

# 高脂饮食和病毒感染损伤血管内膜组织的比较研究

孟红<sup>1</sup>, 王健, 刘菊华, 孙广莲, 李焱, 张家驹, 张卫东

(山东省医学科学院基础医学研究所微生物室, 山东省济南市 250062)

[关键词] 高脂饮食; 巨细胞病毒; 感染; 家兔; 损伤; 内皮, 血管

[摘要] 为了比较病毒感染与高脂饮食造成家兔的血管组织病理变化。将 60 只家兔分为对照组(正常对照组)、灭活病毒组、高脂饮食组、病毒感染组四组, 随后给予相应处理。60 d 后取动物血管组织, 以免疫组织化学方法检测组织内病毒抗原作为病毒感染的证据, 分析高脂饮食与病毒感染损伤血管内膜的光镜和电镜病理学特点。结果发现, 对照组动物血管组织无论光镜或电镜均未见明显异常。高脂组动物光镜下在血管查到脂质沉积, 红细胞粘附; 扫描电镜可见内皮细胞破损, 有红细胞和白细胞粘附于内皮细胞表面; 透射电镜可见动物血管内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞内有脂滴。在病毒组动物, 光镜检查发现血管组织损伤主要为内皮细胞的变性、坏死和脱落, 部分血管腔内有密度较高的呈丝状、颗粒状似“血栓样堆积物”; 扫描电镜发现内皮细胞表面有丝状物粘附; 透射电镜检查发现血管基底膜增宽, 厚度不均, 内皮细胞微突增多, 核呈分叶状, 异染色质积聚, 靠核膜处电子密度增高, 核膜呈皱折状。在一份血管标本的平滑肌细胞浆内查到可疑病毒颗粒; 免疫组织化学法在多组织细胞、尤其是血管内皮细胞查到人巨细胞病毒抗原。实验结果提示, 病毒感染与高脂饮食造成的血管内皮细胞损伤病理改变不同。

[中图分类号] R365.54

[文献标识码] A

## Comparison the Difference of Intima Injurys Induced by Human Cytomegalovirus and Hyperlipemia in Rabbits

MENG Hong, WANG Jian, LIU Ju- Hua, SUN Guang- Lian, LI Yan, ZHANG Jia- Ju, and ZHANG Wei- Dong

(Department of Microbiology, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Medical Sciences of Shandong Province, Jinan 250062, China)

**MeSH** Hyperlipemia; Cytomegalovirus; Infection; Rabbit; Endothelium, Vascular; Injury

**ABSTRACT** **Aim** To compare the difference between human cytomegalovirus (hCMV) - induced and hyperlipemia- induced in rabbits. **Methods** The rabbits were randomly divided into three groups: the control group, the group fed on diet containing high lipid, and the group infected with hCMV AD169 strain. In 60th day the arterial tissue specimens were detected by immunohistochemistry, pathological method and electron microscopy. **Results** The pathological alterations of the arterial intima of the rabbits inoculated with hCMV, were EC swelling, degeneration, necrosis and dropping from intima with adhering fibrin- like materials. Four thrombus- like materials were found in nineteen of arterial specimens. The hCMV antigens were detected in EC and virion- like materials were found in smooth muscle cells. Fibrin- like materials adhering to the surface of ECs were manifested by electron microscopy; The pathological alterations of the arterial intima of the rabbits which fed on diet containing high lipid were atherosclerosis. A large number of red blood cells adhering to the surface of the EC were found by electron microscopy. **Conclusion** There are some differences in the pathological changes of the intimal injury between the hCMV- induced and hyperlipemia- induced of in Rabbits.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生发展, 是极复杂的病理过程, 高血脂、高血压、吸烟、脂质过氧化物等多种因素均可导致 As。自从 Fabricant<sup>[1]</sup>首次发现禽类疱疹科病毒感染可诱发吐绶鸡 As 病变

以后, 流行病学资料已证明人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, hCMV)等感染因子与 As 的发生发展有密切关系<sup>[2~4]</sup>。实验资料也提示动物 CMV 感染的血管组织病变与人类 As 的早期病变相似<sup>[5,6]</sup>。但目前尚未见 hCMV 感染动物血管组织的资料报道。为此, 本文将家兔感染 hCMV AD169 株后, 对其引发的血管组织损伤特点与高脂饮食引起的血管病理学改变进行了比较, 现予报道。

[基金项目] 山东省自然科学基金资助课题: Y96C 16048

[作者简介] 孟红, 副研究员, 病毒学学士, 1982 年毕业于滨州医学院医疗专业。王健, 在读研究生, 免疫学。张家驹, 研究员, 微生物学专业, 硕士, 1981 年毕业于中国预防医学科学院。

## 1 材料和方法

### 1.1 血管损伤兔模型的制备

新西兰兔 60 只, 体重 2.0~2.5 kg, 雌雄各半。随机分为正常对照组(10 只), 以标准饲料喂养; 高脂组(20 只), 以高脂饲料喂养(标准饲料 83%, 胆固醇 2%, 蛋黄粉 5%, 猪油 10%); 病毒感染组(30 只), 耳缘静脉注射 hCMV AD169 株病毒 0.1 mL (TCID<sub>50</sub> 为 108/L, 毒种引自中国预防医学科学院病毒所毒种室, 以人胚肺细胞传代增殖并滴定 TCID<sub>50</sub>, 细胞培养液为含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640), 饲以标准饲料。饲养 60 d 后将上述动物空气栓塞处死, 取血管组织做检查。

### 1.2 各组动物血管组织病理学检查

动物处死后, 迅速剪开胸腔、腹腔, 立即取出胸主动脉血管组织, 在血液凝固前, 以 4% 甲醛固定, 常规脱水、透明、浸蜡, 包埋、切片, HE 染色, 光镜下观察各组动物血管组织病理变化。

### 1.3 超微病理学检查

将腹主动脉用灭菌生理盐水 (pH 7.2~7.4) 灌洗 3 次, 纵向剖开, 将血管内侧向上作为观察面, 切成 1×0.5×0.2 cm<sup>3</sup> 作为扫描电镜标本, 切成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块, 作为透射电镜标本。将二者分别置入 2.5% 戊二醛 4℃ 固定 8 h, 然后用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液冲洗后, 1% 锇酸 4℃ 固定 4 h, 再用梯度乙醇脱水。扫描电镜标本用 CO<sub>2</sub> 干燥器干燥、喷金、粘托, 透射电镜标本用 812 树脂包埋, 超薄切片 (50~80 nm), 然后用醋酸氧铀和枸橼酸铅染色, 观察。

### 1.4 人巨细胞病毒抗原定位检测

人巨细胞病毒抗原定位检测采用免疫组织化学法。将各组动物肝、肾、肺、血管组织做石蜡切片, 经常规脱蜡、脱水, 加抗原修复液 37℃ 30 min, 置入 0.3% 过氧化氢 30 min 去除非特异性过氧化物酶, 然后以正常山羊血清封闭 20 min, 加 hCMV 单克隆抗体 (稀释度为 1:500, 抗体购自中国预防医学科学院病毒所诊断室) 4℃ 孵育过夜, 翌日以 PBS 缓冲液洗片, 加羊抗鼠辣根过氧化物酶-生物素-亲和素-DAB 显色系统 (武汉博士德试剂公司产品) 显色, 显微镜下观察细胞核或浆中出现棕色着色判为阳性。

## 2 结果

### 2.1 动物一般情况

正常对照组、高脂组动物存活好, 感染组动物接种病毒后 25 d 内发病死亡 11 只, 存活 60 d 19 只。

### 2.2 动物血管组织病理学检查

**2.2.1 对照组动物血管组织检查** 正常对照组、灭活病毒组光镜检查未见血管组织病理形态学改变, 管腔内无血凝块形成; 透射电镜检查未见细胞结构异常; 扫描电镜可见内皮细胞 (endothelial cell, EC) 致密, 排列有序, 表面无红细胞或丝状物粘附。

**2.2.2 高脂动物血管组织检查** 光镜检查发现高脂动物血管组织内膜下有点、片状脂质沉积灶, 可见泡沫细胞形成, 红细胞粘附于内膜; 扫描电镜发现 EC 膜局部有破裂, 有胞浆和少量细胞器漏出, 部分 EC 相邻界线消失或被漏出物掩盖, EC 排列稍有紊乱, 有红细胞和白细胞粘附于内膜 (图 1, Fig 1); 透射电镜检查发现血管 EC、平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 和巨噬细胞 (macrophage, MP) 内结构紊乱, 细胞器变性, 胞浆内有脂滴 (图 2, Fig 2)。



图 1 扫描电镜: 内皮细胞表面有红细胞白细胞粘附

Fig 1 Blood cells adhering to the surface of the EC

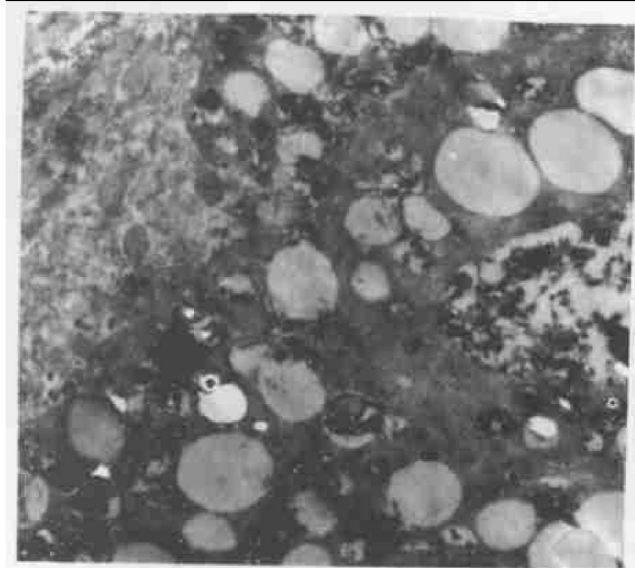


图 2 透射电镜: 平滑肌细胞内有脂滴

Fig 2 Fat drop in SMC

2.2.3 感染组动物血管组织检查 光镜检查发现感染病毒动物血管组织局部 EC 肿胀、变性,甚至坏死脱落(图 3, Fig 3)。在 19 份标本中,4 份血管腔内有密度较高的丝状和颗粒状物形成灶,似“血栓样堆积物”;未见脂质沉积灶。扫描电镜可见部分 EC 表面有丝状物粘附(图 4, Fig 4);透射电镜检查可见局部基底膜增宽,厚度不均,有的 EC 微突增多(图 5, Fig 5),核呈分叶状,染色质积聚,靠核膜处电子密度增高,核膜呈皱折状。在一个 SMC 浆内发现可疑深染颗粒,电镜下该颗粒有一核心和半边包膜,约 100~ 120 nm,疑为疱疹科病毒颗粒(图 6, Fig 6)。

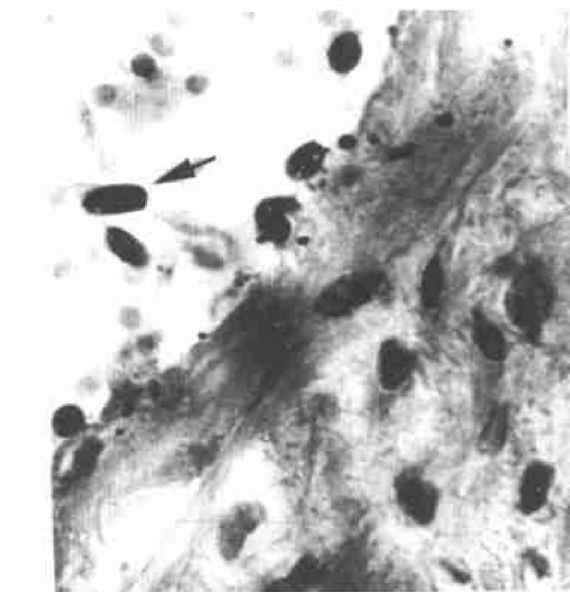


图 3 HE 染色: 内皮细胞变性、坏死、脱落(1 000×3)

Fig 3 The degeneration and necrosis of EC its dropping from intima of arterial (HE. 1 000×3)



图 4 扫描电镜: 内皮细胞表面有丝状物粘附

Fig 4 Fibrin-like materials adhering to the surface of Ecs (Electron microscopy)

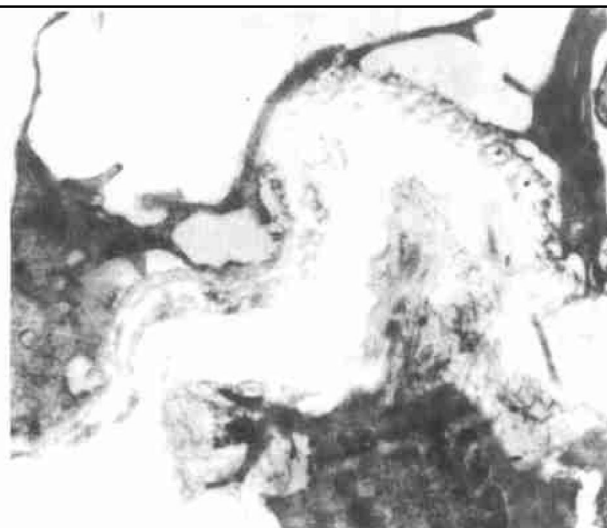


图 5 透射电镜: 内皮细胞微突增多

Fig 5 The increase of micro-spine of EC (Electron microscopy)

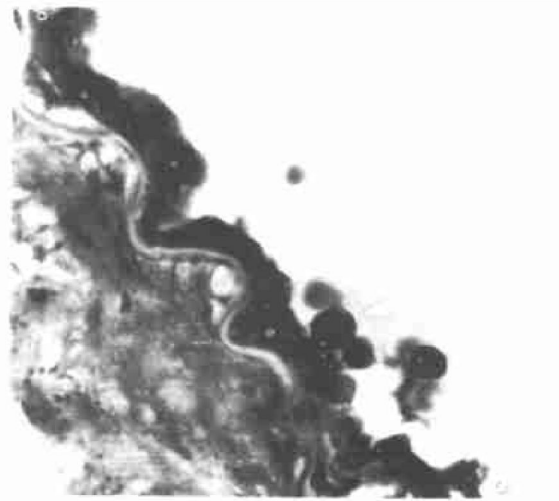


图 6 扫描电镜: 平滑肌细胞浆内发现病毒样颗粒

Fig 6 Virion-like was found in SMC (Electron microscopy)

### 2.3 免疫组织化学检查结果

人巨细胞病毒(hCMV)单克隆抗体免疫组织化学检查表明正常对照组、灭活病毒对照组和高脂组动物组织未查到 hCMV 抗原表达;接种病毒组动物在多组织细胞内(如外周血白细胞、肺小支气管上皮细胞等),尤其在血管内“血栓样形成灶”中单个核白细胞、血管 EC 表面粘附的单个核白细胞(图 7, Fig 7)等,都检测到 hCMV 抗原。

### 3 讨论

将实验动物分别给予高脂饲料和感染病毒,60 d 时高脂组动物血管组织出现动脉脂质沉积灶;感染组动物动脉组织出现内膜炎性病理变化,免疫组织化学法在血管组织查到 hCMV 抗原表达,表明上述两种动物模型的建立是成功的。

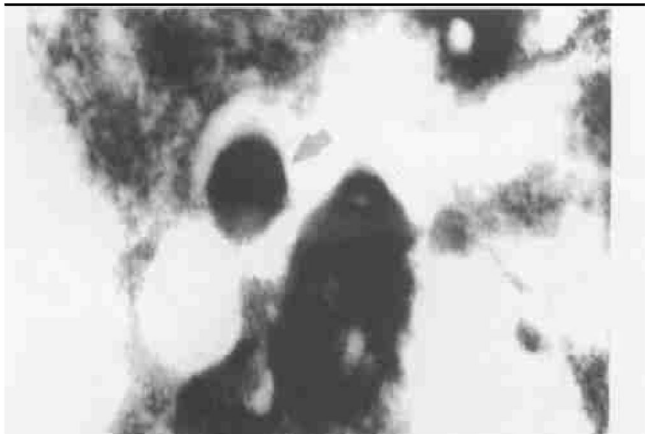


图7 人巨细胞病毒单克隆抗体免疫组织化学染色, 血管内皮、粘附的外周血单个核白细胞着色

Figure 7 Immunohistochemical staining of arterial EC and PMN cell for hCMV antigen

各组动物标本处理条件一致, 光镜检查正常对照组和灭活病毒组动物血管组织内膜光滑, 无纤维素样物粘附于血管内膜, 也未发现“血栓样堆积物”; 扫描电镜检查 EC 排列整齐, 表面光滑, 无粘附物; 透射电镜也未发现 EC 有超微形态学改变。同时, 在制作电镜标本时进行了充分冲洗(生理盐水冲洗 3 次) 因此, 光镜在病毒感染动物发现的“血栓样堆积物”、EC 脱落坏死以及扫描电镜检查发现的 EC 表面的丝状物粘附等现象, 均应与动物接种病毒密切相关。将高脂饮食和感染病毒造成损伤的动物血管组织进行比较, 发现其病理学特点不同, 归纳如表 1 所示。

表 1 高脂饮食与病毒感染动物血管组织病理学特点比较

	高脂组	病毒组
光镜检查	脂质沉积、泡沫细胞形成	EC 肿胀、坏死、脱落, “血栓样堆积物”形成, 无脂质沉积
扫描电镜	红细胞、白细胞粘附于 EC, EC 膜	丝状物粘附于 EC 表面局部破损
透射电镜	EC、SMC、MP 胞浆内有脂滴	EC 微突增多、染色质积聚、核膜呈皱折状, SMC 内发现可疑疱疹科病毒颗粒

从上表可以看出, hCMV 感染组动物的血管组织病理变化与高脂饮食组动物的脂质沉积不同, 病毒感染引起的病理变化主要是 EC 变性、坏死甚至脱落, 表面有丝状物粘附。

正常状态下, EC 表面拥有大量肝素样活性物质, 不断合成前列腺素、内源性舒张因子、蛋白纤溶酶原激活物等, 这些活性物质具有强烈舒张血管及

抗血小板粘附聚集的作用, 随时激活纤溶系统, 排解凝血因素。Jacob 等<sup>[7]</sup>、Key 等<sup>[8]</sup>和 Shibutani 等<sup>[9]</sup>分别以体外试验模拟了病毒感染 EC 代谢和体外血栓形成过程, 发现感染病毒后, 病毒蛋白合成增多, 花生四烯酸代谢障碍, 合成前列腺素能力明显降低, 凝血酶增多, 降低了血栓调节蛋白的表达, 增强了组织因子的活性, 组织因子与微量活化的 (Ⅻ) 因子结合, 激活凝血酶合成途径, 导致凝血酶原合成增加, 凝血-纤溶系统平衡失调, 使血液呈高凝状态; 而且, 本研究发现感染病毒的动物血管组织 EC 的坏死、变性及脱落, 在局部形成粗糙的表面, 成为引发血小板粘附的病理学基础。可见, 本文在图 5 (Figure 5) 所示的 EC 表面丝状粘附物, 不能排除为纤维蛋白粘附的可能。

本研究虽然未发现动物脂质代谢障碍的病理学证据, 但却证明了 hCMV 感染可致血管内皮细胞的损伤, 和凝血-纤溶平衡失调的可能, 与“内皮细胞损伤-反应”学说解释动脉粥样硬化发生的理论相符合。

参考文献

[1] Fabricant CG. Virus- induced cholesterol crystals [J]. *Science*, 1972, 181: 56

[2] Capron L, Wyplosz B. The infection theory in atherosclerosis. Hotel- Dieu, Paris [J]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1998, **91** (5): 21- 26

[3] Biocina B, Husedzinovic I, Sutlic Z, et al. Cytomegalovirus disease as a possible etiologic factor for early atherosclerosis [J]. *Coll Antropol*, 1999, **23** (2): 673- 681

[4] Span AH, Grauls G, Bosman F, et al. CMV infection induces vascular injury in rat [J]. *Atherosclerosis*, 1992, **593** (1): 41- 52

[5] Berencsi K, Endresz V, Klurfeld DTI, et al. Early atherosclerotic plaques in the aorta following cytomegalovirus infection of mice [J]. *Cell Adhes Commun*, 1998, **5** (1): 39- 47

[6] Jacob HS, Visser M, Key N, et al. Herpes virus infection of endothelium: new insights into atherosclerosis [J]. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 1992, **103**: 95- 104

[7] Key NS, Vercellotti GM, Winkelmann JC, et al. Infection of vascular EC with herpes virus enhances tissue factor activity and reduces thrombomodulin expression [J]. *Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 7095- 101

[8] Shibutani T, Yu ZX, Ferrans VJ, et al. Pertussis toxin sensitive G proteins as mediators of the signal transduction pathways activated by CMV infection of SMC [J]. *J Clin Invest*, 1997, **100**: 2 054- 061

(此文 1999- 09- 09 收到, 2000- 05- 10 修回)

(此文编辑 胡必利)