

人巨细胞病毒抑制 SIRT1 表达诱导内皮细胞血管新生的研究

张善超 刘磊 宋兆慧 王瑞金 脱厚珍 易立 郭燕军 谢琰臣 王佳伟 王得新

【摘要】 研究背景 人巨细胞病毒(HCMV)与动脉粥样硬化、移植性血管硬化和动脉再狭窄密切相关。已有研究证实人巨细胞病毒感染可诱发血管新生继而引起血管性疾病。因此,本文拟进一步探讨人巨细胞病毒诱导内皮细胞血管新生的分子学机制。**方法** 分别于感染 HCMV 2、6、12 和 24 h 后收集血管内皮细胞 EA.hy926,实时定量聚合酶链反应和 Western blotting 法检测 SIRT1 mRNA 及其蛋白质表达水平;通过激动剂 Resveratrol 或抑制剂 SIRT1 siRNA 孵育内皮细胞,观察病毒感染 24 h 后其增殖、迁移和小管生成能力。**结果** 与模拟感染组相比,HCMV 感染组 EA.hy926 细胞 SIRT1 mRNA 表达无变化 ($F = 1.395, P = 0.304$);而 SIRT1 蛋白表达水平呈逐渐递减趋势 ($F = 23.927, P = 0.000$)。激动或抑制 SIRT1 蛋白表达后,HCMV 感染组 EA.hy926 细胞迁移 ($P = 0.008, 0.003$) 和成管能力 ($P = 0.012, 0.008$) 下降或增强;而细胞增殖能力无变化 ($P = 0.969, 0.948$)。**结论** HCMV 感染血管内皮细胞后能够促进细胞增殖、迁移和小管生成能力,其作用机制可能与抑制 SIRT1 蛋白表达有关。

【关键词】 巨细胞病毒; 抗衰老酶; 内皮细胞; 动脉硬化; 转染; 细胞增殖; 藜芦; RNA, 小分子干扰

Suppression of SIRT1 in angiogenesis of endothelial cells induced by HCMV infection

ZHANG Shan-chao, LIU Lei, SONG Zhao-hui, WANG Rui-jin, TUO Hou-zhen, YI Li, GUO Yan-jun, XIE Yan-chen, WANG Jia-wei, WANG De-xin

Department of Neurology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: WANG Jia-wei (Email: wangjw2000@yahoo.com.cn)

【Abstract】 **Background** Human cytomegalovirus (HCMV) is closely related to diseases including atherosclerosis, transplanted vascular sclerosis and arterial restenosis. It has been proved that angiogenesis induced by HCMV infection could result in vascular diseases. This article aims to investigate the mechanism of angiogenesis induced by HCMV infection in endothelial cells. **Methods** Endothelial cells (EA.hy926 cells) were divided into HCMV infected group and mock infected group. The cells were collected at 2, 6, 12 and 24 h after infection. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting were used to analyze SIRT1 mRNA and protein levels. Endothelial cells were incubated respectively by Resveratrol and SIRT1 small interference RNA (siRNA) for 2 h before infection. Twenty-four hours after infection, the proliferation, migration and tubule formation of cells were assessed by CCK-8, migration assay and tubule formation assay to detect the angiogenic response of endothelial cells. **Results** Compared to mock infected group, the expression of SIRT1 mRNA in HCMV infected group remained unchanged ($F = 1.395, P = 0.304$), but the expression of SIRT1 protein decreased gradually ($F = 23.927, P = 0.000$). Under the treatment of Resveratrol and SIRT1 siRNA, migration ($P = 0.008, 0.003$) and tubule formation ($P = 0.012, 0.008$) of endothelial cells increased or reduced. The proliferation, however, remained unchanged ($P = 0.969, 0.948$). **Conclusion** HCMV infection promotes proliferation, migration and tubule formation of endothelial cells, and its mechanism may be related to the suppression of SIRT1.

【Key words】 Cytomegalovirus; Sirtuins; Endothelial cells; Arteriosclerosis; Transfection;

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2013.01.009

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81271311);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81041020);北京市自然科学基金资助项目(项目编号:7102040);北京市自然科学基金资助项目(项目编号:7132060);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(项目编号:2011-3-004);北京市出国人员择优基金资助项目

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院神经内科

通讯作者:王佳伟(Email:wangjw2000@yahoo.com.cn)

Cell proliferation; Veratrum nigrum; RNA, small interfering

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81271311, 81041020), Beijing Natural Science Foundation (No. 7102040, 7132060), High-level Technical Training Project Funding of Beijing Health System (No. 2011-3-004) and Project of Beijing for Excellent Abroad Scholars.

动脉粥样硬化是由多基因遗传、环境,以及多种危险因素相互作用所导致的全身性疾病,是脑卒中、心肌梗死、心力衰竭和颅内动脉瘤的独立危险因素^[1]。人巨细胞病毒(HCMV)即人疱疹病毒(HHV)5型,具有严格的种属特异性^[2],人体原发感染后可建立潜伏感染机制,病毒可在T细胞和血管内皮组织中以非复制或缓慢复制的形式隐匿,当机体处于免疫抑制状态时病毒即被激活,从而引起多种疾病^[3]。人巨细胞病毒抗原及其DNA序列存在于动脉粥样硬化病灶组织中,主要见于血管内皮细胞^[4]。因此,感染人巨细胞病毒可能启动动脉粥样硬化形成程序,导致内皮细胞功能失调,促进动脉粥样硬化斑块的形成^[5]。而且血管内皮细胞功能失调是病理性血管新生机制之一,因此人巨细胞病毒感染可能是动脉粥样硬化血管新生的病理因素之一。目前支持这一结论的证据和机制研究较少,笔者拟于基因水平探讨人巨细胞病毒感染与动脉粥样硬化血管新生的相关机制。

材料与方 法

一、实验材料

1. 细胞株来源 血管内皮细胞融合株 EA.hy926 (EA.hy926 细胞) 购自美国典藏中心(ATCC),于体外传代至第20代用于本实验。病毒培养所用人胚胎肺细胞 MRC-5 由北京协和医学院基础研究所提供,于体外传代至第18~30代用于本实验。人巨细胞病毒实验株 AD169(AD169病毒)购自中国典藏中心。

2. 试剂与药品 胎牛血清(FBS)、高糖 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司。转染无血清培养基由美国 Santa Cruz 公司提供。谷氨酰胺、丙酮酸钠、非必需氨基酸(NEAA,甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、脯氨酸、精氨酸、组氨酸、酪氨酸、胱氨酸)和组蛋白乙酰转移酶(HAT)均购自美国 Gicob 公司。青霉素和链霉素液购自美国 Hyclone 公司,使用时按 1:100 比例稀释。DNA 逆转录试剂盒和免疫荧光掺入试剂盒购自美国 Fermentas 公司。双金鸡钠酸(BCA)蛋白定量分析试剂盒由美国

Pierce 公司提供。免疫试剂中 I 抗为兔抗人 SIRT1 单克隆抗体,购自美国 Cell Signaling Technology (CST)公司,羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉菌卵白素多克隆 II 抗由美国 Santa Cruz 公司提供。ECL 发光试剂盒由美国 Millipore 公司提供。曝光胶片购自美国 Kodak 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 由美国 Invitrogen 公司提供。Trizol 液购自美国 Invitrogen 公司。

3. 实验仪器 T550S 型酶标光谱仪购自美国 Bio-Rad 公司。BX530 倒置显微镜为日本 Canon 公司产品。Quantity One 13.0 分析软件由美国 Bio-Rad 公司生产。

二、实验方法

1. 细胞及病毒培养 (1)血管内皮融合细胞培养:于体外传至第20代的EA.hy926细胞置于DMEM培养基(含高糖、体积分数为10%胎牛血清、2%组蛋白乙酰转移酶、1%青霉素和链霉素、1%丙酮酸钠)中孵育2~3d,当细胞密度达70%~80%时进行传代,体积分数为5%二氧化碳、37℃室温条件下继续培养备用。(2)MRC-5细胞培养:MRC-5细胞置于DMEM培养基(含体积分数为10%胎牛血清、1%谷氨酰胺、1%丙酮酸钠、1%非必需氨基酸、1%青霉素和链霉素),体积分数为5%二氧化碳、37℃室温条件下培养3~4d,当细胞密度达70%~80%时进行传代。将AD169病毒以0.10空斑形成单位(PFU)进行扩毒,MRC-5细胞与AD169病毒共培养2h后去上清液,更换含体积分数为2%胎牛血清的DMEM培养基继续培养10~14d,-80℃反复冻融细胞3次,提取病毒,以组织半数感染量(TCID50)法测定病毒滴度。采用以下公式计算病毒颗粒数目:PFU=0.70×TCID50,取平均值。使病毒感染复数(MOI)值达到5。(3)实验分组:分为人巨细胞病毒感染组(HCMV感染组)和模拟感染组(Mock组),后者仅以含体积分数为2%胎牛血清的DMEM培养基孵育处理细胞,不行病毒感染。

2. 实时定量聚合酶链反应检测 SIRT1 mRNA 表达 体积分数为0.05%的胰蛋白酶和乙二胺四乙酸(EDTA)消化EA.hy926细胞,以500×10³/孔细胞密

度铺种于六孔板,高糖 DMEM 培养基孵育过夜,人巨细胞病毒以 MOI 值为 5 感染 EA.hy926 细胞 2 h,去上清,无血清培养基分别孵育 2、6、12 和 24 h,去上清,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞,滴加 1 ml/孔至六孔板,室温静置 5 min,吹打细胞后经 Trizol 法提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,反应条件为 42 °C 60 min,70 °C 5 min。聚合酶链反应(PCR)扩增体系为 12.50 μ l SYBR I Green qPCR Master Mix($\times 2$),上游引物为 0.10 μ mol/L、下游引物为 0.10 μ mol/L、ROX 10 nmol/L、模板 DNA 500 ng,反应体积为 25 μ l;ABI PCR 仪反应条件为 7500 荧光定量,95 °C 15 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s,共 35 个循环。*SIRT1* 基因引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,上游引物序列(forward):GTATTTATGCTCGCCTTGCTG;下游引物序列(reverse):TGACAGAGAGATGGCTGGAAT;内参照物 β -肌动蛋白(β -actin)序列中上游引物序列:AGCACAATGAAGATCAAGATCAT,下游引物序列:ACTCGTCATACTCCTGCTTGC。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据统计。

3. Western blotting 法检测 *SIRT1* 蛋白表达变化 (1)检测方法:AD169 病毒分别感染 EA.hy926 细胞 2、6、12 和 24 h,去上清液,磷酸盐缓冲液冲洗、RIPA 裂解液裂解细胞,BCA 法测定细胞蛋白总量。将蛋白质上样量 20 ng 置质量分数为 5%分离胶中电泳 30 min,质量分数为 10%浓缩胶中电泳 2 h,湿法横流 200 mA 转膜 2 h 至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,质量分数为 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。分别与兔抗人 *SIRT1* 和 β -actin 单克隆 I 抗(1:1000)反应,4 °C 孵育过夜,与辣根过氧化物酶标记的链霉菌卵白素多克隆 II 抗(1:10 000)室温孵育 1 h,TBST 缓冲液冲洗 10 min($\times 3$),ECL 发光液显色 3 min,暗室曝光冲洗胶片。(2)蛋白质鉴定:免疫印迹电泳条带采用 Quantity One 13.0 软件进行分析并计算目的条带和内参条带光密度值(OD 值),以目的条带 OD 值与同样本内参条带 OD 值之比值进行统计学分析。

4. Resveratrol 激动或干扰 RNA 抑制血管内皮细胞 *SIRT1* 基因表达观察对细胞增殖、迁移及成管能力的影响 脂质体转染之前,以体积分数为 0.05%的胰蛋白酶消化细胞,EA.hy926 细胞平铺于六孔板并使其达 30%~40%融合,DMEM 培养基过夜,去上清液,以 1 ml 转染培养基清洗细胞。然后分别滴加激动剂[6 μ l 转染试剂 Lipofectamine 2000、

20 μ mol/L 激动剂 Resveratrol(RSV)或二甲基亚砜(DMSO,阴性对照)]或抑制剂[6 μ l 转染试剂 Lipofectamine 2000、10 μ l 100 nmol/L *SIRT1* siRNA(抑制剂)或阴性对照 scrambled siRNA],室温下反应 15 min;滴加转染培养基至总体积 1 ml,加入六孔板,37 °C 培养箱中孵育 6 h;去上清液,滴加含体积分数为 10%胎牛血清的完全培养基,孵育细胞 24 h;去上清液,磷酸盐缓冲液清洗细胞,然后将 AD169 病毒(MOI 值为 5)或无血清培养基(模拟感染)与 EA.hy926 细胞共孵育,2 h 后更换无血清培养基,继续培养 24 h 分别用于细胞增殖、迁移和成管实验。(1)CCK-8 法检测细胞增殖能力:AD169 病毒(MOI 值为 5)或无血清培养基(模拟感染)感染 2 h 后更换含体积分数为 2%胎牛血清的培养基继续孵育 72 h,每孔添加 10 μ l CCK-8,37 °C、体积分数为 5%二氧化碳培养箱孵育 2 h,于酶标光谱仪 450 nm 处检测细胞 OD 值。(2)细胞迁移实验:AD169 病毒(MOI 值为 5)或无血清培养基模拟感染 EA.hy926 细胞 2 h,采集细胞并计数,调整细胞密度至 $500 \times 10^3/200 \mu$ l 加入到迁移小室上层(8 μ m,美国 Corning 公司),下室加入 600 μ l 含体积分数为 10%胎牛血清的完全培养基,37 °C、体积分数为 5%二氧化碳培养箱中培养 24 h,质量浓度为 0.1%的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色 10 min,磷酸盐缓冲液冲洗 3 次。每小室随机选择 5 个视野于倒置显微镜下计数阳性细胞数目,蓝色标记者代表阳性细胞。(3)成管实验:AD169 病毒(MOI 值为 5)或无血清培养基模拟感染 EA.hy926 细胞 2 h,收集细胞以 $15 \times 10^3/100 \mu$ l 平铺于预先已包裹基质胶(60 μ l)的 96 孔板中,37 °C、体积分数为 5%二氧化碳培养箱孵育 24 h,倒置显微镜下观察血管生成情况,每孔随机选择 5 个视野照相并计数,呈条索状者为新生血管。

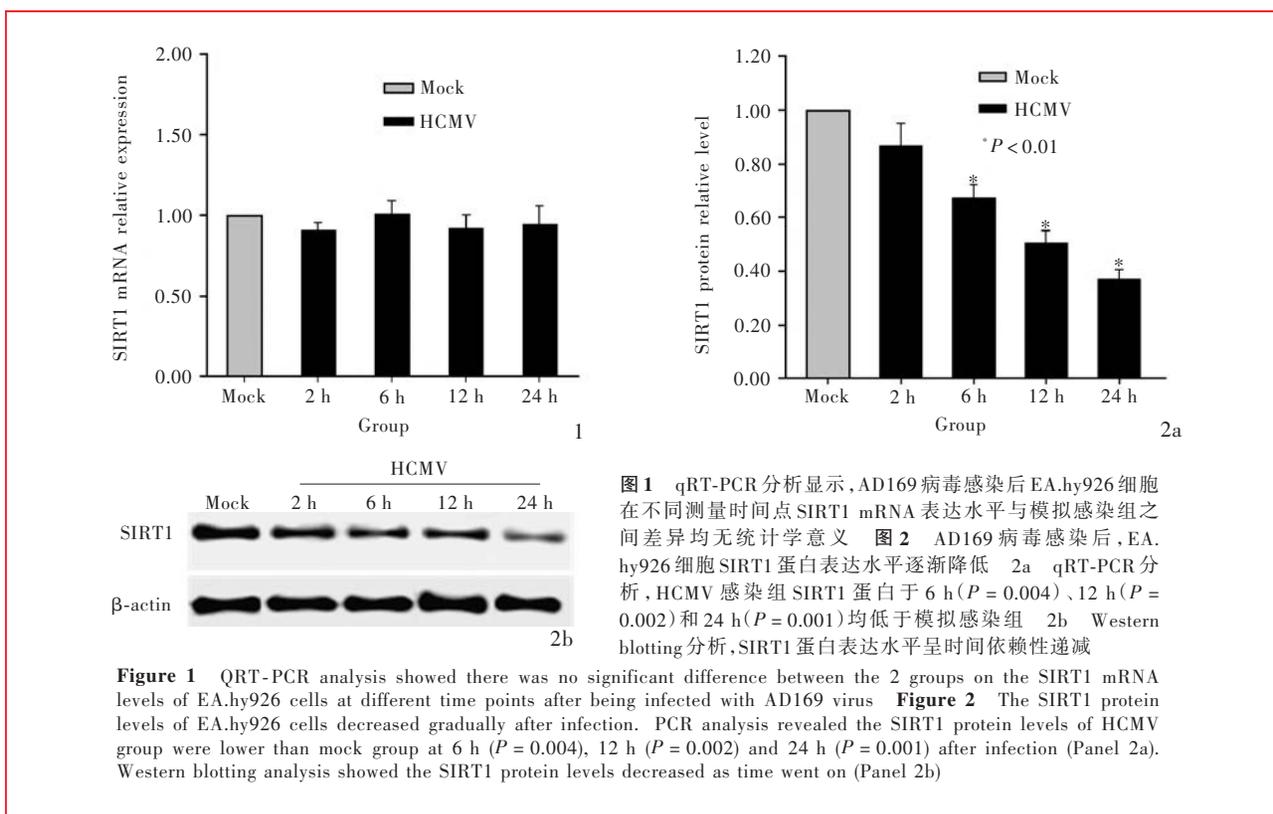
三、统计分析方法

采用 SPSS 14.0 统计软件进行数据计算与分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数间的比较采用单因素方差分析,不同处理组间或测量时间点间的两两比较行 Turkey 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、人巨细胞病毒感染血管内皮细胞后 *SIRT1* mRNA 表达变化

qRT-PCR 分析显示,AD169 病毒感染 24 h 内,



EA.hy926 细胞 SIRT1 mRNA 表达水平无明显变化 ($F = 1.395, P = 0.304$; 图 1)。Western blotting 检测则可见,与模拟感染组相比,AD169 病毒感染 24 h 内, HCMV 感染组 EA.hy926 细胞 SIRT1 蛋白表达水平呈逐渐递减趋势,且不同测量时间点之间差异均有统计学意义 ($F = 23.927, P = 0.000$; 图 2)。

二、SIRT1 蛋白表达变化对血管内皮细胞增殖、迁移、成管能力的影响

细胞迁移和成管实验结果显示,经 Resveratrol 激动后, HCMV 感染组 EA.hy926 细胞迁移 ($P = 0.008$) 和细胞小管生成能力 ($P = 0.012$) 下降,而 siRNA 抑制其表达后,细胞迁移 ($P = 0.003$) 和细胞小管生成能力 ($P = 0.008$) 显著增强;不同处理组之间比较,差异具有统计学意义(迁移实验: $F_{\text{激动剂}} = 67.695, P_{\text{激动剂}} = 0.000; F_{\text{抑制剂}} = 174.810, P_{\text{抑制剂}} = 0.000$; 成管实验: $F_{\text{激动剂}} = 53.518, P_{\text{激动剂}} = 0.000; F_{\text{抑制剂}} = 122.621, P_{\text{抑制剂}} = 0.000$; 图 3, 4)。细胞增殖实验显示, SIRT1 蛋白表达变化对 EA.hy926 细胞增殖能力具有明显影响 ($F_{\text{激动剂}} = 47.574, P_{\text{激动剂}} = 0.000; F_{\text{抑制剂}} = 114.624, P_{\text{抑制剂}} = 0.000$); 但是无论 Resveratrol 的激动作用还是 siRNA 的抑制作用,均对 HCMV 感染组 EA.hy926 细胞增殖能力无影响(均 $P > 0.05$, 图 5)。

讨 论

动脉粥样硬化是由多基因遗传、环境及多种危险因素相互作用所致的全身性疾病,是脑卒中、心肌梗死、心力衰竭及动脉瘤的独立危险因素。在动脉粥样硬化的病理生理过程中,血管重塑占据重要地位,主要包括血管内皮细胞、平滑肌细胞增殖、迁移及细胞外基质(ECM)在细胞外合成、沉淀等病理变化^[6]。最新研究表明,长期、慢性、持续性炎症是形成动脉粥样硬化的重要原因,而人巨细胞病毒感染可能启动动脉粥样硬化的形成^[7]。近年来,大量血清流行病学和分子生物学研究资料表明,人巨细胞病毒抗原及 DNA 序列存在于病灶组织中,并以血管内皮细胞常见^[4]。因此,人巨细胞病毒感染血管内皮细胞可能在动脉粥样硬化血管新生的发生与发展过程中起重要作用。既往研究大多集中于人巨细胞病毒感染、炎性因子及其受体、细胞外基质降解与血管新生间的联系^[8-11],而有关基因水平的研究较少见诸文献报道。

SIRT1 蛋白是一种 NAD⁺ 依赖性脱乙酰酶,参与调控细胞老化、凋亡、细胞周期和炎症反应等生理或病理生理过程^[12],可以抑制高血糖引起的 P53 乙

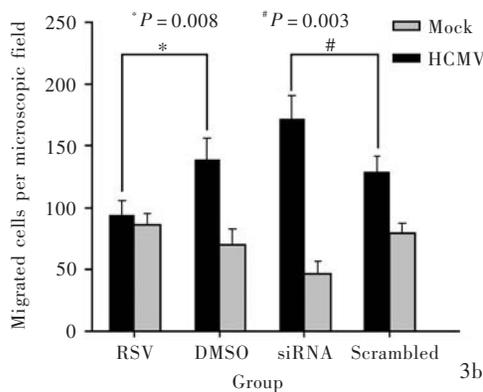
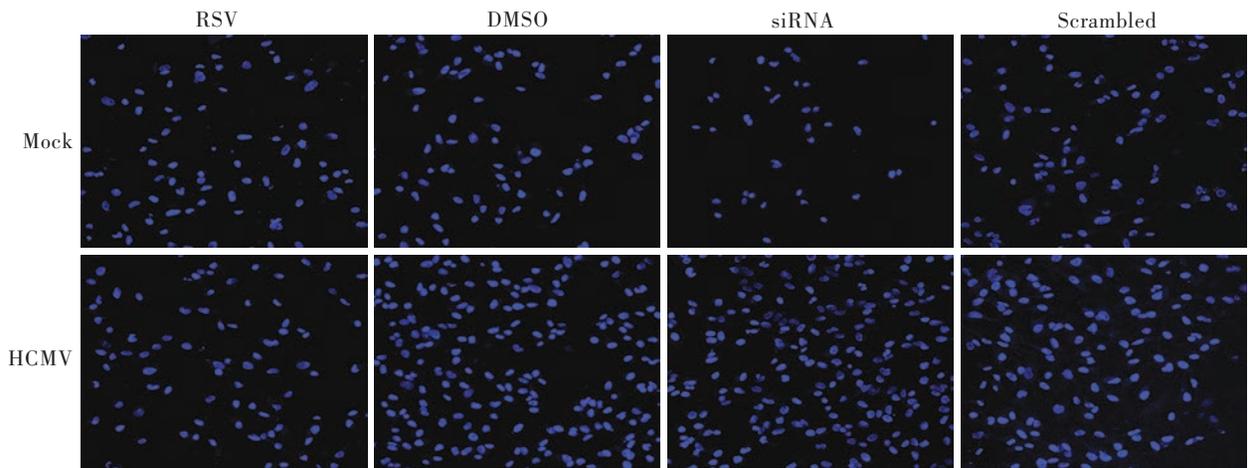


图 3 细胞迁移实验观察 SIRT1 蛋白表达变化对人巨细胞病毒感染后血管内皮细胞迁移能力的影响:以 20 $\mu\text{mol/L}$ Resveratrol 激动 SIRT1 蛋白表达,于 AD169 病毒感染 EA.hy926 细胞 2 h 后其迁移能力下降;经 100 nmol/L siRNA 抑制 SIRT1 蛋白表达,于 AD169 病毒感染 EA.hy926 细胞 2 h 后其迁移能力增强 3a DAPI 染色 中倍放大 3b qRT-PCR 分析

Figure 3 Migration assay showed the effect of SIRT1 on the migration of endothelial cells after HCMV infection. After treatment of Resveratrol (20 $\mu\text{mol/L}$), the migration ability of EA.hy926 cells reduced at 2 h after AD169 virus infection. However, after treatment of SIRT1 siRNA (100 nmol/L), the migration ability of EA.hy926 cells increased at 2 h after AD169 virus infection. DAPI staining medium power magnified (Panel 3a). QRT-PCR analysis (Panel 3b)

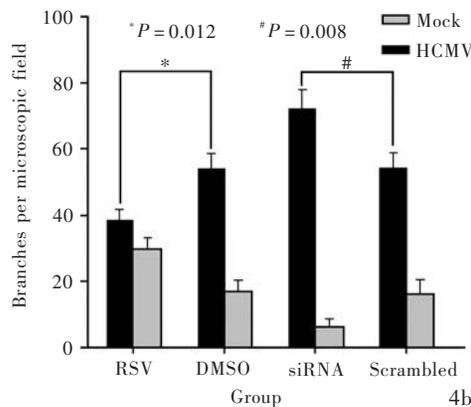
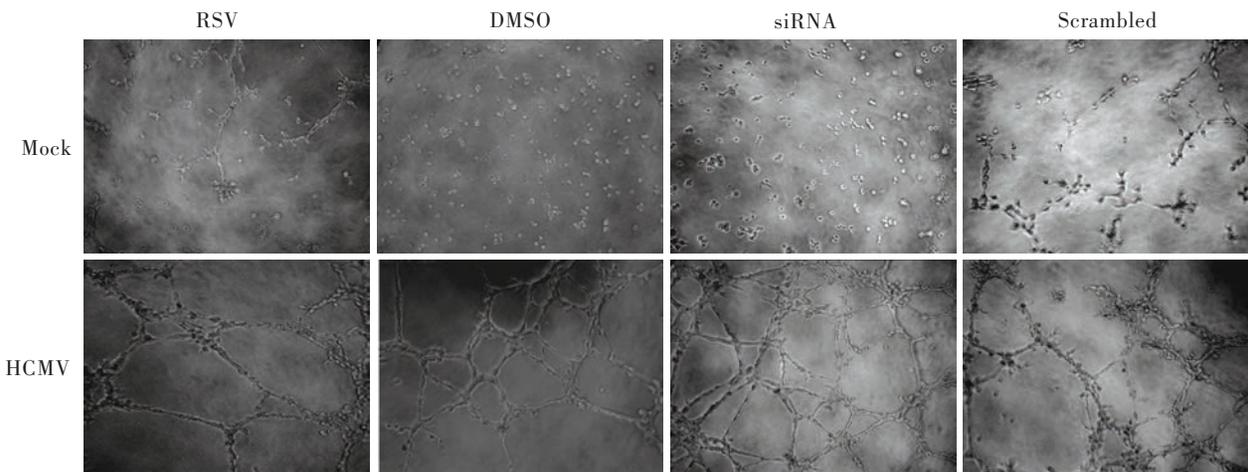


图 4 成管实验观察 SIRT1 蛋白表达变化对人巨细胞病毒感染后血管内皮细胞小管生成能力的影响:以 20 $\mu\text{mol/L}$ Resveratrol 激动 SIRT1 蛋白表达,于 AD169 病毒感染 2 h 后,EA.hy926 细胞小管生成能力下降;以 100 nmol/L siRNA 抑制 SIRT1 蛋白表达,于 AD169 病毒感染 2 h 后,EA.hy926 细胞小管生成能力增强 4a 倒置显微镜观察 低倍放大 4b qRT-PCR 分析

Figure 4 Tubule formation assay revealed the effect of SIRT1 on the tubule formation ability of endothelial cells after HCMV infection. After treatment of Resveratrol (20 $\mu\text{mol/L}$), the tubule formation ability of EA.hy926 cells reduced at 2 h after AD169 virus infection. However, after treatment of SIRT1 siRNA (100 nmol/L), the tubule formation ability of EA.hy926 cells increased at 2 h after AD169 virus infection. Inverted microscopy findings low power magnified (Panel 4a). QRT-PCR analysis (Panel 4b)

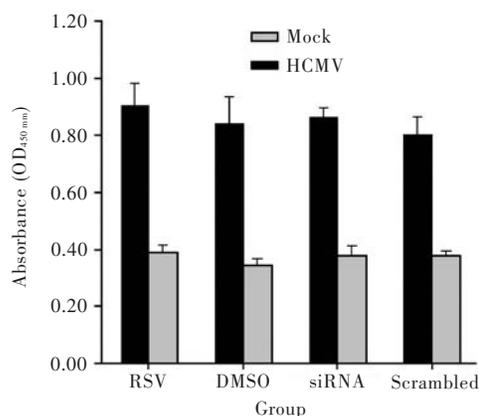


图5 CCK-8法分析SIRT1蛋白表达变化对人巨细胞病毒感染后血管内皮细胞增殖能力的影响:以20 μmol/L Resveratrol激动SIRT1蛋白表达,于AD169病毒感染2 h后,EA.hy926细胞增殖能力无改变($P=0.969$);以100 nmol/L siRNA抑制SIRT1蛋白表达,于AD169病毒感染2 h后,EA.hy926细胞增殖能力无变化($P=0.948$)

Figure 5 The CCK-8 assay showed the effect of SIRT1 on the proliferation ability of endothelial cells after HCMV infection. After treatment of Resveratrol (20 μmol/L), the proliferation ability of EA.hy926 cells had no change at 2 h after AD169 virus infection ($P=0.969$). After treatment of SIRT1 siRNA (100 nmol/L), the proliferation ability of EA.hy926 cells had no change at 2 h after AD169 virus infection ($P=0.948$)

酰化、C-Jun氨基末端激酶(JNK)磷酸化和炎性因子表达,稳定粥样硬化斑块^[13-15]。SIRT1蛋白在血管内皮细胞中呈现高表达,参与对血管内皮细胞功能的调控,生理条件下可促进金属基质蛋白酶-14(MMP-14)表达,分解细胞外基质,同时通过调控转录因子Hex、Fli1和Foxo1,促进血管内皮细胞迁移、形成小管^[16-18]。由此,我们提出假设:SIRT1蛋白可能与人巨细胞病毒感染导致的动脉粥样硬化血管新生有一定联系。为了验证这一假说,我们分别于人巨细胞病毒感染血管内皮细胞2、6、12和24 h后,采用实时定量PCR和Western blotting法检测SIRT1 mRNA及其蛋白质表达变化。结果显示:与模拟感染组相比,人巨细胞病毒感染24 h内SIRT1 mRNA表达水平无明显改变,但蛋白质表达水平呈时间依赖性递减。为了进一步验证SIRT1基因在人巨细胞病毒感染诱导的血管新生中的作用,我们分别通过孵育Resveratrol增强SIRT1蛋白活性或SIRT1 siRNA下调SIRT1基因表达水平,检测血管内皮细胞在感染人巨细胞病毒后其增殖、迁移和成管能力。结果显示:与模拟感染组相比,抑制SIRT1蛋白表达能促进人巨细胞病毒感染诱导的血管内皮

细胞的迁移和成管能力,而对血管内皮细胞增殖能力无明显影响。提示:SIRT1蛋白可抑制人巨细胞病毒感染引起的血管内皮细胞血管新生。此结论与SIRT1蛋白在生理条件下的作用相反,同时也与其他一些研究结论相悖。Xie等^[18]的研究证实,SIRT1可通过下调DLL4/Notch途径和去乙酰化N11C而促进肺癌源性内皮细胞的增殖和迁移。Kim等^[19]指出,SIRT1可促进血管内皮钙黏着蛋白、血小板内皮细胞黏附因子和纤维母细胞生长分子诱导牙髓细胞成管、迁移。另外,对淋巴母细胞白血病、恶性胶质瘤、前列腺癌、结肠癌和皮肤癌的研究亦证实,SIRT1去乙酰化P53、E2F1、Bax、Ku-70等凋亡因子,可促进肿瘤细胞增殖、迁移和肿瘤组织内的血管生成^[20]。我们推测可能与以下4种原因有关:(1)该实验所应用的SIRT1激动剂Resveratrol不直接特异性地作用于SIRT1蛋白,可能通过SIRT1蛋白以外的多个作用靶点影响血管新生。(2)SIRT1蛋白在细胞内的表达水平影响其功能,超量表达SIRT1蛋白可加速细胞老化、促进凋亡,与生理条件下的功能相反^[21]。本实验所用Resveratrol浓度为20 μmol/L,SIRT1 siRNA为100 nmol/L,不能排除此处理条件下SIRT1蛋白表达对其功能的影响。(3)不同实验条件下血管新生机制不同,病毒感染、生理条件和发生肿瘤时SIRT1蛋白之功能及其下游作用因子可能不同。(4)人巨细胞病毒感染所诱导的血管新生存在多重机制,病毒感染的MOI值高低可能会触发不同的路径。

总之,本研究初步探讨了人巨细胞病毒感染诱导血管内皮细胞血管新生的可能机制,提示SIRT1蛋白可能抑制人巨细胞病毒感染诱导的血管内皮细胞血管新生,但实验本身尚存在一定的局限性,尚未就不同处理条件下SIRT1蛋白功能变化及影响其表达水平的上游或下游因素进行研究。因此,人巨细胞病毒感染引起的血管新生的病理生理学机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Pierdomenico SD, Di Nicola M, Esposito AL, Di Mascio R, Ballone E, Lapenna D, Cuccurullo F. Prognostic value of different indices of blood pressure variability in hypertensive patients. *Am J Hypertens*, 2009, 22:842-847.
- [2] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P,

- Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smolter S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y. Heart disease and stroke statistics: 2009 update. A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2009, 119:480-486.
- [3] Li XY, Zhang ZZ, Wang J, Wang YL, Wang CY. Correlation study of human cytomegalovirus infection and atherosclerosis. *Shandong Yi Yao*, 2012, 52:72-74. [李心怡, 张宗泽, 王锦, 王焱林, 王成天. 人巨细胞病毒感染与动脉粥样硬化的相关性研究. *山东医药*, 2012, 52:72-74.]
- [4] Jarvis MA, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5:403-407.
- [5] Yi L, Wang DX, Zhao WQ, Feng ZJ. Expression of human cytomegalovirus immediate early gene in the intracranial artery walls of atherosclerosis. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 2004, 18:66-68. [易立, 王得新, 赵伟琴, 冯子敬. 颅内动脉粥样硬化血管壁中人巨细胞病毒即刻早期基因的表达. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18:66-68.]
- [6] Caposio P, Orloff SL, Streblov DN. The role of cytomegalovirus in angiogenesis. *Virus Res*, 2011, 157:204-211.
- [7] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32:2045-2051.
- [8] Cheeran MC, Hu S, Yager SL, Gekker G, Peterson PK, Lokensgard JR. Cytomegalovirus induces cytokine and chemokine production differentially in microglia and astrocytes: antiviral implications. *J Neurovirol*, 2001, 7:135-147.
- [9] Dengler TJ, Raftery MJ, Werle M, Zimmermann R, Schönrich G. Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin-1beta. *Transplantation*, 2000, 69:1160-1168.
- [10] Dumortier J, Streblov DN, Moses AV, Jacobs JM, Kreklywich CN, Camp D, Smith RD, Orloff SL, Nelson JA. Human cytomegalovirus secretome contains factors that induce angiogenesis and wound healing. *J Virol*, 2008, 82:6524-6535.
- [11] Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzij S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 2010, 116:829-840.
- [12] Wan Z, Yu W, Chen Y, Dai YT. Deacetylase SIRT1 and vascular endothelial function. *Zhonghua Nan Ke Xue Za Zhi*, 2012, 18:831-834. [万赞, 余文, 陈赞, 戴玉田. 去乙酰化酶 SIRT1 与血管内皮功能关系研究进展. *中华男科学杂志*, 2012, 18:831-834.]
- [13] Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17:431-435.
- [14] Stein S, Matter CM. Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis. *Cell Cycle*, 2011, 10:640-647.
- [15] de Kreutzenberg SV, Ceolotto G, Papparella I, Bortoluzzi A, Semplicini A, Dalla Man C, Cobelli C, Fadini GP, Avogaro A. Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms. *Diabetes*, 2010, 59:1006-1015.
- [16] Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, Haendeler J, Mione M, Dejuna E, Alt FW, Zeiher AM, Dimmeler S. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev*, 2007, 21:2644-2658.
- [17] Potente M, Dimmeler S. Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis. *Cell Cycle*, 2008, 7:2117-2122.
- [18] Xie M, Liu M, He CS. SIRT1 regulates endothelial Notch signaling in lung cancer. *PLoS One*, 2012, 7:E45331.
- [19] Kim JJ, Kim SJ, Kim YS, Kim SY, Park SH, Kim EC. The role of SIRT1 on angiogenic and odontogenic potential in human dental pulp cells. *J Endod*, 2012, 38:899-906.
- [20] Liu T, Liu PY, Marshall GM. The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res*, 2009, 69:1702-1705.
- [21] Kawashima T, Inuzuka Y, Okuda J, Kato T, Niizuma S, Tamaki Y, Iwanaga Y, Kawamoto A, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Takemura G, Kita T, Kimura T, Shioi T. Constitutive SIRT1 overexpression impairs mitochondria and reduces cardiac function in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51:1026-1036.

(收稿日期:2012-12-29)

· 小词典 ·

中英文对照名词词汇(五)

培养分泌蛋白-10 culture filtrate protein-10(CFP-10)
 平滑肌肌动蛋白 smooth muscle actin(SMA)
 葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖 glycuronoxylomannan(GXM)
 器质性脑病综合征 organic brain syndrome(OBS)
 桥本脑病 Hashimoto's encephalopathy(HE)
 全面性强直-阵挛发作
 generalized tonic-clonic seizure(GTCS)
 人类白细胞抗原 human leukocyte antigen(HLA)
 人类白细胞抗原组织相容性 DR 抗原
 human leukocyte antigen histocompatibility-DR antigen
 (HLA-DR)
 人类免疫缺陷病毒 human immunodeficiency virus(HIV)
 人类疱疹病毒 human herpes virus(HHV)
 朊蛋白 prion protein(PrP)

朊蛋白病 prion disease(PrD)
 上皮膜抗原 epithelial membrane antigen(EMA)
 神经白塞综合征 neuro-behcet syndrome(NBS)
 神经精神狼疮
 neuropsychiatric systemic lupus erythematosus(NP-SLE)
 神经梅毒 neurosyphilis(NS)
 神经微丝蛋白 neurofilament protein(NF)
 神经元核抗原 neuronal nuclei(NeuN)
 嗜铬素 A chromogranin A(CgA)
 噬血细胞性淋巴组织细胞增生症
 hemophagocytic lymphohistiocytosis(HLH)
 双金鸡纳酸 bicinchoninic acid(BCA)
 水痘-带状疱疹病毒 varicella zoster virus(VZV)