

肾综合征出血热循环内皮细胞及热休克蛋白 70 的检测

荆燕 边鹏飞 赵秀华

【摘要】 目的 检测肾综合征出血热(HFRS)患者循环内皮细胞(CEC)的数量变化及热休克蛋白70(HSP70)表达的动态变化,探讨其在HFRS中的临床意义。**方法** HFRS患者34例,其中轻症组20例,重症组14例,另以20例健康者作对照。每例均按病期采血,采用Percoll密度梯度离心法分离内皮细胞后,应用流式细胞技术检测CEC数量及HSP70的表达,并同期检测肾功能。**结果** 在不同病期的HFRS患者中,CEC计数及HSP70的表达在发热期均已升高,在低血压期和少尿期持续高水平,至恢复期逐渐降低,其变化曲线与血尿素氮(BUN)的变化趋势相似。**结论** HFRS患者急性期CEC数量和CEC中HSP70表达均增高,其增高程度与病期和临床类型有关,且与肾损害有相关性;动态检测HFRS患者CEC及HSP70水平,可作为HFRS病情的重要观察指标,同时也可作为HFRS发病机制及防治研究提供线索。

【关键词】 肾综合征出血热;循环内皮细胞;热休克蛋白70

Detection and clinical significance of circulation endothelial cells and heat-shock protein 70 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome JING Yan, BIAN Peng-fei, ZHAO Xiu-hua. Jinan Infectious Diseases Hospital, Teaching Hospital of Shandong University, Jinan 250021, China

Corresponding author: ZHAO Xiu-hua, Email: xiuhuazhao1971@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the dynamic changes of circulation endothelial cells (CEC) number and the expression of heat-shock protein70 (HSP70) in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and its clinical significance. **Methods** Thirty-four HFRS patients were assigned to moderate group (20 cases) and severe group (14 cases) according to their illness condition, and 20 healthy volunteers served as the controls. After the CEC were separated by using Percoll density gradient centrifugation method, the CEC counts and the HSP70 level were determined with flow cytometry to observe the changes of CEC counts and HSP70 in patients with HFRS, and blood urea nitrogen (BUN) were tested by automatic biochemical

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.01.006

基金项目:济南市卫生局立项课题(2008-29)

作者单位:250021 济南,济南市传染病医院

通讯作者:赵秀华, Email:xiuhuazhao1971@126.com

analyzer simultaneously. **Results** In patients with different stages of HFRS, the counts of CEC and the expression of HSP70 of patients with HFRS began to increase in the fever stage and maintain a high level in the hypotension and oliguria stage, and then decreased gradually in recovery phase, the changes curve of which was similar to that of BUN. **Conclusions** The CEC counts and the expression of HSP70 in CEC both increase in the acute stage in patients with HFRS and the increase extent are related with the stage and clinical type of HFRS and also related with renal injury; furthermore, continuous measurement of these indexes could be an important method to disease observation and could provide a clue to the research of pathogenesis, prevention and cure of HFRS.

【Key words】 Hemorrhage fever with renal syndrome; Circular endothelial cells; Heat-shock protein 70

肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)是由汉坦病毒(hantavirus, HV)引起的以发热、出血、低血压休克和肾功能衰竭为主要临床表现的急性传染病。其发病机制至今尚未完全阐明。研究证实人血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)是HV感染的原始靶细胞,内皮细胞通透性的改变是决定HFRS严重程度最重要的因素^[1]。HV感染可直接导致全身毛细血管及小血管广泛损伤^[2],而机体受到病毒感染时,可出现自身保护性应激反应,选择性上调作为分子伴侣的热休克蛋白70(heat-shock protein 70, HSP70)的表达,对感染的细胞具有明显保护作用。循环内皮细胞(circulation endothelial cells, CEC)是生理或病理情况下从循环中获得的脱落血管内皮细胞^[3],是目前惟一能够在活体持续检测到的直接反映活体毛细血管损伤程度的特异性指标。因此,本研究观察了患者CEC、HSP70的动态变化及其与肾损害的相关性,旨在了解其临床意义,现将结果报道如下。

资料和方法

一、研究对象

病例来源于2008年1月至2009年12月在济南市传染病医院住院的HFRS患者,共34例,其中男性25例,女性9例,平均年龄(40.32 ± 18.20)岁。所有患者血清HFRS特异性IgM抗体均阳性,诊断符合我国卫生部2008年颁布的流行性出血热防治方案中的临床诊断与分型标准。其中,轻型8例,中型12例,重型11例,危重型3例;为便于比较,将轻型与中型合并为轻症组,重型与危重型合并为重症组。因低血压期持续短暂,故与少尿期合并统计。20例健康查体者为对照组,其中男性15例,女性5例,平均年龄为(37.71 ± 26.35)岁。两组间的年龄、性别均具有可比性。

二、内皮细胞计数

在TruCOUNT管中加APC-CD31小鼠抗人单克隆抗体及充分混匀的抗凝全

血,避光孵育后在 TruCOUNT 管中加溶血素,室温下避光孵育 15 min 后用流式细胞仪进行检测。内皮细胞的数量根据以下公式计算:

$$\text{细胞}(/\mu\text{l}) = \frac{\text{获取细胞数} \times \text{Beads 总量}}{\text{Beads 获取数} \times \text{样本量}}$$

三、HSP 70 检测

采用 Percoll 密度梯度离心法分离出目的细胞,用大量 Hanks 液清洗离心;在收获的细胞悬液内加抗-APC-CD31 避光孵育后用鞘液清洗、离心,APC-小鼠 IgG1 作为阴性对照;弃上清液,在细胞悬液中加入固定破膜剂,避光反应后用鞘液清洗、离心;弃上清液,在细胞悬液内加 FITC-HSP70,避光反应后用鞘液清洗、离心, FITC-小鼠 IgG1 作为阴性对照;在 Becton Dickinson FACScans 上检测收获的细胞悬液,根据前向散射光(forward scatter light, FSC)及侧向散射光(crossrange stray light, SSC)将目的细胞 CEC 与血小板及细胞碎片分开,每例标本收集 10 000 个细胞;根据阴性对照设定门,检测目的细胞群内 CD31、HSP70 双阳性细胞的百分比。血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)用德灵 RXL 全自动生化仪检测。

四、统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。组间比较采用 Dunnett *t* 检验及方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、不同病期循环内皮细胞、HSP70、BUN 的变化

HFRS 患者 HSP70 的表达在发热期即明显升高,随病情加重,HSP70 的表达逐渐增加;至恢复期,HSP70 的表达又逐渐减低,各组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。各病期(恢复期除外)HSP70 的表达水平显著高于对照组($P < 0.05$),说明 HV 感染可诱导 CEC 高表达 HSP70。CEC 计数以发热期升高最为明显,在低血压休克期或少尿期仍维持较高水平。至恢复期,CEC 数量明显减少,但仍明显高于健康对照组($P < 0.05$)。除发热期与低血压少尿期外,其余各病期之间,CEC 计数差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。BUN 于发热期亦轻度升高,但与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。至低血压少尿期才明显升高,两组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。多尿期以后逐渐下降,其变化趋势与 CEC 大体一致,见表 1。

表 1 HFRS 患者不同病期 CEC、HSP70 及 BUN 的变化($\bar{x} \pm s$)

临床分期	例数	循环内皮细胞(/ μl)	HSP70(%)	BUN (mmol/L)
发热期	34	43.53 \pm 19.83 ^b	51.32 \pm 10.68 ^b	8.52 \pm 5.38
低血压少尿期	26	39.87 \pm 18.12 ^b	56.94 \pm 7.11 ^{bc}	26.60 \pm 11.42 ^{bd}
多尿期	34	20.15 \pm 9.62 ^{bd}	30.63 \pm 6.84 ^{bd}	10.02 \pm 5.86 ^a
恢复期	34	6.09 \pm 5.19 ^{ad}	26.50 \pm 6.30 ^d	6.36 \pm 4.01

注:^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs 对照组[CEC:(3.31 \pm 1.49)/ μl ,HSP70:(23.86 \pm 4.70)%,BUN:(5.83 \pm 3.52)mmol/L];^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ vs 发热期

二、不同临床分型循环内皮细胞、HSP70 表达的变化

从不同病型来看, HSP70 表达于发热期始显著升高, 至低血压休克期达高峰, 轻症组于多尿期逐渐回降, 而重症组直到恢复期才见回落, 轻、重两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。而且除恢复期外, 两组的 HSP70 表达均显著高于对照组($P < 0.05$)。两组间 CEC 计数亦有类似的变化, 在各病期均有显著性差异($P < 0.05$); 与对照组相比, 除轻症组恢复期外, 各组 CEC 计数均显著升高($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 HFRS 患者不同临床分型 CEC、HSP70 表达的变化($\bar{x} \pm s$)

临床分期	CEC(/ μ l)		HSP70(%)	
	轻症组	重症组	轻症组	重症组
发热期	26.83 \pm 4.69 ^a	62.30 \pm 6.49 ^{ad}	47.49 \pm 6.83 ^b	62.99 \pm 11.31 ^{bd}
低血压少尿期	23.34 \pm 9.51 ^a	40.82 \pm 18.30 ^{ac}	52.65 \pm 6.97 ^b	63.21 \pm 7.09 ^{bc}
多尿期	16.22 \pm 5.07 ^a	25.99 \pm 7.53 ^{ad}	29.21 \pm 5.48	37.35 \pm 6.92 ^{ac}
恢复期	5.33 \pm 4.48	8.19 \pm 5.03 ^a	27.75 \pm 6.03	30.11 \pm 6.81

注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组[CEC:(3.31 \pm 1.49)/ μ l, HSP70:(23.86 \pm 4.70)%]; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 轻症组。其中, 轻症组与重症组患者例数分别为 20 例和 14 例

讨 论

1983 年, Kurata 等^[4]利用免疫荧光法检测到乳鼠毛细血管内皮细胞内有 HV 抗原的存在, 提出 HV 感染的靶细胞可能是内皮细胞。叶苓等^[5]也发现 HV 具有上皮组织或血管内皮细胞易感的特点。但 HV 对内皮细胞的损伤机制至今尚未明确。既往 HFRS 的研究多限于动物实验或体外内皮细胞培养, 但动物实验毕竟不同于机体对病毒的反应, 体外培养的细胞亦不同于人体内环境中的细胞。既往研究在体内皮细胞多取材于尸检或手术中留取的血管段, 取材困难且反映的问题片面。本实验应用流式细胞技术检测 CEC, 取材方便、特异性和回收率高^[6], 并能反复检测, 对机体损伤小且快速精确, 是进行基础与临床研究的新途径。本研究结果显示, HFRS 患者 CEC 数量较对照组明显升高, 不同病期 CEC 计数呈动态变化, 且与病情发展及恢复明显相关。由此可见, HV 感染小血管及毛细血管的内皮细胞后, 内皮细胞在致炎因子、病毒感染及自身抗体等的作用下被激活, 过度或长时间激活后出现功能障碍, 进而出现脱落、凋亡, 最终引起内皮细胞完整性的不可逆损伤, 致使内皮细胞与血细胞间的黏附能力下降, 外周血 CEC 增多。CEC 在发热期及低血压休克期升高最显著, 说明病程早期即出现明显的内皮细胞损伤, 使得血管通透性升高, 至低血压休克期无明显好转, 大量血浆继续外渗, 引起血液浓缩, 最终导致低血压休克。Lee 等^[7]通过观察 CEC 升高的急性冠脉综合征(ACS)患者, 提出 CEC 能独立预测 ACS 的心血管事件; 本研究结果发现 CEC 在不同临床类型的 HFRS 患者计数不同, 以重型或危重型升高最明显, 轻型患者的 CEC 数量最低, 各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此认为 CEC 可用于血

管损伤性疾病的预后判断^[8],进一步证实了 CEC 的数量变化可反映血管损伤的程度,CEC 是直接反映活体毛细血管损伤程度的灵敏指标。

近年来研究发现,在某些应激因素下,细胞自身会启动内源性保护机制,诱导 HSP 家族中不同成员的表达^[9,10]。目前认为,HSP70 家族在生物细胞中含量最高,诱导性最强,具有多种生物学功能:HSP70 的表达可能提供一种能够包裹自身和外来抗原的新的免疫物质,并可阻断信号通路,抑制应激诱导的蛋白激酶 38 和 JNK(junn-terminal kinase)激活,从而避免或减少细胞凋亡^[11];HSP70 是主要的伴侣蛋白之一^[12,13],能够促进新生多肽链的正确折叠,协助新生蛋白质的合成和修复损伤的蛋白质,维持蛋白质合理构象;辅助分子重排、蛋白质解聚和新生多肽的跨膜转运,激活某些酶的作用以保护细胞的生成和功能^[14]。余璐等^[15]发现 HV 可诱导体外培养的人脐静脉内皮细胞高表达 HSP70。HFRS 患者的内皮细胞能否高度表达 HSP70 目前鲜见报道。本研究检测了 34 例 HFRS 患者 CEC 中 HSP70 阳性细胞的比率。结果发现 HFRS 组 HSP70 的表达水平显著高于对照组($P < 0.05$),且与疾病的临床类型密切相关,各型间差异均有统计学意义($P < 0.05$);在不同病期也具有类似的变化趋势,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时,本研究还发现在低血压休克期,HSP70 表达明显升高($P < 0.05$ vs 发热期),但 CEC 数量无升高($P > 0.05$ vs 发热期)。这可能是人体感染 HV 后保护性应激反应上调,HSP70 表达升高,增强了血管内皮细胞对损害性刺激的耐受程度,保护了血管内皮细胞的完整性和功能,内皮细胞脱落减少。另一方面,HSP70 具有很强的肽结合能力并参与抗原提呈的多个环节^[16],可协助抗原提呈细胞将抗原提呈给 T 细胞而参与细胞免疫,HSP70 还可抑制 IL-1、肿瘤坏死因子(TNF)等炎症介质的表达^[17],这可能对持续发挥其细胞保护作用十分重要。

BUN 水平是诊断重型出血热的重要指标之一,本实验结果发现 CEC 计数及 HSP70 表达的变化曲线与 BUN 变化趋势相似。BUN 在发热期升高不明显($P > 0.05$ vs 对照组),至低血压少尿期才明显升高,而 CEC 计数及 HSP70 的表达在发热期即显著升高($P < 0.01$ vs 对照组),明显先于 BUN 水平升高,而且升高的幅度与临床类型和病期密切相关。在病程早期检测 CEC 及 HSP70 有助于临床医生正确预测病情,及早给予干预治疗,可能会阻止或减少重型病例的发生,提高治愈率。因此,CEC 及 HSP70 可作为 HFRS 早期诊断、早期预测病情轻重的可靠指标。

参 考 文 献

- 1 陈骊珠,宫雪,王斯. 汉坦病毒所致肾综合征出血热发病机制的研究进展. 日本医学介绍,2007,28(6):284-286.
- 2 Geimonen E, Lamonica R, Springer K, et al. Hantavirus pulmonary syndrome-associated hantaviruses contain conserved and functional ITAM signaling elements. J Virol,2003,77(2):1638-1643.
- 3 Woywodt A, Bahlmann FH, De-Groot K, et al. Circulatin endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. Nephrol Dial Transplant,2002,1(10):1728-1730.
- 4 Kurata T, Tsai TF, Bauer SP, et al. Immunofluorescence studies of disseminated Hantaan virus infection of sucklingmice. Infect

- Immun,1983,41(1):391-398.
- 5 叶苓,杨守京,刘彦仿. 流行性出血热尸检组织中 HSP70 mRNA 的定位及分布. 中国病毒学, 1998,13(4):327-331.
 - 6 李宏伟,王春玲,修瑞娟. 人循环内皮细胞的分离和鉴定. 基础医学和临床,2006,26(6):640-643.
 - 7 Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, et al. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. Blood,2005,105(2):526-532.
 - 8 盖中涛,张景遥,李婕. 肾综合征出血热患者外周血循环内皮细胞的检测及临床意义. 中华传染病杂志,2008,26(1):33-35.
 - 9 Ohgitani E, Kobayashi K, Takeshita K, et al. Biphasic translocation of a 70 KDa heat shock protein in human cytomegalovirus-infected cells. J Gen Virol, 1999, 80(3): 63-68.
 - 10 赵君,杨守京,刘彦仿,等. 实验性汉坦病毒感染乳鼠诱导脑神经细胞表达热休克蛋白 70. 细胞与分子免疫学杂志, 2000,16(3): 232-233.
 - 11 Didelot C, Schmitt E, Brunet M, et al. Heat shock pro-teins: endogenous modulators of apoptotic cell death. Handb Exp Pharmacol,2006(172):171-198.
 - 12 van Eden W, van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T -cell regulation of chronic inflammation. Nat Rev Immunol,2005,5(4):318-320.
 - 13 Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. Cell,2006,125(3):443-451.
 - 14 Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection. Cardiovasc Res,2001,51(4):637-646.
 - 15 余璐,马恒,刘彦仿. 汉坦病毒诱导人脐静脉内皮细胞 HSP70 的表达及意义. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21(1):9-12.
 - 16 Kumaraguru U, Gouffon CA, Ivey RA, et al. Antigenic peptides complexed to phylogenically diverse Hsp70s induce differential immune responses. Cell Stress Chaperones,2003,8(2):134-143.
 - 17 Muhhof G. Heat shock proteins in immunity. Handb Exp Pharmacol,2006,(172):279-304.

(收稿日期:2010-09-29)

(本文编辑:孙荣华)

荆燕,边鹏飞,赵秀华. 肾综合征出血热循环内皮细胞及热休克蛋白 70 的检测[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2011,5(1):36-41.