

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00750

登革病毒感染对人血管内皮细胞血管细胞黏附分子-1 表达的影响

肖 瑞¹, 江振友^{2*}, 张 倩³

- 1. 广州医学院临床技能实验中心, 广州 510182
- 2. 暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室, 广州 510632
- 3. 安徽省芜湖市疾病预防控制中心, 芜湖 241000

[摘要] 目的: 研究登革病毒 2 型(DV₂)体外感染对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)表达血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)的影响。方法: 原代分离、纯化、培养人 HUVEC 细胞, 用生长良好的 2~3 代细胞进行实验。分别用病毒感染复数(MOI)为 1、2、4、8、16 的 DV₂ 病毒液感染 HUVEC, 阴性对照组直接以 RPMI 1640 培养, 应用细胞计数试剂-8(CCK-8)法测定 DV₂ 感染前和感染后 6、12、24、48、72 和 96 h 的细胞活性。另以 MOI=2 的 DV₂ 病毒液感染细胞, 阴性对照组直接以 RPMI 1640 培养, 于感染后 6、12、24、48、72、96 h 分别收集病毒感染的 HUVEC, 采用流式细胞术测定细胞表面 VCAM-1 表达水平; 采用 RT-PCR 法检测细胞中 VCAM-1 mRNA 转录水平。结果: 当病毒 MOI=2 时对细胞活力的影响与对照组相比差异无统计学意义。DV₂ 感染可以促进 HUVECs 中 VCAM-1 mRNA 的转录, 96 h 内均有增加, 与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。其中, 正常状态下 HUVEC 基本无 VCAM-1 mRNA 转录, 感染 12 h 达到最高峰, 12~48 h 表达量显著高于其他时间($P < 0.05$)。DV₂ 感染 HUVEC 后, VCAM-1 蛋白表达在 12~72 h 显著升高($P < 0.05$), 与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: DV₂ 感染上调 HUVEC 的 VCAM-1 mRNA 转录和蛋白表达。这可能是 DV₂ 感染诱发患者血管通透性升高和血浆渗漏的重要分子机制之一。

[关键词] 登革病毒; 人脐静脉内皮细胞; 血管细胞黏附分子-1

[中图分类号] R 373.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0750-06

Effect of Dengue virus infection on expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human vascular endothelial cells

XIAO Rui¹, JIANG Zhen-you^{2*}, ZHANG Qian³

- 1. Clinical Skill Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China
- 2. Department of Microbiology and Immunology, Medical College of Ji'nan University, Guangzhou 510632
- 3. Wuhu Center for Disease Control and Prevention of Anhui Province, Wuhu 241000

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of Dengue virus 2 (DV₂) on the expression and secretion of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods:** HUVECs were primarily isolated, purified and cultured. Cells of 2-3 generations were infected with DV₂ with different MOI values (1, 2, 4, 8 and 16). HUVECs cultured with RPMI1640 medium were taken as negative control. The viability of HUVECs was assessed by CCK-8 assay before and at different time points after DV₂ infection (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h). Flow cytometry was used to detect the VCAM-1 expression in HUVECs. The expression of cytoplasmic VCAM-1 mRNA was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** When the MOI value was 2, DV₂ had no significant influence on cell viability compared with the control group. DV₂ infection significantly promoted the transcription of VCAM-1 mRNA compared with the control group ($P < 0.05$). The expression of VCAM-1 mRNA peaked at 12 h after infection and remained at a higher level within 96 h ($P < 0.05$). The expression at 12-48 h after infection was significantly higher than that at other time points ($P < 0.05$). HUVECs hardly had VCAM-1 mRNA expression under normal condition. The expression of VCAM-1 protein was significantly increased at 12-72 h after infection compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** DV₂ can increase the expression of VCAM-1 mRNA in HUVECs, which might be one of the important mechanisms for elevated vascular permeability and plasma leakage after DV₂ infection.

[KEY WORDS] dengue virus; human umbilical vein endothelial cells; vascular cell adhesion molecule-1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 750-755]

[收稿日期] 2007-11-28 **[接受日期]** 2007-12-17

[基金项目] 广东省医学科研基金(A2005340). Supported by Medical Research Foundation of Guangdong Province, China(A2005340).

[作者简介] 肖 瑞, 硕士生. E-mail: xiaorui-arrui@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 020-85220257, E-mail: tizhy@jnu.edu.cn

登革病毒(DV)通常引起登革热(dengue fever, DF),严重者可发展为登革出血热(dengue haemorrhagic fever, DHF)以及登革休克综合征(dengue shock syndrome, DSS)。其中 DHF/DSS 最明显的标志是血浆渗漏和全身出血,血浆渗漏通常是毛细血管通透性升高造成的^[1],提示血管的功能病变在 DHF/DSS 的发生发展中起重要作用。

研究表明某些病原微生物感染可使血管内皮细胞过度表达分泌一些黏附分子,参与炎症因子和炎症细胞的聚集、渗出和炎症反应的发生^[2]。临床研究发现^[3]患者血清中高水平的血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)与 DHF 的发生以及疾病的严重程度密切相关。但是关于 DV 直接感染对血管内皮细胞表面黏附分子 VCAM-1 表达的影响及在血液渗漏和出血中的作用还不完全清楚。因此,体外研究 DV 诱导黏附分子 VCAM-1 表达变化,对进一步完善 DHF/DSS 的血浆渗漏和出血的发病机制具有重要的意义。

本研究以人脐静脉内皮细胞(HUVECs)为研究对象,探讨登革病毒 2 型(DV₂)在与 HUVECs 相互作用过程中黏附分子表达的变化并探讨变化产生的环节,为深入阐明 DV 感染的血管内皮细胞功能改变在 DHF/DSS 的发病机制中的作用提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 DV₂ 标准株(New Guinea C 株,NGC 株)为本教研室冻存,采用微量病毒空斑法滴定,病毒的滴度为 2×10^{10} pfu/L。白蚊伊蚊(C6/36)细胞株为本教研室长期传代和冻存。新生小牛血清购于杭州四季青生物公司。RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶和 HEPES 均为 Gibco 公司产品。细胞计数试剂-8(CCK-8)为日本同仁化学研究所产品。TRIzol 购自上海申能博采公司。RT-PCR 试剂盒为上海申能博采公司产品。VCAM-1 和 β -actin 引物由北京赛百盛公司合成。新生儿脐带由暨南大学第一附属医院妇产科提供。SABC 免疫组化染色试剂盒为武汉博士德公司产品。鼠抗 DV₂IgG 免疫血清为本教研室制备。FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为 Sigma 公司产品。VCAM-1 荧光抗体试剂盒(FITC 标记)购自美国 BD 公司。

1.2 HUVECs 的分离与培养 取新生儿脐带约 20 cm,0.125%胰酶:0.01%EDTA 消化液灌注消化法,从 HUVECs 细胞中分离出血管内皮细胞。离心沉淀后加入 20%FCS 培养液(20%FCS、RPMI 1640

培养液、HEPES 5 mg/ml、L-谷氨酰胺 30 μ g/ml、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μ g/ml),接种于 25 cm²培养瓶中,37℃体积分数为 5%CO₂箱内培养。培养 3~4 d 后,待细胞贴壁生长至 80%~90%融合状态,消化传代。选择生长良好的 2、3 代细胞进行实验。ABC 酶标法检测胞质中 VIII 因子相关抗原^[4]。

1.3 DV₂对 HUVECs 的感染性 将 HUVECs 混悬的培养液(4×10^4 /ml)分别加入 6 块 96 孔板上,24 h 后每块板上均分 2 组,即对照组和 DV₂组,DV₂感染复数(MOI)分别设置为 1、2、4、8、16,每组接种 12 孔,2 h 后吸出培养液,加 4%FCS 的 RPMI 1640 培养液每孔 130 μ l,阴性对照孔中加入 RPMI 1640 培养液。分别培养 6、12、24、48、72 和 96 h。取出其中一块 96 孔板,吸出培养液,加无 FCS 的 RPMI 1640 培养液 100 μ l,并于实验各孔分别加入 CCK-8 试剂 10 μ l,37℃继续孵育 1 h,选择 450 nm 波长,并以 655 nm 波长作参照,在酶联免疫检测仪上测定光密度(D)值。

1.4 VCAM-1 mRNA 表达的 RT-PCR 检测

HUVECs 接种于 25 cm²的培养瓶中,24~48 h 后待细胞铺满后,DV₂组以浓度为 MOI=2 的 DV₂病毒液接种细胞,对照组以含 4%FCS 的 RPMI 1640 培养液代替病毒液,2 h 后,DV₂组 PBS 洗 2 次去除未吸附病毒,然后两组均加入新的 4%FCS 的 RPMI 1640 液 4 ml。对照组和 DV₂组孵育相应时间后,用 0.125%胰酶:0.01%EDTA 液消化,室温,200×g 离心 5 min,收集细胞,RNA 提取方法按照 Gibco 试剂盒说明书中的操作步骤进行。提取的 RNA 沉淀用 20 μ l DEPC 处理过的水溶解,并用紫外分光光度计测定 D_{260}/D_{280} 进行总 RNA 纯度及含量计算。实验重复 3 次,每次做复管。逆转录和 PCR 操作步骤参照试剂盒说明书进行。VCAM-1 上游引物为 5'-CTG AGA GTG TCA AAG AAG GAG-3',下游引物为 5'-TGG CAG GTA TTA TTA AGG AGG-3'。扩增片段长度为 278 bp。同时设置 β -actin 为内参照,其上游引物为 5'-ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA-3',下游引物为 5'-ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG -3',其扩增片段长度为 114 bp。PCR 反应体系为: Taq 酶 0.4 μ l,dNTP 0.4 μ l,目的基因上下游引物各 1 μ l,内参 β -actin 上下游引物各 1 μ l,PCR Buffer 2 μ l, H₂O 12.2 μ l。混匀。VCAM-1 与 β -actin 反应条件为:95℃预变性 5 min;94℃ 40 s,62℃ 40 s,72℃ 60 s,30 个循环;72℃ 5 min。PCR 产物于 2%琼脂糖凝胶上电泳,并用 Marker 作比较,判断 PCR 产物片段大小,同时将

VCAM-1 不同时相的条带与相应内参照带的 D 值作比较。

1.5 流式细胞术检测细胞表面 VCAM-1 蛋白分子 细胞长至 80% 融合后分组,对照组:4% FCS 的 RPMI 1640 培养基培养。感染组:MOI=2 的 DV₂ 病毒液感染,吸附 2 h 后更换新鲜完全培养液,分别于感染后 6、12、24、48、72、96 h 收集细胞。(1)将各组细胞分别用 0.125% 胰酶+0.01% EDTA 消化 2~3 min,消化、收集 HUVECs,计数。(2)用含 4% FCS 的 RPMI 1640 将消化下来的细胞制成细胞悬液,200×g 离心 8~10 min。(3)用磷酸盐缓冲液+0.1% 叠氮钠离心洗涤 1 次。重悬细胞并计数,调整细胞密度为 5×10⁶~1×10⁷/ml。(4)取 40 μl 细胞悬液预加入 50 μl 工作浓度的羊抗鼠荧光(双标:PE 标记 VCAM-1)标记物,充分振摇,4℃ 30 min。(5)洗涤液 (DPBS) 洗涤 2 次,每次加液 2 ml 左右,200×g,离心 5 min。(6)加 1 ml 固定液,流式细胞仪检测,计数 10 000 个细胞,黏附分子的表达量用平均荧光强度(MFI)表示。每组检测 3 份标本。

1.6 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用方差分析进行统计学检验各因素的作用效果,进一步应用独立样本 t 检验比较不同组别相同时段目的基因表达水平的差异性,应用单因素方差分析比较 DV₂ 组不同时段时效变化的差异性。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVECs 分离和鉴定 所分离的 HUVEC 在相差倒置显微镜下细胞为单层细鹅卵石样排列,排列紧密,胞质丰富。ABC 酶标法结果显示细胞质中阳性棕黄色颗粒弥散分布(图 1)。证明所分离的为血管内皮细胞。间接免疫荧光法 (IFA) 可检测到 DV₂ 蛋白在细胞质内呈现片状或颗粒状黄绿色荧光(图 2)。通过不同感染时间观察,发现黄绿色荧光的强度变化与时间有一定的关系,结果显示:感染后 12 h,开始出现荧光阳性的细胞,胞质及胞膜呈现微弱荧光(+),DV₂ 特异性抗原在 HUVECs 的胞质内呈灶性分布,24 h 后荧光强度增强,48 h 胞质内荧光达到最大强度。结果提示 12~96 h 均显示出病毒对 HUVECs 的有效感染。

2.2 DV₂ 对 HUVECs 活性的影响 应用 CCK-8 所测得的 5 组不同浓度 DV₂ 组和对照组细胞在 6~96 h 不同时相的活性结果如图 3 所示,当 DV₂ 的 MOI=1、2、4 时, D_{450} 值与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$);而 DV₂ 的 MOI=8、16 时, D_{450} 值呈下

降趋势,且与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此实验选择与对照组 HUVECs 活性最接近的 MOI=2 作为感染 DV₂ 的实验浓度。

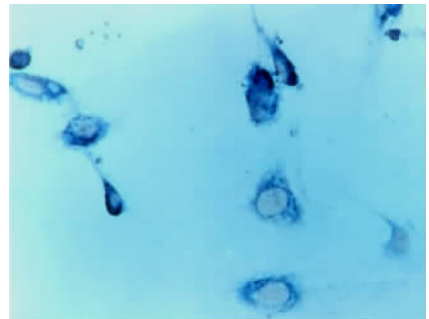


图 1 人脐静脉内皮细胞中 VIII 因子表达的免疫组化 ABC 法染色检测

Fig 1 Detection of Factor VIII expression in HUVECs by immunohistochemical(ABC) staining
Original magnification: ×400

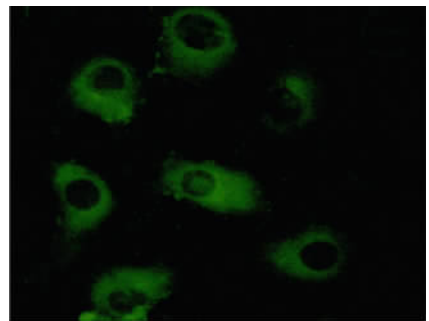


图 2 DV₂ 感染人脐静脉内皮细胞后 48 h DV₂ 特异性抗原的 IFA 染色检测

Fig 2 Detection of DV₂ specific antigen in HUVECs infected with DV₂ for 48 h by IFA staining
Original magnification: ×400

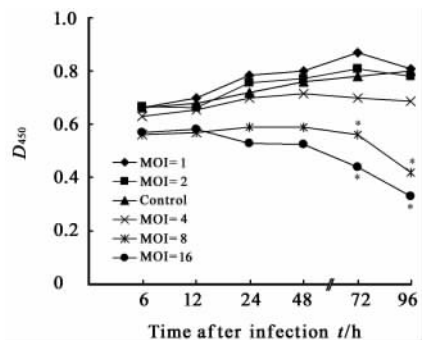


图 3 DV₂ 对 HUVECs 的活性影响

图 3 Effects of DV₂ on HUVECs viability
* $P < 0.05$ vs control group

2.3 DV₂ 对 HUVECs 的 VCAM-1 mRNA 转录的影响 应用图像分析处理系统进行灰度扫描并进行

扫描面积积分, 比较 DV₂ 组和对照组 RT-PCR 扩增的 VCAM-1/ β -actin 目的 DNA 片段灰度比值(图 4, 表 1)。析因分析结果: 因素 $F_{\text{组别}} = 655.08, P < 0.01$; 因素 $F_{\text{时间}} = 9\,299.6, P < 0.01$ 。提示不同处理方法及不同观察时间的差异有统计学意义。单因

素方差分析 DV₂ 组不同时相间也有差别 ($P < 0.05$)。其中表达在 12 h 达到高峰, 之后的 24、48 h VCAM-1 的表达维持在较高水平, 且 12、24 和 48 h 与其他各组均存在差别 ($P < 0.05$), DV₂ 组与对照组各相应时间之间差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。

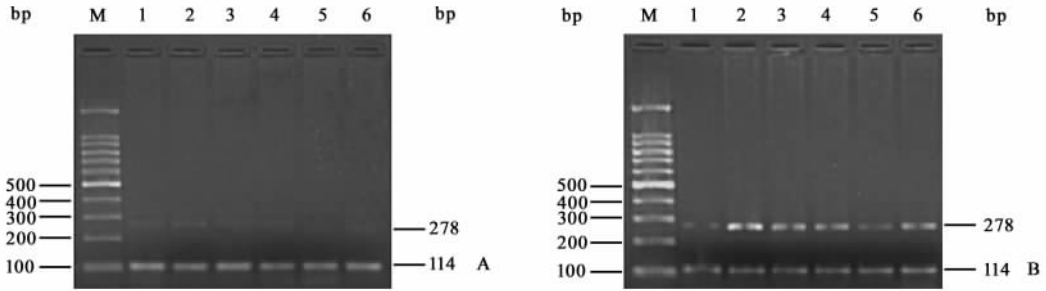


图 4 扩增的目的基因 VCAM-1 mRNA/ β -actin mRNA PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products of VCAM-1 mRNA/ β -actin mRNA

A: Normal condition; B: DV₂ induced. M: Marker; 1-6: VCAM-1 and β -actin mRNA expression at 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h after infection, respectively

表 1 DV₂ 诱导的 HUVECs 表达 VCAM-1 mRNA/ β -actin mRNA 的变化

Tab 1 Changes of VCAM-1 mRNA/ β -actin mRNA expression level in HUVECs induced by DV₂

($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Group	Time after infection <i>t</i> /h					
	6	12	24	48	72	96
Control	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.033	0.004 ± 0.018	0.004 ± 0.008	0.004 ± 0.008	0.003 ± 0.059
DV ₂	0.651 ± 0.017*	4.274 ± 0.211* Δ	3.403 ± 0.087* Δ	1.984 ± 0.103* Δ	0.845 ± 0.057*	1.007 ± 0.101*

* $P < 0.05$ vs control group of same time points; $\Delta P < 0.05$ vs results of 6, 72, and 96 h in DV₂ group

2.4 流式细胞术测定 DV₂ 感染对 HUVECs 表达 VCAM-1 蛋白的影响 DV₂ 组和对照组的 VCAM-1 蛋白表达的双因素方差分析: 因素 $F_{\text{组别}} = 116.097, P < 0.01$; 因素 $F_{\text{时间}} = 549.213, P < 0.01$, 可以认为, DV₂ 组与对照组之间表达的 VCAM-1 蛋白不等或不全相等。DV₂ 组不同时段的 VCAM-1 蛋白表达也不同或不全等。VCAM-1 蛋白的表达 DV₂ 组明显高于对照组, 提示 DV₂ 作用可以影响内皮细胞表达 VCAM-1, 且这种改变有一定时效性。

单因素方差分析表明: DV₂ 组实验各个时间段表达有差异性。DV₂ 感染后 12 h 开始增加, 在 24 h 达到最高峰, 随后逐渐下降, 感染的 24~48 h 一直维持较高表达 ($P > 0.05$), 96 h 恢复到感染前水平(表 2)。正常对照组内皮细胞平均荧光强度为 0.28 ± 0.02 。DV₂ 刺激后平均荧光强度为 0.54 ± 0.04 , 明显高于正常对照组 ($P < 0.05$)。这些变化与该分子转录水平的变化基本一致。具体结果见图 5。

表 2 DV₂ 诱导的人脐静脉内皮细胞 VCAM-1 蛋白水平的变化

Tab 2 Changes of VCAM-1 protein expression in HUVECs induced by DV₂

($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Group	Time after infection <i>t</i> /h					
	6	12	24	48	72	96
Control	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02
DV ₂	0.27 ± 0.02	0.64 ± 0.02*	0.93 ± 0.03* Δ	0.69 ± 0.05*	0.39 ± 0.03*	0.30 ± 0.02

* $P < 0.05$ vs control group of same time points; $\Delta P < 0.05$ vs results of different time points in DV₂ group

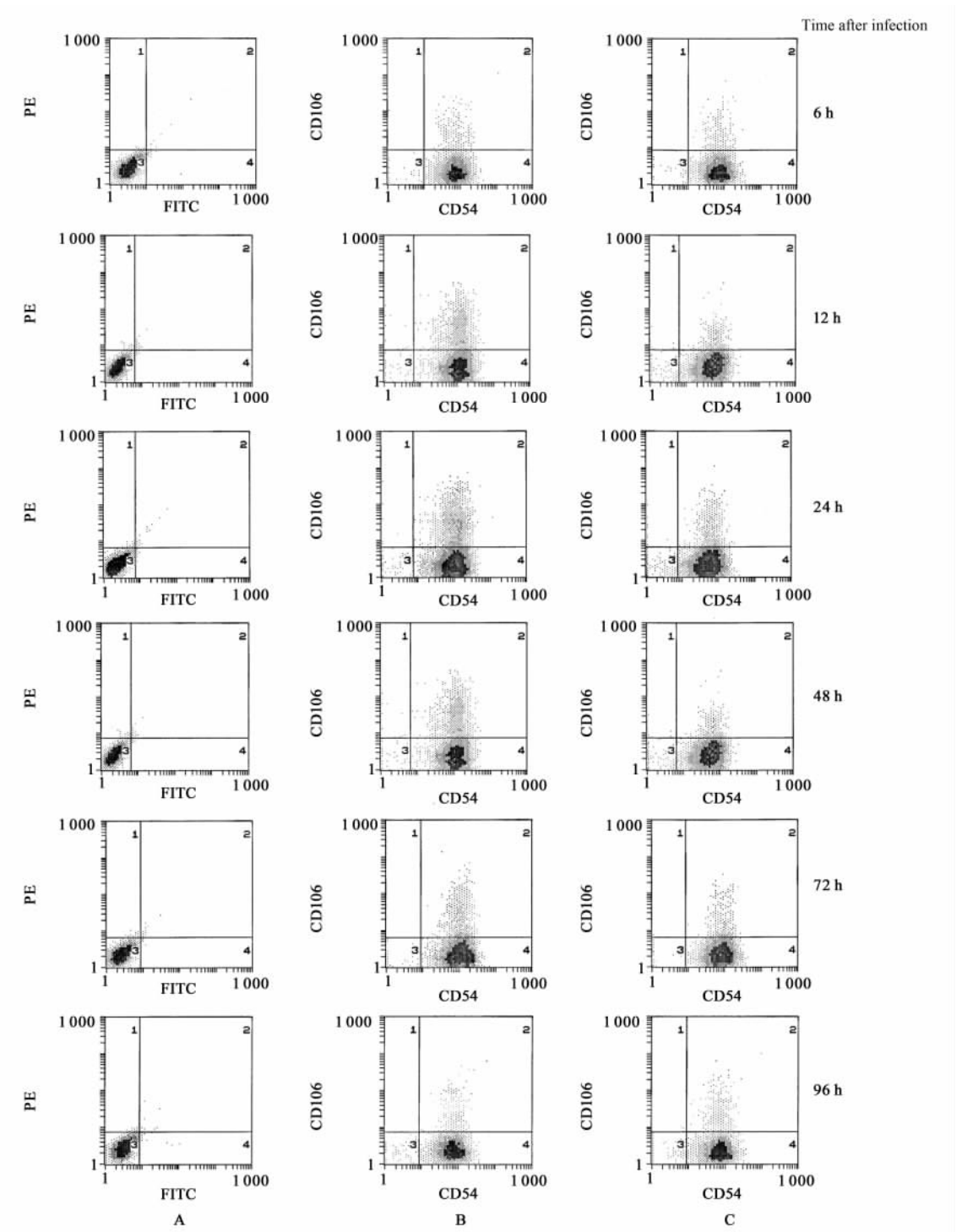


图 5 不同时间点人脐静脉内皮细胞表达 ICAM-1/VCAM-1 流式细胞仪双染检测结果

Fig 5 ICAM-1/VCAM-1 double staining results at different time points in HUVECs by flow cytometry

A: Blank control group; B: DV₂ group; C: Negative control group

3 讨论

据 WHO 估计,全球约 2/5 的人口不同程度受到 DV₂ 病毒的威胁,每年至少有 5 千万至 1 亿人受到感染^[5]。可见 DV 感染已是严重的公共卫生问题^[6]。DHF/DSS 主要临床表现为血浆的渗漏和出

血,当出现血容量减少性休克时^[7-8],如不及时治疗可危及生命。而许多研究证实^[9-10],DV 可以通过直接和间接途径诱导 VECs 的活化、炎症和免疫损伤、甚至凋亡,表明血管内皮细胞结构和功能的改变是 DHF/DSS 的发病过程中一个极其重要的病理生理因素。但是 DV 对血管内皮细胞表达黏附分子的影响

却未见报道。我们的研究以 HUVECs 为 DV₂ 感染靶细胞,研究 DV 感染 HUVECs 对其黏附分子表达的影响,为进一步阐明黏附分子在 DV 作用的血管功能损伤中可能的作用提供实验支持和理论依据。

本研究首先应用 CCK-8 检测 DV 对 HUVECs 毒性和增殖进行分析,其灵敏度和精密度远高于 MTT 法。结果选择与对照组 HUVECs 活性最接近而且与对照组之间差异无显著性的病毒滴度 MOI=2 作为感染 HUVECs 的实验浓度。

我们应用流式细胞术检测了不同时间点 VCAM-1 的表达状况。结果显示:与对照组比,DV₂ 感染可以显著增强 VCAM-1 在细胞膜表面的表达,其中阳性细胞数变化不明显,但相对平均荧光强度显著增加。而且,DV₂ 对 VCAM-1 表达的影响表现出明显的时效性,即在感染的 12 h 表达开始上升,24 h 达高峰,之后的 48、72 h 逐步开始下降,96 h 恢复到感染前水平。但在整个实验时间内感染组与对照组之间差异均有显著性。

为探讨黏附分子 VCAM-1 蛋白产生这种变化的分子环节,我们进一步应用 RT-PCR 检测 DV₂ 感染对血管内皮细胞黏附分子 VCAM-1 mRNA 表达的时效变化,希望从转录水平阐述对蛋白的影响。结果发现 DV₂ 的感染可显著增加 HUVECs 的 VCAM-1 mRNA 表达,12 h 达到峰值,随后这种效应渐减弱,这种变化同样显示了一定时效性。与感染组相比,整个实验时间正常对照组均未发现有 VCAM-1 mRNA 的表达。已知 VCAM-1 在静息状态下没有表达,只有当受到一定的刺激才会有表达或增加表达^[11],提示 DV₂ 感染可激活血管内皮 VCAM-1 的转录,进而增加 VCAM-1 蛋白的表达,VCAM-1 转录水平的变化与蛋白表达变化基本一致。

总之,我们的研究已经显示,DV₂ 感染血管内皮细胞后,血管内皮细胞被活化,表现为其表面的黏附分子 VCAM-1 表达的量在蛋白和转录水平发生相应的变化。已知活化的血管内皮细胞可以促进 VCAM-1 表达和释放,从而在周围血液中可以检测到升高的 VCAM-1 等细胞黏附分子的可溶形式——可溶性细胞黏附分子,可溶性细胞黏附分子升高是血管内皮细胞损害或激活的标志^[12]。由于 VCAM-1 可以表达于激活内皮细胞、树突状细胞及神经细胞和肾的上皮细胞,因此我们的研究结果还可以部分解释临床上的发现:DHF-DSS 患者血浆中有 sVCAM-1 水平升高,与疾病严重程度及感染时间相关,与 DHF 血管的渗漏有关^[13]。VCAM-1 的升高引起血管内皮细胞对白细胞黏附功能的改变,

并表现出有一定的时效性。因为血管内皮细胞是血管的主要组成部分,我们推测:DV₂ 作用后,血管内皮表达黏附分子这一改变,将加重血管局部内环境的紊乱,造成血管内白细胞、淋巴细胞的黏附增加,增加的免疫细胞又可以释放多种炎症介质,造成血管局部炎症介质的大量聚集,共同诱发局部炎症反应,破坏血管的稳态。而血管的急性炎症引起血管损伤,通透性增加。所有这些必将对 DHF/DSS 患者血管渗漏及 DHF/DSS 病情的发生发展起到一定的促进作用。

[参考文献]

- [1] Guzmán M, Kouri G, Diaz M, Llop A, Vazquez S, González D, et al. Dengue, one of the great emerging health challenges of the 21st century[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3: 511-520.
- [2] Villar-Centeno L A, Diaz-Quijano F A, Martínez-Vega R A. Biochemical alterations as markers of dengue hemorrhagic fever [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 78: 370-374.
- [3] Koraka P, Murgue B, Deparis X, Van Gorp E C, Setiati T E, Osterhaus A D, et al. Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity[J]. *J Med Virol*, 2004, 72: 445-450.
- [4] 李琴山,冯赞杰,刘 洋,徐海燕,钱民章.一种改进的人脐静脉内皮细胞的培养方法[J]. *第四军医大学学报*, 2007, 27: 276-278.
- [5] Vijayakumar T S, Chandy S, Sathish N, Abraham M, Abraham P, Sridharan G. Is dengue emerging as a major public health problem[J]? *Indian J Med Res*, 2005, 121: 100-107.
- [6] Gubler D J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social, and economic problem in the 21st century [J]. *Trends Microbiol*, 2002, 10: 100-103.
- [7] Shivbalan S, Anandnathan K, Balasubramanian S, Datta M, Amalraj E. Predictors of spontaneous bleeding in Dengue[J]. *Indian J Pediatr*, 2004, 71: 33-36.
- [8] Setlik R F, Ouellette D, Morgan J, McAllister C K, Dorsey D, Agan B K, et al. Pulmonary hemorrhage syndrome associated with an autochthonous case of dengue hemorrhagic fever[J]. *South Med J*, 2004, 97: 688-691.
- [9] Huang Y H, Lei H Y, Liu H S, Lin Y S, Liu C C, Yeh T M. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 63: 71-75.
- [10] Burgos G S, Pando R H, Campbell I L, Castaneda J R, Ramos C. Cytokine production in brain of mice experimentally infected with dengue virus[J]. *Neuroreport*, 2004, 15: 37-42.
- [11] Pigott R, Dillon L P, Hemingway I H, Gearing A J. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187: 584-589.
- [12] Boldt J, Kumle B, Papsdorf M, Hempelmann G. Are circulating adhesion molecule specifically changed in cardiac surgical patient[J]? *Ann Thorac Surg*, 1998, 65: 608-614.
- [13] Murgue B, Cassar O, Deparis X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections[J]. *J Med Virol*, 2001, 65: 97-104.