

汉滩病毒感染诱导血管 内皮细胞多糖包被损伤及其机制初步研究

杜 虹, 王晓艳, 李 璟, 姜 泓, 申焕君, 王平忠

[摘要] **目的** 探讨汉滩病毒(hantaan virus, HTNV)感染血管内皮细胞致多糖包被(glycocalyx, GCX)损伤的分子机制。**方法** 利用 HTNV 感染人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs), 在感染不同时间段, ELISA 检测细胞上清中 GCX 组分(硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、透明质酸、可溶性 CD138 和磷酸酰肌醇聚糖), 实时定量 PCR 和 Western blot 检测蛋白聚糖中核心蛋白(CD138、磷酸酰肌醇聚糖和 CD44)及相关分解酶(乙酰肝素酶、中性粒细胞弹性蛋白酶和透明质酸酶)的表达, 间接免疫荧光检测糖蛋白的分布情况, 跨内皮电阻检测细胞通透性变化。**结果** HTNV 感染 HUVECs 后, 随着感染时间的延长, 释放至细胞上清液中的粘多糖成分(硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、透明质酸)逐渐增多。与其相连的核心蛋白在细胞中表达亦逐渐增多, 其中 CD138 和磷酸酰肌醇聚糖 mRNA 的表达水平上升, 在 48 h 和 72 h 分别上调 3.68 倍和 2.47 倍(P 均 <0.05), 蛋白表达水平也出现上升。免疫荧光检测结果显示 HTNV 感染后细胞上糖蛋白表达减少。同时, 乙酰肝素酶和中性粒细胞弹性蛋白酶 mRNA 表达水平出现上升, 在 48 h 和 24 h 分别上调 2.23 倍和 2.76 倍(P 均 <0.05)。跨内皮电阻检测结果显示, 弹性蛋白酶抑制剂($1\ \mu\text{M}$)预处理后跨内皮电阻值上升。**结论** HTNV 感染可能引起血管内皮细胞 GCX 损伤, 通过上调或活化某些脱落酶, 酶解 GCX, 致屏障结构破坏和通透性增加, 为阐明 HTNV 感染致血管内皮损伤的分子机制提供了重要资料。

[关键词] 汉滩病毒; 人脐静脉血管内皮细胞; 多糖包被; 通透性

[中国图书资料分类号] R512.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2021)01-0039-06

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2021.01.007

Glycocalyx injury in vascular endothelial cells induced by hantaan virus infection and its preliminary mechanism

DU Hong, WANG Xiao-yan, LI Jing, JIANG Hong, SHEN Huan-jun, WANG Ping-zhong*

Infection Department, the Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710038, China

DU Hong and WANG Xiao-yan are the first authors who contributed equally to the article

*Corresponding author, E-mail: wangpz63@126.com

[Abstract] **Objective** To investigate the molecular mechanism of glycocalyx (GCX) injury in vascular endothelial cells due to hantaan virus (HTNV) infection. **Methods** Human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) were infected by HTNV. At different time points of HTNV infection, ELISA was used to detect the GCX components (heparan sulfate, chondroitin sulfate, haluronic acid, sCD138 and glypican) in the cellular supernatant. Real-time quantitative PCR and Western blot assay were used to detect the expression of core proteins (CD138, glypican and CD44) in the proteoglycan and their related decomposition enzymes (heparanase, neutrophil elastase and hyaluronidase). Immunofluorescence assay was used to detect the distribution of the glycoproteins. Transendothelial electrical resistance (TEER) was used to detect the change of cellular permeability. **Results** With the duration of HTNV infection in vascular endothelial cells, mucopolysaccharide components (heparan sulfate, chondroitin sulfate and haluronic acid) released into the cellular supernatant gradually increased, and the expression of the associated core proteins in cells also gradually increased. Among them, the expression levels of CD138 and glypican mRNA increased, with 3.68 times at 48 h and 2.47 times at 72 h ($P < 0.05$), respectively, and the protein expression levels also increased. Immunofluorescence detection showed that the expression of glycoprotein on cells after HTNV infection decreased. At the same time, the expression levels of heparanase and neutrophil elastase mRNA increased, with 2.23 times at 48 h and 2.76 times at 24 h ($P < 0.05$), respectively. TEER results showed that the TEER value increased after pretreatment with elastase inhibitor ($1\ \mu\text{M}$). **Conclusions** GCX injury in vascular endothelial cells may be caused by HTNV infection, by up-regulating or activating certain shedding enzymes, GCX is enzymolyzed, the barrier structure is destroyed and the permeability increases, which provides a key theoretical basis for elucidating the molecular mechanism of vascular endothelial damage by HTNV infection.

[Key words] HTNV; HUVEC; glycocalyx; permeability

汉滩病毒(hantaan virus, HTNV)是布尼亚病毒科汉坦病毒属中的一种主要血清型, 可引起

以发热、休克、出血和肾脏损害为主要临床特征的肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)^[1]。HTNV 主要感染血管内皮细胞, 可引起血管渗漏和通透性增加^[2], 但其机制尚不清楚。

多糖包被(glycocalyx, GCX)是内皮细胞屏障结构的重要组成部分, 在维持血管内皮完整性方面发挥重要作用^[3]。研究发现, 在感染或致

[基金项目] 空军军医大学第二附属医院科技创新发展基金(2019LCYJ011, 2019LCYJ002); 国家自然科学基金(81373118); “十三五”国家科技重大专项(2017ZX10204401-002-005)

[作者单位] 710038 西安, 空军军医大学第二附属医院传染科(杜虹、王晓艳、李璟、姜泓、申焕君、王平忠)

前两位作者对本文有同等贡献, 均为第一作者

[通信作者] 王平忠, E-mail: wangpz63@126.com

炎因素作用下,细胞中某些酶(统称为“脱落酶”)的表达或活性增加,它们可分解GCX,致GCX损伤,并释放其组成成分^[4]。保护或修复损伤的GCX对防止血管渗漏具有重要作用,可能成为潜在的治疗靶点。然而,HTNV感染是否诱导血管内皮细胞GCX损伤,其机制如何,目前尚不清楚。为此,本研究以HTNV感染的人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vascular endothelial cells, HUVECs)为模型,以GCX为切入点,应用ELISA、间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)、Western blot、实时定量PCR等技术,探讨HTNV感染诱导血管内皮细胞GCX的损伤及其初步机制,为HFRS发病机制和治疗靶点的研究提供新的资料。

1 材料与方法

1.1 材料 VERO E6、HUVECs和HTNV 76-118株(HTNV 76-118,以下简称HTNV)均由本实验室保存。VERO E6使用含10%胎牛血清的DMEM培养基, HUVECs使用内皮细胞专用培养基(ScienCell, 1001),培养条件为37℃ 5%CO₂。硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)、可溶性CD138和磷脂酰肌醇聚糖的ELISA试剂盒均购自上海西唐生物科技有限公司。一抗抗体均购自abcam公司。

1.2 ELISA检测 应用HTNV感染HUVECs,收取不同感染时间点(0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h)细胞上清进行ELISA检测。每一时间点,HS、CS、HA、可溶性CD138和磷脂酰肌醇聚糖均测定2次,取均值。以血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)和TNF- α 刺激作为阳性对照,NC作为阴性对照。具体方法参照说明书。

1.3 实时定量PCR检测 收取HTNV感染不同时间点(0 h、1 h、6 h、12 h、18 h、24 h、48 h、72 h)的细胞沉淀,利用Trizol试剂提取总RNA。将每管中加入200 μ l氯仿;离心后取上清液,加入等量的异丙醇过夜沉淀;离心后用75%的无水乙醇清洗沉淀;将沉淀晾干,每管中加入20 μ l DEPC水溶解RNA;最后进行RNA浓度测量。使用反转录试剂盒和2 $\times$ SYBR染料进行实时定量PCR,检测细胞中相关基因的mRNA表达水平。引物序列由上海生工公司进行合成,GAPDH作为内参。

1.4 Western blot检测 利用蛋白裂解液收取HTNV感染不同时间点(0 h、1 h、6 h、12 h、18 h、24 h、48 h、72 h)的HUVECs,首先使用BCA试

剂盒进行蛋白定量;其次用5 $\times$ Loading Buffer在100℃条件下加热10 min制样;最后进行Western blot检测,每孔上样20 μ g,利用GAPDH作内参。

1.5 免疫荧光检测 HTNV感染HUVECs 48 h后,用4%多聚甲醛固定15 min;0.3% TritonX-100处理5 min;5% BSA室温封闭2 h;一抗4℃过夜孵育;羊抗兔FITC二抗室温孵育1 h;DAPI染色5 min;加入抗荧光猝灭剂封片,在显微镜下观察拍照。

1.6 TEER检测 HTNV感染被弹性蛋白酶抑制剂(1 μ M)预处理的HUVECs,于不同时间点(0 h、6 h、12 h、18 h、24 h、48 h和72 h)应用跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance, TEER)检测HUVECs的跨膜电阻。

1.7 统计学处理 应用Graphpad统计学软件对数据进行处理和分析。蛋白用半定量描述,核酸用定量描述,2组间定量资料比较用Mann-Whitney U检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞上清液中HS、CS、HA、可溶性CD138和磷脂酰肌醇聚糖的表达水平 利用ELISA检测细胞上清液中HS、CS、HA、可溶性CD138和磷脂酰肌醇聚糖的表达,结果如图1所示。HTNV感染后,细胞培养液中HA表达先上升后下降,HS和CS表达逐渐上升;可溶性CD138中LPS组和TNF- α 组在24 h达到最高峰,HTNV、VEGF在24 h达到最高峰并维持至48 h;磷脂酰肌醇聚糖的表达与可溶性CD138相似。

2.2 HTNV感染HUVECs后CD44、CD138和磷脂酰肌醇聚糖的表达 利用实时定量PCR和Western blot检测HTNV感染不同时间点CD138、磷脂酰肌醇聚糖和CD44的表达,结果如图2所示。随着HTNV感染的持续,CD138 mRNA表达水平先上升后下降,在48 h达到最高峰,上调3.68倍($U=6.350$, $P=0.000$);CD138蛋白表达水平逐渐升高,并持续至72 h。磷脂酰肌醇聚糖mRNA表达水平逐渐上升,在72 h上调2.47倍($U=9.404$, $P=0.011$);磷脂酰肌醇聚糖蛋白表达水平在12 h出现上调,并持续升高至72 h。CD44 mRNA表达水平在12 h达到最高值,随后逐渐下降,但差异并无统计学意义($U=2.389$, $P=0.134$);CD44蛋白表达水平在24 h达到最高峰。

2.3 HTNV感染HUVECs后麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)的分布 利用间接免疫荧光法观察HTNV感染HUVECs 48 h后,WGA的细胞分布。WGA能与N-乙酰糖胺结合,可识别糖蛋白和糖肽中,特别是细胞膜中复杂的碳水化

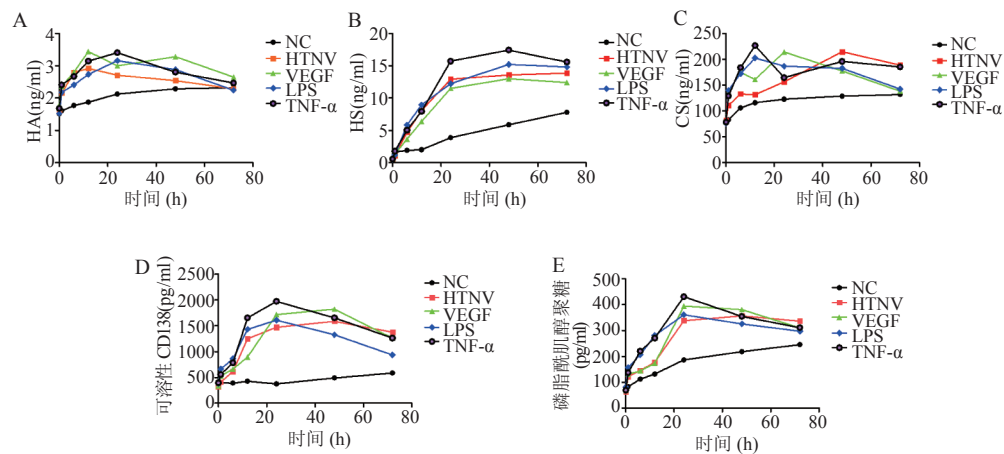


图 1 不同时间点 HUVECs 上清液中 GCX 表达变化

Figure 1 Change of expression of glycolyx in supernatant of HUVECs at different time points

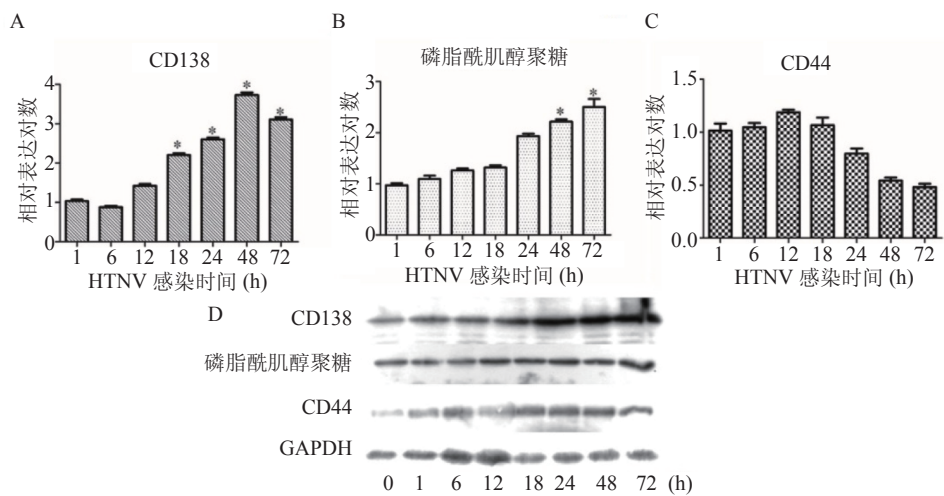


图 2 不同时间点 HUVEC 细胞中 GCX 表达变化

*. 与 1 h 比较, $P < 0.05$

Figure 2 Change of expression of glycolyx in HUVECs at different time points

合物结构。由于 HS、HA 和 CS 均属糖蛋白, 因此用 FITC 标记的 WGA 染色细胞, 其结果反映了细胞膜上总的糖蛋白分布。结果如图 3 所示, 与未处理组相比, HTNV 感染后细胞上绿色荧光减少。

2.4 HTNV 感染 HUVECs 后乙酰肝素酶、透明质酸酶和中性粒细胞弹性蛋白酶的表达 利用实时定量 PCR 和 Western blot 检测 HTNV 感染不同时间点乙酰肝素酶、透明质酸酶和中性粒细胞弹性蛋白酶的表达, 结果如图 4 所示。随着感染时间的持续, 乙酰肝素酶 mRNA 表达水平在 48 h 上调 2.23 倍 ($U=9.782$, $P=0.002$); 蛋白表达水平先上升后下降, 在 24 h 达到最高峰。中性粒细胞弹性蛋白酶 mRNA 表达水平逐渐上升, 在 24 h 上调 2.76 倍 ($U=18.870$, $P=0.000$); 蛋白表达水平同样在 24 h 显著性上调。透明质酸酶 mRNA 表达水平逐渐上

升, 但差异无统计学意义 ($U=2.076$, $P=0.106$)。

2.5 弹性蛋白酶抑制剂处理 HUVECs Western blot 结果显示, 随着弹性蛋白酶抑制剂浓度的升高, 中性粒细胞弹性蛋白酶的蛋白表达水平逐渐下降 (图 5A)。选取抑制剂最佳处理浓度 ($1 \mu\text{M}$) 预处理 HUVECs, 联合 HTNV 感染, 结果发现在 HTNV 感染 24 h 和 48 h 时, CD44 的蛋白表达水平均低于 HTNV 组 (图 5B)。TEER 检测结果显示, HTNV 处理 HUVECs 后 TEER 值逐渐下降; 在给予弹性蛋白酶抑制剂 ($1 \mu\text{M}$) 预处理后, TEER 值上升 (图 5C)。

3 讨论

GCX 主要由蛋白聚糖 (proteoglycans, PGs) 及其与氨基葡聚糖 (glycosaminoglycans, GAG) 共

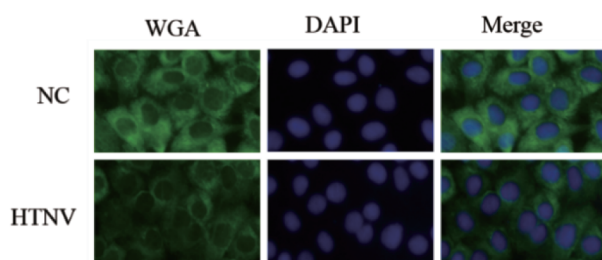


图 3 HTNV 感染 HUVECs 后 WGA 分布

NC. 正常对照; Merge. WGA 与 DAPI 染色合并处理

Figure 3 WGA distribution in HUVECs after HTNV infection

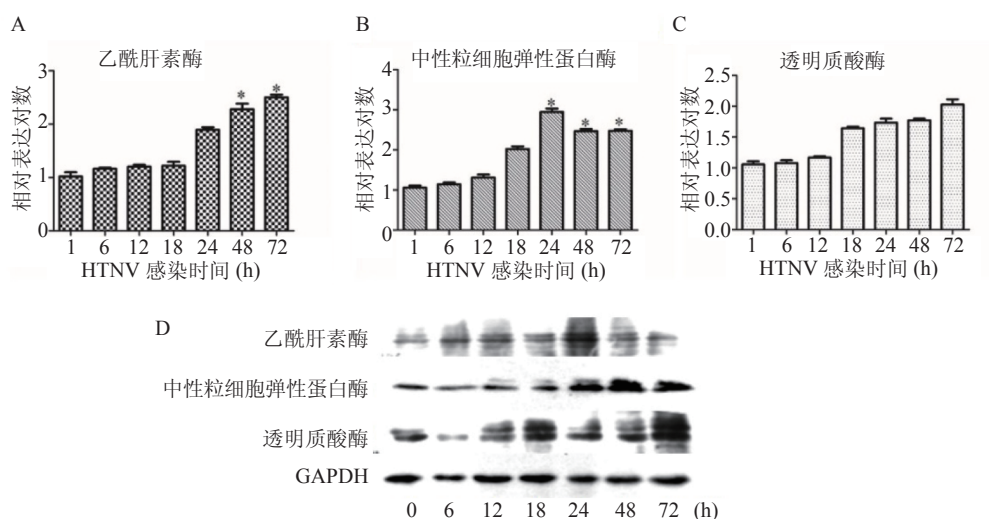


图 4 HTNV 感染 HUVECs 后分解酶的变化

*. 与 1 h 比较, $P < 0.05$

Figure 4 Changes of decomposition enzymes in HUVECs after HTNV infection

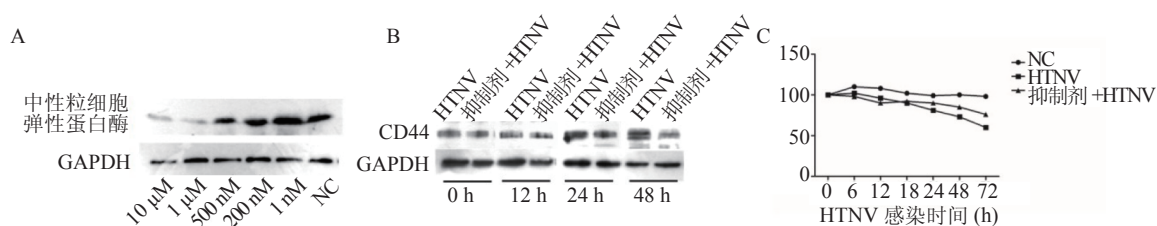


图 5 弹性蛋白酶抑制剂处理 HUVECs 后 CD44 和通透性的变化

Figure 5 Changes of CD44 and permeability in HUVECs after elastase inhibitor treatment

价键结合的复合体构成。PGs 的核心蛋白主要是多配体蛋白聚糖 (syndecans, 其中 syndecan-1 即为 CD138) 和磷脂酰肌醇聚糖。GAG 的主要成分包括 HS、CS 和 HA^[5]。HA 可与细胞表面受体 CD44 结合, 保持亲水特性, 起到稳定 GCX 结构的作用。有研究认为, GCX 在微血管生理, 尤其是在调节血管内皮通透性、血管紧张度及凝血方面起到重要作用^[6]。目前, 针对病毒感染诱导 GCX 损伤的相关研究较少, 包括艾滋病患者接受抗病毒治疗过程中出现肾脏血管内皮 GCX 破坏继而引发肾功能不全^[7]、登革热患者血清中 HA 和 HS 水平变化

与疾病严重程度相关^[8]、登革病毒 (dengue virus, DENV) NS1 蛋白通过 MIF1 引起 GCX 降解的基础研究等。但是至今尚未查阅到关于 HTNV 诱导血管内皮细胞 GCX 损伤的基础研究报道。

本研究观察到, HTNV 感染 HUVECs 后, 随着时间的延长, 细胞上清液中 HA、HS、CS、可溶性 CD138 和磷脂酰肌醇聚糖的水平均有升高, 表明 HTNV 感染或 LPS、VEGF、TNF- α 处理 HUVECs 后均可出现 GCX 破坏。这与 Glasner 等^[9]的研究结果相似, DENV 非结构蛋白 NS1 通过破坏内皮细胞 GCX, 诱导人肺血管内皮细胞

(DENV 主要感染的靶细胞)的高通透性。本课题组前期研究显示,不同分型及分期 HFRS 患者外周血可溶性 CD138 水平出现明显变化,可溶性 CD138 可作为重症 HFRS 早期预警及预后评估的标志物^[10]。Steppan 等^[11]研究发现,循环中 syndecan-1(可溶性 CD138)水平与脓毒症患者预后密切相关,与对照组相比,脓毒症患者血清 syndecan-1 表达显著升高;脓毒症患者 syndecan-1 较手术组表达更高;脓毒症和手术组 syndecan-1 与 IL-6 之间存在很强的相关性。也有研究显示,脓毒性休克患者外周血 HS 碎片表达水平明显升高^[12]。这提示 HTNV 感染引起的 GCX 脱落,可作为内皮损伤的靶向标志物。

本研究还观察到,GCX 骨架中的两个主要成分(CD138 和磷脂酰肌醇聚糖)及 HA 的主要膜受体 CD44 mRNA 和蛋白表达在 HTNV 感染 HUVECs 后均出现升高,其中,CD44 的表达上调同细胞上清中 HA 的表达趋势一致。究其原因可能与 HTNV 感染引起 GCX 主要骨架成分 CD138 和磷脂酰肌醇聚糖表达上调,随后伴随骨架断裂破坏,导致游离的可溶性 CD138 和磷脂酰肌醇聚糖水平升高有关。此外,由 CD138 和磷脂酰肌醇聚糖侧链结合的 GAG 组分(HS、CS 等)可能同步出现脱落,使 HS、CS 的水平也升高。

目前认为,诸多因素如感染、低氧、炎症因子、高血容量、外伤及心脏大血管手术等均可造成内皮 GCX 的损伤,除机械或外力因素损伤外,其他损伤机制尚不清楚^[13]。寻找切割 GCX 组分的特异性脱落酶是探索 GCX 损伤机制的一个关注点。有研究发现,乙酰肝素酶可从细胞膜表面蛋白如磷脂酰肌醇聚糖切割 HS 侧链,释放 HS。透明质酸酶可水解 HA 中的 β -N-乙酰氨基己糖糖苷键,释放 HA^[14]。本研究显示,HTNV 感染 HUVECs 后,乙酰肝素酶、透明质酸酶、中性粒细胞弹性蛋白酶在蛋白及 mRNA 表达水平均有升高,其与细胞上清液中 HS、HA 和可溶性 CD138 水平变化基本一致,提示 HTNV 感染 HUVECs 后,可能通过上调或活化上述 3 种酶,致 GCX 组分酶解、脱落,从而引起 HS、CS、HA、CD138 等成分水平升高。一些出血热病毒,如 DENV、埃博拉病毒可能也伴随内皮细胞 GCX 的损伤^[9, 15-17]。亦有研究认为,汉坦病毒和 DENV 感染可引起基质金属蛋白酶的活化,后者可能参与 syndecans 的脱落^[18]。通过本研究结果,我们认为:包括 HTNV 在内的多种出血热病毒感染可能通过活化或上调多种脱落酶,降解 GCX,致细胞屏障破坏,这为深入探讨 HTNV 感染致血管内皮细胞 GCX 损伤及通透性改变提供了重要资料,抑制切割 GCX 组分的特异性酶可能

作为临床治疗严重血管渗漏的一个重要潜在靶点。

为进一步验证脱落酶可能参与 HTNV 感染致 HUVECs 中 GCX 损伤,本研究选取了中性粒细胞弹性蛋白酶为代表,应用弹性蛋白酶抑制剂预处理 HUVECs,然后用 HTNV 感染,观察细胞通透性变化及弹性蛋白酶作用下 CD44 蛋白的表达有无变化。结果显示,经弹性蛋白酶抑制剂预处理的 HUVECs,其 TEER 值上升,CD44 蛋白表达也低于 HTNV 组,提示弹性蛋白酶抑制剂可能降低血管通透性。其原因可能是通过抑制中性粒细胞弹性蛋白酶的表达或活性,减少其对 CD44 的分解,增加 HA 与 CD44 的胞膜结合,进而减少 HA 的脱落,保护了 GCX 结构的完整性。

本研究仍存在一定的局限性。首先,受实验条件限制,在细胞层面,研究中纳入的样本数较少,缺少必要的样本重复,在一定程度上降低了统计学效力;此外,本研究仍为初步研究,不排除研究结果受多种混杂与偏倚因素的影响。后续将进一步扩大样本量,增加重复实验,对上述结果行进一步验证。

综上所述,HTNV 感染可能引起血管内皮细胞 GCX 损伤,通过上调或活化某些脱落酶,酶解 GCX,致屏障结构破坏,通透性升高,这为阐明 HTNV 感染致血管内皮细胞损伤的分子机制提供了更多理论依据。

【参考文献】

- [1] Brocato RL, Hooper JW. Progress on the prevention and treatment of hantavirus disease [J]. *Viruses*, 2019, 11(7). DOI: 10.3390/v11070610.
- [2] Jiang H, Du H, Wang LM, *et al.* Hemorrhagic fever with renal syndrome: pathogenesis and clinical picture [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00001.
- [3] Tarbell JM, Cancel JM. The glycocalyx and its significance in human medicine [J]. *J Intern Med*, 2016, 280(1):97-113.
- [4] Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, *et al.* Vascular endothelial cell biology: an update [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18). DOI: 10.3390/ijms20184411.
- [5] Reines BP, Ninham BW. Structure and function of the endothelial surface layer: unraveling the nanoarchitecture of biological surfaces [J]. *Q Rev Biophys*, 2019, 52. DOI: 10.1017/S0033583519000118.
- [6] Uchimido R, Schmidt EP, Shapiro NI. The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis [J]. *Crit Care*, 2019, 23(1). DOI: 10.1186/s13054-018-2292-6.
- [7] Meneses GC, Cavalcante MG, da Silva Junior GB, *et al.* Endothelial glycocalyx damage and renal dysfunction in HIV patients receiving combined antiretroviral therapy [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2017, 33(7):703-710.
- [8] Tang TH, Alonso S, Ng LF, *et al.* Increased serum hyaluronic acid and heparan sulfate in dengue fever: association with plasma leakage and disease severity [J]. *Sci Rep*, 2017, 7. DOI: 10.1038/srep46191.

(下转第 49 页)

【参考文献】

- [1] Wallace DF. The regulation of iron absorption and homeostasis[J]. Clin Biochem Rev, 2016, 37(2):51–62.
- [2] Lynch S, Pfeiffer CM, Georgieff MK, *et al.* Biomarkers of nutrition for development (BOND)—Iron review [J]. J Nutr, 2018, 148(suppl_1):S1001–S1067.
- [3] Silvestre OM, Goncalves A, Nadruz JW, *et al.* Ferritin levels and risk of heart failure—the Atherosclerosis Risk in Communities Study [J]. Eur J Heart Fail, 2017, 19(3):340–347.
- [4] Kawabata H, Usuki K, Shindo-Ueda M, *et al.* Serum ferritin levels at diagnosis predict prognosis in patients with low blast count myelodysplastic syndromes [J]. Int J Hematol, 2019, 110(5):533–542.
- [5] Buzzetti E, Petta S, Manuguerra R, *et al.* Evaluating the association of serum ferritin and hepatic iron with disease severity in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Liver Int, 2019, 39(7):1325–1334.
- [6] Son NE. Influence of ferritin levels and inflammatory markers on HbA1c in the type 2 diabetes mellitus patients [J]. Pak J Med Sci, 2019, 35(4):1030–1035.
- [7] Salman Z, Yılmaz T, Mehmetçik G. The relationship between ferritin levels and oxidative stress parameters in serum of β -thalassemia major patients [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 659:42–46.
- [8] 焦德松, 王雨, 苗王琛. 脂联素与铁蛋白在脓毒症患者中的表达水平及与临床指标的相关性研究 [J]. 中国医师杂志, 2017, 19(6):910–912.
- [9] Kelly BJ, Lautenbach E, Nachamkin I, *et al.* Combined biomarkers predict acute mortality among Critically Ill patients with suspected sepsis [J]. Crit Care Med, 2018, 46(7):1106–1113.
- [10] McElroy AK, Erickson BR, Flietstra TD, *et al.* Ebola hemorrhagic Fever: novel biomarker correlates of clinical outcome [J]. J Infect Dis, 2014, 210(4):558–566.
- [11] Büyüktuna SA, Doğan HO, Unlusavuran M, *et al.* An evaluation of the different biomarkers to discriminate bleeding in Crimean–Congo hemorrhagic fever [J]. Ticks Tick Borne Dis, 2019, 10(5):997–1002.
- [12] 李锐. 流行性出血热患者血清铁蛋白水平检测及价值评价[J]. 中国地方病防治杂志, 2014, 29(6):454–455.
- [13] Du H, Li J, Yu HT, *et al.* Early indicators of severity and construction of a risk model for prognosis based upon laboratory parameters in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(11):1667–1675.
- [14] Jiang H, Du H, Wang LM, *et al.* Hemorrhagic fever with renal syndrome: pathogenesis and clinical picture [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 6. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00001.
- [15] Mackow ER, Gavrilovskaya IN. Hantavirus regulation of endothelial cell functions [J]. Thromb Haemost, 2009, 102(12):1030–1041.
- [16] Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, *et al.* Uncovering the mysteries of hantavirus infections [J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(8):539–550.
- [17] 白雪帆, 徐志凯. 肾综合征出血热 [M]. 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013:173–205.
- [18] Avšič-Županc T, Saksida A, Korva M. Hantavirus infections [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 21S:e6–e16.
- [19] 王军宁, 郭维娟, 杜虹, 等. 肾综合征出血热患者血浆白细胞介素-18 水平动态变化研究 [J]. 传染病信息, 2015, 28(1):18–22.
- [20] Zhang CM, Tang K, Zhang YS, *et al.* Elevated plasma growth arrest-specific 6 protein levels are associated with the severity of disease during hantaan virus infection in humans [J]. Viral Immunol, 2017, 30(5):330–335.
- [21] Bunz H, Weyrich P, Peter A, *et al.* Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and proteinuria predict severity of acute kidney injury in Puumala virus infection [J]. BMC Infect Dis, 2015, 15(1):464. DOI: 10.1186/s12879-015-1180-9. DOI: 1186/s12879-015-1180-9.

(2018-11-15 收稿 2019-11-26 修回)

(本文编辑 赵雅琳)

(上接第 43 页)

- [9] Glasner DR, Ratnasiri K, Puerta-Guardo H, *et al.* Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(11):e1006673.
- [10] Li J, Du H, Bai XF, *et al.* Study on expression of plasma sCD138 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome [J]. BMC Infectious Diseases, 2018, 18. DOI: 10.1186/s12879-018-3005-0.
- [11] Stepan J, Hofer S, Funke B, *et al.* Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx [J]. J Surg Res, 2011, 165(1):136–141.
- [12] Nelson A, Berkestedt I, Bodelsson M. Circulating glycosaminoglycan species in septic shock [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2014, 58(1):36–43.
- [13] Tarbell JM. Shear stress and the endothelial transport barrier [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(2):320–330.
- [14] Lukasz A, Hillgruber C, Oberleithner H, *et al.* Endothelial glycocalyx breakdown is mediated by angiopoietin-2 [J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(6):671–680.
- [15] Schonrich G, Kruger DH, Raftery MJ. Hantavirus-induced disruption of the endothelial barrier: neutrophils are on the payroll [J]. Front Microbiol, 2015, 6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00222.
- [16] Escudero-Perez B, Volchkova VA, Dolnik O, *et al.* Shep GP of Ebola virus triggers immune activation and increase vascular permeability [J]. PLoS Pathog, 2014, 10(11):e1004509.
- [17] Connolly-Andersen AM, Thunberg T, Ahlm C. Endothelial activation and repair during hantavirus infection: association with disease outcome [J]. Open Forum Infect Dis, 2014, 1(1). DOI: 10.1093/ofid/ofu027.
- [18] Becker BF, Jacob M, Leipert S, *et al.* Degradation of endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases [J]. Br J Clin Pharmacol, 2015, 80(3):389–402.

(2020-01-22 收稿 2021-01-10 修回)

(本文编辑 闫晶晶)