

肺炎衣原体感染对高脂血症小鼠主动脉内皮细胞 过氧化体增殖物激活型受体 γ 、P50 和 c -Fos 表达的影响

黄冰生¹, 董吁钢², 程颖¹, 麦伟颐², 李永强²

(1. 广州市番禺何贤纪念医院心内科, 广东省广州市 511400; 2. 中山大学附属第一医院心内科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 病理学与病理生理学; 肺炎衣原体感染是动脉硬化的辅助因子; 肺炎衣原体; 高脂血症; 过氧化体增殖物激活型受体 γ ; P50; c -Fos

[摘要] 目的 探讨肺炎衣原体感染对高脂血症小鼠主动脉内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 、核因子 KB 和激活蛋白 1 表达的影响。方法 48 只 C57BL/6J 雌性小鼠分成对照组、感染组、高脂组和感染高脂组。14 周后, 通过间接免疫荧光标记法检测主动脉内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 、P50(核因子 KB 亚单位)和 c -Fos(激活蛋白 1 亚单位)表达情况。用苏丹 Ⅲ 对主动脉窦冰冻切片进行脂染色以检测主动脉窦粥样硬化病灶情况并进行评分。结果 主动脉窦粥样硬化病灶评分在对照组和感染组无升高, 而在高脂组和感染高脂组显著升高 ($P < 0.01$), 且感染高脂组和高脂组相比差异有显著性 ($P < 0.01$)。和对照组相比, 感染组、高脂组和感染高脂组小鼠主动脉内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 、P50 和 c -Fos 的表达是升高的, 而在感染组、高脂组和感染高脂组 3 组之间过氧化体增殖物激活型受体 γ 、P50 和 c -Fos 的表达差异无显著性。结论 在肺炎衣原体感染和高脂血症的早期, 小鼠主动脉内皮细胞的炎症通路已经激活。单独肺炎衣原体感染不能引起动脉粥样硬化的形成, 但肺炎衣原体感染能加速高脂饮食引起的动脉粥样硬化形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Chlamydia Pneumoniae Infection on Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , P50 and c -Fos in Aortic Endothelial Cell in Hyperlipidemia Mice.

HUANG Bing-Sheng¹, DONG Yu-Gang², CHENG Ying¹, MAI Wei-Yi², and LI Yong-Qiang²

(1. Panyu Hexian Remembrance Hospital, Guangzhou 511400; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510080, China)

[KEY WORDS] Chlamydia Pneumoniae; Hypercholesterolemia; Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ ; P50; c -Fos; Endothelium

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of *C. pneumoniae* infection on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and activated protein 1 (AP-1) in aortic endothelial cell in hyperlipidemia mice. **Methods** Forty-eight, 8-week-old female C57BL/6J mice were divided into 4 groups: control group, infected group, atherogenic diet group and infected atherogenic diet group (each twelve). 14 weeks later, the expression of PPAR γ , P50 (subunit of NF- κ B) and c -Fos (subunit of AP-1) was determined by indirect immunofluorescence in the aortic endothelial cell. Slides of aortic sinus were prepared by cryosection, and stained with Sudan Ⅲ for examination of atherosclerotic plaque. The score of atherosclerotic plaque was determined by microscopy. **Results** The score of atherosclerotic plaque in infected group was not increased, while it was significant higher in atherogenic diet group and infected atherogenic diet group ($P < 0.01$), still the score in infected atherogenic diet group was higher than in atherogenic diet group ($P < 0.01$). The expression of PPAR γ , NF- κ B and AP-1 in endothelial cell in aortic sinus was upregulated in infected group, atherogenic diet group and infected atherogenic diet group, in comparison with that in control group ($P < 0.05$). There was no significant difference among infected group, atherogenic diet group and infected atherogenic diet group. **Conclusion** The inflammatory process was already initiated in the aortic endothelial cell in C57BL/6J mice at the early stage of Chlamydia pneumoniae infection and hyperlipidemia. Chlamydia pneumoniae infection alone would not accelerate the process of atherosclerosis. But Chlamydia pneumoniae infection could accelerate the process of atherosclerosis.

[收稿日期] 2005-02-26 [修回日期] 2005-10-25

[基金项目] 广州市科委基金(No: 1999-Z-102-02)

[作者简介] 黄冰生, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病, 联系电话为 13724088781, E-mail 为 hbs8311@163.com。通讯作者董吁钢, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病, 联系电话为 020-87755766-8151, E-mail 为 332dong@163.com。程颖, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病, E-mail 为 pycy@21cn.com。

肺炎衣原体感染和动脉粥样硬化的联系曾被针对冠心病患者的血清学研究所证实^[1,2]。目前, 和一些经典的致动脉粥样硬化的危险因子如高脂血症相比, 肺炎衣原体感染被认为是起辅助因子的作用, 肺炎衣原体感染能引起血管细胞特别是内皮细胞的损伤, 从而促进由高脂血症引起的动脉粥样硬化的形

成^[3]。过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ)、核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和激活蛋白 1 (activated protein 1, AP-1) 在动脉粥样硬化过程中有着重要的作用。一些实验研究显示 PPAR γ 能抑制炎症因子在内皮细胞和平滑肌细胞中的表达。相反, 由肺炎衣原体感染引起的 NF- κ B 和 AP-1 的激活能上调一些炎症因子的表达。因此, 本研究通过探讨肺炎衣原体感染对 C57BL/6J 小鼠主动脉内皮细胞 PPAR γ 、P50 和 κ Fos 表达的影响, 而初步探讨肺炎衣原体感染促进动脉粥样硬化的机制。

1 材料与方法

1.1 动物和分组

48 只 8 周龄的 C57BL/6J 雌性小鼠购于中山大学动物实验中心, 分成对照组、感染组、高脂组和感染高脂组 (每组 12 只)。对照组和感染组喂以常规饮食, 高脂组和感染高脂组喂以高脂饮食 (由 15% 猪油、2.5% 胆固醇、0.5% 胆酸和常规饮食组成), 感染组和感染高脂组同时感染肺炎衣原体。各组小鼠置于清洁的环境中。于实验开始后第 0、2 和 4 周, 将感染组和感染高脂组小鼠经鼻接种 1×10^7 ifu 的肺炎衣原体 (AR-39), 而对照组和高脂组小鼠则接种 0.01 mmol/L PBS 溶液。整个实验过程为 14 周。

1.2 试剂与仪器

羊抗鼠 PPAR γ polyclonal antibody、羊抗鼠 P50 polyclonal antibody、羊抗鼠 κ Fos polyclonal antibody 和大鼠抗小鼠 PECAM-1 monoclonal antibody (内皮细胞抗体) 购于 Santa Cruz。兔抗大鼠 IgG-TRITC 和兔抗羊 IgG-FITC 购于 Sigma-Aldrich。Chlamydia TWAR 购于美国典型菌库, Rabbit anti-C. pneumoniae-FITC 购于 DAKO。其它生物试剂购于上海生工。所用实验器材包括: 冷冻切片机 Cryostat (Shandon, B56206, AIFI), 微量荧光图像分析系统 (Olympus, IX70-142), 生物化学分析仪 (HITACHI, 7170A, Automatic Analyzer) 和低温离心机 (VNIVERAA32R, Hettich)。

1.3 体重和血脂测定

于实验开始和实验结束时分别从小鼠的尾静脉取血 0.5 mL, 用于总胆固醇和甘油三酯的测定, 每 4 周测 1 次体重。

1.4 主动脉窦动脉粥样硬化病灶的评分

实验结束时, 处死小鼠, 分离主动脉, 取主动脉窦冰冻切片。用 10% 福尔马林固定后, 行苏丹 III 染色, 再用苏木精复染。每只小鼠的主动脉窦取 10 张

切片在显微镜下观察动脉粥样硬化病变。动脉粥样硬化的评分采用文献[4]方法。

1.5 内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 、P50 和 κ Fos 表达的测定

小鼠主动脉切片用 100% 丙酮固定 5 min 后, 用 0.01 mmol/L PBS 溶液洗涤 3 次, 再用兔血清阻断 20 min, 然后在切片上加入一抗, 如羊抗鼠 PPAR γ polyclonal antibody 或羊抗鼠 P50 polyclonal antibody 或羊抗鼠 κ Fos polyclonal antibody, 并同时加入大鼠抗小鼠 PECAM-1 monoclonal antibody (内皮细胞抗体), 室温下孵育 2 h, 所有一抗的浓度为 1:700。孵育 2 h, 再用 0.01 mmol/L PBS 溶液冲洗 5 次, 然后加入二抗兔抗大鼠 IgG-TRITC (1:200) 和兔抗羊 IgG-FITC (1:400), 同样在室温下孵育 2 h, 再用 0.01 mmol/L PBS 溶液冲洗 5 次。然后将切片置于微量荧光图像分析系统之下检测内皮细胞中荧光的强度, 其中, TRITC 标记内皮, 被激发后将呈现红光, 而 FITC 标记内皮细胞内的 PPAR γ 、P50 和 κ Fos, 被激发后呈现绿光。荧光强度的分级参照以下标准^[5]: (-) 为无荧光; (±) 为极微弱的荧光; (+) 为弱荧光; (++) 为明亮的荧光; (+++) 为极明亮的荧光。检测时, 对检测者实行盲法。

1.6 统计学处理

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料比较采用单因素方差分析, 计数资料比较采用 Kruskal-Wallis 检验。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组体重和血脂的比较

实验结束时高脂组和感染高脂组小鼠体重下降, 而血脂水平升高, 与对照组和感染组相比, 差异有显著性 (P < 0.01) (表 1)。

表 1. 第 14 周各组小鼠体重和血脂的比较 ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

分 组	体重(g)	总胆固醇 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)
对 照 组	33.2 ± 2.35	2.20 ± 0.17	1.26 ± 0.15
感 染 组	33.3 ± 1.45	2.18 ± 0.18	1.13 ± 0.24
高脂组	30.6 ± 2.4	5.72 ± 0.72 ^a	0.52 ± 0.15 ^a
感染高脂组	30.7 ± 1.45	5.88 ± 0.72 ^a	0.54 ± 0.13 ^a

a 为 P < 0.01, 与对照组比较。

2.2 各组主动脉窦动脉粥样硬化病灶评分的比较

对照组和感染组主动脉窦中未见动脉粥样硬化

病灶的形成,高脂组和感染高脂组有动脉粥样硬化病灶形成(图1)。高脂组和感染高脂组主动脉粥样硬化的评分分别为 2.17 ± 0.44 和 2.92 ± 0.43 ,高脂组和感染高脂组之间比较差异也有显著性

($P<0.01$)。说明单独肺炎衣原体感染不能引起小鼠主动脉粥样硬化的发生,而高脂饮食和高脂饮食合并肺炎衣原体感染则能促进动脉粥样硬化的发生。

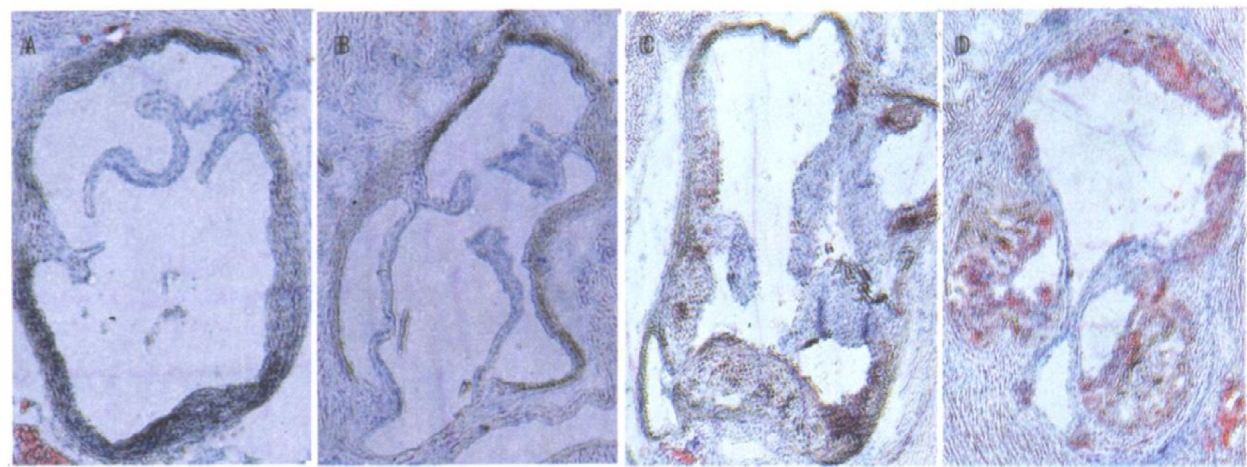


图1. 各组主动脉粥样硬化病灶苏丹Ⅲ染色情况(×40) A为对照组, B为感染组, C为高脂组, D为感染高脂组。

2.3 主动脉内皮细胞氧化体增殖物激活型受体 γ 、P50和 σ Fos的表达

荧光强度结果分析显示,感染组、高脂组和感染高脂组主动脉内皮细胞PPAR γ 、P50和 σ Fos的荧光

强度与对照组比较,差异有显著性($P<0.05$)(图2和表2),说明肺炎衣原体感染或/和高脂饮食能上调主动脉内皮细胞PPAR γ 、P50和 σ Fos的表达。

表2. 各组间氧化体增殖物激活型受体 γ 、P50和 σ Fos荧光强度的比较($n=12$, sample=4)

分 组	PPAR γ					P50					σ Fos				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
对 照 组	0	5	5	1	1	9	3	0	0	0	9	3	0	0	0
感 染 组	0	1	4	6	1	0	0	1	10	1	0	0	1	10	1
高 脂 组	0	0	4	8	0	0	0	4	7	1	0	0	3	8	1
感染高脂组	0	0	3	8	1	0	0	1	9	2	0	0	0	10	2

荧光强度秩次1为±; 2为+; 3为++; 4为+++。

3 讨论

目前,有研究显示PPAR γ 在炎症过程中有抑制炎症过程和促进炎症过程的双重作用。本研究显示,肺炎衣原体感染或/和高脂血症能上调主动脉内皮细胞PPAR γ 的表达。其中肺炎衣原体感染上调主动脉内皮细胞PPAR γ 表达的机制可能是因为肺炎衣原体是一种革兰氏阴性菌,其细胞壁中含有丰富的脂多糖^[6],而脂多糖能诱导机体肝细胞、肠上皮细胞和巨噬细胞分泌大量的前列腺素D₂(prostaglandin D₂, PGD₂)^[7]和肿瘤坏死因子 α , PGD₂的代谢产物是15 α -PDJ₂,而后者是PAAR γ 的配体,随着

体内15 α -PDJ₂的增多,PPAR γ 即被激活。而由喂饲高脂饮食所致高脂血症引起的主动脉内皮细胞PPAR γ 表达上调的机制可能是高脂血症小鼠的体内含有丰富的氧化型低密度脂蛋白(oxidative low density lipoprotein, ox-LDL), ox-LDL也是PPAR γ 的配体,从而引起PPAR γ 的激活^[8]。

正常情况下,核因子 κ B只存在于内皮细胞和平滑肌细胞等细胞的细胞浆中, P65/P50异构体是核因子 κ B激活状态的主要形式^[9]。当小鼠被感染肺炎衣原体或喂以高脂饮食时,细菌的脂多糖、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素1(interleukin 1, IL-1)和ox-LDL引起 κ B的磷酸化,核因子 κ B随之即被激活^[10]并被

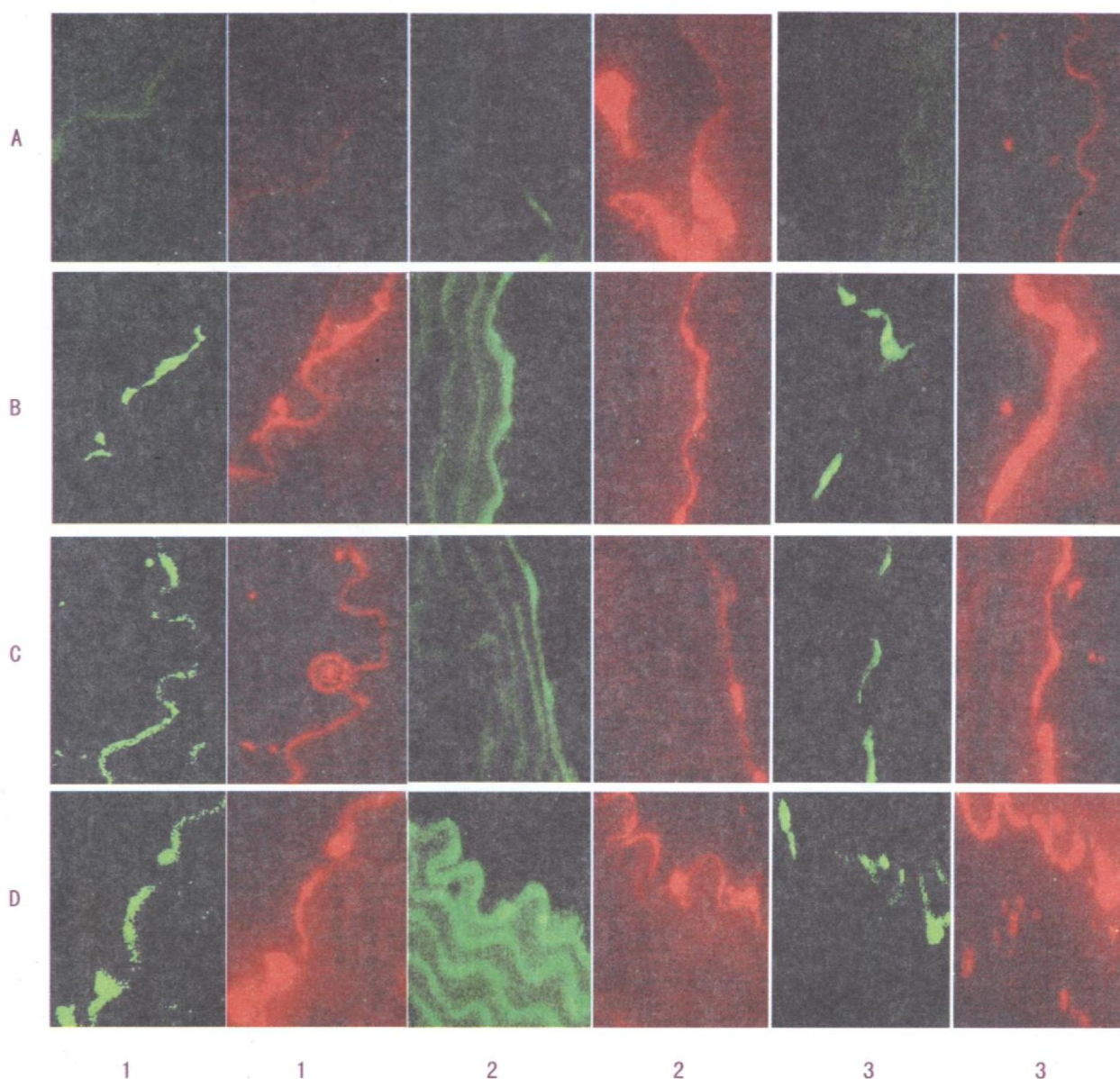


图 2. 各组主动脉内皮细胞过氧化物增殖物激活型受体 γ 、P50 和 $cFos$ 荧光强度的比较 ($\times 400$) 红色荧光标记内皮, 绿色荧光标记内皮细胞内的 PPAR γ 、P50 和 $cFos$ 。A 为对照组, B 为感染组, C 为高脂组, D 为感染高脂组。1 为 PPAR γ , 2 为 P50, 3 为 $cFos$ 。

转运至细胞核内。激活的核因子 κB 和上述炎症因子的靶基因结合, 从而上调血管细胞、单核细胞和巨噬细胞炎症因子的表达。结果, 中性粒细胞、单核细胞和 T 淋巴细胞被募集并粘附在内皮细胞上, 从而引起内皮细胞的损伤。

$cFos$ 是转录因子 AP-1 家族中的一员, $cFos/C-Jun$ 异构体是 AP-1 的主要存在形式, 在正常成熟细胞中表达极少^[11]。本研究显示, 肺炎衣原体感染和/或高脂血症能上调小鼠主动脉内皮细胞 $cFos$ 的表达, $cFos$ 表达上调的机制可能是 3 组实验组小鼠体内含有大量的肿瘤坏死因子 α 和 ox-LDL。激活的 $cFos$ 能上调某些炎症因子的表达, 从而引起炎症反应和内皮细胞的损伤。本研究显示感染组、高脂组

和感染高脂组主动脉内皮细胞 PPAR γ 、P50 和 $cFos$ 的表达是上调的, 而感染高脂组中 PPAR γ 、P50 和 $cFos$ 三者的表达水平最高, 其机制可能是肺炎衣原体感染和高脂血症对血管内皮细胞的相加作用所致。目前实验研究显示, 激活的 PPAR γ 能抑制 NF- κB 、 $cFos$ 与其相应的靶基因结合, 进而抑制这些靶基因的转录^[12, 13]。在感染组中, 表达上调的 P50 和 $cFos$ 并没有引起小鼠主动脉粥样硬化的形成, 由于 PPAR γ 在炎症过程中的双重作用, 因此 PPAR γ 在肺炎衣原体感染时内皮细胞损伤及炎症过程中的确切作用及与其它致动脉粥样硬化因子间的异同作用机制需进一步探讨。

本研究显示肺炎衣原体感染能加速喂以高脂饮

食 C57BL/6J 小鼠主动脉窦动脉粥样硬化的形成,而其单独则不能引起动脉粥样硬化的形成。该结果和以往以载脂蛋白 E 缺陷小鼠、LDL 受体敲除小鼠和新西兰白兔为研究对象的实验结果一致。肺炎衣原体感染的促动脉粥样硬化作用可能与其促炎作用有关。在高脂饮食的小鼠体内,含有大量的低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 而血管内皮细胞的炎症和损伤将导致 LDL-C 较易通过内皮细胞间隙并沉积至内皮下,从而加速动脉粥样硬化的形成。但在低水平 ox-LDL 的小鼠体内,肺炎衣原体感染并不能引起动脉粥样硬化的形成。

总之,在肺炎衣原体感染和高脂血症的早期,小鼠主动脉内皮细胞的炎症通路即已激活。单独肺炎衣原体感染不能引起动脉粥样硬化的形成,但肺炎衣原体感染能加速高脂饮食引起的动脉粥样硬化的形成。PPAR γ 在肺炎衣原体感染时内皮细胞损伤及炎症过程中的确切作用及与其它致动脉粥样硬化因子间的异同作用机制需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 刘漪论. 肺炎衣原体感染致动脉粥样硬化的发病机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (1): 113-115
- [2] 张大庆. 肺炎衣原体与冠心病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002,

10 (3): 274-276

- [3] Erwin B, Lee AC, Micheal E, Chough N, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae infection accelerates hyperlipidemia induced atherosclerotic lesion development in C57BL/6J mice[J]. *Atherosclerosis*, 2001, 158 (1): 13-17
- [4] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice[J]. *Atherosclerosis*, 1987, 68 (3): 231-240
- [5] 刘彦仿. 免疫组织化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989; 47-143
- [6] 闻玉梅, 陆德源. 现代医用微生物学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999; 570-592
- [7] Longo WE, Danmore LJ, Mazuski TE, Smith GS, Panesar N, Kaminski DL. The role of cox-1 and cox-2 in LPS and IL-1 stimulated enterocyte prostanoic acid formation[J]. *Mediators Inflammation*, 1998, 7 (2): 85
- [8] Ericsson C, Hamsten A, Nilsson J, Grip L, Svane B, de Faire U. Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients[J]. *Lancet*, 1996, 347 (9005): 849-853
- [9] Ginn PEASE ME, Whisler RL. Redox signals and NF- κ B activation in T cells[J]. *Free Radical Biol on Med*, 1998, 25 (3): 346-361
- [10] Miller SA, Selzman CH, Shames BD, Barton HA, Johnson SM, Harken AH. Chlamydiae pneumoniae activates NF- κ B and AP-1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation[J]. *J Surg Res*, 2000, 90 (1): 76-81
- [11] Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1 072 (2/3): 129-157
- [12] Chen NG, Xiao Han. Dual function of troglitazone in icartr 1 gene expression in human vascular endothelium[J]. *Biochem Biophysical Res Com*, 2001, 282 (3): 717-722
- [13] Delerive P, Martin NF, Chinetti G, Trotein F, Fruchart JC, Najib J, et al. PPAR activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the AP-1 signal pathway[J]. *Circ Res*, 1999, 85 (5): 394-402

(此文编辑 朱雯霞)