

肺炎支原体脂质相关膜蛋白在动脉粥样硬化发生发展中的作用机制

朱翠明^{1,2}, 汪世平¹, 游晓星², 曾焱华², 陈曦³

(1. 中南大学湘雅医学院病原生物学科, 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学医学院微生物学与免疫学教研室, 湖南省衡阳市 421001; 3. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 肺炎支原体; 脂质相关膜蛋白; 前炎症因子; 细胞凋亡; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 研究肺炎支原体脂质相关膜蛋白对巨噬细胞分泌细胞因子和诱导巨噬细胞凋亡的影响, 初步探讨肺炎支原体引起动脉粥样硬化的机制。**方法** 用 ELISA 检测肺炎支原体脂质相关膜蛋白诱导体外培养的巨噬细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量; 用流式细胞术检测脂质相关膜蛋白诱导巨噬细胞的凋亡率; Western blot 方法检测经脂质相关膜蛋白作用的巨噬细胞 NF- κ B 的激活和 NF- κ B 抑制剂吡咯啉烷二甲基硫脲对巨噬细胞分泌细胞因子和诱导巨噬细胞凋亡的影响。**结果** 脂质相关膜蛋白能促进巨噬细胞分泌高水平的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 和发生凋亡; 并能使 NF- κ B 从细胞浆中转位到细胞核内; 吡咯啉烷二甲基硫脲能显著抑制巨噬细胞 NF- κ B 的激活, 且能抑制脂质相关膜蛋白诱导的巨噬细胞分泌细胞因子和发生凋亡。**结论** 肺炎支原体脂质相关膜蛋白可通过激活 NF- κ B 诱导巨噬细胞分泌前炎症细胞因子和促进凋亡, 可能在动脉粥样硬化的发病中起重要作用。

[中图分类号] R37

[文献标识码] A

The Mechanisms of *Mycoplasma Pneumoniae* LAMP in the Development of Atherosclerosis

ZHU Cui-Ming^{1,2}, WANG Shi-Ping¹, YOU Xiao-Xing², ZENG Yan-Hua², and CHEN Xi³

(1. Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China; 2. Department of Microbiology and Immunology, University of South China, Hengyang 421001, China; 3. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] *Mycoplasma Pneumoniae*; Lipid-Associated Membrane Proteins; Proinflammatory Cytokines; Cell Apoptosis; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the proinflammatory cytokines production and apoptosis of macrophages upon *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) lipid-associated membrane proteins (LAMP) stimulation, and evaluate the molecular mechanism of *M. pneumoniae* to cause atherosclerosis. **Methods** The cultured human macrophages were incubated with various concentrations of *M. pneumoniae* LAMP preparations. The proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 production were detected by ELISA and cell apoptosis by flow cytometry. At the same time, the activation of NF- κ B and the effects of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), an inhibitor of NF- κ B, on *M. pneumoniae* LAMP-induced macrophages apoptosis were analyzed by Western blot. **Results** *M. pneumoniae* LAMP could induce high level of TNF- α , IL-1 β and IL-6 production and macrophages apoptosis. These effects were highly associated with NF- κ B activation of macrophages. PDTC could significantly inhibit the activation of NF- κ B and partially reduce *M. pneumoniae* LAMP-induced macrophages secretion and apoptosis. **Conclusions** *M. pneumoniae* LAMP can induce proinflammatory cytokines secretion and macrophages apoptosis by activating NF- κ B, and it may be an important etiological factor for atherosclerosis.

[收稿日期] 2012-02-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072418); 湖南省教育厅优秀青年基金项目(09B088); 湖南省高校科技创新团队资助项目(湘教通[2010]212号)

[作者简介] 朱翠明, 博士研究生, 副教授, 研究方向为肺炎支原体的致病机制, E-mail 为 cuiming_zhu@yahoo.com.cn. 通讯作者汪世平, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血吸虫病的致病机制与防治研究, E-mail 为 wspxy1122@yahoo.com.cn.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是主要累及动脉病变的慢性炎症性疾病,吸烟、糖尿病、高脂血症和高血压早已被认知是冠心病的危险因素。近年来发现炎性介质和单核-巨噬细胞系统在缺血性心脏病发病中亦起着重要作用。这些炎性因子包括单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、幽门螺杆菌和肺炎衣原体和肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, Mp)等^[1,2]。

以往多认为 Mp 属于胞外菌。但现在的研究表明, Mp 等可通过其顶端结构侵入宿主细胞,在感染宿主肺泡巨噬细胞、内皮细胞等长期存活,引起持续性感染^[3,4]。并可通过感染后形成免疫复合物、沉积血管壁引起局部损伤或激发机体炎症反应等引起 As^[5]。但其具体发病机制目前尚不清楚。

因此,本研究通过检测 Mp 脂质相关膜蛋白(lipid-associated membrane proteins, LAMP)对巨噬细胞分泌细胞因子和诱导巨噬细胞凋亡的影响,初步探讨 Mp 引起 As 的机制,为其防治提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

Mp 标准株 M129 株(ATCC 29342)为本研究所保存,人单核细胞系 THP-1 细胞购自上海生命科学研究所以; BCA 微量蛋白测定试剂盒购自 Pierce 公司; Annexin V-PE 凋亡检测试剂盒购自 Oncogene 公司; 硝酸纤维素膜和 ECL 发光试剂为英国 Amersham 公司产品; 二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)、佛波脂(PMA)、蛋白酶 K、脂多糖(LPS)和胰酶均购自 Sigma 公司; 兔抗 NF- κ B 抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 细胞因子检测试剂盒为美国 R&D 公司产品。

1.2 Mp M129 标准株的培养及 LAMP 的提取

将 M129 株接种于 SP-4 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 5~7 天后, 培养基的颜色由红变橘黄, 且清亮不混浊, 表明有 Mp 生长。LAMP 的提取按文献^[6]进行, 收集 500 mL 生长至对数期的 Mp 的菌体, 将其浮于 5 mL 含有 1 mmol/L EDTA 的 Tris 缓冲盐液(TBSE)当中, 随后加入 2% Triton X-114, 4 $^{\circ}$ C 静置 1 h, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 使其发生相分离。弃去上层水相, 加入等体积的 TBSE, 重复相分离过程 1 次。第 2 次相分离结束, 弃去水相, 再加入等体积 TBSE 恢复至最初体积。最后加入 2.5 倍体积无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 过夜以沉淀 LAMP。次日于 14k rpm 离心 20 min, 弃上清, PBS 重悬浮 LAMP, 超声处理 1~3 min, 离心取上清蛋白。BCA 测定蛋白浓度,

-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 巨噬细胞的准备

THP-1 细胞按 1×10^9 个/L 转入 24 孔培养板(Costar, USA), 每孔 1 mL, 培养 1 天后加入终浓度为 40 ng/mL 的 PMA 诱导 24 h, 使 THP-1 细胞分化为巨噬细胞。

1.4 ELISA 测定细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平

分别用含 0.5~3.5 mg/L LAMP 的无血清培养基培养巨噬细胞 24 h, 同时用 1 mg/L LPS 作阳性对照。收集经处理的细胞上清液, 于 4 $^{\circ}$ C, 离心 5 min 后取上清液储存于 -70 $^{\circ}$ C 用于细胞因子检测。取培养上清液测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量。具体操作按试剂盒说明书进行, 以标准品 1000、500、250、125、62.5、32、16、0 μ g/mL 之 OD₄₉₀ 值作标准曲线, 用酶标仪测定并计算出相应的细胞因子的 OD₄₉₀ 值和含量。

1.5 细胞凋亡率测定

实验分 4 组进行, 每组设 3 个复孔: ①巨噬细胞空白对照组; ②PBS 对照组; ③2.5 mg/L LAMP 作用组; ④25 μ mol/L PDTC 预处理细胞 30 min 后再用含 2.5 mg/L LAMP 作用组。巨噬细胞分别按上述分组处理 24 h, 然后用 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入胰蛋白酶消化细胞并用预冷的 $1 \times$ 结合缓冲液调整细胞浓度到 1×10^9 个/L。加入 10 μ L Annexin V-PE 染色, 流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.6 Western blot 检测 NF- κ B 的转位

为说明 NF- κ B 激活后是否从胞浆转位到胞核内, 按参考文献^[8]方法提取分组(同细胞凋亡检测)处理细胞的核蛋白, 用 BCA 微量蛋白测定试剂盒测定所提取的核蛋白的浓度。10 μ g 蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移至硝酸纤维素膜上, 然后经 5% 脱脂牛奶 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜后与兔抗 NF- κ B 抗体室温孵育 2 h, 经 TBST 洗膜后与 HRP 标记的羊抗兔 IgG 孵育 1 h。经洗膜后用 ECL 发光试剂显色。

1.7 统计分析

结果用统计学软件 SPSS 16.0 处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数的多重比较采用 LSD-t 法, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 LAMP 诱导人巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6

0.5~3.5 mg/L LAMP 能刺激 THP-1 来源的巨

噬细胞分泌 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 三种前炎症细胞因子。当 LAMP 浓度为 2.5 mg/L 时,三种细胞因子分泌水平最高,分别为 1767.2 \pm 159.0 ng/L, 277.3 \pm 30.5 ng/L 和 49.7 \pm 5.2 ng/L,与对照组相比,差异有显著性($P < 0.001$)。用 LAMP 刺激 PDTC 预

处理的巨噬细胞,与 PDTC 未处理组相比, TNF- α 的分泌水平降低至 27.7%, IL-1 β 减少至 18.4%, IL-6 为未处理组的 31.4%。LAMP 刺激 PDTC 处理组和未处理组巨噬细胞分泌的 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 差异有显著性($P < 0.001$;表 1)。

表 1. LAMP 诱导人巨噬细胞分泌 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 (ng/L)

Table 1. TNF- α , IL-1 β and IL-6 induced by LAMP in macrophages cells (pg/mL)

指 标	LPS(1 mg/L)	PBS	LAMP(mg/L)				PDTC(25 μ mol/L)
			0.5	1.5	2.5	3.5	
TNF- α	1392.6 \pm 120.3	102.1 \pm 8.5	695.5 \pm 82.3	1059 \pm 113.4	1767.2 \pm 159.0 ^a	1689.7 \pm 162.2	489.7 \pm 59.9
IL-1 β	468.5 \pm 34.4	25.5 \pm 3.6	132.2 \pm 12.9	151.5 \pm 13.6	277.3 \pm 30.5 ^a	237.1 \pm 29.0	51.1 \pm 5.6
IL-6	41.6 \pm 33.7	10.4 \pm 2.0	28.6 \pm 3.1	41.1 \pm 3.77	49.7 \pm 5.2 ^a	43.5 \pm 6.6	15.6 \pm 1.9

a 为 $P < 0.001$,与 PDTC 处理组和 PBS 组比较。

2.2 细胞凋亡测定结果

LAMP 处理组巨噬细胞 12 h 和 24 h 的凋亡率分别为 8.36% \pm 1.19% 和 12.31% \pm 1.75%,与 PBS 对照组 2.25% \pm 0.40% 和 2.59% \pm 0.51% 比较差异有显著性($P < 0.001$)。与仅用 M_p LAMP 处理的细胞相比,在用 PDTC 预处理后再用 LAMP 刺激细胞时,细胞的凋亡率显著降低到 4.20% \pm 0.81% 和 5.69% \pm 1.01% ($P < 0.001$;图 1 和图 2)。

正常细胞和 PBS 处理细胞的核提取物中未检测到 NF- κ B (图 3)。这些结果表明 M_p LAMP 能诱导激活人巨噬细胞的 NF- κ B,使其从细胞浆中转位到细胞核内。与仅用 M_p LAMP 处理的细胞相比,在 PDTC 预处理后再用 LAMP 刺激的细胞核提取物中, NF- κ B 的表达水平降低(图 3),说明 PDTC 能抑制巨噬细胞 NF- κ B 的激活。

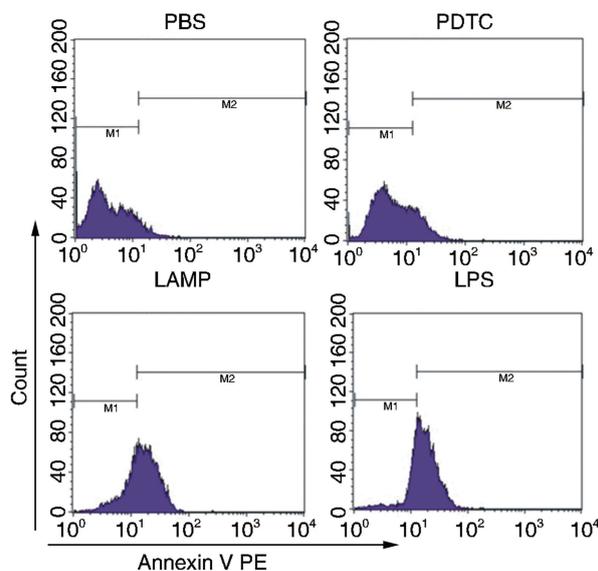


图 1. 流式细胞检测巨噬细胞凋亡

Figure 1. The apoptosis of macrophages detected by flow cytometry

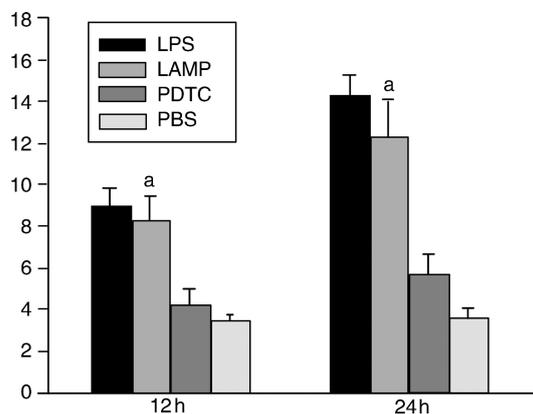


图 2. 巨噬细胞凋亡率 a 为 $P < 0.001$,与 PDTC 处理组和 PBS 组比较。

Figure 2. The apoptosis rates of macrophages

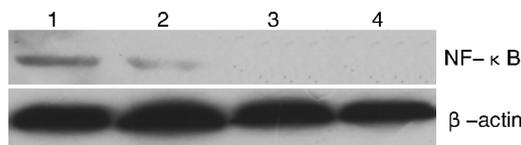


图 3. Western blot 检测细胞核提取物中的 NF- κ B 1 为 2.5 mg/L LAMP 作用 1 h, 2 为 25 μ mol/L PDTC 预处理细胞 30 min 后再用 2.5 mg/L LAMP 作用 1 h, 3 为 PBS 作用 1 h, 4 为未经处理的巨噬细胞。

Figure 3. Detection of NF- κ B from nuclear extract by Western blot

2.3 M_p LAMP 诱导 NF- κ B 的激活

提取各组处理的巨噬细胞的核蛋白, Western blot 分析细胞核中 NF- κ B 的表达。LAMP 处理组的核提取物中可检测到 NF- κ B 特异性蛋白条带,而从

3 讨论

Mp 是社区获得性肺炎的主要病原体,发病以青少年多见,近年来研究发现 50~70 岁的 As 患者, Mp 的感染率显著高于健康对照组^[7,8] Mp 引发 As 的机制尚不清楚。

炎症是 As 过程中许多病理生理改变的共同基础,本实验发现 Mp 的 LAMP 能激活巨噬细胞分泌高水平的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6,这三种前炎症细胞因子既能促进机体固有免疫系统清除病原体,也能影响机体炎症反应的发生发展而引起组织损伤。如 TNF- α 可以促使极低密度脂蛋白(VLDL)过量生成、降低高密度脂蛋白(HDL)水平及诱导胰岛素抵抗,诱导脂类和糖类代谢异常^[9-11];也可抑制一氧化氮合酶的生成、诱导血管内皮细胞的凋亡及刺激内皮细胞表达黏附分子,导致内皮细胞功能障碍,促使血栓形成^[12,13];IL-6 可调节人表皮成纤维细胞释放 MMP-1 和 MMP-2,增加 MMP-9 和 MMP-13 的表达,并可调节基质金属蛋白酶的功能,使胶原分解代谢增加,胶原减少,导致不稳定斑块破裂^[12,14]。IL-1 可致胶原酶和胶原产生,从而刺激成纤维细胞和平滑肌细胞增殖^[12]。因此, Mp LAMP 可通过促进巨噬细胞分泌这三种细胞因子加速心血管平滑肌损伤和粥样斑块的形成与发展。

吞噬性清除凋亡细胞是巨噬细胞的重要生理功能,在 As 斑块的发生、发展和维护斑块的稳定性过程中具有重要作用^[15]。诸多危险因素(ox-LDL、感染等)都可以导致血管壁内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞的凋亡。用 Mp LAMP 处理巨噬细胞后,正常存在于胞浆中的 NF- κ B 被激活后转位到细胞核内,且 NF- κ B 的特异性抑制剂 PDTC 能显著抑制 NF- κ B 的转位。流式细胞术分析显示 PDTC 能显著地抑制 LAMP 处理的巨噬细胞发生凋亡。表明 Mp LAMP 诱导的巨噬细胞凋亡与 NF- κ B 的激活有关。

本研究表明 Mp LAMP 能通过激活 NF- κ B,促进巨噬细胞分泌前炎症细胞因子和促进巨噬细胞凋亡,这可能有利于 As 的形成。但 As 的形成与发展是一个复杂而长期的过程,有关 Mp 引发 As 的确切的发病机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Cook PJ, Lip GVH. Infect ions agent s and atherosclerotic vascular disease [J]. J Med, 1996, 89: 727-735.
- [2] Ellis RW. Infect ion and coronary heart disease [J]. J Med Microbiol, 1997, 46: 535-539.
- [3] Dallo SF, Baseman JB. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas[J]. Microb Pathog, 2000, 29 (5): 301-309.
- [4] Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62 (4): 1 094-156.
- [5] Higuchi ML, G6is JM, Reis MM, et al. Co-infection ratios versus inflammation, growth factors and progression of early atheromas [J]. APMIS, 2006, 114 (5): 338-344.
- [6] Rawadi G, Roman-Roman S. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide [J]. Infect Immun, 1996, 64 (2): 637-643.
- [7] Bayram A, Erdogan MB, Eksi F, et al. Demonstration of chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in atherosclerotic coronary arteries, nonrheumatic calcific aortic and rheumatic stenotic mitral valves by polymerase chain reaction [J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2011, 11 (3): 237-243.
- [8] Maia IL, Nicolau JC, Machado MN, et al. Prevalence of chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae in different forms of coronary disease[J]. Arq Bras Cardiol, 2009, 92 (6): 405-411, 422-428, 439-445.
- [9] Qin B, Anderson RA, Adeli K. Tumor necrosis factor-alpha directly stimulates the overproduction of hepatic apolipoprotein B100-containing VLDL via impairment of hepatic insulin signaling [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294 (5): G1 120-129.
- [10] Popa C, Netea MG, van Riel PL, et al. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk [J]. J Lipid Res, 2007, 48 (4): 751-762.
- [11] Rizvi AA. Inflammation markers as mediators of vascul endothelial dysfunction and atherosclerosis in the metabolic syndrome [J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120 (21): 1 918-924.
- [12] Kleemann R, Zedelaa rS, KooistraT. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79 (3): 360-376.
- [13] Zhang H, Park Y, Wu J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction [J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116 (3): 219-230.
- [14] Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review[J]. Plos Med, 2008, 5 (4): e78.
- [15] González-Navarro H, Abu Nabah YN, Vinué, et al. p19ARF deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55 (20): 2 258-268.

(此文编辑 李小玲)