

本文引用: 张雨珂, 赵茜, 张利军, 等. 泛醌氧化还原酶铁硫蛋白 4 通过影响线粒体功能参与肺炎衣原体感染诱导的血管平滑肌细胞焦亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(7): 573-580. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.07.003.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-07-0573-08

· 实验研究 ·

泛醌氧化还原酶铁硫蛋白 4 通过影响线粒体功能参与肺炎衣原体感染诱导的血管平滑肌细胞焦亡

张雨珂, 赵茜, 张利军, 王蓓蓓, 苗国琳, 张琪, 张丽菁
(天津医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 天津市 300070)

[摘要] **[目的]** 探究肺炎衣原体(*C. pn*)感染诱导血管平滑肌细胞(VSMC)焦亡及其可能机制。**[方法]** 组织贴块法培养大鼠原代 VSMC, 利用 *C. pn* 感染 VSMC 模型, 使用倒置相差显微镜观察 *C. pn* 感染后 VSMC 形态学的变化, 试剂盒检测 *C. pn* 感染 VSMC 后乳酸脱氢酶(LDH)含量变化, Western blot 实验检测 GSDMD 和 Caspase-1 的表达, 串联质谱标签法定量蛋白质组学实验和 GO 富集分析检测线粒体氧化磷酸化和氧化呼吸链 Complex 相关蛋白的变化。**[结果]** 与对照组相比, 倒置相差显微镜下可见 *C. pn* 感染后 VSMC 膜外出现气泡状囊泡, *C. pn* 感染 VSMC 36 h、48 h 后 LDH 含量分别增加 38.92% 和 79.54% (均 $P < 0.001$), 焦亡相关蛋白 GSDMD 表达增加 1.74 倍和 1.67 倍 (均 $P < 0.001$); *C. pn* 感染 VSMC 48 h 后 Caspase-1 表达 (pro-Caspase-1) 和活性 (Caspase-1 p12/p10) 分别增加 2.69 倍和 3.47 倍 (均 $P < 0.001$); 质谱结果显示, *C. pn* 感染 VSMC 后有 20 种差异表达的蛋白质富集在氧化磷酸化通路中, 同时发现, Complex I 泛醌氧化还原酶铁硫蛋白 4 (NDUFS4) 下降最为显著。进一步的 Western blot 实验结果显示, *C. pn* 感染 VSMC 36 h、48 h 后 NDUFS4 的表达水平分别下降了 57.5% 和 57% (均 $P < 0.001$)。**[结论]**

C. pn 感染可能通过抑制 NDUFS4 表达影响线粒体功能, 从而诱导 VSMC 焦亡。

[关键词] 肺炎衣原体; 血管平滑肌细胞; 焦亡; 泛醌氧化还原酶铁硫蛋白 4

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Ubiquinone oxidoreductase iron-sulfur protein 4 participates in vascular smooth muscle cell pyroptosis induced by *Chlamydia pneumoniae* infection through affecting mitochondrial function

ZHANG Yuke, ZHAO Xi, ZHANG Lijun, WANG Beibei, MIAO Guolin, ZHANG Qi, ZHANG Lijun

(Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[ABSTRACT] **Aim** To explore the pyroptosis of vascular smooth muscle cell (VSMC) induced by *Chlamydia pneumoniae* (*C. pn*) infection and its possible mechanisms. **Methods** Primary rat VSMC were cultured by explant method. After the model of VSMC infected with *C. pn* was established, the changes in morphology of VSMC were observed under an inverted phase microscope, the lactic dehydrogenase (LDH) content was detected by the kit, and the expression levels of GSDMD and Caspase-1 were determined by Western blot, the changes in mitochondrial oxidative phosphorylation and the expression of complex-related proteins were measured by quantitative proteomic analysis by tandem mass tag technology and gene ontology. **Results** Compared with the control group, bubble-like vesicles were found outside the membrane of VSMC after *C. pn* infection under an inverted phase microscope. After *C. pn* infection of VSMC for 36 h and 48 h, LDH content increased by 38.92% and 79.54% ($P < 0.001$), respectively, and the expression of pyroptosis-related protein GSDMD increased by 1.74 times and 1.67 times ($P < 0.001$). After *C. pn* infection of VSMC for 48 h, the expression (pro-Caspase-1) and activity (Caspase-1 p12/p10) of Caspase-1 increased by 2.69 times and 3.47 times ($P < 0.001$), respectively. The mass spectrometry results showed that there were 20 differentially expressed proteins en-

[收稿日期] 2022-10-10

[修回日期] 2023-01-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82070452)

[作者简介] 张雨珂, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail: 13781155403@163.com。通信作者张丽菁, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail: lijunwz@hotmail.com。

riched in the oxidative phosphorylation pathway after *C. pn* infection, and at the same time, Complex I ubiquinone oxidoreductase iron-sulfur protein 4 (NDUFS4) decreased significantly. Further Western blot results showed that the expression level of NDUFS4 decreased by 57.5% and 57% ($P < 0.001$) after *C. pn* infection of VSMC for 36 h and 48 h respectively. **Conclusion** *C. pn* infection may induce VSMC pyroptosis by affecting mitochondrial function through downregulating NDUFS4 expression.

[**KEY WORDS**] *Chlamydia pneumoniae*; vascular smooth muscle cell; pyroptosis; ubiquinone oxidoreductase iron-sulfur protein 4

大量基础与临床研究表明,肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*, *C. pn*) 感染与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 性心血管疾病密切相关^[1-2]。*C. pn* 是一种严格的真核细胞内寄生的革兰氏阴性病原体,其引起的呼吸道感染在临床上非常普遍,一般经呼吸道感染肺泡单核/巨噬细胞后循血行可感染血管壁细胞,从而参与 As 发生发展。研究证实,*C. pn* 感染血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 之后不仅可通过促进 VSMC 增殖^[3]、迁移^[1]参与 As 病变形成,还能促进 VSMC 分泌基质金属蛋白酶 1、3 和 9^[4-5],并可降低 I 型和 III 型胶原蛋白及纤连蛋白的表达水平,进而加剧斑块的不稳定^[6]。VSMC 的死亡以及胶原蛋白和细胞外基质的降解可使纤维帽变薄,进而增加斑块的不稳定性。近年来,人们开始关注细胞焦亡在 As 发生发展中的作用。Li 等^[7]发现,氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 可以通过激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 诱导 VSMC 焦亡。另有文献报道,*C. pn* 感染可通过激活 NLRP3 诱导巨噬细胞泡沫化从而加速 As 病变进展^[8]。本研究旨在探索 *C. pn* 感染能否引起 VSMC 焦亡及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 8 周龄 150 g 左右的 SD 大鼠,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

肺炎衣原体 (*C. pn*) 购自美国 ATCC, 单克隆兔抗大鼠 Gasdermins D (GSDMD) 抗体、单克隆兔抗大鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 1 前体+p12+p10 (pro-Caspase-1+p12+p10) 抗体、单克隆兔抗大鼠泛醌氧化还原酶铁硫蛋白 4 (ubiquinone oxidoreductase iron-sulfur protein 4, NDUFS4) 抗体购自美国 Abcam 公司;单克隆小鼠抗大鼠 β -actin 抗体、辣根过氧化

物酶标记羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;反转录试剂盒、qPCR 试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司)、多功能酶标仪和实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司), Multiple Affinity Removal LC Column (安捷伦有限公司), Pierce™ High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit 和 C18 上样柱、C18 分析柱 (赛默飞世尔科技中国有限公司)。

1.3 组织贴块法培养大鼠原代 VSMC

将 8 周龄 SD 大鼠麻醉后进行脱颈处死,手术区备皮、消毒后,取大鼠胸主动脉,放置于添加 4 mL 预冷的 D-Hank's 液的培养皿中,洗去血管中残余血液;仔细分离剥去血管结缔组织;纵行剖开主动脉,刮去血管内膜内皮细胞;分离血管中膜与外膜;收集中膜,剪碎中膜后将组织块均匀贴于培养瓶瓶底,加入适量含 20% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基 (含青、链霉素),瓶底向上在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置 4 h;4 h 后将培养瓶翻转回来,使培养基没过组织块继续培养^[9]。待 VSMC 融合度达 70% ~ 80%,用胰蛋白酶消化液消化 VSMC,使用免疫荧光法检测 VSMC 特异性 α -SM actin 的表达,以鉴定 VSMC。

1.4 *C. pn* 感染 VSMC

收集在人喉癌细胞株 (human epidermoid carcinoma-2 cell, HEp-2) 中增殖培养好的 *C. pn*,在蔗糖-磷酸-谷氨酸缓冲液 (sucrose-phosphate-glutamate, SPG) 中 -80 °C 保存。将大鼠原代 VSMC 种植于 6 孔板内,待细胞融合度达到 80% 时弃原培养基,每孔加入 6 mL *C. pn* 离心液和 40 μ L *C. pn* 悬液 (5×10^5 IFU), 2 500 r/min 室温离心 50 min,放入细胞培养箱内培养 2 h 后弃净离心液,每孔加入 2 mL *C. pn* 生长液,继续培养^[10]。

1.5 倒置相差显微镜观察 VSMC 形态

将大鼠原代 VSMC 种植于 6 孔板内,待细胞融合度达到 80% 时弃去原培养基,加入 *C. pn* 离心液

和 *C. pn* 悬液, 室温离心之后加入 *C. pn* 生长液, 对照组加入等量 SPG 缓冲液, 继续培养 36 h 后倒置相差显微镜下观察 VSMC 形态改变并拍照。

1.6 LDH 含量测定

C. pn 感染 VSMC 36 h 和 48 h 后收集细胞, 加入 1 mL LDH 提取液, 超声破碎细胞, 4 °C 下 9 200 r/min 离心 10 min, 取上清, BCA 测定样本蛋白浓度, 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长至 450 nm, 蒸馏水调零, 将标准品稀释为 2、1、0.5、0.25、0.125、0 mmol/L 做标准曲线。按照说明书步骤将样本加入 Ep 管中, 充分混匀, 室温孵育 30 min, 取 200 μ L 转移至 96 孔板中, 450 nm 处测定吸光度, 按照说明书提供的方法计算 LDH 含量。

1.7 qRT-PCR

C. pn 感染 VSMC 24 h 和 36 h 后用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 用反转录试剂盒合成 cDNA, 之后做实时荧光定量 PCR。因 Caspase 具有种属差异, 因此, 我们确认了鼠类 Caspase 家族成员^[11], 并设计引物, 各引物序列见表 1。

表 1. 引物序列
Table 1. Primer sequences

引物	序列(5'-3')
β -actin	F:CCATGTTCCAAAACCATTC R:GGCAACCTTCCCAATAAAT
Caspase-1	F:GAAACGCCATGGCTGACAAG R:ACATGATCGCACAGGTCTCG
Caspase-2	F:CCAGACTGCACAGGAAATGCAAG R:CCATCTTGCTGGTCAACCCC
Caspase-3	F:GAGCTTGAACGCGAAGAAA R:CCATGCGAGCTGACATTC
Caspase-6	F:ACAGAACTAGGGAAGTGTGG R:CCCGAGGTCGTTAAAGCAT
Caspase-7	F:CTATGTGCCCCGTCAGTACC R:TCTTTGTCCGTCCATTCCG
Caspase-8	F:CCTCTGACCTCCGGTGTTTTA R:ATGTGGTCCAAGCACAGGAA
Caspase-9	F:ACCTGGATCTGGACTGCGT R:GACAGGAGACTTGATCAGTGGG
Caspase-11	F:GACAAGCGCTGGTTTTTGT R:GAGTACGGCCATTGGTCTCC
Caspase-12	F:AAATCGGAGAAGGAGCGAGC R:AGCTGTTTGTCCGAAATTGGC
Caspase-14	F:ACGATTAATCCCCAGCCCTTG R:CTTTGGTGACACACAGCGTC

1.8 Western blot 检测蛋白表达

收集 *C. pn* 感染 36 h 和 48 h 后的 VSMC, 裂解

后提取 VSMC 总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度, 95 °C 加热 10 min 使蛋白变性。用 10% SDS-PAGE 电泳进行分离后转移到 PVDF 膜, 5% BSA 室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜。PBST 洗膜, 加入 PBST 稀释的二抗, 室温孵育 1 h。PBST 洗膜后, 用 ECL 试剂盒进行化学发光反应, 放入自动曝光机, 读取结果, 用分析软件对条带进行光密度分析, 并以 β -actin 进行标准化。

1.9 串联质谱标签法定量蛋白质组学

C. pn 感染 VSMC 后收集细胞, 超声裂解后, 采用 BCA 法测定蛋白的质量浓度, 用 PBS 将蛋白的质量浓度调整为 20 mg/L, 沸水浴 5 min, 每孔上样 20 μ L 后进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后考马斯亮蓝染色。之后经过 FASP 酶解、TMT 标记和 RP 分级后进行质谱检测。用 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析。检测方式为正离子, 母离子扫描范围 300 ~ 1 800 m/z, 一级质谱分辨率为 70 000 at 200 m/z, AGC target 为 3e6, 一级 Maximum IT 为 10 ms, Number of scan ranges 为 1, Dynamic exclusion 为 40.0 s; 每次全扫描后采集 10 个碎片图谱; 二级质谱分辨率 17 500 at 200 m/z (TMT6plex), 35 000 at 200 m/z (TMT10plex), Microscans 为 1, 二级 Maximum IT 为 60 ms, Normalized Collision Energy 为 30 eV, Underfill 为 0.1%。

1.10 统计学处理

用软件 Mascot 2.2 和 Proteome Discoverer 1.4 进行查库鉴定及定量分析; SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示实验结果。采用 *t* 检验分析两组间差异, 单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行多组间数据比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *C. pn* 感染后 VSMC 形态学变化

倒置相差显微镜下可见 *C. pn* 感染的 VSMC 膜外产生气泡状凸出物 (图 1 箭头所示), 而对照组细胞未发现这种变化, 提示 *C. pn* 感染可能使 VSMC 发生焦亡。

2.2 *C. pn* 感染诱导 VSMC 焦亡

2.2.1 *C. pn* 感染诱导 VSMC 死亡 利用体外 *C. pn* 感染 VSMC 模型, 在感染 36 h 和 48 h 后分别检测细胞中 LDH 的含量, 以观察细胞死亡情况。实验结果显示, *C. pn* 感染 VSMC 36 h、48 h 后 LDH 含量较对照组 (0 h) 分别增加 38.92% 和 79.54% (均

$P < 0.001$; 图 2)。

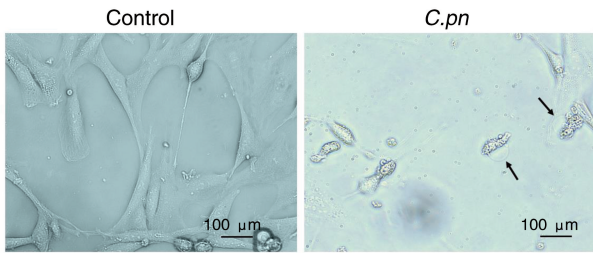


图 1. 倒置相差显微镜观察 *C. pn* 感染后 VSMC 的形态学变化

图中黑色箭头所示为分布于 VSMC 膜外的气泡状凸出物。

Figure 1. Morphological changes of VSMC after *C. pn* infection are observed under an inverted phase microscope

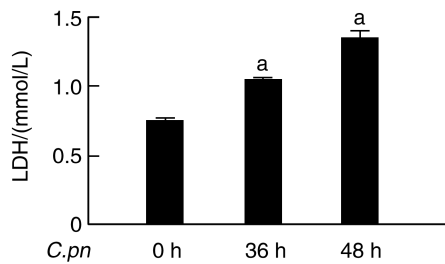


图 2. *C. pn* 感染促进 VSMC 释放 LDH ($n=4$)
a 为 $P < 0.001$, 与 *C. pn* 感染 0 h 比较。

Figure 2. *C. pn* infection promotes LDH release from VSMC ($n=4$)

2.2.2 *C. pn* 感染 VSMC 增加 GSDMD 的表达

Western blot 结果显示, 与对照组 (0 h) 相比, *C. pn* 感染 VSMC 36 h, 48 h 后 GSDMD 的表达水平分别增加 1.74 倍和 1.67 倍 (均 $P < 0.001$; 图 3)。

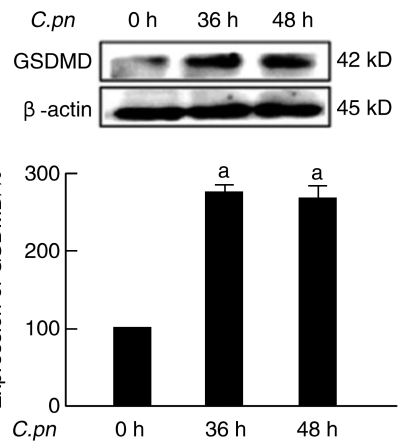


图 3. *C. pn* 感染诱导 VSMC 中 GSDMD 蛋白表达 ($n=4$)
a 为 $P < 0.001$, 与 *C. pn* 感染 0 h 比较。

Figure 3. *C. pn* infection induces GSDMD protein expression in VSMC ($n=4$)

2.2.3 *C. pn* 感染促进 VSMC 中 Caspase-1 的表达及活化

利用 qRT-PCR 技术检测 *C. pn* 感染 VSMC 24 h 和 36 h 后 Caspase 家族成员 mRNA 水平的变化。结果显示, 与对照组 (0 h) 相比, *C. pn* 感染 VSMC 后, Caspase-1 mRNA 的表达分别上升 2.16 倍和 2.57 倍 (均 $P < 0.001$), 而 Caspase-2、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-11、Caspase-12 和 Caspase-14 的 mRNA 表达水平变化无统计学差异; 随后, 采用 Western blot 实验检测了 Caspase-1 的表达 (pro-Caspase-1) 和活性 (Caspase-1 p12/p10^[12]), 发现 *C. pn* 感染 VSMC 48 h 后 Caspase-1 表达和活性分别增加 2.69 倍和 3.47 倍 (均 $P < 0.001$; 图 4)。

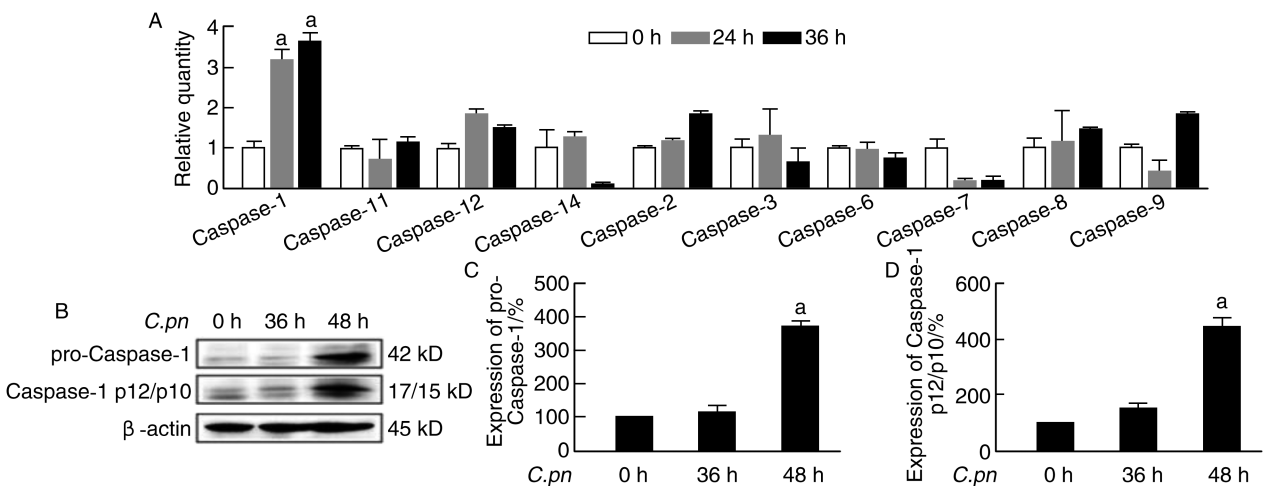


图 4. *C. pn* 感染对 VSMC 中 Caspase-1 mRNA 和蛋白表达及活性的影响 ($n=4$)

A 为 *C. pn* 感染后 VSMC 中 Caspase 家族 mRNA 表达水平; B ~ D 为 *C. pn* 感染后 VSMC 中 Caspase-1 蛋白的表达和活性变化。

a 为 $P < 0.001$, 与 *C. pn* 感染 0 h 比较。

Figure 4. Effects of *C. pn* infection on Caspase-1 mRNA and protein expression and activity in VSMC ($n=4$)

2.3 *C. pn* 感染影响 VSMC 线粒体氧化磷酸化相关通路

为进一步观察 *C. pn* 感染对 VSMC 线粒体功能的影响,我们利用串联质谱标签法定量蛋白质组学

实验和 GO 富集分析发现,*C. pn* 感染 VSMC 后,有 20 种差异表达的蛋白质富集在氧化磷酸化通路中(图 5)。表明 *C. pn* 感染可能会导致 VSMC 线粒体功能紊乱。

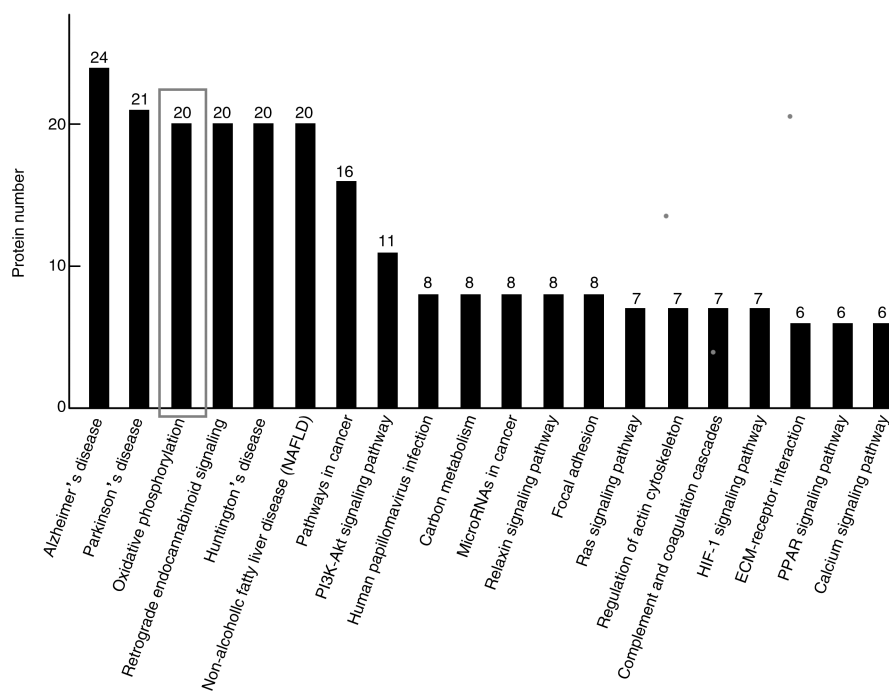


图 5. *C. pn* 感染影响 VSMC 线粒体的氧化磷酸化相关通路

Figure 5. *C. pn* infection affects the mitochondrial oxidative phosphorylation-related pathway in VSMC

2.4 *C. pn* 感染可下调 VSMC 线粒体 Complex I NDUFS4 表达

为探讨 *C. pn* 感染是否会通过影响 Complex 相关蛋白的表达导致线粒体功能紊乱,本研究在上述实验基础上进一步利用串联质谱标签法定量蛋白质组学实验检测 *C. pn* 感染 VSMC 后 Complex 相关蛋白的变化情况。结果表明,在所有 Complex I 相关蛋白中,NDUFS4 下降最为显著(图 6A)。进一步的 Western blot 实验显示,*C. pn* 感染 VSMC 36 h 和 48 h 后,NDUFS4 蛋白表达较对照组(0 h)分别下降了 57.5% 和 57% (均 $P < 0.001$) (图 6B)。这些实验结果表明,*C. pn* 感染可下调 NDUFS4 表达。

3 讨论

心血管疾病的发病率与死亡率居高不下,严重威胁人类健康,而 As 是其主要病理基础。As 斑块不稳定造成的斑块破裂是急性心血管事件发生的主要原因。因此,阐明导致 As 斑块不稳定的因素及

其作用机制,寻找新的治疗靶点,已成为心血管疾病防治领域亟待解决的问题。

C. pn 感染与斑块不稳定密切相关。它可促使巨噬细胞分泌白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)^[8],也能够使 VSMC 和内皮细胞分泌 IL-17^[13-14],进而加重纤维帽的炎症反应,增加斑块的不稳定性^[8,15]。但其导致 As 斑块不稳定的具体机制仍有待进一步阐明。Pan 等^[16]报道,ox-LDL 可诱导 VSMC 焦亡,加重 As 病变程度。研究显示,人和小鼠的 As 斑块内的 VSMC 发生焦亡后可能与斑块不稳定相关^[7]。革兰氏阴性菌的细胞壁成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可通过激活 NLRP3 炎性小体促进 H9c2 心肌细胞焦亡^[17]。此外,*C. pn* 感染也可通过激活 NLRP3 引起牙龈上皮细胞炎症反应^[18]。而 NLRP3 可介导细胞焦亡经典途径。关于 *C. pn* 感染究竟能否诱导 VSMC 焦亡,目前尚不清楚。

本研究结果显示,*C. pn* 感染后,VSMC 膜外出现气泡状凸出物,VSMC 中的 GSDMD 和 Caspase-1

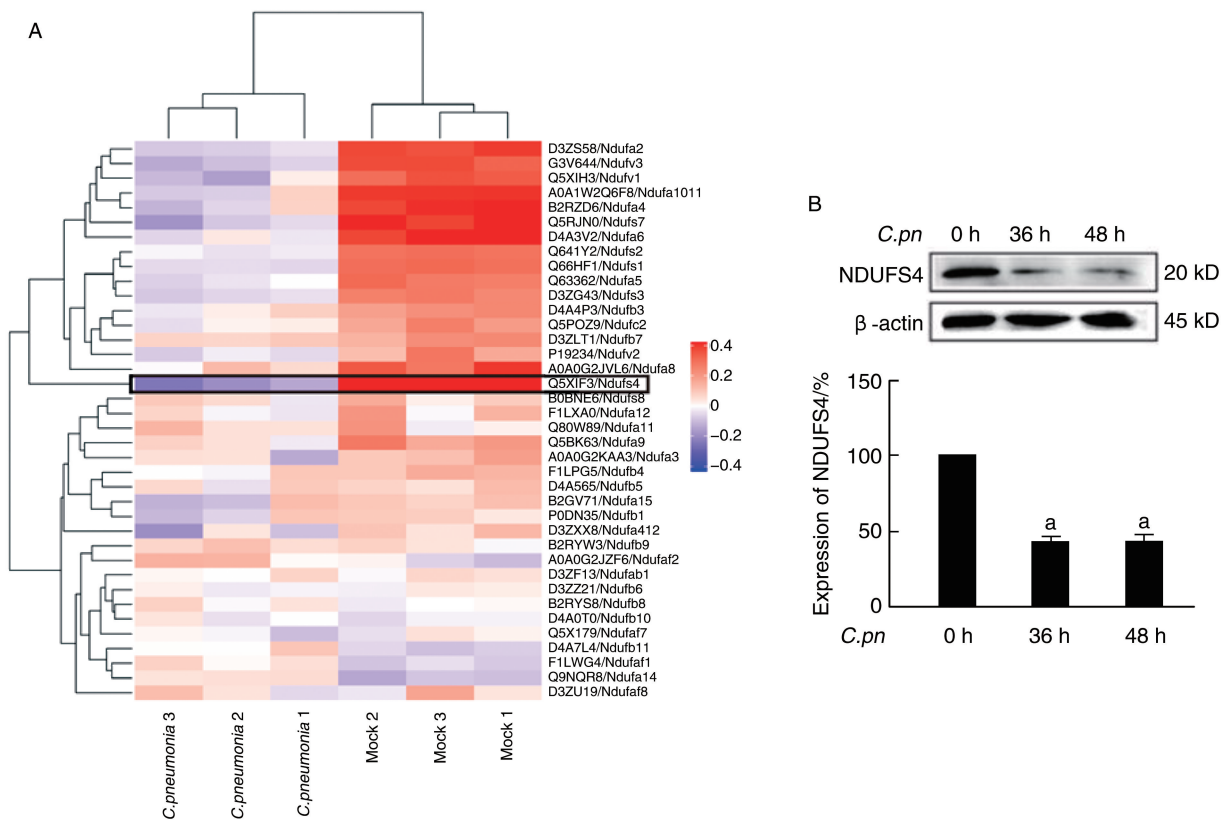


图 6. *C. pn* 感染对 VSMC 线粒体呼吸链 Complex I NDUFS4 表达的影响

A 为串联质谱标签法定量蛋白质组学分析 *C. pn* 感染 VSMC 后线粒体呼吸链 Complex I 相关蛋白的变化;

B 为 *C. pn* 感染 VSMC 后 NDUFS4 蛋白的表达 ($n=4$)。a 为 $P<0.001$, 与 *C. pn* 感染 0 h 比较。

Figure 6. Effect of *C. pn* infection on the expression of Complex I NDUFS4 in mitochondrial respiratory chain in VSMC

蛋白表达水平及培养液中 LDH 含量均明显升高,同时 Caspase-1 的活性也显著增强。说明 *C. pn* 感染可诱导 VSMC 发生焦亡。既往研究主要证实 *C. pn* 感染可以促进 VSMC 增殖、黏附^[19]、迁移^[1]以及向促炎表型的转换^[20],进而参与 As 发生发展。本研究首次从细胞焦亡的角度探讨了 *C. pn* 感染对 VSMC 的影响,为研究 *C. pn* 感染导致 As 斑块不稳定的机制提供了新思路。Zhu 等^[21]发现,丹参酚酸 A 通过抑制内皮细胞焦亡可延缓 As 斑块形成。NR1D1 的缺失也可导致巨噬细胞焦亡进而引起易损斑块破裂^[22]。由此可见,细胞焦亡与斑块不稳定密切相关。因此,以 VSMC 焦亡为切入点,揭示 *C. pn* 感染导致 As 斑块不稳定的新机制,进而寻找新的防治靶点可能成为未来研究的一个新方向。

mtROS 可导致人脐静脉内皮细胞焦亡^[23]。本课题组之前的研究证实 *C. pn* 感染 VSMC 后可使 VSMC 内 mtROS 含量增加^[1]。有文献报道,*C. pn* 感染可影响宿主细胞的线粒体功能,并促进 mtROS 生成增加^[24]。Nisr 等^[25]发现,胰岛素可通过提高线

粒体氧化磷酸化的耦合效率改善线粒体功能。也有研究证实,缺血可影响线粒体氧化磷酸化从而导致线粒体功能损害^[26]。我们的研究发现,*C. pn* 感染可影响 VSMC 线粒体氧化磷酸化相关通路。提示 *C. pn* 感染可能通过调控 VSMC 线粒体氧化磷酸化相关通路导致线粒体功能紊乱。那么,*C. pn* 感染是如何导致线粒体功能紊乱的呢?

Complex I 与线粒体功能紊乱密切相关。Complex I 由多个功能不同的亚基组成,其中 Complex I 装配体是 Complex I 行使功能的核心亚基^[27]。NDUFS4 是 Complex I 装配体上的一个 18 kD 的亚基,对 Complex I 的装配和激活具有重要作用^[28]。NDUFS4 缺乏可引起电子输入域的铁硫簇变形,导致 Complex I 的稳定性和活性降低^[29],从而导致线粒体功能紊乱。有研究表明,NDUFS4 的表达缺失可导致 mtROS 水平增加^[30],我们的前期研究结果证实 *C. pn* 感染也可使 VSMC 内 mtROS 含量增加^[1]。那么 NDUFS4 是否参与 *C. pn* 感染引起的 VSMC 线粒体功能紊乱? 本研究结果显示,*C. pn* 感

染 VSMC 之后 NDUFS4 的表达显著下调,提示 *C. pn* 感染可能通过下调 NDUFS4 的表达引起线粒体功能紊乱。有研究发现巨噬细胞中 NDUFS4 的表达缺失可导致促炎基因上调,进而活化巨噬细胞,引起全身炎症反应^[31]。有学者认为线粒体功能紊乱可以触发先天性免疫反应和炎症^[32]。由此我们推测,*C. pn* 感染很有可能会通过下调 NDUFS4 表达引起线粒体功能紊乱,并促使某些促炎基因表达上调,进而诱发炎症反应,诱导细胞焦亡。本研究结果揭示了 *C. pn* 感染引起 VSMC 线粒体功能紊乱潜在的机制,为探讨 *C. pn* 感染导致 VSMC 焦亡的机制提供了新思路。

综上,*C. pn* 感染可能通过降低 NDUFS4 的表达引起 VSMC 线粒体功能紊乱,进而促使 mtROS 生成增多,最终诱导 VSMC 发生焦亡。但是,*C. pn* 感染如何导致 NDUFS4 下调? NDUFS4 下调后又如何促进 VSMC 焦亡? 这些机制都有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] ZHAO X, MIAO G L, ZHANG L J, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection induces vascular smooth muscle cell migration and atherosclerosis through mitochondrial reactive oxygen species-mediated JunB-Fra-1 activation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 879023.
- [2] KALAYOGLU M V, LIBBY P, BYRNE G I. *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease[J]. *JAMA*, 2002, 288(21): 2724-2731.
- [3] DENISET J F, CHEUNG P K M, DIBROV E, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection leads to smooth muscle cell proliferation and thickening in the coronary artery without contributions from a host immune response [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(2): 1028-1037.
- [4] RÖDEL J, PROCHNAU D, PRAGER K, et al. Increased production of matrix metalloproteinases 1 and 3 by smooth muscle cells upon infection with *Chlamydia pneumoniae* [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 38(2): 159-164.
- [5] MA L, ZHANG L J, WANG B B, et al. Berberine inhibits *Chlamydia pneumoniae* infection-induced vascular smooth muscle cell migration through downregulating MMP3 and MMP9 via PI3K [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 755: 102-109.
- [6] BAUMERT J, SCHMIDT K H, EITNER A, et al. Host cell cytokines induced by *Chlamydia pneumoniae* decrease the expression of interstitial collagens and fibronectin in fibroblasts[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(2): 867-876.
- [7] LI Y Y, NIU X, XU H T, et al. VX-765 attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice by modulating VSMCs pyroptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 389(1): 111847.
- [8] TUMURKHUU G, DAGVADORJ J, PORRITT R A, et al. *Chlamydia pneumoniae* hijacks a host autoregulatory IL-1 β loop to drive foam cell formation and accelerate atherosclerosis[J]. *Cell Metab*, 2018, 28(3): 432-448. e4.
- [9] MIAO G L, ZHAO X, CHAN S L, et al. Vascular smooth muscle cell c-Fos is critical for foam cell formation and atherosclerosis[J]. *Metabolism*, 2022, 132: 155213.
- [10] WANG B B, ZHANG L J, ZHANG T T, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection promotes vascular smooth muscle cell migration through a Toll-like receptor 2-related signaling pathway[J]. *Infect Immun*, 2013, 81(12): 4583-4591.
- [11] CRAWFORD E D, WELLS J A. Caspase substrates and cellular remodeling[J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80: 1055-1087.
- [12] LI W X, WEI D, LIANG J Y, et al. Comprehensive evaluation of white matter damage and neuron death and whole-transcriptome analysis of rats with chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 310.
- [13] ZHENG N B, ZHANG L J, WANG B B, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection promotes vascular smooth muscle cell migration via c-Fos/interleukin-17C signaling[J]. *Int J Med Microbiol*, 2019, 309(8): 151340.
- [14] CHEN S, SHIMADA K N H, ZHANG W X, et al. IL-17A is proatherogenic in high-fat diet-induced and *Chlamydia pneumoniae* infection-accelerated atherosclerosis in mice [J]. *J Immunol*, 2010, 185(9): 5619-5627.
- [15] ERBEL C, DENGLER T J, WANGLER S, et al. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(1): 125-134.
- [16] PAN J Y, HAN L, GUO J, et al. AIM2 accelerates the atherosclerotic plaque progressions in ApoE^{-/-} mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(3): 487-494.
- [17] QIU Z, HE Y H, MING H, et al. Lipopolysaccharide (LPS) aggravates high glucose- and hypoxia/reoxygenation-induced injury through activating ROS-dependent NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in H9c2 cardiomyocytes [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 8151836.
- [18] ALMEIDA-DA-SILVA C L C, ALPAGOT T, ZHU Y, et al. *Chlamydia pneumoniae* is present in the dental plaque of periodontitis patients and stimulates an inflammatory response in gingival epithelial cells [J]. *Microb Cell*, 2019, 6(4): 197-208.
- [19] SASU S, LAVERDA D, QURESHI N, et al. *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60

- stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation [J]. *Circ Res*, 2001, 89(3): 244-250.
- [20] RIVERA J, WALDUCK A K, STRUGNELL R A, et al. *Chlamydia pneumoniae* induces a pro-inflammatory phenotype in murine vascular smooth muscle cells independently of elevating reactive oxygen species [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(3): 218-226.
- [21] ZHU J, CHEN H, LE Y F, et al. Salvianolic acid A regulates pyroptosis of endothelial cells via directly targeting PKM2 and ameliorates diabetic atherosclerosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1009229.
- [22] WU Z N, LIAO F, LUO G Q, et al. NR1D1 deletion induces rupture-prone vulnerable plaques by regulating macrophage pyroptosis via the NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021. DOI: 10.1155/2021/5217572.
- [23] 章舒蕾, 梁亚敏, 罗涪方, 等. 琥珀酸通过活性氧途径诱导人脐静脉内皮细胞焦亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(1): 42-47.
- ZHANG S L, LIANG Y M, LUO C F, et al. Succinate induces pyroptosis of human umbilical vein endothelial cells via reactive oxygen species pathway [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(1): 42-47.
- [24] KÄDING N, KAUFHOLD I, MÜLLER C, et al. Growth of *Chlamydia pneumoniae* is enhanced in cells with impaired mitochondrial function [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 499.
- [25] NISR R B, AFFOURTIT C. Insulin acutely improves mitochondrial function of rat and human skeletal muscle by increasing coupling efficiency of oxidative phosphorylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1837(2): 270-276.
- [26] KUZMIK-GLANCY S, GLANCY B, KAY M W. Ischemic damage to every segment of the oxidative phosphorylation cascade elevates ETC driving force and ROS production in cardiac mitochondria [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2022, 323(3): H499-H512.
- [27] RODENBURG R J. Mitochondrial complex I-linked disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(7): 938-945.
- [28] SCACCO S, PETRUZZELLA V, BUDDE S, et al. Pathological mutations of the human NDUFS4 gene of the 18-kDa (AQDQ) subunit of complex I affect the expression of the protein and the assembly and function of the complex [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(45): 44161-44167.
- [29] STROUD D A, SURGENOR E E, FORMOSA L E, et al. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I [J]. *Nature*, 2016, 538(7623): 123-126.
- [30] VALSECCHI F, GREFFE S, ROESTENBERG P, et al. Primary fibroblasts of NDUFS4^{-/-} mice display increased ROS levels and aberrant mitochondrial morphology [J]. *Mitochondrion*, 2013, 13(5): 436-443.
- [31] JIN Z X, WEI W, YANG M, et al. Mitochondrial complex I activity suppresses inflammation and enhances bone resorption by shifting macrophage-osteoclast polarization [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(3): 483-498.
- [32] WEST A P. Mitochondrial dysfunction as a trigger of innate immune responses and inflammation [J]. *Toxicology*, 2017, 391: 54-63.
- (此文编辑 许雪梅)