

本文引用: 张琪, 张利军, 张雨珂, 等. C-X-C 趋化因子受体 4 增强 Toll 样受体 2 在肺炎衣原体感染促进动脉粥样硬化病变形成的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(2): 102-108. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.02.002.

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2024)32-02-0102-07

## C-X-C 趋化因子受体 4 增强 Toll 样受体 2 在肺炎衣原体感染促进动脉粥样硬化病变形成的作用

张琪, 张利军, 张雨珂, 李忆, 赵茜, 苗国琳, 王蓓蓓, 张丽蓉

天津医科大学基础医学院生理学及病理生理学系, 天津市 300070

**[摘要]** **[目的]** 探究 C-X-C 趋化因子受体 4 (CXCR4) 在肺炎衣原体 (*C. pn*) 感染促进动脉粥样硬化 (As) 病变形成的作用。**[方法]** 以高脂饮食为基础, 建立 *C. pn* 感染诱导 ApoE<sup>-/-</sup>、ApoE<sup>-/-</sup>+Toll 样受体 2 (TLR2)<sup>-/-</sup>、ApoE<sup>-/-</sup>+TLR2<sup>-/-</sup>+AMD3100 小鼠 As 模型, ELISA 检测 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血清 *C. pn* IgG、IgM 抗体水平, PCR 检测肺组织 *C. pn* 特异性 DNA, 油红 O 染色和 HE 染色观察主动脉及主动脉根部脂质沉积和 As 病变面积, 比色法测定血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL) 水平, ELISA 检测血清白细胞介素 1β (IL-1β) 和白细胞介素 6 (IL-6) 含量。**[结果]** ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 *C. pn* 感染模型成功建立。与对照组相比, *C. pn* 感染后 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉及主动脉根部脂质沉积量增加 89.08% 和 71.83%, As 病变面积增加 34.12% (均  $P < 0.05$ ); 与 *C. pn* 感染组相比, TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组主动脉及主动脉根部脂质沉积量减少 46.16% 和 75.73%, As 病变面积减少 63.37% (均  $P < 0.05$ ); 与 TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组相比, TLR2<sup>-/-</sup>+AMD3100+*C. pn* 感染组主动脉及主动脉根部脂质沉积量减少 26.19% 和 56.94%, As 病变面积则减少 22.24% (均  $P < 0.05$ )。与对照组相比, *C. pn* 感染后血清 TC、TG 和 LDLC 水平分别升高 0.62 倍、1.43 倍和 1.34 倍, 血清 IL-1β 和 IL-6 含量分别增加 4.10 倍和 6.00 倍 (均  $P < 0.05$ ); 与 *C. pn* 感染组相比, TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组血清 TC、TG 和 LDLC 水平分别降低 56.96%、50.41% 和 66.64%, 血清 IL-1β 和 IL-6 含量分别减少 66.72% 和 69.54% (均  $P < 0.05$ ); 与 TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组相比, TLR2<sup>-/-</sup>+AMD3100+*C. pn* 感染组血清 TC、TG 和 LDLC 水平分别降低 52.18%、58.56% 和 60.61%, 血清 IL-1β 和 IL-6 含量分别减少 28.84% 和 43.18% (均  $P < 0.05$ )。**[结论]** CXCR4 可增强 TLR2 在升高血脂水平及炎症因子含量中的作用, 进而参与 *C. pn* 感染诱导的 As 病变形成的作用。

**[关键词]** 动脉粥样硬化; C-X-C 趋化因子受体 4; Toll 样受体 2; 肺炎衣原体

**[中图分类号]** R363; R5

**[文献标识码]** A

## C-X-C motif chemokine receptor 4 enhances the role of Toll-like receptor 2 in the formation of atherosclerotic lesions promoted by *Chlamydia pneumoniae* infection

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

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

**[ABSTRACT]** **Aim** To explore the role of C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) in the formation of atherosclerosis (As) induced by *Chlamydia pneumoniae* (*C. pn*) infection. **Methods** The As model in mice of ApoE<sup>-/-</sup>, ApoE<sup>-/-</sup>+TLR2<sup>-/-</sup> and ApoE<sup>-/-</sup>+Toll-like receptor 2 (TLR2)<sup>-/-</sup>+AMD3100 induced by *C. pn* infection was established on the basis of high fat diet. *C. pn* IgG and IgM antibody levels were detected by ELISA, and *C. pn* specific DNA was detected by PCR. Lipid deposition and As lesion area in aorta and aortic root were observed by oil red O and HE staining. Serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDLC) and high density lipoprotein cholesterol (HDL) were analyzed by colorimetry, and ELISA was used to measure the contents of serum interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6). **Results** The ApoE<sup>-/-</sup> mice model of *C. pn* infection was established

**[收稿日期]** 2023-10-12

**[修回日期]** 2023-12-15

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81470551, 82070452)

**[作者简介]** 张琪, 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: qibts1999@163.com. 通信作者张丽蓉, 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.

successfully. Compared with the control group, lipid deposition in aorta and aortic root of ApoE<sup>-/-</sup> mice increased by 89.08% and 71.83%, and As lesion area increased by 34.12% after *C. pn* infection (all  $P < 0.05$ ). Compared with the *C. pn* infection group, lipid deposition in aorta and aortic root reduced by 46.16% and 75.73%, and the lesion area of As decreased by 63.37% in the TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* infection group (all  $P < 0.05$ ). Compared with the TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* infection group, lipid deposition in aorta and aortic root decreased by 26.19% and 56.94%, and the lesion area of As decreased by 22.24% in the TLR2<sup>-/-</sup>+AMD3100+*C. pn* infection group (all  $P < 0.05$ ). Compared with the control group, serum levels of TC, TG and LDLC increased by 0.62 times, 1.43 times and 1.34 times after *C. pn* infection, respectively, while serum contents of IL-1 $\beta$  and IL-6 increased by 4.10 times and 6.00 times, respectively (all  $P < 0.05$ ). Compared with the *C. pn* infection group, serum levels of TC, TG and LDLC in the TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* infection group decreased by 56.96%, 50.41% and 66.64%, and serum contents of IL-1 $\beta$  and IL-6 also decreased by 66.72% and 69.54% respectively (all  $P < 0.05$ ). Compared with the TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* infection group, serum levels of TC, TG and LDLC in the TLR2<sup>-/-</sup>+AMD3100+*C. pn* infection group decreased by 52.18%, 58.56% and 60.61%, and serum contents of IL-1 $\beta$  and IL-6 and reduced by 28.84% and 43.18%, respectively (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** CXCR4 enhances the roles of TLR2 in increasing the serum lipid levels and the contents of inflammatory factors, and then participates in the formation of As lesions induced by *C. pn* infection.

[KEY WORDS] atherosclerosis; C-X-C motif chemokine receptor 4; Toll-like receptor 2; *Chlamydia pneumoniae*

由动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)引发的心脑血管疾病发病率和死亡率居高不下,严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。血脂异常和免疫炎症反应是 As 发病的关键始动因素<sup>[2]</sup>。肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, *C. pn*)感染与 As 病变形成及进展密切相关<sup>[3]</sup>。*C. pn*是一种细胞内寄生的革兰氏阴性原核微生物,通过呼吸道侵入机体后被单核/巨噬细胞吞噬<sup>[4]</sup>,随着血液循环侵入血管壁内,进而感染血管内皮细胞和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC),从而参与 As 的发生发展<sup>[5-6]</sup>,但其确切机制目前尚未完全阐明。

Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是参与固有免疫的一类重要蛋白质分子,可通过识别病原体相关分子模式激活一系列信号转导通路,在免疫防御和炎症反应中发挥重要作用,加速 As 进展<sup>[7-8]</sup>。作为 TLR 家族的重要成员,TLR2 可通过启动信号级联反应,引起炎症因子的产生和适应性免疫的激活,从而参与 As 病变形成<sup>[9]</sup>。研究表明,*C. pn*感染可引起脂质代谢紊乱<sup>[10]</sup>,并通过 TLR2 减少胆固醇流出,从而促进巨噬细胞源性泡沫细胞形成<sup>[11]</sup>。本课题组的前期研究也证实,TLR2 在 *C. pn* 感染诱导 VSMC 迁移及促进 As 病变形成中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。那么,*C. pn* 感染如何通过 TLR2 促进 As 病变形成?

C-X-C 趋化因子受体 4(C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4)是典型的 G 蛋白偶联受体,其可募集免疫细胞、参与炎症反应,与 As 发病密切相关<sup>[12]</sup>。本课题组既往研究发现,CXCR4 可与 TLR2 相互作用并参与 *C. pn* 感染诱导的 As 病变形成<sup>[13]</sup>。那么,CXCR4 如何影响这一过程?目前并不清楚。

本研究拟通过建立 *C. pn* 感染诱导载脂蛋白 E 基因敲除(apolipoprotein E gene knockout, ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠 As 模型,观察 TLR2 敲除的同时抑制 CXCR4 对 *C. pn* 感染诱导的小鼠 As 病变面积、血脂水平以及相关炎症因子表达的影响,以期明确 CXCR4 对 TLR2 在 *C. pn* 感染诱导 As 病变形成中的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

*C. pn* AR-39 菌株购自美国模式菌种收藏中心,在人喉癌细胞株(购自北京协和细胞库)中扩繁传代培养后,-80℃保存于蔗糖-磷酸-谷氨酸缓冲液(sucrose-phosphate-glutamate, SPG)中<sup>[14]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器

高脂饲料购于美国 Research Diets 公司,配方:常规酪蛋白,1.25%胆固醇和 0.5%胆酸钠;CXCR4 抑制剂 AMD3100 购自美国 Abcam 公司;微型泵购自美国 Durect 公司;小鼠 *C. pn* IgG、IgM 抗体试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司;*C. pn* 特异性 DNA 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成;DNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术股份有限公司;高保真 DNA 扩增试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;油红 O 染液购自赛默飞世尔科技中国有限公司;苏木精染液、伊红染液购自北京中杉金桥有限公司;总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)测

试剂盒购自南京建成生物工程研究所;白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 测试盒购自美国 Proteintech 公司。多功能酶标仪 (美国 Bio-rad 公司); 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); 普通 PCR 扩增仪、琼脂糖凝胶电泳仪 (赛默飞世尔科技中国有限公司); 凝胶成像仪 (上海勤翔科学仪器有限公司); 冰冻切片机 (德国莱卡 CM1950); 正置显微镜 (德国莱卡公司)。

### 1.3 实验动物及分组

ApoE<sup>-/-</sup> (C57BL/6-ApoE<sup>em1C482</sup>/Nju) 小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司。ApoE<sup>-/-</sup> TLR2<sup>-/-</sup> 小鼠模型为实验室前期建立<sup>[13]</sup>。所有动物实验均经过天津医科大学实验动物伦理委员会审批 (批准号: TMUaMEC2018007), 符合动物伦理和动物福利要求。实验动物分为对照组、*C. pn* 感染组、TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组和 TLR2<sup>-/-</sup>+AMD3100+*C. pn* 感染组。每组选用 6 周龄 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠, 雌雄各 5 只, 体质量 (18 $\pm$ 2) g。小鼠饲养于中国医学科学院医学实验动物研究中心 II 级生物安全实验室, 适应性喂养 2 周后, 连续高脂饲料喂养 6 周。所有感染组小鼠均在高脂饮食第 0、2、4 周进行 *C. pn* 鼻饲感染, 每次给予 2 $\times$ 10<sup>10</sup> IFU/L 的 *C. pn* SPG 缓冲液 40  $\mu$ L, 对照组每次鼻饲 SPG 缓冲液 40  $\mu$ L; AMD3100 通过皮下埋入微型泵注射给药, 每只小鼠每日 1.25  $\mu$ g/g, 与高脂饮食同时进行。摄食、饮水自由。温度 23~25  $^{\circ}$ C, 相对湿度 50%~70%, 12 h 光照/12 h 避光循环。小鼠高脂饮食喂养 6 周后进行安乐死, 取材用于后续实验。

### 1.4 取材

戊巴比妥钠 (50  $\mu$ g/g 体质量) 腹腔麻醉小鼠后, 摘眼球取血, 将血液样本放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱数小时或过夜后 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。用针头固定小鼠的四个脚掌, 眼科剪剪开皮肤、腹部肌肉, 暴露腹腔, 剪开膈肌, 提起胸廓, 剪断肋骨, 取双肺组织于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。暴露心脏, 以左心室为入口, 灌流 1 $\times$ PBS 缓冲液直至流出液体变得清亮, 以除去心脏、血管中残留血液。分离小鼠心脏及主动脉 (主动脉弓到髂总动脉分支), 清除心脏外及主动脉周围脂肪组织和纤维结缔组织后, 主动脉浸泡于 4% 多聚甲醛中, 常温避光密封保存, 心脏垂直浸入 OCT 包埋剂后于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

### 1.5 ELISA 检测小鼠血清 *C. pn* IgG、IgM 抗体水平

取出小鼠血清标本, 按照 ELISA 试剂盒说明要

求加入对照品或小鼠血清标本 50  $\mu$ L, 每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100  $\mu$ L, 用封板膜封住反应孔, 37  $^{\circ}$ C 恒温箱温育 60 min 后弃去液体, 拍干, 每孔加满洗涤液 350  $\mu$ L, 静置 1 min 后甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 重复洗板 5 次后加入底物 A、B 各 50  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min, 加入终止液 50  $\mu$ L, 在 450 nm 波长处测定各孔的光密度 (optical density, OD) 值。小鼠血清标本 OD 值大于对照品 OD 值 0.25 判定为阳性, 反之为阴性。

### 1.6 PCR 检测小鼠肺组织 *C. pn* 特异性 DNA

取小鼠肺组织, 匀浆后按照 DNA 提取试剂盒说明提取小鼠肺组织 DNA, 进行 PCR 扩增, *C. pn* 特异性 DNA 引物序列为: 5'-ATGAAAAAACTCTTGAAATCGGTAT-3' (上游)、5'-TTAGAAACGGAAGTGA-CATTT-3' (下游)。取 5  $\mu$ L 扩增产物, 采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外线凝胶电泳仪上观察产物, 并拍照。

### 1.7 油红 O 染色

**1.7.1 小鼠主动脉大体油红 O 染色** 取出小鼠主动脉, 自来水冲洗 30 min 除去多聚甲醛, 油红 O 染液浸染 1 h, 60% 异丙醇漂洗 1 min, 1 $\times$ PBS 缓冲液漂洗 3 次, 毛细针固定后拍照。

### 1.7.2 小鼠主动脉根部冰冻切片油红 O 染色

取出小鼠心脏, 使用冰冻切片机 8  $\mu$ m 连续切片, 置于 1 $\times$ PBS 缓冲液中浸泡 30 min, 脱去 OCT 包埋剂后, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 1 $\times$ PBS 缓冲液漂洗 3 次, 浸于油红 O 染液中染色 30 min, 60% 异丙醇漂洗 1 min, 1 $\times$ PBS 缓冲液漂洗 3 次, 甘油封片后, 用正置显微镜观察、拍照。

### 1.8 主动脉根部冰冻切片 HE 染色

取出小鼠心脏, 8  $\mu$ m 连续切片后浸泡于 1 $\times$ PBS 缓冲液以脱去 OCT, 用苏木精染液染色 90 s, 自来水冲洗反蓝, 伊红染液浸染 30 s, 自来水冲洗至透明后置于 95% 乙醇洗去浮色, 无水乙醇脱水 20 s 后, 二甲苯透化 10 min, 中性树脂封片, 风干后用正置显微镜观察、拍照。

### 1.9 比色法检测小鼠血脂水平

取小鼠血清标本, 按照南京建成血脂检测试剂盒说明书测定小鼠血清 TC、TG、LDLC 和 HDLC 水平。

### 1.10 ELISA 检测小鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量

取小鼠血清标本, 按照 ELISA 试剂盒说明书要求在小试管中倍比稀释, 加入标准品或血清标本 100  $\mu$ L, 盖上覆膜于 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 洗涤 5 次, 弃液体, 拍干后加 100  $\mu$ L 检测抗体, 盖上封板膜于 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 洗涤 5 次, 加 100  $\mu$ L 辣根过氧化物酶标记



链霉亲和素,盖上封板膜于 37 ℃ 孵育 40 min,洗涤后每孔加 TMB 显色液 100 μL,37 ℃ 避光显色 15 ~ 20 min 后加 100 μL 终止液,用酶标仪在 450 nm 波长处测量各孔的 OD 值。

1.11 统计学分析

用 Image J Pro Plus 6.0 软件计算 As 病变面积,SPSS 17.0 软件进行实验数据分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。Adobe Photoshop CC2019 软件绘制实验结果图,GraphPad Prism 8 软件绘制统计结果图。

2 结果

2.1 确认 *C. pn* 感染 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠模型成功建立

ELISA 测定 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 *C. pn* IgG、IgM 抗体,结果显示,*C. pn* 感染组、TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组和 TLR2<sup>-/-</sup>+AMD3100+*C. pn* 感染组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 *C. pn* IgG 抗体阳性率分别为 50%、60% 和 50%,而 IgM 抗体阳性率分别为 10%、10% 和 0(表 1)。对于血清 *C. pn* 抗体阴性小鼠,同时采用 PCR 检测肺组织 *C. pn* 特异性 DNA,结果显示,各组均于 437 bp 处可见特异性扩增阳性条带(图 1)。以上结果表明 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 *C. pn* 感染模型成功建立。

表 1. *C. pn* 感染后各组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 IgG、IgM 抗体阳性结果( $n = 10$ )

Table 1. Positive results of serum IgG and IgM antibodies of ApoE<sup>-/-</sup> mice in each group after *C. pn* infection( $n = 10$ )  
例(%)

分组	IgG 阳性	IgM 阳性
<i>C. pn</i> 感染组	5(50)	1(10)
TLR2 <sup>-/-</sup> + <i>C. pn</i> 感染组	6(60)	1(10)
TLR2 <sup>-/-</sup> +AMD3100+ <i>C. pn</i> 感染组	5(50)	0(0)

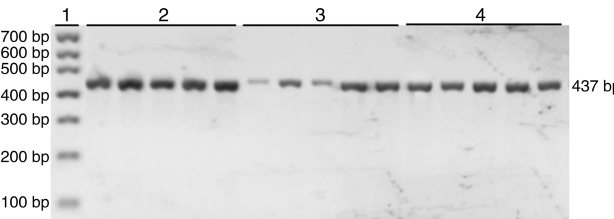


图 1. *C. pn* 感染后各组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠肺组织 *C. pn* 特异性 DNA 凝胶电泳结果

1 为 Marker,2 为 *C. pn* 感染组,3 为 TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组,4 为 TLR2<sup>-/-</sup>+AMD3100+*C. pn* 感染组。

Figure 1. Results of *C. pn* specific DNA gel electrophoresis in lung tissues from ApoE<sup>-/-</sup> mice in each group after *C. pn* infection

2.2 CXCR4 增强 TLR2 在 *C. pn* 感染诱导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 As 病变形成中的作用

与对照组相比,*C. pn* 感染组小鼠主动脉及主动脉根部红染面积增大 89.08% 和 71.83%,As 病变面积增加 34.12%(均  $P < 0.05$ ),表明 *C. pn* 感染可促进 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 As 病变形成;TLR2 敲除后行 *C. pn* 感染,小鼠主动脉及主动脉根部红染面积较单纯 *C. pn* 感染组减少 46.16% 和 75.73%,As 病变面积较单纯 *C. pn* 感染组减少 63.37%(均  $P < 0.05$ ),表明 TLR2 参与 *C. pn* 感染诱导的 As 病变形成。而与 TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组相比,TLR2 敲除同时应用 CXCR4 抑制剂 AMD3100 后行 *C. pn* 感染,主动脉及主动脉根部红染面积减少 26.19% 和 56.94%,As 病变面积则减少 22.24%(均  $P < 0.05$ ;图 2)。以上结果提示,CXCR4 可增强 TLR2 在 *C. pn* 感染诱导的 As 病变形成中的作用。

2.3 CXCR4 增强 TLR2 在 *C. pn* 感染升高 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂水平中的作用

血脂水平与 As 的发生发展密切相关<sup>[15]</sup>。本研究利用比色法分析不同处理因素下 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 TC、TG、LDLC 和 HDLC 水平的变化。结果显示,与对照组相比,*C. pn* 感染可使 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 TC、TG 和 LDLC 水平分别升高 0.62 倍、1.43 倍和 1.34 倍(均  $P < 0.05$ );TLR2 敲除同时行 *C. pn* 感染,小鼠血清中 TC、TG 和 LDLC 水平较单纯 *C. pn* 感染组分别降低 56.96%、50.41% 和 66.64%(均  $P < 0.05$ ),提示 *C. pn* 感染诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂水平升高的作用与 TLR2 有关。而且还发现,TLR2 敲除同时应用 AMD3100 后,*C. pn* 感染的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清中 TC、TG 和 LDLC 水平较 TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组分别降低 52.18%、58.56% 和 60.61%(均  $P < 0.05$ ;表 2)。上述实验中各组 HDLC 的变化无统计学意义。以上结果提示,TLR2 参与 *C. pn* 感染诱导的血脂水平升高,而 CXCR4 可增强 TLR2 的这一作用。

2.4 CXCR4 增强 TLR2 在 *C. pn* 感染升高 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清炎症因子含量中的作用

免疫炎症反应与 As 的发生发展密切相关<sup>[15]</sup>。本研究检测了不同处理因素下 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量的变化。结果显示,与对照组相比,*C. pn* 感染使 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量分别增加 4.10 倍和 6.00 倍(均  $P < 0.05$ );与 *C. pn* 感染组相比,敲除 TLR2 使小鼠血清 IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量分别减少 66.72% 和 69.54%(均  $P < 0.05$ );而敲除 TLR2 同时应用 AMD3100 后行 *C. pn*

感染,与 TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组相比,IL-1β 和 IL-6 含量分别降低 28. 84% 和 43. 18% (均 *P*<0. 05;表3)。以上结果提示,CXCR4 可增强 TLR2 在 *C. pn* 感染增加血清 IL-1β 和 IL-6 含量中的作用。

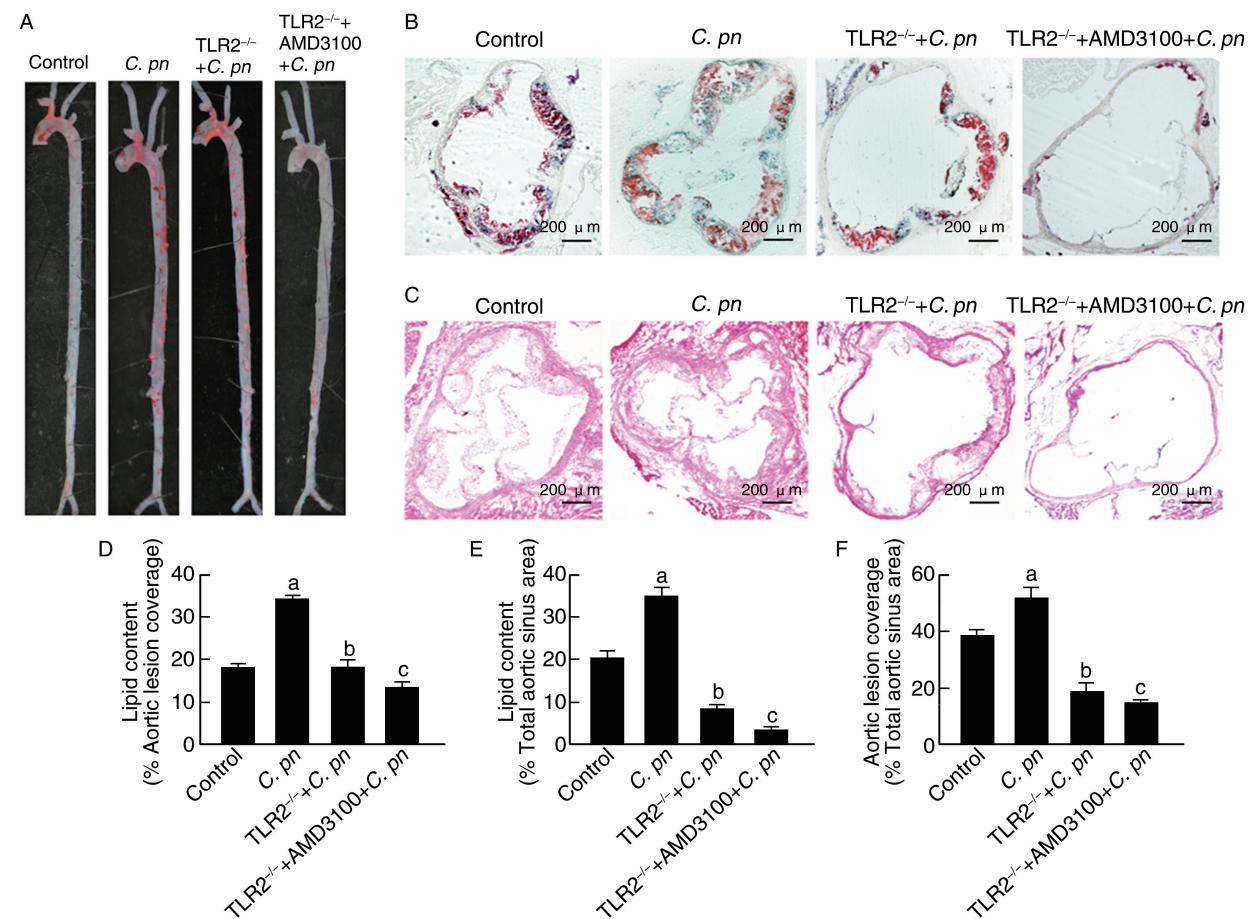


图2. CXCR4 增强 TLR2 在 *C. pn* 感染诱导的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 As 病变形成的作用(*n* = 10)

A 为主动脉大体油红 O 染色,B 为主动脉根部油红 O 染色,C 为主动脉根部 HE 染色,D-F 分别为 A-C 量化图。  
a 为 *P*<0. 05,与对照组比较;b 为 *P*<0. 05,与 *C. pn* 感染组比较;c 为 *P*<0. 05,与 TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组比较。

Figure 2. CXCR4 enhances the role of TLR2 in the formation of As lesions in ApoE<sup>-/-</sup> mice induced by *C. pn* infection(*n* = 10)

表 2. 各组 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血脂水平(*n* = 10)

Table 2. Serum lipid levels in ApoE<sup>-/-</sup> mice in each group(*n* = 10)

分组	TC	TG	LDLC	HDLC
对照组	23. 32±6. 63	1. 50±0. 37	9. 29±2. 74	1. 33±0. 94
<i>C. pn</i> 感染组	37. 85±5. 75 <sup>a</sup>	3. 65±0. 60 <sup>a</sup>	21. 76±4. 70 <sup>a</sup>	2. 32±0. 89
TLR2 <sup>-/-</sup> + <i>C. pn</i> 感染组	16. 29±1. 50 <sup>b</sup>	1. 81±0. 44 <sup>b</sup>	7. 26±1. 49 <sup>b</sup>	1. 83±0. 97
TLR2 <sup>-/-</sup> +AMD3100+ <i>C. pn</i> 感染组	7. 79±1. 92 <sup>c</sup>	0. 75±0. 31 <sup>c</sup>	2. 86±1. 25 <sup>c</sup>	0. 64±0. 22

注:a 为 *P*<0. 05,与对照组比较;b 为 *P*<0. 05,与 *C. pn* 感染组比较;c 为 *P*<0. 05,与 TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组比较。

3 讨论

心脑血管疾病是造成人类死亡的主要原因之一,也是我国居民健康的“头号杀手”,而 As 是其重要的病理基础<sup>[16]</sup>。越来越多的研究表明 *C. pn* 感染

可促进 As 的发生发展<sup>[4]</sup>,但具体机制尚不完全清楚。本课题组之前的研究证实 *C. pn* 感染通过增强 TLR2 和 CXCR4 的协同作用诱导 VSMC 迁移从而促进 As 病变形成的<sup>[13]</sup>,本研究在此基础上进一步从 CXCR4 的角度探讨其对 *C. pn* 感染诱导的血脂异常

表 3. 各组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清炎症因子含量 (n=10)

Table 3. Serum contents of inflammatory factors in

ApoE<sup>-/-</sup> mice in each group (n=10) ng/L

分组	IL-1 $\beta$	IL-6
对照组	270.22 $\pm$ 76.49	530.51 $\pm$ 88.45
<i>C. pn</i> 感染组	1 376.98 $\pm$ 100.07 <sup>a</sup>	3 712.35 $\pm$ 462.40 <sup>a</sup>
TLR2 <sup>-/-</sup> + <i>C. pn</i> 感染组	458.22 $\pm$ 111.56 <sup>b</sup>	1 130.67 $\pm$ 195.07 <sup>b</sup>
TLR2 <sup>-/-</sup> +AMD3100+ <i>C. pn</i> 感染组	326.06 $\pm$ 63.14 <sup>c</sup>	642.40 $\pm$ 119.59 <sup>c</sup>

注:a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 *C. pn* 感染组比较;c 为  $P<0.05$ ,与 TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染组比较。

以及相关炎症因子表达的影响,揭示了 CXCR4 通过增强 TLR2 升高血脂水平及炎症因子含量的作用参与 *C. pn* 感染诱导的 As 病变形成的新机制。

本研究首先利用 ELISA 检测 *C. pn* 感染 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 *C. pn* IgG、IgM 抗体水平,同时采用 PCR 检测 IgG、IgM 抗体阴性小鼠肺组织 *C. pn* 特异性 DNA 片段,确认 *C. pn* 感染小鼠模型成功建立。随后,通过对不同处理组主动脉油红 O 染色以及主动脉根部油红 O 染色和 HE 染色观察比较发现,敲除 TLR2 可延缓 *C. pn* 感染引起的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 As 病变形成,而在 TLR2 敲除基础上使用 AMD3100 抑制 CXCR4 则会使 *C. pn* 感染诱导的 As 病变面积进一步减少,这一结果表明 CXCR4 可增强 TLR2 在 *C. pn* 感染促进 As 病变形成中的作用。有研究报道,牙龈卟啉单胞菌可诱导人单核细胞或小鼠巨噬细胞中 TLR2 和 CXCR4 的相互作用,并破坏宿主防御<sup>[17]</sup>。本课题组前期研究也证实 *C. pn* 感染通过 TLR2 与 CXCR4 的相互作用加速 As 病变形成<sup>[13]</sup>。既然 CXCR4 与 TLR2 存在相互作用,那么,TLR2 如何参与 *C. pn* 感染诱导的 As 病变形成? CXCR4 又是如何影响 TLR2 在 *C. pn* 感染诱导的 As 病变形成中的作用?

免疫炎症反应在 As 的发生发展过程中发挥重要作用<sup>[15]</sup>,IL-1 $\beta$  和 IL-6 是与 As 密切相关的重要炎症因子<sup>[18]</sup>。*C. pn* 感染是 As 慢性炎症的刺激因素之一<sup>[19]</sup>。那么,与免疫炎症密切相关的模式识别受体 TLR2 能否通过影响 *C. pn* 感染诱导的炎症因子的产生从而参与 As 发病? Naiki 等<sup>[20]</sup>报道,*C. pn* 感染以 TLR2 依赖性方式诱导炎症反应,进而促进 As 病变形成,然而具体机制并不清楚。本研究结果证实,*C. pn* 感染可通过 TLR2 诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量增加。有研究发现,使用 AMD3100 抑制 CXCR4 可抑制脊神经结扎诱导的大鼠炎症因子表

达<sup>[21]</sup>。既然 CXCR4 参与炎症反应的调节,那么 CXCR4 是否可影响 TLR2 在 *C. pn* 感染诱导的 As 炎症反应中的作用? 目前未见文献报道。进一步的研究发现,抑制 CXCR4 后,TLR2<sup>-/-</sup>+*C. pn* 感染小鼠血清 IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量明显减少,表明 CXCR4 可能通过增强 TLR2 的作用介导 *C. pn* 感染促进的血清炎症因子含量增加,进而参与 As 病变形成。那么 CXCR4 与 TLR2 究竟如何参与 *C. pn* 感染促进血清炎症因子含量增多?

脂质代谢紊乱是导致 As 的主要危险因素之一<sup>[15]</sup>,而 TC、TG、LDLC 和 HDLC 均是临床上常用的评价指标。本研究结果也证实,*C. pn* 感染可使 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂水平明显升高,这与之前的文献<sup>[10]</sup>报道相一致。本研究还发现,敲除 TLR2 可降低 *C. pn* 感染诱导的小鼠血脂水平;而在敲除 TLR2 的基础上抑制 CXCR4 后,*C. pn* 感染诱导的小鼠血脂水平进一步降低,这表明 CXCR4 可增强 TLR2 在 *C. pn* 感染升高血脂水平中的作用。

研究表明,应用降脂药物可抑制炎症反应,从而减缓 As 的发生发展<sup>[22-23]</sup>。Ridker 等<sup>[24]</sup>发现过量游离胆固醇形成的胆固醇结晶可激活 NLRP3 炎症小体,继而促进 IL-1 $\beta$  分泌,形成 IL-1 $\beta$ /IL-6 轴,从而放大炎症效应。以上研究提示血脂异常可诱发炎症反应,从而促进 As 的发生发展。基于文献和上述实验结果,有理由推测,TLR2 通过调节血脂代谢,进而引起炎症因子含量升高,从而参与 *C. pn* 感染诱导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 As 病变形成,而 CXCR4 可增强 TLR2 的这一作用。

此外,AMD3100 (普乐沙福, Plerixafor) 作为一种特异性 CXCR4 拮抗剂,在 HIV-1 感染、自身免疫性疾病和干细胞动员方面的应用已得到充分开发。然而,其在治疗 As 方面的作用尚不清楚。有研究表明,将现有的化疗、放疗或免疫治疗与 AMD3100 相结合,可进一步提高某些肿瘤的体内外治疗效果<sup>[25]</sup>。本研究结果也证实,在敲除 TLR2 的基础上使用 AMD3100 可进一步延缓 *C. pn* 感染诱导的 As 病变形成。据此,推测 AMD3100 与 TLR2 抑制剂联合应用可能对抗 As 心脑血管疾病具有潜在的临床应用前景。

综上所述,CXCR4 可增强 TLR2 在升高血脂水平及炎症因子含量中的作用,进而参与 *C. pn* 感染诱导的 As 病变形成。本研究结果将对开发有效的临床防治 As 药物有所帮助,但还需更多更深入的研究来证实。



## [参考文献]

- [1] ROTH G A, MENSAH G A, FUSTER V. The global burden of cardiovascular diseases and risks: a compass for global action[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25): 2980-2981.
- [2] RIDKER P M, BHATT D L, PRADHAN A D, et al. Inflammation and cholesterol as predictors of cardiovascular events among patients receiving statin therapy: a collaborative analysis of three randomised trials[J]. Lancet, 2023, 401(10384): 1293-1301.
- [3] 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.
- [4] CHEN S, SHIMADA K, CROTHER T R, et al. *Chlamydia* and lipids engage a common signaling pathway that promotes atherogenesis[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(14): 1553-1570.
- [5] GAYDOS C A, SUMMERSGILL J T, SAHNEY N N, et al. Replication of *Chlamydia pneumoniae* *in vitro* in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells[J]. Infect Immun, 1996, 64(5): 1614-1620.
- [6] RUPP J, KOCH M, VAN ZANDBERGEN G, et al. Transmission of *Chlamydia pneumoniae* infection from blood monocytes to vascular cells in a novel transendothelial migration model[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 242(2): 203-208.
- [7] DUAN T H, DU Y, XING C S, et al. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity[J]. Front Immunol, 2022, 13: 812774.
- [8] 王克华, 王金, 王磊, 等. circ-SKA3 通过 miR-1303 调控 TLR4 轴在动脉粥样硬化中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(11): 1-23.  
WANG K H, WANG J, WANG L, et al. circ-SKA3 regulates the role of TLR4 axis in atherosclerosis through miR-1303[J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(11): 1-23.
- [9] WANG Y G, CHEN L, TIAN Z, et al. CRISPR-Cas9 mediated gene knockout in human coronary artery endothelial cells reveals a pro-inflammatory role of TLR2[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(2): 187-193.
- [10] MARANGONI A, FIORINO E, GILARDI F, et al. *Chlamydia pneumoniae* acute liver infection affects hepatic cholesterol and triglyceride metabolism in mice[J]. Atherosclerosis, 2015, 241(2): 471-479.
- [11] ZHAO G J, MO Z C, TANG S L, et al. *Chlamydia pneumoniae* negatively regulates ABCA1 expression via TLR2-Nuclear factor-kappa B and miR-33 pathways in THP-1 macrophage-derived foam cells[J]. Atherosclerosis, 2014, 235(2): 519-525.
- [12] ROUSSOS E T, CONDEELIS J S, PATSIALOU A. Chemotaxis in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(8): 573-587.
- [13] MIAO G L, ZHAO X, WANG B B, et al. TLR2/CXCR4 coactivation facilitates *Chlamydia pneumoniae* infection-induced atherosclerosis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 318(6): H1420-H1435.
- [14] 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.
- [15] MALEKMOHAMMAD K, BEZSONOV E E, RAFIEIAN-KOPAEI M. Role of lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis: focus on molecular and cellular mechanisms[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 707529.
- [16] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56.
- [17] HAJISHENGALLIS G, WANG M, LIANG S, et al. Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(36): 13532-13537.
- [18] RIDKER P M. Anticytokine agents: targeting interleukin signaling pathways for the treatment of atherothrombosis[J]. Circ Res, 2019, 124(3): 437-450.
- [19] TUMURKHUU G, DAGVADORJ J, PORRITT R A, et al. *Chlamydia pneumoniae* hijacks a host autoregulatory IL-1 $\beta$  loop to drive foam cell formation and accelerate atherosclerosis[J]. Cell Metab, 2018, 28(3): 432-448.
- [20] NAIKI Y, SORRENTINO R, WONG M H, et al. TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control *Chlamydia pneumoniae*-induced acceleration of atherosclerosis[J]. J Immunol, 2008, 181(10): 7176-7185.
- [21] LIU Z Y, SONG Z W, GUO S W, et al. CXCL12/CXCR4 signaling contributes to neuropathic pain via central sensitization mechanisms in a rat spinal nerve ligation model[J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(9): 922-936.
- [22] LI Y, ZHANG L, REN P, et al. Qing-Xue-Xiao-Zhi formula attenuates atherosclerosis by inhibiting macrophage lipid accumulation and inflammatory response via TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway regulation[J]. Phytomedicine, 2021, 93: 153812.
- [23] TUÑÓN J, BÄCK M, BADIMÓN L, et al. Interplay between hypercholesterolaemia and inflammation in atherosclerosis: translating experimental targets into clinical practice[J]. Eur J Prev Cardiol, 2018, 25(9): 948-955.
- [24] RIDKER P M. From C-reactive protein to interleukin-6 to interleukin-1: moving upstream to identify novel targets for atheroprotection[J]. Circ Res, 2016, 118(1): 145-156.
- [25] WANG J Z, TANNOS B A, POZNANSKY M C, et al. CXCR4 antagonist AMD3100 (plerixafor): from an impurity to a therapeutic agent[J]. Pharmacol Res, 2020, 159: 105010.

(此文编辑 文玉珊)