

N-WASP 在肺炎衣原体感染促进血管新生中的作用

陈晓宇, 王海伟, 王蓓蓓, 张利军, 刘静雅, 郑俊波, 张丽君

(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)

[关键词] 肺炎衣原体; 血管新生; N-WASP; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 探讨 N-WASP 在肺炎衣原体感染诱导血管新生中的作用及其可能机制。**方法** 肺炎衣原体增殖培养后感染人血管内皮细胞(VEC), 免疫荧光染色确认感染成功。Western blot 检测肺炎衣原体感染的 VEC 内 N-WASP 磷酸化水平; CCK-8 检测 N-WASP 特异性抑制剂 Wiskostain 对 VEC 活力的影响; 免疫荧光实验检测工作浓度的 Wiskostain 对肺炎衣原体感染率的影响; 肺炎衣原体感染以 5 $\mu\text{mol/L}$ Wiskostain 预处理的 VEC 后, 管腔形成实验观察各组 VEC 形成新生血管能力的变化。**结果** 在荧光显微镜下, 感染的 VEC 胞浆内可见典型的肺炎衣原体包涵体。肺炎衣原体感染 VEC 10、24 h 后 N-WASP 磷酸化水平平均明显上调且高于正常对照组($P<0.05$)。管腔形成实验结果显示, 肺炎衣原体感染 VEC 16 h 后, 其所形成的微管腔节点数明显多于正常对照组($P<0.05$); 经 Wiskostain 预处理后, 肺炎衣原体感染促进微管腔节点形成的作用被显著削弱, 几乎不能形成微管腔结构($P<0.05$)。**结论** 肺炎衣原体感染可能通过 N-WASP 促进 VEC 形成新生血管。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Roles of N-WASP in angiogenesis promoted by *Chlamydia pneumoniae* infection

CHEN Xiao-Yu, WANG Hai-Wei, WANG Bei-Bei, ZHANG Li-Jun, LIU Jing-Ya, ZHENG Ning-Bo, ZHANG Li-Jun

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

[KEY WORDS] *Chlamydia pneumoniae*; Angiogenesis; N-WASP; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the roles of N-WASP in angiogenesis induced by *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) infection and its possible mechanism. **Methods** After proliferation culture, *C. pneumoniae* infected human vascular endothelial cell (VEC), and immunofluorescence staining confirmed successful infection. The phosphorylation level of N-WASP was detected by Western blot in VEC infected by *C. pneumoniae*. The effect of N-WASP specific inhibitor Wiskostain on VEC viability was detected by CCK-8. The effect of Wiskostain working concentrations on *C. pneumoniae* infection rate was detected by immunofluorescence assay. After *C. pneumoniae* infected VEC with 5 $\mu\text{mol/L}$ Wiskostain pretreatment, capillary tube formation assay was performed to observe the changes of VEC angiogenesis ability.

Results Under fluorescence microscope, typical *C. pneumoniae* inclusions were found in infected VEC cytoplasm. After VEC was infected with *C. pneumoniae* for 10 and 24 hours, the level of N-WASP phosphorylation was significantly higher than that in the control group. Capillary tube formation assay showed that after VEC was infected with *C. pneumoniae* for 16 hours, the number of capillary tube node was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). After the pretreatment of VECs with Wiskostain, the role of *C. pneumoniae* infection in promoting the formation of capillary tube node was significantly weakened, and it was almost impossible to form capillary tube structure ($P<0.05$). **Conclusion** *C. pneumoniae* infection may promote the formation of new blood vessels possibly through N-WASP.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块内的病理性血管新生可增加斑块的不稳定性,造成斑块内出血与斑块破裂,进而引发急性心脑血管事件。肺

炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, *C. pneumoniae*)感染与斑块不稳定密切相关^[1-3]。本课题组以及多篇文献的研究结果均显示,肺炎衣原体感染可促进血

[收稿日期] 2017-01-09

[修回日期] 2017-04-17

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81470551、81300206);高等学校博士点基金项目(20111202110011)

[作者简介] 陈晓宇,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化发病机制,E-mail 为 titiachen33@sina.com。通讯作者张丽君,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化发病机制,E-mail 为 lijunwz@hotmail.com。

管新生^[4-6]。因此,肺炎衣原体感染很有可能通过促进斑块内的病理性血管新生增加斑块的不稳定性。但肺炎衣原体感染如何促进血管新生目前尚未阐明。N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) 作为一种细胞骨架调节蛋白,与血管新生密切相关^[7-8]。肺炎衣原体感染是否能通过 N-WASP 来调控血管新生目前鲜有报道。因此,本研究拟探讨 N-WASP 在肺炎衣原体感染促进血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 形成新生血管中的作用及其可能机制,为探讨 As 的发病机制提供新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞系及菌株

人喉癌细胞株 HEp-2 细胞购自协和医科大学细胞库;人脐静脉血管内皮细胞株 EA.hy926 (ATCC CRL-2922) 和肺炎衣原体菌株 AR-39 (ATCC 53592) 均购自美国菌种保藏中心。

1.2 主要材料

DMEM 细胞培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Hyclone 公司;DEAE 购自 Sigma 公司;放线菌酮购自索来宝生物科技有限公司;6 孔、24 孔、96 孔细胞培养板均购自 Corning 公司;小鼠抗肺炎衣原体单克隆抗体购自 Abcam 公司;CCK-8 试剂盒购自同仁化学研究所;Wiskostain 购自 Thermo 公司;多克隆兔抗人 N-WASP 抗体购自 Santa Cruz 公司;多克隆兔抗人 N-WASP (Phospho Y256) 抗体购自 Thermo 公司;单克隆小鼠抗大鼠 β -actin 抗体购自中杉金桥生物技术有限公司;FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和羊抗小鼠 IgG 购自 Jackson 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究;ECL 显影剂购自 Thermo 公司;Matrigel 基质胶购自 BD 公司。

1.3 实验分组

实验分为 3 组:(1) 正常对照组;(2) 肺炎衣原体感染组;(3) Wiskostain (N-WASP 的特异性抑制剂)+肺炎衣原体感染组。各组以 DMEM 为溶剂配制相应实验用液。Wiskostain+肺炎衣原体感染组的 VEC 在感染前用 Wiskostain 孵育 1 h 进行预处理。

1.4 肺炎衣原体感染 VEC

依照参考文献^[8]的方法,增殖培养肺炎衣原体并感染 VEC。将 VEC 接种至 6 孔板,待细胞生长至

90% 融合后,将 5×10^5 包涵体形成单位 (inclusion forming unit, IFU) 的肺炎衣原体悬液接种于 VEC。2500 r/min 离心 50 min 后,放入 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内孵育 2 h。然后,弃离心液,加入肺炎衣原体生长液,置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内继续培养。

1.5 免疫荧光实验

肺炎衣原体感染 VEC 后 60 h,弃肺炎衣原体生长液,经磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗后,甲醛固定 30 min,0.1% Triton X-100 透化 15 min,抗体封闭液封闭 30 min,37℃ 下孵育一抗 (1:500,阴性对照为抗体封闭液) 1 h,37℃ 下孵育 FITC 标记的二抗 (1:80) 1 h,然后行 DAPI 染色、封片,荧光显微镜下观察、拍照。观察工作浓度的 Wiskostain 对肺炎衣原体感染率的影响时,需要用 Wiskostain 预处理 VEC 1 h 后行肺炎衣原体感染,进行荧光染色。

1.6 CCK-8 实验

将制备好的细胞悬液 (细胞浓度为 3×10^7 /L) 接种于 96 孔板中,每组设 5 个复孔,培养过夜;弃细胞培养液,加入无血清的 DMEM 同步化 12 h;弃 DMEM 后,分别使用不同浓度的 Wiskostain (0、0.5、1、5、10、15、25 μ mol/L) 预处理细胞 1 h。随后,弃细胞培养液,PBS 清洗 2 次后,每孔加入含有 10 μ L CCK-8 原液的 100 mL DMEM,继续孵育 2 h;用酶标仪测定在 450 nm 波长处的吸光度值。

1.7 Western blot 实验

VEC 按分组行肺炎衣原体感染,10 h 后用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液于冰上裂解 30 min,细胞刮刀刮取细胞。4℃ 12000 r/min 离心 5 min 后取上清,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。以适当比例与上样缓冲液混合均匀,100℃ 煮沸 10 min 后上样,进行 10% SDS-PAGE、转膜、封闭,分别加入 N-WASP (Phospho Y256) 抗体 (1:10000) 和 β -actin 抗体 (1:20000),4℃ 孵育过夜,PBS 冲洗后,用羊抗兔 IgG 和羊抗小鼠 IgG 分别室温孵育 1 h,PBS 冲洗,加入 ECL 试剂后,显影、定影、拍照,用 Image-J 软件进行条带灰度分析。

1.8 管腔形成实验

将 VEC 接种至 6 孔板,待细胞生长至 90% 融合后,将 5×10^5 IFU 的肺炎衣原体悬液接种于 VEC,于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内培养 10 h。96 孔细胞培养板、移液器吸头、FBS、DMEM 均需事先置 4℃ 冰箱预冷。将 Matrigel 原液、DMEM、FBS 以 2:1:1 的

比例在冰上混匀,并加入预冷的 96 孔板中,室温下使其凝固为固体凝胶后待用。制备 VEC 悬液,将各组细胞悬液缓慢滴入已制备好的 Matrigel 基质胶上,于 37℃、5%CO₂ 条件下培养 6 h 后,倒置显微镜下观察各组 VEC 形成网状微管腔结构的情况。以每孔 5 个不同视野下微管腔节点数的平均数评价 VEC 形成网状微管腔结构的能力。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。使用 One-Way ANOVA 对数据进行统计学处理,两组间差异比较采用 LSD (Least-significant

difference) 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 确认肺炎衣原体感染 VEC 模型成功建立

荧光显微镜下可见肺炎衣原体感染的 VEC 胞浆内呈特征性亮苹果绿色、葡萄状成簇的包涵体(白色实箭头所示),亮度较均匀;白色虚箭头所示为点状感染灶,与包涵体颜色相同,但体积较小(图 1)。细胞核被 DAPI 染成蓝色(黄色实箭头所示)。

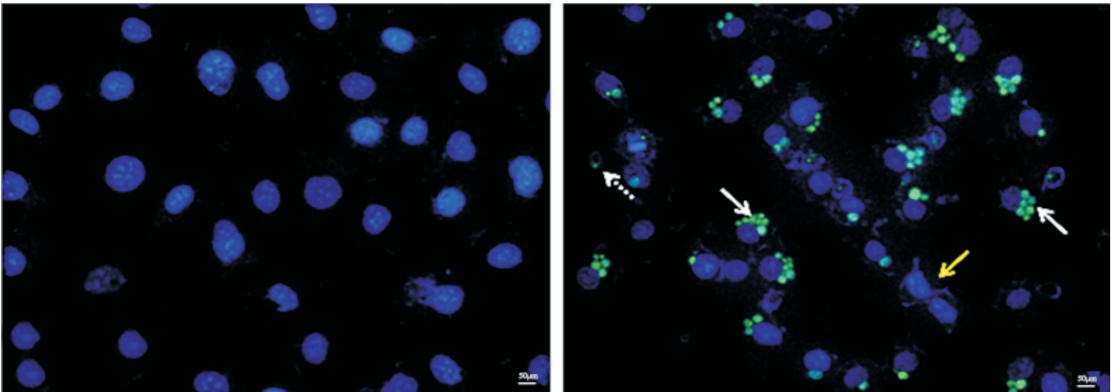


图 1. 荧光显微镜下观察 VEC 内的包涵体(200×) 左图为正常对照组,右图为肺炎衣原体感染组。白色实箭头所示为包涵体,白色虚箭头所示为点状感染灶,黄色实箭头所示为 DAPI 染色的细胞核。

Figure 1. *C.pneumoniae* inclusions in VECs(200×)

2.2 肺炎衣原体感染对 VEC 内 N-WASP 磷酸化水平的影响

肺炎衣原体感染后 10、24 h 的 N-WASP 磷酸化水平均明显高于正常对照组($P<0.05$),而各组之间总 N-WASP 表达量无显著差异(图 2)。这一结果表明,肺炎衣原体感染 VEC 后可上调 N-WASP 磷酸化水平。

2.3 Wiskostain 对 VEC 活力的影响

抑制剂溶剂二甲基亚砜以 1 : 1000 稀释后对细胞活力无明显影响,与正常对照组相比无统计学意义。当 Wiskostain 浓度低于 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,其 VEC 活力和正常对照组相比无明显变化;而当 Wiskostain 浓度高于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,VEC 的活力较正常对照组明显减弱($P<0.05$),且呈浓度依赖性(图 3)。因此,我们选择了对细胞活力无明显影响的最高浓度即 5 $\mu\text{mol/L}$ Wiskostain 用于后续实验。

2.4 Wiskostain 在使用浓度及作用时间内对肺炎衣原体感染率无影响

VEC 内的肺炎衣原体包涵体呈绿色荧光;与肺

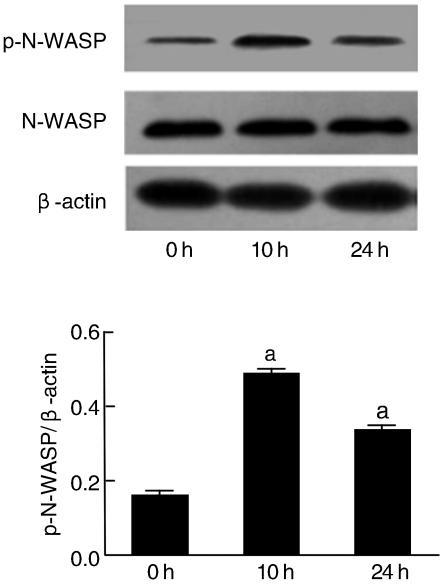


图 2. 肺炎衣原体感染对 VEC 内 N-WASP 磷酸化水平的影响 a 为 $P<0.05$,与正常对照组(肺炎衣原体感染 0 h)比较。

Figure 2. Effect of *C.pneumoniae* infection on N-WASP phosphorylation in VECs

肺炎衣原体感染组相比, 5 $\mu\text{mol/L}$ Wiskostain+肺炎衣原体感染组的肺炎衣原体感染率无明显变化 ($P>0.05$; 图 4), 表明 Wiskostain 在使用浓度及作用时间内对肺炎衣原体感染率无影响。

2.5 N-WASP 在肺炎衣原体感染诱导血管新生中的作用

为了进一步研究 N-WASP 在肺炎衣原体感染诱导 VEC 形成新生血管中的作用, 我们通过使用 N-WASP 的特异性抑制剂——Wiskostain 抑制其功能后, 用管腔形成实验观察各组 VEC 形成新生血管能力的变化。光学显微镜下可见 VEC 爬行后首先形成细胞集落, 随后进一步形成 VEC 条索。汇合的细胞排列形成的条索结构可彼此交联形成空腔样间隙, 即毛细血管样的网状微管腔, 微管腔节点数可反映管腔网络化程度。肺炎衣原体感染组微管腔节点数较正常对照组明显增加 ($P<0.05$), 呈枝状延伸的 VEC 条索分支较多, 管腔网络化程度增加;

5 $\mu\text{mol/L}$ Wiskostain+肺炎衣原体感染组微管腔节点数较肺炎衣原体感染组显著减少 ($P<0.05$), VEC 枝状与条索状结构减少, 代之以伸展程度较差的细胞群落, 管腔网络化程度降低, 几乎不能形成管腔样结构(图 5)。

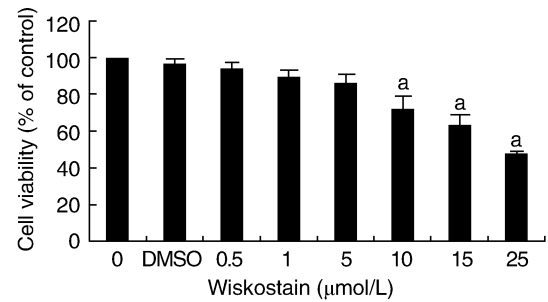


图 3. Wiskostain 对 VEC 活力的影响 a 为 $P<0.05$, 与正常对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ Wiskostain) 比较。

Figure 3. Effect of Wiskostain on VEC viability

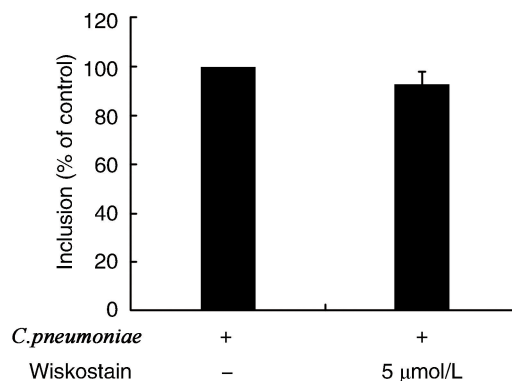
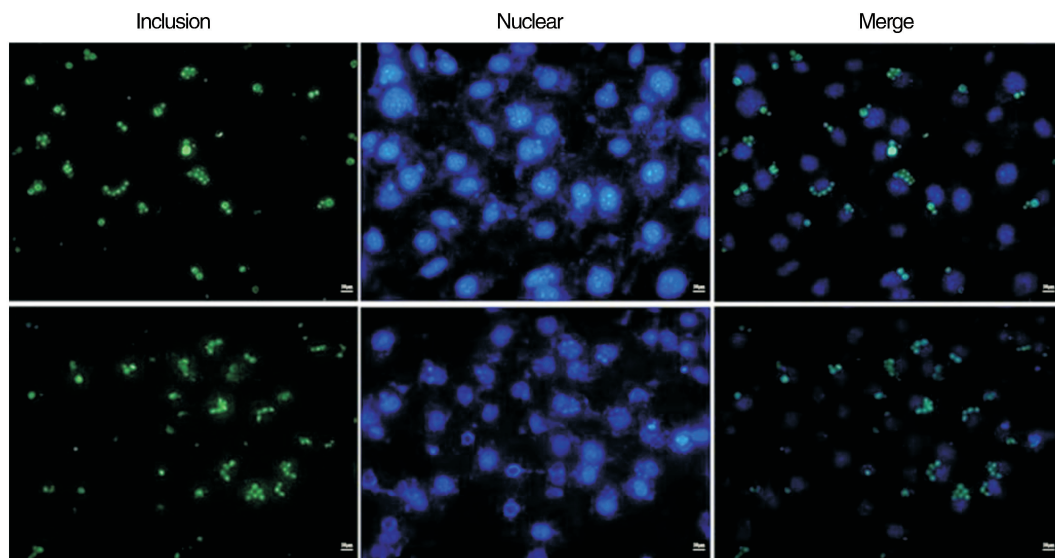


图 4. Wiskostain 在使用浓度及作用时间内对肺炎衣原体感染率无影响 ($n=3$) 显微镜图放大倍数为 200, 上排图为肺炎衣原体感染组, 下排图为 5 $\mu\text{mol/L}$ Wiskostain+肺炎衣原体感染组。

Figure 4. Wiskostain has no effect on the infection rate of *C.pneumoniae* at the working concentration and working time ($n=3$)

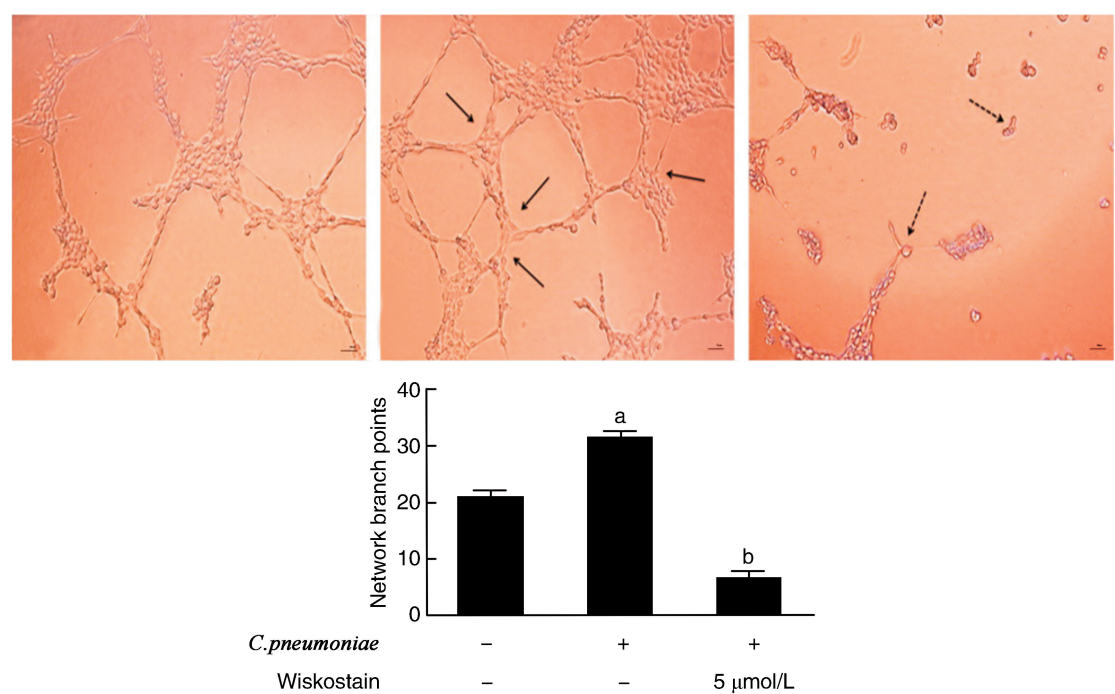


图 5. N-WASP 在肺炎衣原体感染诱导微管腔形成中的作用 ($n=9$) 显微镜图放大倍数为 100, 从左到右依次为正常对照组、肺炎衣原体感染组、5 $\mu\text{mol/L}$ Wiskostatin+肺炎衣原体感染组。黑色实箭头显示 VEC 伸展、交联形成的枝状与条索状结构, 进而形成毛细血管样微管腔; 黑色虚箭头显示 VEC 呈细胞群落状态, 未伸展为微管腔结构, 或形成微管腔结构网络化较差。a 为 $P<0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与肺炎衣原体感染组比较。

Figure 5. Role of N-WASP in *C.pneumoniae* infection-induced capillary tube formation ($n=9$)

3 讨论

肺炎衣原体感染作为 As 的一种新的危险因素, 与 As 斑块不稳定关系密切^[1-3], 但其具体机制尚未明确。研究表明, 病理性血管新生可加速 As 斑块不稳定性的进展^[9-10]。肺炎衣原体感染已被证实与血管新生有关^[4-6]。Fujimoto 等^[6]报道肺炎衣原体感染可以促进脉络膜血管新生。本课题组前期研究也发现, 肺炎衣原体感染可以促进血管新生^[4-5], 但肺炎衣原体感染促进血管新生的机制尚不清楚。

血管新生是一个正性和负性调节因素共同作用的复杂过程。研究表明, N-WASP 和血管新生有关^[7]。那么, 肺炎衣原体感染 VEC 后是否也能通过 N-WASP 促进血管新生呢? 为此, 我们利用 Western blot 技术检测肺炎衣原体感染对 VEC 内总 N-WASP 及其酪氨酸 256 位点磷酸化水平的影响。结果显示, 肺炎衣原体感染 VEC 10、24 h 后 N-WASP 酪氨酸 256 位点的磷酸化水平均明显高于正常对照组, 而总 N-WASP 的表达无明显变化, 提示肺炎衣原体感染可能通过上调 N-WASP 酪氨酸 256 位点的磷酸化水平起作用。N-WASP 酪氨酸 256 位点是其促进细胞迁移的一个重要位点^[11], 而 VEC 迁移又是血

管新生的关键步骤^[12]。由此推测, 肺炎衣原体感染很可能通过促进 N-WASP 磷酸化、加速细胞迁移, 进而促进新生血管的形成。

研究中, Wiskostatin 是一种常用的细胞骨架抑制剂, 可选择性地抑制 N-WASP 的活化, 阻断肌动蛋白丝的组装, 从而抑制依赖于肌动蛋白的细胞功能(迁移、运输、吞噬、内褶等)^[13-14], 常被用来特异性抑制 N-WASP 的功能^[15]。为确定实验中 Wiskostatin 的最佳浓度, 我们用 CCK-8 检测 Wiskostatin 对 VEC 活力的影响, 实验结果显示, Wiskostatin 浓度低于 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, VEC 的活力与正常对照组相比无明显变化, 而其浓度高于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, VEC 的活力则明显下降。因此, 我们选择对 VEC 活力无明显影响的最大浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。为了进一步确定 Wiskostatin 抑制剂是否会影响肺炎衣原体感染 VEC 的能力, 我们利用免疫荧光实验发现 Wiskostatin 在使用浓度及作用时间内并不影响肺炎衣原体感染率。管腔形成实验结果显示, 肺炎衣原体感染可明显促进 VEC 形成毛细血管样的微管腔, 证实了肺炎衣原体感染在血管新生中的作用。为明确 N-WASP 在肺炎衣原体感染诱导 VEC 形成新生血管中的作用, 我们使用 5 $\mu\text{mol/L}$ Wiskostatin 对

VEC 进行预处理,之后行肺炎衣原体感染,结果显示,VEC 形成的节点数明显少于单纯肺炎衣原体感染组,且几乎不能形成管腔样结构,提示 N-WASP 参与了肺炎衣原体感染诱导的血管新生。N-WASP 作为一种细胞骨架调节蛋白,可促进肌动蛋白聚合及细胞骨架重排,进而调控细胞迁移^[16-17]。因此,肺炎衣原体感染可能通过加强 N-WASP 的功能促进肌动蛋白聚合,从而增强细胞的内在动力系统,并促使细胞迁移而诱导新生血管的形成。虽有文献报道 N-WASP 和血管新生有关^[8],但关于 N-WASP 参与肺炎衣原体感染诱导血管新生的报道相对较少。我们的研究提示肺炎衣原体感染可能通过 N-WASP 促进血管新生。

综上所述,本研究证实 N-WASP 在肺炎衣原体感染诱导血管新生中发挥重要作用,为进一步阐明肺炎衣原体感染诱导血管新生的分子机制以及为防治不稳定 As 斑块提供了新的实验依据和思路。

[参考文献]

- [1] 金俊飞. 肺炎衣原体与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(3): 275-278.
- [2] Janczak D, Ziolkowski P, Szydelko T, et al. The presence of some cytokines and *Chlamydia pneumoniae* in the atherosclerotic carotid plaque in patients with carotid artery stenosis[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2015, 69: 227-232.
- [3] Assar O, Nejatizadeh A, Dehghan F, et al. Association of *Chlamydia pneumoniae* infection with atherosclerotic plaque formation[J]. Glob J Health Sci, 2016, 8(4): 260-267.
- [4] 权伟, 张利军, 陈宁, 等. 黄连素通过 PI3K 抑制肺炎衣原体感染诱导的血管内皮细胞迁移[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(11): 877-881.
- [5] Ma L, Zhang LJ, Wang BB, 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] Fujimoto T, Sonoda KH, Hijioka K, et al. Choroidal neovascularization enhanced by *Chlamydia pneumoniae* via toll-like receptor 2 in the retinal pigment epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(9): 4694-702.
- [7] Escudero EA, Jiang WG, Martin TA. Claudin-5 participates in the regulation of endothelial cell motility[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 362(1-2): 71-85.
- [8] Abu TA, Schnittler HJ. Dynamics between actin and the VE-cadherin/catenin complex: novel aspects of the ARP2/3 complex in regulation of endothelial junctions[J]. Cell Adh Migr, 2014, 8(2): 125-135.
- [9] Wang BB, Zhang LJ, Zhang TT, 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): 4583-591.
- [10] Muntyanu AI, Raika M, Zota EG. Immunohistochemical study of the role of mast cells and macrophages in the process of angiogenesis in the atherosclerotic plaques in patients with metabolic syndrome[J]. Arkh Patol, 2016, 78(2): 19-28.
- [11] Chacón MR, Navarro AI, Cuesto G, et al. Focal adhesion kinase regulates actin nucleation and neuronal filopodia formation during axonal growth[J]. Development, 2012, 139(17): 3200-210.
- [12] Anthony SJ, Gregory YH, Stanley SS, et al. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis[J]. Am Coll Cardiol, 2014, 63(1): 1-11.
- [13] Gronewold T, Sasse F, Lunsdorf H, et al. Effects of rhizopodin and latrunculin b on the morphology and on the actin cytoskeleton of mammalian cells[J]. Cell Tissue Res, 1999, 295(1): 121-129.
- [14] Morton W, Ayscough K, McLaughlin P. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(6): 376-378.
- [15] Peterson JR, Bickford LC, Morgan D, et al. Chemical inhibition of n-wasp by stabilization of a native autoinhibited conformation[J]. Nat Struct Mol Biol, 2004, 11(8): 747-755.
- [16] Ziv AA, Giladi ND, Lee HK, et al. Rtp-1 regulates glioma cell migration and invasion via interaction with n-wasp and hnrnpk[J]. Oncotarget, 2015, 6(23): 19826-840.
- [17] Hou JX, Yang H, Huang X, et al. N-WASP promotes invasion and migration of cervical cancer cells through regulating p38 MAPKs signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(2): 403-415.

(此文编辑 曾学清)