

[文章编号] 1000- 4718(2005)09- 1709- 04

肺炎衣原体感染和高脂血症对心肌细胞 NF- κ B 和 AP- 1 的影响*

黄冰生, 董吁钢[△], 李永强

(中山大学第一附属医院心内科, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 探讨肺炎衣原体感染和高脂血症对心肌细胞炎症的影响。方法: 用间接免疫荧光的方法检测肺炎衣原体感染或给予高脂饮食的 C57BL/6J 小鼠, 观察 NF- κ B 亚单位 P50 和 c- Fos 在小鼠心肌细胞中表达程度。结果: 肺炎衣原体感染和高脂血症能引起心肌细胞中 P50 和 c- Fos 的激活。对照组心肌细胞核中未见 P50 和 c- Fos 的表达, 而 3 个实验组心肌细胞核中都有不同程度的 P50 和 c- Fos 表达。实验组和对照组比较 $P < 0.01$, 在 3 个实验组间无显著差异。结论: 在肺炎衣原体感染和高脂血症形成的早期, 心肌细胞的炎症通路已被激活。

[关键词] 衣原体, 肺炎; 高脂血症; 心肌; NF- κ B; 转录因子 AP- 1

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effects of *Chlamydia pneumoniae* infection and hyperlipidemia on the expression of NF- κ B and AP- 1 in myocardium

HUANG Bing- sheng, DONG Yu- gang, LI Yong- qiang

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat- sen University, Guangzhou 510080, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of *Chlamydia pneumoniae* infection and hyperlipidemia on the expression of NF- κ B and AP- 1 in the myocardium. **METHODS:** The indirect immunofluorescence method was used to examine wild C57BL/6J mice infected with *Chlamydia pneumoniae* and fed with an atherogenic diet. The expression of the subunit of NF- κ B, P50, and c- Fos in the murine myocardium was observed. **RESULTS:** *Chlamydia pneumoniae* infection and hyperlipidemia induced the activation of NF- κ B and AP- 1 in murine myocardium. P50 and c- Fos were not detected in the controls, but there were different levels of positive expression in the experiments ($P < 0.01$, compared to the controls). No statistical significance among the experiments was observed. **CONCLUSION:** In early time of *Chlamydia pneumoniae* infection and hyperlipidemia, the inflammatory pathway is already activated in the myocardium.

[KEY WORDS] Chlamydia, pneumoniae; Hyperlipidemia; Myocardium; NF- κ B; Transcription factor AP- 1

肺炎衣原体感染、高脂血症和动脉粥样硬化的关系以及它们导致血管细胞损伤及炎症激活的发生机制已有过体内体外方面的研究^[1- 3], 但是, 到目前为止, 对肺炎衣原体感染和高脂血症是否会引起心肌细胞炎症通路的激活研究不多。Erwin 等^[4]曾在肺炎衣原体感染的 C57BL/6J 小鼠心肌组织中发现炎症细胞的浸润。在炎症通路激活过程中, 核因子- κ B(nuclear factor- κ B) 和激活蛋白- 1(active protein- 1) 是两个关键的调节因子; 两者的激活能使下游参与炎症过程的基因表达上调。本实验用肺炎衣原体感染和高脂饮食喂饲野生 C57BL/6J 小鼠, 探

讨肺炎衣原体感染和高脂饮食对小鼠心肌细胞 NF- κ B 亚单位 P50 和 c- Fos 的影响。

材 料 和 方 法

1 实验动物和分组

48 只 8 周大的 C57BL/6J 小鼠购于本校动物实验中心。分为 4 组: (1) 对照组, 12 只, 给予正常饮食。(2) 感染组, 12 只, 给予正常饮食。(3) 高脂饮食组, 12 只, 给予高脂饮食。(4) 感染高脂饮食组, 12 只, 给予高脂饮食。高脂饮食成分包括: 15% 猪油, 2.5% 胆固醇, 0.5% 胆酸和 82% 的普通饲料。饲养

[收稿日期] 2003- 12- 01 [修回日期] 2004- 03- 25

* [基金项目] 广东省科委基金资助项目(No. 99M04608G); 广州市科委基金资助项目(No. 1999- Z- 102- 02)

[△]通讯作者 Tel: 020- 87755766- 8151; E- mail: ygdong@gzsums.edu.cn.

时间为 14 周。

2 实验材料

山羊抗小鼠 P50(c- 19): sc- 1190 和山羊抗小鼠 c- Fos: sc- 52 购于 Santa Cruz。兔抗山羊 IgG-FITC 购于 Sigma。肺炎衣原体 TWAR 株和 HEP- 2 细胞购于 ATCC。其它普通生化试剂均购于上海生工。实验器材包括恒冷切片机(Shandon, BS6206, AIFI)、微量荧光图像分析系统(Olympus, IX70- 142)、生化分析仪(HITACHI, 7170A, Automatic Analyzer)、冷冻离心机(VNIVERAA32R, Hettich)等。

3 肺炎衣原体的接种

小鼠用乙醚轻微麻醉, 然后第 2-4 组每只小鼠鼻腔内接种 3×10^7 ifu 肺炎衣原体。接种时间为第 8 周、第 10 周和第 12 周, 共 3 次。衣原体用 HEP- 2 细胞培养, 通过密度成分离心分离的肺炎衣原体保存于 -70 °C 的条件下。对照组和高脂饮食组则接种无菌的磷酸盐缓冲液。

4 标本的采集

各组小鼠于 22 周时全部眼球放血处死, 快速取出小鼠心脏, 一部分用 OCT 包埋冻存于 -70 °C, 另一部分用 10% 甲醛固定行苏木精、伊红染色。

5 间接免疫荧光测定

用恒冷切片机以 4 μm 的厚度对标本进行切片, 其荧光染色操作过程参照早前的步骤^[5]。荧光强度分级为^[5]: (-) 无荧光; (±) 极弱的可疑荧光; (+) 荧光较弱, 但清晰可见; (++) 荧光较明亮; (+++) 荧光明亮。

6 体重和血脂浓度的测定

全部小鼠每 4 周测 1 次体重, 实验开始和结束时各测 1 次体重和血脂浓度。血脂浓度的测定用生化自动分析仪检测, 实验前血脂测定从尾静脉取血。

7 统计学处理

使用秩和检验和方差分析组间 *q* 检验对数据进行处理, *P* < 0.05 被认为有统计学意义。

结 果

1 体重和血脂水平

各组小鼠实验结束时的体重和血脂水平见表 1。

2 HE 染色

组织切片 HE 染色后, 用显微镜观察未见到心肌中有炎症细胞的浸润, 未见到心肌细胞肿胀、变性和坏死的表现。

3 P50 和 c- Fos 的免疫荧光检测

各组小鼠心肌 P50 和 c- Fos 免疫荧光染色分别

见图 1 和图 2。各组除对照组外均可见到 P50 和 c- Fos 心肌细胞核内的表达。

各组间 P50 和 c- Fos 免疫荧光强度的比较见表 2。

表 1 体重和血脂水平

Group (22 weeks)	Weight (g)	Cholesterol (mmol/L)	Triglyceride (mmol/L)
Control	33.20 ± 2.35	2.20 ± 0.17	1.26 ± 0.15
Infection	33.30 ± 1.45	2.18 ± 0.18*	1.13 ± 0.24*
Hyperlipidemia	30.60 ± 2.40	5.72 ± 0.72**	0.52 ± 0.15**
Infection+ hyperlipidemia	30.70 ± 1.45	5.88 ± 0.72**	0.54 ± 0.13**

* *P* > 0.05, ** *P* < 0.01 vs control group(SNK- *q*).

表 2 各组间 P50 和 c- Fos 荧光强度的比较

Tab 2 Comparison of the fluorescence strength of P50 and c- Fos among various groups (*n* = 12)

Group	P50					c- Fos				
	0	±	+	++	+++	0	±	+	++	+++
Control	10	2	0	0	0	9	3	0	0	0
Infection	0	0	2	9	1	0	0	1	10	1
Hyperlipidemia	0	1	3	7	1	0	0	4	7	1
Infection+ hyperlipidemia	0	0	1	9	2	0	0	0	10	2

P < 0.01 vs control; *P* > 0.05 among three experimental groups. (Rank) Fluorescence strength(rank 1: ±, 2: +, 3: ++, 4: +++).

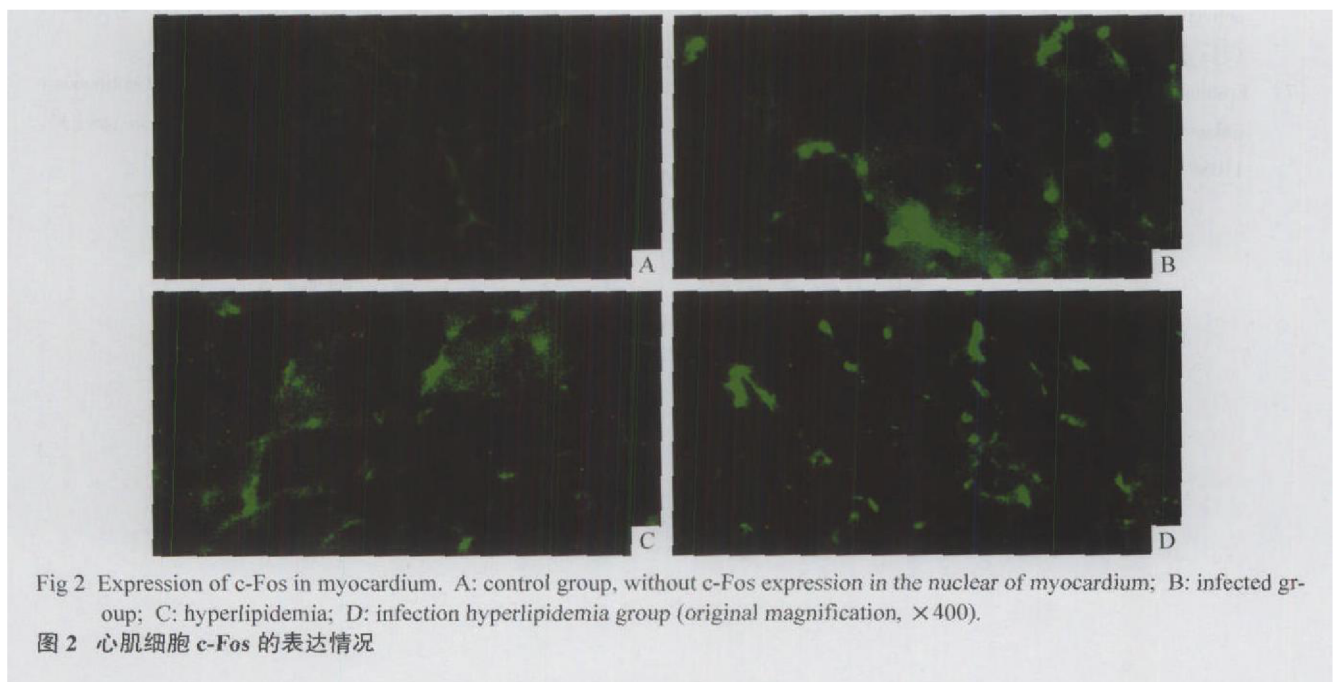
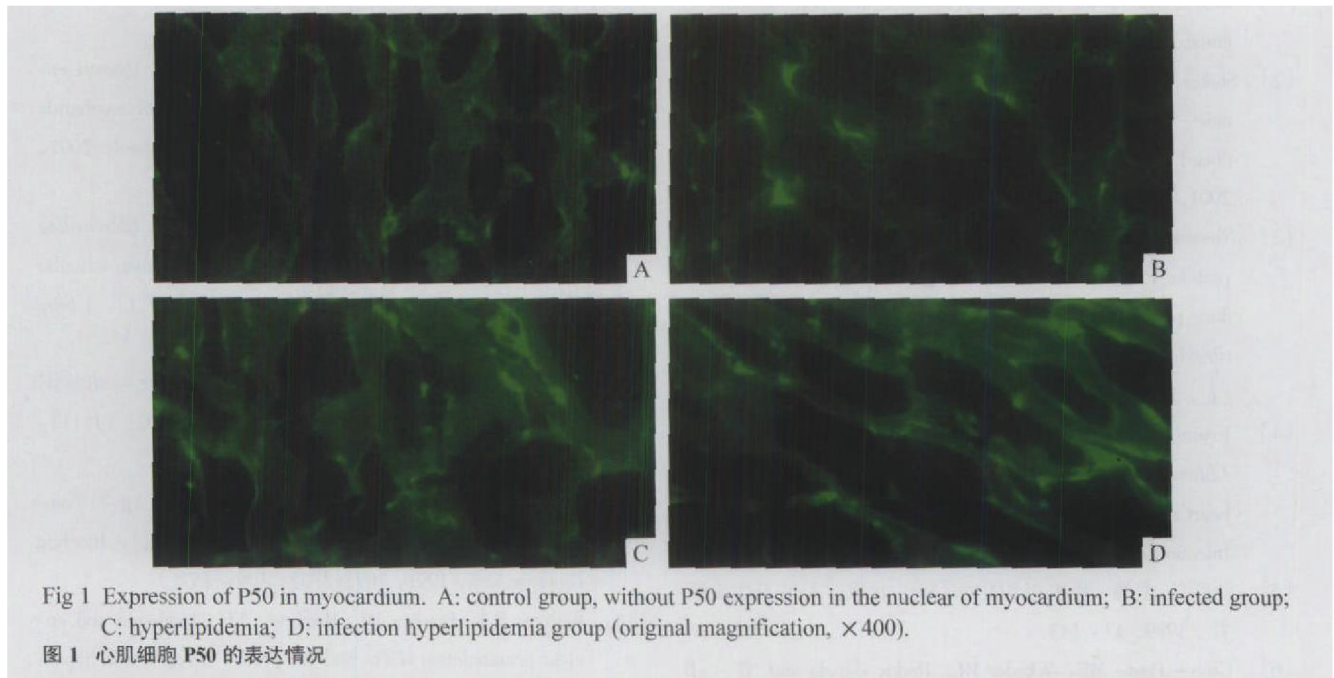
讨 论

在正常情况下, NF- κB 只以抑制状态存在于细胞质中。P50/P65 异二聚体是其活化的主要形式^[6], 参与了许多与炎症反应有关的基因表达的调控, 包括: TNFα、IL- 1、c- myc、M- CSF、GM- CSF、MCP- 1、JCAM- 1 等^[7,8]。当小鼠感染肺炎衣原体和被喂饲高脂饮食时, 细菌脂多糖^[9]、脂蛋白和细胞因子等能引起 κB 的磷酸化, NF- κB 得以激活^[10- 12], 并引起上述细胞因子的表达上调, 并引起中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和 T 淋巴细胞向心肌细胞募集, 造成心肌细胞的损伤和炎症通路的激活。在本实验中未见到心肌组织中炎症细胞的浸润和心肌的损伤, 可能是心肌细胞内炎症因子的激活程度还不足以引起心肌的炎症反应。

c- Fos 是转录因子 Ap- 1 家族中一员, 主要和 Jun 蛋白家族形成二聚体而成为 Ap- 1 的主要形式, 在正常成年心肌细胞中很少表达^[13], 能激活 NF- κB 的刺激也能激活 c- Fos。c- Fos 也参与了炎症的调

控,许多控制炎症反应的基因的启动部位具有 c-Fos 的结合位点。c-Fos 表达的意义可能是在肺炎衣原体脂多糖和高脂血症引起的脂蛋白代谢紊乱等因素的刺激下,c-Fos 基因与蛋白作为应激反应基

因与蛋白出现,作为第三信使使某些基因表达发生改变,并转而调控其它基因。结果便启动了心肌细胞的修复过程,有助于可逆性损伤的修复^[14],但若过度表达,可导致心肌细胞的凋亡^[15]。



肺炎衣原体感染和高脂血症是否会引起心肌细胞 NF- κ B 和 AP-1 的激活,既往未见相关报道。在本实验中,感染组、高脂饮食组 and 感染+高脂饮食组心肌细胞 P50 和 c-Fos 的表达都是升高的。在感染+高脂饮食组心肌细胞 P50 和 c-Fos 的表达水平最高,可能是衣原体感染和高脂血症的协同作用。但是在这 3 组间 P50 和 c-Fos 荧光强度比较无显著差

异。

本实验显示,在动脉粥样硬化的危险因子作用于心肌细胞的早期,心肌细胞的炎症通路就已被激活。但它们对心肌的长期影响如何?是否对缺血性心肌病的发生和发展有促进作用目前尚不清楚。下一步要做的是进一步明确肺炎衣原体和高脂血症,对心肌细胞的远期影响,并进行药物干预,为冠心病

的治疗提供更多的依据。

[参 考 文 献]

- [1] Wapoli C, Lerman LO. Involvement of oxidation-sensitive mechanisms in the cardiovascular effects of hypercholesterolemia[J]. *Mayo Clin Proc*, 2001, 76(6): 619- 631.
- [2] Stokes KY, Clanton EC, Russell JM, et al. NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte- endothelial cell adhesion[J]. *Circ Res*, 2001, 88(5): 499- 505.
- [3] Niessner A, Kaun C, Zorn G, et al. Polymorphic membrane protein(PMP) 20 and PMP21 of *Chlamydia pneumoniae* induce proinflammatory mediators in human endothelial cells *in vitro* by activation of the nuclear factor- kappa B pathway [J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(1): 108- 113.
- [4] Erwin Blessing, Tsun- Mei Lin, Lee Ann Campell, et al. *Chlamydia pneumoniae* induces inflammatory changes in the heart and aorta of normocholesterolemic C57BL/6J mice[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(8): 4765- 4768.
- [5] 刘彦仿 主编. 免疫组织化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 47- 143.
- [6] Ginn- Pease ME, Whisler RL. Redox signals and NF- kappa B activation in T cells[J]. *Free Radical Biol Med*, 1998, 25(3): 346- 361.
- [7] Epstein FH. NF- kappaB- a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1997, 336(115): 11066- 11071.
- [8] Shin WS, Szuba A, Rockson SG, et al. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights[J]. *Atherosclerosis*, 2002, 160(1): 91- 102.
- [9] 闻玉梅, 陆德源 主编. 现代医用微生物学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999. 570- 592.
- [10] Zhao B, Bowden RA, Stavchansky SA, et al. Human endothelial cell response to gram- negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays[J]. *Am J Physiol*, 2001, 281(5): C1587- C1595.
- [11] Miller SA, Selzman CH, Shames BD, et al. *Chlamydia Puumoniae* activates NF- kappaB and AP- 1 in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation[J]. *J Surg Res*, 2000, 90(1): 76- 81.
- [12] 史立宏, 王守训, 高 尔. 核因子- kappaB 的活化与动脉粥样硬化的启动[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(11): 1527- 1531.
- [13] Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the Ap- 1 complex in cell- proliferation and transformation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1072(2/3): 129- 157.
- [14] Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH. Induction and nuclear accumulation of Fos and Jun proto- oncogenes in hypoxic cardiac myocardiums[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(22): 16852- 16858.
- [15] Smeyhe RE, Venderell M, Hayward M, et al. Continuous c- fos expression precedes programmed cell death *in vivo*[J]. *Nature*, 1993, 363(1): 166- 169.