

肺炎衣原体抑制 LXR α -ABCA1 途径 促进巨噬细胞脂质蓄积*

赵国军¹⁾ 喻思扬²⁾ 刘 洋²⁾ 唐业华³⁾ 曾志英²⁾石小桥²⁾ 陈 莹²⁾ 曾高峰^{2)**} 王 燕^{2)**}⁽¹⁾ 桂林医学院组胚教研室, 桂林 541004; ⁽²⁾ 南华大学附二医院, 衡阳 421001; ⁽³⁾ 衡阳市中心医院, 衡阳 421001)

摘要 为探讨肝 X 受体 α (LXR α)-三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1)途径在肺炎衣原体 (*C. pneumoniae*)促巨噬细胞脂质蓄积中的作用和机制, 以 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞为模型, 采用高效液相色谱分析细胞内总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯含量, 液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出, RT-PCR 检测 ABCA1 和 LXR α mRNA 的表达, 蛋白质印迹检测 ABCA1 和 LXR α 的蛋白质表达; 使用 LXR α 的特异性激动剂 T0901317 对细胞进行预处理, 再观察上述指标的变化。结果显示, *C. pneumoniae* 可促进 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞内总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯含量增加, 抑制胆固醇外流, 降低细胞 ABCA1 和 LXR α 的表达; 使用 ABCA1 激动剂 8-溴-环磷酸腺苷预处理细胞或 LXR 激动剂 T0901317 预处理细胞后, 可明显减弱 *C. pneumoniae* 对 THP-1 细胞 ABCA1 的表达抑制, 促进细胞胆固醇流出, 降低细胞内胆固醇的含量。结果提示, *C. pneumoniae* 促进巨噬细胞脂质蓄积及胆固醇流出障碍, 其机制可能与 LXR α -ABCA1 途径有关。

关键词 肺炎衣原体, 肝 X 受体 α , 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1, 胆固醇流出, 脂质蓄积

学科分类号 R363, R5

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0123

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是众多心脑血管性疾病共同的病理学基础, 已成为危害人类健康的头号杀手。除传统危险因素高脂血症、糖尿病、高血压、吸烟、年龄和遗传等之外, 感染因素在 As 中的作用日益受到人们的重视^[1]。大量的实验证实, 肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumoniae*) 存在于动脉硬化斑块内, 而在正常的动脉中则非常少见^[2]。Meta 分析结果显示, 抗 *C. pneumoniae* IgG、IgA 和 *C. pneumoniae* DNA 与脑血管病有明显的相关性^[3]。相关证据表明, *C. pneumoniae* 可能参与了 As 发生发展的多个环节^[4]。

泡沫细胞形成是 As 形成早期的重要事件, 研究发现, *C. pneumoniae* 可促进泡沫细胞的形成, 其机制与 *C. pneumoniae* 下调巨噬细胞膜上三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding membrane cassette transporter A1, ABCA1) 有关^[5]。ABCA1 是介导细胞胆固醇流出的关键基因, 与高密度脂蛋白

(high density lipoprotein, HDL) 的形成和胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 密切相关^[6]。ABCA1 的表达和功能受到多种因素的调控。肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α) 是 ABCA1 的上游基因, 通过作用于 ABCA1 等靶基因启动子上的 LXR 反应元件 (liver X receptors response element, LXRE), 直接上调 ABCA1 等基因的表达, 进而促进胆固醇外流^[7]。然而, *C. pneumoniae* 能否通过 LXR α -ABCA1 途径发挥促巨噬细胞脂质蓄积的作用, 目前尚不清楚。因此, 本研究将观察 *C. pneumoniae* 对巨噬细胞脂质蓄积和胆固醇流出的影响, 并进一步探讨 LXR α -ABCA1 途径在此过

* 湖南省自然科学基金课题 (14JJ5016)。

** 通讯联系人。

Tel: 13178767048, E-mail: zzhcsu@163.com

收稿日期: 2015-04-24, 接受日期: 2015-08-20

程的作用, 为阐明 *C. pneumoniae* 促 As 和细胞脂质蓄积的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

THP-1 细胞购于中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所细胞中心; 8-溴-环磷酸腺苷(8-bromo-cAMP, 8-Br-cAMP) 购自 Sigma 公司; T0901317 购自 Cayman 公司; RNAiso plus 购自 TaKaRa 公司; Reverse Transcription System (ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) 购自 Promega 公司; 核蛋白提取试剂盒购自 Pierce 公司; ABCA1 和 LXR α 兔抗人一抗购自 Novus 公司; β -actin 鼠抗人一抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德公司; 蛋白质印迹 (Western blot) 荧光检测试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 THP-1 单核细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养 THP-1 单核细胞株。培养液中加青霉素和链霉素各 1.0×10^5 U/L。每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯 (PMA) 孵育 12 h, 诱导 THP-1 细胞分化成巨噬细胞, 再用含 50 mg/L 的 ox-LDL 无血清培养基培养 48 h, 使其吞噬脂质形成巨噬细胞源性泡沫细胞。

1.2.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

健康人血浆购自衡阳市中心血站, 参照文献[8]的方法制备低密度脂蛋白 (LDL)。制备的 LDL 在含 200 μ mol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) 的 PBS 溶液中透析 36 h, 充分去除 EDTA, 然后用含 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 溶液, 37℃ 透析 20 h, 进行氧化修饰。用 BCA 法进行蛋白质定量, 并进行氧化修饰和鉴定, 过滤除菌, 4℃ 保存备用。

1.2.3 *C. pneumoniae* 培养及感染 THP-1 巨噬细胞

C. pneumoniae 原株 AR-39 (ATCC) 接种于长满 Hep-2 细胞的培养板内, 按照水平离心法感染 Hep-2 细胞^[9]。具体方法如下: 25℃、2 000 r/min 离心 1 h, 放 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 1 h。吸去原培养液, 换新鲜的 *C. pneumoniae* 生长培养液, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养, 每隔 24 h 更换新鲜的 *C. pneumoniae* 生长培养液, 持续培养

72 h。收集细胞移入无菌离心管内, 在 -80℃、37℃ 反复冻融 5 次后, 超声处理, 4℃、2 500 r/min 离心 30 min, 弃细胞碎片, 上清分装并冻存在 -80℃ 备用。将 AR-39 (50 μ l) 重新感染 Hep-2 细胞, 培养 72 h 后, 行瑞氏-吉姆萨染色, 利用倒置显微镜观察形成的包涵体数目, 以包涵体形成单位 (inclusion forming units, IFU) 表示。感染时, THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞置于 24 孔板内, 加入不同浓度的 *C. pneumoniae* (IFU 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6), 35℃, 5% CO₂, 培养 48 h。某些实验中, THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞先用 ABCA1 激动剂 8-Br-cAMP (0.5 mmol/L) 或 LXR 激动剂 T090131710 (10 μ mol/L) 培养 24 h 后, 再加入 *C. pneumoniae* (1×10^6 IFU) 培养 48 h。

1.2.4 高效液相色谱分析

参照文献[10]方法, 待细胞处理结束后, 弃培养基, PBS 洗 3 遍, 加入细胞裂解液 200 μ l, 反复冻融 3 次裂解细胞, BCA 法定量蛋白质后, 7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行胆固醇检测, 以豆甾醇为内标。取 100 μ l 上清液, 加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 200 μ l, 水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇检测样品。各样品分别与内标液混匀, 用正己烷和无水乙醇抽提后, 1.5 mol/L 的三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥, 100 μ l 乙腈-异丙醇 (80:20) 溶解样品, 上样于高效液相色谱仪。采用 C-18 柱, 柱温 4℃, 流速 1 ml/min, 250 nm 紫外光检测, 胆固醇以峰面积定量, 内标校准, 以每克细胞总蛋白中胆固醇质量表示, 单位为 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.2.5 胆固醇流出实验

胆固醇流出检测参照文献[11]的方法进行。培养 THP-1 细胞, 实验前用 160 nmol/L 佛波酯孵育 THP-1 细胞 24 h, 使其诱导分化成巨噬细胞。各组细胞在加新鲜培养液与 ox-LDL 时, 同时加 7400 Bq/ml [³H]胆固醇孵育细胞 48 h。用 PBS 液洗涤细胞, 加 2 g/L 牛血清白蛋白, 再加 10 mg/L apoA-I 孵育细胞 12 h 后, 用闪烁计数法检测培养液和 THP-1 细胞内的 [³H]胆固醇。胆固醇流出率用培养液中 cpm 除以总 cpm (培养液 cpm + 细胞 cpm), 再乘以 100% 来表示。

1.2.6 逆转录聚合酶链反应

按试剂盒说明操作。人 ABCA1 引物序列: 上

游 5' GGT TTG GAG ATG GT T ATA CAA TAG TTG T 3', 下游 5' CCC GGA AAC GCA AGT CC 3'; 人 LXR α 引物序列: 上游 5' AGC GTC CAC TCA GAG CAA GT 3', 下游 5' GGG GAC AGA ACA GTC ATT CG 3'; 人 β -actin 引物序列: 上游 5' TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG 3', 下游 5' TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG 3'. 采用 Roche Light Cycler Run 5.32 型号荧光定量仪进行反应, 反应结束后进行扩增曲线、溶解曲线分析及结果统计. 目的基因的表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算.

1.2.7 蛋白质免疫印迹检测

参照文献[11]方法: 提取蛋白质样品, 加入适量 5 $\times$ SDS 上样缓冲液和 10% β 巯基乙醇, 100 $^{\circ}$ C 煮 10 min, 10% SDS-PAGE 后电转移至 PVDF 膜上. 5%脱脂牛奶室温封闭 4 h, 分别加入 ABCA1 (1: 500)、LXR α (1: 500)和 β -actin (1: 2 000)一抗孵育 4~8 h, TBST 洗涤 30 min, 每 10 min 换液 1 次. 加入 1: 1000 辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 30 min, 每 10 min 换液 1 次. 用 Western blot 荧光检测试剂盒显示于 X 光片. 结果用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片进行扫描, 分析目的蛋白与内参蛋白条带的灰度值, 以二者的比值代表目的蛋白表达的变化.

1.2.8 统计学分析

实验所得数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示. 用 SPSS 12.0 进行统计处理, 两样本均数的比较采用 t 检验, 多样本组间均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 判定差异的显著性.

2 实验结果

2.1 *C. pneumoniae* 感染对巨噬细胞脂质蓄积和胆固醇流出的影响

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经不同浓度 (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 IFU) 的 *C. pneumoniae* 感染后, 高效液相色谱法检测细胞内的总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC) 和胆固醇酯 (CE) 含量变化. 如表 1 所示, 在 5×10^5 IFU 的 *C. pneumoniae* 感染细胞组, TC 和 CE 的含量明显升高; 在 1×10^6 IFU 感染组, 细胞内 TC、FC 和 CE 的含量均明显升高. 结果提示, *C. pneumoniae* 感染可促进 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积. 进一步通过闪烁计数法检测细胞胆固醇的流出情况, 发现 5×10^5 IFU 和 1×10^6 IFU *C. pneumoniae* 感染组胆固醇流出明显下降(图 1).

Table 1 The effect of different concentrations of *C. pneumoniae* infection on the cholesterol and cholesterol ester concentration in foam cells

	IFU			
	–	1×10^5	5×10^5	1×10^6
TC/(mg $\cdot$ g $^{-1}$)	493 $\pm$ 19	512 $\pm$ 41	576 $\pm$ 35*	615 $\pm$ 28*
FC/(mg $\cdot$ g $^{-1}$)	198 $\pm$ 22	204 $\pm$ 16	214 $\pm$ 24	231 $\pm$ 17*
CE/(mg $\cdot$ g $^{-1}$)	295 $\pm$ 18	308 $\pm$ 25	362 $\pm$ 31*	384 $\pm$ 15*
CE/TC	0.598	0.602	0.628	0.624

TC: Total cholesterol, FC: Free cholesterol, CE: Cholesterol ester.

* $P < 0.05$, compared with control group; $n=3$.

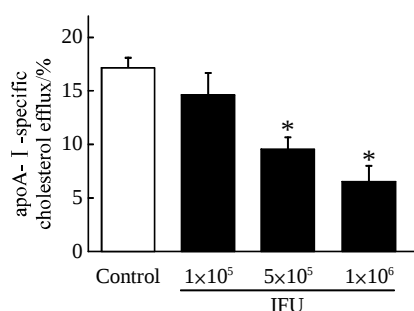


Fig. 1 Effect of different concentrations of *C. pneumoniae* infection on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells

THP-1 macrophage-derived foam cells were cultured in medium with different concentrations of viable *C. pneumoniae* (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 IFU) for 48 h. Cellular cholesterol efflux was analyzed by liquid scintillation counting assays as described in **Materials and methods**. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group. * $P < 0.05$ vs the control group.

2.2 *C. pneumoniae* 感染对巨噬细胞 ABCA1 和 LXR α 表达的影响

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经不同浓度的 *C. pneumoniae* 感染后, 分别提取细胞总 RNA 和总蛋白, 经 Real-time PCR 和 Western blotting 检测细胞内的 mRNA 和蛋白质表达情况. 结果发现, 细胞 ABCA1(图 2)和 LXR α (图 3)的 mRNA 和蛋白质的表达明显下调, 提示 *C. pneumoniae* 感染促巨噬细胞脂质蓄积和减少胆固醇外流, 可能与抑制 LXR α - ABCA1 途径有关.

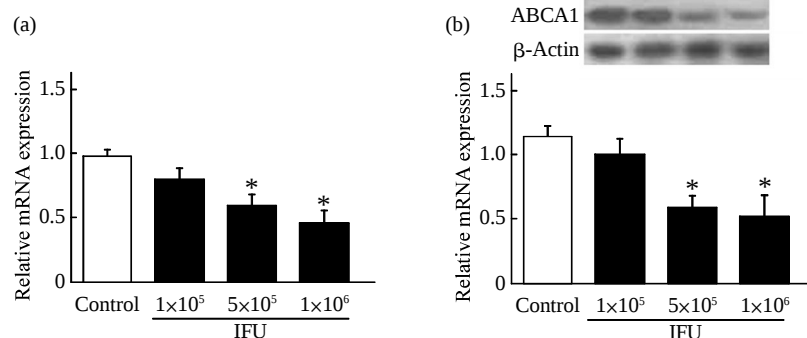


Fig. 2 Effect of different concentrations of *C. pneumoniae* infection on ABCA1 expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

THP-1 macrophage-derived foam cells were cultured in medium with different concentrations of viable *C. pneumoniae* (1×10⁵, 5×10⁵, 1×10⁶ IFU) for 48 h. The levels of ABCA1 mRNA (a) and protein (b) were measured by Real-time PCR and Western blotting assays, respectively. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group. * $P < 0.05$ vs the control group.

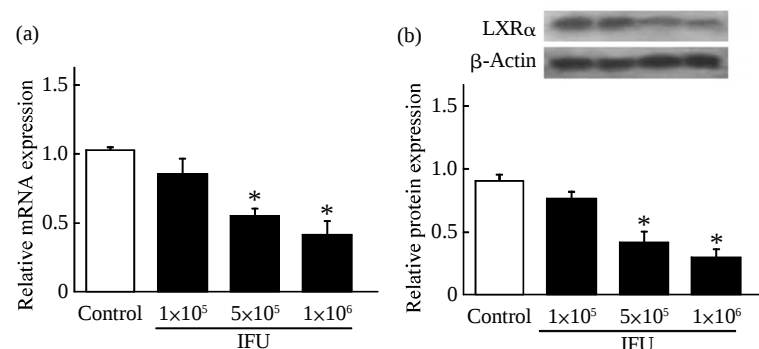


Fig. 3 Effect of different concentrations of *C. pneumoniae* infection on LXR α expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

THP-1 macrophage-derived foam cells were cultured in medium with different concentrations of viable *C. pneumoniae* (1×10⁵, 5×10⁵, 1×10⁶ IFU) for 48 h. The levels of LXR α mRNA (a) and protein (b) were measured by Real-time PCR and Western blotting assays, respectively. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group. * $P < 0.05$ vs the control group.

2.3 ABCA1 在 *C. pneumoniae* 感染调控巨噬细胞胆固醇流出和脂质蓄积中的作用

我们观察了 ABCA1 激动剂 8-Br-cAMP 对 ABCA1 mRNA 表达的作用, 结果发现, 与单独加 *C. pneumoniae* 感染组比较, *C. pneumoniae* 感染 + 8-Br-cAMP 组可见 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达明显升高 (图 4a), 该组胆固醇流出也明显增加 (图 4b). 另外, 与单独加 *C. pneumoniae* 感染组比较, 8-Br-cAMP 可明显减少细胞内 TC 和 CE 的含量 (表 2), 提示 ABCA1 可能参与了

C. pneumoniae 感染对巨噬细胞胆固醇流出和脂质蓄积的调控。

2.4 LXR α 在 *C. pneumoniae* 感染抑制巨噬细胞 ABCA1 表达中的作用

如图 5 所示, 与对照组比较, *C. pneumoniae* 感染组巨噬细胞 ABCA1 表达明显减少, 与单独添加 *C. pneumoniae* 感染组比较, *C. pneumoniae* 感染 + LXR 激动剂 T0901317 组 ABCA1 mRNA 和蛋白质的表达水平明显提高, 提示 LXR α 可能参与了 *C. pneumoniae* 感染对巨噬细胞 ABCA1 表达的抑制。

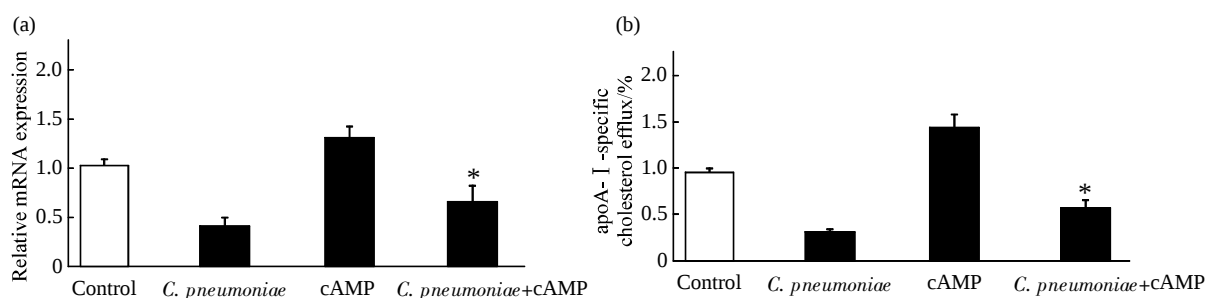


Fig. 4 ABCA1 involved in the regulation of *C. pneumoniae* infection on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells

THP-1 macrophage-derived foam cells were pretreated with or without ABCA1 agonist 8-Br-cAMP (cAMP, 0.5 mmol/L) for 24 h, followed by incubation with viable *C. pneumoniae* for 48 h. (a) The levels of ABCA1 mRNA were measured by Real-time PCR. (b) Cellular cholesterol efflux was analyzed by liquid scintillation counting assays as described in **Materials and Methods**. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group. * $P < 0.05$ vs the *C. pneumoniae* group.

Table 2 ABCA1 and LXR α involved in the regulation of *C. pneumoniae* infection on the cholesterol and cholesterol ester concentration in foam cells

	–	<i>C. pneumoniae</i>	cAMP	<i>C. pneumoniae</i> +cAMP	T0	<i>C. pneumoniae</i> +T0
TC/(mg·g ⁻¹)	508±32	623±38	442±33	524±34*	417±24	548±21*
FC/(mg·g ⁻¹)	196±15	233±11	185±12	194±23	194±17	223±14
CE/(mg·g ⁻¹)	312±24	390±25	257±18	319±15*	231±31	325±22*
CE/TC	0.614	0.626	0.581	0.608	0.554	0.593

TC: Total cholesterol, FC: Free cholesterol, CE: Cholesterol ester. * $P < 0.05$, compared with *C. pneumoniae* group; $n=3$.

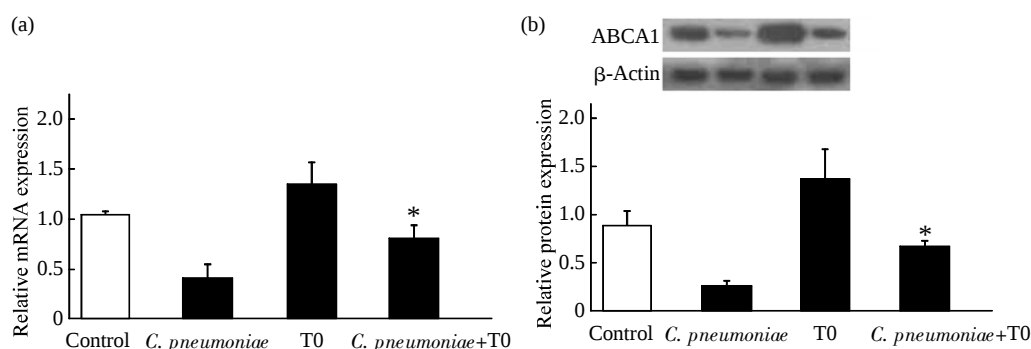


Fig. 5 LXR α involved in the regulation of *C. pneumoniae* infection on ABCA1 expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

THP-1 macrophage-derived foam cells were pretreated with or without LXR agonist T0901317 (T0, 10 μ mol/L) for 24 h, followed by incubation with viable *C. pneumoniae* for 48 h. The levels of ABCA1 mRNA (a) and protein (b) were measured by Real-time PCR and Western blotting assays, respectively. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group. * $P < 0.05$ vs the *C. pneumoniae* group.

2.5 LXR α 在 *C. pneumoniae* 感染调控巨噬细胞胆固醇流出和脂质蓄积中的作用

与单独添加 *C. pneumoniae* 感染组比较, *C. pneumoniae* 感染+T0901317 组胆固醇流出明显

增加(图 6), 同时, 细胞内 TC 和 CE 的含量明显减少(表 2), 提示 LXR α 可能参与了 *C. pneumoniae* 感染对巨噬细胞胆固醇流出和脂质蓄积的调控。

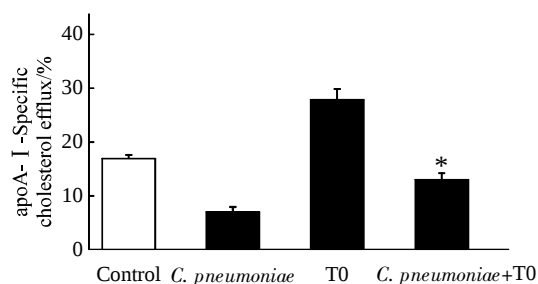


Fig. 6 LXR α involved in the regulation of *C. pneumoniae* infection on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells

THP-1 macrophage-derived foam cells were pretreated with or without LXR agonist T0901317(T0, 10 μ M/L) for 24 h, followed by incubation with viable *C. pneumoniae* for 48 h. Cellular cholesterol efflux was analyzed by liquid scintillation counting assays as described in **Materials and Methods**. The data are represented as the $\bar{x} \pm s$, $n=3$ in each group. * $P < 0.05$ vs the *C. pneumoniae* group.

3 讨 论

泡沫细胞的来源可分为巨噬细胞源性和平滑肌细胞源性, 其中巨噬细胞源性泡沫细胞主要产生于 As 早期. 巨噬细胞具有很强的氧化能力, 使迁入动脉壁的低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 被氧化修饰, 同时, 细胞膜上 LDL 受体功能受到抑制, 转而激活清道夫受体或其家族其他成员, 而这些受体的表达不受细胞内胆固醇水平的抑制, 使得脂质在细胞内大量蓄积, 进而形成泡沫细胞^[12]. 因此本实验在细胞模型的选择上, 没有使用 LDL 加 *C. pneumoniae* 感染来复制泡沫细胞的形成过程, 而是直接使用常规的氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 处理制备巨噬细胞源性泡沫细胞, 然后在此基础上, 再观察 *C. pneumoniae* 感染是否能进一步加重细胞的脂质蓄积. 实验结果证实, *C. pneumoniae* 感染能进一步增加细胞内 TC、FC 和 CE 的含量, 使细胞脂质蓄积加重. 另外, 选用巨噬细胞源性泡沫细胞作为实验细胞模型, 还考虑了实验时主要考察的指标, 因为 ox-LDL 刺激能明显升高细胞内的 ABCA1 和 LXR α 表达, 有利于对 *C. pneumoniae* 感染后指标变化的观测.

胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)是机体胆固醇清除的重要途径, 主要步骤包

括高密度脂蛋白 (HDL) 促进外周组织细胞胆固醇流出, 转运至肝脏, 然后部分地从胆汁和粪便中清除^[13]. 因此 RCT 对于维持细胞内胆固醇的含量具有重要的调节作用. 本实验中, 我们发现, *C. pneumoniae* 感染可抑制 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出, 减弱巨噬细胞的 RCT, 从而使得细胞内胆固醇含量增加. 我们的实验结果与何平等^[14]在巨噬细胞模型上所做的结果一致.

目前的研究认为, 有三个膜运转体在巨噬细胞胆固醇流出中起关键作用, 它们分别是 ABCA1、三磷酸腺苷结合盒转运体 G1 (ATP-binding cassette transporter G1, ABCG1) 和 B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor class B type I, SR-B I)^[15]. 对于富含脂质的细胞来说, 比如泡沫细胞, 流出脂质中的绝大部分是由 ABCA1 介导的^[16], 因此, 我们重点观察了 *C. pneumoniae* 感染对 ABCA1 表达的影响. 实验结果发现, *C. pneumoniae* 感染可有效降低巨噬细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白质的表达. 而使用 ABCA1 的激动剂 8-Br-cAMP 后, *C. pneumoniae* 感染所导致的 ABCA1 降低、胆固醇流出下降和脂质蓄积得到有效缓解, 说明 ABCA1 参与了 *C. pneumoniae* 感染对细胞的蓄脂作用.

LXR α 是 ABCA1、ABCG1 以及胆汁酸合成的关键酶, 合成 LXR 激动剂, 如 T0901317 可抑制鼠 As 的进展, 甚至可促进 As 逆转, 其主要作用在于促进了 ABCA1 介导的泡沫细胞胆固醇外流^[17]. 我们的结果发现, *C. pneumoniae* 感染也能降低 LXR α 的表达水平, 而进一步使用 LXR α 激动剂 T0901317 则能有效逆转 *C. pneumoniae* 感染所导致的 ABCA1 降低、胆固醇流出下降和脂质蓄积, 说明 LXR α 在 *C. pneumoniae* 促巨噬细胞脂质蓄积中可能发挥重要作用. 另外, 在感染 *C. pneumoniae* 的人 As 斑块处, 也发现巨噬细胞 LXR α 表达下调, 和我们在体外的实验结果一致^[18].

本实验中, 重点观察了 LXR α 及其下游靶 ABCA1 在 *C. pneumoniae* 感染促巨噬细胞脂质蓄积中的作用, 结果证实了 *C. pneumoniae* 感染可通过抑制 LXR α -ABCA1 途径, 进而抑制胆固醇流出, 并促进细胞脂质蓄积. 本课题组前期研究发现, *C. pneumoniae* 感染还可通过 Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, TLR2)-核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 途径抑制巨噬细胞 ABCA1 表达及胆固醇的流出^[19]. 这两条途径之间存在着一些内在的联系: 首先, 这两条途径都与炎症密切相关, NF- κ B 是机

体炎症反应中重要的转录调节因子, 而 LXR α 也被发现具有抗炎效应^[20]; 其次, 我们的实验结果证实 *C. pneumoniae* 感染能促进 NF- κ B 活化而抑制 LXR α 表达, 提示 NF- κ B 与 LXR α 可能存在相反的作用; 最后, 体内实验也发现使用 NF- κ B 特异性抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷 (pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC) 抑制 apoE^{-/-} 小鼠 NF- κ B 活化, 可显著提高 LXR α 的表达水平、抑制炎症并促进 As 斑块稳定^[21].

除了上述两种途径之外, 研究还发现 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)- 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)-ABCA1、ABCG1 途径^[14] 以及 PPAR γ - 胆固醇酰基转移酶 1 (cholesterol acyltransferase 1, ACAT1)^[22]等途径均可在 *C. pneumoniae* 感染促巨噬细胞脂质蓄积中发挥作用. 这些不同途径之间有何种内在的联系, 以及各种途径在哪些特定的刺激下发挥主导, 等等, 还需要通过进一步的实验来验证. 总之, 我们的实验有助于阐明 *C. pneumoniae* 感染促进巨噬细胞脂质蓄积的机制及其在 As 中的作用, 也有助于为 As 防治提供新的治疗策略和理论依据.

参 考 文 献

- [1] Burgner D P, Sabin M A, Magnussen C G, *et al.* Early childhood hospitalisation with infection and subclinical atherosclerosis in adulthood: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis*, 2015, **239**(2): 496-502
- [2] Watson C, Alp N J. Role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)*, 2008, **114**(8): 509-531
- [3] Chen J, Zhu M, Ma G, *et al.* *Chlamydia pneumoniae* infection and cerebrovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol*, 2013, **13**: 183
- [4] 谢长青, 吴移谋. 肺炎嗜衣原体感染与动脉粥样硬化的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2008 (04): 332-334
Xie C Q, Wu Y M. *Chin J Atherosclerosis*, 2008 (04): 332-334
- [5] 梅春丽, 何平, 成蓓, 等. 肺炎衣原体通过下调 ABCA1 和 ABCG1 诱导 THP-1 源性泡沫细胞形成. *中国免疫学杂志*, 2009, **25** (2): 108-113
Mei C L, He P, Cheng B, *et al.* *Chin J Immunol*, 2009, **25** (2): 108-113
- [6] Zhao G J, Yin K, Fu Y C, *et al.* The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids. *Mol Med*, 2012, **18** (1): 149-158
- [7] 唐朝克, 贺修胜, 易光辉, 等. 肝 X 受体 α 在泡沫细胞胆固醇流出中的调控作用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**(06): 940-944
Tang C K, He X S, Yi G H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**(06): 940-944
- [8] 赵国军, 汤石林, 田国平, 等. 肝 X 受体激动剂 T0901317 对脂多糖诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症因子释放的影响及其机制. *中国动脉硬化杂志*, 2013, **21** (7): 594-598
Zhao G J, Tang S L, Tian G P, *et al.* *Chin J Atherosclerosis*, 2013, **21** (7): 594-598
- [9] Roblin P M, Dumornay W, Hammerschlag M R. Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 1992, **30**(8): 1968-1971
- [10] He P P, Ouyang X P, Tang Y Y, *et al.* MicroRNA-590 attenuates lipid accumulation and pro-inflammatory cytokine secretion by targeting lipoprotein lipase gene in human THP-1 macrophages. *Biochimie*, 2014, **106**: 81-90
- [11] Mo Z C, Xiao J, Tang S L, *et al.* Advanced oxidation protein products exacerbates lipid accumulation and atherosclerosis through downregulation of ATP-binding cassette transporter A1 and G1 expression in apolipoprotein E knockout mice. *Circ J*, 2014, **78** (11): 2760-2770
- [12] Kodama T, Freeman M, Rohrer L, *et al.* Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, 1990, **343** (6258): 531-535
- [13] 汤石林, 唐朝克. 急性期应答与胆固醇逆向转运. *生命的化学*, 2011, **31**(03): 438-441
Tang S L, Tang C K. *Chemistry of Life*, 2011, **31**(03): 438-441
- [14] 何平, 刘玮, 成蓓, 等. 肺炎衣原体下调 THP-1 源性巨噬细胞 ABCA1、ABCG1 表达的机制研究. *中国病理生理杂志*, 2010, **26** (1): 64-69
He P, Liu W, Cheng B, *et al.* *Chin J Pathophysiol*, 2010, **26** (1): 64-69
- [15] 路倩, 陈五军, 尹凯, 等. 动脉粥样硬化中胆固醇外流的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2012, **39** (4): 319-326
Liu Q, Chen W J, Yin K, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2012, **39** (4): 319-326
- [16] Adorni M P, Zimetti F, Billheimer J T, *et al.* The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res*, 2007, **48** (11): 2453-2462
- [17] Dai X, Ou X, Hao X, *et al.* Effect of T0901317 on hepatic proinflammatory gene expression in apoE^{-/-} mice fed a high-fat/high-cholesterol diet. *Inflammation*, 2007, **30** (3-4): 105-117
- [18] Bobryshev Y V, Orekhov A N, Killingsworth M C, *et al.* Decreased expression of liver X receptor-alpha in macrophages infected with *Chlamydia pneumoniae* in human atherosclerotic arteries *in situ*. *J Innate Immun*, 2011, **3** (5): 483-494
- [19] 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. *Atherosclerosis*, 2014, **235** (2): 519-525
- [20] Huang N, Shaik-Dasthagirisheh Y B, LaValley M P, *et al.* Liver X receptors contribute to periodontal pathogen-elicited inflammation and oral bone loss. *Mol Oral Microbiol*. 2015[Epub ahead of print] (DOI: 10.1111/omi.12103)

- [21] Bhat O M, Kumar P U, Giridharan N V, *et al.* Interleukin-18-induced atherosclerosis involves CD36 and NF- κ B crosstalk in Apo E⁻ mice. *J Cardiol.* 2015, **66**(1): 28-35
- [22] 梅春丽, 何平, 成蓓, 等. PPAR γ -ACAT1 途径在肺炎衣原体

诱导巨噬细胞泡沫化中的作用. *中国病理生理杂志*, 2009, **25** (7): 1312-1318

Mei C L, He P, Cheng B, *et al.* *Chin J Pathophysiol*, 2009, **25** (7): 1312-1318

Chlamydia pneumoniae* Promotes Macrophage Lipid Accumulation Through Inhibition of Liver X Receptor alpha-ABCA1 Pathway

ZHAO Guo-Jun¹, YU Si-Yang², LIU Yang², TANG Ye-Hua³, ZENG Zhi-Ying²,
SHI Xiao-Qiao², CHEN Ying², ZENG Gao-Feng^{2**}, WANG Yan^{2**}

¹ Department of Histology and Embryology, Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

² The Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China;

³ The Central Hospital of Hengyang, Hengyang 421001, China)

Abstract In order to investigate the roles and mechanisms of liver X receptor alpha (LXR α)-ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) pathway in *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) infection induced macrophage lipid accumulation. THP-1 macrophage derived foam cells were used as the cell model. Cellular cholesterol was determined by high performance liquid chromatography analysis. Cholesterol efflux was determined by liquid scintillator. ABCA1 and LXR α mRNA expression was detected by RT-PCR and protein expression was detected by Western blot. Furthermore, we pretreated the cells with LXR α specific agonist T0901317, and then observed the changes of indexes mentioned above. The result showed that *C. pneumoniae* infection could increase the content of total cholesterol, free cholesterol and cholesterol ester, inhibit the efflux of cholesterol from cells, and reduce the expression of ABCA1 and LXR α . The suppression of *C. pneumoniae* infection on ABCA1 expression was significantly attenuated after the use of ABCA1 agonist 8-Br-cAMP or LXR agonist T0901317, correspondingly, cholesterol efflux was promoted and the content of intracellular cholesterol was elevated. These results suggested that the mechanism of *C. pneumoniae* infection promoting lipid accumulation in macrophages and suppresses cholesterol efflux may be related to LXR α -ABCA1 pathway.

Key words *Chlamydia pneumoniae*, liver X receptor alpha, ATP binding cassette transporter A1, cholesterol efflux, lipid accumulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0123

*This work was supported by a grant from Hunan Provincial Natural Science Foundation (14JJ5016).

**Corresponding author.

Tel: 86-13178767048, E-mail: zzhcsu@163.com

Received: April 24, 2015 Accepted: August 20, 2015