

· 医药生物技术 ·

# Dickkopf 相关蛋白 1 抑制肺炎支原体 P1-C 诱导小鼠肺上皮细胞过度分泌 MUC5AC

石娟, 马春骥, 郝秀静, 罗海霞, 李敏\*

宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021

石娟, 马春骥, 郝秀静, 罗海霞, 李敏. Dickkopf 相关蛋白 1 抑制肺炎支原体 P1-C 诱导小鼠肺上皮细胞过度分泌 MUC5AC[J]. 生物工程学报, 2023, 39(1): 248-261.

SHI Juan, MA Chunji, HAO Xiuqing, LUO Haixia, LI Min. Dickkopf-1 inhibits the secretion of MUC5AC induced by *Mycoplasma pneumoniae* P1-C in mouse lung epithelial cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(1): 248-261.

**摘要:**肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)是儿童和成人最常见的呼吸道感染病原体。临床观察肺炎支原体感染会引起呼吸道黏液大量分泌,给患者呼吸造成困难,已有研究表明肺炎支原体感染会引起大量黏蛋白 5AC (mucin 5AC, MUC5AC)的分泌。肺炎支原体 P1 黏附素通过介导病原体与宿主细胞的黏附在肺炎支原体感染的发病机制中发挥重要作用,其中 P1 的 C-末端残基(P1-C)具有免疫原性。本研究探讨了 Wnt (*Wingless*, Wnt)/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制因子 Dickkopf-1 (Dickkopf-1, DKK1)在肺炎支原体 P1-C 诱导的肺上皮细胞分泌黏蛋白 MUC5AC 的分子机制。利用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肺炎支原体 P1-C 对小鼠肺上皮细胞(mouse airway epithelial cells, MAECs)黏液分泌的影响;利用蛋白芯片技术检测肺炎支原体 P1-C 对小鼠气道上皮细胞炎症因子分泌及对相关信号通路的富集分析;采用糖原染色(periodic acid schiff stain, PAS)、Tunel 染色、Masson 染色检测肺炎支原体 P1-C 对小鼠肺的损伤情况;采用免疫组化检测黏蛋白 MUC5AC 的分泌情况,采用蛋白免疫印迹检测 DKK1 调控肺炎支原体 P1-C 蛋白诱导小鼠肺上皮细胞分泌黏蛋白 MUC5AC 的分子机制。结果表明,肺炎支原体 P1-C 能够引起小鼠原代上皮细胞大量黏液和炎症因子的分泌,在肺炎支原体 P1-C 感染中,DKK1 能下调 JAK 激酶 2 (janus kinase 2, JAK2)、磷酸化信号传导与转录激活因子 1 (phosphorylation signal transducer and activator of transcription 1, p-STAT1)和磷酸化信号传导与转录激活因子 3 (phosphorylation signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3)蛋白的表达;同时,DKK1 过表达显著上调 MUC5AC 抑制转录因子叉头框蛋白 A2 (fork-head box A2, FOXA2)的表达,从而显著抑制了肺炎支原体 P1-C 诱导的 MUC5AC 的表达。通过该研究推测 DKK1 通过抑制 JAK/STAT1-STAT3 信号通路以及上调 FOXA2 的表达有效地减少肺炎支原体 P1-C 诱导的小鼠肺上

资助项目: 国家自然科学基金(31960036); 宁夏回族自治区自然科学基金(2020AAC03259)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31960036) and the Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (2020AAC03259).

\*Corresponding author. E-mail: lim@nxu.edu.cn

Received: 2022-07-01; Accepted: 2022-10-10; Published online: 2022-10-12

皮细胞 MUC5AC 的分泌。

关键词：肺炎支原体；P1 黏附素；黏蛋白 5AC；Dickkopf 相关蛋白 1

## Dickkopf-1 inhibits the secretion of MUC5AC induced by *Mycoplasma pneumoniae* P1-C in mouse lung epithelial cells

SHI Juan, MA Chunji, HAO Xiuqing, LUO Haixia, LI Min\*

School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

**Abstract:** *Mycoplasma pneumoniae* is the most common pathogen of respiratory tract infection in children and adults. Clinical observation shows that *M. pneumoniae* infection can cause massive mucus secretion in the respiratory tract, which makes the breathing of patients difficult. Studies have shown that *M. pneumoniae* infection can cause massive secretion of mucin 5AC (MUC5AC). Adhesin P1 plays an important role in the pathogenesis of *M. pneumoniae* infection by mediating the adhesion of pathogens to host cells, and the C-terminal residues of P1 (P1-C) are immunogenic. This study investigated the molecular mechanism of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway inhibitor Dickkopf-1 (DKK1) in the secretion of MUC5AC in mouse airway epithelial cells (MAECs) induced by P1-C. Scanning electron microscope and hematoxylin-eosin staining were used to observe the effect of P1-C on mucus secretion of MAECs. Protein chip was used to detect the secretion of cytokines and analyse the enrichment of related signaling pathways induced by P1-C in MAECs. Periodic acid schiff stain (PAS) staining, Tunel staining and Masson staining were used to detect the damage of the lungs of mouse exposed to P1-C. Immunohistochemistry was used to detect the secretion of MUC5AC expression, and Western blotting was used to reveal the molecular mechanism of DKK1-regulated secretion of MUC5AC induced by P1-C protein in MAECs. The results showed that P1-C induced the massive secretion of mucus and inflammatory factors in MAECs. During P1-C infection, DKK1 down-regulated janus kinase 2 (JAK2), phosphorylation signaling and transcription activator 1 (p-STAT1) and phosphorylation signaling and activator of transcription 3 (p-STAT3) expression. Overexpression of DKK1 significantly up-regulated the expression of MUC5AC repressor transcription factor fork-head box protein A2 (FOXA2). At the same time, the expression of MUC5AC induced by P1-C was inhibited significantly. It is speculated that DKK1 can effectively reduce the secretion of MUC5AC in MAECs induced by P1-C by inhibiting the JAK/STAT1-STAT3 signaling pathway and up-regulating the expression of FOXA2.

**Keywords:** *Mycoplasma pneumoniae*; P1 adhesin; mucin 5AC (MUC5AC); Dickkopf-1

微生物病原体诱导黏液异常分泌是诱导气道疾病加重的机制之一<sup>[1-2]</sup>，肺炎支原体

(*Mycoplasma pneumoniae*)感染是社区获得性肺炎最常见的病因。长期以来肺炎支原体是儿童

和成人最常见的呼吸道感染病原体<sup>[3]</sup>,也一直被认为是一些呼吸道慢性感染和急性加重的触发器<sup>[3-4]</sup>。其中肺炎支原体黏附蛋白 P1 是肺炎支原体黏附上皮细胞的主要介质, P1 蛋白的 C 末端具有免疫原性<sup>[5]</sup>。已有研究表明肺炎支原体感染会造成肺上皮细胞黏蛋白 5AC (mucin 5AC, MUC5AC)的大量分泌<sup>[6]</sup>,但是肺炎支原体黏附蛋白 P1 是否参与肺上皮细胞黏液异常分泌尚不清楚。

气道上皮细胞分泌的黏液形成一层保护膜,可以捕获外来颗粒和微生物,通过黏液和纤毛转运促进其清除<sup>[7]</sup>。黏蛋白是黏液的主要组成成分,具有气道粘弹性和清除特性,其中 MUC5AC 是气道的一类主要大分子黏蛋白<sup>[8-9]</sup>。通常缺乏黏液屏障使肺部容易受到损伤,但异常的黏蛋白分泌和积累在气道疾病的发病过程中却起着负面作用,黏液堵塞在哮喘和慢性阻塞性肺疾病中是气道狭窄和死亡的主要原因<sup>[10-11]</sup>。因此, MUC5AC 的过度分泌在急性肺损伤中是有害的<sup>[12]</sup>。叉头框蛋白 A2 (fork-head box A2, FOXA2)是抑制黏蛋白合成的转录因子<sup>[13-14]</sup>,其中 FOXA2 在支气管扩张和哮喘患者的气道中表达减少<sup>[15]</sup>。已有研究表明肺炎支原体感染能够引起 MUC5AC 的过表达,维持气道中 FOXA2 的功能,可改善患者的肺功能<sup>[6]</sup>。我们推测肺炎支原体 P1-C 参与了肺炎支原体感染引起的黏蛋白 MUC5AC 异常表达。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路拮抗剂 Dickkopf (DKK)家族最近引起了越来越多的关注<sup>[16]</sup>,其中包括 4 个蛋白质成员, DKK1、DKK2、DKK3 和 DKK4。它们被合成为由蛋白水解切割激活的前体蛋白<sup>[17]</sup>。DKK1 是该家族中研究最多的成员,它可以通过结合 LRP-5/6,然后降解受体来抑制 Wnt 信号,因此被认为是 Wnt 信号活性异常疾病的潜在靶点<sup>[18-19]</sup>。此外, DKK1 是

研究最多的 Wnt 信号抑制剂候选药物之一,用于多种疾病的治疗,包括肺癌<sup>[20]</sup>、纤维化疾病<sup>[21]</sup>和自身免疫性疾病<sup>[22]</sup>。这表明 DKK1 可能是一种鉴定传染性疾病的新型生物标志物。

之前的研究表明 DKK1 参与了肺炎支原体 P1-C 感染小鼠肺的炎症调控,能够有效地缓解肺炎支原体 P1-C 引起的过度炎性反应造成的肺损伤,因此,推测 DKK1 对肺炎支原体 P1-C 诱导的黏蛋白 MUC5AC 的分泌也有调控作用。肺炎支原体 P1-C 是否是肺炎支原体感染引起黏液异常分泌的主要因素,以及 DKK1 是否参与肺炎支原体 P1-C 蛋白诱导的黏液分泌尚不清楚。本研究旨在探讨 DKK1 调控肺炎支原体 P1-C 蛋白诱导肺上皮细胞分泌黏蛋白 MUC5AC 的分子机制,以对肺炎支原体感染引起的肺炎治疗具有积极的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物、细胞和抗体

C57/BL6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;小鼠原代气道上皮细胞从 C57/BL6 小鼠气道中分离得到; Colivelin TFA 购自 MedChemExpress 公司(使用浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );抗体信息见表 1。

#### 1.1.2 主要实验仪器和试剂

实验中所用的主要仪器有扫描电镜(型号: S-3700N, 日立公司),凝胶成像仪(型号: CHEMI DOC MP, Bio-Rad 公司),倒置荧光显微镜(型号: IX53, Olympus 公司);主要试剂有 Recombinant *Mycoplasma pneumoniae* P1-C (*M. pneumoniae* P1-C, 0.86 mg/mL) (PROSPEC 公司), PneumaCult ALI 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司), Accutase solution 细胞消化酶(Sigma 公司)等。

表 1 实验中使用的抗体信息表

Table 1 Antibodies used in this study

Protein	Type	Vendor	Product No.	Molecular weight (kDa)
Mucin5AC	Mouse	Abcam	Ab3649	527
FOAX2	Rabbit	Proteintech	22474-1-AP	48
Active- $\beta$ -catenin	Rabbit	Cell signaling	#8814	92
DKK1	Rabbit	Abcam	21112-1-AP	29
JAK2	Rabbit	Cell signaling	#3230	125
Phospho-STAT3	Rabbit	Cell signaling	#9145	79
Phospho-STAT1	Rabbit	Cell signaling	#7649	84
$\beta$ -actin	Mouse	Proteintech	66009	42
GAPDH	Mouse	Proteintech	60004-1-Ig	36

## 1.2 方法

### 1.2.1 原代气道上皮细胞气液相培养模型的建立

本研究涉及的动物实验已通过宁夏医科大学总医院医学科研伦理委员会审查(批准号: KYLL-2022-0240)。随机选取 2 只大小为 2-3 月龄的 C57BL/6 小鼠取其气管,把气管剪成小段用预冷的气管清洗液漂洗 3-5 次,每次 5 min,将洗好的气管放入 2 mL 的 EP 管中,加入 1.5 mL 预冷的消化液 4 °C 过夜。消化完,用枪头吹吸组织多次,加入含 5%胎牛血清培养基终止消化。收集消化液到 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清收集细胞,用 Ex-plus basal medium (STEMCELL 公司)培养基重悬,将分离到的细胞培养至用胶原已包被过夜的 60 mm 培养皿中,每 2 d 进行换液,大概培养至第 7 天细胞长满,用 Accutase solution (SLBX5617, SIGMA)细胞消化液进行消化,将细胞传代到 P3 代时,细胞计数,按  $1.5 \times 10^6$  个细胞/每个小室(孔径 0.4  $\mu\text{m}$ , MILICELL-<sup>®</sup>PCF)进行接种,继续加 Ex-plus basal medium 培养基在气液相环境下培养 2-3 d,观察细胞长满整个小室不再漏液,换 1 $\times$ Ultrosor G 代血清动物培养基 (BioSeptra 公司)进行分化培养,每 2 d 换 1 次液,液界面维持 3 周进行生长分化。

### 1.2.2 肺炎支原体 P1-C 感染小鼠肺及小鼠原代气道上皮细胞

建立肺炎支原体 P1-C 感染小鼠模型,肺炎支原体 P1-C 蛋白使用前,用 1 $\times$ PBS (pH 7.4)稀释至 200 ng/ $\mu\text{L}$ 。小鼠被随机分为不同实验组(每组 6 只,6-8 周龄 C57BL/6 雄性和雌性小鼠各 3 只)。设置 PBS 对照组(0、7、14、21 和 28 d,每个时间点 6 只小鼠,其中雌雄各 3 只,共 30 只)和肺炎支原体 P1-C 感染组(0、7、14、21 和 28 d,每个时间点 6 只小鼠,其中雌雄各 3 只,共 30 只)。在第 0 天对 30 只 PBS 对照组小鼠采用气管内灌注 PBS 各 50  $\mu\text{L}$ ,以及对肺炎支原体 P1-C 感染组 30 只小鼠采用气管内灌注肺炎支原体 P1-C 蛋白(200 ng/每 g 小鼠体重)。对两组小鼠灌肺后分别于第 0 天(PBS 组 6 只, P1-C 感染 6 只)、第 7 天(PBS 组 6 只, P1-C 感染 6 只)、第 14 天(PBS 组 6 只, P1-C 感染 6 只)、第 21 天(PBS 组 6 只, P1-C 感染 6 只)、第 28 天(PBS 组 6 只, P1-C 感染 6 只)实施安乐死,收集小鼠血液及解剖肺组织进行病理组织学分析。

### 1.2.3 腺病毒载体感染

首先采用 1 个“空”腺病毒骨架载体作为对照(AdBgLII)以及表达 DKK1 腺病毒载体(AdDKK1)<sup>[23]</sup>(上海吉凯基因有限公司)两组,每

组 12 只小鼠, 雌雄各 6 只, 两组共 24 只。进行小鼠气管灌肺肺部感染( $1 \times 10^{11}$  病毒颗粒/每只小鼠), 病毒感染小鼠 48 h 后, 对照(AdBgLII)组 12 只小鼠用 PBS 50  $\mu$ L (6 只)、肺炎支原体 P1-C (6 只)再次进行灌肺, AdDKK1 组同样用 PBS 50  $\mu$ L (6 只)、肺炎支原体 P1-C (6 只)再次进行灌肺。感染 14 d 对所有小鼠实施安乐死, 取血液及肺组织进行后续实验。

#### 1.2.4 芯片技术

PBS、P1-C 蛋白刺激小鼠原代气道上皮细胞气液相培养基后收集细胞培养基保存在干冰中, 送至广州 RayBiotech 生物技术有限公司进行检测。

#### 1.2.5 Western blotting 分析

配制 10%的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 蛋白上样; 凝胶电泳, 电压 100 V, 时间 2 h; 湿转, 电流为 300 mA, 时间 2 h; 封闭, 5%脱脂奶粉封闭, 室温 2 h; 膜上蛋白与一抗结合(抗体见表 1), 4  $^{\circ}$ C 过夜; 第 2 天取出孵育一抗的膜在室温摇床上平衡 30 min, 然后回收一抗, 加入 PBS 轻微冲洗, 然后加入 0.1% Tween-20 的 PBS 中, 在水平摇床上摇动洗涤 10 min, 重复洗 3 次, 弃掉洗涤液, 加入已稀释好的二抗, 在室温摇床放置 2 h, 使用 0.1% Tween-20 的 PBS, 洗涤 3 次, 每次 10 min。采用全自动荧光化学发光仪进行曝光, 保存图片。

#### 1.2.6 扫描电镜

培养 21 d 的小鼠原代上皮细胞气液相培养膜泡在 2%戊二醛里固定 1 h, 0.1 mol/L 二甲坤磷酸钠缓冲液浸泡, 每次 1 h, 共换 3 次, 最后泡在 0.1 mol/L 二甲坤磷酸钠缓冲液中 4  $^{\circ}$ C 放置; 30%乙醇脱水, 10 min, 4  $^{\circ}$ C; 50%乙醇脱水, 10 min, 4  $^{\circ}$ C; 70%乙醇脱水, 10 min, 4  $^{\circ}$ C;

80%乙醇脱水, 10 min, 室温; 90%乙醇脱水, 10 min, 室温; 100%乙醇脱水, 15 min, 2 次, 室温; 环氧丙烷渗透, 15 min, 2 次, 放置 -20  $^{\circ}$ C, 30 min, 转移至真空泵中过夜抽干; 将膜切成小块贴到铜片上, 进行喷金处理; 采用扫描电镜观察采集结果。

#### 1.2.7 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色

石蜡切片脱蜡处理, 二甲苯处理两次; 梯度复水, 乙醇的浓度依次为 100% (2 次)、95%、80%、70%和蒸馏水, 每次 3 min; 加入苏木素染色 3 min, 自来水洗, 直至水为无色为止; 酸性洗涤液中反应 2-3 s, 当切片从蓝变为红时立即终止反应, 用自来水洗切片, 待组织上的燃料洗掉为止, 大约需 2-3 遍; 将切片放入到盛有返蓝液的染缸中返蓝约 30 s; 将切片放入到盛有 0.5%伊红的染缸中染色 2 min, 自来水洗, 直至水为无色为止; 放入 80%乙醇 1-2 s; 95%乙醇脱水 2 次, 每次 2 min; 100%乙醇脱水 2 次, 每次 2 min; 将切片放入到盛有二甲苯溶液的染缸中, 使组织透明 3-5 min 后, 取出放到通风橱中, 待二甲苯全部挥发完为止; 向片子中滴加 1 滴中性树脂封片胶, 并盖上盖玻片, 待封片胶将整个组织都覆盖, 用指甲油封住片子边缘, Leica 正置显微镜下观察并采集结果。

#### 1.2.8 免疫组化

石蜡切片脱蜡处理, 将内源性过氧化物酶阻断剂滴加在组织上, 室温孵育 10 min, 双蒸水清洗, 微波热修复抗原, 滴加 5%牛血清白蛋白闭液, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 封闭, 甩去多余液体, 不洗; 一抗孵育 4  $^{\circ}$ C 过夜; 取出后 37  $^{\circ}$ C, 30 min, PBS (pH 7.2-7.6)洗 5 min, 3 次; 二抗孵育; 滴加聚合辣根过氧化物酶抗小鼠 IgG, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min; PBS (pH 7.2-7.6)洗 5 min, 3 次; 滴加二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色液工作液显色, 显微镜下观察, 控制反应时间;

滴加苏木素复染, 室温孵育 1 min; PBS (pH 7.2-7.6)清洗, 碱性溶液返蓝, 中性树胶封片, 显微镜观察结果, 并采用 ImageJ 软件对结果进行量化分析。

### 1.2.9 Tunel 染色

石蜡切片脱蜡处理, 30%双氧水室温灭活 10 min, 水洗; 标本片上滴加新鲜稀释的蛋白酶 K, 室温消化 10 min, 0.01 mol/L Tris 缓冲盐溶液(tris buffered saline, TBS)洗 5 min, 3 次; 标本片加标记缓冲液 20  $\mu$ L/片, 以保持切片湿润; 按每张切片取末端脱氧核糖核酸转移酶和地高辛标记的 d-UTP 各 1  $\mu$ L, 加入 18  $\mu$ L 标记缓冲液中, 混匀; 置样品于湿盒中, 37  $^{\circ}$ C 标记 2 h; 0.01 mol/L TBS 洗 5 min, 3 次; 滴加封闭液, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 甩掉封闭液, 不洗; 用抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体, 混匀后加至标本片上; 置样品于湿盒中, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 0.01 mol/L TBS 洗 5 min, 3 次; 用抗体稀释液 1:100 稀释链霉亲和素-生物素复合物, 混匀后 50  $\mu$ L/片加至切片, 37  $^{\circ}$ C 反应 30 min; 0.01 mol/L TBS 洗 5 min, 4 次; DAB 显色, 取 1 mL 蒸馏水, 分别加入 DAB 试剂盒中, A, B, C 试剂各 1 滴, 混匀后加至切片上, 镜下控制反应时间; 水洗, 滴加 Mayer's 苏木素复染; 室温孵育 1 min, PBS (pH 7.2-7.6)清洗, 碱性溶液返蓝; 中性树胶封片, 显微镜观察并采集结果。

### 1.2.10 糖原染色(periodic acid schiff stain, PAS)

石蜡切片脱蜡处理, 蒸馏水冲洗, 70%乙醇洗; 浸入高碘酸乙醇溶液 10 min; 70%乙醇洗后, 入还原液中 1 min, 70%乙醇后, 入无色盐基性品红溶液 1 h, 流水冲洗 10 min; 用 Mayer's 苏木素染液复染细胞核 5 min, 再用 1% 盐酸乙醇分化, 流水冲洗后, 脱水, 透明, 封片, 用显微镜观察采集图片。

### 1.2.11 Masson 染色

石蜡切片脱蜡处理, 二甲苯 3 缸, 每缸 7 min, 80%、90%和 100%梯度乙醇各浸泡 7 min; 先自来水后蒸馏水洗 3 次; 切片烘干; 配制好的苏木素浸染 5 min, 水洗后分化液分化 7 s; 饱和磷酸氢二钠溶液蓝化 5 min, 先自来水后蒸馏水洗 3 次后烘干; 丽春红酸性品红染液浸染 20 s, 弱酸溶液冲洗 3 次磷钼酸浸泡 5 min, 弱酸溶液冲洗 3 次, 水洗吹干; 苯胺蓝染 30 min, 1%弱酸溶液洗 1 min; 95%乙醇、无水乙醇、二甲苯透明、中性树胶封片; 显微镜观察结果并采集图片。

### 1.2.12 统计学分析

所有数据均以 3 次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差表示。使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行分析。在统计上, 差异通过单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA)进行分析,  $P$  值小于 0.05 为显著性差异, 用\*/#表示,  $P$  值小于 0.01 为极显著差异, 用\*\*/##表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 小鼠原代气道上皮细胞的分离培养与气液相培养模型的建立

首先分离 C57/BL6 小鼠原代气道上皮细胞, 得到的细胞生长状态良好, 并能够迅速生长, 到第 7 天的时候, 细胞密度可达 90%以上(图 1A)。采用实验流程建立体外小鼠原代气道上皮细胞气液相培养模型(图 1B)。将培养分化 21 d 的气液相小鼠原代气道上皮细胞进行 HE 染色, 结果清晰地显示有多层细胞的生长及分化, 其中 HE 染色使细胞核内的染色质与胞质内的核酸着紫蓝色, 使细胞质和细胞外基质中的成分着红色(图 1C)。成功建立小鼠原代气道上皮细胞气液相培养模型, 模拟自然生长状态的呼吸道上皮细胞生长环境。

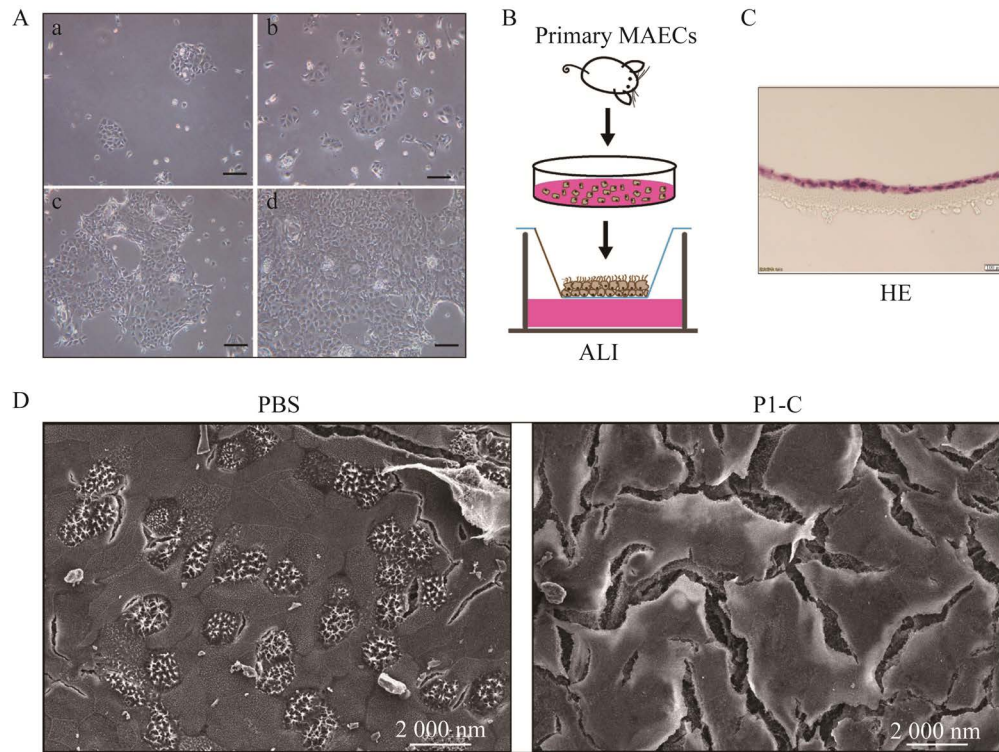


图1 小鼠原代气道上皮细胞气液相培养模型的建立

Figure 1 Development of a culture model using mice primary airway epithelial cells (MAECs) of air-liquid interface (ALI). A: Growth charts of primary airway epithelial cells isolated from C57/BL6 mice at different time (a, 0 d; b, 3 d; c, 5 d; d, 7 d). B: Model diagram of MAECs ALI culture. C: HE staining of MAECs ALI culture after 21 days. D: The secretion of mucus was observed by scanning electron microscope after the MAECs were stimulated by PBS and *M. pneumoniae* P1-C for 48 h. Scale bars in (A) 100  $\mu\text{m}$  and (D) 2 000 nm.

为了更清楚直观地观察 P1-C 蛋白刺激对小鼠气道上皮细胞黏液分泌影响情况,采用扫描电镜观察气液相小鼠气道上皮细胞表面黏液分泌变化。扫描电镜结果显示 21 d 后小鼠气道上皮细胞分化出纤毛细胞,其纤毛成簇状分布,周围有黏液分布。P1-C 蛋白刺激组与对照组 PBS 相比,其表面有大量黏液分泌,覆盖了分化出的纤毛(图 1D)。根据以上结果,我们推测 P1-C 蛋白刺激能够引起气液相小鼠原代气道上皮细胞分泌大量的黏液。

## 2.2 P1-C 刺激增加了小鼠原代上皮细胞炎症因子分泌及与 JAK-STAT 信号通路具有相关性

肺炎支原体感染能够引起机体分泌大量的

炎症因子<sup>[24]</sup>,本研究采用蛋白芯片技术对细胞培养基进行了炎症因子的检测以及相关信号通路的预测。结果发现,与 PBS 处理组相比,P1-C 蛋白刺激组能够上调炎症因子 IL-1b、IL-2、IL-5、IL-6、IL-12p70、IL-17、IL-17F、IL-22、IL-23、IL-28、IFN $\gamma$  和 TNF $\alpha$  的分泌(图 2A)。已有研究表明 JAK 激酶-信号传导与转录激活因子(janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)信号通路在肺炎支原体感染中具有重要的调控作用<sup>[6]</sup>,信号通路富集结果显示 JAK-STAT 信号通路也参与了 P1-C 蛋白刺激的小鼠原代上皮细胞的调控(图 2B)。为了更进一步地在体内发现这一调控机制,我们接着在小鼠体内展开研究。

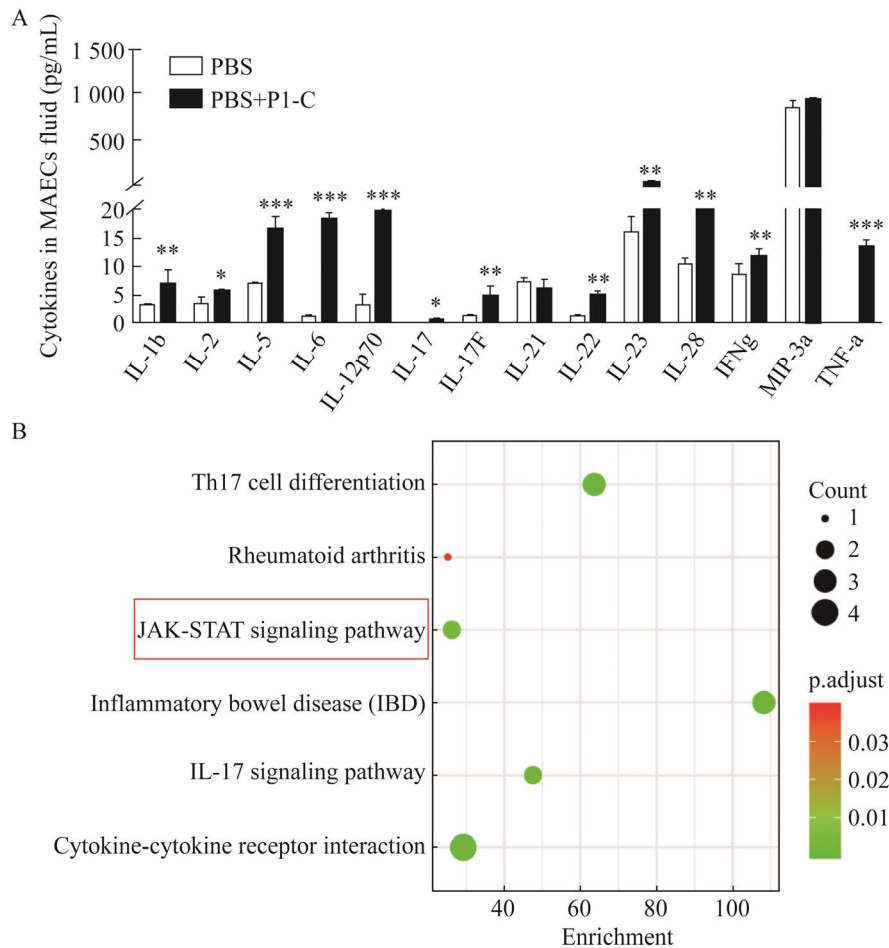


图 2 蛋白芯片检测 P1-C 蛋白刺激小鼠原代上皮细胞诱导炎症因子的分泌及信号通路相关性

Figure 2 Protein microarray was used to detect the secretion of inflammatory factors and the correlation of signaling pathways in primary epithelial cells of mice infected by *M. pneumoniae* P1-C. A: Detection of inflammatory factors in the culture medium of MAECs stimulated by PBS and *M. pneumoniae* P1-C for 48 h. B: Enrichment results of signal pathways in MAECs stimulated by PBS and *M. pneumoniae* P1-C. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 2.3 肺炎支原体 P1-C 刺激对小鼠肺中黏液蛋白 MUC5AC 分泌的影响

肺炎支原体 P1-C 感染小鼠 C57/BL6 后发现其感染能够引起肺水肿(图 3A), 对感染肺炎支原体 P1-C 的小鼠选取 0、7、14、21 和 28 d 5 个不同时间点进行解剖, 免疫组化染色结果显示, 肺炎支原体 P1-C 感染能够引起小鼠肺组织中 MUC5AC 的过量分泌, 在第 14 天黏液蛋白 MUC5AC 分泌呈极显著增加趋势(图 3B、3C)。为了更进一步地观察肺炎支原体 P1-C 感

染引起过度黏液分泌对小鼠肺组织的损伤, 对肺炎支原体 P1-C 感染第 14 天的小鼠肺组织进行 HE 染色、PAS 染色、Tunel 染色和 Masson 染色, HE 染色结果显示, 肺炎支原体 P1-C 感染组与对照 PBS 组相比, 肺炎支原体 P1-C 感染能够引起小鼠肺泡增大, 肺泡壁断裂, 肺中炎性细胞浸润, 可见肺炎支原体 P1-C 感染能够引起小鼠肺部炎症反应, 造成肺组织损伤(HE 图中黑色箭头指示); PAS 染色结果显示, 肺炎支原体 P1-C 感染组与 PBS 组相比, 其糖原积累更



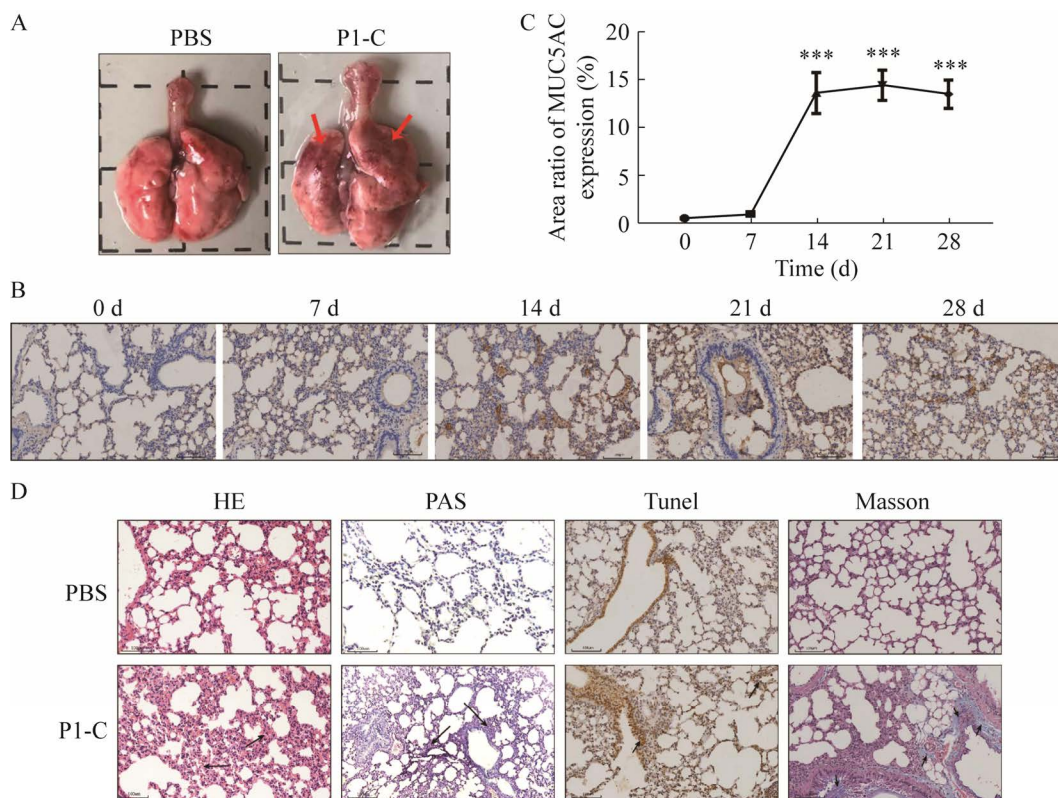


图3 肺炎支原体 P1-C 刺激引起小鼠 C57/BL6 肺中 MUC5AC 的过量分泌

Figure 3 *Mycoplasma pneumoniae* P1-C stimulation caused over-secretion of MUC5AC in the lungs of C57/BL6 mice. A: External lung morphology of C57/BL6 mice stimulated with PBS and *M. pneumoniae* P1-C after 14 days. B: Immunohistochemistry showed the expression of MUC5AC in the lungs of C57/BL6 mice treated with *M. pneumoniae* P1-C at 0 d, 7 d, 14 d, 21 d and 28 d. C: Semi-quantification of MUC5AC protein expression of (B). D: HE, PAS, TUNEL and Masson staining were performed after lung stimulation with PBS and *M. pneumoniae* P1-C for 14 days. Scale bars in (B) and (D) 100  $\mu$ m. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

多,说明肺炎支原体 P1-C 感染引起的免疫反应使得肺泡细胞分泌大量的黏液(PAS 图中黑色箭头指示);Tunel 染色结果显示,肺炎支原体 P1-C 感染组与 PBS 组相比,肺炎支原体 P1-C 感染引起肺部凋亡细胞增多,可见肺炎支原体 P1-C 感染能够引起肺组织破坏(Tunel 图中黑色箭头指示);Masson 染色结果显示,肺炎支原体 P1-C 感染组较 PBS 组产生更多的胶原蛋白和胶原纤维,说明肺炎支原体 P1-C 感染能够引起小鼠肺纤维化(Masson 图中黑色箭头指示)(图 3D)。可见,肺炎支原体 P1-C 刺激能够引起小鼠肺组织中 MUC5AC 的过量分泌从而对小鼠肺组织造

成多方面的损伤。

#### 2.4 DKK1 对肺炎支原体 P1-C 诱导的 MUC5AC 分泌的调控机制

为了更进一步地研究 DKK1 对肺炎支原体 P1-C 诱导 MUC5AC 分泌的调控机制,我们首先用腺病毒 AdBgLII 和 AdDKK1 对小鼠进行灌肺,感染小鼠肺组织 48 h 后,用 PBS 及肺炎支原体 P1-C 进行感染,14 d 后取肺组织进行检测。结果发现,与对照组 AdBgLII 相比,DKK1 蛋白在小鼠肺中大量表达(图 4A);免疫组化结果表明,AdDKK1 过表达能够显著减少肺炎支原体 P1-C 引起的小鼠肺组织中黏液蛋白 MUC5AC 的

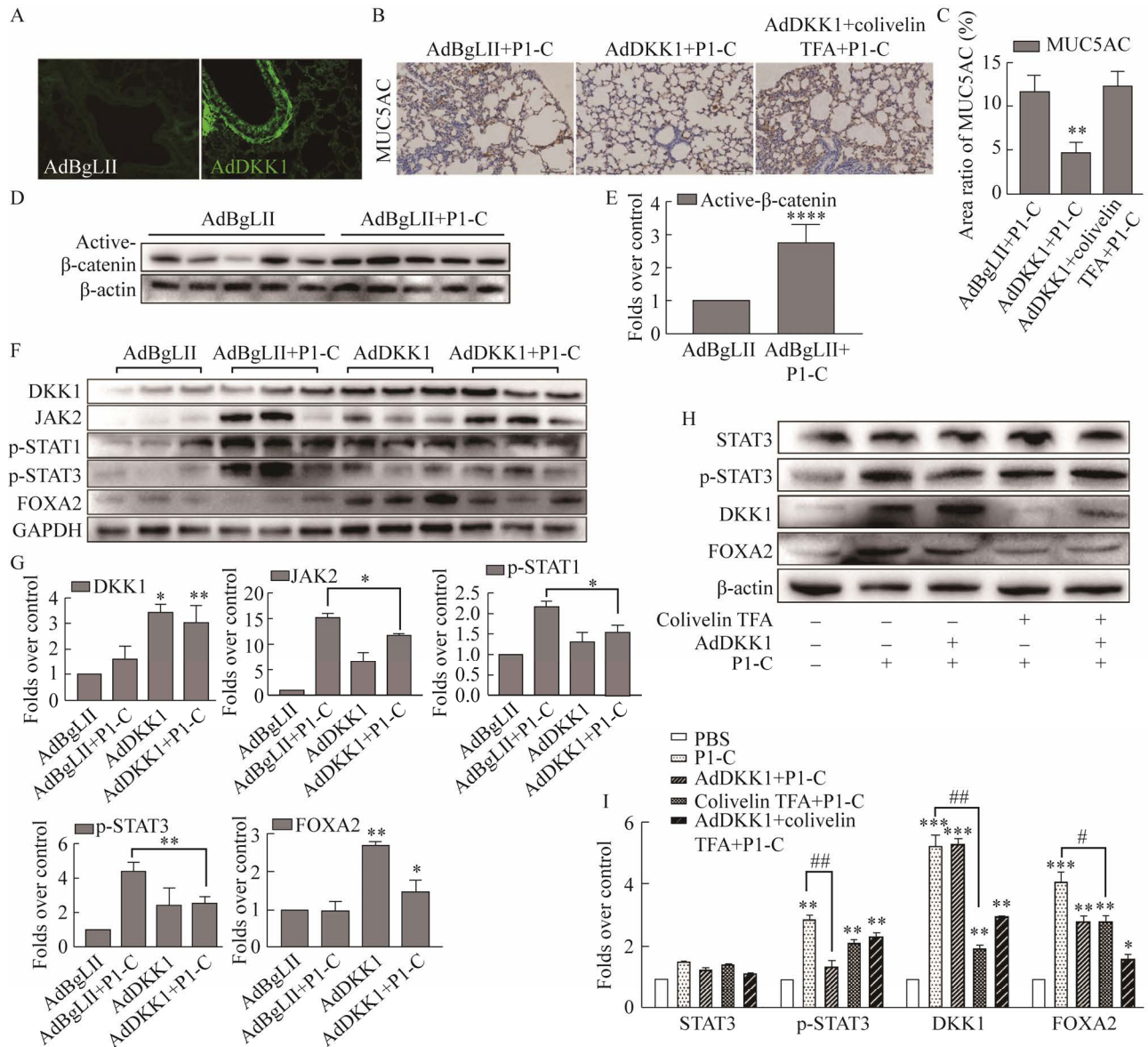


图 4 DKK1 对肺炎支原体 P1-C 诱导的 MUC5AC 分泌的调控机制

Figure 4 DKK1 regulates MUC5AC secretion induced by *Mycoplasma pneumoniae* P1-C. A: Expression of DKK1 protein in the lungs of C57/BL6 mice after adenovirus AdDKK1 infection, compared with PBS. B: Representative immunohistochemistry images showed a reduction of MUC5AC at 14 d with *M. pneumoniae* P1-C exposure. C: Image J software was used for quantitative analysis of (B). D: Representative immunoblot validated an upregulation of active-β-catenin in mouse lungs induced by *M. pneumoniae* P1-C. E: Semi-quantitation of the relative abundance of the indicated proteins in (D) by densitometric analysis of blots from three independent experiments ( $n=6$ ). F: Representative immunoblots showed the expression of DKK1, JAK2, p-STAT1, p-STAT3 and FOXA2 in mouse lungs. G: Semi-quantitation of the relative abundance of the indicated proteins in (F) by densitometric analysis of blots from three independent experiments ( $n=3$ ). H: Representative immunohistochemistry images showed a reduction of STAT3, p-STAT3, DKK1 and FOXA2 in MBECs. I: Semi-quantitation of the relative abundance of the indicated proteins in (H) by densitometric analysis of blots from three independent experiments ( $n=3$ ). Scale bars in (A) and (B) 100  $\mu\text{m}$ . \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ . # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , and ### $P<0.001$  compared to AdBgLII with *M. pneumoniae* P1-C exposure.

表达(图 4B、4C), Western blotting 结果显示, 与 AdBgLII 对照组相比, 肺炎支原体 P1-C 感染能够引起小鼠肺脏中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路关键调控分子 active- $\beta$ -catenin 过表达, 使得 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路异常激活(图 4D、4E)。之前的研究表明 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制分子 DKK1 能够有效地缓解肺炎支原体 P1-C 引起的炎症反应, 推测 DKK1 对 P1-C 诱导的上皮细胞黏蛋白的分泌也有调控作用。研究发现在肺炎支原体 P1-C 感染中, AdDKK1 过表达能够抑制 JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白表达, 同时能够上调黏蛋白抑制转录因子 FOXA2 的表达(图 4F、4G), 推测被抑制的 JAK-STAT1/STAT3

以及过表达的 FOXA2 对 MUC5AC 蛋白的分泌具有抑制作用, 从而缓解肺炎支原体 P1-C 引起黏液过多分泌对小鼠肺组织造成的肺损伤。为了证实这一推测, 采用 STAT3 激活剂 colivelin TFA 刺激小鼠原代气道上皮细胞, 结果发现, 和肺炎支原体 P1-C 感染组相比, colivelin 显著抑制 DKK1 和 FOXA2 蛋白表达(图 4H、4I), 在小鼠体内实验表明 colivelin TFA 能够逆转 DKK1 抑制的 MUC5AC 蛋白分泌(图 4C)。因此, 我们推测 DKK1 通过抑制 JAK/STAT1-STAT3 信号通路以及上调 FOXA2 的表达有效地减少肺炎支原体 P1-C 诱导的小鼠肺上皮细胞 MUC5AC 的分泌(图 5)。

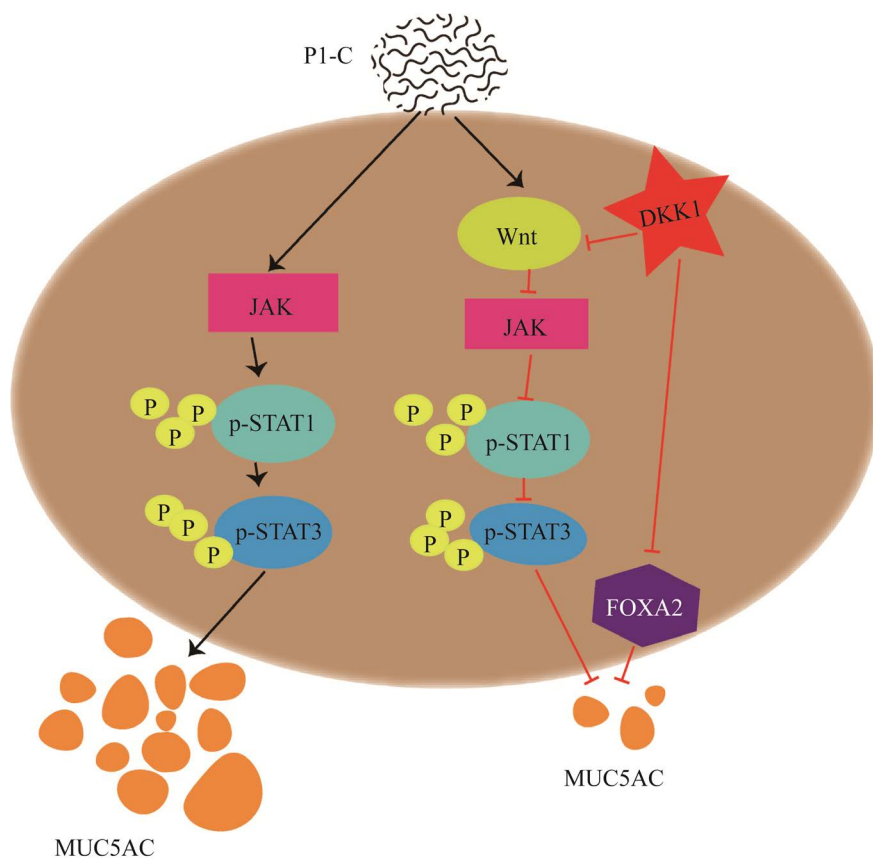


图 5 DKK1 对肺炎支原体 P1-C 诱导 MUC5AC 分泌的调控机制模式图

Figure 5 Mechanism pattern of DKK1-regulated MUC5AC secretion induced by *Mycoplasma pneumoniae* P1-C. Wnt: Wingless; JAK: Janus kinase; p-STAT: Phosphorylation signal transducer and activator of transcription; FOXA2: Fork-head box A2; MUC5AC: Mucin 5AC; DKK1: Dickkopf-1.

### 3 讨论与结论

肺炎支原体肺炎已成为一种全球性传染病<sup>[25]</sup>。当前, COVID-19 肺炎全球大流行及肺炎支原体合并感染给临床治疗带来很大困难, 需要在临床诊断和治疗上取得突破。

肺炎支原体是社区获得性肺炎的常见病原体之一, 了解其发病机制对临床具有重要意义。肺炎支原体的致病机制主要是通过呼吸道上皮细胞的黏附破坏黏膜上皮细胞, 引起炎症反应<sup>[26]</sup>, 肺炎支原体能够编码多种毒力因子, 包括黏附素、糖脂、毒性代谢产物、社区获得性呼吸窘迫综合征毒素和荚膜多糖。其中黏附蛋白是肺炎支原体侵入呼吸道并定植于气道上皮细胞的首要因素, 其中黏附蛋白 P1 不仅在肺炎支原体黏附过程中发挥重要作用, 还参与了肺炎支原体的滑行运动, 使菌体从支气管纤毛尖端向宿主细胞表面转移<sup>[27]</sup>。P1 黏附蛋白具有高度的免疫原性, 常在肺炎支原体感染患者的血清中检测到<sup>[28-30]</sup>。其中 P1 的羧基端具有高度的免疫原性, 它可以与各种宿主分子结合<sup>[5]</sup>, 在黏附蛋白发挥其功能中起至关重要作用<sup>[31-32]</sup>。

黏液蛋白 MUC5AC 与多种肺疾病具有相关性<sup>[33-34]</sup>, 肺炎支原体感染能够引起人上皮细胞中 MUC5AC 显著增加, 导致气道黏液高分泌, 产生黏痰与气道炎症, 影响气道通畅性, 进而加重疾病, 因此找到有效改善黏液过度分泌的靶点显得尤为重要。本研究表明肺炎支原体 P1-C 蛋白作为肺炎支原体主要致病因子, 能够引起小鼠原代气道上皮细胞和小鼠肺组织分泌大量的黏液, 推测肺炎支原体 P1-C 蛋白是肺炎支原体感染上皮细胞导致黏液异常分泌的主要因素, 同时会引起炎症因子大量分泌, 其中 JAK-STAT 信号通路参与调控。

之前的研究表明, 过表达 Wnt/ $\beta$ -catenin 信

号通路抑制分子 DKK1 能够有效缓解肺炎支原体 P1-C 诱导的小鼠肺脏上皮细胞炎症反应, 我们推测 DKK1 可能参与调控肺脏上皮细胞分泌黏蛋白 MUC5AC。FOXA2 是黏蛋白生物合成的主要转录抑制因子, 已有研究表明绿脓素通过翻译后修饰氧化还原失活 FOXA2, 导致黏蛋白过表达<sup>[13-14]</sup>。本研究结果表明, 在肺炎支原体 P1-C 感染中, 过表达 DKK1 能够显著抑制 JAK2、p-STAT1 和 p-STAT3 蛋白的表达, 显著增加转录抑制因子 FOXA2 的表达, 可见 DKK1 在肺炎支原体 P1-C 诱导的小鼠上皮细胞黏液过度分泌中具有重要的调控作用。

总之, 肺炎支原体 P1-C 蛋白可能是肺炎支原体引起呼吸道上皮细胞黏液蛋白异常分泌的主要原因, DKK1 抑制肺炎支原体 P1-C 引起的黏液蛋白 MUC5AC 的异常分泌, 其作用机制可能是通过抑制 JAK2/STAT1-STAT3 信号通路从而促进 FOXA2 的高表达来实现的, 因此 DKK1 作为一种新的潜在治疗靶点, 可能在缓解肺炎支原体 P1-C 引起的黏液蛋白过度分泌造成肺损伤中会起到积极作用(图 5)。

### REFERENCES

- [1] CHU HW, JEYASEELAN S, RINO JG, VOELKER DR, WEXLER RB, CAMPBELL K, HARBECK RJ, MARTIN RJ. TLR2 signaling is critical for *Mycoplasma pneumoniae*-induced airway mucin expression[J]. The Journal of Immunology, 2005, 174(9): 5713-5719.
- [2] KRAFT M, ADLER KB, INGRAM JL, CREWS AL, ATKINSON TP, CAIRNS CB, KRAUSE DC, CHU HW. *Mycoplasma pneumoniae* induces airway epithelial cell expression of MUC5AC in asthma[J]. The European Respiratory Journal, 2008, 31(1): 43-46.
- [3] WAITES KB, BALISH MF, ATKINSON TP. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections[J]. Future Microbiology, 2008, 3(6): 635-648.
- [4] SUTHERLAND ER, BRANDORFF JM, MARTIN RJ.

- Atypical bacterial pneumonia and asthma risk[J]. *Journal of Asthma*, 2004, 41(8): 863-868.
- [5] WIDJAJA M, BERRY IJ, JAROCKI VM, PADULA MP, DUMKE R, DJORDJEVIC SP. Cell surface processing of the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae* identifies novel domains that bind host molecules[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 6384.
- [6] HAO YH, KUANG ZZ, JING J, MIAO JF, MEI LY, LEE RJ, KIM S, CHOE S, KRAUSE DC, LAU GW. *Mycoplasma pneumoniae* modulates STAT3-STAT6/EGFR-FOXA2 signaling to induce overexpression of airway mucins[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(12): 5246-5255.
- [7] LACHOWICZ-SCROGGINS ME, YUAN SP, KERR SC, DUNICAN EM, YU M, CARRINGTON SD, FAHY JV. Abnormalities in MUC5AC and MUC5B protein in airway mucus in asthma[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2016, 194(10): 1296-1299.
- [8] ROSE MC, VOYNOW JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease[J]. *Physiological Reviews*, 2006, 86(1): 245-278.
- [9] FAHY JV, DICKEY BF. Airway mucus function and dysfunction[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2010, 363(23): 2233-2247.
- [10] KUYPER LM, PARÉ PD, HOGG JC, LAMBERT RK, IONESCU D, WOODS R, BAI TR. Characterization of airway plugging in fatal asthma[J]. *The American Journal of Medicine*, 2003, 115(1): 6-11.
- [11] HOGG JC, CHU F, UTOKAPARCH S, WOODS R, ELLIOTT WM, BUZATU L, CHERNIACK RM, ROGERS RM, SCIURBA FC, COXSON HO, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2004, 350(26): 2645-2653.
- [12] KOEPPEN M, MCNAMEE EN, BRODSKY KS, AHERNE CM, FAIGLE M, DOWNEY GP, COLGAN SP, EVANS CM, SCHWARTZ da, ELTZSCHIG HK. Detrimental role of the airway mucin Muc5ac during ventilator-induced lung injury[J]. *Mucosal Immunology*, 2013, 6(4): 762-775.
- [13] HAO YH, KUANG ZZ, WALLING BE, BHATIA S, SIVAGURU M, CHEN Y, GASKINS HR, LAU GW. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin causes airway goblet cell hyperplasia and metaplasia and mucus hypersecretion by inactivating the transcriptional factor FoxA2[J]. *Cellular Microbiology*, 2012, 14(3): 401-415.
- [14] WAN HJ, KAESTNER KH, ANG SL, IKEGAMI M, FINKELMAN FD, STAHLMAN MT, FULKERSON PC, ROTHENBERG ME, WHITSETT JA. Foxa2 regulates alveolarization and goblet cell hyperplasia[J]. *Development*, 2004, 131(4): 953-964.
- [15] PARK SW, VERHAEGHE C, NGUYENVU LT, BARBEAU R, EISLEY CJ, NAKAGAMI Y, HUANG XZ, WOODRUFF PG, FAHY JV, ERLE DJ. Distinct roles of FOXA2 and FOXA3 in allergic airway disease and asthma[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2009, 180(7): 603-610.
- [16] MALINAUSKAS T, JONES EY. Extracellular modulators of Wnt signalling[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2014, 29: 77-84.
- [17] NIEHRS C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators[J]. *Oncogene*, 2006, 25(57): 7469-7481.
- [18] MAO BY, NIEHRS C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/IRP6 signaling[J]. *Gene*, 2003, 302(1/2): 179-183.
- [19] LIANG LB, HE H, LV RX, ZHANG M, HUANG HJ, AN ZM, LI SQ. Preliminary mechanism on the methylation modification of Dkk-1 and Dkk-3 in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(2): 1245-1250.
- [20] DONG LL, QU LY, CHU LY, ZHANG XH, LIU YH. Serum level of DKK-1 and its prognostic potential in non-small cell lung cancer[J]. *Diagnostic Pathology*, 2014, 9(5): 1746-1596.
- [21] KLAVDIANOU K, LIOSSIS SN, DAOUSSIS D. Dkk1: a key molecule in joint remodelling and fibrosis[J]. *Mediterranean Journal of Rheumatology*, 2017, 28(4): 174-182.
- [22] XUE J, YANG JL, YANG LJ, ZHOU SL, JI C, WANG XM, YU N, LIU XM, CHI SH. Dickkopf-1 is a biomarker for systemic lupus erythematosus and active lupus nephritis[J]. *Journal of Immunology Research*, 2017, 2017: 6861575.
- [23] CAI Q, MA J, WANG J, WANG JY, CUI JD, WU S, WANG ZJ, WANG N, WANG JQ, YANG DD, YANG JL, XUE J, LI F, CHEN J, LIU XM. Adenoviral transduction of Dickkopf-1 alleviates silica-induced silicosis development in lungs of mice[J]. *Human Gene Therapy*, 2022, 33(3/4): 155-174.
- [24] YANG J, HOOPER WC, PHILLIPS DJ, TALKINGTON DF. Cytokines in *Mycoplasma pneumoniae* infections[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2004, 15(2/3): 157-168.

- [25] FOY HM. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1993, 17(supplement\_1): S37-S46.
- [26] RASTAWICKI W, RÄTY R, KLEEMOLA M. Detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* adhesin P1 in serum specimens from infected and non-infected subjects by immunoblotting[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 1996, 26(3/4): 141-143.
- [27] SCHURWANZ N, JACOBS E, DUMKE R. Strategy to create chimeric proteins derived from functional adhesin regions of *Mycoplasma pneumoniae* for vaccine development[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(11): 5007-5015.
- [28] RAZIN S, JACOBS E. *Mycoplasma* adhesion[J]. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138(3): 407-422.
- [29] HIRSCHBERG L, HOLME T, KROOK A. Human antibody response to the major adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*: increase in titers against synthetic peptides in patients with pneumonia[J]. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 1991, 99(6): 515-520.
- [30] TUUMINEN T, SUNI J, KLEEMOLA M, JACOBS E. Improved sensitivity and specificity of enzyme immunoassays with P1-adhesin enriched antigen to detect acute *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44(1): 27-37.
- [31] SETO S, KENRI T, TOMIYAMA T, MIYATA M. Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(5): 1875-1877.
- [32] CHAUDHRY R, NISAR N, HORA B, CHIRASANI SR, MALHOTRA P. Expression and immunological characterization of the carboxy-terminal region of the P1 adhesin protein of *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(1): 321-325.
- [33] SOTGIU S, PUGLIATTI M, ROSATI G, DEIANA GA, SECHI GP. Neurological disorders associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. *European Journal of Neurology*, 2003, 10(2): 165-168.
- [34] HILDEBRAND F, VENNER M, GIGUÈRE S. Efficacy of gamithromycin for the treatment of foals with mild to moderate bronchopneumonia[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2015, 29(1): 333-338.

(本文责编 陈宏宇)