

# MyD88 在鼠衣原体生殖道感染过程中的作用

陈丽丽<sup>1\*</sup> 吴移谋<sup>1</sup> 周洲<sup>1</sup> 雷磊<sup>2</sup> 蔡恒玲<sup>1</sup> 钟光明<sup>2</sup>

(1. 南华大学病原生物学研究所 湖南 衡阳 421001)

(2. Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, Texas 78229, USA)

**摘要:** 用  $1 \times 10^4$  IFUs 的 MoPn 经生殖道感染 WT、MyD88 KO 小鼠, 每组一半小鼠于感染后 54 d, 再次感染相同剂量的 MoPn。每隔 3–4 d 取生殖道分泌物, 测定其中衣原体包涵体的数量。初次感染后 80 d, 处死小鼠, 眼眶取血, 分离血清, 用间接免疫荧光法测其中抗体类型及效价; 同时分离生殖道, 肉眼观察其输卵管、子宫角水肿程度, 并做病理切片观察其炎症反应; 分离小鼠脾细胞, 体外用衣原体 EB 刺激, 测定产生的 IL-4、IL-5、IL-17 和 IFN- $\gamma$  等细胞因子水平。MyD88 KO 小鼠阴道带菌时间与 WT 组相当, 但上生殖道病理反应, 尤其是输卵管水肿程度明显比 WT 组严重。脾细胞细胞因子水平显示, MyD88 KO 鼠 IFN- $\gamma$  和 IL-17 的产生量明显比 WT 组低, 而 IL-4 和 IL-5 水平明显高于 WT 组。血清中各亚类抗体效价无明显区别, 但 MyD88 KO 鼠血清 IgG2a/IgG1 比值  $< 1$ , 且明显低于 WT 组。研究结果说明 MyD88 与抗衣原体免疫无关, 但与衣原体引起的炎症损伤密切相关。

**关键词:** 鼠衣原体(MoPn), MyD88, 泌尿生殖道感染, 病理

## The Roles of MyD88 in the Development of Protective Immunity and Pathology During Chlamydial Urogenital Infection in Mice

CHEN Li-Li<sup>1\*</sup> WU Yi-Mou<sup>1</sup> ZHOU Zhou<sup>1</sup> LEI Lei<sup>2</sup> CAI Heng-Ling<sup>1</sup>  
ZHONG Guang-Ming<sup>2</sup>

(1. Institute of Pathogenic Biology, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

(2. Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, 7703 Floyd Curl Drive, San Antonio, Texas 78229, USA)

**Abstract:** C57BL/6J WT and mice deficient in MyD88 (MyD88 KO) were inoculated intravaginally with  $1 \times 10^4$  IFUs of live *C. muridarum* organisms. Half mice of each group were reinfected on day 54 after primary infection. Vaginal swabs were taken every 3 or 4 days to monitor live organism shedding. On day 80 after the primary infection, mice were sacrificed, and the vaginal tract was isolated for pathology. The spleen cells were collected and IL-4, IL-5, IL-17 and IFN- $\gamma$  were detected by ELISA in the spleen cells culture supernatant after restimulated by MoPn EB. The titers of different Ab isotypes

were measured in mice serum by Indirect Immunofluorescence Assay. The Chlamydia shedding time of MyD88 KO mice was similar to WT. Not only the gross appearance of the isolated genital tracts, but also the dilation and inflammation scores under microscope showed that the genital tract pathology from the MyD88-deficient mice was much more severe than WT after primary infection. The results of Th2 (IL-4 & IL-5), Th1 (IFN- $\gamma$ ) and Th17 (IL-17) cytokines from the *in vitro* restimulated splenocyte culture supernatant showed that MyD88 deficient mice produced significantly lower levels of IFN- $\gamma$  and IL-17 but much higher levels of IL-4 and IL-5 than WT mice either after the primary infection or reinfection with Chlamydia. There were no significant differences in Ab isotype levels between the two tested groups. However, the ratio of MoPn specific serum IgG2a/IgG1 in MyD88-deficient mice was less than 1 and significantly lower than that in WT mice. MyD88 is dispensable for protective immunity but required for inflammatory pathologies.

**Keywords:** Chlamydia muridarum, MyD88, Urogenital tract infection, Pathology

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)是目前国内外最常见的性病病原体之一, 包括 A、B、C、D 等 19 种血清型, 其中大部分血清型可引起泌尿生殖道感染, 并可导致严重的并发症, 如不孕、异位妊娠、宫颈鳞状细胞癌等<sup>[1]</sup>。沙眼衣原体鼠肺炎株(MoPn)现已划分为一新的衣原体种(*Chlamydia muridarum*), 目前尚未发现其可引起人类疾病, 但由于其引起的鼠泌尿生殖道病理反应与人类沙眼衣原体性泌尿生殖道感染极其相似<sup>[2-3]</sup>, 因此, 目前常用 MoPn 鼠生殖道感染模型来研究沙眼衣原体的免疫保护和病理损伤机制。

利用体内阻断或基因敲除小鼠模型研究表明, CD4<sup>+</sup> Th 细胞和 IFN- $\gamma$  介导的免疫反应是宿主控制衣原体感染的主要机制, 抗体和 CD8<sup>+</sup> T 细胞也可能在宿主抵御衣原体感染中发挥作用。然而, 关于沙眼衣原体确切的致病机制及机体的抗感染机制目前尚不清楚。

机体的免疫机制包括特异性免疫和天然免疫。天然免疫系统是由模式识别受体(Pattern recognition receptor, PRR)介导的, 这些受体信号转导所激活的信号通路控制着各种免疫应答所要表达的基因, 通过信号转导级联效应引起效应分子的表达, 最终启动天然免疫和获得性免疫反应。Toll 受体(Toll-like receptor, TLR)是一类新近发现的 PRR, 在天然免疫反应中发挥着极其重要的作用。已发现 TLR 的家族有 13 个成员, 髓样分化因子 88 (Myeloid differentiation factor88, MyD88) 是 TLR 信号转导途径中的主要接头蛋白, 在传递上游信息和疾病发生发展中具有重要的作用<sup>[4]</sup>。有研究报道, MyD88 与 LPS 耐

受性、心血管疾病、炎症性肠病、自身免疫性疾病、肿瘤等疾病密切相关<sup>[5-9]</sup>。但 MyD88 在抗衣原体感染方面的作用目前尚不清楚。因此本文用 MoPn 经生殖道感染 MyD88 基因敲除小鼠, 通过观察小鼠生殖道衣原体的清除速度、病理变化, 研究 MyD88 在衣原体免疫与病理方面的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:** 雌性 C57BL/6J 野生型(Wild type, WT)小鼠 18 只、MyD88 基因敲除小鼠 (MyD88 KO) 20 只, 年龄均为 5-6 周, 购自 Jackson 实验室 (Bar Harbor, Maine)。

**1.1.2 菌株及试剂:** *C. muridarum* (MoPn, Nigg 株), 由实验室传代保存。HeLa 细胞, 购自美国标准菌株保存中心(ATCC, cat# CCL2)。Cy3 标记的羊抗鼠 IgG(H)、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 均购自 Jackson Immuno Research 公司; IL-4、IL-5、IFN- $\gamma$ 、L17 等细胞因子检测试剂盒购自 R&D 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 鼠生殖道感染模型制备:** 18 只 C57BL/6J WT 和 20 只 MyD88 KO 小鼠经阴道感染  $1 \times 10^4$  IFUs 的 MoPn, 其中一半小鼠在初次感染后 54 d, 再次感染相同剂量的 MoPn。小鼠初次和再次感染前 5 d 均皮下注射 2.5 mg Depo-provera (Pharmacia Upjohn, Kalamazoo, MI)以增加小鼠对衣原体感染的敏感性。初次感染后 80 d 按文献[10]处死小鼠, 收集血清, 分离生殖道并收集脾细胞。

**1.2.2 染菌小鼠生殖道带菌量检测:** 小鼠经生殖道

感染 MoPn 后, 每隔 3–4 d 取生殖道分泌物于 500  $\mu$ L SPG 中, 然后系列稀释, 取合适稀释度的稀释液感染 HeLa 单层细胞, 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后, 进行荧光抗体染色。用荧光显微镜计数包涵体数量。

**1.2.3 染菌小鼠生殖道病理检测:** 初次感染后 80 d 处死小鼠, 分离生殖道(包括子宫、输卵管和卵巢), 肉眼观察并照像记录其输卵管水肿情况; 然后用 10% 甲醛固定, 切片, 做 H&E 染色, 再用盲法分别给予子宫角及输卵管的炎症反应和水肿程度评分<sup>[10]</sup>。

**1.2.4 血清抗体类型检测:** 用 MoPn 感染 HeLa 细胞单层 24 h, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 4% PF 室温固定 30 min; 再经 2% saponion 室温处理 1 h; 以 PBS 洗涤后, 用含 10% 小牛血清的 PBS 封闭后, 加入系列稀释的感染 80 d 后的小鼠血清, 37°C 孵育 1 h; 充分洗涤, 再分别加入 1:100 稀释的 Cy3 标记的羊抗鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 1:1000 稀释的细胞核染色试剂 hoechst, 37°C 孵育 1 h; 充分洗涤, 封片, 荧光显微镜观察, 以能明显观察到包涵体的血清最高稀释度定义为该血清中相应抗体的效价。

**1.2.5 脾细胞上清中细胞因子水平测定:** 感染 80 d 后处死小鼠, 眼眶取血, 颈椎脱臼处死后用 75% 乙醇消毒; 无菌取脾, 匀浆, 用 5 mL 含 10 mg/L 庆大霉素的 DMEM (D0) 洗涤 2 次, 200 目尼龙膜过滤, 滤液置于 10 mL 的离心管中, 加 5 倍红细胞裂解液溶解红细胞, 1200 r/min 离心 5 min; 去上清, 用含 10% 小牛血清的 DMEM (D10) 洗涤 2 次, 1200 r/min 离心 5 min; 去上清, 加 2 mL D10, 计数后用 D10 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL; 台盼蓝染色后计数脾细胞存活率 > 95%; 接种于 24 孔板中, 每个样品接种

2 孔, 每孔 1 mL, 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后于其中一孔中加入 MoPn EB, 另一孔不刺激做对照。CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h 后, 收集上清, 测定其中 IL-4、IL-5、IFN- $\gamma$ 、IL-17 等细胞因子水平, 严格按试剂盒说明书操作。

**1.3 统计学分析**

用方差分析比较各组间 IFU 和细胞因子水平的差异, 用 *t* 检验(Two-tailed Student's *t* test)做两两比较和病理评分结果及 IgG2a/IgG1 比值分析, *P* < 0.05 为差异有显著性。

**2 结果**

**2.1 MyD88 缺失对衣原体的清除速度没有影响**

MyD88 KO (*n* = 20) 和 WT (*n* = 18) 鼠经生殖道感染 MoPn 后, 比较分析其生殖道衣原体的清除速度。结果显示(图 1), 不管是初次感染还是再次感染后, MyD88 KO 小鼠清除速度几乎与 WT 鼠一致, 表明抗衣原体生殖道感染的保护性免疫不依赖于 MyD88。在初次感染后 54 d, 每组一半小鼠再次感染同等剂量的衣原体, 再次感染后 3 d, 每组小鼠相对初次感染生殖道带菌量均降低 1000 倍左右, 并且带菌时间明显缩短, 表明初次感染后机体获得了对再次感染的免疫力。

**2.2 MyD88 缺失可加重衣原体感染引起的上生殖道病理反应**

初次感染后 80 d, 处死小鼠, 分离生殖道进行病理检测。肉眼观察可见, 初次感染后, 几乎所有的 MyD88 KO 小鼠出现明显的单侧或双侧输卵管水肿, 而只有 50% 左右的 WT 小鼠有明显的水肿(图 2A, 表 1)。显微镜观察各组实验鼠生殖道病理切片, 发

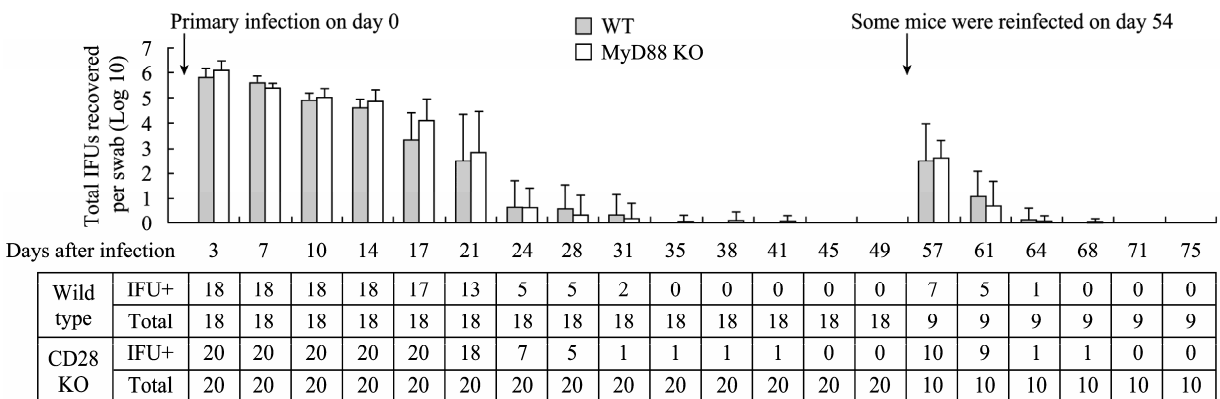


图 1 MyD88-基因缺陷对衣原体清除速度的影响

Fig. 1 Effect of MyD88-deficiency on live organism shedding following chlamydial infection

Note: IFU+: The number of mice with detectable IFUs; Total: The number of mice infected with *C. muridarum*.

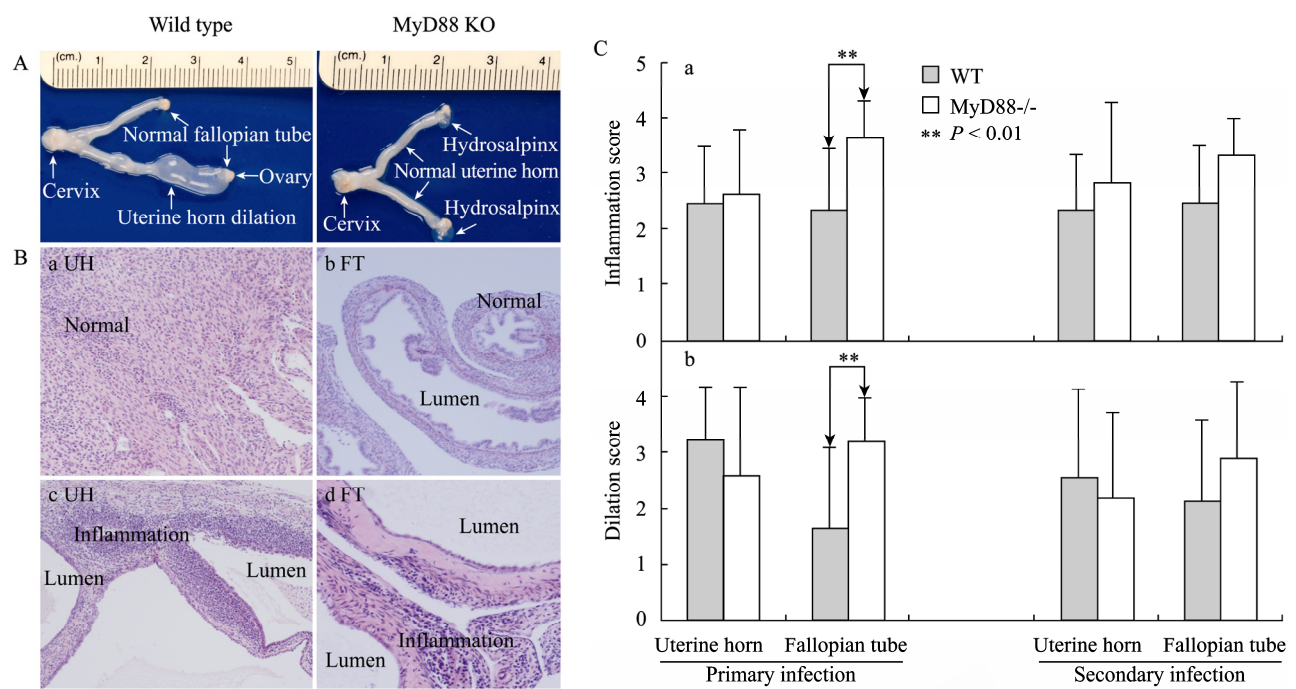


图 2 MyD88-基因缺陷对生殖道病理反应的影响

Fig. 2 Effect of MyD88-deficiency on the development of inflammatory pathologies in the mouse urogenital tract following chlamydial infection

Note: A: The gross appearance of urogenital tract tissues from wild type and MyD88 KO mice. The pathologies were recorded as hydrosalpinx & uterine horn dilatation observable with naked eye; B: The urogenital tract tissues were examined under microscope after H&E staining, a and b show the normal uterine horns or fallopian tubes, c and d show the pathologies which were recorded as extensive infiltration of mononuclear cells and fallopian tubes or uterine horns luminal dilation; C: Inflammation and lumen dilatation of both uterine horns and fallopian tubes were semiquantitatively scored under microscope and the scores were used to calculate the means and standard errors for each group as shown along the Y-axis. The various tissue and mouse groups were indicated along the X-axis.

表 1 肉眼观察小鼠生殖道病理变化结果 Table 1 Incidence of gross pathologies								
感染次数 Infection	小鼠组别 Mice	小鼠数量 No.	子宫角水肿 Uterine dilation			输卵管积水 Hydrosalpinx		
			正常 Normal	单侧 Unilateral	双侧 Bilateral	正常 Normal	单侧 Unilateral	双侧 Bilateral
初次感染 Primary infection	Wild type	9	3	0	6	4	5	0
	MyD88 KO	10	3	1	6	0*	5	5
再次感染 Secondary infection	Wild type	9	3	1	5	2	3	4
	MyD88 KO	10	7	1	2	3	1	6

Note: \*: When the incidence of hydrosalpinx on either or both sides of the fallopian tissues was compared between wt and MyD88 KO mice (Using Fisher's Exact Test or Chi-square test), the KO mice had a statistically significantly higher probability of developing hydrosalpinx follow *C. muridium* infection ( $P = 0.03$ ).

现初次感染后的 MyD88 KO 小鼠的输卵管水肿程度及炎症反应均明显高于 WT 组 (图 2B,  $P < 0.01$ )。而再次感染后, 小鼠之间的这种差异消失。这些结果表明, MyD88 与 MoPn 感染引发的生殖道炎症病理反应有一定关联。

2.3 MyD88 缺失对机体抗体类型的影响

为检测 MyD88 缺失对机体特异性体液免疫应答的影响, 本研究测定了感染小鼠血清中特异性抗

体的类型。结果显示(图 3), WT 组小鼠和 MyD88 KO 小鼠均可产生一定水平的 IgG1、IgG2a、IgG2b 及 IgG2c, 各种类型的抗体水平在两组小鼠间无显著性差异; 但 MyD88 KO 组 IgG2a/IgG1 比值小于 1, 且明显低于 WT 组。

2.4 MyD88 缺失对脾细胞细胞因子产生的影响

取各组小鼠脾细胞, 体外用 MoPn EB 再次刺激, 测定脾细胞上清中 Th2 (IL-4 & IL-5)、Th1 (IFN- $\gamma$ )

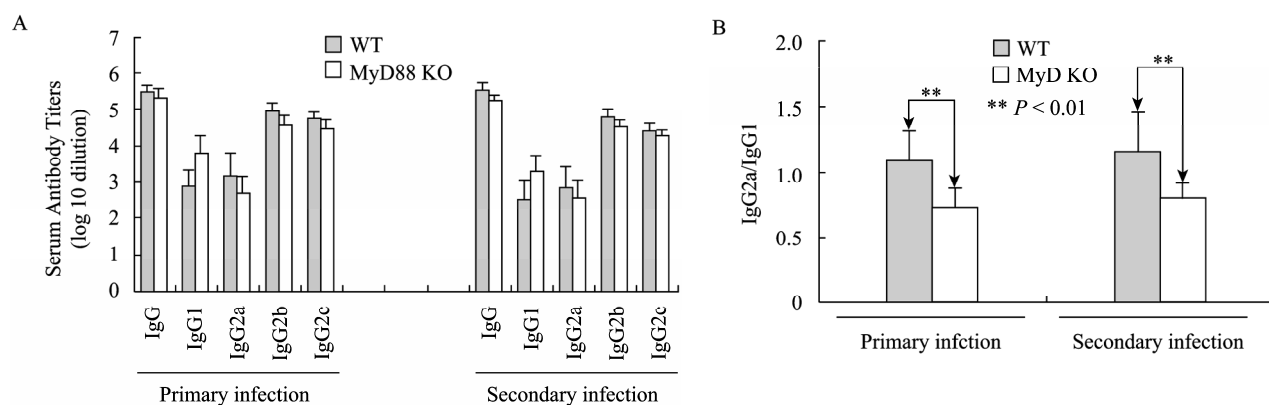


图3 MyD88-基因缺陷对衣原体特异性抗体产生的影响

Fig. 3 Effect of MyD88-deficiency on mouse serum antibody isotypes in response to chlamydial infection

Note: A: The data were expressed as mean standard error of the mean (SEM) of the titers (log10 dilution) of all the sera in the same mouse group; B: The ratio of MoPn-specific IgG2a/IgG1. \*\*  $P < 0.01$ , compared with those in WT and MyD88 KO mice.

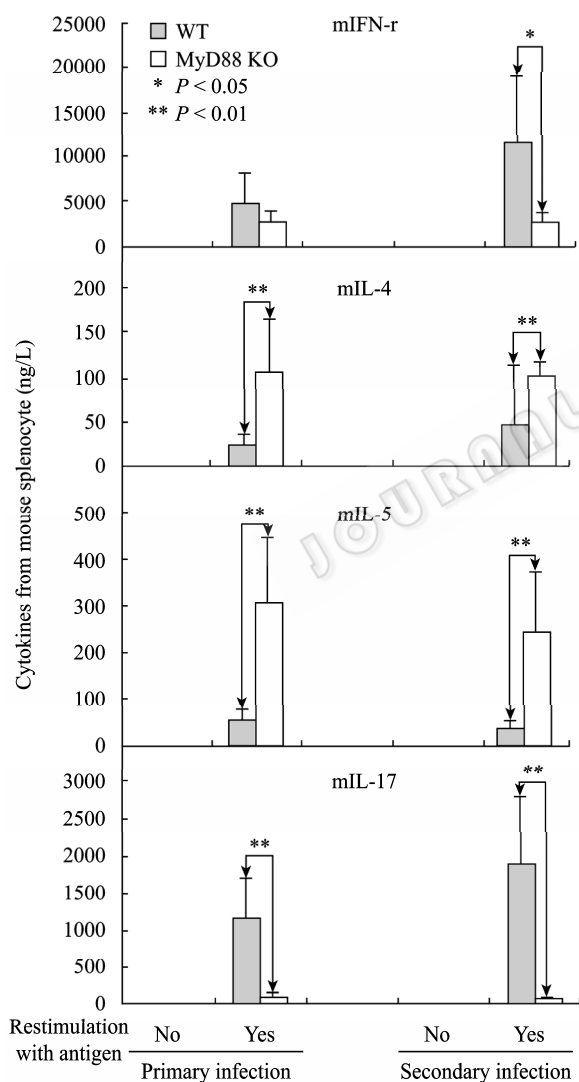


图4 MyD88-基因缺陷对脾细胞细胞因子产生的影响

Fig. 4 Effect of MyD88-deficiency on Antigen-driven cytokine responses by spleen cells

Note: Splenocytes were harvested from WT (Black bar) and MyD88-deficient (Open bar) mice and restimulated with chlamydial organism antigens for 72 h. The culture supernatants were measured for IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 and IL-5 using ELISA.

和 Th17(IL-17)细胞因子水平。结果发现(图 4), 不论是初次感染还是再次感染 MoPn 后, WT 组小鼠脾细胞产生的 IFN- $\gamma$  和 IL-17 水平明显高于 MyD88 KO 组, 而 MyD88 KO 组产生的 IL-4 或 IL-5 均明显高于 WT 组。

### 3 讨论

作为天然免疫系统中关键的接头分子, MyD88 在抗微生物尤其是抗胞内微生物感染中发挥着重要的作用, 但其在衣原体免疫及病理过程中的功能尚不清楚。本文以 MyD88 基因敲除小鼠作为实验模型, 研究了 MyD88 在 *C. muridarum* 生殖道感染中的作用。结果发现 MyD88 信号传导途径与保护性免疫关联性不大, 而与衣原体引起的炎症病理反应密切相关, 且 MyD88 缺失后引起的免疫反应倾向于 Th2 型反应。

小鼠生殖道带菌时间检测结果显示, 不管是在初次感染还是再次感染衣原体后, MyD88 KO 小鼠清除衣原体的速度与 WT 组小鼠相似。Darville 等<sup>[11]</sup>报道 TLR2 KO、TLR4 KO 鼠生殖道衣原体的清除速度与 WT 鼠没有明显区别, 从而认为 TLR2 和 TLR4 在抗衣原体感染方面作用不明显。而 MyD88 是除 TLR3 外, 其他 TLR 分子共同的下游信号通路, 因此这一结果与本文结果相呼应。而 Nagarajan<sup>[12]</sup>认为经生殖道感染 MoPn 后, MyD88 KO 小鼠生殖道清除衣原体的速度明显低于 WT 组。导致该相互矛盾结果的原因可能是由于使用的感染剂量不一, 他们使用的感染剂量为  $1 \times 10^7$  IFU, 远远高于本文使用的剂量( $5 \times 10^4$  IFU)。Ito 等<sup>[3]</sup>在研究 IFN- $\gamma$  在抗

衣原体感染中的作用时,也有类似不一致的发现。因此,我们认为低剂量时,机体可不依赖 MyD88 而通过其他免疫途径将衣原体清除;但当感染剂量过高时,MyD88 可能在抗衣原体免疫方面发挥一定的作用。

虽然 MyD88 与生殖道抗衣原体免疫无关,但生殖道病理结果显示,MyD88 缺陷小鼠输卵管病变明显比对照组小鼠严重。MyD88 与衣原体致生殖道病理损伤方面的关系尚未见文献报道。但本实验室用 *C. muridarum* 经呼吸道感染 MyD88 KO 小鼠,发现 MyD88 KO 小鼠肺部炎症反应比 WT 严重,并且病原体有向肾、脾等器官转移的趋势<sup>[13]</sup>。Naiki<sup>[14]</sup>等用 Cpn 经呼吸道感染 MyD88 KO 和 WT 鼠,发现感染早期(D5) MyD88 KO 组比 WT 组引起的肺部炎症反应轻,而晚期(D14, D35)炎症反应比 WT 组严重。这些均与本文发现的结果是一致的。

为探讨衣原体感染后导致 MyD88 KO 鼠生殖道病理反应加重的原因,我们检测了 MyD88 缺陷组与正常组小鼠脾细胞的细胞因子水平及血清中的抗体类型。结果显示 MyD88 KO 鼠脾细胞产生的 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  及 IL-17 的水平明显低于 WT 组,而 Th2 型细胞因子 IL-4 和 IL-5 明显高于 WT 组,并且 MyD88 KO 鼠血清中 IgG2a/IgG1 比值小于 1,且明显低于 WT 组,说明 MyD88 KO 小鼠不能产生活跃的 Th1 反应,而使机体抗衣原体感染的机制倾向于以 Th2 型为主,且该 Th2 反应可能是加重生殖道病理损伤的主要原因。当然,具体的致病机制及确切的原因还有待进一步研究。

**致谢:**本工作在美国得克萨斯大学圣安东尼奥健康科学中心微生物学和免疫学系 Dr. Zhong 实验室完成。

## 参 考 文 献

- [1] 陈丽丽, 吴移谋, 雷达, 等. 泌尿生殖道沙眼衣原体 omp1 基因多态性研究. 微生物学报, 2006, **46**(2): 214–218.
- [2] Barteneva N, Theodor I, Peterson EM, *et al.* Role of neutrophils in controlling early stages of a *Chlamydia trachomatis* infection. *Infect Immun*, 1996, **64**(11): 4830–4833.
- [3] Ito JI, Lyons JM. Role of gamma interferon in controlling murine chlamydial genital tract infection. *Infect Immun*, 1999, **67**(10): 5518–5521.
- [4] 徐世军, 沈映君. TLR 信号途径关键转接分子 MyD88 的研究进展. 中华中医药学刊, 2007, **25**(12): 2504–2506.
- [5] Kawai T, Adachi O, Ogawa T, *et al.* Unresponsiveness of MyD88 deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 1999, **11**(1): 115–122.
- [6] 李跃华, 哈团柱, 陈琪, 等. MyD88 依赖性核因子- $\kappa$ B 信号途径在心肌肥大发生过程中的调控作用. 中华医学杂志, 2005, **85**(4): 267–272.
- [7] Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*, 2000, **25**(2): 187–191.
- [8] 赵永刚, 周艳春, 李明才, 等. TLR/MyD88 信号通路自身免疫性疾病. 生命的化学, 2008, **28**(4): 457–460.
- [9] 陈凌. Toll 样受体与肿瘤免疫. 国外医学: 肿瘤学分册, 2004, **31**(6): 403–406.
- [10] Chen L, Cheng W, Shivshankar P, *et al.* Distinct roles of CD28- and CD40 ligand-mediated costimulation in the development of protective immunity and pathology during *Chlamydia muridarum* urogenital infection in mice. *Infect Immun*, 2009, **77**(7): 3080–3089.
- [11] Darville T, O'Neill JM, Andrews CW Jr, *et al.* Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. *J Immunol*, 2003(171): 6187–6197.
- [12] Nagarajan UM, Ojcius DM, Stahl L, *et al.* *Chlamydia trachomatis* induces expression of IFN-gamma-inducible protein 10 and IFN-beta independent of TLR2 and TLR4, but largely dependent on MyD88. *J Immunol*, 2005, **175**(1): 450–460.
- [13] Zhang X, Gao L, Lei L, *et al.* A MyD88-dependent early IL-17 production protects mice against airway infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia muridarum*. *J Immunol*, 2009, **183**(2): 1291–1300.
- [14] Naiki Y, Michelsen KS, Schröder NW, *et al.* MyD88 is pivotal for the early inflammatory response and subsequent bacterial clearance and survival in a mouse model of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia. *J Biol Chem*, 2005, **280**(32): 29242–29249.