

鼠衣原体在不同遗传背景小鼠中病变差异性与炎症细胞动态变化

周洲^{1*} 陈建林² 张洪波³ 陈丽丽¹ 李忠玉¹ 吴移谋¹

(1. 南华大学医学院病原生物学研究所 湖南 衡阳 421001)

(2. 中南大学湘雅二医院妇产科 湖南 长沙 410011)

(3. 中南大学湘雅二医院病理科 湖南 长沙 410011)

摘要:【目的】初步分析鼠衣原体(*Chlamydia muridarum*, Cm)致不同遗传背景小鼠生殖道病变的原因,探讨炎症细胞动态变化在衣原体感染致不同人群病变差异的可能机制。【方法】用 2×10^5 Inclusion forming units (IFUs)/小鼠的Cm剂量经子宫角(Intrauterine inoculation, iu)途径分别感染DBA/2J鼠和A/J鼠;在感染60 d处死两组小鼠,肉眼观察其输卵管水肿程度,显微镜下观察评估输卵管的扩张程度及炎症反应程度;每组小鼠在感染后3、7、14、21、28、35、42、49、56、60 d分别取阴道分泌物并检测其中衣原体包涵体的数量;在第14天每组各处死5只小鼠,检测上生殖道(输卵管及卵巢)组织匀浆中衣原体包涵体数量及炎症因子水平;同时,在3、28、35 d每组分别处死5只小鼠,显微镜下鉴定病变组织炎症细胞种类及变化。【结果】两组小鼠在感染60 d肉眼观察下的生殖道病变率有明显统计学差异,且两组小鼠病变组织的输卵管扩张程度也具有统计学差异,但炎症反应程度评分无统计学差异;DBA/2J与A/J两组小鼠在阴道分泌物的衣原体包涵体检测及小鼠阳性检出率中并无显著性差异;感染后14 d两组小鼠在上生殖道组织匀浆中的包涵体检出量无统计学差异,但某些炎症因子水平具有统计学差异;感染早期两组小鼠病变组织中嗜中性粒细胞浸润增加,但无明显差异,第28天DBA/2J小鼠病变组织中出现较多嗜酸性粒细胞,并在第35天与A/J小鼠形成统计学差异。【结论】DBA/2J与A/J小鼠在以iu方式感染等量Cm后,引起小鼠的生殖道病变差异可能与嗜酸性粒细胞参与的炎症反应有关。

关键词: 鼠衣原体, 小鼠模型, 输卵管水肿, 病变率, 炎症细胞

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31570179, 30901352); Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 13JJ4072); The Research Foundation of Education Bureau of Hunan Province (No. 12B109); The Hunan Province Cooperative Innovation Center for Molecular Target New Drug Study (No. 2015-351); The Foundation of Hunan Provincial Key Laboratory for Special Pathogens Prevention and Control (No. 2014-5); Construct Program of the Key Discipline in Hunan Province (No. 2011-76)

***Corresponding author:** Tel: 86-734-8282907; E-mail: susiezhou99503@163.com

Received: November 15, 2016; **Accepted:** January 18, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 18, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31570179, 30901352); 湖南省自然科学基金项目(No. 13JJ4072); 湖南省教育厅优秀青年基金项目(No. 12B109); 湖南省分子靶标新药研究协同创新中心资助项目(No. 2015-351); 特殊病原体防控湖南省重点实验室资助项目(No. 2014-5); 湖南省重点学科资助项目(No. 2011-76)

***通讯作者:** Tel: 86-734-8282907; E-mail: susiezhou99503@163.com

收稿日期: 2016-11-15; **接受日期:** 2017-01-18; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-01-18

Pathological difference and dynamic changes of inflammatory cells in *Chlamydia muridarum* infected mice with diverse genetic background

ZHOU Zhou^{1*} CHEN Jian-Lin² ZHANG Hong-Bo³ CHEN Li-Li¹
LI Zhong-Yu¹ WU Yi-Mou¹

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

(2. Departments of Obstetrics and Gynecology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

(3. Departments of Pathology and Endocrinology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

Abstract: [Objective] To determine the cause of *Chlamydia muridarum*-induced pathology in urogenital tract of mice with various genetic background, and to explore the mechanism of inflammatory cells' dynamic changes in pathological difference of mice infected with chlamydia. [Methods] Each of DBA/2J and A/J mice was inoculated via intrauterine route with 2×10^5 inclusion forming units (IFUs) of live *C. muridarum* organisms. Mice were sacrificed on 60 days post infection, and the severity of oviduct hydrosalpinx from each mouse was examined visually. The severity of inflammation and pathologies were scored under microscope. Vaginal swabs were taken on 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 60 days post infection from each group of mice and the total number of IFUs per swab was calculated. Five mice per group were sacrificed on 14 days post infection, each section of urogenital tract was made into homogenates for measuring the number of IFUs and the level of cytokines per sample. Meanwhile, 5 mice per group were sacrificed each time on 3, 28 and 35 dpi for diagnosis of the type and dynamic changes of inflammatory cells in the diseased tissues. [Results] Two groups of mice had statistically significant differences in hydrosalpinx incidence and severity of dilation whereas no statistically difference in the scores for the severity of inflammation. DBA/2J and A/J mice displayed same in number of chlamydial IFUs and pathology positive mice rate. The level of some inflammatory cytokines but not the number of IFUs detected in oviduct and ovary homogenate on 14 days had statistically difference. In early stage of infection neutrophils in pathological tissues increased in both DBA/2J and A/J mice whereas no obvious difference in two results. Many eosinophils occurred in pathological tissues of DBA/2J mice on 28 days and displayed statistically difference with A/J mice on 35 days. [Conclusion] The pathological difference of urogenital tract from DBA/2J and A/J mice with intrauterine inoculation of *C. muridarum* may have relationship with eosinophils-involved inflammatory reaction.

Keywords: *Chlamydia muridarum*, Mice model, Hydrosalpinx, Pathological incidence, Inflammatory cells

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)引起的泌尿生殖道感染是全球普遍关注的公共健康问题。Ct 感染的隐匿性和反复性特点导致患者不能及时接受有效治疗而形成慢性、迁延不愈的病变,在临床上引起男性的附睾炎、前列腺炎,在女性则引起宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎等,是造成不孕不育、异位妊娠等并发症的重要原因^[1]。但 Ct 不易在常规实验动物体内如小鼠构建衣原体生殖道感染模型,因此,限制了对 Ct 致病机制及防治策略的进一步研究。鼠衣原体(*Chlamydia muridarum*, Cm),

可以引起小鼠肺炎,与 Ct 在基因序列上有一定的相似性,在生物学特性及致病性上也比较相近,例如:Cm 在小鼠生殖道引起的感染和病理变化与 Ct 在人体内引起的非常相似,因此,用 Cm 构建的小鼠生殖道感染模型来研究 Ct 对人类生殖道的致病作用成为 Ct 研究的常规手段^[2]。

研究表明,宿主的遗传背景影响着衣原体感染的结局^[3-4]。我们已经证实,补体 C5 是宿主体内参与 Cm 致小鼠生殖道病变、诱发炎症反应的重要因素,C5 的活化可促进 Cm 以阴道接种(Intravaginal

inoculation, iv)小鼠后形成典型的生殖道病变——输卵管水肿^[5]。但是,在相同 C5 背景(C57)的不同品系小鼠中(DBA/2J 和 A/J),以输卵管囊内接种(Intrabursal inoculation, ib)的方式感染 Cm,两组小鼠的病变率则出现明显的差异。这提示我们除 C5 外,宿主存在与感染方式有关的其他遗传因素参与促进生殖道病变的形成。

前期研究发现通过宫颈角接种(Intrauterine inoculation, iu)途径感染时,DBA/2J 和 A/J 小鼠在产生输卵管水肿的病变率上有显著差异^[3]。为验证 iu 接种方式引起病变差异的结果并进一步探讨可能参与 Cm 致病的机制或因素,也避免 iv 带来的上行感染及 ib 接种带来炎症反应的过多干扰,我们以 iu 方式将等量 Cm 接种于两组不同品系小鼠体内,在检测感染第 60 天小鼠生殖道病变率的同时,对两组小鼠在感染过程中生殖道不同部位的衣原体数量、炎症反应程度及病变组织炎症细胞动态变化进行分析,在排除炎症细胞总量不同致病变差异的可能后,对两组小鼠病变组织的炎症细胞种类进行了鉴定,为探寻衣原体致病因子,揭示其致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:清洁级 5~6 w 雌性 DBA/2J(000671)和 A/J(000646)小鼠均购自美国 Jackson 实验室(Bar Harbor, Maine),喂养于学校动物房。小鼠饲养提供充足的食物和水源,温度长期保持在 25 °C,昼夜交替时间为 12 h/12 h。

1.1.2 菌株、试剂和仪器:Cm 标准株 Nigg 株,由本实验室常规传代制备并保存于-80 °C。HeLa 细胞,美国菌种典藏中心(ATCC, cat#CCL2);胎牛血清和常规细胞培养基 DMEM, Gibco BRL 公司;宫颈角感染的非手术胚胎移植装置 NSET (cat#60010), ParaTechs 公司; Depo-Provera, Pharmacia&Upjohn 公司; Cy3 标记的羊抗鼠 IgG (红色)二抗, Jackson ImmunoResearch 公司;细胞因子检测试剂盒, Sigma-Aldrich 公司或 R&D 公司; Triton-100, Sigma-Aldrich 公司。Olympus AX-70

荧光显微镜, Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 衣原体细胞感染及动物感染:体外实验中,先将 HeLa 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 在预铺盖玻片的 24 孔板中进行培养,使 16~20 h 后细胞丰度达到 80%~90%,然后按常规方案,将待测的处理标本样品(稀释的下生殖道分泌物或上生殖道各段组织匀浆)接种于细胞进行培养,约 24 h 后弃培养上清,以间接免疫荧光法检测标本中衣原体包涵体数量(详见方法 1.2.5)。

预备 35 只/组的 DBA/2J 和 A/J 小鼠。感染前 5 天,每只小鼠腹膜皮下预注射 2.5 mg 的 Depo-Provera,使小鼠发情周期同步,便于衣原体感染。感染当天(0 d),按照 NSET 装置的使用说明和指示步骤实施 iu 接种方式,每只小鼠感染 2×10^5 衣原体包涵体形成单位(Inclusion forming units, IFUs)的 Cm,感染后分别于 3、7、14、21、28、35、42、49、56、60 d 检测每只小鼠下生殖道分泌物的衣原体带菌量(详见方法 1.2.2),于 14 d 处死 5 只/组小鼠进行上生殖道衣原体带菌量和细胞因子的检测(详见方法 1.2.3),于 3、28、35 d 不同时间点分别处死 5 只/组小鼠,制备成病理切片标本并评估输卵管和卵巢组织中的炎症细胞(详见方法 1.2.6),在 60 d 处死 15 只/组小鼠,进行肉眼及镜下生殖道病变的评估(详见方法 1.2.4)。实施 iv 时, DBA/2J 和 A/J 两组各取 15 只/组小鼠(A/J 组 5 只小鼠数据用于其他研究),根据 2×10^5 IFUs Cm/只小鼠的接种剂量,将 Cm 母液稀释并重悬于预冷的衣原体保存液 SPG 中,调节加样枪以 15 μ L/只小鼠取样后,将枪头缓慢而轻柔的伸入小鼠阴道内,在加样枪按钮打下第一档遇到阻滞感后继续加压,直至第二档以便将感染液全部打出,保持加样枪档位不变稍稍停滞待感染液被纳入后,轻缓地将枪头从小鼠阴道中退出。实施 ib 时, DBA/2J 和 A/J 两组各取 10 只/组小鼠,对小鼠背部肾区对应位置行手术切口,并以无菌注射器将感染液直接接种于暴露出的输卵管囊腔内。

1.2.2 小鼠下生殖道带菌量检测:小鼠经生殖道感染 Cm 后, 第一周每隔 3–4 d (其余每隔 7 d) 以无菌棉拭子取生殖道(阴道和宫颈体)分泌物重悬于 500 μ L 预备玻璃珠的 SPG 中, 振荡处理并系列稀释标本混合液, 取合适稀释度的混合液感染单层 HeLa 细胞, 于 CO₂ 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 小鼠上生殖道带菌量及细胞因子检测:小鼠感染衣原体后 14 d 每组各处死 5 只小鼠, 无菌条件下分离小鼠生殖道, 截取两侧卵巢和输卵管、子宫角、阴道和子宫体三段生殖道组织, 无菌条件下分别研磨并以 300 μ L 预冷的 SPG 重悬组织匀浆, 玻璃珠振荡处理。取 50 μ L 匀浆液进行适当稀释后感染单层 HeLa 细胞, 培养 24 h 后, 间接免疫荧光检测包涵体数量; 另取部分输卵管及卵巢匀浆液 1 000 \times g 作用 10 min 分离上清, 根据试剂盒操作说明, 取适量匀浆上清分别检测小鼠细胞因子。

1.2.4 小鼠生殖道病理检测:初次感染后 60 d 处死小鼠, 分离生殖道(包括阴道、子宫、输卵管和卵巢), 肉眼初步观察、评价并拍照记录小鼠两侧输卵管水肿情况; 生殖道标本以 10% 甲醛固定、石蜡包埋后切片、HE 染色, 在显微镜下以盲法分别对输卵管进行水肿程度和炎症反应的评分。输卵管水肿的评分标准为: 0 分, 无明显水肿; 1 分, 肉眼可视有轻微水肿且需要显微镜下确认; 2 分, 肉眼明显可见但水肿不超过同侧输卵管直径; 3 分, 与同侧输卵管大小一致的水肿; 4 分, 超过同侧输卵管直径大小的水肿。炎症反应的评分标准(慢性感染阶段主要以观察单核细胞浸润为主, 急性感染期主要以中性粒细胞为主): 0 分, 无炎症细胞浸润; 1 分, 有 1 处轻微炎症细胞浸润; 2 分, 有 2–4 处炎症细胞浸润; 3 分, 有超过 4 处炎症细胞浸润; 4 分, 明显的大片炎症细胞浸润。

1.2.5 间接免疫荧光实验:将感染衣原体的 HeLa 细胞用 4% 多聚甲醛进行 30 min 固定、0.1% Triton-100 作用 10 min 对细胞膜透性处理, 洗涤封闭后, Hoechst 标记细胞核, 鼠抗 Cm LPS 抗体为

一抗, Cy3 标记的羊抗鼠 IgG (红色) 为二抗, 对不同标本感染细胞后形成的衣原体包涵体进行间接免疫荧光检测。在荧光显微镜下, 随机定位每张盖玻片的 5 个视野, 计算每个视野下包涵体的数量, 根据对标本稀释倍数及视野面积的转换公式, 获得每份标本的总 IFUs 并转换成 Log₁₀ 的对数值。

1.2.6 小鼠输卵管、卵巢组织炎症细胞观察及分析:衣原体感染小鼠后, 于 3、28、35 d 各组分别处死 5 只小鼠, 分离小鼠生殖道, 并按步骤 1.2.4 描述对标本进行固定、包埋、切片、HE 染色, 按间隔 5 张的规律抽取第 1、第 6、第 11 张病理切片标本, 在显微镜下观察, 鉴别病理切片中输卵管及卵巢组织中浸润的主要炎症细胞种类, 取 3 张病理切片计算均值和标准差并统计。

1.2.7 统计学分析:用秩和检验 Wilcoxon rank sum test 分析比较两组间病理评分和下生殖道上皮细胞 IFUs 含量差异, 用 Fisher's exact test 对小鼠下生殖道带菌率、病变小鼠百分率以及上生殖道衣原体定殖率进行统计, 用 *t* 检验(Two-tailed Student's *t* test) 对各细胞因子水平差异进行两两比较, 以 The Spearman's Correlation 对小鼠生殖道病变的描述性参数进行分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果与分析

2.1 *iu* 接种方式在 DBA/2J 小鼠中引起输卵管病变率高于 *iv* 和 *ib* 的接种方式

总结 3 种不同接种方式在小鼠形成输卵管病变的结局, *iv* 方式在两种感染小鼠中均难以造成明显的输卵管病变, DBA/2J 及 A/J 的病变率分别为 20% 和 10%, 且小鼠的输卵管扩张评分仅为 0.6 ± 1.4 和 0.4 ± 1.3 ; *ib* 方式使 DBA/2J 小鼠病变率达到 60%, 但 A/J 鼠无明显改变, 仍为 10%, DBA/2J 小鼠的输卵管扩张评分为 1.3 ± 1.3 , 略高于 A/J 小鼠的 0.1 ± 0.3 ; 与前两种方法相比, *iu* 接种方式感染 Cm 后, DBA/2J 小鼠输卵管病变率可达 100%, 而 A/J 小鼠病变率变化不明显, 仅为 20%, 与 A/J 鼠 0.6 ± 1.5 的输卵管扩张评分相比, DBA/2J 鼠达到了 5.1 ± 1.8 , 与 A/J 鼠形成统计学差异(表 1)。

2.2 以 iu 方式感染 Cm 后 DBA/2J 小鼠的输卵管病变率明显高于 A/J 小鼠

小鼠 iu 方式感染等量 Cm 后第 60 天被处死, 分离完整生殖道进行肉眼观察和镜下病理切片的评估。肉眼观察发现, A/J 组小鼠感染后输卵管病

变不明显, 15 只小鼠中仅 3 只出现输卵管水肿, 发生比率约 20% (图 1B); 而 15 只 DBA/2J 组小鼠感染后输卵管均出现明显水肿, 病变率为 100% (图 1A)。同时, DBA/2J 小鼠输卵管扩张评分为 5.1 ± 1.8 , 而 A/J 鼠输卵管扩张均值均为 0.6 ± 1.5 , 两者形成统计

表 1 不同接种方式对 Cm 感染小鼠形成输卵管水肿的影响									
Table 1 Effect on hydrosalpinx in mice induced by different inoculation with <i>C. muridarum</i>									
小鼠品系 Mouse strains	阴道接种 iv			输卵管囊内接种 ib			宫颈角接种 iu		
	病变率	炎性评分	炎性分组	病变率	炎性评分	炎性分组	病变率	炎性评分	炎性分组
	Incidence (n)	Severity	Susceptibility	Incidence (n)	Severity	Susceptibility	Incidence (n)	Severity	Susceptibility
DBA/2J	20% (15)	0.6 ± 1.4	R	60% (10)	1.3 ± 1.3	S	100% (15)*	$5.1\pm1.8^{**}$	H
A/J	10% (10)	0.4 ± 1.3	R	10% (10)	0.1 ± 0.3	R	20% (15)	0.6 ± 1.5	R

注: 炎性评分 ≥ 5 属于高度敏感组(H); 炎性评分在 1-5 间属于敏感组(S); 炎性评分 <1 属于抵抗组(R)。与 iv 接种法形成的输卵管病变相比, 以 iu 方式感染 DBA/2J 鼠形成的输卵管病变显著升高。
Note: Inflammatory score ≥ 5 belong to highly sensitive (H); Inflammatory score 1-5 belong to sensitive (S); Inflammatory score <1 belong to resistance (R). Comparing with intravaginal inoculation, DBA/2J mice with hydrosalpinx has significantly enhanced by intrauterine inoculation. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

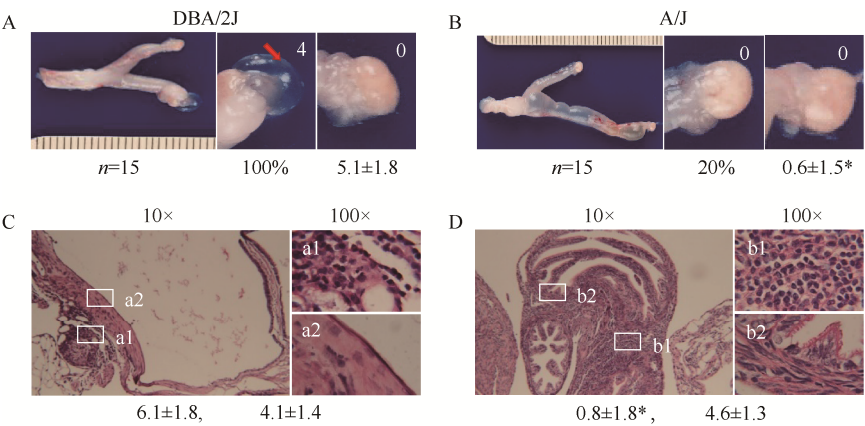


图 1 iu 方式接种 Cm 后 60 d 小鼠上生殖道输卵管水肿的情况
Figure 1 Hydrosalpinx developed in the upper genital tract of mice on Day 60 after intrauterine infection with *C. muridarum*

注: A 和 B: 小鼠生殖道外观, 病理改变以肉眼可见的输卵管水肿进行标记。左图示每组小鼠具有典型代表的完整生殖道图片, 右图示放大的输卵管和卵巢。记录显示具阳性病变(在放大图片中以红色箭头标记)的小鼠数量和阳性病变小鼠的百分率, 并根据材料与方法中提到的评分标准评估输卵管水肿的严重程度, 以白色数字标记在相应的图片中; C 和 D: 显微镜下 HE 染色的生殖道组织 (物镜放大倍数为 10 倍或 100 倍)。DBA/2J 和 A/J 两组小鼠的输卵管管腔扩张程度和炎症细胞浸润程度评分用 Wilcoxon rank sum 进行比较, 而输卵管发生率则用 Fisher 法进行分析。*: $P<0.05$ 。

Note: A and B: The gross appearance of urogenital tract tissues, the pathologies were recorded as hydrosalpinx observable with naked eye. A representative image from each strain of mice is presented with the whole genital tract in the left and the magnified oviduct and ovary portion in the right. The number of mice with positive hydrosalpinx (as marked with red arrows in the magnified oviduct/ovary images) were counted and recorded as % of hydrosalpinx positive mice. Furthermore, the severity of each hydrosalpinx was scored based on the criteria described in the Materials and Methods and marked with numbers in white in the corresponding images; C and D: The urogenital tract tissues were examined under microscope after H&E staining (10 \times or 100 \times objective lens). The luminal dilation of fallopian tubes (the former score in 1B) and hydrosalpinx severity scores (infiltration of inflammatory cells, the later score in 1B) were compared between DBA/2J and A/J mice using wilcoxon rank sum while the hydrosalpinx incidences were compared using Fisher's exact. *: $P<0.05$.

学差异。组织病理学检测证实两组小鼠在显微镜下输卵管水肿扩张程度确有明显差异, A/J 鼠输卵管扩张不明显, 扩张评分均值为 0.8 ± 1.8 , DBA/2J 鼠输卵管扩张明显, 扩张评分均值达到 6.1 ± 1.8 ; 进一步对两组小鼠病变组织中的炎症细胞浸润程度进行评分, 结果显示 DBA/2J 与 A/J 鼠病变组织中均充斥大量的炎症细胞, DBA/2J 鼠的炎症细胞浸润评分均值达到 4.1 ± 1.4 , 而 A/J 鼠的炎症细胞浸润评分均值达到 4.6 ± 1.3 , 两者没有形成统计学差异, 但从绝对值来看, A/J 鼠病变组织的炎症细胞浸润评分稍高于 DBA/2J 组小鼠(图 1C 和图 1D)。

2.3 *iu* 方式感染 Cm 后两种小鼠在下生殖道衣原体检出量及小鼠阳性检出率上没有显著差异

两组小鼠在 *iu* 感染 Cm 后第 3 天, 阴道上皮细胞中衣原体包涵体的检出量均最高, DBA/2J 组为 6.29 ± 0.24 , A/J 组为 6.27 ± 0.41 , 且检出率均为 100%, 说明 Cm 接种小鼠全部成功。从感染后第 7 天, 小鼠阴道上皮细胞中衣原体包涵体的检出量有所下降, 随后感染第 14、21、28 天衣原体检出量逐步降低, A/J 组小鼠在第 35 天阴道上皮衣原体被全部清除, DBA/2J 组小鼠在第 42 天阴道上皮衣原体被全部清除, 两组间无明显差异(图 2A)。两组小鼠带菌率在感染后第 3 天均为 100%, A/J 组在感染第 21 天出现 2 例小鼠阴道衣原体清零, 在感染第 35 天全部小鼠阴道衣原体被清零, DBA/2J 组在感染第 28 天出现 1 例小鼠阴道衣原体清零, 在感染第 42 天全部清零, 两组间无明显差异(图 2B)。该结果与以往实验数据一致(未显示)。

2.4 *iu* 方式感染 Cm 后两种小鼠在生殖道各段的衣原体检出量没有明显差异

在 *iu* 感染后的第 14 天, 每组各取 5 只小鼠, 分离完整生殖道并截取为上段(输卵管和卵巢)、中段(宫颈角)和下段(宫颈体和阴道), 各段均研磨成匀浆, 感染预铺的 HeLa 细胞, 间接免疫荧光法检测各段生殖道中衣原体的定殖情况。结果如图 3 所示, 在感染第 14 天, 两组小鼠的生殖道各段中均可检测到衣原体, 且总体趋势为下段(宫颈体和阴道)中衣

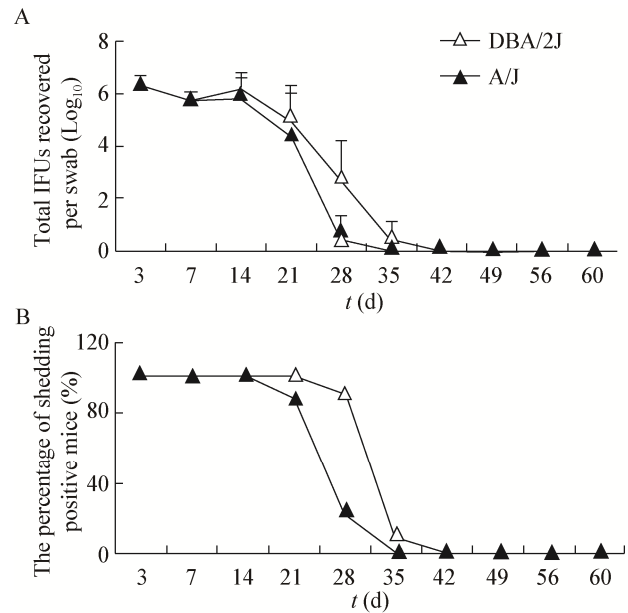


图 2 *iu* 方式感染 Cm 后小鼠下生殖道的衣原体检出量及带菌鼠的阳性检出率

Figure 2 Lower genital tract shedding and the number of mice remaining positive for shedding following intrauterine inoculation with *C. muridarum*

注: A: 从小鼠下生殖道检出的活衣原体数量; B: 处死前感染阶段下生殖道能检出活衣原体的阳性小鼠百分率。

Note: A: The number of live organism shedding from the lower genital tract; B: Percentage of mice remaining positive for shedding live organisms during the infection course prior to sacrifice.

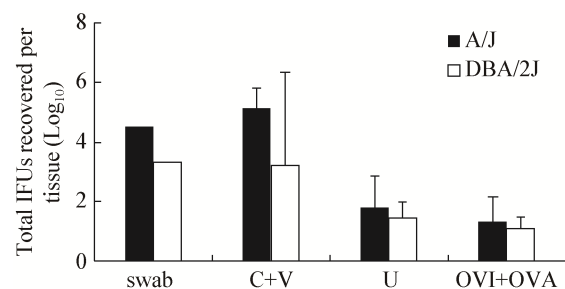


图 3 *iu* 方式感染 Cm 后 14 d 小鼠生殖道各段衣原体的检出量

Figure 3 Live organism recovery from different segments of mouse genital tracts on Day 14 after intrauterine inoculation with *C. muridarum*

注: 阴道和子宫颈(C+V)以及阴道分泌物 swab 代表下生殖道, 子宫角(U)及输卵管和卵巢(OVI+OVA)代表上生殖道。

Note: Vagina, cervix (C+V) and swab represent the lower genital tract, and uterine horn (U), oviduct and ovary (OVI+OVA) represent the upper genital tract.

原体的检出量高于中段(宫颈角)和上段(输卵管和卵巢)组织,提示 Cm 在以 iu 方式接种后可从上生殖道扩散至小鼠整个生殖道,但 A/J 鼠与 DBA/2J 鼠相比在感染过程中各段生殖道的衣原体数量并无显著差异($P>0.05$)。该结果与以往实验数据一致(未显示)。

2.5 DBA/2J 与 A/J 小鼠在病变组织的炎症细胞种类而非炎症细胞总量上形成差异

根据两组小鼠病变组织镜下炎症细胞浸润程度评分均升高但无差异的结果,于感染后第 3、28 和

35 天取每组各 5 只小鼠,处死后分离完整生殖道,制备的病理切片在放大 100 倍的油镜下,对小鼠两侧输卵管壁和输卵管腔进行炎症细胞种类和数量的大体评估(如方法 1.2.4 中炎症反应评分的描述),并进一步对主要炎症细胞(嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞)进行计数。如图 4 所示:在感染第 3 天,两组小鼠的病变组织中浸润大量的炎症细胞,包括淋巴细胞、巨噬细胞等,以嗜中性粒细胞为主,但根据统计,两组小鼠在嗜中性粒细胞的数量上并无明显差异;在感染第 28 天,两组小鼠病变组织的炎症细

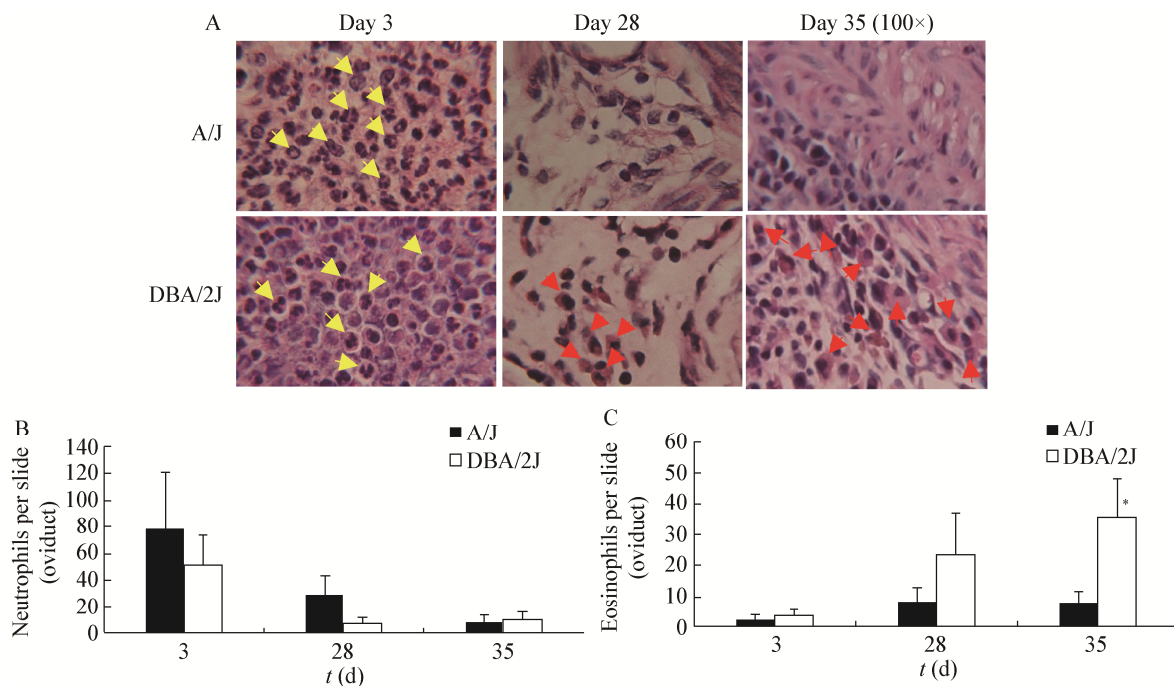


图 4 iu 方式感染 Cm 后小鼠输卵管组织炎症细胞的动态变化

Figure 4 Dynamic changes of inflammatory cells in oviduct following intrauterine inoculation with *C. muridarum*

注: A: Cm 感染后第 3 天、第 28 天、第 35 天 HE 染色的输卵管组织。图中标记了中性粒细胞(黄色箭头)或嗜酸性粒细胞(红色箭头)的存在(物镜放大倍数为 100 倍)。在急性感染期(第 3 天)的输卵管图例中,检测到较多的中性粒细胞,而在慢性感染阶段(第 35 天),DBA/2J 小鼠中检测到较多的嗜酸性粒细胞; B: 图中 Y 轴显示通过计算每只小鼠的中性粒细胞数获得的每组小鼠细胞的均值和标准差; C: 图中 Y 轴显示通过计算每只小鼠的嗜酸性粒细胞数获得的每组小鼠细胞的均值和标准差。注意 A/J 组和 DBA/2J 组小鼠在感染第 3 天均以中性粒细胞为主,第 28 天 DBA/2J 鼠输卵管组织中的嗜酸性粒细胞水平升高,在第 35 天显著高于 A/J 小鼠。*: $P<0.05$ 。

Note: A: H&E-stained oviduct tissue on Day 3, 28, 35 after *C. muridarum* infection. Example images marked with either neutrophils (yellow arrows) or eosinophils (red arrows) are shown (100 \times objective lens). In the image taken from an oviduct with an acute infection (3 d), more neutrophils were detected, while at the chronic stage (35 d), more eosinophils were detected in DBA/2J mice; B: The number of neutrophils from oviduct of each mouse was used to calculate means and standard deviations for each group as shown along the Y axis; C: The number of eosinophils from oviduct of each mouse was used to calculate means and standard deviations for each group as shown along the Y axis. Note that both A/J (solid bar) and DBA/2J (open bar) mice were dominated by neutrophils in oviduct on Day 3 after infection, then levels of oviduct eosinophils increased on Day 28 in DBA/2J mice, and became significantly higher in DBA/2J mice than A/J mice on Day 35. *: $P<0.05$.

胞数量均有所减少,与 A/J 小鼠相比, DBA/2J 小鼠的病变组织中出现了较多的胞浆红色的嗜酸性粒细胞;在感染第 35 天,病变组织中炎症细胞以浆细胞和淋巴细胞较为多见, DBA/2J 组小鼠病变组织中出现大量的嗜酸性粒细胞,而 A/J 组小鼠病变组织无明显嗜酸性粒细胞出现(仅个别病变小鼠组织出现少量嗜酸性粒细胞), A/J 与 DBA/2J 小鼠在病变组织的嗜酸性粒细胞的含量上有统计学差异($P<0.05$)。

2.6 DBA/2J 小鼠上生殖道病变组织的部分炎症因子水平高于 A/J 小鼠

取两组各 5 只小鼠的输卵管和卵巢段匀浆组织,离心后收集上清,检测上生殖道输卵管和卵巢段组织的炎症因子水平。如图 5A 所示, DBA/2J 组小鼠与 A/J 组小鼠在病变部位的衣原体数量上无明显差异。但除 IL-1、TNF- α 外(结果未显示), IL-13

等细胞因子在 DBA/2J 小鼠组的检测值明显高于 A/J 小鼠检测值,具有统计学差异($P<0.05$),且检测值的比值(DBA/2J:A/J) >3.0 (图 5B-E)。提示在感染等量 Cm 后, DBA/2J 组小鼠诱发输卵管及卵巢部位的炎症反应要明显强于 A/J 组小鼠。

3 结论与讨论

输卵管作为女性生育的重要器官,具有把生殖细胞运送到子宫腔的重要作用,输卵管不通或功能障碍是造成女性不孕症的主要原因。女性常见的衣原体生殖道感染,会使衣原体上行至输卵管,通过炎症反应、炎性细胞浸润,导致输卵管内膜水肿、增厚、上皮细胞脱落,若无及时有效治疗则可能造成输卵管管腔粘黏阻塞,形成输卵管水肿、积液。因此,是否出现输卵管水肿,常作为判断女性衣原体生殖道感染是否导致输卵管阻塞或输卵管性不

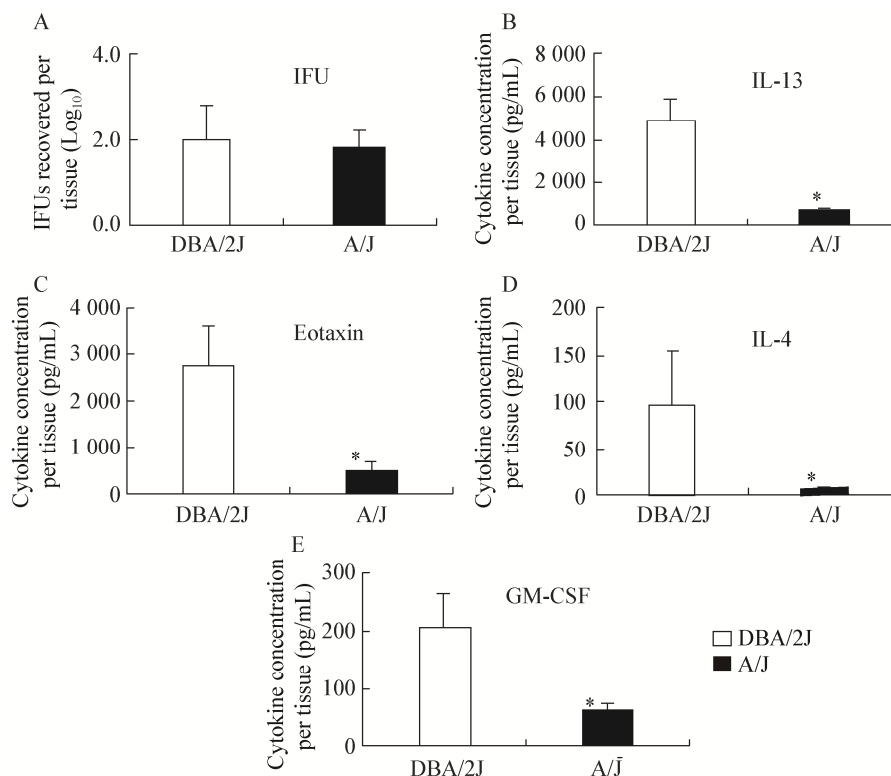


图 5 iu 方式感染 Cm 第 14 天 DBA/2J 和 A/J 小鼠输卵管及卵巢组织细胞因子的比较

Figure 5 Comparison of cytokines from oviduct and ovary tissue in DBA/2J and A/J mice harvested 14 days after intrauterine infection

Note: *: $P<0.05$.

孕的重要标志^[6-8]。而预防因下生殖道衣原体感染导致输卵管病变是维护女性生殖系统正常功能的有效手段。根据衣原体在小鼠模型中的感染特点,把阴道、宫颈、子宫体及分叉部分的子宫角作为小鼠下生殖道组织,而大部分子宫角、输卵管及卵巢则常作为小鼠上生殖道组织来研究衣原体的致病机制^[9-11]。

常规的小鼠衣原体生殖道接种方式采用的是 iv, 即取适量衣原体 EB, 通过预冷 SPG 按比例稀释后, 经小鼠阴道感染, 这种方式最大程度地模拟了衣原体自然情况下侵犯人体生殖道引发病变的过程, 涉及了衣原体感染后从下生殖道往上生殖道侵犯的扩散能力、衣原体在上生殖道的增殖以及衣原体在上生殖道引发炎症反应能力的几个因素。ib 是将小鼠背部肾区对应位置行手术切口, 并将衣原体接种于小鼠输卵管囊腔内, 其优点为可避开衣原体上行扩散的影响而直接评估衣原体在上生殖道引发病变的能力, 但人为手术切口引起的炎症反应可能对衣原体导致的炎性病变造成干扰。而 iu 技术通过采用非手术性的胚胎移植 NSET 装置, 绕过小鼠阴道和宫颈体的阻碍, 将衣原体直接从子宫角感染至上生殖道。这种方式在不造成炎症干扰的前提下, 为衣原体致小鼠输卵管水肿的机制提供了一条排除扩散因素而可独立研究衣原体在上生殖道致病能力的研究策略。

在以往研究中, 就衣原体感染导致输卵管病变的可能因素已进行了相关讨论^[12-14]。但是, 任何毒力因子的作用需要借助于调控宿主靶细胞才能完成。我们发现, 与正常小鼠(C5^{+/+}, B10.D2)相比, 缺失 C5 的小鼠(C5^{-/-}, B10.D2)在感染 Cm 后不能产生明显的输卵管水肿^[5]; 不同品系小鼠对衣原体的易感性及产生的病变率明显不同^[13]。这说明宿主的某些遗传背景可借助于衣原体毒力因子的作用干扰宿主细胞的正常功能, 引发机体病变。有趣的是, 在相同 C5 遗传背景(C^{-/-})的小鼠(DBA/2J 和 A/J 鼠)体内, 以常规 iv 方式接种 Cm, DBA/2J 和 A/J 小鼠均属于病变抵抗组, 病变率分别为 20% 和 10%,

当以 ib 方式接种 Cm 时, DBA/2J 小鼠的病变率提高到 60%, 转变为中度敏感组别, 而 A/J 鼠的病变率依然维持在 10%。这提示在 DBA/2J 和 A/J 小鼠中, 存在差异的某种遗传背景因素可能参与 Cm 调控宿主细胞的病变机制。为此, 我们进一步采用了 iu 接种方式, 检测两种小鼠的病变情况。发现 DBA/2J 组小鼠以 iu 方式直接在上生殖道感染 Cm 后, 病变率达到 100%, 进入高度敏感组, 而 A/J 组小鼠依然属于病变抵抗组, 病变率仅为 22%。据此推测, (1) 通过 3 种不同接种方式致两种小鼠输卵管病变率的差异, 提示除了 C5 因素外, 可能还有其他遗传背景相关因素参与导致两组小鼠生殖道病变率的差异; (2) 这种可能参与病变的宿主因素是通过改变接种方式而被激活的。值得注意的是, 同样是通过上生殖道接种, ib 与 iu 感染方法在 DBA/2J 小鼠生殖道病变率上有一定的差距。考虑到 ib 引起的炎症反应包括 Cm 感染生殖道引起的局部炎症反应, 也包括由手术伤口带来的炎症反应, 手术伤口带来的过强炎症反应可以迅速有效清除上生殖道中的衣原体, 从而导致 DBA/2J 小鼠病变率的减少, 缩小两组小鼠生殖道病变率的差异。因此 iu 与 ib 感染方式致病率的不同可能与 ib 方式引起宿主过激的炎症反应有关。

在探究致两组小鼠 iu 感染 Cm 后生殖道病变差异性的参与因素时, 我们发现, 在 DBA/2J 和 A/J 小鼠的感染过程中, 小鼠下生殖道的衣原体检出量及小鼠带菌率无明显差异, 说明引起病变差异的原因与 Cm 对下生殖道的感染无关; 通过对生殖道各段匀浆组织衣原体包涵体的检出, 发现小鼠生殖道各段在衣原体数量上也无明显区别, 说明病变差异与 Cm 在生殖道的扩散能力及在上生殖道的数量无关, 而可能与其在上生殖道诱发炎症反应的能力相关。在检测感染第 60 天小鼠输卵管病变时, 我们注意到, 肉眼观察下 DBA/2J 和 A/J 组小鼠的输卵管病变率和输卵管扩张评分形成了统计学差异, 而显微镜下的输卵管扩张评分与上述结果一致, 但两组小鼠的病变组织炎症细胞浸润评分并无差异, 甚至

A/J 组数值略高于 DBA/2J 组。这一结果说明, 尽管两组小鼠衣原体感染致病变率不同与输卵管和卵巢组织炎症反应有关, 但该炎症反应与炎症细胞数量无关, 而可能与炎症细胞的种类有关。根据上述推论, 我们对病变组织进行动态病理学分析, 确认参与病变过程的主要炎症细胞。检测结果显示, 在感染早期(第 3 天), DBA/2J 与 A/J 组在病变组织炎症反应程度以及炎症细胞类型上并无明显区别, 病变组织中主要浸润着大量的中性粒细胞。这与以往发现 Cm 感染小鼠早期以中性粒细胞为主的病变特点一致^[4]。至感染中期(第 28 天), 两组小鼠病变组织中炎症细胞的种类及比例有了变化, 中性粒细胞的数量明显下降, DBA/2J 组小鼠输卵管组织中出现了部分嗜酸性粒细胞, 而 A/J 小鼠病变组织中少有嗜酸性粒细胞出现。感染后期以第 35 天为例, DBA/2J 小鼠组织中浸润大量嗜酸性粒细胞, 并与 A/J 小鼠结果出现显著性差异; 而 A/J 小鼠组织中主要浸润的炎症细胞包括浆细胞、淋巴细胞和巨噬细胞(结果未显示)。这一结果与第 60 天病理切片的镜下评估(DBA/2J 小鼠仅在输卵管组织的扩张程度上与 A/J 小鼠形成统计学差异, 但两者组织的炎症细胞浸润程度评分并无统计学差异)一致。进一步通过病变组织细胞因子检测对上述结论进行验证, 结果发现检测的 7 种细胞因子在 DBA/2J 小鼠组织中明显高于 A/J 组别, 包括 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-13、Eotaxin、GM-CSF 和 TNF- α , 并具有明显差异性 (DBA/2J:A/J>3)。IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 在炎症反应中被研究的最多, 对炎症反应的发生发展具有极其重要的作用, 是常规检测的炎症因子, 参与机体炎症反应的多种病理过程。Eotaxin (嗜酸性粒细胞趋化因子) 是对嗜酸性粒细胞具有选择趋化作用的细胞因子, GM-CSF (粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子) 是一种调节造血干细胞增殖和分化的细胞因子, 对嗜酸性粒细胞的分化也同样重要, 而 IL-13 和 IL-4 在结构和功能上具有一定相似性, 两者均可通过对单核巨噬细胞、嗜酸性粒细胞等细胞的调节

作用而参与炎症反应。结合细胞因子的检测结果, 我们推测, 在 DBA/2J 及 A/J 小鼠品系以 iu 接种 Cm 导致不同病变率的结果, 可能与 Cm 激活小鼠某种遗传因素, 并通过 Eotaxin、GM-CSF 等细胞因子, 促使嗜酸性粒细胞在局部病变组织中聚集、浸润并脱颗粒, 通过释放毒性产物, 引起组织损伤的能力有关。

衣原体生殖道感染普遍存在, 但是据统计, 仅有 10%–15% 的女性在感染未治疗的情况下出现输卵管病变, 绝大多数感染者并不患病^[15-16]。衣原体感染的发生、发展和结局, 不仅与衣原体入侵数量和毒力有关, 也受到机体遗传基因和多态性的影响。本实验中, 我们希望找到与生物学相关的致病机制, 以便阐明临床上不同女性患者抗输卵管病变的可能方式。A/J 和 DBA/2J 小鼠在同种条件下感染 Cm 致不同病变结果的实验, 模拟了临床上女性衣原体生殖道病变的不同情况, 提示小鼠 Cm 感染引起输卵管病变与衣原体在生殖道的扩散能力、繁殖数量无关, 而可能与宿主能否诱发嗜酸性粒细胞参与的炎症反应有关。综上所述, 小鼠在 Cm 感染后通过分泌 Eotaxin 等细胞因子诱发输卵管嗜酸性粒细胞炎症反应可能是某些宿主在衣原体感染后导致输卵管病变的机制之一。

参 考 文 献

- [1] Ahmadi MH, Mirsalehian A, Bahador A. Association of *Chlamydia trachomatis* with infertility and clinical manifestations: a systematic review and meta-analysis of case-control studies[J]. Infectious Diseases, 2016, 48(7): 517-523
- [2] Bulir DC, Liang S, Lee A, et al. Immunization with chlamydial type III secretion antigens reduces vaginal shedding and prevents fallopian tube pathology following live *C. muridarum* challenge[J]. Vaccine, 2016, 34(34): 3979-3985
- [3] Chen JL, Zhang HB, Zhou Z, et al. Chlamydial induction of hydrosalpinx in 11 strains of mice reveals multiple host mechanisms for preventing upper genital tract pathology[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95076
- [4] Zhang HB, Zhou Z, Chen JL, et al. Lack of long-lasting hydrosalpinx in A/J mice correlates with rapid but transient chlamydial ascension and neutrophil recruitment in the oviduct following intravaginal inoculation with *Chlamydia muridarum*[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(7): 2688-2696
- [5] Yang ZS, Conrad T, Zhou Z, et al. Complement factor C5 but not C3 contributes significantly to hydrosalpinx development in

- mice infected with *Chlamydia muridarum*[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(8): 3154-3163
- [6] Shah AA, Schripsema JH, Imtiaz MT, et al. Histopathologic changes related to fibrotic oviduct occlusion after genital tract infection of mice with *Chlamydia muridarum*[J]. Sexually Transmitted Diseases, 2005, 32(1): 49-56
- [7] de la Maza LM, Pal S, Khamesipour A, et al. Intravaginal inoculation of mice with the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis biovar results in infertility[J]. Infection and Immunity, 1994, 62(5): 2094-2097
- [8] Swenson CE, Schachter J. Infertility as a consequence of chlamydial infection of the upper genital tract in female mice[J]. Sexually Transmitted Diseases, 1984, 11(2): 64-67
- [9] Chen LL, Lei L, Zhou Z, et al. Contribution of interleukin-12 p35 (IL-12p35) and IL-12p40 to protective immunity and pathology in mice infected with *Chlamydia muridarum*[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(8): 2962-2971
- [10] Huang YM, Zhang Q, Yang ZS, et al. Plasmid-encoded Pgp5 is a significant contributor to *Chlamydia muridarum* induction of hydrosalpinx[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124840
- [11] Zhang Q, Huang YM, Gong SQ, et al. *In vivo* and *ex vivo* imaging reveals a long-lasting chlamydial infection in the mouse gastrointestinal tract following genital tract inoculation[J]. Infection and Immunity, 2015, 83(9): 3568-3577
- [12] Liu YJ, Huang YM, Yang ZS, et al. Plasmid-encoded Pgp3 is a major virulence factor for *Chlamydia muridarum* to induce hydrosalpinx in mice[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(12): 5327-5335
- [13] Zhou Z, Wu YM, Tan G, et al. Screening of virulence gene and establishment of isogenic *Chlamydia muridarum* clones with different genotype[J]. Microbiology China, 2015, 42(8): 1561-1568 (in Chinese)
周洲, 吴移谋, 谭钢, 等. 鼠衣原体毒力基因的筛选和基因差异型菌株的建立[J]. 微生物学通报, 2015, 42(8): 1561-1568
- [14] Chen CQ, Zhou Z, Conrad T, et al. *In vitro* passage selects for *Chlamydia muridarum* with enhanced infectivity in cultured cells but attenuated pathogenicity in mouse upper genital tract[J]. Infection and Immunity, 2015, 83(5): 1881-1892
- [15] Budrys NM, Gong SQ, Rodgers AK, et al. *Chlamydia trachomatis* antigens recognized in women with tubal factor infertility, normal fertility, and acute infection[J]. Obstetrics & Gynecology, 2012, 119(5): 1009-1016
- [16] Rodgers AK, Budrys NM, Gong SQ, et al. Genome-wide identification of *Chlamydia trachomatis* antigens associated with tubal factor infertility[J]. Fertility and Sterility, 2011, 96(3): 715-721

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。