文章编号:1000-5404(2009)16-1563-03

论著

IL-17在沙眼衣原体呼吸道感染早期表达及与衣原体复制的关系

张效云[1],程建贞[1],高丽芬[2],张颖骞[2],钟光明[2] ([1]河北北方学院生物化学教研室,河北 张家口 075000;[2]美国德克萨斯大学圣安东尼奥健康科学中心微生物免疫系,圣安东尼奥 78229, USA)

摘 要:目的 探讨炎症性细胞因子IL-17在沙眼衣原体呼吸道感染中的早期表达及与衣原体复制的关系。**方法** 128只小鼠按随机数字表法分为实验组和对照组,实验组用4 000包涵体形成单位(IFU)沙眼衣原体小鼠肺炎株(MoPn)通过鼻腔感染小鼠,对照组则给予等量蔗糖磷酸盐缓冲液(SPG),分别在感染后0、1、1.5、2、3、4、8、12 d处死小鼠,用免疫荧光检测(IFA)衣原体在肺组织中的生长情况,通过ELISA检测小鼠肺组织IL-17表达。24只小鼠分为3组,分别用160、800、4 000 IFU MoPn通过鼻腔感染小鼠,于感染后第2天测定肺组织中衣原体生长及IL-17表达。16只小鼠随机分为2组,用4 000 IFU MoPn通过鼻腔感染小鼠,实验组肌肉注射利福平和氯霉素,对照组则给予等量PBS,于感染后第2天测定肺组织中衣原体生长及IL-17表达。**结果** MoPn感染后第1天,肺组织有衣原体生长,于感染后第8天达高峰。感染后第2天,IL-17在小鼠肺组织中的表达达峰值,并很快下降。仅剂量为4 000 IFU MoPn感染小鼠2 d后,肺组织中同时有衣原体生长和IL-17的表达。经抗生素处理后衣原体生长被抑制,同时也检测不到IL-17的表达。**结论** IL-17在衣原体呼吸道感染早期出现,其表达情况与衣原体感染剂量和早期复制有关。

关键词: 沙眼衣原体;IL-17;呼吸道感染;抗生素;固有免疫
中图法分类号: R374.1;R392.11;R560.2 **文献标识码:** A

Early IL-17 production in airway upon *Chlamydia trachomatis* infection and its relationship with chlamydial organism replication

ZHANG Xiao-yun[1], CHENG Jian-zhen[1], GAO Li-fen[2], ZHANG Ying-qian[2], ZHONG Guang-ming[2] ([1] Department of Biochemistry, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province 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: Objective To evaluate the early IL-17 production in airway upon Chlamydia trachomatis infection and its relationship with chlamydial organism replication. **Methods** A total of 128 mice were randomly divided into experimental groups and control ones. The mice in experimental groups were induced by intranasal inoculation with Chlamydia trachomatis mouse pneumonitis (MoPn, now classified as a new species C. muridarum) biovar with 4000 IFU of MoPn. The same volume of SPG was given to the control ones. Chlamydial growth in the lung was assessed by inoculating HeLa cell monolayer with lung homogenates followed by IFA at 0, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8 and 12 d after infection. Meanwhile, IL-17 was measured by ELISA. Another 24 mice were divided randomly into 3 groups and infected with 160, 800, and 4 000 IFU of MoPn by intranasal inoculation, respectively. Chlamydial growth and IL-17 production in the lung were assessed at 2 d after infection. Another 16 mice were divided into experimental and control groups and were administrated with 4 000 IFU of MoPn by intranasal injection with or without rifampicin and chloromycepin treatment. Chlamydial growth and IL-17 production in the lung were also assessed at 2 d after infection. **Results** Chlamydial growth in the lung was found at 1 d after infection, and reached its peak at 8 d with subsequent decline in quantity. IL-17 peaked at 48 h transiently, and then decreased subsequently. Both Chlamydial growth and IL-17 production in the lung were detectable at 2 d after infection only with 4 000 IFU of MoPn by intranasal administration. Chlamydial growth in the lung was blocked by treatment with antibiotics. Meanwhile, no IL-17 was detectable by ELISA. **Conclusion** IL-17 can be produced early in airway upon Chlamydia trachomatis. IL-17 production may be associated with the dose of Chlamydia trachomatis infection and early chlamydial organism replication.

Key words: Chlamydia trachomatis; IL-17; respiratory infection; antibiotics; innate immunity

基金项目: 美国国立卫生研究院基金(1 R01 AI47997-01)
Supported by the National Institutes of Health, USA (1 R01 AI47997-01)

作者简介: 张效云,女,河北省张家口市人,硕士,副教授,主要从事感染与免疫方面的研究,发表论文15篇。电话:(0313)8041697,E-mail:xyz700928@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-02-19;**修回日期:** 2009-04-02

沙眼衣原体(*chlamydia trachomatis*)是一类严格细胞内寄生的病原菌,能引起沙眼、生殖道感染、不孕不育和肺炎等多种疾病,危害性很大。小鼠模型研究表明,$CD4^+$ Th1 细胞和依赖 IFNγ 的免疫反应是宿主控制衣原体感染的主要保护性因素,抗体和 CD8 T 细胞也可能在衣原体感染中发挥一定的作用[1]。初始 $CD4^+$ T 细胞可被诱导分化成为一种新的 Th 细胞亚型-Th17[2],并分泌细胞因子 IL-17。IL-17 家族包括 IL-17(IL-17A)、IL-17B-F。IL-17 和 IL-17F 主要由活化的 CD_{4+} T 细胞产生,参与宿主固有免疫应答如中性粒细胞募集及活化。IL-17 作为前炎症因子在许多疾病中发挥作用,缺乏产生 Th17 细胞的小鼠能抵抗实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)、胶原蛋白诱导的关节炎和炎症性肠病(IBD)[3]。本研究以鼠衣原体肺炎为模型,观察衣原体感染不同时间 IL-17 的表达及与衣原体复制的关系,为防治衣原体感染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

IL-17 试剂盒购自 R&D systems 公司,检测原理为双抗夹心法,一抗为抗鼠 IL-17 单克隆抗体(IgG2A),二抗为羊抗鼠IL-17 多克隆抗体(IgG)。组织匀浆器购自 Fisher Scientific 公司,Hoechst 染料购自 Invitrogen 公司,Cy3 标记羊抗鼠(红)购自 Jackson 免疫制剂公司,利福平和氯霉素购自 Sigma 公司。CO_2培养箱(美国 Formo 公司),荧光生物显微镜(日本 Olympus 公司),酶标仪(Molecular Devices Corporation 公司,美国)。

1.2 沙眼衣原体菌株

沙眼衣原体小鼠肺炎株(MoPn,由 Dr. ZHONG 实验室提供)生长于 HeLa 229 细胞,用不连续密度梯度离心法纯化衣原体原体(EB),进行活性测定后用于感染小鼠,具体方法参见文献[4]。

1.3 实验动物及感染

8~9 周龄雄性或雌性 C57BL/6 小鼠,体质量 18~20 g,购自 Jackson laboratories, Bar Harbor, Maine。标记小鼠,分笼颗粒饲料饲养,温度 18~24 ℃,光暗周期 12 h,自由饮水进食。①128 只小鼠采用随机数字表法分为 16 组,分别为感染后 0、1、1.5、2、3、4、8、12 d 的实验组和相应的对照组,每组 8 只。实验组在微麻状态下鼻腔内吸入 40 μl 含 4×10^3 IFU MoPn 的 SPG,对照组则吸入等量 SPG,在感染后特定时间点处死小鼠。②24 只小鼠随机分为 3 组,每组 8 只,经鼻腔分别吸入含 MoPn 160、800 IFU 和 4×10^3 IFU 的 SPG,在感染后 2 d 处死。③16 只小鼠采用随机数字表法分为实验组和对照组,每组 8 只。实验组从感染前 2 d 起,肌肉注射利福平(400 μg/只)和氯霉素(400 μg/只)混合液 1 次/2 d;对照组给与等量 PBS。2 组小鼠鼻腔内均吸入 40 μl 含 MoPn 4×10^3 IFU 的 SPG,在感染后第 2 天处死小鼠。

1.4 肺组织匀浆制备

无菌采集小鼠全肺,称质量,放入 2 ml 玻璃研磨器,按照 1.2 ml/100 mg 肺加入 SPG,制备成组织匀浆,经超声后,在 4 ℃,6 000 r/min 离心 15 min,上清液用来进行 IFU 计数和细胞因子的测定。

1.5 衣原体活性测定

选取消毒灭菌后盖玻片放入24 孔培养板内,收获培养24 h 左右的 HeLa 细胞,经胰蛋白酶消化、记数后,用含 10% FBS 的 DMEM 稀释至 8×10^4/ml,每孔加 1 ml,37 ℃ 5% CO_2 条件下培养过夜。将生长在盖玻片上的单层 Hela 细胞,移去培养基,用 DMEM 洗 1 次,加入 0.5 ml 30 μg/ml 的 DEAE-葡聚糖, 37 ℃ 10 min。弃掉 DEAE,加入适当稀释的肺组织匀浆上清液,每孔 200 μl,室温下 1 000 r/min 离心 1 h,吸去标本,加入含有 2 μg/ml 放线菌酮(cycloheximide)、10 μg/ml 庆大霉素及 100 ml/L FBS 的 DMEM,每孔 1 ml,37 ℃ 5% CO_2条件下培养 24 h。吸掉培养基,用 1×PBS 洗 1 次,加入含有 2% PF 的 1×PBS 0.5 ml,室温固定 30 min,然后加入含有 2% Sapornin 的 0.05% PBST 室温 1 h。吸掉孔内液体,加入含 10% FBS 的 DMEM 0.5 ml,37 ℃ 封闭 1 h。吸掉孔内液体加入一抗(含 10% FBS 的 DMEM 10 ml, MB5H9 100 μl,由 Dr. ZHONG 实验室提供),37 ℃ 作用 1 h。用 1×PBS 洗 3 次,每次放置 5 min,最后风干。加入 20 μl 二抗(1 ml 10% FBS DMEM,5 μl G 抗 M IgG Cy3,2 μl hoechst),37 ℃ 作用 1 h。用 1×PBS 洗 3 次每次放置 5 min,然后封片,在荧光显微镜下计数包涵体个数以 IFU 表示。每个盖玻片随机计数 5 个视野,若视野不足 1 个 IFU 的,计数整个盖玻片。呈明显细胞毒性的细胞不在计数之内。每个器官的总 IFU 计数为每个视野的 IFU、每张盖玻片的计数视野、肺组织上清液的稀释倍数和总体积的综合计数。

1.6 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 衣原体在小鼠肺组织的生长

用小鼠肺组织匀浆做衣原体活性测定,于感染后第 1 天,HeLa 细胞内可见有衣原体包涵体生长,IFU 数值随着感染进程持续增高,于感染后第 8 天 IFU 达峰值,以后逐渐下降(图 1)。对照组检测不到衣原体生长和 IL-17 表达。

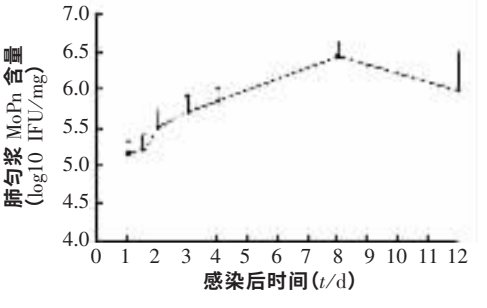


图 1 MoPn 呼吸道感染小鼠肺组织 IFU 生长计数

2.2　感染早期诱导 IL-17 的表达

用小鼠肺组织匀浆进行 IL-17 ELISA 测定,发现 IL-17 表达在感染 48 h 后达到峰值(图 2),但 IL-17 的产生是暂时的;第 4 天,几乎检测不到明显的 IL-17(IL-17 ELISA 试剂盒的工作范围是 15.6 ~ 1 000 pg/ml)。

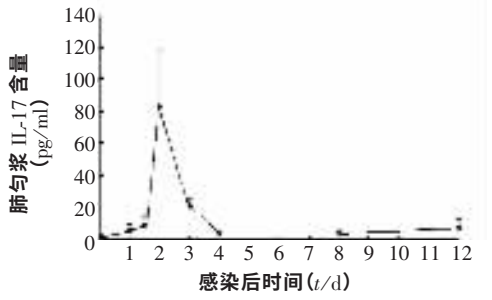


图 2　MoPn 呼吸道感染小鼠肺组织 IL-17 的表达

2.3　不同剂量感染第 2 天衣原体生长及 IL-17 的表达

经不同剂量 MoPn 呼吸道感染小鼠,于感染后第 2 天处死小鼠,用肺组织匀浆做衣原体活性测定, 160 IFU 感染测不到 HeLa 细胞内衣原体包涵体生长和 IL-17 的表达,800 IFU 和 4×10^3 IFU 感染则有衣原体包涵体生长,IFU 数值随着感染剂量增加而增高,但仅 4×10^3 IFU 感染可检测到 IL-17 的表达。IFU 以 lg10 计数,均值分别为(4.23 ±0.24)和(5.43 ±0.24)($P<0.01$),IL-17 则分别为(8.08 ±3.12)、(83.0 ±35.8)pg/ml($P<0.01$)。

2.4　经抗生素处理感染第 2 天衣原体生长及 IL-17 的表达

从感染前 2 d 起,肌肉注射利福平(400 μg/只,1 次/2 d)和氯霉素(400 μg/只,1 次/2 d)混合液,4×10^3 IFU MoPn 滴鼻感染小鼠,于感染后第 2 天处死小鼠,用肺组织匀浆做衣原体活性测定和 IL-17 含量测定。抗生素处理组几乎检测不到 HeLa 细胞内衣原体包涵体生长和 IL-17 的表达。抗生素处理组与对照组肺匀浆 IFU 以 lg10 计数,分别为(1.05 ±0.11)和(5.58 ±0.31)($P<0.01$),IL-17 则分别为(7.3 ±3.4)、(89.5 ±23.2)pg/ml($P<0.01$)。

3　讨论

IL-17 在炎症病理和宿主防御多种微生物感染中具有重要的作用。然而,IL-17 在由严格的细胞内寄生病原菌如沙眼衣原体引起的感染中的作用尚不清楚。本研究用沙眼衣原体体内感染模型证实 IL-17 在感染衣原体后在固有免疫应答早期阶段短暂表达,从而有利于小鼠肺组织逐渐清除感染的衣原体。本研究发现,鼠衣原体 MoPn 经呼吸道感染小鼠,IL-17 作为 Th17 细胞分泌的标志性细胞因子,在感染的早期阶段即 48 h 就达到高峰,随后很快下降。4 000 IFU 感染小鼠后肺组织中有衣原体生长和 IL-17 的表达,经抗生素处理后衣原体生长被抑制,同时也检测不到 IL-17 的表达。尽管衣原体呼吸道感染后 IFU 在第 8 天达峰值,但 IL-17 却只在感染后的第 2 天出现峰值并很快下降,提示 IL-17 在衣原体呼吸道感染早期出现,其表达情况与衣原体感染剂量和早期复制有关,并可能作为一个预警信号参与宿主的免疫反应。

IL-17 在感染的肺组织早期出现,意味着小鼠早期固有免疫应答机制在应对急性感染中的作用。这个结论与获得性免疫反应发生在抗原暴露 4 d 后概念一致。早期 IL-17 在呼吸道的产生也被诱导和作用于防御其他呼吸道病原菌,包括肺炎支原体[5]、肺炎克雷伯氏杆菌[6]和牛分枝杆菌[7]。这些病原菌都触发了 IL-17 的短暂产生,峰值出现与病原菌复制速度呈一定的相关性。肺炎支原体感染,IL-17 峰值出现在第 1 天,肺炎克雷伯杆菌和牛分枝杆菌感染,峰值则分别出现在第 2 天和第 3 天,这些结果均支持本研究 IL-17 的产生依赖于衣原体的早期复制和合成。除了 $CD4^+$ T 细胞参与获得性免疫反应,TCRγ/δ T 细胞、类 NK T 细胞、$NK1.1^{neg}$iNKT 细胞和中性粒细胞[8,9],都能参与固有性免疫反应,也能产生 IL-17。这些细胞可能是宿主在感染衣原体后 IL-17 早期产生的细胞基础。

参考文献:

[1] Morrison S G, Morrison R P. A predominant role for antibody in acquired immunity to chlamydial genital tract reinfection[J]. J Immunol, 2005, 175(11): 7536 - 7542.

[2] Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(29): 12099 - 12104.

[3] Yen D, Cheung J, Scheerens H, *et al*. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation *via* IL-17 and IL-6[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1310 - 1316.

[4] Li Z, Chen C, Chen D, *et al*. Characterization of fifty putative inclusion membrane proteins encoded in the Chlamydia trachomatis genome [J]. Infect Immun, 2008, 76(6): 2746 - 2757.

[5] Wu Q, Martin R J, Rino J G, *et al*. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory Mycoplasma pneumoniae infection[J]. Microbes Infect, 2007, 9(1): 78 - 86.

[6] Happel K I, Lockhart E A, Mason C M, *et al*. Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of Mycobacterium tuberculosis in the lungs[J]. Infect Immun, 2005, 73 (9): 5782 - 5788.

[7] Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections[J]. Microbiol Immunol, 2007, 51(12): 1139 - 1147.

[8] Nakamura R, Shibata K, Yamada H, *et al*. Tyk2-signaling plays an important role in host defense against *Escherichia coli* through IL-23-induced IL-17 production by gammadelta T cells[J]. J Immunol, 2008, 181(3): 2071 - 2075.

[9] Michel M L, Keller A C, Paget C, *et al*. Identification of an IL-17-producing $NK1.1^{neg}$ iNKT cell population involved in airway neutrophilia[J]. J Exp Med, 2007, 204(5): 995 - 1001.

(编辑　龙　亮)