心、肺、泌尿疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000922

沙眼衣原体质粒在新生鼠肺炎中作用的初步研究

鲜雨琦，高磊琼，张　燕，华子瑜，沈　犁

（重庆医科大学附属儿童医院新生儿科、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地，重庆　400014）

[摘　要]目的：以沙眼衣原体野生株（wild type，WT）及无质粒株（plasmid free，PF）感染新生鼠诱导肺炎，探究衣原体质粒对菌株致病力的影响。方法：将出生 24 h 内的 48 只 BALB/c 新生鼠随机分成 4 组，每组 12 只，WT 组感染有质粒的沙眼衣原体血清型 D 野生菌株，PF 组感染同型无质粒株，磷酸盐缓冲液（phosphate buffer，PBS）组予相同剂量 PBS 处理，正常组无处理。于 4、7、11 d 各处死 4 只取标本，逆转录 PCR 检测肺组织内 ompA 基因 mRNA 水平；肺组织苏木精_伊红（H&E）染色及病理评分；髓过氧化物酶（MPO）免疫组化染色分析肺中性粒细胞浸润情况；酶联免疫吸附试验（ELISA）检测肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor-α，TNF-α）及干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）。报告基因分泌型胚胎碱性磷酸酶（SEAP）实验体外检测 TLR2、NF-κB 激活。结果：感染后肺组织衣原体培养阴性，而 ompA 基因 mRNA 检测及 MPO 免疫组化染色阳性，证实 WT 及 PF 菌株皆可感染新生鼠肺，引起间质性改变伴中性粒细胞浸润，PF 组的肺组织病理评分（1.10±0.19）及 PMN 计数（21.06±10.92）均低于 WT 组分别为（1.44±0.17）和（43.90±17.17），P 值分别为 0.048 和 0.005；ELISA 示 WT 组新生鼠肺内 TNF-α（623.35±37.23）和 IFN-γ（2206.83±854.22）水平较对照组分别为（470.93±20.83）和（737.97±79.89）升高（P 值分别为 0.000 和 0.038），而 PF 组分别为（531.59±34.14）和（1099.86±427.39）与对照组比较，无统计学差异（P 值均>0.05）；SEAP 实验显示，PF 株可激活 TLR2 信号（F=483.199，P=0.000），但程度较 WT 组有下降（P=0.000），激活 NF-κB 的能力明显受限（F=229.884，P=1.000），与对照组无统计学差异。结论：沙眼衣原体质粒缺乏使其感染肺部的致病力减弱，可能与衣原体质粒潜在的致病因子影响 TLR2 及 NF-κB 的活化有关。

[关键词]沙眼衣原体；肺炎；隐匿质粒；新生鼠

[中图分类号]R725　　[文献标志码]A　　[收稿日期]2016-02-18

Effect of Cryptic plasmid on *Chlamydia trachomatis* infection in the neonatal mice model of pneumonia

Xian Yuqi, Gao Leiqiong, Zhang Yan, Hua Ziyu, Shen Li

(Department of Neonatology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; Key Laboratory of Pediatrics Committee of Science and Technology in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

[Abstract] ***Objective*** To study the virulence of *Chlamydia trachomatis* (Ct) plasmid in a neonatal mice model of pneumonia induced by Ct. ***Methods*** Forty-eight neonatal BALB/c mice were randomly divided into four groups (each n=9) within 24h after birth: wild type (WT) group (infected with Ct serovar D wild type), plasmid free type (PF) group (infected with Ct serovar D plasmid free type), phosphate buffer (PBS) group and normal group. Four mice in each group were sacrificed on 4, 7, 11 days. The lung tissue was collected for pathological analysis and counts of neutrophils infiltration. The expression of ompA gene, level of tumor necrosis factor-α and interferon-γ were determined by RT-PCR and ELISA assays respectively. Activation of TLR2 and NF-κB was tested by SEAP reporter assays. ***Results*** Ct collected from homogenates was negative whereas ompA mRNA was detected in infection groups. The mice infected with PF strain had obvious pathological changes with neutrophils infiltration (1.10±0.19) and (21.06±10.92), respectively, both decreased significantly than those of WT-infected mice (1.44±0.17) and (43.90±17.17), respectively (P=0.048, 0.005). The secretion of TNF-α and IFN-γ in the lung was obviously increased in WT-infected mice (623.35±37.23) and (2206.83±854.22), respectively, than in non-infection mice (470.93±20.83) and (737.97±79.89) (P=0.000, 0.038), respectively. There was no statistic difference in TNF-α and IFN-γ secretion between PF-infected mice (531.59±34.14) and (1099.86±427.39),

作者介绍：鲜雨琦，Email：xianyuqi357@163.com，研究方向：衣原体感染的研究。

通信作者：华子瑜，Email：h_ziyu@163.com。

基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81370777）；国家临床重点专科_新生儿学资助项目（编号：卫办医政函[2011]873 号）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160429.0955.002.html（2016-04-29）

respectively and non-infected mice in control group ($P>0.05$). In addition, PF strain can activate TLR2 ($F=483.199$, $P=0.000$), but its intensity was lower than WT strain *in vitro* ($P=0.000$). NF-κB activation was restricted in PF strain, and there was no significant difference between control group and PF group in this regard ($F=229.884$, $P=1.000$). ***Conclusion*** Plasmid-deficient Ct exhibits attenuated virulence in lung infection of neonatal mice, which may relate with down-regulated activation of NF-κB and TLR2 due to unknown factor of Chlamydia plasmid.

[Key words] *Chlamydia trachomatis*; pneumonia; cryptic plasmid; newborn mouse

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)是一种专性胞内寄生的革兰氏阴性菌,根据主要外膜蛋白分为15种血清型:血清型A-C感染眼结膜、血清型D-K感染生殖道以及血清型L1~L3引起系统性性病淋巴结炎[1]。作为全球最常见的性传播细菌感染,Ct感染的症状多不明显,难以被发现,以致感染持续存在,最终导致一系列并发症,如女性盆腔炎症,异位妊娠甚至不孕。产褥期和围生期的感染可导致婴儿结合膜炎和肺炎[2]。近年调查显示,我国孕期妇女生殖道Ct感染率从3.62%上升到46.2%[3],垂直传播率更是从34.8%上升到50%[4],严重危害围生期母婴健康。为控制Ct感染带来的沉重医疗负担,了解其致病机制并研制安全有效的疫苗很有必要。

几乎所有Ct菌株都拥有一个7.5 kb大小高度保守的质粒,其上有8个基因,编码8种蛋白。在生殖道和眼部感染的动物模型研究中发现,质粒缺失的Ct感染不能引起典型的病理表现,表明质粒编码蛋白与Ct致病性有密切关系,可能有助于疫苗的研制[5-6]。Ira等人[7]也用临床分离的Ct血清型E在鼠肺部感染模型中证实,无质粒菌株感染引起的宿主抗体水平更低,提示质粒缺失会降低菌株的致病力和毒力。但该研究着重于体液免疫层面,质粒缺失的Ct感染引起的肺部病变及炎症程度等具体情况尚未可知。因此,本文模拟垂直传播感染途径,采用临床常见的Ct血清型D野生型(wild type, WT)和无质粒株(plasmid free type, PF)制作新生鼠肺炎模型,观察质粒缺失对肺部炎症的影响,并初步探究其可能机制,为研究衣原体质粒的潜在致病因子以及相关疫苗的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物、菌株和细胞 健康清洁级BALB/c孕鼠(孕鼠重庆医科大学动物实验中心)。人Ct血清型D野生型(ATCC VR885,即CTD-WT,含天然质粒),无质粒株(CTD-PF)及质粒改造株(CTD-BSD,经分子克隆技术将绿色荧光蛋白[GFP]接入质粒)[8](由钟光明教授馈赠)。人肾脏上皮HEK-Blue-hTLR2稳定表达人TLR2和下游转录因子诱导的SEAP报告基因)和THP1-XBlue-CD14细胞(稳定表达核转录因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)/激活因子蛋白-1(activator protein-1, AP-1)诱导的SEAP报告基因)(InvitroGen)。

1.1.2 主要试剂 细胞培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清(美国HyClone),小鼠抗衣原体脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)一抗、Alexa 568-红荧光二抗、Optiprep分离液、QUANTI-Blue检测液(美国Sigma),Trizol(美国ambion),逆转录试剂盒(RR047A 日本TAKARA),免疫组化试剂盒(PV-9000 北京中杉金桥),抗髓过氧化物酶(ab9535 英国abcam),BCA蛋白定量试剂盒(P0010S 北京碧云天),TNF-α ELISA试剂盒(SEA133Mu、IFN-γ ELISA试剂盒(SEA049Mu 武汉优尔生)。

1.2 实验方法

1.2.1 Ct的繁殖、纯化和检测 培养人宫颈癌上皮(HeLa229单层细胞 本室保存),以感染复数(MOI)1感染3株Ct,孵育55 h后收集细胞,破碎后离心,上清经Optiprep密度梯度离心后,沉淀即为Ct原体,用于后续实验。再感染HeLa229细胞,以鼠抗衣原体LPS(1∶1 500)和Alexa 568-红荧光二抗(1∶500)行免疫荧光染色,激光共聚焦拍照观察。

1.2.2 实验分组及感染模型制作 分别将5×10^6包涵体形成单位(inclusion forming unit, IFU)CTD-BSD及5×10^3 IFU CTD-WT和CTD-PF重悬于5 μl PBS中备用。随机抽取新生鼠48只(性别不限)于生后24 h内分为4组,每组12只。CTD-WT组:CTD-WT菌株滴鼻感染;CTD-PF组:CTD-PF菌株滴鼻感染;PBS组:相同剂量PBS滴鼻;正常(Normal)组:无处理。每组再随机分为4、7、11 d 3个亚组。

1.2.3 肺组织Ct滴度测定 取第4天小鼠右肺,称体质量,以1 g/10 ml比例加入PBS,均匀碾磨成匀浆液,加入等体积蔗糖磷酸盐缓冲液,混匀后超声破碎细胞,离心取上清再感染HeLa 229细胞,孵育55 h后甲醇固定,倒置荧光显微镜观察。

1.2.4 RT-PCR检测ompA基因mRNA水平 取第4天小鼠左肺,称体质量,50~100 mg组织加1 ml Trizol,按Trizol法提取肺组织总RNA[9],按照逆转录试剂盒说明书操作。引物参照文献[10],由invitrogen(上海)公司合成。以2×Tag Mixture酶,1 μl cDNA模板,10 μl体系,按95 ℃ 2 min;95 ℃ 10 s,63 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35个循环;72 ℃ 5 min行PCR扩增DNA。产物行2%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.5 肺组织切片、H&E 染色及病理评分 分别在感染后 4、7、11 d 处死小鼠（每组 4 只）取左肺，4%多聚甲醛固定，石蜡包埋制成 4 μm 切片，苏木精染色 7 min，伊红染色 20 s，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，镜下观察并进行病理评分，评分标准见文献[11]。

1.2.6 免疫组化检测中性粒细胞（neutrophil，PMN）浸润 前述各组肺石蜡切片烘干后，二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化，枸橼酸液加热煮沸，自然冷却后 3%H_2O_2 室温孵育 30 min，10%胎牛血清室温封闭 30 min，抗髓过氧化物酶（myeloperoxidase，MPO）多克隆抗体 1:50 稀释浓度 4 ℃过夜孵育，余步骤参考免疫组化试剂盒说明书，DAB 显色，中性树胶封片，风干后显微镜拍照观察，随机选 6 个视野进行中性粒细胞计数。

1.2.7 炎症因子肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）水平检测 将肺组织匀浆离心后取上清稀释 5 倍，依 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量，依小鼠 TNF-α 和 IFN-γ ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.2.8 TLR2 和 NF-κB 激活实验 分别培养 HEK-Blue-hTLR2 和 THP1-XBlue-CD14 细胞，以感染复数 1 感染不同菌株，热致死的铜绿假单胞菌（*pseudomonas aeruginosa* 1，PAO1）做阳性对照，DMEM 作阴性对照，干预组予紫外光（ultraviolet，UV）灭活的 WT。培养 48 h 后离心收取上清。加入 QUANTI-Blue 检测液，37 ℃孵育 45 min 后以酶标仪测吸光度（absorbance，A）655 nm 值。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 6.0 统计软件进行统计学分析，实验数据用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组之间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 Bonferroni-t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 Ct 的分离及鉴定

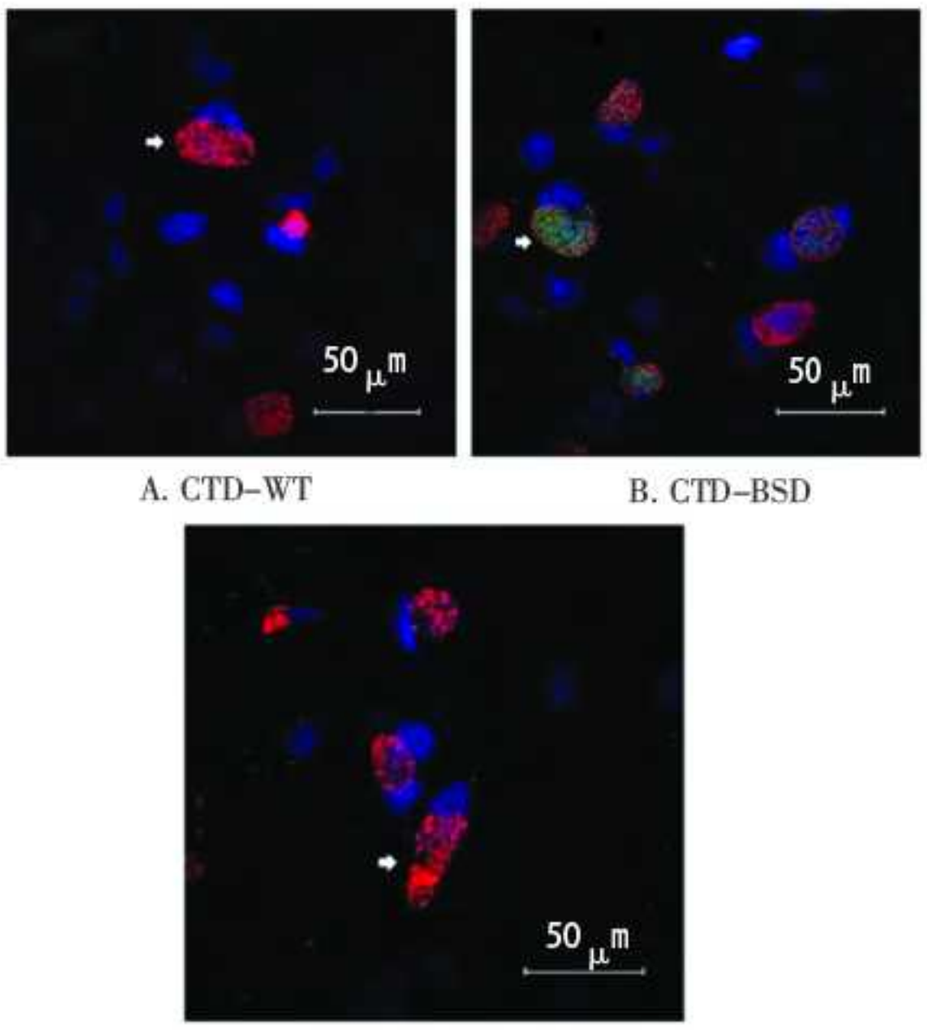
收集在 HeLa229 细胞内繁殖的 Ct，分离并纯化具感染性的 Ct 原体（elementary body，EB）。将 EB 稀释后再感染 HeLa229 细胞，免疫荧光观察提示细胞内均形成典型的 Ct 包涵体（图 1），证实纯化的 EB 具感染性，可用于后续动物实验。

2.2 感染模型方法学验证

为验证滴鼻操作能否引起有效的衣原体肺部感染，本研究采用质粒上引入绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）的改造菌株，以 10^6 IFU 高剂量感染，取肺组织匀浆进行 Ct 培养。图 2A 可见肺组织有衣原体存在，提示该方法切实有效。10^3 IFU 感染剂量下，未能从感染组新生鼠肺内回收到 Ct，但 Ct 特异性 ompA 基因 mRNA 检测阳性（图 2B），证实模型动物肺部存在衣原体活菌感染。

2.3 肺部病理变化

感染后第 4 天小鼠肺部出现不规则的肺泡间隔增厚、水肿和炎性细胞浸润等间质性炎症表现（图 3A、B）。病理评分示 CTD-WT 组（1.44±0.17）和 CTD-PF 组（1.10±0.19）都高于对照组（0.47±0.09）（F=40.958，P 值均为 0.000），CTD-PF 组低于 CTD-WT 组（P=0.048）。用 MPO 标记活化的 PMNs，可见血管及气道周围有较多 PMNs 浸润，肺间质内少量散在分布（图 3C、D）。CTD-WT 组 PMNs 计数（43.90±17.17）较 CTD-PF 组（21.06±10.92）和对照组（6.51±3.69）明显升高（F=19.709，P 值分别为 0.005 和 0.000）；CTD-PF 组 PMNs 计数与对照组无统计学差异（P=0.052）。



A. CTD-WT　B. CTD-BSD　C. CTD-PF

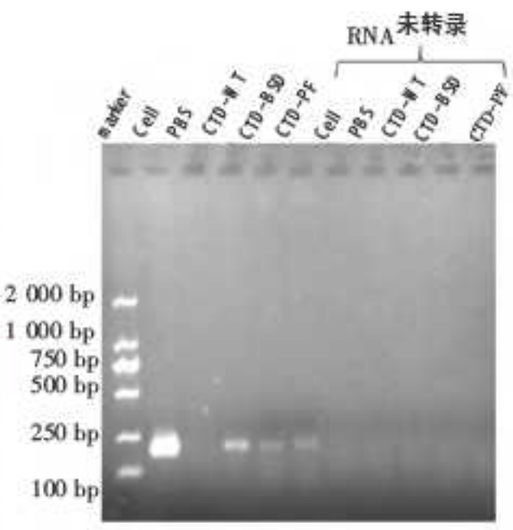
箭头指示衣原体包涵体

图 1 免疫荧光观察衣原体形态（600×）

Fig.1 Identification of *C.trachomatis* inclusion by immunofluorescence microscopy (600×)



A. 箭指头示肺匀浆内表达 GFP 的衣原体（200×）



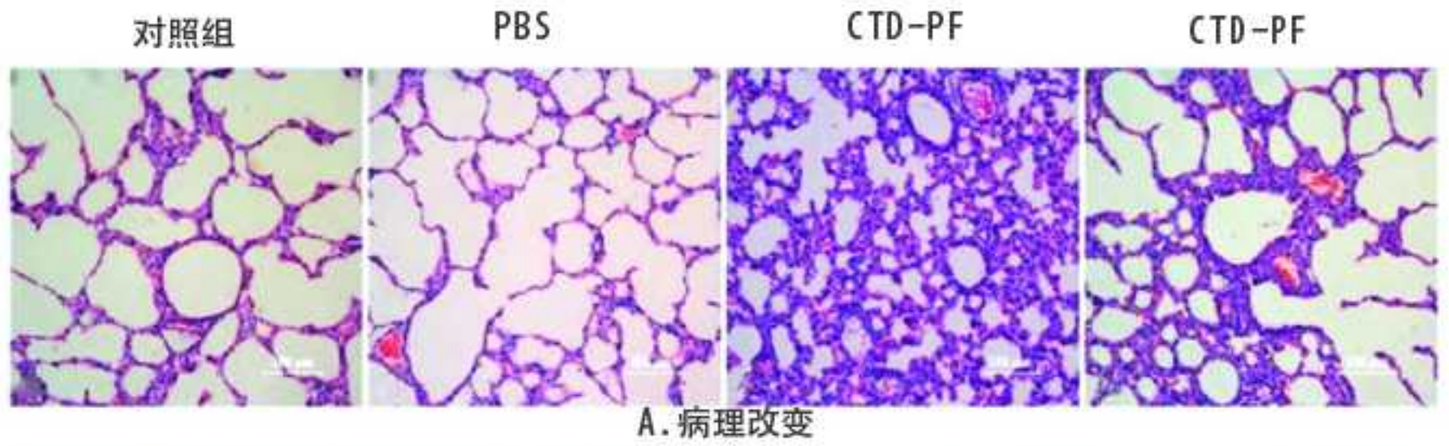
B. 阳性条带示 Ct 特异性 ompA 基因片段

图 2 Ct 培养及 RT-PCR 法检测肺部衣原体

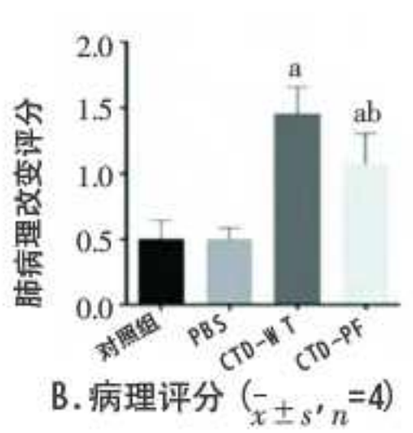
Fig.2 Chlamydial infection assessed by organism numbers and RT-PCR in the lung

2.4 肺组织匀浆细胞因子水平检测

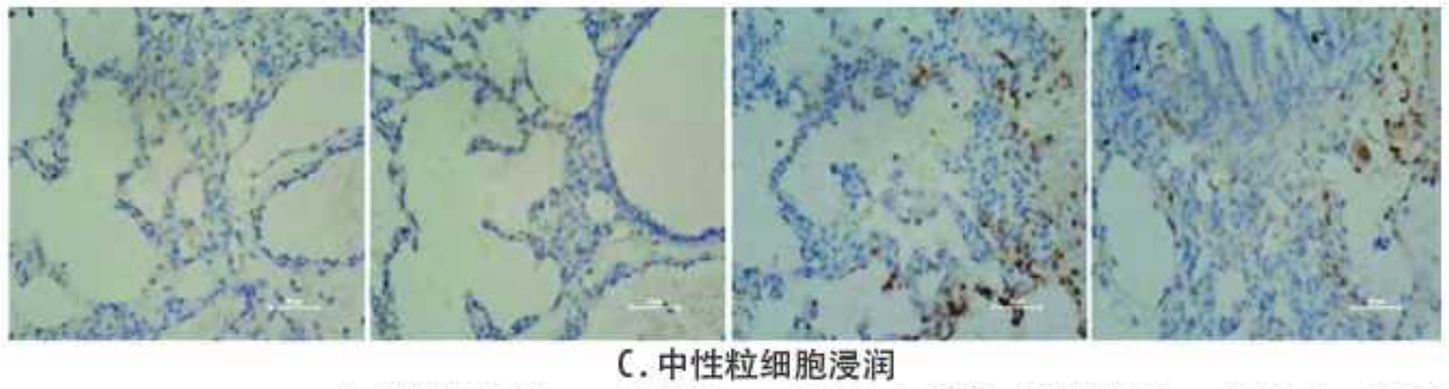
TNF-α 是一种能促炎症细胞聚集的前炎症因子，IFN-γ 则对胞内菌的杀灭有重要作用。肺部出现明显病理改变时，检测肺组织匀浆 TNF-α、IFN-γ 含量。结果显示，CTD-WT 组 TNF-α 水平高于对照组（F=17.389，P=0.000），CTD-PF 组则低于 CTD-WT 组（P=0.006），与对照组无统计学差异（P=0.089）。CTD-WT 组 IFN-γ 水平较对照组明显升高（F=6.136，P=0.038），而 CTD-PF 组与 CTD-WT 组（P=0.137）和对照组（P=1.000）皆无统计学差异。见图 4。



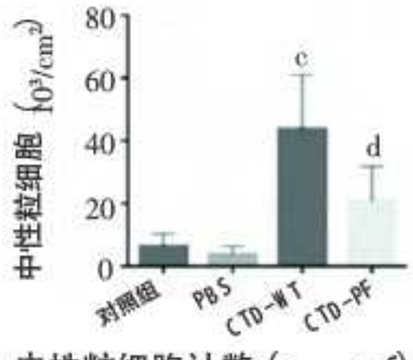
A.病理改变



B.病理评分（$\bar{x}\pm s$，n=4）



C.中性粒细胞浸润

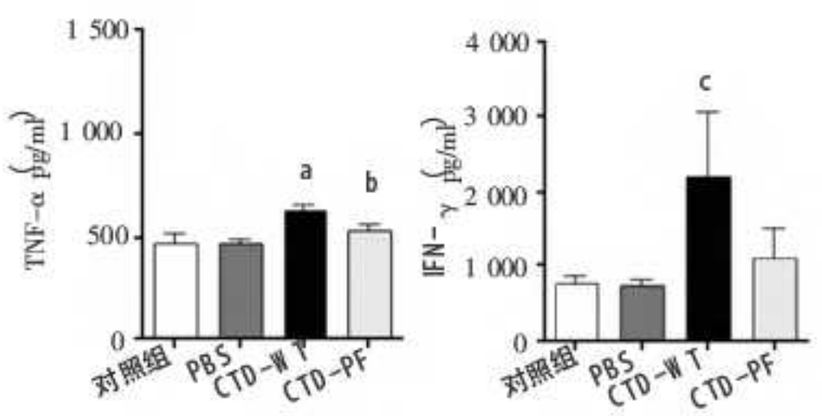


D.中性粒细胞计数（$\bar{x}\pm$，n=6）

与对照组比较：a，P<0.001；c：P<0.001；与 CTD-WT 比较：b，P<0.05；d：P<0.01

图 3 肺部病理改变（200×）和中性粒细胞浸润观察（400×）

Fig.3 Pathological changes（200×）and neutrophils infiltration（400×）observed in the lungs



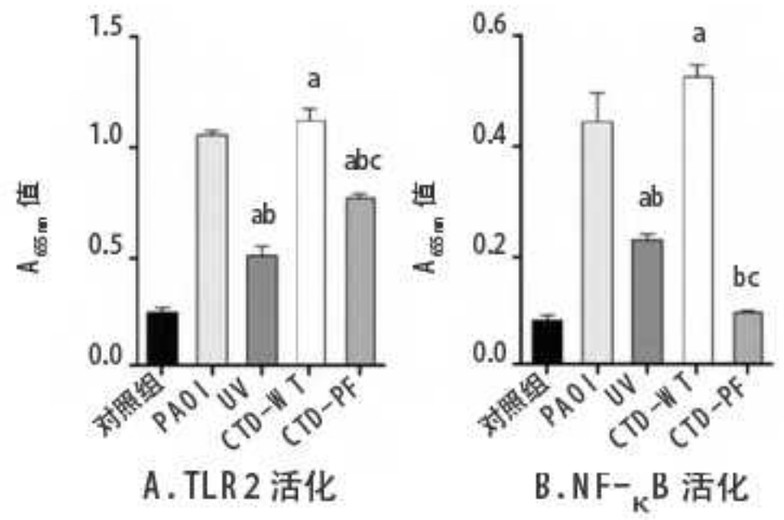
与对照组比较：a，P<0.001；c：P<0.05；与 CTD-WT 组比较：b，P<0.01

图 4 肺匀浆 TNF-α 和 IFN-γ 水平变化（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig.4 Level of TNF-α and IFN-γ in lung of infected mice（ELISA）（$\bar{x}\pm s$，n=4）

2.5 TLR2 及 NF-κB 活化能力检测

如图示，CTD-WT 能显著刺激 TLR2（F=483.199，P=0.000）和 NF-κB（F=229.884，P=0.000）活化，而 UV 灭活后，衣原体活化 TLR2 和 NF-κB 能力下降（p值均为 0.000）；CTD-PF 组激活 TLR2 的能力低于 CTD-WT 组，高于 UV 灭活组和对照组（p值均为 0.000），而激活 NF-κB 的能力较 CTD-WT 组和 UV 灭活组明显减弱（p值均为 0.000），与对照组比较，无统计学差异（P=1.00）。见图 5。



A.TLR2 活化　　B.NF-κB 活化

a.与阴性对照组比较，P<0.001；b.与 CTD-WT 组比较，P<0.001；c.与 UV 组比较，P<0.001

图 5 SEAP 报告基因法检测信号通路激活情况（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Fig.5 Activation of TLR2 and NF-κB by SEAP reporter assays（$\bar{x}\pm s$，n=4）

3 讨 论

Ct 菌株都有一个 DNA 序列 99% 同源的约一百万碱基对的基因组[1]，编码约 894 个预测读码框和功能暂不明确的 7.5 kb 质粒[12]。不同衣原体菌株之间，质粒核酸序列和基因结构高度保守。在衣原体感染的生殖道及眼部模型中，有无质粒菌株显示出不同的毒力和感染后果[5-7]。但目前在衣原体感染肺部模型中尚缺乏无质粒菌株感染后病理变化和炎症程度的报道。因此本文用 Ct 血清型 D 野生株（CTD-WT）和无质粒株（CTD-PF）分别感染新生鼠诱导肺炎，比较肺部炎症，并初步探讨可能机制，为衣原体致病机制研究提供实验基础。

为排除死菌或未知蛋白可能引起的非特异性肺炎，本实验采用密度梯度离心方法获得纯化 EB 感染新生鼠。考虑高浓度感染剂量可能补偿质粒缺乏的影响[7]，且前期实验每日观察感染鼠肺发现肺部病变于感染后第 4 天出现，故选取能引起病理改变的最低浓度（10^3 IFU）和该时间点进行后续实验。实验发现，CTD-PF 株感染引起的肺部病理改变和 IFN-γ 水平均明显低于 CTD-WT 组，说明质粒缺失型衣原体可引起新生鼠肺部感染，但病理改变严重程度和炎症水平均明显弱于野生型，提示质粒缺失会降低衣原体的致病力，与其他部位感染模型研究报道相似[5-7]。另外，各感染组 TNF-α 水平升高均不明显，可能与新生鼠 T 细胞分化不完善[13]，TNF-α 的主要来源 Th17 细胞数量不足有关[14]。

O'Connell 等人[15]在生殖道感染中发现，质粒缺失的衣原体失去诱导宿主 Toll 样受体-2（TLR2）介导的炎性反应的能力，认为质粒可能通过调节 TLR2 途径影响衣原体的致病力。因此，本研究检测野生株和质粒缺失株感染对 TLR2 的激活情况，结果显示，无质粒株感染时 TLR2 活化水平明显低于野生株，高于 UV 灭活的野生株，提示虽然死菌作为异物可能残留有毒力因子，刺激 TLR2 激活，但活菌释放毒力因子刺激 TLR2 激活的能力更强，质粒缺失可能影响毒力因子的合成，从而减弱宿主 TLR2 激活。He 等人[16]用鼠株衣原体野生型感染 TLR2 敲除鼠发现肺炎加重，认为 TLR2 的免疫调节作用具有组织特异性，在肺部主要是抗炎作用。本实验中无质粒株感染引起的肺部炎症未加重反而减弱，说明 TLR2 途径在肺部炎症反应中可能并未占主导地位，不排除还有其他途径影响。

在抗感染的先天免疫中，宿主细胞 TLRs 及其他模式识别受体通过识别微生物保守的病原相关分子模式，经胞内适配体蛋白协作，TLR 信号活化，激活 NF-κB 等转录因子，促进编码促炎细胞因子、趋化因子等基因的转录及下游级联反应的发生[17]。NF-κB 位于 TLRs 下游，对炎症的激发有至关重要的作用。本实验进一步了检测野生株和质粒缺失株感染对 NF-κB 的激活情况。结果显示，野生型能显著激活 NF-κB，但无质粒株激活 NF-κB 的能力明显受限，与阴性对照组无差异，提示衣原体质粒缺乏可能通过影响宿主 NF-κB 的活化抑制炎症反应。虽然无质粒株不能有效激活 NF-κB，感染小鼠体内仍有肺炎表现，表明 NF-κB 活化不是炎性反应的唯一必经途径，可能还有其他途径引发下游炎症反应，具体机制尚不清楚。

综上所述，无质粒的衣原体感染新生鼠肺部时致病力减弱，可能与质粒缺失影响宿主 TLR2 和 NF-κB 的活化有关，具体致病因子及炎症反应激活途径还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Abdelsamed H, Peters J, Byrne GI. Genetic variation in Chlamydia trachomatis and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism[J]. Future Microbiol, 2013, 8(9): 1129-1146.

[2] 沈 犁，吴仕孝，刘官信. 母婴沙眼衣原体的垂直传播[J]. 中华儿科杂志，1994，32(5)：306.

[3] Zhang C, Zhu D, Guo X. A study on the route of intrauterine infection of Chlamydia trachomatis[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2002, 37(3): 149-151.

[4] Ngandjio A, Clerc M, Fonkoua MC, et al. Restriction endonuclease patterns of the omp1 gene of reference Chlamydia trachomatis strains and characterization of isolates from Cameroonian students[J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 1): 47-50.

[5] Carlson JH, Whitmire WM, Crane DD, et al. The Chlamydia trachomatis plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor[J]. Infect Immun, 2008, 76(6): 2273-2283.

[6] Olivares ZN, Whitmire W, Gardner D, et al. Immunization with the attenuated plasmidless Chlamydia trachomatis L2 25667R strain provides partial protection in a murine model of female genitourinary tract infection[J]. Vaccine, 2011, 28(6): 1454-1462.

[7] Ira MS, Justin HS, Yibing Wang, et al. Plasmid deficiency in urogenital isolates of Chlamydia trachomatis reduces infectivity and virulence in a mouse model[J]. Pathogens and Disease, 2014, 70(1): 61-69.

[8] Ding H, Gong S, Tian Y, et al. Transformation of sexually transmitted infection-causing serovars of Chlamydia trachomatis using Blasticidin for selection[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80534.

[9] Gao X, Zhao L, Wang S, et al. Enhanced inducible costimulator ligand ICOS-L expressionon dendritic cells in interleukin-10 deficiency and its impact on T-cell subsets in respiratory tract infection[J]. Mol Med, 2013, 19: 346-356.

[10] Rödel J, Grosse C, Yu H, et al. Persistent Chlamydia trachomatis infection of Hela cells mediates apoptosis resistance through a Chlamydia protease-like activity factor-independent mechanism and induces high mobility group box 1 release[J]. Infect Immun, 2012, 80(1): 195-205.

[11] Cundall M, Sun Y, Miranda C, et al. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 112(6): 1064-1071.

[12] Clarke IN. Evolution of Chlamydia trachomatis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1230: E11-E18.

[13] Philip MH, Malcolm RS, Joerg M, et al. Pulmonary immunity during respiratory infections in early life and the development of severe asthma[J]. Ann Am Thorac Soc, 2014, 11(suppl 5): s297-s302.

[14] Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, et al. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?[J]. Immunology, 2008, 123(3): 326-338.

[15] O'Connell CM, AbdelRahman YM, Green E, et al. Toll-like receptor 2 activation by Chlamydia trachomatis is plasmid dependent, and plasmid-responsive chromosomal loci are coordinately regulated in response to glucose limitation by C. trachomatis but not by C. muridarum [J]. Infect Immun, 2011, 79(3): 1044-1056.

[16] He X, Nair A, Mekasha S, et al. Enhanced virulence of Chlamydia muridarum respiratory infections in the absence of TLR2 activation [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20846.

[17] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity[J]. Immunity, 2011, 34(5): 637-650.

责任编辑：张辉洁）