

沙眼衣原体致小鼠输卵管炎的病理研究

韩建德, 陈木开, 李 斌, 廖绮曼, 林 伟
(中山大学附属第一医院皮肤性病科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】研究沙眼衣原体阴道内感染引起小鼠输卵管炎症的机理、病理改变。【方法】通过雌性小鼠阴道内接种小鼠肺炎(MoPn)沙眼衣原体, 感染后不同时间观察小鼠输卵管病变情况, 并通过光镜、免疫组化和电镜研究其病理改变。【结果】感染早期小鼠输卵管出现急性炎症改变, 病理表现为黏膜层水肿、脱落和坏死; 电镜下, 在黏膜上皮细胞中找到沙眼衣原体。感染后期小鼠输卵管出现输卵管阻塞和积水, 病理表现为黏膜皱襞减少, 黏膜层纤毛柱状上皮细胞成矮柱状, 顶部纤毛消失, 输卵管壁增厚、纤维组织增生和淋巴细胞浸润, 免疫组化显示以 CD4⁺ T 细胞浸润为主。【结论】阴道内沙眼衣原体感染可逆行感染引起输卵管炎症、粘连、阻塞和积水; 其病理基础早期为黏膜层急性炎症改变和后期为输卵管壁增厚、纤维组织增生; 局部以 Th1 细胞介导为主的细胞免疫, 导致了慢性输卵管炎的病理改变。

关键词: 沙眼衣原体; 动物模型; 输卵管炎

中图分类号: R759

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0520-03

Pathologic Changes of Experimental Chlamydia trachomatis Salpingitis in Mice

HAN Jian-de, CHEN Mu-kai, LI Bin, LIAO Qi-man, LIN Wei

(Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the pathogenesis of salpingitis in mice by intravaginal inoculation of Chlamydia trachomatis, and observe the histopathologic changes of oviduct after infection. 【Methods】 Female mice were infected by the Chlamydia trachomatis agent of mouse pneumonitis (MoPn) by intravaginal inoculation. The anatomical changes of oviduct were observed, then the histopathological changes of oviduct were examined by light microscopy, immunohistochemical staining, and electronic microscopy in different phases after infection. 【Result】 An acute inflammation was observed in the early stage of postinoculation. The oviduct mucosa was manifested by edema, erosion, and necrosis. Under electronic microscope, agents of MoPn were easily found in the columnar epithelium of the mucosa. After that, a chronic inflammation occurred and the oviduct showed occluded and hydrosalpinx. Pathologic findings were characterized by decreased mucosa plica, short columnar epithelial cell, disappeared cell cilium, thick wall, fibrosis, and infiltrated lymphocyte. Immunohistochemical staining showed mainly a great number of CD4⁺ T cells. 【Conclusion】 Intravaginal inoculation with Chlamydia trachomatis MoPn can induce salpingitis, result in conglutination occlusion and hydrosalpinx, and these changes are based on the acute mucosa inflammation and the chronic pathological change of thicken and fibrosis of oviduct. This study shows the importance of Th₁ cell-mediated immunity in the chronic oviduct inflammation.

Key word: Chlamydia trachomatis; animal model; salpingitis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(5):520-522, 532]

作为性传播疾病最常见的病因之一, 沙眼衣原体性传播感染在世界范围导致很高的发病率和造成很大的社会经济负担^[1]。在女性, 沙眼衣原体生殖道感染可致盆腔炎 (pelvic inflammatory disease, PID)、不孕和异位妊娠等并发症^[2]; 在性传播疾病

较为流行的今天, 沙眼衣原体引起 PID 的致病机理和病理研究对于女性不孕症的治疗和防止异位妊娠具有重要意义。本研究主要通过小鼠阴道内接种小鼠肺炎 (mouse pneumonitis, MoPn) 沙眼衣原体, 建立沙眼衣原体生殖道感染模型, 初步探讨小

收稿日期: 2005-02-12

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B34201011)

作者简介: 韩建德(1964-), 男, 广东广州人, 副教授, 硕士生导师. E-mail: hanjd-gzb@21cn.net

鼠衣原体生殖道感染引起输卵管炎机理和病理改变。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和试剂

1.1.1 实验对象 6~8周雌性 C3H/HeN 小鼠实验组 40只与对照组 10只, 体质量 18~24 g, 分笼颗粒饲料饲养, 每只动物作标记, 在中山大学动物实验中心清洁级动物房饲养。

1.1.2 细胞株 MoPn 株 (VR123) 和 McCoy 细胞购买于美国 Bivd 大学 ATCC。本实验室保存传代。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和动物模型 沙眼衣原体 MoPn 株体外培养、制备感染液的方法参照文献[3]。建立动物模型: 实验组 40只小鼠, 15 g/L 的戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 分别用 2×10^6 IFU 的 MoPn 感染液阴道内接种感染, 方法参照文献[3]; 另 1组 10只用无感染衣原体的 McCoy 细胞制备的“感染液”(SPG) 接种, 作为对照组。

1.2.2 大体观察及组织病理活检 分别于感染第 7、14、21、28、35、42、49 和 56 天在感染组小鼠中随机抽取 5 只小鼠, 对照组 1 只处死, 观察、记录输卵管的大体病变。取小鼠输卵管组织固定于 40 g/L 中性甲醛溶液内, 常规石蜡包埋, 5 μ m 切片。常规 HE 染色和 Masson 染色; 同时切厚 4 μ m 石蜡切片, 分别用兔抗-CD4⁺、兔抗-CD8⁺、及兔抗-CD45R 免疫组化染色, 染色步骤按 LSAB 法进行。

1.2.3 电镜观察 在上述取输卵管组织作病理切片的同时, 切取一小块约 1 mm³ 新鲜组织, 用 25 g/L 戊二醛固定液固定 1 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液冲洗 10 min 3 次, 再用 10 g/L OsO₄ 固定 1 h, 系列乙醇脱水、包埋, 超薄切片, 10 g/L 醋酸铀染色液和柠檬酸铅染色液染色, 置 JEM-100CX/ 型电镜下观察。

2 结 果

2.1 大体变化

对照组: 输卵管解剖结构正常, 未见明显充血、渗出。实验组: 感染早期(3周内) 输卵管壶腹部、峡部肿胀, 管壁血管扩张充血, 管腔内充满透明液体; 感染后期(3周后) 输卵管周围结缔组织粘连, 输卵管扭曲变形和积水, 随时间推移, 病变发生率越高。

2.2 光镜下变化

正常的输卵管壁由黏膜、肌层、外膜三层构成。黏膜由单层纤毛柱状上皮和固有层组成, 上皮内主要有纤毛细胞和分泌细胞。实验组输卵管漏斗部、壶腹部、峡部病理改变类似。输卵管三层机构中, 以黏膜层病变最为显著, 早期(< 3周) 的病理改变主要为黏膜柱状上皮细胞水肿, 黏膜层纤维母细胞增生, 嗜中性粒细胞浸润; 继而部分柱状上皮细胞坏死, 部分纤毛消失, 见裸露细胞核。后期(3~7周) 黏膜柱状上皮细胞成矮柱状, 顶部纤毛显著变短或消失, 分泌细胞减少; 最后管壁见纤维细胞及纤维母细胞增生, 致管壁增厚硬化, 黏膜皱壁变平、减少, 严重者管腔狭窄甚至闭塞, 部分管腔扩大; 浆膜层毛细血管扩张, 大量淋巴细胞浸润。Masson 染色也显示输卵管管壁明显纤维细胞增生粘连(图 1)。

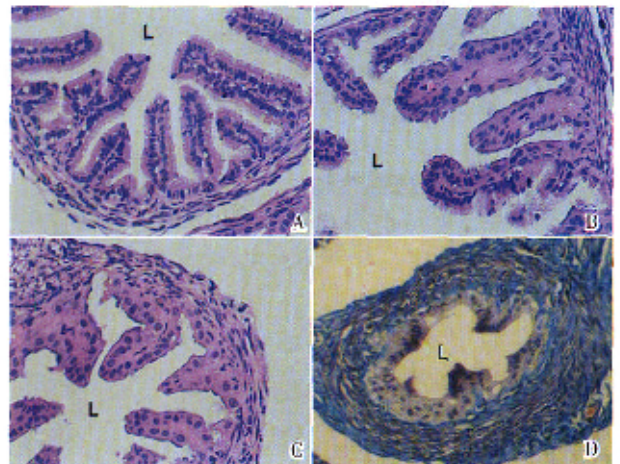


图 1 输卵管显微镜下的图像

Fig.1 Histopathology of oviduct by light microscope

A: negative control, normal construct of oviduct; B: shows the initial inflammation response; C: shows the chronic inflammation change; D: oviduct tissues stained with Masson, show the fibrosis; L: lumen, $\times 200$

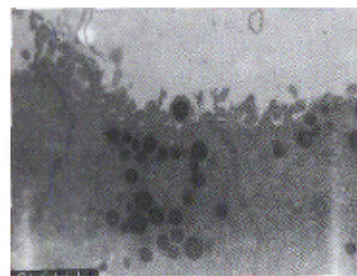


图 2 鼠在感染后 2 周时输卵管黏膜电镜扫描图像

Fig.2 Electronic microscope finding of the oviduct mucosa from chlamydiae-infected mice at 2 weeks postinfection($\times 19000$)

Chlamydia trachomatis including EB and RB are found in the columnar epithelium of the mucosa, the cilia are broken

2.3 电镜检查

感染组小鼠在感染后早期输卵管黏膜层柱状上皮细胞, 上皮细胞纤毛改变, 细胞核变性, 细胞中可见衣原体包涵体, 其中有大量衣原体原体 (EB) 和始体 (RB) (图 2); 在感染后期输卵管表现为慢性炎症, 此时电镜下上皮细胞多无病原体存

在。

2.4 输卵管组织免疫组化结果

小鼠感染沙眼衣原体 4 周以后输卵管子宫段组织, 此时淋巴细胞浸润有 CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞; 但以浸润 CD4⁺ T 细胞为主 (图 3)。

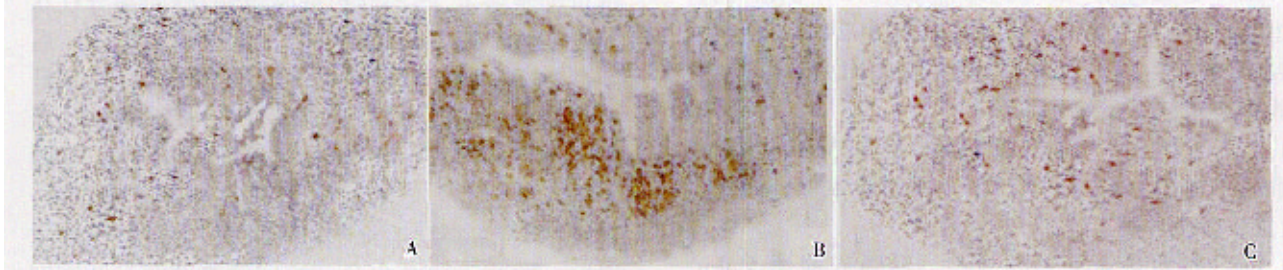


图 3 鼠感染沙眼衣原体 4 周输卵管组织免疫组化

Fig.3 Immunohistochemical staining of oviduct tissue from chlamydiae-infected mice at 4 weeks post-infection (×100)
A: Anti-CD45R (B cells); B: Anti-CD4 (CD4-T cells); C: Anti-CD8 (CD8-T cells)

3 讨论

沙眼衣原体是性传播性疾病最常见的病因之一。沙眼衣原体可引起女性子宫内膜炎、输卵管炎和盆腔炎, 并导致一些严重的并发症, 如不孕和异位妊娠。MoPn 阴道内感染后, 引起小鼠出现类似人类的生殖道沙眼衣原体感染的表现, 可用于沙眼衣原体致输卵管炎的发病机理研究^[3,4]。沙眼衣原体生殖道感染小鼠模型建立有利于进一步对其不孕机理、治疗和疫苗研究。

实验表明, 通过阴道内接种沙眼衣原体 MoPn 株, 可以建立稳定的沙眼衣原体生殖道感染小鼠模型, 阴道内感染 MoPn 后, 可逆行感染上生殖道, 导致小鼠输卵管急性和慢性炎症改变。感染 3 周内, 观察到输卵管发生急性炎症, 表现为输卵管水肿和管周组织充血; 感染 3~7 周, 输卵管表现为慢性炎症, 输卵管出现扭曲、阻塞、积水等类似 PID 表现, 此为沙眼衣原体导致不孕和异位妊娠的病理基础。

输卵管组织病理变化有以下特点: 黏膜层病变明显; 感染早期即有明显的纤维母细胞增生, 导致以后的组织纤维化, 这是输卵管皱壁粘连、扭曲、闭塞和积水的病理基础; 黏膜柱状上皮细胞变性、坏死, 以及黏膜皱壁硬化、变平、减少, 都会造成相应功能减退或丧失。急、慢性炎症细胞浸润及纤维增生, 可导致输卵管粘连以及盆腔炎症。这些病理改变使我们进一步理解生殖道沙眼衣原体感染的发病机理, 正是这些重要病

理基础导致临床 PID、不孕和异位妊娠等并发症的出现, 国外一些学者研究动物感染后输卵管炎发病机理, 结果与我们的研究相类似^[5]。

电镜结果发现沙眼衣原体病原体主要存在于黏膜层纤毛柱状上皮细胞内, 在沙眼衣原体原体进入黏膜层上皮细胞后, 以始体大量繁殖, 并致黏膜层上皮细胞纤毛消失, 部分细胞细胞核固缩、碎裂; 电镜下还观察到黏膜上皮细胞破裂后沙眼衣原体重新释放到输卵管腔, 这些结果进一步证实沙眼衣原体可以经生殖道逆行感染输卵管, 引起输卵管炎。

实验中发现, 在沙眼衣原体病原体感染早期, 局部以嗜中性粒细胞浸润为主, 此时电镜下黏膜层上皮细胞多可发现沙眼衣原体原体存在; 在感染后期输卵管表现为慢性炎症, 此时电镜下上皮细胞多无病原体存在, 局部大量淋巴细胞浸润, 且免疫组化结果显示以 CD4⁺ T 细胞为主。这些结果表明沙眼衣原体感染生殖道上皮细胞后, 可诱导局部以 Th1 细胞介导为主的保护性细胞免疫反应^[6,7], 在清除病原体的同时, 在一些淋巴细胞因子和炎症介质的作用下导致了以炎症细胞浸润及纤维增生为主的慢性输卵管炎的病理改变^[8]。

参考文献:

- [1] Honey E, Augood C, Templeton A. et al. Cost effectiveness of screening for Chlamydia trachomatis: a review of published studies[J]. Sex Transm Infect, 2002, 78(6): 406-12.
- [2] Veghes S, Lupascu I, Solomitchi V, et al. Chlamydial

(下转第 532 页 to page 532)

推测其为 Nuclei。这些结果提示 Xaf1 作为核蛋白,可能介导某些未知蛋白进入细胞核而调节其功能;或者 Xaf1 可能是亚核结构内具有转录调节活性的核蛋白,参与调节某些蛋白质的合成,例如调节亲凋亡蛋白及抗凋亡蛋白的合成,最终诱发细胞凋亡。因此,用基因芯片技术和亚核结构免疫荧光染色进一步的研究,将为探索 Xaf1 调节细胞凋亡的机制提供线索。

参考文献:

[1] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 269-90.

[2] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis [J]. *Genes Dev*, 1999, 13 (3): 239-52.

[3] Liston P, Fong WG, Kelly NL, et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(2): 128-33.

[4] Fong WG, Liston P, Raican-Separovic E, et al. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines [J]. *Genomics*, 2000, 70(1): 113-22.

[5] Reeves PJ, Kim JM, Khorana HG, et al. Structure and function in rhodopsin: a tetracycline-inducible

system in stable mammalian cell lines for high-level expression of opsin mutants [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(21): 13413-8.

[6] Ludwig A, Schlierf B, Schardt A, et al. Sox10-rtTA mouse line for tetracycline-inducible expression of transgenes in neural crest cells and digodendrocytes [J]. *Genesis*, 2004, 40(3): 171-5.

[7] Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, et al. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(1): 439-44.

[8] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition [J]. *Cell*, 2000, 102(1): 33-42.

[9] Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(1): 432-8.

[10] Ng KC, Campos EI, Martinka M, et al. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(6): 1127-34.

(编辑 张恩健)



(上接第 522 页 from page 522)

infections and tubal infertility [J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2004, 108(3): 617-23.

[3] 陈木开, 韩建德, 陈小红, 等. MoPn 沙眼衣原体致小鼠生殖道感染模型的初步研究[J]. *中国人畜共患病杂志*, 2004, 20(8): 687-9.

[4] Morre SA, Lyons JM, Ito JI Jr, et al. Murine models of Chlamydia trachomatis genital tract infection: use of mouse pneumonitis strain versus human strains[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(12):7209-11.

[5] Ramsey KH, DeWolfe JL, Salyer RD. Disease outcome subsequent to primary and secondary urogenital infection with murine or human biovars of Chlamydia trachomatis[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(12):7186-9.

[6] Tammy K, Cain and Roger G. Local Th1-Like respons-

es are induced by intravaginal infection of mice with the mouse pneumonitis biovar of Chlamydia trachomatis [J]. *Infect Immun*, 1995, 63(5): 1784-9.

[7] Lichtenwalner AB, Patton DL, Van Voorhis WC, et al. Heat shock protein 60 is the major antigen which stimulates delayed-type hypersensitivity reaction in the macaque model of Chlamydia trachomatis salpingitis[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(2):1159-61.

[8] Debatista J, Timms P, Allan J, et al. Immunopathogenesis of Chlamydia trachomatis infections in women [J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(6): 1273-87.

(编辑 刘清海)