

小鼠沙眼衣原体肺感染过程中 Treg 细胞与 Th17 反应关系

周晓静^{1#}, 陈丽香^{2#}, 周望展¹, 黄君¹, 刘丹慧¹, 周文江², 胡芸文², 吕建新^{1*}, 周晓辉^{2*}

¹温州医学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035

²上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心, 上海 201500

摘要: 【目的】对沙眼衣原体在 BALB/c 小鼠肺部感染过程中 CD4 + CD25 + Foxp3 + 调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 与 Th17 反应关系进行初步探讨。【方法】取 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠, 鼻腔吸入 25 μ L 含 5×10^3 IFU 的沙眼衣原体鼠肺炎菌株 (*Chlamydia muridarum*, Cm), 建立沙眼衣原体小鼠肺感染模型。监测感染后不同时期小鼠体重变化; 检测肺组织衣原体包涵体形成单位 (IFU) 及肺组织病理改变; 利用流式细胞术检测 Cm 感染后小鼠体内 Treg 细胞百分率; ELISA 检测肺组织上清液 IL-6、TGF- β 、IL-17、IL-2 细胞因子的表达; qRT-PCR 检测 KC (keratinocyte derived chemokine) mRNA 和 MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) mRNA 的表达差异。【结果】用 5×10^3 IFU Cm 经鼻腔吸入感染后小鼠发生沙眼衣原体肺炎, 表现为体重下降、肺组织大量炎症细胞浸润并可检测到衣原体繁殖。Cm 感染后第 3 天, 小鼠体内 Treg 细胞占 CD4 + T 细胞的百分比明显降, 随后开始恢复, 第 7 天恢复原来水平, 一直持续到衣原体清除。TGF- β 、IL-2 的表达与 Treg 细胞动态变化一致。与 Th17 相关细胞因子 IL-6、IL-17 和 Th17 相关趋化因子 KC、MIP-2 的表达于第 3 天开始升高, 至第 7 天达到最高水平, 随后逐渐减少。【结论】在衣原体感染 BALB/c 小鼠过程中, Treg 可能通过提供 TGF- β 并在 IL-6 帮助下促进 Th17 应答产生。

关键词: 沙眼衣原体鼠肺炎菌株, CD4 + CD25 + Foxp3 + 调节性 T 细胞, Th17

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 01-0074-08

沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, C. trachomatis) 感染是目前全球关注的严重公共卫生问题之一^[1-2], 可经呼吸道飞沫、母婴接触和性接触等方式传播, 感染后可导致眼部疾病如结膜炎、致盲性沙眼等; 生殖道疾病如非淋菌性尿道炎、子宫颈炎、盆腔炎、宫外孕、输卵管因素不孕等; 呼吸道疾病如间质性肺炎、婴儿衣原体性肺炎等; 而且还可能和动脉粥样硬化、多发性硬化、成人发作性哮喘等有

关^[1-3]。然而, 目前仍无针对衣原体有效的预防性疫苗, 而抗生素治疗也存在耐药性、无法根除、慢性和反复感染等问题。

沙眼衣原体感染致病与其诱导的炎症反应/免疫应答有密切的关系。我们的前期研究工作提示 Th17/IL-17 与衣原体感染后期的病理损伤有关, 是调节宿主对衣原体易感性的重要因素, Th17/IL-17 通过介导以中性粒细胞浸润为主的炎症反应发挥作

基金项目: 国家自然科学基金 (31270217); 上海市自然科学基金 (12ZR1426400); 浙江省自然科学基金 (Y2081073)

* 通信作者。周晓辉, E-mail: zhouxiaohui@shaphc.org; 吕建新, Email: jxlu313@163.com

作者简介: #对本文有同等贡献。周晓静 (1987-), 女, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 主要从事 IL-17/Th17 与 nTreg 在沙眼衣原体肺部感染中作用的解析的研究, E-mail: zhouxiaojing870806@163.com; 陈丽香 (1988-), 女, 江苏盐城人, 本科生, 主要从事衣原体与细胞坏死的研究, E-mail: chenlixiang@shaphc.org

收稿日期: 2012-09-04; **修回日期:** 2012-10-19

用^[4]。作为严格胞内寄生菌, Th1 型反应被认为是衣原体感染主要的保护免疫^[5-8]。

调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg cell) 在抑制自身免疫性疾病、过度的炎症反应中发挥最重要的作用。多数研究表明 Treg 细胞对 Th1 型应答有抑制作用^[9-10], 而 Treg 细胞与 Th17 型应答的关系则比较复杂。已知二者在分化上有密切的关系^[11], Treg 与 Th17 细胞的分化均需要 TGF- β , 但 IL-6 决定进一步分化的方向和两者的比例^[11-13]。理论上认为, 二者在分化上的动态平衡对机体免疫防御、免疫自稳有着重要的影响, 但在衣原体感染的机体内二者是否存在一定的关系尚不清楚。

本研究通过建立小鼠沙眼衣原体肺感染模型, 观察了感染疾病发生过程中 Treg 细胞数量变化情况以及 Th17 反应变化情况, 并对二者变化趋势及可能关系进行了初步的分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: BALB/c 小鼠, SPF 级, 购自上海实验动物资源中心, 雌性, 6-8 周龄。

1.1.2 主要试剂和仪器: FITC 标记抗小鼠 CD4、PE 标记抗小鼠 CD25 单克隆抗体购于 eBioscience 公司, Alexa Fluor 647 标记的抗小鼠 FoxP3 单克隆抗体购于 BioLegend 公司; ELISA 试剂盒购于 eBioscience 公司; Trizol 购于 invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购于 Fermentas 公司; 动物组织基因组 DNA 小量提取试剂盒购于上海莱枫公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购于 Promega 公司; 流式细胞仪为 BD 公司产品; RPMI 1640 及胎牛血清购于 GIBCO 公司; 引物设计与合成: 根据 GenBank 中小鼠基因序列, 由 invitrogen 公司合成。

1.2 小鼠沙眼衣原体肺炎感染模型的建立

6-8 周龄雌性 BALB/c (H-2^d) 小鼠在麻醉状态下鼻腔内吸入 25 μ L 含 5×10^3 IFU 的沙眼衣原体小鼠肺炎株 (*Chlamydia muridarum*, Cm), 感染后每天监测体重。

1.3 荧光定量 PCR 检测肺组织中的衣原体载量

无菌收集小鼠肺组织左叶, 在 3 mL 蔗糖一磷酸-谷氨酸缓冲液 (SPG) 中研磨成组织匀浆。4 $^{\circ}$ C, 3000 r/min 离心 30 min 收集上清液, 取 100 μ L 上清

液提取 DNA 作为模板, 使用高亲和力双链 DNA 结合染料 SYBR Green 在 Mastercycler ep realplex 检测系统进行实时 PCR, 通过监测鼠衣原体特异性的 16S rRNA 的表达水平来反映肺组织中的衣原体载量 (\log_{10})。16S rRNA、GAPDH (标准品)、 β -actin 引物 (内参) 序列 (表 1)。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测肺组织 KC、MIP-2 mRNA 表达水平

使用 Trizol 试剂严格按说明书提取肺组织细胞总 RNA, 测定浓度后各取 1 μ g, 利用高保真逆转录试剂盒 (Fermentas) 逆转录成 20 μ L 的 cDNA, 然后取 2 μ L 的 cDNA 稀释 10 倍, 使用高亲和力双链 DNA 结合染料 SYBR Green 在 Mastercycler ep realplex 检测系统进行实时 PCR。mRNA 表达水平用目的基因/ β -actin 的比值来表示。KC、MIP-2 引物序列 (表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 sequence of primers

Gene	Sequences (5' \rightarrow 3')	Length/bp
16s RNA	F: CGCCTGAGGAGTACACTCGC R: CCAACACCTCACGGCAGGAG	168
KC	F: GCACCCAAACCGAAGTCATAGC R: TTGTGAGAAGCCAGCGTTCACC	176
MIP-2	F: CTCTCAAGGGCGGTCAAAAAGTT R: TCAGACAGCGAGGCACATCAGGTA	208
GAPDH	F: GGTATCGTGGAAGGACTCATGAC R: ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	188
β -actin	F: GACGGCCAGGTCATCACTATTG R: AGGAAGGCTGGAAAAGAGCC	67

Note: The annealing temperature of all the primer pairs in table 1 was 60 degree centigrade.

1.5 脾细胞和纵膈淋巴结细胞的分离

颈椎脱臼处死小鼠, 75% 乙醇浸泡 10 min, 剖左腹取出脾脏, 进一步分离出纵膈淋巴结, 分别放入 3 mL D-Hanks 液, 研磨, 过 200 目滤网, 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入红细胞裂解液 3 min, 500 r/min 离心 5 min, 然后用 D-Hanks 液洗 2 次, 最后用 RIH buffer (RPMI1640 培养液 + 热灭活的 10% 胎牛血清 + 1 mol/L HEPES 液) 重悬细胞。

1.6 流式细胞术检测 CD4 + CD25 + FoxP3 + Treg 细胞的表达

参考 eBioscience 公司调节性 T 细胞 (Treg) 检测的方法。收集上述处理过的脾细胞和纵膈淋巴结细胞, 计数, 铺 96 孔板, 每孔 100 万个细胞, 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 每孔加入 100 μ L RIH buffer

稀释的表面染色抗体 FITC 标记抗小鼠 CD4 和 PE 标记抗小鼠 CD25 单克隆抗体,冰上避光孵育 30 min;用 RIH buffer 洗两遍后,每孔加入 100 μ L 固定剂和破膜剂即 foxp3 fixation/permeabilization (eBioscience FOXP3 检测专用试剂,目录号为 00-5521 或 00-5523;在 FOXP3 染色前,将其中的 Fixation/Permeabilization Concentrate 和 Fixation/Permeabilization Diluent 以 1:3 的比例混合,配制好的溶液保存时间不要超过一天),冰上避光孵育 45 min;每孔加 100 μ L 1 \times permeabilization buffer (eBioscience 公司,由 10 \times permeabilization buffer 稀释),500 r/min 离心 5 min,弃上清,然后加入 100 μ L 稀释的 Alexa Fluor 647 标记的抗小鼠 FoxP3 单克隆抗体(用 1 \times permeabilization buffer 进行稀释)冰上避光孵育 1h;用 1 \times permeabilization buffer 洗两遍后,重悬于 200 μ L PBS 洗液,用流式细胞仪检测。其结果以阳性百分率表示。

1.7 ELISA 检测肺组织匀浆上清液中 IL-2、IL-6、TGF- β 、IL-17 浓度

操作严格按试剂盒说明进行。

1.8 肺组织病理学染色

在感染后第 0、3、7、12、18 天收集小鼠肺组织标本,固定于 10% 福尔马林中,石蜡包埋,行组织切片

后用 HE 染色,光学显微镜下观察组织病理学改变。

1.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 软件处理分析,组间差异用 t 检验,实验所得数据均以 $x \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALB/c 小鼠感染衣原体后的疾病状态

BALB/c 小鼠滴鼻感染 5×10^3 IFU *Cm* 后,体重下降,第 3 天开始明显下降,至感染后第 7 天下降到最低水平,之后小鼠体重逐渐开始恢复,到感染后第 16 天基本恢复到正常体重(图 1-A)。肺组织从第 3 天即可检测到衣原体的生长,IFU 值与 0 天比有统计学意义($P < 0.05$),IFU 值在感染后第 7 天达到最高水平,之后小鼠肺组织内衣原体逐渐被清除,到感染后第 18 天基本清除(图 1-B)。小鼠肺组织 H&E 染色显示,与未感染组相比,在感染后第 3 天,肺泡内出现炎症细胞浸润,有小灶状脓肿形成的趋势;在第 7 天,炎症反应加重,肺组织可见大量中性粒细胞等炎性浸润,部分肺组织出现灶状实变;之后炎症开始消散,第 12 天仅见少量的炎症细胞浸润;至第 18 天肺组织基本恢复正常(图 1-C)。

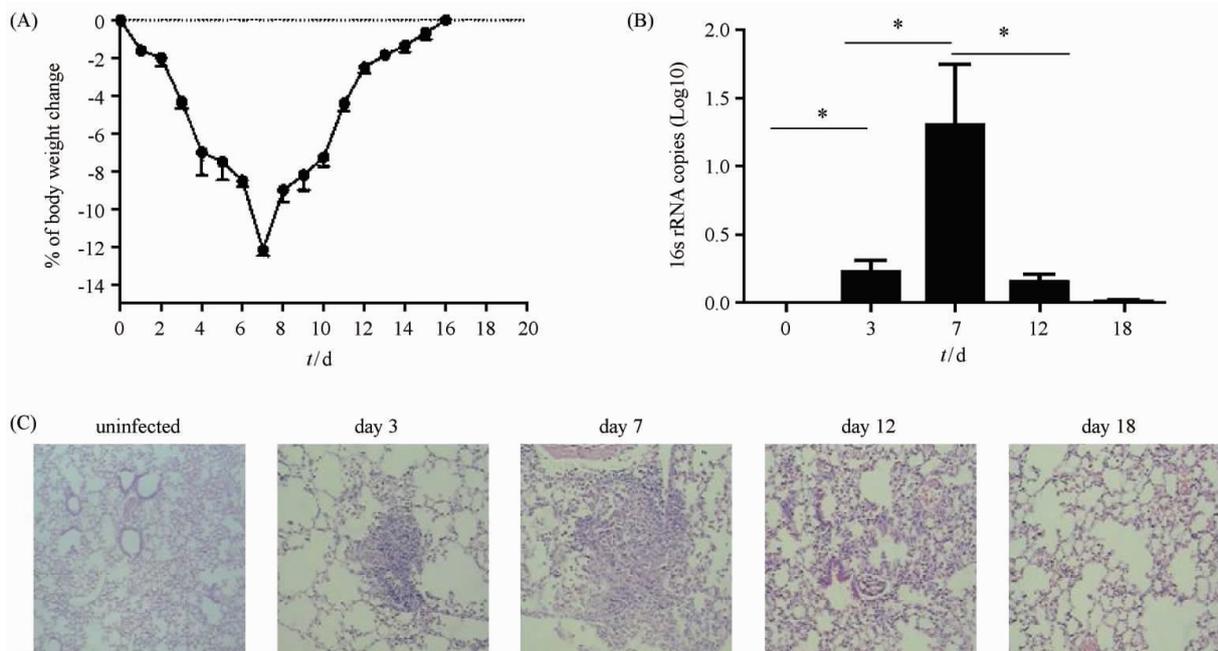


图 1 BALB/c 小鼠感染衣原体后的疾病状态

Fig. 1 Sickness state of BALB/c mice infected by *Chlamydia muridarum*. ($n = 6$, $x \pm s$, * : $P < 0.05$) The body weight changes (A) the growth of *Cm* (B) and the pathology in the lung (C) (HE staining, $10 \times$) were monitored at different time points post *Cm* infection.

2.2 小鼠感染衣原体后 Treg 细胞数量的动态变化

流式细胞术表明小鼠衣原体呼吸道感染 *Cm* 后脾脏和纵膈淋巴结中 Treg 的数量在第 3 天明显降低, 但

第 7 天上升恢复到感染前的水平, 一直持续到第 18 天至衣原体清除 (图 2)。CD4 + CD25 + FoxP3 + Treg 细胞的数量以其占 CD4 + T 细胞的百分比表示。

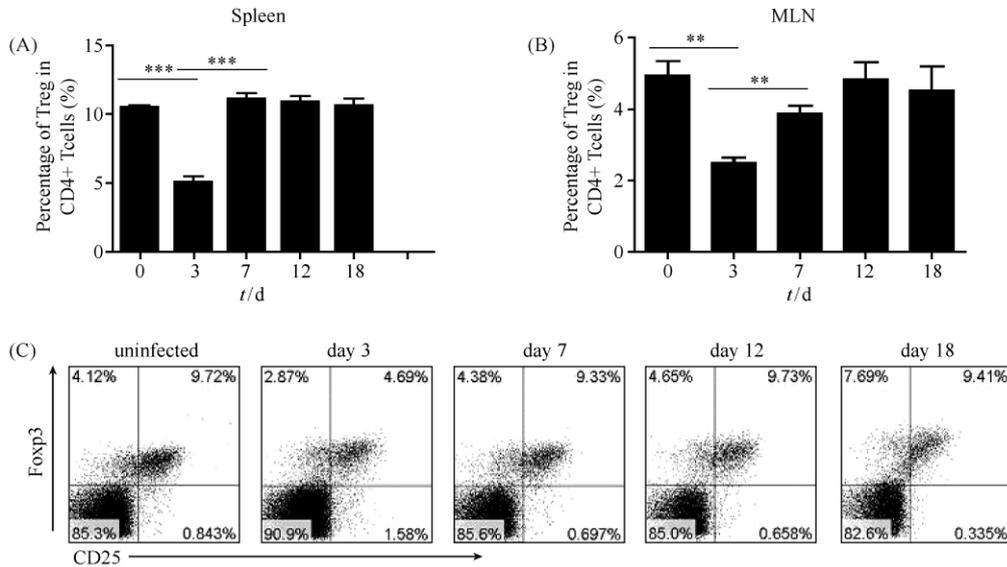


图 2 小鼠感染衣原体后脾脏和纵膈淋巴结中 CD4 + CD25 + Foxp3 + Treg 数量的动态变化

Fig. 2 Dynamic change of the numbers of CD4 + CD25 + Foxp3 + Treg in the spleen and mediastinum lymph node post *Cm* infection. A, B: The percentages of Treg cells in CD4 + T cells from the spleen (A) or MLN (B) (by flow cytometry). (n = 6, x ± s, **: P < 0.01, ***: P < 0.001); C: Typical plot data of flow cytometry showed the frequency of Treg cells (CD4 + CD25 + Foxp3 +) was analyzed in the spleen of the uninfected and infected mice at the indicated days post infection.

2.3 小鼠感染衣原体后肺组织与 Treg、Th17 分化相关的细胞因子的表达

ELISA 方法检测感染后小鼠肺组织上清液中与 Treg、Th17 分化相关的细胞因子 IL-2、TGF-β、IL-6 的表达, 发现小鼠衣原体呼吸道感染后与 Treg 分化相关的细胞因子 IL-2 和 TGF-β 第 7 天显著升高, 高

水平一直持续到第 18 天 (图 3-A、B), 这与 Treg 在感染后第 7 天恢复性增高的变化 (图 2) 基本一致。IL-6 从第 3 天即开始升高, 第 7 天达高峰, 之后逐渐降低至第 18 天基本降到基底水平 (图 3-C), 提示第 7 天后可能诱发 Th17 应答的高峰。

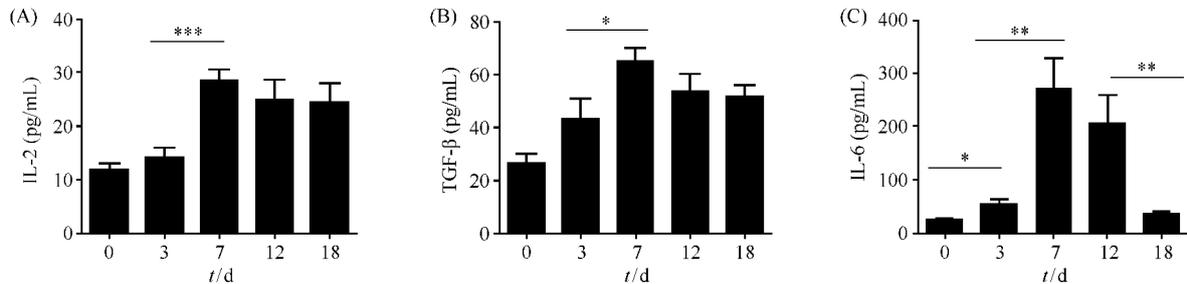


图 3 小鼠感染衣原体后肺组织中 Treg、Th17 细胞分化相关的细胞因子的表达

Fig. 3 The level of cytokines related to Treg and Th17 cells differentiation in the local lung tissues post *Cm* infection (by ELISA). (n = 6, x ± s, *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001) A: IL-2; B: TGF-β; C: IL-6.

2.4 小鼠感染衣原体后肺组织 IL-17、KC、MIP-2 的表达

在 TGF-β 持续存在的情况下, 与 Th17 分化密

切相关的细胞因子 IL-6 的趋势 (图 3-C) 一致, IL-17 第 3 天开始升高, 第 7 天达高峰, 第 18 天基本降到基底水平 (图 4-A)。IL-17 下游的炎症相关趋化因

子 KC 和 MIP-2 的 mRNA 水平也呈现了一致的趋势 (图 4-B、C)。与衣原体感染后炎症反应的趋势也一

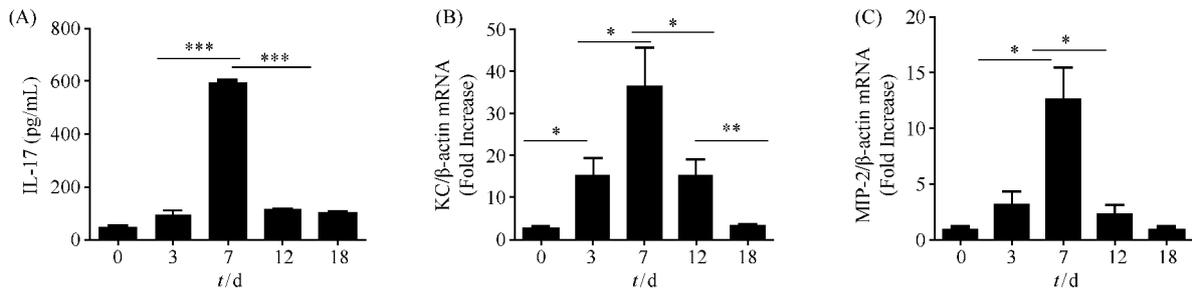


图 4 小鼠感染衣原体后肺组织与 Th17 相关的细胞因子 IL-17 和趋化因子 KC、MIP-2 的表达

Fig. 4 Th17-related cytokine IL-17 protein level and chemokines KC、MIP-2 mRNA expression in the local lung tissues post Cm infection. ($n = 6, x \pm s, * : P < 0.05, ** : P < 0.01, *** : P < 0.001$) A: the IL-17 production in the lung (by ELISA) ; B: the expression of KC mRNA in the lung (by qRT-PCR) ; C: the expression of MIP-2 mRNA in the lung (by qRT-PCR) .

3 讨论

辅助性 T 细胞各亚群及其在疾病中的关系成为近年来免疫学研究的热点。在衣原体感染中 Th1 型反应 (包括 IFN- γ 、IL-12 等 Th1 细胞因子和细胞免疫) 被认为是主要的保护免疫力^[5-8]。而我们的前期研究工作则发现 Th17/IL-17 是调节宿主对衣原体易感性的重要因素^[4]。本研究以 Cm 感染小鼠肺部后,中性粒细胞在肺部大量募集,肺组织中与 Th17 相关的炎症因子 IL-6、IL-17 和趋化因子 KC、MIP-2 也显著增加,与我们之前的报道一致^[4]。近年 Bai H 等曾在小鼠沙眼衣原体肺感染模型探讨 Th17 与 Th1 的关系,发现 IL-17/Th17 可通过调节树突状细胞的功能来促进 Th1 免疫应答^[14]。

作为辅助性 T 细胞中的一个重要亚群,Treg 细胞在抑制自身免疫性疾病、过度的炎症反应中发挥重要的作用。但 Treg 细胞在沙眼衣原体感染中发挥何种作用目前尚无定论,而且在感染个体内 Treg 与 Th17 实际上具有何种关系仍是未解之谜。本研究通过建立小鼠沙眼衣原体肺感染模型观察了感染疾病发生过程中 Treg 细胞数量变化情况以及 Th17 反应变化情况,对二者变化趋势及可能关系进行了初步的分析。

以 Cm 呼吸道感染 BALB/c 小鼠后,用流式细胞术检测感染过程中 Treg 细胞的动态变化,发现在感染后的第 3 天,脾脏和纵膈淋巴结中 Treg 细胞数

量均显著减少 (图 2-A、B)。这种减少的机制及免疫学意义目前尚不清楚,但有研究提示感染后 Treg 细胞的减少可能与其本身增殖的损坏和凋亡的增多有关^[15]。据 Marks E 等的研究表明在衣原体感染体内 Treg 对 Th1 应答可能存在抑制作用,因此感染后的 Treg 细胞减少可能有利于感染后 Th1 应答的诱导^[16],我们的研究也证实感染后的第 3 天 IFN- γ 的显著升高 (结果未显示)。但感染后第 7 天 Treg 细胞数量恢复到原来水平,一直持续到第 18 天衣原体清除。本研究进一步检测了与 Treg 细胞分化相关的细胞因子 IL-2、TGF- β 在肺组织的表达情况,发现在第 7 天,二者的表达都显著增加,之后一直持续到衣原体清除,与 Treg 细胞的趋势一致。这可能部分解释感染后第 7 天 Treg 细胞数量恢复的原因。

体外研究表明,Treg 与 Th17 在分化上存在复杂而密切的关系,二者均需要 TGF- β ,但 IL-6 决定了进一步分化的方向^[11-13]。在没有 IL-6 存在的情况下,可以促进 naive T 细胞向 Treg 分化;在 IL-6 存在的情况下,Treg 的生成被抑制,TGF- β 可与 IL-6 一起促进 naive T 细胞向 Th17 分化。TGF- β 除了来源于上皮细胞等,Treg 本身也可释放大量的 TGF- β ^[17-19]。研究表明,在巨细胞病毒、乙肝病毒等感染过程中 Treg 与 Th17 存在互反关系^[20-21],而 Pandiyan 等最近在 Immunity (2012) 则报道在白色念珠菌感染中 Treg 可促进 Th17 反应^[22]。但是,在衣原体感染过程中 Treg 与 Th17 之间的关系目前尚不清楚。

为探讨在衣原体感染体内 (In Vivo) Treg 与 Th17 的可能关系,本研究进一步检测了与 Th17 分化相关的细胞因子 IL-6,发现在第 3 天开始小量增加,第 7 天达到峰值,随后逐渐消退,至第 18 天基本回到第 0 天的基线水平(图 3-C)。因此,在感染后第 3 天,虽然 Treg 数量有所下降,但小量增加的 IL-6 和 TGF- β (可能来源于感染局部的上皮细胞等)可能启动 naïve CD4 + T 向 Th17 分化。至感染后第 7 天,在高水平 IL-6 与高水平 TGF- β (可能来源于增殖后的 Treg)作用下,Th17 分化最显著。ELISA 检测 IL-17 水平证实感染后第 7 天达到峰值(图 4-A)。定量 PCR 检测 Th17/IL-17 的效应趋化因子 KC、MIP-2 水平也在第 7 天显著升高(图 4-B、C)。与以上 Th17 反应趋势一致,小鼠感染后体重降低、中性粒细胞等炎症浸润也在第 7 天最为显著(图 1)。感染第 7 天之后,虽然 Treg 数量和 TGF- β 水平基本持平,但 IL-6 分泌开始降低,Th17 效应明显减弱,与之相关的因子 IL-17、KC、MIP-2 的表达显著降低,炎症反应逐渐减轻。至第 18 天 IL-6 降至初始水平,Th17 相关炎症消退,小鼠基本恢复正常。

本研究发现了在衣原体感染体内 Treg 与 Th17 关系的可能模式:与 Treg 抑制 Th1 应答不同,衣原体感染体内 Treg 可能通过提供 TGF- β 并在 IL-6 帮助下促进 Th17 应答产生。这一研究为继续深入揭示衣原体感染机体的免疫调节机制提供了一定的理论基础,但 Treg 与 Th17 二者在衣原体感染个体中究竟如何相互作用还有待于更进一步的实验研究。

参考文献

- [1] Vande Laar MJ, Morr  SA. Chlamydia: a major challenge for public health. *Euro Surveillance*, 2007, 12(10):E1-2.
- [2] Campbell LA, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae-an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(1):23-32.
- [3] Igietsme J, Eko F, He Q, Bandea C, Lubitz W, Garcia-Sastre A, Black C. Delivery of Chlamydia vaccines. *Expert Opinion On Drug Delivery*, 2005, 2(3):549-62.
- [4] Xiaohui Zhou, Qiangwei Chen, Jessica Moore, Jay K. Kolls, Scott Halperin, Jun Wang. Critical role of the interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in regulating host susceptibility to respiratory infection with Chlamydia species. *Infection And Immunity*, 2009, 77(11):5059-70.
- [5] Yang X. Role of cytokines in Chlamydia trachomatis protective immunity and immunopathology. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9(1):67-73.
- [6] 布晓坤,李宏钊,邢冬红,黄焕军,白虹. IFN- γ 在沙眼衣原体呼吸道感染中免疫防御机制的探讨. *中国免疫学杂志 (Cellular & Molecular Immunology)*, 2007, 23(12):1129-1132.
- [7] Ramsey KH, Miranpuri GS, Sigar IM, Ouellette S, Byrne GI. Chlamydia trachomatis persistence in the female mouse genital tract: inducible nitric oxide synthase and infection outcome. *Infection And Immunity*, 2001, 69(8):5131-5137.
- [8] Hongyu Qiu, Jie Yang, Hong Bai, Yijun Fan, Shuhe Wang, Xiaobing Han, Lijun Chen&Xi Yang. Less inhibition of interferon-gamma to organism growth in host cells may contribute to the high susceptibility of C3H mice to Chlamydia trachomatis lung infection. *Immunology*, 2004, 111(4):453-461.
- [9] Mills, KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(11):841-855.
- [10] Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(11):875-88.
- [11] Awasthi A, Murugaiyan G, Kuchroo VK. Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. *Journal of Clinical Immunology*, 2008, 28(6):660-70.
- [12] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 2006, 24(2):179-89.
- [13] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 + T helper cells. *Cell*, 2006, 126(6):1121-33.
- [14] Hong Bai, Jianjun Cheng, Xiaoling Gao, Antony George Joyee, Yijun Fan, Shuhe Wang, Lei Jiao, Zhi Yao and Xi Yang. IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity

- against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function. *The Journal of Immunology*, 2009, 183 (9) :5886-95.
- [15] Berretta F, St-Pierre J, Piccirillo CA, Stevenson MM. IL-2 Contributes to Maintaining a Balance between CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cells and Effector CD4 + T Cells Required for Immune Control of Blood-Stage Malaria Infection. *The Journal of Immunology*, 2011, 186 (8) : 4862-4871.
- [16] Marks E, Verolin M, Stensson A, Lycke N. Differential CD28 and inducible costimulatory molecule signaling requirements for protective CD4 + T-cell-mediated immunity against genital tract Chlamydia trachomatis infection. *Infection And Immunity*, 2007, 75 (9) :4638-47.
- [17] Estelle Bettelli, Yijun Carrier, Wenda Gao, Thomas Korn, Terry B. Strom, Mohamed Oukka, Howard L. Weiner & Vijay K. Kuchroo¹. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, 441 (7090) , 235-238.
- [18] Estelle Bettelli, Thomas Korn, Mohamed Oukka & Vijay K. Kuchroo. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature*, 2008, 453 (7198) , 1051-1057.
- [19] Li Zhao, De Kai Qiu, Xiong Ma. Th17 cells: The emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver. *Journal of Digestive Diseases*, 2010, 11 (3) : 126-133.
- [20] 王静, 高伟, 安选, 钟卿, 胡怀东, 胡鹏, 任红. Th17 与 Treg 细胞免疫失衡在慢性乙型病毒性肝炎发病过程中的调节作用. 西南大学学报(自然科学版) [*Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*], 2012, 34 (6) :45-49.
- [21] 谭艳芳, 于四景, 王婕, 李双杰. Treg/Th17 平衡在巨细胞病毒感染发病机制中的作用. 细胞与分子免疫学杂志 (*Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*), 2012, 28 (6) : 649-651.
- [22] Pushpa Pandiyan, Heather R. Conti, Lixin Zheng, Alanna C. Peterson, Douglas R. Mathern, Nydiaris Hernández-Santos, Mira Edgerton, Sarah L. Gaffen, and Michael J. Lenardo. CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model. *Immunity*, 2011 , 34 (3) : 422-434.

Relationship between CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells and Th17 responses in *Chlamydia muridarum* pulmonary infection

Xiaojing Zhou^{1#}, Lixiang Chen^{2#}, Wangzhan Zhou¹, Jun Huang¹, Danhui Liu¹, Wenjiang Zhou², Yunwen Hu², Jianxin Lv^{1*}, Xiaohui Zhou^{2*}

¹Zhejiang Province Key Laboratory for Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China

²Shanghai Public Health Clinical Center Affiliated to Fudan University, Shanghai 201500, China

Abstract: [Objective] To study the relationship between CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells and Th17 responses during pulmonary infection of *Chlamydia muridarum* (Cm) in BALB/c mice. [Methods] BALB/c mice aged 6 - 8

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270217), by the Natural Science Foundation of Shanghai (12ZR1426400) and by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y2081073)

* Corresponding authors. Xiaohui Zhou, E-mail: zhouxiaohui@shaphc.org; Jianxin Lv, E-mail: jxlu313@163.com

These authors contributed equally to this work.

Received: 4 September 2012/Revised: 19 October 2012

weeks were inoculated intranasally with 5×10^3 IFU of *Cm* to set up the murine model of Chlamydial pneumonia. The body weight changes, the growth of *Cm* and the pathology in the lung were monitored at different time post-infection. To determine the CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells responses in BALB/c mice, intracellular cytokine staining was used to assay the percentage of CD4 + CD25 + Foxp3 + T cells in the spleen and mediastinum lymph node (MLN). The production of cytokines/chemokines in the lung were monitored, including IL-6, TGF- β , IL-17, IL-2 (by ELISA), KC and MIP-2 (by RT-PCR). [Results] Intranasally infected with 5×10^3 IFU of *Cm* in mice resulted in chlamydial pneumonitis featured by body weight lost, chlamydia growth and pathological damage in the lung compared with their uninfected counterparts. On day 3 post-infection, the percentage of CD4 + CD25 + Foxp3 + T cells in the spleen and MLN were significantly decreased than the control mice; then began to increase and recover to the original level on day 7 post-infection. The production of Th17 associated cytokines/chemokines such as IL-6, IL-17, KC and MIP-2 increased, which peaked on day 7 post-infection, then gradually reduced. The production of TGF- β and IL-2 was consistent with the trend of CD4 + CD25 + Foxp3 + T cells. [Conclusion] During pulmonary infection of *Cm* in BALB/c mice, CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells may promote type 17 T cell immunity through providing TGF- β in the presence of IL-6.

Keywords: *Chlamydia muridarum*, regulatory T cells, T helper cell type 17

(本文责编:张晓丽)

《微生物学报》第十届编委会第一次会议纪要

纪念中国微生物学会成立 60 周年大会暨 2012 年学术年会于 2012 年 10 月 27 - 28 日在江苏省南京市钟山宾馆召开。10 月 27 日晚,召开了《微生物学报》第十届编委会第一次会议,主编谭华荣研究员主持会议。出席编委会会议的成员,有顾问邓子新院士,主编谭华荣,副主编东秀珠、胡福泉、黄力、陆承平、曲音波、沈萍(陈向东代)、徐建国、杨瑞馥,编委陈冠军、黄英、李越中、刘钢、孙明、温廷益、向华、谢建平以及编辑部成员共 20 多人参加了会议。

本次会议的主要议题是目前形势下《微生物学报》的定位,以及第十届编委会如何进一步提升《微生物学报》学术影响力的建议。编委们首先听取了编辑部对期刊现状、2011 - 2012 年的投稿、审稿统计情况汇报,接着谭华荣主编回顾了学报上届编委会的工作,对各位编委给予《微生物学报》在投稿、审稿方面的无私付出表示衷心感谢,并对编辑部的工作进行了肯定。

讨论阶段,各位编委专家畅所欲言,为《微生物学报》的发展献计献策。集中话题是由于目前评价体系导致的优秀稿件外流现象,以及它对国内期刊,尤其是中文期刊产生的巨大冲击。多数编委认为,在这种形势下,《微生物学报》作为国内目前水平较高的中文学术期刊,需要保持它的高质量。针对高水平稿源不足的情况,编委们提出了许多很好的建议,如:加强与一些专业会议的合作,有针对性的组稿;加强与一些大项目课题组合作,做一些专刊专栏;编辑部多组织一些综述类的文章;编委们继续响应每 2 年给微生物学报贡献 1 - 2 篇论文的倡导,等等。

编委们同时还建议编辑部加强与编委及审稿专家的及时沟通,以便他们准确把握稿件的质量及期刊的出版计划。

会议对《微生物学报》立足中文学术期刊的地位,加强组稿,热诚为作者服务等内容达成了一致意见。相信在第十届编委会的领导下,通过编辑部人员的共同努力,《微生物学报》会办得更好。