

沙眼衣原体的毒力因子研究进展

唐翠连, 史顺杨, 刘丽霞, 张西霞

邵阳学院附属第二医院, 湖南 邵阳 422000

摘要: 沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)是一种常见的专性细胞内寄生微生物,他能够引起女性宫颈炎、输卵管炎、盆腔炎、子宫内膜炎等多种疾病,是最为常见的性传播病原体之一,迄今也没有特异性 Ct 疫苗可以预防其传播。目前关于 Ct 的致病机制还没有完全研究明白,但由于分子生物学,生物信息学,生物物理学的迅速发展,现在已经克隆并验证了包括热休克蛋白、主要外膜蛋白、衣原体分泌蛋白、质粒蛋白和一些新发现的可能的毒力蛋白。本研究对其毒力因子的进展进行研究,为预防和控制 Ct 所致的疾病提供参考。

关键词: 沙眼衣原体;毒力因子;热休克蛋白;主要外膜蛋白;分泌蛋白;质粒蛋白

中图分类号: R711 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2023)03-0379-07 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2023.03.033

Research progress on virulence factors of *Chlamydia trachomatis*

TANG Cui-lian, SHI Shun-yang, LIU Li-xia, ZHANG Xi-xia

The Second Hospital Affiliated to Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000, China

Corresponding author: SHI Shun-yang, E-mail: yaryo@ qq. com

基金项目: 湖南省卫生健康委一般指导项目(D202301066911)

作者简介: 唐翠连(1978-),女,湖南邵阳人,硕士,主任技师,主要从事病原生物学研究工作。

通信作者: 史顺杨, E-mail: yaryo@ qq. com。

但存在从事 ART 医务人员数量的增加速度滞后于 ART 规模扩大速度的主要矛盾,这给第四轮防艾战争 ART 成效的巩固和持续提高带来了挑战。在资源有限地区,一部分 HIV-1 感染者对 ART 益处的理解上存在偏差,艾滋病的耻辱感、担心 HIV-1 身份暴露、外出务工、老年人、儿童、青少年、静脉注射吸毒等因素导致一部分 HIV-1 感染者拒绝进行 ART 或 ART 后服药依从性难于保持较高水平^[8]。2020 年,云南省 ART 比例和治疗有效率虽然超过了 90%,但仍然低于全国平均水平^[9]。在后续的 ART 工作中,提高治疗率和有效率需要各级各部门付出成倍的努力。

综上所述,通过云南省第四轮防艾战争的开展,ART 工作在治疗覆盖面、治疗数据及质量方面均上了一个新的台阶,但仍面临诸多困难和挑战。ART 医务人员数量随 HIV-1 感染者 ART 数量的增加是深入开展 ART 前提。ART 医疗机构、疾病预防控制部门、社区及社会组织之间继续深入协作与信息互通是基本保障。ART 定点医疗机构应持续优化 ART 策略,开展精细化管理,利用好云南省 ART 信息管理平台,提高诊疗效率,持续推动患者主动参与治疗,提高患者自我管理,提升对治疗重点人群,包括新入组、脱失再入组和病毒载量未抑制患者的个案管理水平,关注治疗失败

和治疗脱失的早期预警以及其他慢性病的识别和救治,推广“一站式”服务,强化“全病程”管理。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张永光,王晓锋,郑吉生,等.云南省防治艾滋病工作大事纪实编撰实践与经验—以《云南省防治艾滋病工作大事纪实(1986—2013 年)》为例[J].卫生软科学,2016,30(1):60-63.
- [2] 徐晓杰. 云南省艾滋病防治政策研究[D].昆明:云南大学,2017.
- [3] 樊移山,周曾全,王玉,等.云南省艾滋病抗病毒治疗工作模式现状[J].中国艾滋病性病,2009,15(6):627-628.
- [4] 张福杰,赵燕,马烨,等.中国免费艾滋病抗病毒治疗进展与成就[J].中国艾滋病性病,2022,28(1):6-9.
- [5] 孙江平.写在艾滋病防治“三个 90%”策略目标收官之际[J].中华预防医学杂志,2020,54(11):1180-1183.
- [6] 吕繁.《中国遏制与防治艾滋病“十三五”行动计划》核心策略解读[J].中华预防医学杂志,2017,51(11):966-970.
- [7] 劳云飞,李田舒,楼金成,等.云南省第三轮防治艾滋病人民战争抗病毒治疗工作评估[J].卫生软科学,2017,31(3):58-60,64.
- [8] 陈洁,覃碧云,魏秀青,等. 2016—2020 年湖南省新报告成年 HIV/AIDS 病例抗病毒治疗及时性及其影响因素分析[J].实用预防医学,2022,29(12):1409-1413.
- [9] 韩孟杰,陈清峰,徐鹏,等.砥砺前行“十三五”艾滋病防控迈向新征程—我国艾滋病防治回顾与展望[J].中国艾滋病性病,2021,27(12):1327-1331.

收稿日期:2022-04-21

Abstract: *Chlamydia trachomatis* (Ct) is a common obligate intracellular parasitic microorganism. It can cause female cervicitis, salpingitis, pelvic inflammation, endometritis and other diseases, and is also one of the most common sexually transmitted pathogens. So far, there is no specific Ct vaccine to prevent its transmission. At present, the pathogenic mechanism of Ct has not been fully understood, but it has been cloned and verified, including heat shock protein, main outer membrane protein, chlamydial secretory protein, plasmid protein and some newly-discovered possible virulence proteins due to the rapid development of molecular biology, bioinformatics and biophysics. This study introduces the research progress on these virulence factors so as to provide references for prevention and control of Ct-induced diseases.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*; virulence factor; heat shock protein; major outer membrane protein; secretory protein; plasmid protein

沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, Ct) 是专性细胞内寄生微生物,他能够导致人类泌尿生殖道感染,在国内的性传播疾病中,生殖道沙眼衣原体感染的每年平均发生率为 1.95%,其中 20~29 岁生殖道沙眼衣原体感染的发生率最高^[1]。Ct 感染能够导致女性宫颈炎、输卵管炎、盆腔炎、子宫内膜炎以及异位妊娠等疾病,严重者会引起不育不孕。通常情况下 Ct 为隐性感染,容易错过诊断以及治疗时机,从而导致严重的并发症^[2]。Ct 拥有独特的双相发育周期:原体 (elementary body, EB) 和网状体 (reticulate body, RB),在 EB 到 RB 的发育过程中有时还可以观察到中间体 (intermediate body, IB)^[3]。目前由于分子生物学,生物信息学,生物物理学等的迅速发展,目前对 Ct 的致病机制取得了一定的突破,本研究就对目前 Ct 的热休克蛋白,主要外膜蛋白,分泌蛋白,质粒蛋白和一些新发现的毒力因子进行综述。

1 热休克蛋白

1.1 热休克蛋白 60 (heat shock protein 60, HSP60) HSP60 广泛分布在于原核及真核生物。他参与包括病毒性感染、炎症性肠病等多种炎症性疾病的生理病理过程^[4]。HSP60 与蛋白的正确折叠相关,在进化上高度保守。不同血清型 Ct 之间 HSP60 的相似性大约 80%,与细菌 HSP60 相似性约为 60%,Ct HSP60 蛋白与真核生物 HSP60 的相似性为 50%。特别是 Ct HSP60 与人类的 HSP60 蛋白之间的相似性也高达 48%,研究发现 Ct HSP60 蛋白的抗体也会与人 HSP60 蛋白发生识别,他们之间的交叉免疫反应能够引起人体局部免疫应答,导致输卵管损伤^[5]。通过预测 Ct HSP60 的表位可知,具有多个 B 细胞表位,分别分散在 Ct HSP60 蛋白中。将其与人的 HSP60 比对发现,Ct HSP60 的 135~140,433~440 和 526~532 区域分别与人 HSP60 蛋白的 159~164,457~464 和 549~556 氨基酸区域的相似性较高^[6]。Ct HSP60 蛋白具有高度免疫原性,调查研究发现 84% 的输卵管不孕女

性血清中含有抗 Ct HSP60 抗体,但是在健康人群中只有 9% 的人血清中含有 Ct HSP60 抗体。在临床上将 Ct HSP60 的抗体检测作为 Ct 感染的指标,有人还将其作为不孕的一个辅助指标^[7-9]。Ct HSP60 蛋白接种到豚鼠时可以诱导迟发型超敏反应,调查发现 Ct HSP60 蛋白引起的细胞免疫应答与自发性流产有关^[9]。将 Ct HSP60 蛋白能够刺激 CD4⁺ T 细胞分泌 Th2 型细胞因子,导致炎症产生。现在认为 Ct HSP60 蛋白是一个重要的毒力蛋白,宿主对他的免疫应答可以导致炎症及免疫病理反应。Ct HSP60 其生殖道中的表达水平对于评价 CT 的致病能力有一定的价值,与输卵管性不孕密切相关^[11]。

1.2 Ct HSP10 Ct HSP10 蛋白是热休克蛋白家族中的一员,是一类在遗传上高度保守的蛋白^[12],全长约有 102 个氨基酸,分子量约为 11 kDa^[13]。不同血清型 Ct 的 HSP10 蛋白的氨基酸序列基本相同,L2 型和 A 型 Ct 的 HSP10 蛋白只有两个不同的氨基酸。Ct HSP10 蛋白与鹦鹉热衣原体的 HSP10 蛋白的相似性高达 85%,与其他细菌的相似性不足 50%。Ct HSP10 基因与 Ct HSP60 基因由相同的启动子调控,在遗传上密切相关,两者共同起作用,防止蛋白质错误折叠,阻止蛋白变性。当 Ct 感染宿主后,宿主会产生针对 Ct HSP10 蛋白产生免疫应答,产生抗体。研究发现急性 Ct 感染女性体内的 Ct HSP10 蛋白的抗体滴度明显高于对照,并且与患者疾病的严重性相关^[14]。这证实 Ct HSP10 蛋白可能与疾病的进展相关,在 Ct 感染过程中,Ct HSP10 蛋白持续刺激宿主免疫系统产生应答,从而产生大量抗体。这也预示着 Ct HSP10 抗体的含量可以作为盆腔炎和输卵管不孕疾病的一个标志。Betsou 等^[15]研究发现 Ct HSP10 抗体含量与异位妊娠密切相关,异位妊娠患者 Ct HSP10 阳性率明显高于正常妊娠组。研究发现输卵管积水患者 Ct HSP10 抗体的阳性率高达 46.8%,明显高于正常人群。故认为 Ct HSP10 抗体与导致女性输卵管的积水,并且随着 Ct HSP10 蛋白的表达量升高,促进了女性输卵管积

水。输卵管积水导致病原微生物及其产生的代谢毒素流向子宫,破坏子宫内膜和胚胎,从而引发疾病^[16]。

1.3 Ct HSP70 热休克蛋白 70 (HSP70 蛋白) 又称为 DnaK, HSP70 蛋白在进化上非常保守。他的 N 端是一个 ATP 结合结构域,该结构域通常非常保守,原核和真核生物 HSP70 的 ATP 结合域的氨基酸序列高度同源。C 端是一个肽结合域,变化相对较大。L2 型 Ct HSP70 的编码区共 1 980 bp,与 D 型 Ct HSP70 蛋白的相似性高达 94%,与肺炎衣原体 HSP70 的相似性为 87%,但是与人 HSP70 的相似性只有 42%。在 HSP70 基因上游有一个混合型启动子,含有 TATA 盒,与热休克启动子高度同源的,并且启动子非常保守,如果将其突变,发现其启动活性明显下降。Ct HSP70 蛋白可能参与了 DNA 复制、蛋白质的合成与运输等细胞活动,在维持 Ct 的致病性中起重要作用^[16]。

Ct HSP70 蛋白可能还参与了 Ct 与宿主细胞的粘附与识别,他能够作为宿主与 Ct 相互识别和作用的介导剂。研究显示 Ct HSP70 在 EB 黏附及进入子宫内膜细胞中起重要功能。利用免疫荧光显微术及透射电镜显微术检测到 Ct HSP70 并非直接识别的配体,Ct HSP70 蛋白可能在 EB 最初黏附的时候起展示黏附蛋白的功能^[16]。

Ct HSP70 蛋白也是一种强免疫原,现已生产了两种针对 Ct HSP70 蛋白的单克隆抗体,在 Ct 患者体内能够检测到 HSP70 抗体^[17],这提示 Hsp70 蛋白可作为疫苗的靶标蛋白^[18]。研究显示女性患者血清中存在的抗 Ct HSP70 抗体与抗输卵管疾病的保护性免疫相关,且体外实验证实抗 Ct HSP70 抗体能中和衣原体的感染,起免疫保护作用。利用 HSP70 抗体对 E 型 Ct HSP70 蛋白进行定位,发现 HSP70 蛋白定位在包涵体,HSP70 定位在包涵体可能有助于衣原体感染。当 Ct 持续性感染时候,Ct HSP70 的表达与 HSP60 不同,HSP70 的表达并没有持续增加,他们之间的转录调节方式可能不同。

2 主要外膜蛋白 (major outer membrane protein, MOMP)

衣原体属于革兰氏阴性菌,Ct 的 EB 和 RB 外都被一层外膜所包裹,称 MOMP。现已发现 MOMP 是一种存在于 Ct 的 EB 和 RB 表面的一种含量高达 60% 跨膜蛋白,不同血清型 Ct MOMP 相对分子量为 38 000 ~ 42 000,含 387 ~ 397 个编码氨基酸,由 4 个可变区 (variable domain, VD) 和 5 个保守区 (constant domain, CD) 跨膜 7 次交替组成^[19],孔径大小为 2 nm 的孔道

蛋白,生物信息学预测共有 16 个跨膜片段^[20]。MOMP 是一种三聚体,通过 CD (圆二色谱法) 测定发现他二级结构中以 β -折叠片为主。不同血清型 Ct 的 MOMP 蛋白的可变区氨基酸序列不同,具有较高的差异性。可变区大都为长的环状突起,位于 Ct 表面。由于 Ct MOMP 蛋白在外膜中含量极高,可诱导机体产生特异性中和抗体,并且作为抗体的特异性靶抗原^[21],曾被认为是最有可能成为商品化疫苗的衣原体蛋白^[22-23]。但是当使用接种 Ct 重组 MOMP、合成的 MOMP 多肽或者 DNA 疫苗后,发现机体只能够针对部分 Ct 产生免疫应答,这可能与不同血清型衣原体 MOMP 氨基酸差异较大以及其抗原结构异常复杂相关^[21]。研究发现,在 EB 期,MOMP 4 个可变亲水结构域 VD 暴露于衣原体外膜表面、黏附于易感细胞的甘露糖-6-磷酸/胰岛素样生长因子受体 2 (M6PR/IGFR2) 发挥黏附和侵袭作用。MOMP 对衣原体整个生命周期中的新陈代谢和感染性起着重要作用^[24]。

3 分泌蛋白

3.1 包涵体膜蛋白 (inclusion body membrane protein, INCS) INCS 是由 Ct 基因编码,定位在包涵体膜上的蛋白质,INCS 一般是在 Ct 感染时期表达,是衣原体独有的蛋白质。通过分析,衣原体 INCS 占衣原体总蛋白的 7% ~ 10%,生物信息学结果预测 Ct 大约有 50 多种 INCS。INCS 有两个主要特点:N 端含有一个三型分泌信号肽,C 端含有两个跨膜的亲水螺旋结构域,N 端和 C 端都位于宿主的细胞质。

3.1.1 INCA 蛋白 第一个发现的衣原体 INCS 是 INCA 蛋白,在结构和功能上与真核 SNARE 相似,可介导同型融合分子内钳位,实现致病^[25]。研究发现 INCA 蛋白在保护包涵体不被溶酶体吞噬的过程中起重要作用,INCA 能够抑制溶酶体吞噬衣原体。研究发现宿主的激酶能够把 INCA 蛋白进行磷酸化,然后磷酸化的 INCA 影响了宿主的信号传导途径,便于病原体在宿主体内存活^[26]。因此研究人员提出抑制衣原体 INCA 的活性,从而抑制衣原体的生长,INCA 有望成为治疗衣原体的一个靶点。Hackstadt 等^[26]使用 INCA 的单克隆抗体注入到感染了沙眼衣原体的宿主细胞,发现 Ct 包涵体的表达异常增多。当 INCA 缺失时,宿主细胞内有多个 Ct 的包涵体,这些研究表明 INCA 蛋白可能参与了衣原体包涵体融合。利用荧光显微镜、免疫共沉淀和 GST-pull down 等技术发现 INCA 蛋白能够与宿主 G3BP1 蛋白 (Ras - GTPase activating protein SH3 domain binding protein 1) 发生相互作用。

INCA 蛋白的可能通过 G3BP1 蛋白下调 Myc 蛋白的表达,从而诱导宿主细胞凋亡^[27]。

3.1.2 INCB 和 INCC 蛋白 利用免疫荧光的方法证明 INCB 和 INCC 蛋白也是定位在包涵体膜上,但是与其他 INCS 不同的是他们的疏水区在 C 端,其他 INCS 的疏水区位于 N 端^[28]。这个疏水结构可能是在蛋白的分泌过程中起重要的功能。由沙眼衣原体感染导致的女性盆腔炎及宫颈炎患者的 INCB 和 INCC 抗体滴度很高。并且他们与 MOMP 抗体具有一定的相关性,Ct 感染患者体内 INCB 和 INCC 蛋白都具有较好的免疫原性,这对于 Ct 的临床诊断及研制疫苗都具有重大意义。

3.1.3 INCD 蛋白 研究发现 Ct 效应蛋白 INCD 也是能够插入到包涵体膜,同时能够帮助脂质转移蛋白(certainamide transfer protein, CERT)在包涵体膜上聚集。最新研究结果发现 INCD N 和 C 末端区域都需要与 CERT PH 域结合并定义关键相互作用残基,INCD 寡聚化可促进与 CERT 的高亲和力结合,从而使沙眼衣原体能够有效地将宿主神经酰胺重定向至内合物,这对研究沙眼衣原体感染的分子致病机制具有重要作用^[29]。

3.1.4 INCG 蛋白 INCG 蛋白在 Ct 感染的宿主细胞内可以被磷酸化,且这些磷酸化对于 INCG 蛋白行使生物学功能有重要意义。利用酵母双杂交技术证实 Ct INCG 蛋白能够与宿主细胞的 14-3-3 蛋白发生相互作用。14-3-3 蛋白是真核细胞信号传递过程中的一个重要分子,与磷酸化的 INCG 蛋白结合后传递信号。INCG 蛋白还能够识别 RAB 蛋白,实验结果证明 INCG 蛋白可能参与了调控宿主细胞的信号通路^[30]。

3.1.5 Ct440 蛋白 Ct440 蛋白是沙眼衣原体 INCS 之一,定位在沙眼衣原体包涵体膜。利用间接免疫荧光等方法研究发现 Ct 感染宿主 12 h 后,该蛋白开始表达,一直持续整个感染周期。将该基因转化到宿主细胞,发现宿主细胞表达的 Ct440 蛋白不影响 Ct 的侵袭力^[31]。

3.2 分泌到宿主胞浆中的分泌蛋白

3.2.1 TARP 蛋白 TARP 蛋白是由 Ct 合成的衣原体三型分泌系统的效应蛋白,当 EB 入侵宿主时候释放,宿主细胞质中的 TARP 蛋白能被宿主的激酶磷酸化。TARP 蛋白对感染早期的 EB 的存活和 RB 的形成密切相关^[32]。只有分泌到宿主细胞中的 TARP 蛋白才能被磷酸化,留在 EB 里的 TARP 蛋白通常无磷酸化。现在认为 TARP 蛋白的磷酸化是 Ct 入侵宿主的关键步骤。但目前针对 TARP 的激酶还没有被鉴定,研究

人员正在寻找 TARP 蛋白的磷酸酶。此外最近发现 TARP 蛋白能够结合宿主细胞的 FAK,FAK 蛋白在 Ct 入侵中起重要功能,这也为研究 Ct 与宿主之间的相互作用提供了新的研究思路。

3.2.2 衣原体蛋白酶样活性因子(chlamydial protease-like activity factor, CPAF) CPAF 蛋白是由衣原体合成并分泌到宿主细胞的一种酶,由 Ct858 基因所编码,其分子量大小约为 70 kDa,有相关报道 CPAF 可有效地中和补体因子 C3 依赖的抗衣原体活性,优先抑制替代补体激活途径^[33],在衣原体的致病中起重要功能。CPAF 蛋白具有很强的免疫原性,Sharma 等^[34]分别用活体 D 型 Ct 和灭活的 D 型 Ct 接种到 BA LB/c 小鼠,然后检测 CPAF 的抗体,结果表明接种活 Ct 的小鼠都能够产生针对 CPAF 的特异性抗体,但是接种了灭活 Ct 的小鼠并不能够产生针对 CPAF 抗体,故说明 CPAF 抗体的产生可能依赖 CPAF 的空间结构。但是关于 CPAF 蛋白的具体功能还需要进一步的研究。

4 质粒蛋白

Ct 除了基因组 DNA,还存在一个大小为 7.5 kb 的质粒,该质粒具有 8 个开放阅读框,能够编码 8 个假定蛋白,现在研究较多的是 PGP3、PGP5、PGP6 和 PGP8。

4.1 PGP3 蛋白 PGP3 蛋白又被命名为 PORF5 蛋白,全长共 264 个氨基酸,生物信息学分析 PGP3 蛋白无信号肽。实验证实 PGP3 是一种分泌性蛋白,主要定位在宿主细胞的细胞质,少部分位于 Ct 的 EB 和 RB。结构上 PGP3 蛋白由 3 条相同的肽链组成同源三聚体。PGP3 蛋白通过二硫键与 Ct 外膜蛋白相连形成复合物,PGP3 是研究最多的衣原体质粒蛋白之一^[35]。

PGP3 蛋白具有很强的免疫原性,将 GST-PGP3 融合蛋白免疫小鼠,可以产生高浓度的抗体,且能够与 PGP3 识别。其免疫原性强于 MOMP 和 HSP,与 CPAF 的免疫原性相同。接种 PGP3 蛋白对小鼠产生免疫保护作用,产生的抗体可以在小鼠抗衣原体感染过程中起作用。使用 PGP3 核酸疫苗对小鼠进行鼻黏膜免疫,证实 PGP3 核酸疫苗能够诱导小鼠产生高滴度的抗 PGP3 IgG2a 和 IgG1 抗体。感染实验发现,接种该疫苗的小鼠输卵管未见明显充血积水,病理变化明显要轻于对照组,接种 PGP3 核酸疫苗能够抵抗 Ct 的感染^[36]。陆春雪等^[37]的研究发现使用 PGP3 免疫 Balb/c 小鼠后,除了能够刺激小鼠产生特异性抗体外,还能够刺激小鼠脾淋巴细胞产生高浓度的 IFN- γ 、IL-17 及 IL-5。同时还发现泌尿生殖道感染衣原体患

者的血清中会产生高滴度的 PGP3 抗体,同样证实 PGP3 是一种免疫优势抗原。

利用基因工程的方法获得 PGP3 重组蛋白,然后使用 ELISA 法检测 Ct 患者血清,发现 PGP3 能够与所有患者血清发生强烈的反应,这表明 Ct 感染时会表达 PGP3 蛋白,提示 PGP3 蛋白可以用作临床诊断抗原。研究发现基于 PGP3 的 ELISA 和商品化的 ELISA 检测试剂的特异性和敏感性相符合,特别是在检测女性血清时,其敏感性高于现有的商业试剂^[38-39]。李忠玉等^[40]使用抗 PGP3 蛋白的单克隆抗体为诊断试剂,研制的双抗体夹心酶联免疫吸附试验能够检测到 10 ng/ml 的 PGP3 蛋白,这也提示了 PGP3 的抗体也可以用作临床诊断试剂。

Ct 导致的炎症反应是 Ct 致病的关键因素之一。现在发现 PGP3 蛋白与炎症反应有密切关系。Zhou 等^[41]实验证实 PGP3 蛋白能以剂量和时间依赖性方式诱导 THP-1 细胞分泌多种前炎症细胞因子。抑制 ERK、p38 和 JNK 信号通路能够减少 PGP3 蛋白诱导前炎症细胞因子的含量,表明 PGP3 是通过活化 ERK 和 p38/MAPK 途径分泌前促炎症细胞因子。使用特异性抗体封闭 TLR2,发现 TLR2 也可能参与了 PGP3 诱导前促炎症细胞因子。发现 PGP3 蛋白能导致小鼠输卵管肿胀,周围结缔组织发生粘连、扭曲和积水。将 PGP3 蛋白接种到小鼠阴道后,发现会有中性粒细胞、单核巨噬细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润,其阴道分泌物及血清里 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等前促炎症细胞因子的含量明显提高。这些结果证实 PGP3 蛋白可能导致小鼠生殖道组织的免疫损伤,且可能与 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等前促炎症细胞因子相关。Shu 等^[42]研究发现,PGP3 促进 Nrf2 的核易位,增加 NQO1 表达,降低 LPS 诱导的氧化应激,有助于沙眼衣原体的生存,从而促进沙眼衣原体的感染性。

4.2 PGP4 蛋白 Ct 质粒蛋白中最小的蛋白 ORF 是 PGP4 蛋白,全长只有 102 个氨基酸,可能具有螺旋-环-螺旋结构域,Ct 感染 3 h 就开始表达,是发育周期中最早表达的质粒蛋白,大部分都定位在包涵体。PGP4 蛋白是一个调节蛋白,它能够控制质粒蛋白 PGP3 和 glgA、CTL0638、CTL0339、CTL0397-0399 等染色质基因的转录表达^[43]。PGP4 基因缺失突变会引起 PGP3 基因及 glgA 基因表达降低,从而导致 Ct 的包涵体形态发生异常改变和糖原呈阴性,证实 PGP4 是通过调控 PGP3 和 glgA 等基因的表达,从而起毒力因子的作用。

4.3 其他质粒蛋白 在 Ct 质粒编码其他蛋白中,

PGP1 蛋白与解旋酶 DnaB 类似,PGP5 参与质粒的分区,与分区蛋白(partition protein PARA)具有一定的同源性。PGP2、4、6 是衣原体特异性蛋白。PGP7、8 两者在 C 末端区域有大量同源序列,是噬菌体整合酶/重组酶蛋白家族成员。

5 其他毒力因子

5.1 α -甘露糖苷酶 α -甘露糖苷酶是 N-聚糖成熟和降解过程中必须需要的一种重要的糖苷水解酶。调查发现 D 血清型和 E 血清型 Ct 都有较强的 α -甘露糖苷酶活性,并且其检测速度较快。而泌尿生殖道细菌、念珠菌、支原体和原虫等微生物 α -甘露糖苷酶活性较低。所以可以使用 α -甘露糖苷酶的活性作为临床诊断沙眼衣原体感染的指标,但是值得注意的是并不是所有的血清型 Ct 都有 α -甘露糖苷酶活性,还需要进行大规模的临床实验来检测这种方法的灵敏度和特异性^[44]。真核细胞 α -甘露糖苷酶的表达能够抑制黏附蛋白的黏附功能和促进生长,Ct 的 α -甘露糖苷酶在沙眼衣原体侵染宿主细胞过程中也起到了重要作用。 α -甘露糖苷酶的活性高低直接决定 Ct 感染细胞的能力。这种酶活性对感染力的影响具有非常高的特异性,其他细菌的 α -甘露糖苷酶对 Ct 侵袭能力没有影响。

5.2 巨噬细胞感染增强因子(microphage infectivity potentiator,MIP) MIP 蛋白是 Ct 表面的一种经典脂蛋白,分子量约为 27 kDa,他在不同的血清型 Ct 中高度保守,其结构与嗜肺军团菌 MIP 蛋白及 FK506 结合蛋白相似。研究发现 MIP 蛋白可能与参与衣原体蛋白的运送过程,也与 EB 吸附并穿透宿主细胞相关。现在发现 MIP 蛋白具有较好的免疫原性,彭昕珂等^[45]利用重组蛋白免疫小鼠,发现 MIP 蛋白能够刺激动物产生高滴度的抗体,并且该抗体能够识别 EB,MIP 蛋白还能够降低衣原体的感染,这些结果说明 MIP 能够为抗 Ct 感染提供免疫保护作用。利用 MIP 蛋白处理巨噬细胞,发现 MIP 蛋白可识别 TLR2 /TLR1 /TLR6 受体及 CD14,同时能刺激巨噬细胞分泌前促炎症细胞因子,并且其活性要高于 Ct 的 LPS、MOMP 和 HSP60 等致炎因子,这表明 MIP 蛋白可能在衣原体感染所致的炎症病理反应中起重要功能^[46]。

5.3 多态膜蛋白(polymorphic membrane protein,PMP) PMP 是位于 Ct 外膜上的一个独特的蛋白家族,研究发现 PMP 蛋白在 Ct 中具有黏附、转运以及信号传导等多种功能,并与衣原体的诱导免疫应答密切相关^[47];Ct 中共有 9 种不同 PMP 基因,分别命名为

PMPA-PMPF^[48]; PMP 基因具有明显的多态性, 利用 SNP 分析, 发现 PMP 蛋白的多态性要明显高于 MOMP 蛋白。PMPF 蛋白的分子量大小约为 112 kDa, 利用生物信息学分析发现该蛋白含有 14 个 B 细胞的优势表位, 但是其具体的免疫活性还需要进一步研究^[49]。

5.4 CT135 Sturdevant 等^[50]在研究中发现 Ct135 基因是 Ct 一个新的毒力因子, 在传代较多的血清型 Ct 基因组中的 Ct135 基因具有较高程度的多态性, 而在传代次数较少及性病淋巴肉芽肿 Ct 亚型中该基因不显示或者极少的多态性, 在传代过程中发现 Ct135 会发生无义突变, 并使 Ct 获得生长优势。现在认为 Ct135 基因可能在维持 Ct 慢性及持续感染中起重要作用^[51]。

6 展 望

Ct 是专性细胞内寄生的微生物, 他感染人类后会 导致女性宫颈炎、输卵管炎、盆腔炎、子宫内膜炎以及 异位妊娠等多种疾病。临床上 Ct 都是以低毒力, 多部 位及与其他病原菌混合感染为主。虽然有文献报道 mRNA 疫苗在抗衣原体感染方面具有一定潜在应用价值^[52], 但迄今还没有研制出临床可以使用的 Ct 疫苗。Ct 与宿主相互作用的过程非常复杂, 其致病机制也没有完全研究清楚。虽然现在对衣原体的热休克蛋白, 分泌蛋白, 质粒蛋白等多种可能的毒力因子做出了一系列的研究, 由于目前对于 Ct 的致病机制研究通常都 采用小鼠模型, 但是小鼠本身的固有免疫应答导致其 不易感染 Ct, 或者容易造成 Ct 的毒力基因缺失或者失 活, 现在所鉴定的毒力蛋白是否真正地参与 Ct 致病过程 还需要进一步的研究。因此关于 Ct 的毒力因子与 宿主细胞间的相互作用及机制的研究对于预防和控制 Ct 所致的疾病具有重要意义。

参考文献

- [1] 刘小平, 樊尚荣, 陈晓明, 等. 荧光标记 MOMP 抗体检测沙眼衣原体的方法及性能评价[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(3):858-248.
- [2] 梁君, 莫卓鼎, 吴锡宇. 2011—2020 年广东省湛江市性病流行特征分析[J]. 实用预防医学, 2022, 29(7):852-855.
- [3] 郭莞, 陈超群. 沙眼衣原体黏附和入侵宿主机制的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(1):114-117.
- [4] Cappello F, Mazzola M, Jurjus A, et al. Hsp60 as a novel target in IBD management: a prospect[J]. Front Pharmacol, 2019, 10(5):26-32.
- [5] Cappello F, Conway de Macario E, Di Felice V, et al. *Chlamydia trachomatis* infection and anti-HSP60 immunity: the two sides of the coin[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(8):e1000552.
- [6] 王作鹏, 林文军, 金晓兰, 等. 沙眼衣原体热休克蛋白 60 的 B 细胞表位预测及分析[J]. 温州医学科学院学报, 2010, 40(5):437-

- 440.
- [7] Linhares IM, Witkin SS. Immunopathogenic consequences of *Chlamydia trachomatis* 60 kDa heat shock protein expression in the female reproductive tract[J]. Cell Stress Chaperones, 2010, 15(5):467-473.
- [8] Arsovic A, Nikolov A, Szadzanovic P, et al. Prevalence and diagnostic significance of specific IgA and anti-heat shock protein 60 *Chlamydia trachomatis* antibodies in subfertile women[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(5):761-766.
- [9] Bax CJ, Dorr PJ, Trimbo JB, et al. *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 (c HSP60) antibodies in women without and with tubal pathology using a new commercially available assay[J]. Sex Transm Infect, 2004, 80(5):415-416.
- [10] 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):1159-1161.
- [11] 杨艳华, 肖光文, 罗晓东. 输卵管性不孕患者与生殖道感染不同沙眼衣原体基因型和 c HSP60 表达水平的相关性初步研究[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(1):26-28.
- [12] Wei YR. Related research of heat shock protein[J]. J Clin Med, 2016, 3(40):8076-8077.
- [13] Zhang HY, Lu JC. Cloning and sequence analysis of *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 10[J]. Zhonghua Nan Ke Xue, 2003, 9(9):687-689.
- [14] 张红焯, 陆金春, 黄宇烽. 沙眼衣原体热休克蛋白与女性不孕的研究进展[J]. 生殖与避孕, 2004, 24(2):113-118.
- [15] Betsou F, Borrego MJ, Guillaume N, et al. Cross-reactivity between *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 10 and early pregnancy factor[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(3):446-450.
- [16] Raulston JE, Davis CH, Paul TR, et al. Surface accessibility of the 70-kilodalton *Chlamydia trachomatis* heat shock protein following reduction of outer membrane protein disulfide bonds[J]. Infect Immun, 2002, 70(2):535-543.
- [17] Birkelund S, Larsen B, Holm A, et al. Characterization of a linear epitope on *Chlamydia trachomatis* serovar L2 DnaK-like protein[J]. Infect Immun, 1994, 62(5):2051-2057.
- [18] 杨源, 王慧, 王军, 等. 绵羊肺炎支原体 Hsp70 蛋白 C 末端基因真核表达载体的构建[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(12):59-63.
- [19] 李明洋, 魏荷婷, 陈天枫, 等. E 型沙眼衣原体主要外膜蛋白多克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(9):1014-1022.
- [20] 阿曼古丽·牙生, 兰希, 伊慧霞, 等. 沙眼衣原体主要外膜蛋白抗原的二级结构及 B、T 细胞表位分析[J]. 山东医药, 2016, 56(23):20-23.
- [21] He W, Felderman M, Evans AC, et al. Cell-free production of a functional oligomeric form of a *Chlamydia* major outer-membrane protein (MOMP) for vaccine development[J]. J Biol Chem, 2017, 292(36):15121-15132.
- [22] Jiang P, Cai Y, Chen J, et al. Evaluation of tandem *Chlamydia trachomatis* MOMP multi-epitopes vaccine in BALB/c mice model

- [J]. Vaccine, 2017, 35(23):3096-3103.
- [23] Tu J, Hou B, Wang B, et al. A multi-epitope vaccine based on *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein induces specific immunity in mice [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014, 46(5):401-408.
- [24] 张凯, 李凡飞, 何小丽, 等. 衣原体毒力因子研究进展[J]. 动物医学进展, 2018, 39(5):94-97.
- [25] Cingolani G, McCauley M, Lobley A, et al. Structural basis for the homotypic fusion of chlamydial inclusions by the SNARE-like protein IncA [J]. Nat Commun, 2019, 10(1):1-12.
- [26] Hackstadt T, Scidmore-Carlson MA, Shaw EI, et al. The *Chlamydia trachomatis* IncA protein is required for homotypic vesicle fusion [J]. Cell Microbiol, 1999, 1(2):119-130.
- [27] Ronzone E, Paumet F. Two coiled-coil domains of *Chlamydia trachomatis* INCA affect membrane fusion events during infection [J]. PLoS One, 2013, 8(7):e69769.
- [28] Kostjukova ES, Lazarev VN, Titova GA, et al. Expression of *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein genes INCB and INCC in *Escherichia coli* [J]. Biochemistry (Mosc), 2006, 71(3):262-269.
- [29] Kumagai K, Elwell CA, Ando S, et al. Both the N- and C-terminal regions of the Chlamydial inclusion protein D (IncD) are required for interaction with the pleckstrin homology domain of the ceramide transport protein CERT [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(4):1070-1076.
- [30] Scidmore MA, Hackstadt T. Mammalian 14-3-3 β associates with the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane via its interaction with INCG [J]. Mol Microbiol, 2001, 39(6):1638-1650.
- [31] 李忠玉, 黄秋林, 栗盛梅, 等. 假定蛋白 CT440 在沙眼衣原体感染细胞中的定位研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(1):64-70.
- [32] Brinkworth AJ, Malcolm DS, Pedrosa AT, et al. *Chlamydia trachomatis* Sle1 is a type III secretion chaperone that enhances the translocation of its invasion effector substrate TARP [J]. Mol Microbiol, 2011, 82(1):131-144.
- [33] Yang Z, Tang L, Zhou Z, et al. Neutralizing antichlamydial activity of complement by Chlamydia-secreted protease CPAF [J]. Microbes Infect, 2016, 18(11):669-674.
- [34] Sharma J, Bosnic AM, Piper JM, et al. Human antibody responses to a Chlamydia-secreted protease factor [J]. Infect Immun, 2004, 72(12):7164-7171.
- [35] Galaldeen A, Taylor AB, Chen D, et al. Structure of the *Chlamydia trachomatis* immunodominant antigen PGP3 [J]. J Biol Chem, 2013, 288(30):22068-22079.
- [36] 李忠玉, 汪世平, 吴移谋, 等. 沙眼衣原体质粒蛋白 pORF5 核酸疫苗抗衣原体生殖道感染免疫保护作用 [J]. 中国科学, 2008, 38(9):865-872.
- [37] 陆春雪, 吴移谋, 彭波, 等. 沙眼衣原体分泌性蛋白 PGP3 滴鼻免疫增强小鼠对衣原体生殖道感染的保护作用 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(2):226-236.
- [38] Horner PJ, Wills GS, Righarts A, et al. *Chlamydia trachomatis* PGP3 antibody persists and correlates with self-reported infection and behavioural risks in a blinded cohort study [J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0151497.
- [39] Woodhall SC, Wills GS, Horner PJ, et al. *Chlamydia trachomatis* PGP3 antibody population seroprevalence before and during an era of widespread opportunistic Chlamydia screening in England (1994-2012) [J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0152810.
- [40] 李忠玉, 吴移谋, 黄秋林, 等. 沙眼衣原体 pORF5 质粒蛋白单克隆抗体 2H4 的纯化及其免疫学特性研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(11):1041-1045.
- [41] Zhou H, Huang Q, Li Z, et al. PORF5 plasmid protein of *Chlamydia trachomatis* induces MAPK-mediated pro-inflammatory cytokines via TLR2 activation in THP-1 cells [J]. Sci China Life Sci, 2013, 56(5):460-466.
- [42] Shu M, Lei W, Su S, et al. *Chlamydia trachomatis* Pap3 protein regulates oxidative stress via activation of the Nrf2/NQO1 signal pathway [J]. Life Sci, 2021, 277:119502-119502.
- [43] Song L, Carlson JH, Whitmire WM, et al. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded PGP4 is a transcriptional regulator of virulence-associated genes [J]. Infect Immun, 2013, 81(3):636-644.
- [44] Wang ZY, Fu GY, Wang SM, et al. Rapid screening for *Chlamydia trachomatis* infection by detecting α -mannosidase activity in urogenital tract specimens [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13:e36.
- [45] 彭昕珂, 彭波, 陈超群, 等. 沙眼衣原体 MIP 蛋白的原核表达、纯化及免疫学特性鉴定 [J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(6):625-629.
- [46] Bas S, Neff L, Vuillet M, et al. The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14 [J]. J Immunol, 2008, 180(2):1158-1168.
- [47] Vasilevsky S, Stojanov M, Greub G, et al. Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function and potential vaccine candidates [J]. Virulence, 2016, 7(1):11-22.
- [48] Nunes A, Gomes JP, Karunakaran KP, et al. Bioinformatic analysis of *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane proteins PMPE, PMPF, PMPG and PMPH as potential vaccine antigens [J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0131695.
- [49] 常月立, 张彦霞, 乔海霞, 等. 沙眼衣原体多态膜蛋白 PMPF 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 28(9):786-791.
- [50] Sturdevant GL, Kari L, Gardner DJ, et al. Frameshift mutations in a single novel virulence factor alter the *in vivo* pathogenicity of *Chlamydia trachomatis* for the female murine genital tract [J]. Infect Immun, 2010, 78(9):3660-3668.
- [51] 孙志会, 罗声栋, 何泽民, 等. 沙眼衣原体 CT135 蛋白的表达与抗体制备 [J]. 生物技术通讯, 2020, 31(1):19-23.
- [52] 金盈圻, 王宗保, 王川. 衣原体 mRNA 疫苗的研发对策与展望 [J]. 中国人兽共患学报, 2022, 38(4):349-358.