



衣原体毒力因子研究进展

张 凯, 李凡飞, 何小丽, 王文佳, 程 成, 张 超, 许立华*

(宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021)

摘 要:衣原体(*Chlamydia*)是一类专性细胞内寄生、具有独特的双相型发育周期的原核微生物,对人和多种畜禽有致病性。研究表明,衣原体的致病性是其毒力因子与宿主细胞的相互作用导致。论文通过对国内外许多学者关于衣原体致病机制和毒力因子的研究进行总结梳理,阐述主要外膜蛋白(MOMP)、多形态膜蛋白(Pmps)、Ⅲ型分泌系统(T3SS)、脂多糖(LPS)、热休克蛋白(HSP)、质粒和蛋白酶样活性因子(CPAF)在衣原体的致病性方面发挥的主要作用。

关键词:衣原体;致病性;毒力因子

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2018.05.018

中图分类号:S852.67

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2018)05-0094-04

衣原体(*Chlamydia*)属于专性细胞内寄生的革兰阴性菌,菌体大小 $0.2\ \mu\text{m}\sim 1.0\ \mu\text{m}$,全基因组大小为 1.1 Mbp 左右,是一类人兽共患传染病病原。动物感染衣原体后,主要引起患病动物生殖器官、关节、结膜、肺脏和肠道等部位发生持续感染、反复感染或隐性感染^[1]。衣原体具有独特的双相型发育周期,一种是具有感染性,存在于细胞外非繁殖型的原体(EB),另一种是不具有感染性,存在于细胞内繁殖型的始体(RB)。EB 与 RB 的转化过程就是衣原体感染增殖的过程。截至目前,衣原体属包含 11 个种,即鹦鹉热衣原体(*C. psittaci*)、沙眼衣原体(*C. trachomatis*)、猫衣原体(*C. felis*)、猪衣原体(*C. suis*)、流产衣原体(*C. adortus*)、鼠衣原体(*C. muridarum*)、肺炎衣原体(*C. pneumoniae*)、豚鼠衣原体(*C. caviae*)、反刍动物衣原体(*C. pecorum*),以及鸟衣原体(*C. avium*)和家禽衣原体(*C. galinacea*)^[2]。

作为一种专性细胞内寄生的原核微生物,衣原体进入真核细胞后利用宿主细胞营养,加之其具有双相发育周期,增殖在 RB 包涵体中,不仅能够躲避宿主细胞的免疫防御机制,还能避免被溶酶体消化,在细胞内的繁殖发育可以受到一定的保护。到目前为止,衣原体的致病机制尚不清楚,研究者正通过研究衣原体毒力因子与宿主细胞的相互作用来了解衣原体致病过程。从目前的研究发现,主要外膜蛋白(MOMP)、多形态膜蛋白(Pmps)、Ⅲ型分泌系统

(T3SS)、脂多糖(LPS)、热休克蛋白(HSP)、质粒及蛋白酶样活性因子(CPAF)在衣原体致病过程中起重要作用。

1 主要外膜蛋白

衣原体主要外膜蛋白(MOMP)占膜蛋白总量的 60%以上,分子量约为 40 ku。MOMP 由 ompA 结构基因编码,当前衣原体的基因分型主要是用 ompA 基因当作靶基因来构建^[3]。MOMP 由暴露在表面的 4 个亲水可变区(VD1-VD4)和 5 个内部疏水保守区(CD1-CD5)组成,可变区位于保守区之间。其中 VD1 和 VD2 有丰富的 T 细胞表位,而 VD4 含有丰富的 T 细胞表位和 B 细胞表位,能够诱导产生特异性的细胞免疫和体液免疫^[4]。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。在 RB 繁殖期间,MOMP 主要执行孔蛋白的功能,为衣原体的发育提供必要的物质转运^[5]。由此可见,MOMP 对于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。

2 多形态膜蛋白

对于衣原体这种胞内寄生菌,感染宿主细胞最重要的步骤之一是黏附蛋白与宿主细胞的相互作用。目前已经鉴定了衣原体的几种黏附蛋白,包括 MOMP、HSP、外膜复合物 B(OmcB)和多态性膜蛋

收稿日期:2017-08-24

基金项目:宁夏“优质高产奶牛遗传改良与选育”专项(2013NYYZ0501);国家自然科学基金项目(31560687,31760722)

作者简介:张 凯(1993—),男,陕西渭南人,硕士研究生,主要从事兽医微生物学与免疫学研究。*通讯作者

白(Pmps)。Pmps 是衣原体特有的一类膜结合蛋白,之前被称为 90 ku 蛋白族。Pmps 在鹦鹉热衣原体中首先被发现,随后的研究发现衣原体属的其他成员也存在 Pmps。Pmps 含有多种基因簇,例如:沙眼衣原体含有 9 种 Pmps 基因,其编码的蛋白包括(PmpA-pmpI)9 种蛋白。而肺炎衣原体和流产衣原体分别有 21 种和 18 种 Pmps 基因^[6]。衣原体在感染循环期间或应激反应中 Pmps 基因的表达有所不同。许多研究表明,Pmps 可作为自动转运系统,因其含有 3 个功能域,包括可在膜表面易位的 GG(A、I、L、V、Y)和 FXXN 四肽型 N 末端结构域、用于表面定位或分泌的结构域和 C 末端 β 桶型外膜转位定位结构域^[7]。有研究表明,通过激活核转录因子 NF- κ B、Pmps 能够诱导感染细胞中的先天免疫反应,包括产生 IL-8、IL-6 和单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)等^[8]。在沙眼衣原体中,PmpB、PmpC、PmpD 和 PmpI 是引起炎症性疾病中最强免疫应答的蛋白质。综上所述,Pmps 作为具有自动转运系统的黏附蛋白,不仅与 MOMP 一样对衣原体的新陈代谢和感染性相关,而且可以使宿主细胞发生炎症反应。

3 III 型分泌系统

目前研究发现革兰阴性菌含有 6 种入侵宿主细胞的特异性分泌系统(I-VI 型)。其中最关键的便是细菌 III 型分泌系统(T3SS)。不像其他病原体的 T3SS 是由组合在一起的毒力岛编码,衣原体科的成员拥有至少 13 个分布在整个染色体上的基因与其 T3SS 相关,并且与鞭毛系统具有很高同源性^[9]。T3SS 呈“注射器状”存在于衣原体膜上,整个装置横跨衣原体膜内外,注射装置伸向宿主细胞。其主要由装置蛋白、效应蛋白、调节蛋白、分子伴侣四部分构成。在沙眼衣原体中,5 种蛋白质与衣原体 T3SS 结构相关:CT671 是针头分子尺,CT860 和 CT579 易位元件,CT665 和 CT667 为分子伴侣调节针头聚合^[10]。T3SS 的致病作用主要是通过向宿主细胞释放其效应蛋白(T3SE)来实现。在衣原体中,易位性复原活动磷酸化蛋白(TarP)、外膜蛋白 CopN 和包涵体膜蛋白(Incs)等是主要的 T3SE,它们在早期被递送到宿主细胞中发挥作用^[11]。在衣原体感染过程中,T3SS 定植在宿主细胞的质膜上并将 T3SE 直接通过其注射器状结构注射到宿主细胞胞质,调节宿主细胞结构并干扰免疫信号传导,从而影响正常细胞器功能及免疫应答,导致宿主细胞新陈代谢和免疫反应紊乱。

4 脂多糖

像大多数革兰阴性菌一样,衣原体外膜最外层

还存在着一种脂多糖(LPS)。LPS 是革兰阴性菌致病的关键因子,可激活多种炎症细胞释放炎症介质引起炎症反应,还能导致机体微循环功能紊乱,造成机体器官损伤和休克等病症的发生。衣原体脂多糖(cLPS)由一个 3-脱氧-D-甘露-2-辛酮糖乙酸脂(KDO)的核心与脂质 A 连接而成。cLPS 对衣原体 EB 期的感染性起关键作用。cLPS 缺失,EB 无感染性^[12]。研究发现,感染期间 cLPS 从受染细胞中释放。cLPS 结合可溶性 CD14 受体(sCD14)与脂多糖结合蛋白(LBP)结合形成 cLPS 复合物^[13]。cLPS 复合物通过细胞膜结合的 mCD14 激活单核细胞和巨噬细胞以产生肿瘤坏死因子(TNF- α)、IL-1 和 IL-6,这些细胞因子导致合成应激反应物。作为革兰阴性菌致病关键因子,cLPS 通过对衣原体感染性起作用并通过刺激产生炎症因子和应激反应物,对机体造成病理损伤。

5 热休克蛋白

衣原体感染主要是由于慢性炎症造成组织损伤。研究发现衣原体热休克蛋白 HSP60(GroEL 或 GroEL1)、HSP10(GroES)和 HSP70(DnaK)与这种有害的宿主免疫应答相关。在衣原体发育周期中,衣原体热休克基因受感染细胞内转录因子 HrcA 的调控^[14]。肺炎衣原体的 HSP60 在 EB 表面上表达,作为主要的黏附蛋白,在肺炎衣原体相关疾病的发病机理中起重要作用。在炎症期间,HSP60 可能引发血管细胞、单核细胞和树突状细胞中 IL-6、IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 的分泌^[15]。肺炎衣原体 HSP60 不但与冠状动脉疾病患者动脉粥样硬化斑块中的凋亡信号通路有关,而且其通过降低血管内皮祖细胞的功能来抑制新血管形成^[16]。Kang Y 等^[17]将肺炎衣原体 HSP60 注入正常小鼠与 MAPK 激酶 3(MKK3)敲除小鼠,发现 MKK3 敲除小鼠的肺部中性粒细胞和促炎介质减少,证实了 MKK3 在 HSP60 诱导的肺部炎症起到的关键作用。作为衣原体的保护性蛋白,HSP 通过黏附、介导产生促炎细胞因子,使机体诱发炎症反应。

6 质粒

在沙眼衣原体、鼠衣原体和鹦鹉热衣原体中都含有一个隐蔽质粒,衣原体质粒是一个分子质量约为 7.5 kb、基因序列高度保守的非整合 DNA 分子。衣原体质粒有 8 个开放阅读框,分别编码 8 种不同的糖蛋白(pGP1-pGP8)。其中,pGP3 分子质量约为 28 ku,可能直接被分泌到宿主细胞胞质,引起宿主的免疫应答反应。pGP4 和 pGP5 可以调节衣原

体染色体基因的表达,而其他则为衣原体质粒维持自身功能的蛋白^[18]。研究发现,pGP3 由可以结合并中和由上皮细胞和白细胞分泌的抗菌肽 LL-37,参与免疫逃避^[19]。pGP3 可通过激活 NALP3 炎性体和 p38/MAPK 途径诱导产生 IL-1 β 和 IL-18^[20]。Zhou H 等^[21]研究发现,沙眼衣原体 pGP3 还可通过 THP-1 细胞中的 TLR2 活化诱导 MAPK 介导产生与输卵管积水有关的促炎细胞因子。研究发现质粒缺失的鼠衣原体相比鼠衣原体正常株从生殖道传播到消化道的数量大大减少^[22]。证实了质粒对于鼠衣原体定植在消化道起到重要作用。由此可见,衣原体质粒不仅参与免疫逃避,还与消化道的定植及炎症反应有关。

7 蛋白酶样活性因子

衣原体蛋白酶样活性因子(CPAF)是分泌到宿主细胞胞质中保守的丝氨酸蛋白酶,在免疫逃避中起重要作用。功能性的 CPAF 是由 N 末端 35 ku(CPAFn)和 C 末端 29 ku(CPAFc)的亚基组成的二聚体结构蛋白,分子质量约 70 ku。CPAF 通过 T2SS 介导分泌进入宿主细胞胞质^[23]。CPAF 不仅能降解转录因子 NF- κ B/p65 和自适应转录因子 USF-1 和 RFX5 蛋白,还能维持病原体囊泡完整性。RFX5 为 MHC I 区和 β 2 微球蛋白启动子激活物,而 USF-1 可以激活 IFN- γ 诱导的 MHC II 区基因的表达,USF-1 和 RFX5 被 CPAF 降解使 MHC 分子的表达受到限制,使抗原的呈递受限,阻碍了机体免疫系统对衣原体的识别而引起的免疫应答,导致免疫逃逸的形成^[24]。另外,CPAF 还可降解由上皮细胞表达的糖蛋白 CD1d,引起细胞表面 CD1d 降低,阻碍其通过 NK 和 NKT 细胞发生先天免疫应答,从而有利于衣原体的免疫逃避和持续性感染^[25]。研究发现,沙眼衣原体 CPAF 缺乏株不能够在小鼠生殖道存活,而沙眼衣原体含 CPAF 野生株却可以在小鼠生殖道存活 3 周以上^[26]。证实了 CPAF 促进沙眼衣原体在小鼠生殖道中存活。采用蛋白质组学方法分析沙眼衣原体 CPAF 缺乏株和正常含 CPAF 野生株感染人上皮细胞,发现 CPAF 和 T3SE 合作抑制宿主先天免疫^[27]。其机理为 CPAF 与 T3SE 合作阻断 NF- κ B/p65 转录因子,导致 IFN- β 和促炎细胞因子合成减少。因此,CPAF 不仅对衣原体的免疫逃避至关重要,而且衣原体的定植和持续性感染起到一定的作用。

8 讨论

衣原体这种独特的病原体利用其毒力因子来建

立细胞内的生存环境并干扰宿主的免疫应答。因此,了解衣原体如何黏附进入细胞、如何在细胞内的环境中生存,就能够揭示其对宿主的致病作用。虽然有很多的研究者都在研究衣原体的致病机理,但是摆在人们面前的任务还很艰巨。由于衣原体种类繁多且具有宿主特异性,而且其毒力因子在激活机体的免疫机制过程中的相互作用并没有研究清楚。因此,要搞清楚衣原体的致病机理,还需要用进一步的试验和数据来验证。我国自 1956 年病毒学家汤飞凡采用鸡胚卵黄囊接种法在世界上首次分离到沙眼衣原体后,越来越多的研究者便开始了衣原体的研究。目前,我国已在衣原体疫苗、检测方法等领域取得一些成果^[28]。随着功能基因组学、蛋白质组学、遗传组学和基因编辑等新技术的发展,为我们在研究衣原体致病机理上提供了新的思路和方法。利用毒力基因敲除和功能基因组学等方法将帮助我们解决某些 T3SE 以及其他毒力因子的功能问题。加之细胞培养技术和动物模型的改进,将了解衣原体这一具有独特发育周期的专性细胞内寄生病原体提供更好的条件。

参考文献:

- [1] Park S T, Lee S W, Min J K, et al. Clinical characteristics of genital *Chlamydia* infection in pelvic inflammatory disease[J]. *Bmc Womens Health*, 2017, 17(1): 5.
- [2] Sachse K, Laroucau K, Riege K, et al. Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinaceae* sp. Nov.[J]. *Systematic Appl Microbiol*, 2014, 37(2): 79-88.
- [3] Hadad R, Marks E, Kalbina I, et al. Protection against genital tract *Chlamydia trachomatis* infection following intranasal immunization with a novel recombinant MOMP VS2/4 antigen [J]. *Apmis Acta Pathol Microbiol Et Immunol Scandinavica*, 2016, 124(12): 1078.
- [4] Zhu S, Feng Y, Rao P, et al. Hepatitis B virus surface antigen as delivery vector can enhance *Chlamydia trachomatis* MOMP multi-epitope immune response in mice[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(9): 4107.
- [5] Desclozeaux M, Robbins A, Jelocnik M, et al. Immunization of a wild koala population with a recombinant *Chlamydia pecorum* major outer membrane protein (MOMP) or polymorphic membrane protein (PMP) based vaccine: New insights into immune response, protection and clearance[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178786.
- [6] Van L S, Creasy H H, Myers G S, et al. The number, organization, and size of polymorphic membrane protein coding sequences as well as the most conserved Pmp protein differ within and across *Chlamydia* species[J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(5): 333-344.
- [7] Luczak S E, Smits S H, Decker C, et al. The *Chlamydia pneu-*

- moniae* adhesin Pmp21 forms oligomers with adhesive properties[J]. J Biol Chem, 2016, 291(43): 22806-22818.
- [8] 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.
- [9] Dumoux M, Nans A, Saibil H R, et al. Making connections: snapshots of chlamydial type III secretion systems in contact with host membranes[J]. Curr Opin in Microbiol, 2015, 23: 1-7.
- [10] Muschiol S, Boncompain G, Vromman F, et al. Identification of a family of effectors secreted by the type III secretion system that are conserved in pathogenic Chlamydiae[J]. Infect Immun, 2011, 79(2): 571.
- [11] Cunha M D, Pais S V, Bugalhão J N, et al. The *Chlamydia trachomatis* type III secretion substrates CT142, CT143 and CT144 are secreted into the lumen of the inclusion[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0178856.
- [12] Nguyen B D, Cunningham D, Liang X, et al. Lipooligosaccharide is required for the generation of infectious elementary bodies in *Chlamydia trachomatis* [J]. Proceed Nat Acad Sci USA, 2011, 108(25): 10284-10289.
- [13] Vikatmaa P, Lajunen T, Ikonen T S, et al. Chlamydial lipopolysaccharide (cLPS) is present in atherosclerotic and aneurysmal arterial wall-cLPS levels depend on disease manifestation [J]. Cardiovas Pathol, 2010, 19(1): 48.
- [14] Hanson B R, Tan M. Transcriptional regulation of the *Chlamydia* heat shock stress response in an intracellular infection[J]. Mol Microbiol, 2015, 97(6): 1158-1167.
- [15] Haranaga S, Yamaguchi H, Friedman H, et al. *Chlamydia pneumoniae* infects and multiplies in lymphocytes in vitro[J]. Infect Immun, 2001, 69(12): 7753.
- [16] Rabczyński M, Fiodorenkodumas Ž, Mastej K, et al. A relationship between serological markers of chronic *C. pneumoniae* and CMV infection and hsp60 in patients with atherosclerotic carotid stenosis [J]. Acta Biochimica Polonica, 2015, 62(1): 89-95.
- [17] Kang Y, Wang F, Lu Z, et al. MAPK kinase 3 potentiates *Chlamydia* HSP60-induced inflammatory response through distinct activation of NF-κB[J]. J Immunol, 2013, 191(1): 386-394.
- [18] Zhong G. Chlamydial plasmid-dependent pathogenicity [J]. Trends Microbiol, 2017, 25: 141-152.
- [19] Hou S, Dong X, Yang Z, et al. Chlamydial plasmid-encoded virulence factor Pgp3 neutralizes the antichlamydial activity of human cathelicidin LL-37 [J]. Infect Immun, 2015, 83(12): 4701-4709.
- [20] Cao W, Zou Y, Su S, et al. Chlamydial plasmid-encoded protein pORF5 induces production of IL-1β and IL-18 via NALP3 inflammasome activation and p38 MAPK pathway[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20368-20379.
- [21] Hui Z, Huang Q L, Li Z Y, 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.
- [22] Shao L, Melero J, Zhang N, et al. The cryptic plasmid is more important for *Chlamydia muridarum* to colonize the mouse gastrointestinal tract than to infect the genital tract[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177691.
- [23] Yang Z, Tang L, Sun X, et al. Characterization of CPAF critical residues and secretion during *Chlamydia trachomatis* infection[J]. Infect Immun, 2015, 83(6): 2234.
- [24] Snaveley E A, Kokes M, Dunn J D, et al. Reassessing the role of the secreted protease CPAF in *Chlamydia trachomatis* infection through genetic approaches[J]. Pathog Dis, 2014, 71(3): 336.
- [25] Kawana K, Quayle A J, Ficarra M, et al. CD1d degradation in *Chlamydia trachomatis*-infected epithelial cells is the result of both cellular and chlamydial proteasomal activity [J]. J Biol Chem, 2007, 282(10): 7368.
- [26] John P M, Stuart M C, Chris G, et al. Chlamydial protease-like activity factor and type III secreted effectors cooperate in inhibition of p65 nuclear translocation [J]. Mbio, 2016, 7(5): e01427-16.
- [27] Yang Z, Tang L, Shao L, et al. The *Chlamydia*-secreted protease CPAF promotes chlamydial survival in the mouse lower genital tract[J]. Infect Immun, 2016, 84(9): 2697.
- [28] 张志君, 周继章. 流产衣原体研究进展 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(4): 102-107.

Progress on Virulence Factors of *Chlamydia*

ZHANG Kai, LI Fan-fei, HE Xiao-li, WANG Wen-Jia, CHENG Cheng, ZHANG Chao, XU Li-hua

(College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia, 750021, China)

Abstract: *Chlamydia* is an obligate intracellular bacterium characterized by a unique biphasic developmental life cycle, which is pathogenic to human and many kinds of animals. Research suggests that the pathogenicity of *Chlamydia* is caused by the interaction of virulence factors with host cells. By summarizing the researches on the pathogenic mechanisms and virulence factors of reported by *Chlamydia* many scholars at home and abroad, this paper expounded that the virulence factors, major outer membrane protein (MOMP), polymorphic membrane protein (Pmps), type III secretion system (T3SS), lipopolysaccharide (LPS), heat shock protein (HSP), plasmid and protease-like activity factor (CPAF), play major the roles in pathogenicity of *Chlamydia*.

Key words: *Chlamydia*; pathogenicity; virulence factor