

衣原体质粒的研究进展

侯淑萍*

(天津医科大学总医院皮肤科 天津 300052)

摘要: 衣原体质粒是一个分子量约为 7.5 kb, 基因序列高度保守, 非整合性的 DNA 分子, 广泛存在于沙眼衣原体的各个血清型中, 鼠衣原体和鸚鵡热衣原体也携带该质粒。近年来, 人们发现衣原体质粒是一种毒力因子, 可以导致小鼠输卵管积水。动物实验显示质粒缺失株可作为减毒活疫苗来预防衣原体感染所致的生殖道和眼睛的病变。不仅如此, 衣原体质粒还是一种有效的基因操纵工具, 可用于沙眼衣原体致病机制的研究。因此, 开展对衣原体质粒的研究具有重要的意义。

关键词: 衣原体质粒, 毒力因子, 减毒活疫苗

Research progress on *Chlamydia* plasmid

HOU Shu-Ping*

(Department of Dermatology and Venereology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

Abstract: *Chlamydia* plasmid is a 7.5 kb, highly conserved, non-integrative DNA molecule present in almost all strains of *Chlamydia trachomatis*, as well as *Chlamydia muridarum* and *Chlamydia psittaci*. Recently, *Chlamydia* plasmid has been considered to be a virulence factor which contributes to mouse oviduct hydrosalpinx. Studies in animal models indicate that plasmid-deficient *Chlamydia* strains function as live attenuated vaccines against genital and ocular *Chlamydia* infections. Nevertheless, *Chlamydia* plasmid is also a potential genetic manipulation tool for revealing *Chlamydia trachomatis* pathogenic mechanism. Therefore, research on *Chlamydia* plasmid is very meaningful.

Keywords: *Chlamydia* plasmid, Virulence factor, Live attenuated vaccines

*通讯作者: ✉: housp_1978@163.com

收稿日期: 2012-12-13; 接受日期: 2013-01-25

衣原体质粒是一个分子量小, 基因序列高度保守的双链环状 DNA 分子。它存在于多个衣原体种中, 其中包括沙眼衣原体及鼠肺炎衣原体。沙眼衣原体引起的泌尿生殖道感染目前居性传播疾病之首^[1], 如不及时治疗, 这种感染将会引起严重的并发症, 如盆腔炎、输卵管积水等, 最终导致异位妊娠以及不孕^[2]。沙眼衣原体常为隐匿性感染, 容易错过诊疗的时机, 导致该疾病的发展和扩散, 引起严重的并发症^[3]。沙眼衣原体疫苗可以有效地控制和预防该疾病^[4], 但目前尚无有效的疫苗问世。而最新研究显示, 鼠肺炎衣原体质粒缺失株作为减毒活疫苗, 可以激发免疫保护反应, 预防输卵管病变的形成^[5]。

沙眼衣原体专性细胞内寄生, 由于缺乏基因操纵工具, 关于沙眼衣原体的致病机制一直不明确。最近的研究显示, 衣原体质粒不仅在衣原体的致病机制中起了决定性的作用, 而且还可作为基因转化工具用来研究衣原体的基因功能。目前衣原体质粒已经成为了衣原体领域的研究焦点。

1 衣原体质粒的特点

沙眼衣原体共有 15 个血清型, 其中 A、B、C 型可以感染眼部引起沙眼^[6]; D-K 型感染泌尿生殖道引起非淋菌性尿道炎; L 型分为 L1、L2、L3 共 3 型, 通过性途径传播感染淋巴结, 导致性病性淋巴肉芽肿。早在 20 世纪 80 年代, 学者们就开始注意到了衣原体质粒。人们发现, 所有的沙眼衣原体血清型均携带一个隐蔽性质粒, 该质粒 7.5 kb, 每个细胞内的拷贝数约为 4-10 个, 几乎是染色体数目的 4 倍^[7]。序列对比分析发现, 沙眼衣原体各血清型质粒序列的同源性高达 69%-99%^[8]。沙眼衣原体质粒编码 8 个开放阅读框架 pORF1-8^[9], 其中 5 个属于附加维修基因, 其余 3 个表达衣原体特异性的蛋白, 但功能尚不明确。除了沙眼衣原体, 该质粒也存在于鼠衣原

体和鸚鵡热衣原体中^[10], 基因序列分析显示, 这 3 种衣原体中的质粒序列也高度保守。此外, 人类的肺炎衣原体中不携带该质粒, 但马的肺炎衣原体及其他的兽类衣原体物种中均携带该质粒^[3]。

2 衣原体质粒的生物学功能

长久以来学者们一直致力于衣原体质粒功能的研究。Donati 等证实质粒编码的基因在感染过程中转录, 他们发现一个 28 kD 的质粒编码蛋白 Pgp3, 可以引起体液和粘膜的免疫反应^[11], 该蛋白在 ELISA 中可被患者血清中的抗体识别, 而在 Western blot 中却不能被识别^[12]。后来, 研究者用编码 pgp3 的质粒 DNA 免疫动物, 发现可以产生保护性免疫反应^[13]。Li 等^[14]也证实 Pgp3 是一个免疫优势抗原, 而且人血清中的抗体对该蛋白的识别取决于它的天然构象, 这就解释了为什么抗体无法在 Western blot 中识别该蛋白。Pgp3 的天然构象是一个稳定的三聚体, 存在于沙眼衣原体的外膜及宿主细胞胞浆中, 该构象可能与其功能紧密相关^[15]。在质粒编码的 8 种蛋白中, 只有 Pgp3 在感染的后期被分泌到宿主细胞胞浆中去^[9]。衣原体染色体基因组也编码了一些分泌蛋白, 它们到达胞浆后将宿主细胞变成“衣原体的工厂”, 为衣原体的生长提供帮助, 因此推测 Pgp3 的功能也是如此。对于其他质粒编码蛋白的研究没有明显的进展, 序列同源性分析显示一个编码产物和 DnaB 解旋酶同源, 还有两个可能和重组酶同源^[10]。由于缺乏合适的研究工具, 对于质粒功能的研究似乎陷入了一个困境, 然而衣原体质粒缺失株的出现却帮助人们逐渐揭开了该质粒的神秘面纱。

3 衣原体质粒缺失株的生物学意义

临床上, 天然产生的衣原体质粒缺失株很难分离, 迄今只报道了 3 株^[16]。但这并不意味着质

粒缺失株真正少见。2006年,在瑞典出现了一种沙眼衣原体突变株的大规模流行^[17],原因是常规的检测沙眼衣原体的两种方法 Abbott m2000 和 Cobas Amplicor/TaqMan48 无法检测到一种发生了基因序列缺失的病原菌,导致临床上许多病例的漏诊,引起了这种突变株的扩散。后来,这种突变株被证实为沙眼衣原体质粒缺失株,这项研究结果也吸引了众多学者对衣原体质粒缺失株的关注。

3.1 衣原体质粒是参与衣原体致病的毒力因子

许多实验室对衣原体质粒缺失株和野生株进行了对比性研究,发现衣原体质粒对衣原体的体内生长起到了重要的作用^[18],但体外的比较未发现太大的区别。Akira 等采用菌斑纯化的方法成功分离出了3株衣原体质粒缺失株。他发现这3株和野生株的区别是包涵体内糖原累积障碍,除此之外,未发现其他的特点^[3]。后来,又有学者对衣原体质粒缺失株进行了深入研究,他们均证实了质粒缺失株中的糖原累积障碍^[10,19]。分析质粒缺失株的转录产物发现,不仅质粒编码的基因转录发生改变,部分位于染色体上的基因转录水平也受到了影响,其中包括负责糖原合成的基因 *glgA*。据此人们推测该质粒可能通过编码的某个基因来调控或者参与到糖原累积的过程中去。

沙眼衣原体的质粒在体内感染中究竟起到了怎样的作用呢?沙眼衣原体质粒缺失株 L2 (25667R)同野生株在体外细胞培养中没有明显差别,但在动物体内,质粒缺失株的感染能力远低于野生株,其 50%感染剂量(ID₅₀)是野生株的 400 倍^[9],这说明衣原体质粒在沙眼衣原体的致病机制中起到了重要的作用,该质粒可能通过表达某种毒力因子,影响衣原体在宿主细胞内的定殖和持续感染。

沙眼衣原体的自然宿主是人类,它虽然能成功感染小鼠的下生殖道,但却不能引起小鼠输卵

管的病变。鼠肺炎衣原体感染小鼠模型的建立为研究质粒在沙眼衣原体致病中的作用提供了巨大的帮助。鼠肺炎衣原体(Mouse pneumonitis MoPn)经证实不仅可以感染小鼠的生殖道,而且还可引起输卵管的病变。O'Connell 等^[16]采用新生霉素处理 MoPn 的方法筛选出了 MoPn 的质粒缺失株 CM972。用同等剂量的 CM972 和 MoPn 感染 C3H/HeJ 小鼠,两者所导致的下生殖道感染病程没有太大的差别;但意想不到的是,MoPn 感染的小鼠组大部分都出现了输卵管积水,而 CM972 感染组的小鼠均未出现输卵管积水^[20]。在这之前已有研究显示 Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2)缺陷的小鼠感染 MoPn 后无法产生输卵管的病变,这说明 TLR2 信号途径直接参与了输卵管病变的形成。O'Connell 等还探索了衣原体质粒和 TLR2 信号途径的关系,发现无论是在体内还是体外,质粒缺失株都不能激活 TLR2 所介导的信号转导途径,结果造成一些炎症因子包括肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor α , TNF- α)及大鼠巨噬细胞炎性蛋白 2 (Macrophage inflammatory protein 2, MIP-2)等生成障碍,而这些炎症因子正是造成输卵管积水的决定性因素。

3.2 衣原体质粒缺失株是可预防病变形成的减毒活疫苗

O'Connell 等对质粒缺失株的免疫保护作用进行了检测^[20]。他们先用 CM972 经阴道感染小鼠,初次感染后第 98 天,用野生株 MoPn 再次感染,结果发现所有经 CM972 初次感染的小鼠均未形成输卵管的积水。检测小鼠的免疫反应发现 CM972 和野生株一样都可以引起 Th1 占主导地位的获得性免疫反应,该反应可以有效预防野生株再次感染所导致的输卵管病变,说明质粒缺失株有望成为一种有效的减毒活疫苗。

3.3 衣原体质粒是一种基因研究工具

众所周知,基因工具的缺乏已经严重阻碍了

衣原体的研究进展。通过质粒将 DNA 片段引入衣原体是个可行的方法, 但是许多研究者的尝试都未获得成功。然而最近的一项研究却带来了令人振奋的消息, Wang 等^[21]构建了一个同时携带有衣原体质粒和大肠杆菌质粒复制起点的载体, 在选择条件下将其导入了沙眼衣原体 L2 中。这无疑是研究衣原体历程中的重大突破。通过这个系统, 研究者们可以研究衣原体质粒及染色体基因组所编码产物的生物学功能, 为阐明致病机制提供了可行性。

4 展望

随着人们对沙眼衣原体危害性认识的提高, 对于该疾病的预防越来越受到重视。衣原体质粒缺失株作为一个潜在的减毒活疫苗已引起了各国学者的关注。事实上, 一株通过化学诱变获得的羊流产衣原体减毒活疫苗已经问世, 而且也被常规用来预防羊的流产了^[22]。Kari 等^[3]也报道了一株沙眼衣原体质粒缺失株在猕猴中的实验, 他们发现该株不仅不能感染眼睛, 而且还可以作为减毒活疫苗来预防野生株所致的沙眼。由此, 我们相信质粒缺失株有望成为沙眼衣原体新一代的疫苗。

综上所述, 沙眼衣原体质粒的研究进展有 3 个: (1) 它是衣原体的毒力因子, 在病原菌定殖、感染及导致输卵管病变的过程中起到重要的作用; (2) 衣原体质粒缺失株作为一种减毒活疫苗可以有效预防衣原体所致的输卵管病变; (3) 该质粒可作为基因操纵工具用来研究沙眼衣原体的致病机制。相信不久的将来, 沙眼衣原体质粒将会给沙眼衣原体研究领域带来革命性的进展。

参考文献

[1] Da Ros CT, Schmitt CS. Global epidemiology of sexually transmitted diseases[J]. Asian Journal of

Andrology, 2008, 10(1): 110–114.

- [2] Den Hartog JE, Morré SA, Land JA. *Chlamydia trachomatis*-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening[J]. Human Reproduction Update, 2006, 12(6): 719–730.
- [3] Rockey DD. Unraveling the basic biology and clinical significance of the chlamydial plasmid[J]. Journal of Experimental Medicine, 2011, 208(11): 2159–2162.
- [4] Southern T, Bess L, Harmon J, et al. Fluorometric high-throughput assay for measuring chlamydial neutralizing antibody[J]. Clinical and Vaccine Immunology: CVI, 2012, 19(11): 1864–1869.
- [5] Riley MM, Zurenski MA, Frazer LC, et al. The recall response induced by genital challenge with *Chlamydia muridarum* protects the oviduct from pathology but not from reinfection[J]. Infection and Immunity, 2012, 80(6): 2194–2203.
- [6] Harding-Esch EM, Edwards T, Sillah A, et al. Active trachoma and ocular *Chlamydia trachomatis* infection in two Gambian regions: on course for elimination by 2020?[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2009, 3(12): e573.
- [7] Pickett MA, Everson JS, Peard PJ, et al. The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt3): 893–903.
- [8] Seth-Smith HM, Harris SR, Persson K, et al. Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain[J]. BioMed Central Genomics, 2009, 10(5): 239.
- [9] Li Z, Chen D, Zhong Y, et al. The chlamydial plasmid-encoded protein *pgp3* is secreted into the cytosol of *Chlamydia*-infected cells[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(8): 3415–3428.
- [10] 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]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(3): 1044–1056.
- [11] Donati M, Sambri V, Comanducci M, et al. DNA immunization with *pgp3* gene of *Chlamydia trachomatis* inhibits the spread of chlamydial infection from the lower to the upper genital tract in C3H/HeN mice[J]. *Vaccine*, 2003, 21(11/12): 1089–1093.
- [12] Comanducci M, Cevenini R, Moroni A, et al. Expression of a plasmid gene of *Chlamydia trachomatis* encoding a novel 28 kDa antigen[J]. *Journal of General Microbiology*, 1993, 139(5): 1083–1092.
- [13] Li Z, Wang S, Wu Y, et al. Immunization with chlamydial plasmid protein pORF5 DNA vaccine induces protective immunity against genital chlamydial infection in mice[J]. *Science in China. Series C, Life Sciences*, 2008, 51(11): 973–980.
- [14] Li Z, Zhong Y, Lei L, et al. Antibodies from women urogenitally infected with *C. trachomatis* predominantly recognized the plasmid protein *pgp3* in a conformation-dependent manner[J]. *BioMed Central Microbiology*, 2008, 8(6): 90–103.
- [15] Chen D, Lei L, Lu C, et al. Characterization of Pgp3, a *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded immunodominant antigen[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(22): 6017–6024.
- [16] O'Connell CM, Nicks KM. A Plasmid-cured *Chlamydia muridarum* strain displays altered plaque morphology and reduced infectivity in cell culture[J]. *Microbiology*, 2006, 152(3): 1601–1607.
- [17] Herrmann B, Törner A, Low N, et al. Emergence and spread of *Chlamydia trachomatis* variant, Sweden[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(9): 1462–1465.
- [18] Russell M, Darville T, Chandra-Kuntal K, et al. Infectivity acts as *in vivo* selection for maintenance of the chlamydial cryptic plasmid[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(1): 98–107.
- [19] Carlson JH, Whitmire WM, Crane DD, et al. The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(6): 2273–2283.
- [20] O'Connell CM, Ingalls RR, Andrews CW Jr, et al. Plasmid-deficient *Chlamydia muridarum* fail to induce immune pathology and protect against oviduct disease[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 179(6): 4027–4034.
- [21] Wang Y, Kahane S, Cutcliffe LT, et al. Development of a transformation system for *Chlamydia trachomatis*: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002258.
- [22] Burall LS, Rodolakis A, Rekiki A, et al. Genomic analysis of an attenuated *Chlamydia abortus* live vaccine strain reveals defects in central metabolism and surface proteins[J]. *Infection and Immunity*, 2009, 77(9): 4161–4167.