

• 综述 •

衣原体质粒蛋白 Pgp3 的研究进展

谈园, 吴移谋

南华大学医学院病原生物学研究所, 衡阳 421001

摘要:衣原体中普遍含有一个 7.5 kb 左右的隐蔽性质粒, 在衣原体物种中高度保守。Pgp3 为该质粒编码的相对分子质量约 28 000 的免疫原性蛋白, 能分泌到宿主细胞胞质中。在衣原体感染期间人类抗体可识别 Pgp3 的天然三聚体结构。Pgp3 在衣原体致病机制中起重要作用, 是诱导输卵管积液的主要毒力因子, 能中和抗菌肽 LL37 的抗衣原体活性, 且其 DNA 疫苗对衣原体感染具有一定的保护作用。本文就 Pgp3 的结构、在衣原体致病中的作用及其在疫苗与诊断抗原方面的应用进行简要概述, 为进一步研究衣原体感染的发病机制及其诊断与预防提供新的思路。

关键词:衣原体; Pgp3; 质粒蛋白; 致病机制

Progress in *Chlamydia* plasmid protein Pgp3

TAN Yuan, WU Yimou

Institution of Pathogenic Biology, Medical College, University of South China, Hengyang 421001, China

Abstract: Pgp3 is one of the products produced by a small (about 7.5 kb) but highly conserved cryptic plasmid contained in some chlamydiae. This protein is secreted into the cytoplasm of the host cells and known as a virulence factor associated with hydrosalpinx. Its native conformation is a triplex that can be recognized by host immune system. Pgp3 can neutralize the antichlamydial activity of human cathelicidin LL37. This review presents current research progress on the structure, pathogenesis and applications of Pgp3, and provides the new sights in chlamydial pathogenesis and vaccine preparation.

Key words: *Chlamydia*; Pgp3; Plasmid protein; Pathogenesis

衣原体是一类专性细胞内寄生、具有独特发育周期的原核细胞型微生物, 能引起人类疾病的有肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*, Cps)和沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)。Cpn 主要引起呼吸道和肺部感染, 通过呼吸道分泌物在人与人之间传播, 可引起 Cpn 社区获得性肺炎等。Cps 能在家禽中引起鸟疫, 一般通过密切接触感染的鸟类而传播, 也可感染人类引起呼吸道感染。Ct 主要感染眼和泌尿生殖道, 可引起沙眼、输卵管性不孕症和性传播

疾病^[1]。

大部分衣原体中含有一个隐蔽性质粒, 基因序列高度保守, 广泛存在于 Ct、Cps 和鼠衣原体(*Chlamydia muridarum*, Cm)各血清型中, 其中以 Ct 和 Cm 质粒的研究较为广泛。Ct 和 Cps 质粒均编码 8 个开放读码框(open reading frame, ORF) ORF1~ORF8, 即特定的 Pgp1~Pgp8; Cm 质粒编码 7 个 ORF。各质粒编码蛋白的功能不同, Pgp7 为质粒维护及体外表型变异的非关键蛋白, Pgp1、Pgp2、Pgp6、Pgp8 为质粒维护和复制所必需, Pgp4、

基金项目: 国家自然科学基金(81671986)

通信作者: 吴移谋

Corresponding author. WU Yimou, E-mail: yimouwu@sina.com

Pgp5 可能参与调控染色体基因的表达^[2-3];而 Pgp3 是唯一能分泌到宿主细胞胞质中的质粒蛋白^[4],在衣原体致病机制中起重要作用,一直以来都是衣原体质粒的研究热点。本文就 Pgp3 的研究进展进行简要介绍。

1 Pgp3 的结构及特征

Ct 的 Pgp3 由 ORF5 编码,又称为 pORF5,由 264 个氨基酸组成。Pgp3 的天然结构为相对分子质量约 84 000 的三聚体,衣原体感染期间人类抗体可识别其三聚体的四级结构^[5]。该蛋白通过二硫键整合到衣原体外膜蛋白复合物与外膜联系,并分泌到包涵体腔内和宿主细胞胞质中。

Galaledeen 等利用单晶 X 线衍射技术确定了 Ct Pgp3 的结构,发现其球状的 C 端结构域(C-terminal domain, CTD)及 N 端结构域(N-terminal domain, NTD)由三重卷曲螺旋连接而成。该三重卷曲螺旋呈中心平行,由特殊的极性与非极性残基对交替而成,形成一种罕见的右手超螺旋结构^[6]。Pgp3 是第 1 个被报道具有一个完全封闭的三叶 β 螺旋结构蛋白。该结构同样出现在原核生物 II 型 DNA 拓扑异构酶中。Pgp3 β 螺旋结构中的一个亚结构类似于 T4 噬菌体 β 螺旋结构的次要纤维蛋白折叠区域,该区域为体内外次要纤维蛋白的三聚反应和折叠所必需^[7]。此外,该结构的 NTD 与腺病毒纤维和补体结构也有相似性。C1q 为构成补体 C1 的重要成分,其补充成分与 Pgp3 CTD 结构高度相似,通过免疫复合物的识别与激发经典补体途径在天然免疫中起重要作用;C1q 能直接触发细胞防御反应,如趋化作用、细胞因子释放、吞噬作用及细胞毒作用^[8]。

Pgp3 的 CTD 具有与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)家族成员相似的折叠结构,最靠近 CTD 的同源染色体包括来自伯克菌的凝集素、C1q 补充成分及部分炭疽杆菌芽孢外壁胶原样蛋白 BclA,均具有生物黏附作用^[6]。而 NTD 由建立在三聚体病毒蛋白样的典型结构性图案串联起来。CTD 的 TNF 样区域与 BclA 蛋白结构相似,BclA 的 NTD 能促使 TNF 样结构域远端定位在外膜,具有黏附作用和免疫原性;Pgp3、Bc2L-C 和 BclA 的 CTD 为与哺乳动物 TNF 超家族成员最相似的细菌同源染色体。此外,噬菌体(PRD1)刺突蛋白也具有类似的 TNF 样区域,该刺突蛋白在宿主细胞的黏附中有重要作用,由此推测 Pgp3 的 CTD

区域可能在宿主细胞识别及触发细胞防御反应中起作用。综上所述,Pgp3 的特殊结构提示其可能在衣原体感染、对宿主细胞黏附及特定免疫应答方面起重要作用。

2 Pgp3 在衣原体致病中的作用

2.1 诱导特定炎症反应

Mosolygó 等体外研究发现 Pgp3 可通过激活细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 和 p38/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路,诱导 THP-1 细胞产生白细胞介素 1β (interleukin 1β, IL-1β)、IL-8、TNF-α 等多种前炎症细胞因子,并证实 Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2) 参与该诱导机制^[9]。p38/MAPK 通路是 MAPK 通路中产生炎症因子的重要信号通道。邓红玉等在不同时间用 pORF5 融合蛋白免疫小鼠,同一时间处死并分离生殖道组织,发现免疫组小鼠输卵管组织中出现不同程度的肿胀和粘连,且小鼠阴道分泌物、脾细胞上清液及血清中 TNF-α、IL-1β 水平均显著高于磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) 对照组^[10]。表明 Pgp3 能损伤小鼠生殖道组织,引起 TNF-α、IL-1β 等特定炎症因子水平升高。

Cao 等用 Pgp3 质粒蛋白处理 THP-1 细胞,发现 Pgp3 能刺激 NALP3(NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) 炎性复合体 mRNA 表达,进一步促进 p38 磷酸化,同时能促进 IL-1β 和 IL-18 呈时间和剂量依赖性的表达^[11]。NALP3 炎性复合体由天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1(cysteine-containing aspartate-specific protease 1, caspase-1)、NALP3 和 ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) 组成,可通过 caspase-1 剪切从而为 IL-1β 和 IL-18 活化提供分子平台^[12]。进一步用 NALP3-siRNA、ASC-siRNA 转染 THP-1 细胞或用 caspase-1 特异性抑制剂预处理 THP-1 细胞,再用 Pgp3 刺激 THP-1 细胞,发现 IL-1β、IL-18 表达均降低,表明 Pgp3 通过激活 NALP3 炎性复合体诱导 THP-1 细胞分泌 IL-1β 和 IL-18;p38 磷酸化水平与对照组相比无明显差异,表明激活 NALP3 对 p38/MAPK 信号通路没有影响;而用 p38 抑制剂预处理细胞,再用 Pgp3 刺激细胞,IL-1β、IL-18 的表达水平均明显下降,提示 Pgp3 激活的 p38/MAPK 信号通路能影响 NALP3

的激活。以上结果表明, Ct Pgp3 能诱导 IL-1 β 、IL-18 等前炎症因子形成, 可能与激活 p38/MAPK 信号通路有关, 且通过 NALP3 炎性复合体酶解形成有活性的 IL-1 β 、IL-18。

2.2 诱导输卵管积液的主要毒力因子

Liu 等分别构建缺失质粒基因 Pgp3、Pgp4 或 Pgp7 的 Cm 转化缺失株, 通过不同部位感染小鼠以诱导输卵管积液^[13]。结果显示, 用 Pgp3 或 Pgp4 缺失的 Cm 转化株感染小鼠均不能导致输卵管积液, 而 Pgp7 缺失的 Cm 转化株能诱导输卵管积液。此外, 与 Ct 相似, Cm 的 Pgp4 也是上调因子, Pgp4 缺失可明显降低 Pgp3 表达, 而 Pgp3 缺失不能显著影响 Pgp4 表达^[14]。同样, Liu 等未在缺失 Pgp4 的 Cm 转化株培养基中检测到 Pgp3 蛋白。Pgp3 缺失还导致下生殖道(lower genital tract, LGT) Cm 数量减少, 在阴道或法氏囊内接种后, 上生殖道(upper genital tract, UGT) 获得的 Cm 数量也有所降低。以上结果表明, Pgp3 不但能诱导小鼠输卵管积液, 是小鼠输卵管积液中的毒力效应因子, 而且是 Cm 在生殖道生存和繁殖的必要因素^[13]。此外, 因为 Pgp3 的天然结构为稳定的三聚体, 其 CTD 类似于 TNF- α 受体结合域^[5], 表明其可能通过激活 TNF 受体 1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1) 信号通路, 促进 Cm 诱导输卵管积液。

2.3 中和抗菌肽 LL37 的抗衣原体活性

衣原体传染性子代原体(elementary body, EB) 分泌到宿主细胞胞质外感染其他细胞, 不可避免会接触富含各种抗菌物质的细胞外环境, 如抗菌肽。其中 LL37 为抗菌肽家族中唯一存在于人体的抗菌肽, 是中性粒细胞特殊颗粒的主要蛋白, 广泛存在于中性粒细胞、单核细胞、子宫颈及阴道鳞状上皮细胞中, 具有一定的趋化作用和抗内毒素作用。Hou 等研究发现, 与单独用抗菌肽 LL37 处理组相比, Pgp3 与 LL37 共同处理组细胞 TNF- α 表达水平显著升高。此外, 用 Pgp3 与衣原体共同处理细胞后, LL37 的表达水平相对降低, 提示 Pgp3 能中和 LL37 调控的抑制衣原体作用。进一步研究表明, 随着 Pgp3 浓度升高, 中和作用增强^[15]。研究还发现, Pgp3 是通过其中间区域(middle region of Pgp3, Pgp3m) 与 LL37 结合形成稳定复合体而中和 LL37 的抗衣原体活性, 再次表明 Pgp3 能解除抗菌肽对衣原体的杀伤, 在衣原体致病中发挥重要作用, 且这种中和作用取决于 Pgp3 的三聚体结构。

2.4 动物模型中的保护作用

近年来, 利用小鼠模型对质粒缺失株展开研究, 衣原体质粒的致病机制有了突破性进展。Sigar 等发现, 通过生殖道或呼吸道感染小鼠后, 相比质粒完整的野生菌, 无质粒的 Ct F 型菌株的毒性和传染性显著降低。表明在小鼠模型中, 质粒缺失能降低 Ct 的毒性及感染性, 而用不含质粒的 Cm 感染小鼠后 Cm 感染量也显著降低^[16-17]。体内研究表明, 衣原体质粒能显著适应并诱导炎症应答, 而缺乏质粒的 Cm 不能诱导免疫病理反应, 故小鼠不会出现输卵管疾病^[18]。综上所述, Cm 和 Ct 固有质粒能调控小鼠及较低等灵长类动物的毒力及感染率, 用质粒蛋白免疫小鼠具有一定的保护作用, 而这种保护作用与衣原体质粒编码的 8 个蛋白有必然联系。

Li 等研究表明, 用 Ct Pgp3 DNA 疫苗免疫小鼠对小鼠生殖道衣原体感染具有保护作用^[19]。Ramsey 等用穿梭载体构建缺失 Pgp3 的 CTL2 型菌株, 经阴道感染小鼠, 研究 Pgp3 在衣原体致病中的作用。结果发现, 相比无质粒的 Ct 菌株, 完整质粒穿梭载体转化的菌株能有效增强感染率并诱导宿主免疫应答, 而进一步构建的 Pgp3 缺失株经小鼠阴道接种后能减少抗体免疫应答和 UGT 组织的感染率及炎性浸润^[20]。Mosolygó 等在小鼠皮下注射重组 Pgp3 和 Pgp4 蛋白, 免疫 3 次并感染 Cm 后, 发现感染小鼠肺组织中衣原体载量显著降低, 同时 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ) 水平降低^[9]; 用免疫小鼠获得的血清在体内外进行 Cm 中和实验, 发现小鼠肺组织中 Cm 数量并未降低, 而从免疫小鼠中分离的 CD4 $^{+}$ 脾脏细胞过继转移后, 小鼠肺组织衣原体载量显著降低。以上结果表明, Pgp3 对衣原体感染有重要作用, 主要表现在诱导炎症反应来抵抗衣原体感染, 对免疫小鼠具有一定的保护作用, 而这种保护作用由 CD4 $^{+}$ 细胞介导。

3 Pgp3 是一种免疫优势抗原

Galaleldeen 等对 Ct 的 Pgp3 结构进行分析, 发现该蛋白中有较多的转角与卷曲结构, 易与抗体嵌合^[6]。由此推测其可能包含相关的优势抗原表位, 具备作为候选疫苗的结构特征。此外, 一种有效的疫苗可能需满足衣原体感染唯一靶点的特征, 并产生保护性免疫应答而无病理性免疫反应。Li 等研究表明, Pgp3 核酸疫苗能减少衣原体在生殖道组织中的繁殖, 并明显减轻衣原体感染小鼠的输卵管局部炎症病理变化, 表明 Pgp3 核酸疫苗对衣原体

感染具有一定的免疫保护作用^[19]。以上结果提示,Pgp3符合有效疫苗的特征,可作为衣原体疫苗的候选抗原。

Pgp3也是一个理想的衣原体特异性免疫抗原,可能成为衣原体检测的候选诊断抗原。高西波等在筛选Ct感染血清学优势蛋白时发现,在Pgp3、CPAF、CT143、CT101、CT694、CT875、CT813、MOMP、IncA和HSP60这10种Ct免疫优势蛋白中,Pgp3、CT694和CT875组合蛋白的血清学实验结果与微量免疫荧光和细胞培养的符合率分别为97.73%(43/44)和92.86%(13/14),该蛋白组合对Ct筛查的灵敏度最高,特异度最强。其中Pgp3的抗原性最强,抗体检出率最高,表明Pgp3可作为衣原体诊断的候选抗原^[21]。Horner等调查发现,用Pgp3双抗原夹心酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测Ct的灵敏度高于传统的间接Pgp3 ELISA,且在大多数感染Ct的妇女体内能检测到Ct特定的Pgp3抗体^[22]。近年来,Pgp3作为抗原检测衣原体感染被广泛应用,并获得世界卫生组织(World Health Organization,WHO)推荐。应用Pgp3抗体检测法开展沙眼流行病学调查,可检测沙眼及倒睫症的二次感染率^[23]。

4 结语

Pgp3是人类感染衣原体期间的免疫优势抗原,在衣原体致病中起重要作用,是研究衣原体致病机制的重点。随着分子生物学与蛋白质组学技术的发展,国内外学者已研究了Ct的Pgp3基因结构和部分功能。在Ct感染的治疗和诊断方面,目前还没有完善的方案,能否利用Pgp3制作Ct疫苗与诊断抗原,从而为Ct感染防治与诊断开辟新的领域,还需进一步对Pgp3疫苗的有效性、安全性、实用性等进行研究。

参考文献

- [1] den Hartog JE, Morré SA, Land JA. Chlamydia trachomatis-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(6): 719-730.
- [2] Song L, Carlson JH, Whitmire WM, Kari L, Virtaneva K, Sturdevant DE, Watkins H, Zhou B, Sturdevant GL, Porcella SF, McClarty G, Caldwell HD. Chlamydia trachomatis plasmid-encoded Pgp4 is a transcriptional regulator of virulence-associated genes [J]. Infect Immun, 2013, 81(3): 636-644.
- [3] Gong S, Yang Z, Lei L, Shen L, Zhong G. Characterization of Chlamydia trachomatis plasmid-encoded open reading frames [J]. J Bacteriol, 2013, 195(17): 3819-3826.
- [4] Li Z, Chen D, Zhong Y, Wang S, Zhong G. The chlamydial plasmid-encoded protein pgp3 is secreted into the cytosol of Chlamydia-infected cells [J]. Infect Immun, 2008, 76(8): 3415-3428.
- [5] Chen D, Lei L, Lu C, Galalelddeen A, Hart PJ, Zhong G. Characterization of pgp3, a Chlamydia trachomatis plasmid-encoded immunodominant antigen [J]. J Bacteriol, 2010, 192(22): 6017-6024.
- [6] Galalelddeen A, Taylor AB, Chen D, Schuermann JP, Holloway SP, Hou S, Gong S, Zhong G, Hart PJ. Structure of the Chlamydia trachomatis immunodominant antigen Pgp3 [J]. J Biol Chem, 2013, 288(30): 22068-22079.
- [7] Boudko SP, Londer YY, Letarov AV, Sernova NV, Engel J, Mesyanzhinov VV. Domain organization, folding and stability of bacteriophage T4 fibrin, a segmented coiled-coil protein [J]. Eur J Biochem, 2002, 269(3): 833-841.
- [8] Ghebrehiwet B, Hosszu KK, Valentino A, Peerschke EI. The C1q family of proteins: insights into the emerging non-traditional functions [J]. Front Immunol, 2012. doi: 10.3389/fimmu.2012.00052.
- [9] Mosolygó T, Szabó AM, Balogh EP, Faludia I, Virókb DP, Endrézsa V, Samuc A, Krenács T, Buriána K. Protection promoted by Pgp3 or Pgp4 against Chlamydia muridarum is mediated by CD4⁺ cells in C57BL/6N mice [J]. Vaccine, 2014, 32(40): 5228-5233.
- [10] 邓红玉,李忠玉,吴移谋,周辉,马康康,陆春雪,钟光明.沙眼衣原体pORF5质粒蛋白诱发小鼠生殖道免疫损伤初步研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2013,33(2):107-111.
- [11] Cao W, Zou Y, Su S, He Z, Liu Y, Huang Q, Li Z. Chlamydial plasmid-encoded protein pORF5 induces production of IL-1 β and IL-18 via NALP3 inflammasome activation and p38 MAPK pathway [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20368-20379.
- [12] Case CL, Shin S, Roy CR. Asc and Ipaf inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to Legionella pneumophila [J]. Infect Immun, 2009, 77(5): 1981-1991.
- [13] Liu Y, Huang Y, Yang Z, Sun Y, Gong S, Hou S, Chen C, Li Z, Liu Q, Wu Y, Baseman J, Zhong G. Plasmid-encoded Pgp3 is a major virulence factor for Chlamydia muridarum to induce hydrosalpinx in mice [J]. Infect Immun, 2014, 82(12): 5327-5335.
- [14] Liu Y, Chen C, Gong S, Hou S, Qi M, Liu Q, Baseman J, Zhong G. Transformation of Chlamydia muridarum reveals a role for Pgp5 in suppression of plasmid-dependent gene expression [J]. J Bacteriol, 2014, 196(5): 989-998.
- [15] Hou S, Dong X, Yang Z, Li Z, Liu Q, Zhong G. Chlamydial plasmid-encoded virulence factor Pgp3

- neutralizes the antichlamydial activity of human cathelicidin LL-37 [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(12): 4701-4709.
- [16] Sigar IM, Schripsema JH, Wang Y, Clarke IN, Cutcliffe LT, Seth-Smith HM, Thomson NR, Bjartling C, Unemo M, Persson K, Ramsey KH. Plasmid deficiency in urogenital isolates of *Chlamydia trachomatis* reduces infectivity and virulence in a mouse model [J]. *Pathog Dis*, 2014, 70(1): 61-69.
- [17] Lei L, Chen J, Hou S, Ding Y, Yang Z, Zeng H, Baseman J, Zhong G. Reduced live organism recovery and lack of hydrosalpinx in mice infected with plasmid-free *Chlamydia muridarum* [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(3): 983-992.
- [18] O'Connell CM, Ingalls RR, Andrews CW Jr, Scurlock AM, Darville T. Plasmid-deficient *Chlamydia muridarum* fail to induce immune pathology and protect against oviduct disease [J]. *J Immunol*, 2007, 179(6): 4027-4034.
- [19] Li Z, Wang S, Wu Y, Zhong G, Chen D. Immunization with chlamydial plasmid protein pORF5 DNA vaccine induces protective immunity against genital chlamydial infection in mice [J]. *Sci China C Life Sci*, 2008, 51(11): 973-980.
- [20] Ramsey KH, Schripsema JH, Smith BJ, Wang Y, Jham BC, O'Hagan KP, Thomson NR, Murthy AK, Skilton RJ, Chu P, Clarke IN. Plasmid CDS5 influences infectivity and virulence in a mouse model of *Chlamydia trachomatis* urogenital infection [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(8): 3341-3349.
- [21] 高西波,肖萌,王敬,刘全忠,齐蔓莉. 沙眼衣原体感染免疫优势蛋白的血清学筛选 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014,34(12):904-907.
- [22] Horner PJ, Wills GS, Righarts A, Vieira S, Kounali D, Samuel D, Winston A, Muir D, Dickson NP, McClure MO. *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.
- [23] Zambrano AI, Sharma S, Crowley K, Dize L, Muñoz BE, Mishra SK, Rotondo LA, Gaydos CA, West SK. The World Health Organization recommendations for trachoma surveillance, experience in Nepal and added benefit of testing for antibodies to *Chlamydia trachomatis* pgp3 protein: NESTS Study [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(9): e0005003.

(收稿日期:2016-09-01)