

# 衣原体噬菌体的研究进展

马璟玥 刘全忠\*

(天津医科大学总医院皮肤性病科 天津 300052)

**摘要:** 噬菌体是一类细菌依赖性的病毒, 又称细菌病毒, 能在细菌体内快速增殖。现已发现 6 种衣原体噬菌体 Chp1、Chp2、Chp3、Chp4、CPAR39、PhiCPG1。衣壳蛋白 Vp1、Vp2、Vp3 是衣原体噬菌体的 3 种主要结构蛋白。衣原体噬菌体的研究为衣原体感染的治疗提供了一条新思路。

**关键词:** 衣原体, 噬菌体, Vp1, Vp2, Vp3

## Advances on Chlamydiophage

MA Jing-Yue LIU Quan-Zhong\*

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

**Abstract:** Bacteriophage is a kind of virus depending on bacterium, named bacterial virus, and it can multiply in bacterium. There're six types of Chlamydiophage discovered which are Chp1, Chp2, Chp3, Chp4, CPAR39 and PhiCPG1. Capsid proteins Vp1, Vp2 and Vp3 are three major structural proteins of Chlamydiophage. The study of Chlamydiophage will play great action on chlamydia infection therapy.

**Keywords:** Chlamydia, Bacteriophage, Vp1, Vp2, Vp3

衣原体已成为性传播疾病(sexually transmitted disease, STD)的主要病原体之一, 在世界各地的发病率迅速上升<sup>[1]</sup>。其感染隐匿反复迁延、并发症严重<sup>[2]</sup>、耐药问题突出, 这都给衣原体感染的治疗带来了困难。随着衣原体研究水平的提高和噬菌体替代抗生素研究的兴起, 目前已发现了六种衣原体噬菌体 Chp1、Chp2、Chp3、Chp4、CPAR39、PhiCPG1, 它们都有各自的衣壳蛋白 Vp1、Vp2、Vp3。了解衣原体噬菌体的生物学特性、研究历史、作用机制、分子生物学特点、细胞嗜性及应用等对衣原体感染的治疗有着重要意义。

### 1 概述

噬菌体是一类感染细菌、真菌、放线菌或螺旋

体等微生物的细菌病毒的总称, 本世纪初在葡萄球菌和志贺菌中首先发现, 具有体积微小、无细胞结构、严格寄生性、抵抗力强、抗原性、感染并裂解细菌及分布广泛等特性<sup>[3]</sup>。噬菌体大多数是由蛋白质组成二十面体头部结构, 内含核酸, 下连鞘与尾丝<sup>[4]</sup>。头部蛋白由衣壳蛋白构成, 它是主要的结构蛋白, 是由数目一定的衣壳蛋白亚单位组成的<sup>[5]</sup>, 对保护核酸识别宿主有重要作用。据噬菌体与宿主细胞的关系可分为烈性噬菌体和温和噬菌体两类。前者改变宿主的性质, 产生大量子代噬菌体, 最后导致菌体裂解死亡; 后者将其核酸整合到细菌的染色体上, 随细菌的分裂而传代, 并使其溶原化, 不能根除有害细菌<sup>[6]</sup>。衣原体噬菌体则是其中一种以衣原体为宿主的噬菌体。

## 2 衣原体噬菌体的研究历史

### 2.1 Chp1

1982 年Richmond S等在鸚鵡热衣原体株N352电镜研究中发现了第一种衣原体噬菌体Chp1, 它为20面体的病毒, 浮力密度1.37 g/mL, 有一单链环状DNA, 长4.8 kb, Chp1的发现标志着衣原体噬菌体研究的开端<sup>[7]</sup>。

1989 年Storey CC等报道了感染鸚鵡热衣原体的噬菌体Chp1 完整的核苷酸序列<sup>[8]</sup>。Chp1 DNA序列为4877 nt, 编码5个主要开放读码框(open reading frame, ORF), 其中的ORF1、2、3可分别编码结构蛋白Vp1、Vp2、Vp3, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定它们的分子量分别为75 kD、30 kD、16.5 kD。氨基酸同源性研究显示Vp1 与大肠杆菌噬菌体PhiX174、S13的主要结构蛋白同源。虽然大肠杆菌噬菌体PhiX174仅含有509个核苷酸, 但其基因组与Chp1的极其相似。这些发现为以后进一步研究衣原体噬菌体打下了坚实的基础。

### 2.2 PhiCPG1

1995 年Hsia R和Bavoil PM在鱼类衣原体中发现了第二种衣原体噬菌体PhiCPG1 并提出了该噬菌体可使感染的宿主细胞解体的观点<sup>[9]</sup>, 详细解释了噬菌体侵入衣原体并抑制衣原体的生长周期, 揭示了噬菌体潜在的临床价值。

2000 年Hsia R等从豚鼠包涵体结膜炎模型分离的鸚鵡热衣原体中纯化得到PhiCPG1<sup>[10]</sup>。其为全对称颗粒, 直径25 nm, 近似无凸起φX174噬菌体家族的噬菌体。它的单链环状DNA包括5个大的ORF, 类似于感染鸚鵡热衣原体的Chp1的DNA。其中3个ORF编码的多肽链是构成噬菌体衣壳蛋白Vp1、2、3的重要成分。其上的衣壳蛋白和衣原体外膜上的受体蛋白决定了噬菌体是否能吸附到相应的衣原体外膜上, 并对衣原体的黏附、侵入可能有重要作用。两类蛋白高度保守、特异, 受体蛋白可作为衣原体尤其是沙眼衣原体中寻找衣原体噬菌体的良好的标志物。

### 2.3 Chp2

2000 年Liu BL等在羊流产鸚鵡热衣原体中分离出分子量为61.4 kD的蛋白质小段肽序列, 该序列与鸟类衣原体噬菌体Chp1的衣壳蛋白Vp1相似, 电子显微镜显示有直径25 nm的衣原体噬菌体Chp2存

在<sup>[11]</sup>。Chp2基因组长4567 nt, 编码8个ORF, 这与Chp1相似, 其中7个与Chp1同源(第1~5, 7和8)。该衣原体噬菌体有3种病毒结构蛋白分别为Vp1、Vp2、Vp3, 由ORF 1~3编码。衣壳中的氨基酸残基能调节衣壳蛋白和内部支撑蛋白的相互作用, 内部支撑蛋白存在于Chp2的Vp1和Vp3蛋白中。可以认为Vp3有支撑功能并能转化为结构蛋白。编码Vp1的核苷酸序列高度特异, 它编码的IN5蛋白环可能是潜在的受体结合区。研究发现Chp2颗粒位于包裹衣原体网状体的膜结构上, 是引起羊流产鸚鵡热衣原体病变的主要原因。

2002 年Everson JS等对衣原体噬菌体Chp2进行了生物学性质和细胞嗜性的研究<sup>[12]</sup>, 描述了衣原体噬菌体具有不同的重叠的细胞嗜性这一特点, 它可以感染原来的宿主衣原体也可感染其他的衣原体, 为今后实现重组衣原体噬菌体提供了理论支持。

### 2.4 CPAR39

2000 年Read TD等分析了沙眼衣原体MoPn和肺炎衣原体AR39, 发现了衣原体噬菌CPAR39<sup>[13]</sup>。

2002 年Karuna等完成了3株Cpn全基因组测序<sup>[14]</sup>, 在一株AR39的菌株内发现了含4524个核苷酸的单链环状噬菌体DNA。该基因包含8个ORF, 共编码了113个残基的多肽, ORF1~3分别编码病毒蛋白1~3(Vp1~3), 而Vp1是受体连接位置。这也是首次报道Cpn中整合有噬菌体基因, 仅在AR39内发现整合有噬菌体基因及其合成的表型蛋白, 其他各株均未发现噬菌体基因。

其后Karuna等分离出肺炎衣原体噬菌体CPAR39, 并解释了其侵袭衣原体形成网状体的过程, 同时发现CPAR39与PhiCPG1两者的Vp1几乎相同。通过重组CPAR39的Vp1的DNA, 表达纯化得到Vp1蛋白, 免疫小鼠后进行免疫印记发现Vp1在鼠类中有极强的免疫原性。感染CPAR39的肺炎衣原体患者可筛选出Vp1的抗体, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)回顾性研究了整合有噬菌体基因的Cpn与腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)之间的关系, 说明它与腹主动脉瘤的发病显著相关。

### 2.5 Chp3

2004 年Sarah A Garner等在纯化的家畜衣原体T52中分离出衣原体噬菌体Chp3<sup>[15]</sup>, 基因序列为4554 nt, 同其他衣原体噬菌体的基因结构类似, 也

编码 8 个 ORF。分别与 Chp2、PhiCPG1、CPAR39 有 97.1%、93.4%和 93.3%的基因相同,而与 Chp1 基因序列差别较大,只有 51.8%的基因相同。Chp3 的结构蛋白 Vp2、Vp3 与其他衣原体噬菌体高度相似(各有约 98%的氨基酸残基序列相同),提示其功能也是高度保守的。Vp1 为 Chp3 最大的结构蛋白,分析表明其肽链在第 216~299 和第 462~467 氨基酸残基间有显著差异,推测其中较长的一段形成 IN5 环,呈蘑菇状突出于病毒表面。较短的一段形成 Ins,突出于病毒表面与 IN5 相互作用,且与 Chp2、PhiCPG1、CPAR39 的结构非常相似。

## 2.6 Chp4

2004 年 Graham RC 等发现了新的衣原体噬菌体,将它命名为 Chp4。它寄居于流产衣原体中,基因序列为 4530 nt,并编码 8 个 ORF。其中 ORF1、ORF2、ORF3 分别编 Vp1、Vp2、Vp3,与衣原体噬菌体 Chp2、Chp3 结构相似。2005 年 Graham RC 等又对 Chp4 的完整基因组、基因信息特点进行了详细描述,对衣原体噬菌体的研究有重要价值。

## 3 衣原体噬菌体的作用机制

衣原体的生长发育周期分为两个阶段:原体和网状体。当衣原体的原体分化到代谢活跃的网状体时,噬菌体开始侵入。衣壳蛋白 Vp1 为最大的结构蛋白,其中有一独特大型内环结构 IN5,呈蘑菇状突出于病毒表面<sup>[15]</sup>,可能是受体潜在的结合区,对噬菌体识别黏附衣原体有重要作用。感染后的衣原体细胞通过替代发育途径形成异常的巨大网状体,抑制了细胞分裂,不能成熟为始体,并在发育周期中最终解体,伴随包涵体的解体,释放出大量的子代噬菌体,开始噬菌体的新周期,此周期不断循环,最终使噬菌体不断增多、衣原体逐渐减少<sup>[16]</sup>。利用衣原体噬菌体引起衣原体病变并使之解体这一特点,将其作为生物制剂针对衣原体感染进行有效地治疗与预防来解决日益严重的抗生素耐药问题,但对其研究仍处于起步阶段。

## 4 衣原体噬菌体的分子生物学

### 4.1 目前已开展针对衣原体噬菌体的分子生物学研究

6 种噬菌体的基因组序列被陆续测定,它们虽

都为单链环状 DNA,但其基因特点及结构却不相同。Chp1(NC001741)的长度最长为 4877 nt,结构也最为复杂,另外 5 种的长度都约为 4500 nt 左右。Chp2 (NC002194)、Chp3 (NC008355)、Chp4 (NC007461)这三种噬菌体结构十分相似,其 ORF 和编码的蛋白也几乎一致;CPAR39 (NC002180)与 PhiCPG1 (NC001998)的核苷酸链结构也有相似部分,尤其是重要的 3 个结构蛋白编码区核苷酸数目完全相同。

### 4.2 衣原体噬菌体重要的衣壳蛋白

Vp1、Vp2、Vp3 是衣原体噬菌体上的 3 种衣壳蛋白,有其各自相应的分子量并由 ORF1、2、3 编码。衣壳中的氨基酸残基能调节衣壳蛋白和内部支撑蛋白的相互作用,其中 Vp1 为最大的结构蛋白,编码 Vp1 的核苷酸序列高度特异,它编码的 IN5 蛋白环可能是潜在的受体结合区,对宿主细胞的识别有重要作用,而 Vp3 则起到支撑作用。衣壳蛋白 Vp1 在 Chp1 与 Chp2、PhiCPG1、CPAR39 序列相似性比较中相似性分别为 48.3%、54.5%、54.3%;而 PhiCPG1 与 CPAR39 相似性却高达 99.5%;Chp2 与 Chp3 相似性也很高,Vp1、Vp2、Vp3 三种蛋白的氨基酸组成、编码片段基本一致。衣原体噬菌体衣壳蛋白是重要的结构蛋白,其基因序列具有较高的保守性,该种蛋白在免疫动物血清中存在抗原交叉反应说明其具有抗原性<sup>[17]</sup>,此特征对衣原体噬菌体的研究有重要意义。

## 5 衣原体噬菌体的细胞嗜性

在 6 种衣原体噬菌体中,Chp2 可感染流产衣原体、猫衣原体和家畜衣原体<sup>[12]</sup>。Chp3 以流产衣原体、鱼类衣原体、家畜衣原体、猫衣原体为宿主<sup>[15]</sup>。CPAR39 则以流产衣原体、鱼类衣原体、家畜衣原体、肺炎衣原体为宿主<sup>[17]</sup>。免疫荧光研究发现 CPAR39 不能感染猫衣原体,而 Chp3 不能感染肺炎衣原体。当二者感染相同的宿主细胞时,具有不同的宿主受体,细胞粘附过程对蛋白酶 K 高度敏感,说明粘附过程是蛋白质的相互作用过程。用蛋白酶处理过的原体完全不被二者侵入,进一步提示了衣原体外膜的噬菌体受体是蛋白质。衣原体噬菌体不编码外部支撑蛋白和主要的凸起蛋白,因而 Chp2、Chp3、CPAR39 结构蛋白相似,但三者的衣壳蛋白 Vp1 在第 216 和 299 之间的氨基酸链有较大差异,因

而决定了粘附过程中会有不同的受体与之作用。受体及相应配体的不同决定了噬菌体宿主的差异, 对敏感宿主受体的识别性决定了宿主的限制性。

## 6 噬菌体的应用与发展趋势

近年来, 细菌耐药现象已在全球各地泛滥成灾, 如何克服细菌耐药现象找出新的抗感染手段, 噬菌体治疗有望成为人类制服病菌的新武器。

### 6.1 与传统的抗生素治疗相比, 噬菌体治疗的优点

一般抗生素在治疗的同时也杀死了存在于小肠及生殖道中的有益细菌, 破坏了人体内的生态平衡, 促使其它病原体生长而致病, 像酵母菌感染和腹泻就是抗生素常见的副作用。噬菌体是以特定的细菌菌株为靶标, 可使患者免受因正常菌群被破坏而引起的副作用。噬菌体的另一优点是它们能够以指数生长, 会紧随细菌增殖而生长、随细菌消失而消失。并且噬菌体还能在细菌进化的同时发生突变, 即使细菌对一种噬菌体产生耐受, 自然界还存在着大量的甚至能进攻更新的耐受菌的噬菌体种类。且噬菌体是宿主菌依赖性的, 只在细菌感染部位发生作用, 随着宿主菌的清除而死亡, 不会残留在体内<sup>[18]</sup>。

### 6.2 噬菌体治疗的局限性<sup>[6]</sup>

噬菌体宿主特异性强, 治疗的宿主谱很窄限制了噬菌体在临床上的广泛应用。噬菌体在体内存留的时间短, 还会被机体防御系统尤其是网状内皮系统快速清除。噬菌体可能携带毒力基因, 幸存的噬菌体可能会对机体造成危害。且噬菌体治疗的最佳时间和剂量不易掌握。

### 6.3 噬菌体研究的进展

随着生物工程技术的高度发展以及现代生理研究手段的不断完善, 对噬菌体制剂的研究已逐步开展, 例如溶壁酶抗菌药物的开发<sup>[19]</sup>、噬菌体裂解宿主方式的改造<sup>[20]</sup>等。目前以豚鼠结膜炎衣原体(GPIC)噬菌体(PhiCPG1)的重组Vp1 蛋白已成功诱导表达并通过IDA树脂介质来纯化<sup>[21]</sup>, 通过此蛋白寻找沙眼衣原体噬菌体, 对将噬菌体作为杀菌剂应用于临床治疗与预防沙眼衣原体感染引起的非淋菌性尿道炎有重要价值。

## 7 结语

噬菌体感染并影响宿主细胞这一特性已得到广

泛重视, 将它应用于临床治疗和预防被重新提出, 利用噬菌体作为抗生物制剂来取代抗生素进行有效的治疗和预防手段值得关注。目前衣原体噬菌体的研究还处于起始阶段, 随着研究的深入, 以噬菌体作为抗感染方法将为衣原体感染的治疗开辟一个新的领域。

## 参考文献

- [1] Millman K, Black CM, Johnson RE. Population-based genetic and evolutionary analysis of *Chlamydia trachomatis* urogenital strain variation in the United States. *Bacterial*, 2004, **186**(8): 2457–2465.
- [2] Bachmaier K, Neu N, Maza LM, et al. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science*, 1999, **283**(5404): 1335–1336.
- [3] Hurst CJ, Lindquist HDA. Defining the ecology of viruses. *Viral Ecology*, 2000, **1**: 3–40.
- [4] Ackermann HW. Bacteriophage observations and evolution. *Microbiol*, 2003, **154**(4): 245–251.
- [5] Alan J Cann, Virus structure. *Principles of Molecular Virology*, 2005, **26**: 1–33.
- [6] 钱震雯, 岳启安, 田凤丽. 噬菌体治疗的研究概况. 医学综述, 2007, **13**(16): 1256–1258.
- [7] Richmond S, Stirling P. Virus infecting the reticulate bodies of an avian strain of *Chlamydia psittaci*. *Microbiology*, 1982, **14**: 41–44.
- [8] Storey CC, Lusher M, Richmond SJ. Analysis of the complete nucleotide sequence of Chp1, a phage which infects avian *Chlamydia psittaci*. *General Virology*, 1989, **70**(12): 3381–3390.
- [9] Hsia R, Bavoil PM. Homologs Of *EscherichiacolirecJ*, *Gltx* And Of Aputative ‘Early’ Gene Of Avian *Chlamydia Psittaci* Are Located Upstream Of The ‘Late’ *Omp2* Locus Of *Chlamydia Psittaci* Strain Guinea Pig Inclusion Conjunctivitis. *Gene*, 1996, **176**(1): 163–169.
- [10] Hsia R, Ting LM. Microvirus of *Chlamydia psittaci* strain Guinea pig Inclusion Conjunctivitis: isolation and molecular characterization. *Microbiology*, 2000, **146**(7): 1651–1660.
- [11] Liu BL, Everson JS. Molecular Characterization of a Bacteriophage (Chp2) from *Chlamydia psittaci*. *Virology*, 2000, **74**(8): 3464–3469.
- [12] Everson JS, Garner SA. Biological properties and cell tropism of Chp2, a bacteriophage of the obligate intracellular bacterium *Chlamydomonas abortus*. *Bacteriology*, 2002, **184**(10): 2748–2754.
- [13] Read TD, Brunham RC, Shen C. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae*

- AR39. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**(6): 1397–1406.
- [14] Karuna P Karunakaran, James F Blanchard. Molecular detection and seroepidemiology of the Chlamydia pneumoniae bacteriophage ( $\Phi$ Cpn1). *Clinical Microbiology*, 2002, **40**(11): 4010–4014.
- [15] Sarah A Garner, J Sylvia Everson. Isolation, molecular characterisation and genome sequence of a Bacteriophage (chp3) from Chlamydomonas reinhardtii. *Virus Genes*, 2004, **28**(2): 207–214.
- [16] Hsia R, Ohayon H, Gounon P. Phage infection of the obligate intracellular bacterium, Chlamydia psittaci strain guinea pig inclusion conjunctivitis. *Microbes Infect*, 2000, **2**(7): 761–772.
- [17] Everson JS, Garner SA, Lambden PR. Host range of chlamydia phages  $\phi$ CPAR39 and Chp3. *Bacteriology*, 2003, **185**(21): 6490–6492.
- [18] Carl R Merrill, Dean Scholl, Sankar L Adhya. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature*, 2003, (2): 489–496.
- [19] 叶道成. 噬菌体溶壁酶研究进展. 中国生物工程杂志, 2005, **25**(10): 78–82.
- [20] Hagens S, Blasi U. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. *Lett Appl Microbiol*, 2003, **37**: 318.
- [21] 刘全忠, 姚卫锋, 齐蔓丽, 等. 衣原体 GPIC 噬菌体衣壳蛋白 Vp1 的克隆、表达和鉴定. 中华皮肤科杂志, 2006, **39**(12): 714–716.

## 征订启事

### 欢迎订阅 2009 年《植物保护》杂志

《植物保护》创刊于 1963 年, 由中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办, 为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、“中国期刊方阵”双百期刊, 曾荣获中国科协优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖, 北京市全优期刊奖、国家期刊奖提名奖等多个奖项。收录的数据库有英国《CABI 文献数据库》、《Agrindex (FAO)》、美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中文科技期刊数据库》、《生物学文摘》、《万方数据—数字化期刊群》、《中国农业文摘数据库》、《中国科技论文与引文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》。本刊主要刊登有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护学科各领域原始研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。设有专论与综述、研究报告、调查研究、基础知识、实验技术、国外植保、争鸣、应用与交流、病虫新动态、学会动态与信息、新书新产品介绍等栏目。

竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校教师及研究生、各级植保科技工作者等踊跃订阅。欢迎广大作者踊跃投稿! 并欢迎咨询洽谈广告业务!

本刊为双月刊, 大 16 开, 160 页, 铜版纸印刷。每期定价 25.00 元, 全年 150.00 元。邮发代号: 2-483, 全国各地邮局均可订阅。直接在本刊编辑部订阅, 可享受 9 折优惠价, 全年 135 元, 若需挂号, 每期另加 3 元。

联系地址: 北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部 邮编: 100193

电话: 010-62819059, 62815914 传真: 010-62815914

E-mail: zwbh1963@263.net 网址: www.plantprotection.ac.cn

联系人: 王 音 高洪荣