

## 【综述】

## 有关阴道毛滴虫黏附过程的研究进展

帖超男, 谢辉 综述, 王雅静\* 审校

中图分类号: R531.711

文献标识码: A

滴虫病是常见的性传播疾病, 世界每年约有 1.2 亿患者。我国近年来男性及女性感染率均有上升趋势, 分别约占性病患者的 1/4<sup>[1]</sup>。关于阴道毛滴虫的致病机制, 目前研究较多的是有关虫体黏附宿主上皮细胞过程。这也是阴道毛滴虫能够感染并寄生于宿主细胞的关键性环节<sup>[2]</sup>。本文对其近年来的研究进展综述如下。

### 1 形态变化

陈文列等<sup>[1]</sup>用透射电镜观察阴道毛滴虫, 呈变形虫样穿行于阴道上皮细胞 (VECs) 间, 黏附于细胞表面或细胞膜凹陷处, 包绕局部上皮细胞。虫体指状伪足可插入上皮细胞间, 微丝状伪足可伸入上皮细胞微绒毛间, 形成吞噬泡, 蚕食上皮细胞。小伪足也可插入破损上皮细胞膜处。用扫描电镜观察发现, 阴道毛滴虫与宿主细胞发生黏附时, 附着面与被附着面相互吻合, 平直面紧贴, 凹凸面相应起伏, 而非游离于宿主细胞间。

### 2 肌动蛋白

丰富的细胞骨架成分微丝, 使虫体具有很强的变形能力, 形成伸缩性大的多形性伪足, 而富于阿米巴样运动, 有利于穿行及加大宿主细胞接触面<sup>[1,3]</sup>。电子显微镜观察发现, 阴道毛滴虫黏附到底物的那段区域所对应的虫体外胞浆中, 有一层微丝的存在。通过金免疫标记技术, 利用抗肌动蛋白 mAb, 证实这层微丝主要由肌动蛋白微丝组成。使用毒伞素和抗肌动蛋白 mAb 通过荧光显微镜可以证实在阴道毛滴虫的鞭毛体或类阿米巴体的胞浆中, 都有单层 F-肌动蛋白的存在<sup>[4]</sup>。它在游离的虫体中呈均质状, 而在黏附的变形虫样虫体内可呈网络状<sup>[1]</sup>。通过电泳和免疫印迹技术, 发现这种肌动蛋白的分子量与肌纤维的肌动蛋白一样, 也是 Mr 42 000。但双向电泳能够使这种肌动蛋白带离散为 4 个点, 其中两个主要的点可与肌肉的主要肌动蛋白异构体发生叠加<sup>[4]</sup>。

### 3 半胱氨酸蛋白酶

阴道毛滴虫合成的半胱氨酸蛋白酶种类较多,

Arroyo 等<sup>[5]</sup>曾采用配体实验来鉴定对宿主细胞具有选择靶向性的特异半胱氨酸蛋白酶。结果发现, 分子量为 Mr 65 000 和 30 000 的半胱氨酸蛋白酶能大量连接到 HeLa 细胞和 VECs 表面。用半胱氨酸蛋白酶抑制剂会使细胞黏附也相应受到抑制。反之, 仅具有低水平黏附作用的阴道毛滴虫, 其 Mr 30 000 蛋白酶活性也很低, 或根本无法测出。

Mendoza-Lopez 等<sup>[6]</sup>实验证实, 在阴道毛滴虫黏附宿主上皮细胞的过程中分子量为 Mr 30 000 的半胱氨酸蛋白酶 (CP30) 的参与是必需的。小鼠抗 CP30 抗血清中的 IgG 成分, 能以浓度依赖的方式特异性地抑制阴道毛滴虫黏附到单层 HeLa 细胞上。此外还发现, CP30 能降解一些女性泌尿生殖道中的蛋白质, 包括纤连素、胶原蛋白 IV 及血红蛋白等。

阴道毛滴虫分子量为 Mr 65 000 的半胱氨酸蛋白酶 (CP65) 主要与虫体的细胞毒性有关。经特异性抗 CP65 抗体处理后的阴道毛滴虫, 对单层 HeLa 细胞的细胞毒性作用受到抑制。CP65 也能降解一些女性泌尿生殖道中的蛋白质, 如胶原蛋白 IV、纤连素, 但层黏连蛋白-1 (P1) 和血红蛋白除外<sup>[7]</sup>。

### 4 层黏连蛋白 (LM)、纤连蛋白 (FN)

Silva Filho 等<sup>[8]</sup>实验结果表明 LM 能增强阴道毛滴虫对宿主上皮细胞黏附能力, 还发现酪氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-精氨酸 (YIGSR) 序列是 LM P1 片段上优先被阴道毛滴虫识别的位点。经过碘酸盐处理后的虫体与 LM 的连接减少, 而与 FN 的连接不受影响。提示细胞表面糖类在虫体与 LM 发生连接的过程中发挥作用<sup>[9]</sup>。

阴道毛滴虫能黏附到固定有 FN 的表面, 以高度特异性受体介导的方式与 FN 发生连接<sup>[10]</sup>。Crouch 等<sup>[9]</sup>发现在培养阴道毛滴虫时加入半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 将导致虫体与 FN 发生的黏附受到抑制, 而与 LM 的连接不受影响。这说明蛋白酶的活性会影响最适的 FN 连接。经过 20 h 对数生长期后的阴道毛滴虫, 将其置于新鲜的培养基中再培育 3 h 后, 虫体与 FN 发生连接的水平会更高, 提示培养方法的改变也会影响虫体与 FN 发生连接的程度。过度培育将导致阴道毛滴虫与 FN、LM 发生连接的能力下降。另外, 经胰蛋白酶作用后的虫体与 FN、LM 发生连接的能力

也下降。但将其置于培养基中 2 h 后,能使其与 FN 的连接完全恢复,得以再生,但 LM 则不能。在培养基中加入环己亚胺 (cycloheximide) 却会抑制这种再生能力。表明阴道毛滴虫合成的表面蛋白在虫体与 FN 发生连接的过程中发挥作用。

## 5 虫体表面的糖基

Mirhaghani 等<sup>[11]</sup>将阴道毛滴虫表面的凝集素与金粒子结合,再运用细胞化学标记技术和扫描电子显微镜来确定虫体表面特异糖基的位置,并以此研究阴道毛滴虫虫体表面糖结合物在其对靶细胞黏附过程中所发挥的作用。发现用  $\alpha$ -甘露糖苷酶和  $\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺酶选择性除去阴道毛滴虫表面结合性分子的聚糖部分,可避免上皮细胞被虫体黏附与破坏。超微结构观察发现其表面具有伴刀豆球蛋白 (ConA) 和小麦胚芽凝集素的特定结合位点。表明在其膜上存在甘露糖或类似甘露糖的残基和 N-乙酰-D-葡萄糖胺的残基。此外,实验还发现虫体表面的糖基数目在酶的作用下大为减少,而已被酶处理后的存活的虫体其绝大部分失去了黏附靶细胞的能力。这些结果说明存在于阴道毛滴虫表面糖蛋白中的糖基,特别是甘露糖和 N-乙酰-D-葡萄糖胺参与了虫体黏附宿主上皮细胞的过程。

## 6 宿主细胞表面糖类

阴道毛滴虫在生殖道黏膜表面分布状况与其黏附部位的表面上皮细胞结构及成分密切相关。经组织化学与电镜观察表明,阴道中上段为棱柱状上皮,该细胞内富含糖原颗粒,可随胞膜破损释出,使上皮细胞表面富有黏多糖物质。而穹窿处褶皱有更多黏液,可供阴道毛滴虫吞饮摄取并最终转化为糖原储于体内,极有利于阴道毛滴虫生存及黏附,近阴道口表面为角化扁平上皮细胞,黏液较少,虫体黏附较少<sup>[11]</sup>。此外,细胞表面糖类在虫体与 LM 发生连接的过程中也发挥着作用<sup>[9]</sup>。

## 7 分子生物学研究

已经知道,寄生虫与宿主相互作用的复杂过程以及最终结果是由它们的分子生物学特性所决定的<sup>[12]</sup>。近年来研究阴道毛滴虫黏附宿主上皮细胞过程,主要在以下 3 种凝集素的分子生物学特性及铁对凝集素合成的调控方面取得了较大的进展。

7.1 Ap65 Rappelli 等<sup>[13]</sup>用特异性探针对 Ap65 的小鼠免疫球蛋白从已构建的阴道毛滴虫 cDNA 库中筛选出重组蚀斑。以大肠埃希菌 (*E. coli*) 作为载体将编码 Ap65 的长为 1.38 kb 的 cDNA 片段进行克隆、测序。在已知其序列的基础上,人工合成 6 种用于聚

合酶链反应 (PCR) 的引物。最后将所选择的 30 例临床标本进行特异性扩增,结果表明编码 Ap65 的基因是一种十分保守、稳定的基因。由此认为,编码 Ap65 的基因可作为 PCR 诊断阴道毛滴虫感染的一种较好的检测指标。

同年, Alderete 等<sup>[14]</sup>用针对纯化的 Ap65 而制备的抗血清和单克隆抗体从噬菌体 cDNA 库中筛选出编码 Ap65 的 cDNA 进行实验,却制备出能与 Ap65 发生免疫交叉反应、并与 Ap65 具有相同功能、相同性质的两种重组蛋白编码基因克隆株 F<sub>11.2</sub> 和 F<sub>11.5</sub>。经全序列分析,发现两者都包含 1 701 bp 的开放阅读框架 (ORF), 分别编码 Mr 63 281 和 Mr 83 087 蛋白质。经比较还发现,两者在核苷酸水平上具有 87% 的相似性,在氨基酸水平上具有 91% 的相似性。限制性内切酶谱和 Southern 印迹分析结果进一步证实 F<sub>11.2</sub> 和 F<sub>11.5</sub> 的上述区别。表明在阴道毛滴虫基因组中存在两种不同的 Ap65 基因 (本文称作 ap65-1 和 ap65-2)。可见,编码 Ap65 的基因并不是绝对保守、稳定的。

一年后, O' Brien 等<sup>[15]</sup>发现了 Ap65 的又一免疫交叉反应克隆株,即长为 1.2 kb 的 F<sub>11.1</sub> cDNA, 它表达一种能连接于 HeLa 细胞表面的分子量约为 Mr 46 000 的融合蛋白。将其 5' 端所缺失的末端序列补齐后即得 1 条完整的 cDNA, 即 ap65-3。ap65-3 编码的是含 567 个氨基酸残基、分子量为 Mr 63 100 的蛋白质。它与 ap65-1、ap65-2 的相似性分别为 88% 和 96%, 在阴道毛滴虫基因组中以多拷贝形式存在。限制性酶谱证实这 3 种 Ap65 的基因是不同的。而在每一单个虫体中,这 3 种基因都同时存在。ap65-3 具有一段前导序列,与 ap65-1、ap65-2 一样,和苹果酸酶的编码基因具有明显的相似性;而不同的是,ap65-3 的转录产物 3' 末端具有一段长的 Poly (A) 尾。此外,在不同的 Ap65 基因转录产物中发现了与其降解有关的序列,例如 ap65-1 mRNA 中的 AUUUA 序列、ap65-2 mRNA 中的 UUAUUUAU 序列。而在 ap65-3 mRNA 中则未发现。

7.2 Ap51 Alderete 等<sup>[16]</sup>从噬菌体表达库中筛选出长 1 kb 的 Ap51.2 cDNA 克隆,编码 Mr 38 000、能与 Ap51 发生免疫交叉反应并且保留了 Ap51 基本特性的融合蛋白。利用 PCR 扩增法将其 5' 末端补齐,得到完整的编码 Ap51.2 的基因 (ap51-2)。在 PCR 扩增产物中又发现 Ap51 另外两种基因 (ap51-1、ap51-3)。表明 Ap51 是具有至少 3 种蛋白质和基因形式的多基因家族中的一员。ap51-1 和 ap51-3 编码 407 个氨基酸,ap51-2 则编码 408 个氨基酸。这 3 种基因在核苷酸与氨基酸水平上都具有很大的相似性,它们都是单拷贝性质的,且在每一单个虫体中,这 3 种基因都同时存在。ap51-3 的 3' 末端非编码区具有一段短

的 Poly ( A ) 尾, ap51-1 和 ap51-2 则无。此外还发现, Ap51 3 种基因与阴道毛滴虫氢化酶体中的琥珀酰 CoA 合成酶  $\beta$  亚单位编码基因具有部分相似性。

7.3 Ap33 Engbring 等<sup>[17]</sup>将 Ap33 克隆株进行 Southern 印迹分析, 确定了 3 种单拷贝 Ap33 基因的存在。全序列分析表明, 3 者均包含 930 bp 的 ORF, 分别编码一种近似 Mr 33 000 的蛋白质。经比较发现, 它们在核苷酸和氨基酸水平上都具有高度的相似性。对其 N-末端氨基酸测序发现有前导多肽的存在。此外还发现, 这些重组蛋白仍保留与阴道毛滴虫 Ap33 相同的黏附性。研究还发现, Ap33 与阴道毛滴虫氢化酶体中的琥珀酰 CoA 合成酶  $\alpha$  亚单位编码基因具有 100% 的一致性<sup>[18]</sup>。

7.4 铁对凝集素合成的调控作用 荧光免疫细胞化学实验证实, 相对于在低铁环境中生长的阴道毛滴虫来说, 高铁环境能诱发虫体在细胞表面及细胞内合成更多的凝集素<sup>[19]</sup>。Alderete 等<sup>[14]</sup>发现, 当阴道毛滴虫在高铁培养基中生长时, 其 ap65-1 和 ap65-2 两种基因的转录水平均提高 (高达 18 kb)。通过 Northern 印迹分析发现, ap65-3 的表达水平也受铁调控<sup>[15]</sup>。Tsai 等<sup>[20]</sup>建立 1 个 DNA 转染系统用于监测不同的铁供应条件下对 ap65-3 表达活性的影响。实验发现, 由铁所诱发的 ap65-3 转录是由于受到 ap65-3 上位于 110 ~ 54 的铁感应区域的调控, 它由多个位置紧邻的 DNA 单元所组成, 包括 1 个铁感应单元, 即 ( -98 ) AGATAACGA ( -90 ), 和 3 个与其相邻富含胸腺嘧啶核苷酸的单元, 即 ( -110 ) ATTTTT ( 105 ), ( -78 ) ATTATT ( -73 ) 与 ( -59 ) ATT-TTT ( -54 )。此外还发现, 铁感应区 5' 和 3' 端的旁侧序列有调控基础转录 (即非铁所诱发的转录) 的作用。而 ap65-3 末端的一段调控区对基础转录与铁所诱发的转录均有增强作用。另外, Alderete 等<sup>[16]</sup>还发现, 只有 ap51-1 和 ap51-3 的转录受铁的调控, 而 ap51-2 则否, 提示 ap51-2 可能具有两种重组异构体。

综上所述, 细胞黏附在阴道毛滴虫寄生宿主细胞的致病过程中起着十分重要的作用, 对阴道毛滴虫黏附过程的各个方面进行深入研究, 将有助于从这一环节上找到阻断或抑制其感染宿主的有效方法, 从而为滴虫病的防治打下理论基础。

#### 参 考 文 献

[ 1 ] 陈文列, 陈金富, 钟秀容, 等. 阴道毛滴虫黏附大鼠阴道的超微结构与组织化学研究[ J ]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19: 287-289.  
[ 2 ] Engbring JA, Alderete JF. Characterization of *Trichomonas vaginalis* Ap33 adhesin and cell surface interactive domains[ J ]. Microbiology.

1998, 144: 3011-3018.  
[ 3 ] Bricheux G, Coffe G, Bayle D, et al. Characterization, cloning and immunolocalization of a coronin homologue in *Trichomonas vaginalis* [ J ]. Eur J Cell Biol, 2000, 79: #13-422.  
[ 4 ] Brugerolle G, Bricheux G, Coffe G. Actin cytoskeleton demonstration in *Trichomonas vaginalis* and in other trichomonads[ J ]. Biol Cell, 1996, 88: 29-36.  
[ 5 ] Arroyo R, Alderete JF. Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity[ J ]. Arch Med Res, 1995, 26: 279-285.  
[ 6 ] Mendoza-Lopez MR, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, et al. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence[ J ]. Infect Immun, 2000, 68: #907-4912.  
[ 7 ] Alvarez-Sanchez ME, Avila-Gonzalez L, Becerril-Garcia C, et al. A novel cysteine proteinase ( CP65 ) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity[ J ]. Microb Pathog, 2000, 28: 193-202.  
[ 8 ] Silva Filho FC, Ortega-Lopez J, Arroyo R. YIGSR is the preferential laminin-1 residing adhesion sequence for *Trichomonas vaginalis*[ J ]. Exp Parasitol, 1998, 88: 240-242.  
[ 9 ] Crouch ML, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin[ J ]. Microbiology, 1999, 145: 2835-2843.  
[ 10 ] Alderete JF, Benchimol M, Lecker MW, et al. The complex fibronectin-*Trichomonas vaginalis* interactions and trichomonosis[ J ]. Parasitol Int, 2002, 51: 285-292.  
[ 11 ] Mirhaghani A, Warton A. Involvement of *Trichomonas vaginalis* surface-associated glycoconjugates in the parasite/target cell interaction [ J ]. Parasitol Res, 1998, 84: 374-381.  
[ 12 ] Schee C, Sluiter HJ, Meijden WI, et al. Host and pathogen interaction during vaginal infection by *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urealyticum*[ J ]. J Microbiol Methods, 2001, 45: 61-67.  
[ 13 ] Rappelli P, Rocchigiani AM, Erre G, et al. Sequence of cDNA coding for a 65 kDa adhesive protein for the specific detection of *Trichomonas vaginalis* by PCR[ J ]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 129: 21-26.  
[ 14 ] Alderete JF, O'Brien JL, Arroyo R, et al. Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence[ J ]. Mol Microbiol, 1995, 17: 69-83.  
[ 15 ] O'Brien JL, Lauriano CM, Alderete JF. Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis* [ J ]. Microb Pathog, 1996, 20: 335-349.  
[ 16 ] Alderete JF, Engbring J, Lauriano CM, et al. Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron[ J ]. Microb Pathog, 1998, 24: 1-16.  
[ 17 ] Engbring JA, Alderete JF. Three genes encode distinct Ap33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence[ J ]. Mol Microbiol, 1998, 28: 305-313.  
[ 18 ] Lahti CJ, Bradley PJ, Johnson PJ. Molecular characterization of the alpha-subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase[ J ]. Mol Biochem Parasitol, 1994, 66: 309-318.  
[ 19 ] Garcia AF, Chang TH, Benchimol M, et al. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*[ J ]. Mol Microbiol, 2003, 47: 1207-1224.  
[ 20 ] Tsai CD, Liu HW, Tai JH. Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*[ J ]. J Biol Chem, 2002, 277: 5153-5162.