

人粒细胞无形体致病机制研究进展

王园园 张丽娟

【关键词】 无形体; 致病机制

A review on pathogenesis of human granulocytic *Anaplasma*
WANG Yuan-yuan, ZHANG Li-juan. National Institute of
Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center
for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: ZHANG Li-juan, Email: zhanglijuan@
icdc.cn

This work was supported by grants from the National Basic
Research Program of China (973 Program) (No.
2010CB530200, 2010CB530206) and National Natural
Science Foundation of China (No. 30771854).

【Key words】 *Anaplasma*; Pathogenesis

人粒细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)是新发蜱传病原体,主要引起人无形体病。人粒细胞无形体感染以中性粒细胞为主,其次为嗜酸性粒细胞,急性期 90% 的粒细胞受到感染。病原体在宿主细胞内聚集,被囊膜包裹成小体,称为包涵体^[1]。该病主要表现为发热、头痛、精神萎靡、肌痛等感冒样症状,部分患者有关节痛、胃肠道(恶心、呕吐和腹泻)、呼吸道、肝脏、中枢神经等症状,很少出现皮疹。实验室检测结果显示血小板和白细胞减少、贫血、肝转氨酶升高^[1]。

1. 流行病学:人粒细胞无形体在媒介蜱和哺乳动物宿主之间维持自然循环。主要传播媒介为硬蜱。欧、美等地报道全沟硬蜱(*Ixodes persulcatus*)是其主要传播媒介,如美国的 *I. scapularis*、*I. pacificus*、*I. spinipalpis* 及欧洲和亚洲的 *I. ricinus*、*I. persulcatus* 等硬蜱。该病原体的宿主为哺乳动物,主要有白足鼠、白尾鹿、灰脚木鼠、田鼠。鹿感染后多为持续性和亚临床感染^[2]。Ogden 等^[3]报道迁徙候鸟可携带 *I. scapularis* 蜱若虫,提示候鸟对 *I. scapularis* 生存环境的迁移扩散和无形体的输入及输出传播起一定作用。雌性成年蜱不会经卵垂直传播无形体,但感染蜱经历不同发育阶段后仍能在叮咬过程中通过血液感染动物或人^[4]。

截至 2005 年底,美国报告的病例数为 3011 例^[2],流行地区人群感染率为 15.0%~36.0%,欧洲地区报告人群感染率为 6.2%,与北美地区相近;2005 年底之前,中国及周边国家通过分子生物学及人群血清学检测未发现无形体的存在^[5,6]。2006 年 10 月,中国安徽省某医院首次暴发人粒细胞无形体院内传播感染^[7]。随后,Zhang 等^[8]对该地区周边包括江苏、河南、浙江、山东等省进行了实验室回顾性调查,发现山东省沂源

地区存在无形体病的流行。2006 年,Zhang 等^[9]对天津市 8 区县从事农业及畜牧业等职业的高危人群进行血清流行病学调查,结果显示该地区无形体血清抗体阳性率为 8.8%。对中国 6 省(市)捕捉的啮齿动物进行 PCR 检测发现,其无形体携带率为 5.5%^[10]。

2. 病理特征:无形体病主要病理改变为多器官淋巴细胞浸润,肝炎、脾脏和淋巴结单核细胞增生。感染动物有轻、中度肝炎伴肝小叶淋巴细胞浸润。小鼠感染模型发现肝脏淋巴细胞、巨噬细胞和中性粒细胞浸润、肝小叶损伤,严重者汇管区及门静脉受到损害。

3. 发病机制:

(1) 分子生物学基础:无形体基因组很小(1.5 Mb),能产生广泛的表型变异以适应广泛的宿主,造成长期持续性感染。P44 蛋白是目前研究最多的表面蛋白。该蛋白包括 94 个氨基酸残基组成的高变区,186 个氨基酸残基组成的 N 端保守区和 146 个氨基酸残基组成的 C 端保守区。该蛋白是主要的膜抗原蛋白,引起感染动物产生抗体。该蛋白只有 1 个主要表达位点,其两侧有 6 个开放阅读框(*ndk*、*tr1*、*omp-1X*、*omp-1N*、*recA* 及 *valS*)。 *tr1* 基因编码转录调节子,位于 N 端 30~80 氨基酸残基位置。*p44* 基因转录受温度影响,HL60 细胞进行 37℃ 及 28℃ 培养时,前者 *p44* 基因的 mRNA 是后者的 3 倍。ApxR 蛋白可以结合 *p44E* 和 *apxR* 基因的启动子区域,在哺乳动物体内上调 *p44* 的表达。通过 LacZ 报告系统检测,*p44* 基因为多顺反子,于起始位点上游 157 bp 处开始转录^[11]。Caspersen 等^[12]研究表明抗原变异来源于大量同源转录,而不是突变累积的遗传不稳定性。Lin 和 Rikihisa^[13]在 cDNA 水平上比较 *p44* 基因序列后得出结论:非阶段基因转化是 *p44* 基因表达差异的主要机制,并证实重组位点发生在 *p44* 高变区侧翼的保守区。Huang 等^[14]发现 P44 蛋白具有通道蛋白活性,能转运 L-谷氨酸盐、阿拉伯糖和葡萄糖、蔗糖、水苏四糖。此外,P44 蛋白还具有革兰阴性菌通道蛋白的特点,如溶解度、热可变性、两性分子和反平行 β 折叠结构、丰富的极性分子和 C 端苯基丙氨酸,16 个跨膜 β 折叠包括 C 端和 N 端,这些特点有助于为人粒细胞无形体提供代谢中间物。

P44 蛋白高度保守的 T 细胞抗原决定簇位于高变区(氨基酸残基 171~229)和保守区(氨基酸残基 101~170),B 细胞决定簇位于高变区。Wang 等^[15]借助 Robetta 软件分析 P44 蛋白的三维结构,N 端大约 242 个氨基酸残基(包括保守区和一半高变区)形成富含 α 螺旋和 β 转角,位于无形体的外膜。另一半高变区和 C 端保守区构成 β 折叠结构,位于膜内。

(2) 侵袭:无形体有两种存在形式,即网状型和实体型(体积小但密度高),实体型由网状型在细胞内增殖成熟形

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.11.026

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2010CB530200, 2010CB530206);国家自然科学基金(30771854)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所
通信作者:张丽娟, Email: zhanglijuan@icdc.cn

成,通过细胞裂解释放出来。无形体感染中性粒细胞与P-选择素糖蛋白配体-1(PSGL-1)、唾液酸化和 α -1,3-岩藻糖化多糖有关,通过与PSGL-1结合完成侵入第一步。抗PSGL-1 N端的单抗能阻止这一过程,说明无形体与PSGL-1的N端结合。另有研究发现神经氨酸酶能完全阻止无形体感染。Fuc-TV II表达缺陷细胞不能感染无形体,转染Fuc-TV II后重新表达CD15的细胞又能感染无形体,说明CD15及其相关的唾液酸化分子以及 α -(1,3)-岩藻糖化分子在感染过程中发挥关键作用。有研究发现无形体结合CD15后导致表面蛋白构像改变,引起细胞膜内陷。无形体结合细胞后形成的吞噬体没有自身酸化、与溶酶体融合相关的酶,如液泡型H⁺-ATP酶和GTP酶,也没有融合溶酶体相关膜蛋白-1、CD63、髓过氧化物酶,因此,无形体能逃逸宿主细胞的杀伤作用而繁殖。

(3)免疫损伤:中性粒细胞PSGL-1与内皮细胞的P-选择素、E-选择素和白细胞的L-选择素结合,引起中性粒细胞浸润造成炎症反应。体外研究发现无形体可改变细胞表面分子的表达,感染无形体的中性粒细胞及HL-60细胞的PSGL-1表达下降,严重感染的HL-60细胞(多包涵体)不表达PSGL-1。尽管 β 2整合素、Ig超家族黏附分子表达上调,但不能发生功能性黏附。选择素受体的缺失导致黏附不能进行,延长无形体在血液中的存留时间,促进无形体通过蜱媒传播^[16]。

无形体AnkA蛋白进入细胞核,可下调宿主免疫相关基因的表达,如NADPH氧化酶的组成部分-gp91^{phox}^[17]。另外,无形体还抑制超氧分子形成,延迟凋亡相关基因的表达和产生抗凋亡分子,抑制中性粒细胞凋亡,造成免疫逃逸。凋亡延迟的中性粒细胞产生促炎性介质,抑制早期中性粒细胞产生信号,使其不能诱导或活化其他免疫细胞,造成宿主免疫功能损伤,易造成机会感染。低剂量无形体感染动物后4~7天,脾淋巴细胞中NK1.1/FasL表达增加,同时产生严重的肝部炎症反应。脾中CD8⁺细胞也发生增殖,高峰出现在感染后4~10天^[16]。感染10 d内,IFN- γ 平均水平增加10倍。4 d内IL-10平均水平增加4~5倍,第14、21天有显著上升,说明IFN- γ 是早期免疫反应的重要组成部分。

总之,无形体感染中性粒细胞后,中性粒细胞功能受到损伤,造成黏附、迁移、脱粒及吞噬功能异常,并由此产生一系列免疫病理损伤。

参 考 文 献

- [1] Zhang LJ, Ren J, Xu JG. *Anaplasma phagocytophilum* and human granulocytic anaplasmosis. Chin J Epidemiol, 2007, 28(2): 189-191. (in Chinese)
张丽娟,任军,徐建国. 无形体与人粒细胞无形体病. 中华流行病学杂志, 2007, 28(2): 189-191.
- [2] Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, et al. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis, 2007, 45 Suppl: S45-51.
- [3] Ogden NH, Lindsay LR, Hanincova K, et al. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(6): 1780-1790.
- [4] Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and ehrlichia ewingii ehrlichiosis. Expert Rev Anti infect Ther, 2009, 7(6): 709-722.
- [5] Lim S, Irwin PJ, Lee S, et al. Comparison of selected canine vector-borne diseases between urban animal shelter and rural hunting dogs in Korea. Parasit Vectors, 2010, 3(1): 32.
- [6] Yoshimoto K, Matsuyama Y, Matsuda H, et al. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from haemaphysalis megaspinosus in Hokkaido, Japan. Vet Parasitol, 2010, 168(1-2): 170-172.
- [7] Zhang LJ, Liu Y, Ni DX, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. JAMA, 2008, 300(19): 2263-2270.
- [8] Zhang LJ, Cui F, Wang LL, et al. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* in Yiyuan county, Shandong. Infect Dis Informat, 2009, 22(1): 21-25. (in Chinese)
张丽娟,崔峰,王玲玲,等. 山东省沂源县无形体病实验室调查分析. 传染病信息, 2009, 22(1): 21-25.
- [9] Zhang LJ, Shan AL, Mathew B, et al. Rickettsial seroepidemiology in farm workers, Tianjin, People's Republic of China. Emerg Infect Dis, 2008, 14(16): 938-939.
- [10] Zhan L, Cao WC, Chu CY, et al. Tick-borne agents in rodents, China, 2004-2006. Emerg Infect Dis, 2009, 15(12): 1904-1908.
- [11] Wang XQ, Cheng ZH, Zhang CB, et al. *Anaplasma phagocytophilum* p44 mRNA expression is differentially regulated in mammalian and tick host cells: involvement of the DNA binding protein ApxR. J Bacteriol, 2007, 189(23): 8651-8659.
- [12] Caspersen K, Park JH, Patil S, et al. Genetic variability and stability of *Anaplasma phagocytophilum* msp2 (p44). Infect Immun, 2002, 70(3): 1230-1234.
- [13] Lin Q, Rikihisa Y. Establishment of cloned *Anaplasma phagocytophilum* and analysis of p44 gene conversion within an infected horse and infected SCID mice. Infect Immun, 2005, 73(8): 5106-5114.
- [14] Huang HB, Wang XQ, Kikuchi T, et al. Porin activity of *Anaplasma phagocytophilum* outer membrane extraction and purified P44. J Bacteriol, 2007, 189(5): 1998-2006.
- [15] Wang XQ, Kikuchi T, Rikihisa Y. Two monoclonal antibodies with defined epitopes of P44 major surface proteins neutralize *Anaplasma phagocytophilum* by distinct mechanisms. Infect Immun, 2006, 74(3): 1873-1882.
- [16] Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, et al. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. J Vet Intern Med, 2009, 23(6): 1129-1141.
- [17] Garcia-Garcia JC, Rennoll-Bankert KE, Pelly S, et al. Silencing of host cell CYBB gene expression by the nucleareffector AnkA of the intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. Infect Immun, 2009, 77(6): 2385-2391.

(收稿日期:2010-04-08)

(本文编辑:万玉立)