

输卵管性不孕患者与生殖道感染不同沙眼衣原体基因型和cHSP60表达水平的相关性初步研究

杨艳华, 肖光文, 罗晓东 (嘉应学院医学院, 广东梅州 514031)

摘要:目的 研究沙眼衣原体(CT)及不同基因型导致的生殖道感染与输卵管性不孕(TFI)的相关性,并比较不同CT基因型宫颈分泌物中衣原体热休克蛋白60(cHSP60)表达的差异。方法 采用前瞻性队列研究2018年1月~2019年6月梅州城区三家医院收集的254例TFI和635例其他原因不孕患者资料和宫颈分泌物标本,采用巢式PCR扩增外膜蛋白Omp1基因的VD1-VD3序列并测序分型,酶联免疫吸附法(ELISA)检测不同CT基因型感染者宫颈分泌物中cHSP60表达,分析比较两组患者中CT基因型的分布情况和生殖道中cHSP60表达水平。结果 TFI患者CT的阳性率(14.6%, 37/254)显著高于其他原因不孕患者CT阳性率(4.9%, 31/635);TFI患者感染最常见的CT基因型为E、F和J型,其他原因不孕患者感染最常见的CT基因型为G和D型,TFI与其他原因不孕患者基因型分布的差异性有统计学意义($\chi^2=16.958$, $P=0.031$);CT阳性的TFI患者生殖道中cHSP60表达水平(111.5 ± 15.0 ng/L)显著高于CT阳性的其他原因不孕患者(103.5 ± 9.9 ng/L) ($t=2.754$, $P=0.008$);CT阳性的TFI患者中,E、F和J基因型感染者生殖道中cHSP60表达水平(116.5 ± 14.9 ng/L)明显高于D、G基因型(101.8 ± 9.8 ng/L) ($t=3.984$, $P < 0.001$)。结论 不同CT基因型感染与TFI可能有关,E、F和J型可能是与TFI最密切的基因型。

关键词:沙眼衣原体;输卵管性不孕;衣原体热休克蛋白60

中图分类号:R374.1;Q786 文献标识码:A 文章编号:1671-7414(2021)01-025-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.01.007

Preliminary Study on the Correlation between Different Genotypes of *Chlamydia Trachomatis* and cHSP60 Expression in Patients with Tubal Infertility and Reproductive Tract Infection

YANG Yan-hua, XIAO Guang-wen, LUO Xiao-dong

(Medical College of Jiaying University, Guangdong Meizhou 514031, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between genital tract infections of different *Chlamydia trachomatis* (CT) genotypes and tubal factor infertility (TFI) in women, and compare the expression of Chlamydia heat shock protein 60 (cHSP60) in cervical secretions of different CT genotypes. **Methods** A prospective cohort study of 254 cases of TFI and 635 cases of other causes of infertility collected from three hospitals in Meizhou City from January 2018 to June 2019 and cervical secretions samples were used to amplify the outer membrane protein Omp1 gene by nested PCR. The VD1-VD3 sequence of VD1-VD3 was sequenced and typed, and the expression of cHSP60 in cervical secretions of patients with different CT genotypes was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the distribution of CT genotypes in the two groups of patients and the expression level of cHSP60 in the reproductive tract were analyzed and compared. **Results** The positive rate of CT in TFI patients was 14.6% (37/254), which was significantly higher than that of 4.9% (31/635) in patients with infertility caused by other causes. The most common CT genotypes of infection in TFI patients were E, F and J types. The most common CT genotypes of infertile patients with other causes were G and D. The difference in genotype distribution between TFI and infertile patients with other causes was statistically significant ($\chi^2=16.958$, $P=0.031$). cHSP60 expression in the reproductive tract of CT-positive TFI patients level (111.5 ± 15.0 ng/L) was significantly higher than CT-positive infertile patients with other causes (103.5 ± 9.9 ng/L) ($t=2.754$, $P=0.008$). In CT positive TFI patients, the expression level of cHSP60 in genital tract of patients with genotype E, F and J (116.5 ± 14.9 ng/L) was significantly higher than that of genotype D and G (101.8 ± 9.8 ng/L) ($t=3.984$, $P < 0.001$). **Conclusion** Different CT genotype infections would be associated with TFI, and E, F and J may be the most closely genotypes with TFI.

Keywords: chlamydia trachomatis; tubal factor infertility; chlamydial heat shock protein 60

基金项目:广东省医学科研基金(A2018180)。

作者简介:杨艳华(1979-),女,硕士,副主任医师,主要从事妇产科的临床与科研工作, E-mail: 330956907@qq.com。

通讯作者:肖光文,男,硕士,副教授, E-mail: 270591805@qq.com。

沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, CT) 所致的泌尿生殖道感染是目前临床最为常见的性传播性疾病之一, 女性感染后往往表现为盆腔炎、宫颈炎、输卵管阻塞, 严重的可导致输卵管性不孕 (tubal factor infertility, TFI)。引起泌尿生殖道感染 CT 的主要基因型别为 D ~ K 型, 目前对 CT 的致病性与基因型是否相关的认识并不统一^[1-3], 其致病能力强弱与基因型别是否关联存在分歧, 而尤其对于不同 CT 基因型导致 TFI 是否存在差异, 鲜有文献报道。衣原体热休克蛋白 60 (chlamydial heat shock protein 60, cHSP60) 是 CT 的一个重要的致病因子, 尤其与 TFI 关系密切^[4-5]。本文通过研究对比 TFI 患者与其他原因不孕患者不同基因型 CT 感染情况及感染者生殖道标本中 cHSP60 的水平, 探讨不同基因型 CT 与 TFI 的相关性, 为进一步探明 CT 导致 TFI 的机制提供资料。

1 材料与方法

1.1 研究对象 采用前瞻性队列研究 2018 年 1 月 ~ 2019 年 6 月梅州城区所在的梅州市人民医院、梅州市妇幼保健计划生育服务中心和嘉应学院附属医院三家医院收集的妇科或生殖中心就诊和体检的 CT 阳性女性不孕患者宫颈分泌物标本和资料。根据不孕原因分成 TFI 和其他原因不孕, TFI 的纳入标准^[6]: ①夫妇同居 1 年或以上, 保持正常的性生活并未采取任何避孕措施, 女方仍未能受孕; ②男方精液分析各项指标正常、精子穿透试验为阳性; ③女方连续 3 个月卵泡 B 超监测发育正常且有成熟卵泡排出; ④女方经期第 2 ~ 3 日基础性激素水平正常; ⑤子宫输卵管造影术 (HSG) 显示子宫腔大小和形态正常, 一侧或双侧输卵管管壁显示不完全或完全阻塞; ⑥免疫性不孕 (抗精子抗体等) 血清系列检测正常。其他原因不孕纳入标准为符合条件①和②, 但 HSG 显示为双侧输卵管通畅的患者。

1.2 仪器与试剂 ABI 9600 PCR 核酸扩增仪购自美国 ABI 公司, Biotek ELx808 酶标仪购自美国伯腾公司, ESCO 生物安全柜购自新加坡 ESCO。QIAamp DNA Mini Kit 核酸提取试剂盒购自德国 QIAGEN GmbH-Hilden 公司, 巢式 PCR CT-Omp1 基因检测试剂盒购自中山达安基因公司, cHSP60 ELISA 试剂盒购自美国 RB 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本的采集: 妇科医师使用阴道窥器先使宫颈暴露, 取一个拭子将过多的黏液揩去后, 取另一拭子在宫颈管内口 1 ~ 2 cm 处旋转一周并停留 20 s, 避免碰及阴道壁的情况下将拭子慢慢拔出, 置于盛有 1 ml 无菌生理盐水的冻存管中, 反复挤压拭子 1 min 至衣原体全部脱落, 弃除挤干的拭子并

立即保存标本于 -70 °C。

1.3.2 巢式 PCR 检测 CT 的 Omp1 基因型: 分离标本上清液并用 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒提取核酸, 严格按照试剂盒说明书进行操作。然后按参考文献 [3] 的操作步骤采用巢式 PCR 扩增 CT 外膜蛋白 Omp1 基因的 VD1-VD3 并测序分型。

1.3.3 酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测标本上清中 cHSP60 的表达: 经巢式 PCR 检测 CT 阳性的患者标本, 将分离的上清, 采用 cHSP60 ELISA 试剂盒检测 cHSP60 的表达, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学分析 数据采用 SPSS21.0 软件进行统计和分析。计数资料采用卡方检验进行分析, 计量资料若符合正态分布的, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者的 CT 阳性检出率和阳性检出者资料比较 收集 TFI 患者 254 例, 其中 CT 阳性 37 例, 阳性率为 14.6%; 其他原因不孕患者 635 例, CT 阳性 31 例, 阳性率为 4.9%, 两组患者 CT 阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2=24.091$, $P < 0.001$)。

2.2 TFI 与其他原因不孕患者中 CT 基因型分布情况 见表 1。TFI 与其他原因不孕患者均检出了 D, E, F, G, H, I, J 和 K 基因型, 未见其他型别基因型。其中 TFI 患者中最常见的基因型为 E, F 和 J 型, 3 种基因型共计 23 例, 占 62.2% (23/37), 存在 2 例两种基因型混合感染, 其中 1 例为 D 和 F 的混合感染、另 1 例为 E 和 J 型的混合感染; 其他原因不孕患者中最常见的基因型为 G 型和 D 型, 2 种基因型共计 18 例, 占 58.1% (18/31)。TFI 与其他原因不孕患者基因型分布的比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=16.958$, $P=0.031$)。对各基因型在 TFI 与其他原因不孕患者中所占比率进行比较, 其中 G 型在其他原因不孕患者中所占比率显著高于其在 TFI 患者中的所占比率, 差异有统计学意义 ($\chi^2=7.732$, $P=0.007$)。

2.3 CT 阳性的 TFI 与其他原因不孕患者生殖道中 cHSP60 表达水平 CT 阳性的 TFI 患者生殖道中 cHSP60 表达水平为 111.5 ± 15.0 ng/L, 显著高于 CT 阳性的其他原因不孕患者的 103.5 ± 9.9 ng/L, 差异有统计学意义 ($t=2.754$, $P=0.008$)。

2.4 不同 CT 基因型 TFI 患者 cHSP60 表达水平的比较 见表 2。在 TFI 患者中, 其中感染 E, F 和 J 基因型患者平均表达水平为 116.5 ± 14.9 ng/L, 明显高于感染 D 和 G 基因型患者 (101.8 ± 9.8 ng/L), 差异有统计学意义 ($t=3.984$, $P < 0.001$)。

表1 TFI 与其他原因不孕患者中 CT 基因型的分布情况 [n(%)]

基因型	TFI 患者 (n=37)	其他原因不孕患者 (n=31)	χ^2 值	P 值	
D	3(8.1)	7(22.6)	2.817	0.167	
E	8(21.6)	3(9.7)	1.775	0.208	
F	8(21.6)	2(6.5)	3.095	0.097	
G	3(8.1)	11(35.5)	7.732	0.007	
CT 基因型	H	3(8.1)	2(6.5)	0.068	1.000
	I	1(2.7)	2(6.5)	0.562	0.588
	J	7(18.9)	2(6.5)	2.283	0.166
	K	2(5.4)	2(6.5)	0.033	1.000
	混合	2(5.4)	0(0)	1.726	0.496

表2 不同 CT 基因型 TFI 患者 cHSP60 表达水平之间的比较 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	n	cHSP60 (ng/L)	合计	cHSP60 (ng/L)	t 值	P 值
E	8	118.8 ± 18.2	23	116.5 ± 14.9	3.984	< 0.001
F	8	113.1 ± 11.0				
J	7	118.5 ± 14.2				
D	3	101.2 ± 5.3	6	101.8 ± 9.8		
E	3	102.2 ± 12.4				

3 讨论

CT 所致的生殖道感染是目前最常见的性传播疾病之一，其发病率分别 4 倍于淋病和 20 倍于梅毒^[7]，CT 感染者中女性约占 70%，又以 15 ~ 34 岁的性活跃者为主^[8]，感染后可导致包括宫颈炎、输卵管阻塞、慢性盆腔炎等常见妇科疾病，并且容易引起 TFI 的发生。其主要机制为 CT 感染后可通过阴道宫颈经输卵管蔓延到整个盆腔而引起盆腔急性炎症发作，严重时引起输卵管腔粘连闭塞及积液，甚至出现系膜组织及肠管、输卵管与子宫广泛粘连而导致不孕。

在不同 CT 基因型引起泌尿生殖道感染的相关研究中，有文献^[9]表明 F 型引起的宫颈黏液脓细胞显著低于 E 型，但由 F 型引起的子宫内膜疾病发生率更高，还有文献报道女性出现下腹痛的概率与 F 型 CT 的表达更密切^[10]。本研究显示，在 TFI 人群与其他原因不孕人群中 CT 的检出率组间差异有统计学意义，而且两组人群在不同 CT 基因型的分布比较差异亦有统计学意义。这表明不仅 CT 及其不同基因型的感染可能与 TFI 的发生存在某些关联。近年的分子流行病学研究结果表明^[5,7,13]，不同国家和地区，不同的族群 CT 基因型的分布都是有显著差异的，全球各国流行的相对优势基因型主要为 E、D 和 F 型。本研究中，梅州地区不孕人群中相对优势的基因型除了 E、F 和 J，还包括 G、D、H 和 K 型，

这和杨斌等^[3]研究的广东三市的基因型分布结果相似。

cHSP60 是热休克蛋白 gro-EL 家族同系物，它与真核生物 HSP60 约有 50% 的同源性，与人 HSP60 氨基酸顺序的同源性为 48%。cHSP60 是 CT 的主要致病物质之一，是导致机体免疫损伤的重要抗原，是适应性免疫的主要靶点，可诱导前炎症因子合成出现宫颈上皮细胞的凋亡^[14]。高水平的 cHSP60 可通过信号转导激活 Th1 和 Th2 分泌相关炎症因子诱导了炎症反应，是导致输卵管纤维化和管腔阻塞的重要原因，这种持续的免疫反应是永久性不可逆的输卵管损伤的重要原因^[15]。因此，cHSP60 和 TFI 密切相关，其生殖道中的表达水平对于评价 CT 的致病能力有一定的价值。本研究显示 TFI 患者生殖道中 cHSP60 的表达水平显著高于其他原因不孕患者，其中感染 E、F 和 J 基因型的 TFI 患者生殖道中 cHSP60 的表达水平明显高于感染 D 和 G 基因型的 TFI 患者，这进一步证实了不同 CT 基因型与 TFI 存在相关性的可能，E、F 和 J 型可能是相比 D 和 G 型能更高表达 cHSP60 的基因型，从而更容易引起 TFI。

本文只是从不同 CT 基因型与 TFI 的相关性和生殖道 cHSP60 的表达水平展开的初步研究，而这些都受患者人群、患者的个体差异和 CT 感染的时效性等诸多因素的影响，不同 CT 基因型间毒力是

否存在差异,是否某些型别与TFI更密切,还需要通过更大样本量的临床调查和动物实验等进行更周密的研究。

综上所述,TFI患者CT感染的主要基因型可能为E、F和J,而其他原因不孕患者CT感染的主要基因型可能为D和G型,不同CT基因型感染可能与TFI有关,E、F和J型可能是与TFI最密切的基因型,但要进一步了解CT基因型与TFI的关系和机制,还需深入研究。

参考文献:

- [1] LI Xue, LIANG Qingfeng, SU Guanyu, et al. Current research of *Chlamydial* infection diseases in China [J]. Chinese Medical Journal, 2018, 131(4): 486-489.
- [2] XUE Yaohua, ZHENG Heping, TANG Weiming, et al. Prevalence and genotype distribution of *Chlamydia trachomatis* in urine among men attending sexually transmitted disease clinics in Guangdong Province, China, in 2016 [J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2018, 71(2): 104-108.
- [3] 杨斌, 王柳苑, 薛耀华, 等. cHSP60 在不同基因型沙眼衣原体小鼠生殖道感染中的表达 [J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2014, 21 (6) :437-439.
YANG Bin, WANG Liuyuan, XUE Yaohua, et al. Expression of cHSP60 in mice genital with different genotypes *Chlamydia trachomatis* infection[J]. Journal of Diagnosis and Therapy on Dermato-venereology, 2014, 21(6): 437-439.
- [4] RANTSI T, JOKI-KORPELA P, HOKYNAR K, et al. Serum antibody response to *Chlamydia trachomatis* TroA and HtrA in women with tubal factor infertility[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2018, 37(8): 1499-1502.
- [5] BEYUO T, OPPONG S A, SAMBAA, et al. *Chlamydia trachomatis* infection among Ghanaian women undergoing hysterosalpingography for suspected tubal factor infertility[J]. International Journal of Gynaecology and Obstetrics, 2019, 146(2): 200-205.
- [6] 武卫华, 郝翠芳, 田丽娟, 等. 宫颈分泌物与盆腔液解脲支原体与沙眼衣原体检测在输卵管性不孕患者感染评估中的应用 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(22): 5216-5219.
WU Weihua, HAO Cuifang, TIAN Lijuan, et al. Application of detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* in cervical secretion and pelvic fluid in the evaluation of infection in tubal infertility patients[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2017, 27(22): 5216-5219.
- [7] RANTSI T, ÖHMAN H, PUOLAKKAINEN M, et al. Predicting tubal factor infertility by using markers of humoral and cell-mediated immune response against *Chlamydia trachomatis*[J]. American Journal of Reproductive Immunology (New York, 1989), 2018, 80(5): e13051.
- [8] 唐盈, 林佩萱, 陈翊, 等. 广州地区女性患者泌尿生殖道CT,NG,MG和UU感染状况分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5): 146-149.
TANG Ying, LIN Peixuan, CHEN Yi, et al. Status analysis of infection caused by *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeas*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in female patients from Guangzhou Area[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019,34(5):146-149.
- [9] BRASILIENSE D M, BORGES B N, FERREIRA W A. Genotyping and prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among women in Belém, Pará, northern Brazil[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2016, 10(2): 134-137.
- [10] EDER T, KOBUS S, STALLMANN S, et al. Genome sequencing of *Chlamydia trachomatis* serovars E and F reveals substantial genetic variation[J]. Pathogens and Disease, 2017, 75(9): ftx120.
- [11] IGE O, IGE S, OLAYINKA A. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among women of reproductive age group in a tertiary hospital in Northern Nigeria[J]. Annals of Tropical Pathology, 2018, 9(1):17-21.
- [12] JALAL H, VERLANDER N Q, KUMAR N, et al. Genital *Chlamydial* infection: association between clinical features, organism genotype and load[J]. Journal of Medical Microbiology, 2011, 60(Pt 7): 881-888.
- [13] RAWRE J, DHAWAN B, MALHOTRA N, et al. Prevalence and distribution of *Chlamydia trachomatis* genovars in Indian infertile patients: a pilot study[J]. Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, 2016, 124(12): 1109-1115.
- [14] 田红菊, 陈建林, 施晓波, 等. 联合检测血清CT-IgG60及CHSP60在筛查输卵管不孕中的价值 [J]. 中国妇幼健康研究, 2016, 27(4): 442-444.
TIAN Hongju, CHEN Jianlin, SHI Xiaobo, et al. Clinical value of joint detection of serum CT-IgG60 and CHSP60 in the screening for tubal infertility[J]. Chinese Journal of Woman and Child Health Research, 2016, 27(4): 442-444.
- [15] HJELHOLT A, CHRISTIANSEN G, JOHANNESSON T G, et al. Tubal factor infertility is associated with antibodies against *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 (HSP60) but not human HSP60[J]. Human Reproduction, 2011, 26(8): 2069-2076.

收稿日期: 2020-07-16

修回日期: 2020-08-02