

沙眼衣原体 pORF5 质粒蛋白通过激活 Drp1 诱导细胞线粒体自噬与线粒体分裂

邹燕¹, 郭柳亮¹, 唐伯如¹, 张君¹, 周玉珍², 龚思露^{3*}

1 湘潭市妇幼保健院 检验科, 湖南 湘潭

2 湘潭市妇幼保健院 遗传科, 湖南 湘潭

3 湖南中医药大学第二附属医院 检验科, 湖南 长沙

邹燕, 郭柳亮, 唐伯如, 张君, 周玉珍, 龚思露. 沙眼衣原体 pORF5 质粒蛋白通过激活 Drp1 诱导细胞线粒体自噬与线粒体分裂[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3382-3393.

ZOU Yan, GUO Liuliang, TANG Boru, ZHANG Jun, ZHOU Yuzhen, GONG Silu. *Chlamydia trachomatis* plasmid protein pORF5 induces mitophagy and mitochondrial fission by activating Drp1[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3382-3393.

摘要:【目的】探讨沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)质粒蛋白 pORF5 对细胞线粒体自噬及线粒体分裂的影响, 并阐明其机制是否与 Drp1 激活相关。【方法】采用慢病毒转染技术构建稳定表达 pORF5 基因的 HeLa 细胞株及对照细胞株, 经血清饥饿处理后, 采用 Western blotting 检测自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、Beclin-1 和泛素结合蛋白 p62 的表达水平, 利用间接免疫荧光检测 LC3 与线粒体外膜转位酶 20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOMM20)共定位水平; 采用 MitoTracker Red CMXRos 对线粒体进行染色, 利用激光共聚焦显微镜观察线粒体形态并分析相关形态参数; 通过 Western blotting 和间接免疫荧光检测动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1)的磷酸化水平及其在线粒体上的转位情况。为探究 Drp1 在细胞自噬和线粒体分裂中的作用, 采用激光共聚焦及间接免疫荧光评估 Drp1 特异性线粒体分裂抑制剂 1 (mitochondrial division inhibitor 1, Mdivi-1)预处理后细胞线粒体形态变化及 Drp1 转位情况, 采用 Western blotting 检测自噬相关蛋白的表达水平, 并运用间接免疫荧光法分析 LC3 的荧光强度及其与 TOMM20 的共定位情况。【结果】与对照组相比, pORF5 可显著上调 LC3-II 和 Beclin-1 蛋白表达, 下调 p62 表达, 并增强 LC3 与 TOMM20 的共定位; pORF5 表达导致线粒体网络结构碎片化; pORF5 能促进 Drp1 Ser616 位点磷酸化, 并增强 Drp1 在线粒体上的转位; 使用 Mdivi-1 抑制 Drp1 后可减弱 Drp1 磷酸化与转位, 使线粒体形态趋于延长; Mdivi-1 抑制剂处理组 LC3-II、Beclin-1 表达下调, p62 表达上调, 且 LC3 与 TOMM20 共定

资助项目: 湖南省自然科学基金(2024JJ6445, 2022JJ40324); 湖南省卫健委基金(W20243080)

This work was supported by the Hunan Provincial Natural Science Foundation (2024JJ6445, 2022JJ40324) and the Hunan Provincial Health Commission Fund (W20243080).

*Corresponding author. E-mail: snow5069@126.com

Received: 2025-12-25; Accepted: 2026-03-31; Published online: 2026-05-09

位减弱。【结论】沙眼衣原体 pORF5 蛋白通过促进 Drp1 磷酸化及线粒体转位, 进而诱导细胞线粒体自噬与线粒体分裂。

关键词: 沙眼衣原体; pORF5 质粒蛋白; Drp1; 线粒体自噬; 线粒体分裂

Chlamydia trachomatis plasmid protein pORF5 induces mitophagy and mitochondrial fission by activating Drp1

ZOU Yan¹, GUO Liuliang¹, TANG Boru¹, ZHANG Jun¹, ZHOU Yuzhen², GONG Silu^{3*}

1 Clinical Laboratory, Xiangtan Maternity and Child Health Care Hospital, Xiangtan, Hunan, China

2 Department of Genetic Medicine, Xiangtan Maternity and Child Health Care Hospital, Xiangtan, Hunan, China

3 Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of *Chlamydia trachomatis* plasmid protein pORF5 on cellular mitophagy and mitochondrial fission and to elucidate whether its mechanism is related to Drp1 activation. **[Methods]** HeLa cells stably expressing pORF5 and control cells were constructed by lentiviral transfection. After serum starvation treatment, the expression levels of autophagy-related proteins—microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), Beclin-1, and p62—were determined by Western blotting. Co-localization of LC3 and translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOMM20) was assessed by indirect immunofluorescence. Mitochondria were stained with MitoTracker Red CMXRos, and mitochondrial morphology was observed and analyzed through confocal laser scanning microscopy. Dynamin-related protein 1 (Drp1) phosphorylation and its translocation to mitochondria were examined by Western blotting and indirect immunofluorescence. To explore the role of Drp1 in autophagy and mitochondrial fission, we pretreated cells with the Drp1-specific mitochondrial division inhibitor 1 (Mdivi-1). Changes in mitochondrial morphology and Drp1 translocation were evaluated by confocal microscopy and indirect immunofluorescence. Then, Western blotting was employed to determine the expression levels of autophagy-related proteins, and indirect immunofluorescence assay to analyze LC3 fluorescence intensity and its co-localization with TOMM20. **[Results]** Compared with the control group, pORF5 significantly upregulated the expression of LC3-II and Beclin-1, downregulated the expression of p62, and enhanced the co-localization of LC3 and TOMM20. pORF5 expression led to the fragmentation of the mitochondrial network structure. It promoted Drp1 phosphorylation at Ser616 and enhanced Drp1 translocation to mitochondria. Inhibition of Drp1 with Mdivi-1 attenuated Drp1 phosphorylation and translocation, resulting in elongated mitochondrial morphology. In addition, the Mdivi-1 inhibitor group showed downregulated expression of LC3-II and Beclin-1, upregulated the expression of p62, and attenuated co-localization of LC3 and TOMM20. **[Conclusion]** The *C. trachomatis* plasmid protein pORF5 may induce mitophagy and mitochondrial fission by promoting Drp1 phosphorylation and its

mitochondrial translocation.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*; plasmid protein pORF5; Drp1; mitophagy; mitochondrial fission

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)是一种最常见的性传播病原体,具有19个血清型,致病谱广泛,可引起致盲性沙眼(A-C)、泌尿生殖道感染(D-K)及性病淋巴肉芽肿(L1-L3)等疾病^[1]。临床上,*C. trachomatis*生殖道感染通常症状隐匿,易延误诊治而导致盆腔炎、不孕不育、异位妊娠等严重并发症^[2]。此外,*C. trachomatis*已被证实是协同人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)促进宫颈癌发生发展的风险因子^[3],并可增强人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)和单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)的感染和传播能力^[4]。目前*C. trachomatis*的致病机制尚未完全阐明,因此深入探究其与宿主的相互作用机制对有效预防和控制*C. trachomatis*感染性疾病具有重要意义。

*C. trachomatis*为革兰氏阴性、具有独特双向发育周期的专性胞内寄生菌^[5]。为了顺利完成胞内复制,*C. trachomatis*需依赖宿主代谢获取营养物质,并调控宿主信号途径以逃避免疫清除^[6]。线粒体作为宿主细胞代谢与信号转导的核心枢纽,不仅提供能量,还广泛参与凋亡、自噬、氧化应激及钙稳态等重要生物学过程^[7]。因此,线粒体是*C. trachomatis*感染过程中操纵宿主细胞的重要靶标^[8]。研究表明,*C. trachomatis*在感染晚期可通过诱导线粒体自噬获取营养,从而实现自身增殖与持续存活^[9]。另有证据显示,*C. trachomatis*感染晚期伴随线粒体分裂^[10],但其如何协调调控线粒体分裂与自噬的分子机制尚不明确。

*C. trachomatis*通过分泌效应蛋白与宿主发生相互作用,进而调控宿主细胞信号通路^[11]。其中,pORF5是本课题组鉴定的唯一由*C. trachomatis*质粒编码的分泌性毒力蛋白,可

介导多种宿主信号通路^[12-13]。前期研究发现,pORF5能够通过上调HMGB1、激活未折叠蛋白反应诱导线粒体自噬^[14-15],但其在自噬过程中是否调控线粒体分裂的具体机制尚不明确。Drp1是调控线粒体分裂的关键蛋白^[16],研究证实Drp1 Ser616位点磷酸化可增强其活性并促进其向线粒体转位,进而诱导线粒体分裂^[17],而Drp1向线粒体的转位是启动线粒体自噬的重要步骤^[18]。因此,本文探究pORF5是否通过Drp1调控线粒体自噬和分裂。

为探究pORF5对线粒体自噬和线粒体分裂的调控作用,本研究构建了稳定过表达pORF5的HeLa细胞株,采用激光共聚焦显微镜观察线粒体形态变化,利用间接免疫荧光检测自噬水平,并采用Western blotting分析线粒体分裂相关蛋白的磷酸化状态及自噬标志蛋白的表达;进一步通过免疫荧光技术监测Drp1的线粒体定位情况,并结合Drp1抑制剂评价其对线粒体分裂与自噬过程的影响,从而系统揭示pORF5在*C. trachomatis*调控细胞线粒体分裂和自噬中的作用与机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

HeLa细胞株,旗赛生物科技(武汉)有限公司;pORF5和对照慢病毒,汉恒生物科技(上海)有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM培养基、胎牛血清,Keycell公司;线粒体分裂抑制剂1(mitochondrial division inhibitor-1, Mdivi-1),InvivoChem公司;PMSF、RIPA裂解液、ECL化学发光试剂,Servicebio公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒,广州捷倍斯

生物科技有限公司; MitoTracker Red CMXRos、DAPI, HRP 标记羊抗兔二抗, Beyotime 公司; LC3-B 抗体、Beclin-1 抗体, Abcam 公司; 兔抗 p62 抗体, CST 公司; 小鼠单抗 TOMM20、兔多抗 Drp1, Proteintech 公司; β -actin 抗体、p-Drp1 磷酸化抗体, Affinity 公司; HRP 标记羊抗小鼠二抗, 武汉三鹰生物技术有限公司; CY3-羊抗兔 IgG, Boster 公司; CY5-羊抗小鼠 IgG, 塞维尔生物科技有限公司。

激光共聚焦显微镜、荧光显微镜, 奥林巴斯公司。

1.3 构建 pORF5-HeLa 细胞和对照 HeLa 细胞稳转株

HeLa 细胞接种于 24 孔板后, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养过夜。待细胞融合度达 70%–80% 时, 以感染复数为 10 的剂量分别加入 pORF5 慢病毒或对照慢病毒。感染 6 h 后, 弃去病毒液并更换为新鲜完全培养基。病毒感染后 72 h, 使用倒置荧光显微镜观察荧光表达情况。之后, 更换为含有 2 μ g/mL 嘌呤霉素的培养基进行抗性筛选。

1.4 细胞培养与处理

细胞接种于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。待细胞融合度达 80%–90% 时进行相应实验处理。其中, 部分实验根据需要对 pORF5-HeLa 细胞进行抑制剂预处理: 使用 10 μ mol/L 的 Drp1 选择性抑制剂 Mdivi-1 预处理 1 h。

1.5 Western blotting 分析自噬相关蛋白和 Drp1 磷酸化水平

采用 RIPA 裂解液裂解各细胞样本后收集细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经高温变性后, 通过 SDS-PAGE 进行分离, 随后转至 PVDF 膜。使用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液室温封闭 2 h。之后根据实验需求加入 LC3-B、Beclin-1、p62、p-Drp1、Drp1 一抗, 于

4 °C 孵育过夜。次日经 TBST 洗涤后, 将膜与 HRP 标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗于 37 °C 孵育 1 h, 蛋白条带采用化学发光法进行显影。

1.6 线粒体形态染色

取对数生长期、生长状态良好的细胞, 以 1×10^5 个/孔接种于 12 孔板中的细胞爬片上, 37 °C 培养过夜。每孔加入 MitoTracker Red CMXRos 染料和 DAPI 染色工作液, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 30 min。采用激光共聚焦显微镜及其配套软件进行图像采集, 使用 ImageJ 软件的 Mitochondrial Analyzer 插件分析线粒体形态参数。

1.7 间接免疫荧光

将细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种于 12 孔板中的玻片上, 完成处理后用 37 °C 预热的 4% 多聚甲醛固定 30 min。经 37 °C PBS 洗涤 3 次后, 室温下用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 透化 10 min。PBS 洗涤 3 min 后, 室温下用正常山羊血清封闭 30 min。随后与抗 TOMM20 和 Drp1 的一抗于 4 °C 孵育过夜。PBST 洗涤 3 次后, 于 37 °C 避光条件下与 CY3-羊抗兔 IgG 及 CY5-羊抗鼠 IgG 二抗孵育 1 h。PBST 洗涤后, DAPI 避光染核 5 min, 再次 PBST 洗涤 3 次, 最终用抗荧光淬灭封片剂封片。使用激光共聚焦显微镜采集图像。

1.8 统计学分析

所有实验数据均采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 以 mean $\pm$ SD 表示。两组数据间的比较采用独立样本 *t* 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 pORF5 质粒蛋白诱导细胞线粒体自噬

细胞经饥饿处理后, Western blotting 结果显示: 与对照组相比, pORF5-HeLa 细胞中 LC3-II 与 Beclin-1 的蛋白水平显著升高, 而 p62 表达下

调(图 1A)。免疫荧光结果进一步证实, pORF5-HeLa 细胞中 LC3 荧光斑点显著增加, 且与线粒体标记蛋白 TOMM20 的共定位程度增强(图 1B)。

2.2 pORF5 质粒蛋白诱导线粒体分裂

激光共聚焦显微镜观察显示, 对照组中线粒体呈现连续、细长且相互连接的网状结构, 而 pORF5-HeLa 细胞中线粒体网络结构破碎, 片段化增加(图 2A)。为量化线粒体分裂程度, 本研究分析了线粒体形态各项参数(图 2B)。与对照组相比, pORF5-HeLa 细胞线粒体平均分支长度缩短(1.36 ± 0.12 vs. 0.55 ± 0.12)、分支长度缩短(2.20 ± 0.46 vs. 0.59 ± 0.14)、分支数减少(1.61 ± 0.25 vs. 1.06 ± 0.04)、分支结数减少(0.32 ± 0.13 vs. 0.03 ± 0.02)、平均面积减少(1.14 ± 0.24 vs. 0.45 ± 0.07)、平均周长减少(6.22 ± 0.89 vs. 2.70 ± 0.29), 差异均具有统计学意义($P < 0.0001$)。

2.3 pORF5 质粒蛋白使 Drp1 发生磷酸化及转位

Western blotting 结果显示, 相较于对照组, pORF5-HeLa 细胞组 Drp1 在 Ser616 位点的磷酸

化水平显著增加(图 3A)。同时, 免疫荧光分析结果显示, 与对照组相比, pORF5-HeLa 细胞中 Drp1 与线粒体的共定位显著增强(图 3B)。

2.4 pORF5 质粒蛋白通过 Drp1 诱导线粒体分裂

使用 Drp1 特异性抑制剂 Mdivi-1 预处理后, Western blotting 分析显示 pORF5-HeLa 细胞 p-Drp1 (Ser616) 的表达水平显著降低(图 4A)。免疫荧光观察发现, 相较于对照组, Mdivi-1 预处理组 Drp1 与线粒体的共定位明显减少(图 4B)。线粒体形态学观察进一步显示, 与未处理组相比, Mdivi-1 显著缓解了 pORF5 诱导的线粒体碎片化现象(图 4C)。线粒体形态分析结果显示(图 4D), 经 Mdivi-1 处理的 pORF5-HeLa 细胞线粒体平均分支长度延长(0.57 ± 0.13 vs. 1.23 ± 0.15)、分支长度延长(0.60 ± 0.15 vs. 1.71 ± 0.34)、分支数增加(1.04 ± 0.03 vs. 1.39 ± 0.16)、分支结数增加(0.02 ± 0.02 vs. 0.20 ± 0.01)、平均面积增加(0.49 ± 0.09 vs. 1.27 ± 0.18)、平均周长增加(2.83 ± 0.35 vs. 5.42 ± 0.61), 两组相比差异均具有统计学意义($P < 0.0001$)。

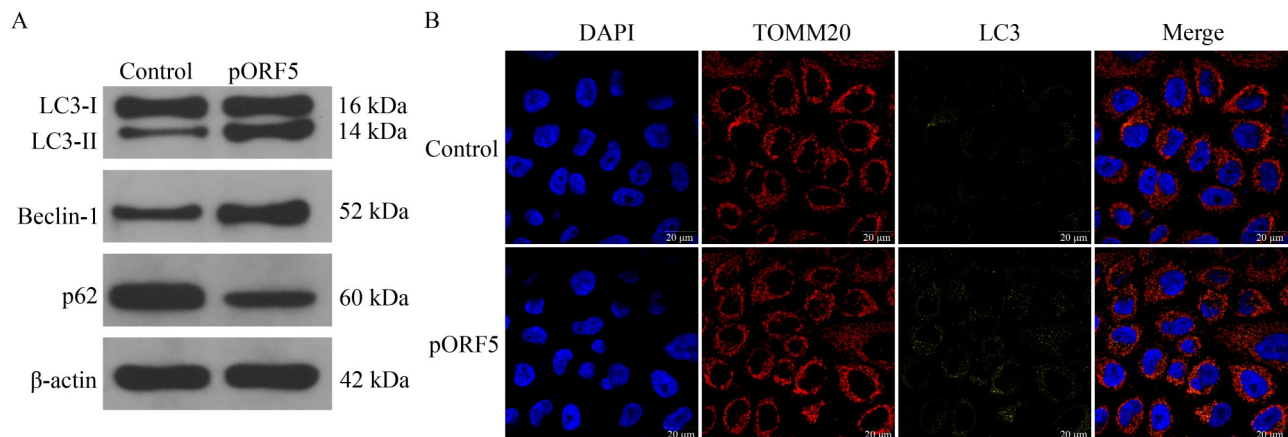


图1 pORF5质粒蛋白对HeLa细胞自噬的影响

Figure 1 Effect of pORF5 plasmid protein on autophagy in HeLa cells. A: Western blotting analysis of protein expression levels of LC3, Beclin-1, and p62; B: Indirect immunofluorescence detection of LC3 expression and mitochondrial co-localization.

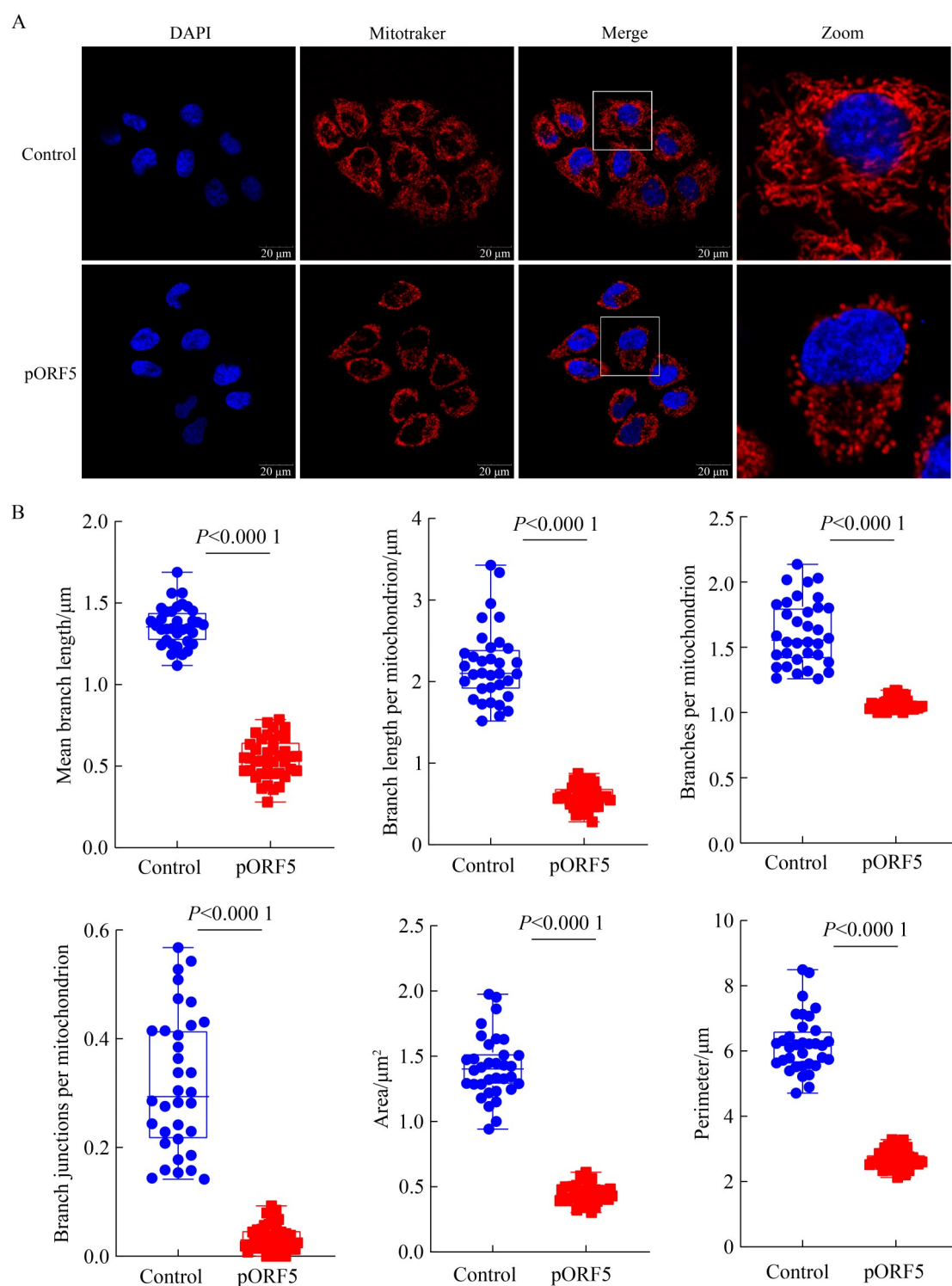


图2 pORF5质粒蛋白对线粒体分裂的影响

Figure 2 Effect of pORF5 plasmid protein on mitochondrial fission. A: Mitochondrial morphology observed by laser scanning confocal microscopy; B: Analysis of mitochondrial morphological parameters (mean branch length, branch length, branches, branch junctions, mean area, mean perimeter).

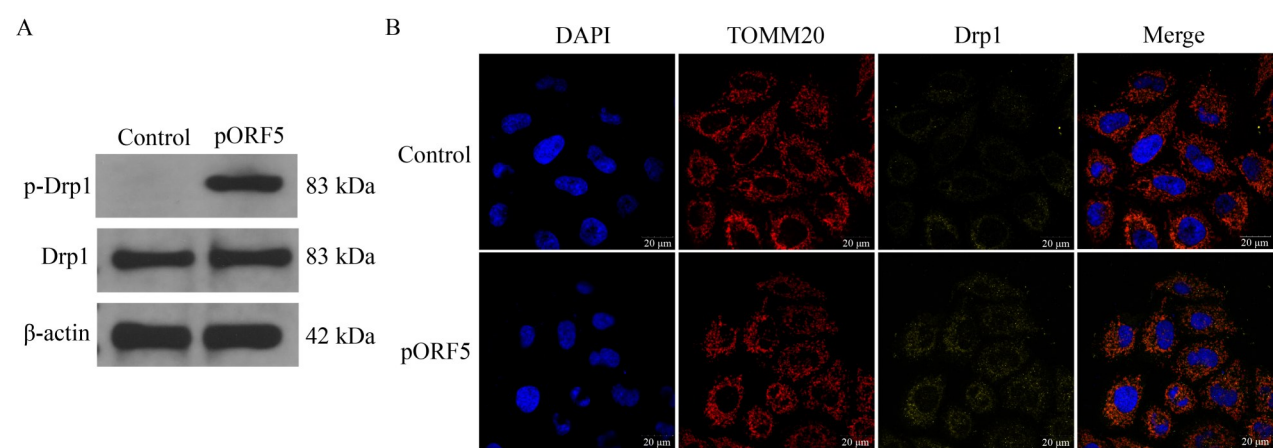
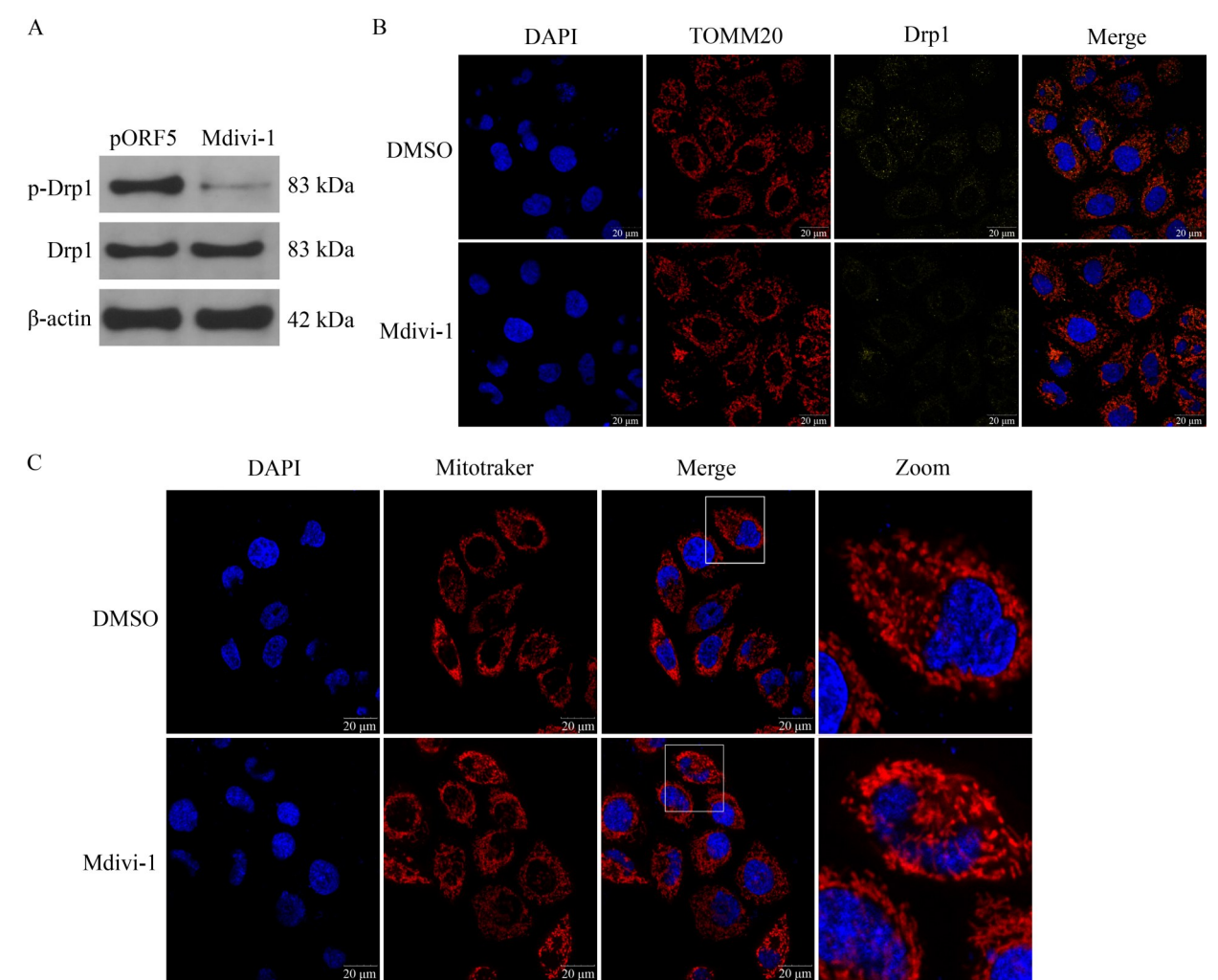


图3 pORF5质粒蛋白诱导Drp1磷酸化及转位

Figure 3 pORF5 plasmid protein induces Drp1 phosphorylation and translocation. A: Western blotting analysis of total Drp1 and p-Drp1 (Ser616) protein expression levels; B: Detection of Drp1 translocation by indirect immunofluorescence.



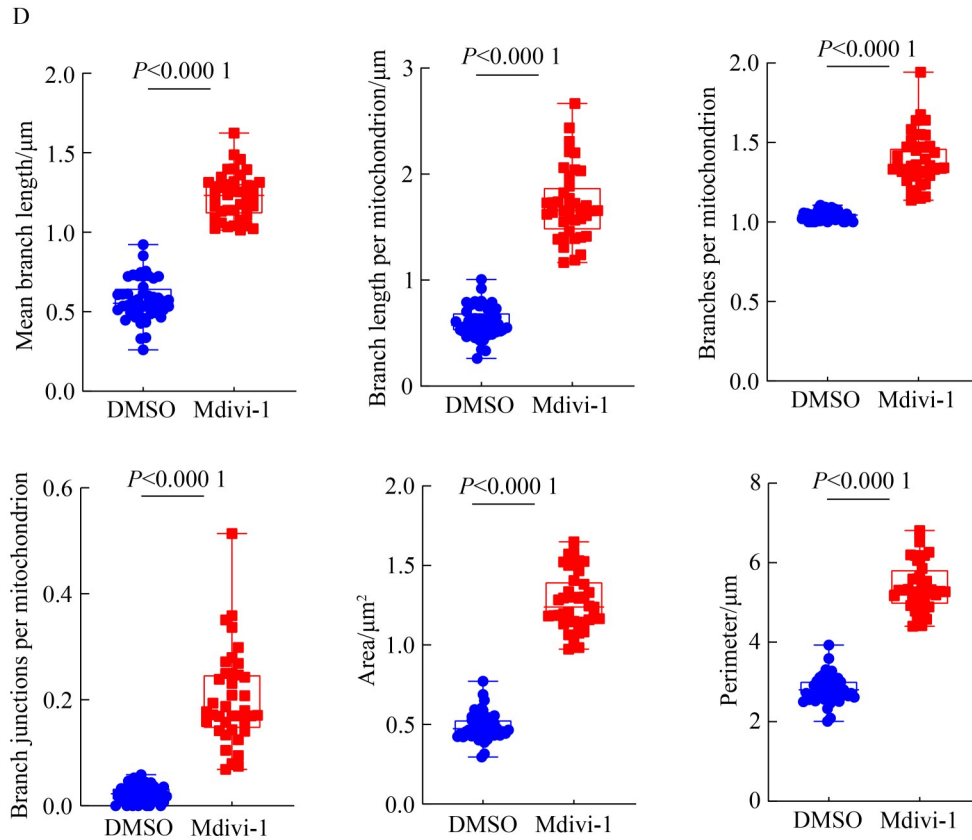


图4 pORF5通过Drp1诱导线粒体分裂

Figure 4 pORF5 induces mitochondrial fission *via* Drp1. A: Western blotting analysis of total Drp1 and p-Drp1 (Ser616) protein expression levels; B: Indirect immunofluorescence detection of Drp1 translocation; C: Mitochondrial morphology observed by laser scanning confocal microscopy after pretreatment with the Mdivi-1 inhibitor; D: Analysis of mitochondrial morphological parameters (mean branch length, branch length, branches, branch junctions, mean area, mean perimeter).

2.5 pORF5 质粒蛋白通过 Drp1 诱导细胞线粒体自噬

Western blotting 结果显示, 相较于 DMSO 对照组, Mdivi-1 预处理组 LC3-II 和 Beclin-1 蛋白表达水平降低, 而 p62 蛋白表达水平升高 (图 5A)。间接免疫荧光结果显示, 相较于对照组, Mdivi-1 预处理组 LC3 荧光强度减弱, 且与线粒体的共定位也减少 (图 5B)。

3 讨论与结论

本研究发现, pORF5 能够特异性激活线粒

体分裂关键蛋白 Drp1, 通过促进其 Ser616 位点的磷酸化驱动线粒体网络碎片化并诱导线粒体自噬 (图 6)。利用抑制剂 Mdivi-1 阻断 Drp1 功能可同时逆转 pORF5 诱导的线粒体分裂与自噬。本研究揭示了 pORF5 通过激活 Drp1 这一枢纽蛋白, 协同调控线粒体分裂与自噬的完整通路, 确立了“pORF5-Drp1 轴”在 *C. trachomatis* 感染中的新机制, 为理解 *C. trachomatis* 如何精细调控宿主细胞环境以维持其持续性感染提供了全新视角。

C. trachomatis 是一种专性胞内寄生病原体, 为实现胞内生长发育和增殖, 其可分泌多种

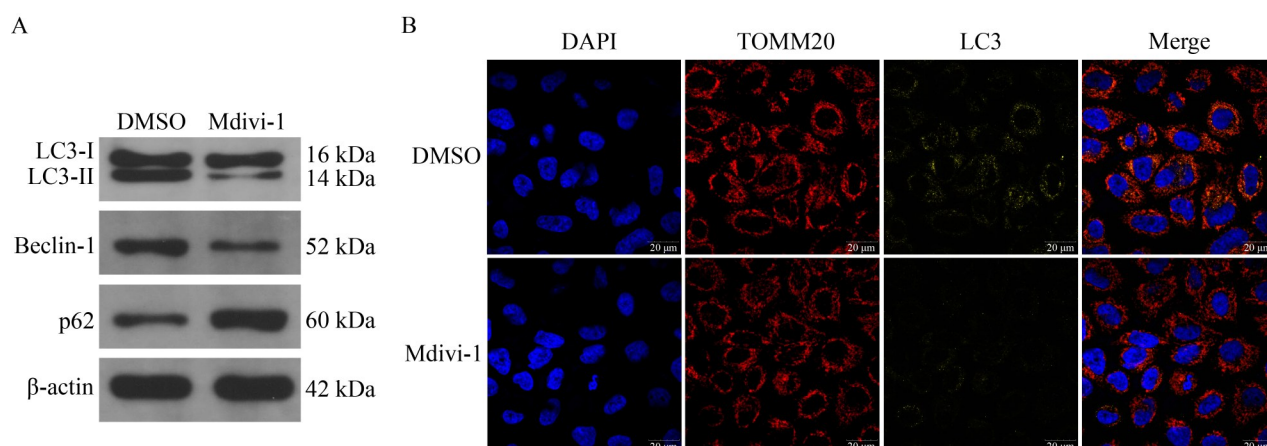


图5 Drp1对pORF5质粒蛋白诱导自噬的影响

Figure 5 Effect of Drp1 on pORF5 plasmid protein-induced autophagy. A: Western blotting analysis of the protein expression levels of LC3, Beclin-1, and p62 after pretreatment with the Mdivi-1 inhibitor; B: Detection of LC3 expression and localization by indirect immunofluorescence after pretreatment with the Mdivi-1 inhibitor.

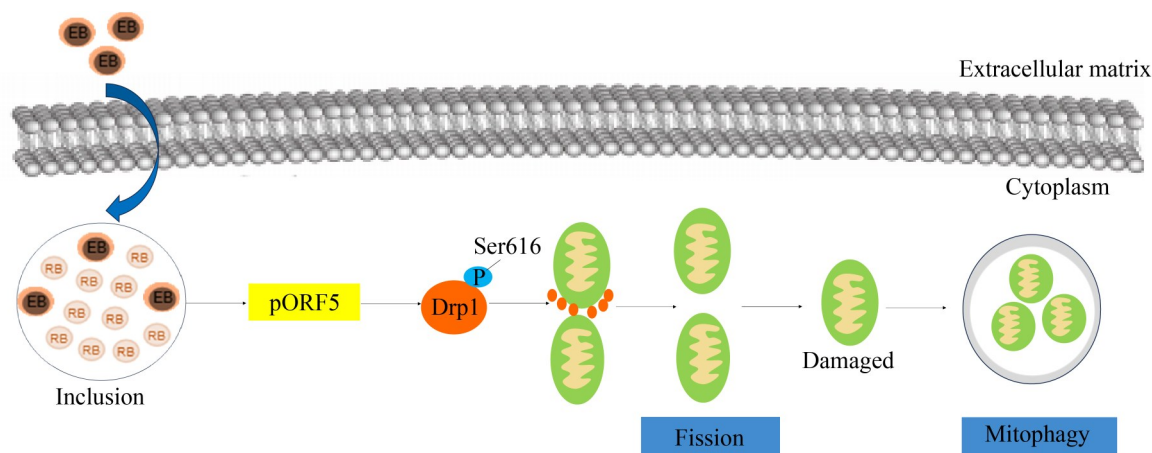


图6 沙眼衣原体pORF5质粒蛋白通过激活Drp1诱导细胞线粒体自噬与线粒体分裂信号简图

Figure 6 Schematic diagram of *Chlamydia trachomatis* pORF5 plasmid protein induces mitophagy and mitochondrial fission via Drp1 activation. *C. trachomatis* secretes the pORF5 protein into the host cell cytoplasm. pORF5 promotes the phosphorylation of the mitochondrial fission key protein Drp1 at its Ser616 site by activating it. The activated Drp1 is recruited to the mitochondrial outer membrane, mediating excessive mitochondrial fission and generating functionally impaired fragments. These damaged mitochondria are enveloped by autophagosomes to form mitophagosomes, which ultimately fuse with lysosomes and are degraded, thereby completing the mitophagy process.

效应蛋白干扰宿主细胞的生理过程，包括细胞增殖、自噬和细胞凋亡等^[19]。大多数 *C. trachomatis* 血清型携带一个约 7.5 kb 的隐蔽性质粒^[20]，该质粒的缺失可导致 *C. trachomatis*

在小鼠生殖道及非人灵长类动物眼道中的毒力显著减弱^[21-22]，提示该隐蔽性质粒在 *C. trachomatis* 致病机制中具有核心作用。该质粒编码 8 个开放阅读框(pORF1-pORF8)，其中

pORF5 是唯一分泌至宿主细胞质内的质粒蛋白^[12]。研究已证实 pORF5 是 *C. trachomatis* 感染过程中的重要毒力因子, 能够引起生殖道免疫病理损伤并促进持续感染^[23]。在机制层面, 既往研究揭示 pORF5 可通过调控宿主蛋白表达影响多条信号通路诱导线粒体自噬^[14-15]。值得注意的是, 线粒体自噬与线粒体分裂密切相关, 线粒体分裂可产生功能异常的子代线粒体, 从而触发线粒体自噬将其清除^[24]。二者关系紧密, 相继发生且协同维持细胞内线粒体稳态, 从而保障细胞正常生理活动^[25]。本研究阐明了 pORF5 通过磷酸化激活 Drp1 来介导线粒体分裂和自噬, 不仅为 pORF5 诱导线粒体自噬的现象提供了机制上的解释, 也揭示了 *C. trachomatis* 通过 pORF5 操控宿主线粒体质量控制系统的新策略。

线粒体自噬是细胞选择性清除功能异常或受损线粒体的过程, 既是细胞内的“再循环系统”, 也是一种抵御病原体的先天性免疫防御机制^[26]。*C. trachomatis* 与线粒体自噬之间的相互作用较为复杂: *C. trachomatis* 感染宿主后, 一方面可诱导自噬以获取自身增殖所需的营养物质; 另一方面也能干扰自噬进程, 从而逃避被宿主降解与清除^[9]。已有研究表明, *C. trachomatis* 感染宿主细胞 24 h 后可诱导自噬特异性指标的表达; 而敲除自噬相关基因后, *C. trachomatis* 的感染率上升, 提示自噬在 *C. trachomatis* 感染中具有一定作用^[27]。本研究中 pORF5 的表达上调了 LC3-II 及 Beclin-1 蛋白水平, 同时下调了 p62 蛋白水平; 免疫荧光结果进一步显示 LC3 荧光强度增强, 且与线粒体的共定位增加(图 1)。由于 LC3-II 水平的升高既可能是自噬诱导的结果, 也可能是溶酶体降解受阻所致^[28], 因此本研究增加了自噬流的检测, 即增设自噬抑制剂氯喹(chloroquine, CQ)处理组以阻断溶酶体降解。结果表明, pORF5 与 CQ 联合组的 LC3-II 累积量显著高于单纯抑制剂对照组[数据已上传 ScienceDB 数据库(<https://www.scidb.cn/communities>), CSTR 编号为 31253.11.sciencedb.j00231.00067]。上述

结果一致表明 pORF5 能够诱导线粒体自噬, 与已有研究结论相符。

线粒体是一种高度动态的细胞器, 通过持续的融合与分裂过程维持其网络稳态^[29]。近年来研究发现, 多种细菌入侵宿主细胞后可通过调控线粒体融合与分裂来逃避免疫清除并促进自身繁殖, 这已成为感染性疾病机制研究的一个重要方向^[30]。Kurihara 等^[10]在研究中观察到, *C. trachomatis* 感染 HeLa 细胞后线粒体形态呈现动态变化: 感染早期以融合为主, 而感染晚期则表现为分裂增强。进一步研究显示, *C. trachomatis* 感染早期诱发的线粒体融合与线粒体呼吸活性增强、ATP 含量升高及衣原体增殖密切相关, 而感染后期线粒体分裂的加剧, 可能与细菌快速增殖所需的高代谢适应有关^[31], 但其具体原因与分子机制尚不明确。本研究通过 MitoTracker Red CMXRos 染色及激光共聚焦显微镜观察发现, 与对照组相比, pORF5 稳转细胞中线粒体呈现显著碎片化表型, 线粒体网络参数(分支数、分支长度、平均分支长度及分支连接数)均减少, 反映线粒体大小的参数(平均面积、平均周长)也减少(图 2)。这些结果提示 pORF5 具有促进线粒体分裂的作用, 从而为阐释 *C. trachomatis* 感染后期线粒体分裂的调控机制提供了新的实验依据。

Drp1 是调控线粒体分裂的关键蛋白, 正常情况下定位于胞质中, 在接受线粒体分裂信号后可被招募至线粒体表面, 通过寡聚化及 GTP 水解驱动线粒体分裂^[16]。研究已证实, Drp1 Ser616 位点的磷酸化能增强其活性并促进其向线粒体转位^[17]。本研究发现, pORF5 并不影响 Drp1 总蛋白表达, 但明显增加其 Ser616 磷酸化水平, 并促进 Drp1 向线粒体易位(图 3)。使用 Mdivi-1 抑制 Drp1 活性后, 其磷酸化和易位过程均受到阻碍, 同时 pORF5 所诱导的线粒体分裂也被有效抑制(图 4)。上述结果表明, pORF5 通过 Drp1 Ser616 磷酸化来促进线粒体分裂。

近年来研究表明 Drp1 介导的线粒体分裂与

线粒体自噬之间存在密切的相互依赖关系^[32]。Drp1 可与自噬受体 FUNDC1 和 BNIP3 等蛋白发生相互作用诱导自噬^[33]，且 Drp1 Ser616 位点发生磷酸化并触发线粒体分裂后也可促进自噬^[34]；反之 Drp1 缺失在阻碍线粒体分裂的同时，也会影响线粒体自噬^[35]。本研究发现，使用 Mdivi-1 抑制 Drp1 活性后，pORF5 稳转细胞中 LC3-II 和 Beclin-1 的表达水平下降，p62 表达上调，同时 LC3 荧光强度降低，且与线粒体共定位减少(图 5)。上述结果表明，Drp1 在 pORF5 诱导线粒体自噬过程中发挥着重要作用。然而，本研究主要利用药理学抑制剂 Mdivi-1 来干预 Drp1 功能。尽管 Mdivi-1 在线粒体分裂研究中被广泛用作 Drp1 的特异性抑制剂^[36-37]，但本研究注意到近期有研究提示，Mdivi-1 可通过抑制线粒体复合物 I 依赖的氧消耗和逆转电子传递介导的 ROS 来靶向线粒体分裂^[38]，因此未来将通过 Drp1 敲除或显性负性突变体等方法进一步夯实 Drp1 在本通路中的核心地位。pORF5 如何激活 Drp1？其调控宿主线粒体分裂与自噬的生物学反应机制对 *C. trachomatis* 感染有何作用？这些问题均需进一步深入研究。

作者贡献声明

邹燕：实验设计、数据采集与分析、论文撰写、基金支持；郭柳亮：数据整理与分析；唐伯如：实验指导、经费管理；张君：图表制作；周玉珍：统计学分析；龚思露：实验方案指导、论文审阅与修改、基金支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Hocking JS, Geisler WM, Kong FYS. Update on the epidemiology, screening, and management of *Chlamydia trachomatis* infection[J]. Infectious Disease Clinics of North America, 2023, 37(2): 267-288.
- [2] Rodrigues R, Sousa C, Barros A, Vale N. *Chlamydia trachomatis*: from urogenital infections to the pathway of infertility[J]. Genes, 2025, 16(2): 205.
- [3] Gargiulo Isacco C, Balzanelli MG, Garzone S, Lorusso M, Inchingolo F, Nguyen KCD, Santacroce L, Mosca A, Del Prete R. Alterations of vaginal microbiota and *Chlamydia trachomatis* as crucial co-causative factors in cervical cancer genesis procured by HPV[J]. Microorganisms, 2023, 11(3): 662.
- [4] Mcharo RD, Kisinda A, Njovu L, Mcharo M, Mbwilo F, Mihale G, Komba B, Andrew E, Mayaud P, Kroidl A, Ivanova O, Msuya SE. Prevalence of and risk factors associated with HIV, herpes simplex virus-type 2, *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections among 18–24 years old students attending Higher Learning Institutions in Mbeya-Tanzania[J]. PLoS One, 2022, 17(5): e0266596.
- [5] Murray SM, McKay PF. *Chlamydia trachomatis*: cell biology, immunology and vaccination[J]. Vaccine, 2021, 39(22): 2965-2975.
- [6] Smith EP, Valdivia RH. *Chlamydia trachomatis*: a model for intracellular bacterial parasitism[J]. Journal of Bacteriology, 2025, 207(3): e00361-24.
- [7] Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E, Nunes JPS. Mitochondria as a cellular hub in infection and inflammation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11338.
- [8] Cheong HC, Sulaiman S, Looi CY, Chang LY, Wong WF. *Chlamydia* infection remodels host cell mitochondria to alter energy metabolism and subvert apoptosis[J]. Microorganisms, 2023, 11(6): 1382.
- [9] Zhang S, Jiang YF, Yu YH, Ouyang X, Zhou DS, Song YJ, Jiao J. Autophagy: the misty lands of *Chlamydia trachomatis* infection[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2024, 14: 1442995.
- [10] Kurihara Y, Itoh R, Shimizu A, Walenna NF, Chou B, Ishii K, Soejima T, Fujikane A, Hiromatsu K. *Chlamydia trachomatis* targets mitochondrial dynamics to promote intracellular survival and proliferation[J]. Cellular Microbiology, 2019, 21(1): e12962.
- [11] Stelzner K, Vollmuth N, Rudel T. Intracellular lifestyle of *Chlamydia trachomatis* and host-pathogen interactions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2023, 21(7): 448-462.
- [12] Li ZY, Chen D, Zhong YM, Wang SP, Zhong GM. The chlamydial plasmid-encoded protein pgp3 is secreted into the cytosol of *Chlamydia*-infected cells[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(8): 3415-3428.
- [13] Zou Y, Dai WT, Lei WB, Su SM, Huang QL, Zhou Z, Chen CQ, Li ZY. Identification of proteins interacting with pORF5 in the pathogenesis of *C. trachomatis*[J]. American Journal of Translational Research, 2018, 10(6): 1633-1647.
- [14] Lei WB, Li Q, Su SM, Bu JC, Huang QL, Li ZY. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded protein pORF5 protects mitochondrial function by inducing mitophagy and increasing HMGB1 expression[J]. Pathogens and Disease, 2017, 75(9): ftx111.
- [15] Wen YT, Luo FZ, Zhao YQ, Su SM, Shu MY, Li ZY. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded protein pORF5

- activates unfolded protein response to induce autophagy via MAPK/ERK signaling pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 527(3): 805-810.
- [16] Jin JY, Wei XX, Zhi XL, Wang XH, Meng D. Drp1-dependent mitochondrial fission in cardiovascular disease[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2021, 42(5): 655-664.
- [17] Bo T, Yamamori T, Suzuki M, Sakai Y, Yamamoto K, Inanami O. Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) mediates radiation-induced mitochondrial fission by regulating the phosphorylation of dynamin-related protein 1 (Drp1) at serine 616[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 495(2): 1601-1607.
- [18] Tong MM, Mukai RS, Mareedu S, Zhai PY, Oka SI, Huang CY, Hsu CP, Yousufzai FAK, Fritzky L, Mizushima W, Babu GJ, Sadoshima J. Distinct roles of DRP1 in conventional and alternative mitophagy in obesity cardiomyopathy[J]. *Circulation Research*, 2023, 133(1): 6-21.
- [19] McCullough A, Huang S, Weber MM. Pathogenicity and virulence of *Chlamydia trachomatis*: insights into host interactions, immune evasion, and intracellular survival[J]. *Virulence*, 2025, 16: 2503423.
- [20] Turman BJ, Darville T, O'Connell CM. Plasmid-mediated virulence in *Chlamydia*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1251135.
- [21] Yang CF, Kari L, Lei L, Carlson JH, Ma L, Couch CE, Whitmire WM, Bock K, Moore I, Bonner C, McClarty G, Caldwell HD. *Chlamydia trachomatis* plasmid gene protein 3 is essential for the establishment of persistent infection and associated immunopathology[J]. *mBio*, 2020, 11(4): e01902-20.
- [22] Kari L, Whitmire WM, Olivares-Zavaleta N, Goheen MM, Taylor LD, Carlson JH, Sturdevant GL, Lu CX, Bakios LE, Randall LB, Parnell MJ, Zhong GM, Caldwell HD. A live-attenuated chlamydial vaccine protects against trachoma in nonhuman primates[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2011, 208(11): 2217-2223.
- [23] Huang YM, Wu HQ, Sun YN, Liu YJ. Tryptophan residue of plasmid-encoded Pgp3 is important for *Chlamydia muridarum* to induce *Hydroalpinx* in mice[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1216372.
- [24] Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan JY, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy[J]. *The EMBO Journal*, 2008, 27(2): 433-446.
- [25] Wang HR, Luo WJ, Chen HY, Cai ZD, Xu GB. Mitochondrial dynamics and mitochondrial autophagy: molecular structure, orchestrating mechanism and related disorders[J]. *Mitochondrion*, 2024, 75: 101847.
- [26] Sharma S, Tiwari M, Tiwari V. Molecular mechanisms of bacteria induced autophagy and its escape strategies[J]. *Future Microbiology*, 2020, 15(5): 303-306.
- [27] Wang FY, Zhang HB, Lu XF, Zhu Q, Shi TT, Lu R, Yu P, Zhang L, Wang Y. *Chlamydia trachomatis* induces autophagy by p62 in HeLa cell[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(3): 50.
- [28] Ueno T, Komatsu M. Monitoring autophagy flux and activity: principles and applications[J]. *BioEssays*, 2020, 42(11): 2000122.
- [29] Chen W, Zhao HK, Li YS. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 333.
- [30] Khan S, Raj D, Jaiswal K, Lahiri A. Modulation of host mitochondrial dynamics during bacterial infection[J]. *Mitochondrion*, 2020, 53: 140-149.
- [31] Chowdhury SR, Reimer A, Sharan M, Kozjak-Pavlovic V, Eulalio A, Prusty BK, Fraunholz M, Karunakaran K, Rudel T. *Chlamydia* preserves the mitochondrial network necessary for replication via microRNA-dependent inhibition of fission[J]. *Journal of Cell Biology*, 2017, 216(4): 1071-1089.
- [32] Quiles JM, Gustafsson ÅB. The role of mitochondrial fission in cardiovascular health and disease[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2022, 19(11): 723-736.
- [33] Wu WX, Lin CX, Wu K, Jiang L, Wang XJ, Li W, Zhuang HX, Zhang XL, Chen H, Li SP, Yang Y, Lu Y, Wang JJ, Zhu RZ, Zhang LQ, Sui SF, Tan N, Zhao B, Zhang JJ, Li LX, et al. FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics at the ER-mitochondrial contact site under hypoxic conditions[J]. *The EMBO Journal*, 2016, 35(13): 1368-1384.
- [34] Feng W, Wang J, Yan X, Zhang QQ, Chai LM, Wang QT, Shi WH, Chen YQ, Liu J, Qu Z, Li SJ, Xie XM, Li MX. ERK/Drp1-dependent mitochondrial fission contributes to HMGB1-induced autophagy in pulmonary arterial hypertension[J]. *Cell Proliferation*, 2021, 54(6): e13048.
- [35] Cahill TJ, Leo V, Kelly M, Stockenhuber A, Kennedy NW, Bao LY, Cereghetti G, Harper AR, Czibik G, Lao CY, Bellahcene M, Steeples V, Ghaffari S, Yavari A, Mayer A, Poulton J, Ferguson DJP, Scorrano L, Hettiarachchi NT, Peers C, et al. Resistance of dynamin-related protein 1 oligomers to disassembly impairs mitophagy, resulting in myocardial inflammation and heart failure[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(43): 25907-25919.
- [36] Manczak M, Kandimalla R, Yin XL, Reddy PH. Mitochondrial division inhibitor 1 reduces dynamin-related protein 1 and mitochondrial fission activity[J]. *Human Molecular Genetics*, 2019, 28(2): 177-199.
- [37] Wang YT, Lu MQ, Xiong LP, Fan JJ, Zhou Y, Li HY, Peng X, Zhong Z, Wang YH, Huang FX, Chen W, Yu XQ, Mao HP. Drp1-mediated mitochondrial fission promotes renal fibroblast activation and fibrogenesis[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11: 29.
- [38] Bordt EA, Clerc P, Roelofs BA, Saladino AJ, Tretter L, Adam-Vizi V, Cherok E, Khalil A, Yadava N, Ge SX, Francis TC, Kennedy NW, Picton LK, Kumar T, Uppuluri S, Miller AM, Itoh K, Karbowski M, Sesaki H, Hill RB, et al. The putative Drp1 inhibitor mdivi-1 is a reversible mitochondrial complex I inhibitor that modulates reactive oxygen species[J]. *Developmental Cell*, 2017, 40(6): 583-594.e6.