

/学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520121153120

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

梅毒螺旋体对人白血病单核细胞 (THP-1)  
来源巨噬细胞极化的影响

Effects of *Treponema pallidum* on THP-1 derived  
macrophage polarization

席亚

指导教师姓名: 杨天赐

专 业 名 称: 临床检验诊断学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

2015 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 摘 要

梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*) 是性传播疾病梅毒的致病菌, 尽管有关 *T. pallidum* 的研究已经开展近一个多世纪, 对其生物学及病原学特性有了一定的了解, 然而对于 *T. pallidum* 致病机制的认识还处于起步阶段。巨噬细胞作为机体防御外来病原体的第一道防线, 在对 *T. pallidum* 的识别、吞噬、抗原提呈、杀伤等方面均发挥着重要作用。随着对巨噬细胞研究不断深入, 有学者将巨噬细胞分为两种不同的极化类型, 即促进炎症发展的 M1 型巨噬细胞和在抑制炎症反应及组织修复等方面发挥作用的 M2 型巨噬细胞。巨噬细胞的极化是一个动态的过程, 不同的微环境中可以表现出不同的表型。但到目前为止梅毒感染与巨噬细胞极化的关系尚未有人提出。本研究包括构建 THP-1 单核细胞来源巨噬细胞极化模型。体外用 *T. pallidum* 刺激 THP-1 单核细胞来源巨噬细胞, RT-PCR、ELISA 等方法检测巨噬细胞细胞因子分泌情况, 判断巨噬细胞极化方向。同时采用 Latex bead 荧光微球方法及免疫荧光显微镜方法检测 M1 及 M2 两种巨噬细胞吞噬能力的差异。实验结果表明, THP-1 在细胞因子 IFN- $\gamma$ 、LPS 和 IL-4 的刺激下, 可成功极化为 M1 及 M2 两种类型, *T. pallidum* 刺激 THP-1 来源的 M0 型巨噬细胞 24h, 可产生 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等促炎性因子, 使巨噬细胞往 M1 方向发生极化。Latex beads 方法检测不同极化类型巨噬细胞吞噬能力的差异, 结果显示 M2 型巨噬细胞吞噬微球的能力较 M1 型明显增强。但采用荧光显微镜观察巨噬细胞对梅毒螺旋体的吞噬情况发现不同极化类型巨噬细胞对 *T. pallidum* 的吞噬差异并不显著。试验初步成功建立了 THP-1 单核细胞来源巨噬细胞极化模型, 为后续试验提供了良好的前期基础, 体外试验说明 THP-1 型 M0 型巨噬细胞在受到 *T. pallidum* 刺激后可向 M1 方向发生极化, 但具体极化机制还有待进行体内试验及动物试验进一步验证。

**关键词:** 梅毒螺旋体; 巨噬细胞极化; 吞噬能力

## Abstract

*Treponema pallidum* is the pathogenic bacteria of sexually transmitted disease — syphilis. Despite the inherent difficulties in investigating this organism, researchers have been successful in uncovering some of the secrets of *T. pallidum*'s biology and the pathogenesis in the past century, but how the *T. spirochete* causes the various clinical features is still a great mystery. Macrophages play a pivotal role in the process of recognizing, phagocytosis, presentation, killing during the infection of *T. pallidum*. Based on their reactions to different stimulants, macrophages can be classified into two activation states. M1 macrophages play a part in the defence against bacteria or viral infection. M2 macrophages play a role in parasite infection, tissue modelling, immunoregulation. Macrophage polarization is a dynamic process which can exhibit different phenotype in various microenvironment. Polarization was analysed using gene expression and surface marker of well-known M1 and M2 marker genes. *T. pallidum* were investigated for their polarizing ability on M0 THP-1 macrophage towards either the M1 and M2 state. Latex beads and immunofluorescence microscopy techniques were used to test the phagocytosis capacity between M1 and M2. Based on the expression of M1 and M2 marker genes we conclude that THP-1 macrophage could be successfully polarized into either the M1 or M2 state. *T. pallidum* primed-THP-1 macrophage strongly expressed M1 marker genes in vitro, suggesting that macrophage can polarize to M1, but a more precise conclusion needs further research. Furthermore, latex beads were used to detect the phagocytic capacity between M1 and M2, results showed that IL-4 enhanced macrophage phagocytosis capacity compared with the M1 and control group. While the in vitro phagocytosis of *T. pallidum* by macrophage studied by indirect immunofluorescence assay (IFA) exhibits no significant difference. In conclusion, we expected that our study will contribute to better understanding macrophage polarization. Furthermore, the effect of *T. pallidum* on macrophage polarization needs to be more in-depth research.

**Keywords:** *Treponema pallidum*; macrophage polarization; phagocytic activity

## 中英文缩略词表

简写	全称	中文名
PMA	phorbol ester	佛波酯
Tp	Treponema pallidum	梅毒螺旋体
IL-4	interleukin-4	白介素-4
LPS	lipopolysaccharide	胎牛血清
PCR	polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$	$\gamma$ -干扰素
M $\phi$	macrophage	巨噬细胞
CAM	classical activated macrophage	经典途径激活巨噬细胞
AAM	alternatively activated macrophage	替代途径激活巨噬细胞
CKs	cytokines	细胞因子引物
IL-10	interleukin-10	白介素-10
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
PE	p-phycoerythrin	藻红蛋白
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
RPR	rapid plasma regain	快速血浆反应素试验
VDRL	venereal disease research laboratory test	性病研究实验室实验

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
中英文缩略词表 .....	III
目 录.....	1
第一章 绪论 .....	1
1.1 梅毒的概述.....	1
1.1.1 梅毒的流行病学特点.....	2
1.1.2 梅毒螺旋体的生物学特点.....	2
1.1.3 梅毒螺旋体的抗原性与侵袭性.....	2
1.1.4 梅毒螺旋体的致病特点 .....	3
1.1.5 梅毒的诊断方法.....	4
1.1.6 梅毒感染后的炎症及免疫学反应.....	5
1.2 巨噬细胞的研究进展.....	6
1.2.1 巨噬细胞概述.....	6
1.2.2 巨噬细胞极化的概述.....	7
1.2.3 巨噬细胞的可塑性.....	10
1.2.4 巨噬细胞吞噬功能的研究.....	10
1.2.5 人白血病单核细胞（THP-1）细胞概述.....	11
第二章 材料与方 法 .....	13
2.1 实验材料.....	13
2.1.1 实验对象.....	13
2.1.2 主要试剂.....	13
2.1.3 试验主要仪器 .....	14
2.1.4 主要试剂的配置.....	14
2.1.5 实验所用器具的处理.....	15
2.1.6 试验中主要引物序列.....	16
2.2 试验方法.....	16

2.2.1	梅毒螺旋体的萃取与纯化.....	16
2.2.2	细胞培养与传代.....	18
2.2.3	THP-1 来源巨噬细胞极化的诱导.....	19
2.2.4	细胞因子引物的设计与溶解.....	19
2.2.5	荧光定量 PCR 方法检测细胞因子 mRNA 水平表达量.....	20
2.2.6	流式细胞仪检测巨噬细胞表面标记物.....	23
2.2.7	ELISA 方法检测细胞因子分泌水平表达量.....	24
2.2.8	免疫荧光共聚焦方法检测巨噬细胞表面标记物.....	25
2.2.9	巨噬细胞吞噬能力的检测.....	26
2.2.10	结果统计与分析.....	27
<b>第三章</b>	<b>实验结果与分析</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>诱导 THP-1 来源巨噬细胞极化</b> .....	<b>28</b>
3.1.1	THP-1 及 THP-1 来源巨噬细胞诱导极化后细胞状态的变化.....	28
3.1.2	M1 型巨噬细胞与 M2 型巨噬细胞极化的鉴定.....	29
<b>3.2</b>	<b>梅毒螺旋体对巨噬细胞极化的影响</b> .....	<b>33</b>
3.2.1	不同浓度梅毒螺旋体刺激 M0 型巨噬细胞.....	34
3.2.2	检测不同时间段梅毒螺旋体刺激 M0 型巨噬细胞的变化.....	36
<b>3.3</b>	<b>巨噬细胞吞噬功能的检测</b> .....	<b>39</b>
3.3.1	Latex 检测极化后的巨噬细胞的吞噬功能.....	39
3.3.2	荧光显微镜观察巨噬细胞对梅毒螺旋体的吞噬作用.....	39
<b>第四章</b>	<b>讨论</b> .....	<b>41</b>
<b>第五章</b>	<b>结论</b> .....	<b>45</b>
<b>参 考 文 献</b>	.....	<b>46</b>
<b>致 谢</b>	.....	<b>58</b>



# Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	II
<b>abbreviation and acronyms</b> .....	III
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 Introduction of syphilis</b> .....	1
1.1.1 Epidemiological characteristics of <i>T.pallidum</i> .....	2
1.1.2 Biology of <i>T.pallidum</i> .....	2
1.1.3 Antigenicity and invasivity of <i>T.pallidum</i> .....	2
1.1.4 Pathogenicity of <i>T.pallidum</i> .....	3
1.1.5 Decetion method of syphilis .....	4
1.1.6 Inflammation and immune response .....	5
<b>1.2 Research advances in macrophage</b> .....	6
1.2.1 Introduction of macrophge.....	6
1.2.2 Introduction of macrophge polarization.....	7
1.2.3 Plasticity of macrophage.....	10
1.2.4 Research about macrophage phagocytosis.....	10
1.2.5 Introduction of THP-1.....	11
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	13
<b>2.1 Materials</b> .....	13
2.1.1 Objects.....	13
2.1.2 Main reagents.....	13
2.1.3 Main instruments.....	14
2.1.4 Configuration of main reagents.....	14
2.1.5 Sterilization of apparatus .....	15
2.1.6 Primer designation .....	16
<b>2.2 Methods</b> .....	16
2.2.1 Purefacation of <i>T.pallidum</i> .....	16
2.2.2 Cell culture and passage .....	18
2.2.3 Polarization of THP-1 derived macrophage.....	19

2.2.4	Designation of cytokines primers .....	19
2.2.5	Cytokines mRNA expression detection in RT-PCR methods .....	20
2.2.6	Macrophage surface marker detection in Flow cytometry .....	23
2.2.7	Cytokines mRNA expression detection in ELISA .....	24
2.2.8	Macrophage surface marker detection in confocal laser microscope .....	25
2.2.9	Phagocytosis capacity detection.....	26
2.2.10	Statistics and analysis .....	27
<b>Chapter 3</b>	<b>Results and analysis.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Polarization of THP-1 derived macrophage .....</b>	<b>28</b>
3.1.1	Cell state of THP-1 and THP-1 derived macrophage after polarization.....	28
3.1.2	Identify of M1 and M2 .....	29
<b>3.2</b>	<b>Effects of <i>T.pallidum</i> on macrophage polarization .....</b>	<b>33</b>
3.2.1	M0 macrophage stimulated with grades doses of <i>T.pallidum</i> .....	34
3.2.2	M0 macrophage stimulated with <i>T.pallidum</i> at different time point	36
<b>3.3</b>	<b>Phagocytosis capacity detection .....</b>	<b>39</b>
3.3.1	Phagocytosis capacity detection in latex beads .....	39
3.3.2	Specific phagocytosis capacity detection in confocal microscope .....	39
<b>Discussion.....</b>		<b>41</b>
<b>Conclusion .....</b>		<b>45</b>
<b>Reference.....</b>		<b>46</b>
<b>Thanks.....</b>		<b>58</b>

## 第一章 绪论

梅毒螺旋体是慢性传播疾病梅毒（syphilis）的致病菌。尽管梅毒在15世纪就开始出现传播，但因其症状的隐匿性及多样性，法国科学家 Schaudinn 和 Hoffman 1905 年才发现并报告了梅毒感染的真正病原体——苍白密螺旋体（*Treponema pallidum* subsp. *pallidum*）。随着对 *T. pallidum* 研究的不断深入，人们对其的认识也日渐加深。梅毒起病隐匿，临床表现复杂，几乎可以侵犯全身各个器官、系统，给人体带来不可逆的损害，严重危害患者的身心健康。目前，国内外学者在 *T. pallidum* 的流行病学、临床治疗和预防方面的研究均取得了重大的成就。但是由于 *T. pallidum* 体外培养较难，菌体来源困难，使得至今对 *T. pallidum* 致病机制的认识仍然是个未解之谜。

近年来，随着分子生物技术的快速发展，*T. pallidum* 标准株（Nicholas 株）的全基因组测序已经完成，为研究 *T. pallidum* 的关键致病基因以及 *T. pallidum* 蛋白的结构、功能、致病等方面提供了极大便利。单核巨噬细胞是机体重要的固有免疫细胞，是人体免疫系统的第一道防线，在对病原体的识别、抗原提呈、吞噬及杀伤等环节起着举足轻重的作用<sup>[1]</sup>，前研究者通过对梅毒患者和实验感染兔组织学和细胞学的研究，结果发现梅毒患者和感染兔体内循环单核细胞显著增高，伴随 T 淋巴细胞数量降低，这一结果说明单核巨噬细胞与梅毒的活动性存在很大联系<sup>[2]</sup>，Pearce 和 Rosahn<sup>[3]</sup> 等学者也曾猜想单核巨噬细胞在梅毒免疫过程中发挥了主导作用，然而迄今为止，梅毒感染后巨噬细胞究竟是如何发挥作用的仍然没有一个确切的解释。随着近年来对巨噬细胞极化研究的不断深入，为我们研究 *T. pallidum* 和巨噬细胞之间的关系提供了新的突破点。本研究的目的是在构建巨噬细胞极化模型，体外研究 *T. pallidum* 感染细胞后巨噬细胞的极化方向，进而进行后续动物试验验证巨噬细胞极化在梅毒螺旋体中的作用，为我们研究从巨噬细胞角度研究 *T. pallidum* 的致病机制提供一个新的思路。

### 1.1 梅毒的概述

### 1.1.1 梅毒的流行病学特点

随着经济快速发展，世界人口流动性大，人类思想越来越开放等特点，梅毒的发病率居高不下，已成为世界第一大性传播疾病。自1979年我国发现第一例梅毒以来，梅毒在我国迅速蔓延，近年来梅毒感染率和发病率呈直线上升趋势。尽管梅毒治疗的特效药青霉素问世已久，梅毒发病率虽得到一定的改善但近年来仍有上升的趋势，如何有效的控制和预防梅毒的关键是了解*T. pallidum*的致病机制从而从源头上限制梅毒的发展传播。

### 1.1.2 梅毒螺旋体的生物学特点

*T. pallidum*属于螺旋体科密螺旋体属，形态纤细呈螺旋状，体长约5-10 $\mu\text{m}$ ，宽0.1-2 $\mu\text{m}$ ，透明且不易着色，因此又称之为苍白密螺旋体。*T. pallidum*在普通光学显微镜很难被观察到，只能通过暗视野显微镜观察或经过镀银染色后于普通显微镜下观察，暗视野显微镜下可见*T. pallidum*成短小纤细螺旋状，运动活泼，呈单个排列，折光性较强。*T. pallidum*经镀银染色后，可染成棕褐色，螺旋排列致密规则。*T. pallidum*的染色体为环状DNA，基因组全长1.13Mb，是最小的原核基因组之一。*T. pallidum*缺乏许多编码新陈代谢的基因，代谢能力较低，需要从宿主摄取能量。

*T. pallidum*对外界环境极其敏感，空气中暴露1-2小时即死亡，50 $^{\circ}\text{C}$ 加热5min即失去活性，代谢能力低且营养要求复杂，因此难以在体外进行连续培养，只能通过兔睾丸接种进行传代。新西兰大白耳兔常用于梅毒研究，因其操作简单，且不同于小鼠感染后无任何症状及体征变化，感染兔子后可产生与人类一期二期梅毒类似的<sup>[4]</sup>症状被认定为研究梅毒的最佳动物模型<sup>[4]</sup>，但*T. pallidum*难以体外培养是限制梅毒研究进展的一项重要因素<sup>[5]</sup>。

### 1.1.3 梅毒螺旋体的抗原性与侵袭性

*T. pallidum*表面的脂类、脂蛋白、鞭毛蛋白以及其他蛋白等均是其抗原成分。*T. pallidum*具有很强的侵袭力，外膜蛋白可以帮助*T. pallidum*抵抗宿主的免疫侵袭，同时也是逃避宿主免疫导致梅毒慢性感染的重要因素<sup>[6]</sup>，在*T. pallidum*的毒力发挥中起着重要作用。目前已阐明的*T. pallidum*膜蛋白抗原原有TpN47、TpN17、TpN15、Gpd，

Tp92等，其中TpN47、TpN17、TpN15由于良好的免疫原性及特异性而被作为血清学诊断抗原<sup>[7]</sup>；最近的一项研究表明Tp0453，被推测是一种外膜蛋白，参与协助梅毒螺旋体穿过细胞外膜进入内层，有利于营养物质的非选择性扩散<sup>[8]</sup>。

*T. pallidum*具有很强的侵袭性，可以大范围的侵入组织和器官并存活在其中。在兔感染实验中，睾丸或者皮内接种*T. pallidum*后，数分钟后*T. pallidum*即进入血液循环<sup>[9, 10]</sup>，数小时后可于深层组织的黏膜中发现*T. pallidum*<sup>[11]</sup>。

梅毒之所以具有很强的侵袭能力，主要可能与三种致病因素有关：①菌体荚膜样物质<sup>[12]</sup>：包括有毒株菌体表面的黏多糖和唾液酸，具有阻止抗体结合、抑制补体激活、干扰补体杀菌、抵抗吞噬等作用，有利于*T. pallidum*在宿主体内存活和扩散；②梅毒蛋白<sup>[13]</sup>：对于梅毒外膜蛋白和分泌蛋白的研究，如今仍然是一个充满争议的话题。梅毒蛋白在促进*T. pallidum*的黏附作用及免疫逃逸过程中均发挥重要作用。同许多其它病原体一样，梅毒入侵的第一步即粘附于宿主细胞，*T. pallidum*可以粘附于人和兔子内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞等多种细胞。过去20多年中，有三种*T. pallidum*膜蛋白Tp0483、Tp0155、Tp0751被发现具有纤维素结合特性，但是直到现在对于*T. pallidum*确切的黏附机制仍然不很清楚。TpN47具有很强的抗原性，对于其是否是*T. pallidum*外膜蛋白仍然充满争议，Leekh等学者研究发现TpN47能够调控宿主细胞黏附分子的表达，TpN47能黏附到宿主细胞表面，激活人皮肤微血管内皮上的血管细胞黏附因子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 和细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达<sup>[14, 15]</sup>，促进细胞增殖，释放TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等炎症因子，引起血管周围浸润、内皮细胞异常增殖等；Tp0483、Tp0155等黏附蛋白，重组Tp0483是基质纤维连接蛋白<sup>[16]</sup>，可以以剂量依赖性的方式与可溶性及矩阵形式的纤维黏连蛋白结合；另外Tp0751，被证明可以与层黏连蛋白结合，可以与宿主细胞的细胞外基质结合，促进*T. pallidum*粘附于宿主细胞<sup>[17, 18]</sup>；③透明质酸酶：*T. pallidum*产生的透明质酸酶可以分解组织、细胞基质内和血管基底膜的透明质酸，有利于*T. pallidum*在宿主体内扩散<sup>[19]</sup>，从而协同参与*T. pallidum*的体内扩散及免疫逃逸。

#### 1.1.4 梅毒螺旋体的致病特点

*T. pallidum*被称为“伟大的模仿者”<sup>[20]</sup>，因其侵入人体后，可引起全身性的非典型性的症状，临床表现复杂，很容易造成临床医生的误诊和漏诊。*T. pallidum*侵入人体后，经过3周可能引起皮肤黏膜损害，多见于外生殖器，即无痛性硬下疳<sup>[21]</sup>，潜伏期可从10天到90天不等<sup>[5]</sup>，与人体感染*T. pallidum*的数量有很大的关系<sup>[22]</sup>，无痛性硬下疳为一期梅毒的典型表现，此期病灶渗出液中含有大量*T. pallidum*，具有很强的传染性。感染后局部首先出现单核细胞浸润<sup>[23, 24]</sup>，感染的第六天左右，T细胞开始增多<sup>[25, 26]</sup>，13天达高峰，巨噬细胞和浆细胞开始出现，此时做组织学检查可发现*T. pallidum*数量迅速减低<sup>[27]</sup>，并可在巨噬细胞内检测到*T. pallidum*抗原，小动脉内皮细胞肿胀与增生，细胞浸润呈现周围血管侵向<sup>[28]</sup>。一期梅毒皮肤组织标本中梅毒螺旋体主要位于表皮下部近基底细胞层、真皮血管周围；直肠粘膜标本中主要位于近浆膜层一侧，组织内及血管周围<sup>[26]</sup>。皮肤发生损害后，机体逐渐产生抗体，同细胞免疫一起，发挥对*T. pallidum*的杀伤作用，经过3-4周，硬下疳逐渐愈合，残留的未被清除的*T. pallidum*经淋巴结进入血液循环，约有15%左右的患者可能进入2-8周的潜伏期，机体免疫功能减退时，*T. pallidum*在体内大量增殖，出现了以梅毒疹为特征临床表现的二期梅毒<sup>[10, 29]</sup>。二期梅毒全身症状复杂，多出现皮肤损害，以梅毒疹为主要特征，临床表现可因疾病所处阶段而表现出多样性，此时全身淋巴结肿大，亦可累计骨、关节、眼及其他器官<sup>[25, 30]</sup>，组织病理特征表现为皮肤组织标本中*T. pallidum*主要位于表皮全层、附属器周围、真皮血管周围；淋巴结活检标本中*T. pallidum*主要位于滤泡周围的炎性肉芽组织中<sup>[31]</sup>，Feher<sup>[32, 33]</sup>和Lee<sup>[34]</sup>等人，曾从二期梅毒患者的肝脏标本中发现*T. pallidum*，说明二期梅毒*T. pallidum*已经侵入到器官。一期二期梅毒统称为早期梅毒，此时传染性强但破坏性小，青霉素治疗可以大大减缓疾病进展，但如未采取积极有效的措施，残存的*T. pallidum*进而可继续侵犯全身组织和器官，到达三期梅毒。此期传染性小而破坏性极强，主要表现为皮肤黏膜的溃疡性损害或内脏器官的肉芽肿样病变<sup>[35, 36]</sup>，严重者在经过10-15年后可能引起全身各系统的损害。

### 1.1.5 梅毒的诊断方法

梅毒的诊断方法主要分为直接检测法和间接检测法。一期或者二期梅毒患者，

在皮肤黏膜损害处用棉拭子擦取组织渗出液,于暗视野或镀银染色后显微镜下观察,可见螺旋状的*T. pallidum*。直接镜检法是检测*T. pallidum*较为直观、准确的方法,但此法适用于出现皮肤损害的一期或者二期梅毒患者,鉴于其敏感性滴,受检测人员主观因素影响较多,目前尚未在临床上广泛应用。有文献报道<sup>[37]</sup>,采用*T. pallidum*为特异抗体的免疫组化法直接标记*T. pallidum*,可同时提高*T. pallidum*检测的敏感性和特异性<sup>[38]</sup>,但国内尚未将其作为梅毒的常规检测方法。

间接检测法主要包括血清学检测方法,是梅毒诊断的最重要且最常用的方法,针对的主要是人体感染*T. pallidum*后血清中产生的非特异的抗心磷脂抗体即反应素和特异性的抗梅毒螺旋体抗体。非特异性抗原血清实验,主要包括性病研究实验室实验(venereal disease research laboratory test, VDRL),快速血浆反映反应素环状卡片试验(rapid plasma reactant test, RPR)等,非特异性梅毒螺旋体血清试验以前被用来作为梅毒的筛查实验,但因其敏感性较低,作为筛查实验很容易造成临床医生漏诊,耽误患者病情治疗,目前用来作为梅毒治疗的疗效观察及*T. pallidum*在体内活动度的监测手段。特异性梅毒螺旋体血清实验主要针对特异性的梅毒螺旋体抗体,包括梅毒螺旋体血凝实验(Treponema pallidum haemagglutination, TPHA)、梅毒螺旋体明胶颗粒凝集实验(Treponema pallidum Particle Agglutination, TPPA)、荧光密螺旋体抗原吸收实验(Fluorescent Treponema Antibody Absorption Test, FTA-ABS)及化学发光方法(Chemiluminescence analysis, CIA)等,其主要用于梅毒的确诊,目前推荐与化学发光方法一起作为梅毒的筛查与确诊实验<sup>[39]</sup>。

### 1.1.6 梅毒感染后的炎症及免疫学反应

科学家们对于*T. pallidum*的研究已经一个多世纪,然而对于梅毒究竟是如何引起千变万化的临床表现,我们知道的仍然少之又少。*T. pallidum*侵入人体后穿过内皮细胞<sup>[15]</sup>,迅速进入血液循环及深层组织<sup>[10, 11]</sup>,引起一系列复杂的细胞及体液免疫反应,早期主要为局部单核细胞浸润<sup>[40]</sup>,通过PRR识别*T. pallidum*,参与吞噬和消化*T. pallidum*,并参与对*T. pallidum*的抗原提呈<sup>[41]</sup>,在感染后的第6天左右T细胞开始出现,致敏的T细胞分泌TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等炎症因子参与对*T. pallidum*的杀伤,巨噬细胞募集至感染灶吞噬杀伤*T. pallidum*。

辅助性T细胞即CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞包括Th1及Th2细胞,其中Th1细胞主要分泌IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 等细胞因子介导细胞毒局部炎症有关免疫应答,而Th2细胞主要分泌IL-4, IL-13, IL-10等细胞因子促进B细胞的增殖产生抗体,增加IgG的合成,参与体液免疫应答。VanVoorhis<sup>[42]</sup>等对13例一期和二期梅毒患者皮疹细胞中Th1型细胞因子进行检测,结果发现几乎所有一期二期梅毒患者皮疹中都表达IL-12、IL-10、IFN- $\gamma$ <sup>[43]</sup>等细胞因子,而几乎不表达Th2型细胞因子如IL-4及IL-13等,说明在早期梅毒中Th1型占优势,而Th2型免疫反应受到抑制,且随着病程进展,IFN- $\gamma$ 、IL-12等表达水平逐渐降低,说明,随病程进展Th2细胞因子表达逐渐增多,Th2型免疫反应逐渐占据主要地位,Th1细胞功能进一步抑制<sup>[44]</sup>。

在体外,用超声过的梅毒螺旋体刺激巨噬细胞可诱导产生TNF- $\alpha$ <sup>[45]</sup>, TNF- $\alpha$ 可诱导级联反应,从而激活体内一系列的免疫反应。第一次发现巨噬细胞在梅毒螺旋体的免疫清除中发挥作用是在巨噬细胞的吞噬小泡中发现了被降解的梅毒螺旋体<sup>[46, 47]</sup>,说明了巨噬细胞在对梅毒螺旋体的免疫清除中也发挥了重要作用。已经在体外证明了巨噬细胞对梅毒螺旋体的吞噬和杀灭存在一定作用。在巨噬细胞识别梅毒螺旋体的过程中,血清中的IgG、IgM抗体,包括梅毒螺旋体的抗原Tp92和TprK都可以诱导巨噬细胞调理性抗体的产生,进而发挥对梅毒螺旋体的杀伤作用。有趣的是,当大部分*T. pallidum*被免疫反应清除后,兔子睾丸内仍存在着少量的梅毒螺旋体<sup>[48]</sup>,而且这些螺旋体可以抵抗巨噬细胞的吞噬作用,分析其原因可能是这些少量的梅毒螺旋体未能与调理性抗体结合,进而逃避了机体的免疫清除,巨噬细胞作为机体固有免疫应答的重要组成部分,感染早期参与*T. pallidum*的识别、抗原提呈、吞噬、杀伤等,但不能完全将其杀灭。*T. pallidum*通过何种途径成功的抵抗了巨噬细胞的吞噬,以及如何逃避宿主的免疫反应而导致梅毒感染的慢性化过程,目前的研究尚未能很好的解释这个问题。

研究*T. pallidum*与巨噬细胞之间的相互作用,探究*T. pallidum*感染人体后巨噬细胞极化的机制、作用靶分子及信号转导通路将为我们逐步了解*T. pallidum*的致病机制提供新的思路。



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.