

学校编码: 10384

分类号密级

学号: 24520131153492

UDC

廈門大學

硕士学位论文

梅毒患者外周血 Th 亚群研究及梅毒螺旋体
免疫机制初步研究

The Th cell subsets analysis of syphilis patients and
mechanism of *Treponema pallidum* infection

张巧

指导教师姓名:

专业名称:

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评阅人:

梅毒患者外周血 γ 亚群研究及梅毒螺旋体免疫机制初步研究

张巧

指导老师

刘莉莉

副教授

厦门大学

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

梅毒是由梅毒螺旋体引起的性传播疾病。梅毒螺旋体可侵入人体各个组织器官，引起各种临床表现。目前机体对梅毒螺旋体的免疫机制尚不清楚。本课题分别从体内和体外实验分析梅毒螺旋体引起的初始 Th 细胞分化，初步探讨梅毒螺旋体细胞免疫机制。我们分析 32 例梅毒患者外周血辅助性 T 细胞 (Th) 亚群含量变化；通过兔皮内接种模型，分析梅毒螺旋体感染后局部炎症反应中 IFN- γ 和 IL-4 mRNA 的表达随时间变化情况。体内研究发现梅毒螺旋体感染后细胞免疫应答在人外周血和兔皮损中 IFN- γ 含量明显升高，Th1 型细胞增多。为了更好的从体外实验研究梅毒免疫机制，本文通过 GM-CSF 和 IL-4 诱导人单核细胞来源的树突状细胞。研究发现，梅毒螺旋体能诱导树突状细胞成熟，且梅毒患者来源的树突状细胞的 CD86 分子比健康人低 ($P < 0.01$)，吞噬功能比健康人高 ($P < 0.01$)。体外进行树突状细胞与初始 Th 细胞共培养，研究 Th 细胞的分化方向和机制。研究表明，树突状细胞将梅毒螺旋体抗原肽提呈给初始 Th 细胞，使 Th 细胞活化克隆增殖，并产生大量的 Th1 型细胞，也有少量的调节性 T 细胞 (Treg) 和 Th2 型细胞产生并伴随 mTOR 通路的激活。说明在梅毒感染后，细胞免疫激活。

综上所述，本研究表明，梅毒螺旋体能诱导健康人树突状细胞成熟，并通过树突状细胞的提呈作用活化初始 Th 细胞，使其向 Th1 方向分化并伴随 mTOR 通路的激活。这也是首次通过体外共培养实验验证梅毒螺旋体对初始 Th 细胞分化的影响，为基于 Th 细胞和树突状细胞的梅毒免疫治疗提供了实验基础。

关键词：梅毒，初始 Th 细胞，树突状细胞

Abstract

Syphilis, a sexually transmitted disease caused by the spirochetal pathogen *Treponema pallidum*. It has plagued both the patient and the physician with its protean clinical manifestations. That the immune mechanism of *Treponema pallidum* is uncertain causes the diagnostic dilemmas of syphilis. In this study, we analysed the *Treponema pallidum*-induced cellular response, and preliminarily discussed the immune mechanism of syphilis. We included 32 syphilis patients and detected the Th cell subsets in these patients. IFN- γ and IL-4 mRNA expression in lesions were detected by rabbit intracutaneous inoculation. In vivo studies have shown that Th1 cells were recruited by *Treponema pallidum* in peripheral blood and local lesions. We generated peripheral blood monocytes-derived dendritic cells supplemented with GM-CSF and IL-4 to further analyse the cellular immunity of *Treponema pallidum* in vitro. We found that dendritic cells can be matured by *Treponema pallidum*. Furthermore, the cell marker CD86 of dendritic cells was much lower in syphilis patients than that in healthy donors ($P < 0.01$), and the phagocytic ability of dendritic cells was higher in syphilis patients ($P < 0.01$). We analysed the differentiation of naïve Th cells by coculture with Tp-matured dendritic cells. We found that dendritic cells present *Treponema pallidum* to naïve Th cells. The naïve Th cells were activated and proliferated, expressed surface markers indicative of a Th1 phenotype, and a small number of Treg and Th2 cells at the same time. In this process, the mTOR pathway was activated. It revealed that *Treponema pallidum* infection activated the immune response.

In conclusion, our study indicates that Tp-matured dendritic cells can induce Th1 response and activate mTOR pathway. To the best of our knowledge, this is the first report to analyse the naïve Th cell differentiation caused by *Treponema pallidum* in vitro, which can provide experimental basis to T cell and dendritic cell treatment.

Keywords: syphilis; naïve Th cell; dendritic cell

目录

摘要	I
Abstract	II
目录	III
Table of Contents	V
缩略语及中英文对照表	VII
第一章 绪论	1
1 梅毒概况	1
2 梅毒诊断标准	1
3 梅毒动物模型研究	3
4 梅毒免疫学研究进展	4
5 本文的研究目的	10
第二章 梅毒患者外周血 Th 细胞亚群分析	11
1 前言	11
2 研究对象、材料和方法	11
3 实验结果	18
4 讨论	22
第三章 梅毒动物模型研究	24
1 前言	24
2 材料与方法	24
3 实验结果	28
4 讨论	31
第四章 梅毒螺旋体体外诱导树突状细胞成熟	33
1 前言	33

2 材料与方法.....	33
3 实验结果.....	37
4 讨论	45
第五章 梅毒螺旋体诱导初始 Th 细胞分化及机制.....	47
1 前言	47
2 材料与方法.....	47
3 实验结果.....	55
4 讨论	59
全文结论.....	61
参考文献.....	62
致谢	70

Table of Contents

Abstract in Chinese I

Abstract in English..... II

Abbreviations..... VII

Chapter 1 Induction..... 1

 1 The overview of syphilis..... 1

 2 The diagnosis standards of syphilis 1

 3 Animal model of syphilis research 3

 4 Immunology research progress of syphilis 4

 5 The purpose of this study..... 10

Chapter 2 Th cell subsets analysis in peripheral blood of syphilis patients..... 11

 1 Induction 11

 2 Study subjects, materials and methods..... 11

 3 Results 18

 4 Discussions 22

Chapter 3 Animal model of syphilis study 24

 1 Induction 24

 2 Materials and methods..... 24

 3 Results 28

 4 Discussions 31

Chapter 4 Dendritic cells matured by *Treponema pallidum* in vitro 33

 1 Introduction 33

 2 Materials and methods..... 33

 3 Results 37

 4 Discussions 45

Chapter 5 *Treponema pallidum* induce naïve Th cell differentiation and the mechanisms 47

1 Induction	47
2 Materials and methods.....	47
3 Results	55
4 Discussions	59
Conclusions	61
References	62
Acknowledgement.....	70

厦门大学博硕士学位论文摘要库

缩略语及中英文对照表

缩写	全称 (英文)	全称 (中文)
<i>T.pallidum</i>	<i>Treponema pallidum</i>	梅毒螺旋体
STD	Sexually transmitted disease	性传播疾病
FCM	Flow cytometry	流式细胞术
Th cell	T-helper cell	辅助性 T 细胞
Treg	Regulatory T cell	调节型 T 细胞
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
APC	Antigen presenting cell	抗原提呈细胞
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
PE	Phycoerythrobilin	藻红素
PE-Cy5	Phycoerythrin- cyanin 5	藻红蛋白-花青素 5
DC	Dendritic cell	树突状细胞
iDC	Immature dendritic cell	未成熟树突状细胞
pDC	Plasmacytoid dendritic cells	浆细胞样树突状细胞
mDC	Myeloid dendritic cells	髓样树突状细胞
HSC	Hematopoietic Stem Cell	造血干细胞
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	粒-巨噬细胞集落刺激因子
IL	Interleukin	白细胞介素
IFN- γ	Interferon- γ	γ -干扰素
TGF- β	Transforming growth factor- β	转化生长因子- β
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetatesuccinimidyl ester	乙酸琥珀酰亚胺酯
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应

RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat	佛波酯
WB	Western blotting	蛋白免疫印迹
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay	酶联免疫吸附试验
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化酶
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640media	RPMI 1640 培养基
HLA	Human leukocyte antigen	人类白细胞分化抗原
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合物
BFA	Brefeldin A	蛋白转运抑制剂
TLR	Toll-like receptor	Toll 样受体
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction	混合淋巴细胞培养
DEPC	Diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
TRUST	Toluidine Red Unheated Serum Test	甲苯胺红不加热血清反应 素试验

第一章 绪论

1 梅毒概况

梅毒 (Syphilis) 是由梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*, *T. pallidum*) 感染引起的一种性传播疾病 (Sexually transmitted disease, STD)。梅毒是一种慢性传染性疾病, 人类是梅毒螺旋体已知的唯一的宿主, 其主要的传播方式是性传播, 研究显示 16%~30% 的人在与梅毒患者发生性关系之后 30 天以内会被传染^[1], 其次梅毒螺旋体还能通过血液传播以及母婴传播。

近年来, 梅毒的感染率在中国乃至全球居高不下, 仅 2014 年全国有 419091 例梅毒确诊患者, 比 2013 年增长 2.94%, 发病率在乙类传染病中居第三, 仅次于病毒性乙肝和肺结核 (中国疾病预防控制中心 <http://www.chinacdc.cn>)。虽然青霉素能有效治疗大部分梅毒患者, 但是仍然有治疗失败及血清固定的病例^[2]。

人类于 1998 年完成了梅毒螺旋体的全基因组测序^[3], 使人们从分子水平上了解了梅毒螺旋体。至今, 梅毒螺旋体已经发现了 110 年, 但由于其对温度、湿度及氧气特别敏感, 所以不能体外长时间传代培养^[4]。自 20 世纪 80 年代后, 就鲜有梅毒螺旋体体外培养文献报道了, 这样在很大程度上限制了梅毒的基础研究及疫苗研究。

2 梅毒诊断标准

梅毒螺旋体侵入机体后可侵犯各个组织器官包括神经系统, 所以临床症状多种多样, 被称为“伟大的模仿者”^[5]。这给梅毒的临床诊断也带来了一定的困难。

2.1 梅毒的临床诊断标准

根据欧洲 2014 年 CDC 指南^[6], 对梅毒的诊断标准概括如下: 1) 梅毒螺旋体的潜伏期一般为 10-90 天, 大部分是通过性传播。2) 一期梅毒: 有溃疡产生,

通常有局部淋巴结肿大或病变。这种溃疡可能是浅表、单一存在，也可能是深部、多发的疱疹样溃疡^[7]。任何没有排除其他疾病的肛门或生殖器溃疡都需要考虑是否是梅毒螺旋体感染。3) 二期梅毒：由于细菌感染，二期梅毒呈现的临床症状比较复杂，其中最典型的是皮肤红疹，90%患者会有皮肤或粘膜的溃疡存在。也有报道累积脏器导致肝炎、脾大、肾小球肾炎或关节炎的^[8-11]。4) 三期梅毒：包括树胶肿梅毒、晚期神经梅毒（脑膜炎、脑神经功能紊乱、脑膜血管梅毒、麻痹性痴呆和脊髓痨）以及心血管梅毒。5) 潜伏期梅毒：血清学试验阳性，但是没有临床症状。包括过去一年或者更长时间有明确临床诊断为梅毒或者性伴侣为梅毒患者的，血清学非特异性抗体 4 倍（2 个滴度）下降，或者血清学试验阴性，但是过去被诊断为梅毒的患者。

2.2 梅毒的实验室诊断

2.2.1 直接检测梅毒螺旋体的存在

- 1) 暗视野显微镜检测皮损涂片，如果能观察到梅毒螺旋体，能确诊为梅毒^[12]。但此法复杂繁琐，耗时耗力，且主观性强，容易导致误诊及漏诊。
- 2) 聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction, PCR）：此方法可以用于检测溃疡、组织、脑脊液及血液等多种标本，灵敏度高，但目前尚缺乏国际统一标准，也没有统一的目的基因用于梅毒螺旋体检测^[13]。
- 3) 免疫组织化学：可以用来有效地检测皮肤、粘膜及组织中的梅毒螺旋体^[14]。

2.2.2 梅毒血清学试验检测

梅毒螺旋体感染人体 2-4 周后，人体会产生特异性的 IgM 或 IgG 抗体^[15]，会比非特异性抗体的产生稍微早一些。近年来，全自动梅毒螺旋体检测如化学发光免疫分析（Chemiluminescence immunoassay, CIA）和螺旋体酶免疫分析法（Treponemal enzyme immunoassay, EIA）大大提高了临床检测的效率，能为梅毒的诊断提供更加客观的检测结果^[16]。1) 非特异性抗体检测：用心磷脂、卵磷脂及胆固醇为一种复合抗原，检测患者血清中的非特异性抗体。主要包括性病研究实验室测试（Venereal diseases research laboratory test, VDRL），快速血浆反应素试验（Rapid plasma reagin test, RPR），甲苯胺红不加热血清反应素试验（Toluidine red unheated serum test, TRUST）等。这些方法都是手工操作不能自

动化，而且很多常见疾病如风疹、系统性红斑狼疮、肺炎、风湿性关节炎、老年病等都会引起该类试验的假阳性反应。但是由于此法快速、便宜、灵敏度较高，常用于梅毒的辅助诊断。2) 特异性抗体检测：包括梅毒螺旋体血凝试验 (*T. pallidum* haemagglutination test, TPHA)、梅毒螺旋体明胶凝集试验 (*T. pallidum* passive particle agglutination test, TPPA)、荧光密螺旋体抗体吸收试验 (Fluorescent treponemal antibody absorption test, FTA-abs test)、EIA、CIA。此类方法直接运用梅毒抗原检测血清或血浆中的待测抗体，进一步提高了检测的特异性。但是特异性抗体检测不能用来评价疾病活动期以及治疗效果，在大多数患者中会保持终生阳性。3) 抗梅毒螺旋体 IgM 抗体检测：包括 EIA/IgM、19S-IgM-FTA-abs 检测和 IgM-immunoblot。IgM 的检测主要用于新生儿梅毒和脑脊液检测，对于活动期梅毒检测敏感性低。

3 梅毒动物模型研究

在梅毒动物模型的研究中，新西兰兔被认为是最适合做梅毒研究的实验动物，新西兰兔主要有以下几个优点：a: 新西兰兔相比之下更容易被梅毒螺旋体感染^[17]；b: 通过皮内接种背部皮肤后，会形成与人类很相似的一期梅毒溃疡^[18, 19]；c: 新西兰兔感染梅毒后的血清学反应跟人类最相似^[18]；d: 形成的免疫学反应能便于我们及时地、定量地进行研究^[19]。兔动物模型存在的主要缺点是：价格昂贵，且市场上缺乏相应的试剂从而限制了相关的研究方向。其它动物如仓鼠和豚鼠也有用于梅毒动物模型的研究^[20, 21]，但由于局部炎症反应不明显以及不容易被梅毒螺旋体感染，所以没有新西兰兔应用广泛^[20]。

Nichols 株是目前应用最多的梅毒螺旋体菌株，是 1913 年由 Nichols 从梅毒病人中分离出来并在新西兰兔中传代成功^[22]。梅毒螺旋体在体外培养时存活能力和传代数量有限，并且不能保持其完整的毒力，只能通过接种梅毒螺旋体到兔子睾丸中才能传代^[23]。梅毒螺旋体在间质细胞间分裂并快速增长，引发明显的炎症反应并表现为显著的睾丸炎症。梅毒螺旋体的最大数量和睾丸炎的严重程度具有相关性，睾丸炎的发展过程因梅毒螺旋体种类和接种量的不同而不同。如果用 Nichols 株来繁殖，通常是通过每个睾丸接种 $1-5 \times 10^7$ 梅毒螺旋体，每

侧 1 mL 至 1.5 mL。通过这种接种量, Nichols 株在接种后的 9 至 11 天炎症反应达到最强^[24]。

新西兰兔一般通过睾丸接种、皮内接种或静脉注射感染梅毒螺旋体,不同的接种方法用途不一样。睾丸接种是指向新西兰雄兔睾丸中注射一定数量的梅毒螺旋体悬液,接种之后 1-2 周内会出现睾丸炎症^[18, 19],接种梅毒螺旋体悬液的浓度越大则出现炎症的时间越短^[25]。睾丸接种可用于保种和传代。皮内接种是指通过皮内注射一定数量的梅毒螺旋体悬液,此法可以用于观察早期梅毒临床症状^[26]和用于辅助诊断梅毒感染^[27]。静脉注射主要用于神经梅毒动物模型的建立^[28]。

4 梅毒免疫学研究进展

梅毒专家一致认为,梅毒螺旋体引起的组织器官损伤和临床表现都与梅毒螺旋体引起的免疫反应有关系。梅毒的发病机制及免疫机制复杂,这也是梅毒发病、病程迁延不愈以至于最后可能发展为晚期梅毒致残或致死的原因。所以深入全面的开展梅毒螺旋体的免疫学致病机制,有助于促进梅毒的诊断和治疗。

4.1 梅毒与体液免疫应答

体液免疫是以 B 细胞产生抗体来达到保护目的的免疫过程,在梅毒感染后,机体会产生特异性抗体和非特异性抗体。临床上通过不同检测方法来检测这两种抗体以辅助诊断梅毒。Miller *et al*^[29]认为非特异性抗体的检测对于梅毒的初筛和预后判断有重要意义。我们的研究认为非特异性抗体检测不适合作为初筛试验,会增加漏诊率,但可作为梅毒疗效的判断^[30]。

4.2 梅毒与细胞免疫应答

细胞免疫在梅毒螺旋体感染过程中起到十分重要的作用,目前对于梅毒螺旋体引起的细胞免疫的规律及机制还不是很清楚。早期研究中,有学者认为梅毒螺旋体感染初期能引起机体免疫功能受到抑制,使机体免疫系统处于“无能”状态^[31, 32]。Turner *et al*^[33]发现在早期梅毒患者的淋巴结副皮质区中淋巴细胞明

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 for delivery details.