

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520121153196

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

梅毒螺旋体对树突状细胞及初始 T 细胞分化的影响

The influence of *Treponema pallidum* on dendritic cells and the differentiation of naive T cell

郭晓静

指导教师姓名: 杨天赐 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 05 月

梅毒螺旋体对树突状细胞及T_H1细胞分化的影响

郭晓静

指导老师

杨天赐

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 (*Treponema pallidum*, *T.pallidum*) 感染引起的一种性传播疾病, 是一个世界性难题。目前, 全世界已有 3600 万人感染梅毒, 每年新增病例数达 1200 万。其高感染率与它特殊的免疫机制有着密切关系。梅毒螺旋体进入机体之后免疫细胞会对其进行清除, 体外研究表明树突状细胞(Dendritic cell, DC) 和巨噬细胞均会吞噬梅毒螺旋体。DC 是体内最有效的专职抗原提呈细胞 (Antigen presenting cell, APC), 并且是唯一能诱导初始 T 细胞发生极化的细胞, 不同抗原刺激过的 DC 对初始 T 分化的作用不同。在早期梅毒皮损区域发现有大量树突状细胞, 巨噬细胞及表达 INF- γ 样单核淋巴细胞, 而细胞间具体相互作用的机制并不明朗。本研究在体外用血液中单核细胞经巨噬细胞-粒细胞集落刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 和白细胞介素 4 (Interleukin 4, IL-4) 诱导为树突状细胞, 经梅毒螺旋体抗原刺激后与初始 T 细胞共培养, 模拟体内微环境, 研究在梅毒螺旋体刺激下树突状细胞表型及成熟度的变化, 并且刺激过的 DC 将抗原呈递给初始 T 之后会引起何种方向的分化, 以期阐明梅毒的免疫抑制及持续感染的分子机制。取得如下研究结果:

(1) 通过 GM-CSF 和 IL-4 联合诱导的 DC, 形态良好, 成簇状分布, 边缘有树枝状突起, CD1a 表达含量高。梅毒螺旋体刺激之后 DC 表面成熟因子 CD83 表达量迅速升高, CD80、CD86、HLA-DR 都有升高。

(2) 梅毒螺旋体刺激后的 DC 与初始 T 共培养, 14days 时能分化出大量 Th1 细胞, 同时有少量 Treg 细胞分化。说明感染初期主要是具有杀伤作用的 Th1 细胞起作用, 而随着感染进行抑制性细胞也发挥了重要作用。

本研究表明通过梅毒螺旋体的刺激能促进树突状细胞的成熟, DC 作为梅毒免疫的第一道防线发挥了重要作用。同时论证了 DC 在梅毒免疫中起桥梁作用, 可单独诱导初始 T 分化, 从而加强对梅毒螺旋体的清除。为基于 DC 及 T 细胞的免疫治疗方案提供实验依据。

关键词: 梅毒螺旋体 细胞免疫 树突状细胞 初始 T 细胞

Abstract

Syphilis a sexually transmitted infection (STI) caused by the bacterium *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. It is a worldwide problem. Some 36 million people are currently infected with syphilis worldwide, with 12 million new cases reported every year. The high prevalence of syphilis across the globe is closely related with its specific immune mechanisms. In vitro studies it has showed that dendritic cell (DC) and macrophages will engulf *T.pallidum*. DC is most effective professional antigen-presenting cells (APC) in the body, and is the only cell that can induce initial T cells polarization. DC stimulated by different antigens can caused different polarization directions. A large area of dendritic cells, macrophages and expression of INF- γ -like mononuclear lymphocytes were found in lesions of secondary syphilis. But specific cell-cell interaction mechanism is not clear. In this study, we used dendritic cells induced by IL-4 and GM-CSF in vitro as model cells. When DC stimulating by *T.pallidum* antigen co-cultured alone with naive T cells in vitro, we simulated in vivo microenvironment to study which changes will happen on dendritic cells' phenotype and maturity after stimulation, and the differentiation of naive T in order to clarify the immunosuppressive and molecular mechanisms of persistent infection on syphilis. Following results were achieved:

(1) DC induced by GM-CSF and IL-4 have good shape, tufted distribution, and edged dendritic processes, expressing high CD1a content. *T.pallidum* stimulation can promote the maturation of dendritic cells. Immature dendritic cells have strong phagocytosis while mature dendritic cells are week. DC maturation factor CD83 increased rapidly after *T.pallidum* stimulating, CD80, CD86, HLA-DR also increased.

(2) When co-cultured DC stimulating by *T.pallidum* with naive T after 14days, a large number of Th1 cells generate, with a small amount of treg cells. It explains that cytotoxicity Th1 cell mainly works on the initial of infection, with the conduct of

infection ,suppressor cells gradually play an important role. This paper demonstrates that DC is a bridge in immunity in syphilis, and can be used alone to induce differentiation of naive T. It provides experimental evidence for immune therapy based on the DC and T cell.

Key words: *Treponema pallidum*; cellular immunity; dendritic cells; naive T cell

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要	I
Abstract.....	II
缩略语及中英文对照表.....	VIII
第一章 绪论.....	1
1.1 梅毒现状	1
1.2 梅毒的免疫	2
1.3 梅毒与树突状细胞.....	4
1.4 T 细胞免疫在梅毒免疫过程中的研究	6
1.5 研究目的与意义	7
第二章 材料与方法.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.2 梅毒螺旋体的准备	13
2.3 树突状细胞的培养与鉴定.....	18
2.4 梅毒螺旋体感染树突状细胞模型的建立.....	19
2.5 感染后树突状细胞细胞因子的检测.....	19
2.6 Dextran 吞噬实验检测 DC 吞噬能力.....	22
2.7 健康人外周血中 naiveT 细胞的分离纯化.....	22
2.8 感染的树突状细胞对 naiveT 细胞分化的影响.....	24
2.9 流式细胞术检测 naiveT 细胞分化情况.....	24
第三章 实验结果	27
3.1. 梅毒螺旋体的繁殖及鉴定.....	27
3.2 人 PBMC 诱导的树突状细胞的检测	30
3.3 梅毒螺旋体感染树突状细胞模型的建立.....	30
3.4 梅毒螺旋体感染树突状细胞对 naiveT 细胞分化的调节.....	33

第四章 讨论.....	36
4.1 梅毒螺旋体诱导 DC 的成熟作用	36
4.2 梅毒螺旋体感染 DC 诱导不同的 naiveT 细胞亚群的分化.....	37
4.3 Th1 型细胞在梅毒螺旋体感染中的作用	38
4.4 Treg 细胞在梅毒螺旋体感染中的作用	39
结 论	40
参考文献.....	41
致 谢	50

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English.....	II
Abbreviations	VIII
Chapter 1 Introduction	1
1.1 The origin of research questions	1
1.2 The immune of syphilis	2
1.3 <i>Treponema pallidum</i> infection of dendritic cells.....	4
1.4 T cell immunity in syphilis	6
1.5 The purpose and significance of this paper.....	7
Chapter 2 Materials and methods	10
2.1 Subjects.....	10
2.2 Preparing required bacteria	13
2.3 Culture and identification of dendritic cells	18
2.4 Establishment of dendritic cell model infected by <i>Treponema pallidum</i>	19
2.5 Detecting cytokines of dendritic cells after infection.....	19
2.6 Dextran phagocytosis assay to detect phagocytic capacity of DC	22
2.7 Isolation and purification of naive T cell from healthy human peripheral blood.....	22
2.8 Effect of dendritic cells on naive T cell differentiation	24
2.9 Detecting naive T cell differentiation by flow cytometry	24
Chapter 3 The experimental results	27
3.1 Reproduction and identification of <i>Treponema pallidum</i>	27
3.2 Detecting dendritic cell induced by human PBMC	30
3.3 Establishment of dendritic cell model infected by <i>Treponema pallidum</i>	30

3.4 Effect of dendritic cells on naive T cell differentiation infected by <i>Treponema pallidum</i>	33
Chapter 4 Discussion.....	36
4.1 Maturation of DC induced by <i>Treponema pallidum</i>	36
4.2 Effect of dendritic cell on naive T cell differentiation infected by <i>Treponema pallidum</i>	37
4.3 Th1 cells in the role of <i>Treponema pallidum</i> infection.....	38
4.4 Treg in the role of <i>Treponema pallidum</i> infection	39
Conclusion.....	40
References	41
Acknowledgement.....	50

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
RPR	Rapid plasma reagin test	快速血浆反应素环状卡片试验
TPPA	Treponema pallidum particle assay	梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验
HIV	Human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
NK	Natural killer cell	自然杀伤细胞
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
DC	Dendritic cells	树突状细胞
iDC	Immature dendritic cell	未成熟树突状细胞
mDC	Mature dendritic cell	成熟树突状细胞
pDC	Plasmacytoid dendritic cell	浆细胞性树突状细胞
APC	Antigen presenting cells	抗原递呈细胞
Th	T helper cells	辅助性 T 细胞
TGF- β	Transforming growth factor- β	β -转化生长因子
Treg	Regulatory T cell	调节型 T 细胞
Foxp3	Forkhead box P3	叉头转录因子 3
IL	Interleukin	白细胞介素
IFN	Interferon	干扰素
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子 α
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	粒-巨噬细胞集落刺激因子
FCM	Flow cytometry	流式细胞术
FITC	Fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
PE	Phycoerythrin	藻红素

PE-Cy5	Phycoerythrin- cyanin 5	藻红蛋白-花青素 5
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat	佛波酯
HLA	Human leukocyte antigen	人类白细胞分化抗原
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
FCS	Fetal calf serum	胎牛血清
DNT	Double negative T	双阴性 T 细胞

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

梅毒 (Syphilis) 是由梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*) 感染引起的一种慢性经典的性传播疾病 (Sexually transmitted disease, STD), 可导致神经、心血管、骨骼等多系统的不可逆性损伤, 甚至威胁生命。据世界卫生组织统计, 每年有 3.4 亿新增的性传播疾病, 如沙眼衣原体病, 淋病, 梅毒和毛滴虫^[1]。其中梅毒危害巨大。世界已有 3600 万人感染梅毒, 每年新增病例数达 1200 万, 发展中国家的患者高达 90% 以上^[2]。梅毒没有被真正的完全控制, 仍然在世界范围内广泛流行, 究其根本原因主要是因为梅毒螺旋体的致病机理仍不清楚。至 2015 年, 梅毒螺旋体已发现 110 年, 但其仍未能能在体外单独培养, 其免疫学变化也复杂多端。因此, 研究梅毒螺旋体的免疫学致病机理对该病的防控显得尤其重要。

1.1 梅毒现状

梅毒螺旋体是 1905 年由 Schaudim 和 Hoffmann 发现的细长的螺旋状微生物, 有 8-14 个螺旋构成, 两端尖直, $5-15 \times (0.1-0.2) \mu\text{m}$, 属于螺旋体目。因它通常不容易着色, 亦被称为苍白螺旋体。梅毒螺旋体体外人工培养仅能存活数天, 需要接种于兔子睾丸内进行传代及繁殖^[3]。梅毒螺旋体对温度、干燥均特别敏感, 日光、煮沸、干燥及常用化学消毒剂都可将其杀死, 但对低温忍耐力强, -78°C 仍能保存数年, 并维持活性及毒性不变^[4]。

梅毒可使机体产生多种多样的症状和体征, 梅毒也因此被称为“最大模仿者”^[5]。人是梅毒的唯一传染源, 由于传染途径的不同可分先天性梅毒和后天性梅毒。前者是患梅毒的孕妇经胎盘传染给胎儿的; 后者 95% 是由性交直接感染, 少数通过输血等间接途径感染。后天获得性梅毒表现复杂, 依其传染过程可分为一期梅毒, 二期梅毒和三期梅毒。一期梅毒的原发病灶一般是无痛硬结并且富含螺旋体的, 在感染后的 3-4 周出现, 并且伴随着腹股沟或近卫淋巴结肿大^[6]。二期梅毒是梅毒的全身散播阶段, 一般开始于感染梅毒之后的 4-10 周, 此时硬下疳已被清除, 在全身皮肤粘膜处的梅毒疹, 淋巴结以及骨、关节、眼及其他器官等损害中可检出梅毒螺旋体^[7]。三期梅毒主要表现为皮肤粘膜的溃疡性损害或内脏器官的肉芽肿样病变 (梅毒瘤)^[8]。三期梅毒中的神经梅毒更是危害巨大^[9]。

据美国疾病预防控制中心（CDC）最新统计数据显示，美国梅毒发病率自2000年以来升高超过一倍，其中男性患者比例显著增加。近10年来中国的梅毒发病率也增长迅猛^[10]。自从于16世纪初传入我国，梅毒一直未被完全消灭。1949年国家采取一系列措施如有效宣传，广泛有力的筛查，关闭妓院以及为性服务人员提供免费治疗等，终于在19世纪60年代基本消灭了梅毒^[11]。然而随着改革开放的不断进行，梅毒再次成为严重危害公众健康的问题之一^[12]。梅毒的居高不下的增长趋势已使之成为我国乃至世界高度关注的公共卫生问题^[2]。研究已指出梅毒与人类免疫缺陷病毒（Human immunodeficiency virus, HIV）感染彼此密切相关^[13]，美国近期增加的大部分梅毒病例出现在男男性行为者（MSM）中，在诊断为一期和二期梅毒的MSM患者中合并HIV感染的高达50-70%，使得梅毒的控制愈发复杂。

梅毒的早期治疗效果显著，通过剂量足够，疗程规则的抗生素治疗，梅毒能得到有效的根治。多达三分之一的未治疗患者可进展至疾病晚期，晚期梅毒对心血管和中枢神经系统造成不可逆的损伤，导致疾病进展甚至死亡。青霉素一直是梅毒治疗的首选药物^[14]，从19世纪40年代开始使用至今，未有梅毒螺旋体对青霉素耐药的报道出现。青霉素治疗还拥有疗效稳定，价格低廉的特点。但青霉素也可以引起严重的过敏反应，同时临床上存在临床症状消失，梅毒血清学试验不能转阴并持续呈阳性，即存在梅毒血清固定（Serum-resistance/serofast）现象^[15]。因此梅毒的治疗也再次成为临床医生一大难题。

1.2 梅毒的免疫

1.2.1 梅毒感染过程

梅毒复杂且反常的免疫学现象一直都在困扰和迷惑着这一领域的研究学者。十九世纪早期，在发现苍白密螺旋体之前的数十年，研究者试图用皮损处菌液接种人体来研究这种疾病，探究其免疫的本质^[16]。二十世纪初发现梅毒螺旋体之后，短时间内动物模型得以建立，使得研究者开始关注机体的免疫情况。同时随着青霉素的应用普及，最后确定机体产生的免疫不一定需要持续感染的情况下才能出现。八十年代初，Wassermann 极其团队孜孜不倦的开始研究梅毒螺旋体的抗原成分^[17]，这也引出了梅毒血清学诊断的方法。并随着抗原的进一步纯化，

梅毒检测的灵敏度和特异性也有所增强^[18]。分子质量为 47、37、35、33、30、17 和 15kDa 的这些蛋白被认为是梅毒螺旋体的主要抗原成分，并且用来合成重组蛋白以研制诊断试剂盒。七十年代末八十年代初，免疫学技术的发展使得研究者开始关注起细胞免疫。这项研究明确的建立起了细胞免疫在螺旋体清除中所起的关键作用^[19]。

梅毒的感染一般是在皮肤或黏膜破损处或性交时性区域接触梅毒螺旋体而引起的。在引起临床表现之前，细菌在局部繁殖并通过血管和淋巴结向全身扩散。梅毒螺旋体能穿过血管内皮细胞的细胞间隙向组织中扩散^[20]。当梅毒螺旋体从内皮细胞穿过时会激活内皮细胞，使内皮细胞重新或大量表达白细胞粘附分子并且募集吞噬细胞最终来清除梅毒螺旋体。梅毒感染早期机体会出现体液免疫和细胞免疫反应，这对苍白螺旋体的清除起着重要作用。人感染梅毒后一般会在 3-6 个月具有明显的免疫保护能力，但是部分患者不能完全清除梅毒螺旋体，并可发展成为三期梅毒。感染后患者经治疗后对梅毒的抵抗力逐渐消失，人工免疫很难再将其激发出来。免疫印迹分析表明梅毒患者血清与梅毒抗原反应的灵敏度和特异性与梅毒病程的持续时间是有关的^[21]。梅毒感染早期体内能检测出 IgM，之后出现 IgG 和 IgA，且 IgG 的含量除早期外都远大 IgM^[22]。尽管二期梅毒患者体内 IgE、IgG 和 IgA 类型的抗螺旋体抗体滴度很高，但是仍然存在梅毒螺旋体的繁殖和扩散，说明抗梅毒螺旋体抗体的保护作用是有限的^[23]。

1.2.2 巨噬细胞与梅毒

多形核白细胞（Polymorphonuclear leukocyte, PMN）最早进入感染部位进行吞噬和消化梅毒螺旋体。在感染 6 天之后 T 细胞起主要作用，T 细胞浸润区于 10-13 天形成。致敏的 T 细胞可分泌巨噬细胞移动抑制因子和激活因子，从而募集巨噬细胞聚集至感染灶来吞噬和破坏梅毒螺旋体^[24]。一期梅毒患者硬下疳中在巨噬细胞浸润后梅毒螺旋体数量下降迅速，并且在皮疹恢复期可以看到巨噬细胞中梅毒螺旋体抗原的存在。免疫兔血清能增强吞噬细胞对梅毒螺旋体的吞噬作用。巨噬细胞在体外吞噬螺旋体的具体步骤已研究明确，并且在体外可观察到巨噬细胞直接杀灭梅毒螺旋体，说明巨噬细胞在梅毒清除过程中起着重要作用。

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.