

# 梅毒疫苗发展的需求、挑战与前景

朱 洪,江银波,余 坚,曾铁兵\*

(南华大学病原生物学研究所,湖南 衡阳 421001)

**摘 要:** 梅毒是由苍白密螺旋体苍白亚种即梅毒螺旋体(Tp)引起的一种性传播疾病,尽管可被廉价有效的抗生素治愈,但依然在发展中国家流行和发达国家再现,严重危害公众健康。感染性梅毒给全球带来医疗负担,先天性梅毒被认为是影响全球胎儿和新生儿最重要的感染性疾病,梅毒感染还会增加感染和传播艾滋病的风险。全球梅毒的高发和防治该病的失败,使得对梅毒疫苗的需求迫在眉睫。在动物模型中用 $\gamma$ 射线致弱的Tp长期免疫动物获得了完全保护,提示了发展梅毒疫苗的可行性及Tp外膜表面成分在诱导免疫保护中的重要性。梅毒适宜发展疫苗用于防治,但实现这一目标前需要解决好参与人员、研究以及市场问题。

**关键词:** 梅毒; 苍白密螺旋体; 疫苗; 外膜蛋白

**中图分类号:**R377.1 **文献标识码:**A

梅毒是梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, Tp)导致的一种慢性性传播疾病(STD)。感染性梅毒是全球流行的一种威胁公众健康的疾病,WHO估计全球有3600万感染者和每年超过1100万的新增患者<sup>[1]</sup>,其中超过90%的病例在发展中国家,近年许多发达国家再次出现。中国梅毒近年来发病数呈快速增长趋势,以先天梅毒和男—男同性接触(MSM)伴艾滋病性梅毒增长<sup>[2]</sup>尤为明显。先天性梅毒在低收入国家被认为是与流产和死产的最相关因素,每年有50多万例先天性梅毒出现<sup>[3]</sup>。有症状的梅毒感染能提高2至5倍感染和传播艾滋病的风险<sup>[4]</sup>。梅毒疫情和危害已成为中国乃至全球高度关注的公共卫生问题,中国政府出台了《中国预防与控制梅毒规划(2010~2020年)》以遏制梅毒疫情的蔓延<sup>[5]</sup>。

青霉素治疗梅毒感染已有70余年,至今Tp对其仍十分敏感,引发了是否需要研发梅毒疫苗的强烈争议。尽管有集中控制梅毒的举措和廉价有效治疗梅毒的药物,但全球梅毒感染率仍持续升高,而且青霉素的二线替代药物如大环内酯类抗生素的耐药性已在许多国家出现,以至于被拒绝用于治疗 and 预防梅毒。因此,控制梅毒不能仅仅依靠筛选和治疗梅毒,迫切需要发展和使用梅毒疫苗作为补充,而前

提是需要深入研究梅毒发病机制和筛选确定梅毒疫苗靶抗原。有效梅毒疫苗研发成功,将明显降低成人梅毒及先天性梅毒的发生率,有效控制梅毒对艾滋病的防御也具有显著积极的影响。

## 1 梅毒发病机制

**1.1 Tp生物学特征** Tp属于螺旋体科密螺旋体属,人是Tp的唯一宿主。1998年,Tp(Nichols株)全基因组被测序,在随后的测序中发现密螺旋体亚种间基因序列同源性高达99.8%以上<sup>[6]</sup>。Tp是一类生物学性状十分独特的原核细胞型微生物<sup>[7]</sup>:(1)缺乏代谢酶,不能像大多原核细胞微生物一样体外人工培养;(2)有28%基因与其它物种无同源性,为新基因;(3)不可培养和不可进行遗传操作(基因敲入或敲出);(4)外膜蛋白(OMP)十分稀少,仅为大肠埃希菌的百分之一,缺乏敏感的鉴定方法,而且外膜十分脆弱,鉴定OMP十分困难;(5)虽为革兰阴性菌却缺乏脂多糖(内毒素)和III型分泌系统、菌毛及荚膜,也不产生明显的外毒素。Tp这些特殊的生物学性状是阻碍研究Tp致病机制和疫苗的主要原因。

**1.2 梅毒的自然感染史** 自然情况下未经治疗的梅毒会出现第一阶段的硬下疳和第二阶段的散发性皮肤病。随后是无症状潜伏期,该期会在大多数人中持续一段时间。在无抗生素的时代,约30%的个体在10~50年后发展为三期梅毒并对其威胁生命。梅毒自然发展过程有利于洞察Tp建立和维持

收稿日期:2015-01-07;修回日期:2015-03-23

基金项目:国家自然科学基金项目(81273322);湖南省卫生厅课题(B2013-035)。

\* 通讯作者, E-mail: nhdxtb@126.com.

感染的发病机制。高度的侵袭力和免疫逃避形成持续感染的能力是 Tp 生存的两个必要因素。

**1.2.1 Tp 的高度侵袭能力** Tp 通过胎盘传播导致先天性梅毒,至少 40% 的早期梅毒患者中枢神经系统受到过 Tp 侵袭,二期梅毒出现广泛皮疹和导致肝、肾及眼部症状,这些都表明 Tp 具有高度侵袭力<sup>[7]</sup>。Tp 在感染动物数小时内,可通过血液和淋巴播散<sup>[7]</sup>。体外实验也显示 Tp 可以穿透完整的膜和内皮细胞层<sup>[7]</sup>。Tp 入侵组织后只能附着在细胞上(如毛细管内皮细胞)。Tp0136<sup>[8]</sup>、Tp0155、Tp0483<sup>[9]</sup>和 Tp0751<sup>[10-12]</sup>几个蛋白能以细胞外基质为桥梁吸附宿主细胞。Tp 的侵袭能力对形成临床表现至关重要,消除这种能力将防止传染性梅毒的传播、先天性梅毒的形成和个体梅毒的感染进程,是发展梅毒疫苗的中心环节。

**1.2.2 梅毒早期病变的消除** 一期和二期梅毒病变主要有 T 细胞浸润,随后为巨噬细胞(M $\phi$ )。M $\phi$  浸润后不久清除绝大多数 Tp。Th1 型细胞产生  $\gamma$  干扰素募集并激活 M $\phi$  使其能吞噬抗体调理的螺旋体并将其杀灭。大部分 Tp 被清除但仍然会有一部分 Tp 存在,这些局部残留的 Tp 能抵抗 M $\phi$  的调理吞噬作用, Tp 的免疫逃逸对形成梅毒终生慢性感染至关重要。

**1.2.3 Tp 持久感染的原因** 在梅毒感染早期症状自发消除后,进入一段无症状慢性感染时期,称之为“潜伏期”。Tp 这种持续生存能力可能与下列因素有关:(1)Tp 隐藏在“免疫豁免”部位如中枢神经系统、眼睛或除吞噬细胞外的其它细胞内;(2)Tp 外膜蛋白稀少,抗原靶位有限,在梅毒逃逸免疫应答中起重要作用;(3)Tp 表面的 Tpr 家族蛋白抗原的多样性和变异性<sup>[13-14]</sup>。最近发现 Tp 存在两种抗原类型变异:①通过改变基因启动子区域的 polyG 长度,阶段性表达或不表达 TprE、TprG 和 TprJ<sup>[15]</sup>;②TprK 分散区域序列在密螺旋体亚种间、Tp 株间甚至株内的变异<sup>[16]</sup>。Tpr 家族的 TprC 和 TprD 都在其株间和亚种间存在异质性,但 TprC 和 TprD 序列在感染过程中却似乎保持不变。这些多变的区域预测为表面结构<sup>[17]</sup>,并且认为 TprC 是抗体调理素的靶位<sup>[13]</sup>,这有助于部分解释人多次感染梅毒可能是因为不同菌株表达不同的 TprC 和 TprD 序列。发展疫苗时需要考虑抗原变异性,应集中针对这些重要蛋白抗原的恒定区。

**1.3 Tp 研究中的技术难题阻碍了 Tp 外膜蛋白的鉴定** Tp 不可人工培养和遗传操纵、OMP 稀少、

外膜脆弱等因素阻碍了对其 OMP 的鉴定。为了避免这些限制,研究者应用生物信息学分析和结构预测<sup>[13,18]</sup>等方法,证明了一些蛋白具有功能活性如对宿主成分粘附作用<sup>[8-12]</sup>、抗体调理素的靶位<sup>[19-20]</sup>、抗原变异<sup>[14]</sup>等。至今为止鉴定的候选表面外膜蛋白主要包括:粘附素 Tp0136、Tp0155、Tp0483 和 Tp0751<sup>[8-12]</sup>;Tpr 家族蛋白中 TprK (Tp0897)<sup>[14]</sup>、TprC/D (Tp0117/131)<sup>[13,17]</sup>、TprI (Tp0620) 与 TprF (Tp0316)<sup>[21]</sup>; Tp92 (Tp0326)<sup>[22]</sup>; Tp0966-Tp0969<sup>[23]</sup>。这些都是重要的梅毒疫苗的候选分子。

## 2 梅毒动物模型

虽然有些哺乳动物能够感染 Tp,但极少会发展为临床疾病。兔是唯一能出现人类梅毒感染多个阶段和慢性特点的实验室小型动物,适宜用做研究梅毒致病机制和免疫机制的动物模型。过去的数十年中,均采用新西兰兔进行梅毒研究,但由于不能获得近交系株和缺乏兔免疫检测试剂,限制了兔模型的免疫学研究。近年来,建立了一些检测兔细胞因子的方法,但需发展更多的检测方法。

## 3 Tp 天然表面抗原是疫苗的关键成分

**3.1 理论依据** 1973 年 Miller 在 37 周内给新西兰兔静脉注射经  $\gamma$  射线致弱的 Tp,获得了长达一年抗同株 Tp 攻击的完全保护。尽管这种免疫方案不适合用于人类,但该研究具有开创性意义,建立了理论上完全保护的动物模型,同时深刻认识到 Tp 表面抗原对保护作用起着决定性作用。使用灭活疫苗失败是由于用物理或化学处理 Tp 时破坏了其表面不稳定的抗原。虽然大多数研究者将焦点集中于 Tp 的 OMP 上,但需要提醒的是 Tp 的表面膜含有脂质,Miller 所使用的免疫原中包含了这些脂类抗原,用其免疫兔可产生调理素抗体获得部分保护性。此外,全 Tp 免疫小鼠可产生高度中和作用的单克隆抗体,该抗体能特异性结合 Tp 磷酸胆碱抗原表位,被动转移该抗体能显著降低 Tp 感染<sup>[24]</sup>。

**3.2 延长形成保护的时间** Miller 用  $\gamma$  射线致弱的无繁殖力的 Tp 静脉注射新西兰兔获得完全保护需要 37 周,而免疫 24 周和 12 周仅分别获得部分保护或不能免疫保护。Miller 的研究也证实了之前的观察,即动物模型内的免疫保护可防止同源 Tp 的

再感染。抵抗有症状的同源株 Tp 感染的完全保护仅在 Tp 感染 12 周后才会出现。如果兔前 12 周阶段受到感染得到治愈,可以在 12 周后再次被感染。现在推测这种免疫保护缓慢的变化与 Tp 细菌上特殊的表面蛋白稀少有关。这些观察结果,结合 Miller 的保护性研究,表明表面抗原在有效梅毒疫苗中的重要性,是有效疫苗的靶抗原成分。

## 4 免疫保护的相关因素

**4.1 兔感染模型中的免疫保护相关因素** 感染过程中,病变处先出现 Th1 细胞应答,随后为抗体调理 M $\phi$  吞噬杀死而清除 Tp。单独的抗体并不能消除 Tp 感染,T 细胞的过继转移只能短暂且不完全抵抗感染。从过去疫苗研究过程中得出的结论是,保护兔免受最初感染既依赖于 Th1 细胞应答(T 细胞浸润及产生  $\gamma$  干扰素),也需要调理素抗体的作用。国外研究常以 Ribi 佐剂(含单磷脂酰 A、合成海藻糖和细胞壁骨架)诱导 Th1 细胞应答和功能性抗体产生,以重组蛋白加 Ribi 佐剂可诱导较明显的保护作用<sup>[19-20]</sup>。但商品化的 Ribi 佐剂已不再生产,曾尝试过其它佐剂但降低了保护作用,因而需要发展和应用其它的佐剂用于梅毒疫苗研究。

**4.2 人类对 Tp 感染的免疫应答** 目前对人类的免疫知之甚少。众所周知,患过梅毒的人群可反复感染。研究表明,晚期潜伏梅毒患者将可以抵抗异源 Tp 株的再次感染不出现症状,但那些更早阶段的患者可再次感染,这与 Miller 在动物中使用疫苗若要诱导完全保护需长期的免疫周期是一致的。在兔体内形成的免疫具有 Tp 亚种甚至株的特异性,这种特异性很可能与 Tp 株间抗原差异有关。因此,研发梅毒疫苗不但需要长期的免疫过程,而且在选择免疫原时需要注意菌株中抗原多样性和抗原变异在免疫逃避中的作用。

## 5 梅毒疫苗研发必需考虑因素与益处

**5.1 疫苗的关键需求** 开发和生产有效梅毒疫苗至少需要几个关键需求:(1)疫苗需要防止初期的硬下疳和二期病变的形成以阻断梅毒和艾滋病的传播,抑制 Tp 在宿主内播散,阻止梅毒发展和形成先天性梅毒。(2)由于在梅毒感染期间调理吞噬作用对 Tp 的清除起关键作用,因此疫苗需要有效激发 Th1 型应

答和调理素抗体产生。(3)疫苗能广泛保护机体免受各种 Tp 菌株的感染。采用单一 Tp 蛋白无法满足这些需求,因此有效疫苗需要多个组分组成。

**5.2 需要解决的问题** 经过近一个世纪的研究,人们在兔感染模型中对免疫保护相关因素有了深入的了解。然而,疫苗的成功研制还需要通过在基础研究实验室和临床之间的信息交流,以进一步了解对人类的相关保护。发展适当有效佐剂必不可少并可能需要工业化生产。在疫苗研究领域需要大规模应用“组学”方法和数据分析来全面理解 Tp,如在 Tp 亚型和 Tp 株间的基因和蛋白表达差异。当前最重要研究任务是明确 Tp 的表面抗原,不仅包括 OMP,也需要延伸范围至非蛋白抗原(如膜脂抗原)和经糖基化或甲基化翻译后修饰的表面蛋白。完成这些目标需要一大批从事梅毒基础研究的科学家投入到该领域进行持续研究,将面临技术障碍和高额的研究经费问题。此外,为促进梅毒疫苗的发展,需要对发达国家市场做出准确评估,应考虑应用梅毒疫苗可降低艾滋病发生率以及疫苗发展带来的行业利益。

**5.3 梅毒疫苗研发的益处** 多种原因有利于研发梅毒疫苗:(1)Tp 仅寄生于人体,在全球成功接种可有效消除这种疾病。(2)兔动物模型展示了人类感染初期、二期和三期各阶段的特征,可采用适当的候选疫苗进入临床前研究以准确评估其保护性能。(3)Tp 对青霉素高度敏感,即使在疫苗保护试验失败后仍可用青霉素完全治愈,这将极大吸引志愿者参与临床试验及厂商赞助。(4)射线致弱 Tp 可诱导完全保护为发展梅毒疫苗提供了可行性。虽然由脂质和外膜蛋白的 Tp 外膜给疫苗研究造成了困难,但 Tp 相对简单的表面又有利于梅毒疫苗的研发。事实上,如果梅毒疫苗成分被发现,将减少疫苗研发的费用,使生产过程流水化,提高生产梅毒疫苗的行业利益。

疫苗接种被认为是世界上最重要和节省成本的公共卫生举措,因为其为社会带来积极的健康效应和经济效益。由于梅毒给全球造成持续性负担,增加传播艾滋病的风险,感染性梅毒和先天性梅毒显著的发病率及死亡率,从概念上、战略上和财政支持上都迫切需要研发疫苗预防梅毒这一严重疾病。

### 参考文献:

- [1] World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008 [C]. Geneva: World Health Organization, 2012.

- [2] Zhou Y, Li D, Lu D, et al. Prevalence of HIV and syphilis infection among men who have sex with men in China: a meta-analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 620431.
- [3] Newman L, Kamb M, Hawkes S, et al. Global estimates of syphilis in pregnancy and associated adverse outcomes: a analysis of multinational antenatal surveillance data [J]. *PLoS Med*, 2013, 10(2): e1001396.
- [4] Douglas Jr JM. Penicillin treatment of syphilis: clearing away the shadow on the land [J]. *JAMA*, 2009, 301(7): 769-771.
- [5] Tan NX, Rydzak C, Yang LG, et al. Prioritizing congenital syphilis control in south China: a decision analytic model to inform policy implementation [J]. *PLoS Med*, 2013, 10(1): e1001375.
- [6] Cejko D, Zbanik M, Chen L, et al. Whole genome sequences of three *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* strains: yaws and syphilis treponemes differ in less than 0.2% of the genome sequence [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(1): e1471.
- [7] LaFond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1): 29-49.
- [8] Brinkman MB, McGill MA, Pettersson J, et al. A novel *Treponema pallidum* antigen, TP0136, is an outer membrane protein that binds human fibronectin [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(5): 1848-1857.
- [9] Cameron CE, Brown EL, Kuroiwa JMY, et al. *Treponema pallidum* fibronectin-binding proteins [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186: 7019-7022.
- [10] Cameron CE, Brouwer NL, Tisch LM, et al. Defining the interaction of the *Treponema pallidum* adhesin Tp0751 with laminin [J]. *Infect Immun*, 2005, 73: 7485-7494.
- [11] Houston S, Hof R, Francescutti T, et al. Bifunctional role of the *Treponema pallidum* extracellular matrix binding adhesin Tp0751 [J]. *Infect Immun*, 2011, 79(3): 1386-1398.
- [12] Houston S, Hof R, Honeyman L, et al. Activation and proteolytic activity of the *Treponema pallidum* metalloprotease, pallilysin [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(7): e1002822.
- [13] Anand A, Luthra A, Dunham-Ems S, et al. TprC/D (Tp0117/131), a trimeric, pore-forming rare outer membrane protein of *Treponema pallidum*, has a bipartite domain structure [J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(9): 2321-2333.
- [14] Giacani L, Molini BJ, Kim EY, et al. Antigenic variation in *Treponema pallidum*: TprK sequence diversity accumulates in response to immune pressure during experimental syphilis [J]. *J Immunol*, 2010, 184(7): 3822-3829.
- [15] Giacani L, Lukehart S, Centurion-Lara A. Length of guanosine homopolymeric repeats modulates promoter activity of subfamily II tpr genes of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007, 51(2): 289-301.
- [16] Centurion-Lara A, Godornes C, Castro C, et al. The tprK gene is heterogeneous among *Treponema pallidum* strains and has multiple alleles [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(2): 824-831.
- [17] Centurion-Lara A, Giacani L, Godornes C, et al. Fine analysis of genetic diversity of the tpr gene family among treponemal species, subspecies and strains [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(5): e2222.
- [18] Cox DL, Luthra A, Dunham-Ems S, et al. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum* [J]. *Infect Immun*, 2010, 78(12): 5178-5194.
- [19] Centurion-Lara A, Castro C, Barrett L, et al. *Treponema pallidum* major sheath protein homologue Tpr K is a target of opsonic antibody and the protective immune response [J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 647-656.
- [20] Cameron CE, Lukehart SA, Castro C, et al. Opsonic potential, protective capacity, and sequence conservation of the *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* Tp92 [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(4): 1401-1413.
- [21] Anand A, LeDoyt M, Karanian C, et al. Bipartite Topology of *Treponema pallidum* Repeat Proteins C/D and I: Outer Membrane Insertion and Porin Function Require a C-terminal  $\beta$ -barrel Domain [J]. *J Biol Chem*, 2015, pii: jbc. M114. 629188.
- [22] Desrosiers DC, Anand A, Luthra A, et al. TP0326, a *Treponema pallidum* beta-barrel assembly machinery A (BamA) orthologue and rare outer membrane protein [J]. *Mol Microbiol*, 2011, 80(6): 1496-1515.
- [23] Brautigam CA, Deka RK, Ouyang Z, et al. Biophysical and bioinformatic analyses implicate the *Treponema pallidum* Tp34 lipoprotein (Tp0971) in transition metal homeostasis [J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(24): 6771-6781.
- [24] Blanco DR, Champion CI, Dooley A, et al. A monoclonal antibody that conveys in vitro killing and partial protection in experimental syphilis binds a phosphorylcholine surface epitope of *Treponema pallidum* [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(5): 3083-3095.