

## 梅毒疫苗发展面临的挑战与机遇

常 青<sup>1,2</sup>, 李臻祎<sup>3</sup>, 曹龙古<sup>4</sup>, 曾铁兵<sup>1\*</sup>

(1. 南华大学病原生物学研究所, 湖南 衡阳 421001; 2. 常德市第一人民医院检验科;  
3. 南华大学衡阳医学院 2015 级临床医学 4 班; 4. 湘南学院预防医学与检验医学系)

**摘要:** 梅毒是一种由梅毒螺旋体引起的性传播疾病, 虽然对青霉素治疗敏感, 但仍然全球流行。研发疫苗是预防梅毒行之有效的措施, 能完善以公共卫生为导向的梅毒的预防、筛查和治疗, 阻止梅毒全球蔓延。本文概述了开发梅毒疫苗的必要性, 总结了梅毒疫苗前期研究状况, 讨论了梅毒疫苗需针对的关键抗感染因素, 提出了梅毒疫苗设计应考虑的关键问题以及未来梅毒疫苗发展的策略与措施。行业、管理和资助机构应优先考虑开发梅毒疫苗, 并应给予适当的鼓励和支持。

**关键词:** 梅毒; 疫苗; 外膜蛋白; 免疫应答; HIV 合并感染

**中图分类号:** R377+1 **文献标识码:** A

梅毒是由苍白密螺旋体苍白亚种 (*Treponema pallidum subspecies pallidum*, Tp) 感染引起的一种全球广泛流行的性传播疾病, 主要发生在包括中国在内的中低收入国家, 但在高收入国家中梅毒也再次出现并迅速回升, 尤其在男-男性行为者 (MSM) 和孕妇中呈急剧上升态势。先天性梅毒成为当前死产的主要原因<sup>[1-2]</sup>, 梅毒患者感染和传播 AIDS 的风险也大大增加, 梅毒感染使全球经济蒙受巨大损失。控制梅毒不能仅靠现有的筛查和治疗手段, 必须寻求新的附加措施, 而开发梅毒疫苗就是其中之一<sup>[3-4]</sup>。有效的梅毒疫苗将克服如今面临的诸多困难<sup>[3]</sup>: 预防 Tp 感染, 进而预防各期梅毒发展及母婴垂直传播; 预防不同 Tp 临床株的交叉感染, 相应地减少再感染的发生率; 无需依赖复诊和青霉素的充足供应即可有效控制梅毒。研发疫苗不但对消灭梅毒具有重要意义, 而且能有效降低 AIDS 发生<sup>[4]</sup>。

### 1 梅毒疫苗前期研究状况

与其它病原体的疫苗开发相比, 有关梅毒疫苗的实验研究非常有限, 主要原因是: Tp 的生物学性状特殊<sup>[2]</sup>: 外膜蛋白 (OMP, 为主要疫苗靶分子) 稀

少; 外膜脆弱使 OMP 难以鉴定; 不能体外培养, 体内增殖缓慢; 不能通过基因操控来研究基因功能; 细胞壁缺乏革兰阴性菌共有的脂多糖; 不产生明显毒力因子。此外, 缺乏从事 Tp 基础研究的科研人员、Tp 研究领域相对于其他病原体较落后的方法学<sup>[5]</sup>也是重要影响因素。

早在上世纪六七十年代, Metzger 和 Miller 分别用 4 °C 短期储存后致弱的 Tp 和  $\gamma$  射线致弱的 Tp (Nichols 株) 免疫家兔后分别获得了针对 Nichols 株攻击的部分和完全保护, 通过比较得出结论<sup>[3]</sup>: 表面抗原是梅毒疫苗的关键成分, 但对热敏感; 保护性免疫是逐步诱导形成的; 不同 Tp 株的保护性抗原不同; 在兔模型中可诱导出持久和无菌免疫保护。

早期应用全细胞免疫虽能获得完全保护, 但因免疫剂量大和免疫时间长, 不适合应用于人体, 却为发展梅毒疫苗提供了可行性和实验依据。随着 Tp 基因组解析和基因工程技术的开展, 国外以重组蛋白类型<sup>[3,5]</sup>, 国内以核酸疫苗类型<sup>[6]</sup>, 先后在动物模型中对单个抗原测试了免疫保护力, 包括 Tp92 (BamA)、TprK、TprI、TprF、Gpd、TmprB、TpN15、TpN47、Tp0155、Tp0483、Tp0956、4D、内鞭毛和 Tp0751<sup>[7]</sup>。其中用 Tp92 (BamA)、4D、Gpd、TprF 和内鞭毛免疫的家兔损害发展减弱, 显示出部分保护; 用抗原可变的 TprK 获得了很有希望的部分保护, 该分子的保护性结构位于蛋白 N 末端区域<sup>[3]</sup>; 最近, 以重组 Tp0751 蛋白免疫兔, 发现其器官的 Tp 负荷明显减低, 而以 Tp 攻击 Tp0751 免疫兔后, 将其淋巴结引入其他兔体内未出现感染, 表现为无菌免

收稿日期: 2018-05-28; 修回日期: 2018-08-05

基金项目: 国家自然科学基金 (81273322); 湖南省教育厅开放创新平台基金 (15K110); 湖南省分子靶标新药研究协同创新中心项目 (湘教通 [2014] 405 号); 湖南省研究生培养创新基地项目 (湘教通 [2017] 451 号); 湖南省教育厅资助科研项目 (17B245, 15C1256)。

\* 通信作者, E-mail: nhdxztb@126.com.

疫,提示 Tp0751 是非常有希望的候选疫苗分子<sup>[7]</sup>。然而, TprK、Gpd 和 Tp92(BamA) 这几种蛋白保护力的研究结果有分歧<sup>[3]</sup>。以上研究表明:抗 Tp 感染保护不是由单一 Tp 抗原提供的,应发展多价疫苗;不同实验室间结果不同,突显了对实验室间抗原制备和免疫方法实行标准化的重要性。

在梅毒临床前开发疫苗方法学方面,一个重大进步是应用实时定量 PCR(qPCR),该技术可以在家兔感染 Tp 的远端部位对 Tp-DNA 进行灵敏的定量检测<sup>[8]</sup>,但无法区分 Tp 死活,也很难从复杂组织中(如淋巴结)有效提取 DNA。荧光原位杂交(FISH)应用一个可识别 Tp 16s rRNA 的种特异性探针,能对人兔组织样本中的 Tp 进行定位分析<sup>[9]</sup>,提供更多信息。

## 2 梅毒疫苗成功接种需要的相关免疫保护因素

强烈的迟发型超敏反应(DTH)对有效清除损害部位的 Tp 至关重要<sup>[10]</sup>。通过 CD4<sup>+</sup>Th1 细胞、NK 细胞、CD8<sup>+</sup>CTL 等局部分泌的 Th1 型细胞因子(如 IFN- $\gamma$ )活化巨噬细胞,促进其吞噬被特异性抗体调理的 Tp,被认为是清除 Tp 的主要机制。

除细胞免疫应答外,体液免疫应答也是必不可少的。然而抗体调理巨噬细胞吞噬进程缓慢,且某些 Tp 亚群可以逃避调理吞噬作用,这些持续存在的亚群可能对调理素(抗体)敏感性不同,这与表面抗原暴露的差异性或抗原变异有关<sup>[3]</sup>。Tp 亚群的免疫逃避使目前的疫苗方案难以完全抵抗 Tp 感染,这对发展梅毒疫苗是一个巨大挑战。

基于对 Tp 免疫清除机制的认识,临床前疫苗研究应着重于促进 Th1 型细胞因子产生,因其能激活巨噬细胞和促进 Tp 的调理吞噬。此外,有效免疫还需针对那些能抗巨噬细胞清除而持续存在的 Tp 种群和血管内的 Tp,以抑制 Tp 向感染远端播散。

## 3 对 HIV 阳性者梅毒防护相关因素的再思考

HIV 和 Tp 混合感染导致 HIV 载量增加,并增加 HIV 传播风险。Tp 感染时,主要依赖 CD4<sup>+</sup>T 细胞活化的 DTH 对清除病变部位 Tp 至关重要,但 HIV 可破坏感染者的 CD4<sup>+</sup>Th 细胞致其数量偏低。

在 HIV 阳性者的硬下疳部位,CD8<sup>+</sup>T 细胞替代耗竭的 CD4<sup>+</sup>Th 细胞而成为主要淋巴细胞,产生 IFN- $\gamma$  等细胞因子,活化硬下疳部位的巨噬细胞。此外,HIV 阳性者的 CD4<sup>+</sup>Th2 细胞受损,B 细胞缺乏其辅助使血清中特异性抗 Tp 抗体活性较低<sup>[11]</sup>,不利于病变部位 Tp 清除。了解 HIV 阳性者体内这一免疫应答变化特点和代偿清除机制,对于开发梅毒疫苗去保护这一最重要的目标人群至关重要。此类疫苗接种应能促进包括 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 NK 细胞等免疫细胞产生 Th1 型细胞因子。然而,在为 HIV 阳性者开发有效疫苗之前,还需更好理解 HIV 阳性者体内调理素应答的变化,以及 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 NK 细胞在梅毒损伤中的作用。

## 4 梅毒疫苗设计应考虑的关键问题

成功的梅毒疫苗需要考虑四个方面<sup>[3]</sup>:在感染部位形成的高度传染性的硬下疳;Tp 的高度侵袭力;Tp 的重复感染能力;Tp 逃避强烈免疫应答清除的能力。因此,有效的梅毒疫苗应能防止梅毒硬下疳的发展、梅毒的传播、梅毒的持续感染和再感染<sup>[3]</sup>,以消除感染者症状和疾病在总人口中的传播。如上所述,Tpr 蛋白家族中的某些蛋白免疫新西兰兔后能减缓硬下疳的发展,预测这些蛋白亚家族成员暴露在 Tp 表面<sup>[3,12]</sup>,在预测的表面暴露环状区域出现广泛的序列变异<sup>[13]</sup>,表明其在 Tp 持续感染和再感染中也发挥作用。关于 Tp 高度侵袭力,已证明 Tp0751 是一种对细胞外基质(ECM)和细胞均具有黏附作用的黏附素,提示 Tp 通过其经血液播散<sup>[14]</sup>。其他已发现的黏附素包括 Tp0136<sup>[15]</sup>、Tp0155<sup>[16]</sup>、Tp0483<sup>[16]</sup>、Tp0750<sup>[17]</sup>和 Tp0435<sup>[18]</sup>,可能在 Tp 播散中起相似作用。由于在 Tp 感染时发病机制复杂,很可能需要多种 Tp 抗原的混合物接种以获得完全保护,因此上述致病因子可能是多价疫苗的候选分子。

梅毒临床前疫苗开发过程中需要评估几个关键问题,包括为获得最大免疫力所需要接种次数,疫苗接种后诱导免疫持续时间,对不同菌株的交叉保护,合适的多价疫苗的制备,佐剂的选择与优化等等,以获得免疫应答有效保护机体抗 Tp 感染。

## 5 未来发展梅毒疫苗的策略与措施

首先需得到政府有关部门的重视和资金投入,

吸引大量的研究人员从事梅毒基础研究,以提供新的思路和跨学科的研究方法,尤其在宿主-病原体相互作用、Tp 基础生物学和动物模型的研究领域。其次,应用反向疫苗学和现代研究手段(包括先进的结构方法学与蛋白质组方法学)开展 Tp 基础生物学研究,鉴定与病原体-宿主间相互作用和致病有关的重要抗原<sup>[19]</sup>,进而筛选新的疫苗候选分子;同时应用其他病原体研究先进的疫苗方法学,从维持抗原分子天然构象(如采用核酸疫苗形式)、疫苗分子间协同效应、佐剂(如菌影<sup>[20]</sup>)、免疫策略(初免-加免)、免疫途径(改变免疫应答类型)等方面进行选择和优化<sup>[5]</sup>,进而发展多价疫苗,诱导系统和局部黏膜产生持久的细胞免疫和体液免疫应答以有效保护机体抗 Tp 感染。此外,还需发展检测家兔种属特异性的免疫试剂,如各类细胞因子检测试剂;建立 Tp 抗原制备和接种与攻击感染标准化操作程序以减少或消除实验室间的误差<sup>[3]</sup>。

梅毒疫苗的发展需要专用资金来评估当前和未来的候选疫苗。为确保成功,政府和监管机构应优先考虑发展梅毒疫苗,同时资助机构、非营利和慈善组织及行业合作伙伴给予支持,特别是行业合作伙伴需要获得担保以生产和销售梅毒疫苗。有理由相信,在持续资助和研究人员共同努力下,预期在 10 年时间内可望获得用于临床的梅毒候选疫苗。

#### 参考文献:

- [1] LAWN JE, BLENCOWE H, WAISWA P, et al. Stillbirths: rates, risk factors, and acceleration towards 2030[J]. *Lancet*, 2016,387(10018):587-603.
- [2] PEELING RW, MABEY D, KAMBML, et al. Syphilis[J]. *Nat Rev Dis Primers*. 2017,3:17073.
- [3] LITHGOW KV, CAMERON CE. Vaccine development for syphilis[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2017,16(1):37-44.
- [4] CAMERON CE. SYPHILIS VACCINE Development: Requirements, Challenges and Opportunities[J]. *Sex Transm Dis*. 2018. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000831.
- [5] CULLEN PA, CAMERON CE. Progress towards an effective syphilis vaccine: the past, present and future[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2006, 5(1):67-80.
- [6] ZHAO F, LIU S, ZHANG X, et al. CpG adjuvant enhances the mucosal immunogenicity and efficacy of a *Treponema pallidum* DNA vaccine in rabbits[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, 9(4):753-60.
- [7] LITHGOW KV, HOF R, WETHERELL, et al. A defined syphilis vaccine candidate inhibits dissemination of *Treponema pallidum* subspecies pallidum[J]. *Nat Commun*, 2017,8:14273.
- [8] SALAZAR JC, RATHI A, MICHAEL NL, et al. Assessment of the kinetics of *Treponema pallidum* dissemination into blood and tissues in experimental syphilis by real-time quantitative PCR[J]. *Infect Immun*, 2007,75(6):2954-8.
- [9] PETRICH A, ROJAS P, SCHULZE J, et al. Fluorescence in situ hybridization for the identification of *Treponema pallidum* in tissue sections[J]. *Int J Med Microbiol*, 2015,305(7):709-18.
- [10] CARLSON JA, DABIRI G, CRIBIERB, et al. The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity[J]. *Am J Dermatopathol*, 2011,33(5):433-60.
- [11] MARRA CM, TANTALO LC, SAHISK, et al. Reduced *Treponema pallidum*-specific opsonic antibody activity in HIV-infected patients with syphilis[J]. *J Infect Dis*, 2016,213(8):1348-54.
- [12] ANAND A, LEDOYT M, KARANIANC, et al. Bipartite topology of *Treponema pallidum* repeat proteins C/D and I outer membrane insertion, trimerization and porin function require a C-terminal  $\beta$ -barrel domain[J]. *J Biol Chem*, 2015,290(19):12313-31.
- [13] CENTURION-LARA A, GIACANI L, GODORNESC, 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.
- [14] KAO WA, PĚTROŠOVÁ H, EBADY R, et al. Identification of Tp0751 (Pallilysin) as a *Treponema pallidum* Vascular Adhesin by Heterologous Expression in the Lyme disease Spirochete[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):1538.
- [15] KE W, MOLINI BJ, LUKEHART SA, et al. *Treponema pallidum* subsp. pallidum TP0136 protein is heterogeneous among isolates and binds cellular and plasma fibronectin via its NH2-terminal end[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015,9(3):e0003662.
- [16] CAMERON CE, BROWN EL, KUROIWA JMY, et al. *Treponema pallidum* fibronectin-binding proteins[J]. *J Bacteriol*, 2004,186(20):7019-22.
- [17] HOUSTON S, RUSSELL S, HOF R, et al. The multifunctional role of the pallilysin-associated *Treponema pallidum* protein, Tp0750, in promoting fibrinolysis and extracellular matrix component degradation[J]. *Mol Microbiol*, 2014,91(3):618-34.
- [18] CHAN K, NASEREDDIN T, ALTER L, et al. *Treponema pallidum* lipoprotein Tp0435 expressed in *Borrelia burgdorferi* produces multiple surface/ periplasmic isoforms and mediates adherence[J]. *Sci Rep*, 2016,6:25593.
- [19] KUMAR JAISWAL A, TIWARI S, JAMAL SB, et al. An In Silico Identification of Common Putative Vaccine Candidates against *Treponema pallidum*: A Reverse Vaccinology and Subtractive Genomics Based Approach[J]. *Int J Mol Sci*, 2017,18(2):pii: E402.
- [20] 张佳俐,曹二龙,曹龙古,等.梅毒螺旋体黏附素 Tp0751 核酸菌影的构建及免疫原性研究. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(4): 508-12,519.

(本文编辑:蒋湘莲)