

苍白螺旋体基因亚型研究及其意义

邓 蕾 杨 健 杨文林

苍白螺旋体(*Treponema pallidum*, Tp)是引起梅毒的病原体,几乎可侵犯全身各个组织和器官,导致组织器官损伤,甚至引起感染者死亡。梅毒在许多发展中国家高度流行,在发达国家社会经济地位较低人群中仍为一重要的公共卫生问题。有关研究肯定梅毒是增加人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)传播的危险因素,因而对 Tp 的研究愈加受到重视。

Tp 在体外不易人工培养,对 Tp 致病性的研究主要集中在荚膜、透明质酸酶及黏多糖酶等抗原物质。以前,对 Tp 的研究受分子生物学技术水平的限制,难以进行 Tp 株间区分,妨碍了从分子水平对梅毒流行病学的研究;而今随着分子生物学技术的飞速发展,对 Tp 分子水平的研究获得了快速进展。本文就近年 Tp 基因亚型研究方面的进展做一综述。

Tp 基因亚型

Centurion-Lara 等^[1]报道,密螺旋体亚种(Tp、雅司螺旋体、地方性梅毒密螺旋体)之间可根据其相对分子质量(Mr)为 15×10^3 的脂蛋白基因 5 端单一 *EcoA7* 限制性酶切位点的存在或缺失进行区别。但应用 DNA 杂交技术、蛋白质分析等遗传学方法及单基因(Mr 15×10^3 抗原、4D 抗原)等实验方法一直未能成功进行 Tp 的株间区分,阻碍了对梅毒病原学的研究。Pillay 等^[2]1998 年首先发现临床标本的 Tp 存在 arp (acidic repeat protein) 和 tpr (treponema pallidum repeat) 基因的株间差异,他们用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的方法分离到 63 个 Tp 株,分出了 12 个 arp 亚型,再用限制性内切酶 *Mse* 消化后,又得到 7 个 tpr 亚型,建立了用 arp 基因与 tpr 基因 2 个系统联合对 Tp 进行分子分型的方法。目前已知,arp 基因编码酸性蛋白,长度约 1 000 bp,含 2 ~22 个不等的 60 bp 重复基因序列,以 arp 基因重复序列个数表示该 Tp 株

的 arp 型,共 21 个亚型;tpr 基因包括 A ~L 12 个亚基因,根据氨基酸的同源性分别属于 3 个 tpr 基因亚家族:亚家族 I 包括 tpr C、D、F 和 I,亚家族 II 包括 tpr E、G 和 J,亚家族 III 包括 tpr A、B、H、K 和 L。在 tpr 基因亚家族 I 和亚家族 II 中的各亚基因之间分别具有相同的氨基(N)端和羧基(C)端,其区别在于中央区域基因序列和长度不同;相比之下,tpr 亚家族 III 同源性不高^[3],tpr 基因通过限制性内切酶 *Mse* 消化后呈现限制性片段长度的多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP),根据不同株出现长度不等的限制性内切酶的酶切片段已发现 tpr 基因 A ~L 共 12 个亚型。在不同的 Tp 株内 arp 和 tpr 基因有不同的组合。将 arp 和 tpr 2 种基因型组合为该菌株的基因型,应用上述 2 种基因系统联合对 Tp 进行分型的方法结果稳定、可重复性高、容易操作,而且对 Tp 株有很高的鉴别力。

Tp 基因 arp 和 tpr 亚型的检测

1. 检测方法 Tp 基因亚型的检测方法主要有常规 PCR 和套式 PCR^[4,5]。应用 arp 基因的单一序列片段作为扩增引物,常规 PCR 即可获得 arp 基因的特异性产物。tpr 基因是一个基因族,套式 PCR 可以减少非特异性扩增产物。有报道套式 PCR 比常规 PCR 扩增 arp 基因的检出率更高,其原因可能是常规 PCR 敏感性低以及标本在保存过程中发生 DNA 降解或标本 DNA 含量不足^[4-6]。

2. 标本选择 PCR 检测 Tp 可使用各种临床标本,包括生殖器溃疡和二期梅毒疹渗出物、淋巴结穿刺液、血清(全血)、脑脊液、羊水、组织抽吸物、石蜡包埋组织及眼玻璃体等^[7,8]。目前国内外学者研究 Tp 基因分型所使用的标本一般采用生殖器溃疡、二期梅毒疹渗出物、脑脊液或全血。男性生殖器溃疡渗出物检测 Tp 基因的分型阳性率较高,但由于女性生殖器溃疡隐匿而不易被发现,以及许多梅毒患者就诊时硬下疳已愈合,其研究结果存在一定的局限性。有学者认为 PCR 对 Tp 含量极低、存在 *Taq* 酶抑制因子的血清(全血)或脑脊液等标本的检出敏

感性较低^[9-11]。

Tp 基因分型的应用

1. 梅毒流行病学调查 Tp 的 arp 基因和 tpr 基因联合分型的方法目前主要应用于梅毒的分子流行病学调查, 已有较多学者进行了这方面的研究。Pillay 等^[2] 在美国伯明翰、路易斯、芝加哥等 10 大城市的研究结果显示 Tp 的优势流行株是 14D 亚型, 主要分布于马达加斯加岛; 另有研究发现南非各地区优势流行株亦为 14D 亚型^[4]。而在亚利桑那州、卡罗来纳州和美国北部, 14F 亚型是主要的流行株^[10, 12]。Florindo 等^[13] 首次报道欧洲 Tp 流行株为 14A 亚型。Molepo 等^[9] 发现在南非比勒陀利亚, 14A 亚型是神经梅毒最主要的流行株, 并检出少见的亚型(2I、3E 和 17E), 但未发现同期南非梅毒患者生殖器溃疡标本检出的优势流行株 14D 亚型^[4], 提示神经梅毒是否有其特异的易感株。我国的湖南和广东省也有相类似的研究报告, 显示 14D 亚型为优势流行株^[5, 6], 与国外文献报道一致。观测各地区 Tp 分子亚型分布情况, 可认为流行株相同的地区其传染源可能相同, 或者该菌株毒力和传染性较强。检测梅毒患者体内的 Tp 基因亚型可为临床判断复发与再感染提供依据, 监测各地区 Tp 基因亚型的流行情况有助于梅毒的防治。

2. Tp 基因型与梅毒感染的免疫学关系 Tp 的免疫性比较复杂, 人类对 Tp 无固有免疫力, 感染后产生不完全免疫。在感染早期阶段, 机体产生强烈的免疫反应能杀灭大部分 Tp, 但不能完全将其清除, 有关的免疫机制尚未清楚。Tp 基因测序完成以后, 对其免疫学的研究主要集中在 tpr 基因。有研究认为 tpr 基因族是引起梅毒的主要致病因子, 是宿主体液免疫和细胞免疫的主要靶基因, 这些蛋白可能在梅毒感染的免疫反应和保护性免疫中起着重要作用^[14]。目前这方面研究最多的是 tpr K 基因, 它含有 40 个多肽, 由 478 个氨基酸组成, 可分成保守区(C 区)和变异区(V 区), tpr K 基因有 7 个不连续的 V 区, C 区和 V 区相交错排列。tpr K 基因的种群内和种群间异质性就在于它的 7 个 V 区, 在 Tp 感染和传代过程中 tpr K 基因 V 区序列可发生变化, 并随着传代次数的增加而累积, Nichols 株 Tp 的 tpr K 基因 V 区序列不变, 其他兔传代的 Tp 分离株 tpr K 基因 V 区序列的异质性大小不一^[15, 16]。Centurion-Lara 等^[17] 研究发现造成 V 区异质性的原因可能是表观的碱基改变、插入或缺失。现有研究

显示 tpr K 基因 C 区含有 T 细胞表位, 可刺激机体产生细胞免疫反应; tpr K 基因 V 区存在 B 细胞表位, 可刺激机体产生体液免疫反应。Morgan 等^[18] 在一项研究中发现, 用感染 Tp 兔血清抗体对同种群进行被动免疫, 能延迟和改变 期和 期梅毒损害的进展, 但不能预防感染, 后者可能是 tpr K 基因 V 区的变异性导致。多项研究发现针对某一 Tp 菌株 tpr K 基因 V 区的抗体与异质性 tpr K 基因 V 区交叉反应有限, 使 Tp 逃避机体的免疫杀伤, 导致再感染或慢性持续性感染^[18-21]。新近发现 arp 基因编码的蛋白质具有强烈的免疫原性, 它刺激机体产生的抗体主要针对 arp 的重复序列区域, 这将有助于 Tp 感染的血清学诊断^[22]。

梅毒疫苗的研制

由于梅毒仍是一个重大的公共卫生问题, 开发梅毒疫苗是减轻公共卫生负担的理想方法。迄今还未发现任何能对 Tp 感染提供完全性保护作用且可用于制备梅毒疫苗的抗原成分。tpr K 基因的 C 区和 V 区都可作为免疫原, 但 V 区的变异性使其不能作为梅毒疫苗的成分, 而 C 区在相同 Tp 菌株基因序列具有高度保守性, 作为制备梅毒疫苗的成分有很大的开发潜力。由于 Tp 的 tpr K 基因 V 区的异质性, 使针对 V 区产生的抗体对不同 Tp 分离株的交叉免疫反应有限。机体清除 Tp 感染是体液免疫和细胞免疫共同作用的结果, 而 tpr K 基因的 C 区刺激机体产生细胞免疫, 仅针对 tpr K 基因 C 区的疫苗只能产生部分保护性免疫^[18, 19]。这种疫苗应用于人类, 预期可减轻梅毒螺旋体感染的损伤, 使梅毒更容易治愈, 但不能预防 Tp 感染。

结 语

Tp 株内存在的 2 种基因——arp 基因和 tpr 基因, 可作为 Tp 分子分型的基础。联合这 2 种基因进行 Tp 基因分型的方法对 Tp 菌株有很高的鉴别力, 且具有良好的稳定性、可重复性和易操作性, 为梅毒分子流行病学研究和梅毒防治研究能提供一种有效的手段。根据 tpr K 基因保守性序列研制梅毒疫苗有望取得突破, Tp 基因编码蛋白的免疫原性有较广阔的研究前景。

参 考 文 献

1. Centurion-Lara A, Castro C, Castillo R, et al. The flanking

- region of the 15-kDa lipoprotein gene differentiate pathogenic treponemes. *J Infect Dis*, 1998, 177: 1036 ~ 1040
2. Pillay A, Liu H, Chen CY, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sex Transm Dis*, 1998, 25: 408 ~414
 3. Giacani L, Molini B, Godornes C, et al. Quantitative analysis of *tpr* gene expression in *Treponema pallidum* isolates: differences among isolates and correlation with T-cell responsiveness in experimental syphilis. *Infect Immun*, 2007, 75: 104 ~112
 4. Pillay A, Liu H, Ebrahim S, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 256 ~258
 5. 曾铁兵, 吴移谋, 黄澍杰, 等. 衡阳和江门地区梅毒螺旋体基因分型的初步研究. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37: 692 ~694
 6. 郑和平, 欧志英, 胡玉山, 等. 梅毒螺旋体的巢式 PCR 检测与基因分型. *中华皮肤科杂志*, 2005, 38: 546 ~ 548
 7. Woznicová V, Votava M, Flasarov M. Clinical specimens for PCR detection of syphilis. *Epidemiol Microbiol Immunol*, 2007, 56: 66 ~71
 8. Müller M, Ewert I, Hansmann F, et al. Detection of *Treponema pallidum* in the vitreous by PCR. *Br J Ophthalmol*, 2007; 91: 592 ~595
 9. Molepo J, Pillay A, Weber B, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa. *Sex Transm Infect*, 2007, 83: 189 ~192
 10. Sutton MY, Liu H, Steiner B, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasingly syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis*, 2001, 183: 1601 ~1606
 11. Burstain JM, Grimprel E, Lukehart SA, et al. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1991, 29: 62 ~69
 12. Pope V, Fox K, Liu H, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 3743 ~3746
 13. Florindo C, Reigado V, Gomes JP, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* clinical strains from Lisbon, Portugal. *J Clin Microbiol*, 2008, 46: 3802 ~3803
 14. Giacani L, Hevner K, Centurion-Lara A. Gene organization and transcriptional analysis of the *tprJ*, *tprI*, *tprG*, and *tprF* loci in *Treponema pallidum* strains Nichols and Sea 81-4. *J Bacteriol*, 2005, 187: 6084 ~6093
 15. LaFond RE, Centurion-Lara A, Godornes C, et al. *TprK* sequence diversity accumulates during infection of rabbits with *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Nichols strain. *Infect Immun*, 2006, 74: 1896 ~1906
 16. LaFond RE, Centurion-Lara A, Godornes C, et al. Sequence diversity of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* *tprK* in human syphilis lesions and rabbit-propagated isolates. *J Bacteriol*, 2003, 185: 6262 ~6268
 17. Centurion-Lara A, LaFond RE, Hevner K, et al. Gene conversion: a mechanism for generation of heterogeneity in the *tprK* gene of *Treponema pallidum* during infection. *Mol Microbiol*, 2004, 52: 1579 ~1596
 18. Morgan CA, Molini BJ, Lukehart SA, et al. Segregation of B and T cell epitopes of *Treponema pallidum* repeat protein K to variable and conserved regions during experimental syphilis infection. *J Immunol*, 2002, 169: 952 ~957
 19. Morgan CA, Lukehart SA, van Voorhis WC. Protection against syphilis correlates with specificity of antibodies to the variable regions of *Treponema pallidum* repeat protein K. *Infect Immun*, 2003; 71: 5605 ~5612
 20. Lafond RE, Molini BJ, van Voorhis WC, et al. Antigenic variation of *TprK* V regions abrogates specific antibody binding in syphilis. *Infect Immun*, 2006; 74: 6244 ~6251
 21. Leader BT, Hevner K, Molini BJ, et al. Antibody responses elicited against the *Treponema pallidum* repeat proteins differ during infection with different isolates of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infect Immun*, 2003; 71: 6054 ~6057
 22. Liu H, Rodes B, George R, et al. Molecular characterization and analysis of a gene encoding the acidic repeat protein (Arp) of *Treponema pallidum*. *J Med Microbiol*, 2007, 56: 715 ~721

(收稿日期: 2008-07-31)