

• 临床检验研究论著 •

结核性脑膜炎和肺结核病患者 Th1/Th2/Treg/Th17 的检测*

幸彩梅¹, 廖明凤², 朱秀云², 孟令香², 张明霞²

(1. 广东深圳市福田区中医院 518034; 2. 广东深圳市第三人民医院研究所 518112)

摘要:目的 分析结核病患者外周血 CD4 T 细胞各亚群的特征, 探讨其在结核病发生的作用。方法 应用流式细胞术分析 40 例健康对照(HD)、50 例不同类型的活动性结核病患者(TB)外周血单个核细胞中 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞应答水平。结果 活动性结核病患者外周血 Th1 和 Th17 细胞应答水平显著低于 HD($P < 0.01$; $P < 0.001$), Th2 和 Treg 细胞应答水平则显著高于 HD($P < 0.0001$); 与单纯肺结核病患者(PTB)相比, 结核性脑膜炎患者(TBM)外周血 Th17 应答水平显著降低($P < 0.0001$); 与此同时, Treg 应答水平也显著降低($P < 0.01$); 但两组之间 Th1/Th2 细胞应答水平无显著差别。结论 活动性结核病患者 CD4 T 细胞各亚群水平严重失调; 与 PTB 患者相比, TBM 患者 Th17 细胞受损更明显, 提示 Th17 与结核病的严重程度有关。

关键词: 结核, 脑膜; 结核, 肺; T 细胞亚群

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)14-1784-03

Detection of Th1/Th2/Treg/Th17 cells in patients with tuberculous meningitis and pulmonary tuberculosis*

Xing Caimei¹, Liao Mingfeng², Zhu Xiuyun², Meng Lingxiang², Zhang Mingxia²

(1. Futian Traditional Chinese Hospital, Shenzhen, Guangdong 518034, China;

2. Department of Research Laboratory, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518112, China)

Abstract: **Objective** To investigate the characteristics of CD4 T cell subpopulations response in patients with tuberculosis and its clinical significance in tuberculosis. **Methods** Intracellular staining and flow cytometry analysis were used to evaluate Th1/Th2/Treg/Th17 responses in peripheral blood samples collected from 40 healthy donors (HD) and 50 patients with different manifestations of active tuberculosis (TB). **Results** The percentages of Th1 cells (IFN- γ + CD4+ T cells) and Th17 cells (IL-17+ CD4+ T cells) were significantly lower in patients with active TB than that in HD ($P < 0.01$; $P < 0.001$). On the contrast, the percentages of Th2 cells (IL-4+ CD4+ T cells) and Treg cells (FoxP3+ CD4+ T cells) were significantly higher in patients with active TB than that in HD ($P < 0.0001$). Compared to patients with pulmonary tuberculosis (PTB), the patients with tuberculous meningitis (TBM) processed significantly lower Th17 response ($P < 0.0001$). Similarly, the percentages of Treg were significantly lower in TBM group than those in PTB group ($P < 0.01$). However, the difference of Th1 and Th2 responses between the two groups was not significant. **Conclusion** The imbalance of CD4 T cells may play an important role in TB. The suppressed Th17 response is associated with the severity of tuberculosis.

Key words: tuberculosis, meningeal; tuberculosis, pulmonary; T-cell subsets

结核菌感染诱导产生的免疫以 CD4T 细胞为主, 其在清除体内结核菌过程中起着重要的作用。CD4T 细胞按其功能和分化途径分为 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞。以往的抗结核免疫研究多侧重于 CD4 T 细胞单个亚群, 同时检测 Th1、Th2、Treg 和 Th17 在活动性结核病中的临床意义以及与疾病严重程度的关系尚未见报道, 本研究通过检测结核病患者外周血 CD4T 细胞各亚群的水平, 并比较其与疾病严重程度的关系, 探讨 Th17 和其他亚群在抗结核免疫中的作用。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料 40 例健康对照(HD)来源于深圳市福田区中医院及第三人民医院体检科, 常规体检无异常, 既往无结核病史、无任何临床症状, 经胸部放射学确定无异常, 应用结核特异性 IFN- γ ELISPOT 技术^[1]排除了结核潜伏感染者, 其中男 23 例, 女 17 例, 平均年龄(29.64 ± 7.80)岁。50 例不同类型的活动性结核患者(TB)来源于深圳第三人民医院结核病区住院患者, 其中 36 例诊断为单纯肺结核病患者(PTB), 男 28 例, 女 8

例, 平均年龄(35.97 ± 14.82)岁; 14 例为结核性脑膜炎患者(TBM), 男 8 例, 女 6 例, 平均年龄(32.07 ± 10.29)岁。所有患者抗结核治疗时间在 2 周内。所有受试者都签署了知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 刺激物佛波酯 propylene glycol monomethyl ether acetate(PMA), 离子霉素(Ionomycin), 蛋白转运抑制剂 Brefeldin A, 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。单克隆抗体 CD3-APC(SK7)、CD8-PerCP(SK1)、IFN- γ -PE(25723.11), IL-4-PE(3010.211)和 Foxp3-PE(259D/C7), 均购自美国 BD Biosciences 公司, 单克隆抗体 IL-17-PE 和 IL-17-FITC (BL168)购自美国 Biolegend 公司。FACS Lysing Solution 溶血素, FACS Permeabilizing Solution 破膜剂, 购自 BD Biosciences 公司; Foxp3 Staining Buffer Set (固定破膜剂), 购自 eBioscience 公司。主要仪器: CO₂ 培养箱 (Forma)、Beckman 离心机和 BD Canto 流式细胞仪。

1.3 实验方法 采集肝素锂抗凝的静脉血 2 mL, 2 h 内取全血刺激。全血 250 μ L 与 750 μ L 含 10% 胎牛血清 1640 培养基

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81172732, 81171535)。 作者简介: 幸彩梅, 女, 主要从事临床医学检验研究。

充分混匀,1 毫升培养体系中加入刺激物 PMA、ionomycin 终浓度分别为 50 ng/mL 和 1 μ g/mL,震荡混匀后于 CO₂ 培养箱,37 $^{\circ}$ C 孵育。1 h 后,在培养体系中加入阻断因子 Brefeldin A(终浓度 10 μ g/mL),继续 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 h。全血 CD3/CD8 表面染色后,溶血,破膜,再加入抗人 INF- γ 、IL-4、Foxp3 和 IL-17 抗体进行胞内染色,流式细胞仪上机检测,用 CD3+CD8 一细胞设门分析各种细胞因子表达情况(由于 PMA 刺激后会导致 CD4 分子下调,实验中采用 CD3+CD8 一细胞反圈门方法反映 CD4 T 细胞各亚群的情况),收集细胞用 FACSDiva 软件进行分析处理。

1.4 统计学处理 采用 Graph Pad Prism(4.02)进行统计分析,非配对 *t* 检验比较健康者和结核病患者各种 CD4 T 细胞水平及其在肺结核和结核性脑膜炎患者之间的差异。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TB 患者外周血 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞应答水平 检测 HD 和 TB 两组人群非特异性刺激情况下 CD4T 细胞各亚群发现,TB 患者 Th1(CD4+INF- γ +)和 Th17(CD4+IL-17+)应答水平均明显低于 HD(*P*<0.01;*P*<0.001);TB 患者 Th2(CD4+IL-4+)和 Treg(CD4+Foxp3+)细胞应答水平则明显高于 HD,结果见表 1。流式检测结果见图 1。

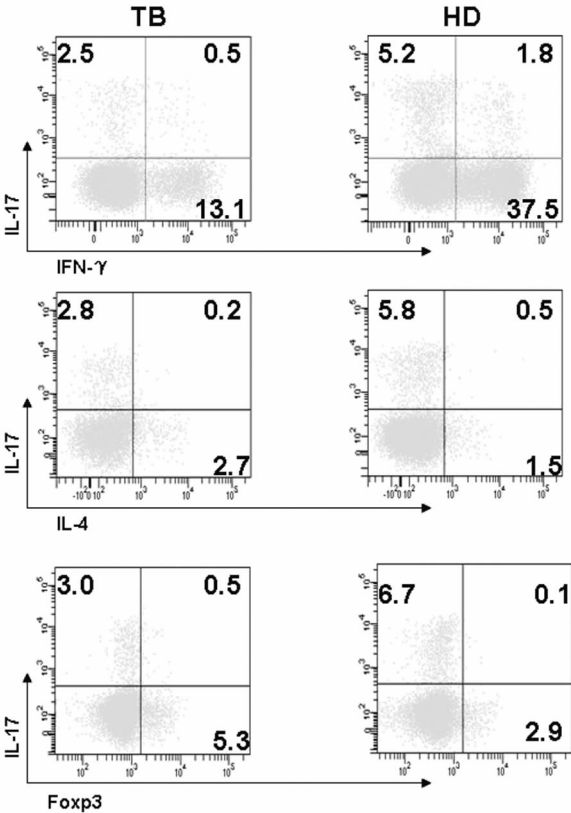


图 1 HD 和 TB 患者外周血 CD4 T 细胞各亚群的流式检测图

2.2 PTB 和 TBM 患者外周血 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞应答水平 和 PTB 患者相比,TBM 患者 Treg 和 Th17 细胞应答水平均明显降低(*P*<0.01;*P*<0.0001);但 Th1 和 Th2 细胞应答水平两组间比较无差异,结果见表 2。

表 2 PTB 和 TBM 患者外周血 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞应答水平($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Th1	Th2	Treg	Th17
PTB	36	28.76 $\pm$ 1.88	1.81 $\pm$ 0.14	5.94 $\pm$ 0.40	3.89 $\pm$ 0.22
TBM	14	29.89 $\pm$ 4.13	1.26 $\pm$ 0.27	4.09 $\pm$ 0.36	2.01 $\pm$ 0.13
<i>t</i> 值		0.287	1.926	2.717	3.832
<i>P</i> 值		0.775	0.06	0.009	<0.0001

3 讨 论

CD4 T 细胞在抗结核免疫反应中起重要作用,有研究表明,结核菌感染可诱导机体分泌 Th1 型细胞因子如 IFN- γ 和 TNF- α 起免疫保护作用,同时产生 IL-4 和 IL-10 等 Th2 型细胞因子可导致结核病的发生,如果感染使机体的 Th1/Th2 细胞平衡受到破坏,Th2 细胞免疫应答过强,将会增加发生结核病的机会而且还与病情的严重程度有关^[2-3]。此外,结核菌感染还可以诱导 Treg 细胞应答,增多的 Treg 通过抑制 Th1 细胞免疫,削弱了后者对体内结核菌的清除,从而在结核病的发生中起着重要作用^[4-6]。Th17 是一群有别于 Th1/Th2/Treg 的 CD4 T 细胞,它表达特异性的转录因子 ROR γ t,分泌 IL-17,参与促炎反应,并可以调节 Th1/Th2 细胞因子功能^[7],Th17 细胞不仅与自身免疫性疾病有关^[8],而且在抗胞内菌感染方面有着重要的保护作用^[9],并参与结核保护性免疫,在加速结核菌二次应答及其结核菌的清除中起重要作用^[10-11]。目前,随着人们对 CD4 T 细胞各亚群的进一步的认识,发现机体的抗结核菌免疫是一个极其复杂的过程,各亚群之间相互作用,但具体机制还不十分清楚。

本研究通过检测胞内 IFN- γ 、IL-17、Foxp3 和 IL-17 分别代表机体的 Th1、Th1、Treg 和 Th17 细胞水平,结果发现活动性结核病患者 Th1 细胞应答水平显著低于 HD(*P*<0.01),Th17 细胞也明显受到抑制(*P*<0.001);而患者的 Th2 和 Treg 细胞应答水平均显著高于 HD(*P*<0.000 1)。说明结核病的发生,不是单纯的 Th1/Th2 失衡导致,也不是单一的 Treg 细胞过多产生的免疫抑制所致,而是 Th1/Th2/Th17/Treg 各细胞亚群共同调节失衡的结果。由于结核病的病情复杂,严重程度不一,我们认为不同类型的结核病患者 CD4 T 细胞各亚群免疫反应也应有所差异。为此,本文又比较了 PTB 和 TBM 患者 CD4 T 细胞各亚群的变化,发现 TBM 患者 Th17 细胞频率比 PTB 患者显著降低(*P*<0.000 1),Treg 细胞应答水平也低于 PTB(*P*<0.01),而 Th1 和 Th2 细胞在两组中没有明显差异。以往有研究报道 TBM 患者存在明显的 CD4 T 细胞数量和功能低下的现象^[12],但没能说明具体受损的细胞亚群,本文通过对 TBM 患者 CD4 T 细胞各亚群的比较,认为主要是 Th17 细胞受损严重,进一步证实了 Th17 细胞与抗结核菌免疫反应有关^[11],并推测 TBM 患者由于 Th17 过低,结核菌的清除受阻,导致病情严重,预后不良,说明 Th17 细胞在结核病保护性免疫反应中起重要作用,并能反映疾病的严重程度,然而起免疫抑制作用的 Treg 在 TBM 患者中亦是降低的,可能与机体的免疫功能整体受损有关,具体原因待进一步探讨。

综上所述,活动性结核病患者 Th1/Th17 反应明显受抑

表 1 HD 和 TB 患者外周血 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞应答水平($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Th1	Th2	Treg	Th17
HD	40	37.10 $\pm$ 2.05	0.96 $\pm$ 0.09	3.38 $\pm$ 0.20	4.56 $\pm$ 0.24
TB	50	29.08 $\pm$ 1.76	1.66 $\pm$ 0.13	5.42 $\pm$ 0.32	3.36 $\pm$ 0.20
<i>t</i>		2.986	4.255	5.037	3.832
<i>P</i>		=0.003 7	<0.000 1	<0.000 1	=0.000 2

制, Th2/Treg 细胞应答水平升高, 说明揭示结核病的免疫学发病机理不能仅从单一的细胞亚型(如 Th1)免疫应答情况来阐述而忽略免疫应答整体的相互影响, 在重视传统的 Th1/Th2 应答的同时, 更多的考虑 Treg/Th17 细胞的作用。本研究发 现 TBM 患者 Th17 反应更低, 说明 Th17 细胞不仅在活动性结 核病保护性免疫中发挥重要作用, 而且与病情的严重程度有一 定关系, 提示 Th17 细胞可以作为病情和预后评估的参考 指标。

参考文献

[1] Chen X, Yang Q, Zhang M, Graner M, et al. Diagnosis of active tuberculosis in China using an in-house gamma interferon enzyme-linked immunospot assay[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(6): 879-884.

[2] Sacco R, Hagen M, Sandor M, Weinstock JV, et al. . Established T (H1) granulomatous responses induced by active Mycobacterium avium infection switch to T(H2) following challenge with Schistosoma mansoni. [J]. Clin Immunol, 2002, 104(3): 274-281.

[3] Ordway DJ, Costa L, Martins M, et al. Increased Interleukin-4 production by CD8 and gammadelta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2004, 190(4): 756-766.

[4] Chen X, Zhou B, Li M, et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease[J]. Clin Immunol, 2007, 123(1): 50-59.

[5] Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, et al. Expansion

and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis[J]. J Exp Med, 2007, 204(9): 2159-2169.

[6] Kursar M, Koch M, Mittrücker HW, et al. Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis[J]. J Immunol, 2007, 178(5): 2661-2665.

[7] Dong C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. Microbes Infect[J], 2009, 11(5): 584-588.

[8] Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis[J]. J Clin Invest, 1999, 103(9): 1345-1352.

[9] Pitta MG, Romano A, Cabantous S, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani[J]. J Clin Invest, 2009, 119(8): 2379-2387.

[10] Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, et al. Early Secreted Antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis Promotes Protective T Helper 17 Cell Responses in a Toll-Like Receptor-2-dependent Manner[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(11): e1002378.

[11] Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge[J]. Nat Immunol, 2007, 8(4): 369-377.

[12] Nadvi SS, Nathoo N, Annamalai K, et al. Role of cerebrospinal fluid shunting for human immunodeficiency virus-positive patients with tuberculous meningitis and hydrocephalus[J]. Neurosurgery, 2000, 47(3): 644-650.

(收稿日期: 2012-11-08)

(上接第 1783 页)

蛋白水平表达均增高, 且与患者的血小板计数呈负相关, 进一步支持了 ITP 发病机制的“分子模拟”学说。我们推测, ITP 患者 PBMC 中穿孔素表达增高可能是由病原体感染引起的。

穿孔素不仅具有直接的免疫杀伤作用, 同时还有免疫调节作用, 通过调节其他免疫细胞而间接参与了感染免疫的应答过程。比如最近的一项研究就发现了穿孔素可以调节抗原特异性辅助性 T 淋巴细胞的功能以及抗体的产生^[6]。本研究发 现穿孔素与炎症因子 TNF-α 和 IFN-γ 呈正相关, 提示穿孔素对这两个炎症因子的表达可能具有调节作用。本研究与以往的研究^[7-8]一样, 均发现了 ITP 患者 TNF-α 水平增高。TNF-α 是固有免疫应答过程中产生的一类极为重要的炎症因子, 具有促进吞噬细胞活性的功能, 其可能通过增强单核巨噬细胞系统对自身抗体致敏的血小板的吞噬作用而参与了 ITP 的发病机制。

目前已知, 外周血 Th1/Th2 失衡是 ITP 的主要特征之一。Th1 细胞的主要效应因子是 IFN-γ, 而 Th2 细胞主要的效应因子则是 IL-4 和 IL-10。本研究发 现穿孔素与 IFN-γ 呈正相关, 与 IL-4 和 IL-10 无关, 提示穿孔素可能与 Th1 反应亢进有关。

总之, 本研究发现了 ITP 患者 PBMC 中穿孔素的表达明显增高, 且与血小板计数、TNF-α、IFN-γ 相关, 提示穿孔素参与了 ITP 的发病机制, 值得进一步研究。

参考文献

[1] Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET. The ITP

syndrome: pathogenic and clinical diversity[J]. Blood, 2009, 113: 6511-6521.

[2] Semple JW, Provan D, Garvey MB, Freedman J. Recent progress in understanding the pathogenesis of immune thrombocytopenia [J]. Curr Opin Hematol, 2010, 17: 590-595.

[3] Peng SL, Moslehi J, Robert ME, Craft J. Perforin protects against autoimmunity in lupus-prone mice[J]. J Immunol, 1998, 160: 652-660.

[4] Cappellano G, Orilieri E, Comi C, Chiocchetti A, Bocca S, Boggio E, et al. Variations of the perforin gene in patients with multiple sclerosis[J]. Genes Immun, 2008, 9: 438-444.

[5] 侯明. 成人特发性血小板减少性紫癜诊断治疗专家共识[J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(5): 647-648.

[6] Bi E, Huang C, Hu Y, Wu X, Deng W, Lin G, et al. Novel function of perforin in negatively regulating CD4(+) T cell activation by affecting calcium signaling[J]. Cell Res, 2009, 19: 816-827.

[7] 李守玮, 李霞. ITP 患者血清 IL-2, 4, 6, 10 及 TNF-α, IFN-γ 测定的临床意义分析[J]. 检验医学, 2012, 27(3): 595-597.

[8] 韩志君, 胡志德, 邓安梅, 等. 慢性血小板减少性紫癜患者 microRNA-146a 的表达及其意义[J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 2011, 31(6): 81-84.

(收稿日期: 2013-01-15)