

• 临床检验研究论著 •

结核感染者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞亚群的检测及其意义

刘才冬, 张瑞生, 高应东, 金玲, 万芳, 夏永祥[△]

(南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院检验科, 江苏南京 210006)

摘要:目的 探讨结核感染者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞亚群的检测及其临床意义。方法 采用结核感染 T 淋巴细胞斑点试验(T-SPOT, TB)技术筛选结核患者与非结核患者各 40 例。采用流式细胞术检测其体内 T 淋巴细胞亚群,即调节性 T 淋巴细胞(Treg)与辅助性 T 淋巴细胞(TH)。结果 结核组患者 Treg 细胞百分比明显高于对照组,TH1 细胞百分比及 TH1/TH2 比值明显低于对照组($P < 0.05$)。两组 TH1 细胞百分比的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 结核感染者外周血 Treg 细胞数量上升,TH1 细胞数量及 TH1/TH2 比例下降,机体免疫力的下降可能是结核感染的重要原因之一。

关键词:结核,肺; T 淋巴细胞; 流式细胞术; 斑点试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3174-02

Detection of CD4⁺T lymphocyte subsets in peripheral blood of people infected with tuberculosis and its significance

Liu Caidong, Zhang Ruisheng, Gao Yingdong, Jin Ling, Wan Fang, Xia Yongxiang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University/the First Hospital of Nanjing, Nanjing, Jiangsu 210006, China)

Abstract: **Objective** To explore the detection of CD4⁺T lymphocyte subsets in peripheral blood of people infected with tuberculosis(TB) and its significance. **Methods** TB-infected T lymphocyte spot test(T-SPOT, TB) was employed to screen for patients with TB and with non-TB, each of 40 cases. Flow cytometry was adopted to detect their T lymphocyte subsets, regulatory T lymphocyte(Treg) and helper T lymphocytes(TH) in peripheral blood. **Results** The percentage of Treg cells of patients in TB group was significantly higher than that in control group. The percentage of TH1 cells and the ratio of TH1/TH2 were markedly lower than those in control group($P < 0.05$). The percentage of TH1 cells in the two groups showed no statistical significance($P > 0.05$). **Conclusion** The amount of Treg cells in peripheral blood of people infected with TB increases, while the amount of their TH1 cells and TH1/TH2 ratio decrease which indicates that the decreasing body immunity may be one of an important cause of TB infection.

Key words: tuberculosis, pulmonary; T-lymphocytes; flow cytometry; spot test

结核病是一种严重危害人类健康的慢性传染病,其发生、发展与多种因素有关,其中机体的免疫应答能力起着重要作用^[1]。结核病的机体免疫以 CD4⁺T 淋巴细胞介导的细胞免疫为主^[2],初始 CD4⁺T 淋巴细胞接受抗原刺激后首先分化为 TH0 细胞,其又分化为不同的 TH 细胞亚群,即 TH1、TH2、TH3 和 TH17 细胞等^[3]。TH1、TH2、Treg 细胞及其细胞因子在结核病的发生、发展过程中均起了重要作用。本研究通过用结核感染 T 淋巴细胞斑点试验(T-SPOT, TB)检测技术对结核病患者进行筛选,再用流式细胞术分析外周血中 TH1、TH2、Treg 亚群的变化情况,以评估结核病患者机体整体的免疫能力和免疫平衡,为结核的临床治疗提供试验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 1~6 月于南京市第一医院就诊的肺结核病患者 40 例,将其作为结核组,其中,男 20 例,女 20 例;平均年龄 45.30 岁,结核病诊断符合中华医学会结核病分会《结核病诊断和治疗指南》。另收集同期 40 例本院的体检健康者作为对照组,其中,男 20 例,女 20 例;平均年龄 42.40 岁,与结核病患者匹配。

1.2 主要试剂和仪器 主要试剂:T-SPOT, TB 检测试剂盒^[4]购自英国 Oxford Immunotec 公司;CD25-藻红蛋白(PE)、CD4-异硫氰酸荧光素(FITC)、干扰素 γ (IFN- γ)-FITC、白细胞介素-4(IL-4)-PE、CD3-PC5、CD8-PC7 抗体购自美国 Beckman 公司;抗人 FoxP3-APC 和破膜固定剂 Fixation/Permeabilization Diluent 购自美国 eBioscience 公司;刺激剂佛波醇酯(PMA)、离子霉素(ionomycin)和莫能菌素(monensin)均购自

德国默克公司;胎牛血清、RPMI 1640 培养液、AIM V 完全培养基购自美国 Gibco 公司;人外周血淋巴细胞分离液(Ficoll)购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。主要仪器:FACS Canto II 流式细胞仪为美国 BD 公司产品;生物安全柜、CO2 细胞培养箱为美国 Thermo 公司产品。

1.3 外周血单个核细胞(PBMC)的分离、收集 抽取健康人以及结核病患者空腹静脉血 5 mL,肝素抗凝,用等体积的 RPMI 1640 培养液稀释后,按 Ficoll 分离液说明书操作,进行 PBMC 分离,1 200×g 离心 20 min,吸取中间层 PBMC,加入 5 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤 2 次,300×g 离心 7 min,用 AIM V 完全培养基悬浮后计数,调整细胞浓度为 2.5×10^6 个/mL。

1.4 T-SPOT, TB 法检测^[5] 用体外酶联免疫吸附测定(ELISA)检测分泌 IFN- γ 的 T 淋巴细胞,实验分为 4 组,每份血清分别设阴性对照组(50 μ L 培养基)、阳性对照组(植物血凝素)、检测 A 组[6 kDa 早期分泌性抗原靶(ESAT6)]和检测 B 组[培养滤液蛋白 10(CFP10)]。按照 T-SPOT, TB 检测试剂盒说明书操作。

1.5 结果判定 当阴性对照斑点数为 0~5 个,以检测孔与阴性对照孔斑点数之差不低于 6 个,判定为阳性;当阴性对照斑点数不低于 6 个,以检测孔斑点数不低于阴性对照孔斑点数的 2 倍,判定为阳性。

1.6 流式细胞术 将分离到的 PBMC 用含 25 ng/mL PMA, 1 μ g/mL 离子霉素、2 mmol/L 莫能菌素和 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养 5 h,收集细胞,洗涤、固定、破膜。用 CD3-PerCP-cy5.5 和 CD8a-PE-cy7 双抗体标记 CD8⁺T 淋巴细

胞,用 CD3-PerCP-cy5.5 和 CD4-PE 双抗体标记 CD4⁺ T 淋巴细胞。再从 CD4⁺ 细胞中用抗人 Foxp3-APC 抗体分选出 CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞,即 Treg 细胞;从 CD8⁺ 细胞中用 IFN- γ -FITC 抗体分选出 IFN- γ ⁺ 细胞,即 TH1 细胞(CD3⁺ CD8a-IFN- γ ⁺),用 IL-4-PE 抗体分选出 IL-4⁺ 细胞,即 TH2 细胞(CD3⁺ CD8a-IL-4⁺)^[6]。加入抗体后,室温、避光静置 30 min,用 PBS 洗涤 2 次,400 μ L 1%多聚甲醛固定,上流式细胞仪检测。结果用 CellQuest 软件进行分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料用率表示,率的比较采用 χ^2 检验,组间比较采用 t 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 T-SPOT. TB 检测结果 在选入本项研究 T-SPOT. TB 检测阳性的 40 例患者中,后期被确诊的阳性例数为 37 例,阳性符合率为 92.5%;T-SPOT. TB 筛选 40 例健康人中,2 例阴性,阴性符合率为 95%。

2.2 流式细胞仪检测结果 结核组患者 Treg、TH1、TH2 细胞百分比及 TH1/TH2 比值与对照组的差异见表 1。结核组患者 Treg 细胞百分比明显高于对照组,TH1 细胞百分比及 TH1/TH2 比值明显低于对照组($P<0.05$)。二者 TH1 细胞百分比差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 结核患者及健康人淋巴细胞亚群结果分析($\bar{x}\pm s$)

组别	Treg(%)	TH1(%)	TH2(%)	TH1/TH2
结核组	2.68 \pm 0.83	5.69 \pm 1.12	1.31 \pm 0.60	4.23 \pm 0.19
对照组	0.43 \pm 0.39	8.34 \pm 1.65	1.43 \pm 0.38	5.785 \pm 0.22
t	0.043	0.047	0.641	0.039
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨 论

T-SPOT. TB 检测法是目前临床上最为便捷、准确的检测结核的方法。其特异性强、灵敏度高,目前已经成为发达国家的临床结核检测的常规项目。在 2011 年被批准进入了中国的《医疗机构临床检验项目目录》。这种方法比传统的痰培养(检出率低,不适用于肺外结核)、结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)试验(特异性差)、基因扩增法和血清学(敏感性低,操作复杂等)具有显著的临床运用优点。T-SPOT. TB 检测的是每 25 万个淋巴细胞中分泌 IFN- γ 的特异性结核效应 T 淋巴细胞的数量,而 ELISA 定量检测是指每毫升全血中 IFN- γ 的整体含量,因为每次采血,每毫升血液中的淋巴细胞数量都是有差异的,但 T-SPOT. TB 检测是否与受试者的免疫力状况有关,还需进一步临床研究与验证。

Treg 细胞可下调机体免疫功能,所以其数目增多可以视为免疫系统受到抑制的指征之一^[7-8]。目前,T-SPOT. TB 法已作为结核的辅助诊断在临床上得到了广泛运用。本实验研究证实,该方法准确、可靠,阳性符合率 92.5%、阴性符合率 95.0%。经 T-SPOT. TB 法检测的结核阳性患者,其 Treg 值较阴性实验参与者明显上升($P<0.05$),说明结核患者的机体免疫力相对下降,而且在结核感染中发挥免疫作用的 Th1 细胞水平下降。本实验说明,机体免疫力下降(Treg 细胞增多和 Th1 减少),导致机体对结核杆菌易感,从而引发结核病的发生。

Th1/Th2 细胞在体内的平衡共同维护着机体抵御感染的

免疫机能。Th1 细胞可产生 IL-2 等细胞因子,促进其自身、Th2 细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和自然杀伤细胞(NK)等的活化和增值,从而放大免疫效应^[9-10]。可以认为,Th1 细胞的高表达是免疫系统处于强势地位的表现,Th1 细胞的低表达则说明免疫系统正在或已经被削弱。Th2 细胞的作用则是辅助体液免疫应答和参与超敏反应性炎症,主要通过产生 IL-4 等细胞因子,协助和促进 B 淋巴细胞的增值和分化,以及激活肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞,从而介导免疫反应^[11-12]。本实验发现,经 T-SPOT. TB 法检测的结核阳性患者的 Th1/Th2 细胞平衡被打破,其 Th1 细胞较阴性实验参与者明显下降,说明其免疫系统受到破坏。但是 Th2 细胞水平无显著变化,提示 Th2 在结核病免疫中的调节作用可能不强。Th1/Th2 比例的变化是结核患者免疫系统变化的重要指标^[13-14],随着研究的深入,结核病的免疫学研究与治疗将会有新的突破。

参考文献

[1] 李奇凤,袁俐. 结核病与 Th1/Th2 细胞亚群研究进展[J]. 中国防痨杂志,2007,29(3):264-267.

[2] Winslow GM,Cooper A,Reiley W,et al. Early T-cell responses in tuberculosis immunity[J]. Immunol Rev,2008,225:284-299.

[3] Ma CS,Deenick EK,Batten M,et al. The origins,function,and regulation of T follicular helper cells[J]. J Exp Med,2012,209(7):1241-1253.

[4] Soysal A,Bakir M. T-SPOT. TB assay usage in adults and children[J]. Expert Rev Mol Diagn,2011,11(6):643-660.

[5] 张斌,伦文辉,成军,等. 结核分枝杆菌抗原 ESAT-6 和 CFP-10 及 rCFP10-ESAT6 融合基因在大肠埃希菌中的表达及比较[J]. 中华实验和临床感染病杂志,2008,2(1):33-43.

[6] 陶国华,曹兴建. 流式细胞术检测 TH1/TH2 的方法探讨[J]. 临床检验杂志,2006,24(2):116-117.

[7] Zhang M,Lin Y,Iyer DV,et al. T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun,1995,63(8):3231-3234.

[8] Turka LA,Walsh PT. IL-2 signaling and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. Front Biosci,2008,13:1440-1446.

[9] 崔言刚,王英年,张克佳. 辅助性 T 细胞亚群(Th1/Th2)失调与结核病[J]. 中国防痨杂志,2000,22(1):47-50.

[10] Urdahl KB,Shafiani S,Ernst JD. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis[J]. Mucosal Immunol,2011,4(3):288-293.

[11] 陈松林,林英辉,黄小琪,等. 调节性 T 细胞及 Th17 细胞在结核性胸膜炎中的表达及其意义[J]. 广西医科大学学报,2011,28(3):388-391.

[12] Bai X,Wilson SE,Chmura K,et al. Morphometric analysis of Th (1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb),2004,84(6):375-385.

[13] Theus SA,Cave MD,Eisenach KD. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of Mycobacterium tuberculosis strains with different transmission dynamics[J]. J Infect Dis,2005,191(3):453-460.

[14] Oh MD,Kang CI,Kim US,et al. Cytokine responses induced by Mycobacterium tuberculosis in patients with HIV-1 infection and tuberculosis[J]. Int J Infect Dis,2005,9(2):110-116.