

• 临床检验研究论著 •

结核病患者治疗过程中外周血 B 细胞及其亚群的变化^{*}

李美忠¹, 张影¹, 许颖琪², 张洁云¹, 张明霞¹, 陈心春¹, 邓群益^{2△}

(深圳市第三人民医院:1. 研究所;2. 结核科, 广东深圳 518112)

摘要:目的 在比较健康人、结核潜伏感染者、活动性肺结核患者 B 细胞及亚群变化的基础上了解活动性肺结核患者治疗过程中 B 细胞百分比及 B 细胞亚群的分布情况。**方法** 根据 B 细胞表面 CD19/CD5/CD1d 标识将 B 细胞分为四群。利用流式细胞术比较活动性肺结核患者治疗前、治疗 3 个月、治疗 6 个月、治疗 9 个月时外周血 B 细胞百分比及 B 细胞分群表达的差异。**结果** 结核患者治疗 6 个月时外周血 B 细胞较治疗 3 个月时有所增加($P < 0.01$)。结核患者治疗 3 个月时外周血中 CD19⁺CD5⁻CD1d⁺ 和 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ B 细胞百分比最高, 并随治疗时间的延长而逐渐下降($P < 0.01$)。结核患者治疗 3 个月时 CD19⁺CD5⁻CD1d⁻ B 细胞百分比治疗前下降($P < 0.01$), 但随治疗时间的延长而逐渐上升($P < 0.01$)。结核患者外周血 CD19⁺CD5⁺CD1d⁻ B 细胞百分比在治疗后逐渐上升, 结果有统计学差异($P < 0.01$)。**结论** 肺结核患者外周血中紊乱的 B 细胞亚群在治疗过程中, 逐渐恢复正常, 提示 B 细胞亚群在结核的发病中起重要作用。

关键词: 结核; B 淋巴细胞; 细胞亚群

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)12-1552-03

Analysis of B cells and B cell subsets in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis in treatment process^{*}

Li Meizhong¹, Zhang Ying¹, Xu Yingqi², Zhang Jieyun¹, Zhang Mingxia¹, Chen Xinchun¹, Deng Qunyi^{2△}

(1. Department of Research Laboratory; 2. Department of Tuberculosis, the Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518112, China)

Abstract: **Objective** To explore the dynamic variation of B cell subsets in the patients with tuberculosis (TB). **Methods** According to expression of CD19/CD5/CD1d on the surface of cells, B cells were divided into four groups. B cell subsets in peripheral blood of TB patients at different stages were analyzed by using flow cytometry. **Results** The frequency of B cells in TB patients after treatment of 6 months was higher than treatment of 3 months ($P < 0.01$). Proportion of CD19⁺CD5⁻CD1d⁺ B cells in TB patients after treatment of 3 months was the highest, but gradually declined after treatment of 6 months and 9 months ($P < 0.01$). Proportion of CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ B cells in TB patients after treatment of 3 months was the highest, but gradually declined after treatment of 6 months and 9 months ($P < 0.01$). Proportion of CD19⁺CD5⁻CD1d⁻ B cells in TB patients after treatment of 3 months was lower than before treatment ($P < 0.01$), but gradually increased after treatment of 6 months and 9 months ($P < 0.01$). Proportion of CD19⁺CD5⁺CD1d⁻ B cells gradually increased after treatment ($P < 0.01$). **Conclusion** B cell subsets might be confused in peripheral blood of TB patients, but could gradually returned to normal level after treatment. B cell subsets might play an important role in morbidity of TB.

Key words: tuberculosis; B cells; subsets

传统观念认为结核保护性免疫主要是 T 细胞介导的细胞免疫发挥作用, 而 B 细胞及其产生的体液免疫在结核病的发生和发展中的意义不大。近年来, 随着免疫学的发展, 新的细胞亚群的不断发现, B 细胞在结核中的研究越来越受到重视, B 细胞不仅是结核结节中数量最多的细胞, 而且其在参与结核的保护性免疫中也发挥重要作用^[1-2]。目前, 通过对 B 细胞的研究发现, 与 T 细胞类似, 外周血 B 细胞库也是由多个不同功能的异质细胞亚群组成。在小鼠体内根据部位和功能不同, 将 B 细胞分为 B1、B2 细胞, 以及分泌白细胞介素(IL)-10 具有免疫调节作用的调节性 B 细胞(Breg), 亦称为 B10 细胞^[3]。但对人 B 细胞亚群的研究没有小鼠透彻, 有研究者检测 B 细胞表面的标志将外周血 B 细胞分为非成熟 B 细胞、幼稚 B 细胞、记忆性

B 细胞、浆细胞四群^[4], 而有关人的 Breg 细胞的界定还没有统一的意见^[5-6]。本研究应用流式细胞术根据 B 细胞表面 CD19/CD5/CD1d 标识, 将 B 细胞分为四群细胞, 并比较了这四群细胞在健康人、结核潜伏感染者和结核患者外周血中的变化, 发现结核患者外周血四群 B 细胞存在异常现象^[7], 在此基础上继续观察了活动性肺结核患者治疗过程中 B 细胞分群的变化, 并对其可能的机制进行了探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 40 例活动性肺结核(TB)患者, 男 25 例, 女 15 例, 平均 34.5 岁(16~59 岁); 所有 TB 患者均经临床症状、体征、痰抗酸杆菌涂片、痰结核菌培养、X 线胸片、抗结核治疗确定, 结核杆菌基因分型为结核分枝杆菌。研究对象均排除

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81241065); 深圳市科技计划项目(20120264)。 作者简介: 李美忠, 男, 副主任技师, 主要从事传染病免疫学发病机制的研究。 △ 通讯作者, E-mail: dengqunyi@hotmail.com。

HBV、HCV、HIV 感染及糖尿病、高血压、肾炎、自身免疫性疾病等其他慢性疾病。所有研究对象均采集治疗前、治疗 3 个月、治疗 6 个月、治疗 9 个月时的肝素锂抗凝静脉血 5 mL。具体程序经深圳第三人民医院伦理委员会批准通过,患者及志愿者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 BD Canto 流式细胞仪及试验所用单克隆抗体均购自 BD 公司。

1.3 方法 采集 40 例 TB 患者治疗前、治疗 3 个月、治疗 6 个月、治疗 9 个月时的外周静脉血 5 mL,使用 Ficoll 经密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC) 2×10^5 个细胞,加入抗人 CD3-FITC、CD19-APC-Cy7、CD5-PE-Cy5、CD1d-PE 抗体进行细胞表面染色。具体操作均参照试剂说明书执行。采用流式细胞仪进行染色结果分析。在淋巴细胞设门分析 CD3⁺、CD19⁺ 细胞表达情况,然后在 CD3⁺CD19⁺ 细胞设门分析 CD5⁺CD1d⁺、CD5⁺CD1d⁻、CD5⁻CD1d⁻、CD5⁻CD1d⁺ 四群细胞表达情况。以上使用流式抗体试验均同时采用各种抗体的同型对照进行阳性背景染色的界定。具体操作均参照试剂说明书执行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析计算各组间的差异,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 建立稳定的 B 细胞分群技术 采用流式细胞术根据 B 细胞 CD19/CD5/CD1d 标识将 B 细胞分为 CD19⁺CD5⁻CD1d⁺、CD19⁺CD5⁺CD1d⁺、CD19⁺CD5⁻CD1d⁻、CD19⁺CD5⁺CD1d⁻ 四群细胞。结果见图 1。

2.2 TB 患者外周血 B 细胞及其亚群的变化 比较 TB 患者治疗前、治疗 3 个月、治疗 6 个月、治疗 9 个月外周血 B 细胞(CD19⁺CD3⁺)百分比,发现治疗 6 个月时患者的 B 细胞百分比治疗 3 个月时升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。在治疗 3 个月时外周血 CD19⁺CD5⁻CD1d⁺ 和 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ B 细胞百分比最高,治疗 9 个月外周血 CD19⁺CD5⁻CD1d⁺ B 细胞较治疗 3 个月及治疗 6 个月均减低,差异有统计学意义($P<0.05$)。比较 TB 患者治疗前、治疗 3 个月、治疗 6 个月、治疗 9 个月外周血 B 细胞发现治疗 3 个月时外周血 CD19⁺CD5⁻CD1d⁻ B 细胞百分比最低($P<0.01$)。患者在治疗过程中 CD19⁺CD5⁺CD1d⁻ B 细胞呈上升趋势,且治疗 9 个月时较治疗前明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 1。

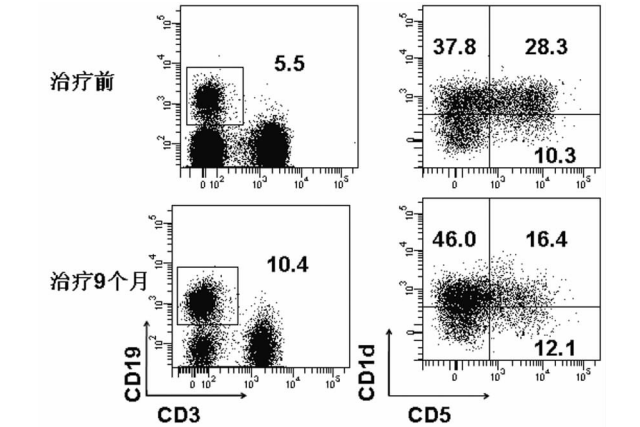


图 1 TB 患者治疗前后 B 细胞各亚群变化的流式图

表 1 结核患者治疗前、后 B 细胞及其分群比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	B 细胞(CD19 ⁺ CD3 ⁺)	CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD1d ⁺	CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ⁺	CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD1d ⁻	CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD1d ⁻
治疗前	40	7.15±2.93	31.47±11.52	15.89±9.06	41.07±14.35	11.58±6.67
治疗 3 个月	40	6.25±2.93	35.55±12.35	23.47±12.41	26.32±13.21	14.67±8.22
治疗 6 个月	40	8.40±3.54	34.43±15.07	17.43±8.57	32.58±14.92	15.56±7.39
治疗 9 个月	40	8.11±4.89	25.67±13.91	11.56±8.15	44.74±15.39	18.03±7.93

3 讨 论

有关 B 细胞在结核菌感染及结核病发生中的作用一直没有得到充分重视,传统观念认为结核免疫主要是细胞免疫,而被动抗体免疫无益于结核病保护性免疫。然而,一些早期研究和临床观察提示,B 细胞在结核菌感染和肺结核的发生中起着一定的作用,B 细胞不仅参与人肺结核结节的形成,而且可以在结核结节淋巴细胞浸润带外周形成异位淋巴滤泡结构(三级淋巴滤泡),这对维持结核结节的稳定具有重要作用^[1],本研究组前期研究也发现肺结核组织中 B 细胞淋巴滤泡样结构的形成与否及其面积大小与患者的结核菌控制情况有关^[2],Maglione 等^[8]通过对 B 细胞缺陷小鼠的研究发现 B 细胞不仅有利于肺炎症病理反应的控制,而且还有利于肺脏内结核菌的控制,而 Ordway 等^[9]的研究结果则显示 B 细胞与肺结核免疫病理有关。虽然这些研究结果不一致,还不能说明 B 细胞是参与保护性免疫还是病理损伤,但可以肯定的是 B 细胞在结核

病的发生中起重要作用。为此,本研究检测了 TB 患者外周血 B 细胞及其亚群水平的变化,发现伴随结核菌感染和结核病的发生,外周血 B 细胞库的稳态被打破^[7],TB 患者外周血 CD19⁺ B 细胞总量呈减少趋势,这一结果与 Hernandez 等^[10]的报道基本一致,而 B 细胞各亚群的百分比出现增高或降低现象,其中,最为突出的变化是 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ B 细胞亚群的百分比显著增高,CD19⁺CD5⁻CD1d⁺ B 细胞也较健康者稍增高,而 CD19⁺CD5⁻CD1d⁻ B 细胞和 CD19⁺CD5⁺CD1d⁻ B 细胞均较健康者稍减低。在本研究中,通过对 TB 患者的随访发现,CD19⁺CD3⁺ B 细胞在治疗前处于低水平状态,治疗 3 个月时有所回升,治疗 6 个月时达到最高水平,随着治疗时间的延长 B 细胞数量逐渐正常;在 B 细胞各亚群中,TB 患者明显升高的 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ B 细胞在治疗 3 个月时升高到最高水平,但是在治疗 6 个月及治疗 9 个月时均明显下降,治疗 9 个月时基本恢复到正常状态;增高的 CD19⁺CD5⁻CD1d⁺

B 细胞经治疗后也下降,降低的 CD19⁺CD5⁻CD1d⁻ B 细胞和 CD19⁺CD5⁺CD1d⁻ B 细胞经治疗后均升高。通过检测治疗过程中 B 细胞及其亚群的变化,发现抗结核治疗 3 个月和治疗 6 个月时是机体免疫反应最活跃的时期,各 B 细胞亚群的百分比变化最大,治疗 9 个月时机体的免疫状态逐渐趋于稳定,说明有效的抗结核治疗不仅可以清除结核菌还可以改变机体的免疫紊乱状态。

本研究中所关注的 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ B 细胞被认为是一种具有免疫调节功能的 B 细胞,通过分泌 IL-10 发挥免疫抑制功能^[11],本课题组前期研究发现结核患者外周血的 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ B 细胞可抑制 CD4 细胞分泌 IL-17 和 IL-22,但不影响 CD4 细胞分泌干扰素 (IFN)- γ ,其作用机制是通过分泌 IL-10 和细胞间接触抑制^[12],而 CD19⁺CD5⁻CD1d⁺、CD19⁺CD5⁻CD1d⁻、CD19⁺CD5⁺CD1d⁻ B 细胞并无抑制 CD4 细胞的作用,其具体机制还有待进一步阐明。

综上所述,本研究通过对 TB 患者外周血的 B 细胞及其亚群的研究,发现 B 细胞及其亚群在结核病的发生和发展中起到重要作用,了解抗结核治疗过程中 B 细胞各亚群百分比的变化可以作为疗效考核的参考指标。

参考文献

[1] Ulrichs T, Kosmiadi GA, Jorg S, et al. Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma[J]. J Infect Dis, 2005, 192(1): 89-97.

[2] Zhang M, Wang Z, Graner MW, et al. B cell infiltration is associated with the increased IL-17 and IL-22 expression in the lungs of patients with tuberculosis[J]. Cell Immunol, 2011, 270(2): 217-223.

[3] Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, et al. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10(B10 cells) requires

antigen receptor diversity and TLR signals[J]. J Immunol, 2009, 182(12): 7459-7472.

[4] Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic[J]. Cytochemistry B Clin Cytom, 2010, 78 Suppl 1: S47-60.

[5] Noh J, Choi WS, Noh G, et al. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B cells in human peripheral blood mononuclear cells: human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cell (Breg)[J]. Immune Netw, 2010, 10(6): 247-249.

[6] Bao W, Zhong H, Manwani D, et al. Regulatory B-cell compartment in transfused alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease[J]. Am J Hematol, 2013, 88(9): 736-740.

[7] 张影, 陆坚, 邱振纲, 等. 结核病患者外周血 B 细胞及其亚群的检测[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(6): 1053-1055.

[8] Maglione PJ, Xu J, Chan J, et al. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with Mycobacterium tuberculosis[J]. J Immunol, 2007, 178(11): 7222-7234.

[9] Ordway D, Palanisamy G, Henao-Tamayo M, et al. The cellular immune response to Mycobacterium tuberculosis infection in the guinea pig[J]. J Immunol, 2007, 179(4): 2532-2541.

[10] Hernandez J, Velazquez C, Valenzuela O, et al. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis[J]. Immunol Invest, 2010, 9(3): 197-205.

[11] Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, et al. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses[J]. Immunity, 2008, 28(5): 639-650.

[12] Zhang M, Zheng X, Zhang J, et al. CD19⁺CD1d⁺CD5⁺ B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses[J]. Cell Immunol, 2012, 274(1/2): 89-97.

(收稿日期: 2014-01-17)

(上接第 1551 页)

参考文献

[1] Yang W, Guan L. Bridging the US and China together to conquer cancer: report of the 4th annual meeting of the US Chinese Anti-Cancer Association(USCACA)[J]. Chin J Cancer, 2012, 31(7): 315-318.

[2] 罗文彦. DMBT1, CD44v6, E-cadherin 在食管癌中的表达及其生物学意义[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2006.

[3] Helmke BM, Renner M, Poustka A, et al. DMBT1 expression distinguishes anorectal from cutaneous melanoma[J]. Histopathology, 2009, 54(2): 233-240.

[4] Tavassoli EF, Devilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs[M]. Lyon, France: IARC Press, 2008: 111-113.

[5] Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, et al. DMBT1, a new

member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25. 3-26. 1 is deleted in malignant brain tumours[J]. Nat Genet, 1997, 17(1): 32-39.

[6] Mueller W, Mollenhauer J, Stockhammer F, et al. Rare mutations of the DMBT1 gene in human astrocytic gliomas[J]. Oncogene, 2002, 21(38): 5956-5959.

[7] Mollenhauer J, Herbertz S, Holmskov U, et al. DMBT1 encodes a protein involved in the immune defense and in epithelial differentiation and is highly unstable in cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(6): 1704-1710.

[8] Somerville RPT, Shoshan Y, Eng C, et al. Molecular analysis of two putative tumour suppressor genes, PTEN and DMBT, which have been implicated in glioblastoma multiforme disease progression[J]. Oncogene, 1998, 17(13): 1755-1757.

(收稿日期: 2014-01-08)