·基础实验研究论著·

结核病患者外周血和胸腔积液中多功能 Th1 细胞检测*

李美忠[1]，邱振纲[1]，孟令香[2]，舒　彬[3]，邓群益[2]，张明霞[1△]
（1. 深圳市第三人民医院研究所，广东深圳 518112；2. 深圳市第三人民医院结核病科，广东深圳 518112；
3. 深圳市福田区疾病预防控制中心实验室，广东深圳 518000）

摘　要：目的　探讨结核病患者外周血和胸腔积液中 IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ 多功能 Th1 细胞的水平及其临床意义。**方法**　选取结核患者 49 例，其中结核性胸膜炎患者 14 例，结核潜伏感染者 27 例，健康对照 66 例，采用佛波酯（PMA）和离子霉素刺激全血和胸腔积液中单个核细胞，胞内细胞因子染色，流式细胞术检测 CD4$^+$ T 细胞细胞因子分泌的情况。**结果**　依据 CD4$^+$ T 细胞产生细胞因子的不同，将其分为 7 个不同亚群，分别为 IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$、IL-2$^+$ IFN-γ$^+$、IL-2$^+$ TNF-α$^+$、IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$、IL-2$^+$、TNF-α$^+$、IFN-γ$^+$ 细胞亚群，外周血中结核病患者的 IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ 多功能 Th1 细胞的比例明显低于健康对照和潜伏感染者（$P<0.01$），IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ 细胞、IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ 细胞表达水平明显低于潜伏感染者和健康对照（$P<0.05$）；TNF-α$^+$ 细胞则高于健康对照和潜伏感染者（$P<0.05$）；其他各亚群无明显变化。胸腔积液单个核细胞（PEMC）的 IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ 多功能 Th1 应答水平高于外周血单个核细胞（$P<0.05$）；外周血单个核细胞中 IL-2$^+$ 细胞低于 PEMC（$P<0.01$），其他各亚群无明显变化。**结论**　非特异性 Th1 细胞应答与结核菌感染的临床转归有关，IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ 多功能 Th1 细胞在结核的保护性免疫反应中起一定作用。

关键词：结核；　外周血单个核细胞；　流式细胞术
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.002　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2014)15-1971-03

Detection of multifunctional Th1 cells in peripheral blood and pleural effusion in TB patients*

Li Meizhong[1], *Qiu Zhengang*[1], *Meng Lingxiang*[2], *Shu Bin*[3], *Deng Qunyi*[2], *Zhang Mingxia*[1△]
(1. *Research Institute, Shenzhen Municipal Third People's Hospital, Shenzhen, Guangdong* 518112, *China*;
2. *Department of Tuberculosis, Shenzhen Municipal Third People's Hospital, Shenzhen, Guangdong* 518112, *China*;
3. *Central Laboratory, Futian District Center for Disease Prevention and Control, Shenzhen, Guangdong* 518000, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the level of IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ multifunctional Th1 cell in peripheral blood and hydrothorax of the TB patients and its clinical significance. **Methods**　49 patients with tuberculosis (TB) including 14 cases of tuberculous pleurisy and 27 individuals with latent TB infection were selected and 66 healthy individuals were selected as the controls. PMA and ionomycin were adopted to stimulate mononuclear cells in whole blood and pleural effusion. The secretion status of CD4$^+$ T cells cytokines was detected by using the intracellular cytokine staining and the flow cytometric analysis. **Results**　According to the different cytokines generated by CD4$^+$ T cells, which were divided into 7 cell subgroups: IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$, IL-2$^+$ IFN-γ$^+$, IL-2$^+$ TNF-α$^+$, IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$, IL-2$^+$, TNF-α$^+$ and IFN-γ$^+$ cell subgroups. The proportion of peripheral blood IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ multifunctional Th1 cells in the TB patients was significantly lower than that in the healthy controls and the individuals with latent TB infection ($P<0.01$), the expression levels of IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ cells and IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ cells were significantly lower than those in the individuals with latent TB infection and the healthy controls ($P<0.05$); TNF-α$^+$ cells was higher than that in the healthy controls and the individuals with latent TB infection ($P<0.05$). The other subgroups had no obvious change. The response level of IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ multifunctional Th1 cells in the pleural effusion mononuclear cells (PEMC) was higher than that in the peripheral blood mononuclear cells ($P<0.05$); IL-2$^+$ cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was lower than that in PEMC ($P<0.01$). **Conclusion**　The response of non-specific Th1 cells is related with the clinical outcome of TB infection, IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ multifunctional Th1 cells plays a certain role in the protective immunoreaction of TB.

Key words: tuberculosis;　peripheral blood mononuclear cell;　flow cytometry

CD4$^+$ T 细胞免疫在结核菌保护性免疫中起着关键作用，同时也参与结核病的病理反应。近年来随着对 CD4$^+$ T 细胞各亚群的研究，认为结核免疫是 Th1、Th2、Treg、Th17 这 4 个细胞亚群组成的网络相互调节的结果，但是结核免疫极其复杂，目前理论还不能完全解释，也可能还存在其他新发现的免疫细胞或分子参与或干预结核病免疫应答反应并在结核病的发生中起着重要作用[1-2]。其中，新近发现的多功能 Th1 细胞可能就是一个重要的参与者，多功能 Th1 细胞是一种新型的 CD4$^+$ T 细胞，可以同时分泌白细胞介素 2（IL-2）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）和 γ 干扰素（IFN-γ），参与抗寄生虫感染并与结核病的免疫反应有关[3-5]。为此，本研究通过流式细胞术和胞内细胞因子检测技术反映分泌相应细胞因子的细胞亚群的数量或表达水平，了解 IL-2$^+$ IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$ 多功能 Th1 细胞及其他亚群在结核病患者外周血和胸腔积液中的表达差异，探讨其

*　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（210021111、20120264）。　作者简介：李美忠，男，副主任技师，主要从事结核病免疫学发病机制的研究。　△　通讯作者，E-mail：1097040204@qq.com。

在结核病发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 2～7 月在深圳市第三人民医院结核病区住院的患者，选取结核病(TB)患者 49 例，诊断的依据是按 2001 年中华医学会结核病学分会肺结核诊断和治疗指南标准，痰培养有人型或牛型结核分枝杆菌生长，临床表现和胸部影像学特征，胸膜活检阳性以及抗结核治疗有效的初治成人继发型肺结核患者，其中 14 例为结核性胸膜炎(TP)患者，所有受试者都已签署知情同意书，实验程序符合医院伦理委员会的伦理学标准并且已经得到其批准。另外选取健康对照(HD)66 例，诊断标准为用 PPD 皮试和结核分枝杆菌抗原特异性 IFN-γ Elispot 检测阴性和常规的体检排除结核菌潜伏感染者的健康者。选取潜伏(LTBI)感染者 27 例，诊断的依据是用 PPD 皮试和结核分枝杆菌抗原特异性 IFN-γ Elispot 检测阳性，未出现明显的临床症状。TB 患者平均(35.97±14.82)岁；TP 患者平均(32.07±10.29)岁；LTBI 患者平均(33.30±13.43)岁；HD 患者平均(29.64±7.80)岁。所有受试者均排除感染艾滋病、乙型肝炎和丙型肝炎。外周血样本在抗结核前或抗结核治疗 1 周内收集。

1.2 仪器与试剂 CO_2 孵箱(美国 Thermo 公司)，离心机(美国 Beckman 公司)，BD canto 流式细胞仪(美国 BD 公司)。250 μL 全血，含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 完全培养基，佛波酯(PMA，50 ng/mL；Sigma-Aldrich)/离子霉素(1 μg/mL；Sigma-Aldrich)，布雷菲德菌素 A(10 μg/mL，Sigma)，CD3-藻红蛋白荧光素-CY5，CD8-别藻蓝蛋白荧光素-CY7，IL-2-藻红蛋白荧光素，IFN-γ-别藻蓝蛋白荧光素，TNF-α-异硫氰酸荧光素(购自美国 BD Pharmingen)，磷酸盐缓冲液。

1.3 方法

1.3.1 全血和胸腔积液细胞刺激及胞内染色 肝素锂抗凝静脉全血 250 μL，收集胸腔积液后 1 500 r/min 5 min 离心弃上清，细胞计数后悬成 2×10^6 取 250 μL 加 750 μL 1640 完全培养基，非特异刺激加入刺激剂佛波酯和离子霉素，加完刺激剂后 2 h 后加入阻断剂布雷菲德菌素 A，在 37 ℃ CO_2 孵育箱共孵育 6 h；胞内染色：先对全血有核细胞和胸腔积液单个核细胞(PEMC)表面用抗人的荧光抗体 CD3，CD8 染色，用 BD lysing solution 溶血素溶血，离心弃上清，后用 BD Perms solution 破膜，再加入抗人 IL-2、INF-γ、TNF-α 抗体进行胞内染色。

1.3.2 流式细胞仪检测 用前向和侧向角圈定 PBMC 及 PEMC 后，在淋巴细胞设门分析 CD3、CD8 细胞表达情况，然后在 $CD3^+CD8^-$ 细胞设门分析 Th1 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 $CD3^+CD8^-$ 细胞反圈门方法反映 $CD4^+$ T 辅助细胞亚群的情况)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件包和 Graph Pad Prism(4.02)进行统计分析，三组间用单因素方差分析分别比较健康者，潜伏感染和结核患者的 $CD4^+$ T 细胞水平，以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 外周血和胸腔积液中多功能 Th1 细胞的表达情况 $CD4^+$ T 细胞在非特异性抗原短期刺激下产生大量的细胞因子，进一步分析其组成，将 $CD4^+$ T 细胞分为 $IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$、$IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$、$IL\text{-}2^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$、$IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$、$IL\text{-}2^+$、$TNF\text{-}\alpha^+$、$IFN\text{-}\gamma^+$ 7 个不同细胞亚群，每个细胞亚群在不同人群中的比例是不相同的，PEMC 和外周血单个核细胞(PBMC)中多功能 Th1 细胞及各亚群表达情况也有所不同，结果见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 非特异性抗原刺激下不同结核菌感染转归的多功能 Th1 应答特征 对 3 组人群外周血 $IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$ 多功能 Th1 应答情况进行分析发现，TB 患者外周血的多功能 Th1 细胞表达水平明显低于 LTBI 患者和 HD($P<0.01$)；LTBI 患者和 HD 两者之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)；$IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ 细胞、$IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$ 细胞表达水平明显低于 LTBI 患者和 HD($P<0.01$，$P<0.05$)；$TNF\text{-}\alpha^+$ 细胞则高于 LTBI 患者和 HD($P<0.05$)，其他亚群在各组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 结核病患者胸腔积液和外周血中多功能 Th1 应答特征 非特异性抗原刺激下，结果显示 PEMC 中的 $IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$ 多功能 Th1 应答水平高于 PBMC($P<0.05$)，而 PBMC 中 $IL\text{-}2^+$ 细胞低于 PEMC($P<0.01$)，其他亚群则明显变化，结果见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

$CD4^+$ T 细胞及其分泌的细胞因子在结核病保护性免疫机制中起着必不可少的作用。早期的动物实验表明，$CD4^+$ T 细胞消除的小鼠体内的结核分枝杆菌得不到有效抑制，感染小鼠最终死于结核病[6]。相反，通过过继转移结核菌抗原特异性 T 细胞可以增强小鼠对结核菌的抵抗作用[7]。近年来研究发现，同时分泌 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 的多功能 Th1 细胞与小鼠的结核免疫保护作用密切相关[8]，但有关 $IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$ 多功能 Th1 细胞对人体肺结核免疫保护机制中的作用还不明确，目前现有的几篇文献报道的结果并不一致，Caccamo 等[9]发现结核患者用 Ag85B、ESAT-6 和 16-kDa 刺激 PBMC 后特异性 $IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$ 多功能 Th1 细胞比结核潜伏感染者明显增多，认为与结核的保护性免疫有关，并可作为诊断和疗效检测的指标，而 Harari 等[5]则认为 CFP-10、ESAT-6 和 PPD 刺激后特异性 $IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$ 多功能 Th1 细胞在活动性结核体内是降低的，区分结核患者和潜伏感染者的最好指标是 TNF-α 单阳的 CD4 细胞，另有报道显示 $IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ CD4 细胞在活动性结核病中的诊断价值更大[10]。上述研究检测的多为抗原特异性多功能 Th1 细胞，虽然特异性多功能 Th1 细胞能直接反映结核感染的情况，但因产生的细胞因子量少，检测技术要求高，一般实验室很难掌握，为此，本研究采用体外 PMA 和离子霉素刺激的方法，使得人外周血和胸腔积液中的淋巴细胞发生非特异性转化，产生大量的细胞因子如 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 等，采用流式细胞技术检测胞内细胞因子，反映体内 Th1 细胞各亚群的变化。在 PMA、植物血凝素(PHA)、抗 CD3/CD28 等各种非特异性刺激中，PMA 刺激效果最强，可以产生大量的细胞因子，便于检测，提高了检测的灵敏度；本文中采用全血刺激，无需分离 PBMC，操作简便，同时保留了细胞及生化微环境，基本接近生物体的分析条件，更能准确反映体内免疫状况。通过对 TB 患者多功能 Th1 等细胞的检测发现 TB 患者外周血中 $IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$ 多功能 Th1 细胞反应受到抑制，表达水平明显低于 LTBI 患者和 HD；同时发现 $IL\text{-}2^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ 细胞、$IFN\text{-}\gamma^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$ 细胞表达水平明显低于 LTBI 患者和 HD；$TNF\text{-}\alpha^+$ 细胞则高于 HD 和 LTBI 患者，$IL\text{-}2^+$ $TNF\text{-}\alpha^+$、$IL\text{-}2^+$、$IFN\text{-}\gamma^+$ 等亚群细胞在各组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)，结果表明 TB 患者 $IL\text{-}2^+$ IFN-

γ^+ TNF-α^+ 的多功能 Th1 细胞、IL-2^+ IFN-γ^+ 细胞及 IFN-γ^+ TNF-α^+ 细胞数量减少，其发挥抗结核的功能也受到相应的影响；而 TNF-α^+ 细胞数量的增高，TNF-α 是一种多效能的细胞因子，体内适量的 TNF-α 对机体抗结核感染有一定的保护作用，而分泌过多时可致病情恶化，由此可见，单阳的 TNF-α^+ 细胞过多是导致结核病发生的重要因素。此外，IL-2^+ TNF-α^+、IL-2^+、IFN-γ^+ 等亚群细胞在结核病中的发生作用还有待进一步研究。

由于外周血中的 IL-2^+ IFN-γ^+ TNF-α^+ 多功能 Th1 细胞数量不能反映肺内多功能 Th1 细胞产生情况，了解活动性肺结核局部 IL-2^+ IFN-γ^+ TNF-α^+ 多功能 Th1 细胞的频率更能说明其在结核病发病中的意义，目前同时检测外周血和人体肺组织局部 IL-2^+ IFN-γ^+ TNF-α^+ 多功能 Th1 细胞尚未见报道，国外仅有 Kumar 等[11]报道了结核性淋巴结中多功能 Th1 细胞变化情况，淋巴结中特异性多功能 Th1 细胞增多，非特异性多功能 Th1 细胞也呈现增多趋势，国内学者李丽等[12]检测了胸腔积液中特异性 IL-2^+ IFN-γ^+ TNF-α^+ 多功能 Th1 的表达，发现肺结核局部的多功能 Th1 应答水平高于其他 6 个亚群，与本文的结果基本一致，但文中没有对应外周血的情况，本文进一步比较了胸腔积液和外周血配对患者 Th1 细胞表达情况，发现胸腔积液中 IL-2^+ IFN-γ^+ TNF-α^+ 多功能 Th1 高于外周血，IL-2^+ 单阳细胞低于外周血，其他亚群则明显变化。综合外周血和局部 IL-2^+ IFN-γ^+ TNF-α^+ 多功能 Th1 的检测结果，说明结核病免疫是 Th1 细胞各亚群调节失衡的结果，而不是单一因素的结果。外周血 IL-2^+ IFN-γ^+ TNF-α^+ 多功能 Th1 细胞反映机体整体水平，其数量过低，可能会使结核菌的清除障碍，导致疾病的发生，而结核感染的局部多功能 Th1 细胞增高，可能是感染导致多功能 Th1 细胞募集到感染部位所致，以便有效的杀灭结核杆菌。提示 IL-2^+ IFN-γ^+ TNF-α^+ 多功能 Th1 细胞在结核病保护性免疫反应中发挥重要作用，临床上通过检测非特异性外周血和胸腔积液中 IL-2^+ IFN-γ^+ TNF-α^+ 多功能 Th1 细胞可以反映结核患者的免疫状况，是结核病诊断和疗效考核的一种参考指标。

参考文献

[1] Andersen P, Smedegaard B. CD4(+) T-cell subsets that mediate immunological memory to Mycobacterium tuberculosis infection in mice[J]. Infect Immun, 2000, 68(2): 621-629.

[2] Goldsack L, Kirman JR. Half-truths and selective memory: Interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis[J]. Tuberculosis(Edinb), 2007, 87(6): 465-473.

[3] Wilkinson KA, Wilkinson RJ. Polyfunctional T cells in human tuberculosis[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(8): 2139-2142.

[4] Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, et al. Multifunctional Th1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major[J]. Nat Med, 2007, 13(7): 843-850.

[5] Harari A, Rozot V, Enders EB, et al. Dominant TNF-α^+ Mycobacterium tuberculosis-specific CD4$^+$ T cell responses discriminate between latent infection and active disease[J]. Nature Med, 2011, 17(3): 372-377.

[6] Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice[J]. Immunity, 1995, 6(2): 561-572.

[7] Andersen P, Smedegaard B. CD4(+) T-cell subsets that mediate immunological memory to Mycobacterium tuberculosis infection in mice[J]. Infect Immun, 2000, 68(2): 621-629.

[8] Lindenstrom T, Agger EM, Korsholm KS, et al. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells[J]. J Immunol 2009, 182(12): 8047-8055.

[9] Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, et al. Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(8): 2211-2220.

[10] Nemeth J, Winkler HM, Zwick RH, et al. Peripheral T cell cytokine responses for diagnosis of active tuberculosis[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35290.

[11] Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV, et al. Expansion of pathogen-specific mono-and multifunctional Th1 and Th17 cells in multi-focal tuberculous lymphadenitis[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57123.

[12] 李丽，乔丹，李琴，等. 结核胸液中 ESAT-6 多肽特异性多功能 CD4$^+$ T 细胞数量及功能分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2011，27(1)：26-28.

（收稿日期：2014-02-18）

（上接第 1970 页）

[2] 汤红英. 髓过氧化物酶相关疾病的研究进展[J]. 新疆医科大学学报，2009，32(3)：255-258.

[3] 宋志刚，谢蕾蕾，何旭洪. SPSS16 使用教程[M]. 北京：人民邮电出版社，2008：95.

[4] 郑筱叶，朱建华. 髓过氧化物酶在冠状动脉粥样硬化研究中的新进展[J]. 国际内科学杂志，2007，34(5)：257-260.

[5] Zhang R. Brennan ML, Fu X, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease[J]. JAMA, 2001, 286(17): 2136-2142.

[6] Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis[J]. Free Radio Biol Med, 2000, 28(12): 1717-1725.

[7] Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, et al. A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions[J]. J Biol Chem, 2002, 277(41): 38517-38523.

[8] 殷泉忠，马根山，张华，等. 髓过氧化物酶与急性冠状动脉综合征的相关性研究[J]. 现代医学，2007，35(6)：432-435.

[9] 黄景欢，刘洋，马冬冬. 高迁移率族蛋白 1 和髓过氧化物酶预测冠状脉病变程度和斑块易损性的临床研究[J]. 中华老年医学杂志，2013，32(1)：9-13.

[10] 周玉杰，韩红亚. 心肌生物标志物的应用前景与挑战[J]. 中华检验医学杂志，2013，36(9)：769-772.

[11] Nicholls SJ, Hazen SL. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of coronary atery disease[J]. Jpn J Infect Dis, 2004, 57(5): S21-22.

[12] 苏淑红. 髓过氧化物酶与动脉粥样硬化[J]. 国际心血管病杂志，2007，34(3)：162-165.

（收稿日期：2014-03-01）