

• 论 著 •

# 肺结核患者 NO 和 FOXP3 表达水平变化及意义

沈丽燕, 申卫红, 朱 岚

(南京医科大学附属苏州医院生殖与遗传中心, 江苏苏州 215001)

**摘 要:**目的 探讨肺结核患者一氧化氮(NO)和叉头蛋白 3(FOXP3)表达水平的变化及临床意义。方法 选择肺结核患者与健康者各 40 例,采用 Griess 比色法检测血清 NO 水平,采用流式细胞仪检测外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分比;采用实时定量聚合酶链反应检测 FOXP3 mRNA 水平。结果 肺结核患者血清 NO 浓度为 (15.71±1.26) μmol/L,高于健康者的 (5.45±0.98) μmol/L ( $P<0.05$ );肺结核患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞约占 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞的 (4.57±0.85)%,高于健康者的 (1.83±0.49) % ( $P<0.05$ );肺结核患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞高表达 FOXP3。结论 肺结核患者 NO、FOXP3 表达水平均升高,在肺结核免疫调节机制中起着重要作用;动态监测二者表达水平的变化有利于肺结核患者的诊治。

**关键词:**一氧化氮; 叉头蛋白 3; 肺结核

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)10-1364-02

## Study of NO and FOXP3 in patients with pulmonary tuberculosis

Shen Liyan, Shen Weihong, Zhu Lan

(Nanjing Medical University Affiliated Suzhou Hospital/Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, Jiangsu 215001, China)

**Abstract:** Objective To Study the expressions and significance of nitric oxide (NO) and forkhead box protein 3 (FOXP3) in patients with pulmonary tuberculosis. **Methods** Serum NO levels were measured by Griess colorimetric reaction. Flow cytometry was used to determine the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in peripheral blood. The expression of FOXP3 mRNA was measured by real-time polymerase chain reaction. **Results** Serum NO level in patients was (15.71±1.26) μmol/L, higher than the (5.45±0.98) μmol/L of healthy controls ( $P<0.05$ ). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells comprised (4.57±0.85)% of CD4<sup>+</sup>T cells in patients, higher than the (1.83±0.49)% in healthy controls ( $P<0.05$ ). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis highly expressed FOXP3. **Conclusion** Patients with pulmonary tuberculosis could be with an increased level of NO and FOXP3, which might have important role in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis.

**Key words:** nitric oxide; forkhead box protein 3; pulmonary tuberculosis

肺结核是由结核分枝杆菌引发的肺部感染性疾病,与 T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应密切相关,其中调节性 T 淋巴细胞(Treg)在其中占重要作用<sup>[1]</sup>。Treg 是一类具有免疫抑制功能的 T 淋巴细胞,在维持机体免疫自稳、调控免疫应答方面起重要作用,特征性表达转录因子叉头蛋白 3(FOXP3)<sup>[2-3]</sup>。一氧化氮(NO)由具有多种生物学活性,由 NO 合成酶(NOS)催化合成。NOS 可分为基础型(cNOS)及诱导型(iNOS)。研究发现,结核分枝杆菌感染巨噬细胞后,能诱导 NO 的产生,从而发挥炎症介质和细胞毒作用,杀伤结核分枝杆菌<sup>[4-5]</sup>。为了解 NO 和 FOXP3 在肺结核发病机制中的作用,本研究检测了肺结核患者 NO、FOXP3 水平,探讨二者与肺结核免疫功能紊乱的关系,以期对肺结核的免疫治疗提供新的方向。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2012 年 6 月至 2013 年 3 月在无锡市第三人民医院呼吸科住院治疗的结核病患者 40 例(实验组),诊断标准符合《肺结核诊断和治疗指南》<sup>[6]</sup>;男 26 例、女 14 例,年龄 20~75 岁,平均(40.5±11.2)岁。与研究组性别、年龄相匹配的体检健康者 40 例纳入对照组。所有受试者均签署知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 NO 检测** 采集受试者晨起空腹静脉血 4 mL,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清标本,采用上海杰美基因医药科技有限公司 Griess 比色法 NO 检测试剂盒检测血清 NO 水平。

**1.2.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群检测** 采集受试者枸橼酸钠抗凝静脉血 2 mL,取全血标本 100 μL,加入 PE 标记的 CD4 抗体、FITC 标记的 CD25 抗体(美国 BD 公司)各 10 μL,室温避光孵育 30 min;加入红细胞裂解液(美国 BD 公司),振荡混匀;离心后弃上清液,磷酸盐缓冲液洗涤后混匀,采用 FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)计数细胞,以 Cellquest 软件分析数据,计算 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分比。

**1.2.3 FOXP3 mRNA 表达的检测** 按照实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(德国 QIAGEN 公司)说明书的要求,提取全血 RNA,采用 RT-PCR 检测 FOXP3 mRNA 水平,以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参基因。FOXP3 扩增上游引物:5'-GAA CGC CAT CCG CCA CAA CCT GA-3',下游引物:5'-CCC TGC CCC CAC CAC CTC TGC-3'。聚合酶链反应(PCR)循环条件:95 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,69 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 循环 30 次。反应结束后设定最佳阈值,根据仪器给出的标准曲线和斜率,计算 FOXP3 相对表达指数。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较采用  $t$  检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 NO 浓度检测** 实验组、对照组血清 NO 浓度分别为 (15.71±1.26)、(5.45±0.98) μmol/L,实验组血清 NO 浓度高

于对照组( $P<0.05$ )。

**2.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群检测** 实验组、对照组外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞在 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞中所占比例分别为(4.57±0.85)%、(1.83±0.49)%，实验组高于对照组( $P<0.05$ )。

**2.3 FOXP3 mRNA 表达水平检测** 实验组、对照组 FOXP3 mRNA 相对表达指数分别为 4.42±0.31、2.08±0.26，实验组 FOXP3 mRNA 表达水平高于对照组( $P<0.05$ )。

### 3 讨 论

肺结核是较为常见的一类传染病，T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应和迟发性变态反应对结核病发病、演变及转归产生决定性影响。近年来，调控免疫反应的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞成为免疫抑制治疗的研究焦点。Treg 特征性表达转录因子 FOXP3，后者对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞发育及功能具有调控作用<sup>[7]</sup>。本研究结果表明，肺结核患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞的数量明显高于健康者，提示结核分枝杆菌进入机体后，可在宿主细胞内大量寄生和繁殖，从而诱导 T 淋巴细胞介导的细胞免疫反应。NO 是在 NO 合成酶(NOS)作用下由 L-精氨酸转化而来。NOS 是生成 NO 的关键酶。一方面，在 cNOS 的作用下，参与血管张力生理性调节过程；另一方面，iNOS 激活后可介导血管内皮细胞损伤，产生大量的 NO，从而参与免疫病理反应。本研究结果显示，肺结核患者血清 NO 水平高于健康者，表明 NO 水平的变化与肺结核的发生、发展有关，参与肺结核的免疫炎症反应<sup>[8-9]</sup>。

综上所述，肺结核患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞数量明显升高，而 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 淋巴细胞又高表达 FOXP3，说明 FOXP3 的高表达可能在肺结核发病机制中起重要作用。同时，肺结核患者血清 NO 水平也明显升高，表明 NO 的高表达也参与肺结核的免疫炎症反应。因此，在肺结核的治疗中，对 NO 和 FOXP3 介导的免疫耐受进行干预十分必要。动态监测 NO、FOXP3 表达水平的变化，有利于肺结核患者的诊治。这为进一步研究 NO 和 FOXP3 在肺结核发生、发展机制中的作用奠定了基础。

(上接第 1363 页)

而手术失败就会造成鼓膜等结构上出现连接不良。而对于迷路瘘管研究指出手术中快速用自体组织和生物蛋白覆盖瘘口效果良好，且严禁使用吸引器对准瘘口吸引<sup>[8-9]</sup>。后鼓室胆脂瘤往往会侵犯锤骨上结构，容易发生向前破坏砧镫关节等镫骨上结构完整性而出现较重的传导性耳聋。所以对于合并后鼓室胆脂瘤往往在开放后鼓室后，手术中磨低外耳道后壁，经面神经隐窝下清除后鼓室病灶，有条件者还可以使用在电视耳内镜下清除后鼓室胆脂瘤。同时手术中使用适当的听骨腭复物对听力的恢复也很有作用。

虽然目前慢性化脓性中耳炎的确切发病机制尚不明确，而治疗上主要以手术为主。除以上影响因素外，鼓室黏膜状况，病变性质、并发症、翻查手术、手术方式的选择等均和术后听力受损有一定的相关性<sup>[10]</sup>。

### 参考文献

- [1] 丁跃明,董得恩.慢性化脓性中耳炎骨导听阈变化相关因素分析[J].听力学及言语疾病杂志,2010,13(3):197-198.
- [2] 方练,刘继丽.慢性化脓性中耳炎骨导听力下降的影响因素分析

### 参考文献

- [1] Ribeiro-Rodrigues R,Resende CO,Rojas R,et al. A role for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in regulation of response during human tuberculosis[J]. Clin Exp Immunol,2006,144(1):25-34.
- [2] van Mierlo GJD,Scherer HU,Hameetman M,et al. Cutting edge: TNFR-shedding by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators[J]. J Immunol,2008,180(5):2747-2751.
- [3] Zhang L,Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells:multiple pathways on the road[J]. J Cell Physiol,2007,211(3):590-597.
- [4] Jonna I,Mekonnen M,Abate E,et al. Resistance to first-line anti-TB drugs is associated with reduced nitric oxide susceptibility in Mycobacterium tuberculosis[J]. PLoS One,2012,7(6):891-896.
- [5] Martin IV,Bartek IL,Visconti K,et al. The response of mycobacterium tuberculosis to reactive oxygen and nitrogen species[J]. Front Microbiol,2011,2(2):105-109.
- [6] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(1):70-73.
- [7] Churina EG,Urazova OI,Novitskiy VV. The role of Foxp3-expressing regulatory T cells and T helpers in immunopathogenesis of multidrug resistant pulmonary tuberculosis[J]. Tubercul Res Treat,2012,26(1):1-9.
- [8] Cavalcanti YV,de Almeida TM,de Almeida AF,et al. Foxp3 expression and NO production in peripheral blood mononucleated cells of communicants with pulmonary tuberculosis [J]. Scand J Immunol,2013,15(3):120-125.
- [9] Niedbala W,Cai B,Liu H,et al. Nitric oxide induces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 regulatory T cells from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells via p53,IL-2, and OX40[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2007,104(39):5478-5483.

(收稿日期:2015-02-08)

[J]. 听力学及言语疾病杂志,2011,16(6):513-514.

- [3] 王斌,戴春富.听骨链修复材料及其术后排出的影响因素[J]. 听力学及言语疾病杂志,2010,14(2):150-152.
- [4] 吴玉花.影响开放式乳突根治鼓室成形术听力效果的相关因素分析[D]. 郑州:郑州大学,2012.
- [5] 彭芮,骆文龙.慢性中耳炎患者改良乳突根治术后不干耳的术前因素分析[J]. 听力学及言语疾病杂志,2013,21(4):372-374.
- [6] 戴艳红,余万东,俞晨杰,等.慢性化脓性中耳炎鼓室成形术前后骨导听阈变化的临床观察[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2010,22(1):25-27.
- [7] 敬峥,李洪涛,陈燕芯,等.慢性化脓性中耳炎鼓膜成形术的时机选择[J]. 医学综述,2012,18(12):1958-1959.
- [8] 林碧.手术治疗 85 例慢性化脓性中耳炎的临床效果分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(4):724-725.
- [9] 谭沛,陈阳,邱建华,等.慢性化脓性中耳炎手术前后患者生活质量的调查分析[J]. 中华耳科学杂志,2011,(2):195-199.
- [10] 刘红兵,郭素英,刘月辉,等.慢性化脓性中耳炎致感音神经性聋相关因素分析[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志,2010,20(16):758-758.

(收稿日期:2015-01-25)