

• 论 著 •

肺结核患者外周血中 Treg 细胞和 Th17 细胞等 4 种 T 细胞亚群与其发病的关系

赵 钰¹, 余红岚², 宋静芳², 聂泽燕², 陈 俊², 马 莉¹

(1. 贵州医科大学附属医院中心实验室, 贵阳 550002; 2. 贵州省贵阳市第一人民医院检验科 550004)

摘要:目的 通过检测肺结核患者和健康人群外周血中 Treg 细胞、Th17 细胞以及 CD8⁺CD28⁺T 细胞和 CD8⁺CD28⁻T 细胞的数量,探讨各细胞亚群的数量与肺结核发病的关系,为结核的诊断、治疗及预后提供新思路。方法 应用流式细胞技术检测 Treg 细胞、Th17 细胞以及 CD8⁺CD28⁺T 细胞和 CD8⁺CD28⁻T 细胞,分别比较肺结核组、初治组、复治组与健康对照组之间的上述指标是否存在差异。结果 (1)肺结核组、初治组及复治组外周血中 Th17 细胞的数量分别为(0.74±0.33)%、(0.76±0.34)%、(0.73±0.32)%、CD8⁺CD28⁺T 细胞的数量分别为(39.5±11.4)%、(39.5±10.9)%、(38.7±12.2)%、均分别低于健康对照组(1.17±0.38)%、(62.5±12.0)%、差异有统计学意义(P<0.01);(2)肺结核组、初治组及复治组外周血中 Treg 细胞的数量分别为(10.1±2.7)%、(11.4±3.8)%、(9.4±2.5)%、CD8⁺CD28⁻T 的数量分别为(60.5±11.4)%、(60.5±10.9)%、(61.3±12.2)%、均分别高于健康对照组的(7.2±2.2)%、(37.5±12.0)%、差异有统计学意义(P<0.01);(3)初治组患者与复治组患者外周血中 Th17 细胞、Treg 细胞、CD8⁺CD28⁺T 细胞、CD8⁺CD28⁻T 细胞数量之间的差异无统计学意义(P>0.05)。

结论 肺结核患者外周血中的效应性 T 细胞亚群 Th17 细胞和 CD8⁺CD28⁺T 细胞下降,具有抑制功能的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞和 CD8⁺CD28⁻T 细胞升高,以上 4 个 T 细胞亚群可能与肺结核的发病过程相关。

关键词:肺结核; Treg 细胞; Th17 细胞; CD8⁺CD28⁺T 细胞; CD8⁺CD28⁻T 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)24-3434-03

Relation between 4 kinds of peripheral blood T cell subsets of Treg cell and Th17 cell in patients with pulmonary tuberculosis and its onset

ZHAO Yu¹, YU Honglan², SONG Jingfang², NIE Zeyan², CHEN Jun², MA Li¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Guiyang Municipal First People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China; 2. Central Laboratory, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the number of various cellular subsets and pulmonary tuberculosis (TB) onset by detecting the number of peripheral blood Treg cells, Th 17 cells, CD8⁺CD28⁺T cells and CD8⁺CD28⁻T cells in the patients with pulmonary TB and healthy population so as to provide a new thinking for the diagnosis, treatment and prognosis of TB. **Methods** Treg cells, Th 17 cells, CD8⁺CD28⁺T cells and CD8⁺CD28⁻T cells were detected by using flow cytometry (FCM). The differences of these indexes were compared among the pulmonary TB group, initial treatment group, re-treatment group and healthy control group. **Results** (1) The percentages of peripheral blood Th17 cells and CD8⁺CD28⁺T cells in the TB group, initial treatment group and re-treatment group respectively were(0.74±0.33)%、(0.76±0.34)%、(0.73±0.32)% and (39.5±11.4)%、(39.5±10.9)%、(38.7±12.2)% respectively; which were lower than(1.17±0.38)% and(62.5±12.0)% in the control group, the difference was statistical significance(P<0.01);(2) the percentages of peripheral blood Treg cells and CD8⁺CD28⁻T cells in the TB group, initial treatment group and re-treatment group were (10.1±2.7)%、(11.4±3.8)%、(9.4±2.5)% and (60.5±11.4)%、(60.5±10.9)%、(61.3±12.2)% respectively; which were higher than (7.2±2.2)% and(37.5±12.0)% in the healthy control group, the difference was statistical significance(P<0.01);(3) the percentages of peripheral blood Th17 cells, Treg cells, CD8⁺CD28⁺T cells and CD8⁺CD28⁻T cells had no statistical difference between the initial treatment group and re-treatment group (P>0.05). **Conclusion** The percentage of peripheral blood effect T cell subsets Th17 cells and CD8⁺CD28⁻T cells in the patients with pulmonary TB is decreased, while the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg cells and CD8⁺CD28⁻T cells with the inhibiting effect is increased, these 4 kinds of T cell subsets may be related to the onset process of pulmonary TB.

Key words: pulmonary tuberculosis; Treg cell; Th17 cell; CD8⁺CD28⁺T cell; CD8⁺CD28⁻T cell

随着 Th17 细胞和 Treg 细胞亚群的发现,两者均迅速成为目前研究的热点。Th17 细胞是近年来发现的一种不同于 Th1 和 Th2 细胞的 CD4⁺效应 T 细胞新亚群,该细胞是由初始 T 细胞前体分化而来,具有独立的分化和发育机制,并且特异

性地产生细胞因子白细胞介素(IL)-17,并由此命名。研究显示,与健康对照组相比较,结核性胸膜炎患者外周血中 Th17 细胞的数量显著降低^[1]。

调节性 T 细胞(Treg 细胞)是一群具有免疫抑制效应的细

胞。Treg 细胞在维持机体免疫稳态方面发挥着重要作用,其可通过细胞间的接触抑制(直接抑制)或者释放 IL-10、转化生长因子(TGF)- β 等抑制性细胞因子抑制效应性 T 细胞的增殖和免疫活性细胞因子的合成来调节体内免疫平衡。研究显示,与健康人群相比较,肺结核患者外周血中 Treg 细胞数量显著升高,抑制效应性 T 细胞的免疫功能,参与肺结核的发病^[2-4]。CD8⁺CD28⁺T 淋巴细胞主要执行的是细胞毒性 T 细胞功能,特异性杀伤靶细胞,发挥细胞免疫功能;而 CD8⁺CD28⁻T 淋巴细胞主要参与免疫调节和反馈抑制功能。因此,本课题旨在通过检测 Th17 细胞、Treg 细胞以及 CD8⁺CD28⁺T 细胞和 CD8⁺CD28⁻T 细胞在肺结核患者外周血中的数量,以期探讨以上各细胞亚群与肺结核发病的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2011 年 12 月至 2012 年 3 月贵阳市肺科医院住院部的肺结核患者 40 例设为肺结核组,男 25 例,女 15 例;年龄 15~65 岁,平均(37±13)岁。其中初治组(未开始用药)24 例,男 15 例,女 9 例,平均年龄(38±12)岁;复治组(不规则化疗超过 1 个月)16 例,男 11 例,女 5 例,平均年龄(35±12)岁。具有肺结核的相关症状和体征,胸部 X 线片检查支持肺结核的临床诊断,同时通过痰涂片和痰培养结果确诊为肺结核患者。具体诊断参照《肺结核诊断标准(WS288-2008)》。无合并自身免疫性疾病、肿瘤、糖尿病及慢性感染性疾病;未使用影响机体免疫功能的药物。随机选取贵阳市第一人民医院体检的健康志愿者 30 例设为健康对照组,其中男 15 例,女 14 例,年龄 15~56 岁,平均(33±8)岁。胸片检查未见异常,否认有结核病史,血压、肝功能、肾功能正常,无过敏性疾病,并且也未曾服用过任何影响机体免疫功能的药物。所有受试者均签写了知情同意书。

1.2 方法 使用美国 BD 公司生产的流式细胞仪 Canto II 检测 T 细胞亚群,T 细胞亚群检测盒也购于美国 BD 公司(除用于体外刺激转化的佛波酯离子霉素,莫能霉素购于美国 Sigma 公司),各项操作均严格按照说明书进行。

1.3 统计学处理 流式细胞仪收集细胞以及分析的过程采用 BD-Diva 软件;对所得数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)来表示,应用 SPSS17.0 统计软件进行处理;对于方差齐性的两组独立样本采用 *t* 检验,而方差不齐的两组独立样本采用 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组研究对象外周血中 T 细胞亚群的结果比较 肺结核组患者的外周血中 T 细胞亚群与健康对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 肺结核患者和健康对照者外周血中 T 细胞亚群的结果比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	Treg	Th17	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁻
健康对照组	30	7.2±2.2	1.17±0.38	62.5±12.0	37.5±12.0
肺结核组	40	10.1±2.7*	0.74±0.33*	39.5±11.4*	60.5±11.4*

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 初治组、复治组和健康对照组外周血中 T 细胞亚群的结果比较 初治组、复治组患者的 T 细胞亚群结果与健康对照

组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 初治/复治患者和健康对照者外周血中 T 细胞亚群的结果比较($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	Treg	Th17	CD8 ⁺ CD28 ⁺	CD8 ⁺ CD28 ⁻
健康对照组	30	7.2±2.2	1.17±0.38	62.5±12.0	37.5±12.0
初治组	24	11.4±3.8*	0.76±0.34*	39.5±10.9*	60.5±10.9*
复治组	16	9.4±2.5*	0.73±0.32*	38.7±12.2*	61.3±12.2*

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

目前,长期化疗引发了耐药及多耐药结核分枝杆菌的出现和肺结核的复发,单纯化疗已经不能满足肺结核临床治疗的需要,因此迫切需要从免疫学角度寻求治疗手段以达到免疫治疗的目的^[5],即增加免疫对机体的保护作用;降低免疫反应对自身造成的病理损伤。

许多报道显示,抗结核分枝杆菌感染主要由 CD4⁺Th1 细胞发挥细胞免疫作用,而 CD8⁺T 细胞的免疫作用报道甚少。此次研究中,肺结核患者外周血中 CD8⁺CD28⁺T 细胞占 CD8⁺T 细胞的比例显著低于健康对照组。推测可能由于机体缺乏激活 T 淋巴细胞的第二信号,T 细胞无法正常活化,导致机体不能对结核分枝杆菌产生有效的免疫应答。

于韬等^[6]研究认为,CD8⁺CD28⁻T 细胞是一种调节性 T 细胞,其功能的关键在于下调机体的免疫反应,防止组织破坏,然而对免疫应答的过度抑制会导致机体无法有效的对抗结核分枝杆菌的感染。本次研究中,CD8⁺CD28⁻T 细胞占 CD8⁺T 细胞的比例显著高于健康对照组,增强了对机体免疫功能的抑制作用,机体不能有效地杀灭结核分枝杆菌,使得其在体内不断增殖,促进肺结核的发展。

本次研究显示,肺结核患者外周血中的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞的百分率显著升高,与文献^[7]报道一致。有研究认为,CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞的免疫抑制性机制是通过细胞膜表面表达的 CTLA-4 分子实现的抗原特异性的细胞接触机制,至于该抑制是通过抗原提呈细胞的介导作用还是直接与靶细胞相接触发挥作用^[8],存在一定的分歧。有文献报道,Treg 细胞发挥抑制作用的机制与刺激抗原的浓度有关,浓度低时只需接触抑制;浓度高时则需要分泌抑制性细胞因子辅助^[9]。本次研究发现肺结核患者外周血中的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞数量显著高于健康对照组,而 Th17 细胞和 CD8⁺CD28⁺T 细胞数量显著性下降。因为 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞本身具有抑制其他 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞亚群活化增殖的活性,推测 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞可能对效应性 T 细胞(Th17 细胞和 CD8⁺CD28⁺T 细胞)有抑制作用,然而关于其确切的抑制机制,仍需进一步的探索。

有研究显示,CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞与 Th17 细胞在外周血中的平衡状况,参与自身免疫性疾病及慢性乙型肝炎的发病过程^[8-10]。本研究经线性相关性分析结果显示:肺结核患者外周血中 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞与 Th17 细胞的表达呈显著负相关。分析可能在结核分枝杆菌感染机体时,由于体内存在多种细胞因子对二者的分化发育发挥促进或抑制作用,最终导致二者在患者外周血中的数量出现失衡,从而参与肺结核的免疫发病过程。

由于本次研究选取的初治组患者未开始用药,而复治组是不规则用药超过 1 个月的患者,与健康对照组相比较,患者外周血中发挥抑制性作用的 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞、CD8⁺CD28⁻T 细胞数量显著升高,发挥正向调节作用的 Th17 细胞、CD8⁺CD28⁺T 细胞数量显著降低;但两组患者之间比较,各个细胞亚群的差异无统计学意义($P>0.05$),提示由于用药不规则,未能有效调动机体主动抗结核免疫机制,外周血中抑制性 T 细胞占优势,这可能是导致疾病迁延不愈的一方面原因。

近年来,结核病卷土重来,发病率和复发率逐渐上升,鉴于化疗较长的疗程及耐药性的出现,调节机体免疫力对于结核病的防治工作具有重要意义。单纯研究 CD8⁺CD28⁺T 细胞、CD8⁺CD28⁻T 细胞和 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞的文章见诸报道,但本次实验从肺结核患者与健康人群之间以上 4 个 T 细胞亚群相比较的角度,发现原有的 Th1/Th2 细胞平衡机制或者某个细胞亚群的作用研究已经不足以解释肺结核的免疫发病机理,结果提示 Th17 细胞、CD8⁺CD28⁺T 细胞、CD8⁺CD28⁻T 细胞和 CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Treg 细胞共同参与了肺结核的发病过程,由此考虑是否可以将其作为患者免疫功能调节的靶点,与化疗药物相结合,从而缩短化疗的疗程,使疾病尽快得到治愈。尽管参与免疫反应的细胞及其产生的细胞因子比较复杂,并且其彼此之间具有网络性的相互作用,但本次实验研究的 4 个细胞亚群的状况至少可以为肺结核的临床诊断、预后及免疫治疗提供一种新的思路。

参考文献

[1] 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.
 [2] 赵雁林,王敬,张海青,等. 天然调节 T 细胞与结核病免疫病理关联[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2010, 30(5):

460-465.

[3] 马晓波,黄家禹,洪强,等. 不同结核病患者 CD4⁺CD25⁺Foxp³⁺ 调节性 T 细胞表达的变化[J]. 国际免疫学杂志, 2010, 33(6): 472-475.
 [4] 张青,肖和平,粟波. 肺结核患者外周血 CD4CD₂₅(high) T 细胞的临床意义初探[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(2): 95-98.
 [5] 李德宪,张天托,谭守勇,等. 外周血辅助性 T 细胞亚群与肺结核严重性及疗效的关系[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(5): 453-457.
 [6] 于韬,杨渝浩,董德琼. CD8⁺CD28⁻T 淋巴细胞在肺结核发病机制中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(2): 130-132.
 [7] 柳红梅. 肺结核患者外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的检测及意义[J]. 上海预防医学, 2010, 22(5): 232-233.
 [8] Roy E, Lowrie DB, Jolles SR. Current strategies in TB immunotherapy[J]. Curr Mol Med, 2007, 7(4): 373-386.
 [9] 高晓明,鲁琰. CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞的研究现状及展望[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(3): 201-202.
 [10] 张蓝方,郝云良. CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞和 Th17 细胞在特发性血小板减少性紫癜中的表达和意义[J]. 临床医学, 2011, 31(9): 1-4.
 [11] 牛倩,黄卓春,蔡蓓,等. 类风湿性关节炎患者外周血 Th17/Treg 细胞比率失衡的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(3): 267-269.
 [12] 高夕雷,钱雷,孙海玲. 慢性乙型肝炎患者外周血 Th17/Treg 和 Th1 免疫失衡研究[J]. 南通大学学报(医学版), 2011, 31(4): 264-266.

(收稿日期:2016-09-01 修回日期:2016-10-20)

(上接第 3433 页)

血清雌二醇水平比异常妊娠组高出很多($P=0.001$),笔者认为此时血清雌二醇水平对评估妊娠结局起重要作用。吴国英等^[9]对住院保胎治疗的 65 例患者血清雌二醇回顾性分析显示:早孕期雌二醇水平逐步上升,认为雌二醇增长速度快提示胎盘功能良好及胚胎或胎儿存活,但雌二醇水平低下往往预后不佳,多数在 8~12 周孕间流产。在进行 4~9 周异常妊娠组孕妇血清雌二醇结果统计过程中也发现这种现象,但部分雌二醇水平降低一段时间后仍会继续增长且预后良好,其中的原因还需要更多的数据进行深入研究。

在早孕期动态监测孕妇血清雌二醇与 β -HCG,是预测复发性流产患者再次妊娠结局有价值的生化指标,具有重要的临床意义。而利用孕酮预测复发性流产患者再次流产的价值有限。

参考文献

[1] Duan L, Yan D, Zeng W, et al. Predictive power progesterone combined with beta human chorionic gonadotropin measurements in the outcome of threatened miscarriage [J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 283(3): 431-435.
 [2] 刘霓,刘炜培,张羽虹,等. 妊娠早期绒毛膜促性腺激素和孕酮的临床意义分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14

(2): 48-49.

[3] 冯蓉. 血清孕酮诊断难免流产及异位妊娠的价值[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2000, 16(4): 215-216.
 [4] 来婷,蒋庆春. 血清孕酮在鉴别宫内早早孕、先兆流产、难免流产及异位妊娠的价值[J]. 中国临床实用医学, 2007, 1(3): 34-36.
 [5] 包狄,耿丽琼. 复发性流产患者早期流产与绒毛膜促性腺激素孕酮的相关性研究[J]. 解放军医药杂志, 2011, 23(4): 29-30.
 [6] Sultan KM, Davis OK, Liu HC, et al. Viable term pregnancy despite "subluteal" serum progesterone levels in the first trimester[J]. Fertil Steril, 1993, 60(2): 363-365.
 [7] 杨燕飞,韦塑峰,蒋健穗. 早期妊娠血 P、E2、HCG 检测临床参考值及意义[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(4): 687-689.
 [8] 楼毅云,傅萍,刘晓荣,等. 血清雌二醇及孕酮与不同中医证型先兆流产患者预后的关系[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(11): 1153-1156.
 [9] 吴国英,王素霞. 连续测定雌二醇水平对先兆流产妊娠结局的预测价值[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(1): 43.

(收稿日期:2016-06-28 修回日期:2016-09-22)