

• 短篇论著 •

结核病感染期间中性粒细胞 CD64、TLR2 和 TLR4 表达变化及其对免疫反应的影响^{*}

蒋秀娣, 姚晓阳, 段爱华, 项舟弘

(上海中医药大学附属第七人民医院检验科, 上海 200137)

摘要:目的 探究结核病感染期间中性粒细胞 CD64、TLR2 和 TLR4 表达变化分析其对免疫反应造成的影响。方法 筛选 2016 年 10 月至 2018 年 3 月来该院呼吸内科就诊的患者, 按患者是否患有结核病分为对照组($n=38$)和观察组($n=36$), 分别检测感染结核分枝杆菌前后其外周血中中性粒细胞和 Toll 样受体(TLRs)的表达水平, 检测中性粒细胞吞噬作用变化。结果 两组感染后 CD64 表达水平均明显高于感染前且观察组均高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 对照组感染后 CD32 表达水平明显提升, 差异有统计学意义($P<0.05$); 对照组感染前 TLRs 表达水平均明显低于观察组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 感染后两组 TLRs 表达量均明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$); 两组感染前后中性粒细胞吞噬作用百分比均明显变化, 差异有统计学意义($P<0.05$), 感染前对照组吞噬作用百分比明显高于观察组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 结核病感染期间, 患者外周血中性粒细胞 CD64、TLR2 和 TLR4 表达水平均明显升高, 且中性粒细胞吞噬功能下降明显。

关键词: 结核病; 中性粒细胞; Toll 样受体; 免疫反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.14.026

中图法分类号: R52

文章编号: 1673-4130(2019)14-1770-03

文献标识码: B

结核病是一种传染病, 通常由结核分枝杆菌(MTB)引起, 潜伏性肺结核往往没有明显症状, 其中 10% 会发展为活动性疾病, 危及生命^[1]。中性粒细胞是先天免疫系统重要组成部分, 属于多形核细胞家族(PMN), 当机体受 MTB 感染时, 中性粒细胞通过血液向受感染部位迁移, 因此其是急性炎症的标志^[2-3]。研究表明, PMN 受细胞因子吸引的免疫反应可能与抗结合病细菌感染相关, 并在早期感染期间起防御作用^[4]。其次, Toll 样受体(TLRs)通常在前体细胞如巨噬细胞和树突细胞上表达, 是一种单跨膜非催化受体, 当感染源到达物理屏障如皮肤或肠道黏膜时, 它们会被 TLRs 识别从而激活免疫反应^[5]。因此本文就 MTB 感染期间, 中性粒细胞和 TLRs 表达情况及其对机体免疫反应产生的影响展开研究, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 筛选 2016 年 10 月至 2018 年 3 月来本院呼吸内科就诊的患者作为研究对象; 纳入标准: 诊断为结核病, 体质量减轻, 持续咳嗽和发烧 2 周以上, 痰涂片抗酸杆菌(AFB 涂片)呈阳性; 排除标准: 糖尿病, 艾滋病病毒/艾滋病和高血压的既往史; 将符合标准的 36 例患者纳为观察组。另外, 选取同期来本科

室就诊的 38 例无结核病患者作为对照组, 其中全部患者均无结核病, 糖尿病或免疫功能低下症的既往病史, 也无近期发烧和/或持续咳嗽情况。对照组男、女比例为 10 : 9, 年龄 20~48 岁, 平均(30.14±10.76)岁; 观察组男、女比例为 10 : 8, 年龄 20~50 岁, 平均(34.35±10.57)岁; 两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 血样采集和处理 分别于清晨 8:00 前通过静脉穿刺收集两组患者肝素化血液。

1.2.2 菌液培养 将本科室保藏 MTB 接种于酸性罗氏培养基, 斜面朝上静置于 37℃ 恒温培养箱中, 每隔 3 d 观察 1 次。长出菌落后, 转接至 MGIT960 液体培养基(含 MGIT 杂菌抑制剂)中, A_{600} 达到 0.8 后待用。

1.2.3 中性粒细胞 Fcγ 受体表达检测 采用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤细胞 2 次, 并用于流式细胞术染色方案, 通过使用小鼠单克隆抗人抗体 CD32(克隆号 FL18.26, eBioscience)-别藻蓝蛋白(APC), CD64(克隆号 10.1, eBioscience)-藻红蛋白花青染色细胞来测定中性粒细胞 Fcγ 受体 CD64 和 CD32 表达。在加入抗体前加入 MTB 菌液($A_{600}=0.8$)30 μL, 37℃ 孵育

^{*} **基金项目:** 上海市浦东新区科技发展基金民生科研专项资金医疗卫生项目(PKJ2016-Y16); 上海中医药大学附属第七人民医院人才培养计划(XX2016_05)。

本文引用格式: 蒋秀娣, 姚晓阳, 段爱华, 等. 结核病感染期间中性粒细胞 CD64、TLR2 和 TLR4 表达变化及其对免疫反应的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(14): 1770-1772.

30 min,检测 CD64 和 CD32 表达^[6]。

1.2.4 TLRs 表达检测 分别取 30 μ L 两组患者肝素化血液,加入抗人 TLR1-PE(克隆号 GD2. F4, eBioscience)、TLR2-PE(克隆号 T2. 5, eBioscience)和 TLR4-PE(克隆号: HTA125, eBioscience)单克隆抗体,孵育 30 min 后用 PBS 清洗 1 次,离心取上清后作为感染前待测样。在加入抗体前加入 MTB 菌液($A_{600}=0.8$)30 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,加入上述抗体重复相同操作后获得 MTB 感染后待测液。通过 QT-PCR 检测 TLR1、TLR2 和 TLR4 相对表达量^[7]。见表 1。

表 1 PCR 引物	
项目	引物
TLR1	上引物 5'-TCT CAC TAT CAA AGC TGA A-3'
	下引物 5'TCC CCA TAA GTA TCT CCT A-3'
TLR2	上引物 5'-CAT GGA GCG CGC GTC CT-3'
	下引物 5'-ACT TAG GCA AAG CCC CG-3'
TLR4	上引物 5'-TGA TGT CTG CCT CGC GCC TG-3'
	下引物 5'-TAG GAA CCA CCT CCA CGC AGG G-3'

1.2.5 中性粒细胞吞噬能力检测 取 100 μ L 肝素化血样做好标记,将 5 nmol/L PMA(Sigma,USA)作为阳性对照,向所有管内加入预冷却的 FITC 标记大肠杆菌($A_{600}=0.8$),加入 100 μ L 猝灭溶液,然后洗涤,裂解并固定,将细胞悬浮液与染色溶液一起温育,并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 10 min。使用蓝绿激发光(488 nm 氩离子激光),通过 FACS Calibur 流式细胞仪(Becton Dickinson,USA)分析细胞。在加入抗体前加入 MTB 菌液($A_{600}=0.8$)30 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,再次通过流式细胞仪检测获得感染后中性粒细胞吞噬能力结果^[8]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS24.0 先进行正态性检验,若满足正态性且组间方差齐,采用 t 检验进行组间比较,反之则考虑非参数 Mann-Whitney U 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料以 $[n(\%)]$ 表示,采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,所有检验均为双侧检验。

2 结 果

2.1 两组感染前后中性粒细胞表达比较 两组感染后 CD64 表达水平均明显高于感染前,而且观察组均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);对照组感染后 CD32 表达水平明显提升,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

2.2 两组感染前后 TLRs 相对表达量比较 对照组感染前 TLRs 表达水平均明显低于观察组,差异有统计学意义($P<0.05$);感染后两组 TLRs 表达量均明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

2.3 两组感染前后中性粒细胞吞噬能力比较 两组感染前后中性粒细胞吞噬作用百分比均明显变化,差

异有统计学意义($P<0.05$);对照组感染前吞噬作用百分比明显高于观察组,差异有统计学意义($P<0.05$),两组感染后吞噬作用百分比比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3,图 2。

表 2 两组感染前后中性粒细胞表达比较				
组别	<i>n</i>		CD64	CD32
对照组	38	感染前	3.64 $\pm$ 2.34	15.79 $\pm$ 9.42
		感染后	19.05 $\pm$ 7.33	22.26 $\pm$ 7.11
		t_1	12.346	3.379
		P_1	<0.05	<0.05
观察组	36	感染前	25.42 $\pm$ 10.57 [#]	17.57 $\pm$ 10.63
		感染后	39.87 $\pm$ 11.41 [#]	21.73 $\pm$ 8.26
		t_2	5.574	1.854
		P_2	<0.05	>0.05

注:与对照组比较, [#] $P<0.05$

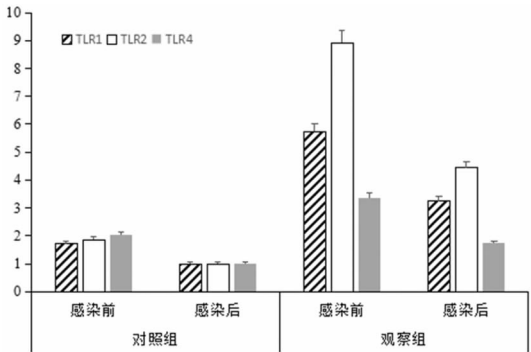
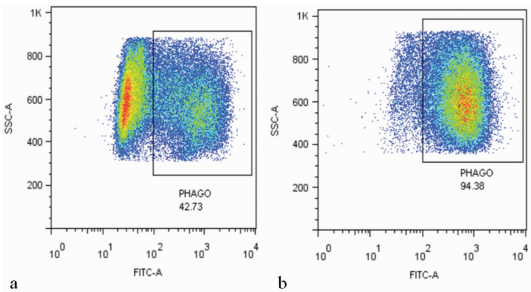


图 1 两组感染前后 TLRs 相对表达量比较

表 3 两组感染前后中性粒细胞吞噬能力对比					
组别	<i>n</i>	感染前	感染后	t_1	P_1
对照组	38	75.00 $\pm$ 30.50	97.76 $\pm$ 4.15	4.558	<0.05
观察组	36	50.50 $\pm$ 15.30	98.57 $\pm$ 5.13	17.873	<0.05
		t_2	4.330	0.749	
		P_2	<0.05	>0.05	



注:a 为对照组;b 为观察组

图 2 两组中性粒细胞吞噬能力比较

3 讨 论

结核病活动期患者可通过咳嗽、吐痰、说话或者喷嚏在空气中传播 MTB,使周围人的人收到感染^[1,9]。筛选发病高危人群,早期发现并接种卡介苗(BCG)疫苗可避免疾病发生,对于可能患病的患者,

需要长期服用多种抗菌药物进行治疗^[10]。但抗菌药物耐药性是一个日益严重的问题,现已发现多重耐药结核病(MDR-TB)和广泛耐药结核病(XDR-TB)发病率在不断上升^[11]。因此针对结核病治疗和 MTB 抑制的研究非常必要,本研究针对 MTB 感染期间中性粒细胞及其受体、TLRs 表达变化,中性粒细胞吞噬作用变化展开研究。

研究表明,在结核感染期间病原体识别的初始阶段,中性粒细胞提供显著的免疫抗性,这表现为对病原体的吞噬作用、细胞凋亡和下游免疫反应的激活等^[12]。在吞噬作用中 Fc γ 受体起重要作用,它们在所有吞噬细胞上表达。在本研究中,观察两组感染后各项指标发现,CD64 表达水平平均明显高于感染前和同时段对照组,说明结核病患者外周血中 Fc γ 受体明显高于对照组,该受体增加量明显高于感染 MTB 者,说明 Fc γ 受体是参与抗原吞噬作用和相关功能调节。因此,CD64 的表达水平用作诊断结核病的额外标志物具有相当重要的意义。

在结核病中,除中性粒细胞 Fc γ 受体外,TLRs 也被认为在 MTB 识别中起着至关重要的作用。已有报道显示,结核病患者血液中的中性粒细胞通过 TLR2 识别 MTB^[13]。在研究中观察到 MTB 感染的中性粒细胞中 TLR2 的表达增加,概述了中性粒细胞 TLR2 对 MTB 菌株的识别和响应。同时,有研究表明当 TLR4 被阻断时,BCG 感染的 CXCL8 产生显著减少^[14-15]。在本研究中也观察到了类似的变化,感染后 TLRs 表达量均明显上升,说明 TLRs 表达受 MTB 菌株的影响。在实验中还发现,感染 MTB 时结核病患者血液中 TLRs 表达明显高于对照组,说明中性粒细胞在进一步感染 MTB 后能够快速进行 TLRs 介导的活化反应。对比外周血中中性粒细胞吞噬大肠杆菌能力发现,感染前对照组吞噬作用百分比明显高于观察组,表明中性粒细胞由于 MTB 感染而经历功能恶化。

虽然研究者强调了中性粒细胞在结核病中诊断的重要性,就目前观察还可进行深入。下一步可以对 TLRs 受 Fc γ 刺激后吞噬作用及其导致的下游信号变化展开研究,进一步了解结核病期间中性粒细胞间修饰为中性粒细胞介导的诊断、药物设计和治疗打下基础。

总而言之,结核病感染期间,患者外周血中性粒细胞 CD64、TLR2 和 TLR4 表达水平平均明显升高,且中性粒细胞吞噬功能下降明显。

参考文献

[1] FALZON D, SCHÜNEMANN H J, HARAUSZ E, et al. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update [J]. Eur Respir J, 2017, 49(3):1602308.

[2] WANG J, HOSSAIN M, THANABAL A, et al. Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair[J]. Science, 2017, 358(6359):111-115.

[3] NAVEGANTES K C, GOMES R D, TARTARI P A, et al. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity[J]. J Transl Med, 2017, 15(1):36-57.

[4] FARIDGOHAR M, NIKOUEINEJAD H. New findings of Toll-like receptors involved in Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Pathog Glob Health, 2017, 111(5):256-264.

[5] DALLENGA T, REPNIK U, CORLEIS B, et al. M-tuberculosis-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages[J]. Cell Host Mic, 2017, 22(4):519-530.

[6] 张庭艳, 关瑞莲, 梁红, 等. 中性粒细胞 CD64 对新生儿感染早期判断的研究[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(13):2205-2208.

[7] 陈静思, 孙晨, 阳海平, 等. 过敏性紫癜患者中性粒细胞及其 IgA Fc 受体对血管内皮细胞凋亡的影响及机制[J]. 中华皮肤科杂志, 2017, 50(11):795-799.

[8] 陆姗姗, 陈益国, 张咏, 等. TLR2 配基 Pam3CSK4 对小鼠中性粒细胞吞噬耐甲氧西林金黄色葡萄球菌功能的影响[J]. 现代预防医学, 2018, 20(8):1453-1457.

[9] 胥江俊, 胡屹, 蒋伟利, 等. 上海市流动人口肺结核患者密切接触者结核分枝杆菌潜伏感染情况及危险因素[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(1):25-29.

[10] CLARK S, LANNI F, MARINOVA D, et al. Revaccination of Guinea Pigs with the live attenuated mycobacterium tuberculosis vaccine MTBVAC improves BCG's protection against tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2017, 216(5):525-533.

[11] MARAIS B J, SINTCHENKO V. Epidemic spread of multidrug-resistant tuberculosis in China[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(3):238-239.

[12] AWONIYI D O, TEUCHERT A, SUTHERLAND J S, et al. Evaluation of cytokine responses against novel Mtb antigens as diagnostic markers for TB disease[J]. J Infect, 2016, 73(3):219-230.

[13] GU X, GAO Y, MU D G, et al. MiR-23a-5p modulates mycobacterial survival and autophagy during mycobacterium tuberculosis infection through TLR2/MyD88/NF- κ B pathway by targeting TLR2[J]. Exp Cell Res, 2017, 354(2):71-77.

[14] ALARIDAH N, WINQVIST N, HAKANSSON G, et al. Impaired CXCR1-dependent oxidative defence in active tuberculosis patients[J]. Tubercu, 2015, 95(6):744-750.

[15] RONNELID J. Granulocyte-augmented chemokine production induced by type II collagen-containing immune complexes is mediated via TLR4 in rheumatoid arthritis patients[J]. Europ J Immunol, 2016, 46(12):2822-2834.