

CD4+CD25+Foxp3+T 淋巴细胞抑制耐药肺结核患者机体细胞免疫研究

尹 柯, 杨 励, 李圆菲, 谢和宾, 喻 容, 刘超群

(长沙市中心医院, 湖南 长沙 410004)

[摘 要] **目的** 了解耐药肺结核患者外周血中 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞及其分泌的细胞因子转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、白细胞介素 - 10 (IL-10) 的表达水平与非耐药肺结核患者和健康对照者的差异, 并探讨其在抑制特异细胞免疫反应中的作用。**方法** 应用流式细胞技术分别对 30 例健康成人 (健康对照组)、39 例非耐药肺结核患者 (普通肺结核组) 及 35 例耐药肺结核患者 (耐药肺结核组) 的外周血 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞和 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞表达水平进行检测; 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测不同组别人群外周血血清中 TGF- β_1 、IL-10 水平。**结果** 健康对照组成人外周血中 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞和 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞分别占 CD4 + 细胞总数的 (17.09 ± 5.43)% 和 (0.78 ± 0.88)%; 普通肺结核组外周血中上述两种细胞分别占 CD4 + 细胞总数的 (22.12 ± 3.43)% 和 (2.79 ± 1.65)%; 耐药肺结核组外周血上述两种细胞分别占 CD4 + 细胞总数的 (24.01 ± 5.65)% 和 (4.51 ± 1.47)%。耐药肺结核组外周血中 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞所占 CD4 + T 淋巴细胞的比例较普通肺结核组高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 耐药肺结核组 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞的比例明显高于健康对照组及普通肺结核组 ($P < 0.05$), 并且耐药肺结核组 TGF- β_1 [(4.15 ± 1.39) ρ /ng · L⁻¹], IL-10 [(872.17 ± 269.75) μ g/L] 明显高于普通肺结核组 [分别为 (3.03 ± 1.42) ρ /ng · L⁻¹, (266.83 ± 57.09) μ g/L] 和健康对照组 [分别为 (2.12 ± 0.77) ρ /ng · L⁻¹, (105.21 ± 23.56) μ g/L] ($P < 0.05$)。**结论** CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞可能削弱结核病患者机体免疫系统对感染结核分枝杆菌的清除作用, 是导致结核病感染慢性化且出现耐药的原因之一; TGF- β_1 、IL-10 可能参与抑制机体细胞免疫, 与耐药结核病的形成和严重程度有一定相关性。

[关键词] 结核, 肺; CD4 + CD25 + T 淋巴细胞; CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞; 转化生长因子 β_1 ; 白细胞介素-10

[中图分类号] R521 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)05-0328-04

Inhibition of cellular immune response by CD4 + CD25 + Foxp3 + T lymphocyte in drug-resistant tuberculosis patients

YIN Ke, YANG Li, LI Yuan-fei, XIE He-bin, YU Rong, LIU Chao-qun (Changsha Central Hospital, Changsha 410004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the difference in CD4 + CD25 + Foxp3 + T lymphocytes and their secretion of cytokines transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and interleukin-10 (IL-10) among drug-resistant tuberculosis (DR-TB) patients, non-drug-resistant tuberculosis (non-DR-TB) patients and healthy control subjects, and evaluate its role in the inhibition of specific cellular immune response. **Methods** Flow cytometry was applied to detect the expression levels of peripheral blood CD4 + CD25 + T lymphocytes and CD4 + CD25 + Foxp3 + T lymphocytes in 30 healthy subjects (control group), 39 non-DR-TB patients (non-DR-TB group) and 35 DR-TB patients (DR-TB group); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect TGF- β_1 and IL-10 levels in peripheral blood in different groups. **Results** CD4 + CD25 + T and CD4 + CD25 + Foxp3 + T lymphocytes accounted for (17.09 ± 5.43)% and (0.78 ± 0.88)% respectively of total number of CD4 + T cells in the peripheral blood of control

[收稿日期] 2012-07-30

[基金项目] 国家“十二五”“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项——中医药防治结核病临床科研基地建设项目 (2012ZX10005010-003)

[作者简介] 尹柯 (1977-), 女 (汉族), 湖南省邵阳市人, 主治医师, 主要从事呼吸道疾病免疫机制研究。

[通讯作者] 尹柯 E-mail: doctoryinke@yahoo. com. cn

group, $(22.12 \pm 3.43)\%$ and $(2.79 \pm 1.65)\%$ respectively in non-DR-TB group, $(24.01 \pm 5.65)\%$ and $(4.51 \pm 1.47)\%$ respectively in DR-TB group. The percentage of CD25 + CD4 + T lymphocytes in CD4 + T lymphocytes in DR-TB group was higher than that of non-DR-TB group, but the difference was not significant ($P > 0.05$); the percentage of CD4 + CD25 + Foxp3 + T lymphocytes in CD4 + T lymphocytes in DR-TB group was significantly higher than control and non-DR-TB group ($P < 0.05$), and levels of TGF- β_1 ($[4.15 \pm 1.39] \rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$) and IL-10 ($[872.17 \pm 269.75] \mu\text{g}/\text{L}$) were significantly higher than those of non-DR-TB group ($[3.03 \pm 1.42] \rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ and $[266.83 \pm 57.09] \mu\text{g}/\text{L}$, respectively) as well as control group ($[2.12 \pm 0.77] \rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ and $[105.21 \pm 23.56] \mu\text{g}/\text{L}$, respectively) ($P < 0.05$). **Conclusion** CD4 + CD25 + Foxp3 + T lymphocytes may weaken elimination function of immune system on *Mycobacterium tuberculosis* in TB patients, and related to the progress of tuberculosis infection as well as multidrug-resistance. TGF- β_1 and IL-10 may be involved in the inhibition of cellular immunity and have some correlation with the formation and the severity of the DR-TB.

[Key words] tuberculosis, pulmonary; CD4 + CD25 + T lymphocytes; CD4 + CD25 + Foxp3 + T lymphocytes; transforming growth factor- β_1 ; interleukin-10

[Chin Infect Control, 2012, 11(5):328-331]

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种慢性全身性传染病。近年来,结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)耐药,尤其是耐多药结核(multi-drug-resistant tuberculosis, MDR-TB)和广泛耐药结核病(extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB)的流行与传播引起了全球各国学者的关注。世界卫生组织(WHO)最新统计显示,全球有 39 万~51 万例耐多药结核患者,其中 50% 分布在印度和中国^[1]。我国是全球 22 个结核病流行严重的国家之一,同时也是全球 27 个耐药结核高负担国家之一。耐药结核患者往往控制难度和经济耗费均很大。耐药结核病已对全球结核病控制构成了严重的威胁。

目前人们对决定耐多药肺结核患者结核菌感染呈慢性化的因素和结核特异免疫反应被抑制的原因还缺乏清楚的认识^[2]。本研究通过对耐药肺结核患者的 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞数量及转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)数值的检测,了解耐药肺结核患者的 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞与普通肺结核患者机体内的有何差异,其是否在耐药肺结核病的特异免疫中也起相应的免疫调节作用,并探讨 TGF- β_1 、IL-10 是否可作为病情严重程度的观察指标之一。

1 对象与方法

1.1 研究对象 耐药肺结核组:2010 年 9 月—2012 年 1 月诊断为耐药肺结核的患者 35 例,其中男性 19 例,女性 16 例,年龄 26~68 岁,平均 $(38.30 \pm$

10.34)岁;普通肺结核组:同期诊断为非耐药肺结核的患者 39 例,其中男性 20 例,女性 19 例,年龄 20~62 岁,平均 (39.54 ± 8.34) 岁;健康对照组:同期在社区进行流行病学调查筛查出的健康人 30 例,其中男性 14 例,女性 16 例,年龄 16~64 岁,平均 (33.21 ± 9.98) 岁。各组间的年龄、性别分布无差异。

1.2 诊断标准 耐药肺结核诊断标准参照中华医学会耐药结核病规划管理指南^[3]:即肺结核患者感染的结核杆菌,体外细菌培养或基因芯片技术被证实至少对异烟肼及利福平耐药。非耐药肺结核诊断标准参照 2001 年结核病诊断和分型标准^[4]。本次调查通过医院研究中心伦理委员会批准,入选对象均签署知情同意书。

1.3 方法

1.3.1 主要试剂与设备 流式细胞仪(FACSCalibur)购自美国 Becton Dickinson 公司; anti-CD4 FITC(IgG1)、anti-CD25 PE(IgG2 α)和 FOXp3 PE-CY5 均购自美国 BD Pharmingen 公司;人 TGF- β_1 、IL-10 检测试剂盒购自美国 ADL 公司。

1.3.2 外周血中 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞的百分含量检测 采集患者入院后第 2 天清晨空腹静脉血 2 mL,肝素抗凝,充分混匀后室温保存,24 h 内用流式细胞仪进行检测。采用直接荧光标记法测定 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞的百分含量,并分析 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞中表达 Foxp3 + 的细胞比例。

1.3.3 外周血清中 TGF- β_1 、IL-10 水平检测 采集患者入院后第 2 天清晨空腹静脉血 2 mL,分离血清,置 -80°C 冰箱冻存待检;严格按酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书操作,绘制标准曲线,根据样品吸光度值在标准曲线图上查出相应 TGF- β_1 、

IL-10 含量。

1.4 统计方法 应用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行分析,3 组数据均为正态分布,故以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析进行 3 组间的比较,SNK 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞和 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞的表达 见表 1。耐药肺结核组、普通肺结核组、健康对照组 3 组间 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞占 CD4 + T 淋巴细胞的比值,差异有

统计学意义($F = 18.21, P < 0.05$);两两比较,耐药肺结核组、普通肺结核组外周血中 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞占 CD4 + T 淋巴细胞总数的比例较健康对照组高,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),普通肺结核组与耐药肺结核组差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 组患者外周血中 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞占 CD4 + T 淋巴细胞的比例差异有统计学意义($F = 14.75, P < 0.05$);两两比较,耐药肺结核组、普通肺结核组外周血中 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞的比例较健康对照组高,耐药肺结核组较普通肺结核组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 外周血中 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞和 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞的表达 [$\bar{x} \pm s$], %]

Table 1 Expression level of peripheral blood CD4 + CD25 + and CD4 + CD25 + Foxp3 + T lymphocytes [$\bar{x} \pm s$], %]

Group	n	(CD4 + CD25 +)/CD4 +	(CD4 + CD25 + Foxp3 +)/CD4 +
Control group	30	17.09 ± 5.43	0.78 ± 0.88
non-DR-TB group	39	22.12 ± 3.43*	2.79 ± 1.65*
DR-TB group	35	24.01 ± 5.65*	4.51 ± 1.47*#

* vs control group, $P < 0.05$; # vs non-DR-TB group, $P < 0.05$

2.2 IL-10、TGF- β_1 水平 耐药肺结核组、普通肺结核组、健康对照组间 TGF- β_1 、IL-10 水平,差异有统计学意义($F = 31.25, P < 0.05$);两两比较,耐药肺结核组外周血中 TGF- β_1 、IL-10 明显高于普通肺结核组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 IL-10、TGF- β_1 水平变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Levels of IL-10 and TGF- β_1 in the peripheral blood of different groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	IL-10($\mu\text{g/L}$)	TGF- β_1 ($\text{pg} \cdot \text{ng}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)
Control group	30	105.21 ± 23.56	2.12 ± 0.77
non-DR-TB group	39	266.83 ± 57.09*	3.03 ± 1.42*
DR-TB group	35	872.17 ± 269.75*#	4.15 ± 1.39*#

* vs control group, $P < 0.05$; # vs non-DR-TB group, $P < 0.05$

3 讨论

结核病的免疫是 T 淋巴细胞介导的细胞免疫,CD4 + T 淋巴细胞及其亚群的平衡状态对结核病的发病和演变具有决定性意义,与疾病的转归和预后密切相关^[5]。国外研究结果^[6]也证实 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞可通过抑制过强的 Th1 细胞免疫反应对机体造成免疫病理损害。增加的 CD4 + CD25 + T

淋巴细胞可能主要与结核分枝杆菌感染有关,能抑制特异性结核分枝杆菌的 T 细胞反应,从而促进结核病的发生^[7]。研究表明^[8-11],CD4 + CD25 + Foxp3 + 调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)分泌的 IL-10 和 TGF- β_1 能抑制干扰素(IFN)- γ 介导的杀结核分枝杆菌作用,有效下调炎症反应,从而有助于结核分枝杆菌生存。

CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞也称 CD4 + CD25 + 调节性 T 细胞,是一种具有免疫调节功能(主要是免疫抑制功能)的 T 淋巴细胞,能进入机体周围组织抑制其他自身免疫细胞,这样使机体保持自身耐受,防止自身免疫性疾病的产生,但这也削弱了机体对感染病原菌的免疫抑制反应^[6-8]。

本研究发现耐药及非耐药肺结核患者外周血中 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞和 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞数占 CD4 + 细胞总数的比例明显高于健康人,说明结核菌感染使机体产生更多 CD4 + CD25 + T 淋巴细胞和 CD4 + CD25 + Foxp3 + 调节性 T 细胞。而且耐药肺结核患者的 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞较非耐药肺结核患者显著增高,显示 CD4 + CD25 + Foxp3 + 调节性 T 细胞在耐药肺结核患者机体的细胞免疫中作用更为强大。作为 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞分泌的产物 TGF- β_1 、

IL-10,在一定程度上可以体现 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞的活性程度。耐药肺结核患者与非耐药肺结核患者外周血中的 TGF- β_1 、IL-10 明显高于健康人,且耐药肺结核患者的 TGF- β_1 、IL-10 也较非耐药肺结核患者显著增高,这与 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞的表达增高相一致。说明耐药肺结核患者在对多种抗结核药物耐药的同时,机体的细胞免疫功能同样减弱,其抑制了耐药结核病患者抵御耐药结核菌的侵袭能力,因此,能够比较充分地说明 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞对于耐药肺结核免疫抑制的重要作用。

总之,耐药肺结核患者机体抗结核免疫反应增强,增多的 CD4 + CD25 + Foxp3 + T 淋巴细胞在一定程度上抑制了抗结核菌感染的免疫力,使结核菌在体内长期生存,感染呈慢性化表现,并可能与结核菌出现多重耐药具有密切的相关性,而且 TGF- β_1 、IL-10 可能参与抑制机体细胞免疫并与耐药结核病的严重程度具有一定相关性。

[参考文献]

[1] World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). 2010 global report on surveillance and response; WHO report 2010[R]. 2010.

[2] Chiacchio T, Casetti R, Butera O, *et al.* Characterization of regulatory T cells identified as CD4(+)CD25(high)CD39(+) in

patients with active tuberculosis[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 156(3):463-470.

- [3] 中华医学会结核病学分会. 耐药结核病规划管理指南[S]. 北京, 2008.
- [4] 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(2):70-74.
- [5] Furuhashi K, Shirai T, Suda T, *et al.* Inflammatory markers in active pulmonary tuberculosis: association with Th1/Th2 and Tc1/Tc2 balance [J]. Kekkaku, 2012, 87(1):1-7.
- [6] Guyot-Revol V, Innes J A, Hackforth S, *et al.* Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 173(7):803-810.
- [7] Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Rojas R, *et al.* A role for CD4 + CD25 + T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 144(1):25-34.
- [8] Sharma P K, Saha P K, Singh A, *et al.* Foxp3 + regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(11):1061-1070.
- [9] Hougardy J M, Place S, Hildebrand M, *et al.* Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(4):409-416.
- [10] Rook G A. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis[J]. Curr Mol Med, 2007, 7(3):327-337.
- [11] He X Y, Xiao L, Chen H B, *et al.* T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29(6):643-650.

(上接第 344 页)

[5] Li H, Sang J, Li R, *et al.* Disseminated *Penicillium marneffei* infection with verrucoid lesions in an AIDS patient in Beijing, a non-endemic region[J]. Eur J Dermatol, 2010, 20(3):378-380.

[6] 魏寿忠, 刘光惠, 郑新兰, 等. 艾滋病合并马尔尼菲青霉菌败血症的实验室诊断[J]. 国际检验医学, 2009, 30(11):1102-1103.

[7] Sudjaritruk T, Sirisanthana T, Sirisanthana V. Immune reconstitution inflammatory syndrome from *Penicillium marneffei* in an

HIV-infected child: a case report and review of literature[J]. BMC Infect Dis, 2012, 12:28.

- [8] 郭彩萍, 王景泉, 李在村, 等. 两性霉素 B 治疗 HIV/AIDS 合并新型隐球菌脑膜脑炎的疗效及不良反应[J]. 中国全科医学, 2006, 9(24):2041-2042.
- [9] Li M, Liao Y, Chen M, *et al.* Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China[J]. Braz J Infect Dis, 2012, 16(2):175-179.