

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.30.013

结核患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与巨噬细胞凋亡的临床意义*

周 安¹,徐巧玲²,李明强¹,刘清蒙^{1△}

(1. 遵义医学院微生物学教研室,贵州遵义 563000;2. 贵州航天医院肺科,贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 探讨结核病患者外周血单个核细胞(PBMC)中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞(Treg)表达与单核巨噬细胞(MΦ)凋亡的可能关系及临床意义。**方法** 用流式仪测定 29 例活动性结核、17 例肺外结核患者治疗前及治疗后 3、6 个月 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达及 MΦ 凋亡率,并与 20 例健康对照者(健康对照组)进行比较。**结果** 活动性结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达明显高于健康对照组和治疗后患者,且复治患者高于初治患者,肺外结核高于肺结核;患者 MΦ 凋亡率明显高于健康对照组($P < 0.01$),初治组明显高于复治组($P < 0.01$)。活动性结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与 MΦ 凋亡呈负相关。**结论** CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达升高,MΦ 凋亡下降,提示与结核病呈慢性感染有关。

[关键词] 活动性结核;外周血单个核细胞;CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞;单核巨噬细胞凋亡

[中图分类号] R52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)30-4217-03

The clinical significance of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg expression and macrophage apoptosis in patients with tuberculosis*

Zhou An¹, Xu Qiaoling², Li Mingqiang¹, Liu Qingmeng^{1△}

(1. Department of Microbiology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China;

2. Tuberculosis Ward of Guizhou Aerospace Hospital, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the possible relationship between CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg expression and macrophage apoptosis in peripheral blood mononuclear cell(PBMC) in patients with tuberculosis and its clinical significance. **Methods** The expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg before treatment and 3 and 6 months after treatment in PBMC and the apoptosis rate of monocytes in 29 patients with active tuberculosis and 17 patients with extrapulmonary tuberculosis were measured by flow cytometry, and the results were compared with those of 20 healthy controls(healthy control group). **Results** The proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg in PBMC of active tuberculosis patients was significantly higher than that of controls and treated patients ($P < 0.01$), and the proportion of re-treatment patients was higher than that of primary treatment patients. The proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg in PBMC from the extra-pulmonary tuberculosis patients was higher than that of pulmonary tuberculosis patients($P < 0.01$). The apoptosis rate of monocytes of patients with tuberculosis was higher than that of the control group($P < 0.01$), and the apoptosis rate of primary treatment patients were higher than that of re-treatment patients($P < 0.01$). The expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg in patients with active tuberculosis was negatively correlated with the apoptosis of macrophages in PBMC. **Conclusion** The expression of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg is increased, and the apoptosis of macrophages is decreased, which might be related to chronic infection of tuberculosis.

[Key words] active tuberculosis; peripheral blood mononuclear cell; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg; macrophage apoptosis

据世界卫生组织(WHO)2010 年全球结核病控制报告显示,结核病仍是危害人类健康的主要疾病之一^[1]。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 淋巴细胞(regulatory T cell, Treg)是一种具有多种免疫调节功能的 Treg,经细胞接触依赖或抑制性细胞因子依赖机制主动抑制自身免疫性 T 淋巴细胞活化,维持自身免疫耐受,防止自身免疫性疾病的产生,但 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达增高可抑制机体抗感染免疫应答^[2-5]。近年来发现,细胞凋亡在结核病的发生、发展中起着重要作用,而活动性肺结核患者,初治及复治结核病患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与单核巨噬细胞(macrophage, MΦ)凋亡之间有何关联及临床意义,鲜见报道,本文就此进行

了初步探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 观察组 46 例,为就诊于遵义医学院附属医院和贵州航天医院的结核病患者,男 27 例,女 19 例,平均年龄(37.2±4.8)岁,患者诊断均符合《WS288-2008 肺结核诊断标准》。其中,肺结核 29 例纳入肺结核组;血性播散性结核 5 例,结核性胸膜炎 8 例,淋巴结核 3 例,盆腔结核 1 例均纳入肺外结核组;按化疗史分类,初治患者 28 例(初治组),复治患者 18 例(复治组)。健康对照组 20 例,男 13 例,女 7 例;平均年龄(32.8±7.3)岁,均未感染传染病和罹患其他慢性疾病,均未服用糖皮质激素等药物。

1.2 仪器与试剂 抗 CD4-藻红蛋白(CD4-PE)、抗 CD25-异

硫氰酸荧光素 (CD25-FITC) 和抗 Foxp3-AOC (美国 BD 公司); 红细胞裂解液 (美国 Solarbio 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman-Coulter 和 BD 公司); Annexin-V-FITC 细胞凋亡试剂盒 (南京凯基生物)。

1.3 方法

1.3.1 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 的检测 严格按试剂盒说明书操作。取清晨空腹肝素抗凝静脉血 3 mL, 加入红细胞裂解液混匀, 4 °C 放置 15 min, 其间混匀 2 次, 离心洗涤细胞, 调细胞数至 1×10^4 , 加入抗 CD4-FITC 和抗 CD25-PE 单克隆抗体各 10 μ L, 室温暗室孵育 20 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤, 加入抗 Foxp3-AOC 单克隆抗体 10 μ L, 室温暗室孵育 2.5 h, 洗涤重悬细胞后经流式仪测定。

1.3.2 M ϕ 凋亡检测 严格按试剂盒说明书操作。M ϕ 的分离培养参照文献 [6] 进行, 用 Ficoll 分离单个核细胞, 洗涤重悬后, 以每孔 1×10^5 个的细胞量加入 24 孔培养板, 在 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 孵育 3 h, 贴壁细胞洗涤 3 次, 按试剂盒说明书加入各试剂, 室温避光反应 15 min, 离心、洗涤沉淀细胞经流式仪测定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计描述和统计分析。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞百分比及 M ϕ 凋亡率均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 SNK 法。PBMC 凋亡因方差参差不齐, 组间比较采用非参数检验 (秩和检验), 两两比较采用扩展 *t* 检验法。患者治疗前后比较采用重复测量资料方差分析及两两比较。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺与肺外结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达及 M ϕ 凋亡 肺结核组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达及 M ϕ 凋亡率明显高于健康对照组 ($P < 0.01$); 肺外结核组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达明显高于肺结核组 ($P < 0.01$), 而 M ϕ 凋亡率却低于肺结核组 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与 M ϕ 凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg	M ϕ 凋亡
肺结核组	29	9.37 ± 3.46*#	12.32 ± 5.76* Δ
肺外结核组	17	13.84 ± 5.14*	8.22 ± 4.23*
健康对照组	20	4.18 ± 2.04	3.34 ± 1.26
<i>F/K₂</i>		32.67	36.37
<i>P</i>		0.00	0.00

*: $P < 0.01$, 与健康对照组比较; #: $P < 0.01$, Δ : $P < 0.05$, 与肺外结核组比较。

2.2 初治和复治结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达及 M ϕ 凋亡 初治组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达明显低于复治组 ($P < 0.01$); 初治组 M ϕ 凋亡率明显高于复治组 ($P < 0.01$); 但两组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达及 M ϕ 凋亡率均明显高于健康对照组 ($P < 0.01$), 见表 2。

2.3 治疗前后肺结核病患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达及 M ϕ 凋亡 经重复测量资料方差分析及两两比较, 治疗前 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达明显高于治疗后 3、6 个月 ($P < 0.01$), 但治疗后 3 个月与治疗后 6 个月比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。M ϕ 凋亡率治疗前明显高于治疗后

3、6 个月 ($P < 0.01$), 治疗后 3 个月与治疗后 6 个月比较, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。治疗后 6 个月患者 M ϕ 凋亡率 [(4.78 ± 2.39)%] 与健康对照组 [(3.34 ± 1.26)%] 比较, 差异无统计学意义 ($t = 2.004, P = 0.051$)。

表 2 不同结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与 M ϕ 凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg	M ϕ 凋亡
初治结核组	28	8.34 ± 3.16*#	16.34 ± 5.56*#
复治结核组	18	14.84 ± 5.15*	9.81 ± 5.21*
健康对照组	20	4.18 ± 2.04	3.34 ± 1.26
<i>F/K₂</i>		42.98	41.80
<i>P</i>		0.00	0.00

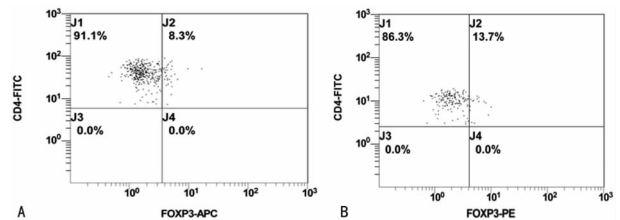
*: $P < 0.01$, 与健康对照组比较; #: $P < 0.01$, 与复治结核组比较。

表 3 治疗后肺结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与 M ϕ 凋亡率 ($n = 29, \bar{x} \pm s, \%$)

时间	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg	M ϕ 凋亡
治疗前	12.19 ± 4.44	11.69 ± 5.46
治后 3 个月	8.56 ± 3.93*	7.84 ± 3.67*
治后 6 个月	6.58 ± 3.23*	4.78 ± 2.39*#
<i>F</i>	15.308	21.125
<i>P</i>	0.000	0.000

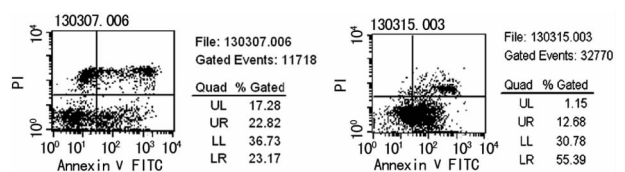
*: $P < 0.01$, 与治疗前比较; #: $P < 0.05$, 与治疗 3 个月比较。

2.4 结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与 M ϕ 凋亡流式细胞 初治患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达率为 8.3%; 复治患者为 13.7%, 见图 1。初治患者 M ϕ 凋亡率为 22.82%; 复治患者为 12.68%, 见图 2。



A: 初治患者; B: 复治患者。

图 1 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 流式细胞图



A: 初治患者; B: 复治患者。

图 2 M ϕ 凋亡流式细胞图

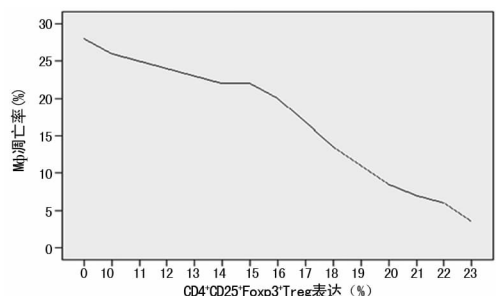


图 3 结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与 M ϕ 凋亡率的相关性分析

2.5 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与 M ϕ 凋亡的相关性分析 对结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与 M ϕ 凋亡率做相关性分析,结果显示 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达与 M ϕ 凋亡率呈负相关($r=-0.478, P<0.05$),见图 3。

3 讨 论

Foxp3 是 Treg 特异表型和功能标志,Treg 的数量和功能失调与多种重大疾病的发生、发展和结局密切相关^[7-9]。免疫抑制性是 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 最重要的特性,可抑制机体抗感染免疫和抗肿瘤免疫效应,现认为 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 与多种慢性感染性疾病的发生、发展有关,与结核病发病亦可能有关^[2,10],其详细机制尚不清楚。本试验结果显示,活动性结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达明显高于健康对照组和治疗后患者,且复治组明显高于初治患者。说明活动性结核患者由于 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达水平增高,抑制机体抗结核免疫功能,可导致效应性 CD4⁺T、CD8⁺T 及 NK 等杀伤性细胞的活化受抑制,引起特异性细胞免疫及其产生的免疫效应水平下降,最终抑制 M ϕ 的激活,这与结核病的发生和发展应密切相关。郭净等^[11]用抗结核合剂减少初治肺结核患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Treg 的细胞数量,并下调 Foxp3 mRNA 的表达,从而调节机体抗结核免疫功能,取得一定的临床疗效。提示 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 参与了结核病的发生和发展。

M ϕ 具有天然免疫和获得性免疫两大功能,且协调宿主有效免疫应答。本文研究结果显示,活动性结核患者 PBMC 中 M ϕ 凋亡率明显高于健康对照组($P<0.01$)。初治组明显高于复治组($P<0.01$)。患者治疗 3 个月高于治疗 6 个月与健康对照组($P<0.05$),治疗 6 个月与健康对照组无明显差异($P>0.05$)。肺外结核组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达明显高于肺结核组($P<0.01$),而 M ϕ 凋亡率却明显低于肺结核组($P<0.05$),且两者呈负相关(图 3)。上述结果均提示结核病初期,M ϕ 凋亡明显高于健康人群,这对杀灭入侵机体的结核分枝杆菌有利,随着病程延长,患者 PBMC 中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 表达升高,M ϕ 凋亡下降,机体天然和获得性免疫功能均受损,入侵结核分枝杆菌逃逸机体免疫功能杀伤,在体内顽强生长繁殖并休眠于 M ϕ 中,导致结核病迁延不愈。有研究报道,局部浸润的 Treg 通过抑制结核分枝杆菌抗原特异性效应 T 淋巴细胞的免疫反应,一方面限制过强免疫应答所造成的过度自身组织病理损伤,另一方面可使结核分枝杆菌逃逸免疫攻击,从而导致和维持细菌在体内的慢性感染^[2]。

目前,尚不清楚结核病免疫功能紊乱的详细机制、决定结核分枝杆菌感染呈慢性化的因素和结核特异免疫应答被抑制的原因。本文结果与相关报道相一致^[12-14],活动性结核患者存在 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 数量升高和功能增强,导致特异性细胞免疫功能受抑制,降低机体杀菌能力,同时抑制 M ϕ 凋亡,削弱机体免疫系统对入侵机体的结核分枝杆菌的清除,使感染慢性化。如能揭示结核分枝杆菌与宿主 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 和 M ϕ 相互作用的详细机制,将为阐明结核病的发病机制提供理论依据,并为防治结核病提供新的靶标。但本研究未检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 功能与其他抗结核免疫功能之间的关系,这有待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] World health Organization, Global tuberculosis control;WHO

report 2010. WHO/HTM/TB/2010 [R]. Geneva: WHO, 2010.

- [2] Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease[J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 353-360.
- [3] Belkaid Y, Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells[J]. Immunity, 2008, 29(3): 362-371.
- [4] Stoop JN, Van Der Molen RG, Baan CC, et al. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2005, 41(4): 771-778.
- [5] 刘胜, 刘亚普, 罗晶晶, 等. CD4⁺Foxp3⁺Treg 细胞在幽门螺杆菌感染 C57BL/6 小鼠中作用的初步研究[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(9): 1182-1185.
- [6] Hirsch CS, Toossi Z, Johnson LL, et al. Augmentation of apoptosis and interferon- γ production at sites of active M. tuberculosis infection in human tuberculosis [J]. J Infect Dis, 2001, 183(5): 779-788.
- [7] He XY, Xiao L, Chen HB, 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.
- [8] 李凤惠, 吕洪敏, 王芳, 等. 慢性 HBV 感染者外周血 CXCR5⁺CD4⁺Tfh 细胞的测定及其与 Foxp3⁺Treg 细胞的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(13): 1100-1106.
- [9] 侯友翔, 张园, 钟薇, 等. 宫颈癌人乳头瘤病毒感染与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞的相关性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(12): 1749-1752.
- [10] Wergeland I, Assmus J, Dyrhol-Riise AM. T regulatory cells and immune activation in Mycobacterium tuberculosis infection and the effect of preventive therapy [J]. Scand J Immunol, 2011, 73(3): 234-242.
- [11] 郭净, 刘忠达, 张尊敬, 等. 抗结核合剂对初治肺结核患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞及 Foxp3 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(9): 2087-2090.
- [12] 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.
- [13] 姚楠, 董江涛, 徐芳, 等. 流式细胞术检测不同毒力结核分枝杆菌感染巨噬细胞的凋亡率及其时相性变化[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(2): 81-84.
- [14] Wu YE, Peng WG, Cai YM, et al. Decrease in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells after pulmonary resection in the treatment of cavity multidrug-resistant tuberculosis [J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(9): e815-e822.

(收稿日期: 2016-03-27 修回日期: 2016-07-15)