

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.35.003

肺结核患者外周血 MAIT 细胞功能及血清 IL-22 水平分析*

冯 龙^{1,2}, 马 燕^{1,2}, 叶子瑜^{1,2}, 颜慧敏², 林碧华^{1,2}, 林东子^{2,3}, 袁耀钦³, 李玉美³, 黄明元², 周克元^{1,2}, 曾今诚^{1,2,△}

(1. 广东医科大学广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 2. 广东医科大学东莞市

医学活性分子开发与转化重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东省东莞市第六人民医院检验科 523008)

[摘要] **目的** 观察肺结核(TB)患者外周血 MAIT 细胞功能及血清白细胞介素 22(IL-22)水平, 分析其临床意义。**方法** 收集 50 例 TB 患者和 30 例健康志愿者为研究对象。流式细胞术检测外周血 MAIT 细胞水平; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 IL-22 水平; 磁珠分选 CD8⁺ T 细胞, 体外结核菌抗原 Ag85B 刺激检测 MAIT 细胞产生 Perforin 和 IL-22 的能力。**结果** TB 患者外周血 MAIT 细胞和血清 IL-22 水平均明显低于健康志愿者($P < 0.05$); 痰涂片检查结核菌阳性患者外周血 MAIT 细胞和血清 IL-22 水平均明显低于阴性患者($P < 0.05$); 常规化疗药物治疗后外周血 MAIT 细胞和血清 IL-22 水平均明显增高($P < 0.05$); TB 患者外周血 MAIT 细胞和血清 IL-22 水平呈正相关($P < 0.05$); Ag85B 干预后, TB 患者和健康志愿者外周血 MAIT 细胞产生 Perforin 的能力均明显降低($P < 0.05$), 而产生 IL-22 的能力与对照组比较无明显差异($P > 0.05$)。**结论** MAIT 细胞与 IL-22 可能在抗结核免疫过程中发挥重要作用。

[关键词] 黏膜相关恒定 T 细胞; 白细胞介素 22; 结核, 肺**[中图分类号]** R521**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)35-4452-04

The role Function of peripheral blood mucosal-associated invariant T cells and serum IL-22 in level in patients with active pulmonary tuberculosis*

FENG Long^{1,2}, MA Yan^{1,2}, YE Ziyu^{1,2}, YAN Huimin²,
LIN Bihua^{1,2}, LIN Dongzi^{2,3}, YUAN Yaoqin³, LI Yumei³,
HUANG Mingyuan², ZHOU Keyuan^{1,2}, ZENG Jincheng^{1,2,△}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China; 2. Dongguan Municipal Key Laboratory of Medical Bioactive Molecular Developmental and Translational Research, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China; 3. Dongguan Municipal Sixth People's Hospital, Dongguan, Guangdong 523008, China)

[Abstract] **Objective** To study observe the role function of peripheral blood mucosal-associated invariant T (MAIT) cells and serum IL-22 level in peripheral blood of the patients with pulmonary tuberculosis (TB) and to analysis analyze its their clinical significance. **Methods** 50 Fifty cases patients with TB and 30 cases healthy volunteers (HV) were collected as the study subjects. The counts level of peripheral blood MAIT in cells peripheral blood were as detected by flow cytometry. The levels of serum IL-22 level in serum were as detected by ELISA. CD8⁺ T cells were sorted by magnetic beads. The production ability of MAIT cells for producing Perforin and IL-22 by MAIT cells were as examined by flow cytometry after in vitro Mycobacterium tuberculosis antigen Ag85B stimulated stimulation. **Results** The counts levels of peripheral blood MAIT and serum levels of IL-22 in peripheral blood of the patients with TB were significantly lower than those of in healthy volunteers ($P < 0.05$). The levels of peripheral blood MAIT cells and serum IL-22 in the patients with Mycobacterium tuberculosis positive by sputum smear were significantly lower than those in the patients with Mycobacterium tuberculosis negative ($P < 0.05$). The levels of peripheral blood MAIT cell counts and serum IL-22 after routine chemotherapy and were significantly increased ($P < 0.05$); the level of peripheral blood MAIT cells was positively correlated with serum IL-22 levels level ($P < 0.05$); after Ag85B intervention, the ability of peripheral blood MAIT cells for producing Perporin in the TB patients and healthy

* 基金项目: 国家自然科学基金资助(81500007); 广东省科技计划项目(2016A020215003); 广东省医学科研基金项目(B201804); 东莞市社会发展项目(2016108101030, 201750715005451, 2018507150051657)。 作者简介: 冯龙(1993-), 在读硕士, 主要从事临床检验诊断学研究。

△ 通信作者, E-mail: zengjc@gdmu.edu.cn.

volunteers was significantly decreased ($P < 0.05$), while the ability for producing IL-22 had no obvious difference compared with the control group ($P > 0.05$) in sputum smear-positive TB patients were significantly lower than those of sputum smear-negative TB patients ($P < 0.05$). There was a positive correlation between MAIT cell counts and serum IL-22 levels in patients with TB ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in IL-22 production between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** MAIT cells and IL-22 may play an important role in during anti-TB immunity process.

[Key words] mucosal mucosal associated invariant T cells; interleukin-22; pulmonary tuberculosis, pulmonary

肺结核(TB)是由结核菌感染引发的肺部传染性疾病,严重威胁人类健康。TB在我国发病率较高,据统计2013年我国新发感染TB患者900万,其中死亡约150万^[1]。因此,我国是世界上结核疫情最严重的国家之一,控制TB发展和传播是疾病防控的一大挑战^[2]。流行病学研究显示,5%~10%结核菌感染者最终发展成TB,在这个过程中,宿主固有免疫和适应性免疫在控制结核菌活动过程中起重要作用^[3]。

MAIT细胞是一类新的天然免疫T细胞。人MAIT细胞的T细胞受体由恒定的V α 7.2-J α 33链及有限的 β 链组成。绝大部分MAIT均表达CD8和CD161抗原,本文亦将CD8⁺CD161⁺T细胞视为MAIT细胞^[4]。此类细胞因其嗜组织性,倾向于分布在肠道黏膜固有层而得名^[4],目前发现约20%肝脏T细胞,5%左右外周血T细胞均为MAIT细胞,而在肺部其含量也有较丰富^[5]。近年来研究发现MAIT细胞在启动自身免疫活化、分泌炎症反应细胞因子、杀伤病原微生物中起着重要作用^[6]。亦有研究报道小鼠MAIT细胞可以抵抗脓肿分枝杆菌的感染,缺乏这些细胞的小鼠更容易受到细菌和脓肿分枝杆菌的感染^[7]。尽管越来越多的证据表明T细胞在肺部免疫反应中的重要性,但对结核菌感染过程中MAIT细胞的调节机制知之甚少,尤其是MAIT细胞功能与多种细胞因子异常表达密切相关。IL-22在屏障组织(包括肠道、皮肤和肺)防御微生物感染过程中起关键作用^[8]。最近亦有研究发现MAIT细胞存在于女性生殖黏膜中,并且在细菌感染后,产生IL-17和IL-22^[9]。然而,IL-22产生的MAIT细胞在结核菌感染过程中的作用国内外均未见明确报道。本研究通过检测肺结核患者外周血MAIT细胞功能及血清IL-22水平,探讨MAIT细胞及IL-22在抗结核免疫过程中的作用及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2016年1月至2017年5月在东莞市第六人民医院(东莞市结核病定点治疗医院,原东莞市慢性病防治医院)就诊且参照《WS 288-2008肺结核诊断标准》确诊的初治TB患者50例,男30例,女20例,年龄20~65岁,平均(38.2 \pm 1.8)岁。所有TB患者均行常规抗结核治疗,其中常规抗结核治疗前(治疗3d以内)27例,常规抗结核治疗后(治

疗28~35d)23例;痰涂片检查结核菌阳性患者20例,阴性患者30例。选取与TB患者同期的健康志愿者30例为对照组,排除心、肝、肾等疾病,男20例,女10例,年龄23~58岁,平均(38.9 \pm 1.7)岁。TB患者排除标准:(1)患有严重肝肾疾病、心脏病和其他病情严重的疾病;(2)妊娠期和哺乳期妇女;(3)酗酒和吸烟严重;(4)有使用镇静类或其他精神类药物;(5)合并感染艾滋病或者其他传染病和其他(如糖尿病、肿瘤等)慢性疾病;(6)近期服用免疫调节剂或者激素治疗;(7)不签署知情同意书的患者。收集标本前均取得标本提供者知情同意并签署知情同意书,本研究经东莞市第六人民医院和广东医科大学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测MAIT细胞水平 所有对象均用肝素钠管空腹采血5mL,D-Hanks液稀释后置于淋巴细胞分离液上。1500r/min离心20min后将单个核细胞吸出、洗涤,加入CD3抗体、CD8抗体和CD161抗体室温避光染色30min,PBS洗涤2次,BD-FACS Calibur流式细胞分析仪检测CD8⁺CD161⁺T细胞亚群水平。采用Flow Jo 7.6.1软件对流式细胞仪检测结果进行分析。

1.2.2 ELISA检测血清IL-22水平 采用ELISA法检测血清IL-22水平,Human IL-22 ELISA检测试剂盒为美国BioLegend公司产品,操作步骤严格按照说明书进行,检测仪器为芬兰MK3-酶标仪。

1.2.3 磁珠分选 采用MojoSortTM Human CD8 T Cell Isolation Kit(BioLegend公司)分选外周血CD8⁺T细胞,具体步骤严格按照说明书进行。

1.2.4 抗原刺激 采用结核菌抗原Ag85B刺激实验检测TB患者和健康志愿者外周血CD8⁺CD161⁺T细胞产生IL-22、Perforin的能力。将以上分离的外周血单个核细胞(3×10^5 个)采用Ag85B(10 μ g/mL)刺激,同时加入CD28(1 μ g/mL)和CD49d(1 μ g/mL)共刺激分子。37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱刺激6h,PBS洗涤,分别加入CD3抗体、CD8抗体和CD161抗体室温避光染色30min,采用胞内因子染色试剂盒(达科为生物技术股份有限公司)对IL-22、Perforin抗体进行胞内染色,具体操作步骤严格按照说明书进行。以上实验设立对照组,对照组仅采用CD28(1 μ g/mL)和

CD49d(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 和 GraphPad Prism 5 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TB 患者外周血 MAIT 细胞水平 TB 患者外周血 MAIT 细胞水平 $[(3.15 \pm 2.21)\%]$ 明显低于健康志愿者 $[(5.31 \pm 2.28)\%]$, 差异有统计学意义 ($t = 3.661, P < 0.05$)。痰涂片检查结核菌阳性 TB 患者外周血 MAIT 细胞水平 $[(1.87 \pm 2.11)\%]$ 明显低于阴性 TB 患者 $[(4.43 \pm 2.27)\%]$, 差异有统计学意义 ($t = 4.016, P < 0.05$)。常规化疗药物治疗前 TB 患者外周血 MAIT 细胞水平 $[(2.04 \pm 2.19)\%]$ 明显低于治疗后 TB 患者 $[(4.26 \pm 2.23)\%]$, 差异有统计学意义 ($t = 3.543, P < 0.05$)。TB 患者外周血 MAIT 细胞水平与患者性别、年龄均无关 ($P > 0.05$)。

2.2 TB 患者外周血血清 IL-22 水平 TB 患者外周血血清 IL-22 水平 $(32.67 \pm 35.17) \text{ pg/mL}$ 明显低于健康志愿者 $(55.18 \pm 30.14) \text{ pg/mL}$, 差异有统计学意义 ($t = 2.919, P < 0.05$)。痰涂片检查结核菌阳性 TB 患者外周血血清 IL-22 水平 $(19.55 \pm 36.68) \text{ pg/mL}$ 明显低于阴性 TB 患者 $(45.79 \pm 34.16) \text{ pg/mL}$, 差异有统计学意义 ($t = 2.584, P < 0.05$)。常规化疗药物

治疗前 TB 患者外周血血清 IL-22 水平 $(22.37 \pm 34.11) \text{ pg/mL}$ 明显低于治疗后 TB 患者 $(42.97 \pm 36.41) \text{ pg/mL}$, 差异有统计学意义 ($t = 2.063, P < 0.05$)。TB 患者外周血血清 IL-22 水平与患者性别、年龄均无关 ($P > 0.05$)。

2.3 MAIT 细胞和 IL-22 水平相关性分析 Pearson 相关分析结果显示 TB 患者外周血 MAIT 细胞和 IL-22 水平呈正相关 ($r = 0.427, P < 0.05$), 见图 1。

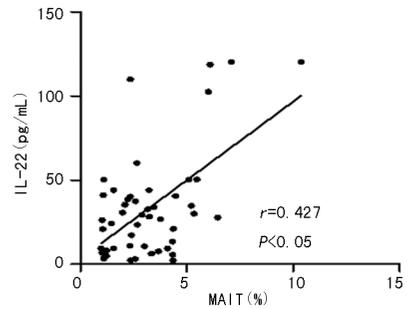
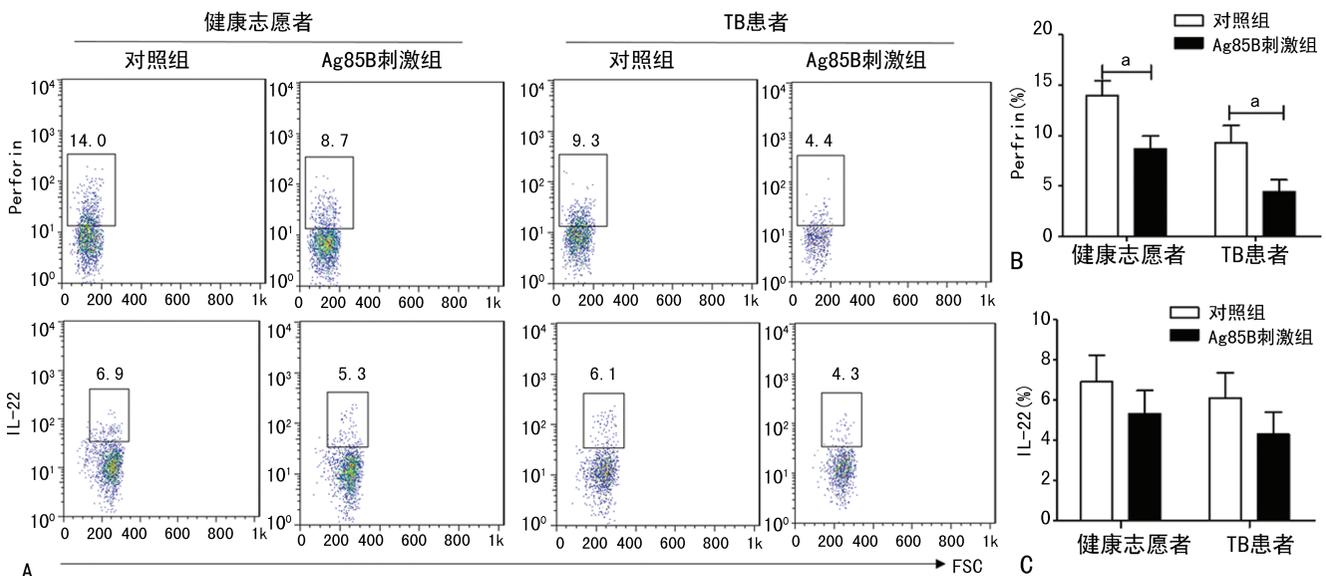


图 1 MAIT 细胞和 IL-22 水平相关性分析

2.4 MAIT 细胞产生细胞因子的能力分析 Ag85B 刺激后 TB 患者和健康志愿者外周血 MAIT 细胞产生 Perforin 的能力与对照组比较均明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2A、B。Ag85B 刺激后 TB 患者和健康志愿者外周血 MAIT 细胞产生 IL-22 水平无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 2C。



A: 代表性流式图; B: 两组 Perforin 水平比较; C: 两组 IL-22 水平比较

图 2 流式细胞术检测 Ag85B 刺激后 MAIT 细胞产生 Perforin 和 IL-22 的能力

3 讨论

MAIT 细胞是一群在进化上高度保守的 T 淋巴细胞, 在外周血中 MAIT 细胞占总 T 细胞的 $1\% \sim 10\%$, 由于其可以激活表达 Granzyme B、Perforin、IFN- γ 、TNF- α 等杀伤性细胞因子, 从而构成了固有免疫屏障的重要防线。近年来研究发现 MAIT 细胞在

抵抗各种细菌感染中均发挥着重要的作用, 例如肺炎克雷伯菌、痢疾志贺菌、土拉菌、卡介苗、和脓肿分支杆菌等^[10-12]。大肠杆菌感染外周血单个核细胞后, MAIT 细胞产生的 IFN- γ 、TNF- α 均明显低于对照组^[13]。本研究发现 TB 患者外周血 MAIT 细胞水平明显低于健康志愿者 ($P < 0.05$), 尤其是痰涂片检查

结核菌阳性患者外周血 MAIT 细胞水平较阴性患者更低($P < 0.05$)。另外, TB 患者经规范化疗药物治疗后 MAIT 细胞水平明显增高($P < 0.05$), 以上结果提示结核菌感染可能弱化了 MAIT 细胞功能, 机体 MAIT 细胞减少可能促进了 TB 的发生、发展。此外, 在这个过程中, 本文亦发现 TB 患者外周血 IL-22 水平亦明显下降, 并与患者结核菌活跃度密切相关。特别是, Pearson 相关分析结果显示 TB 患者外周血 MAIT 细胞水平和 IL-22 水平呈明显正相关($P < 0.05$), 提示二者关系密切, 可能共同介导了 TB 的发生、发展。为了进一步验证结核菌感染是否直接影响 MAIT 细胞功能, 本文采用结核菌抗原 Ag85B 刺激分选的 CD8⁺ T 细胞, 并采用流式细胞术检测 MAIT 细胞产生 Perforin 和 IL-22 的能力, 结果发现 Ag85B 刺激之后 TB 患者和健康志愿者外周血 MAIT 细胞产生 Perforin 的能力与对照组比较明显降低($P < 0.05$), 提示 TB 患者 MAIT 细胞激活杀伤性细胞因子的能力可能受损。

IL-22 是在 2000 年发现的细胞因子, 在机体中由 Th22、Th17、Th1、NK22、 $\gamma\delta$ T 及 MAIT 等细胞分泌^[14-15], 它在自身免疫性疾病、慢性炎症性疾病和感染性疾病中发挥着重要作用, 在银屑病、异位性皮炎和溃疡性结肠炎患者中作用更加突出^[16]。IL-22 是 T 细胞膜表面成熟的细胞因子, 其阳性细胞可通过产生效应分子, 发挥抗结核菌作用, 抑制 T 细胞 IL-22 表达, 巨噬细胞抗结核作用将会被抑制。本研究发现 Ag85B 刺激后, TB 患者和健康志愿者外周血 MAIT 细胞产生 IL-22 水平无明显差异($P > 0.05$), 提示结核菌抗原可能通过完全不同的机制调节了 MAIT 细胞 Perforin 和 IL-22 表达, 然而确切的机制还有待进一步研究。

综上所述本文作出以下推测: (1) TB 患者 MAIT 细胞水平降低, 尤其与患者结核菌活跃状态密切相关。(2) 当机体感染结核菌后, MAIT 细胞功能受到明显影响, 尤其是产生 Perforin 的能力明显降低。(3) MAIT 和 IL-22 在抗肺结核免疫过程中可能起着协同作用。因此, MAIT 细胞和 IL-22 动态变化可反映肺结核的病情发展与转归, 具有成为肺结核患者临床诊断依据的可能。尽管 MAIT 细胞和 IL-22 在结核病的发生、发展中可能具有一定的作用, 但在抗结核免疫中各亚群细胞与 IL-22 的协同机制尚不明确, 仍需进一步研究。

参考文献

- [1] WANG T, XUE F, CHEN Y, et al. The spatial epidemiology of tuberculosis in Linyi City, China, 2005–2010[J]. BMC Public Health, 2012, 12: 885.
- [2] ZHANG H, HUANG F, CHEN W, et al. Estimates of tuberculosis mortality rates in China using the disease surveillance point system, 2004–2010[J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(4): 483–488.
- [3] ERNST J D. The immunological life cycle of tuberculosis[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(8): 581–591.
- [4] TREINER E, DUBAN L, BAHRAM S, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1[J]. Nature, 2003, 422(6928): 164–169.
- [5] MARTIN E, TREINER E, DUBAN L, et al. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human[J]. PLoS Biol, 2009, 7(3): e54.
- [6] SZABO P A, ANANTHA R V, SHALER C R, et al. CD1d- and MR1-Restricted T Cells in Sepsis[J]. Front Immunol, 2015, 6: 401.
- [7] CHUA W J, TRUSCOTT S M, EICKHOFF C S, et al. Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection[J]. Infect Immun, 2012, 80(9): 3256–3267.
- [8] DUDAKOV J A, HANASH A M, VAN DEN BRINK M R. Interleukin-22; immunobiology and pathology[J]. Annu Rev Immunol, 2015, 33: 747–785.
- [9] GIBBS A, LEEANSYAH E, INTROINI A, et al. MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation[J]. Mucosal Immunol, 2017, 10(1): 35–45.
- [10] MEIEROVICS A, YANKELEVICH W J, COWLEY S C. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(33): 3119–3128.
- [11] LE BOURHIS L, DUSSEAUX M, BOHINEUST A, et al. MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells[J]. PLoS Pathog, 2013, 9(10): e1003681.
- [12] GEORGEL P, RADOSAVLJEVIC M, MACQUIN C, et al. The non-conventional MHC class I MR1 molecule controls infection by Klebsiella pneumoniae in mice[J]. Mol Immunol, 2011, 48(5): 769–775.
- [13] JIANG J, WANG X, AN H, et al. Mucosal-associated invariant T-cell function is modulated by programmed death-1 signaling in patients with active tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(3): 329–339.
- [14] RUTZ S, EIDENSCHENK C, OUYANG W. IL-22, not simply a Th17 cytokine[J]. Immunol Rev, 2013, 252(1): 116–132.
- [15] TIAN T, YU S, MA D. Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases[J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(2): 113–125.
- [16] LEUNG J M, LOKE P. A role for IL-22 in the relationship between intestinal helminths, gut microbiota and mucosal immunity[J]. Int J Parasitol, 2013, 43(3/4): 253–257.