肺结核患者治疗前后外周血 $\gamma\delta$ T细胞及其记忆表型变化

张梅 (广州医科大学附属第六医院清远市人民医院检验科, 广东清远 511518)

摘要:目的 观察肺结核患者治疗前后外周血 $\gamma\delta$ T细胞及其记忆表型变化。方法 采用流式细胞术检测39例肺结核治疗前患者(治疗前组)、36例肺结核治疗3个月后患者(治疗后组)及28例健康人(对照组)外周血 $\gamma\delta$ T细胞及其记忆表型变化。结果 治疗前组外周血 $\gamma\delta$ T细胞明显高于治疗后组和对照组($P<0.01$ 或 0.05), $CD45RA^-CD27^+\gamma\delta$ T细胞明显低于治疗后组和对照组($P<0.01$), 而 $CD45RA^-CD27^-\gamma\delta$ T细胞高于治疗后组和对照组($P<0.01$)。结论 肺结核患者外周血 $\gamma\delta$ T细胞及其记忆表型转化可能与结核发生、发展密切相关。

关键词: 肺结核; $\gamma\delta$ T细胞; 流式细胞术

中图分类号: R 521

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)04-0360-03

Peripheral blood $\gamma\delta$ T cells and memory phenotypes in patients with pulmonary tuberculosis before and after treatment

ZHANG Mei (Laboratory Department, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511518, China)

Abstract: Objective To observe the changes of peripheral blood $\gamma\delta$ T cells and memory phenotypes in patients with pulmonary tuberculosis before and after treatment. Methods The peripheral blood $\gamma\delta$ T cells and memory phenotypes were determined by flow cytometry in 39 pretreatment patients with pulmonary tuberculosis, 36 posttreatment patients, and 28 healthy controls. Results The $\gamma\delta$ T cells were higher in pretreatment patients than in posttreatment patients and healthy controls ($P<0.01$ or 0.05). Compared with posttreatment patients and healthy controls, $CD45RA^-CD27^+\gamma\delta$ T cells were decreased but $CD45RA^-CD27^-\gamma\delta$ T cells increased in pretreatment patients ($P<0.01$). Conclusion The number and memory phenotypic switch of peripheral blood $\gamma\delta$ T cells may be related to the occurrence and development of pulmonary tuberculosis.

Key words: pulmonary tuberculosis; $\gamma\delta$ T cells; flow cytometry

我国是结核病高发国家之一^[1], 其防治形势依然严峻, 表现在耐多药结核杆菌^[2]和结核合并艾滋双重感染^[3], 导致传统药物治疗以及卡介苗预防效果越来越差^[4], 迫切需要寻找新的药物靶点。科研工作者认为, 结核病主要机制是机体免疫系统失衡, 无法有效清除病原体^[5]。由此可见, 研究机体免疫反应是阐明结核病发病机制的重要途径。 $\gamma\delta$ T细胞亚群是一群非经典的T淋巴细胞, 其介导的免疫反应在机体清除结核菌的过程中发挥了重要作用^[6]。实验证据表明, 敲除了 $\gamma\delta$ T细胞的结核感染动物模型免疫反应降低, 死亡率增加^[7]。进一步研究发现, $\gamma\delta$ T细胞的功能与其记忆表型密切相关, 感染条件下其记忆表型 $CD45RA$ 和 $CD27$ 发生变化, 提示 $\gamma\delta$ T细胞对于结核感染可能存在保护或治疗作用^[7]。然而, $\gamma\delta$ T细胞在结核患者治疗前后记忆表型变化依然

不清楚, 本文旨在探讨其在结核病发展和预后中的意义。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取我院2015年6月至2016年3月诊治的肺结核患者, 其中治疗前患者(治疗前组)39例, 男26例, 女13例, 年龄18~84岁, 平均51.2岁; 治疗3个月后的患者(抗结核治疗满3个月, 胸片X透视肺部病灶减小, 临床症状减轻)36例(治疗后组), 男25例, 女11例, 年龄21~81岁, 平均48.7岁。诊断分组标准参考《肺结核诊断和治疗指南》^[8]。同时选取清远市中心血站健康献血者28例作对照, 男15例, 女13例, 年龄23~60岁, 平均42.1岁, 胸部X透视正常, 近期无接触结核病史, PPD结核菌素皮试结果为阴性。

1.2 试剂与仪器

收稿日期: 2017-01-11; 修订日期: 2017-05-07

作者简介: 张梅(1985-), 女, 硕士, 主管技师。

Ficoll单个核细胞(PBMC)分离液(广州昊洋生物有限公司); CD3-PERCpCy5.5、 $\gamma\delta$ T TCR-FITC、CD27-APC、CD45RA-PEcy7 荧光抗体(美国BD bioscience公司); Hank's 液(美国Gibco公司); 牛血清白蛋白(BSA)、1×PBS(美国Life invitrogen公司)。BD Fertassia型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 实验方法

空腹采集研究对象静脉血3 mL于肝素钠抗凝管。用Hank's液两倍稀释全血,缓慢加入到装有3 mL淋巴细胞分离液的15 mL离心管中。22℃、2 000 r/min离心20 min,吸取单个核细胞层,Hank's液重悬细胞,离心洗涤细胞两次。含1% BSA的PBS洗涤2次,用100 μ L PBS重悬细胞。分别加入CD3-PERCpCy5.5、 $\gamma\delta$ TCR-FITC、CD27-APC、CD45RA-PEcy7 荧光抗体,4℃避光孵育30 min,含1% BSA的PBS洗涤2次,4℃、1 500 r/min、离心10 min,300 μ L含1%BSA的PBS重悬细胞。应用BD Fertassia流式细胞仪进行检测。以前向散射光和侧向散射光圈出淋巴细胞群,分析 $\gamma\delta$ TCR⁺、CD45RA⁻CD27⁺ TCM和CD45RA⁻CD27⁻TEM细胞的百分比。

1.4 统计学处理

数据由SPSS19.0软件处理,采用单因素方差分析及 q 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间外周血 $\gamma\delta$ T细胞亚群表达百分率的比较

治疗前组 $\gamma\delta$ T细胞百分率高于正常对照组和治疗后组($P<0.01$ 或 0.05),详见表1。

表1 各组间外周血 $\gamma\delta$ T细胞比例的比较

组别	<i>n</i>	$\gamma\delta$ T/%
正常对照组	28	2.86±0.51
治疗前组	39	5.79±0.95 ^b
治疗后组	36	2.48±0.57 ^{ac}

与正常对照组比较:^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与治疗前组比较:^c $P<0.01$ 。

2.2 各组间 $\gamma\delta$ T细胞TCM和TEM表型比例的比较

治疗前组TCM型 $\gamma\delta$ T细胞百分率明显低于正常对照组和治疗后组($P<0.01$),而治疗前组TEM型 $\gamma\delta$ T细胞百分率则明显高于正常对照组和治疗后组($P<0.01$)。详见表2。

表2 各组间外周血 $\gamma\delta$ T细胞TCM和TEM记忆表型的比较

组别	<i>n</i>	CD45RA ⁻ CD27 ⁺ $\gamma\delta$ T TCM/%	CD45RA ⁻ CD27 ⁺ $\gamma\delta$ T TEM/%
正常对照组	28	28.33±4.63	33.51±4.49
治疗前组	39	13.38±2.94 ^a	59.13±5.87 ^a
治疗后组	36	27.47±3.12 ^b	43.32±3.89 ^{ab}

与正常对照组比较:^a $P<0.01$;与治疗前组比较:^b $P<0.01$ 。

3 讨论

T细胞是一类非经典的固有样淋巴细胞。和一般T细胞不同, $\gamma\delta$ T细胞识别的配体不是蛋白抗原,而是病原体释放的磷酸化小分子(又称为磷酸化抗原)^[9]。磷酸化抗原激活 $\gamma\delta$ T细胞,诱导后者发生增殖和分化。本研究结果显示,治疗前结核患者外周血 $\gamma\delta$ T细胞百分比明显高于正常人群,提示 $\gamma\delta$ T细胞明显增殖,其刺激源可能是结核分枝杆菌来源的磷酸化抗原。本研究还发现,抗结核治疗满3个月且治疗有效的患者外周血 $\gamma\delta$ T细胞减少,提示 $\gamma\delta$ T细胞比例和结核患者的预后密切相关。临床常用抗结核药物(异烟肼、利福平等)抑制结核分枝杆菌的生长繁殖,从而减少机体内磷酸化抗原的含量, $\gamma\delta$ T细胞比例回复至正常人水平。此外, $\gamma\delta$ T细胞在自身免疫疾病、感染性疾病和肿瘤疾病中具有广泛的免疫调

节作用^[10]。 $\gamma\delta$ T细胞的增殖分化反映了其参与机体的抗结核免疫反应,调控机体清除结核分枝杆菌。

$\gamma\delta$ T细胞在免疫反应过程中定向分化,首先是初始(CD45RA⁺CD27⁺, naive)状态存在的 $\gamma\delta$ T细胞,在磷酸化抗原诱导后转化成中央型记忆细胞(CD45RA⁻CD27⁺, TCM),最后转化成效应型记忆细胞(CD45RA⁻CD27⁺, TEM)^[7]。TEM型 $\gamma\delta$ T细胞主要产生IFN-和TNF-,发挥抗结核免疫应答。本研究结果显示,与正常人相比,治疗前患者TCM型 $\gamma\delta$ T细胞比例明显减少,而TEM型细胞比例明显增加,说明结核感染有效诱导 $\gamma\delta$ T细胞由TCM型转化为TEM型,TEM型更有利于 $\gamma\delta$ T细胞发挥抗结核作用。进一步实验结果提示,3个月有效抗结核治疗后,TCM型比例升高,TEM型比例减少,提示免疫反应强度降低,机体趋向正常状态。由此我们推测

(下转第366页)

自微乳在胃肠道吸收后还能经淋巴系统转运,可以避免肝首过效应。综上分析,SMEDDS可以提高口服Res的生物利用度,为开发Res新剂型提供依据。

参考文献:

- [1] 倪南珍,王敏,林茂,等.白藜芦醇对阿尔茨海默病小鼠记忆能力及脑组织NOS和NO含量的影响[J].遵义医学院学报,2014,37(1):99-102.
- [2] Park E J, Pezzuto J M. The pharmacology of resveratrol in animals and humans[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1852(6): 1071-1113.
- [3] Singh G, Pai R S. Dawn of antioxidants and immune modulators to stop HIV-progression and boost the immune system in HIV/AIDS patients: An updated comprehensive and critical review[J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(3): 600-605.
- [4] 李金凤,高明月,王慧敏,等.载白藜芦醇泊洛沙姆403/407混合胶束的制备及其体外性质[J].药科学报,2015,50(8):1045-1051.
- [5] Malhotra A, Bath S, Elbarbry F. An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 1-15.
- [6] Tsai M J, Lu I J, Fu Y S, et al. Nanocarriers enhance the transdermal bioavailability of resveratrol: In-vitro and in-vivo study[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 148: 650-656.
- [7] Sapra B, Thatai P, Bhandari S, et al. A critical appraisal of microemulsions for drug delivery: part II [J]. *Ther Deliv*, 2014, 5(1): 83-94.
- [8] Mundada V, Patel M, Sawant K. Submicron Emulsions and Their Applications in Oral Delivery[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2016, 33(3): 265-308.
- [9] 蒋燕,陆继好,陈建伟.白藜芦醇自微乳软胶囊的制备及粒度测定[J].中医药导报,2012,18(8):80-82.
- [10] 吴莹,周庆,李杏,等.蓝莓花青素与白藜芦醇复配对老年小鼠抗衰老作用的评价[J].中国医院药学杂志,2016,36(24):2178-2183.
- [11] 王丽丽,舒晓宏,李宏,等.白藜芦醇在人体内生物利用度的研究进展[J].大连医科大学学报,2014,36(6):592-596.
- [12] 卢秀霞,何琳,李敏媛,等.盐酸雷洛昔芬自微乳在大鼠体内的药动学评价[J].中国新药杂志,2015,24(8):936-941.
- [13] Duan X, Li M, Ma H, et al. Physicochemical properties and antioxidant potential of phosvitin-resveratrol complexes in emulsion system[J]. *Food Chem*, 2016, 206: 102-109.

(上接第361页)

TEM型 $\gamma\delta$ T细胞的升高应该是机体对于结核杆菌的免疫反应与病情发展紧密相关。

综上所述, $\gamma\delta$ T细胞比例和记忆表型的变化是机体对结核分枝杆菌免疫反应的表现,与肺结核发展紧密相关。当肺结核处于机体免疫功能活跃高峰期时, $\gamma\delta$ T细胞比例升高,经过3个月治疗后病情缓解, $\gamma\delta$ T细胞则下降至正常水平。同时,机体抗结核免疫功能活跃时, $\gamma\delta$ T细胞由TCM型转化为TEM型,增强机体免疫反应。 $\gamma\delta$ T细胞比例和记忆表型变化与肺结核的发病程度和疾病转归有关。因此,监测结核患者治疗前后外周血 $\gamma\delta$ T细胞比例的变化对于掌握活动性肺结核的发展和预后有重要的意义。

参考文献:

- [1] WHO. WHO global tuberculosis control report 2010[J]. *Cent Eur J Public Health*, 2010, 18(4):237.
- [2] 蔡智群,刘苏东,林兆原,等.耐药肺结核患者抑郁状况分析[J].广州医科大学学报,2015,43(6):47-48.
- [3] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组.2010年

全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J].中国防痨杂志,2012,34(8):485-508.

- [4] 黄松熙.73例抗结核药物致药物性肝炎的临床分析[J].广州医科大学学报,2015,43(2):74-75.
- [5] Abate G, Hoft D F. Immunotherapy for tuberculosis: future prospects[J]. *Immunotargets Ther*, 2016, 20(5): 37-45.
- [6] Boom W H. Gammadelta T cells and mycobacterium tuberculosis[J]. *Microbes Infect*, 1999, 1(3): 187-195.
- [7] Kabelitz D, He W. The multifunctionality of human Vgamma9Vdelta2 gammadelta T cells: clonal plasticity or distinct subsets?[J]. *Scand J Immunol*, 2012, 76(3): 213-222.
- [8] 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.
- [9] Chen Z W. Immune regulation of gammadelta T cell responses in mycobacterial infections[J]. *Clin Immunol*, 2005, 116(3): 202-207.
- [10] Bonneville M, O'Brien R L, Born W K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity[J]. *Nature reviews Immunology*, 2010, 10(7): 467-478.