论著

文章编号:1000-5404(2007)13-1298-03

肺结核患者外周血树突状细胞亚群的变化

鄢仁晴[1],罗军敏[2],孙万邦[2],祁 莹[3] (遵义医学院:[1]附属医院检验科,[2]免疫学教研室,[3]附属医院细胞工程室,遵义 563003)

提 要:目的 通过对肺结核患者外周血树突细胞(dendritic cell,DC)亚群数量的观察,了解DC亚群在肺结核病程中的变化情况,探讨DC亚群在肺结核发病机制中的作用及临床意义。**方法** 采用流式细胞术的三色分析法检测70例肺结核患者外周血的DC1及DC2亚群。**结果** 肺结核活动期患者外周血DC1/PBMC(外周血单个核细胞)、DC2/PBMC及DC1、DC2的绝对数均明显低于健康者($P<0.05$),DC1/DC2值明显高于健康者($P<0.05$);肺结核非活动期患者与健康者外周血DC1/PBMC、DC2/PBMC及DC1、DC2的绝对数比较均无显著性差异($P>0.05$),与健康者比较DC1/DC2值无显著性差异($P>0.05$);肺结核活动期患者外周血DC的绝对数明显低于非活动期($P<0.05$)。**结论** 肺结核患者外周血DC1和DC2数均明显降低。提示外周血树突细胞亚群(DC1、DC2)的检测可了解肺结核患者的免疫功能状态及反映病情变化,也说明DC在结核病免疫损伤的发生发展中发挥一定作用。

关键词:肺结核;树突细胞亚群;流式细胞术
中图法分类号:R392.12;R392.3;R521.02 **文献标识码**:A

Changes of peripheral blood dendritic cell subgroup in pulmonary tuberculosis patients

YAN Ren-qing[1], LUO Jun-min[2], SUN Wan-bang[2], QI Ying[3] ([1]Clinlic Medical Laboratory, [3]Cell Engineering Laboratory, The First Affiliated Hospital, [2]Department of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective To observe the changes of peripheral blood dendritic cell (DC) subgroup in amount in pulmonary tuberculosis patients. **Methods** DC1 and DC2 subgroups were detected in peripheral blood of 70 pulmonary tuberculosis patients by tricolor analytic method of flow cytometry. **Results** In active stage of pulmonary tuberculosis, DC1/PBMC, DC2/PBMC and the absolute quantity of DC1, DC2 in peripheral blood were significantly lower than healthy subjects ($P<0.05$) and DC1/DC2 ratio was significantly higher ($P<0.05$). In inactive stage of pulmonary tuberculosis, DC1/PBMC, DC2/PBMC and the absolute quantity of DC1, DC2, DC1/DC2 ratio in peripheral blood showed no significant difference with that of healthy subjects ($P>0.05$); The absolute quantity of DC2 in active stage of pulmonary tuberculosis was obviously lower than that in inactive stage ($P<0.05$). **Conclusion** The percentage and the absolute quantity of DC1 and DC2 subgroups in peripheral blood in active stage of pulmonary tuberculosis are lower than the healthy subjects, suggesting DC can reflect the immune function of pulmonary tuberculosis patients, the patients' condition and illuminate the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis.

Key words: pulmonary tuberculosis; dendritic cell subgroup; flow cytometry

肺结核(tuberculosis,TB)是由结核分枝杆菌感染肺脏所引起的一种最常见的结核病。近年来其发病率呈上升趋势,卫生部2006年一季度调查结果显示,甲、乙类传染病发病数及死亡人数中肺结核居首位。对结核病的控制依赖有效的预防及治疗,而对结核杆菌诱导的宿主免疫应答过程的深刻了解是新型疫苗及免疫辅助治疗的研究基础,因此关于结核病的免疫发病机制及生物免疫防治再次成为研究热点。

树突状细胞(dendritic cell,DC)是专职的抗原提

基金项目:遵义医学院青年科研启动基金(2006,F-183)
Supported by the Initial Research Foundation for Young Scholars of Zunyi Medical University(2006, F-183)
作者简介:鄢仁晴(1974-),女,贵州省湄潭县人,硕士,主管技师,主要从事临床免疫学、临床生物化学方面的研究,发表论文6篇。电话:(0852)8608604,E-mail:yanrenqin@163.com
通讯作者:罗军敏,电话:(0852)8609530,E-mail:luojm128@163.com
收稿日期:2006-08-07;**修回日期**:2006-12-06

呈细胞(antigen presenting cell，APC)。近年的研究表明，DC 在人体的免疫过程中既是发动者又是调控者，参与了多种疾病的发生过程，如 DC 亚群在病毒性疾病和肿瘤[1-4]的发生发展中均发挥重要作用。关于 DC 在结核免疫发病机制中的作用国内尚少见实验研究报道。本研究采用流式细胞术的三色分析法检测肺结核患者外周血 DC1 及 DC2 亚群，探讨 DC 在肺结核免疫发病机制中的作用及临床意义。

1　材料与方法

1.1　研究对象

患者组：收集遵义 3417 肺科医院呼吸肺(内)科住院及门诊患者，经呼吸肺(内)科临床诊断的肺结核患者 70 例，肺结核诊断标准按《新编结核病学》(彭卫生主编)。其中活动期 50 例，男性 32 例，女性 18 例，年龄(41 ±8.5)岁；非活动期 20 例，男性 11 例，女性 9 例，年龄(35 ±6.4)岁；所有病例甲、乙型肝炎病毒感染指标均为阴性，亦无并发其他急性感染性疾病。

对照组：选择 20 例健康成人(本院健康体检人员)，男性 12 例，女性 8 例，年龄(31 ±9)岁，肝、肾功能正常，甲、乙型肝炎病毒感染指标均为阴性。

1.2　主要仪器和主要试剂

谱系抗原 Lineage cocktai l (CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)-FITC、CD123-PE、CD11C-PE、anti-HLA-DR -PE-Cy5、鼠 IgG1-PE，鼠 IgG_{2a}-PE、FACS 溶血素 Lysing Solution 均购自美国 BD 公司，SysmexXT-1800i 全自动血球计数仪(日本)，BD-FACBCalibu 流式细胞分析仪(美国 BD 公司)。

1.3　检测方法

1.3.1　标本收集　　用 $EDTAK_2$抗凝管采取空腹静脉血 2 ml，4 h 内检测 DC1、DC2 亚群及血常规。

1.3.2　外周血树突细胞 DC1、DC2 亚群检测　　根据试剂说明书操作步骤[2]，见表 1。

表 1　流式细胞术三色分析法加样表

试管号	FITC 标记	PE 标记	PE-Cy5 标记
A	Lineage1 10 μl	CD123 5 μl	抗 HLA-DR 10 μl
B	Lineage1 10 μl	IgG1 5 μl	抗 HLA-DR 10 μl
C	Lineage1 10 μl	CD11c 5 μl	抗-HLA-DR 10 μl

混匀抗凝全血，A、B、C 管分别加入全血 100 μl，避光放置 15～30 min(室温 20～25 ℃)，加入溶血素 2 ml，混匀，室温避光放置 10 min，离心后加入 PBS 缓冲液 1 ml 洗细胞，离心 5 min，加入固定液 300 μl。上机检测。采用 CELLQuest 软件获取分析 50 000 个 PBMC，三色分析法检测外周血 DC 亚群，HLA-DR 对 Lineage1 的细胞分布图中以 $Lineage1^-$ 设门，在双重设门中获取 $HLA\text{-}DR^+$ $CD11c^+$ 的细胞为 DC1，同时获取 $HLA\text{-}DR^+$ $CD123^+$ 的细胞为 DC2。用 CELLQuest 软件分析 $HLA\text{-}DR^+$ $CD11c^+$ 细胞和 $HLA\text{-}DR^+$ $CD123^+$ 细胞在静脉血单个核白细胞中的百分率。用(LC + MO)的绝对值 × DC1(DC2)百分率，可得 DC1、DC2 的绝对数($\times 10^5$/L)。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件，组间比较行方差分析。

2　结果

2.1　肺结核患者外周血树突细胞亚群检测结果

肺结核活动期患者外周血 DC1/PBMC、DC2/PBMC 及 DC1、DC2 的绝对数均明显低于健康者($P<0.05$)。肺结核非活动期患者外周血 DC1/PBMC、DC2/PBMC 及 DC1、DC2 的绝对数与健康者比较均无显著性差异($P>0.05$)。肺结核活动期患者外周血 DC2 的绝对数明显低于非活动期($P<0.05$)；肺结核活动期患者外周血 DC1/PBMC、DC2/PBMC 及 DC1 的绝对数与非活动期比较均无显著性差异($P>0.05$)。肺结核活动期患者外周血 DC1/DC2 的比值明显高于健康者($P<0.05$)，肺结核非活动期 DC1/DC2 值与健康者比较无显著性差异($P>0.05$)，肺结核活动期 DC1/DC2 值与非活动期比较无显著性差异($P>0.05$)。见表 2。

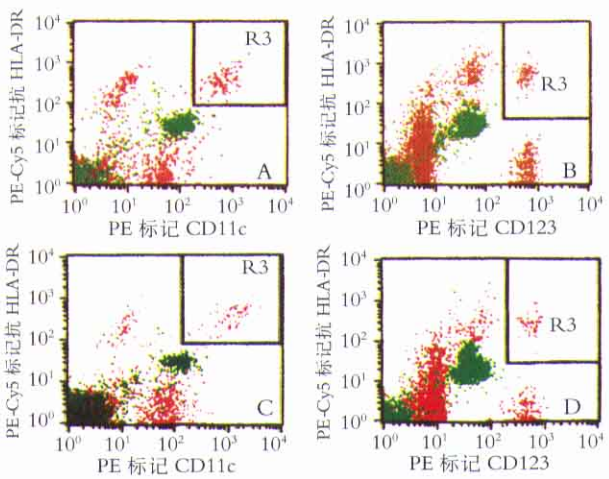
表 2　肺结核患者组外周血 DC1 和 DC2 的检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	DC1/PBMC (%)	DC2/PBMC (%)	DC1 绝对值 ($\times 10^5$/L)	DC2 绝对值 ($\times 10^5$/L)	DC1/DC2
活动期组	50	0.52 ±0.27[a]	0.33 ±0.20[a]	96.5 ±57.8[a]	59.5 ±27.3[ab]	2.4 ±1.8[a]
非活动期组	20	0.58 ±0.16	0.42 ±0.20	123.6 ±51.8	96.3 ±53.1	1.8 ±1.2
健康者	20	0.72 ±0.31	0.56 ±0.16	166.3 ±75.6	116.5 ±37.1	1.4 ±0.6

a：$P<0.05$，与健康者比较；b：$P<0.05$，与非活动期组比较

2.2　肺结核患者外周血 DC 亚群的检测

结果见图 1。



A、B：肺结核非活动期患者的 DC1 和 DC2，即 R3 区；C、D：肺结核活动期患者的 DC1 和 DC2，即 R3 区

图 1　肺结核患者外周血 DC 亚群的检测图谱

3 讨论

现已明确,结核病免疫主要是T细胞介导的细胞免疫,DC可有效地刺激T、B淋巴细胞活化,是机体内唯一能激活初始T细胞的APC,且能决定所触发的T淋巴细胞免疫反应的类型,对固有免疫和适应性免疫均起重要的调控作用。

有学者认为结核杆菌感染后,受染的DC产生细胞因子如IL-12和IFN-α,因此在结核感染中DC主要与诱导抗分枝杆菌性T细胞的免疫应答有关[5]。结核菌感染后,DC迅速迁移到感染部位并产生较多细胞因子调节保护性免疫和致病性免疫[6]。2004年Marino等[7]从感染短尾猴模型观察到,延迟树突细胞迁移到二级淋巴组织可影响肺结核感染后表现出不同的症状。Bodnar等[8]认为在肺结核发生时,DC除了抑制结核分枝杆菌的生长,还可为结核分枝杆菌提供潜伏的场所。

DC根据其细胞表型可分为2个亚群:DC1,表面标志为$Lin^-HLADR^+CD11c^+CD123^-$,主要发挥抗原提呈的功能,促进Th1细胞极化和细胞免疫的发生;DC2,表面标志为$Lin^-HLADR^+CD11c^-CD123^+$,主要产生Ⅰ型干扰素(IFN-α),具有较弱的抗原提呈功能,促进Th2细胞极化和体液免疫的发生。本研究采用流式细胞术直接检测肺结核患者外周血DC亚群的变化,结果显示:① 肺结核活动期患者外周血DC1/PBMC、DC2/PBMC及DC1、DC2的绝对数均明显低于健康者($P<0.05$),DC1、DC2数量下降表明结核分枝杆菌感染后机体的抗原提呈细胞减少,则激活T淋巴细胞的能力降低,提示活动性肺结核患者存在保护性免疫反应减弱,机体免疫功能降低。②肺结核非活动期患者外周血DC亚群:DC1/PBMC、DC2/PBMC及DC1、DC2的绝对数与健康者比较均无显著性差异($P>0.05$);说明非活动期患者结核病灶处于静止状态,免疫功能有所回升,但机体免疫状况(细胞免疫和体液免疫)仍然较低下。③肺结核活动期患者外周血DC2的绝对数明显低于与非活动期患者($P<0.05$),活动期DC1/PBMC、DC2/PBMC及DC1绝对数与非活动期比较均无显著性差异($P>0.05$),说明活动期患者的免疫功能紊乱较非活动期严重。④ 肺结核活动期患者外周血DC1/DC2值明显高于健康者($P<0.05$),一方面说明肺结核活动期患者的DC亚群比例失调,另一方面说明肺结核活动期患者可以比非活动期患者更快地调动体内免疫反应向Th1方向极化,从而有效地调动细胞免疫来应对结核分枝杆菌,也说明结核分枝杆菌感染后的免疫以细胞免疫为主。所以,观察DC1、DC2亚群对肺结核病程的监测具有重要参考价值。张政等[2]在对SARS的研究中应用DC1/DC2的比值的变化趋势说明了DC在SARS疾病发展中的作用。Lichtner等[9]报道了活动性肺结核伴随着DC的缺损,在有效的抗菌治疗后,DC数量有所回升。非活动期肺结核的DC1/PBMC、DC2/PBMC及DC1、DC2绝对数均高于活动期,提示可通过DC数量的变化反映肺结核的疗效。

本研究结果提示活动性肺结核患者机体外周血DC亚群数量明显下降,外周血树突状细胞亚群(DC1、DC2)的检测可了解肺结核患者的免疫功能状态及反映病情变化,也说明DC在结核病免疫损伤的发生发展中发挥一定作用,同时也可为肺结核的生物防治提供新线索。至于DC1、DC2下降的原因及下降程度还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 高 斌,陈红松,赵桂鸣,等. 树突状细胞亚群相对数与乙型肝炎病毒复制及肝损伤的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(6): 414-416.

[2] 张 政,王福生,赵 敏,等. 传染性非典型肺炎(SARS)患者外周血树突状细胞亚群的变化及临床意义[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(1): 22-26.

[3] Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, *et al*. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: a phase 1 trial[J]. J Med Virol, 2006, 78(6): 711-718.

[4] Becker Y. Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers——a review, hypothesis and implications[J]. Anticancer Res, 2006, 26(2A): 1113-1134.

[5] 吴悦涵. 结核分枝杆菌的分子免疫学进展[J]. 国外医学:免疫学分册, 2004, 27(2): 75-80.

[6] Gonzalez-Juarrero M, Orme I M. Characterization of murine lung dendritic cells infected with Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 2001, 69(2): 1127-1133.

[7] Marino S, Pawar S, Fuller C L, *et al*. Dendritic cell trafficking and antigen presentation in the human immune response to Mycobacterium tuberculosis[J]. J Immunol, 2004, 173(1): 494-506.

[8] Bodnar K A, Serbina N V, Flynn J L. Fate of Mycobacterium tuberculosis within murine dendritic cells[J]. Infect Immun, 2001, 69(2): 800-809.

[9] Lichtner M, Rossi R, Mengoni F, *et al*. Circulating dendritic cells and interferon-alpha production in patients with tuberculosis: correlation with clinical outcome and treatment response[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 143(2): 329-337.

(编辑 汪勤俭)