基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1375-02

结核分枝杆菌培养滤液蛋白对鼻息肉患者 IL-4、IFN-γ、GM-CSF 的影响

邹 伟[1],朱丽敏[2],钱 迪[2],柯 霞[2],洪苏玲[2]

(1. 重庆邮电大学医院耳鼻咽喉科,重庆 400065;2. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察结核分枝杆菌培养滤液蛋白(Culture filtrate protein,CFP)对鼻息肉(Nasal polyp)患者外周血 γ-干扰素(γ-interferon,IFN-γ)、白细胞介素-4(Interleukin-4,IL-4)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)3 种细胞因子的影响。方法:抽取 30 例鼻息肉患者外周静脉血,分离单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells,PBMCs),采用 MTT 法测定刺激淋巴细胞增殖的最佳 CFP 浓度,采用酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immune sorbent assay,ELISA)检测 CFP 干预前后 PBMCs 培养上清液中的 IL-4、IFN-γ、GM-CSF 水平。结果:鼻息肉患者组 PBMCs 上清液中 IL-4、GM-CSF 含量较对照组显著增高,而 IFN-γ 含量显著减少。CFP 干预后鼻息肉患者组上清液 IL-4、GM-CSF 水平明显降低,而 IFN-γ 含量显著升高,差异有显著性。结论:CFP 能纠正鼻息肉患者体内 Th1 和 Th2 细胞因子的失平衡状态,可能成为鼻息肉的一种辅助治疗手段。

【关键词】鼻息肉;结核分支杆菌;IL-4;IFN-γ;GM-CSF

【中国图书分类法分类号】R765.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-07

Effects of culture filtrate proteins of Mycobacterium tuberculosis on IL-4, IFN-γ, GM-CSF with nasal polyp

ZOU Wei, et al

(*Department of Otolaryngology, Hospital of Chongqing University of Posts and Telecommunicaion*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of culture filtrate proteins (culture filtrate proteins, CFP) of Mycobacterium tuberculosis in vitro culture on IL-4, IFN-γ, GM-CSF in patients with nasal polyp. *Methods*: 5 ml peripheral venous bloods was obtained from the enrolled thirty patients with nasal polyp, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated. The optimal CFP concentration that stimulated lympholeukoeyte proliferation was measured by MTT.method. IL-4, IFN-γ, GM-CSF levels in culture supematant of the PBMCswere determined by ELISA before and after CFP treatment. *Results*: Supematant IL-4, GM-CSF levels were all significantly increased, while IFN-γ level was significantly decreased in these nasal polyp as compared with these normal of contro1. Aftert treatment of CFP, supematant IL-4, GM-CSF levels were significantly reduced, while IFN-γ level was significantly increased. *Conclusion*: CFP may inhibit Th2 cell activation and modulate the imbalance state of the Thl and Th2 cytokines. It proves that CFP could be useful in the treatment of nasal polyp.

【Key words】Nasal polyp; Mycohacterium tuberculosis; IL-4; IFN-γ; GM-CSF

鼻息肉(Nasal polyp)的发病机制复杂,多数学者认为是以嗜酸性粒细胞(Eosinophil,EOS)浸润为基本病理改变的疾病过程。EOS 能够合成、释放多种重要的炎性介质,可能诱导鼻粘膜的局部变态反应,引起鼻息肉的发病。结核分枝杆菌培养滤液蛋白(Culture filtrate protein,CFP)是结核分枝杆菌培养上清中的分泌蛋白,作为强 T 细胞抗原,能刺激免疫记忆细胞早期高效分泌 IFN-γ[1],目前主要用于结核的诊治方面。本实验通过体外干预,观察 CFP 对鼻息肉患者 IL-4、IFN-γ、GM-CSF 的影响,为探讨 CFP 成为治疗鼻息肉的辅助新方法提供实验依据。

作者介绍:邹 伟(1969-),男,主治医师,

研究方向:变应性鼻炎基础与临床。

1 材料和方法

1.1 病历资料

采自 2008 年 6 月~2009 年 12 月于我院住院行鼻内窥镜手术的慢性鼻-鼻窦炎(双侧,伴息肉)患者,其中男 21 例,女 9 例。年龄 18~65 岁,平均年龄 41 岁。手术前一周停用糖皮质激素及抗组胺类药物,所有患者均无变态反应性疾病病史。对照组 10 例,系单纯鼻中隔偏曲接受矫正手术的志愿者(排除慢性鼻-鼻窦炎,变应性疾病,以及全身性疾病和家族疾病史)。

1.2 实验材料

CFP 由美国科罗拉多州兽学院微生物免疫教研室 John T.Belisle，Ph D 惠赠。ELISA 试剂盒购自北京晶美生物工程有限公司。

1.3 单个核细胞分离

取外周静脉血 5 ml，离心后收集血浆于 -80℃保存以备测，采用密度梯度离心法分离 PBMC，等量 PBS 稀释后每管加等倍体积的淋巴细胞分离液，2 000 r/min，离心 20 min 后取中间环状乳白色单个核细胞层后等倍 1640 洗涤 2 遍后，采用台盼兰染色，活细胞计数 >95%，用 RPMI1640 培养液配制成 1×10^6 个 /ml 的细胞悬液。

1.4 淋巴细胞增殖实验

调整单个核细胞浓度至 1×10^5 个/ml，加入 96 孔培养板中，200 μl/ 孔，分别用 1.25、2.5、5、10、25 μg/ml 5 个不同浓度的 CFP 50 μl/ 孔干预，对照组加生理盐水。在 37℃、5% CO_2 条件下培养 48 h 后，每孔加 20 μl MTT（5 mg/ml，溶于 PBS，pH7.2），继续培养 4 h 后终止培养，去尽上清，加 DMSO 150 μl/ 孔，振荡 10 min，测 OD490 nm 值。结果用刺激指数 SI=OD 实验组 /OD 对照组表示。

1.5 细胞因子检测方法

取细胞悬液，鼻息肉组加 10 μg/ml 的 CFP，对照组加生理盐水。在 37℃、5% CO_2 条件下培养 48 h 后，收集上清液，采用酶联免疫吸附实验（Enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）进行 IL-4、IFN-γ、GM-CSF 含量测定，实验步骤按试剂盒说明书进行。

1.6 结果判断

在全自动酶标仪上，波长为 490 nm 处测 OD 值。以标准品浓度作横坐标，OD 值作纵坐标，绘制标准曲线，通过标本的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。

1.7 统计学处理

实验结果以和百分率表示。采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理，两样本均数比较用 t 检验。以 $P\leq0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 CFP 体外刺激鼻息肉患者淋巴细胞增殖实验

30 例鼻息肉患者外周血淋巴细胞用不同浓度 CFP 体外刺激，以生理盐水为阴性对照，测定淋巴细胞增殖反应。生理盐水组 OD490 nm=0.134 ± 0.008，CFP 浓度为 1.25、2.5、5、10、25 μg/ml 时的 OD490 nm 分别为 0.241 ± 0.017、0.273 ± 0.018、0.360 ± 0.037、0.581 ± 0.073、0.212 ± 0.015。用刺激指数表示结果见图 1，可见 CFP 浓度为 10 μg/ml 时，淋巴细胞增殖显著，其刺激指数为 4.33。

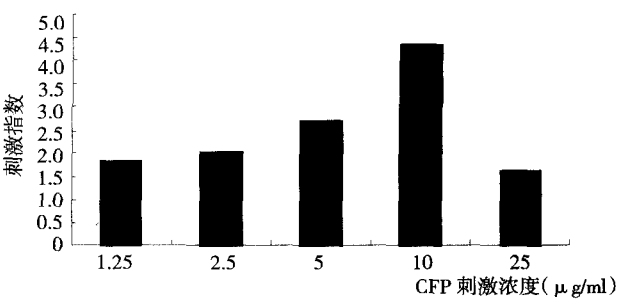


图 1 不同浓度 CFP 刺激淋巴细胞增殖反应

表 1 CFP 刺激前后及对照组培养上清中 IL-4、IFN-γ、GM-CSF 水平变化

分组	例数	IL-4（pg/ml）	IFN-γ（pg/ml）	GM-CSF（pg/ml）
CFP 组	30			
治疗前		50.127 ± 9.363	249.248 ± 100.295	42.468 ± 17.772
治疗后		34.545 ± 7.892	404.165 ± 168.957	35.365 ± 9.771
对照组	10	40.026 ± 8.103	363.166 ± 112.652	23.017 ± 8.876

2.2 CFP 干预前后细胞因子变化

如表 1 所示，鼻息肉组 PBMCs 培养上清中 IL-4、GM-CSF 含量在 CFP 干预前显著高于对照组，IFN-γ 含量显著低于对照组，两组比较差异有显著性（$P<0.05$）。CFP 干预后上清液中 IL-4、GM-CSF 较干预前水平明显下降，而 IFN-γ 较干预前水平升高，差异有显著性，且与对照组相比差异无显著性（$P>0.05$）。

3 讨 论

鼻息肉是鼻科常见病，其病理实质是黏膜的慢性炎症，由鼻窦黏膜上皮细胞和 T 细胞介导，通过细胞因子、趋化因子以及炎性介质对促炎细胞的激活，引起炎细胞浸润、腺体增生和黏蛋白分泌的异常、组织重塑等病理改变[2]。大量研究表明，鼻息肉组织以嗜酸性粒细胞浸润为主[3]，而嗜酸性粒细胞的浸润聚集可能和变态反应和细胞因子的作用有关[4]。自 Strachan 提出“卫生假说”理论后，认为机体免疫系统内抗感染免疫反应和变态反应之间存在一定的拮抗关系。这一认识的突破，为治疗变应性疾病提供了一种富有前景的免疫治疗手段。

在生理条件下，人体的 Th1 和 Th2 细胞处于相对平衡状态，机体内存在许多通过选择性的调节 Th1 或 Th2 细胞的分化来维持两者之间平衡的因素，其中 IL-4、IFN-γ 的相互作用是维持 Th1 与 Th2 细胞平衡的关键。一旦这种平衡被打破，即发生某些病理变化：当 Th1 细胞占优势时，机体即发生细胞免疫亢进所引起的疾病；当 Th2 细胞占优势时，机体随之发生体液免疫亢进所引起的疾病，因此维持 Th1 和 Th2 细胞的平衡有广泛的生理意义。在正常人鼻黏膜中，Th1 和 Th2 细胞也可能维持着这样一种平衡状态，当病理因素使 Th 细胞发生极化，引起细胞因子分泌的紊乱，则可能引起鼻息肉的发生。已有研究发现，IL-4 在鼻息肉及鼻息肉病中高表达，而 IFN-γ 低表达[5,6]。GM-CSF 能诱导粒细胞和巨噬细胞呈

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)09-1377-04

应用组织芯片检测 Pin1 在肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌组织中的表达

许晓梅[1],胡怀东[1],廖 勇[2],张大志[1]

(1.重庆医科大学附属第二医院感染科,重庆 400010;2.美国得克萨斯大学 MD 安德森癌症中心,美国 77030)

【摘 要】目的:利用组织芯片技术检测肽基脯氨酰顺反异构酶(Peptidyl-proplyl isomerase 1,pin1)在正常、肝炎、肝硬化及肝癌组织中的表达,了解 pin1 在肝细胞性肝癌发生、发展不同阶段的表达情况及与临床病理参数的关系。方法:用免疫组织化学染色法在组织芯片上同时检测 10 例 HBsAg 阳性病毒性肝炎、40 例肝硬化、19 例肝细胞性肝癌及 34 例正常肝组织中 pin1 的表达情况,并分析 pin1 在不同肝脏疾病组织中的表达差异。结果:pin1 在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化、肝细胞性肝癌及正常肝组织中的阳性表达率分别为 80%(8/10)、82.5%(33/40)、100%(19/19)、55.8%(19/34),肝细胞性肝癌组织中的阳性表达率明显高于 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化及正常肝组织,同时肝癌中 pin1 的表达强度也明显高于 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化和正常肝组织($P<0.001$),而在 HBsAg 阳性病毒性肝炎、肝硬化和正常肝组织中 pin1 阳性表达率及表达强度均无差异无统计学意义($P>0.001$);肝细胞性肝癌组织中 pin1 的表达与病理分级、有无淋巴结转移及临床分期无相关性($P>0.05$)。结论:pin1 参与了 HBsAg 阳性病毒性肝炎,肝硬化到肝细胞性肝癌的疾病进展过程,在肝细胞性肝癌的发生和发展中发挥了一定作用。

【关键词】pin1;HBsAg 阳性病毒性肝炎;肝硬化;肝细胞性肝癌;组织芯片

【中国图书分类法分类号】R51 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-28

作者介绍:许晓梅(1984-),女,硕士,

研究方向:病毒性肝炎的发病机理及治疗研究。

通讯作者:张大志,男,教授,E-mail: dzhzhang@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30872250)。

集落性生长,维持粒细胞系和单核细胞系的存活,促进生长,诱导分化和增强功能等。研究发现,在复发性和多发性鼻息肉患者血清中,GM-CSF 显著升高,比较术前术后水平也无明显差异,因此考虑复发性鼻息肉与 GM-CSF 及 EOS 密切相关[7]。

随着对鼻息肉发病机制的逐渐明确,其免疫治疗也显示了良好的前景。CFP 是结核分枝杆菌培养上清中的一种分泌蛋白混合物,这些蛋白在所有的卡介苗菌株和绝大部分非结核分枝杆菌中都没有表达,是强 T 细胞抗原。它能刺激机体产生特异性的细胞免疫应答,使单个核细胞出现增殖反应和产生 IFN-γ。目前,在结核病的诊治中研究较多[8],在变应性疾病的研究当中,尚属于起步阶段。

本研究通过测定 CFP 干预后淋巴细胞的增殖情况,结果表明 CFP 浓度为 10 μg/ml 时,细胞增殖最明显。我们以此浓度为干预浓度,检测 CFP 作用前后,鼻息肉患者外周血单个核细胞培养上清液中 IL-4、IFN-γ、GM-CSF 水平。结果显示,经 GFP 作用后,IL-4、GM-CSF 水平下降,明显低于干预前,而 IFN-γ 较干预前水平升高,与对照组相比差异无显著性。表明 CFP 能抑制 Th2 细胞活化,促进 Th1 细胞功能,从而纠正 Th1 和 Th2 细胞因子网络失平衡状态。CFP 的这种免疫调节作用,为探索治疗鼻息肉,尤其是复发性鼻息肉的免疫药物提供了理论依据,但其确切的作用机制和如何优化给药还有待于进一步研究和探讨。

参 考 文 献

[1] Dillon D C, Alderson M R, Day C H, et al. Molecular and immunological characterization of Mycobacteritun tubelculosisCFP-10.an immunodiagnostic antigen missing in Mycobacterimn bovis BCG[J]. J Clin Micobiol, 2000, 38(9): 3285-3290.

[2] 董 震.慢性鼻及鼻窦炎的病理本质及对策[J].中国医学文摘耳鼻咽喉科学,2006,21(3):139.

[3] 闫 舒,李 娜,杨艳华,等.鼻息肉的组织病理学特征及其发病机制[J].山东大学耳鼻喉眼学报,2008,22(1):52-54.

[4] 田从哲,檀艳丽,高水平,等.鼻息肉中 IgE 及 IL-5 与 EOS 浸润的相关性研究[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,21:916.

[5] 陈 嵘,史剑波,许 庚,等.鼻息肉组织 T 淋巴细胞 IFN-γ、IL-4 的表达[J].中国病理生理杂志,2003,19(12):1623-1626.

[6] 任秀敏,何 强,蒋新霞.白介素 4,白介素 5 在鼻息肉及鼻息肉病组织中的表达[J],河北医药,2009,31(22):3036-3038.

[7] 薛卫国,梅栩斌,逄明杰.GM-CSF 及 EOS 与复发性鼻息肉的关系探讨[J].医学临床研究,2004,21(1):51-52.

[8] 谢 婷,李文桂.结核分枝杆菌 CFP10 研究进展[J].中国病原生物学杂志,2007,2(3):228-229.

(责任编辑:关蕴良)