

• 论 著 •

流式微球分析法检测血清中 Th1/Th2/Th17 型细胞因子的表达在肺结核病患者中的临床意义*

张萧萧¹, 周慧芳^{2#}, 张朝霞^{1△}, 张琼¹, 孟存仁¹

(1. 新疆医科大学第一附属医院医学检验中心 830054; 2. 新疆维吾尔自治区喀什地区第一人民医院检验科 844000)

摘要:目的 探讨流式微球分析法(CBA法)检测血清 Th1/Th2/Th17 型细胞因子的表达在结核病患者中的临床意义。方法 按照 BD CBA Flex Set 检测试剂盒的要求,用 CBA 法检测 98 例肺结核患者(痰涂片阳性肺结核患者 38 例,痰涂片阴性肺结核患者 60 例)和 79 例同期健康体检者的 Th1 型细胞因子(白细胞介素 2、 γ 干扰素、肿瘤坏死因子),Th2 型细胞因子(白细胞介素 4、白细胞介素 6、白细胞介素 10)以及 Th17 型细胞因子(白细胞介素 17A)的表达水平,并分析 3 组之间的差异。结果 除白细胞介素 17A 组间、组内差异无统计学意义($P > 0.05$)外,结核组白细胞介素 2、白细胞介素 4、白细胞介素 6、白细胞介素 10、肿瘤坏死因子、 γ 干扰素水平均高于对照组($P < 0.05$);痰涂片阳性患者白细胞介素 2、白细胞介素 4、白细胞介素 10、 γ 干扰素水平均高于对照组($P < 0.05$),痰涂片阳性患者和阴性患者差异无统计学意义($P > 0.05$);而痰涂片阳性患者白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子水平均显著高于痰涂片阴性患者($P < 0.05$)。结论 白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子可作为判断结核病严重程度的指标,监测结核病病情的转归。与此同时,CBA 法作为 1 种新兴的检测技术,敏感度高,可同时检测多种细胞因子,并能大大节约血清用量与时间,因此可作为结核病检测和病情监测的实验室技术。

关键词:流式微球分析法; 肺结核; Th1/Th2/Th17; 细胞因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.02.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)02-0145-03

The significance of cytometric beads array for the detection of Th1/Th2/Th17 cytokine in the serum of patients with pulmonary tuberculosis*

ZHANG Xiaoxiao¹, ZHOU Hui Fang^{2#}, ZHANG Zhaoxia^{1△}, Zhang Qiong¹, MENG Cunren¹

(1. Laboratory Medicine Diagnostic Centre, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 2. Laboratory Medicine Diagnostic Centre, the First People's Hospital of Kashgar, Kashgar, Xinjiang 844000, China)

Abstract: Objective To evaluate the significance of cytometric beads array(CBA) in the detection of Th1/Th2/Th17 cytokine in patients with pulmonary tuberculosis. **Methods** The levels of 7 cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A) were detected by CBA according to the instruction of BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit(BD Biosciences, USA) in the serum of 98 patients with tuberculosis(38 sputum-smear positive and 60 sputum-smear negative) and 79 healthy individuals. Then analyze the relationship and differences among these groups. **Results** Except IL-17A, the level of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ was higher in the patients group than control group; As to IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- γ , the sputum-smear positive group had a higher level than control group, but the sputum-smear positive group had no difference with sputum-smear negative group. Compared with sputum-smear negative group, the sputum-smear positive group have a higher level of IL-6 and TNF. **Conclusion** IL-6 and TNF can be used to monitor the prognosis of tuberculosis. Meanwhile, CBA is sensitive, could detect several cytokines once with less sample consumption and time, thus could be applied for the monitor of tuberculosis progress.

Key words: cytometric beads array; tuberculosis; Th1/Th2/Th17; cytokines

目前认为,结核病是由结核分枝杆菌引起 1 种慢性呼吸道传染病,其中以肺结核最为常见。结核分枝杆菌被吞噬后寄生在巨噬细胞内,主要引起 CD4⁺ T 细胞介导的细胞免疫反应。其中 CD4⁺ T 细胞可分泌不同的细胞因子,包括 Th1 型细胞因子[白细胞介素 2(IL-2)、 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子(TNF)],Th2 型细胞因子[白细胞介素 4(IL-4)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 10(IL-10)]以及 Th17 型细胞因子[白细胞介素 17A(IL-17A)]等,其平衡状态与结核病的转归和预后密切相关^[1]。

细胞因子在血清水平多数为皮克(pg)级,目前免疫学检测方法主要有酶联免疫吸附法(ELISA法)、酶联免疫斑点法(ELISPOT法)及流式微球分析法(CBA法)。ELISA法虽操作简便但检测速度慢,所需样本量大,1次只能检测1种细胞因子,不能进行多种细胞因子的平行研究,且较易产生假阳性结果。ELISPOT法虽然比ELISA法敏感度高,但操作复杂、费时,而且也不适合进行细胞因子的网络研究。而CBA法可反复使用,可同时检测多个指标,所需样本量少,具有高通量自动化的特点,每种分析物做梯度稀释后可得到相应的独立标准

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460323);新疆重大疾病医学重点实验室开放课题(SKLIB-XJMDR-2014-6)。

作者简介:张萧萧,女,研究生,主要从事临床免疫与分子生物学方面的研究。# 共同第一作者:周慧芳,女,副主任技师,主要从事微生物和分子生物学方面的研究。△ 通信作者,E-mail:xia00513@aliyun.com。

稀释曲线,检测敏感度可高达 2.6 pg/mL,且每次 CBA 法比单次 ELISA 法时间短,可得到相当于 n 次(n 根据定制微球数目的不同有所差异)ELISA 法数据的结果,多项目联合检测比 ELISA 法更省钱,可用于多种细胞因子表达的研究与验证。

为探讨 CBA 法在研究 Th1/Th2/Th17 型细胞因子的变化与肺结核的关系,作者在 98 例肺结核患者(痰涂片阳性肺结核患者 38 例,痰涂片阴性肺结核患者 60 例)和 79 例同期体检的健康者中采用 CBA 法检测了以 Th1 代表性细胞因子 TNF、IFN- γ 、IL-2, Th2 代表性细胞因子 IL-4、IL-6、IL-10, Th17 代表性细胞因子 IL-17A,并分析了不同分组之间的差异,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 12 月至 2016 年 3 月在喀什地区肺科医院就诊的肺结核患者 98 例作为结核组,所有患者临床资料齐全,且其诊断均符合中华医学会结核病学分会 2001 年制订的《肺结核诊断和治疗指南》:具有肺结核病一般临床症状,X 线片检查有肺部病灶,痰检查抗酸杆菌阳性(痰菌阴性者符合痰菌阴性肺结核诊断标准)^[2]。纳入对象年龄 18~80 岁,排除合并有全身性疾病或其他免疫性疾病的患者以及妊娠妇女。同期收集同一家医院的健康体检者作为对照组,年龄 18~80 岁,排除妊娠期妇女。

1.2 仪器与试剂 使用美国 BD FACS Aria II 型流式细胞仪以及 BD CBA 人 Th1/Th2/Th17 试剂盒(BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, BD Biosciences, USA)。试剂盒主要包含:人 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF、IFN- γ 以及 IL-17A 捕获微球各 0.8 mL,人 Th1/Th2/Th17 藻红蛋白检测试剂 4 mL,人 Th1/Th2/Th17 细胞因子标准品(冻干粉)0.2 mL,藻红蛋白阳性质控品 0.5 mL,异硫氰酸荧光素阳性质控品 0.5 mL,洗液 130 mL,试验稀释液 30 mL。

1.3 方法

1.3.1 样本收集 所有试验对象均在清晨空腹抽取静脉血 3 mL 于不加抗凝剂的采血管内,分离血清,于 -80 °C 条件下保存,备用。

1.3.2 CBA 试剂盒细胞因子标准品的制备 将细胞因子标准品(2 500 pg/mL)置于 15 mL 的离心管中。标志 8 个流式管,分别为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256,检测稀释液为阴性对照。以上每管先加入 300 μ L 稀释液。从原液管开始进行倍比稀释,即从原液管中吸 300 μ L 到

1:2 管中混匀,然后从 1:2 管中吸 300 μ L 加入 1:4 管,以此类推。

1.3.3 混合的捕获微球的制备 每种捕获微球取出 10 μ L,根据要检测总样本数,每种捕获微球吸取的体积为:10 μ L \times 样本数。混合 7 种捕获微球,200 \times g,离心 5 min,弃上清液,重悬于血清增强液中,充分涡旋震荡混匀,避光、室温静置 30 min。

1.3.4 CBA 试剂盒血清样本中 7 种细胞因子水平的检测 每个试验管中加入 50 μ L 混合的捕获微球,标准品管中加入 50 μ L 梯度稀释好的标准品。在样本管中加入 50 μ L 的待测样本。然后在所有的试验管中加入 50 μ L 的人 Th1/Th2/Th17 藻红蛋白检测试剂。室温避光孵育 3 h。随后加入 1 mL 洗液,200 \times g,离心 5 min。弃上清液,加入 300 μ L 洗液重悬微球。留待上机检测。上机检测前涡旋震荡 3~5 s 以充分混匀。采集流式图谱并用 FCAP Array 软件进行数据分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示;2 组间比较采用 Mann-Whitney U (曼-惠特尼检验)检验;多组间比较采用单因素方差分析,多组之间的两两比较采用 LSD 法进行检验;检验水准 $\alpha=0.05, P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人口学资料 本研究共纳入痰涂片阳性肺结核 38 例,其中男 21 例,女 17 例;年龄 19~78 岁,平均(55.08 \pm 17.81)岁。痰涂片阴性肺结核 60 例,其中男 24 例,女 36 例;年龄 20~76 岁,平均(55.76 \pm 15.74)岁。对照组 79 例,其中男 54 例,女 25 例;年龄 22~55 岁,平均(33.86 \pm 8.04)岁。

2.2 不同分组血清中不同细胞因子水平比较

2.2.1 结核组与对照组细胞因子水平比较 除 IL-17A($P=0.226$)外,结核组患者血清中的 IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF、IFN- γ 水平均高于对照组($P<0.05$),见表 1。

2.2.2 对照组与痰涂片阳性组、阴性组的细胞因子水平对比 结果显示,IL-17A 组间、组内差异无统计学意义。痰涂片阳性组 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ 水平与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),而痰涂片阳性组与痰涂片阴性组相比,虽然因子水平相对稍有增高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。IL-6 水平在痰涂片阳性组中最高,痰涂片阴性组中次之,在对照组中最低,且差异有统计学意义($P<0.05$)。TNF 水平在痰涂片阳性组显著高于对照组和痰涂片阴性组($P<0.05$),其他组相比差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 1 结核组和对照组不同因子水平对比($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}$)

组别	n	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF	IFN- γ	IL-17A
结核组	98	19.49 \pm 1.00	19.50 \pm 0.79	627.49 \pm 265.80	22.42 \pm 4.22	81.97 \pm 311.27	14.82 \pm 0.22	35.20 \pm 13.13
对照组	79	18.70 \pm 0.59	18.79 \pm 0.67	21.53 \pm 1.20	21.03 \pm 0.82	21.10 \pm 1.12	14.68 \pm 0.10	32.08 \pm 8.02
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.015	<0.05	0.226

表 2 痰涂片阳性、阴性组与对照组不同因子水平对比($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}$)

组别	n	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF	IFN- γ	IL-17A
对照组	79	18.70 \pm 0.59	18.79 \pm 0.67	21.53 \pm 1.20	21.03 \pm 0.82	21.10 \pm 1.12	14.68 \pm 0.10	32.08 \pm 8.02
痰涂片阳性组	38	19.58 \pm 0.53*	19.51 \pm 0.59*	984.53 \pm 357.78*	22.91 \pm 6.50*	120.59 \pm 94.17*	14.83 \pm 0.19*	37.47 \pm 14.91
痰涂片阴性组	60	19.35 \pm 0.93*	19.47 \pm 0.90*	163.74 \pm 95.73*#	22.11 \pm 1.62*	22.00 \pm 1.18#	14.81 \pm 0.23*	33.76 \pm 1.78

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与痰涂片阴性组相比,# $P<0.05$ 。

3 讨 论

肺结核是 1 种由结核分枝杆菌引起的肺部感染性疾病,占各器官结核病总数的 80%~90%。大量研究已经证实, Th1、Th2、Th17 型免疫细胞及其分泌的细胞因子在结核病的潜伏感染、发病、治疗监测及转归的过程中均起着重要的作用^[3-4]。Th1 型免疫细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2、TNF 等细胞因子,这些细胞因子具有直接抗感染和调节功能,可促进细胞免疫应答。其中, IFN- γ 作为巨噬细胞的活化因子,是 1 种促炎因子,有助于消灭结核分枝杆菌,对人体起到保护作用^[5]; IL-2 主要由 Th1 型细胞受抗原刺激后合成,可以促进 T 细胞的体外生长,同时也能促进 NK 细胞的生长,提高单核-巨噬细胞的杀菌能力^[6];具有生物活性的 TNF- α 对于机体包围感染部位,防止感染扩散具有重要作用^[7]。Th2 型免疫细胞主要分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等细胞因子,辅助体液免疫应答,刺激 B 细胞增殖并产生抗体。其中, IL-4 可介导 Th2 型免疫反应,还可抑制 Th1 型免疫反应^[8]; IL-6 不仅是激活分泌 IFN- γ 的 T 细胞所必需的物质,而且还可以诱导保护性 T 细胞,加强 IFN- γ 的作用^[9];据报道, IL-10 可通过降低 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的活性以及下调单核-巨噬细胞协同刺激分子的表达来抑制细胞介导的抗结核分枝杆菌感染的免疫反应^[10]。Th17 是除 Th1、Th2 和 Treg 的另外 1 种 CD4⁺ T 细胞亚群。IL-17A 是 IL-17 家族的重要成员,由 Th17 细胞分泌产生。IL-17 家族在机体的免疫监视和免疫调控中发挥着重要作用,尤其在炎症性疾病中具有促进炎症反应和协同刺激 T 细胞活化的作用^[11]。在机体抗微生物感染过程中, IL-17A 主要发挥诱导 T 细胞活化、刺激巨噬细胞和上皮细胞产生多种促炎介质并放大致炎效应的作用。

本研究结果表明,除 IL-17A 外,痰涂片阳性组其他细胞因子水平均高于对照组,提示 Th1 型和 Th2 型细胞因子在结核病的自身免疫过程中对机体具有保护作用,与先前的报道一致, IL-6 和 TNF 水平均为痰涂片阳性组最高,痰涂片阴性组居中,对照组最低,且对对照组内差异远远小于结核组的组内差异^[12-14];而且痰涂片阳性组和痰涂片阴性组与对照组相比也具有更高的组内差异,这些均提示 2 种细胞因子与结核病病情严重程度有关,检测这些因子可用于结核病的病情监测。关于 IFN- γ ,有文献报道,对照组的水平高于结核组^[15];还有报道与作者的研究不一致,这种不一致可能与所纳入研究对象的机体免疫状态及病情严重程度有关,需进一步研究和探讨^[16-17]。

综上所述,检测血清中细胞因子的动态变化可了解结核病的严重程度,但是不能仅从某 1 个细胞亚型的免疫应答状况去解释结核病的免疫学发病机制,应考虑免疫应答整体的相互作用和影响及整个细胞因子网络水平。与此同时,相对于传统的 ELISA 法, CBA 法结合了流式细胞术敏感、快速、多通道的优点,对样本消耗量小且 CBA 试剂盒所检测的因子可自由组合定制,为进一步在整个因子网络水平研究和探索结核病的发病机制提供了良好的试验技术支持。

参考文献

[1] Carter LL, Swain SL. Single cell analyses of cytokine production[J]. *Curr Opin Immunol*, 1997, 9(2):177-182.
[2] 张培元. 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.

[3] Winslow GM, Cooper A, Reiley W, et al. Early T-cell responses in tuberculosis immunity[J]. *Immunol Rev*, 2008, 225(1):284-299.
[4] 邓国防, 雷建平. 结核病与相关免疫细胞和细胞因子[J]. *中国防痨杂志*, 2008, 30(5):456-460.
[5] Sutherland JS, Young JM, Peterson KL, et al. Polyfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses to tuberculosis antigens in HIV-1-infected patients before and after antiretroviral treatment[J]. *J Immunol*, 2010, 184(11):6537-6544.
[6] Zumla A, George A, Sharma V, et al. The WHO 2014 global tuberculosis report-further to go[J]. *The Lancet Global Health*, 2015, 3(1):e10-12.
[7] Lasco TM, Yamamoto T, Yoshimura T, et al. Effect of mycobacterium bovis BCG vaccination on mycobacterium-specific cellular proliferation and tumor necrosis factor alpha production from distinct Guinea pig leukocyte populations[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(12):7035-7042.
[8] Harris J, De Haro SA, Master SS, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis[J]. *Immunity*, 2007, 27(3):505-517.
[9] Leal IS, Smedegard B, Andersen P, et al. Interleukin-6 and interleukin-12 participate in induction of a type 1 protective T-cell response during vaccination with a tuberculosis subunit vaccine[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(11):5747-5754.
[10] De La Barrera S, Aleman M, Musella R, et al. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients[J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138(1):128-138.
[11] Basu R, Hatton RD, Weaver CT. The Th17 family: flexibility follows function[J]. *Immunol Rev*, 2013, 252(1):89-103.
[12] 朱晓燕, 陈慧, 徐俊驰, 等. 肺结核患者外周血 sIL-2R、IL-6、IL-8、IL-10 及 TNF- α 的检测意义[J]. *临床肺科杂志*, 2015(9):1564-1566.
[13] 南德齐. 肺结核患者血清 TNF 和 IL-6 联检的临床意义[J]. *放射免疫学杂志*, 2000, 13(6):364.
[14] 唐神结, 肖和平, 范以虎, 等. 肺结核患者血清前炎细胞因子及其受体的变化[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(6):325-329.
[15] 王琳, 蔡映云, 程秋兰, 等. 肺结核患者的 Th1/Th2 细胞因子失衡[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(9):535-537.
[16] 李红, 唐神结. 肺结核患者外周血 sIL-2R、TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 的检测及意义[J]. *中国防痨杂志*, 2011, 33(1):57-60.
[17] 沈云飞, 殷凯生, 王新宁. 肺结核与肺癌患者血 IL-12、IFN- γ 和 IL-4 的联合检测及意义[J]. *江苏医药*, 2006, 32(12):1110-1111.