

肺结核患者外周血 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分含量和 sCD26 水平之间的变化

彭雪峰, 范任华, 向延根, 刘艳科, 王雷

长沙市中心医院, 湖南 长沙 410004

摘要: **目的** 探讨肺结核患者外周血 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分含量和血清中 sCD26 水平变化。 **方法** 采取 30 例健康体检者 (HD), 30 例非耐药初治肺结核患者 (S-TB) 及 30 例多耐药结核病患者 (MDR-TB) 2 ml 肝素抗凝外周静脉血, 经 CD3、CD4、CD26 流式抗体标记后, Beckman 流式细胞仪 (FCM) 计数各组 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分含量, ELISA 检测外周血清中 sCD26 水平。 **结果** MDR-TB 组外周血 CD26⁺CD4⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞总数的 (13.63±3.85)%, 低于 S-TB 组 (20.17±5.94)% 以及对照 HD 组 (26.55±5.77)%, 比较差异有统计学意义 ($F=45.037, P=0.000$); MDR-TB 组血清 sCD26 含量为 (617.99±55.57) μg/ml, 高于健康人群对照 HD 组含量 (410.23±36.21) μg/ml 以及 S-TB 组含量 (435.22±38.34) μg/ml, 比较差异有统计学意义 ($F=197.287, P<0.05$)。Spearman 相关分析, 正常人群、S-TB 和 MDR-TB 肺结核病患者 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分含量与血清 sCD26 水平变化之间存在负相关 ($r=-0.391, P=0.002$)。 **结论** 随着肺结核由非耐药往耐药结核病发展, 外周血中 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分含量逐渐下降, 耐药肺结核病人血清中 sCD26 水平含量明显上调, 二者成负相关, 通过检测肺结核患者外周血 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分含量与血清中 sCD26 水平能了解肺结核疾病的进程。

关键词: CD26⁺CD4⁺T 细胞; sCD26; 肺结核

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2017)08-0919-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.08.007

Changes of of CD26⁺CD4⁺T cell percentage and sCD26 level in peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis

PENG Xue-feng, FAN Ren-hua, XIANG Yan-gen, LIU Yan-ke, WANG Lei

Changsha Central Hospital, Changsha, Hunan 410004, China

Corresponding authors: FAN Ren-hua, E-mail: fanrenhua14@163.com; XIANG Yan-gen, E-mail: xiangyangen@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the changes of percentage of peripheral blood CD26⁺CD4⁺T cell and the serum level of soluble CD26 (sCD26) in patients with pulmonary tuberculosis. **Methods** Thirty healthy donors (HD), 30 patients with susceptible primary tuberculosis (S-TB) and 30 patients with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) were enrolled in this study. 2 ml peripheral venous blood with heparin anticoagulation was stained with multicolor labeled monoclonal antibody of CD3, CD4 and CD26. Beckman flow cytometry (FCM) was used to count the percentage of CD26⁺CD4⁺T cell. ELISA was employed to determine peripheral serum level of sCD26. **Results** The percentage of CD26⁺CD4⁺T cell in all CD4⁺T cells was significantly lower in the MDR-TB group ((13.63±3.85)%) than in the S-TB group ((20.17±5.94)%) and HD group ((26.55±5.77)%) ($F=45.037, P=0.000$). The serum level of sCD26 was significantly higher in the MDR-TB group ((617.99±55.57) ug/ml) than in the HD group ((410.23±36.21) ug/ml) and S-TB group ((435.22±38.34) ug/ml) ($F=197.287, P=0.000$). Spearman correlation analysis showed that there was a negative correlation between the percentage of CD26⁺CD4⁺T cell and the serum level of sCD26 in healthy donors, patients with susceptible primary tuberculosis and patients with multidrug-resistant tuberculosis ($r=-0.391, P=0.002$). **Conclusions** With the development of pulmonary tuberculosis from susceptible primary tuberculosis to multidrug-resistant tuberculosis, the percentage of peripheral blood CD26⁺CD4⁺T cell decreases gradually, while the serum level of sCD26 increases significantly, and there is a negative correlation between them. Determination of the percentage of peripheral blood CD26⁺CD4⁺T cell and serum level of sCD26 in patients with pulmonary tuberculosis is conducive to knowing the progression of tuberculosis disease.

Key words: CD26⁺CD4⁺T cell; sCD26; pulmonary tuberculosis

基金项目: 科技部重大专项课题 (2013ZX10005004-004)

作者简介: 彭雪峰 (1971-), 男, 主管技师, 主要从事肺结核病研究工作。

通信作者: 范任华, E-mail: fanrenhua14@163.com; 向延根, E-mail: xiangyangen@126.com。

肺结核严重威胁人类健康,全球约有 20 亿肺结核带菌者,而我国结核患者数量居世界第二位,形势非常严峻^[1]。结核病免疫功能紊乱涉及到非特异性、特异性的细胞免疫,体液免疫以及多种免疫调节因子,有不同程度的免疫功能低下。有研究报道 CD26⁺CD4⁺T 细胞作为 Th1 细胞,它在机体的细胞免疫调节中发挥重要作用^[2-3]。同时,Rafiei 等^[4]报道在戊型肝炎中可溶性的 CD26 分子(sCD26)是一个有用的预后指标,Mahmoudi 等^[5]在研究普通变异性的免疫缺陷疾病患者时发现 sCD26 明显高于健康对照组。本研究分析正常人以及肺结核患者外周血中 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分比含量与 sCD26 水平变化,探讨它们在肺结核病发生发展中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2015 年 1-12 月长沙市中心医院住院患者中,MDR-TB 组 30 例,其中男 16 例,女 14 例,平均年龄(49.3±16.7)岁;初治肺结核组 30 例,其中男 19 例,女 11 例;平均年龄(52.0±14.2)岁;健康人群 30 例,其中男 17 例,女 13 例,平均年龄(48.9±15.7)岁,各组间性别、年龄比较差异无统计学意义(性别: $\chi^2 = 0.430, P = 0.950$;年龄: $F = 1.67, P = 0.277$)。肺结核病的临床诊断:根据临床症状、痰菌阳性排查、X 线胸片、CT 扫描,均符合中华医学会结核病分类与诊断标准^[6],非耐药肺结核病人、多耐药肺结核病人根据药敏结果确证后采集外周血,健康人对照组来源于经筛查身体各项指标正常的体检人群,空腹采血。入组标准:所有入组研究对象均无心、肝、肾等脏器合并症及自身免疫相关性或免疫性疾病,无其他感染,无糖尿病,3 个月内未用过免疫抑制剂及激素等药物。

1.2 试剂和仪器 采用 Beckman-Coulter Epics XL 流式细胞仪,流式单克隆抗体 CD3-PC5,CD4-FITC,CD26-PE,IgG1-FITC,IgG1-PC5,IgG1-PE,溶血剂 OptiLyse C 均购自美国 Beckman-Coulter 公司。血清 sCD26 ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司。

1.3 检测方法 取 2 ml 静脉血、肝素抗凝,混匀,各取 50 μ l 全血于 3 支测定管,第 1 管加入 IgG1-FITC、IgG1-PC5、IgG1-PE,第 2 管加入 CD3-PC5、CD4-FITC、CD26-PE,单克隆抗体量均为 20 μ l,标记抗体和抗凝血混匀后,在室温、避光 20 min 后,每管 300 μ l 溶血剂 OptiLyse C 溶解红细胞 1 h,用侧向散射光(SS)和前向散射光(Fs)圈门选取淋巴细胞群,以 IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5 为 CD26⁺CD4⁺T 细胞的同型

对照。分别检测健康人对照组、S-TB 组和 MDR-TB 组的 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分比含量,以及按照 ELISA 试剂盒操作说明要求检测各组 sCD26 水平变化。

1.4 统计学处理 用统计分析软件 SPSS19.0 对检测结果进行分析,多个样本均数间差异比较用方差分析 F 检验,其两两比较采用 LSD- t 检验。CD26⁺CD4⁺T 细胞与血清 sCD26 水平变化之间的关系采用 Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD26⁺CD4⁺T 细胞在正常人群、结核病患者外周血中的表达变化 MDR-TB 组外周血 CD26⁺CD4⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞总数的(13.63±3.85)%,低于 S-TB 组(20.17±5.94)%以及对照 HD 组(26.55±5.77)%,比较差异有统计学意义($F = 45.037, P = 0.000$)。见表 1。

表 1 HD 组、S-TB 组与 MDR-TB 组外周血 CD26⁺CD4⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞总数的百分比($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD26 ⁺ CD4 ⁺ T/CD4 ⁺ (%)	F 值	P 值
HD 组	30	26.55±5.77		
S-TB 组	30	20.17±5.94 ^a	45.037	0.000
MDR-TB 组	30	13.63±3.85 ^{a,b}		

注:a 与 HD 组比较, $P < 0.01$;b 与 S-TB 组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 血清 sCD26 在正常人群、结核病患者外周血中的表达变化 MDR-TB 组血清 sCD26 含量为(617.99±55.57) μ g/ml,高于健康人群对照 HD 组含量(410.23±36.21) μ g/ml 和 S-TB 组含量(435.22±38.34) μ g/ml,比较差异有统计学意义($F = 197.287, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 HD 组、S-TB 组与 MDR-TB 组外周血 sCD26 含量($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	sCD26(μ g/ml)	F 值	P 值
HD 组	30	410.23±36.21		
S-TB 组	30	435.22±38.34 ^a	197.287	<0.05
MDR-TB 组	30	617.99±55.57 ^{a,b}		

注:a 与 HD 组比较, $P < 0.05$;b 与 S-TB 组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 正常人群、肺结核病患者 CD26⁺CD4⁺T 细胞与血清 sCD26 水平变化之间的关系 采用 Spearman 相关分析,正常人群、S-TB 和 MDR-TB 肺结核病患者 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分比含量与血清 sCD26 水平变化之间存在负相关($r = -0.391, P = 0.002$)。见图 1。

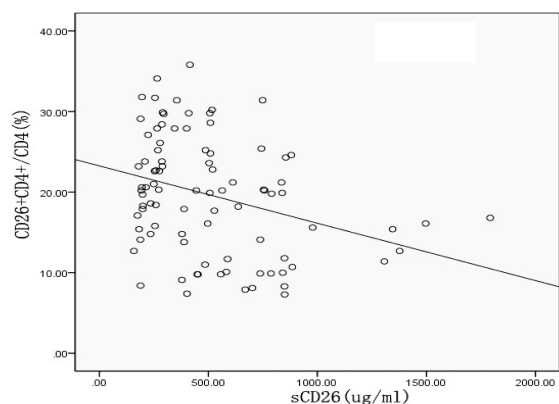


图 1 正常人群、S-TB 和 MDR-TB 肺结核病患者 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分比含量与血清 sCD26 水平散点图

3 讨论

肺结核病感染主要是吸入含有结核分枝杆菌的气溶胶后,细菌侵入肺部的远端区域并被肺树突细胞(DCs)吞噬,激活 Th1 适应性免疫,结核性肉芽肿形成,Th1 免疫不足以完全根除结核分枝杆菌而导致的^[7]。

Th1 细胞是机体最重要的免疫细胞之一,主要介导细胞免疫,外周血中 Th1 细胞反映机体细胞免疫状态。一般把胞内表达 INF- γ 的 CD4⁺T 细胞作为 Th1 细胞。Th1 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- β 等细胞因子,介导细胞免疫反应,在诱发器官特异性自身免疫病,器官移植排斥反应和抗感染免疫中起着重要的免疫调节作用。Krakauer 等^[2] 研究报道,把 CD26 分子作为 Th1 细胞表面标记。CD26 是一种高度保守、分布于多种细胞的 II 型跨膜糖蛋白,有蛋白水解作用,又名二肽酶 IV (DPPIV),它有多种天然底物,在体内执行多种重要功能^[8]。CD26 分子是细胞膜受体和共刺激分子,参与机体免疫调节、细胞移行、细胞黏附和细胞凋亡过程,同时,它的分泌体 sCD26 出现在血清中,与多种疾病的发生有关。Darrah 等^[9] 报道在利什曼原虫感染 Th1 介导的细胞免疫发挥重要作用,而 Carmen 等^[10] 更进一步的研究报道利什曼原虫感染会损害 CD26 的表达导致 T 细胞免疫受损。然而,关于 CD26 分子参与肺结核病发展进程并未有报道。

本研究发现,入组的非耐药肺结核患者 CD4⁺T 细胞的 CD26 分子表达低于正常人群,而耐药肺结核患者 CD4⁺T 细胞的 CD26 分子表达显著低于正常人群,提示由非耐药往耐药结核病发展,CD4⁺T 细胞的 CD26 分子表达降低明显,而外周血中的分泌体 sCD26 水平却明显增加。Spearman 统计学分析 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分比含量与血清 sCD26 水平变化之间在健康

人群,肺结核患者中成负相关,本研究猜测在肺结核疾病的发展进程中 CD4⁺T 细胞上的 CD26 分子受到某种酶剪切攻击,膜型的 CD26 分子从 CD4⁺T 细胞表面上脱落^[11],从而引起外周血中的分泌体 sCD26 水平上升。因此,同时监测 CD26⁺CD4⁺T 细胞百分比含量与血清 sCD26 两个指标对了解肺结核患病过程发展阶段有一定的提示作用。

综上所述,CD4⁺T 细胞上的 CD26 分子参与肺结核疾病的发展,然而,需要更进一步研究 CD26 分子参与肺结核疾病的具体机理,对寻找肺结核发病因素^[12-13] 和干预肺结核或许是一个潜在帮助。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Control 2011 [R]. Australian and New Zealand Journal of Public Health, 36:497-498.
- [2] Krakauer M, Sorensen PS, Sellebjerg F. CD4⁽⁺⁾ memory T cells with high CD26 surface expression are enriched for Th1 markers and correlate with clinical severity of multiple sclerosis [J]. J Neuroimmunol, 2006, 181:157-164.
- [3] Roca b, Francisco Feo-Brito. Expression of Th1, Th2, lymphocyte trafficking and activation markers on CD4⁺ T-cells of *Hymenoptera* allergic subjects and after venom immunotherapy [J]. Mol Immunol, 2014, 62:178-185.
- [4] Rafiei A, Ajami A, Mohammad Mirabi A, et al. Serum levels of soluble CD26, a novel prognostic marker for hepatitis E infection [J]. Jundishapur J Microbiol, 2016, 15;9(2):e31110.
- [5] Mahmoudi M, Hedayat M, Aghamohammadi A, et al. Soluble CD26 and CD30 levels in patients with common variable immunodeficiency [J]. J Investig Allergol Clin Immunol, 2013, 23(2):120-124.
- [6] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断与治疗指南 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(2):70-74.
- [7] Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17:374-380.
- [8] Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes [J]. Scand J Immunol, 2001, 54:249-264.
- [9] Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major* [J]. Nat Med, 2007, 13(7):843.
- [10] Rai AK, Thakur CP, Kumar P, et al. Impaired expression of CD26 compromises T-cell recruitment in human visceral leishmaniasis [J]. Eur J Immunol, 2012, 42(10):2782-2791.
- [11] Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients [J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(11):1723-1747.
- [12] 赵蓉, 向莹君. 肺结核患者生存质量状况及其影响因素研究 [J]. 实用预防医学, 2013, 20(11):1307-1310.
- [13] 唐惠红, 何志青, 龚芳, 等. 青壮年肺结核发病影响因素的条件 Logistic 回归分析 [J]. 实用预防医学, 2012, 19(6):830-833.