

白细胞介素-9 在肺结核患者血浆和 T 细胞中表达水平的研究

廖莎 霍凤敏 杨新婷 唐神结 陈效友 孙照刚

【摘要】 目的 比较肺结核患者、结核潜伏感染(latent tuberculosis infection, LTBI)者和健康人群血浆中白细胞介素-9(interleukin-9, IL-9)表达水平,以及各人群辅助性 T 细胞(Th9)细胞亚群经结核特异性早期分泌抗原靶蛋白 6(early secreting antigen target 6 kD, ESAT-6)刺激前后的变化,探索 IL-9 的表达特点。**方法** 选取 2015 年 4 月至 2016 年 4 月于首都医科大学附属北京胸科医院结核科住院治疗的 43 例初治肺结核患者作为肺结核组;LTBI 组和健康对照组均来自 2015 年 12 月于本院进行体检的健康体检者,其中健康对照组 33 名,LTBI 组 38 例。收集研究对象血浆,采用酶联免疫吸附法检测其血浆中 IL-9 水平;采用流式细胞术检测各组人群外周血单核淋巴细胞经 ESAT-6 刺激前后 Th9 细胞的比率。**结果** 肺结核组血浆 IL-9 表达水平为 175.04(149.67~221.70) pg/ml,LTBI 组为 60.21(48.43~102.37) pg/ml,健康对照组为 88.19(73.82~113.79) pg/ml。肺结核组血浆 IL-9 表达水平明显高于 LTBI 组($Z=7.64, P<0.01$)和健康对照组($Z=5.18, P<0.01$)。肺结核组 Th9 淋巴细胞比率为 0.17%(0.14%~0.23%),LTBI 组为 0.14%(0.10%~0.16%),健康对照组为 0.15%(0.11%~0.20%),各组间比较差异无统计学意义($H=4.45, P>0.05$)。经 ESAT-6 刺激培养后,肺结核组 Th9 细胞比率为 0.11%(0.09%~0.14%),LTBI 组为 0.10%(0.07%~0.12%),健康对照组为 0.11%(0.11%~0.14%),三组比较差异无统计学意义($H=1.13, P>0.05$);各组刺激前后 Th9 细胞比率,肺结核组差异有统计学意义($Z=-3.20, P<0.05$);LTBI 组差异有统计学意义($Z=-3.32, P<0.05$)。**结论** IL-9 在肺结核患者血浆中的表达水平高于 LTBI 者和健康人群,其对肺结核诊断具有一定的辅助价值。

【关键词】 结核,肺; 白细胞介素 9; 酶联免疫吸附测定; 流式细胞术; 评价研究

A study of the interleukin-9 expression in plasma and T cells in pulmonary tuberculosis patients LIAO Sha, HUO Feng-min, YANG Xin-ting, TANG Shen-jie, CHEN Xiao-you, SUN Zhao-gang. National Clinical Laboratory on Tuberculosis, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China
Corresponding author: SUN Zhao-gang, Email: sunzg75@163.com

【Abstract】 Objective To compare interleukin-9 (IL-9) expression in plasma and the proportion of Th9 cell subsets change before and after stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* specific early secreting antigen target 6 kD (ESAT-6) in pulmonary tuberculosis patients, latent tuberculosis infection (LTBI) ones and healthy-control people, in order to explore the feature of IL-9 expression. **Methods** A total of 43 pulmonary tuberculosis patients with initial treatment were selected from Department of Tuberculosis, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University between April 2015 and April 2016. The LTBI group ($n=38$) and the healthy control group ($n=33$) were all from those who getting physical examination in our hospital on December 2015. Plasma levels of IL-9 were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the ratio of Th9 cells in peripheral blood mononuclear cells was measured by flow cytometry before and after stimulation with ESAT-6. **Results** The plasma level of IL-9 in pulmonary tuberculosis group, LTBI group, healthy-control group were 175.04 (149.67–221.70) pg/ml, 60.21 (48.43–102.37) pg/ml, and 88.19 (73.82–113.79) pg/ml respectively. The level of IL-9 in pulmonary tuberculosis group was significantly higher than those in LTBI group ($Z=7.64, P<0.01$) and healthy-control group ($Z=$

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2017.03.013

基金项目:北京市医院管理局临床医学发展专项基金(ZY1X201304);首都医学发展专项基金(2016-2-1043);北京结核病临床数据和样本资源库项目(D131100005313012)

作者单位:101149 首都医科大学附属北京胸科医院国家结核病临床实验室(廖莎、霍凤敏、孙照刚),结核三科(杨新婷、陈效友),结核一科(唐神结)

通信作者:孙照刚,Email:sunzg75@163.com

5.18, $P < 0.01$). Percents of Th9 in the three groups were 0.17% (0.14%–0.23%), 0.14% (0.10%–0.16%), and 0.15% (0.11%–0.20%) respectively; there was no statistical significance ($H = 4.45$, $P > 0.05$). After stimulated with ESAT-6, differences of percents of Th9 in the three groups were 0.11% (0.09%–0.14%), 0.10% (0.07%–0.12%), 0.11% (0.11%–0.14%) respectively and there was no statistical significance in the three groups ($H = 1.13$, $P > 0.05$). However, significant differences of Th9 before and after stimulated with ESAT-6 were found in pulmonary tuberculosis group ($Z = -3.20$, $P < 0.05$) and LTBI group ($Z = -3.32$, $P < 0.05$).

Conclusion The plasma level of IL-9 in pulmonary tuberculosis patients is significantly higher than those in LTBI or healthy-control ones, which has subsidiary value in the diagnosis of tuberculosis.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary; Interleukin-9; Enzyme-linked immunosorbent assay; Flow cytometry; Evaluation studies

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染引起的一种慢性传染性疾病, 全球约有 1/3 的人群感染 MTB, 约有 5%~10% 的结核潜伏感染 (latent tuberculosis infection, LTBI) 者发展为活动性结核病^[1-2]。我国是结核病高发国家, LTBI 率达 44.5%^[3]。现有的诊断方法, 如结核菌素皮肤试验 (tuberculin skin test, TST) 和 γ -干扰素释放试验 (interferon gamma release assay, IGRA) 等目前广泛使用的结核病免疫诊断方法, 不能满足现实的需求^[4-6]。因此, 探索用于辅助诊断的新方法将有力促进结核病的控制^[7]。

白细胞介素-9 (interleukin-9, IL-9) 主要由新型效应性 T 细胞 Th9 分泌, 同时 Th2、Th17、调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg)、自然杀伤性 T 细胞 (nature killer T cell, NKT) 和肥大细胞等也可以分泌。IL-9 是一种多效应的细胞因子, 在多种疾病中起着重要的应答和调节作用^[3], 其在活动性结核病患者血清中的分泌水平高于健康人群。但是, 目前尚没有系统比较 IL-9 在肺结核患者、LTBI 者和健康人群中表达差异的研究。笔者通过检测健康人群、LTBI 者和肺结核患者血浆中 IL-9 表达水平, 以及各人群 Th9 细胞亚群经结核特异性早期分泌抗原靶蛋白 6 (early secreting antigen target 6 kD, ESAT-6) 刺激前后的变化, 探索 IL-9 的表达特点。

对象和方法

一、研究对象和样本收集

选取 2015 年 4 月至 2016 年 4 月于首都医科大学附属北京胸科医院结核科住院治疗的初治肺结核患者作为肺结核组, 共 43 例; 患者均经临床症状、胸部 CT 扫描、痰涂片抗酸染色、结核分枝杆菌培养及菌群鉴定确诊, 其中 11 例痰培养阳性, 9 例痰涂片抗酸染色阳性, 其余 23 例经病理学、影像学 and GeneXpert 检测确诊, 且入组前治疗时间均 ≤ 4 周。排除慢性非传染性疾病 (如糖尿病、肺部肿瘤)、自身

免疫性疾病 (如肾炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等)、感染性疾病 (如病毒性肝炎、寄生虫感染等)、其他呼吸系统疾病患者, 以及 HIV 感染者和免疫抑制剂使用者。

LTBI 组和健康对照组均来自 2015 年 12 月于首都医科大学附属北京胸科医院进行体检的健康体检者。健康对照组共 33 名, TST 硬结平均直径均 < 5 mm, 经结核感染 T 细胞斑点试验 (T-SPOT.TB) 检测提示 MTB 感染阴性, 无咳嗽、咯痰、发热等相关症状, 无慢性病史, 无呼吸系统疾病。LTBI 组共 38 例, TST 硬结平均直径均 > 10 mm, T-SPOT.TB 检测阳性, 均无咳嗽、咯痰、发热等相关症状, 胸部 X 线摄影检查无异常, 无慢性病史, 无呼吸系统疾病。

所有研究对象均抽取 4 ml 静脉血于肝素钠抗凝管中备用。本研究经首都医科大学附属北京胸科医院伦理委员会批准, 研究对象入组前均签订知情同意书。

二、主要设备和试剂

1. 设备: 流式细胞分析采用美国 BD 公司 FAC-SCalibur 型流式细胞仪, 酶标仪为美国 Thermo Fisher 公司生产。CO₂ 培养箱购自上海 Heal Force 公司。离心机购自日本日立公司。

2. 试剂: IL-9 检测试剂盒购自美国 Cloud-Clone 公司。单克隆抗体: CD3-PerCP、CD4-FITC、CD8-APC、溶血素、阻断剂均购自美国 BD 公司; IL-9-PE、固定剂和破膜剂均购自美国 eBioscience 公司; ESAT-6 特异性抗原购自英国 Oxford 公司; RPMI1640 培养基购自美国 Hyclone 公司。

三、实验检测

1. 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA): 取各组研究对象静脉血液 3 ml 于肝素钠抗凝管中, 4℃ 离心 15 min, 离心转速为 3000 r/min, 离心半径为 15 cm。收集上清于冻存管中, 置于一 80℃ 冻存备用。ELISA 法检测研

研究对象血浆 IL-9 水平,操作过程严格按照试剂盒说明进行。

2. 流式细胞术分析:取研究对象肝素钠抗凝血 0.5 ml 于 12 孔细胞培养板中,加入 RPMI1640 培养基充分混匀,总体积 1 ml。研究对象均设置 ESAT-6 刺激培养组和未刺激组。抗原刺激组加入 ESAT-6(终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$),未刺激组加入等体积 RPMI1640 培养基,充分混匀,置于 5% CO_2 培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。20 h 后在培养体系中加入阻断剂,终浓度为 0.7 $\mu\text{l}/\text{ml}$,继续培养 5~6 h。进行细胞表面 CD3-PerCP、CD8-APC、溶血素、破膜剂、细胞内 IL-9-PE 因子染色。具体操作均参照各抗体说明书进行。应用流式细胞仪进行结果检测分析。在淋巴细胞设门里分析 $\text{CD}3^{+}$ 细胞表达情况,在 $\text{CD}3^{+}$ 细胞设门里分析 Th9 细胞的表达情况。

四、统计学分析

使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。首先采用 Kolmogorov-Smirnova 检验法对各组数据进行正态性检验,符合正态分布计量资料数据采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间均数的比较采用方差分析;偏态分布数据采用“中位数(四分位数间距),即 $M(Q_1 \sim Q_3)$ ”表示,组间比较使用 Kruskal-Wallis 秩和检验,进一步的两两比较使用 Dunn-Bonferroni 法,配对资料的比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验;计数资料的比较采用卡方检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、基本情况

肺结核组 43 例,其中,男 23 例(53.5%),女 20 例(46.5%),平均年龄(36.5 \pm 10.5)岁;LTBI 组共 38 例,其中,男 20 例(52.6%),女 18 例(47.4%),平均年龄(34.4 \pm 12.9)岁;健康对照组共 33 名,其中,男 18 名(54.5%),女 15 例(45.5%),平均年龄(27.7 \pm 5.2)岁。三组研究对象年龄和性别构成均衡可比($F = 1.58, P = 0.119; \chi^2 = 0.02, P = 0.980$)。

二、血浆 IL-9 水平检测

肺结核组血浆 IL-9 表达水平为 175.04(149.67~221.70) pg/ml,LTBI 组为 60.21(48.43~102.37) pg/ml,健康对照组为 88.19(73.82~113.79) pg/ml。肺结核组血浆 IL-9 表达水平明显高于 LTBI 组($Z = 7.64, P < 0.01$)和健康对照组($Z = 5.18, P < 0.01$),健康对照组和 LTBI 组比较,差异无统计学意义($Z = -2.11, P > 0.05$)。

三、外周血单核细胞中 Th9 细胞比率

血浆中的 IL-9 主要来源于 Th9 淋巴细胞,因此,进一步采用流式细胞分析技术检测 Th9 淋巴细胞在外周血单核细胞中的比率。结果显示,肺结核组 Th9 淋巴细胞比率为 0.17% (0.14%~0.23%),LTBI 组为 0.14% (0.10%~0.16%),健康对照组为 0.15% (0.11%~0.20%),各组间比较差异无统计学意义($H = 4.45, P > 0.05$)。

四、抗原刺激对 Th9 细胞比率的影响

在结核特异性抗原 ESAT-6 刺激培养后,肺结核组 Th9 细胞比率为 0.11% (0.09%~0.14%),LTBI 组为 0.10% (0.07%~0.12%),健康对照组为 0.11% (0.11%~0.14%),三组比较差异无统计学意义($H = 1.13, P > 0.05$)。分别比较各组研究对象经 ESAT-6 刺激培养前后 Th9 细胞比率,肺结核组差异有统计学意义($Z = -3.20, P < 0.05$);LTBI 组差异有统计学意义($Z = -3.32, P < 0.05$);健康对照组差异无统计学意义($Z = -1.83, P > 0.05$)。

讨 论

免疫学方法是一种简单、快速、无创的结核病辅助诊断方法,本研究探索了 IL-9 在肺结核患者中的分泌特点及其潜在的应用价值。IL-9 是主要由新型效应 T 细胞 Th9 淋巴细胞分泌的一种细胞因子^[8-9],同时 $\text{CD}8^{+}$ T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞也有一定的分泌^[10]。研究表明,IL-9 是一种具有多种生物学功能的细胞因子,参与机体多种疾病的免疫调节过程。研究发现,IL-9 在诸如慢性乙型肝炎^[11]、寄生虫感染^[12]等患病过程中表达升高,但在幽门螺旋杆菌感染中有不同的报道^[13-14]。另有研究表明 IL-9 在肺结核患者血清中的表达水平高于健康人群^[7,10]。本研究用 ELISA 方法检测肺结核患者、LTBI 者、健康对照者血浆中 IL-9 的表达水平,研究发现肺结核患者血浆中 IL-9 的表达水平明显高于健康对照者,与其他研究结果相似^[7],同时本研究发现肺结核患者血浆中 IL-9 的表达水平明显高于 LTBI 者。可见,血浆中 IL-9 水平的检测对于结核病诊断有一定的辅助意义。

同时,笔者在细胞水平检测了 Th9 细胞的比率,通过流式细胞技术分析研究对象经结核特异性抗原 ESAT-6 刺激前后 Th9 细胞在外周血单核细胞中比率的变化。结果表明,肺结核患者 Th9 细胞比率与 LTBI 者及健康人群相比差异没有统计学意

义。考虑由于淋巴细胞亚群中 Th9 细胞的比率较低,流式细胞检测术敏感度不足,因此,本次研究未能发现 Th9 细胞的比率在肺结核患者、LTBI 者和健康人群间的差异。

研究发现,IL-9 参与损伤 Th1 型细胞抗结核免疫反应,IL-9 的表达水平与 γ -干扰素(IFN- γ)的表达水平呈明显负相关甚至拮抗关系,通过外源性中和 IL-9 或者敲除 IL-9 基因,可以明显提高体内 IFN- γ 的表达水平^[15]。同时,IFN- γ 可以通过抑制 IL-4 的表达来降低 IL-9 的表达水平^[16]。笔者发现,通过结核特异性抗原刺激后,肺结核患者 Th9 细胞比率明显低于刺激前,可能因 ESAT-6 刺激外周血单核细胞后 IFN- γ 释放水平上升,从而抑制 IL-9 的表达^[14-15]。

综上所述,本研究发现 IL-9 在肺结核患者血浆中的表达水平明显高于 LTBI 者和健康对照者,提示有望通过检测人群血浆 IL-9 来予以区分;肺结核患者血浆标本经结核特异性抗原刺激后,Th9 细胞在外周血单核细胞中的比率降低,说明经抗原刺激后流式细胞分析法并不适合 Th9 细胞比率的检测。针对以上结论,还应扩大样本量进一步研究;同时,本次研究未纳入其他呼吸系统感染性疾病患者,对于 IL-9 在肺结核与其他呼吸系统疾病中的表达差异有待继续探索。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [2] Zumla A, George A, Sharma V, et al. WHO's 2013 global report on tuberculosis: successes, threats, and opportunities. *Lancet*, 2013, 382(9907): 1765-1767.
- [3] 刘二勇,周林,成诗明. 结核分枝杆菌潜伏性感染及预防性治疗研究进展的系统评价. *中国防痨杂志*, 2013, 35(4): 231-239.
- [4] Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(4 Pt 1): 1376-1395.
- [5] Morgan M, Kalantri S, Flores L, et al. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*, 2005, 5: 62.
- [6] Chegou NN, Black GF, Kidd M, et al. Host markers in QuantiFERON supernatants differentiate active TB from latent TB infection: preliminary report. *BMC Pulm Med*, 2009, 9: 21.
- [7] Hur YG, Kang YA, Jang SH, et al. Adjunctive biomarkers for improving diagnosis of tuberculosis and monitoring therapeutic effects. *J Infect*, 2015, 70(4): 346-355.
- [8] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ effector T cells. *Nat Immunol*, 2008, 9(12): 1347-1355.
- [9] Veldhoen M, Uytendaele C, van Snick J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 2008, 9(12): 1341-1346.
- [10] 梁友宝. 肺结核患者外周血中分泌 IL-9 的淋巴细胞亚群的探讨. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2011.
- [11] 邓勇, 苏智军, 余雪平, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血 IL-9 和 IL-10 及 TGF- β 1 检测及其意义. *中国病毒病杂志*, 2012, 2(4): 296-300.
- [12] 沙地克·阿帕尔, 吐尔洪江·吐逊, 马海长, 等. 肝脏泡型包虫病患者外周血单个核细胞 IL-9、PU.1 及 IRF-4 mRNA 表达水平的研究. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(1): 46-49.
- [13] 余抒, 邹全明. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7E07 表位的免疫学性质研究和 IL-9/CD4⁺ IL-9⁺ T 细胞在幽门螺杆菌感染中的作用研究. 重庆: 第三军医大学, 2011.
- [14] 程平. IL-9⁺ CD4⁺ T 细胞/IL-9 与幽门螺杆菌感染的相关性研究和 $\gamma\delta$ T 细胞在金黄色葡萄球菌肺炎的宿主应答中的作用. 重庆: 第三军医大学, 2013.
- [15] Wu B, Huang C, Kato-Maeda M, et al. IL-9 is associated with an impaired Th1 immune response in patients with tuberculosis. *Clin Immunol*, 2008, 126(2): 202-210.
- [16] Schmitt E, Germann T, Goedert S, et al. IL-9 production of naive CD4⁺ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol*, 1994, 153(9): 3989-3996.

(收稿日期:2016-09-06)

(本文编辑:李敬文)