

• 论著 •

肺结核患者结核分支杆菌 EIS 抗原特异性
细胞免疫的临床研究

王火生 陈心春 李美忠 张维 邓群益 付向东 张红梅 王辉 周伯平

【摘要】 目的 探讨肺结核患者结核分支杆菌 EIS 抗原特异性细胞免疫水平与病情的关系。方法 选择 30 例初治、痰涂片结核杆菌阳性的活动性肺结核患者,采用比色法测定其外周血淋巴细胞对结核分支杆菌 EIS 抗原的增殖反应,酶联免疫吸附法测定细胞分泌的 γ -干扰素(IFN- γ)及白细胞介素-10(IL-10)的水平,并与 20 名健康对照者和 16 例康复的肺结核患者进行比较。结果 康复者对 EIS 的细胞免疫最为强烈,其外周血淋巴细胞的细胞增殖强度显著高于健康对照者和活动性肺结核患者(P 均 < 0.01)。活动性肺结核患者外周血淋巴细胞在受到 EIS 刺激时分泌的 IFN- γ 显著低于康复者($P < 0.05$)。EIS 抗原刺激主要诱导细胞分泌 Th2 型细胞因子 IL-10。结论 活动性肺结核患者对 EIS 抗原的细胞免疫水平低下,经抗结核治疗康复后,细胞免疫维持在较高水平。EIS 抗原诱导 Th1/Th2 免疫失衡可能是 EIS 参与结核发病的机制之一。

【关键词】 肺结核; 细胞免疫; EIS 蛋白

Study on specific cellular immunity of enhance intracellular survival antigen of mycobacterium tuberculosis in patients with pulmonary tuberculosis WANG Huo-sheng, CHEN Xin-chun, LI Mei-zhong, ZHANG Wei, DENG Qun-yi, FU Xiang-dong, ZHANG Hong-mei, WANG Hui, ZHOU Bo-ping. Shenzhen East Lake Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the level of specific cellular immunity in patients with active pulmonary tuberculosis and its potential relationship with severity of the disease. **Methods** Thirty active pulmonary tuberculosis patients with positive tubercle bacilli in sputum were enrolled for the study. Immune responses including lymphocytes proliferation enhanced by enhance intracellular survival (EIS) antigen and cytokine production including interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-10 (IL-10), were assayed. Cell proliferation was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), while cytokine production was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results were compared to those of 20 healthy individuals and 16 persons recovered from tuberculosis. **Results** Cell proliferation response and IFN- γ production were significantly higher in patients convalescent from tuberculosis compared to patients with active pulmonary tuberculosis, EIS antigen was found to elicit a dominant Th2 cytokine response. **Conclusion** Impaired Th1 immune response to EIS is observed in patients with active pulmonary tuberculosis. Induction of imbalance of Th1/Th2 immune response may be the main action of EIS, which may be a factor of pathogenesis of tuberculosis.

【Key words】 pulmonary tuberculosis; cellular immune response; enhance intracellular survival

感染结核分支杆菌后是否发病以及病情的严重程度与宿主的遗传背景、感染细菌量及其毒力、机体的免疫状态等多种因素有关。结核分支杆菌通过其致病因子(包括菌体产物或分泌的活性蛋白)作用于机体的免疫系统,抑制特异性免疫保护作用的产生,而逃避免疫杀伤,导致慢性感染的形成^[1-4]。EIS (enhance intracellular survival)基因为结核分支杆菌复合群特有的基因,EIS 基因产物具有提高结核分支杆菌在巨噬细胞中生存能力的作用,这也是 Friedman 教授发现这一基因并命名的由来^[5,6]。结

核分支杆菌 EIS 基因产物是一种可溶性分泌型蛋白,不仅分泌到感染结核分支杆菌的巨噬细胞胞浆中,还可分泌到细胞外,作用于其他未感染的巨噬细胞、吞噬细胞或免疫细胞,影响机体保护性免疫反应的产生。因此,EIS 蛋白既是结核分支杆菌特异性抗原,又是结核分支杆菌致病相关因子。本研究观察活动性肺结核患者对 EIS 抗原的细胞免疫应答状态、特征及其与肺结核发生的可能关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象:深圳市东湖医院收治的初治、痰涂片示结核分支杆菌阳性的活动性肺结核患者 30 例(患者组),其中男 18 例,女 12 例;年龄(30.05 ± 11.25)岁。20 名健康体检者(健康对照组),其中男 14 名,女 6 名;年龄(29.78 ± 8.45)岁;均无结核病

基金项目:广东省深圳市科技计划项目(200304204)

作者单位:518020 深圳市东湖医院

作者简介:王火生(1958-),男(汉族),湖北武汉人,副主任医师,获深圳市科技进步奖 8 项。

史和任何临床症状,经胸部X线检查确定无异常。康复组的肺结核患者16例(康复组),其中男8例,女8例;年龄 (31.05 ± 10.50) 岁,为已经完成抗结核治疗后1年以上的肺结核患者。

1.2 标本采集和体外细胞培养:采集肝素抗凝的外周血4 ml,经Ficoll方法分离单个核细胞(PBMC),洗涤后,使用RPMI 1640培养液将细胞浓度调至 $2 \times 10^6/L$,接种在 25 cm^2 的培养瓶中,2~3 h后收集悬浮的淋巴细胞,重新计数并将细胞浓度调至 $2 \times 10^6/L$ 。在圆底96孔培养板上每孔加入100 μl 细胞,再向每孔补充不含或含有植物血凝素(PHA)或EIS抗原的RPMI 1640完全培养液100 μl ,使总体积为200 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5%的 CO_2 条件下培养48 h。PHA终浓度为10 $\mu\text{g}/L$,EIS抗原浓度为10 mg/L 。每一培养条件重复3孔。

1.3 重组EIS蛋白表达和纯化:表达EIS蛋白的工程菌BL21(DE3)由美国亚利桑那大学微生物系Friedman教授提供。挑取含重组表达EIS的单菌落,扩大培养,37 $^{\circ}\text{C}$ 、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达4 h。将诱导表达的菌体重悬浮,超声,取超声上清,通过Ni-Chelating Sepharose亲和层析纯化融合蛋白EIS,经0.05~0.20 mol/L咪唑梯度洗脱,收集融合蛋白洗脱峰。

1.4 细胞增殖反应测定:采用比色法测定细胞增殖反应,使用日本同仁化学研究所生产的细胞计数试剂盒(cell counting Kit-8)。将细胞培养48 h后,按试剂盒说明书要求加入染料,孵育4 h,测定波长450 nm处的吸光度(A)值。细胞增殖强度=特定刺激条件下的A值-无刺激条件下的A值。

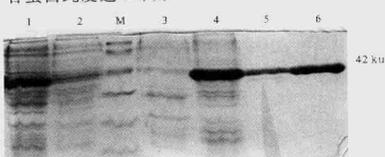
1.5 细胞因子测定:收集培养细胞上清,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定上清中 γ -干扰素(IFN- γ)及白细胞介素-10(IL-10)的含量。试剂盒购自美国R&D公司,操作按说明书进行。

1.6 统计学方法:采用GraphPad Prism软件进行统计学处理。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析(AVOVA)和 q 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EIS蛋白的表达和纯化(图1):由于EIS融合蛋白含有6个组氨酸亲和和纯化标签,因此选择亲和层析进行纯化,在0.20 mol/L咪唑和0.15 mol/L NaCl洗脱条件下,获得纯化的分子质量为42 ku的EIS蛋白。质量分数为10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果表明,纯化的融

合蛋白纯度达90%。

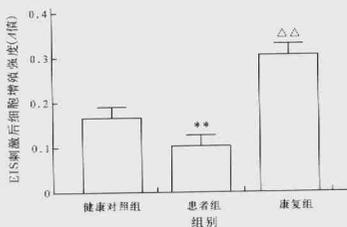


1:表达EIS大肠杆菌的裂菌液;2:表达EIS大肠杆菌的裂菌液上清;3:穿透液;4~5:分别为0.05、0.10和0.20 mol/L的咪唑洗脱EIS蛋白;M:分子质量标准,依次是94、67、43、50、20.1和14.4 ku

图1 重组EIS蛋白的表达和纯化

Figure 1 Expression and purification of recombinant EIS protein

2.2 淋巴细胞增殖反应(图2,图3):康复组外周血淋巴细胞对EIS抗原刺激后的细胞增殖反应最强烈,显著高于健康对照组和患者组($P < 0.01$)。但3组外周血淋巴细胞对PHA刺激后的细胞增殖反应差异并无显著性。



注:与健康对照组比较,△△ $P < 0.01$;与康复组比较,** $P < 0.01$

图2 3组外周血淋巴细胞对EIS蛋白抗原刺激的增殖反应

Figure 2 Proliferation of peripheral blood lymphocyte stimulated by EIS

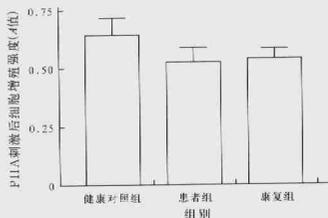


图3 3组外周血淋巴细胞对PHA刺激的增殖反应

Figure 3 Proliferation of peripheral blood lymphocyte stimulated by PHA

2.3 细胞因子含量(图4,图5):患者组外周血淋巴细胞在受到EIS蛋白抗原刺激时分泌IFN- γ 量显著低于康复组($P < 0.05$);患者组和康复组IL-10的分泌量显著高于健康对照组($P < 0.05$ 或 $P <$

0.01), 但患者组与康复组 IL-10 的分泌量之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。各组淋巴细胞受到 EIS 蛋白抗原刺激时, IL-10 的分泌量远远超过 IFN- γ 的分泌量。

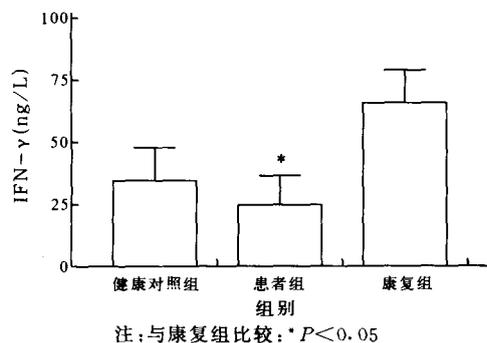


图 4 3 组外周血淋巴细胞分泌 IFN- γ 含量的比较
Figure 4 Comparison of content of IFN- γ secreted by peripheral blood lymphocytes among three groups

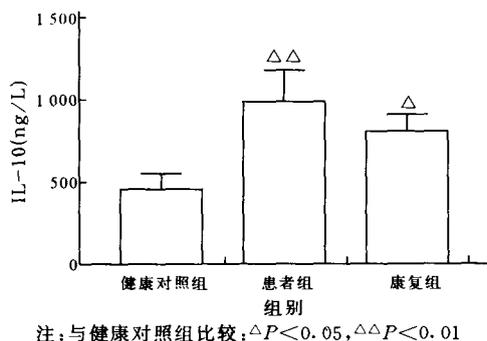


图 5 3 组外周血淋巴细胞分泌 IL-10 含量的比较
Figure 5 Comparison of content of IL-10 secreted by peripheral blood lymphocytes among three groups

3 讨论

肺结核的发生与机体的免疫状态密切相关, 结核分支杆菌通过菌体产物或分泌的致病因子抑制机体产生对结核菌的有效免疫是结核菌生存和致病的重要机制。本研究中通过观察活动性肺结核患者对结核分支杆菌致病基因产物 EIS 的特异性细胞免疫应答反应, 发现活动性肺结核患者的抗原特异性细胞增殖反应及 IFN- γ 分泌量均显著低于康复的肺结核患者。表明活动性肺结核患者不能产生有效的针对结核菌 EIS 蛋白抗原的保护性免疫, 从而有利于结核菌慢性感染和肺结核的发生。

尽管活动性肺结核患者细胞免疫水平(包括抗原特异性细胞增殖反应和 Th1 型细胞因子 IFN- γ 含量)显著低于康复的肺结核患者, 但与健康对照组比较, 两组间 Th1 型细胞免疫差异并无显著性, 仅 Th2 型细胞因子 IL-10 水平显著高于健康对照组, 这与其他学者的报道不完全相同^[1-3]。这可能是由于

EIS 蛋白是相对特异的结核分支杆菌抗原, EIS 基因仅见于结核分支杆菌复合群^[5,6], 而其他分支杆菌不存在该基因。因此, 体外淋巴细胞针对 EIS 抗原刺激的应答反应是体内结核分支杆菌复合群感染后产生特异性免疫反应的具体体现, 而常规使用的卡介菌纯蛋白衍生物抗原可能与其他分支杆菌的抗原存在交叉反应, 所测定的细胞免疫反应水平不能排除其他非致病性分支杆菌感染的交叉免疫应答。此外, EIS 蛋白还是结核分支杆菌致病相关基因产物, 可以增强结核分支杆菌在巨噬细胞中的生存能力^[5,6], 但对其作用机制并不清楚。其中一种可能就是 EIS 诱导 Th2 型细胞免疫, 抑制 Th1 型细胞免疫应答, 从而有利于结核分支杆菌的生存和慢性感染的维持。我们的研究显示, 无论是活动性肺结核患者、康复的肺结核患者还是健康人, 其外周血淋巴细胞受到 EIS 抗原的刺激时, 均以 Th2 型细胞分泌 IL-10 为主, IL-10 的分泌量是 Th1 型细胞分泌 IFN- γ 量的 10 倍以上, 支持上述观点。Friedman 等通过基因工程技术敲除 EIS 基因, 构建 EIS 基因缺失的结核分支杆菌, 观察其对免疫细胞功能和细胞因子分泌的影响, 初步发现, 与野生株相比, EIS 缺失株感染细胞后, Th1 型细胞分泌细胞因子的量增多, 而 Th2 型分泌量减少(待发表), 亦支持上述观点。在小鼠结核分支杆菌感染模型中发现, IL-10 可激活慢性潜伏性感染而导致肺结核, 表明 IL-10 在肺结核发生中有重要作用^[4]。其具体机制还需要进一步验证。

参考文献:

- Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32: 1605-1613.
- Jo E K, Park J K, Dockrell H M. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2003, 16: 205-210.
- Rook G A, Dheda K, Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 661-667.
- Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis D L, et al. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice [J]. *J Immunol*, 2002, 169: 6343-6351.
- Wei J, Dahl J L, Moulder J W, et al. Identification of a Mycobacterium tuberculosis gene that enhances mycobacterial survival in macrophages [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182: 377-384.
- Dahl J L, Wei J, Moulder J W, et al. Subcellular localization of the intracellular survival-enhancing Eis protein of Mycobacterium tuberculosis [J]. *Infect Immun*, 2001, 69: 4295-4302.

(收稿日期: 2006-04-05 修回日期: 2006-07-26)

(本文编辑: 李银平)