

结核病与肿瘤坏死因子和白细胞介素的相关性研究

韦庆文¹, 迟秀文², 杨利桃¹, 束振华¹, 黄震¹ (1. 广东省深圳市龙岗中心医院 518116; 2. 广东医学院, 广东东莞 523808)

【摘要】 目的 研究 3 种白细胞介素 IL-12、IL-18、IL-10 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β) 在结核病免疫发病机制中的作用, 为开发新的疫苗和发展免疫疗法提供依据。**方法** 用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)及素化酶复合物(生物素-亲和素双抗夹心)ABC-ELISA 试剂盒检测 39 例结核性胸膜炎患者胸腔积液和血清中以上 5 种细胞因子的水平, 并进行相关性分析。对治疗过程中 10 例结核病Ⅲ型和 5 例Ⅳ型患者 X 线胸片提示进展期到好转期上述细胞因子在胸腔积液中的变化进行观测。**结果** 对每组、每型的分析发现, 从总体来看, 除 IL-18 外, IL-12、TNF- α 、IL-10 胸腔积液中含量均远远超过血清中含量, 而值得注意的是转化生长因子 β_1 血清中含量远远超过胸腔积液中含量, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** IL-18 可以作为加强疫苗保护性的一种辅助因子; 各组、各型患者胸腔积液中上述细胞因子的相关性分析结果可为结核病免疫发病机制的研究提供参考; 开展对治疗好转结核病的免疫治疗时应综合考虑机体的免疫状态, 某种细胞因子的作用不是对所有患者都有效, 与体内细胞因子间的平衡有关。

【关键词】 结核; 胸水; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素类; 免疫

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.02.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)02-0148-03

Study of relationship between tuberculous with interleukins and TNF WEI Qing-wen¹, CHI Xiu-wen², YANG Li-tao¹, SHU Zhen-hua¹, HUANG Zhen¹ (1. Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China; 2. Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

【Abstract】 Objective To study the role of three kinds of interleukins IL-12, IL-18 and IL-10 and two kinds of cytokines TNF- α and TGF- β_1 in the immunopathogenesis of tuberculosis to provide evidence for designing new vaccine and developing immunotherapy. **Methods** The concentration of IL-12, IL-18, TNF- α and TGF- β_1 and IL-10 in pleural fluid(PF) and serum were measured by sandwich ABC-ELISA and sandwich double antibody ELISA Kits in 39 cases of tuberculosis pleural effusion and analysed their correlation. The changes of these cytokines were observed during the course from progression to resolving stage showed by X-ray in 10 cases of type III and 5 cases of type IV. **Results** Except IL-18, the other cytokines were far higher in PF than in serum; the level of TGF- β was higher in serum than in PF ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** IL-18 perhaps could be used as an adjuvant agent to enhance the efficacy of vaccine, which could be considered to design a new vaccine. The results of correlation with these cytokines could be used to help the study of immunopathogenesis in tuberculosis. Through the observation of these cytokines in the course of therapy, it might be important to consider the immune situation synthetically, because the role of a certain cytokine related with the balance of cytokine network is not effective in all patients.

【Key words】 tuberculosis; hydrothorax; tumor necrosis factor-alpha; interleukins; immunization

近年来, 由于结核分枝杆菌(MTB)耐药株的出现及获得性免疫缺陷综合征(AIDS)合并结核病正成为人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性人群主要的死亡原因, 结核病这一古老的疾病作为全球性公共卫生问题的严重性日益加重^[1]。本研究对结核性胸腔积液中主要由单核巨噬细胞来源的 3 种致炎细胞因子 IL-12、IL-18、肿瘤坏死因子(TNF- α)和两种抑制性细胞因子转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、IL-10 水平及治疗过程中这些细胞因子的变化进行观测及相关性分析。通过对这些细胞因子在免疫发病中的作用研究, 以期对结核的发病机制加深了解, 同时为疫苗设计及免疫治疗提供依据^[2-3]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集深圳市结核病防治所 2008 年 3 月至 2009 年 4 月结核性胸腔积液患者的胸水及入院时的血清标本共 39 例。男性患者 31 例, 年龄 22~83 岁; 女性 8 例, 年龄 18

~62 岁。根据中华医学会结核病学分会《肺结核诊断和治疗指南》确诊并分组、分型^[4]。其中初治组患者 29 例, 复治组患者 10 例。39 例患者中, Ⅱ型肺结核 1 例, Ⅲ型 28 例, Ⅳ型 10 例。

1.2 方法

1.2.1 胸水标本处理 收集新鲜穿刺胸水约 5 mL, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 分装, -20 °C 保存。

1.2.2 血清标本来源 为患者入院时常规检查所抽取全血标本, 分离血清, 由深圳市结核病防治所检验科提供。-20 °C 保存待用。

1.2.3 试剂 试剂购自深圳晶美生物制品公司。其中人 IL-12、IL-18 试剂盒为原装进口(奥地利 Bender MedSystems); 人 TNF- α 、TGF- β_1 、IL-10(深圳晶美公司进口分装)。IL-12 及 IL-18 采用 ABC-ELISA 检测; TNF- α 、TGF- β_1 、IL-10 采用双抗体

夹心 ELISA 检测。主要仪器为 BIO-TEK ELX800 型酶标仪 (USA)。

1.3 统计学方法 用 SAS 软件进行数据处理。先对总体进行正态性检验,若为正态分布,其统计学描述以 $\bar{x} \pm s$ 表示;若为非正态分布,统计学描述为以 $M \pm (Q3 - Q1)$ 表示,即:中位数 \pm 四分位数间距;在小样本时,正态检验水准 $\alpha = 0.10$ 。成组比较时,若两总体均为正态总体,则可用参数检验,student, s test,其中再作方差齐性检验;若两总体不是都来自正态总体,则用秩和检验。用 SAS 程序中关于相关和回归分析程序进行各细胞因子间相关性分析。

2 结 果

2.1 初治组和复治组两类细胞因子水平及相关性分析

2.1.1 两组胸水和血清中各细胞因子水平及显著性分析 初治组、复治组间各种细胞因子水平经显著性检验,差异无统计学意义。但从总体上看,胸水与血清中除 IL-18 含量无显著性差异外,其余各种细胞因子含量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);初治组也除 IL-18 外,其余各细胞因子水平在胸水和血清中含量差异极显著;复治组除 IL-18 与 TGF- β_1

外,其余各种细胞因子在胸水及血清中含量差异显著。从总体来说,3 种致炎细胞因子中 IL-18 在血清中水平最高(表 1)。

2.1.2 两组胸水中各细胞因子水平的相关性分析 (1)初治组 IL-12 与 TGF- β_1 水平呈正相关($r = 0.393\ 1, P = 0.034\ 9$); IL-12 与 IL-10 水平呈显著正相关($r = 0.550\ 8, P = 0.002\ 0$); IL-18 与 TGF- β_1 水平呈正相关($r = 0.459\ 7, P = 0.012\ 1$); TNF- α 与 IL-10 间也呈显著正相关($r = 0.648\ 1, P = 0.000\ 1$)。 (2)复治组 IL-12 与 TNF- α 间呈正相关($r = 0.852\ 1, P = 0.001\ 7$)。从两组总体来看,IL-12 与 TNF- α 呈正相关($r = 0.317\ 3, P = 0.049\ 0$);IL-12 与 IL-10 呈正相关($r = 0.481\ 9, P = 0.001\ 9$);IL-18 与 TGF- β_1 也呈正相关($r = 0.316\ 1, P = 0.049\ 9$);TNF- α 与 IL-10 呈显著正相关($r = 0.567\ 0, P = 0.000\ 2$)。

2.2 不同临床类型结核患者两类细胞因子水平及相关性分析

2.2.1 不同临床类型结核患者两类细胞因子水平及显著性分析 除 IL-18 外,Ⅲ、Ⅳ型结核患者胸水和血清中其他各种细胞因子含量均有显著性差异;Ⅲ、Ⅳ型间比较,仅血清中 TGF- β_1 和胸水中 IL-10 水平有明显差异(表 2)。

表 1 初治组、复治组两类细胞因子水平比较 (pg/mL)

组别	n	IL-12		IL-18		TNF- α	
		胸水	血清	胸水	血清	胸水	血清
总例数	39	2 400.00 \pm 1 538.00	231.00 \pm 137.00 \blacklozenge	884.00 \pm 592.00	933.80 \pm 296.00	82.00 \pm 81.00	14.00 \pm 7.00 \blacklozenge
初治组	29	1 622.00 \pm 1 538.00	222.00 \pm 143.00 *	788.80 \pm 536.63 \star	933.00 \pm 446.00	102.00 \pm 82.00	13.76 \pm 5.48 \star \blacklozenge
复治组	10	2 218.00 \pm 148.72 \star	318.00 \pm 78.40 \star	644.46 \pm 557.54 \star	782.30 \pm 59.50	79.02 \pm 46.26 \star	25.00 \pm 20.22 \blacklozenge \blacktriangle

组别	n	TGF- β_1		IL-10	
		胸水	血清	胸水	血清
总例数	39	16 412.82 \pm 6 291.10 \star	45 169.05 \pm 13 854.16 \star \blacklozenge	174.00 \pm 49.00	8.70 \pm 4.20 \blacklozenge
初治组	29	17 024.14 \pm 5 550.01 \star	47 229.41 \pm 12 686.74 \star \blacklozenge	153.00 \pm 44.00	8.90 \pm 3.65 *
复治组	10	12 875.00 \pm 6 550.00	36 412.50 \pm 17 171.89 \star	125.90 \pm 114.89 \star	9.30 \pm 7.50 \blacktriangle

注: \star 为 $\bar{x} \pm s$,余为 $M \pm (Q3 - Q1)$ 。与两组总体胸水比较, $\blacklozenge P < 0.01$;与初治组胸水比较,* $P < 0.01$;与复治组胸水与比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

表 2 不同临床类型结核患者两类细胞因子水平比较 (pg/mL)

结核分型	n	IL-12		IL-18		TNF- α	
		胸水	血清	胸水	血清	胸水	血清
Ⅱ型	1	3 010.00 \pm 0.00	472.00 \pm 0.00	1 850.00 \pm 0.00	1 022.00 \pm 0.00	102.00 \pm 0.00	21.20 \pm 0.00
Ⅲ型	28	2 352.00 \pm 1 552.00	229.00 \pm 92.00 *	738.86 \pm 528.44 \star	719.60 \pm 123.50	101.50 \pm 88.00	15.00 \pm 10.00 *
Ⅳ型	10	1 085.00 \pm 410.00	275.58 \pm 142.65 \star \blacktriangle	678.18 \pm 495.67 \star	673.07 \pm 557.37 \star	69.00 \pm 54.00	11.17 \pm 4.17 \star \blacktriangle

结核分型	n	TGF- β_1		IL-10	
		胸水	血清	胸水	血清
Ⅱ型	1	27 500.00 \pm 0.00	45 320.00 \pm 0.00	28.00 \pm 0.00	4.50 \pm 0.00
Ⅲ型	28	16 157.14 \pm 6 643.71 \star	40 740.00 \pm 11 925.14 \star \blacklozenge	195.50 \pm 57.00	8.65 \pm 4.40 *
Ⅳ型	10	4 545.03 \pm 16 020.00 \star	56 241.67 \pm 12 790.32 \star \blacktriangle	174.00 \pm 52.75 \blacklozenge \blacklozenge	8.52 \pm 1.86 \star \blacktriangle

注: \star 为 $\bar{x} \pm s$,余为 $M \pm (Q3 - Q1)$ 。与Ⅲ型胸水和血清细胞因子水平比较,* $P < 0.01$;与Ⅱ、Ⅲ型胸水或血清细胞因子水平比较, $\blacklozenge P < 0.05$, $\blacklozenge P < 0.01$;与Ⅳ型胸水比较, $\blacktriangle P < 0.01$ 。

2.2.2 Ⅲ、Ⅳ型结核患者胸水中各细胞因子相关性分析 Ⅲ型患者胸水中 IL-12 与 TNF- α 呈正相关, $r = 0.449\ 3 (P = 0.016\ 5)$;IL-12 与 IL-10 显著正相关 ($r = 0.588\ 0, P =$

$0.001\ 0$);TNF- α 与 IL-10 呈正相关 ($r = 0.477\ 6, P = 0.010\ 2$)。Ⅳ型结核患者胸水中仅 TNF- α 与 IL-10 呈正相关 ($r = 0.760\ 3, P = 0.010\ 7$)。

2.3 III、IV 型结核患者治疗过程中胸水两类细胞因子水平动态观测 本研究对治疗过程中 X 线胸片示进展期到好转期的 10 例 III 型结核患者和 5 例 IV 型结核患者胸水中的 5 种细胞因子水平进行了观测, 结果见表 3 和表 4。

表 3 III 型患者结核治疗过程中 5 种细胞因子水平变化 (n=10)

细胞因子	IL-12	IL-18	TNF- α	TGF- β_1	IL-10
增高	8	7	5	6	1
降低	2	1	5	4	9
不变	—	2	—	—	—

注: — 表示无数据。

表 4 IV 型结核患者治疗过程中 5 种细胞因子水平变化 (n=5)

细胞因子	IL-12	IL-18	TNF- α	TGF- β_1	IL-10
增高	2/5	3/5	4/5	4/5	3/5
降低	3/5	2/5	1/5	1/5	2/5

3 讨 论

目前, 由于结核菌耐多药株的出现及艾滋病合并结核病, 基于对结核病发病机制了解的深入, 出现了免疫疗法。免疫疗法有利于增加机体的抵抗力, 有助于感染的消除, 因而现在有许多关于免疫疗法的研究^[5]。

本研究对 39 例结核性胸腔积液患者胸水与血清中单核巨噬细胞来源的 5 种致炎细胞因子和抑制性细胞因子在胸水及血清中的水平进行了观测。结果发现, 不管是初治组还是复治组, III 型还是 IV 型, IL-12、TNF- α 、IL-10 在胸水中的含量都远远超过血清中的含量, 差异显著。而 IL-18 不管在总体, 初治组、复治组, III 型还是 IV 型, 胸水中的含量与血清中的含量都没有统计学差异; 而且从总体上看, 3 种致炎细胞因子中 IL-18 在血清中水平最高, 这一发现少见文献报道。从表 1 和表 2 可见 TGF- β_1 血清中的含量远远高于胸水中的含量, 差异有统计学意义。可能是由于结核性胸膜炎为结核杆菌本身及蛋白抗原渗出胸膜, 胸膜受刺激后引起的迟发型超敏反应, 其反应强度大, 炎症反应严重, 所以引起机体产生了更高水平的 TGF- β_1 来对抗感染引起的免疫^[6]。而胸水中 IL-10 水平在两型间差异极显著, III 型患者胸水中 IL-10 含量显著高于 IV 型患者, 表明 IL-10 在 III 型结核抗感染免疫中更为重要。

由于 IL-18 是一种新发现的细胞因子, 因而在结核病中对其研究甚少。本研究发现, 结核患者胸水中 IL-18 与 TGF- β_1 水平呈正相关 ($r=0.3161, P=0.0499$); 初治组患者 IL-18 与 TGF- β_1 间也呈正相关 ($r=0.4597, P=0.0121$), 可为其他研究提供参考。初治组患者胸水中这几种细胞因子的相关性分析表明, 三种致炎细胞因子与抑制性细胞因子间都相关, 包括 IL-12、IL-18 与 TGF- β_1 之间呈正相关, IL-12 与 TNF- α 同 IL-10 间呈显著正相关; 复治组患者 IL-12 与 TNF- α 间呈显著正相关 ($r=0.8521, P=0.0017$)。

MTB 感染时, 体内免疫细胞产生的各种细胞因子处于精密调节中, 构成了细胞因子网络, 各细胞因子之间也相互调节, 通过各种机制来发挥免疫调节作用。有学者在体外实验中有

研究了 IL-12 和 TGF- β_1 、TGF- β_1 和 TNF- α 、TGF- β_1 和 IL-10、TNF- α 和 IL-10、IL-12 和 IL-10、TNF- α 和 IL-12 等细胞因子之间相互诱导、相互抑制、相互调节的关系^[7-8]。

目前的研究用增加 Th1 型细胞因子浓度来提高疫苗的保护性, 如 IL-12、IL-18 都用作疫苗的佐剂 (adjuvant)^[9]。本研究表明, IL-18 用来作为基因疫苗的佐剂应该更为理想, 这与范雄林等^[10]的实验结果相符。

本研究观测了 10 例 III 型结核和 5 例 IV 型结核患者, 治疗过程中 X 线胸片示由进展期至好转期, 其胸水中这两类细胞因子的水平及变化。作者认为, 用细胞因子来开展免疫疗法不能一概而论; 用某种细胞因子进行治疗是否会发挥保护效应, 还取决于体内的免疫环境。各细胞因子间处于严密的相互调控中, 要想用细胞因子进行的辅助治疗有效, 需要考虑体内的细胞因子环境, 使用能取得满意效果的细胞因子, 以达到免疫治疗的效果。

参考文献

- [1] North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis [J]. Annu Rev Immunol, 2004, 22(4): 599-623.
- [2] Tomioka H. Adjunctive immunotherapy of mycobacterial infection [J]. Curr Pharm Des, 2004, 26(10): 3297-3312.
- [3] Hiraki A, Aoe K, Matsuo K, et al. Simultaneous measurement of T2-helper 1 cytokines in tuberculous pleural effusion [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7(12): 1172-1177.
- [4] 中华医学会结核病学分会. 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.
- [5] Tomioka H. Adjunctive immunotherapy of mycobacterial infections [J]. Curr Pharm Dec, 2004, 10(26): 3297-3312.
- [6] Barrea DL, Aleman M, Musella R, et al. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients [J]. Clin Exp Immunol, 2004, 138: 128-138.
- [7] Jalapathy KV, Prabha C, Sulochana D, et al. Correlates of protective immune response in tuberculosis pleuritis [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004, 40(2): 139-145.
- [8] Wilkinson KA, Aung H, Wu M, et al. Modulation of transforming growth factor β -1 gene expression by interleukin-12 [J]. Scand J Immunol, 2000, 52: 271-277.
- [9] Triccas JA, Sun L, Palendira U, et al. Comparative affects of plasmid-encoded interleukin-12 and interleukin 18 on the protective efficacy of DNA vaccination against Mycobacterium tuberculosis [J]. Immunol Cell Biol, 2002, 80(4): 346-350.
- [10] 范雄林, 王丽梅, 王福祥, 等. Th1 型细胞因子基因对结核分枝杆菌基因疫苗诱导 BALB/c 小鼠产生抗 CFP10 抗体水平的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(3): 260-262.