

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.20.032

结核分枝杆菌抗原特异反应性白细胞介素-22对结核性和恶性胸腔积液的鉴别诊断价值*

原艳明^{1,2} 王仲元^{3△} 王心静⁴ 程小星⁴ 安慧茹³ 翟守恒² 张玲莉² 吕双梅²

(1 解放军医学院 北京 100039; 2 解放军 264 医院感染科 山西 太原 030001;

3 解放军 309 医院结核三科 北京 100091; 4 解放军 309 医院结核病研究室 北京 100091)

摘要 目的: 研究结核性胸膜炎与恶性胸水患者胸腔积液单个核细胞经结核分枝杆菌特异性抗原肽刺激后 IL-22 的表达特点, 探索 IL-22 对结核性胸膜炎和恶性胸水的鉴别诊断价值。**方法:** 采用 eBioscience IL-22 和 IFN- γ 试剂盒, 利用流式细胞术微球阵列法检测 52 例结核性胸膜炎和 35 例恶性胸水患者胸水上清、PFMCs 经结核分枝杆菌特异性抗原肽刺激培养后上清中 IL-22 和 IFN- γ 的浓度, 并作统计学分析。**结果:** 结核性胸膜炎组 IL-22 在刺激后上清中表达水平显著升高, 且显著高于恶性胸水组 ($P < 0.05$)。结核性胸膜炎组 IL-22 与 IFN- γ 在刺激后上清中表达水平显著相关 ($r = 0.3485$, $P = 0.0320$)。**结论:** 结核分枝杆菌抗原特异反应性 IL-22 可作为鉴别诊断胸腔积液病因的新指标。

关键词: 白细胞介素-22; 结核性胸膜炎; 恶性胸水; 鉴别诊断

中图分类号: R521.7; R446.62 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)20-3922-03

Diagnostic Value of Mtb-antigen-specific Interleukin-22 in Tuberculous and Malignant Pleural Effusions*

YUAN Yan-ming^{1,2}, WANG Zhong-yuan^{3△}, WANG Xin-jing⁴,CHENG Xiao-xing⁴, AN Hui-ru³, ZHAI Shou-heng², ZHANG Ling-li², LV Shuang-mei²

(1 Medical School of PLA, Beijing, 100039, China; 2 Infections Department, 264 hospital, Taiyuan, Shaanxi, 030001, China;

3 Third Department of the Tuberculosis Research Institute, 309 hospital, Beijing, 100091, China;

4 Division of Tuberculosis Research Institute, 309 hospital, Beijing, 100091, China)

ABSTRACT Objective: To study the characteristics of the expression of IL-22 generated by the PFMCs of TPE and MPE was stimulated by ESAT-6 and CFP-10 and to probe into the diagnose value in TPE and MPE. **Methods:** The eBioscience IL-22 and IFN- γ kits and the Flow cytometry streaming technology were used to test the concentration of IL-22 and IFN- γ , the PFMCs culture fluid supernatant and the PFMCs culture fluid supernatant stimulated by specific MTB antigen peptides of 52 patients with TPE and 35 patients with MPE, and the results were statistically analyzed. **Results:** The concentrations of IL-22 was elevated significantly in PFMCs stimulated by peptides in TPE group which was significantly higher than that of the MPE group ($P < 0.05$). The concentrations of IL-22 and IFN- γ in PFMCs stimulated by peptides were correlated in TPE group ($r = 0.3485$, $P = 0.0320$). **Conclusion:** Mtb-antigen-specific IL-22 become a the new biomarker for pleural effusions differential diagnosis.

Key words: Interleukin-22; Tuberculous pleurisy; Malignant pleural effusions; Differential diagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R521.7; R446.62 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)20-3922-03

前言

结核性胸膜炎和恶性肿瘤是胸腔积液的常见病因, 但由于胸腔积液中含菌率低, 而胸膜活检在造成患者创伤的同时又很难取得合格的标本, 因此早期确诊难度较大。白细胞介素-22 (Interleukin-22, IL-22) 属于白细胞介素-10 (Interleukin-10, IL-10) 细胞因子家族, 在天然免疫和获得性免疫细胞中均有表达^[1]。有研究证实结核性胸腔积液 (Tuberculous Pleural Effu-

sions, TPE) 单个核细胞 (pleural fluid mononuclear cells, PFMCs) 经结核分枝杆菌特异性抗原肽 (early secreted antigenic target-6, ESAT-6)、(culture filtrate protein-10, CFP-10) 刺激后可表达高水平的 IL-22^[2], 但与恶性胸水 (Malignant Pleural Effusions, MPE) 的比较研究鲜有报道。我们对此作初步研究, 使用已广泛应用于临床的干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ) 作为阳性对照, 探讨 IL-22 在结核性胸膜炎与恶性胸水的鉴别诊断中的应用价值。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81071318)

作者简介: 原艳明 (1983-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 结核病的诊断与治疗,

电话: 010-66775093, E-mail: yuanyanming264@126.com

△ 通讯作者: 王仲元, E-mail: wzy2004177@sina.com

(收稿日期: 2014-01-23 接受日期: 2014-02-19)

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2012 年 4 月至 2013 年 9 月在解放军 309 医院住院确诊的结核性胸膜炎患者 52 例,其中男 34 例,女 28 例,年龄 17~76 岁,平均(36 ± 17)岁。诊断标准:胸膜活检抗酸杆菌染色阳性 2 例,肺穿刺活检抗酸杆菌染色阳性 1 例,胸膜活检病理发现典型结核性病变 2 例,支气管镜取组织活检证实为结核性病变 1 例,其余诊断建立在临床表现、PPD 皮试、胸腔积液检查(细胞学、生化)、外周血淋巴细胞干扰素释放检测及治疗效果的基础上。恶性胸水患者 35 例,其中男 15 例,女 20 例,年龄 36~82 岁,平均(59.9 ± 13.7)岁。35 例均经病理组织学或胸水细胞学检查证实诊断,其中肺癌 29 例,胸膜间皮瘤 2 例,霍奇金淋巴瘤 1 例,乳腺癌 1 例,胃癌 1 例,肝癌 1 例。

1.2 主要试剂

结核分枝杆菌特异性抗原肽库(ESAT-6, CFP-10)由北京赛百盛公司合成,纯度大于 95%。Ficoll 密度梯度淋巴细胞分离液购自 GE biosciences (USA), RPMI 1640 培养液购自 GIBCO (USA), 细胞因子检测试剂盒购自 eBioscience; 流式细胞仪为 Beckman coulter PC500 型。

1.3 样品制备

1.3.1 胸腔积液上清(pleural effusion supernatant, PES)的制备 所有胸腔积液均在入院 24 h 内,未经任何治疗前,经患者同意,在无菌操作下胸腔穿刺取积液 50 mL, 1800 rpm 离心 5 min, 取上清置于 -80°C 保存待测。

1.3.2 细胞培养液上清的制备 将胸腔积液离心后沉淀细胞用 Ficoll 进行密度梯度离心, 获取 PFMCs, 充分洗涤后, 用 RPMI1640 完全培养液调整细胞数为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 于 5% CO_2 , 37°C 培养 18 h 后取上清(细胞培养液上清, cell culture fluid super-

natant, CCFS), 置于 -80°C 保存待测。部分 200 μL 体系细胞悬液内加入结核分枝杆菌 ESAT-6 和 CFP-10 抗原肽库(终浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 相同条件下培养 18 h 后取上清(刺激后细胞培养液上清, stimulated cell culture fluid supernatant, SCCFS)。1 周内完成胸水上清与细胞培养上清检测。

1.4 Flowcytomix 流式细胞仪检测

根据说明书操作, 设阴性对照孔。步骤简述如下: 将标准品、微球、生物素偶联的检测抗体按比例配置顺次加入, 避光室温孵育 2 h; 清洗后按照 FlowCytomix Pro 2.1 分析软件(eBioscience 公司提供)计算比例加入链亲和素-PE, 避光室温孵育 1 h, 再次清洗后进行流式检测。用标准品控制组间变异, 使其小于 15%。

1.5 统计学处理

使用 FlowCytomix Pro 2.1 分析软件读取所得流式检测原始 LMD 文件, 建立各检测因子的标准曲线后, 软件自动计算出样品浓度, 结果以 pg/ml 表示。对所有观察指标, 以中位数(四分位间距)表示。组间比较用非参数 Mann-Whitney 检验, 双变量非正态分布的计量资料其相关关系采用 Spearman 秩相关分析。此次试验采用 GraphPad Prism 5 统计软件处理, 所有统计检验均为双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 IL-22 和 IFN- γ 在 PFMCs 培养液上清中的表达特点

TPE 组 PFMCs 经结核分枝杆菌特异性抗原肽库刺激后产生的 IL-22 浓度 [$1161(3279.8)$] pg/ml 显著升高 ($P<0.05$), 与 MPE 组比较, 差异存在统计学意义 ($P<0.05$), 与 IFN- γ 检测结果一致。直接检测两组胸腔积液上清中 IL-22 浓度, TPE 组 [$108.1(155.9)$] pg/ml 和 MPE 组 [$25.27(171)$] pg/ml 组间比较差异无统计学意义 ($P>0.5$)。IFN- γ 结果相同, 见表 1。

表 1 TPE 组与 MPE 组 IL-22 和 IFN- γ 在 3 种不同处理上清液中的浓度比较[中位数(四分位间距), pg/ml]

Table 1 Comparison of the concentrations of IL-22 and IFN- γ in different supernatants between two groups

Group	CCFS		SCCFS		PES	
	IL-22	IFN- γ	IL-22	IFN- γ	IL-22	IFN- γ
TPE	125.7(202.7) [▲]	24.66(543.7) [●]	1161(3279.8) [▲]	3374(5591.8) [●]	108.1(155.9)	13.96(203.7)
MPE	0(115.6)	0(21.43)	97.09(233.5)	14.69(103.2)	25.27(171)	0.6(28.62)
U value	587.5	263	233	91	96	20
P value	0.007	0.0001	<0.001	<0.001	0.6974	0.4353

Note: [▲] $P<0.05$, concentration of IL-22 in SCCFS compared with CCFS in TPE group;

[●] $P<0.05$, concentration of IFN- γ in SCCFS compared with CCFS in TPE group.

2.2 TPE 组 PFMCs 经结核分枝杆菌特异性抗原肽库刺激后上清中 IL-22 和 IFN- γ 的相关性

TPE 组 PFMCs 经结核分枝杆菌抗原肽刺激后培养液上清中 IFN- γ 浓度显著升高, 且与 IL-22 浓度显著相关($r=0.3485$, $P=0.0320$)(图 1)。

3 讨论

胸腔积液是临床常见病症, 国内报道结核性胸膜炎是最常见病因, 占 54.15%, 其次为恶性肿瘤, 占 23.11%^[3]。两者鉴别

诊断是临床难题。结核性胸膜炎是结核分枝杆菌感染胸膜后, 发生的由 CD4⁺T 细胞介导的局部迟发型变态反应的结果^[4], 巨噬细胞、T 细胞以及 IFN- γ 、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)等诸多细胞因子参与免疫病理过程^[5]。目前, IFN- γ 已被临床广泛应用, 在结核性胸膜炎早期诊断中的灵敏度和特异度分别达到 89% 和 97%^[6]。本文使用 IFN- γ 作为阳性对照, 研究结核分枝杆菌抗原特异反应性 IL-22 在结核性胸膜炎和恶性胸水中的表达特点, 探索 IL-22 对结核性胸膜炎和恶性胸水的鉴别诊断价值。

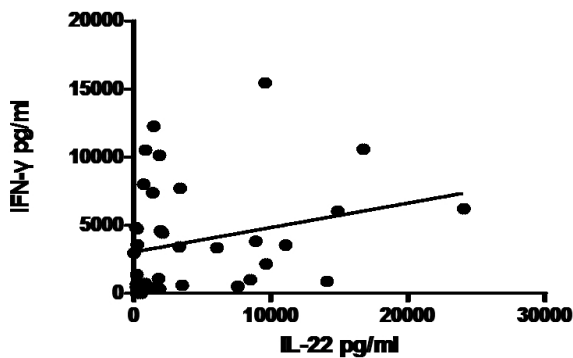


图1 TPE 组刺激后细胞培养液上清中 IL-22 与 IFN- γ 浓度的相关性
Fig.1 The correlation of the concentration of IL-22 and IFN- γ in SCCFS in TPE group

IL-22 最初由 Dumoutier 等用白细胞介素 -9(Interleukin-9, IL-9)刺激一株 T 淋巴瘤细胞系发现,属于 IL-10 细胞因子家族^[1]。当机体感染病毒或细菌等病原体后,IL-22 能够激活其他免疫细胞,帮助机体控制炎症对抗感染^[7],并通过介导组织表达急性炎症蛋白、粘蛋白或抗微生物肽等物质,使慢性炎症中的组织保持完整^[8]。IL-22 在结核性胸膜炎的发病机制中发挥怎样的作用尚不明确,国外学者研究推测 IL-22 可能通过促进向自然杀伤细胞(natural killer cell, NK cell)溶酶体传送结核分枝杆菌,加强吞噬溶酶体的溶解作用^[9],并可能通过增加基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)的表达,参与结核性胸膜炎的病理形成过程^[10]。

许多不同类型的淋巴细胞均可表达 IL-22^[11],其中平均由 Th1 细胞产生的约占 35%,由 Th17 细胞产生的约占 10%~18%,由 Th22 细胞(helper T cell 22)产生的 IL-22 约占总量的 37%~63%^[12]。Jochen Behrends^[13]发现在结核感染早期,多于 90% 的 IL-22 由产生 IFN- γ 的 Th1 淋巴细胞产生。而恶性肿瘤患者机体处于 Th2 细胞因子优势状态,肿瘤组织多分泌 Th2 类细胞因子,是造成肿瘤免疫逃逸的原因之一^[14]。有学者认为在恶性肿瘤患者体内,内源性 IL-22 的产生能力及肿瘤细胞对 IL-22 的反应能力显著下降,是导致病情进一步恶化、肿瘤浸润和转移的重要因素^[15]。已有多项研究证实结核性胸腔积液中存在显著升高的 IL-22^[16,17],但与恶性胸水比较结果却大相径庭。Di Jin 等^[16]研究 TPE 组胸腔积液 IL-22 水平高于 MPE 组,而 Zhang W 等研究结果却与之相反^[18]。本研究所见,直接检测胸腔积液上清 IL-22 水平, TPE 组与 MPE 组比较差异无统计学意义。提示用于鉴别诊断时,直接检测胸腔积液上清中 IL-22 浓度,结果存在不稳定性。

本研究将 TPE 与 MPE 患者 PFMCS 分离培养,联合测定了细胞培养液上清与经结核分枝杆菌特异性抗原肽库(ESAT-6, CFP-10)刺激后细胞培养液上清中 IL-22 和 IFN- γ 的浓度,并对结果做比较分析,国内外尚未见类似报道。结果发现 TPE 组 PFMCS 经结核分枝杆菌特异性抗原肽库刺激后培养液上清 IL-22 浓度显著提高,与文献报道一致^[2],且显著高于 MPE 组,进一步证实恶性胸腔积液的局部 Th1 免疫应答比结核性胸腔积液低。实验结果可用于结核性胸膜炎和恶性胸腔积液的鉴别诊断。相关性分析结果显示 TPE 组 IL-22 与 IFN- γ 在刺激后上清中表达水平呈正相关。证实 IL-22 与 IFN- γ 可能产生于同

类型细胞,与 Jochen Behrends 研究结果一致。但 IL-22 与 IFN- γ 在结核性胸膜炎局部免疫反应中的相互关系尚有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Pestka S, Krause CD, Sarkar D, et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors[J]. Annu Rev Immunol, 2004, 22: 929-979
- [2] Qiao D, Yang BY, Li L, et al. ESAT-6- and CFP-10-Specific Th1, Th22 and Th17 Cells in Tuberculous Pleurisy May Contribute to the Local Immune Response Against Mycobacterium.Tuberculosis Infection[J]. Scand J Immunol, 2011, 73(4): 330-337
- [3] 周灵, 时国朝, 万欢英. 胸腔积液中渗出液与漏出液鉴别诊断新进展[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(12): 1627-1629
Zhou Ling, Shi Guo-chao, Wan Huan-ying. New progress of the differential diagnosis between effusion and transudative hydrothorax [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2008, 13(12): 1627-1629
- [4] Barnes PF, Mistry SD, Cooper CL, et al. Compartmentalization of a CD4⁺ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis [J]. J Immunol, 1989, 142(4): 1114-1119
- [5] Prabha C, Jalapathy KV, Matsa RP, et al. Differential T helper cell response in tuberculous pleuritis[J]. Indian J Med Microbiol, 2007, 25 (1): 18-23
- [6] Jing Jiang, Huan-Zhong Shi, Qiu-Li Liang, et al. Diagnostic Value of Interferon- γ in Tuberculous Pleurisy[J]. Chest, 2007, 131(4): 1133-1141
- [7] 孙奇. IL-22-- 炎症性疾病关键因子 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(9): 821-825
Sun Qi. IL-22-The key factor of the inflammatory disease [J]. Journal of Immunology, 2011, 27(9): 821-825
- [8] Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, et al. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(4): 447-453
- [9] Dhiman R, Indramohan M, Barnes PF, et al. IL-22 produced by human NK Cells inhibits growth of mycobacterium tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion[J]. J Immunol, 2009, 183(10): 6639-6645
- [10] Matthews K, Wilkinson KA, Kalsdorf B, et al. Predominance of interleukin-22 over interleukin-17 at the site of disease in human tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2011, 91(6): 587-593
- [11] Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology [J]. Int Immunol, 2011, 23(3): 159-163
- [12] Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, et al. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset skin-homing memory T cells[J]. Nat Immunol, 2009, 10(8): 857-863
- [13] Jochen Behrends, Jean-Christophe Renaud, Stefan Ehlers, et al. IL-22 Is mainly produced by IFN γ -secreting cells but is dispensable for host protection against Mycobacterium tuberculosis infection[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57379
- [14] 刘杰, 魏海明, 田志刚. Th1/ Th2 漂移与抗肿瘤免疫 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 1997, 24(2): 168-170
Liu Jie, Wei Hai-ming, Tian Zhi-gang. Th1/ Th2 shift and antitumor immunity [J]. Foreign Medical Sciences: cancer Section, 1997, 24(2): 168-170

163-168

- [8] Marnie A Ryan, Henry T Akinbi, Alicia G Serrano, et al. Antimicrobial Activity of Native and Synthetic Surfactant Protein B Peptides[J]. The Journal of Immunology, 2006, 176(1): 416-425
- [9] Tewary P, Yang D, de la Rosa G, et al. Granulysin activates antigen-presenting cells through TLR4 and acts as an immune alarmin [J]. Blood, 2010, 116(18): 3465-3474
- [10] Sekiguchi N, Asano N, Ito T, et al. Elevated serum granulysin and its clinical relevance in mature NK-cell neoplasms [J]. Int J Hematol, 2012, 96(4): 461-468
- [11] Lisa P. Huang, Shu-Chen Lyu, Carol Clayberger, et al. Granulysin-Mediated Tumor Rejection in Transgenic Mice[J]. Immunol, 2007, 178(1): 77-84
- [12] Saigusa S, Ichikura T, Tsujimoto H, et al. Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma [J]. Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(8): 1322-1327
- [13] Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, et al. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection[J]. Transplantation, 2004, 77(12): 1866-1875
- [14] Nagasawa M, Isoda T, Itoh S, et al. Analysis of serum granulysin in patients with hematopoietic stem-cell transplantation: its usefulness as a marker of graft-versus-host reaction[J]. Am J Hematol, 2006, 81(5): 340-348
- [15] Massari D, Prpic-Massari L, Kehler T. Analysis of granulysin-mediated cytotoxicity in peripheral blood of patients with psoriatic arthritis [J]. Rheumatol Int, 2012, 32(9): 2777-2784
- [16] Ammar M, Mokni M, Boubaker S, et al. Involvement of granzyme B and granulysin in the cytotoxic response in lichen planus [J]. Cutan Pathol, 2008, 35(7): 630-634
- [17] Chung WH, Hung SI, Yang JY, et al. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis[J]. Nat Med, 2008, 14(12): 1343-1350
- [18] Balogh GA, Russo IH, Spittle C, et al. Immune-surveillance and programmed cell death-related genes are significantly overexpressed in the normal breast epithelium of postmenopausal parous women[J]. Int J Oncol, 2007, 31(2): 303-312
- [19] Qiu C, Saito S, Sakai M, et al. granulysin concentrations and preeclampsia risk[J]. Clin Biochem, 2006, 39(10): 1016-1021
- [20] Okada M, Kita Y, Nakajima T. Novel therapeutic vaccine: granulysin and new DNA vaccine against Tuberculosis[J]. Hum Vaccin, 2011, 7(Suppl): 60-67
- [21] Mueller H, Fae KC, Magdorf K, et al. Granulysin-expressing CD4⁺ T cells as candidate immune marker for tuberculosis during childhood and adolescence[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29367
- [22] Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, et al. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle[J]. Clinical and Developmental Immunology, 2011, 2011: 11
- [23] Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, et al. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy[J]. Nat Med, 2001, 7: 174-179
- [24] Botero TM, Son JS, Vodopyanov D, et al. MAPK signaling is required for LPS-induced VEGF in pulp stem cells [J]. Dent Res, 2010, 89(3): 264-269
- [25] 盖菁菁, 王金平, 王娟, 等. 急性肺损伤大鼠肺组织中颗粒溶素的表达[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2012, 11(3): 282-285
- Ge Jing-jing, Wang Jin-ping, Wang Juan, et al. Increased Expression of Granulysin in Lung Tissue of Rats with Acute Lung Injury [J]. Chinese Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2012, 11(3): 282-285
- [26] Irwin AD, Marriage F, Mankhambo LA, et al. This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon[J]. BMC Medical Genomics, 2012, 5: 13: 1471-1493
- [27] Huang LP, Lyu SC, Clayberger C. Granulysin-mediated tumor rejection in transgenic mice[J]. Immunol, 2007, 178(1): 77-84

(上接第 3924 页)

- [15] Lai KN, Ho S, Leung JC, et al. Soluble interleukin-2 receptors in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer, 1991, 67(8): 2180-2185
- [16] Di Jin, Ying Chen, Zheng Yun-wang, et al. Diagnostic value of interleukin 22 and carcinoembryonic antigen in tuberculous and malignant pleural effusions[J]. Exp Ther Med, 2011, 2(6): 1205-1209
- [17] 江静. 胸腔积液白细胞介素-20 与白细胞介素-22 的水平和意义[D]. 南宁: 广西医科大学, 2008: 1-47
- Jiang Jing. Interleukin (IL)-20 and Interleukin (IL)-22 in pleural effusion[D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2008: 1-47
- [18] Zhang W, Chen Y, Wei H, et al. Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(20): 6432-6439