



## 尖锐湿疣患者外周血Th1/Th2淋巴细胞比的改变

尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA)是目前最为常见的性传播疾病之一,由人乳头瘤病毒(HPV)感染引起,机体对于入侵的HPV主要以T细胞介导的细胞免疫为主。人类CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞可根据产生的不同类型的细胞因子分为3个亚群:Th1、Th2和Th0细胞,其中Th1细胞主要产生干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-2(IL-2)和肿瘤坏死因子- $\beta$ (TNF- $\beta$ )等, Th2细胞主要产生IL-4、IL-5、IL-6和IL-10等。本研究通过流式细胞仪检测CA患者外周血CD4<sup>+</sup> T细胞内细胞因子IFN- $\gamma$ 和IL-4的表达,旨在探讨CA患者Th1/Th2淋巴细胞分布的失衡情况及其与CA发病的相关性。

### 1 对象和方法

#### 1.1 研究对象

2001年7月~2002年10月在我院皮肤科门诊初次就诊的40例CA患者,均有明确接触史。临床确诊,醋酸白实验阳性,病理组织检查有典型的空泡细胞。病程1~24周,平均2.6周;女22例、男18例;已婚23例,未婚17例;年龄18~52岁,平均28.1岁。所有患者就诊前4周内未用过免疫调节药物,并排除患有肝肾疾病、糖尿病及其他免疫性疾病。正常对照20例,均为健康志愿者,其中男11例、女9例,平均21.3岁。

#### 1.2 主要试剂及仪器

CYTODETECT<sup>TM</sup> 试剂盒购自荷兰Immuno Quality Products公司, RPMI 1640培养液及胎牛血清购自美国GIBCO BRL公司, CD8-FITC单克隆抗体、CD3-Cy单克隆抗体和PE标记的鼠IgG<sub>1</sub>同种型对照免疫球蛋白均购自Becton Dickinson公司, PE标记的抗人IL-4及抗人IFN- $\gamma$ 购自荷兰IQ公司。流式细胞仪为Becton Dickinson公司产品。

#### 1.3 方法

1.3.1 培养活化 取1 ml新鲜外周血,肝素抗凝。按1:1比例用RPMI 1640培养液混匀后取1 ml加入24孔培养板。分别加入刺激剂佛波酯、离子霉素和蛋白质转运抑制剂莫能霉素各20  $\mu$ l。对照组则只加莫能霉素。在37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>温箱中孵育5 h。

1.3.2 标记表面抗原及固定 在试管中加入10  $\mu$ l CD3-cy和10  $\mu$ l CD8-FITC;各管中分别加入300  $\mu$ l培养全血,常温下暗处孵育20 min;加入4 ml溶血剂(南方医院血液科实验室提供),暗处孵育10 min;1 000 r/min离心5 min后弃上清。用Hanks液(HBSS)洗涤后弃上清。加入500  $\mu$ l 2%多聚甲醛,常温下孵育固定10 min,4  $^{\circ}$ C冰箱过夜。

1.3.3 破膜及标记细胞内抗原 加入1.5 ml的破膜剂,离心后弃上清。在100  $\mu$ l的破膜液中使细胞悬浮,分别加入10  $\mu$ l的PE标记的抗人IL-4及抗人IFN- $\gamma$ 单克隆抗体。同型对照采用PE标记的小鼠IgG<sub>1</sub>单克隆抗体。4  $^{\circ}$ C暗处孵育20 min。破膜液洗涤后,在100  $\mu$ l HBSS中制成混悬液。2 h内上机检测。

1.3.4 流式细胞仪分析 因为CD4抗原的表达在刺激剂佛波酯作用下会下调,因此用CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>设门来圈定CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞群。收集1 $\times$ 10<sup>4</sup>细胞,用CellQuest软件分析数据,打印出散点图,以荧光抗体染色阳性细

细胞的百分率记录结果。

1.3.5 统计学处理 应用SPSS11.0统计软件,行t检验。

## 2 结果

由表1可见,CA患者外周血分泌IFN- $\gamma$ 的CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞数显著多于分泌IL-4的CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞数。与健康对照组相比,CA患者分泌IFN- $\gamma$ 的Th1细胞阳性细胞数降低,而分泌IL-4的Th2细胞阳性细胞数增高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );同时患者Th1/Th2比值显著低于对照组( $P<0.01$ )。

Group	n	Th1 cell (IFN- $\gamma$ -positive)	Th2 cell (IL-4-positive)	Th1/Th2
Control	20	19.27 $\pm$ 8.63	1.48 $\pm$ 0.92	7.54 $\pm$ 9.45
CA	40	11.11 $\pm$ 6.79*	2.43 $\pm$ 1.21*	5.30 $\pm$ 2.76**

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control

## 3 讨论

HPV感染后CA的发生、发展、消退及癌变等都与机体的免疫应答密切相关,而辅助性T细胞在抗病毒免疫中起着重要作用。Th1细胞主要参与细胞免疫,介导迟发型变态反应;Th2细胞主要参与体液免疫反应,激发I型变态反应。Th1/Th2比值的平衡是维持正常免疫功能的重要因素,在清除病毒和肿瘤、诱导免疫耐受等方面起着重要作用[1]。对于细胞内病毒感染的免疫反应,应以Th1应答为主。Th1细胞可能通过清除病毒来促使机体恢复,而Th2细胞亚群功能的增高则可能造成机体对病毒的耐受,致使疾病迁延不愈。

国内外有关CA免疫状态的研究发现,在其免疫应答过程中存在着Th1和Th2类淋巴细胞分泌细胞因子交互作用失衡的现象[2][3];IL-10等Th2型细胞因子增多,而IFN- $\gamma$ 等Th1型细胞因子减少[4]。据此国外学者认为在CA免疫状态中存在“克隆漂移”(clonal diversion)现象[5]。

本研究中,分别选用IFN- $\gamma$ 和IL-4作为Th1和Th2类代表性细胞因子。在体外对CA患者外周血T淋巴细胞进行激活后,经流式细胞仪对其CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞中Th1、Th2细胞亚群进行检测。实验结果显示CA患者普遍存在Th1型细胞亚群降低、Th2型细胞亚群增高以及Th1/Th2比值降低,说明在CA患者中由HPV激发的细胞免疫应答中Th2亚群功能增强,其细胞活动处于相对强势,从而不能诱导有效细胞免疫应答而清除病毒,导致临床上CA的迁延和复发。

传统检测Th1/Th2细胞的方法,多采用对标本中T淋巴细胞进行培养后测定培养上清液中的细胞因子成分,通过计算上述细胞因子的比率而推测计算Th1、Th2细胞频率,不够精确且费时。本研究采用荧光标记的抗细胞因子单克隆抗体结合细胞固定、破膜打孔技术,用流式细胞仪来检测单个细胞水平内细胞因子的方法,能够大大增加对Th1/Th2亚群检测的敏感性和特异性[6]。

对Th1/Th2细胞亚群的检测,主要在于观察和分析机体的免疫状况及疾病发展动向。根据CA患者机体Th1/Th2的漂移情况,设计治疗方案,调整机体的Th1/Th2平衡状态,设法使得免疫反应由Th2型向Th1型逆转,将有助于临床治疗CA及对其抗复发的研究。

参考文献:

- [1] Del-Prete G. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans[J]. *Int Rev Immunol*, 1998, 16(3-4): 427-55.
- [2] Bonagura VR, Hatam L, de-Voti J, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: altered CD8(+) T-cell subsets and T(H)1/T(H)2 cytokine imbalance[J]. *Clin Immunol*, 1999, 93(3): 302-11.
- [3] al Saleh W, Giannini SL, Jacobs N, et al. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix[J]. *J Pathol*, 1998, 184(3): 283-90.
- [4] El Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, et al. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer[J]. *J Pathol*, 2001, 195(2): 179-85.
- [5] Grassegger A, Rollinger-Holzinger I, Zelger BW. Spontaneous or interferon -gamma-induced T-cell infiltration, HLA-DR and ICAM-1 expression in genitoanal warts are associated with TH1 or mixed TH1/TH2 cytokine mRNA expression profiles[J]. *Arch Dermatol Res*, 1997, 289(5): 243-50.
- [6] Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, et al. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells[J]. *Cytometry*, 1999, 35(4): 318-28.

参考文献:

- [1] Del-Prete G. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans[J]. *Int Rev Immunol*, 1998, 16(3-4): 427-55.
- [2] Bonagura VR, Hatam L, de-Voti J, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: altered CD8(+) T-cell subsets and T(H)1/T(H)2 cytokine imbalance[J]. *Clin Immunol*, 1999, 93(3): 302-11.
- [3] al Saleh W, Giannini SL, Jacobs N, et al. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix[J]. *J Pathol*, 1998, 184(3): 283-90.
- [4] El Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, et al. Quantitative analysis of IL-10 and IFN-gamma mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer[J]. *J Pathol*, 2001, 195(2): 179-85.
- [5] Grassegger A, Rollinger-Holzinger I, Zelger BW. Spontaneous or interferon -gamma-induced T-cell infiltration, HLA-DR and ICAM-1 expression in genitoanal warts are associated with TH1 or mixed TH1/TH2 cytokine mRNA expression profiles[J]. *Arch Dermatol Res*, 1997, 289(5): 243-50.
- [6] Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, et al. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells[J]. *Cytometry*, 1999, 35(4): 318-28.