

活动性肺结核患者外周骨髓样树突状细胞中 BTLA 与 B7 - H4 共表达检测及临床意义

徐 欢 黄 纪 孙胤富 王万党 张俊爱 徐军发

摘 要 **目的** 检测活动性肺结核患者 (APT) 外周骨髓样树突状细胞 (myeloid dendritic cell, mDC) 中 BTLA 和 B7 - H4 的表达, 分析其与 mDC 表面成熟标志分子 CD83、抗原递呈分子 HLA - DR 以及共刺激分子 CD86 表达的相关性, 探究其临床意义。**方法** 采用流式细胞术检测 46 例 APT 外周血中 mDC 共表达 BTLA 和 B7 - H4 的情况, 以 23 例健康志愿者作为对照, 同时对 10 例患者进行治疗后 (1 个月) 的跟踪检测。比较 BTLA 和 B7 - H4 双阳性 mDC (DP - mDC) 中 CD83、HLA - DR 及 CD86 的表达差异。**结果** APT 外周血中 DP - mDC 的表达显著高于健康对照组, 在复治患者中表达显著高于初治患者, 经过 1 个月治疗 DP - mDC 比例显著降低。在健康对照和患者外周血中, DP - mDC 表达 CD83 和 HLA - DR 都显著高于 DN - mDC, 而 CD86 在 DP - mDC 中的表达水平低于 DN - mDC。APT 外周血中 DP - mDC 和 DN - mDC 表达 HLA - DR 的水平显著低于健康对照, CD86 和 CD83 水平都显著高于正常对照。**结论** APT 中 mDC 高表达 BTLA 和 B7H4 分子, 并与其表面分子的表达存在相关性, 提示 BTLA 和 B7H4 的表达可能对 mDC 抗结核免疫中发挥调节作用。

关键词 活动性肺结核 mDC BTLA B7 - H4

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.06.013

Detection of BTLA and B7 - H4 Co - expression in Peripheral Blood Myeloid Dendritic Cells from Patients with Active Pulmonary Tuberculosis and Its Clinical Significance. Xu Huan, Huang Ji, Sun Yinfu, et al. Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical University, Guangdong 523808, China

Abstract Objective To detect the expression of BTLA and B7 - H4 in peripheral blood myeloid dendritic cells from active pulmonary tuberculosis patients (APT), and assay its correlation with the expression of the expression of CD83 and CD86 and HLA - DR on mDC. **Methods** 46 APT patients were enrolled in the study and 23 health volunteers servers as controls (HC). Simultaneous follow - up testing of 10 patients after treatment (one month). The frequents of co - expression of BTLA and B7 - H4 on mDC in peripheral blood detected by flow cytometry. Furthermore, the expression of CD83, HLA - DR and CD86 in BTLA and B7 - H4 double position mDC (DP mDC) and BTLA and B7 - H4 double negative mDC (DN mDC) were detected. **Results** The proportion of DP - mDC in peripheral blood of APT was significantly higher than that of normal control group, and the proportion of retreated patients was significantly higher than that of newly diagnosed patients. The proportion of DP - mDC in peripheral blood of patients decreased significantly after treatment After one month. In healthy controls and peripheral blood of patients, DP - mDC expressed CD83 and HLA - DR significantly higher than DN - mDC, while CD86 expressed lower level in DP - mDC than DN - mDC. The levels of CD86 and CD83 expressed by DP - mDC and DN - mDC in peripheral blood of APT were significantly higher than those of normal controls, but the levels of HLA - DR expressed by DP - mDC and DN - mDC in peripheral blood of APT were significantly lower than those of healthy controls. **Conclusion** mDC in APT highly expresses BTLA and B7H4 molecules, and has a correlation with the expression of surface molecules, suggesting that the expression of BTLA and B7H4 may play a regulatory role in mDC anti - tuberculosis immunity.

Key words Active pulmonary tuberculosis patients; Myeloid dendritic cell; Band tlymphocyte attenuator; B7 - H4

活动性肺结核是结核分枝杆菌感染引起的慢性传染性疾病, 目前其发病机制尚不明确, 但细胞免疫在介导其发生、发展中发挥重要作用。笔者前期工作

中发现, 结核性胸膜炎患者外周血及胸水中树突状细胞及其亚群髓样性 DC 比例显著高于正常对照组, 且与 IL - 12 水平呈正相关。BTLA 与 B7 - H4 是近年来发现的免疫检查点抑制因子 (immune checkpoint inhibitors), 表达在 T 细胞上的 BTLA 通过 HVEM - BTLA 信号途径抑制 T 细胞的增殖、分化和多种细胞因子的分泌^[1]。笔者前期研究中发现 BTLA 和 B7 -

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81870016)

作者单位: 523808 东莞, 广东医科大学检验医学研究所

通讯作者: 徐军发, 教授, 电子信箱: imxujunfa@163.com

H4在肺结核患者外周血CD11c⁺抗原递呈细胞中高表达,且表达BTLA和B7-H4的CD11c⁺APC活化同种T细胞的能力下降,提示BTLA和B7-H4对抗原递呈细胞抗结核免疫有重要影响^[2]。而mDC是CD11c⁺抗原递呈细胞中最主要的细胞之一^[3]。在体内能活化初始T细胞的抗原递呈,在固有性和适应性结核免疫中发挥重要作用^[4]。在活动性肺结核患者中,检查点抑制分子BTLA和B7-H4对mDC的抗结核免疫的影响尚不清楚,本研究采用流式细胞技术对46例诊断为活动性肺结核的患者外周血mDC中BTLA及B7-H4共表达情况进行了检测,分析其与mDC表面成熟标志分子CD83、抗原递呈分子HLA-DR以及共刺激分子CD86表达的相关性,探究其临床意义。

资料与方法

1. 研究对象:46例活动性肺结核患者及23例健康对照均来自广东医科大学附属厚街医院。排除标准:①妊娠;②酗酒;③年龄<16岁或>65岁;④HIV阳性;⑤其他传染病和慢性疾病(如糖尿病);⑥近1个月内服用激素等治疗的患者。根据抗结核药物治疗情况,本研究中将活动性肺结核患者分为抗MTB药物治疗前(prior treatment, PRT)组和治疗后(post treatment, POT)组,其中,治疗<3天者为治疗前,治疗2周者为治疗后。本研究经过广东医科大学附属厚街医院和广东医科大学医学伦理学委员会批准,已征得研究对象的知情同意。

2. 主要试剂和仪器:流式抗体分别为Lin1-FITC(为混合抗体,包括FITC标记的CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56的抗体,克隆号是SK7、3G8、SJ25C1、L27、eMfP9、NCAM16.2)购自美国BD公司;BTLA-APC(MIH26, Biolegend), B7-H4-P(H74, eBioscience), CD83-PerCP-CyTM5.5(HB15, Biolegend), CD11c-APC-eFluor780(BU15, eBioscience), HLA-DR-PE-Cyanine7(LN3, eBioscience),以及各自同型抗体均购自美国eBioscience公司。人淋巴细胞分离液购自美国GE公司,FACS-Canto II流式细胞仪型号为美国BD公司产品。

3. 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的分离:具体方法参考文献^[5],肝素钠抗凝血5ml离心1500r/min,5min,上清血浆与-80℃冻存;血液细胞与无菌0.9%氯化钠溶液1:1混合稀释,将稀释液缓慢加入淋巴细胞分离液上,室温870×g离心30min,分离单个核细胞。

4. 流式细胞术检测 mDC 共表达 BTLA 和 B7-H4 以及 BTLA、B7-H4 双阳性 mDC 和 BTLA、B7-H4 双阴性 mDC 表达 CD83、HLA-DR 和 CD86:取100μl含1×10⁶个PBMC于流式管中,加入推荐量荧光团标记的抗体(CD83-PerCP-CyTM5.5、HLA-DR-PE-Cyanine7、CD11c-APC-eFluor780、Lin1-FITC、BTLA-APC、B7-H4-PE、CD86-FITC),以相同的方式各加入各自相应同型抗体作为对照。振荡混匀,4℃避光孵育30min;加入2ml洗涤液洗2次,弃上清;加入200μl 10g/L多聚甲醛溶液,轻轻混匀,4℃避光保存。24h内上机检测分析,采用FlowJo 7.6.1软件进行数据分析。

5. 统计学方法:使用GraphPad Prism 7.0统计学软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间的数据分析采用t检验,多组间的数据比较采用方差分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. BTLA 和 B7-H4 在活动性肺结核患者外周血中高表达:采用流式细胞技术检测 APT 患者外周血来源 mDC 中 BTLA 和 B7-H4 共表达情况。结果显示患者外周血 mDC 中 BTLA 和 B7-H4 共表达水平显著高于健康对照组(图1A, P=0.000), AUR=0.9282(图1B)。

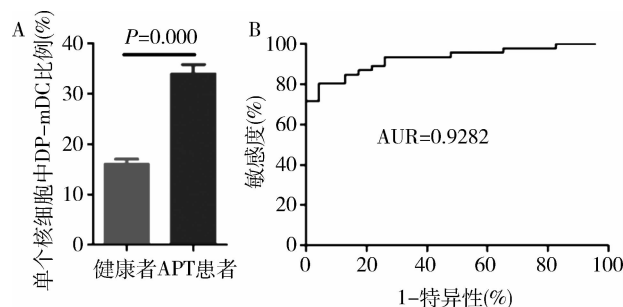


图1 BTLA 和 B7-H4 在活动性肺结核患者 (APT) 外周血 mDC 中高表达

2. BTLA 和 B7-H4 在治疗前后、初治与复治患者中 DP-mDC 表达情况:10例患者经1个月治疗后 DP-mDC 比例显著下降(图2A, P<0.01)。复治患者中表达显著高于初治患者(图2B, P<0.05)。

3. BTLA 和 B7-H4 共表达 mDC 中 CD83 的表达:健康对照组和 APT 外周血共表达 BTLA 和 B7-H4 的 mDC 中表达 CD83 的阳性率均显著高于不表达 BTLA 和 B7-H4 的 mDC(图3中 A、B, P=0.000)。但患者外周血中共表达和不表达 BTLA 和

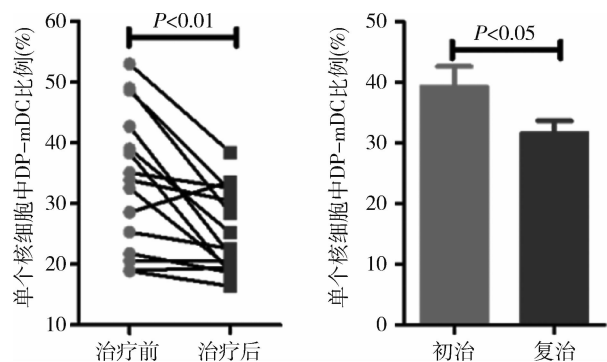


图2 治疗前后、初治与复治患者中 DP-mDC 表达情况

B7-H4 的 mDC 中 CD83 的表达高于健康对照组 (图 3C, $P<0.05$)。

4. BTLA 和 B7-H4 共表达 mDC 中 HLA-DR 表达:健康对照组和患者组外周血共表达 BTLA 和 B7-H4 的 mDC 中表达 HLA-DR 的阳性率均显著高于不表达 BTLA 和 B7-H4 的 mDC (图 4 中 A、B, $P=0.000$)。但患者外周血中共表达 BTLA 和 B7-H4 的 mDC 和不表达 BTLA 和 B7-H4 的 mDC 中 HLA-DR 的表达均显著低于健康对照组 (图 4C, $P=0.000$)。

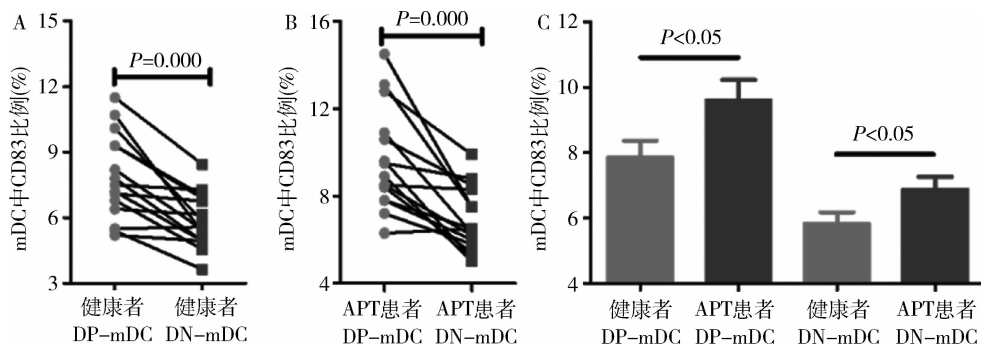


图3 DP-mDC、DN-mDC 中 CD83 的表达

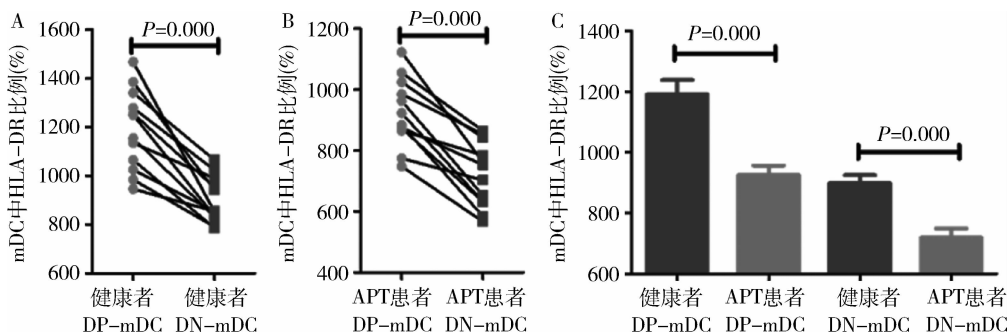


图4 DP-mDC、DN-mDC 中 HLA-DR 的表达

5. BTLA 和 B7-H4 共表达 mDC 中 CD86 表达:健康对照组和患者组外周血共表达 BTLA 和 B7-H4

的 mDC 中表达 CD86 的水平显著低于不表达 BTLA 和 B7-H4 的 mDC (图 5 中 A、B, $P<0.01$)。但患者

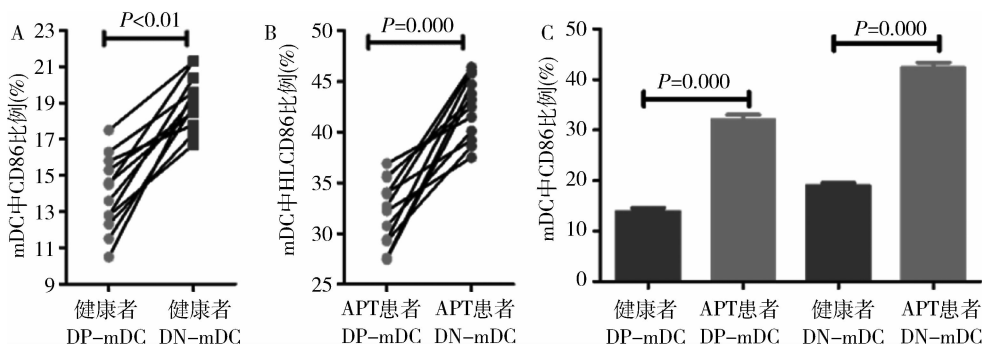


图5 DP-mDC、DN-mDC 中 CD86 的表达

外周血中共表达和不表达 BTLA 和 B7 - H4 的 mDC 中 CD86 的表达均显著高于健康对照组 (图 5C, $P = 0.000$)。

讨 论

笔者的研究发现共表达 BTLA 和 B7 - H4 的 mDC 在 TP 患者外周血中显著高于健康对照组; APT 外周血中 DP - mDC 的表达显著高于健康对照组, 复治患者中比例显著高于初治患者, 经过 1 个月治疗 DP - mDC 比例显著降低。进一步研究发现, 在健康对照和患者外周血中, DP - mDC 表达 CD83 和 HLA - DR 都显著高于 DN - mDC, 而 CD86 在 DP - mDC 中的表达水平低于 DN - mDC。APT 外周血中 DP - mDC 和 DN - mDC 表达 CD86 和 CD83 水平都显著高于健康对照组, 但 APT 外周血中 DP - mDC 和 DN - mDC 表达 HLA - DR 的水平显著低于健康对照组。以上结果提示 BTLA 和 B7 - H4 在活动性肺结核中可能影响 mDC 的抗结核免疫。

树突状细胞 (DC) 在抗结核中发挥着重要作用, APT 患者 mDC 上高表达 BTLA 和 B7 - H4 可能介导结核杆菌的免疫逃逸, BTLA 主要表达在 T 细胞和一些髓源性细胞上, 表达在 T 细胞上的 BTLA 可与配体 HVEM 作用来抑制 T 细胞增殖与活化, 并抑制 T 细胞分泌多种细胞因子^[1]。在活动性肺结核患者 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞高表达 BTLA, BTLA 通过抑制 T 细胞的活性参与结核病的进展^[6]。在免疫性疾病系统性红斑狼疮患者中 Th1、Th2 和 Th17 效应 T 细胞上的 BTLA 表达与活动性疾病相关, BTLA 作为共抑制分子在系统性红斑狼疮患者 T 细胞稳态和疾病活动中发挥重要作用^[7]。肝细胞癌中 BTLA 抑制 T 细胞功能参与其免疫进程, 免疫抑制分子 BTLA 有望成为新的肿瘤免疫治疗靶点^[8]。笔者前期研究发现, APT 外周血 CD11c⁺ 抗原递呈细胞高表达 BTLA, 且 BTLA 的表达与 CD11c⁺ 抗原递呈细胞活化同种 T 细胞功能下降相关^[2]。目前笔者的结果显示 DP - mDC 在 APT 外周血中的表达显著高于健康对照组, 复治患者中比例显著高于初治患者, 经过 1 个月治疗 DP - mDC 比例显著降低。提示在 ATP 中, 结核杆菌可能通过升高 BTLA 来抑制 mDC 的功能, 并且通过 mDC 高表达 B7 - H4 来抑制 T 细胞的免疫活性, 最终影响机体的抗结核免疫。经治疗后 BTLA 和 B7 - H4 表达水平降低, BTLA 对 mDC 的抑制作用也随之降低, mDC 通过 B7 - H4 对 T 细胞的抑制作用也降低。

CD83 分子是成熟 DC 细胞表面重要的标志分子, 参与 DC 细胞功能的调节。用结核菌体或菌体抗原体外刺激可诱导其成熟并且高表达 CD83^[9,10]。笔者前期研究发现, 在结核性胸膜炎患者中 mDC 活化成熟, 高表达 CCR7 和 CD83^[11]。BTLA 不仅在 T 细胞的表面高表达, 在成熟的 DC 细胞上也有表达。BTLA 在 T 细胞上的表达可抑制其增殖活化和多种细胞因子的分泌。成熟 DC 细胞在高表达 CD83 的同时也高表达免疫负向调节因子, 包括 BTLA 和 B7 - H4^[12], 其在 DC 细胞上的表达可能对其功能有影响。Kobayashi 等^[13] 研究发现 BTLA 可抑制 LPS 刺激时 DC 和巨噬细胞的功能, BTLA -/- 小鼠极易发生 LPS 诱导的内毒素休克。有研究发现腺病毒介导的 CCR7 和 BTLA 过表达可增强未成熟树突状细胞的免疫耐受性和迁移^[14]。笔者研究发现, 无论是 APT 还是健康对照组其外周血 DP mDC 表达 CD83 的比例都显著高于 DN mDC, 这些结果显示 APT 外周血中 DP mDC 相对成熟, 提示检查点共抑制分子 BTLA 和 B7 - H4 可能倾向于表达在成熟的 mDC 上, 表达在成熟 mDC 上的共抑制分子一方面可抑制其进一步的活化, 最终抑制 CD83 的升高; 另一方面可抑制 T 细胞的活化, 从而维持 mDC 的免疫自稳, 目前, 笔者也进一步发现 ATP 患者 DP mDC 和 DN mDC 表达 CD83 都显著高于健康对照, 提示 ATP 患者中的 DC 是相对成熟活化的, 在机体的抗结核免疫中具有重要的作用。而 BTLA 和 B7 - H4 在 ATP 患者 mDC 中高表达也进一步地说明它们可能具有抑制 mDC 的免疫活性的特点。

抗原递呈分子 HLA - DR 可递呈抗原给 T 细胞, 刺激 T 细胞的活化。成熟的 DC 也高表达 HLA - DR。笔者的研究发现无论是 APT 还是健康对照组其外周血 DP mDC 表达 HLA - DR 的水平都显著高于 DN mDC, 这同样说明了 DP mDC 是相对成熟的 DC, 这提示检查点共抑制分子 BTLA 和 B7 - H4 倾向于在成熟活化的 mDC 上表达, 其可能作用是对 mDC 免疫活性产生抑制, 维持其免疫自稳。笔者的结果发现在 APT 外周血中 DP mDC 表达 HLA - DR 显著低于健康对照组, 可能原因是患者外周血 mDC 高表达 BTLA 和 B7 - H4, 高表达的 BTLA 和 B7 - H4 可能抑制了 mDC 的免疫活性。结核菌或卡介苗感染抗原递呈细胞后, HLA - DR 的表达受到抑制^[15]。结核菌感染小鼠模型中 DC 表达 MHC - 2 也是降低的。这可能与结核菌感染导致 mDC 高表达 BTLA 有关, 过高

表达的 BTLA 可能抑制了 DC 表达 HLA - DR。这可能是结核病患者 DC 免疫功能低下的一个原因。另一方面则通过增加 B7 - H4 表达抑制 HLA - DR 对 T 细胞的激活作用。

CD86 是在抗原递呈细胞上表达的分子,在 T 细胞的增殖分化中发挥重要作用。笔者的研究发现正常对照组和患者组外周血共表达 BTLA 和 B7 - H4 的 mDC 中表达 CD86 的水平显著低于不表达 BTLA 和 B7 - H4 的 mDC,但患者外周血中共表达 BTLA 和 B7 - H4 的 mDC 和不表达 BTLA 和 B7 - H4 的 mDC 中 CD86 的表达均显著高于健康对照组。有研究表明,结核菌感染后 DC 较高表达 CD80 和 CD86^[16]。笔者最近研究发现,在 APT 中表达 BTLA 的 CD11c⁺ 抗原递呈细胞 CD86 表达增加^[2]。APT 患者 CD86 表达的增高一方面可激活免疫系统,增强 T 细胞介导的杀菌作用;另一方面可能是对 APT 患者中 DC 功能降低进行补偿,达到抗结核作用。

综上所述,本研究结果显示 APT 外周血 mDC 高表达 BTLA 和 B7H4 比例显著升高,进行有效的抗结核治疗后,mDC 共表达 BTLA 和 B7 - H4 的比例明显降低;高表达 BTLA 和 B7 - H4 影响 mDC 的成熟以及 HLA - DR 的表达,提示在 APT 中 BTLA 和 B7 - H4 可负向调节 mDC 的免疫活性,有可能是结核菌的免疫逃逸机制。BTLA 和 B7H4 调节 DC 成熟的机制尚不清楚,共表达 BTLA 和 B7 - H4 的 mDC 的免疫功能还有待于进一步阐明。

参考文献

- 1 Sedy JR, Gavrieli M, Potter KG, *et al.* B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator[J]. *Nat Immunol*, 2005,1: 90 - 98
- 2 Wang WD, Gao YC, Lu YB, *et al.* BTLA - expressing CD11c antigen presenting cells in patients with active tuberculosis exhibit low capacity to stimulate T cell proliferation[J]. *Cell Immunol*, 2017,11: 28 - 35
- 3 Ihanus E, Uotila LM, Toivanen A, *et al.* Red - cell ICAM - 4 is a ligand for the monocyte/macrophage integrin CD11c/CD18: characterization of the binding sites on ICAM - 4[J]. *Blood*, 2007,9(2): 802 - 810
- 4 Cooper AM. Cell - mediated immune responses in tuberculosis[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 393 - 422
- 5 Bhavanam S, Rayat GR, Keelan M, *et al.* Characterization of immune responses of human PBMCs infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: impact of donor declared BCG vaccination history on immune responses and M tuberculosis growth[J]. *PLoS One*, 2018,13(9): e0203822
- 6 Shen X, Zhang J, Tang P, *et al.* Expression and clinical significance of B and T lymphocyte attenuator on CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients with pulmonary tuberculosis[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2019,62(2): 232 - 238
- 7 Oster C, Wilde B, Specker C, *et al.* BTLA expression on Th1, Th2 and Th17 effector T - cells of patients with systemic lupus erythematosus is associated with active disease[J]. *Mol Sci*, 2019,20(18): E4505
- 8 Liu J, Li J, He M, *et al.* Distinct changes of BTLA and HVEM expressions in circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Immunol Res*, 2018,2018: 4561571
- 9 Dulphy N, Herrmann JL, Nigou J, *et al.* Intermediate maturation of *Mycobacterium tuberculosis* LAM - activated human dendritic cells [J]. *Cell Microbiol*, 2007,9(6): 1412 - 1425
- 10 Mihret A, Mamo G, Tafesse M, *et al.* Dendritic cells activate and mature after infection with *mycobacterium tuberculosis* [J]. *BMC Res Notes*, 2011,4: 247
- 11 Lu YB, Xiao DQ, Liang KD, *et al.* Profiling dendritic cell subsets in the patients with active pulmonary tuberculosis [J]. *Mol Immunol*, 2017, 91: 86 - 96
- 12 Chen Y, Yang C, Jin N, *et al.* Terminal complement complex C5b - 9 - treated human monocyte - derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization [J]. *Eur J Immunol*, 2007,37(1): 167 - 176
- 13 Kobayashi Y, Iwata A, Suzuki K, *et al.* B and T lymphocyte attenuator inhibits LPS - induced endotoxic shock by suppressing Toll - like receptor 4 signaling in innate immune cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013,110(13): 5121 - 5126
- 14 Xin H, Zhu J, Miao H, *et al.* Adenovirus - mediated CCR7 and BTLA overexpression enhances immune tolerance and migration in immature dendritic cells [J]. *Biomed Res Int*, 2017,2017: 3519745
- 15 Fulton SA, Reba SM, Pai RK, *et al.* Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19 - kilodalton mycobacterial lipoprotein [J]. *Infect Immun*, 2004,72(4): 2101 - 2110
- 16 Kim WS, Kim JS, Cha SB, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* PE27 activates dendritic cells and contributes to Th1 - polarized memory immune responses during in vivo infection [J]. *Immunobiology*, 2016, 221(3): 440 - 453

(收稿日期:2019 - 12 - 29)

(修回日期:2020 - 01 - 13)