

· 论著 ·

恶性肿瘤患者 NK 细胞免疫状态与弓形虫感染关系的研究

韩宇逸¹, 张英², 顾国平³, 尤建良³, 徐明^{2*}

(1. 南京医科大学临床医学院, 江苏南京 210029; 2. 江苏省寄生虫病防治研究所; 3. 江苏省无锡市中医医院)

【摘要】 目的 通过检测恶性肿瘤患者及健康体检者血液 NK 细胞及弓形虫 IgG、IgM, 探讨恶性肿瘤患者 NK 细胞免疫状态与弓形虫感染的关系。方法 利用流式细胞术对临床确诊的 200 例恶性肿瘤(消化系统、呼吸系统)患者及 50 例健康体检者血液进行 NK 细胞检测, 并利用酶联免疫法检测弓形虫 IgG、IgM 水平, 比较、分析恶性肿瘤患者与健康体检者弓形虫感染情况。结果 200 例恶性肿瘤患者与 50 例体检者弓形虫感染率分别为 17.50% 和 6.00%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。200 例恶性肿瘤患者中 NK 细胞低下(NK 细胞 $< 8\%$) 164 例, 50 例体检者血液中 NK 细胞全部在正常范围内(8%~25%)。NK 细胞低下和正常恶性肿瘤患者弓形虫感染率分别为 20.12% 和 5.56%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 恶性肿瘤患者弓形虫感染与 NK 细胞免疫状态有关, NK 细胞低下肿瘤患者弓形虫感染率高。

【关键词】 恶性肿瘤; 弓形虫; NK 细胞**【中图分类号】** R730.3**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2012)08-0592-02

[Journal of Pathogen Biology. 2012 Aug; 7(8): 592-593, 620.]

A study of the immune status of NK cells and *Toxoplasma* infection in patients with malignant tumorsHAN Yu-yi¹, ZHANG Ying², GU Guo-ping³, YOU Jian-liang³, XU Ming² (1. Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Jiangsu Institute of Parasitic Diseases; 3. Wuxi Hospital of TCM)

【Abstract】 Objective To study the relationship between NK cells in immune status and *Toxoplasma gondii* infection in patients with malignant tumors and to detect NK cells and *T. gondii* IgG and IgM in the blood of patients with malignant tumors and healthy people. **Methods** Flow cytometry was used to detect NK cells in the blood of 200 patients with malignant tumors (digestive system, respiratory system) and 50 healthy people. The levels of IgG and IgM of *T. gondii* were detected with an enzyme-linked immunosorbent assay. The prevalence of *T. gondii* infection was compared and analyzed in patients with malignant tumors and healthy people. **Results** The rate of *T. gondii* infection was 17.50% in 200 patients with malignant tumors and 6.00% in 50 healthy people; the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Of the 200 patients with malignant tumors, 164 had a low NK cell count (NK cells $< 8\%$). Healthy people had NK cells in the blood within the normal range (8% - 25%). The rate of *T. gondii* infection was 20.12% in patients with malignant tumors and a low NK cell count and 5.56% in patients with malignant tumors and a normal NK cell count; the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** *T. gondii* infection in patients with malignant tumors is related to the immune status of NK cells. Patients with a low NK cell count had a high rate of *T. gondii* infection.

【Key words】 Malignant tumor; *Toxoplasma gondii*; NK cells

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)寄生于人及动物细胞内,世界人均感染率为 5%~25%^[1],在机体正常情况下,患者的临床表现不明显,呈隐性感染状态。一旦机体免疫力下降,如恶性肿瘤患者及艾滋病患者,弓形虫可大量增殖,呈急性感染状态,引起组织炎症,临床症状加重^[2]。恶性肿瘤患者机体细胞免疫力下降,特别是自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)明显减少,而 NK 细胞是杀灭弓形虫的主要免疫细胞。本研究采用流式细胞术检测恶性肿瘤患者血液 NK 细胞百分比,采用酶联免疫法检测血清弓形虫 IgG、IgM 抗体,探讨 NK 细胞免疫状态与弓形虫感染的关系及恶性肿瘤患者弓形虫感染率高的原因。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 研究对象 选择无锡市中医院住院确诊的消化系统、呼吸系统恶性肿瘤患者 200 例,年龄在 25~65 岁之间,男性 100 例,女性 100 例。健康体检者 50 例,年龄在 25~60 岁之间,男性 25 例,女性 25 例。

1.2 试剂 流式细胞仪检测 NK 细胞试剂盒 MultiTEST IMK Kit CAT: 340503,美国 BD Biosciences 公司生产;酶联免疫法检测弓形虫 IgG、IgM 抗体诊断试剂盒为德国 Virion/serion 公司生产,批号为 SFB. DQ。

【通讯作者】 徐明, E-mail: 13506190521@163.com**【作者简介】** 韩宇逸(1989-),女,江苏无锡,本科。主要研究方向:肿瘤免疫。E-mail: lalalayuyi@163.com

2 方法

2.1 NK 细胞检测

2.1.1 血液样品的准备 所有受检者均使用 BD 真空采血管采集 2 份血样:1 份用 EDTA-K₂ 抗凝管采集 2 ml 全血,1 份用血清分离管采集 2 ml 全血。血样采集后立即放入 4 °C 冰箱保存备用(当天检测完成)。

2.1.2 血液 NK 细胞检测 1)EDTA-K₂ 抗凝全血及检测试剂放室温平衡 15 min,混匀;2)全血标本管编号 A,取流式专用检测管编号 A1,A1 管加入 CD3-FITC/CD16+56-PE 20 μl,全血 100 μl,混匀,室温下避光孵育 15 min;加入 FACSLysing 溶血素 2.0 ml,室温下,避光孵育 10 min,300 g 离心 5 min,弃上清液;用 PBS 洗涤细胞两次,再 300 g 离心 5 min,弃上清液,加 PBS 重悬细胞至 400 μl;3)标记后的 PBS 悬液上 BD FACSCalibur 流式细胞仪,利用 multiset 自动获取、分析软件检测,分析结果(图 1、2)。NK 细胞(CD3⁻CD56⁺CD16⁺)百分率正常范围为 8%~25%,小于 8%为 NK 细胞低下。

2.2 血清弓形虫 IgG/IgM 抗体检测 采用酶联免疫法。待检血清与检测试剂一起放室温平衡 15 min。血清作 1 : 100 稀释后加入酶标板,每孔 100 μl,同时设立阳性和阴性对照孔,37 °C 孵育 60 min(湿盒中),加 300 μl 洗液洗涤;加入酶标记抗弓形虫抗体 100 μl,37 °C 孵育 60 min(湿盒中),加 300 μl 洗液洗涤;加入底物 100 μl,37 °C 孵育 60 min(湿盒中),加入终止液 100 μl,用酶标仪在 405 nm 波长处以空白对照调零,读取吸光度(A)值。

结果判断:检测弓形虫 IgG 抗体时,待测血清 A₄₅₀ 值 > 0.6 为阳性,检测弓形虫 IgM 抗体时,待测血清 A₄₅₀ 值 > 0.4 为阳性。IgG 和 IgM 抗体之一或两者都阳性者即为弓形虫感染。

2.3 统计学分析 采用 SPSS11.0 软件进行 χ^2 检验。

结 果

1 弓形虫抗体阳性率

200 例恶性肿瘤患者弓形虫抗体阳性 35 例,阳性率为 17.50%(包括 IgG、IgM 或两者都阳性者),50 例体检者弓形虫抗体阳性 3 例,阳性率为 6.00%(包括 IgG、IgM 或两者都阳性者),差异有统计学意义($\chi^2=4.10, P<0.05$)。

2 NK 细胞检测结果比较

200 例恶性肿瘤患者中 164 例(82.00%)NK 细胞低于正常水平(图 1),健康体检者 NK 细胞全部在正常范围内(图 2),差异有统计学意义($\chi^2=119.19, P<0.01$)。

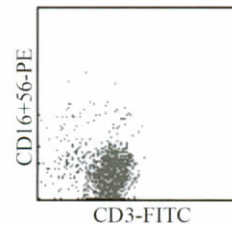


图 1 NK 细胞低下流式散点图
Fig. 1 Scatter plot with low NK cells

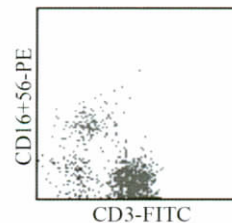


图 2 NK 细胞正常流式散点图
Fig. 2 Scatter plot with normal NK cells

3 不同 NK 细胞水平肿瘤患者间及其与健康体检者弓形虫感染情况比较

164 例 NK 细胞低下的恶性肿瘤患者中有 33 例弓形虫抗体阳性,阳性率为 20.12%;36 例 NK 细胞正常的恶性肿瘤患者中有 2 例弓形虫抗体阳性,阳性率为 5.56%;健康体检者弓形虫抗体阳性率为 6.00%。NK 细胞低下恶性肿瘤患者弓形虫感染率与 NK 细胞正常恶性肿瘤患者比较差异有统计学意义($\chi^2=4.34, P<0.05$);NK 细胞低下恶性肿瘤患者弓形虫抗体阳性率与健康体检者比较差异有统计学意义($\chi^2=5.46, P<0.05$);NK 细胞正常恶性肿瘤患者与健康体检者比较差异无统计学意义($\chi^2=0.01, P>0.05$)。

讨 论

弓形虫在健康人体内多为隐匿性感染,当机体免疫功能下降时,其发病率上升^[3]。而恶性肿瘤病人由于免疫功能障碍,特别是经放化疗治疗后,机体机能发生变化,更容易使体内原有的弓形虫隐性感染活化,从而诱发弓形虫病。

细胞免疫是抗肿瘤及抗弓形虫感染的主要免疫途径,而 NK 细胞是第一道免疫杀伤防线^[4],NK 细胞作为天然免疫细胞在体外具有无需致敏即可杀伤肿瘤细胞及弓形虫的能力,还可通过调节获得性免疫反应的方向和强度^[5~7],来维持和稳定人体免疫正常状态。因此 NK 细胞免疫状态与机体抗肿瘤及抗弓形虫感染有关。

本研究结果表明,恶性肿瘤患者弓形虫感染率显著高于一般人群,表明恶性肿瘤病人因细胞免疫功能下降及免疫系统不协调而诱发弓形虫感染的发生^[8]。

种细菌分别有 5 株和 7 株检出 SHV 型基因,TEM-1 检出率较低,另外有 2 株大肠埃希菌和 4 株肺炎克雷伯菌携带 2 种及 2 种以上的 ESBLs 基因。本研究只对流行最广的 3 种基因型进行了分析,受试菌中是否存在其他类型的基因型尚不清楚。

ESBLs 是由广谱 β-内酰胺酶 TEM-1、TEM-2 或 SHV-1 衍生而来,可以水解青霉素类、头孢菌素类和单环氨基类抗生素。产 ESBLs 菌耐药谱较广,常表现为多重耐药^[7]。头孢菌素是临床常用的一类抗生素,医院 ICU 产 ESBLs 细菌对第二、三代头孢菌素的耐药率均大于 60%,对第四代头孢菌素的耐药率也在 50%以上,但低于蒋冬香等^[8]报道,临床应根据药敏结果来选用该类药物;对环丙沙星的耐药率在 70%以上,与傅冷西等^[9]报道一致,在治疗产 ESBLs 菌引起的感染时应慎用该药;舒巴坦和他唑巴坦是 β 内酰胺酶抑制剂,能不可逆地结合 β 内酰胺酶,本试验中细菌对含酶抑制剂的抗生素耐药率(均 < 20%)较低,表明该类药物可作为治疗产酶细菌感染的一线药物;所有菌株均对亚胺培南敏感,与黄声旗等^[10]报道结果一致,表明碳青霉烯类抗生素是治疗产酶细菌引起的感染的首选药物。

产 ESBLs 细菌是引起 ICU 患者感染的重要致病菌,检出率高,耐药性强,应引起 ICU 医生高度重视,应根据药敏试验合理使用抗生素,同时微生物实验人员应加强产酶细菌的监测,阻止产酶细菌的产生和播

散。

【参考文献】

[1] Bush K. Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006 [J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(Suppl 1): 134-43.

[2] Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, nineteenth informational supplement [S]. 2009, M100-S19.

[3] Pitout J D D, Hossain. A, Hanson. N D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-β-lactamases produced by Escherichia coli and Klebsiella spp[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 5715-21.

[4] 郭玉金, 王雪松, 杨艳君. ICU 下呼吸道感染产 ESBLs 肠杆菌科细菌的耐药性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(3): 217-9.

[5] Livermore DM, Canton R, Marek G, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59: 165-74.

[6] 张阮章, 卢月梅, 王沙燕, 等. 重症监护病房产 ESBLs 菌的基因分型[J]. 中国微生态杂志, 2009, 21(10): 939-43.

[7] Rodriguez-Villalobos H, Bogaerts P, Berhin C, et al. Trends in production of extended-spectrum β-lactamases among Enterobacteriaceae of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66: 37-47.

[8] 蒋冬香, 陈刚, 王玉春, 等. 产 ESBLs 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌的临床分布与耐药性[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(2): 371-3.

[9] 傅冷西, 傅蕾, 陈丽锦, 等. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药性和耐药质粒谱分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(1): 11-3, 19.

[10] 黄声旗, 张青锋. 浙南山区产 ESBLs 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(8): 1669-71.

【收稿日期】 2012-04-24 【修回日期】 2012-08-06

(上接 593 页)

同时,通过与 NK 细胞正常的恶性肿瘤患者的比较发现,NK 细胞低下的恶性肿瘤患者更易诱发弓形虫病,而 NK 细胞正常的恶性肿瘤患者与一般人群弓形虫感染率无显著差异,进一步说明弓形虫感染与 NK 细胞免疫状态有关。由于恶性肿瘤患者 NK 细胞的活性受到抑制,无法有效地清除体内弓形虫体,而使其大量增殖,所以在弓形虫治疗中使用干扰素可抑制弓形虫的增殖,并能促进 NK 细胞的杀伤作用^[9]。本研究论证了恶性肿瘤患者弓形虫感染率增加与 NK 细胞免疫有关,而细胞免疫中 Th1/Th2 的变化与恶性肿瘤患者弓形虫感染是否有关,需进一步探讨。

【参考文献】

[1] Guglietta S, Beghetto E, Spadoni A, et al. Age-dependent impairment of functional helper T cell responses to immunodominant epitopes of *Toxoplasma gondii* antigens in congenitally infected individuals[J]. Microbes Infect, 2007, 9(2): 127-33.

[2] Sanchis BR, Cuadraod ML, Ortiz Munoz AB, et al. Possible interactions between *Toxoplasma gonaii* infection and the presence of carcinomas of female genitalia and the breast[J]. Rev Esp Oncol, 1984, 31: 247-51.

[3] 岳慧萍, 侯玉英, 饶华祥, 等. 太原市健康人群弓形虫感染现状调查[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(4): 291-3.

[4] Kin R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape[J]. Immunology, 2007, 121(1): 1-14.

[5] Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, et al. Natural killer cells activated by MHCI (low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses[J]. Immunity, 2003, 19(4): 561-9.

[6] Mailliard RB, Son YI, Redlinger R, et al. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses. Two signal requirement for induction of NK cell helper function[J]. J Immunol, 2003, 171(5): 2366-72.

[7] 汪涛, 汤自豪, 赵志军. 隐性弓形虫感染对人为影响及可能机制概述[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(2): 155-7.

[8] Hakes TB, Annstrong D. Toxoplasmosis: problems in diagnosis and treatment[J]. Cancer, 1983, 52: 1535.

[9] Nnthan CF, Marray HW, Wiebe ME, et al. Identification of inter feront as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity [J]. J Exp Med, 1983, 158: 670.

【收稿日期】 2012-05-10 【修回日期】 2012-07-22