DOI:10.12138/j.issn.1671－9638.20264701

·论著·

慢性期布鲁氏菌病免疫特征及 CD8$^+$ Tem 细胞变化的初步分析

郑嵘炅[1],木衣司尔·艾买提江[1],杨　丽[2],张紫怡[1],邵彤彤[1],鲁晓擘[1]
(1.新疆医科大学第一附属医院感染·肝病中心,新疆 乌鲁木齐　830000;2.新疆维吾尔自治区传染病医院布病科,新疆乌鲁木齐　830000)

[摘　要] **目的**　阐明慢性期布鲁氏菌病的免疫学特征,并筛选可用于病情与疗效监测的客观指标。**方法**　收集慢性期、恢复期布鲁氏菌病患者及健康对照者的临床资料与实验室指标,并分离外周血单个核细胞(PBMC)。采用单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)结合流式细胞术,绘制并验证患者的免疫细胞图谱;通过定量聚合酶链反应(qPCR)验证核心基因表达。同时,分析基因表达综合数据库(GEO)转录组数据筛选差异表达基因(DEGs),并结合机器学习算法确定核心诊断基因。**结果**　与健康对照组相比,慢性期患者 CD8$^+$ T 细胞显著增多;单细胞测序水平鉴定出 11 种免疫细胞亚群,其中恢复期患者 CD8$^+$ 效应记忆 T 细胞(CD8$^+$ Tem)少于慢性期患者。筛选出 6 个核心基因,受试者工作特征(ROC)曲线分析显示其对疾病识别具有较好的诊断效能。流式细胞术验证了恢复期患者 CD8$^+$ Tem 较慢性期减少。临床资料显示,慢性期患者乏力(70.0%)和关节疼痛(70.0%)多见,血沉增快(40.0%),C 反应蛋白增高(30.0%)。qPCR 显示,慢性期患者 GZMK、GZMA、CXCR6、MCOLN2、GPR171、C1orf61 的 mRNA 表达均高于健康对照组(均 $P<0.001$),恢复期表达下降($P<0.001$)。**结论**　慢性布鲁氏菌病患者存在明显的免疫微环境差异。CD8$^+$ Tem 细胞比例在慢性期升高,恢复期下降,提示其可能与疾病进展及免疫状态相关,有望作为潜在的免疫监测指标。

[关　键　词] 布鲁氏菌病;CD8$^+$ 效应记忆 T 细胞;单细胞 RNA 测序;慢性期;免疫细胞;免疫监测;生物标志物
[中图分类号] R516.7

Preliminary analysis of immunological characteristics and changes in CD8$^+$ Tem cells in chronic brucellosis

Zheng Rongjiong[1], *Muyisier Aimaitijiang*[1], *Yang Li*[2], *Zhang Ziyi*[1], *Shao Tongtong*[1], *Lu Xiaobo*[1](1. *Infectious Diseases and Hepatology Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi* 830000, *China*; 2. *Department of Brucellosis, Infectious Diseases Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi* 830000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**　To investigate the immunological characteristics of chronic brucellosis and to identify objective indicators for monitoring disease status and treatment efficacy. **Methods**　Clinical data and laboratory indicators were collected from patients with chronic-phase and recovery-phase brucellosis and healthy controls, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated. Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) combined with flow cytometry was used to characterize and validate the immune cell landscape of the patients. The expression of core genes was validated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). In addition, transcriptomic data from the Gene Expression Omnibus (GEO) database were analyzed to screen differentially expressed genes (DEGs), and machine learning algorithms were used to identify core diagnostic genes. **Results**　Compared with healthy controls, patients in the chronic phase showed a significant increase in CD8$^+$ T cells. A total of 11 immune cell subsets were identified at the single-cell level, with fewer CD8$^+$ effector memory T cells (CD8$^+$ Tem) observed in recovery-

[收稿日期]　2026－06－23
[基金项目]　新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(2022B03013－5);"天山英才"医药卫生高层次人才培养计划(TSYC202301B018)
[作者简介]　郑嵘炅(1981－),女(汉族),安徽省阜阳市人,主任医师,主要从事感染性疾病相关研究。
[通信作者]　鲁晓擘　　E-mail:xjykdluxiaobo@126.com

phase patients than in chronic-phase patients. Six core genes were screened, and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that they had good diagnostic performance for disease identification. Flow cytometry confirmed that $CD8^+$ Tem cells were reduced in recovery-phase patients compared with chronic-phase patients. Clinical data showed that fatigue (70.0%) and joint pain (70.0%) were common in chronic-phase patients, along with elevated erythrocyte sedimentation rate (40.0%) and elevated C-reactive protein levels (30.0%). qPCR showed that the mRNA expression levels of GZMK, GZMA, CXCR6, MCOLN2, GPR171 and C1orf61 were higher in chronic-phase patients than in healthy controls (all $P<0.001$) and decreased in the recovery phase ($P<0.001$).

Conclusion Patients with chronic brucellosis exhibited marked differences in the immune microenvironment. The proportion of $CD8^+$ Tem cells was elevated in the chronic phase and decreased in the recovery phase, suggesting that these cells may be associated with disease progression and immune status and may serve as a potential indicator for immune monitoring.

[**Key words**] brucellosis; $CD8^+$ effector memory T cells; single-cell RNA sequencing; chronic phase; immune cells; immune monitoring; biomarkers

布鲁氏菌病(简称布病)是一种重要的人兽共患传染病,不仅对畜牧业造成威胁,也是全球持续性的公共卫生问题。全球发病率呈上升趋势,在发展中国家尤为明显,部分地区呈现死灰复燃态势[1]。近年来,全国人间布病疫情在时间和空间上均存在明显的聚集性[2]。布病属于全身性感染性疾病,可累及多个脏器和组织系统。布鲁氏菌为兼性胞内寄生,通过多种免疫逃避机制逃脱宿主细胞清除,实现胞内长期寄生,导致感染反复发作且治疗后易复发。多项研究[3-4]指出,反复感染患者中部分会进展为慢性期,致残率较高。布病慢性化机制复杂,临床治疗难度大[5-7]。目前布病诊治的主要挑战之一是慢性期患者缺乏有效、客观的免疫监测指标。随着研究不断深入,布鲁氏菌感染引发的免疫应答异常与免疫系统之间存在复杂联系,涉及多种分子机制和信号通路,在疾病进展中发挥关键作用[8-10]。在感染过程中,布鲁氏菌可干扰宿主的固有免疫与适应性免疫应答,调节免疫细胞的胞内运输与凋亡,从而逃避免疫监控与防御清除,最终形成慢性感染[11-14]。本研究从免疫调节角度出发,分析布鲁氏菌持续性感染过程中的免疫特征,为寻找针对慢性期患者的客观免疫监测指标提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 试验材料、试剂 研究设备采用美国贝克曼公司 DxFLEX 流式细胞仪。试剂抗体均购自 BD 公司(Becton, Dickinson and Company),TRIzol 试剂购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(Thermo Fisher Scientific)。

1.2 试验方法

1.2.1 受试者招募、标本采集与公共数据获取 本研究从新疆医科大学第一附属医院招募慢性期和恢复期布病患者共 20 例。慢性期定义为病程>6 个月。经新疆医科大学第一附属医院机构审查委员会和伦理委员会批准(编号:K202304-29),所有参与者均签署书面知情同意书。纳入标准为基于临床症状和实验室检测确诊的布鲁氏菌感染,实验室检测包括试管凝集试验(SAT)≥1∶100 和(或)虎红平板凝集试验(RBPT)阳性。分组定义如下,(1)慢性期组:病程>6 个月,符合布病诊断标准;(2)恢复期组:完成规范抗布鲁氏菌治疗(联合用药方案,疗程≥6 周),临床症状完全缓解且持续随访 3 个月以上无复发;(3)健康对照组:同期健康体检者,无布病病史及接触史。排除标准:(1)入组前 4 周内有糖皮质激素、免疫抑制剂或生物制剂使用史者;(2)合并自身免疫性疾病、恶性肿瘤及其他慢性感染[如人类免疫缺陷病毒(HIV)感染、结核病、病毒性肝炎]者;(3)既往有布病史或复发史者。

所有入组患者均为初次确诊并完成首程治疗者。慢性期和恢复期患者均为独立横断面入组,非同一患者的纵向随访样本。从每例受试者采集外周血标本,并在采集后 2 h 内处理以确保细胞活力和完整性。使用 Ficoll-Paque 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC)。将 PBMC 悬浮于磷酸盐缓冲液(PBS)中,并使用血细胞计数板和台盼蓝排斥法评估细胞计数和活力。

转录组分析纳入基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)公开数据集 GSE69597。GEO 为 NCBI 提供的公共功能基因组学数据库,数据可公开下载用于研究。GSE69597

数据集共包含 149 份标本，其中布病患者 103 份（含急性期和慢性期）、健康对照组 46 份，同时记录了患者的临床分期（acute/chronic）、治疗反应及随访信息。本研究纳入全部 103 例布病病例进行差异表达基因筛选，后续以自测慢性期及恢复期患者标本进行临床验证。单细胞 RNA 测序（scRNA-seq）数据整合了人外周血 PBMC 公共数据集 GSE148020（3 例正常对照）和 GSE235857（6 例正常对照），以及自测标本中选取的 3 例恢复期和 3 例慢性期患者标本。

1.2.2 转录组相关生物信息学分析 使用 R 语言 edgeR 包，基于负二项广义线性模型及贝叶斯估计，识别 GSE69597 数据集中布病病例与正常对照标本之间的差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）。筛选标准为 $P<0.05$ 且 $|\log FC|>1$。此外，采用 CIBERSORT 算法基于基因表达数据估算 22 种免疫细胞类型的相对比例，并比较病例组与对照组之间免疫细胞组成的差异。

采用 R 语言 WGCNA 包（version 1.64.1）对 DEGs 构建加权基因共表达网络。采用层次聚类分析法删除异常样本后，使用 pickSoftThreshold 函数计算无标度拓扑拟合指数，选定软阈值 $\beta=12$（无标度拓扑拟合指数 $R^2>0.85$）。利用一步法 blockwiseModules 函数构建网络并识别模块，参数设定最小基因数 30，并将成对相关系数>0.8 的相似模块进行合并。进一步通过 *Pearson* 相关分析，筛选与特定免疫细胞评分相关性最强的核心模块。

利用 R 包 clusterProfiler（version 3.14.3）对模块基因进行功能富集分析。基因本体论（gene ontology，GO）富集分析以 org.Hs.eg.db（version 3.1.0）软件包中的基因注释为背景，京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路注释通过 KEGG REST API（https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html）获取最新通路注释。富集参数设定最小基因集为 5、最大基因集为 5 000，以 $P\leqslant0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.2.3 单细胞转录组数据分析 随机选取 3 例慢性感染患者和 3 例恢复期患者，使用 10×Genomics 公司的 Chromium 系统进行单细胞捕获和文库制备。将单细胞悬液浓度调整至 1 000 个细胞/μL，并加载到 Chromium 控制器上。细胞在液滴中裂解后，进行逆转录以合成互补 DNA（complementary DNA，cDNA），其中包含细胞特异性条形码和唯一分子标识符（unique molecular identifier，UMI）。随后，对带有条形码的 cDNA 进行纯化并通过聚合酶链反应（PCR）扩增。cDNA 经酶切片段化和末端修复后，进行 A 端尾化以连接接头。使用生物分析仪系统评估文库的质量和大小分布。测序在 Illumina NovaSeq PE150 平台上完成，每个细胞至少靶向 50 000 条读数。

将自测样本与正常对照（GSE148020 和 GSE235857）的测序原始数据分别经比对定量生成细胞－基因表达矩阵后，采用 Scanpy 流程进行分析。首先采用全局归一化方法进行标准化，将表达量转换为相对丰度并乘以 10 000 的归一化因子，随后进行 log 转化并筛选高变异基因。数据经主成分分析（PCA）降维后，基于欧氏距离构建 K 近邻（KNN）图，采用 Louvain 算法进行细胞聚类，并通过统一流形近似与投影（uniform manifold approximation and projection，UMAP）算法进行二维可视化展示。利用 *Wilcoxon* 秩和检验寻找各聚类亚群的标记基因，并结合 CellMarker 2.0 数据库完成细胞亚群的生物学注释，最终计算各亚群在不同分组中的占比。

1.2.4 机器学习筛选核心基因 综合采用三种机器学习算法进一步提炼核心基因，包括引入 L1 正则化实现变量选择的最小绝对收缩和选择算子（least absolute shrinkage and selection operator，Lasso）回归，通过多棵决策树集成提高稳定性的随机森林（random forest）以及控制模型复杂度的极端梯度提升树（XGBoost）算法。取三种算法输出的特征基因的交集作为最终的候选核心基因。采用受试者工作特征（ROC）曲线评估这些基因的分类效能，并计算 ROC 曲线下面积（AUC）以量化其判别能力。

采用皮尔森（*Pearson*）相关性分析，检验核心候选基因表达水平与单样本基因集富集分析（CIBERSORT 算法）得出的免疫细胞评分之间的相关性，以 r 值评估相关强度。进一步通过 UMAP 图展示筛选出的核心基因在单细胞亚群中的表达分布特征。

1.2.5 流式细胞术检测 将慢性期、恢复期和健康对照者的抗凝全血取 100 μL 加入样本管，分别加入 CD3-PCP 5.5、CD8-PE、CD45RA-APC 和 CCR7-PC7 流式抗体各 5 μL，涡旋混匀后避光孵育 15 min 后加入 1×的红细胞裂解液，离心洗涤。将 300 μL PBS 重悬的细胞悬液置于流式细胞仪进行检测，数据使用 FlowJo v10.8 软件分析。设门策略如下：首先圈出 $CD8^+$ T 细胞，再以 CD45RA－/CCR7－定义

$CD8^+$ Tem 细胞，计算其占 $CD8^+$ T 细胞的比例。实验设备采用美国贝克曼公司的 DxFLEX 流式细胞仪，试剂抗体均购自 BD 公司。

1.2.6 定量聚合酶链反应（qPCR）验证核心基因表达 采用 qPCR 检测慢性期、恢复期患者及健康对照者 PBMC 中 GPR171、C1orf61、CXCR6、GZMA、GZMK 及 MCOLN2 的 mRNA 表达水平。使用 TRIzol 试剂（Invitrogen，15596018）提取总 RNA，PrimeScript™ RT reagent Kit（Takara，RR047A）反转录合成 cDNA。使用 TB Green® Premix Ex Taq™（Takara，RR820A）在荧光定量 PCR 仪上进行扩增。引物序列见表 1。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。计算公式：ΔCt = Ct 目的基因 − Ct 内参基因，ΔΔCt = ΔCt 慢性期组（或恢复期组）− ΔCt 健康对照组，相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$。每个样本设 3 个复孔。熔解曲线分析显示各基因扩增产物均为单一峰，提示引物特异性良好。

表 1 引物序列及扩增产物大小

Table 1 Primer sequences and amplification product sizes

基因名称	方向	序列（5′→3′）	产物大小(bp)
GPR171	F	CCAAGTAACAGCCTGCCTCA	84
	R	TGAAGACAGCGGTCAATGCT	
CXCR6	F	TCCTGGTGATGGCTGTGTTC	150
	R	TAAGGCAGGCCCTCAGGTAT	
MCOLN2	F	GCAAGGATTCCGGAGAGAGG	177
	R	CTGCAAACCCAGTTTCCACG	
GZMA	F	GTTGTGCGAGGGTGTTTTCC	83
	R	TATAGACACCAGGCCCACGA	
C1orf61	F	ACTTCATCTGGTTGGGCTGG	164
	R	CAGGTACAGTGGGCTTCCTG	
GZMK	F	CAAGGTTACTGGCTGGGGAG	130
	R	AAAAGGGTCGCCGTTGTAGT	
GAPDH	F	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	258
	R	AGGGGCCATCCACAGTCTTC	

1.3 统计学方法 应用 SPSS 27.0 和 R 软件（4.3.0 版本）进行分析，表达水平以均值 ± 标准差（$\overline{x} \pm s$）表示。对于不同阶段间免疫细胞比例等连续变量的比较，符合正态分布且方差齐者采用单因素方差分析及 *Tukey HSD* 事后检验；不符合正态分布或方差不齐者则采用 *Kruskal-Wallis* 检验及 Dunn 事后检验。多重比较采用 *Benjamini-Hochberg* 方法进行错误发现率（FDR）校正，以 $P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

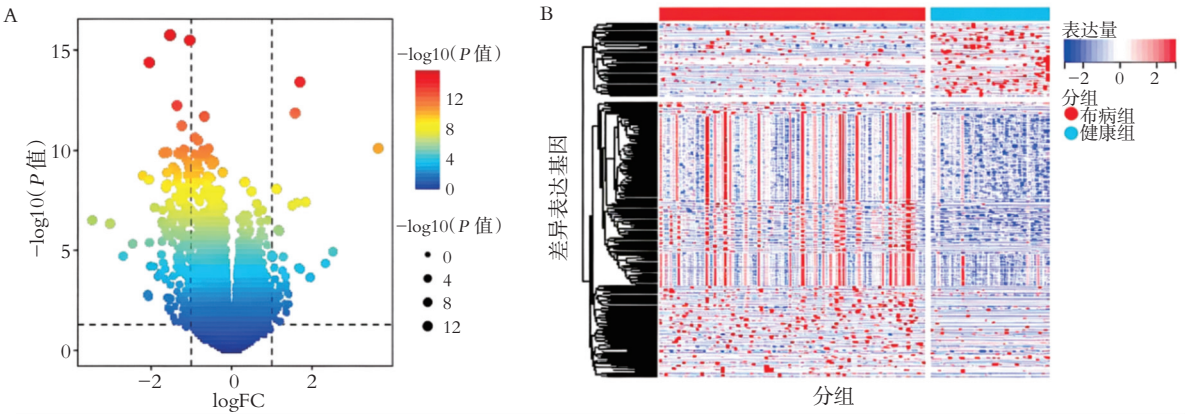
2.1 布病患者基本资料 慢性期患者 10 例：患者病程均＞1 年，年龄 29～75 岁，平均（50.2 ± 14.1）岁；男性 7 例，女性 3 例。恢复期患者 10 例：年龄 31～69 岁，平均（50.4 ± 11.8）岁；男性 8 例，女性 2 例。健康对照组 10 例：年龄 23～63 岁，平均（42.8 ± 14.4）岁；男性 8 例，女性 2 例。对上述 20 例布病患者进行病史采集，其中 90.0%（18/20）有明确的牛羊接触史。

2.1.1 临床表现 对不同临床分期患者的临床特点进行分析。慢性期患者的临床表现以乏力和关节疼痛为主，具体为发热 6 例（60.0%）、乏力 7 例（70.0%）、多汗 3 例（30.0%）、关节疼痛 7 例（70.0%）、头痛 2 例（20.0%）、肌肉痛 1 例（10.0%）、体重减轻 2 例（20.0%）。恢复期患者临床症状均缓解。

2.1.2 实验室检查 对全部入组患者的实验室指标进行分析。全部患者 RBPT 和 SAT 结果均为阳性。慢性期患者抗体滴度为 1∶50～1∶800，恢复期患者抗体滴度为 1∶50～1∶200。恢复期患者 SAT 结果仍为阳性，提示不能以抗体滴度判定疗效。慢性期患者血培养结果均为阴性。慢性期患者实验室检查结果异常情况如下：白细胞减少 4 例（20.0%）、血红蛋白降低 3 例（30.0%）、血小板减少 1 例（10.0%）、红细胞沉降率（简称血沉）增快 4 例（40.0%）、C 反应蛋白增高 3 例（30.0%）、肝功能异常 2 例（20.0%）。恢复期患者上述实验室检查结果均未见异常。

2.2 慢性布病患者与健康对照组之间的差异表达分析 对 GSE69597 数据集中的 103 例布病患者标本和 46 例健康对照组标本进行差异表达分析。共鉴定出 209 个 DEGs，其中在慢性布病患者中上调基因 157 个，下调基因 52 个，见图 1。

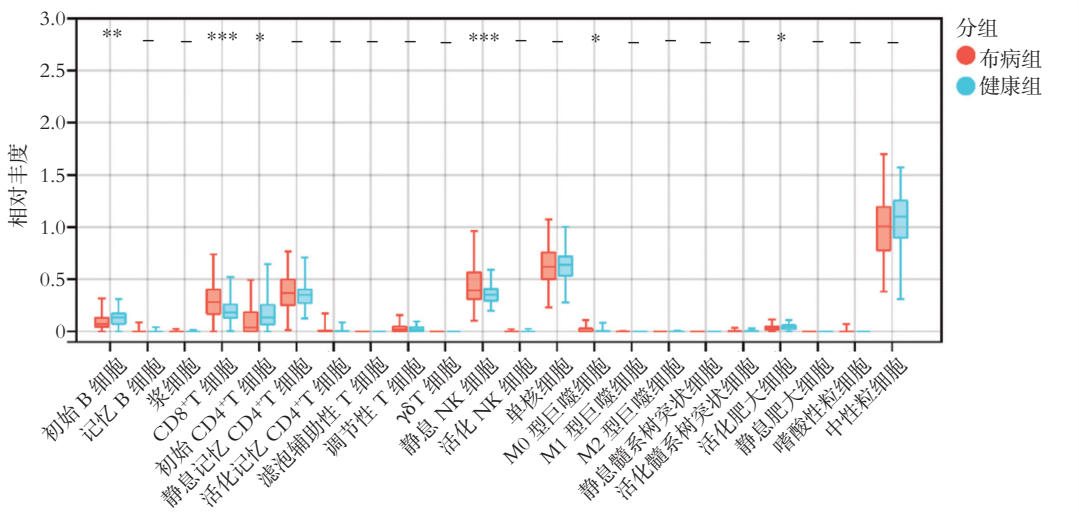
使用 CIBERSORT 算法评估标本中 22 种免疫细胞的相对丰度。分组差异分析结果显示，与健康对照组相比，布病患者外周血中的 $CD8^+$ T 细胞比例显著升高，提示其在慢性感染阶段可能发挥关键的免疫调节作用，见图 2。



注：A 为火山图，横坐标表示基因表达变化的对数值（logFC），纵坐标表示统计学显著性[－log10（*P* 值）]。每个散点代表一个基因，点的颜色及大小反映其统计学显著性，虚线表示差异表达基因的筛选阈值（$P<0.05$，$|logFC|>1$），虚线分割的右上角是显著高表达，左上角是显著低表达；B 为差异表达基因表达热图，横坐标为分组（红色为布病组，蓝色为正常对照组），纵坐标为差异表达基因，颜色代表标准化后的表达水平（红色为高表达，蓝色为低表达）。

图 1　慢性布病患者与健康对照组之间差异表达基因分析

Figure 1　Analysis of differentially expressed genes between patients with chronic brucellosis and healthy controls



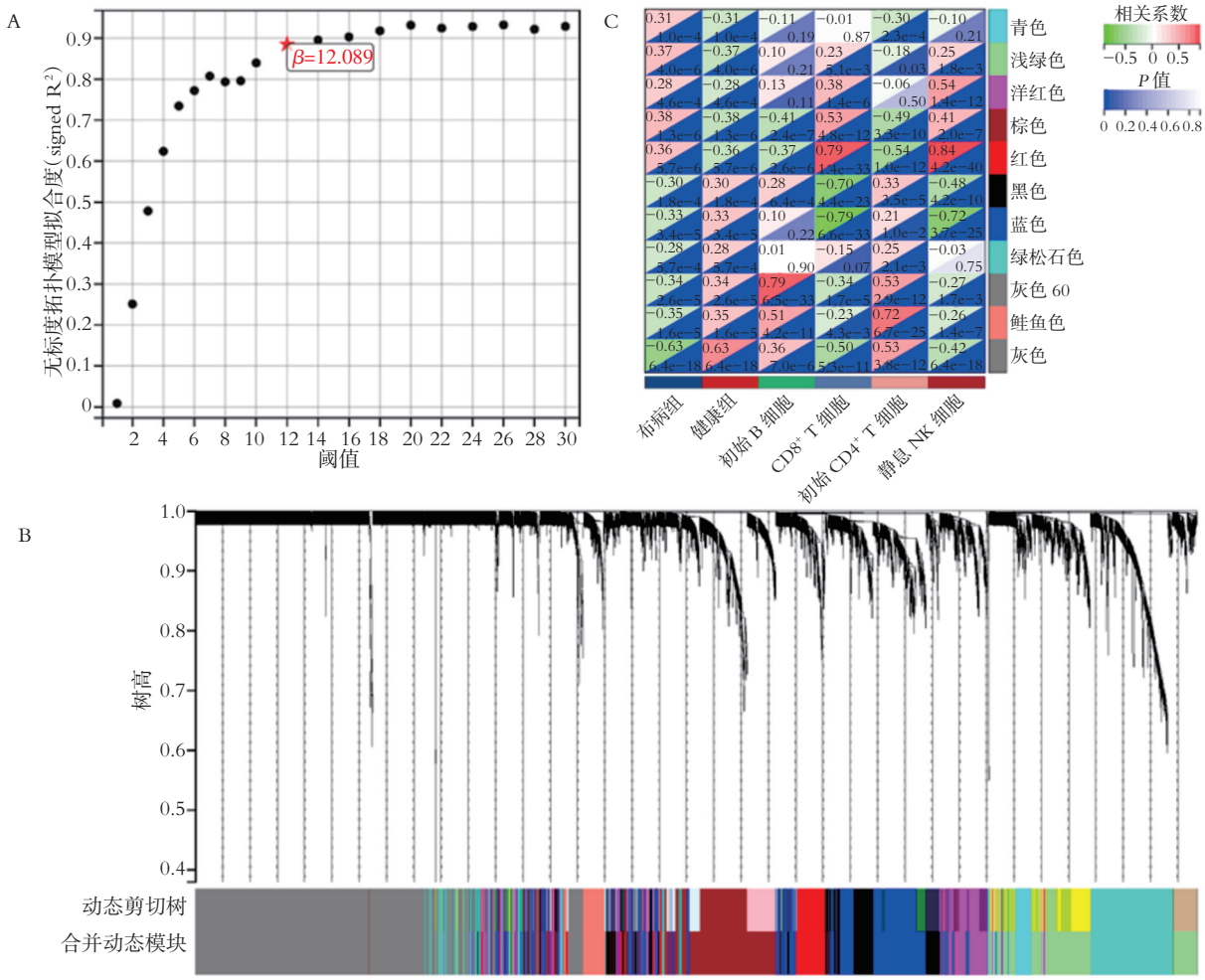
注：图为 22 种免疫细胞相对丰度的组间比较（箱线图）；红色代表布病组，蓝色代表正常对照组；横坐标为免疫细胞亚群，纵坐标为相对丰度；箱体表示中位数及四分位数范围；＊ $P<0.05$，＊＊ $P<0.01$，＊＊＊ $P<0.001$，－为 $P>0.05$。

图 2　慢性布病患者与健康对照组的免疫细胞浸润差异

Figure 2　Differences in immune cell infiltration between patients with chronic brucellosis and healthy controls

2.3　加权基因共表达网络（WGCNA）构建与核心模块识别　以 GSE69597 数据集中 DEGs 作为候选基因，使用 WGCNA 包构建加权基因共表达网络。网络拓扑分析显示，当软阈值 $\beta=12$ 时，无标度拓扑拟合指数＞0.85，满足构建无标度网络的最佳条件，见图 3A。通过聚类分析共识别出 11 个具有相似表达谱的基因模块，见图 3B。进一步的 *Pearson* 相关分析表明，红色（Red）模块的基因表达谱与 $CD8^+$ T 细胞浸润评分呈现正相关性（图 3C），因此将 Red 模块确定为后续分析的核心模块。

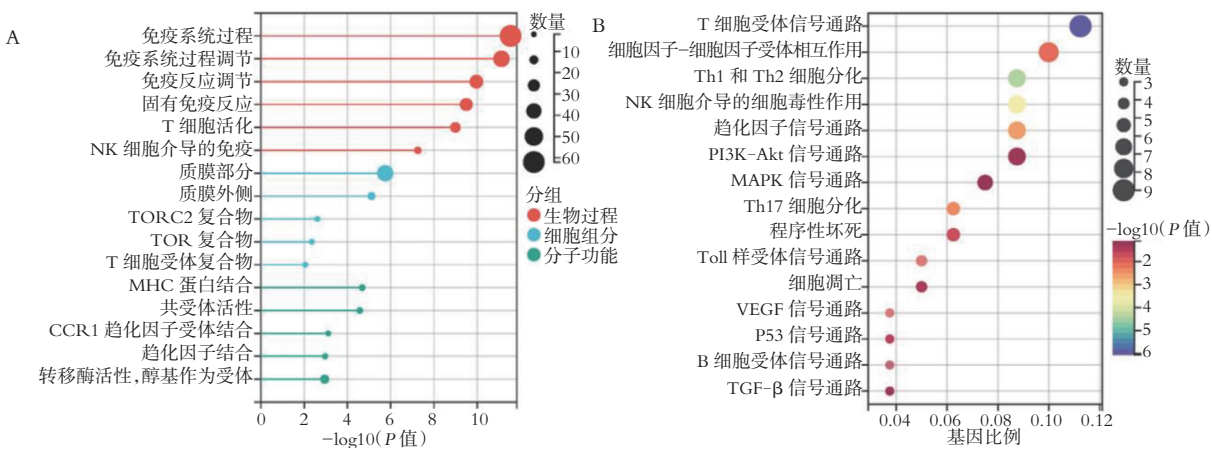
基因本体论（GO）功能富集结果显示，Red 模块基因主要参与调控适应性免疫系统过程、免疫应答调节、T 细胞活化、T 细胞受体复合物以及自然杀伤（NK）细胞介导的免疫等生物学过程，见图 4A。KEGG 通路分析进一步表明，这些基因显著富集于 T 细胞受体信号通路、细胞因子－细胞因子受体相互作用、Th1 和 Th2 细胞分化、NK 细胞介导的细胞毒性、趋化因子信号通路等相关信号通路，见图 4B。



注：A 为 WGCNA 软阈值幂(β)分析；B 为 11 个共表达模块的聚类树；C 为模块与免疫细胞的相关性分析，红色代表正相关，绿色代表负相关。

图 3　加权基因共表达网络分析

Figure 3　Weighted gene co-expression network analysis

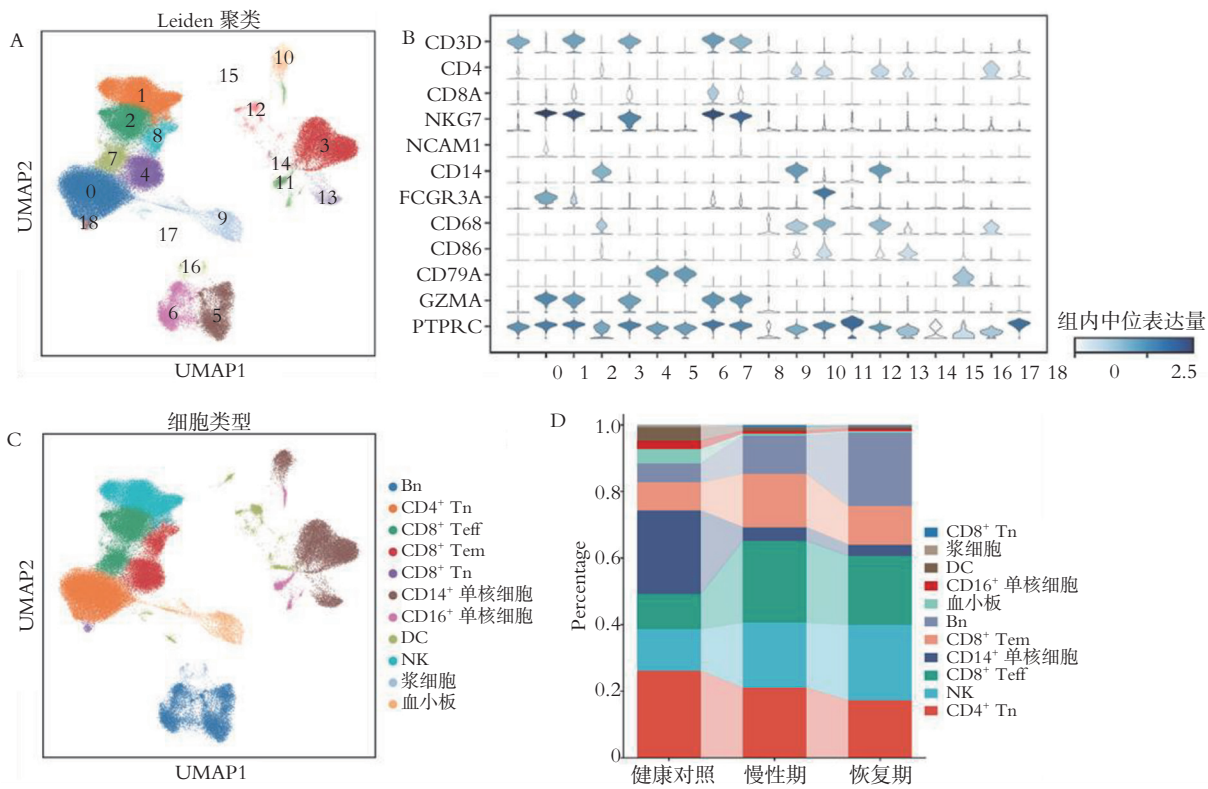


注：A 红色模块基因富集的 GO 条目。B 红色模块基因富集的 KEGG 通路。

图 4　功能富集分析结果

Figure 4　Results of functional enrichment analysis

2.4　单细胞测序揭示布病患者免疫细胞特征　基于单细胞测序数据(包括 3 例慢性期、3 例恢复期及公共数据库的正常对照),经 Scanpy 标准化与降维后,通过无监督聚类和 UMAP 可视化划分出 18 个细胞簇,见图 5A。依据标记基因,鉴定出 11 种主要免疫细胞类型:初始 CD8$^+$ T 细胞(CD8$^+$ Tn)、浆细胞、树突状细胞(DC)、CD16$^+$ 单核细胞、血小板、初始 B 细胞(Bn)、CD8$^+$ 效应记忆 T 细胞(CD8$^+$ Tem)、CD14$^+$ 单核细胞、CD8$^+$ 效应 T 细胞(CD8$^+$ Teff)、NK 和 CD4$^+$ Tn,见图 5B、C。细胞亚群占比分析发现,与健康对照组相比,慢性期患者 CD8$^+$ Tem 细胞比例显著增多;而在恢复期患者中,CD8$^+$ Tem 细胞比例较慢性期显著下降,见图 5D。

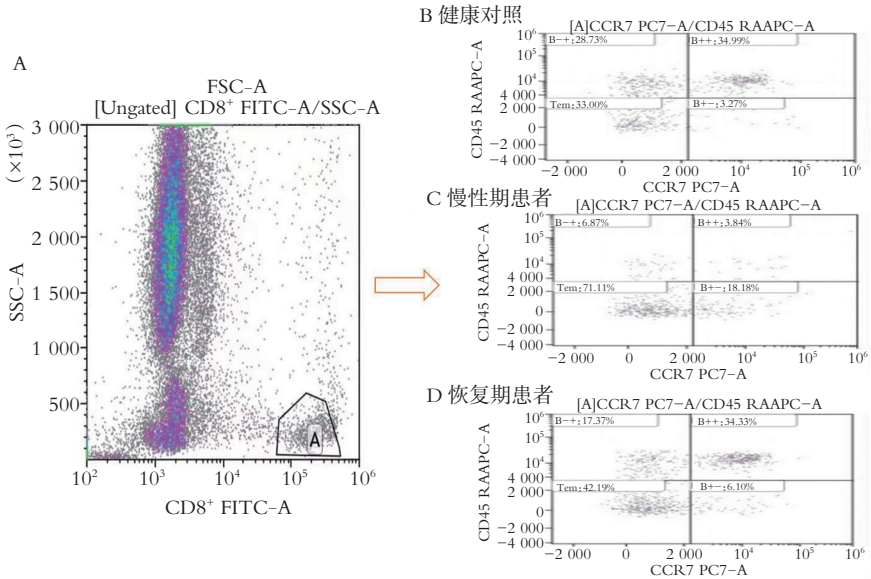


注:A 为不同细胞簇的 UMAP 图;B 为不同细胞亚群中经典标志基因的表达分布;C 为基于标记基因注释的主要细胞类型;D 为不同分期患者免疫细胞亚群占比。

图 5　单细胞测序揭示慢性布病患者免疫细胞类型

Figure 5　Single-cell sequencing reveals immune cell types in patients with chronic brucellosis

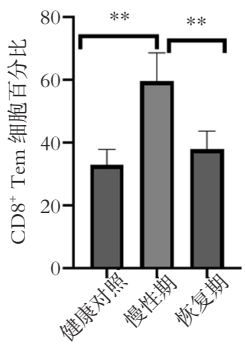
利用流式细胞术检测各组外周血 CD8$^+$ Tem 细胞比例。首先圈出 CD8$^+$ T 细胞,见图 6A,继而得出慢性期患者、恢复期患者及健康对照组外周血中 CD8$^+$ Tem 细胞亚群的百分比差异,见图 6。流式细胞术结果显示,慢性期患者 CD8$^+$ Tem 细胞百分比[(59.49 ± 9.14)%]高于恢复期组[(37.84 ± 5.87)%]和健康对照组[(32.83 ± 5.02)%],差异有统计学意义(P < 0.05),见图 7。该结果与单细胞测序结果基本一致。



注：A 圈出 $CD8^+$ T 细胞，箭头指示后续设门；B～D 为以 CCR7－定义 $CD8^+$ Tem 细胞。

图 6　流式细胞术检测 $CD8^+$ Tem 细胞的设门策略

Figure 6　Gating strategy for the detection of $CD8^+$ Tem cells by flow cytometry

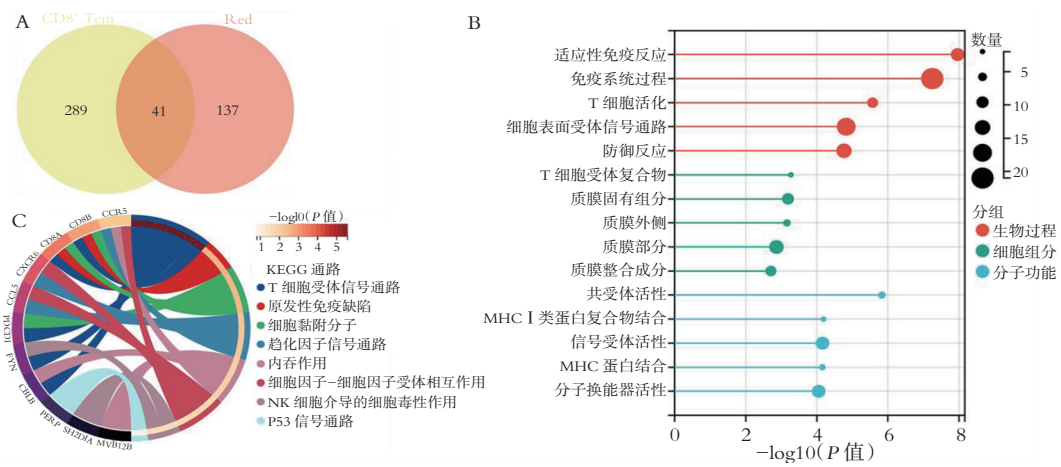


注：* * 表示 $P<0.01$。

图 7　不同分期患者外周血中 $CD8^+$ Tem 细胞比例

Figure 7　Proportions of $CD8^+$ Tem cells in peripheral blood of patients at different disease stages

2.5　$CD8^+$ Tem 细胞与核心模块基因的交集与功能富集分析　将单细胞分析鉴定出的 $CD8^+$ Tem 细胞特征基因（Marker 基因）与 WGCNA 识别出的核心 Red 模块基因进行交集分析，共筛选出 41 个共有基因，见图 8A。对共有基因进行 GO 与 KEGG 富集分析发现，在生物学过程中主要参与适应性免疫应答、MHC 分子结合和信号转导以及 T 细胞活化等，见图 8B。在 KEGG 通路中，则主要富集于髓系细胞和 T 细胞信号通路、免疫细胞迁移（趋化因子受体高表达）、免疫识别与活化和固有免疫，见图 8C。



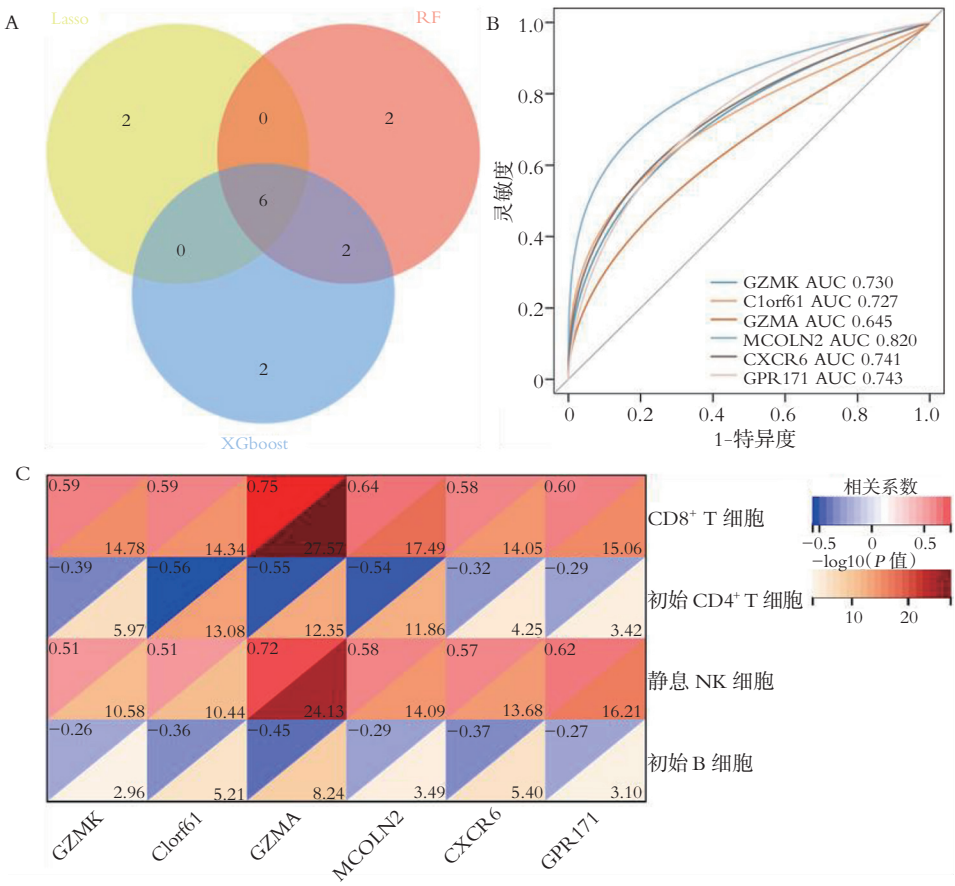
注：A 为 $CD8^+$ Tem 细胞与红色模块基因的交集分析；B 为共有基因富集的 GO 功能条目；C 为共有基因富集的 KEGG 通路。

图 8　$CD8^+$ Tem 细胞特征基因与 Red 模块基因的交集及富集分析

Figure 8　Intersection and enrichment analyses of $CD8^+$ Tem cell signature genes and Red module genes

2.6　机器学习筛选核心诊断基因及其相关性分析

对共有基因采用三种机器学习算法(Lasso 回归分析、随机森林和 XGboost)进行特征基因筛选,提取重要特征基因,最终确定了 6 个核心基因:GZMK、GZMA、CXCR6、C1orf61、MCOLN2 和 GPR171,见图 9A。ROC 曲线分析显示,这些核心基因具有良好的评估与分类价值,其曲线下面积(AUC)分别为:GZMK(0.730)、GZMA(0.645)、CXCR6(0.741)、C1orf61(0.727)、MCOLN2(0.820)和 GPR171(0.743),见图 9B。其中,MCOLN2 的诊断效能最高(AUC = 0.820,灵敏度 69.9%,特异度 82.6%,准确率 73.8%),其次为 GPR171(AUC = 0.743)。各项诊断评估指标见表 2。进一步将这 6 个核心基因的表达量与 CIBERSORT 免疫细胞浸润评分进行 *Pearson* 相关性分析,结果显示这些基因与 $CD8^+$ T 细胞的浸润丰度呈显著正相关,见图 9C。UMAP 可视化图也直观展示了上述 6 个基因主要在 $CD8^+$ Tem 细胞和 NK 细胞亚群中特异性高表达,见图 10。



注:A 为三种机器学习算法重要特征基因的交集;B 为候选基因对患者识别效能的 ROC 曲线;C 为免疫细胞与核心候选基因之间的相关性(红色代表正相关,蓝色代表负相关)。

图 9　机器学习筛选核心基因及免疫相关性分析

Figure 9　Screening of core genes using machine learning and analysis of immune correlations

表 2　6 个核心基因的诊断效能评估

Table 2　Evaluation of the diagnostic performance of six core genes

基因	AUC(95%*CI*)	灵敏度(%)	特异度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	准确率(%)
GZMK	0.730(0.650～0.818)	56.3	91.3	93.5	48.3	67.1
GZMA	0.645(0.562～0.740)	65.0	67.4	81.7	46.3	65.8
CXCR6	0.741(0.658～0.818)	60.2	87.0	91.2	49.4	68.5
C1orf61	0.727(0.636～0.803)	47.6	100	100	46.0	63.8
MCOLN2	0.820(0.744～0.883)	69.9	82.6	90.0	55.1	73.8
GPR171	0.743(0.654～0.823)	58.3	82.6	88.2	46.9	65.8

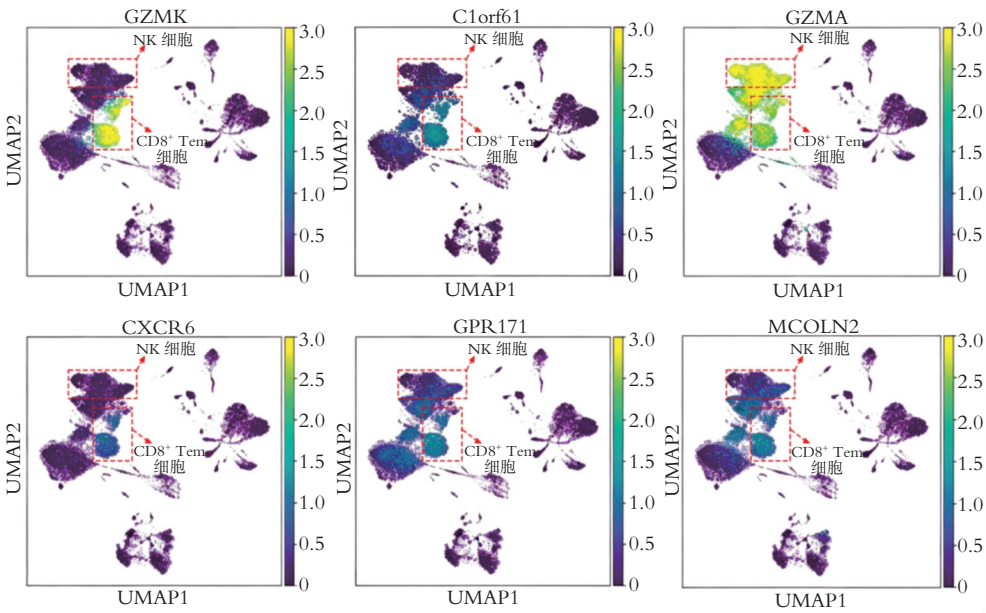
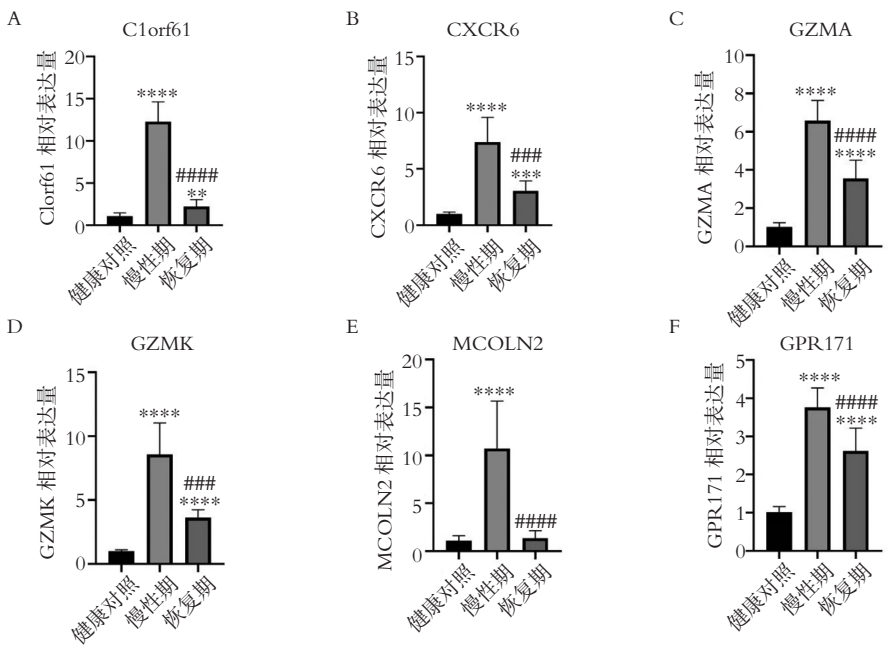


图 10　6 个核心基因在不同细胞类型中的表达 UMAP 图

Figure 10　UMAP plot of the expression of six core genes across different cell types

2.7　qPCR 验证核心基因表达　为在转录水平验证核心基因的表达差异，采用 qPCR 检测慢性期患者、恢复期患者及健康对照组 PBMC 中 GPR171、C1orf61、CXCR6、GZMA、GZMK 及 MCOLN2 的 mRNA 表达水平。熔解曲线显示各基因扩增产物均为单一峰，提示引物特异性良好。与健康对照组相比，慢性期患者 PBMC 中上述 6 个基因的 mRNA 表达水平均显著升高（均 $P<0.000\ 1$）；恢复期患者各基因表达水平较慢性期患者显著下降（均 $P<0.001$），且与健康对照组相比除 MCOLN2 外，其余基因差异均有统计学意义（均 $P<0.01$）。该结果与转录组及单细胞测序筛选结果趋势一致，从转录水平进一步验证了核心基因在布病患者中的异常表达，见图 11。



注：* 表示与健康对照组比较；# 表示与慢性期患者比较。* * P 表示 <0.01，* * * / # # # 表示 $P<0.001$，* * * * / # # # # 表示 $P<0.000\ 1$。

图 11　6 个核心基因在不同组中的 mRNA 相对表达水平

Figure 11　Relative mRNA expression levels of six core genes in different groups

3　讨论

临床实践中，慢性期患者治疗效果欠佳，且缺乏客观的免疫监测指标。SAT 检测抗体滴度对疾病诊断具有较高的敏感性和特异性，但无法有效评估疗效，目前疾病治愈标准主要依据临床表现和常规炎症指标，缺乏精确的实验室标志物，因此筛选可用于判断病情及免疫状态的生物标志物对临床实践具有重要意义。诊断方法中血培养是金标准，但阳性率低，血清学检测技术仍具有重要价值。基于核酸检测的分子生物学方法较为高效，灵敏度和特异度均较高，但存在局限[15-17]。布病的治疗应早期、联合、足量、足疗程，但由于缺乏病情监测指标，目前疗程及预后监测仍存在争议。

本研究资料显示，慢性期患者乏力(70.0%)和关节疼痛(70.0%)多见，血沉增快(40.0%)、C 反应蛋白增高(30.0%)；恢复期患者上述指标均恢复正常。慢性期患者抗体滴度为 1∶50～1∶800，恢复期为 1∶50～1∶200，恢复期 SAT 结果仍为阳性，提示抗体滴度不能单独判定病情转归。研究[18-19]显示，布病患者与健康人群的外周血免疫细胞存在显著差异。分析特异性免疫情况可为寻找免疫监测指标提供依据，了解免疫微环境的变化情况可为筛选客观评价指标提供参考。本研究从免疫细胞的变化特点入手，探索评估免疫状态的生物标志物。

本研究系统分析布病患者的免疫细胞分布，结果显示，布病在不同病程阶段，免疫细胞的表现也不相同。在慢性期患者体内，$CD8^+$ T 细胞的比例增加。T 细胞在抗原刺激下增殖能力较强，这一现象可能与长期感染后形成的免疫记忆有关。免疫记忆能够让机体在再次遇到相同病原体时，更快启动免疫应答[20]。$CD8^+$ T 细胞的细胞毒作用在抗布鲁氏菌感染中起重要作用，激活的细胞毒性 $CD8^+$ T 细胞是清除布病的关键环节[21]。T 淋巴细胞在数量和功能上的改变为布病发生、发展、慢性化以及再次复发的机制提供了方向。$CD8^+$ T 细胞可释放 γ-干扰素(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-2(IL-2)等细胞因子，通过细胞毒作用清除寄生在细胞内的布鲁氏菌，同时激活体液免疫，促进 B 细胞分化为浆细胞产生特异性抗体。抗体通过调理作用，增强巨噬细胞杀菌能力[22-23]。

记忆性 $CD8^+$ Tem 是持久存在的细胞群，当机体再次接触抗原时可快速增殖并转化为效应 T 细胞，为机体提供长期的抗感染保护[24]。Tem 细胞一般会携带 CCR5、CXCR3 和整合素等组织归巢分子，可以从血液进入非淋巴组织。Tem 细胞的增殖能力不强，但受 TCR 信号刺激后可快速产生细胞因子与细胞毒性物质，迁移至感染部位清除病原体[25]。本研究使用 scRNA-seq 对样本进行分析，鉴定出多种免疫细胞亚群，构建了较为完整的免疫细胞图谱。对细胞比例统计后发现，与健康人群相比，慢性期患者 $CD8^+$ Tem 细胞比例明显升高，而进入恢复期后比例会下降。进一步使用流式细胞术进行检测，结果显示慢性期患者 $CD8^+$ Tem 细胞比例高于恢复期和健康对照组，与单细胞测序结果一致。说明在治疗有效、病情好转时，$CD8^+$ Tem 细胞比例会下降，该细胞有望作为监测慢性布病免疫状态的潜在生物标志物。

通过分析标记基因，慢性期布病患者免疫细胞相关功能主要涉及适应性免疫应答、MHC 分子结合、信号转导、T 细胞信号通路、免疫细胞迁移、免疫识别与活化以及部分固有免疫信号通路。这提示慢性期免疫应答为多类免疫细胞和多条信号通路共同参与的复杂调控过程。进一步对共有基因进行 3 种机器学习算法交叉筛选后，最终确定 6 个核心基因：GZMK、GZMA、CXCR6、C1orf61、MCOLN2 和 GPR171。ROC 分析显示，这些核心基因具有较好的分类能力和疾病识别效能。相关性分析表明，这些基因与 $CD8^+$ T 细胞浸润丰度呈正相关，并主要在 $CD8^+$ Tem 细胞中高表达。qPCR 验证结果显示，慢性期患者 GZMK、GZMA、CXCR6、MCOLN2、GPR171、C1orf61 的 mRNA 表达高于健康对照组($P<0.000\ 1$)，恢复期表达下降($P<0.001$)，与转录组及单细胞测序结果趋势一致。关于 $CD8^+$ Tem 细胞在慢性布病中升高的机制，推测可能与慢性抗原持续刺激促进 T 细胞向效应记忆表型分化、免疫检查点分子(如 PD-1、TIGIT)表达异常导致 T 细胞分化失衡有关，具体机制将在后续研究中进行探讨。熔解曲线显示各基因扩增均为单一峰，数据可靠。上述结果从临床特征、免疫细胞组成及分子标志物三个层面加深了对布病免疫特征的认识，为筛选免疫监测指标提供了参考。后续需结合更大样本量及功能实验，对其分子机制及临床应用价值进行验证。

本研究在开展过程中存在不足。研究所纳入的

样本数量较少，研究结果可能受个体差异的影响。慢性期和恢复期患者为独立横断面入组，未实现同一患者治疗前后的配对随访。此外，未纳入急性期患者，无法完整展示布病从急性期到慢性期再到恢复期的全病程免疫演变过程。虽然本研究为分析布病的免疫反应提供了初步依据，但要得到更全面、更可靠的结论，并获得更具实用性的疗效评估标志物，还需要补充急性期队列，结合前期 GEO 数据，构建“急性期→慢性期→恢复期”的完整免疫图谱，还需要采用前瞻性配对设计，对同一患者进行纵向随访验证等，以进一步明确 $CD8^+$ Tem 细胞及核心基因的临床应用价值。

作者贡献声明：郑嵘灵负责设计试验、实施研究、试验操作、统计分析及论文撰写。木衣司尔·艾买提江负责标本采集、试验操作、临床资料整理及数据整理。杨丽负责标本采集、数据分析及试验操作。张紫怡负责标本采集、数据整理及试验操作。邵彤彤负责试验操作、数据整理及统计分析。鲁晓擘负责研究指导、试验指导及论文修改。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Qureshi K A, Parvez A, Fahmy N A, et al. Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment - a comprehensive review[J]. Ann Med, 2023, 55(2): 2295398.

[2] Liu Zhiguo, Shi Yue, Xue Chuizhao, et al. Epidemiological and spatiotemporal clustering analysis of human brucellosis-China, 2019 - 2023[J]. China CDC Wkly, 2025, 7(4): 130 - 136.

[3] Ghssein G, Ezzeddine Z, Tokajian S, et al. Brucellosis: bacteriology, pathogenesis, epidemiology and role of the metallophores in virulence: a review[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2025, 15: 1621230.

[4] Almuzaini A M, Elbehiry A. Unraveling brucellosis: advances in pathogenesis, diagnostic strategies, therapeutic innovations, and public health perspectives[J]. Front Med (Lausanne), 2025, 12: 1629008.

[5] Lu Peipei, Luo Bin, Wang Qian, et al. Progress in brucellosis immune regulation inflammatory mechanisms and diagnostic advances[J]. Eur J Med Res, 2025, 30(1): 830.

[6] Lavigne J P, Magnan C, Loubet P, et al. What's new in the diagnosis and treatment of human brucellosis? [J]. Infect Dis Now, 2025, 55(7): 105121.

[7] Prabhakar Y K, Skariah S, Shanmugam G, et al. Molecular epidemiology, immunobiology, genomics and proteomics insights into bovine brucellosis[J]. Vet Microbiol, 2025, 305: 110505.

[8] Bahabri I, Hakeem A, Alturki M S, et al. Brucellosis relapse: rate, patient characteristics, and clinical outcomes in an endemic region[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2025, 19(7): e0013270.

[9] Dorneles E M S, Santana J A, Costa A C T R B, et al. Equine brucellosis: current understanding and challenges[J]. J Equine Vet Sci, 2023, 127: 104298.

[10] Bosilkovski M, Keramat F, Arapović J. The current therapeutical strategies in human brucellosis[J]. Infection, 2021, 49(5): 823 - 832.

[11] Dadar M, Tiwari R, Sharun K, et al. Importance of brucellosis control programs of livestock on the improvement of one health[J]. Vet Q, 2021, 41(1): 137 - 151.

[12] Narimisa N, Razavi S, Masjedian Jazi F. Risk factors associated with human brucellosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2024, 24(7): 403 - 410.

[13] Pritam M, Kumar R. Pathophysiology, current therapeutic options, vaccine candidates, and drug targets for human brucellosis[J]. Curr Mol Pharmacol, 2024, 17: e130723218680.

[14] Hou Shuiping, Kong Fandong, Li Xintong, et al. Role of myeloid-derived suppressor cells in chronic brucellosis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 14: 1347883.

[15] Lau C H, Li Xiaojun, Liang Qingle, et al. CRISPR technology for diagnosis and treatment of human brucellosis[J]. J Microbiol Methods, 2026, 240: 107339.

[16] Feng Qiangsheng, Ha Xiaoqin, Lin Tong, et al. Brucella cultures characteristics, clinical characteristics, and infection biomarkers of human Brucellosis[J]. J Infect Public Health, 2023, 16(3): 303 - 309.

[17] Liu Haiwen, Jiang Hai. Advances in the application of molecular diagnostic techniques to brucellosis[J]. Biomed Environ Sci, 2024, 37(7): 790 - 794.

[18] Wang Yi, Yang Siyuan, Han Bing, et al. Single-cell landscape revealed immune characteristics associated with disease phases in brucellosis patients[J]. iMeta, 2024, 3(4): e226.

[19] He Xiaoyan, Ma Yu, Aynur, et al. Immune cell and biochemical marker levels in the cerebrospinal fluid and blood of patients with brucella meningitis and their clinical significance[J]. Am J Transl Res, 2024, 16(9): 5097 - 5105.

[20] Zhu Yongzhang, Shi Li, Zeng Yige, et al. Key immunity characteristics of diverse stages of brucellosis in rural population from Inner Mongolia, China[J]. Infect Dis Poverty, 2022, 11(1): 63.

[21] Silva M F, Batista D F A, Eckstein C, et al. *Brucella abortus* interferes with the inflammatory response and tissue repair in mice[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 30279.

[22] Serafino A, Bertinat Y A, Bueno J, et al. Beyond its preferen-

tial niche: *Brucella abortus* RNA down-modulates the IFN-γ-induced MHC-I expression in epithelial and endothelial cells [J]. PLoS One, 2024, 19(7): e0306429.

[23] Aguilar C N T, Huy T X N, Nguyen T T, et al. Imipramine-induced immunomodulation and intracellular growth inhibition during *Brucella abortus* 544 infection in RAW 264.7 cells and BALB/c mice[J]. Front Vet Sci, 2025, 12: 1598106.

[24] 王宁，王一晗，姜凤良，等. 记忆性 T 细胞亚群及其分化调控研究进展[J]. 中国免疫学杂志，2023，39(6)：1326－1330，1336.
Wang Ning, Wang Yihan, Jiang Fengliang, et al. Research progress on differentiation and regulation of memory T cell subsets[J]. Chinese Journal of Immunology, 2023, 39(6): 1326－1330, 1336.

[25] 邢建蕾，赵旭东. Runx3 调控组织驻留记忆 $CD8^+$ T 细胞分化与功能的研究进展[J]. 中国免疫学杂志，2026，42(1)：214－218.
Xing Jianlei, Zhao Xudong. Research progress of Runx3 regulating differentiation and function of tissue-resident memory $CD8^+$ T cells[J]. Chinese Journal of Immunology, 2026, 42(1): 214－218.

（本文编辑：陈玉华）

本文引用格式：郑嵘炅，木衣司尔·艾买提江，杨丽，等. 慢性期布鲁氏菌病免疫特征及 $CD8^+$ Tem 细胞变化的初步分析[J]. 中国感染控制杂志，2026，25(11)：1623－1635. DOI：10.12138/j.issn.1671－9638.20264701.

Cite this article as: Zheng Rongjiong, Muyisier Aimaitijiang, Yang Li, et al. Preliminary analysis of immunological characteristics and changes in $CD8^+$ Tem cells in chronic brucellosis[J]. Chin J Infect Control, 2026, 25(11): 1623－1635. DOI: 10.12138/j.issn.1671－9638.20264701.