

肺结核患者外周血免疫细胞水平与临床意义分析

朱春玲,侯远沛,尤莲,刘成永

摘要:目的 探讨肺结核患者外周血免疫细胞的表达水平及其临床意义。方法 回顾性分析2016年1月至2017年5月徐州市传染病医院收治的676例肺结核患者和体检中心的40例健康对照者。采用贝克曼库尔特公司FC500型流式细胞仪,以荧光微球为参照,分别检测外周血CD4⁺、CD8⁺、B和NK细胞的绝对数。**结果** 肺结核患者免疫细胞CD4⁺、CD8⁺、B和NK细胞数量低于健康对照者($t=6.25, 5.12, 5.05, 4.37; P$ 值均为0.00);痰菌阳性的肺结核患者免疫细胞CD4⁺、CD8⁺、B、NK细胞数量低于痰菌阴性的肺结核患者($t=4.07, 3.70, 2.75, 2.71; P=0.00, 0.00, 0.01, 0.01$);老年肺结核患者免疫细胞CD4⁺、CD8⁺、B细胞数量低于年轻患者($t=4.04, 2.60, 5.25; P=0.00, 0.01, 0.00$),554例初治肺结核患者经过2个月化疗后,其中510例单纯采用标准化抗结核治疗方案的患者CD4⁺、CD8⁺、B和NK细胞数量增加无统计学意义($t=1.19, 1.04, 0.39, 1.82; P=0.23, 0.30, 0.70, 0.07$),44例合并免疫治疗的肺结核患者除NK细胞数量增加无统计学意义($t=0.80; P=0.42$),CD4⁺、CD8⁺、B数量增加($t=2.15, 2.17, 3.12; P=0.03, 0.03, 0.00$)。**结论** 肺结核患者免疫细胞的表达水平降低,痰菌阳性以及老年肺结核患者降低尤为明显,对于免疫细胞表达水平降低的肺结核患者,在化疗的基础上配合免疫治疗更有利患者的康复。

关键词:结核;肺;体液免疫;细胞免疫

中图分类号:R521

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)07-0648-05

Expression level and clinical significance of immune cells in peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis

ZHU Chun-ling, HOU Yuan-pei, YOU Lian, LIU Cheng-yong

(Department of Clinical Laboratory, Xuzhou Municipal Infectious Disease Hospital, Xuzhou 221004, China)

Abstract: We investigated the expression level and clinical significance of immune cells in peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. Data from 676 patients with pulmonary tuberculosis and 40 healthy controls collected from January 2016 to May 2017 was analyzed retrospectively. The absolute number of CD4⁺, CD8⁺, B and NK cells in peripheral blood were detected with FC500 flow cytometry, fluorescent microspheres used as a reference. Results showed that the number of CD4⁺, CD8⁺, B, NK cells in patients with pulmonary tuberculosis was significantly lower than that of healthy controls ($t=6.25, 5.12, 5.05, 4.37; P=0.00$ each). The number of CD4⁺, CD8⁺, B, NK cells in sputum-positive patients with pulmonary tuberculosis was significantly lower than that in sputum-negative patients ($t=4.07, 3.70, 2.75, 2.71; P=0.00, 0.00, 0.01, 0.01$). The number of CD4⁺, CD8⁺ and B cells in elderly patients with pulmonary tuberculosis was significantly lower than in young patients ($t=4.04, 2.60, 5.25; P=0.00, 0.01, 0.00$). After 2 months chemotherapy about 554 initial treatment pulmonary tuberculosis, the number of CD4⁺, CD8⁺, B and NK cells did not increase significantly in 510 pulmonary tuberculosis patients with standardized anti-tuberculosis simply ($t=1.19, 1.04, 0.39, 1.82; P=0.23, 0.30, 0.70, 0.07$); the number of CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes and B lymphocytes increased significantly in 44 pulmonary tuberculosis patients after 2 months chemotherapy combined with immunotherapy ($t=2.15, 2.17, 3.12; P=0.03, 0.03, 0.00$), while the number of NK cells did not increase significantly ($t=0.80; P=0.42$). The expression levels of immune cells decreased in patients with pulmonary tuberculosis, especially in the sputum positive pulmonary tuberculosis patients and elderly patients, chemotherapy combined with immunotherapy were more conducive to the rehabilitation of pulmonary tuberculosis patients whose expression levels of immune cells were significantly reduced.

Keywords: tuberculosis; pulmonary; humoral immunity;

cellular immunity

Corresponding author: Hou Yuan-pei, Email: hhyppxz@163.com

结核分枝杆菌侵入肺部后,大多患者表现为隐性感染,部分患者感染该菌后会出现轻重不一的临床症状,这一方面与感染的结核分枝杆菌数量和性状有关,一方面与自身的免疫功能有关。结核分枝杆菌是胞内寄生菌,以往的研究与报道大都与细胞免疫有关^[1-2],随着流式细胞仪的普及以及免疫细胞检测种类的增加,流式细胞术在结核感染的诊断和疗效评价方面取得一定的进展^[3]。我院于2015年引进贝克曼库尔特公司生产的FC500型流式细胞仪,经过一年多的使用,现将肺结核患者免疫细胞的表达情况进行总结,探讨其临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 病例选择 676例入选患者为2016.1—2017.5来本院就诊的门诊和住院肺结核患者,其中女性191例,男性485例,年龄15—92岁,平均年龄43.0±19.53岁。痰菌阴性的肺结核患者369例,年龄15—92岁,平均年龄41.6±19.21岁,痰菌阳性的肺结核患者307例,年龄17—83岁,平均年龄44.30±20.17岁;痰菌阴性与阳性的肺结核患者相比,年龄差异无统计学意义($t=1.78, P=0.08$);初治肺结核患者569例,复治肺结核患者74例,耐多药肺结核患者33例,所有患者的诊断均符合《肺结核诊断和治疗指南》^[4]中肺结核的诊断标准,排除合并HIV、糖尿病等其他免疫缺陷病患者,以及最近半年有过免疫治疗的患者。40例健康对照者来自本院体检中心,年龄17—72岁,平均年龄37.25±15.86例,肺

结核患者与健康对照者相比,年龄差异无统计学意义($t=1.83, P=0.07$)

1.2 研究方法 所有患者入院当日抽取静脉血,经乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)抗凝后送检采用贝克曼库尔特公司生产的FC500型流式细胞仪进行外周血免疫细胞的检测,以荧光微球为参照品进行免疫细胞的绝对计数,试剂为贝克曼库尔特公司生产的配套试剂,所有检测均严格按照试剂盒配备的说明书和SOP文件操作,每次检测以库尔特公司生产的细胞质控品进行质量控制,确保检测结果准确。

1.3 治疗方法 569例初治肺结核患者中有554例患者采用标准化抗结核治疗方案2HRZE/4HR进行治疗,其中有44例患者在此抗结核治疗的基础上辅以胸腺法新(海南中和药业有限公司提供,国药准字H20051916,1.6mg/次,2次/周,皮下注射)进行免疫调节治疗,连续治疗2个月后再抽取静脉血检测免疫细胞数。

1.4 统计学方法 采用PEMS 3.1医学统计软件进行统计分析,率的比较采用 χ^2 检验,两组均数的比较采用t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 经检测肺结核患者CD4⁺,CD8⁺,B,NK细胞数量低于健康对照($t=6.25, 5.12, 5.05, 4.37; P$ 值均为 $P=0.00$),肺结核患者与健康对照者免疫细胞的检测情况见表1。

表1 肺结核组与健康对照组免疫细胞绝对数的比较

Tab.1 Comparison of the absolute number of immune cells in tuberculosis group and healthy group

组别	例数	CD4 ⁺ (个/ μ L)	CD8 ⁺ (个/ μ L)	B(个/ μ L)	NK(个/ μ L)
肺结核组	676	535.56±264.92	361.66±218.0	160.95±117.74	253.77±185.31
健康对照组	40	720.08±175.05	528.90±199.80	230.91±82.74	369.34±160.89
		$t=6.25, P=0.00$	$t=5.12, P=0.00$	$t=5.05, P=0.00$	$t=4.37, P=0.00$

2.2 痰菌阳性肺结核患者 CD4⁺,CD8⁺,B,NK细胞数量低于痰菌阴性肺结核患者($t=4.07, 3.70,$

2.75,2.71; $P=0.00, 0.00, 0.01, 0.01$),痰菌阳性与痰菌阴性肺结核患者免疫细胞的检测情况见表2。

表 2 痰菌阳性与痰菌阴性肺结核患者免疫细胞绝对数的比较

Tab.2 Comparison of the absolute numbers of immune cells in tuberculosis patients with sputum positive and sputum negative

组别	例数	CD4 ⁺ (个/ μ L)	CD8 ⁺ (个/ μ L)	B(个/ μ L)	NK(个/ μ L)
痰菌阳性组	307	492.11±255.25	326.40±221.11	148.87±117.95	233.70±155.89
痰菌阴性组	369	574.09±265.23	388.21±212.56	173.72±116.54	270.93±200.72
		$t=4.07, P=0.00$	$t=3.70, P=0.00$	$t=2.75, P=0.01$	$t=2.71, P=0.01$

2.3 60岁以上的老年人与30岁以下的年轻人相比,NK细胞数差异无统计学意义($t=1.89, P=0.06$),CD4⁺,CD8⁺,B细胞数差异($t=4.04, 2.60, 5.25; P=0.00, 0.01, 0.00$);与30—60岁的中年人相比CD4⁺,B细胞数差异有统计学意义($t=3.59, 3.23; P$ 值均为 $P=0.00$);CD8⁺,NK细胞数差异

无统计学意义($t=1.19, 1.96; P=0.24, 0.06$)。30—60岁的中年人与30岁以下的年轻人相比CD8⁺,B细胞数差异有统计学意义($t=1.98, 3.08; P=0.00, 0.04$);CD4⁺,NK细胞数差异无统计学意义($t=0.39, 0.02; P=0.70, 0.98$)不同年龄肺结核患者免疫细胞的检测情况见表3。

表 3 不同年龄肺结核患者免疫细胞绝对数的比较

Tab.3 Comparison of the absolute numbers of immune cells in tuberculosis patients with different age

年龄(岁)*	例数	CD4 ⁺ (个/ μ L)	CD8 ⁺ (个/ μ L)	B(个/ μ L)	NK(个/ μ L)
≤30①	260	572.84±259.09	385.30±173.20	190.91±129.22	245.20±173.30
31—60②	254	563.73±268.66	353.20±194.39	160.57±91.51	244.85±153.21
≥61③	162	468.58±255.22	324.67±263.54	123.94±124.22	284.84±229.68
		$t=4.04, 3.59;$ $P=0.00, 0.00$	$t=2.60, 1.19;$ $P=0.01, 0.24$	$t=5.25, 3.23;$ $P=0.00, 0.00$	$t=1.89, 1.96;$ $P=0.06, 0.06$

* 统计值为③与①②比较值

2.4 569例初治肺结核患者中有554例采用标准化抗结核治疗方案2HRZE/4HR治疗。554例肺结核患者中有510例仅采用传统的标准化抗结核治疗,有44例患者在标准化治疗方案的基础上辅以胸腺法新进行免疫治疗。治疗前,标准化治疗组与合并免疫治疗组相比CD4⁺、CD8⁺、B、NK细胞数量差异有统计学意义($t=3.46, 2.18, 2.73, 2.47; P=0.00, 0.03, 0.01, 0.01$)。经过2个月的治疗后,标准化治疗组与合并免疫治疗组相比CD4⁺、CD8⁺、B、NK细胞数量无统计学意义($t=0.89, 0.28, 0.88, 0.61; P=0.37, 0.078, 0.38, 0.54$);与自身相比,510例仅采用标准化抗结核治疗方案的患者CD4⁺、CD8⁺、B、NK细胞数量增加无统计学意义($t=1.19, 1.04, 0.39, 1.82; P=0.23, 0.30, 0.70, 0.07$);44例采用标准化抗结核治疗合并免疫治疗的结核患者除NK细胞数量增加无统计学意义($t=0.80; P=0.42$),CD4⁺、CD8⁺、B细胞数量明显增加($t=2.15, 2.17, 3.12; P=0.03, 0.03, 0.00$),554例初治肺结核患者经过2个月的治疗后免疫细胞的变化情况见表4。

3 讨 论

结核分枝杆菌主要通过飞沫经呼吸道进入肺泡,侵入肺泡的结核分枝杆菌被吞噬细胞吞噬后,通过阻止巨噬细胞吞噬溶酶体的成熟及酸化、抑制氧化应激反应等方式逃避机体的免疫杀伤^[5],使得该菌在吞噬细胞内大量繁殖,造成原发感染;当结核分枝杆菌再次侵入人体,人体的免疫系统受到抗原刺激后,免疫细胞开始活化,分泌细胞因子,通过一系列的免疫反应清除侵入体内的结核分枝杆菌。表1资料提示肺结核患者免疫细胞CD4⁺、CD8⁺、B、NK细胞的表达水平低于健康对照者,当结核分枝杆菌侵入人体后,由于患者免疫细胞数量降低,不利于该细菌的及时清除,导致结核分枝杆菌在肺内长期生长繁殖,造成不同程度的肺损伤。

表2资料提示痰菌阳性肺结核患者CD4⁺、CD8⁺、B、NK细胞数量显著低于痰菌阴性肺结核患者。结核分枝杆菌是胞内寄生菌,细胞免疫对该菌的清除起主导作用^[6],机体主要依靠CD4⁺T淋巴细胞释放细胞因子活化单核吞噬细胞和淋巴细胞、CD8⁺T淋巴细胞通过释放穿孔素和颗粒酶以及诱

表 4 554 例肺结核患者经 2 个月治疗后免疫细胞绝对数的比较

Tab.4 Comparison of the absolute number of immune cells in 554 patients with pulmonary tuberculosis after 2 months of treatment

组别	例数	时期	CD4 ⁺ (个/ μ L)	CD8 ⁺ (个/ μ L)	B(个/ μ L)	NK(个/ μ L)
标准化治疗组	510	治疗前	455.04±243.45	387.17±240.73	141.33±103.18	271.88±170.05
		治疗后	474.55±279.61	401.73±205.63	138.61±121.32	251.55±185.98
			$t=1.19, P=0.23$	$t=1.04, P=0.30$	$t=0.39, P=0.70$	$t=1.82, P=0.07$
合并免疫治疗	44	治疗前	322.54±248.39	305.93±192.85	97.96±69.70	206.0±169.50
		治疗后	435.68±245.07	392.81±182.83	155.11±99.46	233.82±155.30
			$t=2.15, P=0.03$	$t=2.17, P=0.03$	$t=3.12, P=0.00$	$t=0.80, P=0.42$

导靶细胞凋亡等方式清除侵入体内的结核分枝杆菌,研究表明 CD4⁺ T 细胞缺乏容易导致早期肺外结核菌的播散以及肺结核的快速进展^[7]。随着研究的深入,发现体液免疫在结核菌的清除中也起到重要作用^[8],B 淋巴细胞通过产生中和抗体、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)、吞噬调理作用以及抗原提呈作用等方式清除体内的结核分枝杆菌。研究表明,B 淋巴细胞缺乏的小鼠感染结核分枝杆菌后,肺组织炎症反应加重,B 淋巴细胞可减轻其炎症反应进展和增强抑菌作用^[9]。NK 细胞可直接杀伤结核分枝杆菌感染的靶细胞,无需 MHC 限制,也可通过 ADCC 效应清除结核分枝杆菌。研究表明,NK 细胞在结核特异性抗原 ESAT-6 刺激下可通过分泌高水平的 IFN-γ 协同 CD4⁺ T 细胞在抗结核感染中发挥重要作用^[10]。因此 NK 细胞减少易导致机体对结核分枝杆菌的清除能力减弱,黄丽静等人认为 T 淋巴细胞及 NK 细胞的水平变化可以预测肺结核病情的严重程度^[11]。

表 3 资料提示老年肺结核患者除 NK 细胞外,CD4⁺,CD8⁺,B 淋巴细胞的数量低于年轻人,与中年人相比,CD4⁺,B 淋巴细胞数量也降低,由于免疫细胞数量的减少,其分泌的细胞因子含量也随之降低,适应性免疫功能的下降导致其对结核分枝杆菌清除能力减弱。刘会等人认为老年继发性肺结核患者 T 细胞免疫功能较中青年患者低,治疗效果差,治疗时间长^[12]。对于老年肺结核患者在化疗的基础上,进行适当的免疫干预治疗能够提高患者细胞免疫功能,有利于结核分枝杆菌的清除^[13]。

结核分枝杆菌侵入人体后,患者的免疫功能受到一定的损伤,尤其是重症结核病患者,其细胞免疫和体液免疫较普通结核病患者受到的损害更大^[14],耐多药结核病患者较敏感患者细胞免疫功能下降明显,病情复杂,治疗难度大^[15],表 4 资料提示对于免

疫细胞减少的肺结核患者在标准化抗结核治疗的基础上合并使用胸腺法新进行免疫治疗 2 个月后,除 NK 细胞增加不明显外,CD4⁺、CD8⁺、B 淋巴细胞数量均增加。说明联合治疗可促进患者适应性免疫功能的恢复,有利于机体对结核分枝杆菌的清除,有研究表明对于初治肺结核患者给予免疫辅助治疗,可加快病灶的吸收^[16]。

综上所述,肺结核患者免疫细胞的表达水平降低,痰菌阳性和老年肺结核患者降低尤为明显,肺结核患者在常规抗结核药物治疗的基础上辅以适当的免疫治疗更有利于患者的康复。

参考文献:

- [1] 董毅,吴利先.T 细胞免疫在抗结核杆菌感染中的研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(18):3593-3595.DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.18.050
- [2] Waeckerle-Men Y, Bruffaerts N, Liang Y, et al. Lymph node-targeting of BCG vaccines amplifies CD4 and CD8 T-cell responses and protection against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Vaccine, 2013,31(7):1057-1064. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.12.034
- [3] 吴凡,孙林,张晓明.基于流式细胞术诊断结核感染的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2015,31(10):963-966.DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2015.10.014
- [4] 中华医学会结核病学分会.肺结核诊断和治疗指南[J].中国实用乡村医生杂志,2013,20(2):7-11.DOI: 10.3969/j.issn.1672-7185.2013.02.005
- [5] 陈伟伟,张冉冉,曹雯,等.结核分枝杆菌免疫逃避机制研究进展[J].中国人兽共患病学报,2017,33(8):730-733. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.08.013
- [6] 万引,徐漫清,张爱妹.初治肺结核病人 T 淋巴细胞亚群的表达及与化学药物治疗的相关性[J].江西医药,2015,50(12):1323-1325.
- [7] Yao S, Huang D, Chen CY, et al. CD4⁺ T cells contain early extrapulmonary tuberculosis (TB) dissemination and rapid TB progression and sustain multifactorial functions of CD8⁺ T and CD3⁻ lymphocytes; mechanisms of CD4⁺ T cell immunity[J]. J

- Immunol, 2014, 192(5): 2120-2132. DOI: 10.4049/jimmunol.1301373
- [8] 吕艳,白丽. B 细胞免疫应答与抗结核分枝杆菌感染的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 3(9): 279-281. DOI: 10.13350/j.cjpb.140322
- [9] 苏瑾文,程小星. 肺结核的保护性免疫和免疫病理机制进展[J]. 中国热带医学, 2015, 15(5): 635-638.
- [10] 王慧宇,程齐俭,季萍,等.活动期结核病患者外周血 NK 细胞免疫反应特征分析[J]. 现代免疫学, 2014, 34(4): 265-270.
- [11] 黄丽静,陈焯彬,韦永孜. 肺结核患者病情严重程度与免疫功能受损程度的相关性研究[J]. 海南医学, 2016, 27(9): 1424-1425. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2016.09.017
- [12] 刘会,张晓光,黄新莉,等.不同年龄活动性肺结核患者 T 细胞亚群分析及动态变化[J]. 河北医科大学学报, 2016, 37(8): 889-892. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2016.08.005
- [13] 赵晖.老年肺结核患者细胞和体液免疫状况及免疫干预治疗对其的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(15): 4186-4188. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2014.15.035
- [14] 毛敏杰,汪彩红,潘蕾. 细胞免疫和体液免疫功能检测对重症结核病患者的临床意义[J]. 中华危重症医学杂志, 2015, 8(2): 109-111. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2015.02.008
- [15] 喻容,周添荣,石国民,等.耐多药结核病患者细胞免疫功能的初步研究[J]. 实用预防医学, 2016, 23(10): 1199-1201. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.10.015
- [16] 何娅,潘洪秋,范琳. 免疫辅助治疗初治肺结核的研究[J]. 中国防痨杂志, 2017, 39(2): 134-139. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2017.02.006

收稿日期:2017-11-07 编辑:李友松

(上接第 647 页)

- [20] Chan MY, Borgdorff M, Yip CW, et al. Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype[J]. Epidemiol Infect, 2001, 127(1): 169-171.
- [21] Jou R, Chiang CY, Huang WL. Distribution of the Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1): 95-100.
- [22] 邢进,赵玉玲.河南省结核分枝杆菌间隔区寡核苷酸分型技术的应用研究[J].河南预防医学杂志, 2014, 25(5): 321-324.
- [23] 石荔,董海燕,西洛.间隔区寡核苷酸分型运用于西藏自治区藏族结核分枝杆菌临床分离株的基因多态性分析[J].中华传染病杂志, 2014, 32(1): 22-25.
- [24] 逢宇,夏辉,姜广路,等.中国结核分枝杆菌寡核苷酸基因分型及其耐药性分析[J].中华检验医学杂志, 2011, 34(11): 1023-1028.
- [25] Rufai SB, Sankar MM, Singh J, et al. Predominance of Beijing lineage among pre-extensively drug-resistant and extensively drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A tertiary care center experience[J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5(1): 197-198.
- [26] Dalla Costa, Elis Regina, Lazzarini, et al. *Mycobacterium tuberculosis* of the RD10 genotype is the predominant caus of tuberculosis and associated with multidrug resistance in Porto Alegre City South Brazil[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(4): 1071-1077.

收稿日期:2017-08-12 编辑:王晓欢