

外周血 Th1/Th2/Treg 细胞及相应细胞因子水平 在耐多药结核疾病中的诊断价值及意义

如克亚木·阿不都沙拉木¹ 古丽巴哈尔·阿不拉合买提² 李树涛¹ 阿布都沙拉木·托合提¹

【摘要】 目的 外周血 Th1/Th2/Treg 细胞及相应细胞因子水平在耐多药结核(MDR-TB)患者中的诊断价值及意义。方法 回顾性分析自2016年2月-2020年2月于我院接受治疗的肺结核患者99例,其中无耐药肺结核患者52例(无耐药组),耐多药结核患者47例(耐药组),另外抽取同期体检的健康者76例(健康组),采用酶联免疫吸附试验法检测各组Th1细胞及IFN- γ 细胞因子,Th2细胞及IL-4细胞因子,Treg细胞及IL-10细胞因子水平。结果 与对照组相比,耐药组和无耐药组患者血清Th1细胞及其细胞因子IFN- γ 水平、Th2细胞及其细胞因子IL-4水平以及Treg细胞及其细胞因子IL-10水平均显著降低(P 均 <0.001);耐药组患者血清Th1细胞及其细胞因子IFN- γ 水平、Th2细胞及其细胞因子IL-4水平以及Treg细胞及其细胞因子TGF- β 水平均较无耐药组患者显著低(P 均 <0.05)。结论 患者外周血Th1/Th2/Treg细胞及相应细胞因子水平的变化与耐多药结核发病相关,因此可考虑将其作为耐多药结核疾病诊断的参考指标。

【关键词】 外周血 Th1/Th2/Treg 细胞;耐多药结核;无耐药肺结核;诊断价值

Diagnostic value and significance of peripheral blood Th1/Th2/Treg cells and corresponding cytokines in multi-drug resistant tuberculosis

RUKEYAMU Abudushalamu¹, GULIBAHAER Abulahemaiti², LI Shu-tao¹, Abudushalamu · Tuoheti¹

1. Department of Tuberculosis I; 2. Department of Tuberculosis II, Chest Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumuqi, Xinjiang 830013, China

【Abstract】 Objective To evaluate the diagnostic value and significance of peripheral blood Th1/Th2/Treg cells and corresponding cytokine levels in patients with multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). **Methods** A retrospective analysis of 99 pulmonary tuberculosis patients from February 2016 to February 2020 in our hospital were conducted, including 52 patients without drug-resistant TB (no resistance) and 47 patients with MDR-TB (resistance). At the same time, another 76 healthy physical examination people were taken as the control group. Enzyme-

doi: 10.3969/j.issn.1009-6663.2020.09.029

作者单位: 830013 新疆维吾尔自治区, 新疆维吾尔自治区胸科医院 1. 结核一科 2. 结核二科

通信作者: 古丽巴哈尔·阿不拉合买提, E-mail: rukeyamu@163.com

SciTech 2019 20(3): 120.

[10] 蔡静. 肺结核患者就诊临床表现特征及变化情况调查分析 [D]. 青岛: 青岛大学, 2012.

[11] MÉDA ZC, SOMÉ T, SOMBIÉ I, et al. Patients infected by tuberculosis and human immunodeficiency virus facing their disease, their reactions to disease diagnosis and its implication about their families and communities, in burkina faso: a mixed focus group and cross sectional study [J]. BMC Res Notes 2016 9: 373.

[12] TADESSE S. Stigma against tuberculosis patients in addis ababa, ethiopia [J]. PLoS One 2016 11(4): e0152900.

[13] ASIKI G, MOHAMED SF, WAMBUID, et al. Sociodemographic and behavioural factors associated with body mass index among men and women in Nairobi slums: AWI-Gen project [J]. Glob Health Action 2018 11(Suppl2): 1470738.

[14] WINGFIELD T, TOVAR MA, HUFF D, et al. Beyond pills and tests: addressing the social determinants of tuberculosis [J]. Clin

Med 2016 16(Suppl6): s79-s91.

[15] HUSSEIN B, HUSSEIN MM, SEID A, et al. Nutritional deficiency and associated factors among new pulmonary tuberculosis patients of Bale Zone hospitals, southeast Ethiopia [J]. BMC Res Notes, 2019 12(1): 751.

[16] AHLE M, DROTT P, ANDERSSON RE. Epidemiology and trends of necrotizing enterocolitis in Sweden: 1987-2009 [J]. Pediatrics, 2013 132(2): e443-e451.

[17] 刘其会, 孙峰, 孙涛, 等. 一线抗结核药物血药浓度与早期痰菌阴转的相关性研究 [J]. 中国防痨杂志, 2018, 40(2): 157-160.

[18] RODRIGO T, CASALS M, CAMINERO JA, et al. Factors associated with fatality during the intensive phase of anti-tuberculosis treatment [J]. PLoS One 2016 11(8): e0159925.

[收稿日期: 2019-12-18]

linked immunosorbent assay method was used to detect Th1 cells and IFN- γ cytokines, Th2 cells and IL-4 cytokines, and Treg cells and IL-10 cytokines. **Results** Compared with the control group, the levels of serum Th1 cells and IFN- γ cytokines, Th2 cells and IL-4 cytokines, and Treg cells and IL-10 cytokines in the drug-resistant and non-resistant groups were significantly lower (all $P < 0.001$), and they were significantly lower in the drug-resistant group than in the non-resistant group (all $P < 0.05$). **Conclusion** The changes of peripheral blood Th1/Th2/Treg cells and corresponding cytokines are related to the incidence of MDR-TB, so it can be considered as a reference indicator for diagnosis of MDR-TB.

【Key words】 peripheral blood Th1/Th2/Treg cells; MDR-TB; no drug-resistant tuberculosis; diagnostic value

耐多药肺结核是指感染结核分枝杆菌后对利福平耐药、异烟肼耐药的肺结核,其主要特点为高治疗费、低治愈率及高死亡率,是临床结核病治疗的难题之一^[1-2]。据相关研究证实,其病因与临床不合理用药相关,因机体内基因突变造成药物降低对突变菌的作用,故耐药菌株增多是诱发耐药的重要原因^[3-4]。结核分支杆菌属于胞内寄生菌,细胞免疫是机体内主要的抗结核免疫,而机体内T淋巴细胞亚群及其细胞因子与细胞免疫强弱密切相关。因此结核病的研究重点是分析其细胞免疫。经查阅发现Th1/Th2/Treg细胞及相应细胞因子水平在耐多药结核患者中的研究甚少,因此本研究将探讨外周血Th1/Th2/Treg细胞及相应细胞因子水平在耐多药结核患者中的诊断价值及意义,以期临床提供理论依据。

资料与方法

一、患者临床资料

回顾性分析自2016年2月-2020年2月于我院接受治疗的肺结核患者99例,分为无耐药组和耐药组,其中无耐药组:肺结核患者共52例,男31例(占比59.62%),女21例(占比40.38%),年龄为20~54岁、平均年龄为(34.83±7.21)岁;耐药组:肺结核患者47例,男27例(占比57.45%),女20例(占比42.55%),年龄为19~54岁、平均年龄为(34.62±7.35)岁;另外抽取同期体检的健康者76例作为健康组:男45例(占比59.21%),女31例(占比40.79%),年龄为20~53岁、平均年龄为(34.48±7.19)岁。

三组患者一般资料差异无统计学意义,具有可比性($P > 0.05$)。本研究方案的制定符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》的相关要求。

二、入选标准

纳入标准:肺结核根据《肺结核诊断和治疗指

南》中的相关标准,耐多药肺结核根据2019版《耐多药肺结核诊断和治疗指南》中的相关标准,且经X线胸片或胸部CT诊断为肺结核;首次接受治疗者;年龄>18岁;未合并其他传染病病原合并感染者,如乙肝、艾滋病等。

排除标准:合并慢性阻塞性肺疾病、糖尿病或恶性肿瘤者;合并慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎等其他慢性感染;近3个月内使用过糖皮质激素、免疫抑制剂等药物;妊娠期或哺乳期妇女;免疫功能障碍者。

三 实验方法

1 主要仪器及试剂

DW-86L626超低温冰箱(生产厂家:海尔特种电器有限公司);L535R台式大容量冷冻离心机(生产厂家:湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);美国Beckman Coulter公司生产的Epics XL型流式细胞仪;DD-5M低速大容量离心机(生产厂家:湖南湘立科学有限公司);南京卡米洛生物工程有限公司生产的本研究所所需的试剂盒;上海慧颖生物科技有限公司生产的PBS缓冲液;美国Santa Cruz公司生产的荧光抗体。

2 检测外周血Th1/Th2/Treg细胞及相应细胞因子水平

所有患者入院后均抽取空腹8h以上肘静脉血3~5mL,以3500 r/min离心15 min后提取血清50 μ L放入离心管,分离单个核细胞。采用FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司生产)测定Th1/Th2/Treg细胞比例:将细胞分为三份,CD4-FITC+IFN- γ -APC抗体标记Th1细胞,CD4-FITC+IL-4-cy5抗体标记Th2细胞,CD4-FITC+CD25-PE+Foxp3抗体标记Treg细胞,调整细胞浓度,将100 μ L以上荧光抗体加入对应单个核细胞内,室内避光孵育1h,冲洗(PBS缓冲液),将破膜剂加入,再次避光孵育15 min,PBS冲洗后上机收集细胞流式细胞仪进行检测,检测过程严格按照其说明书进行操作。

Th1 细胞因子 IFN- γ 、Th2 细胞因子 IL-4 及 Treg 细胞因子 IL-10 均采用酶联免疫吸附试验进行检测,其操作过程需严格根据说明书进行操作。

3 数据分析

用 Flow-Check 标准荧光微球校正仪器光路,调整 FITC/PE 的荧光补偿,以 CD4/IFN- γ 、CD4/IL-4 和 CD4/CD25/Foxp3 分别建立双参数直方图,得出 CD4⁺/IFN- γ ⁺、CD4⁺/IL-4⁺ 和 CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ 的比例。

四、统计学方法

应用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析。定量资料服从正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料的比较先采用单因素方差分析,再采用 LSD- t 检验进行多重比较;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、三组 Th1 细胞及相应细胞因子水平比较

与对照组相比,耐药组和无耐药组患者血清 Th1 细胞、IFN- γ 水平均显著降低 ($t_{Th1} = 27.652$ 、 25.508 , P_{Th1} 均 < 0.001 ; $t_{IFN-\gamma} = 31.709$ 、 29.309 , $P_{IFN-\gamma}$ 均 < 0.001) ,且耐药组患者血清 Th1 细胞、IFN- γ 水平均显著低于无耐药组 ($t_{Th1} = 2.182$, $P_{Th1} = 0.031$; $t_{IFN-\gamma} = 2.781$, $P_{IFN-\gamma} = 0.006$) (见表 1)。

表 1 三组 Th1 细胞及相应细胞因子水平比较

组别	n	Th1 细胞(%)	IFN- γ (pg/mL)
健康组	76	8.91 \pm 1.35	33.09 \pm 5.47
无耐药组	52	4.21 \pm 0.72	12.33 \pm 2.37
耐药组	47	3.91 \pm 0.64	11.09 \pm 2.03
F	-	477.526	620.738
P	-	<0.001	<0.001

二、三组 Th2 细胞及相应细胞因子水平比较

与对照组相比,耐药组和无耐药组患者血清 Th2 细胞以及 IL-4 水平均显著降低 ($t_{Th2} = 29.457$ 、 18.881 、 17.227 , P_{Th2} 均 < 0.001 ; $t_{IL-4} = 31.741$ 、 16.838 、 14.995 , P_{IL-4} 均 < 0.001) ,且耐药组患者血清 Th2 细胞以及 IL-4 水平均显著低于无耐药组 ($t_{Th2} = 2.077$, $P_{Th2} = 0.041$; $t_{IL-4} = 2.333$, $P_{IL-4} = 0.022$) (见表 2)。

三、三组 Treg 细胞及相应细胞因子水平比较

与对照组相比,耐药组和无耐药组患者血清 Treg 细胞和 IL-10 水平均显著降低 ($t_{Treg} = 28.560$ 、 14.002 , P_{Treg} 均 < 0.001 ; $t_{IL-10} = 27.853$ 、 21.376 , P_{IL-10} 均 < 0.001) ,且耐药组患者血清 Treg 细胞和 IL-10

水平均显著低于无耐药组 ($t_{Treg} = 2.339$, $P_{Treg} = 0.022$; $t_{IL-10} = 3.395$, $P_{IL-10} = 0.001$) (见表 3)。

表 2 三组 Th2 细胞及相应细胞因子水平比较

组别	n	Th2 细胞(%)	IL-4(pg/mL)
健康组	76	6.26 \pm 0.87	61.13 \pm 10.09
无耐药组	52	2.57 \pm 0.43	36.11 \pm 6.72
耐药组	47	2.35 \pm 0.60	33.02 \pm 6.42
F	-	644.52	220.902
P	-	<0.001	<0.001

表 3 三组 Treg 细胞及相应细胞因子水平比较

组别	n	Treg 细胞(%)	IL-10(pg/mL)
健康组	76	4.53 \pm 0.76	6.78 \pm 0.79
无耐药组	52	4.01 \pm 1.39	4.19 \pm 0.58
耐药组	47	1.29 \pm 0.21	3.31 \pm 0.41
F	-	257.921	489.486
P	-	<0.001	<0.001

讨 论

据 2016 年世界卫生组织报告,我国耐多药肺结核发病率据全球第 2 位,复治肺结核患者具有明显的耐药性,同时耐药性也是结核病防治工作中急需解决的难点及重点问题^[5-6]。耐多药肺结核诱因较多,患者免疫力降低是结核分枝杆菌感染的重要危险因素,且可增加结核分枝杆菌耐药性^[7-8]。因此,通过分析耐多药肺结核患者免疫水平的变化情况,从而进一步探讨其对患者病情影响的的价值及意义,对该疾病的临床治疗尤为重要。

Th1/Th2 型细胞因子在抗结核免疫中发挥重要作用,相关研究显示,耐多药结核的主要发病机制是患者外周血中 Th1 细胞和 Th2 细胞降低导致^[9-10]。Th1 细胞主要抗细胞内细菌及调节细胞免疫应答,可分泌 IFN- γ 等细胞因子,增加免疫应答^[11]。Th2 细胞可分泌白细胞介素 IL-4、IL-5 等细胞因子,对 Th1 细胞增殖具有抑制作用,介导体液免疫反应^[12]。本研究结果显示,与对照组相比,耐药组和无耐药组患者血清 Th1 细胞及其细胞因子 IFN- γ 水平、Th2 细胞及其细胞因子 IL-4 水平以及 Treg 细胞及其细胞因子 IL-10 水平均显著降低 (P 均 < 0.001);耐药组患者血清 Th1 细胞及其细胞因子 IFN- γ 水平、Th2 细胞及其细胞因子 IL-4 水平以及 Treg 细胞及其细胞因子 TGF- β 水平均较无耐药组患者显著降低 (P 均 < 0.05),表明:耐药和无耐药结核患者免疫细胞水平均低于健康对照人群,而耐多药结核患者免疫细胞水平则较无耐药组患者更

低,以上研究结果与前人研究结果一致。例如,刘凤娟^[13]等学者通过研究提示,肺结核患者体内 Th1 细胞、IFN- γ 水平及 Th2 细胞、IL-4 水平明显低于正常人;余美玲^[14]等研究提示,Th1 型细胞因子与 Th2 型细胞因子水平可随肺结核患者病情变化增高或降低,病情越严重则其水平越低反之则相反。Miahipour^[15]等研究提示,Th 细胞亚群的失衡与耐多药肺结核的发生密切相关,特别是 Th1 细胞及其细胞因子降低。

Treg 细胞是一类控制体内自身免疫反应性的 T 细胞亚群,对 Th1 等所介导的抗结核免疫应答具有抑制作用,当机体内 Treg 细胞及其相关因子不平衡时,会严重影响抗结核免疫应答,导致机体免疫功能受到抑制^[16]。本研究结果提示,耐药组与无耐药组患者血清 Treg 细胞、IL-10 水平明显低于健康组,并且以耐药组患者血清 Treg 细胞、IL-10 水平最低($P > 0.05$),提示结核病患者免疫功能明显受到抑制,而耐多药结核患者免疫抑制程度则比无耐药患者更为严重,与前人研究结果相似,如王国钺^[17]等学者通过研究提示,在结核性胸膜炎患者体内 Treg 细胞水平明显降低,且低于正常人水平。另外本研究时间有限所纳入样本量较少,且随访时间较短,故进一步研究时,应在扩大样本量的同时对耐多药结核患者免疫细胞中的 Th17 细胞及其相关因子进行分析,且增加随访时间,深入研究论证。

总之,结核患者外周血中 Th1 细胞、IFN- γ ,Th2 细胞、IL-4 以及 Treg 细胞、IL-10 水平则高于健康人,特别是耐多药结核患者上述细胞因子变化更大,说明耐多药结核患者中免疫功能受损较为严重,Treg 细胞及其细胞因子可能成为临床治疗耐多药结核患者的新方向。

参考文献

- [1] STERLING TR, NJIE G, ZENNER D, et al. Guidelines for the treatment of latent tuberculosis infection: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020 [J]. *Am J Transplant* 2020, 20(4): 1196-1206.
- [2] UDDIN MKM, RAHMAN A, ATHER MF, et al. Distribution and frequency of rpoB mutations detected by Xpert MTB/RIF assay among Beijing and non-Beijing rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Bangladesh [J]. *Infect Drug Resist* 2020, 13: 789-797.
- [3] SENGHORE M, DIARRA B, GEHRE F, et al. Evolution of Mycobacterium tuberculosis complex lineages and their role in an emerging threat of multidrug resistant tuberculosis in Bamako, Mali [J]. *Sci Rep* 2020, 10(1): 327.
- [4] HAMEED HA, TAN Y, ISLAM MM, et al. Detection of novel gene mutations associated with pyrazinamide resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Southern China [J]. *Infect Drug Resist* 2020, 13: 217-227.
- [5] MPOBELA AGNARSON A, WILLIAMS A, KAMBILI C, et al. The cost-effectiveness of a bedaquiline-containing short-course regimen for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis in South Africa [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2020, 18(5): 475-483.
- [6] 马艳, 杜建, 高微微, 等. 377 例复治肺结核患者耐药的危险因素研究 [J]. *中国预防医学杂志* 2018, 19(9): 641-646.
- [7] BAYA B, ACHENBACH CJ, KONE B, et al. Clinical risk factors associated with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in Mali [J]. *Int J Infect Dis* 2019, 81: 149-155.
- [8] BOLHUIS MS, AKKERMAN OW, STURKENBOOM MGG, et al. Linezolid-based regimens for multidrug-resistant tuberculosis (TB): a systematic review to establish or revise the current recommended dose for TB treatment [J]. *Clin Infect Dis* 2018, 67 (Suppl 3): S327-S335.
- [9] 叶静, 吴琦, 杜钟珍, 等. 耐多药结核患者外周血 Th1、Th2、Th17 细胞及其细胞因子水平变化 [J]. *山东医药* 2019, 59(26): 76-78.
- [10] 欧阳建军, 伍参荣, 陈北阳, 等. 月华胶囊对耐多药结核鼠 T 淋巴细胞亚群及细胞因子的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(9): 28-31.
- [11] SACRAMENTO LA, BENEVIDES L, MARUYAMA SR, et al. TLR4 abrogates the Th1 immune response through IRF1 and IFN- β to prevent immunopathology during *L. infantum* infection [J]. *PLoS Pathog* 2020, 16(3): e1008435.
- [12] LUO X, LI C, WANG Y, et al. Interleukin-33 promotes Th2/Th17 response in eosinophilic and non-eosinophilic nasal polyps [J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2020, 82(1): 34-39.
- [13] 刘凤娟, 马爱国, 陈璐璐, 等. 青岛地区支气管哮喘合并老龄结核病患者 Th1/Th2 细胞因子水平及危险因素分析 [J]. *中华保健医学杂志* 2019, 21(6): 528-530.
- [14] 余美玲, 郭卉欣, 王云霞, 等. 肺结核患者体内结核相关免疫细胞因子的动态变化 [J]. *中华结核和呼吸杂志* 2015, 38(8): 584-588.
- [15] MIAHIPOURA, HAJI-FATAHALIHAM, KESHAVARZH, et al. Thelper1 (Th1), Th2, and Th17 response to leishmaniamajor Lipophosphoglycan3 [J]. *Immunol Invest* 2016, 45(7): 692-702.
- [16] LU H, DAI X, LI X, et al. Gal-4 regulates dendritic cells-induced Treg/Th17 balance through NF- κ B/RelB-IL-27 pathway [J]. *Ann Transl Med* 2019, 7(22): 628.
- [17] 王国钺, 赵英政, 裴利宏, 等. Th17 细胞和 Treg 细胞在结核病人外周血中的变化及临床意义 [J]. *中国免疫学杂志* 2013, 29(11): 1181-1185.

[收稿日期: 2020-04-07]