



扫码阅读电子版

活动性肺结核患者外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达干扰素 γ 的研究

杨万福 张菊侠

陕西省结核病防治院内三科, 西安 710100

通信作者: 张菊侠, Email: zhangjx0576@163.com

【摘要】 目的 比较活动性肺结核患者治疗 2 个月前后表达干扰素 γ (IFN- γ) 的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞百分比差异。方法 选取 2015 年 3 月至 2016 年 6 月医院收治的新诊断的活动性肺结核患者 40 例。采集 40 例患者治疗前和治疗 2 个月后全血, 采用流式细胞术检测 CD4⁺ T、CD8⁺ T、表达 IFN- γ 的 CD4⁺ T 及 CD8⁺ T 细胞百分比, 酶联免疫吸附法检测血清 IFN- γ 表达。结果 活动性肺结核患者治疗前后 CD4⁺ T 及 CD8⁺ T 细胞百分比比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后表达 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞百分比 (4.30 ± 2.01)% 显著低于治疗前 (2.06 ± 1.03)% ($t = 4.162, P = 0.0005$)。治疗前后表达 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞百分比比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗前血清 IFN- γ 表达 (53.82 ± 8.84) ng/L 显著高于治疗后 (47.73 ± 9.17) ng/L ($t = 2.709, P = 0.0139$)。结论 治疗前新发活动性肺结核的表达 IFN- γ 的 CD4⁺ T 百分比高于治疗后 2 个月, 提示表达 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞在防治肺结核感染中发挥作用。

【关键词】 结核, 肺; T 淋巴细胞; 干扰素 γ

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.01.006

Study of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells expressing interferon γ changes in active pulmonary tuberculosis patients

Yang Wanfu, Zhang Juxia

The Third Department of Tuberculosis Prevention, Shaanxi Provincial Tuberculosis Control Hospital, Xi'an 710100, China

Corresponding author: Zhang Juxia, Email: zhangjx0576@163.com

【Abstract】 Objective Percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing interferon gamma (IFN- γ) in patients with active tuberculosis were compared before and after 2 months standard treatment. **Methods** Forty cases of newly diagnosed active tuberculosis patients admitted to the hospital from March 2015 to June 2016 were selected. The whole blood was collected before and after 2 months treatment in all 40 patients. The percentage of CD4⁺ T, CD8⁺ T, CD4⁺ T and CD8⁺ T cells expressing IFN- γ were detected by flow cytometry. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the serum IFN- γ expression. **Results** The percentages of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in patients with active tuberculosis before and after treatment had no statistical difference ($P > 0.05$). The percentage of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ after treatment (4.30 ± 2.01)% was significantly lower than those before treatment (2.06 ± 1.03)% ($t = 4.162, P = 0.0005$). There showed no significant difference in the percentages of CD8⁺ T cells expressing IFN- γ between patients before and after treatment ($P > 0.05$). Serum IFN- γ expression (53.82 ± 8.84) ng/L before treatment was significantly higher than that after treatment (47.73 ± 9.17) ng/L ($t = 2.709, P = 0.0139$). **Conclusions** The percentage of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ in newly active pulmonary tuberculosis was higher than that after 2 months treatment, suggesting that CD4⁺ T cells expressing IFN- γ may play a role in the prevention and treatment of tuberculosis infection.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary; T-lymphocytes; Interferon γ

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.01.006

结核病 (tuberculosis, TB) 仍然是当今全球较严重的传染病之一。2016 年全球约有 1 040 万人患有 TB, 约 170 万人因该病死亡, 超过 95% 的 TB 死亡发生在中低收入国家。2016 年中国报告肺结核患者 78 万多例, 新发 TB 人数居世界第 3 位^[1]。目前采用全面督导短程化疗治疗 TB 能有效治愈大部分新发现 TB 患者。大部分患者在治疗 2 个月后 TB 患者的临床症状、细菌学及放射学特征均得到明显改善^[2]。治疗 2 个月后痰培养是评估 TB 治疗疗效的生物标志, 但是获得高质量的痰, 尤其是肺结核患儿的痰较困难^[3]。由此有必要寻找新的判断疗效的生物标志物。研究发现接受抗结核治疗 2 个月后, 分泌干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ) 的免疫细胞总量减少, CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的功能及其产生的细胞因子变化可能抗结核早期治愈的免疫效应有关^[4], 这提示表达 IFN- γ 的免疫细胞可能是潜在的判断疗效的生物标志物。本研究通过比较活动性肺结核患者抗结核治疗前和治疗后 2 个月表达 IFN- γ 的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的百分比, 以评估 2 个月抗结核治疗对新发活动性肺结核患者的细胞免疫效应, 为 IFN- γ 作为生物标志物运用于评估抗 TB 疗效奠定基础。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2015 年 3 月至 2016 年 6 月在陕西省结核病防治院住院的新诊断为活动性肺结核病患者 20 例。纳入标准: 根据临床表现、影像学检查及实验室检查诊断为活动性肺结核病, 诊断指标参照《肺结核诊断和治疗指南》^[5]; 排除标准: (1) 非进展期肺结核患者; (2) 其他结核患者、复治肺结核病、非结核分枝杆菌感染患者; (3) 入院前接受过抗结核治疗者; (4) 严重心、肝、肾功能损害者; (5) 合并其他感染者; (6) 其他免疫性疾病者; (7) 恶性肿瘤患者等。40 例活动性肺结核病患者男 19 例, 女 21 例, 年龄 (33.3 ± 11.6) 岁, 年龄范围为 21~45 岁。本研究符合《赫尔辛基宣言》的原则, 所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂及仪器 BD Fasimune CD4 和/或 CD8 细胞内细胞因子染色试剂盒、Anti-Hu-IFN γ 抗体 (BD Cat. No. 340970)、鼠抗人 CD4-APC/CD69-PE/CD3-PerCP、鼠抗人 CD8-FITC/CD69-PE/CD3-PerCP 等均购自美国 BD 公司、IFN- γ 酶联免疫吸附试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司。FACS caliber 型流式细胞仪购自美国 BD 公司。Thermo Multiskan GO 酶标仪购自美国

Thermo 公司。

1.2.2 治疗方法 所有患者均给予正规抗结核治疗, 应用 4 联抗结核药物: 异烟肼 (成都锦华药业有限公司, 国药准字 H51020789)、利福平 (成都锦华药业有限公司, 国药准字 H51020873)、吡嗪酰胺 (成都锦华药业有限公司, 国药准字 H51020877)、乙胺丁醇 (广东华南药业集团有限公司, 国药准字 H44020758) 强化治疗 2 个月。

1.2.3 标本采集及检测 所有患者在接受治疗前及治疗完成后, 采集患者空腹静脉血 10 ml。取 9 ml 全血, 采用流式细胞术检测 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞及表达 IFN- γ 的 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分比。取静脉血 1 ml 取静置 30 min 后, 离心半径 8 cm, 3 000 r/min 离心 15 min, 血清分离 -80 °C 保存, 采用酶联免疫吸附法检测血清 IFN- γ 。所有操作严格按照产品说明书进行。所有检测均由经过技术培训及质量考核的同一个操作者完成。

1.3 统计学分析 采用 Graphpad 5.0 软件进行绘图和数据统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量数据分布符合正态分布, 治疗前后比较采用配对 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后 CD4⁺T 细胞及 CD8⁺T 细胞百分比变化 活动性肺结核患者治疗前后 CD4⁺T 细胞及 CD8⁺T 细胞百分比比较差异无统计学意义, CD4⁺T 细胞治疗前后百分比: (48.42 ± 10.41)% 比 (44.84 ± 9.15)% (*t* = 2.046, *P* = 0.054 8); CD8⁺T 细胞治疗前后百分比: (40.70 ± 11.84)% 比 (37.81 ± 11.69)% (*t* = 1.320, *P* = 0.202 4); 见图 1。

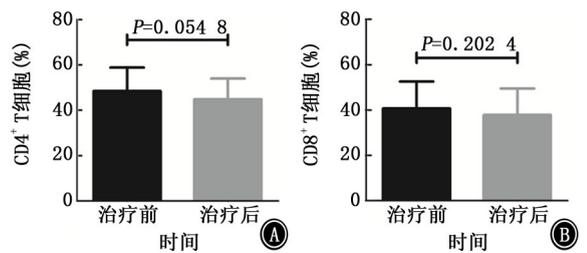
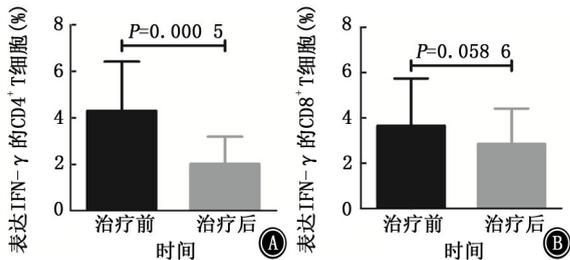


图 1 活动性肺结核患者治疗前后 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞百分比比较 A: 患者治疗前后 CD4⁺T 细胞百分比比较; B: 患者治疗前后 CD8⁺T 细胞百分比比较

2.2 治疗前后表达 IFN- γ CD4⁺T 细胞及 CD8⁺T 细胞百分比变化 活动性肺结核患者治疗后表达 IFN- γ 的 CD4⁺T 细胞百分比 (4.30 ± 2.01)% 显著低于治疗前 (2.06 ± 1.03)% (*t* = 4.162, *P* =

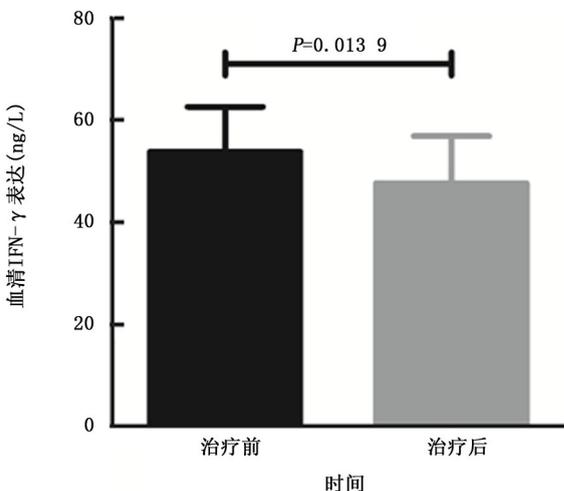
0.000 5); 治疗前后表达 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞百分治疗前后比差异无统计学意义 (3.654 \pm 1.80)% 比 (2.86 \pm 1.45)% ($t = 2.012, P = 0.058 6$); 见图 2。



注: IFN- γ 为干扰素 γ

图 2 活动性肺结核患者治疗前后表达 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞百分比比较 A: IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞百分比比较; B: IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞百分比比较

2.3 治疗前后血清干扰素 γ 表达变化 活动性肺结核患者治疗前血清 IFN- γ 表达 (53.82 \pm 8.84) ng/L 显著高于治疗后 (47.73 \pm 9.17) ng/L ($t = 2.709, P = 0.013 9$), 见图 3。



注: IFN- γ 为干扰素 γ

图 3 活动性肺结核患者治疗前后血清 IFN- γ 的表达

3 讨论

结核杆菌感染所致的结核病严重危害人类生命安全。结核杆菌是胞内寄生菌, 该菌感染机体后可刺激机体产生有菌免疫应答, 机体免疫应答水平与感染结局密切相关^[6]。介导机体结核杆菌感染免疫应答的细胞主要是 T 淋巴细胞及其亚群。结核杆菌感染机体后, 首先被巨噬细胞吞噬, 巨噬细胞通过内质网产生主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 类分子, 将结核杆菌片段转移到巨噬细胞表面, 被其他免疫细胞识别并与 CD4⁺ T 细胞受体结合, 活化 CD4⁺ T

细胞^[7]。活化的 CD4⁺ T 细胞可产生破坏或控制结核杆菌生长的细胞因子, 如 IFN- γ , 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 IL-2 等^[8]。IFN- γ 可激活单核细胞, 使单核细胞聚集在病灶周围, 并刺激巨噬细胞形成吞噬溶酶体, 增强感染的巨噬细胞的吞噬功能。IFN- γ 还可刺激含有结核杆菌的巨噬细胞形成能够破坏结核杆菌组分的自由基, 有利于清除体内细菌^[9]。另外, CD8⁺ T 细胞也可产生 IFN- γ 来破坏结核分枝杆菌, 与 CD4⁺ T 细胞一起抑制结核杆菌的生长^[10]。研究表明抗结核治疗后机体 IFN- γ 水平下降是疾病转归的表现^[11], 检测机体 CD4⁺ T、CD8⁺ T 及表达的 IFN- γ 的细胞对于评估机体免疫状态及判断疗效具有重要意义。

本研究中患者标准抗结核病强化治疗 2 个月后, 新活动性肺结核患者中 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞的百分比有降低趋势, 但并不显著。结核杆菌感染肺组织时, 细胞免疫发挥主要作用。首先外周循环初始 T 细胞分布到肺部感染部位, 然后通过 MHC II 类分子通过树突细胞和巨噬细胞识别和呈递抗原给初始 T 细胞, 导致初始 T 分化成 CD4⁺ T 细胞或 CD8⁺ T 细胞^[12]。经过 2 个月的抗 TB 治疗后, 细菌载量和炎症的减少, 感染部位的 CD4⁺ T 及 CD8⁺ T 细胞减少, 并且感染部位上活化的 T 细胞和尚未被活化的 T 细胞与初始 T 细胞一起返回外周循环, 从而导致治疗后 CD4⁺ T 细胞百分比降低, 但并不显著。本研究治疗后患者 CD8⁺ T 细胞百分比降低, 这与前人的报道一致^[12-13], 这可能也与机体免疫状态恢复有关。抗结核治疗后 CD8⁺ T 与 CD4⁺ T 细胞同时比例下降, 二者之间是否有相关性需要进一步研究探讨。

本研究中患者标准抗 TB 强化治疗 2 个月后, 新活动性肺结核患者表达 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞百分比显著降低, 与 Feruglio 等^[4] 研究结果相似。该研究发现治疗 2 周后表达 IFN- γ 的 T 细胞总数显著减少。这可能是痰抗酸杆菌转阴, 结核杆菌感染减少, 导致有菌免疫应答减弱所致。CD4⁺ T 细胞的主要效应功能是合成 IFN- γ 或其他细胞因子刺激巨噬细胞。来自 CD4⁺ T 细胞的 IFN- γ 直接增加 CD8⁺ T 细胞对结核杆菌感染的反应^[14]。CD8⁺ T 细胞本身也可产生 IFN- γ ^[15]。本研究中未发现治疗 2 个月后新活动性肺结核患者中表达 IFN- γ 的 CD8⁺ T 细胞百分比显著降低。这可能是由于 CD8⁺ T 细胞的免疫功能主要是细胞毒性细胞, 而不是 IFN- γ 分泌细胞。CD8⁺ T 细胞产生 IFN- γ 的

效应功能在肺结核中不是主要的。

本研究结果发现, 经过标准抗 TB 治疗 2 个月, 新活动性肺结核患者中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞百分比无明显减少, 但治疗后表达 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞百分比显著降低, 与国内多项研究结论相符^[16-19]。多项研究表明标准抗结核治疗后患者血清或脑脊液中 IFN- γ 显著降低^[16-20]。机体内多种可表达 IFN- γ , 因此患者血清 IFN- γ 水平受多种因素影响, 本研究仅纳入结核杆菌感染导致活动性肺结核患者, 尽量减少其他因素, 如感染、免疫缺陷等因素, 对血清 IFN- γ 表达水平的影响。监测表达 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞比仅检测血清或体液 IFN- γ 对于判断抗结核治疗后的疗效及免疫应答效应具有更佳临床运用价值。

本研究的不足: (1) 本研究纳入对象仅限于新诊断的活动性肺结核患者, 需要进一步监测肺外结核的结核患者中表达 IFN- γ 的 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的百分比; (2) 本研究仅研究全血样本中的表达 IFN- γ 的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞及血清 IFN- γ 的表达, 其他体液如痰、胸水中 IFN- γ 的表达未研究, 但其他研究中已有相关研究^[14-17]; (3) 由于临床资料的不齐全, 研究样本量较少, 本研究未比较表达 IFN- γ 的 CD4⁺ T 细胞与临床相关指标, 如患者症状的改善程度、胸部 CT 改变及血液学指标变化等的相关性。这是后续研究的方向之一。另外, 本研究纳入对象数量较少, 需要进一步扩大研究样本量, 提高研究的精准性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] 世界卫生组织. 2017 年全球结核病报告 [EB/OL]. Geneva: World Health Organization [2018-02-16]. <http://www.who.int/tb/en/>.

[2] Choi R, Jeong BH, Koh WJ, et al. Recommendations for optimizing tuberculosis treatment: therapeutic drug monitoring, pharmacogenetics, and nutritional status considerations [J]. *Ann Lab Med*, 2017, 37(2): 97-107. DOI: 10.3343/alm.2017.37.2.97.

[3] Heyckendorf J, van Leth F, Avsar K, et al. Treatment responses in multidrug-resistant tuberculosis in Germany [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2018, 22(4): 399-406. DOI: 10.5588/ijtld.17.0741.

[4] Feruglio SL, Tonby K, Kvale D, et al. Early dynamics of T cell cytokines and T regulatory cells in response to treatment of active *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Clin Exp Immunol*, 2015, 179(3): 454-465. DOI: 10.1111/cei.12468.

[5] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南 [J]. 中华

结核和呼吸杂志, 2001, 24(2): 70-74. DOI: 10.3760/j.issn:1001-0939.2001.02.002.

[6] Chae H, Shin SJ. Importance of differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* strains for understanding differences in their prevalence, treatment efficacy, and vaccine development [J]. *J Microbiol*, 2018, 56(5): 300-311. DOI: 10.1007/s12275-018-8041-3.

[7] Tonaco MM, Moreira JD, Nunes FFC, et al. Evaluation of profile and functionality of memory T cells in pulmonary tuberculosis [J]. *Immunol Lett*, 2017, 192: 52-60. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.10.014.

[8] Panteleev AV, Nikitina IY, Burmistrova IA, et al. Severe tuberculosis in Humans correlates best with neutrophil abundance and lymphocyte deficiency and does not correlate with antigen-specific CD4 T-cell response [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 963. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00963.

[9] Sakai S, Kauffman KD, Sallin MA, et al. CD4 T Cell-derived IFN- γ plays a minimal role in control of pulmonary *mycobacterium tuberculosis* infection and must be actively repressed by PD-1 to prevent lethal disease [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(5): e1005667. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005667.

[10] Wang F, Mao L, Hou H, et al. The source of *Mycobacterium tuberculosis*-specific IFN- γ production in peripheral blood mononuclear cells of TB patients [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 32: 39-45. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.01.012.

[11] Liang L, Shi R, Liu X, et al. Interferon-gamma response to the treatment of active pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2017, 21(10): 1145-1149. DOI: 10.5588/ijtld.16.0880.

[12] Guglielmetti L, Cazzadori A, Conti M, et al. Lymphocyte subpopulations in active tuberculosis: association with disease severity and the QFT-GIT assay [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2013, 17(6): 825-828. DOI: 10.5588/ijtld.12.0361.

[13] Nyendak MR, Park B, Null MD, et al. *Mycobacterium tuberculosis* specific CD8(+) T cells rapidly decline with antituberculosis treatment [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81564. DOI: 10.1371/journal.pone.0081564.

[14] Jiang H, Gong H, Zhang Q, et al. Decreased expression of perforin in CD8⁺ T lymphocytes in patients with *Mycobacterium tuberculosis* infection and its potential value as a marker for efficacy of treatment [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(5): 1353-1360. DOI: 10.21037/jtd.2017.05.74.

[15] Axelsson-Robertson R, Rao M, Loxton AG, et al. Frequency of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8⁺ T-cells in the course of anti-tuberculosis treatment [J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 32: 23-29. DOI: 10.1016/j.ijid.2015.01.017.

[16] 余美玲, 郭卉欣, 周琳, 等. 肺结核患者体内结核病相关免疫细胞因子的动态变化 [J]. *中华结核与呼吸杂志*, 2015, 30(8): 584-588. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2015.08.008.

[17] 时翠林, 徐俊驰, 陈兴年, 等. 中医艾灸配合抗结核药物对肺结

核患者的临床疗效及其对 γ -干扰素水平的影响[J]. 抗感染药
学, 2017, 14 (8): 1541-1543. DOI: 10. 13493/j. issn. 1672-
7878.2017.08-031.

[18] 杨陈一, 胡建超, 刘宇文, 等. 维生素 D 联合抗结核药物对老
年脊柱结核患者血清 IL-1 β 及干扰素 γ 水平的影响[J]. 现代
生物医学进展, 2017, 17 (9): 1707-1742. DOI: 10. 13241/j.
cnki. pmb. 2017. 09. 028.

[19] 张帅杰, 王满侠, 李晓玲, 等. 脑脊液白介素 8、干扰素 γ 水平

在结核性脑膜炎病程中的动态变化及意义[J]. 中国全科医
学, 2017, 20 (27): 3377-3381. DOI: 10. 3969/j. issn. 1007-
9572.2017.27.011.

[20] Zhang M, Xiong D, Li H, et al. Diagnostic value of T-Spot TB
combined with INF- γ and IL-27 in tuberculous pleurisy[J].
Exp Ther Med, 2018, 15 (2): 1871-1874. DOI: 10. 3892/etm.
2017.

(收稿日期: 2018-07-30)

· 简讯 ·

国际呼吸杂志第七届编辑委员会通讯编委名单

(按汉语拼音排序)

安 立	白 莉	卜小宁	蔡志刚	操 敏	曹 彬
曹国强	曹卫军	陈 娟	陈 沁	陈 燕	陈怀永
陈晓阳	陈效友	陈宇清	陈志华	陈智鸿	程齐俭
迟春花	崔朝勃	崔俊昌	邓朝胜	董 亮	董霄松
杜先智	杜媛鲲	段 争	段宪武	傅炜萍	高秀玲
关伟杰	管希周	郭丽萍	郭岩斐	郝创利	何志义
何忠明	胡 洁	胡国栋	胡晓芸	黄华琼	加孜那·托哈依
姜丽岩	蒋 萍	蒋进军	金建敏	李 靖	李 静
李满祥	李芹子	李润浦	李王平	李筱妍	李燕明
李玉苹	梁志欣	刘国梁	刘晓菊	刘先胜	刘 毅
龙怀聪	罗 群	罗 炜	孟 莹	母 双	穆德广
穆新林	倪松石	欧阳海峰	潘 珏	潘频华	潘文森
潘志杰	彭 丽	邱小建	邱忠民	曲仪庆	阙呈立
任 涛	任新玲	沈 宁	施举红	石志红	史凤颖
宋立强	宋 宁	苏莉莉	苏 欣	孙 兵	孙文青
谭 杰	汤 葳	唐小葵	田 庆	王 刚	王 嘉
王 伟	王 颖	王 臻	王东昌	王关嵩	王桂芳
王洪冰	王建春	王 凯	王鹏羽	魏春华	吴立平
吴尚洁	肖 奎	肖永龙	谢俊刚	谢永宏	徐金富
徐子平	薛 芳	颜伏归	杨 冬	杨 昆	杨华平
杨俊玲	杨媛华	姚 欣	姚小鹏	叶贤伟	印 洁
应颂敏	袁开芬	岳红梅	曾雪峰	翟振国	张 巧
张 嵩	张 新	张建全	张立强	张鹏俊	张淑香
张晓雷	张新日	张秀伟	张玉想	张子强	章 巍
赵 峰	赵海金	赵培革	赵铁梅	赵云霞	郑春燕
钟 旭	钟殿胜	周 建	周 敏	周林福	朱 红
朱 玲					