

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2013.05.002

· 论 著 ·

## 非耐药与耐多药肺结核患者外周血 T 淋巴细胞亚群及细胞因子的变化

何 纲<sup>1</sup>, 丁佩佩<sup>1</sup>, 甄沛林<sup>1</sup>, 李秀娟<sup>1</sup>, 伍金华<sup>1</sup>, 汤志强<sup>2</sup>, 胡长征<sup>1</sup>, 吴兴柳<sup>1</sup>, 陈晓华<sup>1</sup>

(1 江门市中心医院, 广东 江门 529030; 2 江门市结核病防治所, 广东 江门 529000)

**[摘要]** 目的 对非耐药(DS)及耐多药(MDR)肺结核患者外周血 T 淋巴细胞亚群及细胞因子的变化及意义进行探讨。方法 对某医院及某结核病防治所 2011 年 7 月—2012 年 7 月住院的肺结核患者(其中 DS 肺结核患者 20 例, MDR 肺结核患者 15 例)以及医院同期 26 例健康体检者(对照组)外周血的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群进行检测;同时检测外周血干扰素(IFN)- $\gamma$ 、白细胞介素(IL)-10,对 3 组数据进行比较。结果 DS 肺结核组、MDR 肺结核组及对照组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群的表达率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ );3 组患者 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞绝对值比较,差异有统计学意义( $P<0.01$ );各组间两两比较,差异亦有统计学意义( $P<0.05$ ),其中对照组 CD3<sup>+</sup> [(1 426  $\pm$  485)/ $\mu$ L]、CD4<sup>+</sup> [(825  $\pm$  306)/ $\mu$ L]、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞 [(516  $\pm$  213)/ $\mu$ L]绝对值最高,MDR 肺结核组最低[分别为(746  $\pm$  358)/ $\mu$ L、(461  $\pm$  204)/ $\mu$ L、(213  $\pm$  101)/ $\mu$ L]。3 组间 IFN- $\gamma$  浓度比较,差异有统计学意义( $P<0.01$ );各组间两两比较,差异亦有统计学意义( $P<0.05$ ),其中对照组浓度 [(65.04  $\pm$  36.31)pg/mL]最高,MDR 肺结核组 [(23.32  $\pm$  14.04)pg/mL]最低。3 组间 IL-10 浓度比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 人类痰菌阳性肺结核及 MDR 肺结核患者外周血 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞绝对值及血清 IFN- $\gamma$  有不同程度下降,其下降可能促进了结核病情进展,且可能为耐药肺结核形成的原因之一。

**[关键词]** 结核,肺; T 淋巴细胞亚群;  $\gamma$  干扰素; 白细胞介素-10; 抗药性,微生物

**[中图分类号]** R521 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2013)05-0326-04

## Change in peripheral blood T lymphocyte subsets and cytokines in patients with drug-sensitive and multidrug-resistant pulmonary tuberculosis

HE Gang<sup>1</sup>, DING Pei-pe<sup>1</sup>, ZHEN Pei-lin<sup>1</sup>, LI Xiu-juan<sup>1</sup>, WU Jin-hua<sup>1</sup>, TANG Zhi-qiang<sup>2</sup>, HU Chang-zheng<sup>1</sup>, WU Xing-liu<sup>1</sup>, CHEN Xiao-hua<sup>1</sup> (1 Jiangmen Central Hospital, Jiangmen 529030, China; 2 Jiangmen Tuberculosis Prevention and Control Institute, Jiangmen 529000 China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the changes and significance of T lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of patients with drug-sensitive and multidrug-resistant pulmonary tuberculosis (MDR pulmonary TB). **Methods** From July 2011 to July 2012, T lymphocyte subsets (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T) and cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-10) were detected in patients with drug-sensitive pulmonary TB (DS group, 20 cases), MDR pulmonary TB (MDR group, 15 cases) and healthy physical examination persons (control group, 26 cases) in a hospital, data of three groups were compared. **Results** No significant differences were found in percentages of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T among three groups ( $P>0.05$ ); there were significant differences in absolute counts of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> T among three groups ( $P<0.01$ ), and the difference between every two groups was also significant ( $P<0.05$ ), which was highest in control group (CD3<sup>+</sup> [1 426  $\pm$  485]/ $\mu$ L; CD4<sup>+</sup> [825  $\pm$  306]/ $\mu$ L; CD8<sup>+</sup> T [516  $\pm$  213]/ $\mu$ L) and lowest in MDR group (CD3<sup>+</sup> [746  $\pm$  358]/ $\mu$ L; CD4<sup>+</sup> [461  $\pm$  204]/ $\mu$ L; CD8<sup>+</sup> T [213  $\pm$  101]/ $\mu$ L). There were significant differences in IFN- $\gamma$  value among three groups ( $P<0.01$ ), and the difference between every two

[收稿日期] 2012-12-25

[基金项目] 广东省医学科研基金项目(B2011322)

[作者简介] 何纲(1978-),男(汉族),湖南省邵阳市人,副主任医师,主要从事感染病学研究。

[通讯作者] 何纲 E-mail:45833190@qq.com

groups was also significant ( $P < 0.05$ ), which was highest in control group ( $[65.04 \pm 36.31] \text{pg/mL}$ ) and lowest in MDR group ( $[23.32 \pm 14.04] \text{pg/mL}$ ). No significant differences were found in IL-10 among three groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The absolute counts of T lymphocyte subsets CD3+, CD4+, and CD8+ T as well as IFN- $\gamma$  declined in drug-sensitive pulmonary TB patients and MDR pulmonary TB patients, which may accelerate the progress of TB and be one of the causes of MDR pulmonary TB.

**[Key words]** tuberculosis, pulmonary; T-lymphocyte subset; interferon- $\gamma$ ; interleukin-10; drug resistance, microbial

[Chin Infect Control, 2013, 12(5):326-329]

结核病是全世界范围内最普遍的传染性疾病之一。尽管卡介苗疫苗普遍应用及化疗药物的有效性不断提高,但由于耐多药(multidrug-resistant, MDR)肺结核患者比率不断增加,故结核病仍是对人类威胁性很大的一种疾病。结核杆菌感染率很高,发病率却较低,因为结核病发生、发展和转归不仅与感染的细菌量及其毒力等因素有关,还与患者机体免疫功能有关。结核杆菌是胞内寄生菌,机体抗结核免疫主要是细胞免疫,决定细胞免疫强弱的主要是 T 淋巴细胞亚群数量、功能及其分泌的细胞因子。本研究拟对非耐药(drug-sensitive, DS)及 MDR 肺结核患者外周血 T 淋巴细胞亚群及细胞因子的变化及意义进行探讨。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 中山大学附属江门市中心医院及江门市结核病防治所 2011 年 7 月—2012 年 7 月住院的 DS 和 MDR 肺结核患者。DS 肺结核组:DS 肺结核患者 20 例,男性 14 例,女性 6 例;年龄 25~72 岁,平均( $45.72 \pm 17.01$ )岁;所有患者均符合以下 3 项标准:(1)X 线胸片或胸部 CT 考虑肺结核,且为初次治疗;(2)痰找抗酸杆菌阳性、痰结核分枝杆菌培养阳性;(3)结核菌药物敏感试验未发现耐药。MDR 肺结核组:MDR 肺结核患者 15 例,男性 10 例,女性 5 例;年龄 30~65 岁,平均( $49.28 \pm 17.73$ )岁;所有患者均符合以下 3 项标准:(1)痰结核分枝杆菌培养阳性;(2)结核菌药敏试验至少对利福平、异烟肼耐药;(3)X 线胸片或胸部 CT 考虑肺结核。对照组:江门市中心医院 2011 年 7 月—2012 年 7 月健康体检者 26 例,男性 16 例,女性 10 例;年龄 24~66 岁,平均( $45.50 \pm 16.38$ )岁;各项体检指标及胸片正常,身体健康。DS 与 MDR 肺结核组患者的排除标准:(1)伴有自身免疫性疾病;(2)合并恶性肿瘤;(3)合并其他慢性感染如慢性丙型肝炎、慢性

乙型肝炎、人免疫缺陷病毒(HIV)感染等;(4)合并糖尿病、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、支气管哮喘等慢性疾病;(5)妊娠及哺乳期妇女。所有研究对象均在采集标本前告知,并征得本人同意,研究方案取得医院伦理委员会批准。

**1.2 主要试剂与仪器** Anti-human CD3 PE-Cy5、Anti-human CD8a FITC 及 Anti-human CD4 FITC 均购自 eBioscience 公司;荧光微球:FLOW-COUNTM Fluorospheres 购自 Beckman Coulter 公司;Human IL-10 ELISA Kit 和 Human IFN-gamma ELISA Kit 试剂盒购自 MultiSciences 公司;Beckman Coulter Epics XL 型流式细胞仪为中山大学附属江门中心医院实验室提供。

**1.3 T 细胞亚群数量的检测** 采用流式细胞术检测 T 细胞亚群数量。无菌采集静脉血 2 mL,枸橼酸钠充分抗凝;流式专用管加入 100  $\mu\text{L}$  全血,各管均加入 10  $\mu\text{L}$  CD3-PECY-5、CD4-PE 及 CD8-ECD 荧光抗体,避光孵育 30 min;用 Q-PREP 配套溶血素溶血;加 100  $\mu\text{L}$  荧光微球轻轻混匀,立刻上流式细胞仪检测;应用 EXPO32ADC 软件对结果进行分析。

**1.4 血清干扰素(IFN)- $\gamma$  和白细胞介素(IL)-10 的检测** 用促凝管采空腹静脉血 2 mL,3 000 r/min,10 min 分离上清液,取足够上清液于离心管中,-70 $^{\circ}\text{C}$  保存备用,避免反复冻融。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测,操作步骤按照试剂盒说明进行。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析,采用 Mann-Whitney U 检验和 Kruskal-Wallis H 检验。

## 2 结果

**2.1 T 淋巴细胞亚群表达率及绝对值** DS 肺结核组、MDR 肺结核组及对照组 CD3+、CD4+、CD8+

T 淋巴细胞亚群的表达率比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 3 组患者 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞绝对值比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 各

组间两两比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中健康对照组 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞绝对值最高,MDR 肺结核组最低。见表 1。

表 1 3 组患者 T 淋巴细胞亚群表达率及绝对值比较

Table 1 Comparison of percentages and absolute counts of T lymphocyte subsets among three groups

Group	No. of cases	CD3 + (%)	CD4 + (%)	CD8 + (%)	CD3 + absolute count(/ $\mu$ L)	CD4 + absolute count(/ $\mu$ L)	CD8 + absolute count(/ $\mu$ L)
DS group	20	64.29 ± 11.26	39.26 ± 9.84	22.36 ± 8.26	876 ± 412*	564 ± 230*	283 ± 149*
MDR group	15	63.58 ± 10.86	40.55 ± 10.37	22.25 ± 7.65	746 ± 358**	461 ± 204**	213 ± 101**
Control group	26	67.65 ± 10.74	41.12 ± 10.36	23.64 ± 9.25	1 426 ± 485***	825 ± 306***	516 ± 213***
K-W <sup>2</sup>		1.002	0.552	0.456	13.149	12.253	12.315
P		>0.05	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

\* DS vs control group,  $P < 0.01$ ; \*\* DS vs MDR group,  $P < 0.05$ ; \*\*\* MDR vs control group,  $P < 0.01$

2.2 血清 IFN- $\gamma$  和 IL-10 浓度 DS 肺结核组、MDR 肺结核组及对照组血清 IFN- $\gamma$  浓度比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 各组间两两比较,差异亦有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中对照组浓度最高,MDR 肺结核组最低。3 组间 IL-10 浓度差异无统计学意义。见表 2。

表 2 3 组患者血清 IFN- $\gamma$  和 IL-10 浓度对比 (pg/mL)

Table 2 Comparison of IFN- $\gamma$  and IL-10 concentration among three groups (pg/mL)

Group	No. of cases	IFN- $\gamma$	IL-10
DS group	20	36.43 ± 20.41*	1.57 ± 1.89
MDR group	15	23.32 ± 14.04**	2.07 ± 2.51
Control group	26	65.04 ± 36.31***	1.19 ± 1.63
K-W <sup>2</sup>		17.22	1.061
P		0.000	0.588

\* DS vs control group,  $P < 0.01$ ; \*\* DS vs MDR group,  $P < 0.05$ ; \*\*\* MDR vs control group,  $P < 0.01$

### 3 讨论

T 淋巴细胞在结核病的免疫保护性反应中起着重要作用,CD4 + T 淋巴细胞通过激活效应细胞,以及使其他免疫细胞聚集于感染部位以增强宿主免疫反应,并可分泌多种细胞因子来发挥保护作用;而 CD8 + T 淋巴细胞更有可能对靶细胞产生细胞毒作用,也可产生少量 IFN- $\gamma$ <sup>[1-2]</sup>。作为一种特殊的细胞内慢性感染细菌,结核感染时,机体的免疫功能受损,与 T 细胞活化障碍和 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  的产生减少有关<sup>[3-5]</sup>。IFN- $\gamma$  可激活单核巨噬细胞,增加抗原递呈。促进 CD4 + T 细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)聚集于病变部位,在控制结核分枝杆菌感染中起着重要作用;而对于 Th2 型细胞因子

在肺结核中的作用尚有争论,因此,肺结核患者 T 淋巴细胞亚群与细胞因子的产生之间有何关系,值得进一步研究。

Rodrigues 等<sup>[6]</sup>检测肺结核患者 T 淋巴细胞表达率,认为外周血中 CD4 + T 淋巴细胞亚群表达率降低、CD8 + T 淋巴细胞表达率升高是结核病患者的重要免疫学特征,也是结核病发生的重要原因。但本组研究结果显示,DS 肺结核组、MDR 肺结核组及对照组 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞亚群的表达率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。由于 DS 肺结核、MDR 肺结核患者 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞绝对值同时降低,因此 3 组间 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞亚群的表达率没有统计学差异,提示检测肺结核患者 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞亚群的表达率意义不大。3 组患者 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞绝对值差异有统计学意义,其中健康对照组 CD3 +、CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞绝对值最高,MDR 肺结核组最低。管波清等<sup>[7]</sup>也发现结核患者的 CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞绝对值下降,与本研究结果相符。CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞是特异性介导结核菌免疫的细胞,其绝对值下降说明肺结核患者存在细胞免疫缺陷。有研究<sup>[8]</sup>发现 CD8 + T 淋巴细胞可以识别感染结核杆菌的巨噬细胞,杀死巨噬细胞内的结核杆菌。CD8 + T 淋巴细胞对于控制肺结核的进展同样有重要意义。

本研究发现,随着 DS 肺结核、MDR 肺结核患者 CD4 +、CD8 + T 淋巴细胞绝对值的下降,外周血 IFN- $\gamma$  也明显下降。国外有学者研究<sup>[9]</sup>发现,肺结核患者可分为高反应型和低反应型两类,高反应型患者病情较轻,IFN- $\gamma$  产生明显增加,而低反应型

患者病情较重,IFN- $\gamma$  产生减少。由于本研究中患者均为住院患者且痰结核菌阳性,考虑以低反应型患者为主,因此,IFN- $\gamma$  较健康对照组均明显下降,这也与国内的其他相关研究结果<sup>[10]</sup> 相符。结核感染时,IFN- $\gamma$  主要由活化的 CD4+ 及 CD8+ T 淋巴细胞产生<sup>[11]</sup>,所以结核感染时 CD4+、CD8+ T 淋巴细胞绝对值的下降可引起 IFN- $\gamma$  分泌减少,削弱了机体针对结核菌的细胞免疫,减少了 Th1 细胞因子的产生。因此,结核患者 CD4+、CD8+ T 淋巴细胞绝对值的下降与肺结核持续不愈相关。有研究<sup>[12]</sup> 发现,MDR 肺结核患者外周血 IL-2 较 DS 肺结核患者降低,认为细胞免疫功能低下及细胞因子网络紊乱可能也是导致患者耐药的原因之一,这与本研究结果相符。同时也提示 CD4+、CD8+ T 淋巴细胞绝对值及 IFN- $\gamma$  水平的下降可能也与 MDR 肺结核的发生相关。

本研究对 Th2 型细胞因子 IL-10 进行检测,发现各组间 IL-10 水平无明显变化。有研究<sup>[5]</sup> 认为,肺结核患者外周血单核细胞被结核分枝杆菌刺激后,Th1 型细胞因子如 IFN- $\gamma$  产生减少,基因表达下滑;而 Th2 型细胞因子,如 IL-10 分泌和基因表达无变化,提示结核患者 Th1 型细胞免疫应答受损,而 Th2 型细胞因子则影响不大。本研究结果也支持此观点。但有研究<sup>[13]</sup> 发现活动性肺结核患者外周血单核细胞产生的 IL-10 较对照组明显增高,认为 IL-10 是 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- $\gamma$  的强力抑制剂;也有研究<sup>[11]</sup> 发现 MDR 肺结核患者外周血单核细胞分泌 IL-10 较 DS 肺结核患者反而减少,与本研究不一致。

综上所述,本研究发现人类非耐药痰菌阳性肺结核及 MDR 肺结核患者外周血 CD3+、CD4+、CD8+ T 淋巴细胞绝对值及血清 IFN- $\gamma$  有不同程度下降,而其下降可能促进了结核病情进展,且可能为耐药肺结核形成的原因之一,尚有待进一步扩大样本量进行证实。

## [参 考 文 献]

[1] Lazatevic V, Nolt D, Flynn J L. Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune response[J]. J Immunol, 2005, 175(2): 1107 - 1117.

[2] De la Barrera S, Aleman M, Musella R, et al. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on *Mycobacterium tuberculosis*-pulse macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients [J]. Clin Exp Immunol, 2004, 138(1): 128 - 138.

[3] Desvignes L, Ernst J D. Interferon-gamma-responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Immunity, 2009, 31(6): 974 - 985.

[4] Kaufmann S H, Hengartner M O. Programmed cell death: a live and well in the new millennium [J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(12): 526 - 534.

[5] Zhang M, Lin Y, Iyer D V, et al. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 1995, 63(8): 3231 - 3234.

[6] Rodrigues D S, Medeiros E A, Weckx L Y, et al. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease [J]. Clin Exp Immunol, 2002, 128(1): 149 - 154.

[7] 管波清, 林羽, 吴启秋, 等. 初治骨关节结核患者外周血 T 细胞亚群特点及临床意义 [J]. 中华骨科杂志, 2007, 27(4): 287 - 291.

[8] 吴守芝, 宋俊峰. 结核分枝杆菌致病机制及免疫 [J]. 中华结核与呼吸病杂志, 2003, 26(2): 112 - 113.

[9] Quiroga M F, Pasquinelli V, Martinez G J, et al. Inducible costimulator: a modulator of IFN- $\gamma$  production in human tuberculosis [J]. J Immunol, 2006, 176(10): 5965 - 5974.

[10] 张贤兰, 吕江青, 林兆原, 等. 肺结核患者 CD4+ T 淋巴细胞凋亡及相关细胞因子水平变化 [J]. 广东医学, 2008, 29(10): 1664 - 1666.

[11] Kaufmann S H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? [J]. Nat Rev Immunol, 2001, 1(1): 20 - 30.

[12] Tan Q, Xie W P, Min R, et al. Characterization of Th1- and Th2-type immune response in human multidrug-resistant tuberculosis [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(6): 1233 - 1242.

[13] Torres M, Herrera T, Villareal H, et al. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 1998, 66(1): 176 - 180.