论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1234-03

活动性肺结核患者血清炎性因子变化特点及与免疫状态的关系

陈 志,林明贵,梁建琴,王金河 (解放军总院第二附属医院全军结核病防治中心,北京 100091)

提 要:目的 探讨活动性结核患者血清炎性因子水平特征及与患者免疫状态的关系。**方法** 选择2003年2月至2005年10月本科住院的结核患者97例,其中活动型结核患者57例,静止期患者40例,对照组为41例健康成年体检者。ELISA法及碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶(APAAP)法检测活动性肺结核患者血清中炎性因子水平(TNF-α、IL-1和IL-6)及相关细胞免疫指标(CD_4、CD_8、CD_4/CD_8)的变化。**结果** 正常对照组IL-1、IL-6、TNF-α水平分别为(15.3±1.3)、(80.5±7.3)、(77.2±9.8)ng/ml,活动性结核组为(33.7±3.6)、(293.6±30.5)和(190.7±25.2)ng/ml,显著高于正常对照组和静止性结核组。活动性结核组患者外周血CD_4比例及CD_4/CD_8比值为(32.3±2.9)%和(0.83±0.17),显著低于正常对照组。**结论** 炎性因子水平增高及免疫功能下降是活动型结核患者的临床特点之一,两者呈反向依赖关系。

关键词:结核;炎性因子;免疫

中图法分类号:R392.11;R446.62;R521.02 **文献标识码**:A

Relationship of inflammatory factors in blood serum and immune status of patients with active pulmonary tuberculosis

CHEN Zhi, LIN Ming-gui, LIANG Jian-qin, WANG Jin-he (Anti-tuberculosis Center of PLA, The Second Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of inflammatory factors in the blood serum and their relationship with the immune status of patients with active pulmonary tuberculosis (TB). Methods A total of 97 cases of pulmonary tuberculosis were included from Feb 2003 to Oct 2005, 57 of active TB, 40 in resting period. Another 41 healthy people were used as normal control. ELISA and APAAP method were used to detect the level of TNF-α, IL-1, IL-6 and the changes of CD_4, CD_8 and CD_4/CD_8. Results The levels of IL-1, IL-6, TNF-α were (15.3±1.3), (80.5±7.3) and (77.2±9.8) ng/ml in the normal controls, (33.7±3.6), (293.6±30.5) and (190.7±25.2) in the patients of active TB, and (18.2±2.1), (130.7±14.5), (87.5±10.2) ng/ml in the patients at resting period, which were highest in the patients of active TB. The ratio of CD_4 and CD_4/CD_8 was (32.3±2.9)% and (0.83±0.17) in the patients of active TB, lower than (48.2±4.4)% and (0.83±0.17) of normal controls. Conclusion The increase of inflammatory factors and decrease of immune activity were the clinical characteristic of patients with active pulmonary tuberculosis, which are of inverse relationship.

Key words: tuberculosis; inflammatory factor; immune

结核是威胁人类健康的重要疾病之一。据WHO统计,目前全世界每年结核发病率以大于1%的速度增长,即全世界每年有800万的新增结核病例,而每年有200万人直接死于结核病[1,2]。结核发病率的增加除与现在流行的结核菌株抗菌性增加有关外,对结核感染机制的认识还有待进一步的深化,特别是对活动性结核患者全身炎性因子水平变化需要深入认识。现有研究证实,罹患结核后患者主要产生由T淋巴细胞介导的细胞免疫反应,多种细胞因子参与了该过程。在结核活动状态下,患者的全身免疫水平较正常有何变化也值得进行详细的探讨[3]。目前研究认为,结核病的发生发展和转归及药物疗效在一定程度上取决于结核病患者自身免疫功能。但是,目前对该方面的认识尚不深入。本研究即利用双抗体夹心ELISA法和

作者简介:陈 志(1977-),男,贵州省贵阳市人,医师,主要从事肺结核治疗及机制方面的研究。电话:(010)85146615, E-mail:czcz2002@sohu.com

收稿日期:2006-01-24;修回日期:2006-03-29

碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶（APAAP）法检测活动性肺结核患者血清中炎性因子水平（TNF-α、IL-1 和 IL-6）及相关细胞免疫指标（CD_4、CD_8、CD_4/CD_8）的变化，为更好的认识和治疗肺结核提供依据。

1　资料与方法

1.1　一般资料

选择 2003 年 2 月至 2005 年 10 月在我院结核科住院的结核患者 97 例，其中活动性结核患者 57 例，静止期患者 40 例，对照组为 41 例健康成年体检者。活动性结核组 57 例均为痰结核分枝杆菌涂片及培养阳性患者，其中男性 36 例，女性 21 例，年龄 17～63（37.5±15.4）岁。该组患者符合以下条件：①连续 3 份痰标本涂片镜检抗酸杆菌阳性；②符合活动性肺结核病变的胸部 X 线片表现；③临床具有结核中毒症状；④排除其他非结核性肺部疾患。静止性结核组 40 例患者均为痰结核分枝杆菌涂片及培养阴性患者，其中男性 25 例，女性 15 例，年龄 20～66（42.3±16.2）岁。该组患者较活动性结核组具有以下特点：无结核中毒症状，胸片主要表现为纤维条索、结节等，PPD 试验小于 5 mm。正常对照组选择健康体检者 41 例，男性 21 例，女性 20 例，年龄 17～63（39.5±15.6）岁，X 线检查未发现肺部阴影。以上 3 组患者均无免疫缺陷病史及临床表现。

1.2　血样采集

采集所有受试对象空腹静脉血 10 ml，立即取 3 ml 行细胞免疫功能检查，剩余部分进行 3 000 r/min 高速离心后取上清，分装后 -20 ℃保存待测。

1.3　炎性因子检测

IL-1、IL-6、TNF-α 检测试剂盒购自深圳晶美生物工程公司，采用双抗体夹心 ELISA 法检测。具体过程如下：取包被有抗 IL-1、IL-6、TNF-α 单克隆抗体微量反应板条，各孔分别加入经倍比稀释配制而成的系列浓度的人 IL-1、IL-6、TNF-α 标准液、复溶的血清标本各 100 μl，封闭板条 37 ℃孵箱孵育 3 h，洗涤 4 次。各孔（空白孔除外）加入 100 μl 生物素 IL-1、IL-6、TNF-α 单克隆抗体工作液，封闭条板，37 ℃孵箱孵育 60 min，洗涤 4 次。在各孔（空白孔除外）加入 100 μl 亲合素-酶工作液，37 ℃孵育 30 min，洗涤 4 次。在所有孔内都加入 100 μl 显色剂，避光 37 ℃显色 15 min，则可见反应孔内溶液呈现深浅各异的蓝色。在所有孔内都加入 100 μl 终止液，混匀后即用 Labsystems 酶标仪在 450 nm 处测定各孔溶液的吸光度值，酶标仪内计算机自动读取并显示标准曲线上与各吸光度相对应的浓度数值，即为标本中待测细胞因子的浓度。

1.4　全身细胞免疫功能检查

T 淋巴细胞亚群测定（CD_4、CD_8、CD_4/CD_8）采用碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶（APAAP）法，试剂盒由中山生物技术有限公司提供。取肝素抗凝血 3 ml，以 Ficoll 密度梯度分离单个核细胞，洗涤后调细胞密度至 4×10^6～5×10^6/ml，制片，干燥，丙酮-甲醛固定，加 CD 系列特异性抗体，4 ℃湿盒孵育，TBS 充分洗涤后加 APAAP（1∶1 000），室温 30 min，冲洗后加桥抗及 APAAP 各 2 次，每次湿盒室温作用 10 min，冲洗后底物显色 10～15 min，苏木精复染，光镜下计数 200 个细胞，计算阳性细胞率。

1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　血清 TNF-α、IL-1、IL-6 测定结果

活动性结核组患者 IL-1、IL-6、TNF-α 水平分别为（33.7±3.6）、（293.6±30.5）、（190.7±25.2）ng/ml，显著高于正常对照组和静止性结核组（$P<0.01$），见表 1。

表 1　各组血清 TNF-α、IL-1、IL-6 测定结果（ρ_B/ng·ml^{-1}）

组别	IL-1	IL-6	TNF-α
正常对照组	15.3±1.3	80.5±7.3	77.2±9.8
静止性结核组	18.2±2.1	130.7±14.5	87.5±10.2
活动性结核组	33.7±3.6^{ab}	293.6±30.5^{ab}	190.7±25.2^{ab}

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与静止性结核组比较

2.2　细胞免疫学指标检测结果

活动性结核组患者外周血 CD_4 比例及 CD_4/CD_8 值为（32.3±2.9）%和（0.83±0.17），显著低于正常对照组（$P<0.01$）。静止性结核组 CD_4/CD_8 较正常对照组低（$P<0.01$），较活动性结核组高（$P<0.01$）。结果见表 2。

表 2　各组外周血 CD_4、CD_8 比例及 CD_4/CD_8 值

组别	CD_4（%）	CD_8（%）	CD_4/CD_8
正常对照组	48.2±4.4	30.4±3.8	1.61±0.22
静止性结核组	42.5±4.1^a	36.3±3.1^a	1.22±0.19^a
活动性结核组	32.3±2.9^a	38.3±4.0^a	0.83±0.17^a

a：$P<0.01$，与对照组比较

2.3　活动性结核组模拟治疗好转血清炎性因子及细胞免疫学指标变化趋势

按活动性结核治疗好转趋势（活动-静止期-正常）作血清炎性因子及 CD_4/CD_8 值趋势图，可见随治疗的好转，炎性因子 IL-1、IL-6、TNF-α 水平趋降，CD_4/CD_8 值趋升，两者呈反向关系。

3　讨论

活动性肺结核患者是结核传播的重要传染源之一，通过支气管肺泡灌洗液检出抗酸杆菌，或支气管或肺部组织经病理检查证实结核性改变可确诊。其辅助性的指标有结核菌素皮肤试验、血清抗结核抗体检测、痰结核分枝杆菌 PCR 加探针检测、肺外组织病理检查证实结核病变等[4]。因此，活动性结核相对容易确诊。中国疾病预防控制中心 2005 年的调查认为中国

内地现有活动性肺结核患者450万，特别是有临床症状的患者，其治疗是不容乐观的。

本试验中，活动性结核患者血清中TNF-α、IL-1、IL-6的水平较正常对照组均显著增高，说明炎性因子的变化是活动性结核患者全身特征之一。有研究表明，机体特定细胞受到刺激信号及损伤因素的影响可以很迅速地释放TNF-α，TNF-α继而可激活其他炎性因子，导致瀑布效应，吸引更多的炎症应激细胞聚集在局部，通过促进黏附分子表达等多种手段，促进巨噬细胞活化，增强其吞噬作用[5,6]，达到抵抗结核分枝杆菌感染的作用。IL-1是由单核巨噬细胞产生的，IL-6由T淋巴细胞和单核巨噬细胞等所产生，两者均具有广泛的生物学活性，对结核病患者既可产生有害影响，又能发挥保护作用[7,8]。有学者发现在肺结核患者支气管肺泡灌洗液中3种炎性因子的水平也较高，而且与结核的活动性有关，结合本试验的结果可以认为，活动性肺结核患者肺泡炎症可激活结核炎症局部多种炎性细胞尤其是肺泡巨噬细胞，使之释放TNF-α，导致IL-1、IL-6增多，促进肉芽肿形成，并有助于控制结核分枝杆菌感染。本试验结果表明患者血清种3种炎性因子较正常对照组高，与文献[9]报道结果一致。有研究结果提示，结核病变程度越重，局部的TNF-α、IL-1、IL-6水平越高，提示对炎性因子的监控有助于判断病情。

本研究结果显示，活动性肺结核患者血清TNF-α、IL-1、IL-6水平均明显高于非活动性肺结核和正常对照组，提示三者均参与结核病的免疫发病过程，其表达失调可能是结核病发生发展的一个重要因素。感染结核后患者免疫力低下，单纯结核菌感染者，只有5%～10%发展为活动性结核病，细胞免疫有防御结核病的作用，CD_4^+细胞在结核病免疫中发挥主导作用，活动性结核患者机体CD_4^+细胞明显减少，对结核菌的杀伤作用显著下降，导致结核菌大量繁殖而发生结核病[10]。有研究表明，机体免疫功能抑制时，结核症状将出现进一步改变，CD_4^+细胞计数$>300/mm^3$，肺结核呈典型改变。CD_4^+细胞计数$<300/mm^3$，病变呈播散型，播及两肺或其他器官，有的呈进行性，原发性肺结核，肺门淋巴结肿大，肺间质浸润或肺下叶浸润。当CD_4^+细胞计数$<200/mm^3$时，4%的患者发生菌血症。当CD_4^+细胞计数$<100/mm^3$时，49%的患者发生菌血症[11]。

以上研究表明，免疫状态高低在结核患者的发展及传播中起重要作用，免疫指标也是结核病治疗的监测指标之一。

参考文献：

[1] HEO J N, CHOI Y W, JEON S C, *et al*. Pulmonary tuberculosis: another disease showing clusters of small nodules[J]. AJR Am J Roentgenol, 2005, 184(2): 639-642.

[2] ISMAIL Y. Pulmonary tuberculosis—a review of clinical features and diagnosis in 232 cases [J]. Med J Malaysia, 2004, 59(1): 56-64.

[3] CACCAMO N, MERAVIGLIA S, DIELI F, *et al*. Th0 to Th1 switch of CD4 T cell clones specific from the 16-kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis after successful therapy: lack of involvement of epitope repertoire and HLA-DR[J]. Immunol Lett, 2005, 98(2): 253-258.

[4] JO E K, PARK J K, DOCKRELL H M. Dynamics of cytokine generation in patients with active pulmonary tuberculosis [J]. Curr Opin Infect Dis, 2003, 16(3): 205-210.

[5] HERNANDEZ-PANDO R, AGUILAR D, HERNANDEZ M L, *et al*. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis[J]. Eur J Immunol, 2004, 34(1): 174-183.

[6] MAYORDOMO L, MARENCO J L, GOMEZ MATEOS J, *et al*. Pulmonary miliary tuberculosis in a patient with anti-TNF-alpha treatment [J]. Scand J Rheumatol, 2002, 31(1): 44-45.

[7] BULUT Y, FAURE E, THOMAS L, *et al*. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and Borrelia burgdorferi outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling[J]. J Immunol, 2001, 167(2): 987-994.

[8] VAN-LETTOW M, WEST C E, VAN-DER-MEER J W, *et al*. Low plasma selenium concentrations, high plasma human immunodeficiency virus load and high interleukin-6 concentrations are risk factors associated with anemia in adults presenting with pulmonary tuberculosis in Zomba district, Malawi[J]. Eur J Clin Nutr, 2005, 59(4): 526-532.

[9] RIBERIO-RODRIGUES R, RESENDE-CO T, JOHNSON J L, *et al*. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(4): 818-823.

[10] TESFA L, KOCH F W, PANKOW W, *et al*. Confirmation of Mycobacterium tuberculosis infection by flow cytometry after *ex vivo* incubation of peripheral blood T cells with an ESAT-6-derived peptide pool [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2004, 60(1): 47-53.

[11] WOLDAY D, TEGBARU B, KASSU A, *et al*. Expression of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 on CD4$^+$ T cells and plasma chemokine levels during treatment of active tuberculosis in HIV-1-coinfected patients[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005, 39(3): 265-271.

（编辑 陈聪连）