文章编号:1000-5404(2008)18-1749-04

论著

结核性及恶性肿瘤性胸腔积液淋巴细胞亚群比例以及 Th1/Th2 免疫平衡研究

凡瞿明[1],张国元[1], 刘剑平[1],严明生[2],刘彦华[3],唐 中[1],何 兰[1] ([1]川北医学院附属医院检验科,四川 南充 637000;[2]四川省遂宁市人民医院检验科,四川 遂宁 629000;[3]成都医学院医学检验系,成都 610083)

摘 要:目的 探讨 Th1/Th2 免疫应答平衡在结核性和恶性肿瘤性胸腔积液病理生理过程中的可能作用。**方法** 对 24 例治疗前结核性胸腔积液以及 28 例患者恶性胸腔积液患者胸液标本进行有核细胞计数、分类和流式细胞仪检测淋巴细胞亚群,检测 $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$、$CD3^+CD8^+$ T 淋巴细胞亚群比例,并计算 $CD4^+/CD8^+$ 值;利用夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测胸液标本中 INF-γ、IL-18、TNF-α 以及 IL-10 的浓度。**结果** 结核性胸腔积液患者胸水中 T 辅助淋巴细胞以 $CD3^+CD4^+$ 细胞为主,其 $CD3^+$ 细胞比例、$CD3^+CD4^+$ 细胞比例以及 $CD4^+/CD8^+$ 值均高于恶性肿瘤性胸腔积液组($P<0.01$)。2 组研究对象 INF-γ、IL-18、TNF-α 以及 IL-10 的浓度分别是(中位数):结核性胸腔积液组 942.0、1 526、62 pg/ml 和 153 pg/ml;恶性胸腔积液组 10.35、1 763、8.85 pg/ml 和 66.85 pg/ml。结核性胸腔积液中 INF-γ、TNF-α 以及 IL-10 均明显高于恶性肿瘤性胸腔积液中的水平($P<0.01$),且平均分别高约 90 倍、7 倍和 2 倍。IL-18 在 2 组胸腔积液中的含量无显著性差异($P>0.05$)。结核性胸腔积液 IL-18/IL-10 明显低于恶性肿瘤性胸腔积液组($P<0.01$)。**结论** 结核性胸腔积液表现为 Th1 免疫应答为主;而恶性肿瘤性胸腔积液患者存在明显的细胞免疫功能低下。这种低下可能主要以 T 辅助淋巴细胞受损、Thl 免疫应答降低以及 Th2 免疫应答升高为主。IFN-γ 可作为鉴别结核性胸腔积液和恶性肿瘤性胸腔积液特异性和敏感度较高的指标。

关键词: 结核性胸腔积液;恶性肿瘤性胸腔积液;1 型辅助性 T 淋巴细胞;2 型辅助性 T 淋巴细胞;细胞因子
中图法分类号: R392.3;R520.2;R561.302 **文献标识码:** A

Proportion of leukomonocyte subgroup and T-helper type 1/T-helper type 2 balance in tuberculous pleural effusion and malignant pleural effusion

FAN Qu-ming[1], ZHANG Guo-yuan[1], LIU Jian-ping[1], YAN Ming-sheng[2], LIU Yan-hua[3], TANG Zhong[1], HE Lan[1] ([1]Department of Medical Laboratory, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, [2]Department of Medical Laboratory, Suining People's Hospital, Suining 629000, Sichuan, [3]Department of Medical Laboratory, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

Abstract: Objective To investigate the possible role of T-helper type 1/T-helper type 2 balance in the pathogenesis of human tuberculous and malignant pleurisy by examining the proportion of T leukomonocyte subgroup: $CD3^+$, $CD3^+$ $CD4^+$, $CD3^+$ $CD8^+$ and evaluating the distribution features of Th1-type cytokines (INF-γ, IL-18 and TNF-α) and Th2-type cytokine (IL-10) in tuberculous pleural effusion (TPE) and malignant pleural effusion (MPE). **Methods** Twenty-four samples of tuberculous pleural effusion and 28 samples of malignant pleural effusion were collected and detected the karyocyte cell counting, classification, proportion of T leukomonocyte subgroup $CD3^+$, $CD3^+$ $CD4^+$, $CD3^+$ $CD8^+$ and the ratio of $CD4^+/CD8^+$. Simultaneously, the concentrations of INF-γ, IL-18, TNF-α and IL-10 were measured with ELISA before treatment. **Results** The proportion of $CD3^+$, $CD3^+$ $CD4^+$ or $CD4^+/CD8^+$ in TPE was significantly higher than that in MPE. The median concentrations of INF-γ, IL-18, TNF-α and IL-10 in pleural effusion were 942.0, 1 526, 62 pg/ml and 153 pg/ml in TPE, and 10.35, 1 763, 8.85 pg/ml and 66.85 pg/ml in MPE respectively. The levels of INF-γ, TNF-α and IL-10 in TPE were significantly higher (about 90-fold, 7-fold and 2-fold respectively) than that in MPE ($P<0.01$). However, no significant difference of IL-18 was found between the two kinds of pleural effusions ($P>0.05$). The ratio of IL-18 to IL-10 in TPE was markedly lower than that in MPE ($P<0.01$).

作者简介: 凡瞿明,男,四川省广元市人,主管技师,主要从事临床免疫方面的研究。电话:(0817)2262208,E-mail:fanqum@163.com
通信作者: 刘剑平,电话:(0817)2796818,E-mail:ljpbr@sina.com
收稿日期: 2008-03-17;**修回日期:** 2008-05-16

Conclusion Tuberculous pleural effusion presents a process with Th1-dominant pathogenesis. Malignant pleural effusion presents impaired T help leukomonocytes, Th2-dominant pathogenesis and depressed Th1 immune response, which may contribute to the low cellular immunity in the patients with malignant pleural effusion. INF-γ might be an available indicator to distinguish tuberculous pleural effusion from malignant pleural effusion with high specificity and sensitivity.

Key words: tuberculous pleural effusion; malignant pleural effusion; T-helper lymphocyte type-1; T-helper lymphocyte type-2; cytokines

结核性胸膜炎和恶性肿瘤性疾病是引起胸腔积液的两大主要疾病。目前认为,结核性胸腔积液中的辅助性T淋巴细胞(CD4$^+$细胞)前体细胞更易于向1型辅助性T淋巴细胞(T helper lymphocyte type-1,Th1)方向分化并产生Th1型细胞因子,如干扰素-γ(interferon-gamma, INF-γ)、白细胞介素-18(interlukin-18, IL-18)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)等[1]。而恶性肿瘤性胸腔积液中的CD4$^+$细胞前体细胞则主要分化为2型辅助性T淋巴细胞(T helper lymphocyte type-2,Th2)[2]。上述研究均提示结核性和恶性肿瘤性胸腔积液中的T淋巴细胞亚群的比例和数量以及Th1/Th2细胞因子的免疫平衡状况可能影响相关胸膜病变的病理生理进程,故阐述胸腔积液中免疫细胞及其主要细胞因子的表达状况及其对疾病发展过程的影响具有重要临床指导意义。本研究拟通过检测结核性和恶性肿瘤性胸腔积液中T淋巴细胞亚群的比例,初步探讨结核性和恶性肿瘤性胸腔积液病理生理过程中的Th1/Th2免疫平衡状态。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2006年5月至2007年11月川北医学院附属医院52例胸腔积液住院患者,其中结核性胸腔积液组(tuberculous pleural effusion group, TPEG)24例,男性10例,女性14例,年龄(33.3±9.9)岁。结核性渗出性胸膜炎的诊断标准:①有结核中毒症状;②伴有肺部结核病灶;③胸腔积液为渗出性改变;④抗结核治疗2~4周有效且胸腔积液吸收快;⑤痰涂片或痰培养找到结核杆菌;⑥胸腔积液中找到抗酸杆菌;⑦胸膜活组织检查病理有典型的结核性肉芽肿改变。所有病例符合上述3项或3项以上的诊断标准。恶性肿瘤性胸腔积液组(malignant pleural effusion group, MPEG)28例,男性12例,女性16例,年龄(63.3±9.9)岁,原发肿瘤均经病理活检证实且胸水细胞学检查发现恶性细胞,其中肺癌胸膜转移13例,乳腺癌胸膜转移1例。

所有受试者血清抗人类获得性免疫缺陷病毒(HIV)抗体阴性,且无免疫缺陷的病史和临床表现。研究得到当地卫生部门伦理委员会同意,所有研究对象签署知情同意书。2组研究对象性别构成无显著差异($\chi^2=0.1009$, $P>0.05$)。

1.2 样本采集以及检测方法

1.2.1 样本采集 所有患者均在入院后3 d内、治疗前抽胸水5 ml放入EDTA抗凝试管内,混匀后4 ℃ 375×g离心5 min后取上清液分管分装,置-30 ℃冰箱保存待测各种细胞因子。一次性解冻并测量完成所用样品。

1.2.2 细胞计数 同时离心后的细胞悬液用于有核细胞计数、分类和流式细胞仪检测T淋巴细胞亚群,包括CD3$^+$、CD3$^+$CD4$^+$、CD3$^+$CD8$^+$ T淋巴细胞亚群比例,并计算CD4$^+$/CD8$^+$比值。

1.2.3 细胞因子测定 采用双抗体夹心ELISA法分别测定结核性胸腔积液和恶性肿瘤性胸腔积液中INF-γ与IL-18(DIACLONE Research),TNF-α(DPC,USA),IL-10(MARKET INC,USA)浓度。

1.2.4 质量控制 各检测指标的组内和组间变异系数均小于10%。

1.3 统计学分析

采用SAS 8.1软件,各组检测指标若为正态分布,则以$\bar{x}\pm s$形式表示;偏态分布则以中位数(四分位间距)即M(Q1,Q3)形式表示。进行组间各指标差异的比较时,若各指标总体均数均为正态分布且方差齐同,则用完全随机设计资料的单因素方差分析;否则采用Wilcoxon秩和检验进行组间比较。

2 结果

2.1 两组胸腔积液中细胞总数和分类

结核性胸腔积液患者胸水中的细胞总数较高,以淋巴细胞为主,其他还有中性粒细胞、巨噬细胞和间皮细胞等。恶性肿瘤性胸腔积液组患者胸水中细胞总数相对较少,以淋巴细胞和巨噬细胞为主,28例均发现肿瘤细胞,从而确定为恶性肿瘤性胸腔积液。与恶性肿瘤性胸腔积液相比,结核性胸水中细胞总数、淋巴细胞比例、中性粒细胞比例显著高于癌性胸水($P<0.01$),而巨噬细胞比例则明显低于癌性胸水($P<0.01$)。见表1。

表1 两组患者胸腔积液中细胞总数及分类比例($\bar{x}\pm s$)

组别	n	细胞总数(×10^9/L)	细胞分类(%)				
			淋巴细胞	中性粒细胞	巨噬细胞	间皮细胞	肿瘤细胞
结核性胸腔积液组	24	3.89±0.34[a]	79.8±4.9[a]	11.3±0.4[a]	4.9±0.2[a]	4.0±0.9	0
恶性肿瘤性胸腔积液组	28	1.55±0.31	40.2±5.7	5.5±0.7	43.7±3.6	3.8±0.4	6.8±1.1

a: $P<0.01$,与恶性肿瘤性胸腔积液组比较

表 2　两组胸腔积液淋巴细胞总数以及 T 淋巴细胞亚群检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	淋巴细胞总数($\times 10^9$/L)	$CD3^+$细胞(%)	$CD3^+CD4^+$细胞(%)	$CD3^+CD8^+$细胞(%)	$CD4^+/CD8^+$比值
结核性胸腔积液组	24	3.10 ± 0.46[a]	71.6 ± 2.1[a]	50.4 ± 3.1[a]	20.2 ± 2.3	1.9 ± 0.09[a]
恶性肿瘤性胸腔积液组	28	0.62 ± 0.21	45.9 ± 3.5	20.2 ± 2.9	23.1 ± 1.8	0.98 ± 0.07

a：$P<0.01$,与恶性肿瘤性胸腔积液组比较

表 3　各组胸腔积液中细胞因子浓度的比较[m(Q_1, Q_3)]

组别	n	INF-γ(pg/ml)	IL-18(pg/ml)	TNF-α(pg/ml)	IL-10(pg/ml)	IL-18/IL-10
结核性胸腔积液组	24	942.0(865.2,967.0)[a]	1 526 (1 143.5, 1 905)	62(44.05,103.9)[a]	153(18.75,229.15)[a]	10.1 (5.6, 35.2)[a]
恶性肿瘤性胸腔积液组	28	10.35(9.40,12.10)	1 763(1 202,2 079)	8.85(0,16.9)	66.85(11.1,198)	26.4 (10.7, 69.1)

a：$P<0.01$,与恶性肿瘤性胸腔积液组比较

2.2　两组胸腔积液中 T 淋巴细胞亚群检测结果

结核性胸腔积液患者胸水中 T 淋巴细胞以 $CD3^+CD4^+$细胞为主,且 $CD3^+$细胞比例、$CD3^+CD4^+$细胞比例以及 $CD4^+/CD8^+$比值均高于癌性胸腔积液组,差异有统计学意义($P<0.01$)。$CD3^+CD8^+$细胞在结核性胸腔积液和恶性肿瘤性胸腔积液患者中没有显著性差异($P>0.05$)。见表 2。

2.3　两组胸腔积液中 INF-γ、IL-18 、TNF-α 以及 IL-10 浓度

结核性胸腔积液中 INF-γ、TNF-α 以及 IL-10 均明显高于恶性肿瘤性胸腔积液中的水平($P<0.01$),且平均分别高约 90 倍、7 倍和 2 倍;IL-18 在两组胸腔积液中的含量无显著性差异($P>0.05$);结核性胸腔积液组 IL-18/IL-10 值则明显低于恶性肿瘤性胸腔积液组($P<0.01$)。见表 3。

3　讨论

结核性胸腔积液的宿主防御机制中,辅助性 T 淋巴细胞亚群 $CD4^+$具有重要作用。在离体实验中,若 PPD (purified protein derivative of tuberculin)为刺激物,则能使结核性胸腔积液中的淋巴细胞产生高浓度 INF-γ,而结核性胸腔积液中增多的 $CD4^+$T 细胞被认为是积液中高浓度 INF-γ 的主要来源。与临床研究[3]相似,本研究结果显示结核性胸腔积液中 IFN-γ 水平显著高于恶性肿瘤性胸腔积液,并且结核性胸腔积液的淋巴细胞以 $CD4^+$细胞为主,表明体内 $CD4^+$T 细胞处于激活状态并且结核性胸膜炎的局部免疫反应非常活跃。本研究表明,结核性胸膜炎中以 T 淋巴细胞($CD3^+$)为主,这与结核是 T 细胞介导的局部细胞免疫应答和致病性发生的机制一致。

与结核性胸膜炎不同,恶性肿瘤引起的胸腔积液主要与继发的胸膜反应以及癌细胞转移伴随的淋巴细胞在局部的堆积有关。本研究表明,肿瘤患者胸腔积液中的 $CD4^+$细胞明显低于结核性胸腔积液患者,所以尽管抑制性 T 淋巴细胞($CD8^+$)在两组间无显著性差异,恶性肿瘤性胸腔积液组仍出现 $CD4^+/CD8^+$比例倒置,表明恶性肿瘤性胸腔积液患者其细胞免疫功能失去平衡,而主要以辅助性 T 淋巴细胞受到损伤为主。本研究结果表明恶性肿瘤性胸腔积液的 IFN-γ 远远低于结核性胸腔积液,提示恶性肿瘤性胸腔积液局部辅助性 T 淋巴细胞的损伤主要表现为 Thl 免疫应答降低,与文献[4]报道一致。$CD8^+$细胞主要抑制机体的免疫功能,与肿瘤的发生、发展和转移密切相关。恶性肿瘤性胸腔积液患者肿瘤细胞负荷增加,分泌免疫抑制因子增多,在抑制 T 淋巴细胞增殖、分化过程中造成 $CD4^+/CD8^+$细胞水平的增、减,以有利于肿瘤在宿主的转移。因此,我们的研究提示 $CD4^+/CD8^+$比值是反映细胞免疫平衡状态的敏感性指标。

胸腔积液主要由结核性胸膜炎和恶性肿瘤性胸膜疾病所致,由于胸水中的结核杆菌和癌细胞的检出率低,结核性胸水和癌性胸水的鉴别是临床上常遇到的问题。Okamoto 等[5]的研究结果也表明 IFN-γ 及其诱导产生的细胞因子 IL-12、IL-18 等在结核性胸腔积液中显著升高,认为可作为诊断结核性胸腔积液的重要指标。我们的研究也提示结核性胸腔积液中 IFN-γ 的浓度远高于恶性癌肿性胸腔积液,亦提示该细胞因子可以作为结核性胸腔积液诊断的重要指标,但其诊断界值以及诊断的敏感度和特异度还需要在更大的研究样本中予以确定。

TNF-α 是一种可参与多种生理、病理免疫过程的细胞因子,主要表现为抗肿瘤、免疫调节、介导炎症反应等活性。国外研究认为,结核性胸腔积液 TNF-α 浓度明显高于其他原因引起的胸腔积液,而以恶性肿瘤性胸腔积液为最低,我们的研究结果与之类似。同研究[6]结果相同,在结核性胸膜炎时,胸腔 TNF-α 浓度明显增高的原因,推测可能是由于胸膜间皮和巨噬细胞受到结核杆菌细胞壁成份的刺激,致局部分泌增高所致。

IL-18 是新近发现的一种典型的 Th1 类细胞因子,具有强大的诱生 IFN-γ 能力。关于 IL-18 在结核性胸腔积液和恶性肿瘤性胸腔积液的水平变化的临床研究

还相对较少。Okamoto 等[5]研究发现,不仅是 IFN-γ 本身,包括与 IFN-γ 密切相关的 IL-12、IL-18 等 Th1 细胞因子,在结核性胸腔积液中的浓度都要高于在恶性肿瘤性胸腔积液中的浓度。但是 Hiraki 等[7]则认为,在结核性胸膜炎中,仅 IFN-γ 才有比较高的诊断结核性胸膜炎的特异度和敏感度。而本研究表明,结核性胸腔积液中 IL-18 的浓度并不比恶性肿瘤性胸腔积液的 IL-18 的浓度高,这除了与细胞因子之间复杂的相互作用有关外,还可能与疾病的不同发展阶段有关。另外,也可能各受试者对结核分枝杆菌或 PPD 的 Thl 或 Th2 免疫应答本身就有较大的个体差异。

IL-10 属于免疫抑制性细胞因子。研究表明,不管是恶性肿瘤性胸腔积液,还是结核性胸腔积液,其胸膜腔局部的 Th2 免疫应答均有所加强[8]。但是本研究表明,结核性胸腔积液中的 IL-10 明显高于恶性肿瘤性胸腔积液,并且 IL-18/IL-10 值则明显低于恶性肿瘤性胸腔积液组,提示恶性肿瘤性胸腔积液胸膜局部的 Th2 免疫应答明显强于结核性胸腔积液。

总的来说,我们的临床资料分析提示结核性胸腔积液表现为以 Th1 免疫应答为主;而恶性肿瘤性胸腔积液患者存在明显的细胞免疫功能低下,这种低下主要以 T 辅助淋巴细胞受损、Thl 免疫应答降低以及 Th2 免疫应答升高为主。T 淋巴细胞亚群的测定对恶性肿瘤性胸腔积液的诊断及疗效评估有一定价值,IFN-γ 可作为鉴别结核性胸腔积液和恶性肿瘤性胸腔积液特异性和敏感度较高的指标。

参考文献:

[1] Hiraki A, Aoe K, Matsuo K, *et al*. Simultaneous measurement of T-helper 1 cytokines in tuberculous pleural effusion[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7(12): 1172 - 1177.

[2] Oshikawa K, Yanagisawa K, Ohno S, *et al*. Expression of ST2 in helper T lymphocytes of malignant pleural effusions[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(7): 1005 - 1009.

[3] Okamoto M, Hasegawa Y, Hara T, *et al*. T-helper type 1/T-helper type 2 balance in malignant pleural effusions compared to tuberculous pleural effusions[J]. Chest, 2005, 128(6): 4030 - 4035.

[4] Xue K, Xiong S, Xiong W. Clinical value of vascular endothelial growth factor combined with interferon-gamma in diagnosing malignant pleural effusion and tuberculous pleural effusion[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2007, 27(5): 495 - 497.

[5] Okamoto M, Kawabe T, Iwasaki Y, *et al*. Evaluation of interferon-gamma, interferon-gamma-inducing cytokines, and interferon-gamma-inducible chemokines in tuberculous pleural effusions[J]. J Lab Clin Med, 2005, 145(2): 88 - 93.

[6] Kiropoulos T S, Kostikas K, Oikonomidi S, *et al*. Acute phase markers for the differentiation of infectious and malignant pleural effusions[J]. Respir Med, 2007, 101(5): 910 - 918.

[7] Hiraki A, Aoe K, Eda R, *et al*. Comparison of six biological markers for the diagnosis of tuberculous pleuritis[J]. Chest, 2004, 125(3): 987 - 989.

[8] Sikora J J, Dworacki G T, Kaczmarek M T, *et al*. Immunosuppressive mechanisms in the microenvironment of malignant pleural effusions[J]. Cancer Detect Prev, 2004, 28(5): 325 - 330.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)18-1752-01

两性霉素 B 脂质体雾化吸入治疗肺曲菌病 19 例

郭 琼 (重庆市中山医院呼吸内科,重庆 400012)

两性霉素 B 对绝大部分真菌感染有效,且耐药菌株少见,价格较低,这使其得以在临床应用 40 多年仍显示出很高的实用价值,但因其明显的肾毒性和输注相关性毒性(如发热、寒战、恶心等),推广应用受到了很大限制[1]。为降低不良反应,国外近年来开发了 3 种脂质体剂型:两性霉素 B 脂质体、两性霉素 B 脂质体复合物和两性霉素 B 胶体分散剂[2]。我科于 2003 年 5 月至 2007 年 12 月应用两性霉素 B 脂质体(商品名为锋克松)治疗肺曲菌病,尤其用其雾化吸入治疗肺曲菌病取得了满意效果,现报告如下。

作者简介:郭 琼,女,重庆市人,主管护师,主要从事内科疾病护理方面的研究。电话:(023)66628283,E-mail: cqppyx_ys@sina.com

收稿日期:2008-07-16;修回日期:2008-07-22

1 资料与方法

1.1 临床资料

2003 年 5 月至 2007 年 12 月我科共收治了 19 例肺曲菌病患者,男性 13 例,女性 6 例,年龄 39 ~ 78 岁,其中,曲菌球 8 例,变态反应性曲菌病 4 例,由肺结核、肺癌、重症肺部感染、糖尿病等引起继发性曲菌病 7 例。

1.2 仪器

德国百瑞公司 PARI 压缩型空气雾化吸入器。

1.3 方法

两性霉素 B 脂质体无菌冻干制剂(上海新先锋药业有限公司,10 mg/支)5 mg 加入 5% 葡萄糖盐水 10 ml 中完全溶解后雾化吸入,15 ~ 20 min/次,每日 2 次,15 d 为一疗程。

(下转 1769 页)