

肺结核合并慢性乙型肝炎患者 T 淋巴细胞免疫应答研究

郭皓宇¹, 刘洪波², 张成国¹

(1 长沙市中心医院, 湖南 长沙 410004; 2 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的** 研究结核合并慢性乙型肝炎(乙肝)患者血清中 Th1 型细胞的细胞因子水平变化以及 Th1、Th2 的表达水平及意义。**方法** 对 21 例肺结核并乙肝表面抗原(HBsAg)阳性患者、30 例单纯肺结核患者及 30 例健康对照者,应用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定其血清中肿瘤坏死因子(TNF)- α 、干扰素(IFN)- γ 、白细胞介素(IL)-12 水平;运用流式细胞术检测外周血中 CD4+T 淋巴细胞及细胞内 Th1、Th2 的表达水平。**结果** 单纯肺结核及肺结核并 HBsAg 阳性组 TNF- α 水平均显著高于健康对照组(均 $P < 0.01$);单纯肺结核组 IFN- γ 、IL-12 水平均显著低于健康对照组(均 $P < 0.05$),而肺结核并 HBsAg 阳性组 IFN- γ 、IL-12 水平均显著低于单纯肺结核组(均 $P < 0.01$)。单纯肺结核组外周血 CD4+T 淋巴细胞及细胞内 Th1 表达水平均显著低于健康对照组(分别 $P < 0.05, P < 0.01$);细胞内 Th2 表达水平显著高于健康对照组($P < 0.05$)。肺结核并 HBsAg 阳性组 CD4+T 淋巴细胞及细胞内 Th1 表达水平显著低于单纯肺结核组(分别 $P < 0.05, P < 0.01$)。**结论** 肺结核患者存在细胞内 Th1 反应减弱, Th2 反应增强;而肺结核合并慢性乙肝的患者则进一步致细胞内 Th1 反应减弱, Th2 反应增强。

[关键词] 结核, 肺; 肝炎, 乙型, 慢性; T 淋巴细胞; 免疫应答

[中图分类号] R521 R512.6+2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)01-0019-04

Immune response of T lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis combined with chronic hepatitis B

GUO Hao-yu¹, LIU Hong-bo², ZHANG Cheng-guo¹ (1 Changsha Central Hospital, Changsha 410004, China; 2 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To study the serum levels of Th1 lymphocyte factor and the expression pattern of Th1 and Th2 in patients with pulmonary tuberculosis (PT) combined with chronic hepatitis B (CHB). **Methods** Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-12 (IL-12) in 21 patients with PT combined with positive HBsAg, 30 simple PT patients and 30 healthy controls were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); and the expression pattern of CD4+T lymphocytes, Th1 and Th2 cells in peripheral blood were detected by flow cytometry. **Results** The serum levels of TNF- α in patients with simple PT and PT co-infected with CHB were both higher than that in healthy group (both $P < 0.01$); the serum levels of IFN- γ and IL-12 in patients with simple PT were both lower than that in healthy group (both $P < 0.05$); the serum levels of IFN- γ and IL-12 in patients with PT co-infected with CHB were both lower than that in simple PT patients (both $P < 0.01$). The expression of CD4+T lymphocytes and Th1 cells in simple PT patients were significantly lower than that in healthy group ($P < 0.05, P < 0.01$); The expression of Th2 cells in simple PT patients was significantly higher than that in healthy group ($P < 0.05$); The expression of CD4+T lymphocytes and Th1 cells in PT co-infected with CHB patients were significantly lower than that in simple PT patients ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion** Patients with PT showed lower expression of Th1 and higher expression of Th2; patients with PT co-infected with CHB showed further lower expression of Th1 and higher expression of Th2.

[Key words] tuberculosis, pulmonary; hepatitis B, chronic; T lymphocytes; immune response

[Chin Infect Control, 2010, 9(1): 19-21, 24]

[收稿日期] 2009-09-08

[作者简介] 郭皓宇(1972-), 男(汉族), 湖南省沅江市人, 医师, 主要从事病毒性肝炎临床研究。

[通讯作者] 郭皓宇 E-mail: guohaoyuzc@live.cn

在我国,结核病与慢性乙型肝炎(乙肝)是很常见的两种传染病,临床上也不乏见到结核病合并慢性乙肝的患者。在发病机制上,两者有一些共同点:都是细胞免疫在其中起决定性作用,两种疾病的发生、发展与 T 细胞亚群(Th1/Th2)的失调有密切关系;都有一些共同的关键细胞因子参与,如肿瘤坏死因子(TNF)- α 、干扰素(IFN)- γ 、白细胞介素(IL)-12 等。笔者对结核病合并慢性乙肝患者的上述几种细胞因子的变化作了一定研究,并运用流式细胞术对此类患者的 CD4 + T 淋巴细胞和分别以细胞内 IFN- γ 、IL-4 表达为代表的 Th1、Th2 水平进行研究,从几个方面探讨两种疾病的免疫机制,从而为临床上此类患者的免疫治疗提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2007 年 12 月—2009 年 1 月间住院的痰涂片阳性肺结核患者 51 例,均符合中国肺结核诊断标准^[1];其中 21 例患者为肺结核合并乙肝表面抗原(HBsAg)阳性者[其中 4 例乙肝病毒(HBV)DNA>1.0 \times 10⁴拷贝/mL,表明 HBV 复制活跃],另 30 例为单纯肺结核患者。30 名健康对照者为性别、年龄相当的健康体检者。30 例单纯肺结核患者中,男性 18 例,女性 12 例,年龄 23~67 岁;21 例肺结核并 HBsAg 阳性患者,男性 14 例,女性 7 例,年龄 21~58 岁;30 名健康对照者,男性 16 例,女性 14 例,年龄 22~60 岁。

1.2 方法

1.2.1 血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-12 测定 采用酶联免疫吸附试验(ELISA),试剂盒购于上海森雄实业有限公司,操作步骤按试剂盒说明进行。

1.2.2 流式细胞术

1.2.2.1 试剂与仪器 药品和试剂淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司,批号 20010315)、PBS(pH 7.2)、RPMI-1640 培养基(GIBCO)、新生牛血清(杭州四季青生物技术公司)、佛波醇乙酯(Phorbol 12-Myristate 13Acetate,PMA,美国 Sigma 公司)、DMSO(常州市科丰化工有限公司)、离子霉素(Ionomycin,美国 Sigma 公司)、莫能霉素 Monensin(美国 Sigma 公司)。FACsort 流式细胞仪(美国 Becton Dickson 公司),试剂:鼠抗人单克隆抗体(PE-anti-IL-2、PE-anti-IFN- γ ,美国 BD PharMingen 公司),FITC-anti-IL-4、FITC-anti-IL-10、Percp-anti-CD3、FITC-anti-CD8、PE-anti-

CD8、PE-anti-CD4 抗体及 Percp-同型对照、FITC-同型对照、PE-同型对照(法国 Immunotech 公司)。

1.2.2.2 实验方法及过程 各组均采外周静脉血 5 mL,用肝素抗凝,PBS 1:1 体积稀释全血,充分混匀,淋巴细胞分离液分离单个核细胞,PBS 液洗涤 1 次,离心 10 min(1 500 r/min),弃上清液后用 RPMI-1640 培养基洗涤 1 次,离心 10 min(2 000 r/min),将细胞数调至 2.5~10 个/mL,以 IL-2 和血清 IFN- γ 作为 Th1 细胞因子,IL-4、IL-10 作为 Th2 细胞因子,测定 CD4、Th1 及 Th2 细胞。CD4 阳性细胞相对数 = 经处理样本的 CD4 阳性细胞数 / 对照样本 CD4 阳性细胞数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件包进行统计学分析,两组计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-12 水平 肺结核并 HBsAg 阳性、单纯肺结核及健康对照组 TNF- α 、IFN- γ 、IL-12 水平见表 1。单纯肺结核与肺结核并 HBsAg 阳性组之间 TNF- α 水平差异无显著性($t = 1.07, P > 0.05$),但均显著高于健康对照组(t 分别为 5.05、3.32,均 $P < 0.01$);单纯肺结核组 IFN- γ 、IL-12 水平均显著低于健康对照组(t 分别为 2.27、2.12,均 $P < 0.05$);而肺结核并 HBsAg 阳性组 IFN- γ 、IL-12 水平均显著低于单纯肺结核组(t 分别为 2.89、3.49,均 $P < 0.01$)。

表 1 各组血清 TNF- α 、IFN- γ 、IL-12 水平值(ng/L)

Table 1 Serum values of TNF- α , IFN- γ and IL-12 in each group (ng/L)

组别	TNF- α	IFN- γ	IL-12
肺结核并 HBsAg 阳性	36.13 \pm 10.04	33.24 \pm 7.71	32.73 \pm 9.26
单纯肺结核	39.05 \pm 9.27	41.53 \pm 11.42	43.55 \pm 14.23
健康对照	27.56 \pm 8.32	49.08 \pm 14.15	52.07 \pm 16.71

2.2 各组血清 T 淋巴细胞亚群水平 见表 2。单纯肺结核组外周血 CD4 + T 淋巴细胞及细胞内 Th1 表达水平显著低于健康对照组(分别 $t = 2.33, P < 0.05$; $t = 3.92, P < 0.01$),细胞内 Th2 表达水平显著高于健康对照组($t = 2.11, P < 0.05$);肺结核并 HBsAg 阳性组 CD4 + T 淋巴细胞及细胞内 Th1 表达水平显著低于单纯肺结核组(分别 $t = 2.74, P < 0.05$; $t = 3.58, P < 0.01$),而细胞内 Th2 表达水平

与单纯肺结核组的差异无显著性 ($t = 1.91, P > 0.05$)。

表 2 各组血清 CD4+ T 淋巴细胞和 Th1、Th2 水平(%)

Table 2 Serum values of CD4+ T and Th1 and Th2 in each group (%)

组别	CD4+	Th1	Th2
肺结核并 HBsAg 阳性	24.66 ± 4.03	11.29 ± 2.66	20.22 ± 2.49
单纯肺结核	29.34 ± 7.02	14.26 ± 3.07	18.56 ± 3.38
健康对照	33.97 ± 8.29	18.17 ± 4.51	16.83 ± 2.96

3 讨论

结核病与慢性乙肝是常见的危害甚大的两种传染病,而临床上结核病合并慢性乙肝的患者也不乏存在。结核病和慢性乙肝的发病机制中,免疫机制都占据着关键地位。一方面,结核杆菌的免疫原性诱发机体产生 2 种免疫应答反应,即细胞免疫和迟发型变态反应,导致结核病的发生;另一方面,HBV 本身并不会对肝脏细胞造成损伤,它也是通过免疫机制造成急性或慢性肝炎,免疫应答在乙肝发病机制中起重要作用。

人体内的免疫可分为体液免疫和细胞免疫两大类,而结核病与慢性乙肝起病的免疫机制中都是细胞免疫起决定性作用。介导免疫的 T 淋巴细胞依其分泌细胞因子的不同而分为 Th1/Th2 细胞,Th1 型细胞促进细胞免疫,Th2 型细胞抑制细胞免疫^[2]。

结核杆菌是胞内寄生菌,机体抗结核免疫主要是细胞免疫,而决定细胞免疫强弱的主要是 T 淋巴细胞亚群数量及功能。在 T 淋巴细胞亚群中,CD4+ T 细胞是机体针对结核杆菌的细胞免疫应答中的主要细胞。CD4+ T 细胞诱导细胞免疫应答,对于抑制结核杆菌的感染必不可少^[3]。而 CD8+ T 细胞在调节免疫,发挥细胞毒作用,溶解受感染后失去免疫活性的靶细胞,使之凋亡及在促使结核菌暴露、病灶清除等方面都有重要作用^[4]。

由 HBV 诱发的细胞免疫反应有 3 个方面:T 细胞介导的免疫、抗体依赖性细胞毒以及自然杀伤细胞,以 T 细胞介导的免疫最重要。乙肝患者体内存在明显的细胞免疫功能紊乱,T 细胞活化障碍,并与肝病的慢性化有关^[5]。HBV 感染后常导致 Th1/Th2 细胞之间的不平衡,表现为不同的细胞因子水平差异及机体对抗原的不应答性。有文献报道^[6],慢性乙肝患者体内 Th1 型细胞因子升高而 Th2 型细胞因子水平降低,提示 Th1 受抑制而以 Th2 应答

为主。

Th1 细胞免疫应答低下是结核病的免疫学特征。本研究所探讨的 3 种细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-12 都是由 Th1 细胞分泌的。本研究结果显示,在单患结核病(菌阳)的患者血清中,TNF- α 的水平一般有所升高;而 IFN- γ 、IL-12 的水平值一般有所下降,这与已有文献报道的结果^[6-7]相一致。本研究进一步探讨的内容是:在结核病合并慢性乙肝的患者中,这几种细胞因子的值会有怎样的变化。结果表明,单患结核病患者与结核病合并慢性乙肝的患者比较,后者血清中的 TNF- α 水平与前者差异无显著性 ($P > 0.05$);但 IFN- γ 、IL-12 的水平较前者有进一步的降低,且差异有显著性 ($P < 0.05$)。

再者,本研究对外周血中 CD4+ T 淋巴细胞及细胞内 Th1、Th2 的表达水平进行了检测。结果表明,痰菌阳性肺结核患者外周血 CD4+ T 淋巴细胞显著低于健康对照组,且 Th1 水平降低,而 Th2 水平高于健康对照组。说明肺结核患者存在 Th1/Th2 失调,表现为 Th1 低下,Th2 优势表达。这与已有报道^[6-7]相符。在慢性乙肝患者,HBV 也通过抑制人体的细胞免疫,助病毒形成持续感染^[8];而结核病患者,在结核杆菌产生的复杂的免疫抑制因子作用下,机体出现继发细胞免疫缺陷。肺结核合并慢性乙肝患者的 CD4+ T 淋巴细胞及细胞内 Th1 表达水平低于单患肺结核患者(细胞内 Th2 表达水平差异无显著性),表明与后者相比,前者机体的 Th1 反应进一步低下,这说明结核杆菌与 HBV 对人体的细胞免疫功能可能产生联合的抑制作用。

研究结核病合并慢性乙肝患者的免疫机制,具有一定的实践意义。对结核病合并慢性乙肝患者,使用药物对细胞因子网络进行干预,促进机体免疫重建,可能有助于提高治愈率。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部. 肺结核诊断标准[S]. 北京, 2008.
- [2] 魏海明, 刘杰, 田志刚, 等. 检测 Th1/Th2 亚群的临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 1998, 21(1): 56.
- [3] 高维新, 潘春莹, 徐勇胜, 等. 结核感染儿童 T 细胞亚群测定的意义[J]. 天津医药, 2005, 33(3): 141.
- [4] 雷建平. 正确认识 CD8 细胞在结核病免疫治疗效果评价中的意义[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(2): 112-113.
- [5] 王克霞, 朱玉霞, 许礼发, 等. 乙肝病人外周血 T 细胞亚群和 mIL-2R 表达水平的研究[J]. 中国基层医药, 2002, 9(7): 589-591.

报道^[9]显示,如果样品被及时检测,灵敏度可以从 91.2% 增加到 97.4% 或 99.6%。因上述 HIV 感染者的标本采集后未立即检测,可能会因储存时间的延长而导致假阴性结果的出现。此外,由于部分被收集标本的患者系住院者,一些药物(利尿剂等)的消耗,大量液体的摄入,尿样收集之间的时间间隔,都可以影响尿液检测 HIV-1 抗体的结果^[7]。对照组中出现 1 例假阳性,国内论文辉等^[7]的报道中同样出现过,哈佛大学医学院医疗中心的学者认为其原因与“区室作用”有关^[10],目前原因和原理仍在探讨中。

ELISA 法、蛋白印迹法一直被国际上公认为是检测 HIV 抗体的金标准,但由于蛋白印迹试验检测成本高,而且对实验条件、实验技术等要求都很高,检测所需时间也很长,受检者难以及时得到检测结果,这样使有效预防与控制艾滋病的传播在很大程度上受到限制。有学者认为^[11],用 2 种 ELISA 试剂替代蛋白印迹法对高危人群的疫情监测有一定的实际意义。张洪花等^[12]对其检测结果分析发现,ELISA 和胶体硒法检测同时阳性者,在其免疫印迹阳性组符合率为 100%。因此,笔者认为对于 ELISA 初筛光密度稍高于临界值,胶体硒检测阴性的受检者,如果尿 HIV-1 抗体检测阴性,能否不需要进行蛋白印迹法确认,即可确定无 HIV 感染,值得进一步观察。本次检测中,1 例 ELISA 检测光密度值稍高于临界值,胶体硒法复查阴性,尿 HIV-1 抗体检测阴性,送 CDC 确认亦为阴性。

尽管本次检测结果表明尿检 HIV-1 抗体的灵敏性不及血液标本,但在实际应用中还具有其自身优势:(1)尿液不同于血液,HIV 感染者的尿液中仅含有 HIV 抗体,不含有病毒本身,因此不通过尿液传染,可以安全地收集和运输;(2)无针头采集尿液标本时不会引起皮肤损伤,消除了医务人员职业暴露的风险;(3)尿液标本的采集是非创伤性的,这样

可以提高被检测者的依从性,特别有利于对高危人群 HIV 感染情况的检测和筛查。

总之,随着尿液 HIV-1 抗体试剂的不断更新,其敏感性、特异性的不断提高,尿液检测技术的不断完善,其临床实际应用的价值会越来越受到重视。

[参 考 文 献]

- [1] 陈立力,赖章丽. 人类免疫缺陷病毒实验室检测的研究进展[J]. 实用医学杂志,2008,24(21):3625-3626.
- [2] 魏民. HIV 实验室检测研究进展和发展趋势[J]. 国外医学病毒学分册,2003,10(3):65-69.
- [3] 赵立庆,雷素萍,李连学,等. ELISA 法检测尿液中 HIV-1 抗体的研究分析[J]. 中国艾滋病性病,2003,9(5):276-277,269.
- [4] 戴建平,李庆华,覃绍莹,等. 203 名吸毒人员血液和尿液 HIV 抗体检测结果对比分析[J]. 中国艾滋病性病,2003,10(9):278-279.
- [5] 万卓越,周海,赵茜茜,等. 人血液和尿液样本 HIV-1 抗体的 ELISA 检测比较[J]. 华南预防医学,2002,28(1):25-26.
- [6] 刘中夫,李志军,刘世亮,等. 在吸毒人群中应用 ELISA 检测尿液及血液标本中 HIV-1 抗体结果分析[J]. 中国性病艾滋病防治,2001,7(1):35-36.
- [7] 论文辉,李莉,黄钦,等. ELISA 检测 HIV 感染者尿液标本中抗 HIV-1 抗体结果分析[J]. 中国性病艾滋病防治,2001,7(1):32-34.
- [8] Tiensiwakul P. Urinary HIV-1 antibody patterns by western blot assay[J]. Clin Lab Sci,1998,11(6):336-338.
- [9] Almeda J, Casabona J, Matas I, et al. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for HIV screening in urine[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2004,23(11):831-835.
- [10] 纪秋宇,何小维,罗志刚. 尿液 HIV-1 抗体检测技术[J]. 卫生研究,2008,7(4):511-514.
- [11] 马义才,秦光明,郑国英,等. 两种不同初筛酶联免疫吸附试验试剂联合检测替代艾滋病病毒抗体蛋白印迹试验确认检测的对比分析[J]. 中国性病艾滋病防治,2002,8(6):335-336.
- [12] 张洪花,史晓燕,赵国有. ELISA、胶体硒和免疫印迹检测 HIV 抗体结果分析[J]. 中国病原生物学杂志,2006,1(5):338-340.

(上接第 21 页)

- [6] Wang L, Cai Y, Cheng Q, et al. Imbalance of Th1/Th2 cytokines in patients with pulmonary tuberculosis[J]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi,2002,25(9):535-537.
- [7] Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, et al. Dynamic changes in pro-and anti-inflammatory cytokine profiles and gamma interferon receptor signaling integrity correlate with

tuberculosis disease activity and response to curative treatment [J]. Infect Immun,2007,75(2):820-829.

- [8] 李志群,朱思和,陈焕永,等. 乙型肝炎患者血清中肿瘤坏死因子、 γ 干扰素及白介素-12 检测结果[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(5):603-604.