

非耐药和耐多药肺结核患者外周血 T 淋巴细胞亚群动态变化及临床意义[△]

高瑜^{1*}, 仵倩红¹, 胡萍¹, 王立², 郭乐^{3#} (1. 陕西省结核病防治院/陕西省第五人民医院内四科, 西安 710100; 2. 陕西省结核病防治院/陕西省第五人民医院影像中心, 西安 710100; 3. 陕西省结核病防治院/陕西省第五人民医院内五科, 西安 710100)

中图分类号 R978.3 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)06-0661-04

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.06.006

摘要 目的:探讨非耐药和耐多药肺结核患者外周血 T 淋巴细胞亚群动态变化及临床意义。方法:选取 2020 年 1 月至 2021 年 6 月该院收治的 97 例肺结核患者为研究对象,均进行耐药性检测,根据检测结果将患者分为耐多药组和非耐多药组,两组患者均检测并对比外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和外周血 Th1、Th2、Th17 细胞亚群水平。耐多药组和非耐多药组患者均进行抗结核治疗 3 个月,评价抗结核治疗效果并复查外周血 T 淋巴细胞亚群水平。结果:治疗前,耐多药组患者外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平显著低于非耐多药组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组患者 CD8⁺ 水平比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 耐多药组患者外周血 Th1、Th2 水平显著低于非耐多药组,外周血 Th17 水平显著高于非耐多药组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。非耐多药组患者抗结核治疗预后良好率为 77.59% (45/58),显著高于耐多药组的 35.90% (14/39),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与治疗前比较,非耐多药组患者治疗后 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平均显著升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而耐多药组患者治疗后 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 水平与本组治疗前比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与治疗前比较,非耐多药组患者治疗后 Th1、Th2 水平显著升高,Th17 水平显著降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而耐药性组患者治疗后 Th1、Th2 和 Th17 水平与本组治疗前比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论:肺结核患者存在明显的免疫功能受损状态,且耐多药肺结核患者的免疫功能受损状态更严重;结核分枝杆菌的耐药性会影响肺结核患者体内的免疫功能及抗结核治疗效果。

关键词 肺结核; 耐药性; T 淋巴细胞亚群

Dynamic Changes and Clinical Significance of Peripheral Blood T Lymphocyte Subsets in Patients with Non-Drug-Resistant and Multi-Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis[△]

GAO Yu¹, WU Qianhong¹, HU Ping¹, WANG Li², GUO Le³ (1. Dept. of Internal Medicine, Shaanxi Provincial Tuberculosis Prevention and Control Institute/the Fifth People's Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710100, China; 2. Image Center, Shaanxi Provincial Tuberculosis Prevention and Control Institute/the Fifth People's Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710100, China; 3. Dept. of Internal Medicine, Shaanxi Provincial Tuberculosis Prevention and Control Institute/the Fifth People's Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the dynamic changes and clinical significance of peripheral blood T lymphocyte subsets in patients with non-drug-resistant and multi-drug-resistant pulmonary tuberculosis. **METHODS:** Totally 97 patients with pulmonary tuberculosis admitted into the hospital from Jan. 2020 to Jun. 2021 were extracted as the research objects. All patients were tested for drug resistance. According to the results, all patients were divided into multi-drug resistance group and non-drug resistance group. Peripheral blood T lymphocyte CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ ratio and peripheral blood Th1, Th2, Th17 cell subsets were detected and compared between two groups. Both the multi-drug-resistance group and the non-drug-resistance group received anti-tuberculosis treatment for 3 months, and the anti-tuberculosis treatment effect was evaluated and the levels of peripheral blood T lymphocyte subsets were re-examined. **RESULTS:** Before treatment, the peripheral blood T lymphocyte CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ ratio in the multi-drug-resistance group was significantly lower than that in the non-drug-resistance group, with statistically significant difference ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the level of CD8⁺ between two groups ($P > 0.05$). Peripheral blood Th1 and Th2 in the multi-drug-resistance group were significantly lower than

△ 基金项目:陕西省重点研发计划项目 (No. 2020SF-105)

* 副主任医师。研究方向:结核病的诊断与治疗。E-mail:gao137206@163.com

通信作者:主治医师。研究方向:耐多药肺结核。E-mail:40199027@qq.com

those in the non-drug-resistance group, and peripheral blood Th17 was significantly higher than that in the non-drug-resistance group, with statistically significant difference ($P < 0.05$). The good prognosis rate of non-drug-resistance group was 77.59% (45/58), significantly higher than that of multi-drug-resistance group (35.90%, 14/39), the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with before treatment, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$ ratio in non-drug-resistance group increased significantly after treatment, with statistically significant difference ($P < 0.05$). There were no significant differences in $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$ ratio in the multi-drug-resistance group after treatment compared with those before treatment ($P > 0.05$). Compared with before treatment, Th1 and Th2 in non-drug-resistance group increased significantly and Th17 decreased significantly after treatment, with statistically significant difference ($P < 0.05$). However, there were no significant differences in Th1, Th2 and Th17 in the multi-drug-resistance group after treatment compared with those before treatment ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: Patients with pulmonary tuberculosis have significantly impaired immune status, which is more severe in patients with multi-drug-resistant pulmonary tuberculosis; drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* affects the immune status and the efficacy of anti-tuberculosis treatment in patients with pulmonary tuberculosis.

KEYWORDS Pulmonary tuberculosis; Drug resistance; T lymphocyte subsets

随着国家对肺结核的管控,肺结核发病率呈现降低趋势,但患者疾病负担及总经济负担表现为升高趋势,仍需将肺结核的防治作为重点关注内容^[1]。目前,临床对于肺结核的治疗以服用抗结核药为主,但随着耐药菌株的增多和扩散,耐多药结核病(multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB)发生率也越来越高^[2]。耐药结核病的治疗极为棘手,MDR-TB患者中仅48%的患者获得治疗成功,病死率和失访率分别高达15%和28%。结核分枝杆菌为胞内寄生菌,其感染率很高,发病率却较低,除与感染的细菌量和毒力等相关外,还与患者机体免疫功能有关^[3-4]。机体抗结核免疫主要为细胞免疫,而影响细胞免疫程度的主要为T淋巴细胞亚群。有研究结果显示,肺结核患者外周血T淋巴细胞亚群含量与健康人群存在显著差异,且与预后相关^[5]。因此,本研究探讨了非耐药和耐多药肺结核患者外周血T淋巴细胞亚群动态变化及临床意义,以期能为肺结核治疗提供资料。

1 资料与方法

1.1 资料来源

本研究经医院伦理委员会批准[(2020)年临审第(1)号],纳入2020年1月至2021年6月我院收治的97例肺结核患者。纳入标准:(1)非耐药肺结核患者,①X线检查或胸部CT检查考虑肺结核,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结核分枝杆菌药物敏感试验未发现耐药。(2)耐多药肺结核患者,①X线检查或胸部CT检查考虑肺结核;②痰结核分枝杆菌培养阳性;③结核分枝杆菌药物敏感试验结果显示,至少对利福平、异烟肼耐药。排除标准:患有肺外结核者;合并免疫系统相关疾病者;长期服用激素或者近1年内曾用免疫抑制剂者;因患有其他疾病,不能耐受一线或二线抗结核药治疗者;人类免疫缺陷病毒阳性者;合并肿瘤者;妊娠或哺乳期妇女。97例患者中,男性53例,女性44例;年龄20~68岁,平均(41.57±9.26)岁。

1.2 病原菌培养与药物敏感试验

采集所有患者痰液,接种于M-H培养基中进行病原菌培养,培养条件:37℃环境中培养24h,取单个菌落接种于罗氏固体培养基,培养16~24h。采用Kirby-Bauer纸片扩散法(K-B法)进行药物敏感试验,在同一平板中选择3~5个性状

相似的菌落,采用接种环进行接种,于35℃环境中培养2~6h,以0.9%氯化钠溶液稀释后接种于MHA平板上。孵育完成后,根据临床实验室标准化研究所制定的标准^[6]进行结果判断,采用游标卡尺(精确度为1mm)测量抑菌圈直径,若发现抑菌圈内有散在菌落生长,提示可能为混合生长,需重新分离纯化鉴定,再次行药物敏感试验。耐多药判断标准:符合《耐药结核病化学治疗指南(2015)》^[7]中MDR-TB诊断标准。根据结核分枝杆菌药物敏感试验结果,将患者分为耐多药组、非耐多药组。

1.3 治疗方法

耐多药组患者根据药物敏感试验结果,依据《中国耐多药和利福平耐药结核病治疗专家共识》(2019年版)制定治疗方案。非耐多药组患者采用异烟肼(1次0.3g,1日1次)、利福平(体重<50kg者1次0.45g,1日1次;体重≥50kg者1次0.6g,1日1次)、吡嗪酰胺(1次0.5g,1日3次)和盐酸乙酰胺丁醇(1次0.75g,1日1次)等常规抗结核药治疗。

1.4 外周血T淋巴细胞亚群检测

抽取所有受检者新鲜EDTA抗凝血4mL,分为2份,一份通过流式细胞仪检测CD3、CD4、CD8、CD4/CD8以及Tregs亚群水平;另一份检测Th1、Th2和Th17细胞亚群水平。耐多药组和非耐多药组患者于接受抗结核治疗疗程结束后1d抽取2份新鲜血液样本,用于检测外周血T淋巴细胞亚群水平。使用美国Beckman Coulter公司荧光校正微球校准仪器光路与流路,根据试剂使用说明书,按照所测的样本数取相应数目的流式细胞仪专用试管。CD3、CD4、CD8和Tregs亚群测定:向每支试管中分别加入荧光素标记的抗体试剂各10mL,再加入EDTA抗凝全血10μL,混匀后于室温(25℃)下避光孵育20min,向每支试管中各加入溶血剂500μL,混匀后于室温下避光孵育10min后上机。分别计算外周血T淋巴细胞CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和CD4⁺/CD8⁺水平,外周血Th1、Th2和Th17细胞亚群水平。

1.5 治疗效果评定

参照文献[8],根据治疗后病灶吸收情况评定治疗效果:治疗后病灶缩小≥50%为预后良好,治疗后病灶缩小<50%为预后不良。

1.6 统计学方法

数据采用 SPSS 20.0 软件处理,治疗效果等计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和 CD4⁺/CD8⁺及外周血 Th1、Th2 和 Th17 细胞亚群水平等计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两两比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 *F* 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结核分枝杆菌药物敏感试验结果

结果显示,耐多药肺结核患者 39 例,非耐药肺结核患者 58 例。耐多药组患者中,男性 23 例,女性 16 例;年龄 20~66 岁,平均(44.20±8.25)岁。非耐药组患者中,男性 33 例,女性 25 例;年龄 20~68 岁,平均(40.18±9.10)岁。两组患者基线资料相似,有可比性。

2.2 外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和 CD4⁺/CD8⁺水平比较

治疗前,耐多药组患者外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺和 CD4⁺/CD8⁺水平显著低于非耐药组,差异均有统计学意义(*P*<0.05);两组患者 CD8⁺水平比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。与治疗前比较,非耐药组患者治疗后外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺和 CD4⁺/CD8⁺水平均显著升高,差异均有统计学意义(*P*<0.05);而耐多药组患者治疗后外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺和 CD4⁺/CD8⁺水平与治疗前比较,差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 两组患者治疗前后外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和 CD4⁺/CD8⁺水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ ratios of peripheral blood T lymphocytes among the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	CD3 ⁺ /%	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
耐多药组(<i>n</i> =39)	治疗前	55.38±16.45	24.56±8.24	45.68±12.77	0.54±0.20
	治疗后	60.66±15.20	27.22±6.78	44.24±10.45	0.61±0.26
	<i>t</i>	1.472	1.557	0.545	1.333
	<i>P</i>	0.145	0.124	0.587	0.187
	非耐药组(<i>n</i> =58)	治疗前	64.27±18.22	30.25±12.35	42.26±13.20
治疗后	70.05±12.25	36.48±7.20	41.25±10.88	0.88±0.30	
<i>t</i>	2.005	3.319	0.450	2.437	
<i>P</i>	0.047	0.001	0.654	0.016	

2.3 外周血 Th1、Th2 和 Th17 细胞亚群水平比较

治疗前,耐多药组患者外周血 Th1、Th2 水平显著低于非耐药组,外周血 Th17 水平显著高于非耐药组,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。与治疗前比较,非耐药组患者治疗后外周血 Th1、Th2 水平显著升高,外周血 Th17 水平显著降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05);而非耐药组患者治疗前后上述指标水平比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 2。

表 2 两组患者治疗前后外周血 Th1、Th2 和 Th17 细胞亚群水平比较($\bar{x}\pm s$,%)

Tab 2 Comparison of Th1, Th2, Th17 cell subsets in peripheral blood among two groups ($\bar{x}\pm s$,%)

组别	时间	Th1	Th2	Th17
耐多药组(<i>n</i> =39)	治疗前	3.98±1.10	2.40±0.90	2.28±0.88
	治疗后	4.62±1.80	2.88±1.45	1.97±0.48
	<i>t</i>	1.895	1.756	1.931
	<i>P</i>	0.062	0.083	0.057
	非耐药组(<i>n</i> =58)	治疗前	4.88±1.08	3.35±1.05
治疗后	7.18±1.42	5.68±1.12	0.65±0.18	
<i>t</i>	9.818	11.558	12.414	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	

2.4 抗结核治疗效果比较

非耐药组患者抗结核治疗预后良好率为 77.59% (45/58),显著高于耐多药组的 35.90% (14/39),差异有统计学意义($\chi^2=17.009, P<0.001$)。

3 讨论

结核病防治一直是临床研究的重点,如今越来越多的抗结核药在临床发挥了较好的治疗效果,控制了疾病进展和泛滥^[9]。但也伴随着一些不合理用药情况出现,导致结核菌耐药增加^[10-11]。耐药结核病是由于基因突变使药物对结核分枝杆菌的效力降低导致的,耐药基因间的相互关系尚不知晓,耐药机制极其复杂仍处于不断探索阶段。耐药性直接关系到患者的治疗效果及预后,分析 MDR-TB 患者的病情对提高临床治愈率具有至关重要的作用。

研究结果发现,人体在感染结核菌之后并不会马上发病,而是在免疫功能降低或细胞介导病态反应增高时才会发病^[12]。因此,有学者认为,结核病的发生发展不仅与致病菌感染有关,还与患者自身的免疫功能密切相关,其在细胞免疫功能降低的情况下更易发病^[13]。T 淋巴细胞在结核患者的细胞免疫过程中起着重要作用。CD3⁺ T 细胞可以激活 T 淋巴细胞参与细胞免疫;CD4⁺ T 细胞可以激活效应 T 细胞及其他免疫细胞聚集于感染部位发挥免疫保护作用;CD8⁺ T 细胞也共同作用 CD4⁺ T 细胞所介导的免疫反应,可以溶解已经吞噬的结核菌及受抗原影响产生的巨噬细胞,并分泌 γ 干扰素等细胞因子增加抗原呈递,拮抗结核菌感染^[14-15]。Th 细胞能够进一步分化为不同的亚群,通过不同的转录因子,分泌细胞因子和趋化因子,通过复杂的作用机制协调不同的免疫效应机制。Th1 细胞在诱导结核分枝杆菌等细胞外致病菌的保护性免疫反应方面起着关键作用,能刺激分泌白细胞介素(IL)2、IL-18 和干扰素细胞因子,是器官特异性自身免疫的主要驱动因素。Th2 可以产生 IL-4、IL-5 等细胞因子介导细胞免疫及细胞毒 T 细胞的生长和活化,抑制致病菌的感染作用。Th17 是近年来越来越受到关注的细胞亚群,在结核分枝杆菌感染过程中,Th17 有利于机体形成结核保护性免疫并加速二次免疫应答,从而起到清除结核分枝杆菌的作用^[16-17]。

本研究中,耐多药组患者外周血 T 淋巴细胞 CD3⁺、CD4⁺和 CD4⁺/CD8⁺水平显著低于非耐药组,外周 Th1、Th2 水平显著低于非耐药组,Th17 水平显著高于非耐药组,说明肺结核患者存在明显的免疫功能受损状态,且耐多药肺结核患者的免疫功能受损状态更严重。接受抗结核治疗 3 个月后,非耐药组患者抗结核治疗预后良好率显著高于耐多药组;复查外周血 T 淋巴细胞亚群水平发现,与治疗前比较,非耐药组患者治疗后 CD3⁺、CD4⁺和 CD4⁺/CD8⁺水平及 Th1、Th2 水平均显著升高,Th17 水平显著降低,而耐多药组患者治疗后 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、Th1、Th2 和 Th17 水平与治疗前相似,与相关文献报道结果一致,均显示耐多药肺结核患者治疗效果不佳。且本研究进一步分析发现,结核分枝杆菌的耐药性可以影响肺结核患者体内的免疫状态,因此认为,在接受抗结核治疗时,机体对于结核分枝杆菌的清除是在免疫应答的作用下完成的,对于结核病患者尤其是耐多药肺结核患者免疫状态的探究有助于更好地认识耐多药肺结核治疗效果不佳的原因。

(下转第 667 页)