

## • 短篇论著 •

# 菌阴性肺结核患者肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群分析<sup>\*</sup>

李素英<sup>1,3</sup>, 杨 红<sup>2△</sup>, 余海霞<sup>3</sup>

(甘孜州人民医院:1. 输血科;2. 传染病院;3. 检验科, 四川甘孜 626000)

**摘要:**目的 探讨菌阴性肺结核患者肺泡灌洗液(BALF)T 淋巴细胞亚群变化情况及其临床意义。方法

将本院 2016 年 1 月至 2017 年 6 月收治的菌阴性肺结核患者 48 例纳入本研究(肺结核组), 另选择同期因异物入院行软式支气管镜术患者 48 例作为对照组。以流式细胞仪分析 BALF 内 T 细胞亚群变化情况, 并进行统计学分析。

**结果** 肺结核患者 BALF 的 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平较对照组患者显著升高( $P=0.001$ ), 而 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比值(CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>)显著低于对照组( $P<0.01$ ); 受试者工作特征曲线(ROC)曲线分析显示 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 诊断菌阴性肺结核曲线下面积(AUC)分别为 0.756(95%CI: 0.611~0.887,  $P=0.003$ )、0.785(95%CI: 0.621~0.903,  $P=0.001$ ); 在系统抗结核治疗后 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平较治疗前明显下降( $P<0.05$ ), CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 较治疗前明显升高( $P<0.05$ )。

**结论** 菌阴性肺结核患者 BALF T 淋巴细胞亚群显著改变, 通过检测 BALF 的 T 淋巴细胞亚群有助于菌阴性肺结核诊断和疗效评价。

**关键词:**菌阴性肺结核; 肺泡灌洗液; T 淋巴细胞

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.09.029

**文章编号:**1673-4130(2018)09-1123-03

**中图法分类号:**R446.5

**文献标识码:**B

肺结核是我国常见传染性疾病之一, 发病率居高不下, 对肺结核进行有效防治成为我国亟待解决的卫生难题<sup>[1]</sup>, 《WHO2015 年全球结核病报告》也将我国列为结核高负担国家<sup>[2]</sup>。痰涂片抗酸杆菌阳性或结合分子杆菌培养阳性被认为是肺结核诊断金标准, 但是痰液细菌学检测受制于多种因素, 并不能高度灵敏地对肺结核做出诊断。据国外文献报道, 超过 50% 的肺结核患者呈痰菌阴性<sup>[3]</sup>, 这类患者诊断困难且部分具有传染性, 故提高菌阴性肺结核患者诊断效率对肺结核有效防治具有积极意义。机体对结核分枝杆菌应答的最主要方式是细胞免疫, 在这个过程中 T 淋巴细胞被认为扮演关键角色<sup>[4]</sup>。本研究对菌阴性肺结核患者肺泡灌洗液中(BALF)T 淋巴细胞亚群进行检测, 探讨其对菌阴性肺结核诊断和疗效判定的价值, 以期对菌阴性肺结核诊断、疗效评估提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择甘孜州人民医院 2016 年 1 月至 2017 年 6 月收治的菌阴性肺结核患者 48 例为肺结核组, 其中男 30 例, 女 18 例, 年龄 18~57 岁, 平均(35.7±8.6)岁。菌阴性肺结核诊断标准<sup>[5]</sup>: (1)患者具有潮热盗汗、咳嗽咳痰、消瘦等肺结核典型临床症状, CT、X 线等影像学检查符合; (2)PPD 试验强阳性; (3)排除非肺结核肺部疾病; (4)痰结核菌 PCR 探针检测支持肺结核诊断; (5)临床抗结核治疗有效;

(6)连续 3 次抗酸杆菌涂片及 1 次痰培养均为阴性。纳入标准:(1)所有患者年龄均在 18 岁以上, 且为首次诊断、就医; (2)患者菌阴性肺结核诊断明确; (3)无自身免疫性疾病或获得性免疫疾病, 近半年内未服用免疫抑制剂或免疫增强剂; (4)未伴有非肺结核肺部疾病, 如肺炎、肺癌等; (5)排除恶性肿瘤及严重心、肝、肾等疾病; (6)所有患者在出院后 3 个月随访时仍然支持菌阴性肺结核诊断。另外, 选择同期本院因异物入院行软式支气管镜术患者 48 例作为对照组, 其中男 35 例, 女 13 例, 年龄 18~62 岁, 平均(36.9±7.5)岁。两组患者年龄、性别等一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 具有可比性。本研究得到医院伦理委员会支持, 所有纳入本研究的患者及家属均知晓本研究目的、过程及意义, 签署知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 BALF 采集** 结核组患者取病灶所在肺段作为灌洗部位, 采用 Olympus 电子纤维支气管镜(日本)、由娴熟纤支镜操作技能的医师严格按照《纤维支气管镜临床应用指南》<sup>[6]</sup> 进行肺泡灌洗: 将纤维支气管镜嵌入病变段后经灌洗导管注入 100 mL 无菌生理盐水至支气管肺泡内, 再通过负压缓慢回收灌洗液, 采用双层无菌纱布过滤以除去痰液及黏液, 得到 BALF 后置于恒温硅塑瓶(4 °C), 混匀后送检。对照组患者在取出异物后经上述方法取得 BALF。

\* 基金项目:四川省卫生与计划生育委员会科研课题(150060)。

△ 通信作者, E-mail:13154416622@sina.cn。

本文引用格式:李素英,杨红,余海霞.菌阴性肺结核患者肺泡灌洗液 T 淋巴细胞亚群分析[J].国际检验医学杂志,2018,39(9):1123-1125.

**1.2.2 T细胞亚群检测** 收集BALF后,在甘孜州人民医院检验科,采用FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司)检测T细胞亚群,CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞流式细胞术检测试剂均购买成品试剂盒(美国BD公司,批号:50726),严格按照试剂盒操作说明书进行操作,检测当日实验室温度、湿度均符合说明书要求。所有操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,设置空白对照、阳性对照、阴性对照,仅有对照试验符合要求时才能进行样本检测;检测当日实验室温度、湿度均符合说明书要求。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS19.0软件进行统计分析,计量数据首先进行数据正态性分布检验,正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用t检验;CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>淋巴细胞比值(CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>)对菌阴性肺结核诊断效率采用受试者工作特征曲线(ROC)分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 肺结核组与对照组患者间BALF的T细胞亚群的比较** CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞水平与对照组比较,差异无统计学意义( $P=0.136$ );肺结核组CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞水平高于对照组,差异有统计学意义( $P=0.001$ ),但是CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞水平、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>低于对照组,差异有统计学意义( $P=0.000$ )。见表1。

表1 肺结核组与对照组患者间BALF的T细胞亚群比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
肺结核组	48	52.7±6.2	30.5±5.1	25.6±3.7	1.10±0.25
对照组	48	51.4±5.3	34.2±5.3	22.7±3.9	1.37±0.27
t/P		1.104/0.136	3.485/0.003	3.737/0.001	5.083/0.000

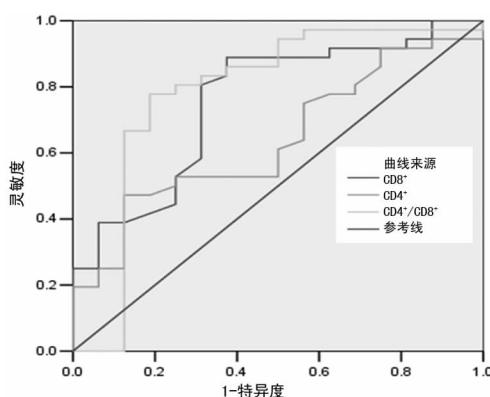


图1 菌阴性肺结核诊断的ROC分析

**2.2 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>对菌阴性肺结核的诊断效能** 根据受试者特征曲线对菌阴性肺结核诊断效率进行分析,CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞水平对菌阴性肺结核无诊断价值,AUC为0.640(95%CI:0.484~0.795, $P=0.110$ )。CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>对菌阴性肺结核诊断的AUC为0.785(95%CI:0.621~0.903,

$P=0.001$ ),诊断阈值为1.02;CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞水平对菌阴性肺结核诊断的AUC为0.756(95%CI:0.611~0.887, $P=0.003$ ),诊断阈值为32.9%。见图1。

**2.3 治疗后T淋巴细胞亚群变化情况** 在患者系统抗结核治疗1个月及3个月后再次进行BALF检测,结果显示CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>在治疗前、治疗1月后、3个月后比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),抗结核治疗后CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞水平明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>较治疗前上升,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

表2 治疗后T淋巴细胞亚群变化情况( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CD3 <sup>+</sup> T	CD4 <sup>+</sup> T	CD8 <sup>+</sup> T	CD4 <sup>+</sup> T/ CD8 <sup>+</sup> T
治疗前	48	52.7±6.2	30.5±5.1	25.6±3.7	1.10±0.25
治疗1月后	48	52.1±5.9*	33.9±5.7*	22.5±3.2*	1.29±0.21*
治疗3月后	48	52.5±5.1*#	35.8±6.1*#	20.6±3.2*#	1.41±0.22*#
F/P		1.307/0.106	4.139/0.007	3.628/0.021	3.872/0.015

注:与治疗前比较,\* $P < 0.05$ ,与治疗后1个月比较,# $P < 0.05$

## 3 讨 论

肺结核是我国高发病率、高致死率的传染性疾病,结核分枝杆菌作为其病原菌主要通过呼吸道进行传播,多数先引起肺部感染而发生肺结核,之后引起其他器官感染、发病<sup>[7]</sup>。痰涂片及痰结核分枝杆菌培养阳性是诊断肺结核“金标准”,但是菌阴性肺结核患者占该病总人数比例超过50%<sup>[3,8]</sup>,给临床诊断带来难度。相关研究显示,菌阴性肺结核患者中大概有30%具有传染性,可对结核病流行性传播造成严重后果<sup>[9]</sup>,所以提高菌阴性肺结核临床诊断和针对性治疗有助于肺结核防治。BALF是通过支气管以下的病变肺组织或病变亚段灌洗而获得的诊断标本,不仅可以更加直接、客观、准确地了解肺部病变程度,还可以反映结核分枝杆菌感染后局部肺组织免疫功能状态,近年来已经被广泛应用于肺结核临床诊断。张继萍等<sup>[10]</sup>采用改良抗酸染色法检测肺结核患者BALF抗酸杆菌,可将菌阴性肺结核诊断阳性率由38%提高至82%。本研究也选择菌阴性肺结核患者BALF作为检测标本,通过测定BALF的T淋巴细胞亚群来分析其对菌阴性肺结核诊断和疗效判定的价值。

细胞免疫是结核分枝杆菌诱发结核疾病的主要病理学机制,结核疾病发病的过程中机体表现为持续性的细胞免疫应答。T淋巴细胞是执行细胞免疫的主要效应细胞,可识别、提呈抗原,也可对抗原做出最终应答反应,所以T淋巴细胞被认为在肺结核发病过程中扮演关键角色<sup>[4,11]</sup>。T淋巴细胞主要包含CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>亚群,不同亚群在免疫应答发挥不同作用。CD3<sup>+</sup>亚群主要起传导抗原信号的作用,

激活后的 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞可以促进细胞免疫应答。CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞是调节性 T 细胞, 包括辅助性 T 细胞(Th)1、Th2, 能够促进 B 细胞、自然杀伤(NK)细胞等其他免疫细胞增殖、活化, 还可参与体液免疫应答。CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞是杀伤性 T 细胞, 主要通过对细胞表面 MHC-I 类分子识别后杀死细胞以发挥免疫效应<sup>[12]</sup>。

本研究显示, 肺结核患者与对照组患者 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞无明显差异, 但是 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞明显升高, CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup> T/CD8<sup>+</sup> T 明显下降。CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞与肺结核发病密切相关, 当机体感染结核分枝杆菌后其免疫功能低下, 可表现为 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平的急剧下降, 而免疫细胞水平下降后进一步减弱机体对病原体的抵抗能力<sup>[13]</sup>。CD4<sup>+</sup> T 与 CD8<sup>+</sup> T 在人体内通过一定的动态平衡来保持免疫状态和免疫应答水平<sup>[14]</sup>, 一旦 CD4<sup>+</sup> T/CD8<sup>+</sup> T 平衡被打破则会导致对体外病原菌抵抗能力下降, 容易出现病原微生物感染。肺结核患者 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平升高, 可能与 CD8<sup>+</sup> T 作为杀伤性 T 细胞在感染后被激活以杀伤结核分枝杆菌有关<sup>[15]</sup>。笔者进一步分析了 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 对菌阴性肺结核诊断效能, 结果显示 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 对菌阴性肺结核均有诊断价值( $P < 0.05$ )。而在结核病免疫过程中发挥重要作用的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞却无诊断价值, 这可能与 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞在不同免疫应答阶段分化 Th1、Th2 有关。在系统抗结核治疗 1 个月后及 3 个月后, BALF 的 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平明显下降, 而 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞水平、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 较治疗前明显上升, 提示 BALF 的 T 淋巴细胞亚群变化对菌阴性肺结核治疗效果有一定评价意义。

综上所述, 菌阴性肺结核患者进行 BALF T 淋巴细胞亚群检测对该病诊断和疗效评价有一定意义, 临床应该推广纤维支气管镜肺泡灌洗技术及灌洗液的 T 淋巴细胞亚群检测, 以提高菌阴性肺结核防治水平。

## 参考文献

- [1] 荀甜甜, 刘萍, 周卫东, 等.  $\gamma$ -干扰素释放试验对筛查藏族肺结核患者的临床应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(7): 914-915.
- [2] KIM J, LEE I J, KIM J H. CT findings of pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy in diabetes mellitus patients[J]. Diagn Interv Radiol, 2017, 23(2): 112-117.
- [3] JANG F, HUANG W, WANG Y, et al. Nucleic Acid Amplification Testing and Sequencing Combined with Acid-Fast Staining in Needle Biopsy Lung Tissues for the Diagnosis of Smear-Negative Pulmonary Tuberculosis [J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0167342.
- [4] LIANG Y, WANG Y, LI H, et al. Evaluation of a whole-blood chemiluminescent immunoassay of IFN- $\gamma$ , IP-10, and MCP-1 for diagnosis of active pulmonary tuberculosis and tuberculous pleurisy patients[J]. APMIS, 2016, 124(10): 856-864.
- [5] 马刚, 张淑香, 郭丽萍, 等. 支气管镜检查对痰菌阴性拟诊肺结核的诊断价值[J]. 宁夏医科大学学报, 2015, 37(8): 969-971.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会支气管镜学组. 纤维支气管镜(可弯曲支气管镜)临床应用指南(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(3): 134-135.
- [7] RAHMAN M M, RAHIM M R, KHALED A, et al. Molecular detection and differentiation of mycobacterium tuberculosis complex and non-tuberculous mycobacterium in the clinical specimens by real time PCR[J]. Mymensingh Med J, 2017, 26(3): 614-620.
- [8] LI Q, BAO X, LIU Y, et al. Comparison of two molecular assays for detecting smear negative pulmonary tuberculosis[J]. Biomed Environ Sci, 2016, 29(4): 248-253.
- [9] ULLAH I, JAVAID A, MASUD H, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance in extrapulmonary tuberculosis and sputum smear-negative pulmonary suspects using Xpert MTB/RIF[J]. J Med Microbiol, 2017, 66(4): 412-418.
- [10] 张继萍, 柳晓金, 叶迎宾, 等. 支气管镜肺泡灌洗液改良抗酸染色法诊断菌阴性肺结核的价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(13): 1702-1703.
- [11] CERVERA P, GILHOT A, MARZAC C, et al. T-cell prolymphocytic leukemia and tuberculosis: a puzzling association[J]. Clin Case Rep, 2017, 5(9): 1536-1541.
- [12] BARTH S D, SCHULZE J J, KUEHN T, et al. Treg-Mediated immune tolerance and the risk of solid cancers: findings from EPIC-Heidelberg[J]. J Natl Cancer Inst, 2015, 107(11): 224.
- [13] PANTELEEV A V, NIKITINA I Y, BURMISTROVA I A, et al. Severe tuberculosis in humans correlates best with neutrophil abundance and lymphocyte deficiency and does not correlate with Antigen-Specific CD4 T-Cell response[J]. Front Immunol, 2017, 8(10): 963.
- [14] HADDADI S, THANTHRIGE-DON N, AFKHAMI S, et al. Expression and role of VLA-1 in resident memory CD8 T cell responses to respiratory mucosal viral-vectorized immunization against tuberculosis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9525.
- [15] LI X, CHEN J, WANG L, et al. Profiling B and T cell immune responses to co-infection of Mycobacterium tuberculosis and hookworm in humans[J]. Infect Dis Poverty, 2015, 4(1): 20.