

# 结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞对活动性肺结核诊断及疗效评估价值

赵慈余, 何咪娜, 鲁笑容, 陈捷

【关键词】 活动性肺结核; T 细胞; 免疫活化标记; 结核特异性抗原

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.09.035

【中图分类号】 R521 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)09-1238-04

结核病仍是我国乃至全球的重大公共卫生问题之一<sup>[1]</sup>。如何早期诊断并监测结核病疗效是控制结核病的主要挑战。痰培养、痰涂片阳性以及其转阴分别是诊断和监测抗结核疗效的实验室常用方法,但这些方法均存在灵敏度低、耗时长等缺点。因此,可快速、灵敏的代替方法亟需临床探寻。目前关于结核特异性生物标志物用于结核的诊断和疗效监测少有研究报道。有研究显示<sup>[2]</sup>,经分泌抗原靶蛋白-6 (ESAT-6) 和培养滤过蛋白-10 (CFP-10) 刺激后, CD4<sup>+</sup>T 细胞将产生 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等细胞因子以及 T 细胞表面标记的特异性表达变化。因此,本研究拟以 T 淋巴细胞典型的早期和中晚期活化指标 CD69 和 HLA-G<sup>[3-4]</sup>为指标,同时为减少 T 细胞表面的非特异性表达的干扰,设立对照管(不含多肽抗原)和培养刺激管(含 ESAT-6 和 CFP-10 的蛋白混液),以培养刺激前后 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞群百分比差值为最终检测值,探讨结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞对活动性肺结核的诊断及疗效评估的潜在价值,现报道如下。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2022 年 10 月至 2024 年 1 月于余姚市人民医院就诊的活动性结核患者 150 例为观察组,另外入选同期健康体检者 80 例作为对照组。纳入标准:(1)参考我国肺结核诊断标准 (WS288-2017)<sup>[5]</sup>,结合患者的临床症状、体征及实验室检查等综合诊断为活动性肺结核;(2)年龄 18 ~

80 岁,临床资料完整。排除标准:(1)合并恶性肿瘤或自身免疫系统疾病者;(2)服用影响机体免疫功能的药物;(3)孕妇或哺乳期。本研究获得余姚市人民医院伦理委员会批准,所有研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 仪器和试剂 美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞分析仪。RPMI-1640 培养基(购自 Thermo Scientific 公司);ESAT-6 和 CFP-10 购自 Cusabio 公司;HLA-G-PE、CD4-FITC、CD69-APC、FACS Lysing 均购自美国 BD 公司。

## 1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集对照组的空腹静脉血 2 ml 和观察组患者治疗前后的空腹静脉血 2 ml。

1.3.2 细胞培养 各样本分别设立未刺激的对照管和培养刺激管。对照管中加入 1 ml 全血和 1 ml RPMI-1640 培养基,混匀。培养刺激管中加入 1 ml 全血和 1 ml 浓度为 10  $\mu$ g/ml ESAT-6 和 CFP-10 的蛋白混液。放入 37  $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 20 ~ 24 h。

1.3.3 CD69 和 HLA-G 的检测 (1)荧光抗体标记:取 2 支流式检测管并编号 1、2 号,分别加 HLA-G-PE/CD4-FITC、CD4-FITC/CD69-APC 10  $\mu$ l; (2)加样:每支流式检测管加入抗凝外周全血 50  $\mu$ l; (3)孵育并溶血:室温避光孵育 30 min,加入 400  $\mu$ l 溶血素并轻混匀; (4)上机:使用 FACS Calibur 流式细胞分析仪进行检测; (5)分析与记录:Cell Quest 软件分析 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>以及 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞群的百分数。以培养刺激管和对照管的 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞百分比差值为最终检测值。

1.3.4 治疗方案和疗效判定 观察组入院治疗方案均给予标准四联强化期抗结核治疗<sup>[6]</sup>:规律口服四联抗结核药物方案(异烟肼 0.3 g/d,利福平 0.45 g/d,吡

基金项目: 宁波市科技计划项目(2023J269)

作者单位: 315400 浙江省余姚,余姚市人民医院

通信作者: 赵慈余, Email: 995268134@qq.com

噻酰胺 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 乙胺丁醇 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 治疗 2 个月。根据世界卫生组织标准评估肺结核治疗效果<sup>[7]</sup>: (1) 显效为症状体征基本消失, 肺部病灶吸收≥50%, 空洞闭合, 连续 2 次痰菌试验培养呈阴性; (2) 有效为症状体征减轻, 肺病灶吸收小于< 50%、空洞缩小; (3) 无效为病情无改善, 肺部病灶无变化或恶化。总有效率=(显效+有效)/总例数×100%。

1.4 统计方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 计数资料采用χ<sup>2</sup> 检验; 非正态分布计量资料以中位数(四分位数)表示, 两组比较采用 Mann-Whitney U 检验; 采用受试者工作特征曲线(ROC)评价诊断活动性结核的效能。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象临床特征 观察组与对照组的年龄、性别、卡介苗接种史、出生地差异均无统计学意义(均 *P* > 0.05), 见表 1。观察组入选的 150 例患者, 经过 2 个月抗结核治疗后, 42 例复查临床症状基本消失, 且痰菌培养转阴, 治疗显效率为 28.0% (42/150); 99 例患者临床症状减轻, 表现为肺部病灶缩小等, 治疗有效率 66.0% (99/150); 9 例患者病情无改善 6.0% (9/150)。观察组的临床治疗总有效率为 94.0% (141/150)。

2.2 结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞百分比比较 治疗前, 观察组的 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞百分比高于对照组 (*Z*=8.61、11.36, 均 *P* < 0.05); 治疗后, 观察组的 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞百分比低于治疗前 (*Z*=6.91、11.16, 均 *P* < 0.05), 且与对照组差异无统计学意义 (*Z*=1.39、1.67, 均 *P* > 0.05), 见表 2。1 例结核患者

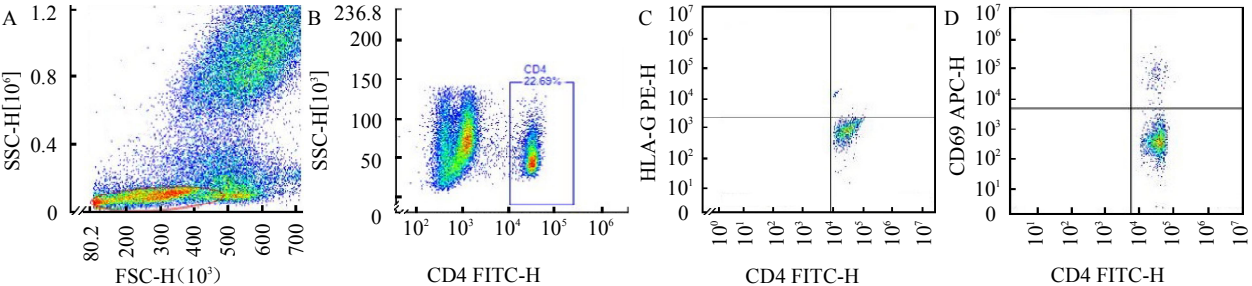
经 ESAT-6 和 CFP-10 刺激培养后的治疗前后外周血 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞流式细胞术控门方案分别见图 1 ~ 2。

2.3 结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞预测活动性结核的价值 结果显示 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞以及两者联合诊断结核的曲线下面积(*AUC*)分别为 0.784、0.885 和 0.920, 见表 3 及图 3。

2.4 抗结核治疗效果与结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞的关系 将观察组按照治疗前 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>T 细胞≥1.650 和 < 1.650; CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞≥1.080 和 < 1.080 分为高、低水平组。高水平组 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞百分比在治疗 2 个月后, 其治疗显效率均高于低水平组 (*P* < 0.05), 治疗有效率与低水平组相比有升高趋势, 但差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 治疗无效率均低于低水平组 (*P* < 0.05), 见表 4。

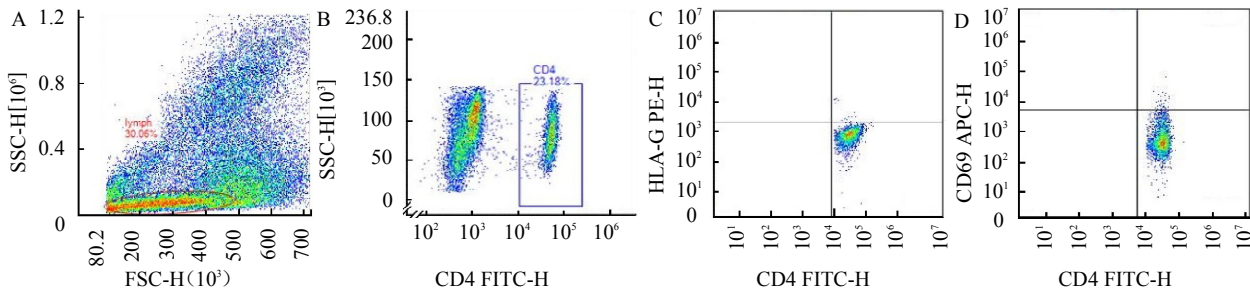
| 表 1 临床特征比较 |                     |                    |                              | 例(%)       |
|------------|---------------------|--------------------|------------------------------|------------|
| 项目         | 观察组( <i>n</i> =150) | 对照组( <i>n</i> =80) | χ <sup>2</sup> ( <i>Z</i> )值 | <i>P</i> 值 |
| 年龄         | 49.0(43.0, 57.0)    | 45.0(36.0, 52.0)   | (1.63)                       | > 0.05     |
| 性别         |                     |                    |                              |            |
| 男          | 81(54.00)           | 47(58.75)          | 0.48                         | > 0.05     |
| 女          | 69(46.00)           | 33(41.25)          |                              |            |
| 出生地        |                     |                    |                              |            |
| 城镇         | 48(32.00)           | 27(33.75)          | 0.07                         | > 0.05     |
| 乡村         | 102(68.00)          | 53(66.25)          |                              |            |
| 卡介苗接种史     |                     |                    |                              |            |
| 是          | 145(96.67)          | 79(98.75)          | 0.26                         | > 0.05     |
| 否          | 5(3.33)             | 1(1.25)            |                              |            |

| 表 2 抗结核治疗前后患者 CD4 <sup>+</sup> HLA-G <sup>+</sup> 和 CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> T 细胞百分比比较 |     |                                     |                                    | % |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------------------------------|------------------------------------|---|
| 组别                                                                                               | 例数  | CD4 <sup>+</sup> HLA-G <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> |   |
| 对照组                                                                                              | 80  | 0.40(0.10, 1.28)                    | 0.62(0.02, 0.72)                   |   |
| 观察组                                                                                              | 150 |                                     |                                    |   |
| 治疗前                                                                                              |     | 2.90(1.50, 5.00)                    | 3.10(2.70, 4.40)                   |   |
| 治疗后                                                                                              |     | 0.50(0.20, 1.30)                    | 0.70(0.00, 1.10)                   |   |



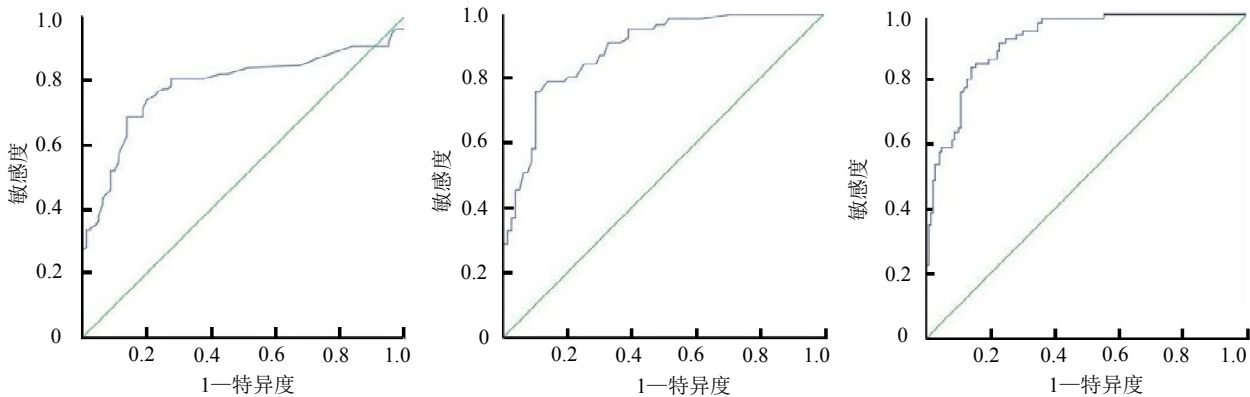
注: A 为根据细胞体积大小和细胞内容物对外周血淋巴细胞的门控图; B 为 CD4<sup>+</sup>T 细胞的门控图, C 为 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>T 细胞的门控图, D 为 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞的门控图

图 1 1 例结核患者经 ESAT-6 和 CFP-10 刺激培养后, 治疗前外周血 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞流式细胞术控门方案



注:A 为根据细胞体积大小和细胞内容物对外周血淋巴细胞的门控图,B 为 CD4<sup>+</sup>T 细胞的门控图,C 为 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>T 细胞的门控图,D 为 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞的门控图

图 2 1 例结核患者经 ESAT-6 和 CFP-10 刺激培养后,治疗后外周血 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞流式细胞术控门方案



注:A 为 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>T 细胞预测活动性结核的 ROC 曲线图,B 为 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞预测活动性结核的 ROC 曲线图,C 为 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>联合 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞预测活动性结核的 ROC 曲线图

图 3 结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞预测活动性结核的 ROC 曲线图

表 3 结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞

| 预测活动性结核的价值                          |       |       |               |       |       |
|-------------------------------------|-------|-------|---------------|-------|-------|
| 项目                                  | AUC   | 截断值   | 95%CI         | 敏感度   | 特异度   |
| CD4 <sup>+</sup> HLA-G <sup>+</sup> | 0.784 | 1.650 | 0.724 ~ 0.844 | 0.713 | 0.812 |
| CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>  | 0.885 | 1.080 | 0.840 ~ 0.930 | 0.787 | 0.850 |
| 联合检测                                | 0.920 | 0.552 | 0.887 ~ 0.954 | 0.860 | 0.838 |

表 4 不同结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞

| 百分比与抗结核治疗效果分析                       |           |           |          |
|-------------------------------------|-----------|-----------|----------|
| 指标(%)                               | 显效(n=42)  | 有效(n=99)  | 无效(n=9)  |
| CD4 <sup>+</sup> HLA-G <sup>+</sup> |           |           |          |
| 高水平(n=107)                          | 35(32.71) | 71(66.35) | 1(0.93)  |
| 低水平(n=43)                           | 7(16.28)  | 28(65.12) | 8(18.60) |
| χ <sup>2</sup> 值                    | 4.11      | 0.02      | 13.99    |
| P 值                                 | < 0.05    | > 0.05    | < 0.05   |
| CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>  |           |           |          |
| 高水平(n=122)                          | 39(31.96) | 83(68.03) | 0        |
| 低水平(n=28)                           | 3(10.71)  | 16(57.14) | 9(32.14) |
| χ <sup>2</sup> 值                    | 5.10      | 1.14      | 36.21    |
| P 值                                 | < 0.05    | > 0.05    | < 0.05   |

### 3 讨论

全球结核病的防控形势依旧严峻。2023 年的全球结核病报告显示:2022 年新发结核患者 1 060 万,死亡患者 130 万例<sup>[8]</sup>。早期诊断以及疗效监测对防控结核病具有重要意义。结核分枝杆菌作为胞内寄生菌,细胞免疫在抗结核感染中起重要作用。有研究证实,CD4<sup>+</sup>T 细胞数目减少以及功能低下,将会导致结核分枝杆菌长期存活并难以局限于病灶区,进而加重病情<sup>[9]</sup>。故探索结核特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞表面的活化标志物能否作为预测肺结核以及监测抗结核疗效具有潜在价值。

本研究结果显示,观察组的结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞百分比均高于对照组。ROC 曲线分析结果显示,CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>

T 细胞两者联合对诊断活动性结核比单一指标有更好的预测价值。CD69 和 HLA-G 均为 T 淋巴细胞表面的活化免疫标记分子<sup>[10-11]</sup>,CD69 作为早期活化标记可作为共刺激信号进一步诱导 T 淋巴细胞增殖或活化<sup>[12]</sup>。而 HLA-G 是 T 淋巴细胞的中晚期免疫标记,在激活后可进一步促进 T 细胞活化增殖,并且在抑制机体免疫功能中起重要作用<sup>[13]</sup>。近年来的研究发现,CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T 细胞在活动性结核患者中的表达要高于健康人以及与结核患者密切接触的高危人群<sup>[14]</sup>,这和本研究结果一致。本

研究中 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T 细胞百分比在结核患者中显著升高,笔者推测其原因可能是在活动性结核病阶段,同时存在促进 T 细胞活化的炎症反应和逃避宿主免疫应答的抗炎反应。此外,本研究结果显示,在有效的抗结核治疗后,活动性肺结核患者的结核特异性 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞比率均明显下降,推测可能是由于细菌载量下降以及炎症反应减轻,使得 T 细胞活化反应减弱,提示其水平变化可作为观察结核患者疗效和转归的指标。本研究按照截断值将 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞百分比分为高、低水平组,进一步分析其与治疗效果的关系,结果显示高水平组的 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>患者在抗结核治疗 2 个月后,其治疗的显效率高于低水平组,并且其治疗无效率明显低于低水平组,说明 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞百分比的高水平表达可预示活动性肺结核的良好预后。

综上所述,结核特异性的 CD4<sup>+</sup>HLA-G<sup>+</sup>和 CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T 细胞百分比变化能反映抗结核治疗的疗效,并且联合检测对预测活动性肺结核有一定的诊断价值。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] 马艳,陆伟,成诗明.结核分枝杆菌潜伏感染现状及防控对策[J].解放军医学杂志,2023,48(6):634-642.
- [2] 全静,李姗姗,逢宇,等.结核特异性 T 淋巴细胞共信号分子的功能研究进展[J].中华结核和呼吸杂志,2024,47(3):275-281.
- [3] GORABI A M, HAJIGHASEMI S, KIAIE N, et al. The pivotal role of CD69 in autoimmunity[J]. J Autoimmun, 2020, 111: 102453.
- [4] BAI Y, LIU W, XIE Y, et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression plays an important role in the diagnosis and grading of endometrial cancer[J]. J Obstet Gynaecol, 2022, 42(4): 641-647.
- [5] 王黎霞,成诗明,周林,等.中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断 WS288-2017[J].中国感染控制杂志,2018,17(7): 642-652.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会办公厅.中国结核病预防控制工作技术规范(2020 版)[S]. 2020-04-02.
- [7] LINH N N, VINEY K, GEGIA M, et al. World Health Organization treatment outcome definitions for tuberculosis: 2021 update[J]. Eur Respir J, 2021, 58(2):2100804.
- [8] 徐文辉,张艳秋,石洁,等.生物标志物在结核病诊断中的研究进展[J].中国防痨杂志,2024,46(6):713-721.
- [9] BASILE J I, LIU R, MOU W, et al. Mycobacteria-specific T cells are generated in the lung during mucosal BCG immunization or infection with Mycobacterium tuberculosis[J]. Front Immunol, 2020, 11: 566319.
- [10] 吴于青,姜国强,宗佩兰.外周血单个核细胞中 CD69、CD40L 表达在识别抗结核药物诱导超敏反应致敏药物中的价值[J].实用医学杂志,2019,35(12):1875-1879.
- [11] 朱林波,李鹏,飞王敏,等.人类白细胞抗原 G 在甲状腺乳头状癌患者外周血和癌组织中的表达[J].中华内分泌外科杂志,2023,17(1):29-33.
- [12] TAYLOR E S, MCCALL J L, SHEN S, et al. Prognostic roles for IL-2-producing and CD69<sup>+</sup> T cell subsets in colorectal cancer patients[J]. Int J Cancer, 2018, 143(8): 2008-2016.
- [13] 耿白璐,郭静,胡晓飞,等. CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>活化 T 淋巴细胞对溃疡性结肠炎患者疾病严重程度和药物疗效的预测价值[J].肠病学和肝病杂志,2023,32(02): 146-150.
- [14] CHEN Z Y, WANG L, GU L, et al. Decreased expression of CD69 on T cells in tuberculosis infection resisters[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1901.

收稿日期:2024-04-11

(本文编辑:陈志翔)