

• 临床探讨 •

肺结核患者外周血 CD4⁺T 细胞表达与不同检测方法结果分析*

华彦珺¹, 周 芬¹, 杨玉婷¹, 陈 慧¹, 陈苏芳¹, 胥 萍^{1,2△}

(1. 江苏省苏州市第五人民医院检验中心 215007; 2. 江苏省苏州市结核病防治重点实验室 215007)

摘要:目的 探讨肺结核患者外周血 CD4⁺T 细胞的表达对不同方法检测结果的影响。方法 210 例患者分别进行结核感染 T 细胞 γ -干扰素释放试验、痰涂片找抗酸杆菌检测、结核分枝杆菌 DNA 检测、痰培养结核分枝杆菌、外周血 CD4⁺T 细胞绝对数检测。**结果** 患者外周血 CD4⁺T 细胞的表达对不同方法的检测结果有显著影响,其中 TB-DNA 阴性组及痰培养阴性组的患者外周血 CD4⁺T 细胞的表达水平平均高于 TB-DNA 阳性组及痰培养阳性组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 机体免疫状态影响不同检测方法的检测方法,因此,根据患者免疫功能状态选择合适的检测方法,对不同检测结果的分析要结合患者的免疫状况,以免影响临床诊疗。

关键词:肺结核; 结核分枝杆菌; 脱氧核糖核酸; γ -干扰素释放试验; CD4⁺T 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.05.033 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)05-0687-03

我国是全球第三大结核病高负担国家,结核病报告发病人数始终位居法定报告甲、乙类传染病前列^[1-2]。结核病是由结核分枝杆菌引起的慢性传染病,可侵及许多脏器,以肺部受累形成肺结核最为常见^[3]。目前检测肺结核的方法有很多种,以痰涂片找抗酸杆菌检测、痰培养结核分枝杆菌较为多见。本研究开展 γ -干扰素(γ -IFN)释放试验、结核分枝杆菌脱氧核糖核酸(TB-DNA)检测并结合外周血 CD4⁺T 细胞绝对数等检测项目,共同分析患者外周血 CD4⁺T 细胞的表达与各检测方法结果间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 1—10 月苏州市第五人民医院门诊及住院肺结核 210 例,其中男 156 例,女 54 例;年龄 15~91 岁,平均(48.3±20.4)岁。诊断符合结核病诊断标准^[4]。对纳入的 210 例患者分别进行结核感染 T 细胞 γ -IFN 释放试验、痰涂片找抗酸杆菌检测、TB-DNA 检测、痰培养结核分枝杆菌、外周血 CD4⁺T 细胞绝对数检测。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 全自动酶免疫分析仪(爱康公司,中国深圳),CX-21 双目显微镜(Olympus 公司,日本),SLAN 荧光定量 PCR 扩增仪(宏石公司,中国上海),BACTEC MGIT-960 结核培养仪(BD 公司,美国),FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司,美国),XE2100 五分类血球仪(Sysmex 公司,日本)。

1.2.2 主要试剂 结核感染 T 细胞 γ -IFN 释放试验检测试剂盒由北京万泰生物药业股份有限公司提供;抗酸杆菌涂片试剂由中国台湾地区珠海贝索生物技术有限公司提供;TB-DNA 检测试剂由北京博奥生物有限公司提供;结核培养配套试剂由美国 BD 公司提供;CD3-APC、CD4-PerCP、鼠 IgG1-PerCP 以及溶血素均由美国 BD 公司提供。血常规检测试剂由日本 Sysmex 公司提供。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 检测 CD4⁺T 细胞及血常规标本采用乙二胺四乙酸二钾真空采血管(BD 公司),采集静脉血 2 mL,新鲜标本 6 h 内做检测处理。检测结核感染 T 细胞 γ -IFN 释放

试验标本采用肝素锂真空采血管(BD 公司),采集静脉血 5 mL,新鲜标本 4~8 h 内做检测处理。痰涂片、TB-DNA 检测及痰培养标本采用一次性留样瓶留取清晨第 1 口深咳痰 4 瓶。

1.3.2 CD4⁺/CD3 细胞表型的分析 (1)CD3-APC、CD4-PerCP 测定标本的处理:取对照与测定两管,分别加入全血 100 μ L,对照管依次加入 CD3-APC 10 μ L,鼠 IgG1-PerCP 10 μ L,测定管依次加入 CD3-APC 10 μ L,CD4-PerCP 10 μ L。室温避光孵育 15 min,加入 FACS 1:10 稀释溶血素 2 mL,混匀,室温避光反应 15~20 min,依据细胞溶血效果而定。1 300 r/min 离心 5 min,弃上清液。加磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL 混匀,1 300 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入 PBS 500 μ L 重悬,应用流式细胞仪 CELLQUEST 软件,设门于淋巴细胞,再以淋巴细胞为门圈出 CD3⁺、CD4⁺T 细胞。(2)同一管血采用五分类血常规仪 XE2100 测淋巴细胞,通过白细胞计数、淋巴细胞比率,计算 CD4⁺T 细胞的绝对数。

1.3.3 结核分枝杆菌感染 T 细胞 γ -IFN 释放试验 采用体外释放酶联免疫法原理测定特异性抗原介导的细胞免疫反应强度。按 SOP 文件规范操作。

1.3.4 痰涂片 将标本高温高压消毒后,采用改良碱性复红法,按 SOP 文件规范操作。

1.3.5 痰培养 采用 BD960 液体培养仪,通过连续测定荧光强度的方法检测分枝杆菌生长情况。严格按 SOP 文件操作。

1.3.6 TB-DNA 检测 采用多重聚合酶链反应结合 Taqman 技术。严格按 SOP 文件操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果采用受试者工作特征(ROC)曲线分析。

2 结 果

2.1 各检测指标一致性分析 结核分枝杆菌感染 T 细胞 γ -IFN 释放试验与痰 TB-DNA、痰涂片、痰培养结果一致性分析,见表 1。TB-DNA、痰涂片及痰培养结果之间具有一致性,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 γ -IFN 释放试验检测结果与 TB-DNA、痰涂片及痰培养结果之间无明显关联。见表 1。

* 基金项目:江苏省苏州市科学技术局资助项目(SYS201433、SZS201412);江苏省苏州市卫生和计划生育委员会科技项目(LCZX201414)。

△ 通信作者,E-mail:573311485@qq.com。

表 1 各检测指标一致性分析[Kappa 值(P 值)]

项目	γ -IFN 释放试验	TB-DNA	痰涂片	痰培养
γ -IFN 释放试验	1.00(<0.01)	-0.117(0.094)	-0.098(0.124)	-0.098(0.134)
TB-DNA	—	1.00(<0.01)	0.623(<0.01)	0.332(0.003)
痰涂片	—	—	1.00(<0.01)	0.379(<0.01)
痰培养	—	—	—	1.00(<0.01)

注:—表示无数据。

2.2 各方法检测结果的 CD4⁺T 细胞水平比较 各方法检测结果的患者外周血 CD4⁺T 细胞表达水平的统计学分析,见表 2。 γ -IFN 释放试验阳性组 CD4⁺T 细胞的表达明显高于阴性组,差异有统计学意义($P<0.01$);TB-DNA 阴性组 CD4⁺T 细胞的表达高于阳性组,差异有统计学意义($P<0.05$);痰培养阴性组 CD4⁺T 细胞的表达明显高于阳性组,差异有统计学意义($P<0.05$);痰涂片是否阳性或不同阳性程度与 CD4⁺T 细胞的表达无关联($P>0.05$)。

表 2 各方法检测结果的 CD4⁺T 细胞水平比较($\bar{x}\pm s, \%$)

项目	<i>n</i>	CD4 ⁺ T 细胞水平	<i>t</i>	<i>P</i>
γ -IFN 释放试验			3.829	<0.01
阳性	131	377.99±200.74		
阴性	20	217.91±110.59		
TB-DNA			2.004	0.045
阳性	59	333.57±163.16		
阴性	48	404.96±182.87		
痰涂片			5.675	0.339
阴性	89	388.84±208.55		
1~7 条	8	398.93±106.15		
+	23	364.98±197.20		
++	22	362.33±130.83		
+++	28	287.68±151.79		
++++	28	344.84±174.62		
痰培养			0.969	0.333
阳性	109	341.91±162.99		
阴性	89	388.44±208.56		
痰培养			3.011	0.003
阳性	101	329.29±173.39		
阴性	49	425.67±190.61		

注:痰涂片结果,每 300 视野 1~7 条分枝杆菌,实报条数。每 100 视野 3~9 条,报+;每 10 个视野 1~9 条,报++;每个视野 1~9 条,报+++;每个视野 ≥ 10 条,报++++。

3 讨论

结核病是由结核分枝杆菌引起的慢性传染病,可侵及多个脏器,以肺部受累形成肺结核最为常见。随着临床研究的不断深入,目前检测肺结核的方法有很多种,以痰涂片找抗酸杆菌检测、痰培养结核分枝杆菌较为多见,本研究开展 γ -IFN 释放试验、TB-DNA 检测、外周血 CD4⁺T 细胞绝对数检测,并进行综合分析,发现在机体感染结核分枝杆菌时期,上述检测方法的结果与机体免疫状态存在显著相关性。肺结核存在细胞免疫功能低下,免疫功能抑制^[5],而文献^[6]报道 CD4⁺T 细胞对

结核分枝杆菌感染起保护性免疫作用,因此可通过患者 CD4⁺T 细胞绝对数检测对这些测定方法的结果进行一个可行性评价,并为患者的临床免疫治疗提供依据。

本文通过分析 γ -IFN 释放试验、痰涂片找抗酸杆菌检测、TB-DNA 检测及痰培养结核分枝杆菌与外周血 CD4⁺T 细胞绝对数分析,发现 γ -IFN 释放试验阳性组 CD4⁺T 细胞绝对数水平明显高于阴性组,差异有统计学意义($P<0.01$);TB-DNA 阴性组 CD4⁺T 细胞绝对数水平显著高于阳性组,差异有统计学意义($P<0.05$);痰培养阴性组 CD4⁺T 细胞绝对数水平明显高于阳性组,差异有统计学意义($P<0.05$);未发现痰涂片是否阳性或阳性程度不同与 CD4⁺T 细胞绝对数水平有关联($P>0.05$)。

研究已证实,结核病的发生、发展和转归与宿主细胞的免疫功能有密切关系^[7-8]。CD4⁺T 细胞在结核分枝杆菌的细胞免疫应答中占有重要位置,CD4⁺T 细胞表达降低可能是结核病病情加重、排菌数量增加的原因之一^[9];细胞凋亡增强是与结核分枝杆菌反应性 T 细胞数目的减少或缺失同时发生的,从而导致宿主淋巴细胞对结核分枝杆菌的反应低下,也可能导致结核分枝杆菌在宿主体内长期存在^[6,10];CD4⁺T 细胞比例明显降低时结核分枝杆菌难以局限于病灶内^[11],与本研究结果一致。因此,通过对结核病患者外周血 CD4⁺T 细胞水平的检测,及时了解患者的免疫功能异常变化对结核病临床检验和免疫治疗十分必要。根据患者的免疫状况选择相适应的检测方法对临床诊断非常重要,以避免由于实验方法选择不恰当造成临床诊断差错。

参考文献

- [1] Meressa D, Hurtado RM, Andrews JR, et al. Achieving high treatment success for multidrug-resistant TB in Africa: initiation and scale-up of MDR TB care in Ethiopia: an observational cohort study[J]. Thorax, 2015, 70(12): 1181-1188.
- [2] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-508.
- [3] 李剑颖. 了解肺结核[J]. 中华养生保健, 2014, 13(10): 9-11.
- [4] 中华医学会. 临床诊疗指南(结核病分册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 48-50.
- [5] 胥萍, 施美华, 费晓峰, 等. 肺结核患者外周血树突状细胞亚群和 Th 细胞分析与临床意义的研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2010, 30(1): 114-117.
- [6] 胥萍, 施美华, 费晓峰, 等. 肺结核患者外周血中 Th 细胞极化偏移及临床意义分析[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 26(2): 178-181.

[7] 王庆枫, 韩喜琴, 陈玉玲, 等. 肺结核患者 T 淋巴细胞亚群的检测及临床意义[J]. 北京医学, 2013, 35(12): 993-995.
 [8] Sharami SH, Afrakhteh M, Shakiba M. Urinary tract infections in pregnant women with bacterial vaginosis[J]. J Obstet Gynaecol, 2007, 27(3): 252-254.
 [9] Reiley WW, Shafiani S, Wittmer ST, et al. Distinct functions of antigen specific CD4 T cells during murine Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(45): 19408-19413.

[10] 唐神结, 肖和平. 细胞凋亡与结核病[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(7): 477-480.
 [11] Hirsch CS, Toossi Z, Johnson JL, et al. Augmentation of apoptosis and Interferon-gamma production at sites of active mycobacterium tuberculosis infection in human tuberculosis[J]. J Infect Dis, 2001, 183(5): 779-788.

(收稿日期: 2016-08-15 修回日期: 2016-12-21)

• 临床探讨 •

血清及尿液特定蛋白检测在糖尿病肾病早期诊断中的意义

范 瑾

(上海中医药大学附属曙光医院血库, 上海 200021)

摘要:目的 分析血清及尿液特定蛋白检测在糖尿病肾病早期诊断中的意义。方法 选取 62 例 2 型糖尿病且尿常规检测蛋白阴性患者(单纯糖尿病组), 62 例糖尿病肾病患者(糖尿病肾病组)为研究对象, 采集静脉血检测血清 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)、尿微量清蛋白(MA)、尿 α_1 -微球蛋白(α_1 -MG)、尿 β_2 -MG、尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)等指标。另选取 50 名健康体检者作对照研究。**结果** 单纯糖尿病组、糖尿病肾病组血 β_2 -MG、尿 β_2 -MG、MA、 α_1 -MG 水平均明显高于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 糖尿病肾病组血 β_2 -MG、尿 β_2 -MG、MA、 α_1 -MG 水平均明显高于单纯糖尿病组($P < 0.05$); 糖尿病肾病组血 β_2 -MG、尿 β_2 -MG、MA、 α_1 -MG、BUN、Scr 阳性率均明显高于单纯糖尿病组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 血清及尿液中特定微量蛋白检测能早期发现肾损伤, 可为临床早期诊断、治疗糖尿病肾病, 减少疾病迁延提供参考依据。

关键词: 糖尿病肾病; β_2 -微球蛋白; 尿 α_1 -微球蛋白; 尿微量清蛋白; 尿素氮

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.05.034 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)05-0689-02

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最常见的慢性并发症之一, 是终末期肾衰竭的主要原因, 治疗费用高且疗效差, 致残、致死率极高, 严重影响患者的生活质量^[1]。早期 DN 患者常无明显症状和体征, 常规检查尿蛋白多为阴性, 常造成漏诊。而一旦出现临床肾损伤症状, 药物干预难以逆转。因此早期诊断 DN 并进行有效的防治非常重要。血、尿微量蛋白、微球蛋白及尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)等均为临床判断肾小球微血管病变的敏感性指标^[2-3]。本文通过比较糖尿病、DN 患者、健康人群中上述指标的表达差异, 以期临床早期诊断 DN 提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 5 月至 2015 年 12 月本院内分泌科就诊的 62 例 2 型糖尿病且尿蛋白阴性者为单纯糖尿病组, 男 32 例, 女 30 例, 年龄 47~79 岁, 平均(66.14±7.35)岁; 另选取 62 例 DN 患者为 DN 组, 男 34 例, 女 28 例, 年龄 50~79 岁, 平均(67.82±8.16)岁。选取同期在本院健康体检中心检查排除肾功能损伤的 50 例健康体检者作为健康对照组, 男 26 例, 女 24 例, 年龄 49~77 岁, 平均(62.35±6.74)岁。2 型糖尿病及 DN 诊断均参照《内科学》中相关标准^[4], 排除高血压、心力衰竭、肿瘤及其他非 DN 患者。

1.2 方法

1.2.1 血液及尿液标本的收集处理 采集所有对象的清晨空腹静脉血 5 mL, 凝固后 3 000 r/min 离心 10 min(离心半径为 3 cm), 取血清保存待检。留取所有对象 24 h 尿液, 加入盐酸防腐, 混匀后留取 20 mL 备用。尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)检测前将尿标本 pH 值调至 6.0~7.5。

1.2.2 检测 (1)血 β_2 -MG 检测采用 LUMO 半自动化学发光仪及日立高新技术公司生产的试剂盒, 检测方法为化学发光法。正常参考值范围为 0~2.2 $\mu\text{g/mL}$ 。(2)尿 β_2 -MG 测定采用上海日环所生产的 γ -计数器, 试剂盒购自北京北方生物技术研究所, 检测方法为放射免疫法。正常参考值范围为 0~7.82 $\mu\text{g/h}$ 。(3)尿微量清蛋白(MA)、尿 α_1 -微球蛋白(α_1 -MG)检测采用 Beckman 公司 Image800 全自动散射比浊仪及配套的试剂盒, 检测方法为散射速率比浊法。正常参考值 MA 为 0~21.15 mg/24 h, α_1 -MG 为 0~14.09 mg/24 h。(4)BUN 正常参考值为 1.7~8.3 mmol/L, Scr 44~144 mmol/L。各项指标检测均严格按试剂盒说明书进行, 若超出正常参考值范围, 则视为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清及尿特定蛋白的测定结果比较 单纯糖尿病组、DN 组的血 β_2 -MG、尿 β_2 -MG、MA、 α_1 -MG 水平明显高于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); DN 组各项特定蛋白的水平均明显高于单纯糖尿病组($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 各组微量蛋白与 BUN、Scr 阳性率比较 健康对照组各项微量蛋白及 BUN、Scr 检测的阳性率为 0。DN 组血 β_2 -MG、尿 β_2 -MG、MA、 α_1 -MG、BUN、Scr 阳性率均明显高于单纯糖尿病组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。