

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.11.014

布鲁氏菌病患者外周血 T 淋巴细胞表面 BTLA、LAG-3 及相关细胞因子的临床意义*

贾金彤¹, 陈梦思¹, 朱晓玉¹, 王 倩², 卢佩佩², 王玲玲², 李智伟^{2△}

1. 石河子大学医学院, 新疆石河子 832003; 2. 新疆维吾尔自治区人民医院临床检验中心, 新疆乌鲁木齐 830001

摘 要:目的 检测急性、慢性布鲁氏菌病(以下简称布病)患者 T 淋巴细胞表面 B、T 淋巴细胞衰减因子(BTLA), 淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)占比以及血清白细胞介素(IL)-2、IL-18 和干扰素(IFN)- γ 水平, 探讨临床意义。**方法** 选择 2023 年 3 月 1 日至 12 月 31 日就诊于新疆维吾尔自治区人民医院的布病患者 50 例为研究对象, 分为急性布病组(25 例)、慢性布病组(25 例)。另选取同期体检的 30 例健康人群作为健康对照组。采用流式细胞术检测各组外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD45RA⁺、CD4⁺CD45RA⁻、CD8⁺CD45RA⁺、CD8⁺CD45RA⁻ T 淋巴细胞表面 BTLA 和 LAG-3 的表达。采用流式液相多重蛋白定量实验(CBA)技术检测各组血清 IL-2、IL-18 和 IFN- γ 水平。**结果** 与健康对照组相比, 急性布病组、慢性布病组 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 和 LAG-3 占比均升高($P < 0.05$), 且慢性布病组 BTLA 高于急性布病组($P < 0.05$)。与健康对照组相比, 急性布病组 CD8⁺CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比升高($P < 0.05$), CD4⁺CD45RA⁻ T 淋巴细胞、CD4⁺CD45RA⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺CD45RA⁻ T 淋巴细胞和 CD8⁺CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比升高($P < 0.05$)。与健康对照组相比, 急性布病组、慢性布病组的 IL-18 和 IFN- γ 水平显著升高($P < 0.05$), 且急性布病组高于慢性布病组($P < 0.05$); 与健康对照组相比, 急性布病组 IL-2 水平升高($P < 0.05$), 慢性布病组差异无统计学意义($P > 0.05$)。BTLA、LAG-3、IL-2、IL-18 和 IFN- γ 诊断布病分期的曲线下面积分别为 0.786、0.736、0.779、0.694、0.932。**结论** 布病患者外周血 T 淋巴细胞表面 BTLA、LAG-3 占比及血清 IL-2、IL-18 和 IFN- γ 表达水平升高, 这可能是布鲁氏菌慢性持续感染的原因。

关键词: 布鲁氏菌病; B、T 淋巴细胞衰减因子; 淋巴细胞活化基因-3; 感染; T 淋巴细胞

中图分类号: R516.7; R446.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2025)11-1513-07

Clinical significance of BTLA, LAG-3 on peripheral blood T lymphocytes and related cytokines in patients with brucellosis*

JIA Jintong¹, CHEN Mengsi¹, ZHU Xiaoyu¹, WANG Qian², LU Peipei², WANG Lingling², LI Zhiwei^{2△}

1. School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China;

2. Clinical Laboratory Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830001, China

Abstract: Objective To detect the proportions of B and T lymphocyte attenuator (BTLA) and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) expressed on the surface of T lymphocytes in patients with acute and chronic brucellosis, as well as the serum levels of interleukin (IL)-2, IL-18 and interferon-gamma (IFN- γ), and to explore their clinical significance. **Methods** A total of 50 patients with brucellosis who received treatment at the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region from March 1, 2023 to December 31, 2023 were enrolled in the study. The patients were divided into the acute brucellosis group (25 cases) and chronic brucellosis group (25 cases). In addition, 30 healthy individuals undergoing routine physical examinations during the same period were selected as the healthy control group. Flow cytometry was used to detect the expression of BTLA and LAG-3 on the surface of peripheral blood T lymphocyte subsets, including CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD45RA⁺, CD4⁺CD45RA⁻, CD8⁺CD45RA⁺ and CD8⁺CD45RA⁻ T cells. The serum levels of IL-2, IL-18 and IFN- γ were measured using a cytometric bead array (CBA)-based multiplex protein quantification as-

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金杰出青年科学基金项目(2022D01E30); 新疆维吾尔自治区“天山英才”培养计划(2022TSYCCX0102); 新疆维吾尔自治区科技支疆计划(2022E02118); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2024D101C86, 2023D01C83, 2023D01C84)。

作者简介: 贾金彤, 女, 在读硕士研究生, 主要从事布鲁氏菌病免疫机制方向的研究。 △ 通信作者, E-mail: 13899994455@163.com。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20250513.1624.004.html>(2025-05-14)

say. **Results** The proportions of BTLA and LAG-3 expression on the surface of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes in both the acute brucellosis group and chronic brucellosis group were significantly higher than those in the healthy control group ($P < 0.05$). Moreover, the proportions of BTLA in the chronic brucellosis group were significantly higher than those in the acute brucellosis group ($P < 0.05$). The proportion of BTLA expression on $CD8^+CD45RA^+$ T lymphocytes significantly increased in the acute brucellosis group compared with the healthy controls ($P < 0.05$). The proportion of LAG-3 expression on $CD4^+CD45RA^-$, $CD4^+CD45RA^+$, $CD8^+CD45RA^-$ and $CD8^+CD45RA^+$ T lymphocytes in the acute group was also significantly higher than those in the healthy control group ($P < 0.05$). Serum levels of IL-18 and IFN- γ significantly elevated in the acute brucellosis group and chronic brucellosis group, compared with the healthy control group ($P < 0.05$). The levels of IL-18 and IFN- γ in the acute brucellosis group were significantly higher than those in the chronic brucellosis group ($P < 0.05$). Serum IL-2 level in the acute brucellosis group was significantly higher than that in healthy control group ($P < 0.05$). No significant difference in IL-2 levels was observed between the chronic brucellosis group and healthy control group ($P > 0.05$). The area under the receiver operating characteristic curve for distinguishing disease stages were 0.786 for BTLA, 0.736 for LAG-3, 0.779 for IL-2, 0.694 for IL-18, and 0.932 for IFN- γ respectively. **Conclusion** Elevated proportions of BTLA and LAG-3 expression on peripheral blood T lymphocytes, along with increased serum levels of IL-2, IL-18 and IFN- γ , may contribute to the chronic and persistent infection observed in patients with brucellosis.

Key words: brucellosis; B and T lymphocyte attenuator lymphocyte activation gene-3; infection; T lymphocytes

布鲁氏菌病(以下简称布病)是布鲁氏菌感染人或动物后引起的全球常见的人畜共患传染病^[1]。布病主要在畜牧业发达地区流行,研究表明,全球每年有 50 万新发病例,新疆是该病的高发地区之一^[2-3]。对于发展中国家,布病是一个持续存在的公共卫生挑战,不仅对畜牧业的发展产生负面影响,造成经济损失,还严重危害人类的身心健康。布鲁氏菌感染宿主后,会诱发一系列复杂的免疫应答,其中 T 淋巴细胞介导的细胞免疫在这一过程中发挥着关键作用^[4]。

研究发现,布鲁氏菌能够在宿主体内长期存活并逃避免疫系统的清除,主要机制可能与免疫细胞的耗竭有关^[5]。B、T 淋巴细胞衰减因子(BTLA)是重要的免疫检查点分子,主要表达在活化的 T 淋巴细胞上,属于 CD28 超家族的一员^[6]。其配体为疱疹病毒侵入介体(HVEM),属于肿瘤坏死因子受体超家族,BTLA 和 HVEM 结合后,负性调控 T 淋巴细胞的免疫应答^[7]。淋巴细胞活化基因-3(LAG-3)属于免疫球蛋白超家族的一员,是一种跨膜糖蛋白,也是近年来发现的一种免疫细胞负性调控因子,通常在活化的 T 淋巴细胞、调节性 T 淋巴细胞(Tregs)、自然杀伤(NK)细胞、B 淋巴细胞上表达^[8]。当 LAG-3 与其配体主要组织相容性复合体 II 类分子(MHC-II)高亲和力结合后,LAG-3 细胞质结构域会传递抑制信号,抑制 T 淋巴细胞增殖与分化,促进 T 淋巴细胞凋亡,从而发挥免疫抑制的作用^[9]。布鲁氏菌作为细胞内寄生菌,侵入机体后在吞噬细胞内存活和繁殖,并依靠特定的免疫逃逸机制不被机体清除,最终导致慢性持续感染^[10-11]。其中白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-18

(IL-18)和干扰素- γ (IFN- γ)作为重要的细胞因子,参与了布鲁氏菌感染后机体的免疫应答^[12-13]。但 BTLA、LAG-3 和相关细胞因子与该病患者疾病进展的关系鲜有报道,基于此,本研究采用流式细胞术检测布病患者 BTLA、LAG-3 占比及 IL-2、IL-18、IFN- γ 的表达水平,分析其与疾病进展的关联,从而为该病的治疗提供新的思路和方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2023 年 3 月 1 日至 12 月 31 日就诊于新疆维吾尔自治区人民医院的布病患者 50 例作为研究对象,将病程 < 3 个月的患者纳入急性布病组(25 例),病程 > 6 个月的患者纳入慢性布病组(25 例)。所有患者均符合《布鲁氏菌病诊断:WS 269—2019》^[14]中的相关诊断标准。纳入标准:(1)有流行病学接触史;(2)血清学检查虎红平板凝集试验(RBPT)阳性,试管凝集试验(SAT)检测抗体滴度 $\geq 1:100$,伴有血培养结果阳性;(3)临床资料完整。排除标准:(1)合并结核、风湿等发热性疾病的患者;(2)合并自身免疫性疾病和免疫缺陷的患者;(3)近 3 个月服用过糖皮质激素或免疫抑制剂的患者;(4)伴有呼吸、循环、神经等其他系统严重疾病的患者;(5)处于妊娠期的女性和年龄 < 18 岁的人群。另选取同期体检的 30 例健康人作为健康对照组。本研究已获得新疆维吾尔自治区人民医院医学伦理学委员会批准(KY2023060171),所有研究对象均签署知情同意书。健康对照组、急性布病组、慢性布病组的年龄、性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪(美国 BD 公司,型号:

BD FACSLyric,用于检测 BTLA 和 LAG-3;深圳唯公生物科技有限公司,型号:EasyCell 206A1,用于检测 IL-2、IL-18 和 IFN- γ)。主要试剂包括 CD3-APC-CyTM7(美国 BD 公司,批号:557832)、CD4-FITC(美国 BD 公司,批号:555346)、CD8-PerCP-CyTM5.5(美国 BD 公司,批号:565310)、BTLA-PE/Cyanine7(美国 BD 公司,批号:344516)、LAG-3-BV421(美国 BD 公司,批号:565720)、CD45RA⁻ BV510(美国 BD 公司,批号:560673)、溶血素(美国 BD 公司,批号:349202)、鞘液(迈瑞公司生产,批号:342003)、细胞因子检测试剂(深圳唯公生物科技有限公司,批号:20240501)。

表 1 健康对照组、急性布病组和慢性布病组一般资料比较(*n*/*n* 或 $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	性别(男/女)	年龄(岁)
健康对照组	30	19/11	50.17±13.06
急性布病组	25	18/7	52.94±12.62
慢性布病组	25	16/9	51.95±14.31
χ^2/F	2.036		0.510
<i>P</i>	>0.05		>0.05

1.3 方法

1.3.1 标本收集与处理 采集所有研究对象静脉血置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,充分混匀后,进行流式细胞术检测;同时采集静脉血于不含抗凝剂的采血管中,3 000 r/min 离心 15 min 后,将上清液转移至 EP 管中,放置-80 ℃冰箱中储存,用于流式液相多重蛋白定量实验(CBA)。

1.3.2 BTLA 和 LAG-3 检测 吸取外周血标本 100 μ L,分别加入 CD3-APC-CyTM7 3 μ L,CD4-FITC 2 μ L,CD8-PerCP-CyTM5.5 4 μ L,BTLA-PE/Cyanine7 5 μ L,LAG-3-BV421 6 μ L,CD45RA⁻ BV510 8 μ L。混匀避光温育 15 min,加入溶血素裂解红细胞后 1 500 r/min 离心 5 min,去上清液,加入磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,1 500 r/min 离心 5 min 去上清液。加入 200 μ L PBS 混匀后,采用 BD FACSLyric 流式细胞仪进行检测,使用 Flowjo 软件进行数据分析。首先,根据正向散射(FSC)和侧向散射(SSC)设门圈出淋巴细胞群,再用 SSC 和 CD3 设门圈出 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞,在 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞群中,分析 BTLA 和 LAG-3 占比。然后,分析 CD4⁺ CD45RA⁻/CD45RA⁺、CD8⁺ CD45RA⁻/CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 和 LAG-3 占比。

1.3.3 血清 IL-2、IL-18、IFN- γ 水平检测 利用 CBA 对血清 IL-2、IL-18 和 IFN- γ 水平进行检测。取出一80 ℃下储存的标本进行解冻,吸取 50 μ L 微球悬液和 50 μ L 血清标本充分混匀后,室温避光温育 1 h;磁分离去上清液,加入 100 μ L 荧光标记抗体,充分混

匀,室温避光温育 1 h;磁分离去上清液,用 200 μ L 磁珠稀释液清洗 1 次,再次磁分离,用 200 μ L 磁珠稀释液重悬微球,采用流式细胞仪进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析。采用 GraphPad Prism8.0 软件进行图片绘制。符合正态分布且方差齐性的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用 SNK-*q* 法进行两两比较;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25},P_{75})$ 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,采用 Dunn's test 进行两两比较。绘制受试者工作特征(ROC)曲线,计算曲线下面积(AUC),分析各指标对布病分期的诊断效能。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 急性布病患者最常见的临床症状是发热(48%),其次是乏力(44%)、关节疼痛(32%)、淋巴结肿大(32%)、肝脾肿大(20%)、寒战(12%)和盗汗(4%);慢性布病患者最常见的临床症状是关节疼痛(44%),其次是发热(40%)、乏力(24%)、肝脾肿大(24%)、淋巴结肿大(16%)、盗汗(12%)和寒战(4%)。

2.2 3 组 BTLA 占比比较 与健康对照组比较,急性布病组、慢性布病组 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比均明显升高($P<0.05$),且慢性布病组高于急性布病组($P<0.05$)。见表 2、图 1。

表 2 3 组 BTLA 占比比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ T 淋巴细胞 表面 BTLA 占比	CD4 ⁺ T 淋巴细胞 表面 BTLA 占比	CD8 ⁺ T 淋巴细胞 表面 BTLA 占比
健康对照组	30	3.02±2.02	7.31±2.26	3.12±1.51
急性布病组	25	18.51±5.37 [*]	21.40±7.71 [*]	17.00±4.67 [*]
慢性布病组	25	30.40±15.23 ^{*#}	38.55±19.41 ^{*#}	25.59±9.85 ^{*#}
<i>F</i>		62.66	48.26	108.66
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$;与急性布病组比较,# $P<0.05$ 。

2.3 3 组 LAG-3 占比比较 与健康对照组相比,急性布病组、慢性布病组 CD3⁺ T 淋巴细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与急性布病组相比,慢性布病组 CD4⁺ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比升高($P<0.05$)。见表 3、图 2。

2.4 3 组 CD4⁺ CD45RA⁻、CD4⁺ CD45RA⁺、CD8⁺ CD45RA⁻、CD8⁺ CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比比较 与健康对照组相比,急性布病组、慢性布病组 CD8⁺ CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),而 3 组 CD4⁺ CD45RA⁻、CD4⁺ CD45RA⁺、CD8⁺ CD45RA⁻ T 淋巴

细胞表面 BTLA 占比比较,差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 4。

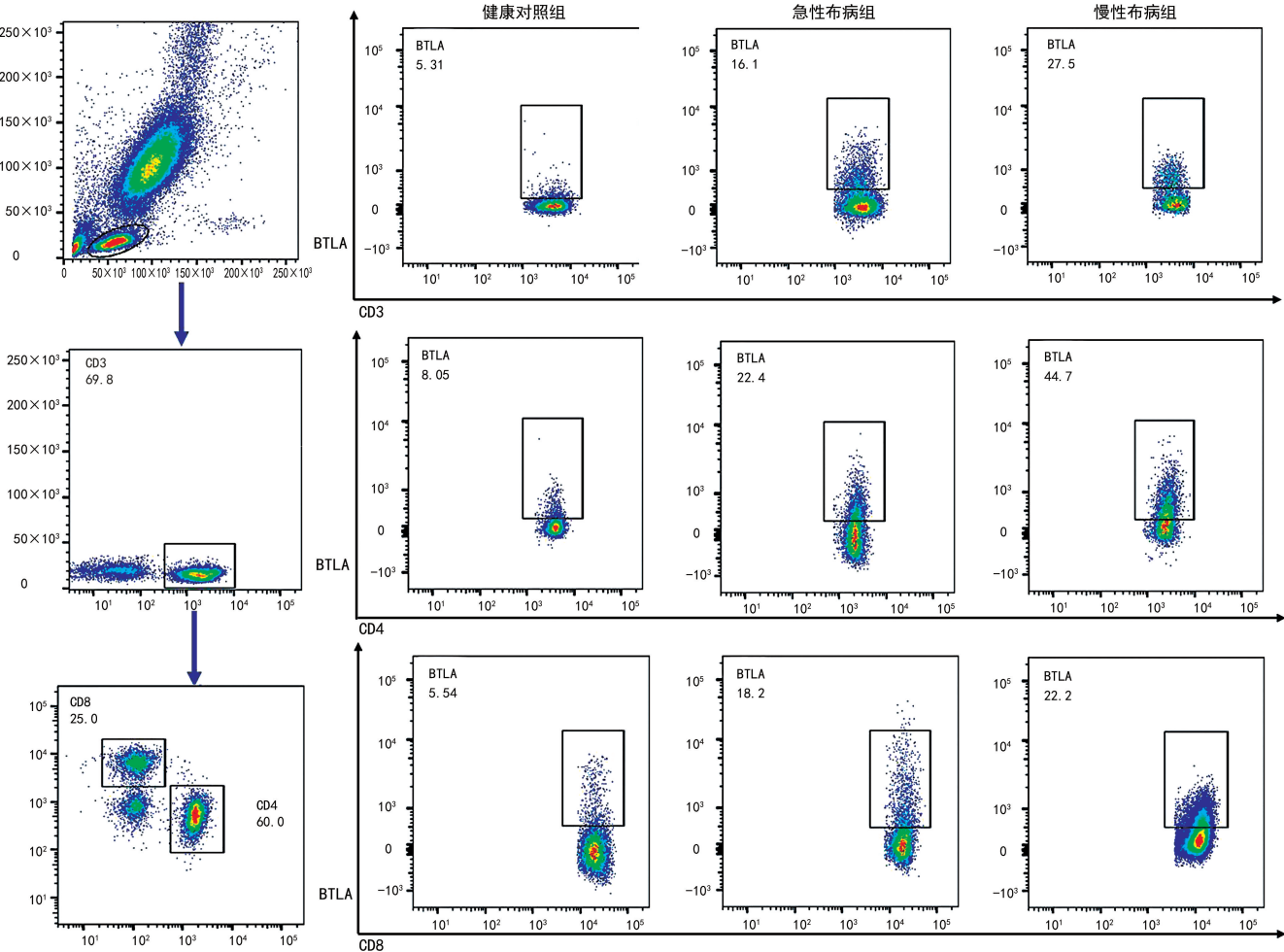


图 1 健康对照组、急性布病组和慢性布病组 BTLA 流式细胞术检测结果

表 3 3 组 LAG-3 占比比较($\bar{x}\pm s, \%$)			
组别	<i>n</i>	CD8 ⁺ T 淋巴细胞 表面 LAG-3 占比	CD4 ⁺ T 淋巴细胞 表面 LAG-3 占比
健康对照组	30	6.62±3.33	4.59±2.10
急性布病组	25	17.62±7.75*	17.15±6.21*
慢性布病组	25	24.19±11.23*	25.06±9.85*#
<i>F</i>		35.07	67.10
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$;与急性布病组比较,# $P<0.05$ 。

2.5 3 组 CD4⁺CD45RA⁻、CD4⁺CD45RA⁺、CD8⁺CD45RA⁻、CD8⁺CD45RA⁺T 淋巴细胞表面 LAG-3

占比比较 与健康对照组相比,急性布病组 CD4⁺CD45RA⁻、CD4⁺CD45RA⁺、CD8⁺CD45RA⁻、CD8⁺CD45RA⁺T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比升高,慢性布病组 CD4⁺CD45RA⁻T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 5。

2.6 3 组血清细胞因子水平比较 与健康对照组相比,急性布病组、慢性布病组 IL-18 和 IFN- γ 水平均升高,急性布病组 IL-18 和 IFN- γ 水平高于慢性布病组,差异均有统计学意义($P<0.05$);与健康对照组比较,急性布病组 IL-2 水平升高($P<0.05$),而慢性布病组差异无统计学意义($P>0.05$)。急性布病组 IL-2 水平高于慢性布病组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 6。

表 4 3 组 CD4 ⁺ CD45RA ⁻ 、CD4 ⁺ CD45RA ⁺ 、CD8 ⁺ CD45RA ⁻ 、CD8 ⁺ CD45RA ⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比比较 [$M(P_{25}, P_{75}), \%$]				
组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T 淋巴 细胞表面 BTLA 占比	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比	CD8 ⁺ CD45RA ⁻ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比
健康对照组	30	6.47(2.65,14.13)	5.14(0.13,9.91)	3.82(0.88,10.20)
急性布病组	25	23.30(3.39,43.90)	10.00(0.10,28.60)	10.20(0.87,19.60)

续表 4 3 组 CD4⁺CD45RA⁻、CD4⁺CD45RA⁺、CD8⁺CD45RA⁻、CD8⁺CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比比较 [M(P₂₅, P₇₅), %]

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比	CD8 ⁺ CD45RA ⁻ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比
慢性布病组	25	22.25(10.38,31.75)	4.67(0.10,16.40)	10.20(5.15,15.68)	3.23(0.03,11.16) *
<i>H</i>		5.37	2.72	2.76	12.49
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05	<0.01

注:与健康对照组比较, * *P*<0.05。

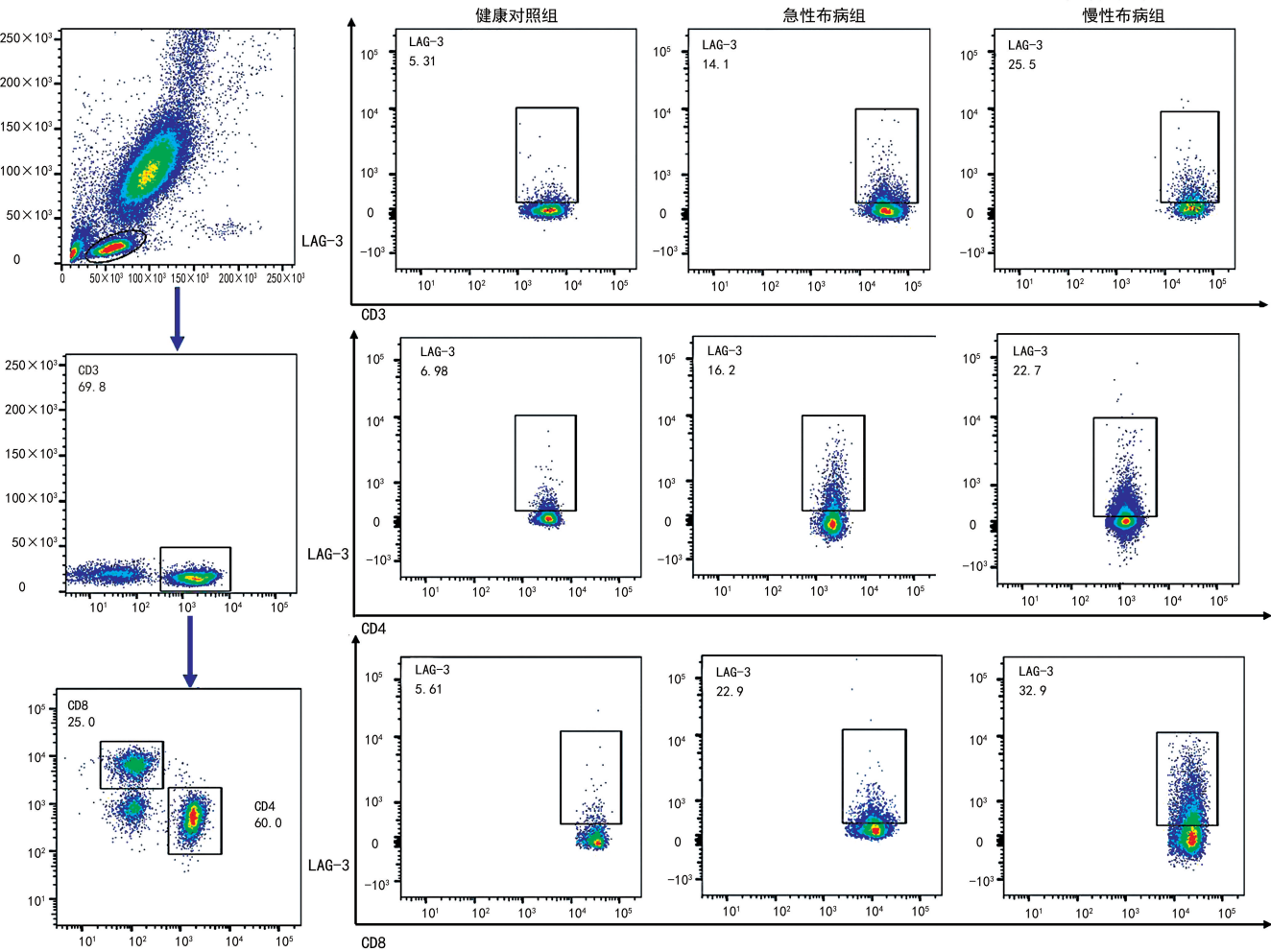


图 2 健康对照组、急性布病组和慢性布病组 LAG-3 流式细胞术检测结果

表 5 3 组 CD4⁺CD45RA⁻、CD4⁺CD45RA⁺、CD8⁺CD45RA⁻、CD8⁺CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比比较 [M(P₂₅, P₇₅), %]

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比	CD8 ⁺ CD45RA ⁻ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比
健康对照组	30	3.08(2.18,5.85)	3.08(0.75,6.08)	12.40(5.48,23.83)	1.09(0.54,3.49)
急性布病组	25	15.70(7.39,25.30) *	16.00(2.75,44.45) *	32.30(15.95,74.45) *	13.20(2.02,33.90) *
慢性布病组	25	10.20(7.25,12.40) *	4.69(0.62,14.82)	18.95(10.76,35.00)	10.13(0.81,24.90)
<i>H</i>		27.22	7.73	11.41	11.16
<i>P</i>		<0.001	<0.05	<0.01	<0.01

注:与健康对照组比较, * *P*<0.05。

2.7 BTLA、LAG-3 及细胞因子对布病分期的诊断价值 为进一步评估上述指标在区分急性布病和慢

性布病中的效能,将 BTLA、LAG-3 及细胞因子作为检验变量,急性和慢性布病作为状态变量,对其进行

ROC 曲线分析。结果显示,BTLA、LAG-3、IL-2、IL-18 和 IFN- γ 在区分急性和慢性布病患者的 AUC 分别为 0.786、0.736、0.694、0.779、0.932,其中 IFN- γ 的 AUC 最大。见图 3、表 7。

表 6 3 组血清细胞因子水平比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL)				
组别	n	IL-2	IL-18	IFN- γ
健康对照组	30	4.13 $\pm$ 1.64	42.93 $\pm$ 12.80	0.67 $\pm$ 0.18
急性布病组	25	7.22 $\pm$ 3.23 [*]	80.53 $\pm$ 33.17 [*]	9.76 $\pm$ 2.47 [*]
慢性布病组	25	4.31 $\pm$ 1.79 [#]	60.55 $\pm$ 12.77 ^{*#}	5.38 $\pm$ 1.98 ^{*#}
F		13.96	20.26	162.63
P		<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康对照组比较,^{*} $P<0.05$;与急性布病组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 7 BTLA、LAG-3、IL-2、IL-18 和 IFN- γ 对布病分期的诊断效能						
项目	AUC(95%CI)	最佳截断值	P	灵敏度(%)	特异度(%)	约登指数
BTLA	0.786(0.648~0.925)	30.60%	0.001	68.0	88.0	0.560
LAG-3	0.736(0.597~0.875)	21.95%	0.004	60.0	84.0	0.440
IL-2	0.779(0.652~0.906)	4.97 pg/mL	0.001	68.0	80.0	0.480
IL-18	0.694(0.553~0.844)	76.56 pg/mL	0.016	44.0	92.0	0.360
IFN- γ	0.932(0.880~0.999)	6.74 pg/mL	<0.001	92.0	76.0	0.680

3 讨论

布病是一种感染布鲁氏菌后引起多种临床症状的人畜共患疾病,在全球范围内广泛传播。布鲁氏菌可经皮肤、黏膜等多种途径感染人体,其发病机制复杂,治疗困难,若未及时干预,易进展至慢性期,不仅对公共卫生健康造成重大威胁,同时也对社会经济发展造成较大影响^[15]。因此,明确布鲁氏菌感染在不同阶段对免疫系统的影响,有助于临床医师更早地采取有效措施,减少急性布病患者发展为慢性的可能性,为治疗提供帮助。

研究表明,布鲁氏菌感染机体后导致免疫细胞稳态失调,免疫功能被抑制,这使得其在宿主细胞内存存和复制,并通过各种方法来逃避宿主的免疫反应,导致布病的迁延不愈^[16-17]。作为重要的免疫检查点分子,BTLA 和 LAG-3 通过传递抑制性信号,减弱了 T 淋巴细胞的免疫功能。既往研究表明,在乙型肝炎患者的外周血单个核细胞中,BTLA 在 CD4⁺ T 淋巴细胞表面占比增加,这可能减弱对病毒的免疫反应,从而增加疾病的易感性^[18]。在活动性肺结核患者中,LAG-3 在 CD8⁺ T 淋巴细胞上的占比升高,通过与其配体 MHC-II 的高亲和力结合,导致 T 淋巴细胞功能缺陷,促进肺结核的发生。此外,阻断 LAG-3 可以恢复 T 淋巴细胞的功能,表明 LAG-3 在调控 T 淋巴细胞活性中起关键的负向调节作用^[19]。本研究分别检测了急性、慢性布病患者和健康对照者外周血中 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 和 LAG-3 的表达情况,发现与健康对照者相比,急性、慢性布病患者中 BTLA 和 LAG-3 占比升高,且慢性布病患者 BTLA 占比显著高于急性布病患者,这一结果表明布病患者外周血 T 淋巴细胞表面 BTLA 和

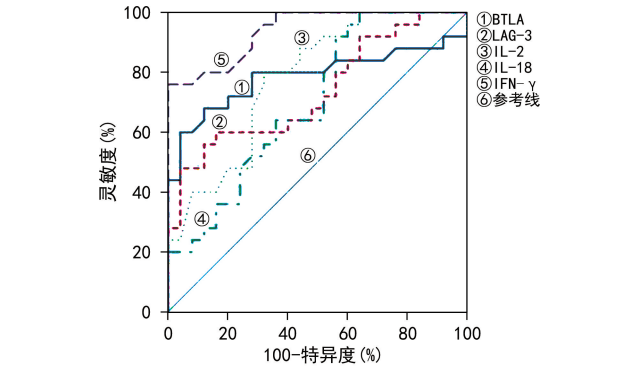


图 3 BTLA、LAG-3、IL-2、IL-18、IFN- γ 诊断布病分期的 ROC 曲线

LAG-3 的表达上调,推测在布病感染过程中 BTLA 和 LAG-3 发挥重要的负性调控作用,通过与其相应配体结合,抑制免疫细胞活化,降低机体清除布鲁氏菌的能力,使布鲁氏菌能够实现免疫逃逸,从而导致慢性持续性感染^[20]。

CD45RA⁺ T 淋巴细胞即初始 T 淋巴细胞,经抗原特异性刺激后,可转变为 CD45RA⁻ T 淋巴细胞(记忆 T 淋巴细胞),当再次暴露于相同抗原时能迅速参与对特异性抗原的有效应答^[21]。既往研究结果显示,在人类免疫缺陷病毒(HIV)感染早期 CD45RA⁻ 和 CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 表达升高,于慢性期降低^[22]。本研究结果显示,与健康对照组相比,急性、慢性布病组 CD8⁺ CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 BTLA 占比升高,急性布病组 CD4⁺ CD45RA⁻、CD4⁺ CD45RA⁺、CD8⁺ CD45RA⁻ 和 CD8⁺ CD45RA⁺ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比升高;慢性布病组 CD4⁺ CD45RA⁻ T 淋巴细胞表面 LAG-3 占比升高。笔者推测,在布病感染的急性期,大量布鲁氏菌刺激淋巴细胞分化和成熟,并发挥其效应功能,BTLA 和 LAG-3 作为免疫负性调控因子,其表达为反馈性升高,以防止免疫反应过度激活。而在持续慢性感染阶段,局部或整体免疫应答出现失衡或异常激活,LAG-3 占比升高使得 CD4⁺ CD45RA⁻ T 淋巴细胞处于耗竭状态,随着机体免疫应答能力降低,在长期慢性感染中,局部或整体免疫应答出现失衡或异常激活,部分 T 淋巴细胞出现耗竭,难以有效清除布鲁氏菌,最终导致布病迁延不愈。

既往研究结果显示,在布病感染急性期,机体的免疫系统启动,辅助性 T 细胞(Th)1 细胞被激活,分泌大量的细胞因子,而在慢性期会出现 Th1/Th2 的

比例失衡, Th1 功能减弱, 其分泌的细胞因子水平较急性期降低, 导致布病的慢性进展^[23]。本研究通过检测布病患者血清中 IL-2、IL-18 和 IFN- γ 水平发现, 与健康对照组相比, 急性布病组、慢性布病组血清 IL-18 和 IFN- γ 水平升高, 且在急性期水平更高。由此推测, 在布病的早期阶段, Th1 对于抗感染应答起主要作用, 随着疾病的进展, Th2 开始出现并逐渐占据优势。在慢性布病患者中, Th1 免疫反应减弱, 分泌 IL-2、IL-18 和 IFN- γ 等细胞因子能力减弱, 导致布鲁氏菌无法被完全清除从而发生免疫逃逸。另外, IL-18 作为促炎性细胞因子, 可以诱导 IFN- γ 的分泌, 从而参与清除病原体的过程。

本研究通过 ROC 曲线分析外周血 T 淋巴细胞 BTLA、LAG-3, 以及血清 IL-2、IL-18 和 IFN- γ 对布病分期的诊断意义, 结果发现 IFN- γ 的曲线下面积为 0.932, 提示 IFN- γ 对鉴别诊断急性和慢性布病有重要价值。布病患者细胞因子水平存在差异, 动态监测细胞因子水平有利于判断疾病进展。

综上所述, 在布病感染过程中, 综合分析免疫检查点 BTLA 和 LAG-3 占比, 并结合血清炎症细胞因子 IL-2、IL-18 和 IFN- γ 检测, 对于布病的诊断及分期诊断具有重要意义。另外, 通过免疫方法阻断 BTLA 和 LAG-3 恢复免疫细胞的功能, 有望成为治疗布病的新靶点, 为布病免疫治疗提供了新的思路和视角。此外, 由于收集样本困难导致本研究样本量较少, 后续研究将持续收集样本进行验证。

参考文献

[1] QIN Y, ZHOU G, JIAO F, et al. Brucella mediates autophagy, inflammation, and apoptosis to escape host killing [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1408407.

[2] LAINE C G, JOHNSON V E, SCOTT H M, et al. Global estimate of human brucellosis incidence[J]. *Emerg Infect Dis*, 2023, 29(9): 1789-1797.

[3] LIN Z Q, LIN G Y, HE W W, et al. IL-6 and INF- γ levels in patients with brucellosis in severe epidemic region, Xinjiang, China[J]. *Infect Dis Poverty*, 2020, 9(1): 47.

[4] ZHENG R J, XIE S S, NIYAZI S N, et al. Meta-analysis of the changes of peripheral blood T cell subsets in patients with brucellosis[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 8439813.

[5] 郭文宏, 谢忻汝, 古丽沙提·海米提, 等. 布鲁菌病患者 CD4⁺T 细胞 Tim-3 及其相关细胞因子的表达及临床意义[J]. *中国热带医学*, 2024, 24(4): 433-437.

[6] NING Z C, LIU K Y, XIONG H B. Roles of BTLA in immunity and immune disorders[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 654960.

[7] SORDO-BAHAMONDE C, LORENZO-HERRERO S, MARTÍNEZ-PÉREZ A, et al. BTLA dysregulation correlates with poor outcome and diminished T cell-mediated antitumor responses in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2023, 72(7): 2529-2539.

[8] AGGARWAL V, WORKMAN C J, VIGNALI D A A. LAG-3 as the third checkpoint inhibitor[J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(9): 1415-1422.

[9] MARUHASHI T K, SUGIURA D, OKAZAKI I M, et al. LAG-3: from molecular functions to clinical applications[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e001014.

[10] 李智伟, 早克然·阿力肯, 等. IL-33 介导 Treg 细胞功能参与布鲁氏菌免疫调节机制研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2024, 45(18): 2184-2188.

[11] 李智伟, 王倩, 王玲玲, 等. 中性粒细胞 CD64 指数在布鲁菌病中的临床应用价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2024, 45(13): 1541-1545.

[12] TANG Y X, MA C J, SUN H L, et al. Serum levels of seven general cytokines in acute brucellosis before and after treatment [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 5501-5510.

[13] SU X, ZHAO S G, SONG Y J. Expression of NLRP3 and AIM2 inflammasome in Peripheral blood in Chinese patients with acute and chronic brucellosis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 15123.

[14] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 布鲁氏菌病诊断: WS269—2019[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 2019.

[15] 李智伟, 王玲玲, 李书灵, 等. 新疆维吾尔自治区布鲁氏菌病流行病学及临床特征分析[J]. *中华地方病学杂志*, 2024, 43(7): 575-579.

[16] AMJADI O, RAFIEI A, MARDANI M, et al. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis [J]. *Infect Dis (Auckl)*, 2019, 51(5): 321-333.

[17] 刘亚敏, 郑晓雅, 王雨萍, 等. $\gamma\delta$ T 细胞在慢性布鲁氏菌病患者外周血中的数量变化分析[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2020, 38(8): 570-572.

[18] YU X P, YANG F F, SHEN Z L, et al. BTLA contributes to acute-on-chronic liver failure infection and mortality through CD4⁺ T-cell exhaustion[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 1835.

[19] CHEN J, XU J C, NIU Y A, et al. The elevated expression of LAG-3 on CD8⁺ T cells correlates with disease severity of pulmonary TB[J]. *Microb Pathog*, 2023, 179: 106089.

[20] 庞盼, 甫拉提·热西提, 贾斌, 等. 负性协同刺激分子 PD-1 和 Tim-3 及细胞因子在布鲁氏菌病中的变化[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(11): 979-984.

[21] AHMED M G T, LIMMER A, HARTMANN M. CD45RA and CD45RO are regulated in a cell-type specific manner in inflammation and sepsis[J]. *Cells*, 2023, 12(14): 1873.

[22] 胡斯文, 张子宁, 何磊, 等. HIV 早期和慢性感染者不同亚群 T 细胞 BTLA 的表达[J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 27(7): 657-661.

[23] 李智伟, 沙桐, 蔺志强, 等. IL-33 和 ST2 在急慢性布鲁氏菌病中的变迁[J]. *新疆医科大学学报*, 2020, 43(3): 291-294.