

cient isolation of cancer cells from whole blood using a microfluidic device[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(9): 4199-4206.

[20] Wan Y, Tan J, Asghar W, et al. Velocity effect on aptamer-based circulating tumor cell isolation in microfluidic devices[J]. *J Phys Chem B*, 2011, 115(47): 13891-13896.

[21] Flores LM, Kindelberger DW, Ligon AH, et al. Improving the yield of circulating tumour cells facilitates molecular characterisation and recognition of discordant HER2 amplification in breast Cancer[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(10): 1495-1502.

[22] Zhu J, Nguyen T, Pei R, et al. Specific capture and temperature-mediated release of cells in an aptamer-based microfluidic device[J]. *Lab Chip*, 2012, 12(18): 3504-3513.

[23] Zhang ZY, Guo L, Guo AT, et al. In vitro lectin-mediated selection and characterization of rHuEPO- α -binding ssDNA aptamers[J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(22): 8016-8025.

[24] Thirstrup D, Baird GS. Histochemical application of a peroxidase DNAzyme with a covalently attached heme cofactor[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(6): 2498-2504.

[25] Sun J, Guo A, Zhang Z, et al. A conjugated aptamer-gold nanoparticle fluorescent probe for highly sensitive detection of rHuEPO- α [J]. *Sensors (Basel)*, 2011, 11(11): 10490-10501.

(收稿日期: 2013-10-10 修回日期: 2014-01-20)

· 综 述 ·

结核病免疫学标记物研究进展

章明徐 综述, 邓少丽 审校

(第三军医大学大坪医院检验科 400042)

关键词: 结核; 免疫学标记; 免疫机制; 研究进展

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.048

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)13-1654-03

结核病是由结核杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)引起的慢性感染性疾病。据世界卫生组织统计,全世界结核病每年新增病例 870 万左右,其中,110 万人合并 HIV 感染^[1]。目前,主要依靠有效的疫苗、精确的诊断技术及合理的药物治疗等方法对结核病进行有效的控制。然而,由于机体对结核杆菌(*M. tuberculosis*, MTB)免疫反应的复杂性,致使目前为止对新型结核疫苗的评价、结核感染的诊断和感染后治疗方案的调整等仍没有确切的免疫学评价指标。因此,了解结核杆菌致病机制和宿主免疫反应之间的相互作用,无疑将有助于找到合适的免疫学标记物,以便明确感染各阶段评价指标。本文就结核杆菌感染不同阶段其与宿主的关系及各类免疫学标记物潜在应用价值作一综述,以期针对结核病的不同感染阶段确定特有的免疫学标记物,用以诊断结核病的病程和治疗效果的评价。

1 免疫应答在结核杆菌致病机制中的重要作用

结核杆菌感染人体后的发病机制相当复杂,且非一成不变。结核杆菌的致病作用与细菌在组织细胞内顽强增殖引起炎症反应,以及诱导机体产生迟发型变态反应性损伤有关。人体首次感染结核杆菌后并不一定发病,宿主的免疫系统针对结核杆菌的固有免疫,以及引起的适应性免疫可以有效控制结核杆菌的复制,造成潜伏感染;而当机体免疫力低下时,结核杆菌在体内扩增造成继发感染。由此可见,(1)结核杆菌的暴露不一定引起感染,提示结核杆菌有可能通过机体固有免疫应答机制被清除,虽然这一机制目前尚未被证实;(2)感染结核杆菌后不一定引发结核病,这与机体适应性免疫应答机制相关。

人体对结核杆菌的感染率很高,但发病率却较低。研究发现,处于潜伏感染的患者只有不到 10% 的人会进展为活动性结核病,大多数潜伏感染患者体内的结核杆菌可以逃避宿主的免疫系统监测,而在宿主体内存活长达数年^[2]。因此,结核杆菌致病机制与宿主免疫反应之间的相互作用关系是机体感染结核杆菌后发病机制的重要环节。

2 机体对结核杆菌免疫机制及其免疫学标记物

2.1 固有免疫反应机制 人体对结核杆菌的固有免疫主要包括被激活的巨噬细胞和致敏的 T 淋巴细胞。巨噬细胞通过受体介导方式识别并杀灭结核杆菌,亦可以通过自身凋亡来抑制结核杆菌进一步生长和繁殖。T 细胞依据表面抗原识别受体类型分为 $\alpha\beta$ T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞^[3]。 $\gamma\delta$ T 细胞可分泌干扰素 γ (IFN- γ) 增强树突状细胞(dendritic cell, DC)产生白细胞介素-12(IL-12),使之有效的启动 CD8⁺ T 细胞应答以对抗结核杆菌(MTB)。 $\gamma\delta$ T 细胞亦可抑制转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 的产生,上调 IFN- γ 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-12 等表达,有助于抑制结核杆菌生长。

2.2 适应性免疫反应机制 适应性免疫又称特异性免疫,包括抗原呈递, T 细胞的识别、活化、应答两个阶段。抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)在吞入抗原后逐渐成熟,并高表达组织相容复合体-I (MHC-I) 和 MHC-II 分子,释放大量 IL-12 诱导 Th1 细胞反应^[4]。T 细胞依据表面抗原不同可分为 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞, CD8⁺ T 细胞可通过释放胞质颗粒酶和 Fas/FasL 诱导细胞凋亡杀灭病菌,亦可分泌 IFN- γ 活化巨噬细胞来清除结核杆菌。CD4⁺ Th 细胞又可以分为

Th0、Th1 和 Th2 3 种细胞。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2、TNF- β 等细胞因子,正反馈调节细胞免疫;Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-10 等细胞因子,辅助 B 细胞激活、增殖调节体液免疫。也有学者指出 CD4⁺T 细胞还存在非 IFN- γ 依赖性机制来控制结核杆菌感染^[5]。

3 机体免疫保护与发病风险评估及其免疫学标记物

潜伏期感染患者体内结核杆菌可以逃避机体免疫系统监视,在体内存活长达数年而不发病,这可能与机体获得结核免疫相关。这为我们研制更有效的结核疫苗提供了一个新的切入点。目前,常用的结核疫苗为卡介苗(bacillus calmette guerin,BCG),然而接种 BCG 后的免疫保护与机体感染结核后的免疫状况很难区分^[6]。有报道指出新生儿在接种卡介苗后,机体是否发病与 CD4⁺T 细胞的免疫保护作用没有太大关系^[7],同时有学者提出 CD8⁺T 细胞在控制结核感染中发挥了重要作用^[8]。由此可见,在抗结核免疫保护作用中,巨噬细胞、树突状细胞、CD8⁺T 细胞、Th17 细胞特别是结核特异 Th1 细胞^[9]扮演了重要角色。常用的结核菌素皮肤试验(tuberculin skin test reaction,TST)用于预测接种卡介苗后人群发病风险的能力有限^[10],因此,目前常选择通过测量 CD4⁺T 细胞特别是结核特异 Th 细胞分泌的 IFN- γ 、IL-2、TNF- β 等细胞因子来区分 BCG 的免疫保护作用 and 结核感染。但是不同地区人群中这种生物标记物也存在差异,因此此类指标需考虑不同地区不同种族的适用性。

4 结核感染的诊断及免疫学标记物

结核感染的早期诊断可以有效的控制结核病的发展与传播,然而目前的诊断技术还不能满足临床需求。在很多结核病严重流行的国家仍然依靠痰涂片方法来筛查结核病,此外肺外结核、痰涂片阴性结核,以及小儿结核为结核感染的早期诊断带来了新的挑战。

4.1 IFN- γ 在诊断结核病中的价值 在过去很长一段时间里,作者只能用 TST 来筛查结核病,遗憾的是 TST 还不能有效的区分结核杆菌感染和非典型结核感染。直到 10 年前 γ 干扰素释放试验(interferon gamma release assays,IGRAs)的发明,为结核感染的诊断建立了新的标准^[11]。IGRAs 是利用结核分枝杆菌特异性抗原[例如早期分泌抗原靶分子 6(ESAT-6)、培养滤液蛋白 10(CFP-10)及 TB7.7 等]在体外刺激受检者全血或外周血单个核细胞(PBMC),使 T 淋巴细胞产生大量 IFN- γ ,然后检测 IFN- γ 浓度或计数分泌 IFN- γ 细胞。通过 ESAT-6 和 CFP-10 测定机体 IFN- γ 可区分结核分枝杆菌感染和非典型分枝杆菌感染及 BCG 接种后的反应性。此外,IGRAs 在诊断潜伏性结核感染及预测结核发病风险方面具有良好的应用价值。由于潜伏性结核感染的诊断缺乏金标准,要想非常精确地衡量 IGRAs 在潜伏性结核感染诊断中的敏感性和特异性是很难做到的。因此,有人提出将 IFN- γ 定量将能更有效的区分活动性结核病和潜伏性结核感染^[11]。

此外,在活动性结核和潜伏期结核感染患者体内一些细胞因子[例如白细胞介素-8(IL-8)、转录因子 FOXP3 以及 IL-12 β 等]会表现出特有的变化趋势^[12],这种特有的变化趋势将有助于诊断结核的病程。目前,在活动性结核病患者体内发现的仅分泌 TNF 的结核特异性 CD4⁺T 细胞也将有助于区分活动性

结核病和潜伏期结核感染^[13]。

4.2 血清学诊断在结核病中的价值 结核感染的血清学诊断包括机体感染结核后抗体的检查和结核特异性抗原的检测,结核特异性抗原的检测临床应用价值均高于抗体的检测。然而血清学生物标记物的应用受限于结核特异性抗原的选择和高效价特异性抗体的制备。也有学者提出多种结核特异性抗原的联合应用将有助于提高诊断的敏感性和特异性^[14]。因此,针对多种结核特异性抗原的抗体谱系检测结合宿主机体的免疫因子的谱系分析将有助于结核感染的诊断以及病程的判断。

5 结核感染的治疗及其免疫学标记物

结核感染后治疗方案的选择及治疗效果的评价目前尚没有确切的免疫学指标,因此利用宿主体内免疫学标记物的变化情况,可有助于选择合理的治疗方案、评价治疗效果和指导新型抗痨药物的临床试验。

5.1 治疗前免疫学标记物应用价值 机体内免疫学标记物的变化情况可用于指导临床的治疗。在治疗前,通过测定机体内特定的免疫学标记物含量以评价机体的免疫状况,再根据机体免疫状况选择合适的治疗方案;在治疗中,免疫学标记物的变化情况可直接反应治疗效果,以便随时更改治疗方案和预测复发。以前常通过比较治疗前后机体内细菌数量和 X 线片检查变化情况来评价效果与预测复发风险,然而体内细菌数量的测定耗时太长,X 线片检查又缺乏明确的评价标准^[15]。因此,对于治疗前后机体免疫状况和治疗效果的评价,免疫标记物的研究起着不可替代的作用。

5.2 治疗中免疫学标记物应用价值 目前,评价抗结核感染治疗效果常依靠痰涂片或痰培养方法。由于这种评价模式是在接受治疗 2 个月后才开始,这无疑耽误了结核的有效治疗期,特别是对于耐药结核杆菌感染的患者。因此,通过测定机体特定免疫学标记物的变化情况,既可直观的反应治疗效果(例如机体对药物的敏感性),又可预测疾病的转归。有研究报道,白细胞介素-10(IL-10)在治疗有效的患者体内表达下调,IFN γ /IL-10 的值与治疗有效相关且有助于区分活动性结核病和潜伏期结核感染^[16]。同样,IL-4 和 IL-4 δ 2 在治疗过程中表达有所上调,且 IL-4/IL-4 δ 2 有助于判断疾病的预后^[19]。

5.3 治疗终点免疫学标记物应用价值 目前,很多抗结核药物致力于缩短抗结核的治疗周期,而结核病的复发率也无疑成为治疗效果的重要评价指标。因此,利用机体内特定生物标记物变化情况,评价治疗结束后机体免疫状况和复发风险日益重要。有研究报道,在治疗结束后,机体内仅分泌 IFN γ 的 T 细胞、既分泌 IFN γ 又分泌 IL-2 的 T 细胞^[18],以及仅分泌 TNF 的特异性 T 细胞数量均表现出特定的变化趋势^[19]。

6 展 望

结核杆菌因其顽强的生命力和复杂的免疫机制一直以来未能得到有效的控制,特别是近年来合并 HIV 感染的结核患者与非典型结核感染患者发病率呈逐年上升趋势,使得结核病有死灰复燃的迹象。目前,结核病实验室诊断的金标准为细菌学检查。然而痰涂片检查阳性率低,敏感性仅为 34%~80%;痰培养需时又太长,且由于设备限制不适合高发病率地区,因此,细菌学检查对结核病的诊断价值有限。结核病的体液免疫学检查和细胞免疫学检查在临床上也广泛使用。例如基于酶

联免疫斑点(ELISPOT)技术的 γ 干扰素释放试验(IGRAs),因其出色的敏感性和特异性使其不但成为最吸引人的免疫监测候选方法之一,而且可以应用于疫苗的研发、临床诊断,以及基础研究等多个方面。但依然无法确切的判断结核的活动性或潜伏期感染。因此,通过免疫学标记物研究结核杆菌致病机制与宿主免疫反应之间的相互作用关系,将成为控制结核感染的新突破口。生物信息学的快速发展也为新的生物标记物的发现提供了强有力的技术支持。结核杆菌免疫学标记物的研究不仅为结核杆菌的溯源、致病机制研究,以及耐药性研究奠定了坚实的理论基础,同时也为结核病的实验室诊断技术提供了重要的科学依据。

本文中提及的一些免疫因子在结核病的不同阶段呈现出特有的变化趋势,但这些因子的作用和应用价值还需要大量的临床样本研究,最终才能确定能否用于诊断结核病的病程和疗效的评价。且一些免疫因子的变化情况与机体自身免疫状况乃至地域性差异有一定联系,因此,针对多种免疫因子的复合诊断方法将成为今后研究的方向。

参考文献:

- [1] Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, et al. Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation[J]. Immunobiology, 2012, 217(3): 363-374.
- [2] Pinheiro MB, Antonelli LR, Sathler-Avelar R, et al. CD4-CD8- $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells display inflammatory and regulatory potentials during human tuberculosis[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50923.
- [3] Carvalho RV, Kleijn J, Meijer AH, et al. Modeling innate immune response to early Mycobacterium infection[J]. Comput Math Methods Med, 2012, 2012: 790482.
- [4] Rueda CM, Marin ND, García LF, et al. Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN- γ in human latent and active tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2010, 90(6): 346-353.
- [5] Rowland R, Mcshane H. Tuberculosis vaccines in clinical trials[J]. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(5): 645-658.
- [6] Kagina BM, Abel B, Scriba TJ, et al. Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(8): 1073-1079.
- [7] Rahman S, Magalhaes I, Rahman J, et al. Prime-boost vaccination with rBCG/rAd35 enhances CD8 γ cytolytic T-cell responses in lesions from Mycobacterium tuberculosis-infected primates[J]. Mol Med, 2012, 18(1): 647-658.
- [8] Heo DR, Shin SJ, Kim WS, et al. Mycobacterium tuberculosis H37Rv, induces dendritic cell maturation and Th1 polarization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(3): 642-647.
- [9] Gran G, Amus J, Dyrhol-Riise AM. Screening for latent tuberculosis in Norwegian health care workers: high frequency of discordant tuberculin skin test positive and interferon-gamma release assay negative results [J]. BMC Public Health, 2013, 13(1): 353.
- [10] Ferrara G, Losi M, Fabbri LM, et al. Exploring the immune response against Mycobacterium tuberculosis for a better diagnosis of the infection [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010, 57(6): 425-433.
- [11] Chiappini E, Accetta G, Bonsignori F, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children: a systematic review and meta-analysis [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2012, 25(3): 557-564.
- [12] Chegou NN, Black GF, Kidd M, et al. Host markers in QuantiFERON supernatants differentiate active TB from latent TB infection: preliminary report [J]. BMC Pulm Med, 2009, 9(1): 21.
- [13] Harari A, Rozot V, Enders FB, et al. Dominant TNF- α + mycobacterium tuberculosis-specific CD4 $^{+}$ T cell responses discriminate between latent infection and active disease [J]. Nat Med, 2011, 17(3): 372-376.
- [14] Koyama S. The diagnosis of pulmonary tuberculosis [J]. Rinsho Byori, 2012, 60(8): 796-803.
- [15] Correale S RA, X-ray XL. D-transpeptidase LdtMt1 from Mycobacterium tuberculosis [J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2013, 69(3): 253-256.
- [16] Sai Priya VH, Latha GS, Hasnain SE, et al. Enhanced T cell responsiveness to Mycobacterium bovis BCG r32-kDa Ag correlates with successful anti-tuberculosis treatment in humans [J]. Cytokine, 2010, 52(3): 190-193.
- [17] Wassie L, Demissie A, Aseffa A, et al. Ex vivo cytokine mRNA levels correlate with changing clinical status of ethiopian TB patients and their contacts over time [J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1522.
- [18] Chiappini E, Della Bella C. Potential role of M tuberculosis specific IFN- γ and IL-2 ELISPOT assays in discriminating children with active or latent tuberculosis [J]. PLoS One, 2012, 7(9): 460-465.
- [19] Kleinstaub K, Heesch K, Schattling S, et al. Decreased expression of miR-21, miR-26a, miR-29a, and miR-142-3p in CD4 $^{+}$ T cells and peripheral blood from tuberculosis patients [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61609.