

with HIF-1 alpha degradation[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35 (5):2887-2895.

[24] Maynard MA, Ohh M. The role of hypoxia-inducible factors in cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(16):2170-2180.

[25] Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, et al. Identification  
• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.31.044

of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 alpha [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(44):33095-33106.

(收稿日期:2017-04-28 修回日期:2017-07-17)

## 结核病疗效监测技术及指标研究进展\*

陈云坤<sup>1</sup>, 王 勇<sup>2</sup>综述, 冯英凯<sup>1△</sup> 审核

(1. 重庆市中医院道门口院部呼吸内科 400011; 2. 重庆市公共卫生医疗救治中心普内科, 重庆 400036)

【关键词】 结核; 疗效监测; 抗结核治疗

【中图分类号】 R516

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-8348(2017)31-4441-03

世界卫生组织 2016 年全球结核病报告显示, 全球结核病死亡数量和发病率均继续下降。2015 年, 据估计全世界新发结核病数量约为 1 040 万例, 其中 590 万为男性(56%), 350 万为女性(占 34%), 100 万为儿童(10%)<sup>[1]</sup>。120 万新发结核病例为艾滋病感染者(11%)。印度、印度尼西亚、中国、尼日利亚、巴基斯坦和南非这 6 个国家占新发病例数的 60%, 中国结核病患者人数居世界第 3。2015 年, 据估计有 140 万人死于结核病, 还有 40 万艾滋病感染者死于结核病。虽然从 2000—2015 年结核病死亡数量下降了 22%, 但结核病仍是 2015 年全球十大死因之一。

早期确诊和提高治愈率是控制结核病的现实目标。结核病的治疗多采用联合化疗方案, 遵循“早期、联合、适量、规律、全程”的原则。由于结核化疗药物不良反应严重, 加之缺乏灵敏、有效的疗效监测指标, 相当一部分患者服药依从性较差, 特别是西部欠发达地区, 经济及文化落后, 患者往往一旦自觉症状改善即自行停药, 导致治疗失败或产生耐药。采取正确合理的治疗方案、提高患者服药依从性是实施结核化疗成功的关键。缩短和简化疗程是减少化疗药物不良反应、提高服药依从性的重要手段之一。而实施短程化疗必须建立在实时掌握结核患者病情变化和疗效的基础之上, 否则, 治疗的成功与否便无据可依。目前国内外学者对其疗效监测技术和指标做了大量的研究, 除了传统手段以外, 分子生物学、内镜、超声等技术在结核病的诊疗和效果观察中发挥越来越多的优势<sup>[2]</sup>。现对其研究进展作一综述。

### 1 目前常用的肺结核疗效判定方法

目前临床上观察肺结核病情变化的常用方法有痰涂片镜检、传统改良罗氏培养法、结核菌素试验(TST)等, 病情变化的标志为症状改善、痰菌阴转、病灶吸收、空洞闭合等。

**1.1 结核杆菌检查** 最经典的肺结核疗效判定方法为:(1)痰或呼吸道分泌物(通过纤支镜检吸取分泌物、镜下毛刷取材、活检、支气管肺泡灌液等直接涂片和应用集菌法)涂片应用萋尼抗酸染色法行抗酸杆菌检查。(2)结核杆菌培养。选择痰或呼吸道分泌物、胸腔积液、腹水、脑脊液等行结核杆菌培养。培养基从性状上分主要有固体培养基(如罗氏培养基)、液体培养基(苏通培养基)、半流体培养基(改良苏通半流体琼脂培养基)、

固液双相培养基(Septi-Check AFB 双相培养基)等类型。(3)病理学检查。通过肺活检、胸膜活检、淋巴结活检、手术切除等留取可疑结核组织, 固定、切片, 行病理学检查。病理学检查结果被视为结核诊断的金标准, 不足之处是其敏感度差, 阳性率较低。

**1.2 胸部 X 线片检查** X 线片是早期发现肺结核病的重要手段, 且通过胸部 X 线片可以了解肺结核病灶吸收、空洞闭合情况。王国庆<sup>[3]</sup>通过对 120 例痰菌和聚合酶链反应(PCR)阳性肺结核患者, 选择 6 个月短程方案, 并在 X 线片下动态观察病灶变化, 发现原病灶吸收、缩小、纤维化、消散, 钙化及自觉症状消失, 体质恢复, 得出 X 线片变化可作为化疗效果的判断指标。并且 X 线片检测应用普及, 覆盖面广, 一般医院都能开展, 使用方便, 在结核病防治工作中仍是必不可少的检查手段。不足之处是其特异度低、缺乏明确的评价标准; 时效性差, 不能实时反映抗结核疗效, 存在滞后性。

**1.3 红细胞沉降率(ESR)** ESR 是一种经典急性期反应标志物, 常用来监测炎症状态的发生和转归, 还可作为疾病活动与否的监测指标, 以及监测疾病严重程度。Mesquita 等<sup>[4]</sup>通过研究发现, 在抗结核治疗过程中 ESR 水平明显下降, 结果表明 ESR 可以作为结核病患者疗效及预后的参考指标。不足之处是其特异度低, 除结核以外, 各种炎症性疾病、急性全身性或局部性感染、自身免疫性疾病、严重贫血、血液病、慢性肝炎、肝硬化、多发性骨髓瘤、甲状腺功能亢进、重金属中毒、恶性淋巴瘤、巨球蛋白血症、慢性肾炎等疾病时, ESR 也可明显加快。

**1.4 结核菌素皮肤试验(TST)** 该试验具有操作简单易行、成本低廉、可目视反应结果等优点。但 TST 所用的纯化蛋白质衍生物是从结核分枝杆菌中粗提的抗原混合物, 与牛结核分枝杆菌减毒株(卡介苗), 以及非结核分枝杆菌的抗原, 都存在交叉反应, 易出现较高的假阳性率, 特异度低, 且无法区别既往及现患结核。而对于营养不良、器官移植、免疫系统功能低下的结核病患者而言, 该方法的灵敏度较低。

### 2 血清学检查

**2.1 C 反应蛋白(CRP)** CRP 是一种非特异性的急性期蛋白, 在组织损伤急性期, CRP 会相应增高。Mendy 等<sup>[5]</sup>通过对肺结核患者抗结核治疗前后 CRP 的动态监测, 发现通过 2

\* 基金项目: 重庆市卫生和计划生育委员会医学科研重点项目(2013-1-038)。 作者简介: 陈云坤(1992—), 在读硕士, 主要从事呼吸系统疾病的诊疗工作。 △ 通信作者, E-mail: fykme@163.com。

个月的抗结核治疗,其 CRP 水平显著下降,通过 6 个月治疗后其 CRP 水平进一步下降,结果表明 CRP 可以作为评估抗结核治疗疗效的一个指标。国外其他学者也通过研究发现,监测 CRP 水平可以评估抗结核病治疗效果<sup>[6-7]</sup>。

**2.2 降钙素原(PCT)** PCT 是降钙素的前体物质,当 PCT 水平升高时,可以反映炎性反应的活跃程度。徐立等<sup>[8]</sup>将抗结核治疗的患者(观察组)与未行抗结核治疗的患者(对照组)相比较,结果显示观察组患者抗结核治疗后 1、3、6 个月后,血清降钙素原水平明显降低,显著低于对照组水平,提示血清降钙素原可以作为抗结核治疗疗效评估的指标之一。

**2.3 其他** 一些学者也发现  $\beta_2$  微球蛋白<sup>[9]</sup>、血清球蛋白<sup>[9]</sup>、血清清蛋白(ALB)、补体成分 3(C3)、和载脂蛋白(a)(LPA)<sup>[10]</sup>、血小板计数<sup>[11]</sup>可作为结核病诊断、疗效、活动判断的重要辅助指标之一。

### 3 免疫学

**3.1  $\gamma$ -干扰素释放试验(IGRA)** IGRA 是一种体外免疫检测方法,当结核特异性抗原[如早期分泌抗原靶分子 6(ESAT-6)、培养滤液蛋白 10(CFP-10)]刺激结核菌抗原致敏的 T 淋巴细胞时,效应记忆 T 淋巴细胞产生并分泌  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ ),通过检测 IFN- $\gamma$  水平,可以评估抗结核治疗疗效。目前,IGRA 有结核分支杆菌  $\gamma$ -干扰素体外释放定量试验(TB-IGRA,浓度法)和结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB,斑点法)。

**3.2 TB-IGRA** 有研究发现,效应记忆 T 淋巴细胞只在人体内存在结核分支杆菌(MTB)时产生,当结核病治愈后即消失,故抗原特异性 IFN- $\gamma$  体外释放测定只与体内 MTB 负荷量即结核活动性呈正相关,而不受既往结核感染的影响,从而成为评估抗结核治疗疗效的理想指标<sup>[12]</sup>。且多项研究发现,TB-IGRA 的动态监测可用于评估抗结核治疗疗效,当抗结核治疗有效时,TB-IGRA 结果会下降,甚至转阴;若 TB-IGRA 结果长期无明显改善,可能提示抗结核效果不满意<sup>[13-15]</sup>。

**3.3 T-SPOT. TB** T-SPOT. TB 是运用酶联免疫斑点法(ELISPOT)检测结核分支杆菌感染后 T 淋巴细胞分泌的特异性细胞因子 IFN- $\gamma$  来判断结核感染状态,该方法能快速而敏感地诊断结核。一项研究发现,抗结核治疗 3 个月后有 62 例患者复查 T-SPOT. TB,6 个月后有 54 例患者复查 T-SPOT. TB,其抗原 A(ESAT-6)与抗原 B(CFP-10)的特异性斑点形成细胞中位数均显著低于治疗前,T-SPOT. TB 可以作为抗结核治疗的效果评价指标<sup>[16]</sup>。但是该方法也存在一定的不足之处,如无法区分活动性和潜伏性结核感染、操作复杂、试剂成本昂贵等。尽管有 Meta 分析指出,IGRA 对于诊断儿童肺结核的敏感度具有一定参考价值,但 IGRA 单独用于诊断活动性结核病尚缺乏充足的临床证据支持。IGRA 诊断活动性结核敏感度高于结核菌素(OT)、纯蛋白衍生物皮试(PPD),但特异度较低,会导致部分患者被误诊为活动性结核。

**3.4 流式细胞术(FCM)** FCM 是利用流式细胞仪对处于液流中的单个细胞或生物颗粒进行定性、定量分析和分选的技术。有学者通过流式细胞术分析研究发现,在抗结核治疗中患者 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞、Th1 细胞水平升高,Th2 细胞水平降低,提示外周血 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞及其亚型(Th1/Th2)细胞水平可以判断病情变化及治疗效果<sup>[17]</sup>。利用流式细胞术研究发现患者 CD4<sup>+</sup> Tim1<sup>+</sup> 细胞和 CD3<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> Tim1<sup>+</sup> 细胞在抗结核治疗后明显下降,提示 CD4<sup>+</sup> Tim1<sup>+</sup> 细胞和 CD3<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> Tim1<sup>+</sup> 细胞可以作为疗效考核的参考指标<sup>[18]</sup>。利用流式细胞术研究发现双阴性细胞(DNT)、双阳性细胞(DPT)百分含量减少,提示 DNT 和 DPT 可作为判断结核患者

免疫状态、指导用药和疗效观察的指标<sup>[19]</sup>。

**3.5 酶联免疫吸附法(ELISA)** ELISA 是将抗原与抗体的特异性反应和酶的催化反应相结合,从而建立的一种特异而敏感的技术,可以进行定性或定量测定。一些学者通过运用 ELISA 对比研究发现,在抗结核治疗过程中血清白细胞介素(IL)-6 水平迅速下降,得出监测血清 IL-6 水平可能对监测抗结核治疗的临床效果是有用的<sup>[20-21]</sup>。还有些学者运用 ELISA 发现趋化因子 IP-10 可作为鉴别结核感染的阶段之间和监测治疗效果的诊断标志物<sup>[22-23]</sup>。

**3.5 液相芯片技术** 液相芯片技术是将 DNA、抗体等附着于微球表面作为探针,在液相中与待测物结合,再加入荧光标记的报告分子,借助流式细胞仪检测微球表面荧光标记物,该方法能检测蛋白或核酸,特别适用于流行病学调查、临床诊断及蛋白组学的研究。一项研究通过液相芯片技术监测肺结核患者治疗过程中血清 IP-10、IL-17A 水平的动态变化,发现患者血清 IP-10、IL-17A 水平随着治疗时间延长而下降,提示液相芯片技术可能可以作为抗结核治疗疗效的监测方法<sup>[24]</sup>。

### 4 分子生物学

**4.1 PCR** PCR 技术是以体外扩增技术检测标本中结核菌特异性的 DNA 片段,该方法具有快速、特异、敏感等特点,但检查技术质量对结果影响较大<sup>[25]</sup>。有学者通过运用 PCR 技术研究发现髓源性抑制细胞(MDSCs)具有显著的抑制 T 细胞反应的能力,在调节结核病免疫反应中起重要作用,在抗结核治疗有效后该类细胞有减少趋势,提示这些细胞可作为监测抗结核治疗疗效的一个潜在的生物标志物<sup>[26]</sup>。

**4.2 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)** RT-PCR 是一种基于 PCR 技术的核酸定量技术。缪家文等<sup>[27]</sup>建立检测人颗粒溶素(GNLY)mRNA 含量的实时荧光定量 PCR 的方法,并测定肺结核病患者外周血单个核细胞(PBMC)中颗粒溶素(GNLY)的基因表达水平,发现肺结核患者 PBMC GNLY 基因表达水平显著低于对照组,治疗前菌阳组 PBMC GNLY 基因表达水平显著低于菌阴组,治疗后菌阳组 PBMC GNLY 基因表达水平较治疗前显著升高,提示 GNLY 基因表达水平可作为肺结核治疗的疗效观察及预后判断的一个新的实验室指标。

**4.3 蛋白芯片技术** 蛋白芯片技术具有简便、快速、准确,敏感度较高、特异度强和检测成本低等优点,是临床辅助诊断结核病的有效方法。结核分支杆菌蛋白芯片技术同时用结核菌脂阿拉伯甘露糖(LAM)、蛋白 16 $\times 10^3$  和 38 $\times 10^3$  等 3 种抗原进行检测,提高了检测的阳性率。有研究发现,当治疗有效或感染被控制时,抗体水平会随之下降,反映出结核蛋白芯片能动态监测这 3 种抗体水平,故结核蛋白芯片能动态监测抗结核治疗疗效<sup>[28-29]</sup>。Deng 等<sup>[30]</sup>利用酿酒酵母系统可溶表达结核分支杆菌蛋白并点制成蛋白芯片,利用芯片寻找血清中的生物标记物以评估治疗效果。不足之处是敏感度、特异度尚不够高。目前对蛋白芯片技术对结核病疗效的监测尚缺乏系统研究。

### 5 展望

当痰涂片检测抗酸染色阴性时,临床很难对肺结核进行快速的明确诊断。目前结核病的疗效监测技术方法和指标很多,除文中列举以外,尚有其他许多新型手段在临床和实验中探讨应用。每种技术方法和指标均有其各自的优缺点,但目前仍缺乏方便、快捷、有效、价廉的判断方法和指标,主要依赖多指标检测及临床综合评估。如何更好、更快地实时监测结核病情变化与治疗效果,为合理用药和规范治疗提供科学依据,及早发现耐药、及时更换治疗方案、减少经济浪费、减轻不必要用药对

患者的损害、提高服药依从性、选择最佳治疗方案、改善结核预后、提高治愈率成为当前研究的方向。通过侵入性操作提高样本的取样有效率,应用灵敏、特异、快速的免疫学及分子生物学检测,可能具有良好的研究前景。

## 参考文献

- [1] Global tuberculosis report 2016[EB/OL]. [2017-03-14]. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).
- [2] 中国防痨协会结核病临床专业委员会. 结核病临床诊治进展年度报告(2014 年)[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(6): 549-582.
- [3] 王国庆. X 线检查在肺结核短程化疗中疗效观察[J]. 中外健康文摘, 2010, 7(25): 165-165.
- [4] Mesquita ED, Gil-Santana L, Ramalho D, et al. Associations between systemic inflammation, mycobacterial loads in sputum and radiological improvement after treatment initiation in pulmonary TB patients from Brazil: a prospective cohort study[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1): 368.
- [5] Mendy J, Togun T, Owolabi O, et al. C-reactive protein, Neopterin and Beta2 microglobulin levels pre and post TB treatment in The Gambia[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1): 115.
- [6] Jayakumar A, Vittinghoff E, Segal MR, et al. Serum biomarkers of treatment response within a randomized clinical trial for pulmonary tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2015, 95(4): 415-420.
- [7] Jacobs R, Malherbe S, Loxton AG, et al. Identification of novel host biomarkers in plasma as candidates for the immunodiagnosis of tuberculosis disease and monitoring of tuberculosis treatment response[J]. Oncotarget, 2016, 7(36): 57581-57592.
- [8] 徐立, 金雪. 血清降钙素原在肺结核抗结核治疗疗效评估中的价值[J]. 中国医药科学, 2013(15): 152-153.
- [9] Singanayagam A, Manalan K, Connell DW, et al. Evaluation of serum inflammatory biomarkers as predictors of treatment outcome in pulmonary tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(12): 1653-1660.
- [10] Wang C, Wei LL, Shi LY, et al. Screening and identification of five serum proteins as novel potential biomarkers for cured pulmonary tuberculosis[J]. Sci Rep, 2015, 5(3): 15615.
- [11] 王晓军, 孙绍秋, 张建伟. 血小板计数在结核病诊断及疗效评价中的意义[J]. 现代预防医学, 2010, 37(24): 4697-4698.
- [12] Saharia KK, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, et al. Tuberculosis therapy modifies the cytokine profile, maturation state, and expression of inhibitory molecules on mycobacterium tuberculosis-specific CD4<sup>+</sup> T-Cells[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0158262.
- [13] Sauzullo I, Mengoni F, Lichtner M, et al. In vivo and in vitro effects of antituberculosis treatment on mycobacterial interferon-gamma T cell response[J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5187.
- [14] Sauzullo I, Mengoni F, Ermocida A, et al. Interferon- $\gamma$  release assay in HIV-infected patients with active tuberculosis: impact of antituberculous drugs on host immune response[J]. New Microbiol, 2014, 37(2): 153-161.
- [15] 张腊红, 洪理泉, 罗贤, 等. 结核分支杆菌相关 IFN- $\gamma$  释放试验在结核病诊断及疗效监测中的应用[J]. 放射免疫学杂志, 2013, 26(6): 760-764.
- [16] 韩洪祥. 结核感染 T 细胞斑点试验在预测抗结核治疗效果中的作用评价[J]. 航空航天医学杂志, 2016, 27(3): 346-348.
- [17] Xu P. Study on T helper cells in the patients of pulmonary tuberculosis and the clinical significance of Th polarization[J]. Chin J Immunol, 2010, 777(2): 1845-1858.
- [18] 殷玲丽, 张影, 赵桅, 等. 结核病患者治疗过程中外周血 T/B 细胞表面 Tim1 的变化[J]. 临床肺科杂志, 2013, 18(9): 1662-1663.
- [19] 栗群英, 吴丽娟, 陈莉, 等. 结核病患者 T 细胞亚群检测临床意义分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(19): 2346-2347.
- [20] Chowdhury IH, Ahmed AM, Choudhuri S, et al. Alteration of serum inflammatory cytokines in active pulmonary tuberculosis following anti-tuberculosis drug therapy[J]. Mol Immunol, 2014, 62(1): 159-168.
- [21] Chowdhury IH, Choudhuri S, Sen A, et al. Serum interleukin 6 (IL-6) as a potential biomarker of disease progression in active pulmonary tuberculosis following anti-tuberculosis drug therapy[J]. Mol Immunol, 2015, 63(2): 601-602.
- [22] Wergeland I, Pullar N, Assmus J, et al. IP-10 differentiates between active and latent tuberculosis irrespective of HIV status and declines during therapy[J]. J Infect, 2015, 70(4): 381-391.
- [23] Tonby K, Ruhwald M, Kvale D, et al. IP-10 measured by dry plasma Spots as biomarker for therapy responses in Mycobacterium Tuberculosis infection[J]. Sci Rep, 2015, 5(9): 9223.
- [24] 劳德华, 谢贝, 董海平, 等. 肺结核治疗过程中血清 IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-17A、IL-4、IL-6 和 IP10 水平动态观察[J]. 现代医院, 2016, 16(8): 1172-1174.
- [25] 王黔宇, 李桂凤. 痰结核杆菌 DNA 扩增对肺结核疗效监测[J]. 中国社区医师, 2016, 32(21): 126.
- [26] El Daker S, Sacchi A, Tempestilli M, et al. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expansion during active pulmonary tuberculosis is associated with high nitric oxide plasma level[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123772.
- [27] 缪家文, 张海燕, 王捷婷, 等. 肺结核病患者外周血单个核细胞颗粒溶素基因的表达及临床意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2012, 6(5): 400-403.
- [28] 吴友根, 李朝金, 杨兴萍, 等. 结核蛋白芯片检测对结核病诊断的价值[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(8): 1317-1319.
- [29] 杨群, 江晓静. 结核蛋白芯片对肺结核及肺外结核的诊断价值[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2012, 33(1): 129-130.
- [30] Deng J, Bi L, Zhou L, et al. Mycobacterium tuberculosis proteome microarray for global studies of protein function and immunogenicity[J]. Cell Rep, 2014, 9(6): 2317-2329.