

TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  在结核性脑膜炎患者血清和脑脊液中的变化\*

程碧珍<sup>1</sup>, 杨 礼<sup>1</sup>, 张俏忻<sup>1</sup>, 谢汉斌<sup>2</sup>, 蔡应木<sup>1△</sup> (1. 汕头大学医学院第一附属医院检验科, 广东汕头 515041; 2. 广东省汕头市第三人民医院检验科 515073)

**【摘要】 目的** 检测结核性脑膜炎(TBM)患者血清和脑脊液(CSF)中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )的变化情况,探讨 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  在 TBM 中的致病机制及其对诊断和预后的预示意义。**方法** 按 Thwaites 诊断标准入选 18 例 TBM 患者,并对患者进行病程分期。采用双抗体夹心法检测患者血清及 CSF 中 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平。同时选取 20 例无颅内感染征象患者 CSF 及血清作为对照组。对照组和 TBM 组 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平采用 *t* 检验进行比较分析,并对 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  与 TBM 组不同病期的相关性采用 Pearson 检验进行分析。**结果** TBM 患者血清和 CSF 中 TNF- $\alpha$  水平分别为 (65.80±5.18)pg/mL 和 (34.40±2.56)pg/mL,与对照组血清和 CSF 中 TNF- $\alpha$  水平 [(4.51±0.50)pg/mL 和 (3.44±0.40)pg/mL] 相比均显著增高,差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。TBM 患者血清和 CSF 中 IFN- $\gamma$  水平分别为 (125.00±16.00)pg/mL 和 (77.60±2.33)pg/mL,与对照组血清和 CSF 中 IFN- $\gamma$  水平 [(7.49±0.14)pg/mL 和 (7.95±0.14)pg/mL] 相比均显著增高,差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。并且 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  升高水平与 TBM 患者的病情呈正相关。**结论** TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  参与了 TBM 的发病机制,并与 TBM 患者的病情相关。检测 TBM 患者 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平有利于疾病的诊断及对病程的判断。

**【关键词】** 结核性脑膜炎; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;  $\gamma$ -干扰素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.13.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)13-1745-02

**Changes of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in serum and cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis\*** CHENG Bizhen<sup>1</sup>, YANG Li<sup>1</sup>, ZHANG Qiao-xin<sup>1</sup>, XIE Han-bin<sup>2</sup>, CAI Ying-mu<sup>1△</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong 515041, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Shantou, Guangdong 515073, China)

**【Abstract】 Objective** To reveal the diagnostic value of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (IFN)- $\gamma$  in patients with tuberculous meningitis (TBM). **Methods** According to the Thwaites' criteria, 18 TBM patients (TBM group) were enrolled and divided into different stages. Serum and cerebrospinal fluid (CSF) were collected from TBM patients and 20 patients without intracalvarium infection (control group), and detected for TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  by using enzyme linked immunosorbent assay. The differences of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  between TBM group and control group were analyzed, and Pearson correlation was used to analyze the relationship of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  with different stages of TBM. **Results** Serum and CSF levels of TNF- $\alpha$  in TBM group were (65.80±5.18) and (34.40±2.56)pg/mL, which were higher than the (4.51±0.50) and (3.44±0.40)pg/mL in control group ( $P<0.01$ ). Serum and CSF levels of IFN- $\gamma$  in TBM group were (125.00±16.00) and (77.60±2.33)pg/mL, which were higher than the (7.49±0.14) and (7.95±0.14)pg/mL in control group ( $P<0.01$ ). Moreover, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  might be correlated with the disease stages of TBM. **Conclusion** TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  could be related to the pathogenesis of TBM and the different disease stages of TBM. TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  might be potential diagnostic indicators of TBM.

**【Key words】** tuberculosis meningitis; TNF- $\alpha$ ; IFN- $\gamma$

中枢神经系统结核是常见且最严重的肺外结核病。结核性脑膜炎(TBM)由于其高致残及致死率,引起了人们的广泛关注。TBM 诊断、治疗的早晚与预后直接相关。由于临床表现缺乏特异性,且分子和细胞致病机制仍不为人知,故早期诊断较困难。TBM 临床诊断的“金标准”是脑脊液(CSF)中发现结核分枝杆菌(MTB)。然而 MTB 的 CSF 涂片阳性率较低,MTB 培养阳性率也仅为 16%<sup>[1]</sup>,且培养时间需要 4~6 周,故 TBM 早期诊断仍是临床难题之一。本文拟检测 TBM 患者血清和 CSF 中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )的变化情况,以探讨 TBM 患者 CSF 免疫方面的变化及其对 TBM

早期诊断及预后的可能意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 按 Thwaites<sup>[2-3]</sup> 诊断标准选择 TBM 患者 18 例,其中男 11 例,女 7 例;年龄 9~68 岁,平均(42.6±25.7)岁。其中儿童(<12 岁)1 例。对照组为 20 例无感染征象患者,其中男 12 例,女 8 例;年龄 12~65 岁,平均(38.4±16.3)岁。TBM 组与对照组性别、年龄差异无统计学意义。18 例患者中一期 3 例,二期 11 例,三期 4 例。TBM 分期后 3 组患者的性别、年龄差异无统计学意义。本文涉及的所有实验都经过患者或家属同意,并签署知情同意书。

\* 基金项目:广东省自然科学基金自由申请项目(S2012010009081)。

作者简介:程碧珍,女,硕士,主管检验医师,主要从事临床免疫学检验研究。△ 通讯作者,E-mail:st\_ymcai@126.com。

TBM按疾病严重程度分为3期<sup>[4]</sup>:一期仅有脑膜炎症状;二期除了脑膜炎症状外,还有局部颅神经障碍,但意识清楚;三期为昏迷期,昏迷、惊厥频繁发作。

**1.2 仪器与试剂** TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 双抗体夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒均购于达科为生物技术有限公司,严格按照试剂盒说明书进行检测。每次实验均做标准曲线,细胞因子单位为pg/mL。

**1.3 方法** CSF在8:00~10:00由临床医生进行腰椎穿刺获得,每例患者留取5 mL CSF。对照组CSF来源于白细胞总数及分类正常且无明显感染指征并需要做蛛网膜下腔阻滞麻醉的手术患者。血液标本和相对应的CSF标本由临床医生进行采集及编号后,送至实验室由实验室工作人员进行检测。未经抗凝的血液标本采集后放置30 min自然凝集,在室温下3 000 r/min离心10 min,分离血清,装于清洁冻存管中于-80  $^{\circ}$ C冻存。CSF室温下3 000 r/min离心10 min,上清液冻存于-80  $^{\circ}$ C。

**1.4 统计学方法** 数据均采用Graphpad Prism 5软件和SPSS13.0软件进行分析,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。TBM患者与对照组细胞因子水平采用t检验进行比较。细胞因子水平与病程分期的相关性采用Pearson分析进行检验。

## 2 结 果

**2.1 两组血清和CSF中TNF- $\alpha$ 水平** 见表1。由表1可见,TBM患者与对照组相比TNF- $\alpha$ 水平显著增高,两组差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

表1 两组血清和CSF中TNF- $\alpha$ 水平(pg/mL,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	血清	CSF
对照组	20	4.51 $\pm$ 0.50	3.44 $\pm$ 0.40
TBM患者	18	65.80 $\pm$ 5.18*	34.40 $\pm$ 2.56*

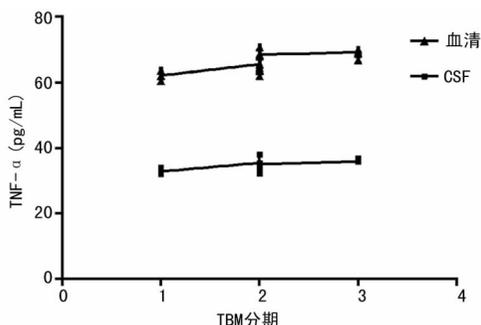
注:与对照组相比,\* $P<0.01$ 。

**2.2 两组血清和CSF中IFN- $\gamma$ 水平** 见表2。由表2可见,TBM患者血清和CSF中IFN- $\gamma$ 水平与对照组相比增高,两组差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

表2 两组血清和CSF中IFN- $\gamma$ 水平(pg/mL,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	血清	CSF
对照组	20	7.49 $\pm$ 0.14	7.95 $\pm$ 0.14
TBM患者	18	125.00 $\pm$ 16.00*	77.60 $\pm$ 2.33*

注:与对照组相比,\* $P<0.01$ 。

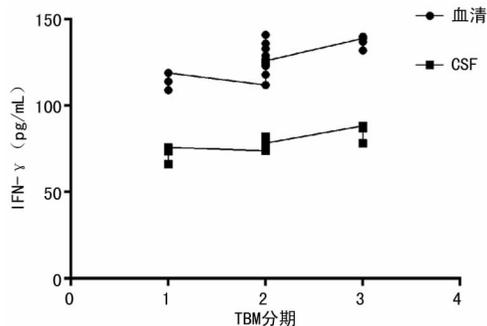


注:1为TBM一期,2为二期,3为三期。

图1 TNF- $\alpha$ 在TBM不同分期时血清和CSF中的表达情况

**2.3 TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 在TBM不同分期时血清和CSF中的表达情况** TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 在TBM患者血清和CSF中升高与

TBM患者的病情呈正相关。TBM患者血清和CSF TNF- $\alpha$ 水平与疾病分期的相关度分别为0.6817和0.6420,  $P=0.0018$ 和0.0041,其相关性差异有统计学意义,见图1。IFN- $\gamma$ 水平与疾病分期的相关度分别为0.7396和0.7187,  $P=0.0005$ 和0.0018,其相关性差异有统计学意义,见图2。



注:1为TBM一期,2为二期,3为三期。

图2 IFN- $\gamma$ 在TBM不同分期血清和CSF中的表达情况

## 3 讨 论

有研究认为,结核杆菌引起的中枢神经系统炎症主要由中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞介导<sup>[5-6]</sup>。这些炎症细胞被结核杆菌激活后,释放TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 等大量炎症因子,使炎症进一步扩大<sup>[7-9]</sup>。CSF是反映颅内情况的最重要物质,本试验通过对TBM患者血清和CSF表达的细胞因子进行研究,试图获得更多有关TBM致病机制的信息。

与结核相关的炎症因子TNF- $\alpha$ 能通过打开血脑屏障影响物质在大脑的运输。此外,高水平的TNF- $\alpha$ 与脑组织急性缺氧和脑血管缺血、持续高热、癫痫和强直痉挛以及死亡相关<sup>[10]</sup>。因此,本试验收集了TBM患者CSF和血清并检测其中TNF- $\alpha$ 的水平,结果发现TBM患者CSF和血清标本中TNF- $\alpha$ 水平都有升高,由此说明TNF- $\alpha$ 参与了结核杆菌的致病过程。此外,CSF中TNF- $\alpha$ 的增高程度与TBM的病程相关,即分期越高,病情越严重,TNF- $\alpha$ 水平越高。这进一步说明了TNF- $\alpha$ 与结核杆菌感染产生的病理过程相关,对TBM患者的不良预后起提示作用。但是,CSF中TNF- $\alpha$ 升高是由于血清的渗透作用还是脑膜受到致炎因素刺激后局部释放增多,仍需要进一步深入研究。

IFN- $\gamma$ 是Th1细胞分泌的一种细胞因子,不但能够反映机体Th1细胞的免疫情况,还与体内结核杆菌的抗原水平密切相关<sup>[11-12]</sup>。外周血IFN- $\gamma$ 的Eilsopt检测方法已开始应用于结核患者中,并显示出较好的敏感性和特异性。但是IFN- $\gamma$ 在TBM患者CSF中的表达至今研究较少。本研究结果显示,TBM患者血清和CSF中IFN- $\gamma$ 水平显著升高,与对照组相比其差异有统计学意义。这为CSF中IFN- $\gamma$ 的Eilsopt检测方法奠定了理论基础。并且IFN- $\gamma$ 升高的程度与疾病的严重程度相关,进一步支持以上观点,由此说明IFN- $\gamma$ 与TNF- $\alpha$ 一样对TBM患者的不良预后起提示作用。IFN- $\gamma$ 可作为TBM诊断及疗效监测的候选标志物。

## 参考文献

[1] 张露露,马军捷,孟杰. 结核性脑膜炎患者血和脑脊液淋巴细胞动态变化[J]. 检验医学与临床,2013,10(13): 1720-1721.

[2] Thwaites GE,Chau TT,Stepniowska (下转第1749页)

其找到合适的血液。冷凝集素或冷自身抗体也是造成临床配血不合的一项重要影响因素,健康人血清中含有少量冷凝集素,效价很低,且低于 4℃才有活性,20℃即不凝集,一般对交叉配血无影响。某些疾病患者血清中常含有高效价的病理性冷凝集素,如系统性红斑狼疮、自身免疫性溶血性贫血、支原体肺炎、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、肝硬化、多发性骨髓瘤及某些肿瘤患者等,在低温下患者血清中的 IgM 抗体能使红细胞发生凝集,并将补体与红细胞结合,结果发生溶血。当这种红细胞在血液循环中回到身体温度较高之处,抗体与红细胞脱离,但补体仍留在红细胞表面,常给交叉配血带来一定的困难<sup>[7]</sup>。解决冷凝集素配血不合的问题,作者建议选择同型洗涤红细胞制剂与患者交叉配血,配血方法用盐水、酶和经典的抗球蛋白法 3 种方法联合使用为宜。因为临床上常用的凝聚胶法和卡式凝胶法都不能避免冷凝集素对配血的影响,会造成假阳性结果。配血温度应严格控制在 37℃条件下进行,抗球蛋白法配血时应注意患者血清与供血者红细胞混匀共同孵育 30 min 后,需用 37℃温生理盐水洗涤试验管 3 次后,再加入单-抗 IgG 抗球蛋白试剂,3 500 r/min 离心 15 s 后看结果,常能给予冷凝集素患者找到合适的血液输注。对于温性自身免疫性抗体患者,一般应尽量避免输血,因输入的红细胞能被患者的抗体附着而遭破坏,输血有可能(但不一定)加速溶血,导致患者体内黄疸加重。如患者贫血和缺氧症状严重威胁其生命时,不应以可能发生输血反应为由而执意不输血,为了稳妥,输血时应注意:交叉配血试验困难时,只能输注比患者自身对照凝集强度最弱的献血者血液,在输血前加用大量激素的同时遵循少量慢输的原则给予患者输注血液,可减少溶血,一旦发现溶血现象,应立即终止输血,最大限度避免输血不良反应的发

生,保证临床输血安全。

通过抗球蛋白试验,找出造成交叉配血不合的重要影响因素,发现有意义的不规则抗体,避免受血者因输入含有相应的红细胞抗原发生溶血性输血反应,也可受血者找到相合的血液提供依据<sup>[8]</sup>。解决交叉配血不合的问题,使患者得到及时救治,为抢救患者生命赢得宝贵的时间,其意义非常重大。

#### 参考文献

- [1] 池泉,郭永建,田兆嵩. 红细胞血型抗体与输血安全[J]. 中国输血杂志,2008,21(8):649-654.
- [2] 刘凌,李流娇,莫水群,等. 疑难交叉配血分析和对策[J]. 医学检验与临床,2011,22(4):64-65.
- [3] 汪辉,王京华,苗美娟,等. 不规则抗体筛查对临床输血的意义[J]. 现代生物医学进展,2010,10(5):884-886.
- [4] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海:科学技术出版社,2002:65-66.
- [5] 闫芳,刘亚庆,刘素芳,等. 意外抗体的鉴定在疑难配血中的重要作用[J]. 北京医学,2011,33(7):587-589.
- [6] 周吉安,艾伯平,代方. 有输血或妊娠史的患者抗-E 的检测[J]. 中国输血杂志,2010,23(9):705-706.
- [7] 郝繁运,刘晶,董振芳. 1 例高效价冷凝集素致配血不合及单一主侧管配血不合简析[J]. 中国输血杂志,2003,16(4):283-284.
- [8] 肖文海,朱红梅. 临床输血患者红细胞、血型不规则抗体分析[J]. 中国输血杂志,2012,25(7):686-687.

(收稿日期:2013-11-04 修回日期:2014-02-03)

(上接第 1746 页)

- K, et al. Diagnosis of adult tuberculous meningitis by use of clinical and laboratory features[J]. Lancet, 2002, 360(9342):1287-1292.
- [3] Marais S, Thwaites G, Schoeman JF, et al. Tuberculous meningitis: a uniform case definition for use in clinical research[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(11):803-812.
  - [4] Misra UK, Kalita J, Srivastava R, et al. A study of cytokines in tuberculous meningitis: clinical and MRI correlation[J]. Neurosci Lett, 2010, 483(1):6-10.
  - [5] Al-Attayah R, El-Shazly A, Mustafa AS. Comparative analysis of spontaneous and mycobacterial antigen-induced secretion of Th1, Th2 and pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients[J]. Scand J Immunol, 2012, 75(6):623-632.
  - [6] Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis[J]. Nat Rev Immunol, 2001, 1(1):20-30.
  - [7] Donald PR, Schoeman JF, Beyers N, et al. Concentrations of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1 beta in the cerebrospinal fluid of children treated for tuberculous meningitis[J]. Clin Infect Dis, 1995,

21(4):924-929.

- [8] Hur YG, Gorak-Stolinska P, Ben-Smith A, et al. Combination of cytokine responses indicative of latent TB and active TB in Malawian adults[J]. PLoS One, 2013, 8(11):e79742.
- [9] Kellar KL, Gehrke J, Weis SE, et al. Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with Mycobacterium tuberculosis antigens[J]. PLoS One, 2011, 6(11):e26545.
- [10] 韦庆文,迟秀文,杨利桃. 结核病与肿瘤坏死因子和白细胞介素的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2):148-150.
- [11] Redelman-Sidi G, Sepkowitz KA. IFN- $\gamma$  release assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection among immunocompromised adults [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(4):422-431.
- [12] Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010, 28(4):245-252.

(收稿日期:2013-11-28 修回日期:2014-02-16)