

# 调节性 T 细胞 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> 在抗多耐药肺结核治疗中的意义\*

范任华, 向延根, 杨 励<sup>△</sup>, 刘艳科, 尹 柯, 封文军, 许忆新, 谢和宾, 傅满姣, 吴佳玲, 王 雷, 张 婷  
(湖南省长沙市中心医院 410004)

**【摘要】 目的** 探讨调节性 T 细胞 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> 在西药联合中药复方“益肺通络方”抗多耐药结核患者中的免疫调节作用。**方法** 选取多耐药结核病(MDR-TB)住院患者 34 例, 随机分成标准化疗(西药)组 12 例作为对照组, 中药复方联合西药组 22 例作为试验组, 并签署知情同意书, 按临床试验方案抗结核治疗, 第 0、3、6、9 个月时分别采集 2 mL 肝素抗凝外周静脉血, 经 CD4、CD25、CD127 流式抗体标记后, Beckman 流式细胞仪(FCM)计数各组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> 百分比。**结果** 随服药时间推移, 对照组 MDR-TB 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> 调节性 T 细胞百分比下降, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 试验组 MDR-TB 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> 调节性 T 细胞百分比下降明显, 差异有统计学意义( $P = 0.007$ ); 与对照组 MDR-TB 患者比较, 试验组 MDR-TB 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> 调节性 T 细胞百分比下降, 差异有统计学意义( $P = 0.047$ )。**结论** 经过 9 个月的抗结核治疗, 试验组能有效降低 MDR-TB 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> 调节性 T 细胞百分比, 中药复方可能协同西药下调调节性 T 细胞的免疫抑制, 恢复结核病患者机体免疫平衡状态。因此, 中药复方联合西药抗多耐药结核患者治疗也许是一个有益的帮助。

**【关键词】** 调节性 T 细胞; 多耐药肺结核; 抗结核治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.16.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)16-2307-02

**Significance of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cells in therapy of anti-MDR-TB\*** FAN Ren-hua, XIANG Yan-gen<sup>△</sup>, YANG Li<sup>△</sup>, LIU Yan-ke, YIN Ke, FENG Wen-jun, XU Yi-xin, Xie He-bin, FU Man-jiao, WU Jia-ling, WANG Lei, ZHANG Ting (Changsha Central Hospital, Changsha, Hunan 410004, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the immunomodulatory role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cells in Western medicine combined with Chinese medicine Compound Yifeitongluo Decoction for treating multi-drug resistant pulmonary tuberculosis. **Methods** 34 cases of multidrug-resistant TB (MDR-TB) were selected and randomly divided into the standard chemotherapy (Western medicine) group (12 cases, control group) and the Western medicine plus compound Chinese medicine group (22 cases, experimental group). The informed consent was obtained from all subjects and the anti-TB therapy was performed according to the clinical trial scheme. 2mL of heparin coagulated peripheral venous blood was collected in 0, 3, 6, 9 months. After CD4, CD25 and CD127 monoclonal antibody labeling, the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> in each group was detected by using the Beckman flow cytometry (FCM).

**Results** The percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> T cells in control group was declined with time lapse, but without statistical significance ( $P > 0.05$ ); which in the experimental group was decreased significantly ( $P = 0.007$ ); compared with the control group, the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> T cells in the experimental group was decreased significantly ( $P = 0.047$ ). **Conclusion** After 9-month anti-TB therapy, the experimental group can effectively decrease the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cells. The compound Chinese medicine could synergize the Western medicine to down-regulate the immunosuppression of regulatory T cells and recover the body immune balance of TB patients. Therefore, compound Chinese medicine combined with Western medicine may be a beneficial help to the anti-MDR-TB therapy.

**【Key words】** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cells; multi-drug resistant pulmonary tuberculosis; anti-tuberculosis therapy

肺结核严重威胁人类健康, 全球约有 20 亿肺结核带菌者, 而我国结核患者人数居世界第二位, 形势非常严峻<sup>[1]</sup>。结核分枝杆菌对常用抗结核药物构成耐药性, 导致发病率上升以及多

耐药结核菌株的出现, 对现有的抗结核治疗构成严重的挑战<sup>[2-3]</sup>。结核病免疫功能紊乱涉及到特异性的细胞免疫、体液免疫和多种免疫调节因子, 有不同程度的免疫功能低下或免疫

抑制,单纯抗结核药物化疗很难收到较好疗效。因此,对结核病患者进行抗结核药物化疗外,辅以免疫调节功能的低不良反应的中草药,恢复机体免疫功能平衡,增强患者对抗结核药物的敏感性,达到抑制或杀灭结核菌,提高耐药结核病的治愈率。因此,从天然药物中寻找安全有效的抗结核药物,用于临床治疗和辅助治疗耐药性结核病,具有重要的现实意义。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2013年11月至2014年9月本院收治的多耐药结核病(MDR-TB)患者34例,其中男20例,女14例,平均(47.3±14.2)岁,随机分成标准化疗(西药即对照)组12例、中药复方联合西药即试验组22例;临床诊断根据临床症状、体征、X线胸片、CT扫描、痰菌检查,均符合中华医学会结核病分类与诊断标准<sup>[4]</sup>。纳入标准:所有纳入研究对象均无心、肝、肾等脏器合并症及其他感染,无糖尿病、自身免疫相关性或免疫性疾病,3个月内未用过免疫抑制剂及激素等药物。纳入研究对象签署知情同意书,按临床试验方案分别标准化疗(西药)即对照组、西药+中药复方进行抗结核治疗即试验组,第0、3、6、9个月时分别采集2 mL肝素抗凝外周静脉血。

**1.2 仪器与试剂** 采用Beckman-Coulter Epics XL流式细胞仪,流CD4-FITC、CD25-PC5、CD127-PE、IgG1-FITC、IgG1-PC5、IgG1-PE、溶血剂OptiLyse C均购自美国Beckman-Coulter公司。复方中药“益肺通络方”颗粒为本院自制颗粒剂。

**1.3 方法** 取2 mL静脉血、肝素抗凝,混匀,各取50 μL全血于3支测定管,第1管加入IgG1-FITC、IgG1-PC5、IgG1-PE,第2管加入CD4-FITC、CD25-PC5、CD127-PE单克隆抗体量均为20 μL,标记抗体和抗凝血混匀后,在室温、避光15 min后,每管400 μL溶血剂OptiLyse C溶解红细胞1 h,用侧向散射光(SS)和前向散射光(Fs)圈门选取淋巴细胞群,以IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5为Treg细胞同型对照。分别检测CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg细胞百分比含量。

**1.4 统计学处理** 采用SPSS19.0软件对数据进行处理及统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 对照组不同时间点的各指标水平比较** 对照组,第0、3、6、9个月时分别采集2 mL肝素抗凝外周静脉血流式细胞术计数CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg细胞,发现随抗结核治疗时间推移Treg细胞数量逐渐下调,当月(未抗结核治疗)MDR-TB外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg细胞占CD4<sup>+</sup>T细胞总数的(10.01±4.40)%,高于第3个月的(9.03±3.50)%,第6个月的(8.33±3.39)%,第9个月的(7.10±3.74)%,各时间点比较差异无统计学意义( $F=1.313, P=0.230$ )。

**2.2 试验组不同时间点各指标水平比较** 试验组,第0、3、6、9个月分别采集2 mL肝素抗凝外周静脉血流式细胞术计数CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg细胞,发现随抗结核治疗时间推移Treg细胞数量逐渐下调,当月(未抗结核治疗),MDR-TB外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg细胞占CD4<sup>+</sup>T细胞总数的(10.85±5.66)%,高于第3个月的(7.12±3.80)%,第6个月的(4.88±2.57)%,第9个月的(3.41±1.53)%,各时间点比较差异无统计学意义( $F=12.317, P=0.007$ )。

**2.3 2组结核患者不同时间点的外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>调节性T细胞水平比较** 抗结核治疗不同时间点CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg细胞百分含量变化,差异有统计学意义( $F=6.361, P=0.018$ ),对照组Treg细胞数量变化,差异无统计学意义( $F=1.313, P=0.230$ );试验组随着抗结核治疗时间推移Treg细胞数量逐渐下调,差异有统计学意义( $F=12.317, P=0.007$ )。2组组间比较,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg细胞百分含量变化,差异有统计学意义( $F=5.207, P=0.047$ ),分组与各时间点无交互效应( $F=3.504, P=0.094$ )。见表1。

表1 抗结核治疗前后不同时间点外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg细胞占淋巴细胞总数的百分比( $\bar{x} \pm s, \%$ )

分组	n	Treg/CD4 <sup>+</sup>				各组内比较	
		第0个月	第3个月	第6个月	第9个月	F	P
对照组	12	10.01±4.40	9.03±3.50	8.33±3.39	7.10±3.74	1.313	0.230
试验组	22	10.85±5.66	7.12±3.80	4.88±2.57	3.41±1.53	12.317	0.007

注:组内比较  $F=6.361, P=0.018$ ;组间比较  $F=5.207, P=0.047$ 。

### 3 讨论

近年中草药在抗结核分枝杆菌、增强和(或)调节机体免疫功能、辅助治疗结核病、减轻药物的不良反应和对机体生理功能影响等方面已有一些研究<sup>[5-7]</sup>。复方中药“益肺通络方”颗粒为本院自制的专利配方颗粒剂,本院采用复方中药“益肺通络方”颗粒干预多耐药结核病患者,取得了较好的临床疗效。

调节性T细胞CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg与多种肿瘤以及慢性感染免疫抑制状态有关。Treg细胞通过分泌抑制性的细胞因子、细胞接触和诱导凋亡等方式发挥其免疫抑制的功能,进而间接抑制CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞特异性免疫<sup>[8-9]</sup>。研究发现,外科切除治疗空洞型多耐药肺结核后,Treg细胞数量减少,表明Treg细胞参与了多耐药肺结核疾病进程<sup>[10]</sup>。本研究选取20例多耐药结核病患者,按临床试验方案随机分标准化

疗(西药)组与中药复方联合西药组,在第0、3、6、9个月时分别采集2 mL肝素抗凝外周静脉血,流式细胞检测T淋巴细胞发现,随服药时间推移,对照组MDR-TB患者外周血的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg百分比数量各月份略有下降;而试验组MDR-TB患者外周血的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg百分比数量下降明显,2组间的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg细胞百分比变化,差异有统计学意义( $F=5.207, P=0.047$ ),表明中药复方联合西药治疗耐药结核在下调免疫抑制细胞CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg有较好的效果。同时,提示复方中药“益肺通络方”颗粒可能协同西药打破MDR-TB组患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg产生的免疫抑制。

综上所述,复方中药“益肺通络方”可能协同西药下调CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>Treg免疫抑制,提升(下转第2313页)

解组的 sTK1 浓度为(1.78±0.39)pmol/L,未缓解组的 sTK1 浓度为(3.56±0.64)pmol/L,3 组间两两比较,sTK1 水平差异均有统计学意义( $P<0.01$ ),同时化疗前 sTK1 浓度也明显高于完全缓解组及部分缓解组,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),但化疗前 sTK1 浓度与未缓解组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。这提示着儿童 ALL 在有效的化疗之后,完全缓解及部分缓解的患儿骨髓中造血干细胞异常增殖被不同程度地有效抑制,白血病细胞在造血组织中大量减少,血液中 sTK1 浓度降低,在骨髓细胞病理学的疗效判断标准中,完全缓解患儿骨髓中的原幼淋巴细胞降至 5%以下,部分缓解组的患儿骨髓内的原幼淋巴细胞降至 5%至 20%,可以发现 sTK1 浓度结果与 ALL 疗效判断标准中骨髓细胞病理学检查结果是相符的。从 sTK1 检出阳性率结果也显示,化疗后的阳性率(20.5%)与化疗前的阳性率(87.1%)差异有统计学意义。综上所述,sTK1 浓度对于儿童 ALL 的疗效监测及指导治疗方案的调整具有重要意义。

本研究初步表明,sTK1 浓度作为儿童 ALL 的初筛、辅助诊断具有一定的参考价值,并在儿童化疗疗效评估上也具有重要临床意义。但本研究病例有限,缺少良性疾病的对照,研究结论有一定局限性,今后应通过增加病例及良性病种的深入研究,探讨 sTK1 在临床上的价值。

参考文献

[1] 刘壮,张义堂,吴香琴,等. p73 基因在儿童急性淋巴细胞白血病的表达[J]. 临床儿科杂志,2010,28(5):410-413.  
 [2] Gronowitz SJ, Kallander FR, Diderholm H, et al. Application of an in vitro assay serum thymidine kinase: results on viral disease and malignancies in humans [J]. Int J Cancer,1984,33(1):5-12.  
 [3] Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. Improved out-

come in child-hood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracycline and cranial radiotherapy: Results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group[J]. Blood,2000,95(11):3310-3322.

[4] Madhoun A, Tjarks W, Eriksson S. The role of thymidine kinases in the activation of pyrimidine nucleoside analogues[J]. Mini Rev Med Chem,2004,4(4):341-350.  
 [5] Karp G. Cell and molecular biology[M]. USA: Wiley International Edition,2005:6699.  
 [6] 陈凯,于在成. 血清胸苷激酶 1 检测在食管癌诊治中的应用[J]. 蚌埠医学院学报,2013,38(4):424-426.  
 [7] 任若冰,李亚芬. 血清胸苷激酶 1 在乳腺肿瘤中的表达及其临床意义[J]. 中国癌症杂志,2014,24(1):41-45.  
 [8] 王静,陶健. 卵巢癌患者联合检测血清 TK1、CA125 的临床价值[J]. 中华全科医学,2014,12(6):975-976.  
 [9] Gronowitz JS, Hagberg H, Kllander CFR, et al. The use of serum deoxythymidine kinase as a prog-nostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma[J]. Br J Cancer,1983,47(4):487-495.  
 [10] 徐卫,沈秋丹,于慧,等. 慢性淋巴细胞白血病患者脂蛋白酯酶和血清胸苷激酶水平及与其他预后因素的相关性研究[J]. 中国血液学杂志,2009,30(1):23-26.  
 [11] He Q, Wu J, Merza M, et al. Cytosolic thymidine kinase is a specific histopathologic tumour marker for breast carcinomas[J]. Int Journal oncol,2004,25(4):945-953.  
 [12] 曾智杰,欧阳文婷. 胸苷激酶 1 在白血病患者化疗过程中的临床意义探讨[J]. 分子诊断与治疗杂志,2009,1(1):28-30.

(收稿日期:2015-02-28 修回日期:2015-05-20)

(上接第 2308 页)

报道。多耐药结核病特异性的细胞免疫,发挥抗结核免疫调节作用。诚然,深入研究复方中药在多耐药结核病中的免疫调节作用或许是对抗耐药结核治疗是一个有益的帮助。

参考文献

[1] Organization WH. Global tuberculosis control 2010 [J]. Global Tuber Control,2010,10(4):2179-2191.  
 [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Extensively drug-resistant tuberculosis—United States, 1993-2006[J]. J Am Med Assoc,2007,56(23):250-253.  
 [3] Chiang CY, Van WC, Mori T, et al. Challenges to the global control of tuberculosis [J]. Respirology, 2013, 18 (4):596-604.  
 [4] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断与治疗指南 [J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(2):70-74.  
 [5] 钟炳图. 黄芪注射液佐治耐药肺结核疗效观察 [J]. 浙江中西医结合杂志,2004,14(2):83-84.

[6] 蒋成全. 中药抗结核杆菌的研究概况 [J]. 中国实用医药, 2007,2(22):95.  
 [7] 袁修德,袁媛,吴激波,等. 益肺止血汤治疗肺结核咯血的临床效果观察 [J]. 检验医学与临床,2014,11(10):1375-1376.  
 [8] Chen X, Zhou B, Li M, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease [J]. Clin Immunol, 2007,123(1):50-59.  
 [9] 胡良安,李岱荣,罗永艾,等. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞抑制肺结核特异细胞免疫 [J]. 基础医学与临床, 2012,32(2):181-185.  
 [10] Wu Y, Peng W, Cai Y, et al. Decrease in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Treg cells after pulmonary resection in the treatment of cavity multidrug-resistant tuberculosis [J]. Int J Infect Dis,2010,14(9):815-822.

(收稿日期:2015-02-10 修回日期:2015-04-20)