

瘰癧宁对淋巴结核患者免疫细胞及细胞因子的影响研究

——附102例临床资料

窦慧¹ 朱珠² 钮晓红¹

(1.南京中医药大学附属南京市中西医结合医院,江苏南京210014;2.南京中医药大学,江苏南京210023)

摘要 目的:研究瘰癧宁对淋巴结核患者外周血免疫细胞(T细胞)和细胞因子的影响。方法:204例淋巴结核患者随机分为治疗组与对照组,每组102例。对照组采用常规抗结核三联西药治疗,治疗组在对照组治疗的基础上加用南京市中西医结合医院院内制剂瘰癧宁治疗。治疗4周后比较2组患者外周血T细胞和炎症因子表达水平。结果:治疗后治疗组患者CD4⁺CD25⁺CD127^{low}调节性T细胞(Tregs)水平明显低于对照组和本组治疗前($P<0.01$),CD3⁺CD8⁺CD69⁺效应性T细胞(Teffs)水平明显高于对照组和本组治疗前($P<0.05$)。2组患者治疗后,白介素2(IL-2)、白介素4(IL-4)、白介素10(IL-10)含量组内及组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$);治疗组治疗后肿瘤坏死因子(TNF- α)及干扰素 γ (IFN- γ)均明显低于本组治疗前($P<0.05$, $P<0.01$)和对照组治疗后($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:瘰癧宁可能通过下调Tregs、上调Teffs及降低炎症因子TNF- α 和IFN- γ 来发挥其治疗淋巴结核的作用。

关键词 淋巴结核;瘰癧宁;抗结核药;调节性T细胞;效应性T细胞;肿瘤坏死因子 α ;干扰素 γ

中图分类号 R522.05 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2020)08-0033-04

基金项目 南京市科技计划项目(201402039):瘰癧宁治疗淋巴结核平衡Teffector/Tregs作用研究

结核分枝杆菌(MTB)感染肺实质以外的部位引起的结核称为肺外结核,淋巴结核作为一种最常见的肺外结核,属中医学“瘰癧”范畴,如不进行及时的诊断和治疗患处易溃烂、流脓,并难以愈合,特别是免疫系统受到抑制的患者,易危及生命^[1]。MTB感染后患者会呈现非常强的抗原特异性CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞反应,调节性T细胞(Tregs)和效应性T细胞(Teffs)在其中发挥着重要的作用。淋巴结核是一种在淋巴结中引起的肉芽肿性免疫反应性疾病,而肉芽肿的形成主要是由细胞免疫介导的细胞因子和趋化因子相互作用完成^[2]。因淋巴结核的病原菌是结核杆菌,临床上通常使用抗结核三联西药治疗^{[3]64},西药联合杀菌抑菌作用虽然有效,但常常会因耐药而使疾病失控,因此临床上迫切需要其他有效且副作用较小的药物。瘰癧宁为南京市中西医结合医院研发的抗淋巴结核中药,前期研究结果表明,其治疗淋巴结核有效^[4],且可提高外周血T淋巴细胞的应答能力^[5],证明瘰癧宁可参与抗结核治疗过程中机体的免疫调节。本研究旨在进一步研究瘰癧宁对Tregs、Teffs及对结核相关炎症细胞

因子白介素(IL)-2、IL-4、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和干扰素 γ (IFN- γ)表达水平的影响,探究瘰癧宁是否通过调节这两种免疫细胞和相关炎症细胞因子来发挥其免疫调节作用,现报道如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 收集2016年7月至2017年12月南京市中西医结合医院瘰癧科204例确诊为淋巴结核的患者,按照随机数字表法分为治疗组与对照组,每组102例。治疗组男50例,女52例;年龄19~65岁,平均年龄(40.33 $\pm$ 14.32)岁;病程7~7 300 d,平均病程(373.4 $\pm$ 104.0) d;病灶部位在颈部92例,腋下8例,腹股沟2例;单侧56例,双侧46例;肿块46例,脓肿33例,破溃23例。对照组男46例,女56例;年龄18~70岁,平均年龄(39.92 $\pm$ 14.35)岁;病程7~7 300 d,平均病程(360.9 $\pm$ 103.7) d;病灶部位在颈部89例,腋下9例,腹股沟4例;单侧58例,双侧44例;肿块45例,脓肿36例,破溃21例。2组患者性别、年龄、病程等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会审批通过,批件号:201403001。

1.2 诊断标准 参照中华医学会《临床诊疗指南结核病分册》^{[3]27}和《中医外科常见病诊疗指南》^[6]中淋巴结核的诊断标准。(1)淋巴结增大或融合成团,或化脓破溃;(2)病灶组织或脓液做MTB rpoB基因和突变的检测为阳性;(3)穿刺液中查到MTB;(4)病理检查:结核病理学典型特征及抗酸染色阳性。以病原学及病理学诊断为主要依据。

1.3 纳入标准 (1)符合淋巴结核西医诊断标准;(2)年龄在18~70岁,男女不限;(3)自愿参加本研究,并签署知情同意书。

1.4 排除标准 已经抗结核1个月以上者;合并心脑血管、肝、肾及血液系统异常等严重疾病者;全身结核杆菌感染或活动性肺结核患者;孕期或哺乳期女性。

2 治疗方法

2.1 对照组 采用常规抗结核三联西药治疗并予安慰剂。异烟肼(杭州民生药业有限公司,批号:T16B031,规格:0.1 g×100片),3片/次,1次/d;利福平(沈阳红旗制药有限公司,批号:1609211,规格:0.15 g×100粒),3粒/次,1次/d,晨起空腹服;乙胺丁醇(上海新亚药业闵行有限公司,批号:063160652,规格:0.25 g×100片)3片/次,1次/d。安慰剂(南京市中西医结合医院制剂室提供,规格:0.5 g×100粒,主要药物组成:淀粉),4粒/次,3次/d。

2.2 治疗组 在对照组西药治疗的基础上加服療癆宁。療癆宁(南京市中西医结合医院制剂室,批号:44160507,规格:0.5 g×100粒,主要药物组成:梓木草、夏枯草,2006年获得国家发明专利^[7],2013年获得医院制剂批号:苏药制字Z20130001),4粒/次,3次/d。

2组疗程均为4周。

3 疗效观察

3.1 观察指标

3.1.1 Tregs和Teffs表达水平 2组患者治疗前后抽取外周静脉血,用相应的荧光抗体染色后,流式细胞仪上机检测Tregs和Teffs的表达水平。

3.1.2 炎症因子水平 采用酶联免疫吸附术(ELISA)检测2组患者治疗前后血清IL-2、IL-4、IL-10和TNF- α 、IFN- γ 的表达水平。

3.2 统计学方法 应用Graphpad Prism 6.0统计软件进行统计分析。组间比较采用 t 检验,组内比较采用配对 t 检验,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3.3 治疗结果

3.3.1 2组患者治疗前后外周血Tregs和Teffs表达水平比较 2组患者治疗前外周血Tregs和Teffs表

达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组治疗后上述指标与治疗前比较差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗组治疗后Tregs表达水平明显低于治疗前和对照组治疗后($P < 0.01$),Teffs表达水平明显高于治疗前和对照组治疗后($P < 0.05$)。见表1。治疗前后Tregs流式图比较见图1和图2,治疗前后Teffs流式图比较见图3。

表1 治疗组与对照组治疗前后Tregs和Teffs表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	时间	Tregs/%	Teffs/%
治疗组	102	治疗前	7.63 $\pm$ 1.51	2.67 $\pm$ 1.03
		治疗后	5.05 $\pm$ 2.21***	3.62 $\pm$ 1.11 [#]
对照组	102	治疗前	7.62 $\pm$ 1.54	2.67 $\pm$ 1.04
		治疗后	7.60 $\pm$ 3.28	2.68 $\pm$ 1.02

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组治疗后比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

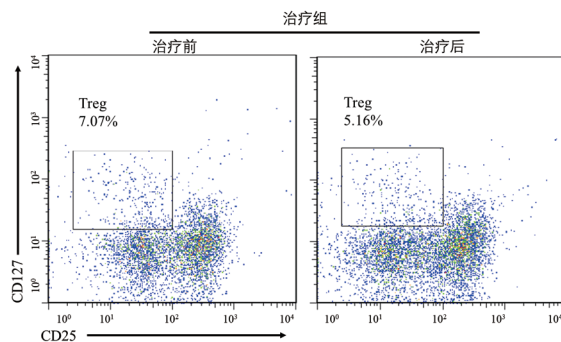


图1 治疗组治疗前后 Tregs 的百分数含量比较

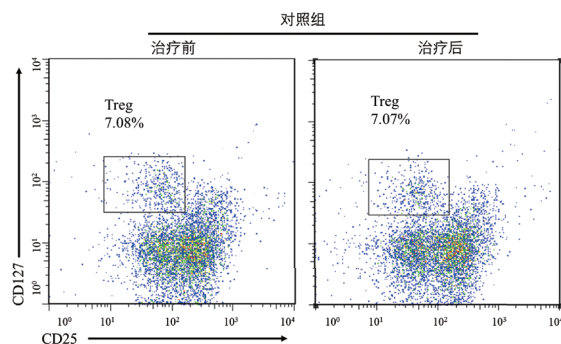


图2 对照组治疗前后 Tregs 的百分数含量比较

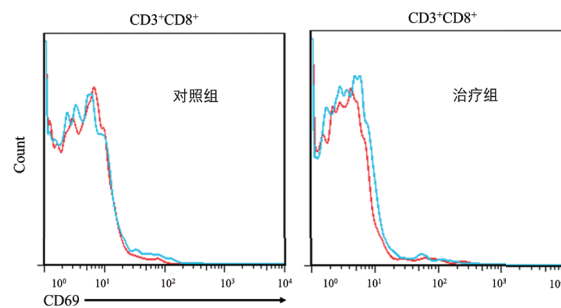


图3 治疗组与对照组治疗前后 Teffs 表达变化情况

3.3.2 2组患者治疗前后炎症因子表达水平比较 2组患者治疗前IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组治疗后上述指标与治疗前比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。治疗组治疗后TNF- α 、IFN- γ

表达明显低于治疗前和对照组治疗后($P<0.05$, $P<0.01$),其余指标组内及组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

4 讨论

结核病是世界上导致健康不良和死亡的主要原因,全球每年就有1 000多万的新发结核患者^[8]。结核分为肺结核和肺外结核,肺外结核可影响人体几乎所有的器官,其中就包括淋巴结^[9]。淋巴结在传统的中医学上被称为“瘰癧”,是以出现豆粒大小的肿块,缓慢增大增多,或脓肿溃烂为主要特征的慢性感染性疾病。

当大量结核杆菌进入机体,固有免疫应答启动,外周淋巴器官和组织诱导T细胞活化,进而启动适应性免疫应答。Tregs约占循环CD4⁺T细胞的5%~10%,对T细胞的增殖具有抑制作用^[10],在结核的疾病进展过程中,Tregs表达量升高并可导致疾病易感性^[11]。此外,抗原特异性的Tregs可增加机体感染细菌的风险^[12]。早期结核病人的病原特异性Tregs可延迟Teffs到达感染灶,而且即使是少量MTB特异性的Tregs也能延迟CD4⁺、CD8⁺效应性T细胞在淋巴结内的免疫启动,强力限制机体的保护性免疫反应^[13]。Tregs一方面在防止炎症介导的对宿主组织损伤方面可能起积极作用,但另一方面在结核杆菌感染启动T细胞反应方面则可能起消极作用,结核杆菌通过诱导Tregs扩增,抑制或延迟获得性免疫启动,导致结核杆菌繁殖^[14]。

肉芽肿是结核杆菌繁殖和居留的主要场所^[15],肉芽肿内结核免疫反应的局限化可能是结核杆菌不能被完全清除进而形成慢性感染的原因之一,效应T细胞(Teffs)是机体免疫功能的执行细胞,其活化后可杀灭结核杆菌。CD8⁺初始T细胞在同样情况下较CD4⁺初始T细胞更容易分化成效应/记忆T细胞,CD8⁺细胞毒性T细胞(CTL)是解决胞内细菌的关键,CTL功能失调可能会导致结核杆菌逃逸^[16]。在结核性淋巴结的肉芽肿的损伤中CD8⁺T细胞与Tregs细胞的比值显著降低^[17]。我们的研究结果也表

表2 治疗组与对照组治疗前后炎症因子表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	IL-2/(ng/mL)	IL-4/(ng/mL)	IL-10/(ng/mL)	TNF- α /(pg/mL)	IFN- γ /(pg/mL)
治疗组	102	治疗前	2.09 $\pm$ 0.41	13.01 $\pm$ 3.31	12.44 $\pm$ 4.21	19.67 $\pm$ 6.54	325.1 $\pm$ 47.88
		治疗后	2.12 $\pm$ 0.93	12.41 $\pm$ 5.64	12.81 $\pm$ 5.36	14.58 $\pm$ 4.70 [#]	263.3 $\pm$ 54.39 ^{##}
对照组	102	治疗前	2.08 $\pm$ 0.42	12.96 $\pm$ 3.30	12.40 $\pm$ 4.16	19.45 $\pm$ 6.57	326.8 $\pm$ 48.73
		治疗后	2.09 $\pm$ 1.64	12.51 $\pm$ 5.33	12.45 $\pm$ 8.20	19.09 $\pm$ 5.08	325.6 $\pm$ 63.79

注:与本组治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对照组治疗后比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

明,与传统西药相比,瘰癧宁可通过抑制Tregs和上调Teffs的表达,维持Teffs/Tregs之间的免疫平衡,提高结核病人低下的细胞免疫反应,从而发挥更强的抗结核治疗作用。

细胞因子是一把“双刃剑”,既能清除免疫系统感染,也会使机体遭到严重损害,因此,全面了解与结核疾病有关的细胞因子如IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 和IFN- γ 是十分必要的。CD4⁺T细胞亚型包括辅助性T细胞1型(Th1)和辅助性T细胞2型(Th2),其中Th1分泌的细胞因子有IL-2、TNF- α 和IFN- γ 等,Th2分泌的细胞因子有IL-4和IL-10等。IL-2是T细胞增殖的刺激因子,与肉芽肿的形成有关,IL-10的作用与IL-2相反,可抑制T细胞的增殖;IL-4与多核巨细胞的形成有关;TNF- α 是参与肉芽肿形成和巨噬细胞活化的重要组分^[18];IFN- γ 也与结核的疾病进程息息相关^[19]。我们的研究结果表明,对照组和治疗组药物干预前后Th1分泌的细胞因子IL-2和Th2分泌的细胞因子IL-4、IL-10表达水平并没有显著的差别。TNF- α 是由Th1细胞合成的对机体免疫反应和炎症反应及组织损伤起重要调节作用的因子,有研究报道肺结核患者胸腔积液TNF- α 的表达明显升高^[20]。IFN- γ 是第一个被人类发现的细胞因子,对细胞增殖有抑制作用,能够诱导细胞的凋亡,在机体免疫调节中起重要作用^[21]。有文献指出,肺结核患者血清中IFN- γ 含量明显升高^[22]。我们的研究结果显示,瘰癧宁可以降低TNF- α 和IFN- γ 这两种细胞因子的表达,从而减轻结核杆菌感染引起的炎症反应,减少淋巴结病变组织的坏死和液化。

综上,瘰癧宁可抑制调节性T细胞Tregs和促进效应性T细胞Teffs的表达,发挥其治疗淋巴结结核作用的同时,还降低了炎性细胞因子TNF- α 和IFN- γ 的含量,进而减少炎症过度反应对机体的损害。因此,临床上在常规西药的基础上加用瘰癧宁来治疗淋巴结结核,既可增强疗效,又能调节机体的免疫应答,从而减少耐药病例,瘰癧宁越早使用效果越佳。

截至目前,我们的研究内容也仅限于药物对调节性T细胞、效应性T细胞和相关细胞因子的影响,瘰癧宁到底通过什么途径影响这些细胞及细胞因子来发挥其治疗功效,是否有相关的信号通路,以及瘰癧宁是否也会影响其他细胞,这些都是我们以后研究的重点。

参考文献

- [1] WANG X Q, YANG Z H, FU Y Y, et al. Insight to the epidemiology and risk factors of extrapulmonary tuberculosis in Tianjin, China during 2006–2011[J]. PLoS One, 2014, 9 (12): e112213.
- [2] ETNA M P, GIACOMINI E, SEVERA M, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis[J]. Semin Immunol, 2014, 26 (6): 543.
- [3] 中华医学会. 临床诊疗指南结核病分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [4] 钮晓红, 黄子慧, 杨春睿. 瘰癧宁治疗淋巴结核临床研究[J]. 中医学报, 2014, 29 (3): 399.
- [5] 钮晓红, 李明吾, 李运曼. 瘰癧宁对淋巴结核患者细胞免疫力的影响[J]. 江苏药学与临床研究, 1998, 6 (4): 20.
- [6] 中华中医药学会. 中医外科常见病诊疗指南[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 16.
- [7] 钮晓红. 一种治疗结核病的药物组合物及其制备方法: 中国, ZL2003101064924[P]. 2006–9–20.
- [8] GLAZIOU P, FLOYD K, RAVIGLIONE M C. Global epidemiology of tuberculosis[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2018, 39 (3): 271.
- [9] KHAN R, HARRIS S H, VERMA A K, et al. Cervical lymphadenopathy: scrofula revisited[J]. J Laryngol Otol, 2009, 123 (7): 764.
- [10] SCHMIDT A M, LU W, SINDHAVA V J, et al. Regulatory T cells require TCR signaling for their suppressive function[J]. J Immunol, 2015, 194 (9): 4362.
- [11] SCOTT-BROWNE J P, SHAFIANI S, TUCKER-HEARD G, et al. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis[J]. J Exp Med, 2007, 204 (9): 2159.
- [12] SHAFIANI S, DINH C, ERTELT J M, et al. Pathogen-specific Treg cells expand early during Mycobacterium tuberculosis infection but are later eliminated in response to Interleukin-12[J]. Immunity, 2013, 38 (6): 1261.
- [13] SHAFIANI S, TUCKER-HEARD G, KARIYONE A, et al. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis[J]. J Exp Med, 2010, 207 (7): 1409.
- [14] LARSON R P, SHAFIANI S, URDAHL K B. Foxp3+ regulatory T cells in tuberculosis[M]//Advances in Experimental Medicine and Biology. New York: Springer New York, 2013: 165.
- [15] KAPOOR N, PAWAR S, SIRAKOVA T D, et al. Human granuloma in vitro model, for TB dormancy and resuscitation[J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e53657.
- [16] LI L, YANG B Y, ZHANG X L, et al. Mycobacterium tuberculosis-specific polyfunctional cytotoxic CD8+ T cells express CD69[J]. Tuberculosis (Edinb), 2014, 94 (3): 219.
- [17] RAHMAN S, GUDETTA B, FINK J, et al. Compartmentalization of immune responses in human tuberculosis: few CD8+ effector T cells but elevated levels of FoxP3+ regulatory t cells in the granulomatous lesions[J]. Am J Pathol, 2009, 174 (6): 2211.
- [18] MUSTAFA T, BROKSTAD K A, MFINANGA S G, et al. Multiplex analysis of pro- or anti-inflammatory serum cytokines and chemokines in relation to gender and age among Tanzanian tuberculous lymphadenitis patients[J]. Tuberc Res Treat, 2015, 2015: 1.
- [19] BERTOLINI T B, PIÑEROS A R, PRADO R Q, et al. CCR4-dependent reduction in the number and suppressor function of CD4+Foxp3+ cells augments IFN- γ -mediated pulmonary inflammation and aggravates tuberculosis pathogenesis[J]. Cell Death Dis, 2018, 10 (1): 11.
- [20] BOREKCI S, ATAHAN E, DEMIR YILMAZ D, et al. Factors affecting the tuberculosis risk in patients receiving anti-tumor necrosis factor- α treatment[J]. Respiration, 2015, 90 (3): 191.
- [21] KATTI M K. Assessment of serum IL-1, IL-2 and IFN- γ levels in untreated pulmonary tuberculosis patients: role in pathogenesis[J]. Arch Med Res, 2011, 42 (3): 199.
- [22] TATEOSIAN N L, PASQUINELLI V, HERNÁNDEZ DEL PINO R E, et al. The impact of IFN- γ receptor on SLPI expression in active tuberculosis: association with disease severity[J]. Am J Pathol, 2014, 184 (5): 1268.

第一作者: 窦慧 (1990—), 女, 硕士, 主管检验技师, 医学免疫学专业。

通讯作者: 钮晓红, 本科学历, 主任中医师, 二级教授, 博士研究生导师。niuxiaohongllk@163.com

修回日期: 2020-03-16

编辑: 吴宁