

· 指南 · 规范 · 共识 ·

结核病患者外周血淋巴细胞亚群检测 及临床应用专家共识

《中国防痨杂志》编辑委员会

中国医疗保健国际交流促进会结核病防治分会基础专业和临床专业学术部

【摘要】 结核病(TB)的发生、发展及转归取决于入侵结核分枝杆菌(MTB)的数量、毒力及机体免疫抵抗力。通过流式细胞术分析 TB 患者外周血淋巴细胞亚群有助于评估患者的免疫状况、免疫功能和免疫平衡,为临床制定免疫干预措施、观察疗效及判断预后等方面提供实验室检测依据。本专家共识简要地介绍了我国临床常用的淋巴细胞亚群分析项目(包括百分比和绝对计数);提出了 TB 患者淋巴细胞亚群检测及结果正确判读的建议;简介了淋巴细胞亚群分析在 TB 患者临床诊疗中的用途,并对未来淋巴细胞亚群检测的发展前景进行了展望。

【关键词】 结核; 淋巴细胞亚群; 流式细胞术; 免疫; 实验室技术和方法

Expert consensus on detection and clinical application of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with tuberculosis Editorial Board of Chinese Journal of Antituberculosis, Basic and Clinical Speciality Academic Department of Tuberculosis Control Branch of China International Exchange and Promotive Association for Medical and Health Care
Corresponding authors: WU Xue-qiong, Email: xueqiongwu@139.com; CHU Nai-hui, Email: dongchu1994@sina.com

【Abstract】 The occurrence, development and prognosis of tuberculosis (TB) depend on the quantity and virulence of MTB and immune resistance. The analysis of lymphocyte subsets in peripheral blood of TB patients by flow cytometry can help to evaluate the immune status, immune function and immune balance of TB patients, and provide experimental basis for clinical development of immune intervention measures, observation of curative effect and judgment of prognosis. This expert consensus briefly introduces lymphocyte subsets analysis items (including percentage and absolute count) commonly used in clinic; puts forward the suggestions for the detection of lymphocyte subsets in TB patients and the correct interpretation of the results; introduces the use of lymphocyte subsets analysis in the clinical diagnosis and treatment of TB patients, and prospects the development of lymphocyte subsets detection in the future.

【Key words】 Tuberculosis; Lymphocyte subsets; Flow cytometry; Immunity; Laboratory techniques and procedures

结核病(TB)是严重威胁人类健康的呼吸道传染病。TB 发生、发展及转归取决于入侵结核分枝杆菌(MTB)的数量、毒力及机体免疫抵抗力^[1]。因此,对 TB 患者免疫状况的评估和了解其临床免疫学特征是近年来研究的热点之一。通过流式细胞术(flow cytometry, FCM)分析患者外周血淋巴细胞亚群是目前临床评估免疫功能的方法之一,有助于

了解患者当前的免疫状态、免疫功能和免疫平衡,为临床制定免疫干预措施、观察疗效及判断预后等方面提供实验室检测依据。该项目在免疫性疾病、血液病、肿瘤和艾滋病等临床应用广泛^[2-5],但在 TB 临床的应用较有限,认识不足^[6-7]。淋巴细胞亚群分析涉及多个指标,各指标之间关系复杂,如何正确解读、客观分析、科学判断结果,指导 TB 临床诊断和治疗,对于 TB 防控具有现实意义。为此,《中国防痨杂志》编辑委员会、中国医疗保健国际交流促进会结核病防治分会基础和临床专业学术部组织专家共同拟定《结核病患者外周血淋巴细胞亚群检测及临床应用专家共识》,提出可供临床借鉴的具体建议。



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2020.10.001

通信作者:吴雪琼, Email: xueqiongwu@139.com; 初乃惠,

Email: dongchu1994@sina.com

临床常用的淋巴细胞亚群分析项目

目前,临床常规分析的人类外周血淋巴细胞亚

群根据其细胞表面或细胞内独特的分化抗原(cluster of differentiation, CD)的表达可分为:T 淋巴细胞($CD3^+$)、B 淋巴细胞($CD19^+$)和自然杀伤(natural killer, NK)细胞($CD3^-CD16^+CD56^+$)。正常情况下, T 细胞占淋巴细胞总数的 65% 以上, 主要由 $\alpha\beta$ T 细胞(按 T 细胞受体分类)构成(占 T 细胞总数的 90%~95%), 是人类最重要的免疫效应细胞, 其包括辅助性/诱导性 T 细胞($CD3^+CD4^+CD8^-$, 也称 $CD4^+$ T 细胞)、细胞毒/抑制性 T 细胞($CD3^+CD8^+CD4^-$, 也称 $CD8^+$ T 细胞)、双阳性 T 细胞($CD3^+CD4^+CD8^+$, 简称 DPT 细胞)、双阴性 T 细胞($CD3^+CD4^-CD8^-$, 简称 DNT 细胞)和 NK 样 T 细胞($CD3^+CD16^+CD56^+$, 简称 NKT 细胞)等亚群。目前, 通过 FCM 可分析各淋巴细胞亚群的相对计数(百分比)和绝对计数。

一、检测原理

应用各种荧光染料标记的单克隆抗体分别结合待检测血液标本中各类淋巴细胞膜表面或胞内独特的 CD, 然后通过流式细胞仪将染色后的血液细胞制成单细胞悬液, 用一定压力将待检测样品压入流式细胞仪流动室, 待测细胞在鞘液的包被下单行排列, 依次通过流式照射室检测区域。激光照射到细胞上发生散射和折射, 即产生散射光和激发荧光两种信号, 荧光强度代表细胞表面的抗原量。通过流式细胞仪识别和分辨这些荧光, 实现对各类淋巴细胞分化抗原的定量检测。通过检测不同标记的细胞亚群的荧光强度, 可判断目的细胞群在总淋巴细胞群中的百分比。而应用细胞亚群绝对计数管进一步分析血细胞样本, 根据管中准确定量的标准内参荧光微球数, 可对淋巴细胞各个亚群进行绝对计数。

二、检测方法

参考原中华人民共和国卫生部 2011 年 12 月 14 日发布的中华人民共和国卫生行业标准《WS/T 360—2011 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》^[8]进行淋巴细胞亚群分析、相对计数和绝对计数。

1. 淋巴细胞亚群相对计数法: 在普通上样管中加入荧光染料标记的单克隆抗体, 然后加入抗凝血样本, 涡旋混匀, 室温避光放置 15 min; 加入溶血素, 涡旋混匀, 室温避光放置 10 min; 离心弃掉上清液; 加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤, 涡旋混匀, 离心弃上清; 加入 PBS, 混匀,

上机检测。在操作系统中输入基本信息, 设置模板圈门, 分别圈出总淋巴细胞、T 细胞($CD3^+$)、辅助性 T 细胞($CD3^+CD4^+$)、杀伤抑制性 T 细胞($CD3^+CD8^+$)、NKT 细胞($CD3^+CD16^+CD56^+$)、NK 细胞($CD3^-CD16^+CD56^+$)、B 细胞($CD3^-CD19^+$), 获取淋巴细胞门下至少 5000 个细胞, 在软件中即可获得各个亚群占总淋巴细胞群的相对百分比。

2. 淋巴细胞亚群绝对计数法: 在绝对计数管中加入荧光染料标记的单克隆抗体, 然后于管中反向加入 50 μ l 抗凝血样本, 涡旋混匀, 室温避光放置 15 min; 加入 450 μ l 溶血素, 涡旋混匀, 避光放置 10 min 后, 再次混匀后上机检测; 在上述相对计数法设置的模板下增加荧光微球门, 在淋巴细胞门下获取至少 5000 个细胞, 在软件中获得各个亚群占总淋巴细胞群相对百分比的同时, 获得各亚群细胞获取数与荧光微球获取数。依据绝对计数管中准确定量的标准内参荧光微球总数, 通过如下公式计算各细胞亚群绝对值: 亚群细胞数/ μ l = (亚群细胞获取数 $\times$ 荧光微球总数) / (荧光微球获取数 $\times$ 样本量)。

三、检测报告内容

应用 FCM 常规分析下列淋巴细胞亚群: T 细胞($CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、DPT、DNT 和 NKT)、NK 细胞和 B 细胞后, 建议报告各个细胞亚群细胞的相对计数(百分比)和绝对计数。常见的检测报告内容见图 1。

四、检测注意事项

1. 流式检测仪器及抗体试剂的质量保证: 保证流式检测仪器的正常运行, 以及淋巴细胞亚群检测试剂质量可靠是临床获得客观、稳定的检测数据的前提条件。因此, 建议所使用的流式细胞仪和淋巴细胞亚群试剂盒均需获得临床医疗注册证书。

2. 标本采集^[8]: FCM 检测淋巴细胞亚群采用外周血标本, 建议抗凝剂首选乙二胺四乙酸盐(EDTA-K2/EDTA-K3), 该抗凝标本在室温下保存 12~24 h, 不超过 30 h, 以免粒细胞减少; 也可选择肝素钠或柠檬酸钠抗凝, 该标本可在室温下保存 48 h。标本中极少的凝血块均会造成结果的差异, 因此检测前应该仔细观察标本是否有凝血。

3. 审核内容: 建议检验报告时审核人员应对检验过程中的关键步骤进行审核, 如模板的设置、采集的细胞数和荧光微粒数、散射光模式、所有的设门等。

	编号	检测项目	单位	参考范围
相对计数(百分比)	1	总 T 淋巴细胞百分比	%	50~84
	2	辅助性/诱导性 T 淋巴细胞百分比	%	27~51
	3	细胞毒/抑制性 T 淋巴细胞百分比	%	15~44
	4	CD4 ⁺ /CD8 ⁺		0.71~2.78
	5	双阳性 T 淋巴细胞百分比	%	0~4.0
	6	双阴性 T 淋巴细胞百分比	%	2.0~7.0
	7	NK 样 T 淋巴细胞百分比	%	2~13
	8	总 B 淋巴细胞百分比	%	5~18
	9	NK 细胞百分比	%	7~40
绝对计数	10	总 T 淋巴细胞绝对计数	个/ μ l	955~2860
	11	辅助性/诱导性 T 淋巴细胞绝对计数	个/ μ l	550~1440
	12	细胞毒/抑制性 T 淋巴细胞绝对计数	个/ μ l	320~1250
	13	NK 样 T 淋巴细胞绝对计数	个/ μ l	40~300
	14	总 B 淋巴细胞绝对计数	个/ μ l	90~560
	15	NK 细胞绝对计数	个/ μ l	150~1100

图 1 淋巴细胞亚群检测报告内容

4. 报告结果的参考值范围:临床检验结果的参考值范围是临床医生合理地解释结果、判断患者免疫状况正常与否的重要标准。临床实验室为临床医生提供的参考值范围应正确适用,以免误诊或漏诊,导致错误的治疗。目前,国内 FCM 淋巴细胞亚群检测结果的参考值范围来源以试剂及仪器厂家说明书居多,少数实验室自己确定,也有根据其他实验室所提供的参考值范围。然而参考值范围尤其是绝对计数的参考值范围受性别、年龄、种族、营养和环境差异的人群,以及仪器类型及试剂来源的不同而存在差异^[9-13]。因此,建议各实验室需针对不同型号的仪器和不同厂家的试剂科学合理地建立区域人群淋巴细胞亚群检测结果的参考值范围及评价体系,男性和女性、成人和儿童应分别建立参考值范围^[14-15],每年还应采用 20 名健康人血液标本进行验证和调整。

淋巴细胞亚群分析在 TB 患者
临床诊疗中的应用

TB 的发生、发展与机体免疫功能失衡有关,机体免疫系统在 TB 的发病、发展及转归方面扮演重要的角色,直接影响患者预后。淋巴细胞通过多种功能效应在感染性疾病中起着抵抗侵入病原菌的重要作用,淋巴细胞亚群的改变会影响肺部疾病的发

生和发展。检测淋巴细胞亚群水平对了解 TB 患者机体免疫功能、判断病情严重程度及评估预后等方面都有重要意义。因此,对淋巴细胞亚群分析在 TB 患者临床诊疗中的应用提出以下意见和建议。

一、评估 TB 患者的免疫状况

下列 TB 患者有必要进行淋巴细胞亚群分析,以辅助临床客观评价患者免疫状况,合理制定治疗方案,适时进行免疫干预,调节患者的免疫功能,促进患者早日康复。

1. 老年 TB 患者:我国第五次流行病学抽样调查发现肺结核患者中老年人(>60 岁)所占比率高达 48.8%^[16]。50%左右的老年肺结核患者各淋巴细胞亚群绝对计数均低于健康人,尤其是 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、NKT 和 B 淋巴细胞绝对计数明显低于中青年患者^[14,17];而反映固有免疫的 NK 细胞与年龄无明显相关性,说明老年肺结核患者由于适应性免疫功能降低^[18],因而通常症状不典型、耐药率高、化疗后痰菌涂片阴转率低、不良反应多、治疗效果差、病程长^[19]。因此,建议在老年 TB 患者中进行淋巴细胞亚群分析以了解其免疫状况,更好地应对和控制 TB。

2. 活动性 TB 患者:1/3~1/2 的活动性 TB 患者外周血中各淋巴细胞亚群绝对计数均低于健康人,病情越严重,下降越明显,如耐多药或病变范围

广泛的 TB 患者各淋巴细胞亚群绝对计数均明显降低^[20-26]。复治肺结核患者各淋巴细胞亚群降低的发生率和降低的程度均高于初治肺结核患者^[27]。因此,建议病情严重的活动性 TB 患者进行淋巴细胞亚群分析,以判断是否需进行免疫干预。

3. 糖尿病并发活动性肺结核患者:糖尿病患者并发活动性肺结核的发病率增高,其代谢紊乱及免疫损伤等发病机制促进了肺结核的发病和发展。反之,TB 也加重了糖尿病患者的代谢紊乱,近 10% 的初治肺结核患者并发糖尿病。糖尿病与活动性肺结核之间由于血糖水平、机体免疫力等因素相互作用,构成了互为因果的恶性循环。糖尿病并发肺结核患者的 CD3⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞和 B 细胞绝对计数降低的发生率明显高于未并发糖尿病的肺结核患者;其中 CD8⁺ T 细胞和 B 细胞绝对计数降低的程度也明显高于未并发糖尿病的肺结核患者^[28]。糖尿病并发 TB 患者的 NKT 细胞百分比或绝对计数明显高于没有糖尿病的 TB 患者^[29]。因此,建议糖尿病并发活动性 TB 患者进行淋巴细胞亚群分析。

4. HIV 与 MTB 双重感染者:HIV 感染者 CD4⁺ T 淋巴细胞明显下降,并发 MTB 感染可提高 HIV 病毒的侵袭和复制能力,并提高 CD4⁺ T 淋巴细胞对 HIV 的易感性,加速 HIV 感染的疾病进程^[30]。HIV 与 MTB 双重感染者艾滋病发病的风险高,TB 已成为艾滋病高流行地区的最重要的单一死因。有效的抗结核治疗可使 HIV 感染与艾滋病并发肺结核患者的淋巴细胞亚群绝对计数恢复正常,提高其细胞免疫功能,并可使 TB 得到良好的控制,从而改善预后,提高生存质量、延长寿命^[31]。因此,建议 HIV 与 MTB 双重感染者进行淋巴细胞亚群分析,以了解患者的免疫状况和监测治疗效果。

5. 其他:并发肿瘤、贫血、低蛋白血症等重症 TB 患者各淋巴细胞亚群降低的发生率和降低的程度均明显高于未并发的肺结核患者^[32-33]。因此,建议并发肿瘤、贫血、低蛋白血症等重症 TB 患者也进行淋巴细胞亚群分析,以便适时干预和提高治疗效果。

二、监测肺结核患者的治疗效果

临床上 TB 尤其是 MDR-TB、重症 TB 患者均可能出现各淋巴细胞亚群的百分比或绝对计数和功能的改变。TB 患者接受有效化疗后,其淋巴细胞

亚群百分比尤其是绝对计数若改善或恢复正常,一般疗效较好、康复快、预后好^[34-35];其淋巴细胞亚群百分比尤其是绝对计数若没有改善,一般疗效较差,病程长、预后差,且有反复发作的可能^[34]。因此,建议上述活动性 TB 患者治疗前、后进行淋巴细胞亚群分析,以作为制定免疫治疗方案的实验依据和监测疗效的指标。

三、TB 患者进行外周血淋巴细胞亚群检测的指征

鉴于以上观点,建议活动性 TB 患者在治疗前后进行外周血淋巴细胞亚群检测的指征为:(1)老年活动性 TB 患者;(2)复治、久治不愈的 TB 患者;(3)病变范围广泛的、病情严重的 TB 患者;(4)并发反复感染、严重感染,尤其并发 HIV 感染的 TB 患者;(5)并发糖尿病的活动性 TB 患者;(6)并发肿瘤、贫血、低蛋白血症的活动性 TB 患者;(7)有免疫缺陷病家族史、长期使用免疫抑制剂的活性性 TB 患者。

TB 患者淋巴细胞亚群检测结果的判读及其临床意义

机体的免疫状况决定了 MTB 感染后 TB 的发生、发展和转归,T 淋巴细胞亚群与细胞免疫功能有关,B 淋巴细胞与体液免疫功能有关,NK 细胞与非特异性自然杀伤活性有关^[36-38]。在现有科学证据的基础上,对应用 FCM 检测 TB 患者淋巴细胞亚群结果的判读及其临床意义提出以下意见和建议。

1. 总 T 淋巴细胞(CD3⁺):T 淋巴细胞参与机体细胞免疫应答,外周血 CD3⁺ 百分比或绝对计数值低于参考范围,说明 T 淋巴细胞数可能减少,提示可能存在免疫功能低下。活动性 TB 患者 CD3⁺ T 细胞的百分比和绝对计数值可能没有明显变化,也可能降低,而且病情越严重,下降越明显^[20,24,39];如低蛋白血症、贫血、并发糖尿病、耐多药或病变广泛的 TB 患者,其外周血 CD3⁺ T 细胞数明显降低^[21,28,40];≥60 岁 TB 患者的 CD3⁺ T 细胞百分比或绝对计数可能明显低于<60 岁的患者^[19,41]。CD3⁺ T 细胞的百分比或绝对计数值明显下降,说明患者出现明显的免疫抑制。

2. 辅助性/诱导性 T 淋巴细胞(CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻):CD4⁺ T 淋巴细胞在 TB 病程各个阶段均发挥主要的抗结核作用^[42]。CD4⁺ T 淋巴细胞主要

辅助其他细胞产生免疫应答效应或调节免疫应答。目前 $CD4^+$ T 细胞根据诱导因子和分泌因子的不同,主要分为辅助性 T 细胞(helper T cells, Th)1、Th2、Th17 细胞和调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)等 4 类。Th1 细胞分泌白细胞介素(IL)-2、 γ 干扰素(IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)- α 等细胞因子,这些细胞因子能激活巨噬细胞和淋巴细胞,提高巨噬细胞杀伤细菌的功能,诱导细胞免疫反应;Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等细胞因子,这些细胞因子主要激活体液免疫系统,也引起超敏反应炎症^[43]。活动性 TB 患者 $CD4^+$ T 细胞百分比或绝对计数可能低于健康人,病情越严重,下降越明显,如低蛋白血症、贫血、并发糖尿病、耐多药或病变广泛的 TB 患者 $CD4^+$ T 细胞绝对计数明显降低^[21-24, 28, 32, 39-40, 44];此外, ≥ 60 岁 TB 患者的 $CD4^+$ T 细胞百分比或绝对计数可能明显低于 < 60 岁的患者^[41]。 $CD4^+$ T 细胞百分比或绝对计数明显下降,表明 $CD4^+$ T 细胞功能缺失,将削弱机体抗 MTB 的保护性防御机制,是 TB 患者免疫状态恶化的一种表现形式。潜伏性结核感染者若出现外周血 $CD4^+$ T 细胞耗竭,就易导致 MTB 再活化^[45]。

3. 细胞毒/抑制性 T 淋巴细胞($CD3^+ CD8^+$ $CD4^-$): $CD8^+$ T 淋巴细胞主要执行细胞免疫功能,是排斥同种异体移植、杀伤细菌、病毒感染细胞和肿瘤细胞的效应细胞。其可以特异性地识别内源性抗原肽-主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I 类分子复合物,进而杀伤靶细胞(细胞内寄生病原体的细胞或肿瘤细胞)。杀伤机制主要有两种:一是分泌穿孔素、颗粒酶、颗粒溶素及淋巴毒素等物质直接杀伤靶细胞;二是通过 Fas/FasL 途径诱导靶细胞凋亡^[46]。活动性 TB 患者 $CD8^+$ T 细胞百分比可能没有明显变化,或明显增高,这是由于 $CD4^+$ T 细胞百分比明显降低所致^[21-22, 39]。活动性 TB 患者 $CD8^+$ T 细胞绝对计数可能低于或高于健康人,也可能无明显变化,与患者病情相关; $CD8^+$ T 细胞绝对计数无论是增高还是降低均预示可能预后不良,需进行免疫干预。病情越严重(如老年、低蛋白血症、贫血、并发糖尿病或病变广泛的 TB 患者),下降越明显^[20, 25, 28]。 $CD8^+$ T 细胞绝对计数明显下降,表明机体调动 $CD8^+$ T 细胞直接杀灭胞内外 MTB 而导致 $CD8^+$ T 细胞大量消耗,是 TB 患者免疫状态恶化的一种表现形

式^[46]。若发病早期不及时对患者进行治疗和免疫干预,可能导致 $CD8^+$ T 细胞计数不断下降,从而导致病情加重或呈慢性感染。 $CD8^+$ T 细胞绝对计数增高可能是患者 MTB 负荷高所致,可能预示患者对化疗反应迟缓^[47]。

4. $CD4^+/CD8^+$ 比值:显示辅助性/诱导性 T 淋巴细胞与细胞毒/抑制性 T 淋巴细胞之间功能平衡状态,是评价人体免疫系统内环境是否稳定的重要指标。 $CD4^+/CD8^+$ 比值升高提示免疫功能亢进,见于类风湿性关节炎、糖尿病等。 $CD4^+/CD8^+$ 比值减低提示免疫抑制,艾滋病患者的 $CD4^+/CD8^+$ 比值多在 0.5 以下。活动性 TB 患者 $CD4^+/CD8^+$ 比值可能正常、减少或增高,取决于患者 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞下降的程度^[21, 39]。若 $CD4^+/CD8^+$ 比值低于健康人,表明 $CD4^+$ T 细胞较 $CD8^+$ T 细胞下降明显^[48];病情严重的患者 $CD4^+/CD8^+$ 比值可能高于病情较轻的患者,可能是因为 $CD8^+$ T 细胞较 $CD4^+$ T 细胞下降明显所致^[49]。

5. 双阳性 T 淋巴细胞(DPT 细胞, $CD3^+ CD4^+ CD8^+$):正常人外周血中 DPT 细胞极少,但是在重症肌无力、原发性免疫性血小板减少症、多发性硬化症等自身免疫性疾病中表达增高。肺结核患者外周血 DPT 细胞具有抗结核免疫力,活动性 TB 患者 DPT 细胞百分比可能正常、增高或减少^[50],其绝对计数可能明显降低,提示抗结核免疫力下降,其变化的临床意义尚需进一步探讨。

6. 双阴性 T 淋巴细胞(DNT 细胞, $CD3^+ CD4^- CD8^-$):DNT 细胞具有免疫抑制功能并能诱导耐受,抑制具有相同 T 细胞受体的 $CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+$ T 细胞的功能,以预防体内过度亢进的细胞免疫应答所造成的免疫损伤。外周血 DNT 升高主要见于临床炎症性疾病,包括感染性和非感染性疾病,如:肺部细菌性感染、全身性病毒感染、胸膜炎、创伤、急性扁桃体炎等疾病;此外,青少年患者的增高幅度较其他年龄段的患者高。DNT 细胞是急性感染、严重创伤等患者体内免疫功能状态和病情监测的一个新指标。活动性 TB 患者 DNT 细胞百分比和绝对计数可能减少,病情越严重,下降越明显,可能是因为机体通过 DNT 数量下降使机体免疫抑制功能降低,以提高 MTB 清除能力^[50]; ≥ 60 岁 TB 患者的 DNT 细胞绝对计数可能明显低于 < 60 岁的患者^[51]。

7. NKT 细胞($CD3^+CD56^+CD16^+$): NKT 细胞是 T 淋巴细胞中的一个比较特殊的亚群,兼具 T 细胞和 NK 细胞的某些特性,是一类在固有免疫和适应性免疫之间起桥梁作用的免疫调节细胞,活化后能迅速分泌一些具有免疫调节作用的细胞因子并且具有潜在的细胞毒效应;参与体内免疫调节、维持免疫稳定,参与体液免疫应答或细胞免疫应答,能防止自身免疫性疾病的发生,并在抗感染、抗结核和抗肿瘤免疫及防止器官移植排斥中发挥重要作用^[52-53]。原发性肺结核 NKT 细胞数一般无明显变化^[26],其他类型的活动性 TB 尤其是血行播散性肺结核患者 NKT 细胞百分比或绝对计数明显增高^[22-23,26,54-55],糖尿病并发 TB 患者的 NKT 细胞百分比或绝对计数明显高于没有糖尿病的 TB 患者^[29],这可能是由于体内 MTB 含量高、分布广泛,诱导机体产生 NKT 细胞抗结核。但随着病情加重 NKT 细胞会逐渐减少。

8. NK 细胞($CD3^-CD56^+CD16^+$): NK 细胞是固有免疫的关键组成部分,但也发挥适应性免疫作用,其主要功能为杀死各种肿瘤细胞和某些感染细菌、病毒的细胞,所以在抗肿瘤和抗感染防御疾病中起主要作用;它还可以分泌 IFN- γ 等细胞因子参与免疫应答调控^[56]。原发性肺结核 NK 细胞百分比和绝对计数一般无明显变化^[26,47],其他类型的活动性 TB 患者 NK 细胞绝对计数可能明显减少,其自然杀伤功能也可能明显降低^[22];而且病情越严重,下降越明显;复治肺结核患者的 NK 细胞绝对计数明显低于初治肺结核患者;血行播散性肺结核及肺外结核患者 NK 细胞百分比或绝对计数降低的发生率和降低程度均明显高于单纯肺结核患者^[26]。

9. B 淋巴细胞($CD3^-CD19^+$): B 淋巴细胞活化后转化为浆细胞,分泌抗体,主要执行体液免疫功能,在抗结核感染中发挥主要作用。B 细胞也参与结核肉芽肿形成,B 细胞功能缺陷的宿主更易受到 MTB 感染、TB 易感性增加^[57]。活动性 TB 患者病情严重时(如并发糖尿病、贫血、低蛋白血症或病变广泛的患者)B 淋巴细胞百分比和绝对计数均明显下降,而且随着患者年龄增长而逐渐降低,尤其是 60 岁以上的患者下降明显^[22,49,58]。

对 TB 患者淋巴细胞亚群检测与分析的建议和展望

1. 合理选择淋巴细胞亚群检测与分析的方法:

相对计数法是分析各亚群细胞占总淋巴细胞数的百分比,结果易受各类细胞亚群变化的影响;而绝对计数法可了解各类细胞亚群的独立变化,一种淋巴细胞亚群绝对计数的变化不会影响其他细胞亚群绝对计数的变化,但可能影响淋巴细胞亚群相对计数的变化,因此,只分析各淋巴细胞亚群的百分比不能客观、准确地反映 TB 患者的免疫功能状况,建议同时检测与分析淋巴细胞亚群的相对计数和绝对计数。

2. TB 患者进行淋巴细胞亚群检测的建议:原则上免疫功能受损者均应常规评估淋巴细胞亚群,但目前 TB 患者的免疫功能评价在临床上并未获得广泛重视;因此,建议活动性 TB 患者尤其是存在下列情况的患者应进行淋巴细胞亚群分析:(1)并发反复感染、严重感染及多种病原体与特殊病原体感染者,尤其是并发 HIV 感染的患者^[31];(2)常规抗结核治疗效果不佳的患者,除了考虑耐药等原因外还应考虑是否存在宿主免疫功能受损;(3)并发严重的过敏性疾病或自身免疫性疾病的患者,可能存在免疫自稳和耐受功能受损^[59];(4)并发血液系统肿瘤或者其他肿瘤及实体瘤患者,可能存在免疫监视功能受损^[33];(5)其他特殊情况,即 TB 患者血常规中淋巴细胞明显异常、家族成员中有免疫缺陷病史、长期使用免疫抑制剂者,以及 TB 并发糖尿病、低蛋白血症及贫血的患者^[28,32,60]。

3. 建立新的基于多色 FCM 检测 T 淋巴细胞亚群的方法:目前临床检测分析淋巴细胞亚群的数目和分类有限,对淋巴细胞亚群功能的评价不足,尚缺乏将 T 细胞亚群表型和功能联合分析的工具,而不能完全满足临床需求;需研发新的针对 TB 患者临床免疫学特征的淋巴细胞亚群的分析指标和方法,以指导临床诊疗。

随着 FCM 在 TB 患者检测中的不断研究和应用,相信这项技术能够为 TB 临床诊断和治疗提供更多有价值的实验室检测依据。

参与讨论与撰写本共识的主要单位和专家(排名不分先后): 100091 北京,解放军总医院第八医学中心 全军结核病研究所(吴雪琼、白雪娟、梁建琴、张俊仙);200433 同济大学附属上海市肺科医院结核病中心(肖和平、范琳);101149 首都医科大学附属北京胸科医院(初乃惠、张宗德、黄海荣、逢宇);100035 北京,《中国防痨杂志》期刊社(薛爱华、李敬文、范永德);102206 北京,中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心(赵雁林);100710 北京,中国防痨协会秘书处(成诗明);100035 北京市结核病控制研究所实验室(王甦

民、丁北川); 510095 广州市胸科医院(谭守勇、谭耀驹); 400036 重庆市公共卫生医疗救治中心(严晓峰、李同心); 710061 西安市结核病胸部肿瘤医院(党丽云、崔小莉); 215007 苏州市第五人民医院(吴妹英、胥萍、张建平); 410013 长沙, 湖南省胸科医院 湖南省结核病防治所检验科(谭云洪); 110044 沈阳市胸科医院中西医结合病房(梁秋); 518112 深圳市第三人民医院结核科(邓国防、邓群益); 610061 成都市公共卫生临床医疗中心(吴桂辉)

参 考 文 献

- [1] Dorhoi A, Reece ST, Kaufmann SH. For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. *Immunol Rev*, 2011, 240(1):235-251. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00994.x.
- [2] Bleasing JJ, Brown MR, Straus SE, et al. Immunophenotypic profiles in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 2001, 98(8):2466-2473. doi:10.1182/blood.v98.8.2466.
- [3] 陈荣伴, 邹茂权, 梁惠如, 等. 急性髓性白血病外周血 T 淋巴细胞亚群的研究. *中国卫生标准管理*, 2019, 10(4): 36-38. doi:10.3969/j.issn.1674-9316.2019.04.015.
- [4] 石静怡. 流式细胞术在临床肿瘤学中应用研究进展. *医药前沿*, 2016, 6(36): 138-139. doi:10.3969/j.issn.2095-1752.2016.36.104.
- [5] 贾春辉, 王磊, 荆凡辉, 等. 艾滋病合并巨细胞病毒感染 48 例临床分析及 T 淋巴细胞亚群特点. *中华内科杂志*, 2019, 58(3): 191-197. doi:10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2019.03.008.
- [6] Zhou SH, Wang X, Fan MY, et al. Influence of vitamin D deficiency on T cell subsets and related indices during spinal tuberculosis. *Exp Ther Med*, 2018, 16(2): 718-722. doi:10.3892/etm.2018.6203.
- [7] Igari H, Ishikawa S, Nakazawa T, et al. Lymphocyte subset analysis in QuantiFERON-TB Gold Plus and T-Spot. TB for latent tuberculosis infection in rheumatoid arthritis. *J Infect Chemother*, 2018, 24(2):110-116. doi:10.1016/j.jiac.2017.09.012.
- [8] 中华人民共和国卫生部. WS/T 360—2011 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南. 2011-12-14.
- [9] Lee BW, Yap HK, Chew FT, et al. Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy Asian subjects: from birth to adulthood. *Cytometry*, 1996, 26(1): 8-15. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19960315)26:1<8::AID-CYTO2>3.0.CO;2-E.
- [10] 朱立华, 王建中. 中国人血液淋巴细胞免疫表型参考值调查. *中华医学检验杂志*, 1998, 21(4):223-226. doi:10.3760/j.issn.1009-9158.1998.04.010.
- [11] 张琰, 温浩, 张朝霞, 等. 新疆地区维吾尔族和汉族血液淋巴细胞免疫表型参考值范围的调查. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(1):133-136. doi:10.3969/j.issn.1009-2137.2006.01.030.
- [12] Chng WJ, Tan GB, Kuperan P. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(1):168-173. doi:10.1128/cdli.11.1.168-173.2004.
- [13] 张诗诗, 王薇, 何法霖, 等. 全国流式细胞术淋巴细胞亚群项目健康成人参考区间现状分析. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(5): 356-360. doi:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.05.007.
- [14] 赵宏, 焦顺昌, 张国庆, 等. 不同年龄、性别的健康成年人 21 项淋巴细胞亚群分析. 标记免疫分析与临床, 2011, 18(2): 99-102. doi:10.3969/j.issn.1006-1703.2011.02.013.
- [15] 许遵鹏, 李蓓, 廖灿, 等. 广州市健康儿童和成人淋巴细胞亚群数量的对比分析. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(2):126-128, 125.
- [16] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告. *中国防痨杂志*, 2012, 34(8): 485-508.
- [17] 李高波, 张涛, 刘晓辉. T 淋巴细胞亚群对初治活动性肺结核病人痰菌与 PPD 结果的影响. *现代预防医学*, 2008, 35(3):569-570, 572. doi:10.3969/j.issn.1003-8507.2008.03.082.
- [18] Qin L, Jing X, Qiu Z, et al. Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(5):848-859. doi:10.18632/aging.100894.
- [19] 刘会, 张晓光, 黄新莉, 等. 不同年龄活动性肺结核患者 T 细胞亚群分析及动态变化. *河北医科大学学报*, 2016, 37(8):889-892. doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2016.08.005.
- [20] 陶成武. 基于多色流式细胞术的结核病患者 T 细胞亚群研究. 扬州:扬州大学, 2017.
- [21] 喻容, 周添荣, 石国民, 等. 耐多药结核病患者细胞免疫功能的初步研究. *实用预防医学*, 2016, 23(10):1199-1202. doi:10.3969/j.issn.1006-3110.2016.10.015.
- [22] Morais-Papini TF, Coelho-Dos-Reis JGA, Wendling APB, et al. Systemic Immunological changes in patients with distinct clinical outcomes during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunobiology*, 2017, 222(11):1014-1024. doi:10.1016/j.imbio.2017.05.016.
- [23] Al Majid FM, Abba AA. Immunophenotypic characterisation of peripheral T lymphocytes in pulmonary tuberculosis. *J Postgrad Med*, 2008, 54(1): 7-11. doi:10.4103/0022-3859.39182.
- [24] 宋小冬, 任彦薇, 张宏娟, 等. 初治菌阴肺结核患者 T 淋巴细胞亚群测定与预后关系的临床意义. *中国防痨杂志*, 2002, 24(4):185-187. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2002.04.002.
- [25] 戴建义, 苏菲菲, 杨守峰, 等. 复治肺结核病患者外周血淋巴细胞亚群变化及临床意义. *上海预防医学*, 2014, 26(4): 180-181.
- [26] 周颖, 董伟毅, 倪佩青, 等. 肺结核患者血清维生素 D 与外周血 T 淋巴细胞亚群水平变化及临床意义. *中国防痨杂志*, 2017, 39(8): 890-893. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2017.08.019.
- [27] 沈洁, 吴妹英, 李苏梅. 初治和复治肺结核患者外周血淋巴细胞亚群的变化及其临床意义. *临床肺科杂志*, 2019, 24(2): 208-212. doi:10.3969/j.issn.1009-6663.2019.02.004.
- [28] 傅小燕, 吴桂辉, 黄涛, 等. 活动性肺结核合并糖尿病患者的 T 细胞亚群与血糖水平的相关性研究. *中西医结合心血管病杂志(电子版)*, 2018, 6(34):71.
- [29] Zhang Q, Xiao HP, Cui HY, et al. Significant increase in natural-killer T cells in patients with tuberculosis complicated by type 2 diabetes mellitus. *J Int Med Res*, 2011, 39(1):105-111. doi:10.1177/147323001103900113.
- [30] Kabue JP, de Swardt D, de Beer C, et al. Short-term antiretroviral therapy fails to reduce the expanded activated CCR5-expressing CD4⁺ T lymphocyte population or to restore the depleted naive population in chronically HIV-infected individuals with active pulmonary tuberculosis. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2013, 29(5):769-777. doi:10.1089/aid.2012.0153.
- [31] 如凤仁, 汤恒, 殷继国, 等. HIV/AIDS 人群中肺结核患者的治疗效果与细胞免疫的相关性研究. *中国防痨杂志*, 2008, 30(4):311-315. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2008.04.013.
- [32] 谭守勇, 冯浩斌, 李艳, 等. CD4⁺ T 淋巴细胞对肺结核患者血清白蛋白的影响. *中国防痨杂志*, 2011, 33(11): 725-728.

- doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2011.11.007.
- [33] 邹清梅,戴盛明.不同原发性肿瘤病人淋巴细胞亚群的临床研究.广西中医学院学报,2000,17(3):17-18. doi:10.3969/j.issn.1008-7486.2000.03.008.
 - [34] El-Shafey BI, El-Bedewy MM, Ezzat SE, et al. Role of some T-lymphocyte subsets in assessment of treatment response in tuberculous patients. Egyptian J Chest Dis Tubercu, 2015, 64 (2):513-520. doi:10.1016/j.ejcdt.2015.03.006.
 - [35] Nyendak MR, Park B, Null MD, et al. *Mycobacterium tuberculosis* specific CD8⁺ T cells rapidly decline with antituberculosis treatment. PLoS One, 2013, 8(12):e81564. doi:10.1371/journal.pone.0081564.
 - [36] 吴雪琼,吴长有.结核病免疫学.北京:人民卫生出版社,2016:104-105,128-133.
 - [37] Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, et al. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. Tuberculosis (Edinb), 2003, 83(1-3):98-106. doi:10.1016/s1472-9792(02)00054-9.
 - [38] Sia JK, Georgieva M, Rengarajan J. Innate immune defenses in human tuberculosis: an overview of the interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and innate immune cells. J Immunol Res, 2015, 2015: 747543. doi:10.1155/2015/747543.
 - [39] 陆恩词,朱颖蔚.肺结核合并糖尿病患者 T 淋巴细胞亚群及红细胞免疫功能的变化及意义.中国老年学杂志,2017,37(3):648-649. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.03.055.
 - [40] 何畏,陈晴,黄涛,等.肺结核及肺外结核患者外周血 T 淋巴细胞亚群的变化及其临床意义.中国防痨杂志,2019,41(10):1090-1095. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2019.10.005.
 - [41] 周世明,贾杰,杨建国.成年人肺结核患者 T 淋巴细胞亚群、自然杀伤细胞及免疫球蛋白的检测与分析.中国热带医学,2003,3(6):767-769. doi:10.3969/j.issn.1009-9727.2003.06.028.
 - [42] Orme IM, Andersen P, Boom WH. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis, 1993, 167(6):1481-1497. doi:10.1093/infdis/167.6.1481.
 - [43] Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, et al. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol, 1993, 151(1):518-525.
 - [44] Venturini E, Lodi L, Francolino I, et al. CD3, CD4, CD8, CD19 and CD16/CD56 positive cells in tuberculosis infection and disease: Peculiar features in children. Int J Immunopathol Pharmacol, 2019, 33: 2058738419840241. doi:10.1177/2058738419840241.
 - [45] Diedrich CR, Mattila JT, Klein E, et al. Reactivation of latent tuberculosis in cynomolgus macaques infected with SIV is associated with early peripheral T cell depletion and not virus load. PLoS One, 2010, 5(3):e9611. doi:10.1371/journal.pone.0009611. published correction appears in PLoS One, 2015, 10(4):e0124221.
 - [46] Stenger S. Cytolytic T cell in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Infect Dis, 2001, 33(7):483-487. doi:10.1080/00365540110026584.
 - [47] Chen YC, Chang HC, Chen CJ, et al. Blood absolute T cell counts may predict 2-month treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. Dis Markers, 2010, 28(6):343-352. doi:10.3233/DMA-2010-0714.
 - [48] 黄丽静,陈焯彬,韦永孜.肺结核患者病情严重程度与免疫功能受损程度的相关性研究.海南医学,2016,27(9):1424-1426. doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2016.09.017.
 - [49] Guglielmetti L, Cazzadori A, Conti M, et al. Lymphocyte subpopulations in active tuberculosis: association with disease severity and the QFT-GIT assay. Int J Tuberc Lung Dis, 2013, 17(6):825-828. doi:10.5588/ijtld.12.0361.
 - [50] 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.国际检验医学杂志,2012,33(19):2346-2347. doi:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.021.
 - [51] 郑昭景,马拥军,胡少龙,等.健康汉族人外周血 CD4⁺CD8⁺双阳性和 CD4⁺CD8⁻双阴性 T 淋巴细胞的分布.温州医学院学报,2010,40(3):247-252. doi:10.3969/j.issn.1000-2138.2010.03.010.
 - [52] Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, et al. NKT cells: What's in a name? Nat Rev Immunol, 2004, 4(3):231-237. doi:10.1038/nri1309.
 - [53] Sada-Ovalle I, Chiba A, Gonzales A, et al. Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. PLoS Pathog, 2008, 4(12):e1000239. doi:10.1371/journal.ppat.1000239.
 - [54] 孙巍,杨永辉,李登瑞,等.NKT 细胞、NK 细胞和 T 细胞亚群在活动性肺结核患者外周血的表达及意义.中国免疫学杂志,2011,27(11):1030-1034. doi:10.3969/j.issn.1000-484x.2011.11.017.
 - [55] 李利娟.肺结核患者 T 辅助细胞、NKT 细胞、NK 细胞水平与疾病发展及预后的关系.中国医药导报,2019,16(1):98-101.
 - [56] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science, 2011, 331(6013):44-49. doi:10.1126/science.1198687.
 - [57] Vordermeier HM, Venkataprasad N, Harris DP, et al. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. Clin Exp Immunol, 1996, 106(2):312-316. doi:10.1046/j.1365-2249.1996.d01-845.x.
 - [58] Hernandez J, Velazquez C, Valenzuela O, et al. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. Immunol Invest, 2010, 39(3):197-205. doi:10.3109/08820130903586346.
 - [59] 秦岭,邱志锋,谢静,等.系统性红斑狼疮合并机会性感染的疾病谱及其外周血淋巴细胞亚群特点分析.中华内科杂志,2018,57(1):32-36. doi:10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2018.01.006.
 - [60] 李霞,李殿俊,富东旭.免疫抑制剂对小鼠胸腺及外周血、脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响.哈尔滨医科大学学报,2005,39(4):325-326,330. doi:10.3969/j.issn.1000-1905.2005.04.008.

(收稿日期:2020-09-10)

(本文编辑:薛爱华)