

· 临床研究 ·

血清 IL-35 与抗 PPD 抗体在活动性肺结核中的诊断价值

刘桂花 曹达兴 张争业

[摘要] **目的** 探究血清白细胞介素-35(IL-35)与抗结核菌素的纯蛋白衍化物(PPD)抗体在活动性肺结核中的诊断价值。**方法** 选择94例活动性肺结核患者为研究组,88例同期到本院体检者为对照组。测定两组血清IL-35、外周血IL-35亚基mRNA水平,抗PPD-IgG浓度,分析各指标对活动性肺结核诊断价值。研究组患者依据病情严重程度进行分组,比较不同病情严重程度患者外周血指标水平,分析血清IL-35及其亚基mRNA水平与抗PPD-IgG相关性。**结果** 研究组患者血清IL-35、外周血EBI3 mRNA、P35 mRNA以及血清抗PPD-IgG水平明显高于对照组(t 分别=19.18、16.14、21.24、12.16, P 均 <0.05);ROC曲线显示,血清IL-35、外周血EBI3 mRNA、P35 mRNA、血清抗PPD-IgG以及各指标联合诊断活动性肺结核曲线下面积分别为0.71、0.67、0.63、0.85、0.87。研究组血清IL-35、外周血EBI3 mRNA、P35 mRNA以及血清抗PPD-IgG水平与病情严重程度有关(F 分别=15.98、14.23、7.77、20.70, P 均 <0.05);Pearson相关性分析显示,研究组血清IL-35与抗PPD-IgG水平呈正相关($r=0.64$, $P<0.05$)。**结论** 活动性肺结核患者血清IL-35水平异常上升,与抗PPD抗体以及病情严重程度关系密切。

[关键词] 活动性肺结核; 血清IL-35; 抗PPD抗体; 相关性

Diagnostic values of serum IL-35 and anti-PPD antibody in active pulmonary tuberculosis LIU Guihua, CAO Daxing, ZHANG Zhengye. Department of Infection, Changxing People's Hospital, Changxing 313100, China.

[Abstract] **Objective** To explore the diagnostic values of serum interleukin-35 (IL-35) and anti-protein purified derivative (PPD) antibody in active pulmonary tuberculosis. **Methods** Totally 94 patients with active pulmonary tuberculosis were selected as the study group, and 88 healthy people who receiving physical examination during the same period were enrolled as the control group. Serum IL-35 level, peripheral blood IL-35 subunit mRNA level, and anti-PPD-IgG concentration in both groups were measured and compared. The diagnostic values of those parameters in active pulmonary tuberculosis were analyzed. Patients in the study groups were grouped into three groups according to the severity of the disease, and the serum IL-35, peripheral blood EBI3 mRNA, P35 mRNA, and serum anti-PPD-IgG levels among them were compared. The correlation between serum IL-35 and anti-PPD-IgG was analyzed. **Results** Serum IL-35, peripheral blood EBI3 mRNA, P35 mRNA and serum anti-PPD-IgG levels in the study group were significantly higher than those in the control group ($t=19.18, 16.14, 21.24, 12.16, P<0.05$). ROC curves showed that AUC values of serum IL-35, peripheral blood EBI3 mRNA, P35 mRNA, serum anti-PPD-IgG level and combination of the indexes in diagnosis of active pulmonary tuberculosis were 0.71, 0.67, 0.63, 0.85, and 0.87, respectively. Serum IL-35, peripheral blood EBI3 mRNA, P35 mRNA and serum anti-PPD-IgG levels were the lowest in mild group, followed by moderate group, and the highest in severe group ($F=15.98, 14.23, 7.77, 20.70, P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that serum IL-35 was positively correlated with anti-PPD-IgG level ($r=0.64, P<0.05$). **Conclusion** Serum IL-35 level is abnormally elevated in patients with active pulmonary tuberculosis, which is closely related to anti-PPD antibody and the severity of the disease.

[Key words] active pulmonary tuberculosis; serum IL-35; anti-PPD antibody; correlation

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2021.002.011

作者单位:313100 浙江长兴,浙医二院长兴院区(长兴县人民医院)感染科

结核疾病为肺部结核分歧杆菌感染所致传染疾病,由于患者机体免疫功能不佳,病情较易发展

为活动性肺结核,病情严重者甚至会出现呼吸功能衰竭,严重影响患者生命安全^[1]。相关研究显示活动性肺结核患者感染与患者免疫功能损伤有关,而抑制性细胞因子在其中发挥重要作用^[2]。白细胞介素-35(interleukin 35, IL-35)为重要免疫抑制细胞因子,经由抑制效应T细胞以及调节辅助T细胞作用介导免疫反应^[3]。抗结核菌素的纯蛋白衍化物(pure protein derivativ, PPD)抗体为结核分歧杆菌感染后代谢产物进入机体后产生抗体,为诊断结核疾病重要指标^[4]。目前关于活动性肺结核患者IL-35或者抗PPD抗体研究较多,尚没有研究探究两者之间关系。本研究探究了活动性肺结核患者血清IL-35、抗PPD抗体变化,及其两者之间关系,以明确两者在活动性肺结核发病中作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2019年6月至2020年6月期间到长兴县人民医院就诊的94例活动性肺结核患者为研究组,纳入标准为:①肺结核诊断参照相关肺结核诊断标准^[5];痰液抗酸染色检查最少有1次显示为阳性,表现出结核中毒相关症状,胸片检查显示患者病灶显示为活动性;②精神意识正常,可以配合检测;③患者知情同意。本次研究获得医院伦理会批准。排除标准为:①并发支气管炎、耐药性肺结核等其他相关肺部疾病;②患者入组前已进行对症治疗;③存在免疫性相关性疾病;④并发感染、肿瘤;⑤并发身体重要脏器等相关疾病。同时选取88例同期到本院健康体检者为对照组,痰检抗酸染色检查显示为阴性,未见结核临床表现,影像学检查显示正常。研究组中男性54例,女性40例;年龄21~73岁,平均(48.64±17.64)岁;平均体重指数(24.84±3.12)kg/m²。对照组中男性42例,女性46例;年龄20~76岁,平均(50.67±19.22)岁;平均体重指数(24.51±3.69)kg/m²。两组一般资料比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

1.2 方法

1.2.1 外周血指标测定 抽取所有患者晨起静脉血3 ml,离心处理后保留上清液待测。血清IL-35水平应用酶联免疫吸附法予以测定,参照试剂盒中附加说明书进行测定。静脉血离心后保留血浆,应用Ficoll淋巴细胞分离液处理进行密度梯度离心法获得外周血单个核细胞,测定IL-35亚基EBI3与P35 mRNA水平,外周血单个核细胞应用

Trizol 试剂获得总RNA,在进行反转录之后在ABI7500型号荧光定量PCR仪上进行SYBR Green实时定量反转录聚合酶链式反应以测定IL-35亚基EBI3与P35 mRNA水平,引物序列见表1。循环条件:95℃以及30℃进行40个循环,95℃5 s,30℃34 s。亚基EBI3以及P35水平mRNA相对表达量表示方式为对应检测mRNA与磷酸甘油脱氢酶mRNA值之间比值。抗PPD-IgG应用胶体金免疫层析法进行测定,测定步骤按照试剂盒说明书进行测定。

表1 EBI3与P35引物序列

指标	引物
EBI3	正向:5'-GGCAAGTAGCAAGGCTTC-3' 反向:5'-AGTCGTCATCTGAGTTGC-3'
P35	正向:5'-TCCTCCTTGAAGAACCGA-3' 反向:5'-TGACAACGTTTGAGGAC-3'
磷酸甘油脱氢酶	正向:5'-CAGGAGGCCATTGGAT-3' 反向:5'-GAGCTGGGGCTCATT-3'

1.2.2 病情严重程度评估 研究组患者在治疗前胸部X线进行检查,依据第2、4前肋下缘将双侧肺部进行6个分区,若是存在空洞者将分区增加一个,病灶分布在1~2个区域、3~4个区域以及5~6个区域分别为轻度组、中度组以及重度组^[5]。

1.3 观察指标 比较两组外周血指标水平,分析外周血指标对活动性肺结核诊断价值,比较不同病情严重程度患者外周血指标,分析血清IL-35及其亚基mRNA水平与抗PPD-IgG相关性。

1.4 统计学方法 采用SPSS 20.0软件进行处理。计量资料表示为均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式,两组间比较采用 t 检验,多组间比较选择方差分析。外周血指标对活动性肺结核诊断价值采用ROC曲线分析,曲线下面积比较应用 Z 检验,相关性分析应用Pearson相关性分析。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血指标水平比较见表2

由表2可见,研究组患者血清IL-35、外周血EBI3 mRNA、P35 mRNA以及血清抗PPD-IgG水平高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=19.18、16.14、21.24、12.16, P 均<0.05)。

2.2 外周血指标对活动性肺结核诊断价值分析见表3

表2 两组外周血指标水平比较

组别	IL-35/pg/ml	EBI3 mRNA	P35 mRNA	抗 PPD-IgG/ μ g/ml
研究组	256.74 $\pm$ 102.81*	26.82 $\pm$ 11.79*	79.34 $\pm$ 25.71*	2.84 $\pm$ 1.03*
对照组	42.66 $\pm$ 20.43	6.22 $\pm$ 2.13	19.73 $\pm$ 5.82	1.36 $\pm$ 0.51

注: *: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表3 外周血指标对活动性肺结核诊断价值分析

指标	最佳截断值	曲线下面积	特异度/%	灵敏度/%	95%CI	P
IL-35	90.73 pg/ml	0.71	79.60	88.90	0.53~0.90	< 0.05
EBI3 mRNA	13.62	0.67	83.70	76.50	0.50~0.85	< 0.05
P35 mRNA	27.93	0.63	83.20	76.90	0.45~0.82	< 0.05
抗 PPD-IgG	1.64	0.85	89.80	86.70	0.66~0.99	< 0.05
各指标联合	-	0.87	91.53	74.90	0.72~0.99	< 0.05

由表3可见,由ROC曲线计算可得,血清IL-35、外周血EBI3 mRNA、P35 mRNA以及血清抗PPD-IgG水平诊断活动性肺结核曲线下面积分别为0.71、0.67、0.63、0.85,各指标联合诊断活动性肺结核的曲线下面积为0.87。血清IL-35、外周血EBI3 mRNA、P35 mRNA的诊断价值明显低于各指标联合诊断的诊断价值,差异有统计学意义(Z 分别=3.29、

3.61、5.19, P 均 < 0.05),但血清抗PPD-IgG水平诊断活动性肺结核的价值与各指标联合诊断的诊断价值无明显差异($Z=0.84$, $P > 0.05$)。

2.3 不同病情严重程度患者外周血指标比较 依据胸部X线将研究组患者分为轻度组30例、中度组30例、重度组34例,不同病情严重程度患者外周血指标比较见表4。

表4 不同病情严重程度患者外周血指标比较

组别	IL-35/pg/ml	EBI3 mRNA	P35 mRNA	抗 PPD-IgG/ μ g/ml
轻度组	213.81 $\pm$ 46.33	22.76 $\pm$ 4.81	68.76 $\pm$ 17.65	2.19 $\pm$ 0.65
中度组	257.91 $\pm$ 54.16	26.08 $\pm$ 7.51	79.22 $\pm$ 15.24	2.79 $\pm$ 0.72
重度组	293.59 $\pm$ 63.51	31.06 $\pm$ 6.23	85.91 $\pm$ 18.99	3.45 $\pm$ 0.93

由表4可见,研究组患者血清IL-35、外周血EBI3 mRNA、P35 mRNA以及血清抗PPD-IgG水平随着病情严重程度呈现上升趋势,差异均有统计学意义(F 分别=15.98、14.23、7.77、20.70, P 均 < 0.05)。

2.4 血清IL-35及其亚基mRNA水平与抗PPD-IgG相关性分析 血清IL-35与抗PPD-IgG水平呈正相关($r=0.64$, $P < 0.05$),外周血EBI3 mRNA、P35 mRNA与抗PPD-IgG无明显相关性(r 分别=0.14、0.24, P 均 > 0.05)。

3 讨论

活动性肺结核患者结核病变位置播散,病情严重者甚至会造成肺部损伤,传染性较大,给患者家庭以及社会带来负担^[6]。相关研究显示,细胞免疫是结核病患者体内发挥作用免疫方式,而Th17/Treg细胞经由其释放白介素等细胞因子介导活动性肺结核发病^[7]。IL-35为CD4⁺CD35⁺Foxp3⁺Treg细胞分泌细胞因子,其可以经由改善调节性T细胞、B细胞

功能以及促进新型Treg细胞生成进行免疫功能调节^[8]。

本次研究中研究组患者血清IL-35、外周血EBI3 mRNA、P35 mRNA以及血清抗PPD-IgG水平明显高于对照组,分析认为结核分枝杆菌侵入机体后导致病灶位置出现迟发型变态反应,诱使Th17活化,同时其分泌细胞因子可以有效杀灭结核分枝杆菌,机体抗炎系统被激活,抗炎IL-35水平上升,抑制病灶炎症反应^[9]。有研究显示,EBI3以及P35为IL-35亚基,其具有抑制效应T细胞免疫作用,延缓机体结核疾病发生以及病情进程作用^[10]。宋新宇等^[11]认为结核病患者因为炎症反应导致外周血Treg细胞增多,因此EBI3以及P35 mRNA水平增加,导致两者组成异源二聚体水平增加,最终导致IL-35水平上升。Dewi等^[12]认为结核杆菌侵入机体后导致患者结合蛋白抗原水平上升,影响T细胞以及B细胞功能,前者功能被抑制,后者则被激活,进

而分泌出大量抗体,这些分泌抗体经由与结合菌结合而发挥抗炎免疫作用,因此抗 PPD-IgG 水平上升。本次研究中 ROC 曲线显示,血清 IL-35、外周血 EBI3 mRNA、P35 mRNA、抗 PPD-IgG 水平以及各指标联合诊断活动性肺结核曲线下面积分别为 0.71、0.67、0.63、0.85、0.87,抗 PPD-IgG 与各指标联合诊断价值最佳,抗 PPD-IgG 作为细菌进入机体后分泌出大量抗体,由于其在患者肺结核疾病治愈后可以至少存在一年,因此其可以在患者血液中稳定存在^[12];而各指标联合应用可以全面反映患者病情,因此其诊断价值较高。国内研究者认为活动肺结核患者机体炎症反应以及免疫反应随着病情严重程度而加重,相关炎症反应以及免疫调节因子随之变化^[13]。本次研究中活动性肺炎患者血清 IL-35、外周血 EBI3 mRNA、P35 mRNA 以及血清抗 PPD-IgG 水平随着患者病情严重程度加重而增加。患者病情加重,免疫反应激烈,相关抗体水平以及抑炎因子水平上升,因此血清 IL-35、外周血 EBI3 mRNA、P35 mRNA、抗 PPD-IgG 水平上升。Pearson 相关性分析显示,血清 IL-35 与抗 PPD-IgG 水平正相关,外周血 EBI3 mRNA、P35 mRNA 与抗 PPD-IgG 无明显相关性,结核分歧杆菌感染后机体炎症因子大量释放,导致机体免疫反应被激活,可见机体炎症因子与免疫反应关系密切,因此 IL-35 水平高显示机体炎症反应激烈,机体免疫反应剧烈,相关免疫细胞与抗体增加^[10],因此抗 PPD-IgG 水平上升,而外周血 EBI3 mRNA、P35 mRNA 测定应用实时定量反转录聚合酶链式反应测定,容易受到多种因素影响,其可能是 EBI3 mRNA、P35 mRNA 水平与抗 PPD-IgG 水平无相关性的原因。

综上,IL-35 与抗 PPD-IgG 在活动性肺结核患者水平异常上升,且 IL-35 与抗 PPD-IgG 存在明显相关性,两者一同介导肺结核发病以及病情进展,但是其具体机制尚需要进一步研究。

参考文献

1 Meintjes G,Brust JCM,Nuttall J,et al.Management of ac-

- 2 Halliday A,Masonou T,Tolosa-Wright M,et al.Immunodiagnosis of active tuberculosis[J].Expert Rev Respir Med, 2019,13(6):521-532.
- 3 Zhang J,Zhang Y,Wang Q,et al.Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction[J].Immunology, 2019,157(1):13-20.
- 4 Dewi DNSS,Mertaniasih NM,Soedarsono,et al.Characteristic profile of antibody responses to PPD,ESAT-6, and CFP-10 of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis suspected cases in Surabaya,Indonesia[J].Braz J Infect Dis, 2019,23(4):246-253.
- 5 中华医学会结核病学分会.肺结核诊断和治疗指南[S].中华结核和呼吸杂志,2001,24(2):70-74.
- 6 姚人骐,吴瑶,马兵.白细胞介素-35在感染性疾病中的作用及意义[J].中华危重病急救医学,2017,29(9):848-852.
- 7 甄利波,陈园园,邱美华,等.卡介苗感染人树突状细胞对 miRNA-99b 表达和 Th17/Treg 分化的影响[J].中华医院感染学杂志,2019,29(12):1767-1771.
- 8 Fogel O,Rivière E,Seror R,et al.Role of the IL-12/IL-35 balance in patients with Sjögren syndrome[J].J Allergy Clin Immunol, 2018,142(1):258-268.
- 9 金武,杜鹃.不同结核类型患者外周血 IL-6 与 IL-35 和 IL-37 及 TNF- α 水平的动态变化研究[J].中华医院感染学杂志,2017,27(22):5057-5060.
- 10 Kong B,Liu GB,Zhang JA,et al.Elevated serum IL-35 and increased expression of IL-35-p35 or -EBI3 in CD4(+)CD25(+) T cells in patients with active tuberculosis[J].Am J Transl Res, 2016,8(2):623-633.
- 11 宋新宇,黄慧,刘永哲,等.结节病患者外周血中白细胞介素-35 蛋白和基因表达水平及其临床意义[J].中华结核和呼吸杂志,2018,41(1):32-36.
- 12 陶叶海,杨小林,金法祥,等.T淋巴细胞 γ -干扰素释放试验在结核病诊断中的应用研究[J].中华医院感染学杂志, 2017,27(18):4081-4084.
- 13 张会强,文政芳,张冬杰,等. IFN- γ 及血清炎症因子水平变化与肺结核发病相关性及其作用机制分析[J].中华医院感染学杂志, 2019,29(2):32-35.

(收稿日期 2020-07-23)

(本文编辑 蔡华波)