

## PD-1 在耐多药肺结核患者 T 淋巴细胞上的表达

巫丽兰<sup>1</sup>, 谭守勇<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>广东省第二人民医院 广东广州

<sup>2</sup>广州市胸科医院 广东广州

**【摘要】目的** 分析耐多药肺结核患者自身 T 淋巴细胞表达和 PD-1 之间的关系。**方法** 选取对异烟肼、利福平耐药的患者为 HR 耐药组，对异烟肼、利福平敏感的患者为 HR 敏感组，健康人群为健康组。采集外周血，运用流式细胞检测技术对其进行 T 淋巴细胞、CD8+表面 PD-1 受体的检测。**结果** 分析机体淋巴细胞 CD4+表达情况为：HR 耐药组与 HR 敏感组 ( $P=0.016$ )；HR 耐药组以及健康分析组之间的数据比较，对应  $p<0.05$ ；且 HR 敏感组以及健康分析组之间的数据比较，对应  $p<0.05$ 。针对机体淋巴细胞 CD8+表达情况为：HR 耐药组与 HR 敏感组 ( $P=0.012$ )；HR 耐药组与健康分析组 ( $P<0.001$ )；HR 敏感组与健康分析组 ( $P=0.001$ )。**结论** HR 耐药相关的肺结核检验中，T 淋巴细胞 CD4+、和 T 淋巴细胞 CD8 对应的 PD-1 受体均较 HR 敏感类型患者、健康群体的受体水平高。

**【关键词】** 耐多药肺结核；淋巴细胞亚群；PD-1 受体

**【收稿日期】** 2024 年 8 月 10 日 **【出刊日期】** 2024 年 9 月 20 日 **【DOI】** 10.12208/j.ijcr.20240344

### Expression of PD-1 on T lymphocytes in patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis

Lilan Wu<sup>1</sup>, Shouyong Tan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Second People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong

<sup>2</sup>Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou, Guangdong

**【Abstract】Objective:** To analyze the relationship between self T lymphocyte expression and PD-1 in multidrug-resistant pulmonary TB patients. **Methods:** Patients resistant to isoniazid and rifampin were selected as the HR resistant group, patients sensitive to isoniazid and rifampin were selected as the HR sensitive group, and the healthy population was the healthy group. Peripheral blood was collected and tested for T lymphocytes and CD8 + PD-1 surface receptor by flow cytometry technology. **Results:** CD4 + expression of lymphocytes was: HR resistant and HR sensitive groups ( $P=0.016$ ); data comparison between HR resistant and healthy analysis groups, corresponding to  $p < 0.05$ ; and data comparison between HR sensitive and healthy analysis groups, corresponding  $p < 0.05$ . CD8 + expression of lymphocytes of the body was: HR resistant and HR sensitive group ( $P=0.012$ ); HR resistant and healthy analysis group ( $P < 0.001$ ); and HR sensitive group and health analysis group ( $P=0.001$ ). **Conclusion:** In the pulmonary tuberculosis test of HR resistance, PD-1 receptors corresponding to CD4 + of T lymphocytes and CD8 were higher than those of HR sensitive patients and healthy groups.

**【Keywords】** Multidrug-resistant tuberculosis, Lymphocyte subsets, PD-1 Receptor

T 淋巴细胞的表面，存在着免疫性受体，即 PD-1。此受体能够和相关配体结合 (PD-L1)，在彼此出现抑制信号的情况下，控制 mRNA 细胞的正常合成过程，会引出相应 T 淋巴细胞有凋亡现象，控制 T 淋巴细胞增殖过程，从而减小其对病原体产生的清除效应<sup>[1-4]</sup>。

经过一些研究可以了解到，肺结核患者会出现体内 T 淋巴细胞 PD-1 表达过程持续改变的情况，且部分实验明确了若对 PD-1/PD-L1 通路有阻断的现象，可以显著降低 T 淋巴细胞凋亡几率。结合实际情况，我们能够初步对耐多药肺结核患者进行 T 淋巴细胞的分析，研

\*通讯作者：谭守勇

究对应表达中 PD-1 是否以及健康人群的细胞表达有差异, 可能存在着耐多药肺结核患者自身有细胞免疫抑制的问题, 造成患者免疫功能降低。这样临床上患者会有病灶面积广泛、难以治愈等一系列问题。另外结核病的出现, 在一定程度上受到免疫功能影响, 相关 HR 耐药患者体内出现的免疫抑制现象, 要较 HR 患者有更加敏感的表现, 对应免疫抑制过程没有直接和抑制分子 PD-1 之间存在关联, 也没有报道进一步确定。所以为了研究患者自身淋巴细胞亚群 PD-1 的具体表现, 具体情况如下。

## 1 研究对象

### 1.1 对象

时间统计为 2018 年 7 月至 2018 年 12 月, 观察对象统计为胸科医院结核内科住院患者, 这些患者 37 例均属于菌阳耐多药肺结核, 被记作 HR 耐药组。并且将 44 例存在菌阳肺结核的人员与其对比, 记作 HR 敏感组。再者挑选一定数量的健康人员, 这些人员经过体检筛查属于身体健康情况, 共有 22 例, 记作健康分析组。其中 HR 耐药组的男性和女性患者数量分别为 22 例、15 例、最小年龄是 15 岁、最大年龄是 78 岁, 平均年龄 40.03 16.88 岁。HR 敏感组的男性和女性患者数量分别为男 32 例、12 例、最小年龄是 15 岁、最大年龄是 88 岁, 平均年龄 43.57 19.87 岁。健康分析组的男性和女性人员数量分别是 7 例、15 例、最小年龄是 23 岁、最大年龄是 68 岁、平均年龄 38.95 11.46 岁。

### 1.2 纳入标准

选择的肺结核患者满足如下: 满足临床基本症状、通过肺部光片和细菌学得以诊断, 与 2017 年颁布的肺结核 (ws288-2017) 内容相一致<sup>[5]</sup>。并且利用菌种检验, 属于结合分歧杆菌, 以药敏检验表明对一些药物生成耐药性的患者, 尤其是异烟肼、利福平, 上述患者 37 例被记作 HR 耐药组; 针对 HR 敏感组, 即利用菌种鉴定含有结核分歧杆菌, 然而药敏检验对异烟肼、利福平能够同时产生耐药作用的患者; 针对健康分析组, 即通过体检表明身体所处健康范围, 没有出现结核病临床症状的人员。

### 1.3 排除标准

严重肝肾及心血管疾病, 出现其他类型的免疫性病患者, 有肿瘤患者或者伴随免疫抑制的人员。

## 2 方法

### 2.1 实验方法

以细胞技术的方式对三个小组人员的外周血进行检测, 即 CD4+T 淋巴细胞、CD8+T 淋巴细胞相关表达

过程中参与的 PD-1 分子, 对比检测结果。

## 2.2 实验材料

表 1 实验材料表

产品名称	型号	生产企业
FACSAriaTMII 流式细胞仪器	-	美国 BD 公司
常温离心机	-	美国 ThermoFisher 公司
细胞漩涡均匀器	-	美国 Sheldon 公司
冷藏箱柜	-	海尔 SC-326 型
微量移液器	-	法国 Gilson 公司
白细胞分化抗原 CD3 检测试剂 (APC)	652815	美国 BD 公司
白细胞分化抗原 CD4 检测试剂 (FITC)	340133	美国 BD 公司
白细胞分化抗原 CD8 检测试剂 (PerCP)	652829	美国 BD 公司
MsIgGKpaItCIPEMOPC-21	555749	美国 BD 公司
HuCD279PEEHEH121	560795	美国 BD 公司
5ml 圆底试管聚苯乙烯 12*75mm	352052	美国 BD 公司
溶血素	349202	美国 BD 公司
鞘液	342003	美国 BD 公司
EDTA-K2 抗凝血无菌管	367843	美国 BD 公司
各种规格移液器吸头	-	北京金麦克技术发展有限公司
FALCON 流式管	-	美国 BD 公司

## 2.3 实验步骤

(1) 做好流式细胞仪使用的准备操作者明确检测方案, 对检查鞘液桶以及废液桶进行全方面检查, 确保前者处于充满情况。且废液桶中需要留出一定空间进行标本的处理, 即容纳相关的废液。操作者依次打开需要应用的工具, 即电源、电脑、打印机。

(2) 制备实验应用的标本组织受检人员进行静脉血抽取, 即 5 毫升。将静脉血利用紫头管进行收集, 处于室温状态置入滚动物充分转动; 之后利用 2 支圆底试管准备好聚苯乙烯, 将序号分别记作 1 和 2。并且通过加样枪加以白细胞分化抗原的吸取, 记作 3ul, 将抗原 CD3 和 2 支试管分别混合。选择白细胞抗原 CD4 和 2 支试管分别混合、选择白细胞抗原 CD8 和 2 支试管分别混合。接下来在标注为 1 号的试管中引进 10ul 的抗体 (IgG), 在标注为 2 号的试管中引进 CD279 抗体, 事先轻微混合。最后增加血样 50ul 混合, 以手动

形式进行摇匀, 开展相应的 15 分钟避光孵育处理。

#### 2.4 排除标准

严重肝肾及心血管疾病, 有其他类型重要疾病的人员、出现肿瘤人员或者进行免疫抑制剂干预的人员。

### 3 方法

#### 3.1 实验方法

以细胞技术的方式对三个小组人员的外周血进行检测, 即 CD4+T 淋巴细胞、CD8+T 淋巴细胞相关表达过程中参与的 PD-1 分子, 对比检测结果。

#### 3.2 实验材料

表 2 实验材料表

产品名称	型号	生产企业
FACSAriaTMII 流式细胞仪器	-	美国 BD 公司
常温离心机	-	美国 ThermoFisher 公司
细胞漩涡均匀器	-	美国 Sheldon 公司
冷藏箱柜	-	海尔 SC-326 型
微量移液器	-	法国 Gilson 公司
白细胞分化抗原 CD3 检测试剂 (APC)	652815	美国 BD 公司
白细胞分化抗原 CD4 检测试剂 (FITC)	340133	美国 BD 公司
白细胞分化抗原 CD8 检测试剂 (PerCP)	652829	美国 BD 公司
MsIgGKpaltCIPEMOPC-21	555749	美国 BD 公司
HuCD279PEEHEH121	560795	美国 BD 公司
5ml 圆底试管聚苯乙烯 12*75mm	352052	美国 BD 公司
溶血素	349202	美国 BD 公司
鞘液	342003	美国 BD 公司
EDTA-K2 抗凝血无菌管	367843	美国 BD 公司
各种规格移液器吸头	-	北京金麦克技术发展有限公司
FALCON 流式管	-	美国 BD 公司

#### 3.3 实验步骤

(1) 做好流式细胞仪使用的准备操作者明确检测方案, 对检查鞘液桶以及废液桶进行全方面检查, 确保前者处于充满情况。且废液桶中需要留出一定空间进行标本的处理, 即容纳相关的废液。操作者依次打开需要应用的工具, 即电源、电脑、打印机。

(2) 制备实验应用的标本组织受检人员进行静脉血抽取, 即 5 毫升。将静脉血利用紫头管进行收集, 处

于室温状态置入滚动物充分转动; 之后利用 2 支圆底试管准备好聚苯乙烯, 将序号分别记作 1 和 2. 并且通过加样枪加以白细胞分化抗原的吸取, 记作 3ul, 将抗原 CD3 和 2 支试管分别混合。选择白细胞抗原 CD4 和 2 支试管分别混合、选择白细胞抗原 CD8 和 2 支试管分别混合。接下来在标注为 1 号的试管中引进 10ul 的抗体 (IgG), 在标注为 2 号的试管中引进 CD279 抗体, 事先轻微混合。最后增加血样 50ul 混合, 以手动形式进行摇匀, 开展相应的 15 分钟避光孵育处理。

(3) 稀释溶血素的处理操作者使用 1 支试管, 准备好相应的溶血素, 且准备蒸馏水, 将两者以 1:9 的比例进行混合, 把配置完成的液体置入滚动物, 处理五分钟。再次取得稀释溶血素, 剂量是 1ml, 均置入在 1 号试管中、2 号试管中, 缓慢摇匀, 依旧实施 15 分钟的避光加工。

(4) 离心放置离心槽的处理操作者进行离心槽的作业, 即每分钟实施 1500 转, 处理五分钟后得到弃掉液体。后续增加鞘液 1ml 使用。接下来离心作业, 对废液加以处理, 引进鞘液, 剂量是 500ml, 由此结束了标本的准备。

(5) 标本上机尚未上机之前, 不需要额外进行流式细胞仪的功能调试, 包含电压调试或者补偿数值调试等, 后续进行五千个细胞的采集以及设定。结束了采集细胞的过程, 完整对图谱结果打印出来, 医师对比和观看。

### 4 统计学方法

基于 SPSS20.0 统计学软件对全部数据信息处理, 参照 EXCEL 构建完整资源库, 以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式检验计量资料, 依据 t 检验参考; 以  $\chi^2$  检验研究观察中的计数资料, 通过 [n (%)] 形式表示  $P < 0.05$  代表差异明显, 即具备统计学意义。不符合正态分布的计量资料经自然对数 (ln) 转换后, 资料符合正态分布, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 组间比较用 F 检验的 LSD 法进行分析。

### 5 结果

#### 5.1 PD-1 在 CD4+T、CD8+T 淋巴细胞表面的表达

(1) PD-1 在 CD4+T 淋巴细胞表达: HR 耐药组: 1167 (743.50 1358.00)、HR 敏感组: 867.00 (579.25 1236.25)、健康分析组: 384.00 (260.75 451.75)。

5.2 三组比较分析 ( $F=18.89$ ,  $P < 0.001$ )。见表 3 和图 1。

(1) PD-1 在 CD8+T 淋巴细胞表达: HR 耐药组: 625.00 (476.50 722.50)、HR 敏感组: 438.00 (372.50

545.25)、健康分析组: 206.50 (160.75 270.50)。

5.3 三组比较分析 (F=42.05, P<0.001)。见表 3 和图 2。

(1)组间的两两比较结果显示 PD-1 在 CD4+T 淋巴细胞表面的表达: HR 耐药组与 HR 敏感组

(P=0.016); HR 耐药组与健康分析组 (P<0.01); HR 敏感组与健康对照组 (P<0.01)。PD-1 在 CD8+T 淋巴细胞表面的表达: HR 耐药组与 HR 敏感组 (P=0.012); HR 耐药组与健康分析组 (P<0.001); HR 敏感组与健康分析组 (P=0.001)。见表 3 和图 3。

表 3 PD-1 在淋巴细胞亚群表面表达的情况

	HR 耐药组 M (IQR)	HR 敏感组 M (IQR)	健康分析组 M (IQR)	F	P
CD4+T 细胞表面的 PD-1	1167.00 (743.50 1358.00)	867.00 (579.25 1236.25)	384.00 (260.75 451.74)	18.89	<0.001
CD8+T 细胞表面的 PD-1	625.00 (476.50 722.50)	438.00 (372.50 545.25)	206.00 (160.75 270.50)	42.05	<0.001

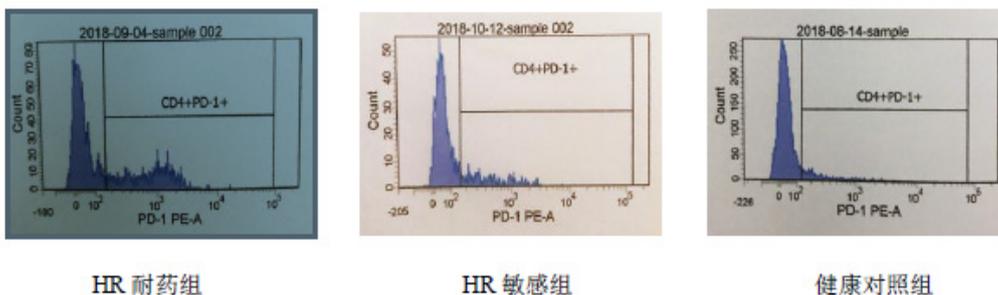


图 1 PD-1 在 CD4+T 淋巴细胞的表达

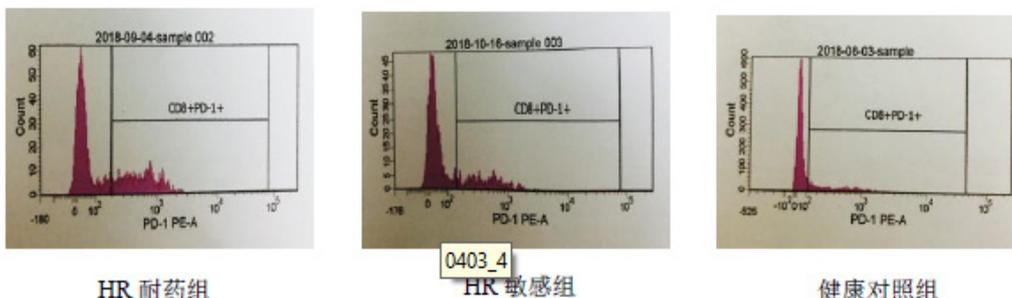


图 2 PD-1 在 CD8+T 淋巴细胞的表达

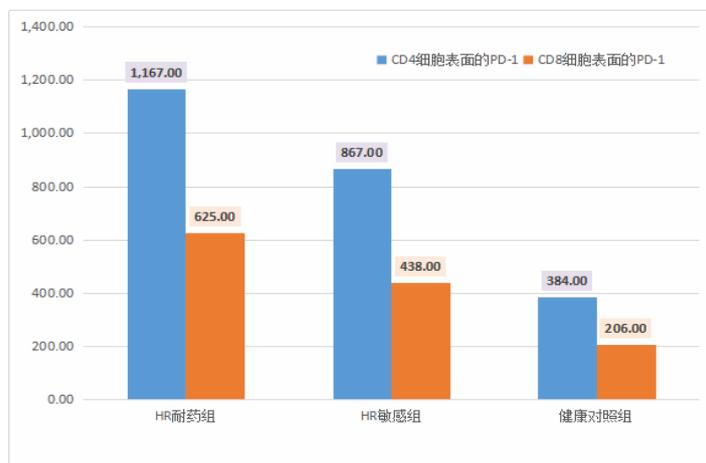


图 3 三组研究对象 PD-1 在淋巴细胞亚群表达的中位数比较

## 6 讨论

鉴于医学领域, 人体的生存中不可离开 T 淋巴细胞的存在, 对应细胞免疫主要强调了结合分歧杆菌的应答过程, 可以理解为 T 淋巴细胞活化阶段、功能体现阶段, 都应在双信号通路基础上实现。首先是进行信号的识别、其次是进行信号的刺激。刺激分子以功能的模式被划分为两种类型, 第一种类型记作正性分子、第二种类型记作负性分子。前者可以促进第一信号的实现, 加快细胞增殖速度。后者阻碍信号和 T 淋巴细胞的联系, 显著控制此细胞有免疫应答功能。即两者之间的互相作用, 实现了 T 细胞的免疫机制处于平衡状态。分析细胞调节系统, 包含多种衰减因子, 有 PD-1、CTLA-4 等, 且相关的细胞因子有明显繁琐过程反应。

对于 PD-1 这一个表达因子, 其可以存在于 T 淋巴细胞上、或者巨噬细胞上, 呈现大范围表达的形式。还作为 T 淋巴细胞的另外受体形式, 产生了相应的免疫应答调控功能。在 PD-1 因子以及对应 PDL-1 因子能够互相结合的情况下, 直接加快了体内 T 淋巴细胞有凋亡的速度, 阻碍了细胞功能进一步发挥, 还阻碍了细胞增殖流程<sup>[6]</sup>。本研究提示健康分析组 CD3+T、CD4+T 淋巴细胞表面有少量 PD-1 免疫负性分子表达, HR 敏感组的表达明显高于健康人群。

前期有学者研究显示<sup>[7-9]</sup>: 具体表述是 PD-1 这种分子能够广泛存在于肺结核患者身上, 且有一定表达升高的发展趋势, 从某种层面上而言代表着结核病有可能出现和发展, 甚至是逐步转化。再者 PD-1 这种因子能够有一定表达功能, 相关的表达率指数记作 $(27.56 \pm 2.34)\%$ , 将此数值和与正常健康对照组的表达率指数 $(12.48 \pm 3.28)\%$ 比较、还要将此数值和肺部感染对照组的表达率指数 $(14.98 \pm 4.29)\%$ 比较, 相关的差异都体现出一定统计学意义, 这些结果都可以完全和之前的研究情况进行衔接, 有显著的相似性。

通过本次分析和实践中, HR 耐药的肺结核人员中, 有 CD4+T 淋巴细胞以及相关 CD8+T 淋巴细胞表达 PD-1 因子效果提升的情况, 尤其是 CD4+T 淋巴细胞的表达比较显著。表达的速度较健康群体、甚至是 HR 敏感的肺结核人员高一些。能够代表着 HR 耐药类型的患者, 自身 PD-1 存在于淋巴细胞上表达呈现增高趋势, 第一个调查结果可以理解为 HR 耐药肺结核人员自身淋巴细胞的对应计数没有与亚群表达之间的数据出现统计学意义。从另外方面考虑, 即 HR 耐药肺结核人员相对严重一些, 即便 HR 耐药肺结核人员身体内的细胞亚群计数没有与敏感类型的人员之间数据比

较出现意义, 可是 HR 耐药肺结核人员的负性因子(PD-1), 相应的细胞表达速度提升, 这一个现象的出现可能是耐多药肺结核人员有免疫抑制显著的情况, 这样不管是 PD-1, 还是 PD-L1, 都会直接阻碍了机体淋巴细胞正常增殖, 程序凋亡情况明显。另外 TCR 受体可以发出抑制信号, 对应的淋巴细胞因子下调整, 这样体内淋巴细胞分歧杆菌清除的效率逐步降低, 患者的病情持续加重, 引出治疗难的问题, 难以从根源上对肺结核患者进行治疗。

一些资料明确了<sup>[10,11]</sup>: CD4+CD8+T 淋巴细胞 PD-1 及 PD-L1 水平可能同 HIV 和肺结核合并感染者的免疫功能低下有关。本文推理与前期关于 HIV 患者 T 淋巴细胞免疫功能下降的原因相似。

PD-1 与 PDL-1 两种细胞因子的运行途径能够促进 ITIM 酪氨酸残基有磷酸化的表达, 加快了 SHP-2 磷酸酶以及相关 SHP-2 两者的互相结合, 引出了磷酸化速度提高。这样体内 SHP-2 的活化效率也会加快, 引出抑制性细胞有信号传递的现象, 相关细胞因子合成过程受到阻碍, 减少 T 细胞的增殖。在下调激活因子表达中, 包含 IL-2、IL-10, 这些细胞的分泌量都会减少, 引出了相关细胞 IFN- $\gamma$  的表达, 加重免疫抑制<sup>[12]</sup>。

文检测耐多药肺结核患者 T 淋巴细胞亚群 PD-1 明显高表达, 但未检测 PD-11 是否高表达, PD-1 只有在与其配体受体 PD-L1 相结合后才能介导免疫负性反应, 介导 T 淋巴细胞的凋亡、耗竭、抑制其增殖。故暂不能定论耐药肺结核患者 T 淋巴细胞 PD-1 增高, 就说明其细胞免疫低下且低下由 PD-1 介导。不考虑 PD-1 这一个因子, 还涉及细胞的分子作用过程, 比如细胞正性因子、负性因子的作用。还包含了细胞之间的识别, 此实验明确了结果数据可能作为一种机制表现, 然而耐多药肺结核患者的细胞免疫过程、抑制过程的机理依旧要被深入挖掘和探索。

## 参考文献

- [1] Flynn JL, Chan J. Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: living with the enemy [J]. *Current Immunol*, 2003, 15 (4): 450-455.
- [2] Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation[J]. *Front Immunol*, 2016, 7 (1) :550.
- [3] Rota G, Niogret C, Dang AT, et al. Shp-2 is dispensable for establishing T cell exhaustion and for PD-1 signaling in

- vivo[J]. Cell Rep, 2018, 23 (1) :39.
- [4] Boussiotis VA. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway[J]. N Engl J Med, 2016, 375 (18) :1767.
- [5] 中华人民共和国卫生部.肺结核诊断 (ws288-2017).北京:人民卫生出版.2018.
- [6] 何纲,丁佩佩,甄沛林,等. 程序性死亡分子 1 在药物敏感及耐多药肺结核患者 T 淋巴细胞上的表达及意义[J]. 中华传染病杂志,2014(7):30-35.
- [7] 巫丽兰. PD-1 在耐多药肺结核患者 T 淋巴细胞亚群的表达及意义[D]. 广州医科大学,2019.
- [8] 王丽,熊坤龙,朱长太,等. T 淋巴细胞耗竭在耐多药肺结核患者免疫表达中的初步研究[J]. 中国防痨杂志,2021,43(8):808-812.
- [9] 赵霞,孙会,王建新,等. 茜草配方颗粒辅助治疗耐多药肺结核患者的临床效果[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(10): 1451-1455.
- [10] 宫雯雯,王天琳,肖燕,等. PD-1/PD-L1 抑制剂相关垂体炎临床特征分析并文献复习[J]. 中华内分泌代谢杂志,2024,40(4):298-304.
- [11] 张海莲. Hp 感染萎缩性胃炎胃黏膜中 T 淋巴细胞亚群及 PD-1 表达的意义[D].蚌埠医学院,2017.
- [12] 彭丽珊,冷静,刘显,等.HIV-1 感染者 CD4+CD127-T 细胞减少与 PD-1 高表达相关[J]. 免疫学杂志, 2018, 34(10): 886-893.

**版权声明:** ©2024 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



**OPEN ACCESS**