

会有更多新的以血管新生为靶点的治疗肿瘤的机制被发现。目前已知的几种抑制肿瘤血管新生的机制有针对 VEGF 及其受体的抗体等,已有几种新发展的针对血管新生的抗体可用于治疗肿瘤。例如,抗血管新生素或抗血管新生素受体 tie-2 的抗体能影响血管的稳定性。针对内皮细胞特异性配体受体系统的抗体,如抗 ephrinB2 和抗 Eph4 的抗体能影响内皮细胞之间的识别。一些针对其他细胞因子(例如肝细胞生长因子,IL-8)或其受体的抗体也能影响血管的生成。

四种抑制肿瘤血管新生的单抗机制目前仍在进一步研究,单克隆抗体靶点药物也成为治疗肿瘤的有效手段,近年来基于抗体的肿瘤治疗药物在商业上取得了成功,将会促使人们研究更多抑制肿瘤血管新生的作用机制,为肿瘤治疗提供更多的方法。

参考文献

- [1] Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 464-478.
- [2] Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nat Med*, 2003, 9: 669-676.
- [3] Hattori K, Heissig B, Wu Y, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment[J]. *Nat Med* 2002, 8: 841-849.
- [4] Rakic JM, Lambert V, Devy L, et al. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44:

3186-3193.

- [5] Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, et al. Anti-PLGF Inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels[J]. *Cell*, 2007, 131: 463-475.
- [6] Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, et al. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2(Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1998, 17: 155-161.
- [7] Klement G, Baruchel S, Rak J, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(8): 15-24.
- [8] Urake CJ, Cheresch DA, Little CD, et al. An antagonist of integrin $\alpha\beta3$ prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization[J]. *J Cell Sci*, 1995, 108(7): 2655-2661.
- [9] Burrows FJ, Thorpe PE. Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(19): 8996-9000.
- [10] Takahashi N, Haba A, Matsuno F, et al. Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin(CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide[J]. *Cancer Res* 2001, 61(21): 7846-7854.
- [11] Oh P, Li Y, Yu J, et al. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumors for tissue-specific therapy [J]. *Nature*, 2004, 429: 629-635.

(2013-08-15 收稿 2013-08-19 修回)

[DOI]10.3969/j.issn.1008-9810.2013.04.039

· 论 著 ·

结核分枝杆菌相关 IFN- γ 释放试验 在结核病诊断及疗效监测中的应用[△]

张腊红¹ 洪理泉¹ 罗 贤¹ 葛胜祥² 徐立群¹ 陈兆军^{1*}

摘要 目的: 探讨结核分枝杆菌相关 γ -干扰素释放试验(TB-IGRA)在结核病诊断及临床抗结核治疗效果评价中的应用价值。方法: 对 196 例临床确诊结核患者进行相关病史收集,同时进行 TB-IGRA、结核菌素皮肤试验、结核杆菌培养、涂片镜检、结核抗体检测。结核患者的治疗过程中按用药疗程(初治患者第 2、5、6 个月,复治患者第 2、5、8 个月)对其进行随访,在治疗结束后 6 个月和 1 年后各随访一次,比较 TB-IGRA 与结核菌素皮肤试验在治疗过程中的变化。结果: 确诊结核病例 196 例,其中肺结核 158 例,肺外结核 38 例, TB-IGRA 在结核诊断中灵敏度为 82.1%, 特异性为 91.7%, 阳性预测值为 93.1%, 阴性预测值为 79.3%, 与传统实验室检查方法相比有显著性差异($P < 0.01$)。在结核患者的抗结核治疗过程中, TB-IGRA 阳性率及浓度水平治疗前与治疗后 2、6 月以及复治后 2、5、8 月比较显著下降($P < 0.01$), TB-IGRA 水平与结核分枝杆菌数量存在较好相关性,与传统的 TST 方法评估疗效相比有显著性差异($P < 0.01$)。结论: TB-IGRA 在结核诊断中敏感性和阳性预测值较高,可作为较好的结核诊断的依据,同时 TB-IGRA 对肺外结核的灵敏度较高,为肺外结核患者的诊断提供了较为可靠的依据。通过治疗过程 TB-IGRA 检测分析,外周血 TB-IGRA 的变化随着抗结核治疗的进程下降的趋势明显,与结核涂片镜检结果符合率较高,是临床疗效评估较为理想的指标。

关键词 IFN- γ 释放试验 结核 诊断 疗效

[△] 浙江省医药卫生科技计划项目(2009A167)

¹ 杭州师范大学附属医院检验科(310015)

² 厦门大学(361005)

* 通信作者

Application of Mycobacterium Tuberculosis Specific Protein Interferon-Gamma Release Assay in Tuberculosis Diagnosis and Therapeutic Monitoring

Zhang Lahong, Hong Liqun, Luo Xian, et al

Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou (310015), China

Abstract Objective To investigate the applicative value of mycobacterium tuberculosis specific protein interferon gamma release test in early diagnosis of tuberculosis and the evaluation of clinical efficacy. **Methods** 196 clinical diagnosis of tuberculosis patients were related to the history collection, and detected by TB-IGRA simultaneously, tuberculin skin test (purified protein derivative of tuberculin 5 units), tubercle bacillus culture, directly smear, tuberculosis antibody detection. Treatment of tuberculosis patients were followed up (2, 5, 6 months, retreatment patients at 2, 5, 8 months) in 6 months and 1 years after the end of treatment follow-up once. Compared with difference between the IGRA and tuberculin skin test and other traditional laboratory results. **Results** Confirmed tuberculosis cases in 196 cases, including 158 cases of pulmonary tuberculosis, 38 cases of extra-pulmonary tuberculosis. The sensitivity of TB-IGRA in the pulmonary tuberculosis and extra-pulmonary tuberculosis showed 81% and 86.8% respectively, at the same time, TB-IGRA in the diagnosis of tuberculosis, the negative predictive value express 86.3%, specificity was 91.7%, and the positive predictive value was 88.2%. In anti-tuberculosis treatment the positive rate of TB-IGRA and concentration levels before treatment and after treatment 2, 5, 6 months, retreatment 2, 5, 8 months decreased significantly ($P < 0.01$). There is better correlation TB-IGRA concentration level with number of mycobacterium tuberculosis. It is significant difference compared to TB-IGRA with the traditional TST method to the evaluation of clinical treatment ($P < 0.01$). **Conclusion** The sensitivity of TB-IGRA in the diagnosis of tuberculosis and the positive predictive value is higher; it can be used as a good basis for the diagnosis of tuberculosis. TB-IGRA provides a more reliable diagnosis method in patients with extra-pulmonary tuberculosis. Peripheral blood TB-IGRA decreased significantly in anti-tuberculosis treatment process. Coincidence rate between TB-IGRA concentration level and number of mycobacterium tuberculosis is higher. It is an ideal index to evaluate the clinical efficacy.

Key Words interferon-gamma release test, mycobacterium tuberculosis, diagnosis, evaluation of clinical treatment

结核是由结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 所致以呼吸系统感染为主的慢性传染病, 目前全球约有 1/3 的人感染了 MTB, 每年新发病例 870 多万 (13% 合并 HIV 感染) 约 140 万人死于结核 (其中近 100 万为 HIV 阴性)^[1]。我国结核患者数量居全球第二位^[2]。卡介苗的普遍接种, 结核病人的及时发现和规范性治疗, 以及对较易发展的无症状感染者进行预防性治疗是结核防控的主要措施, 而结核患者及时准确的早期诊断是结核规范性治疗的起点, 因此, 高效的结核早期诊断手段就显得尤为重要。

上世纪 90 年代科学家们通过比较基因组学发现了 MTB 具有而卡介苗、其他分枝杆菌没有的基因区域, 且位于此区域的两个蛋白早期分泌抗原-6 (ESAT-6) 和培养基滤过蛋白-10 (CFP-10) 具有较强的 Th 表位。在此基础之上, 国外学者结合 T 细胞免疫检测技术的进展建立了一种新型的结核特异性 T 细胞免疫体外检测方法—T 细胞 IFN- γ 体外释放试验 (interferon-gamma release assay, IGRA)^[3]。国际上为评价 TB-IGRA 在结核病的临床诊断、流行病学调查、非活动性结核感染者疾病发展的预示以及评价抗结核治疗效果等方面的应用价值开展了大量研究^[4-6], 但目前围绕 TB-IGRA 开展的研究均集中在结核低流行区的各发达国家进行, 且均局限于评价 TB-IGRA 作为单独指标在流行病学筛查和临床诊断中的应用价值, 而诸如中国、印度等发展中国家作为结核的高流行区, 存在庞大的非活动性结核感染人群, 检测 MTB 感染的方法 TB-IGRA 作为单独指标在临床上对结核病的诊断价值仍不明确, 十分有必要开展此类研究, 以期这种新方法

能有助于我国结核诊断方案的改进, 提高对结核的诊断效率。

本文通过对结核新型诊断技术 TB-IGRA 在结核高流行区的临床应用研究, 明确 TB-IGRA 作为结核病早期诊断及抗结核治疗效果评估的应用价值。

1 材料和方法

1.1 标本来源 选取于 2009 年 7 月~2010 年 2 月在我院门诊及住院诊治的疑似结核患者共 272 例, 对所有临床结核确诊患者进行基本信息及联络方式、主要症状、病程、既往结核感染史、既往结核接触史、胸片陈旧性结核疤痕、免疫抑制因素等病史信息的登记, 并进行皮肤结核菌素试验、涂片镜检、结核杆菌培养、结核抗体及外周血 TB-IGRA 检测。抗结核治疗以 INH、RFP、PZA、EMB 为主, 疗程 (6~16) 月, 平均疗程 10.8 个月, 所有患者均为 HIV 阴性, 无原发或继发性免疫缺陷, 结核杆菌药敏结果除 4 例耐 INH 外其余均为敏感菌。

入选标准: (1) 年龄 > 14 岁; (2) 性别不限; (3) 临床表现提示结核杆菌感染。

排除标准: (1) 针对目前病情已进行诊断性抗结核治疗; (2) HIV 阳性患者。

1.2 试剂和仪器 TB-IGRA 定量检测试剂盒 (北京万泰生物药业有限公司), PPD (成都生物制品有限公司), 结核抗体试剂盒 (杭州艾博生物医药有限公司), 罗氏培养基 (杭州嘉伟生物制品有限公司), GNP-9270 培养箱 (上海精宏实验设备有限公司), ESCO 生物安全柜 (新加坡艺思高公司)。

1.3 TB-IGRA 标本采集及检测 每个受试者采用 BD 肝素锂抗凝管真空采集 4ml 全血后立即送检(要求 2h 内送达), 收样后立刻各取 1ml 全血分装到 N、T、P 3 个培养管, 37℃ 恒温培养箱培养 22h ± 2h 后, 以 3000r/min 离心 10min, 吸取上清, 上清标本可在 4℃ 存放 1 周, 长期存放需置 -20℃ 或者更低温度中, TB-IGRA 检测按照试剂说明书操作(两步双抗体夹心法)。

1.4 皮肤结核菌素试验(TST) 患者接受了结核菌素纯蛋白衍生物(PPD) 5 个单位的皮肤试验(TST), 并记录 72h 内皮肤红肿、硬结直径、溃破及水泡情况。阳性标准: 皮肤硬结 >10mm 或者出现溃破、水泡。

1.5 结核杆菌培养 收集结核感染患者清晨浓痰或非呼吸道样本(胸腹腔积液、脑脊液或其它组织液等), 接种于罗氏培养基内, 培养(4~8)周, 每周观察一次, 记录培养结果。

1.6 结核抗体检测 快速检测结核疑似病例血清中 MTB 抗体 IgG, 检测反应板中检测线和红色对照线同时出现判断为阳性, 只出现红色对照线则判断为阴性。

1.7 抗酸染色涂片镜检 收集结核感染患者清晨浓痰或非呼吸道样本(胸腹腔积液、脑脊液、尿液或其它组织液等), 抗酸染色, 油镜视野中观察到抗酸杆菌则判断为阳性。

1.8 随访 初治在治疗开始后的第 2、6 月, 复治在第 2、5、8 月, 治疗结束后 6 个月, 同时复查 TB-IGRA、TST 及与抗结核治疗疗效相关的痰菌涂片情况。

1.9 统计学处理 用 SPSS11.5 软件进行统计分析, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例分组: 疑似结核病例 272 例, 根据临床表现、MTB 涂片抗酸染色、结核杆菌培养、影像学检查、细胞组织病理学检查以及诊断性抗结核治疗等, 最终确诊结核 196 例, 根据患者临床表现按 WHO 的对肺结核及肺外结核的分类标准进行分类, 肺结核感染病例 158 例, 肺外结核感染病例 38 例, 38 例确诊肺外结核患者中经细菌学确诊的有 8 例, 经组织学符合结核病变的有 32 例(其中 2 例患者细菌学及组织学均符合结核病), 主要诊断包括盆腔结核 4 例, 淋巴结结核 5 例、结核性胸膜炎 7 例, 骨结核 4 例, 结核性脑膜炎 2 例, 结核性心包炎、肠结核、肝结核各 2 例, 泌尿系统结核 6 例, 结核性腹膜炎 4 例, 部位不明确患者 2 例, 其中 2 例患者有 2 个以上部位的结核感染; 非结核病例共 146 位患者, 其中肺炎 80 例, 肺癌 15 例, 其它肺部疾病 51 例。

2.2 TB-IGRA 灵敏度和特异度评价: 在确诊肺结核的 158 例病例中 128 例 TB-IGRA 阳性, 在确诊的 38 例肺外结核病例中 33 例 TB-IGRA 阳性, 非结核病的 146 例病例中 134 例为 TB-IGRA 阴性, 见表 1。TB-IGRA 诊断肺结核和肺外结核灵敏度分别为 81.0% 和 86.8%, TB-IGRA 诊断结核灵敏度为 82.1%, 特异性为 91.7%, 阳性预测值为 93.1%, 阴性预测值为 79.3%。

表 1 TB-IGRA 与临床诊断结果比较

TB-IGRA	肺结核	临床诊断肺外结核	非结核
阳性	128	33	12
阴性	30	5	134
合计	158	38	146

2.3 TB-IGRA 诊断价值分析: 临床确诊为肺结核的 158 例病例中, 肺结核涂片阳性为 40 例, 灵敏度为 25.3%, 结核杆菌培养阳性 68 例, 灵敏度为 43.0%; 38 肺外结核涂片阳性为 6 例, 灵敏度为 15.7%, 结核杆菌培养阳性 8 例, 灵敏度为 21.0%; 与 TB-IGRA 检测肺结核及肺外结核灵敏度 81.0% 及 86.8% 相比有显著差异 ($P < 0.01$), TST 在诊断肺及肺外结核的灵敏度分别为 79.1% 和 78.9%, 与 TB-IGRA 相比无统计学意义 ($P > 0.05$), 但其在结核诊断的特异性仅为 43.1%, 与 TB-IGRA 的特异性 91.7% 相比差异显著, 同时 TB-IGRA 的阳性预测值及阴性预测值分别达到 93.1% 及 79.3%, 显著高于 TST 及结核抗体。综合以上指标, 结果表明, TB-IGRA 在结核诊断具有显著的临床价值, 优于传统的检测方法, 见表 2、表 3。

表 2 TB-IGRA 与其它方法学之间比较

组别	n	TB-IGRA 阳性	结核菌培养 涂片	TST	结核抗体
肺结核病组	158	128	68	40	125
肺外结核组	38	33	8	6	30
非结核病组	146	12	0	0	83

表 3 TB-IGRA 与其它方法的敏感度、特异性比较

方法	敏感度(%)	特异性(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)
TB-IGRA	82.1	91.7	93.1	79.3
TST	79.1	43.1	65.1	60.6
结核抗体	63.2	50.6	63.2	50.6
痰涂片	23.5	100	100	49.3
痰培养	38.8	100	100	54.9

2.4 TB-IGRA 测定于抗结核治疗前期(2 个月)的阳性率显著高于后期(疗程满 6 个月) [132/196(67.3%) vs. 48/196(24.5%); $P < 0.01$], 而 TST 结核菌素皮试于抗结核治疗前期 2 月及后期 6 月的阳性率无统计学意义 [147/196(75.0%) vs. 119/196(59.2%); $P > 0.05$]; 疗程已完成时(复治满 8 个月) TST 结核菌素皮试阳性 98 例(50.0%), TB-IGRA 阳性仅 12 例(6.1%), 其中有 4 例均为耐药结核病; 治疗结束后 6 个月及 1 年随访表明, TB-IGRA 阳性率 4.1% 和 3.1% 远远低于 PPD 结核菌素皮试阳性率 47.9% 和 46.9%, 见表 4。

表 4 TB-IGRA 在抗结核治疗前后的阳性率比较

时间	TB-IGRA 阳性数(n)	TB-IGRA 阳性率(%)	TST 阳性(n)	TST 阳性率(%)
治疗前	161	82.1	155	79.1
疗程满 2 月	132	67.3	147	75.0
疗程满 5 月	83	42.3	123	62.75
疗程满 6 月	48	24.5	116	59.2
复治满 2 月	32	16.3	108	55.1
复治满 6 月	20	10.2	102	52.0
复治满 8 月	12	6.1	98	50.0
治疗结束后 6 月	8	4.1	94	47.9
治疗结束后 1 年	6	3.1	92	46.9

2.5 疗程满 2 个月时 TB-IGRA 结果与痰菌结果的诊断符合率为 50.0%, PPD 结核菌素皮试与痰菌结果的诊断符合率为 41.3%, 两者符合率相近; 疗程满 6 个月时 TB-IGRA 与痰菌结果的诊断符合率为 81.6%, PPD 结核菌素皮试与痰菌

结果的诊断符合率为 44.4%, 后者符合率显著小于前者; 复治满 6 个月及以后 TB-IGRA 与痰菌结果的诊断符合率约为 95.0%, PPD 结核菌素皮试与痰菌结果的诊断符合率仅为 50.0% 左右, 后者符合率显著小于前者, 见表 5。

表 5 两组试验与痰菌结果的符合情况

疗程(时间)	涂片结果	n	TB-IGRA(n)		TST(n)	
			阳性	阴性	阳性	阴性
治疗前	阳性	46	45	1	41	5
	阴性	150	116	34	114	36
疗程满 2 月	阳性	38	36	2	35	3
	阴性	158	96	62	112	46
疗程满 5 月	阳性	23	22	1	16	7
	阴性	173	61	112	107	66
疗程满 6 月	阳性	12	10	2	9	3
	阴性	184	38	146	107	77
复治满 2 月	阳性	10	9	1	6	4
	阴性	186	23	163	102	84
复治满 6 月	阳性	8	8	0	6	2
	阴性	188	12	176	96	92
复治满 8 月	阳性	6	6	0	5	1
	阴性	190	6	184	93	97
治疗结束后 6 月	阳性	4	4	0	2	2
	阴性	192	4	188	92	100
治疗结束后 1 年	阳性	4	4	0	2	2
	阴性	192	2	190	90	102

2.6 治疗前与治疗后 TB-IGRA 的浓度水平呈明显下降 (480 ± 24 vs. 14 ± 2 ; $P < 0.01$), 在复治满 8 月(治疗结束时)已基本接近正常, 见表 6。

表 6 治疗前与治疗后 TB-IGRA 水平比较

疗程	TB-IGRA 水平(ng/ml)
治疗前	480 ± 24
疗程满 2 月	210 ± 18
疗程满 6 月	60 ± 5
复治满 2 月	30 ± 4
复治满 6 月	20 ± 3
复治满 8 月(治疗结束)	14 ± 2
治疗结束后 6 月	10 ± 1

3 讨论

结核病是一种常见且难以进行病原学诊断的疾病, 近年来发病率呈逐年上升趋势, 严重危害人类健康。结核病的实验室诊断是发现传染源的主要途径和手段, 是确定结核病诊断和化疗方案的重要依据, 也是考核疗效、评价治疗效果的重要的参考, 目前结核病诊断实验室方法主要采用痰涂片分析、结核抗体检测、TST、结核杆菌基因扩增和结核杆菌培养等, 但存在时效性不足或敏感度较差等缺陷。

由于 MTB 是一种细胞内病原体, 因此, 评估患者的 T 淋巴细胞是否被 MTB 特异性抗原致敏是一种可行的诊断方法, 经典的 TST 就是根据这个原理, TST 试验敏感性高, 但特异性差, 对于接种过卡介苗(BCG)的健康人群往往呈阳性表现, 且与其他分枝杆菌感染存在交叉免疫反应。21 世纪初期, Lalvani 等^[7]首先应用 ELISPOT 检测外周血结核杆菌抗原特异性 γ -干扰素释放水平来诊断结核杆菌感染, 又称 IGRA。近年来, 随着比较基因组学的发展, 以 T 细胞为基础

的体外 IFN- γ 反应测定方法成为结核病实验室诊断研究的热点。TB-IGRA 的基本原理是, 被 MTB 致敏的 T 淋巴细胞, 再次受到相关抗原刺激后会释放一种 Th1 型细胞因子 IFN- γ , 高水平的 IFN- γ 反应可能提示 MTB 感染或致敏^[8-9], 而且与皮肤实验不同的是, 这个过程可以在体外完成。根据检测方法不同, TB-IGRA 包括 2 类: 一类是用 ELISA 检测用上述两种蛋白刺激全血后的上清液中 γ 干扰素的水平; 一类是用 ELISpot 计数, 用上述两种蛋白刺激外周血单个核细胞后分泌 γ 干扰素的 T 细胞个数。结核感染 T 细胞斑点试 T-SPOT.TB 研究表明, TB-IGRA 等对非活动性结核感染者和隐性结核感染者等检测可以早期发现, 并对潜伏性感染者进行早期预防性治疗^[10]。2005 年美国 FDA 批准了 QFT-G 用于诊断潜伏性结核和活性性结核^[11], 而 T-SPOT.TB 检测在诊断潜伏和活性性结核方面也有较好的评估, 在欧洲和加拿大已被批准用于诊断结核病。然而 TB-IGRA 方法在结核高发的国家目前的评估不多, 仅少量是研究, TB-IGRA 在结核中的诊断价值仍然不清, 在我国, 关于较大样本的 TB-IGRA 诊断结核病的研究也少见报道。

我国国内在解决了全血体外培养、特异性提高 T 细胞反应等技术难题后已成功建立了国产的 TB-IGRA 检测试剂, 本文采用国产 TB-IGRA 检测试剂, 以 MTB 感染患者为对象, 对 TB-IGRA 与痰涂片、结核杆菌培养、结核抗体检测、TST 检测进行比较分析, 检测结果显示, TB-IGRA 灵敏性和特异性明显高于痰涂片、结核杆菌培养、结核抗体检测, 差异显著 ($P < 0.01$), TST 在结核诊断灵敏性与 TB-IGRA 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但其在结核诊断的特异性仅为 43.1%, 与 TB-IGRA 的特异性 91.7% 相比差异显著 ($P < 0.01$), 提示 TB-IGRA 对 MTB 感染的诊断具有重要的临床意义, 优于传统实验室检查方法。

MTB 感染引起的细胞免疫属于带菌免疫, 当人或动物感染了 MTB 后, 具有免疫活性的 T 淋巴细胞识别 ESAT-6 及 CFP-10 并产生高水平的 γ -干扰素, 理论上 γ -干扰素能特异性地反映机体 MTB 的感染情况。目前临床利用 TST 间接监测抗结核治疗过程中 MTB 负荷量即结核活动性, 来评估抗结核治疗效果, 往往得出与临床不相符的结果, 原因主要有以下两点: 其一因 PPD 为 MTB 培养上清液的粗提物, 其中大多数蛋白质是非 MTB 及 BCG 的共同抗原成分, 从而在普遍接种 BCG 的地区造成非常高的假阳性; 其二结核菌素皮试通过特异性刺激记忆 T 淋巴细胞(包括既往感染产生的中央记忆 T 淋巴细胞)激活抗原特异性免疫记忆应答, 而是否现患结核病及 MTB 负荷量无显著相关性。抗原特异性 IFN- γ 体外释放试验克服了以上两个缺点: 特异的蛋白抗原(ESAT-6 和 CFP-10 蛋白)可刺激 MTB 感染的人外周血单个核细胞(PBMC)产生增殖反应和大量的 IFN- γ , 而卡介苗接种的健康人对该抗原反应水平低, 其特异性显著高于 PPD^[12], 更重要的是, 根据 Harari^[13]等的研究报告, 虽然此特异的蛋白抗原所激发的免疫应答反应也存在中央记忆 T 淋巴细胞大量增殖的现象, 但中央记忆 T 淋巴细胞只产生 IL-2, 不产生 IFN- γ , 只有效应记忆 T 淋巴细胞产生并分泌 IFN- γ , 且效应记忆 T 淋巴细胞只在人体内存在 MTB 时产生, 当结核病治愈后即消失, 故抗原特异性 IFN- γ 体外释放测定只与体内 MTB 负荷量即结核活动性呈正相关, 而不受既往结核感染的影响, 从而成为评估抗结核治疗疗效的理想指标。

本文采用敏感性和特异性较高的 TB-IGRA 动态观察 196 名患者抗结核治疗过程中 γ -干扰素的变化,结果表明,治疗后 TB-IGRA 阳性率及水平均呈下降趋势,治疗前后差异有统计学意义($P < 0.01$)。治疗后,病菌复制受到抑制,病菌量减少,T 淋巴细胞对抗原的反应强度减低,表现在 IFN- γ 水平呈下降趋势,临床疗效为好转;疗效不好的患者,病菌没有得到控制,持续的 T 淋巴细胞反应使患者 IFN- γ 水平呈较高状态,TB-IGRA 水平与 MTB 数量存在较好相关性,与传统的 TST 方法评估疗效相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 TB-IGRA 是结核治疗疗效评估较敏感的指标。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2012 [R]. Geneva, Switzerland: World.
 [2] 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.
 [3] Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis [J]. Lancet, 2000, 356: 1099-1104.
 [4] Andersen P, Doherty TM, Pai M, et al. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? [J]. Trends in molecular medicine, 2007, 13: 175-182.
 [5] Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, et al. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with Mycobacterium tuberculosis [J]. Am J Respir Crit Care Med 2008, 177: 1164-1170.
 [6] Herrmann JL, Belloy M, Porcher R, et al. Temporal dynamics of

interferon gamma responses in children evaluated for tuberculosis [J]. Plos One 2009, 4: e4130.
 [7] Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells [J]. Am J Respir Crit Care Med 2001, 163: 824-828.
 [8] Ferrara G, Losi M, Meacci M, et al. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172: 631-635.
 [9] Lee SW, Lee CT, Yim JJ. Serial interferon-gamma release assays during treatment of active tuberculosis in young adults [J]. BMC Infect Dis 2010, 10: e300.
 [10] Zhang S, Shao L, Mo L, et al. Evaluation of gamma interferon release assays using Mycobacterium tuberculosis antigens for diagnosis of latent and active tuberculosis in Mycobacterium bovis BCG-vaccinated populations [J]. Clin Vaccine Immunol 2010, 17(12): 1985-1990.
 [11] Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States [J]. MMWR Recomm Rep 2005, 54: 49-55.
 [12] Dogra S, Narang P, Mendiratta DK, et al. Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India [J]. Infect, 2007, 54: 267-276.
 [13] Harari A, Vallelian F, Meylan PR, et al. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence [J]. Immunol, 2005, 174: 1037-1045.

(2013-10-12 收稿)

[DOI]10.3969/j.issn.1008-9810.2013.06.040

· 论 著 ·

人促甲状腺激素单克隆抗体的制备及鉴定

乔元彪¹ 王 权² 张文举¹ 陈 沁^{1*}

摘要 目的: 制备特异性强、灵敏度高的人促甲状腺激素(hTSH)单克隆抗体,为建立高灵敏性和高特异性的 hTSH 检测方法奠定基础。方法: 人工合成人促甲状腺激素(hTSH)上的 28 个氨基酸,采用戊二醛交联法与牛血清白蛋白(BSA)构建完全抗原。用人工免疫原免疫 BALB/c 小鼠,利用杂交瘤技术建立分泌抗 hTSH 单克隆抗体的杂交瘤细胞,并对得到的单抗进行鉴定。结果: 建立了一株杂交瘤细胞 4E5,制备了腹水单抗,经鉴定,抗体重链属于 IgG1 类型,轻链属于 κ 型,McAb 腹水 ELISA 效价达 $1: 1.6 \times 10^5$,与促黄体生成激素(LH)、促卵泡激素(FSH)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)无明显交叉反应,细胞株冻存复苏后抗体分泌稳定。结论: 本实验建立的细胞株显示稳定性好,特异性高,McAb 腹水效价高,为进一步提高 hTSH 检测的灵敏性和简便性提供依据。

关键词 人促甲状腺激素 单克隆抗体 杂交瘤细胞株

Preparation and Identification of Monoclonal Antibody Against h-Thyroid-stimulating Hormone

Qian Yuanbiao¹, Wang Quan², Zhang Wenju¹, Chen Qin^{1*}

¹Shanghai University, Shanghai(200444); ²Shanghai Veterinary Research Institute, Shanghai(200241), China

Abstract **Objective** To prepare high quality monoclonal antibody against human thyroid stimulating hormone(h-TSH) for high-sensitivity detection. **Methods** After synthetic hTSH β chain of 28 amino acids, glutaraldehyde cross-linked method was adopted to

* 通信作者

¹ 上海大学(200444);

² 中国农业科学院上海兽医研究所(200241)