

NOD1mRNA 调节 Th1/Th2 和 Treg/Th17 细胞因子在肺结核中的免疫机制及预后价值研究

张兆明, 陈素丽, 姬 玉, 李雪燕, 田 月 (昌吉市人民医院医学检验科, 新疆昌吉 831100)

摘要: **目的** 探究肺结核 (tuberculosis, TB) 患者核苷酸结合寡聚化结构域 1(nucleotide binding oligomerization domain1, NOD1)表达水平与辅助性 T 细胞 1(Th1)/辅助性 T 细胞 2(Th2), 辅助性 T 细胞 17(Th17)/调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)平衡的相关性, 分析 NOD1 mRNA 是否通过调节 Th1/Th2, Treg/Th17 的平衡参与肺结核细胞免疫进展过程。**方法** 运用病例对照研究, 收集 2021 年 6 月~2022 年 7 月昌吉市人民医院结核病门诊收治的肺结核患者 50 例作为肺结核组, 同期健康体检者 50 例作为对照组。所有病例均标准抗结核治疗 6 个月, 利用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)法检测患者抗结核治疗前后外周血单个核细胞 NOD1 基因的表达, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的细胞因子 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)和白细胞介素-17(IL-17)的表达水平。将抗结核治疗前后 NOD1 与细胞因子 IFN- γ , IL-4, IL-10 和 IL-17 的动态变化进行相关性比较。运用多因素 COX 回归分析影响肺结核患者短期预后的危险因素。**结果** 与对照组比较, 肺结核组 NOD1 (10.87 ± 5.29 vs 0.95 ± 0.44), IL-4 (17.23 ± 4.77 pg/ml vs 10.44 ± 0.59 pg/ml) 和 IL-10 (29.17 ± 2.07 pg/ml vs 24.17 ± 2.88 pg/ml)表达水平均升高, 差异具有统计学意义($t=44.86, -9.97, -9.89$, 均 $P<0.05$); 肺结核组 IFN- γ (3.91 ± 0.52 pg/ml) 和 IL-17 [$28.93 (27.57 \sim 31.03)$ pg/ml] 表达水平均低于对照组 [5.40 ± 0.36 pg/ml, $33.35 (29.77 \sim 35.10)$ pg/ml], 差异有统计学意义($t=16.58, Z=-5.79$, 均 $P<0.05$)。与治疗前相比, 治疗 3 个月 NOD1, IL-4, IL-10 和 6 个月的表达水平显著下降, 差异具有统计学意义($t=-17.03, 2.46, 5.51, -26.51, 9.47, 10.13$, 均 $P<0.05$); 与治疗前相比, IFN- γ 和 IL-17 治疗 3 个月和 6 个月表达水平显著升高, 差异有统计学意义($t=-5.28, -3.41, -13.81, -4.34$, 均 $P<0.05$); 所有病例接受抗结核治疗后效果良好, 治疗 6 个月与健康对照组比较, 差异均无统计学意义($t=-1.01 \sim 1.73$, 均 $P>0.05$)。Pearson 相关性分析表明, NOD1 水平与 IFN- γ , IL-10 水平呈正相关($r=0.514, 0.421, P<0.05$), 与 IL-4 水平呈负相关($r=-0.363, P<0.05$), 与 IL-17 水平无明显相关性($r=0.125, P>0.05$)。多因素 COX 回归分析结果显示, NOD1mRNA 的表达 ≥ 10.87 (OR=-0.923, $P=0.040$) 和 IFN- $\gamma \geq 3.90$ (OR=0.820, $P=0.038$) 的高表达是影响肺结核患者短期预后的危险因素。**结论** NOD1 的表达水平与 Th1/Th2, Treg/Th17 的平衡具有相关性, 随着患者治疗的好转, NOD1 的表达是降低的, 并且可能通过调节 Th1/Th2, Treg/Th17 的平衡参与肺结核患者细胞免疫进展过程, 但具体的变化机制还需要进一步研究。NOD1mRNA 和 IFN- γ 的高表达, 二者共同影响肺结核患者的短期预后。有望成为评估肺结核患者短期预后的危险因素。**关键词:** 肺结核; 核苷酸结合寡聚化结构域 1; 辅助性 T 细胞 1; 辅助性 T 细胞 2; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞

中图分类号: R521; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2023) 06-023-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.06.005

Study on the Immunological Mechanism and Prognostic Value of NOD1 mRNA Regulating Th1/Th2 and Treg/Th17 Cytokines in Pulmonary Tuberculosis

ZHANG Zhaoming, CHEN Suli, JI Yu, LI Xueyan, TIAN Yue

(Department of Medical Laboratory, Changji People's Hospital, Xinjiang Changji 831100, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between the expression level of nucleotide binding oligomerization domain 1 (NOD1) and the balance of helper T cell 1 (Th1)/helper T cell 2 (Th2) and helper T cell 17 (Th17)/regulatory T cell (Treg) in patients with pulmonary tuberculosis, and analyze whether NOD1 mRNA participates in the progression of pulmonary tuberculosis by regulating the balance of Th1/Th2 and Treg/Th17. **Methods** A case-control study was conducted to collect 50 cases of pulmonary tuberculosis patients admitted to the tuberculosis clinic of Changji People's Hospital from June 2021 to July 2022, and 50 cases of health checkups in the same period served as controls. All cases were treated with standard anti-tuberculosis therapy for 6 months. The expression of NOD1 gene in peripheral blood mononuclear cells of patients before and

基金项目: 新疆昌吉州科技计划项目 (2022110493): NOD1 调节 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞因子在肺结核免疫中的作用和机制研究。

作者简介: 张兆明 (1978-), 男, 本科, 副主任检验师, 研究方向: 感染免疫相关研究, E-mail: 308754557@qq.com。

通讯作者: 田月 (1987-), 女, 硕士, 主管检验师, 研究方向: 血液免疫相关研究, E-mail: 422971599@qq.com。

after anti-tuberculosis therapy was detected using real-time quantitative PCR (qPCR) method. Expression levels of interferon- γ (IFN- γ), IL-4, IL-10, and IL-17, which belong to the cytokine IFN of serum Th1/Th2 and Th17/Treg, were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The correlation between NOD1 and the dynamic changes of cytokines IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17 before and after anti-tuberculosis treatment were compared. Multivariate COX regression analysis was used to analyze the risk factors affecting the short-term prognosis of patients with pulmonary tuberculosis. **Results** Compared with the control group, the expression levels of NOD1 (10.87 ± 5.29 vs 0.95 ± 0.44), IL-4 (17.23 ± 4.77 pg/ml vs 10.44 ± 0.59 pg/ml), and IL-10 (29.17 ± 2.07 pg/ml vs 24.17 ± 2.88 pg/ml) in the pulmonary tuberculosis group were higher than those in the control group, with statistical significance ($t=44.86, -9.97, -9.89$, all $P<0.05$). The expression levels of IFN- γ (3.91 ± 0.52 pg/ml) and IL-17 [$28.93(27.57\sim 31.03)$ pg/ml] in the pulmonary tuberculosis group were lower than those in the control group [5.40 ± 0.36 pg/ml, $33.35(29.77\sim 35.10)$ pg/ml], with statistically significant differences ($t=16.58, Z=-5.79$, all $P<0.05$). Compared with before treatment, the expression levels of NOD1, IL-4 and IL-10 significantly decreased at 3 months and 6 months after treatment, and the differences were statistically significant ($t=-17.03, 2.46, 5.51, -26.51, 9.47, 10.13$, all $P<0.05$). Compared with IFN- γ and IL-17 before treatment, the expression levels of IFN- γ and IL-17 significantly increased after 3 and 6 months of treatment, with statistically significant differences ($t=-5.28, -3.41, -13.81, -4.34$, all $P<0.05$). All cases which received anti tuberculosis treatment showed good results, in which there was no statistically significant difference compared to the healthy control group after 6 months of treatment ($t=-1.01\sim 1.73$, all $P>0.05$). Pearson correlation analysis shows that NOD1 levels were positively associated with the level of IFN- γ and IL-10 ($r=0.514, 0.421$, all $P<0.05$), and negatively correlated with the level of IL-4 ($r=-0.363, P<0.05$), but not significantly correlated with the level of IL-17 ($r=0.125, P>0.05$). The results of multivariate COX regression analysis showed that the expression of NOD1 mRNA was ≥ 10.87 (OR=-0.923, $P=0.040$) and IFN- $\gamma \geq 3.90$ (OR=0.820, $P=0.038$), suggesting high expression of NOD1 mRNA and IFN- γ were risk factors affecting the short-term prognosis of pulmonary tuberculosis patients. **Conclusion** The expression level of NOD1 was correlated with the balance of Th1/Th2 and Treg/Th17. With the improvement of patient treatment, the expression of NOD1 decreases. These results showed that NOD1 may participate in the cellular immune progression of pulmonary tuberculosis patients by regulating the balance of Th1/Th2 and Treg/Th17. However, the specific mechanism of changes still needs further research. High expression of both NOD1 mRNA and IFN- γ jointly affect the short-term prognosis of patients with pulmonary tuberculosis, which may be expected to become risk factors for evaluating the short-term prognosis of patients with pulmonary tuberculosis.

Keywords: tuberculosis; nucleotide binding oligomerization domain 1; helper T cells1; helper T cells 2; helper T cells 17; regulatory T cell

结核病 (tuberculosis) 是一类由结核分枝杆菌感染引起的, 具有传染性强、病情易反复且以肺部感染最为常见^[1-2]的传染性疾病。数据显示, 我国新疆地区为结核病的高负担地区, 结核病发病率 (195.8/10 万) 及死亡率均居全国首位^[3]。目前认为 T 细胞介导的细胞免疫在结核病发病机制中有至关重要的作用。其中 CD4⁺ 的 T 淋巴细胞群是发挥抗结核免疫的关键细胞, 可以通过进一步分化为辅助性 T 细胞 1 (Th1)、辅助性 T 细胞 2 (Th2)、辅助性 T 细胞 17 (Th17)、调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 等发挥其免疫协调作用。核苷酸结合寡聚化结构域 1 (nucleotide binding oligomerization domain1, NOD1) 是一种重要的模式识别受体, 目前关于 NOD1 与结核病的研究仅有少量报道^[4-5]。虽有多项研究分析了健康者、肺结核患者治疗前后 Th1/Th2, Th17/Treg 平衡的变化情况, 以及从 Th1/Th2, Th17/Treg 平衡角度研究结核病诊断、进展和治疗的相关靶点或药物^[6-7], 但是其作用机制是否

与调节免疫功能有关, 尚不清楚。基于国内外多项研究, 本项目组提出科学假说: NOD1 可能通过调节 Th1/Th2, Th17/Treg 平衡参与肺结核细胞免疫进展过程。为验证此假说, 本项目拟通过临床收集肺结核患者和健康体检者 100 例临床样本, 最终分析 NOD1 mRNA 与 Th1/Th2, Th17/Treg 细胞因子表达之间的差异和相关性, 为后续 NOD1 在结核分枝杆菌感染的机制研究方面提供实验基础, 具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2021 年 7 月 ~ 2022 年 7 月昌吉市人民医院结核病门诊收治的肺结核患者 50 例为研究对象, 其中男性 29 例 (58.0%), 女性 21 例 (42.0%), 年龄 23 ~ 58 (38 ± 6.7) 岁。纳入标准: ①须符合国内肺结核指南诊断标准《中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断 WS288-2017》; ②经 CT, X 线、病理检查确诊为肺结核患者; ③首次确诊、既往 5 个月未服用免疫抑制剂或激素。排

除标准：①并发慢性肺炎、哮喘性疾病、慢阻肺等肺部疾病；②既往有肺部手术史；③并发心、肝、肾等重大脏器疾病；④存在意识或精神障碍不能与患者取得良好配合者；⑤孕妇及哺乳期妇女。并选择该院同期门诊就诊的健康体检者 50 例作为对照组。男性 31 例 (62.0%)，女性 19 例 (38.0%)，年龄 22 ~ 49 (24 ± 5.8) 岁。两组一般资料年龄、性别等比较，差异无统计学意义 ($t=3.51$, $\chi^2=12.11$, 均 $P>0.05$)。本研究经我院伦理委员会批准，所有研究对象对本研究知情同意，并签署知情同意书。入组肺结核患者进行常规抗结核治疗，定期来院领药或者电话随访，随访截止日期以 2023 年 2 月止。

1.2 仪器与试剂 运用 Trizol 法进行 NOD1 总 RNA 的提取，RT-PCR 反应体系 (南京诺唯赞生物科技有限公司)。实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 上下游引物由上海生工生物工程有限公司合成，各细胞因子检测试剂盒 (上海语纯生物科技有限公司)。荧光定量 PCR 扩增仪 (西安天隆科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本收集：所有研究对象空腹采集静脉血两管，1 管采集于 EDTA-K₂ 抗凝管中，并于采集后尽早进行单个核细胞分离，NOD1 总 RNA 的提取。另一管则采集于非抗凝黄头管中，3 000r/min 离心 10min，分离的血清置于 -80℃ 以下保存。肺结核组收集抗结核治疗前、抗结核治疗 3 个月和治疗 6 个月的标本。

1.3.2 外周血单个核细胞分离：将全血使用 PBS 稀释混匀后，在一次性无菌离心管中加入含有与血液相同体积的淋巴细胞分离液，室温 2 000 r/min 离心 20 min 后，弃上清，离心结束后整个体系分为肉眼可见的 4 层，上层为血浆和血小板成分，中层为分

离液，上层和中层界面之间是外周血单个核细胞为主的白膜层成分，最下层为白细胞和红细胞成分。使用加样枪小心缓慢吸取白膜层细胞，再用 PBS 冲洗 2 遍，收集细胞沉淀物。

1.3.3 总 RNA 的提取：采用 Trizol 法提取外周血单个核细胞总 RNA，在所提取的单个核细胞中加入 500 μ l Trizol 裂解液，按照说明书步骤进行总 RNA 的提取，最后室温干燥晾干，加入无 Rnase 的水溶解 RNA，放 -80℃ 保存备用。

1.3.4 cDNA 的逆转录：利用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA，严格按照试剂说明书进行。逆转录反应体系：RNase-free dd H₂O 16 μ l, 4 \times g DNA wiper Mix 4 μ l, 模板 RNA 2 μ l, 移液器吹打混匀，42℃ 2min，后取反应液 16 μ l，加入 4 μ l 的 5 \times HIScript III qRT superMix 混匀后上机进行逆转录反应，逆转录反应参数，37℃ 15min，85℃ 5s。

1.3.5 实时荧光定量 qPCR：以产物 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增。设计选择 NOD1 引物，引物参数见表 1。qPCR 体系包括：2 \times Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ l, Primer1 (10 μ mol/L) 0.5 μ l, Primer2 (10 μ mol/L) 0.5 μ l, 模板 cDNA 2 μ l, ddH₂O 7 μ l 混匀离心后，进行 qPCR 反应，反应参数：预变性 95℃ 30s，一个循环。95℃ 5s，60℃ 10s 40 个循环，降温 95℃ 15s，60℃ 60s，95℃ 15s 1 个循环。目的基因设置空白对照。上述实验设置三个平行实验，取 Ct 值均值。Ct 值与加入的 cDNA 模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，加入的起始模板浓度越高，Ct 值越小，起始模板浓度越低，Ct 值越大。根据目的基因的相对定量结果，以 GAPDH 内参基因对目的基因进行标化，在 Excel 表中采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析 NOD1 在各组间的相对表达情况。

表 1 NOD1 引物参数列表

Lot No	Oligo Name	Sequence	Length	Tm	GC%	M.W.
2602379330	NOD1-F	5'-AGCTGAAGATGAATTTGGGAAA-3'	22	51.6	36.4	6 871.6
2602379331	NOD1-R	5'-GCCGAGAAGTAGTCATTCTTCAG-3'	23	55.1	47.8	7 063.7

1.3.6 ELSIA 方法检测血清 Th1/Th2, Th17/Treg 细胞因子 IFN- γ , IL-4, IL-10 和 IL-17 的表达水平：具体实验步骤按照试剂说明书进行，酶标检测仪在 450nm 波长下测定吸光度值 (A)，绘制标准曲线，在 Excel 表中，横坐标为标准品浓度，纵坐标为对应 A 值，绘制标准品线性回归曲线，根据测得样本 A 值，在标准曲线中计算样本浓度。

1.4 统计学分析 运用 Spss26.0 软件进行数据处理。所得数据计量资料首先进行正态分布检验，符合正态分布检验后采用两独立样本 t 检验，计量资

料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。非正态分布数据采用秩和检验，计量资料以中位数 (四分位数 [$M(P_{25} \sim P_{75})$]) 表示。多组间的比较采用单因素方差分析比较。采用 Pearson 相关性分析，多因素 COX 回归分析影响肺结核患者短期预后的危险因素。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组检测指标比较 见表 2。采用 RT-qPCR 检测 NOD1 的表达水平，ELISA 法检测细胞因子 IFN- γ , IL-4, IL-10 和 IL-17 的表达水平。NOD1，

IFN- γ 和 IL-17 水平在肺结核组均低于对照组；具有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）。
IL-4 和 IL-10 水平在肺结核组均高于对照组，差异

表 2 两组检测指标比较 [$\bar{x} \pm s$, M (P₂₅ ~ P₇₅)]

项 目	对照组	肺结核组 (治疗前)	t/U 值	P 值
NOD1	0.95 \pm 0.44	10.87 \pm 5.29	44.86	<0.05
IFN- γ (pg/ml)	5.40 \pm 0.36	3.91 \pm 0.52	16.58	<0.05
IL-4 (pg/ml)	10.44 \pm 0.59	17.23 \pm 4.77	-9.97	<0.05
IL-10 (pg/ml)	24.17 \pm 2.88	29.17 \pm 2.07	-9.89	<0.05
IL-17 (pg/ml)	33.35 (29.77 ~ 35.10)	28.93 (27.57 ~ 31.03)	-5.79	<0.05

2.2 肺结核组抗结核治疗前后各指标比较 见表 3。观察规范抗结核治疗后的 3 个月及 6 个月与治疗前相比较指标的差异。结果显示，与治疗前相比，NOD1，IL-4，IL-10 治疗 3 个月和 6 个月表达水平显著下降，差异均有统计学意义（ $t = -17.03, 2.46, 5.51, -26.51, 9.47, 10.13$ ，均 $P < 0.05$ ）。治疗前相比，

IL-17，FN- γ 治疗 3 个月和 6 个月的表达水平显著升高，差异均有统计学意义（ $t = -5.28, -3.45, -13.81, -4.34$ ，均 $P < 0.05$ ）。所有病例接受抗结核治疗后效果良好，治疗 6 个月后与健康对照组比较，差异均无统计学意义（ $t = -1.01, -0.83, 1.73, -1.24$ ，均 $P > 0.05$ ）。

表 3 肺结核组抗结核治疗前后各指标比较 [$\bar{x} \pm s$, M (P₂₅ ~ P₇₅)]

项 目	治疗前	治疗 3 个月	治疗 6 个月	F	P
NOD1	0.87 \pm 5.29	6.11 \pm 3.91	1.06 \pm 0.96	-17.03	<0.05
IFN- γ (pg/ml)	3.91 \pm 0.52	4.45 \pm 0.51	5.32 \pm 0.51	-5.28	<0.05
IL-4 (pg/ml)	17.23 \pm 4.77	15.20 \pm 3.39	10.72 \pm 0.94	2.46	<0.05
IL-10 (pg/ml)	29.17 \pm 2.07	26.36 \pm 2.70	24.12 \pm 2.68	5.51	<0.05
IL-17 (pg/ml)	28.93 (27.57 ~ 31.03)	29.67 \pm 3.65	31.52 \pm 5.03	-3.41	<0.05

2.3 NOD1 表达与细胞因子 IFN- γ ，IL-4，IL-10 和 IL-17 相关性比较 Pearson 相关性分析表明，NOD1 水平与 IFN- γ ，IL-10 水平呈正相关（ $r = 0.514, 0.421$ ），与 IL-4 水平呈负相关（ $r = -0.363$ ），差异具有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）；与 IL-17 水平无明显相关性（ $r = 0.125, P > 0.05$ ）。

2.4 NOD1 及 Th1/Th2/Treg/Th17 细胞因子对肺结

核患者的短期预后研究 见表 4。多因素 COX 回归分析影响肺结核患者短期预后的危险因素，以肺结核患者短期预后状态为应变量，赋值 1=治愈，0=未治愈。以年龄、性别、NOD1，IFN- γ ，IL-4，IL-10，IL-17 为协变量。COX 回归分析表明：NOD1mRNA 的表达 ≥ 10.87 ，IFN- $\gamma \geq 3.90$ pg/ml 是影响肺结核患者短期预后的危险因素。

表 4 多因素 COX 回归分析影响肺结核短期预后的危险因素

指标 / 因素	赋值	回归系数	标准误差	Wald χ^2	P	95% 置信区间
NOD1mRNA 表达	1= ≤ 10.87 , 0= > 10.87	-0.923	0.449	4.224	0.040	0.165 ~ 0.958
IFN- γ (pg/ml)	1= ≥ 3.90 , 0= < 3.90	0.820	0.395	4.308	0.038	1.047 ~ 4.925
IL-4 (pg/ml)	1= ≥ 16.90 , 0= < 16.90	0.857	0.457	3.525	0.060	0.963 ~ 5.770
IL-10 (pg/ml)	1= ≥ 29.04 , 0= < 29.04	0.554	0.380	2.119	0.146	0.825 ~ 3.666
IL-17 (pg/ml)	1= ≥ 26.02 , 0= < 26.02	-0.199	0.330	0.366	0.545	0.429 ~ 1.563
年龄 (岁)	1= ≥ 40 , 0= < 40	0.584	0.342	2.915	0.088	0.917 ~ 3.506
性别	1= 男, 0= 女	-0.363	0.36	1.013	0.314	0.343 ~ 1.410

3 讨论

肺结核 (TB) 是世界范围内最重要的传染病。2022 年 10 月 27 日，WHO 发布了最新的《2022 年全球结核病报告》^[8]，2021 年全世界有新发肺结核患者 1 060 万例，肺结核发病率上升了 3.6%。控制结核病感染仍然是发展中国家的主要任务。目前临

床研究发现肺结核患者治疗的周期长、效果慢、费用高，患者经治愈后易复发，且容易导致药物对结核分枝杆菌产生耐药性^[9]。在肺结核的发病机制中，适应性免疫在原发性肺结核及其再激活中发挥着关键作用，结核分枝杆菌活动性感染可引起高度反应性的免疫应答，产生特异性或非特异性的细胞因子

以根除感染^[10]。在所评价的细胞因子中, IFN- γ 和 TNF- α 是控制结核分枝杆菌感染的关键, 它们有助于先天性免疫细胞如单核细胞和粒细胞的募集和活化以及 T 淋巴细胞的细胞毒活性的激活。各细胞因子水平之间的平衡对于解决结核分枝杆菌感染或结核病进展至关重要。有证据表明, 促炎环境中 Th2 应答的激活导致细菌增殖和疾病进展^[11-12], Th1 免疫反应诱导巨噬细胞抗微生物活性的激活^[13]。细胞因子产生的缺陷被认为是结核分枝杆菌感染和结核病进展的危险因素^[14]。并且结核分枝杆菌可以操纵宿主的免疫系统, 调节抗原的加工, 造成效应免疫反应的不平衡, 均与细胞因子的产生有关^[15]。

此外, 结核分枝杆菌部分可通过调节改变 Th 细胞的平衡来逃避宿主的免疫应答^[16]。正常情况下, Th1/Th2 细胞相互调节, 维持免疫系统正常运转, 其中 Th1 可介导细胞免疫, 清除病原体并诱使免疫细胞浸润, 而 Th2 分泌 IL-4, IL-10 等细胞因子介导体液免疫, 能够清除抗原并发挥抗过敏作用^[3]。李奇凤等^[17]研究发现结核病患者体内 Th1 细胞、Th2 细胞免疫应答情况, 结果显示结核病患者 Th1 细胞含量下降, Th2 细胞含量升高, Th1/Th2 细胞比例失衡, 提示异常增高的 Th2 以及 Th1 细胞被抑制, 无法对机体起到保护性作用, 导致了结核病的进展。Th17 及 Treg 细胞是近年来发现的新型免疫细胞, 两者相互抑制。其中 Th17 是一种以分泌 IL-17, IL-22 等细胞因子为主的 T 细胞亚群, 能够诱导多种前炎症细胞因子和趋化因子的产生。而 Treg 细胞则能够分泌 TGF- β , IL-10 等细胞因子发挥免疫抑制作用^[18]。有学者发现, 肺结核患者 Th17 细胞数量和 IL-17 的表达降低, Treg 细胞数量和 IL-10 的表达升高, 且这种趋势与肺结核患者病灶数目、直径总和以及空洞形成密切相关^[19]。武忠长^[20]研究证实了肺结核患者 Th17 细胞表达率降低, Treg 细胞表达率升高, 经 6 个月抗结核治疗后 Th17/Treg 比值明显高于治疗前, 提示 Th17/Treg 的平衡状态能够影响肺结核病理过程。肺结核患者的 Th17 细胞比例降低, Th2 和 Treg 细胞比例升高, 可能与 Th17 细胞减少有关^[21]。在一项巴西亚马逊人群中肺结核和肺外结核患者的流行病学和细胞因子特征研究中结果显示^[22], 不同临床类型肺结核患者血清 IFN- γ 水平的 AUC 值较高, 提示 IFN- γ 水平有助于肺结核与肺外结核的鉴别诊断, 促炎细胞因子和抗炎细胞因子水平的失调是结核病发生的危险因素。

LEE 等^[4]研究认为 NOD1 基因多态性与不同人群的结核病易感性存在相关性。NOD1 广泛表达其水平在免疫细胞、胃肠道和脂肪组织中更为丰富^[23]。

代谢紊乱患者的脂肪细胞和免疫细胞中 NOD1 基因表达增加^[24]。WANG 等^[25]通过化学酶法合成了结核分枝杆菌包膜中的一系列肽聚糖片段, 发现这些肽聚糖片段能够通过激活 NOD1 进而刺激机体的免疫系统。同时, 有临床研究检测证实了活动性肺结核患者外周血 NOD1mRNA 水平显著高于潜伏性结核患者和健康体检者, 并且在抗结核治疗三个月后 NOD1mRNA 水平显著降低, 在接受 6 个月抗结核治疗后 NOD1mRNA 水平已下降至正常水平^[6]。以上研究提示 NOD1 与结核病进展密切相关, 并且其作用机制可能与调节免疫功能有关。在 T 细胞介导的细胞免疫方面, SUAREZ 等^[26]研究发现, 鉴于 NOD1 在免疫细胞中高水平表达, 研究 NOD1 在免疫细胞浸润和巨噬细胞极化中的作用是有意义的。DENG 等^[27]将外周血单个核细胞与树突状细胞共培养, 结果发现树突状细胞中 NOD1 和 NOD2 的激活可诱导外周血单个核细胞中促炎细胞因子的产生和分泌, 并且促进了 CD4⁺T 细胞的分化和增殖, 提示 NOD1 表达水平在调节 Th1/Th2, Th17/Treg 平衡中可能扮演了重要角色。NOD1 或 NOD2 的配体可能是有前景的候选配体, 因为激活 NOD1 和 NOD2 可有效诱导 Th1 应答^[28-30], 并且 NOD1 和 NOD2 的激活诱导的识别成分来源于肠道细菌导致促炎和 I 型干扰素反应^[31]。本研究通过 RT-qPCR 法检测两组研究对象的 NOD1mRNA 水平, 发现在肺结核病例中 NOD1mRNA 的表达升高。Th1, Th17 细胞含量下降, 而 Th2, Treg 细胞含量上升, Th1/Th2 的平衡由 Th1 向 Th2 方向偏移, Th17/Treg 的平衡由 Th17 向 Treg 偏移。因此, Th1, Th17 细胞被抑制, Th2, Treg 细胞被增强, 对结核感染的免疫应答产生一定影响, 并最终造成结核病的进展。本文研究结果与邢志伟等^[6]研究结果一致, NOD1 的 mRNA 的变化与疾病的治疗进展有关。

进一步运用 Pearson 相关性分析结果表明, NOD1 mRNA 水平与 IFN- γ , IL-10 水平呈正相关, 与 IL-4 水平呈负相关, 与 IL-17 水平无明显相关性, 通过相关性分析 NOD1 可能通过调节 Th1/Th2, Treg/Th17 的平衡参与肺结核患者细胞免疫进展过程。NOD1 mRNA 表达与 IL-17 无相关性可能与 TB 感染患者的 Th17 细胞水平降低, 与其程序性细胞死亡有关^[22]。在国外, SAINI 等^[32]通过 qPCR 比对了皮肤结核组和健康对照组中 FOXP3 和 IL-17, TGF- β 的基因表达水平, 发现 FOXP3 与 TGF- β 呈显著正相关, 而 IL-17 与 FOXP3 没有任何相关性, 推测认为 Th17/Treg 的平衡分化取决于 IL-6, IL-1 和 TGF- β 的平衡。在 NOD1 及 Th1/Th2, Treg/Th17 细胞因子对肺结核患者的短期预后

的危险因素中发现, NOD1 mRNA 和 IFN- γ 的表达增加是影响肺结核患者短期预后的危险因素。二者有望成为预测肺结核患者短期预后的标志物。

综上所述, 本文研究分析健康体检者以及肺结核患者治疗前后 NOD1 mRNA 以及 Th1/Th2, Th17/Treg 细胞因子表达水平, 明确 NOD1 的表达与 Th1/Th2, Treg/Th17 的平衡具有相关性, 在肺结核患者治疗前后, 细胞因子指标变化或许和 NOD1 的表达有关, 但引起这种变化的确切机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] ZHOU Jie, LÜ Jingzhu, CARLSON C, et al. Trained immunity contributes to the prevention of *Mycobacterium tuberculosis* infection, a novel role of autophagy [J]. *Emerging Microbes Infections*, 2021, 10(1):578-588.
- [2] 肖红亮, 郭述良. 浅析肺结核介入诊疗现状及进展 [J]. *临床肺科杂志*, 2018, 23(10):1891-1898.
XIAO Hongliang, GUO Shuliang. Analysis of the current situation and progress of interventional diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis [J]. *Journal of Clinical Pulmonary Medicine*, 2018, 23(10):1891-1898.
- [3] 王少华, 杨翰, 李爱芳, 等. 三种实验方法检测胸腔积液对结核性胸膜炎的诊断价值分析 [J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(3):104-108.
WANG Shaohua, YANG Han, LI Aifang, et al. Diagnostic value of three detection methods of hydrothorax for tuberculous pleurisy [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(3):104-108.
- [4] LEE J Y, HWANG E H, KIM D J, et al. The role of nucleotide-binding oligomerization domain 1 during cytokine production by macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Immunobiology*, 2016, 221(1):70-75.
- [5] WANG Qian, MATSUO Y, PRADIPTA A R, et al. Synthesis of characteristic *Mycobacterium* peptidoglycan (PGN) fragments utilizing with chemoenzymatic preparation of meso-diaminopimelic acid (DAP), and their modulation of innate immune responses [J]. *Organic Biomolecular Chemistry*, 2016, 14(3):1013-1023.
- [6] 邢志伟, 孙红梅, 于慧敏, 等. 固有免疫受体 NOD1 和 NOD2 在肺结核中的诊断价值 [J]. *医学动物防制*, 2020, 36(8):735-738, 742.
XING Zhiwei, SUN Hongmei, YU Huimin, et al. Diagnostic value of innate immune receptor NOD1 and NOD2 in pulmonary tuberculosis [J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2020, 36(8): 735-738, 742.
- [7] 梁津, 刘轻彬, 梁成员, 等. 初诊活动性肺结核患者血浆 IL-6, IL-17, IL-37 及 TIM-3 水平表达及其临床意义 [J]. *现代检验医学杂志*, 2021, 36(6): 179-182.
LIANG Jin, LIU Zhibin, LIANG Chengyuan, et al. Expression and clinical significance of plasma IL-6, IL-17, IL-37 and TIM-3 in patients with newly diagnosed active pulmonary tuberculosis [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2021, 36(2): 179-182.
- [8] World Health Organization. GLOBAL Tuberculosis report [EB/OL]. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/TB-reports/global-tuberculosis-report-2022>. (accessed on 13 February 2023).
- [9] 黄惠珍. 我国肺结核流行的主要危险因素及干预措施研究进展 [J]. *中外医学研究*, 2017, 15(11):162-164.
HUANG Huizhen. Research progress on main risk factors and intervention measures of tuberculosis epidemic in China [J]. *Chinese and Foreign Medical Research*, 2017, 15 (11): 162-164.
- [10] ARRIGUCCI R, LAKEHAL K, VIR P, et al. Active tuberculosis is characterized by highly differentiated effector memory Th1 cells [J]. *Frontiers Immunology*, 2018, 9, 2127.
- [11] CLIFFORD V, TEBRUEGGE M, ZUFFEREY C, et al. Cytokine biomarkers for the diagnosis of tuberculosis infection and disease in adults in a low prevalence setting [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2019, 114: 91-102.
- [12] POORAN A, DAVIDS M, NEL A, et al. IL-4 subverts mycobacterial containment in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages [J]. *European Respiratory Journal*, 2019, 54(2): 1802242.
- [13] GHANAVI J, FARNIA P, FARNIA P, et al. The role of interferon-gamma and interferon-gamma receptor in tuberculosis and nontuberculous *Mycobacterial* infections [J]. *International Journal of Mycobacteriology*, 2021, 10(4): 349-357.
- [14] CHAI Qiya, WANG Lin, LIU Cuihua, et al. New insights into the evasion of host innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2020, 17(9):901-913.
- [15] DLAMINI Z, ALAOUNA M, CHOLO M C, et al. Is targeting dysregulation in apoptosis splice variants in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) host interactions and splicing factors resulting in immune evasion by MTB strategies a possibility? [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2020, 124, 101964.
- [16] AHMAD S, BHATTACHARYA D, KAR S, et al. Curcumin nanoparticles enhance *Mycobacterium bovis* BCG vaccine efficacy by modulating host immune responses [J]. *Infection and Immunity*, 2019, 87(11): e00291-19.
- [17] 李奇凤, 赵晶, 余亮, 等. Notch1 表达水平与肺结核患者外周血 Th1/Th2 比例的相关性 [J]. *热带医学杂志*, 2018, 18(6): 729-732.
LI Qifeng, ZHAO Jing, YU Liang, et al. The correlation between Notch1 expression and Th1/Th2 ratio in tuberculosis patients [J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2018, 18 (6): 729-732.
- [18] 夏清, 薛珉, 张亚娟, 等. 哮喘-慢阻肺重叠综合征患者外周血 Th17 和 Treg 细胞水平表达与肺功能的关系研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2020, 35(2): 104-107.
XIA Qing, XUE Min, ZHANG Yajuan, et al. Study on the relationship between the expression of Th17

- and Treg cells in peripheral blood and lung function in patients with asthma-COPD overlap syndrome [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(2): 104-107.
- [19] 李沛军, 莫晨玲, 马秀珍. 肺结核患者外周血 Th17/Treg 的表达及其病理意义 [J]. 现代免疫学, 2020, 40(5): 408-411.
- LI Peijun, MO Chenling, MA Xiuzhen. Peripheral blood Th17/Treg ratio in patients with pulmonary tuberculosis and its pathological significance [J]. Current Immunology, 2020, 40 (5): 408-411.
- [20] 武忠长. 抗结核治疗对肺结核患者 Th17/Treg 的影响 [J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(11): 2101-2104.
- WU Zhongchang. Effect of anti-tuberculosis therapy on the balance state of Th17 cells and regulatory T cells in patients with tuberculosis [J]. Journal of clinical Pulmonary Medicine, 2016, 21(11):2101-2104.
- [21] TURNER J, GONZALEZ-JUARRERO M, ELLIS D L, et al. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice [J]. Journal Immunology, 2022, 169(11): 6343-6351.
- [22] QUEIROZ M A F, LIMA S S, AMORAS E D S G, et al. Epidemiological and cytokine profile of patients with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in a population of the Brazilian Amazon [J]. Microorganisms, 2022, 10(10): 2075.
- [23] SHARMA A, MAURYA CK, ARHA D, et al. Nod1-mediated lipolysis promotes diacylglycerol accumulation and successive inflammation via PKC δ - IRAK axis in adipocytes [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2019, 1865(1):136-146.
- [24] CHAN K L, TAM T H, BOROUMAND P, et al. Circulating NOD1 activators and hematopoietic NOD1 contribute to metabolic inflammation and insulin resistance [J]. Cell Reports, 2017, 18(10): 2415-2426.
- [25] WANG Qianqian, MATSUO Y, PRADIPTA A R, et al. Synthesis of characteristic Mycobacterium peptidoglycan (PGN) fragments utilizing with chemoenzymatic preparation of meso-diaminopimelic acid (DAP), and their modulation of innate immune responses [J]. Organic Biomolecular Chemistry, 2016, 14(3):1013-1023.
- [26] SUAREZ G, ROMERO-GALLO J, PIAZUELO M B, et al. Nod1 imprints inflammatory and carcinogenic responses toward the gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. Cancer Research, 2019, 79(7):1600-1611.
- [27] DENG B, YE Z, LI L, et al. Higher expression of NOD1 and NOD2 is associated with vogt-koyanagi-harada (VKH) syndrome but not Behcet's Disease (BD) [J]. Current Molecular Medicine, 2016, 16(4):424-435.
- [28] BICKETT T E, MCLEAN J, CREISSEN E, et al. Characterizing the BCG induced macrophage and neutrophil mechanisms for defense against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Frontiers Immunology, 2020, 11: 1202.
- [29] MA Xiaomin, QIU Yumin, ZHU Lihui, et al. NOD1 inhibits proliferation and enhances response to chemotherapy via suppressing SRC-MAPK pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Molecular Medicine, 2020, 98(2):221-232.
- [30] TRINDADE B C, CHEN G Y. NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases [J]. Immunological Reviews, 2020, 297(1): 139-161.
- [31] HUANG Shunmei, WU Jun, GAO Xiaoyan, et al. LSECs express functional NOD1 receptors: A role for NOD1 in LSEC maturation-induced T cell immunity in vitro [J]. Molecular Immunology, 2018, 101: 167-175.
- [32] SAINI C, KUMAR P, TARIQUE M, et al. Regulatory T cells antagonize proinflammatory response of IL-17 during cutaneous tuberculosis [J]. Journal of Inflammation Research, 2018, 11:377-388.
- 收稿日期: 2023-03-15
修回日期: 2023-10-09

(上接第18页)

- [21] LI Jia, MACDONALD J, VON STETTEN F. Correction: review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification [J]. The Analyst, 2020, 145(5): 1950-1960.
- [22] FAN Xiaoxu, LI Lin, ZHAO Yonggang, et al. Clinical validation of two recombinase-based isothermal amplification assays (RPA/RAA) for the rapid detection of african swine fever virus [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1696.
- [23] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [24] LIN Hongqing, LIANG Yuanhao, ZOU Lirong, et al. Combination of isothermal recombinase-aided amplification and CRISPR-Cas12a-mediated assay for rapid detection of major severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 variants of concern [J]. Frontiers Microbiology, 2022, 13: 945133.
- [25] CUI Huan, TU Fei, ZHANG Cheng, et al. Real-Time reverse transcription recombinase-aided amplification assay for rapid amplification of the N gene of SARS-CoV-2 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 15269.
- [26] GHOSH P, CHOWDHURY R, HOSSAIN M E, et al. Evaluation of recombinase-based isothermal amplification assays for point-of-need detection of SARS-CoV-2 in resource-limited settings [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2022, 114: 105-111.
- 收稿日期: 2023-05-25
修回日期: 2023-07-18