

结核病治疗疗效评定进展

桂徐蔚 沙巍

【关键词】 结核病； 疗效评定； 研究进展

结核病是全球第九大致死疾病。2016 年约有 1 040 万新发病例和 167 万因结核死亡病例,最新数据显示结核病的全球治疗成功率为 83%。尽管结核病已经得到有效的治疗和控制,但结核病的诊治过程中仍有很多困扰临床医生的问题,其中比较重要的一项就是缺乏快速准确的疗效评定指标。目前我国肺结核病的治疗效果主要从以下 3 个方面进行评估:临床症状是否改善;胸部 X 线或 CT 检查显示病灶吸收的程度;痰液涂片和培养阴转情况。但这 3 个方面的考量均存在不足之处,如患者症状的表述主观性较强、胸部 X 线或 CT 检查结果受拍片质量及阅片人员经验的影响等。且随着抗结核治疗的进行,患者痰液数量和质量均明显下降,部分患者治疗数周后甚至无痰液可送检,且痰培养耗时较长,无法及时提供结果。由此可见,现有的疗效评定指标不足以准确快速反映结核病治疗的效果。

理想的疗效学生物学标志物应具有以下特点:(1)精确:新的指标必须能精准描述患者的疾病状态,在治疗前可以评估疾病的严重程度,在治疗过程中可以准确地评定治疗效果,指导医生实施个体化方案,并指示是否痊愈;(2)采集方法便捷,对患者的损伤小,不需要侵入性技术便可获得样本;(3)检测技术易操作,获得结果迅速。目前评定疗效的新指标包括以检测样本中结核分枝杆菌(MTB)变化的微生物学相关指标,以及基于宿主自身各种指标变化的生物学指标,本文现对近几年发展的与疗效评定相关的新技术及研究进行综述。

一、基于 MTB 的生物标志物

1. 细菌学染色技术

细菌学检测是结核病诊断和治疗后痊愈的“金标准”,显微镜下痰抗酸杆菌涂片阴性是评定抗结核治疗有效的重要依据,但是镜检抗酸染色涂片敏感性较

低,且无法区分死菌和活菌,尤其是一些肺部有空洞坏死的结核病患者可能长期涂片阳性,即使排出的可能是死菌,但因无法鉴定可能导致无谓的疗程延长。荧光素二乙酸酯能被代谢活跃的 MTB 所分泌的乙酰酯酶水解,可作为 MTB 活菌的染色剂,再通过发光二极管荧光显微镜对 MTB 进行定量。Schramm 等^[1]用荧光素二乙酸酯作为荧光活性标记物,对 288 份痰标本进行检测,并与痰培养结果进行对照,发现其检测痰中活菌的敏感性为 83.7%,特异性为 66.1%,阳性预测值为 35.0%,阴性预测值为 94.8%,虽然其特异性不够理想,但其阴性预测值 >90%,意味着可以采用这种方法准确排除治疗失败的患者。MTB 染色的方法不能用于痰涂片阴性的患者,因此限制了其在临床的推广。

2. MTB 产物的检测

MTB 在宿主体内繁殖时,会产生一些菌体特异性的成分,随着治疗的进展,菌体死亡及裂解后这些成分会发生变化,检测样本中这些成分的含量可能对疗效评估有一定价值。早在上个世纪,Wallis 等^[2]对结核病患者痰中的 Ag85 抗原进行追踪,发现 Ag85 抗原在 2 周内下降至 <60 pg/ml 的患者均痊愈,而在 Ag85 抗原 >60 pg/ml 的患者中,33% 在 90 天后未转阴,17% 最终治疗失败。但是痰液中 MTB 特异性抗原检测的灵敏度并不理想,此后类似研究较少,因此业内将视线转向其他产物。脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)是 MTB 细胞壁上的重要糖脂,已发现尿液中 LAM 的检测可以用于诊断肺结核,抗结核治疗后尿液中 LAM 含量的变化是否可作为疗效的评定指标,已有一些研究初步评定了其价值,尤其是对 HIV 感染合并结核病的患者有一定的监测疗效的功能,但仍需要更多的数据支持。

3. 分子生物学检测

分子生物学检测 MTB DNA 的技术近年发展非常迅速,以 GeneXpert[®] MTB/RIF 为代表的检测手段为临床早期诊断结核病提供了有力支撑,但是由于其同样无法鉴别死菌和活菌而不能用于疗效评定。目前有研究尝试用特殊的试剂来增加活菌 PCR 扩增的特异性。叠氮溴化丙锭(PMA)是具有高亲和力的光敏反应

DNA 结合染料,染料自身的荧光非常微弱,但是结合核酸后荧光信号很强。PMA 不能通透细胞膜,因此只能选择性地修饰死亡细胞“暴露”的 DNA。这一特性使其可以和定量 RT-PCR 联合使用,进行选择性的扩增活细胞 DNA。Kim 等^[3]采用 PMA 处理 MTB 菌株和加入灭活株,发现灭活后 RT-PCR 的信号明显增高,而活菌几乎无变化;Nikolayevskyy 等^[4]对 310 例活动性结核患者的 1 937 份痰液标本进行处理,得出类似结论,提示该试剂可联合定量 PCR 对结核病患者治疗后的疗效进行判定。

二、影像学技术

胸部 X 线检查对肺结核的诊断有较好的敏感性,但特异性较差。CT 检查诊断结核病的敏感性及特异性均优于胸部 X 线检查,但判断治疗过程中疗效的主观性过强。现代影像技术的飞速发展使影像学检查在结核病疗效监测方面有一定进展,正电子发射计算机断层显像(PET)/CT 的优势尤其明显。MTB 在肺部的感染通常会增加¹⁸F-脱氧葡萄糖(FDG)摄取,Agarwal 等^[5]发现经过有效的抗结核治疗后,¹⁸F-FDG 摄取量明显下降,Jeong 等^[6]认为若肺部病灶最大标准摄取值(SUV_{max})≥1.5,提示肺结核还未有效控制,仍需进行治疗。Lin 等^[7]在对动物模型的研究中发现 PET/CT 能够在有效的抗结核治疗 1~2 个月后清楚地显示出食蟹猴肺部单个结核性肉芽肿结节及纵隔淋巴结对¹⁸F-FDG 的摄取量均明显下降,提示 PET/CT 可以成为人体不同部位结核病变疗效评价的一种较敏感的方法。虽然¹⁸F-FDG-PET 和 PET/CT 有助于监测结核病治疗效果,但由于其费用较高,限制了其在临床的应用,特别是在结核病高负担国家,PET/CT 作为一种疗效检测的手段在短期内只能是一种奢望。

三、基于宿主的生物标志物

在抗结核治疗过程中,患者(宿主)-MTB(病原体)的相互作用是一个极其复杂的动态过程,由信号通路的细微和局部差异驱动,导致每位患者的病变轨迹不同,因而治疗效果也各不相同,使用常规的监测手段可能无法检测。随着转录组学、基因组学、蛋白组学和代谢组学等各种组学技术的发展,发现新的结核病诊断和疗效评估的宿主生物学指标已成为研究热门。

1. 免疫和炎症相关指标

Sigal 等^[8]对 319 例 MTB 培养阳性的结核病患者在治疗前和治疗后 8 周的外周血进行与感染相关的 70 个生物标记物(主要是炎症相关因子和细胞因子)进行筛选并观察这些生物标记物的变化,发现其中的

7 种蛋白——血清淀粉样蛋白 A(SAA)、降钙素(PCT)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、C 反应蛋白(CRP)、穿透素 3 (PTX-3) 和基质金属蛋白酶 8(MMP-8)与肺结核病的严重程度、治疗前痰培养阳性的程度是否存在显著相关,说明可以将这些炎症因子作为评估疾病严重程度的指标。经抗结核治疗 8 周后,有许多炎症指标具有统计学意义的变化(大多数降低),最显著的指标为 SAA1 和 CRP,与 8 周痰菌阴转率具有相关性,且疗效不佳患者(痰菌未阴转和仍有咳嗽)与疗效较好患者之间有显著差异,提示可以将这些指标作为判定结核病疗效的指标。但 SAA1 和 CRP 并非结核病特异性的炎症指标,且该研究缺乏远期的观察结果,因此炎症因子和细胞因子是否能在结核病治疗过程中精确评估疗效和预后有待于进一步考证。

结核病作为一种无内、外毒素的胞内生长菌,其致病机制是机体和宿主之间复杂的免疫反应失衡,因此理论上机体免疫相关指标的变化最能反映出 MTB 在体内的存活情况。机体抗结核免疫最重要的效应分子是 γ -干扰素(IFN- γ)和 IL-2,早在 2007 年,Millington 等^[9]对治疗前后结核病患者 T 淋巴细胞分泌的结核抗原特异性的 IFN- γ 和 IL-2 的动态变化进行观察,发现治疗后 IFN- γ 水平逐渐降低,IL-2 水平逐渐升高,其中 IFN- γ 阳性的 T 淋巴细胞数量的年递减率达 5.8%。结核病患者治疗前以 IFN- γ 阳性为主,治疗后逐渐转化为 IFN- γ 和 IL-2 双阳性,进而转化为 IL-2 单阳性,提示淋巴细胞功能在治疗过程中发生了变化,提示免疫相关指标可作为结核病疗效评估的重要部分。

2. 转录组学研究

直接检测宿主的免疫功能和炎症因子可能对于疗效评定尚不够敏感,且干扰因素较多,而转录组学可通过高通量的检测技术,从基因转录水平来阐述结核病发病和治疗后机体抗结核机制的相关改变。Berry 等^[10]通过监测血液中 IFN 诱导的相关基因表达来评定活动性肺结核患者的治疗效果,发现罹患肺结核后患者血液中 IFN 诱导基因表达大量增加,经过 2 周治疗后,这些基因表达明显减少,而治疗 12 个月后 IFN 诱导基因表达基本消失,且这些基因的减少和消失与患者临床症状的改善及胸部 X 线片的吸收呈正相关。Jayakumar 等^[11]研究发现活动性肺结核患者的 T 和 B 淋巴细胞相关基因转录水平在整个治疗过程中变化持续而缓慢,经过 2 个月抗结核治疗后,患病初期减少的 T 和 B 淋巴细胞相关基因表达逐步恢复,治疗 12 个月后恢复最为明显。Cliff 等^[12]则发现 MTB 感染 1 周内显性补体 C1q 基因表达快速下调,Ottenhoff 等^[13]在对印度尼西亚患者的研究中也观察到在治疗 8 周和治

疗结束后患者血液中的基因表达出现变化,健康志愿者血液中的基因表达和患者治疗结束时的表达类似。上述发现提示遴选出血液中与结核病治疗效果紧密相关的转录基因并优化组合将可能取代相对不易取得的痰液或灌洗液标本,对治疗效果作出客观准确的评价。

3. 代谢组学

代谢组学是研究生物体系(细胞、组织或生物体)受外部刺激所产生的所有代谢产物变化的科学,关注的对象是分子量 < 1 000 kDa 的小分子化合物。MTB 生长时会消耗能量,并产生一系列小分子化合物;结核病作为一种慢性消耗性疾病,在长期与宿主的免疫系统相互作用后,宿主会出现代谢异常,可能会影响外周代谢小分子的含量,因此可以通过代谢组学检测代谢物的变化并从中筛选具有诊断价值的生物标志物。其研究对样本要求简单,且所得到的信息量大,已被广泛应用于结核病新的标志物检测和致病机制,以及机体治疗后动态变化分析等多方面的研究。Zhou 等^[14]通过对患者血液标本的代谢产物检测,揭示了结核病患者与健康者有 17 种小分子化合物有显著差异,其中与蛋白质合成、丙氨酸代谢和苯丙氨酸代谢相关的小分子水平在结核病患者中显著升高,提示宿主的代谢增加。Weiner 等^[15]从代谢物谱图上观察到结核病患者氨基酸类、核酸类和脂质代谢通路发生了变化,患者吡哆胺 2,3-双加氧酶 I 活性显著升高,为结核病代谢组学在结核病疗效监测方面提供了新的思路。

由于尿液易于收集,且无创即可获取,是目前代谢组学疗效评价最常用的标本。Mahapatra 等^[16]使用液相色谱-质谱法(LC-MS)对患者的尿液进行代谢组学研究,对在治疗前和治疗后收集的尿液进行比较,发现治疗后 45 个代谢物有显著差异,而治疗后 2 个月和 6 个月共有 12 个小分子代谢物与治疗前相比有显著差异,认为可将这些化合物作为疗效评定的指标。Das 等^[17]通过对经过一线抗结核病治疗后患者不同时间点的尿液样本代谢组学进行研究,发现治疗后患者尿液的代谢组学具有随治疗时间变化的趋势,治愈患者的代谢特征与无症状的健康对照组相似,表明代谢组学在对结核病的疗效分析均有潜在作用。Luies 等^[18]通过对比治疗成功和治疗失败患者的尿液代谢组学研究发现,3,5-二羟基苯甲酸和 3-(4-羟基-3-甲氧基苯乙酸)丙酸可作为治疗失败的预测因子,而这两个化合物与肠道菌群失调相关。

总之,准确快速评定结核病患者治疗效果是临床医生追求的目标,只有精准判定疗效,患者才能在合适的时机停止治疗,既避免治疗过度,也避免治疗不到位,是每个患者个体化精确治疗的基础,也是降低社会

治疗结核病负担的基础。虽然目前关于评定疗效的新的生物标志物研究正在广泛开展,但是至今还未能发现灵敏性和特异性良好的一个或一组指标,如何优化这些新的生物标志物的组合也是我们面临的难题,需要大量的研究工作进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Schramm B, Hewison C, Bonte L, et al. Field evaluation of a simple fluorescence method for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens during treatment follow-up[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(8): 2788-2790.
- [2] Wallis RS, Perkins M, Phillips M, et al. Induction of the antigen 85 complex of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum: a determinant of outcome in pulmonary tuberculosis treatment[J]. J Infect Dis, 1998, 178(4): 1115-1121.
- [3] Kim YJ, Lee SM, Park BK, et al. Evaluation of propidium monoazide real-time PCR for early detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* in clinical respiratory specimens[J]. Ann Lab Med, 2014, 34(3): 203-209.
- [4] Nikolayevskyy V, Miotto P, Pimkina E, et al. Utility of propidium monoazide viability assay as a biomarker for a tuberculosis disease[J]. Tuberculosis (Edinb), 2015, 95(2): 179-185.
- [5] Agarwal KK, Behera A, Kumar R, et al. (18) F-Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography/Computed Tomography in Tuberculosis: Spectrum of Manifestations[J]. Indian J Nucl Med, 2017, 32(4): 316-321.
- [6] Jeong YJ, Paeng JC, Nam HY, et al. (18) F-FDG positron-emission tomography/ computed tomography findings of radiographic lesions suggesting old healed tuberculosis[J]. J Korean Med Sci, 2014, 29(3): 386-391.
- [7] Lin PL, Coleman T, Carney JP, et al. Radiologic Responses in Cynomolgus Macaques for Assessing Tuberculosis Chemotherapy Regimens [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(9): 4237-4244.
- [8] Sigal GB, Segal MR, Mathew A, et al. Biomarkers of Tuberculosis Severity and Treatment Effect: A Directed Screen of 70 Host Markers in a Randomized Clinical Trial[J]. EBio Medicine, 2017, 25: 112-121.
- [9] Millington KA, Innes JA, Hackforth S, et al. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load[J]. J Immunol, 2007, 178(8): 5217-5226.
- [10] Berry MP, Graham CM, McNab FW, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis [J]. Nature, 2010, 466(7309): 973-977.
- [11] Jayakumar A, Vittinghoff E, Segal MR, et al. Serum biomarkers of treatment response within a randomized clinical trial for pulmonary tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2015, 95(4): 415-420.
- [12] Cliff JM, Lee JS, Constantinou N, et al. Distinct phases of blood gene expression pattern through tuberculosis treatment reflect modulation of the humoral immune response[J]. J Infect Dis, 2013, 207(1): 18-29.
- [13] Ottenhoff TH, Dass RH, Yang N, et al. Genome-wide expression profiling identifies type 1 interferon response pathways in active tuberculosis [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45839.
- [14] Zhou A, Ni J, Xu Z, et al. Application of (1)H NMR spectroscopy-based metabolomics to sera of tuberculosis patients [J]. J Proteome Res, 2013, 12(10): 4642-4649.
- [15] Weiner J 3rd, Parida SK, Maertzdorf J, et al. Biomarkers of inflammation, immunosuppression and stress with active diseases are revealed by metabolomic profiling of tuberculosis patients [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40221.
- [16] Mahapatra S, Hess AM, Johnson JL, et al. A metabolic biosignature of early response to anti-tuberculosis treatment [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14: 53.
- [17] Das MK, Bishwal SC, Das A, et al. Deregulated tyrosine-phenylalanine metabolism in pulmonary tuberculosis patients [J]. J Proteome Res, 2015, 14(4): 1947-1956.
- [18] Luies L, Reenen MV, Ronacher K, et al. Predicting tuberculosis treatment outcome using metabolomics [J]. Biomark Med, 2017, 11(12): 1057-1067.

(收稿日期: 2019-11-07)

(本文编辑: 张一冰)