

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.09.003

❖ 基础研究 ❖

免疫组织化学染色检测肺结核组织中的 Ag85B

方诗宇, 段绍琪, 陈雪倩, 于江, 孙杰, 刘凤君

(川北医学附属医院感染科, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨结核分枝杆菌分泌性抗原 Ag85B 在肺结核组织中的分布特点, 初步分析其在肺结核病理学诊断中的应用价值。**方法:** 收集医院病理科手术切除的肺结核组织标本 19 例, 以非肺结核肺组织 (肺癌切除标本正常组织断端 20 例) 为阴性对照。通过免疫组化检测 Ag85B 的表达情况, 并与抗酸染色进行对比。**结果:** Ag85B 免疫组化阳性信号主要沉积在结核坏死灶及周围, 分布与抗酸杆菌相关、范围更广。19 例肺结核标本中, 10 例抗酸染色阳性, 抗酸染色敏感度为 52.63% (10/19); 10 例抗酸染色阳性的标本免疫组织化学染色全部阳性, 9 例抗酸染色阴性的标本中免疫组化阳性的标本有 6 例, 免疫组化敏感度为 84.21% (16/19)。20 例阴性对照组中, 3 例免疫组化呈阳性, 免疫组化特异度为 85.00% (17/20)。**结论:** Ag85B 免疫组化阳性信号表达范围比抗酸杆菌分布更广, 较抗酸染色具有更高的敏感性, 可作为结核确诊的一种补充手段。

【关键词】 传染病; 抗原 Ag85B; 免疫组织化学染色; 肺结核

【中图分类号】 R521 **【文献标志码】** A

Detection of Ag85B in pulmonary tuberculosis by immunohistochemical staining

FANG Shi-yu, DUAN Shao-qi, CHEN Xue-qian, YU Jiang, SUN Jie, LIU Feng-jun

(Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the distribution characteristics of Mycobacterium tuberculosis secretory antigen Ag85B in pulmonary tuberculosis tissue, and to preliminarily analyze its application value in the pathological diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Methods:** 19 cases of pulmonary tuberculosis tissue specimens were collected from the Department of Pathology, and 20 cases of normal lung tissue (normal tissue cut end of lung cancer resection specimen) was used as a negative control. The expression of Ag85B was detected by chemical staining and compared with acid-fast staining. **Results:** Ag85B immunohistochemical positive signals were mainly deposited in and around the necrotic foci of tuberculosis, and the distribution was related to acid-fast bacilli and had a wider range. Among the 19 tuberculosis samples, 10 had positive acid-fast staining, and the sensitivity of acid-fast staining was 52.63% (10/19). Among the 10 samples with positive acid-fast staining, all the immunohistochemical staining was positive, and among the 9 samples with negative acid-fast staining, 6 samples were immunohistochemically positive, and the immunohistochemical sensitivity was 84.21% (16/19). Among the 20 negative control tissues, 3 had positive immunohistochemistry, and the immunohistochemical specificity was 85.00% (17/20). **Conclusion:** The expression range of Ag85B immunohistochemical positive signal is wider than that of acid-fast bacilli, and it has higher sensitivity than acid-fast staining, which may be used as a supplementary method for the diagnosis of tuberculosis.

【Key words】 Infectious disease; Ag85B; Immunohistochemical staining; Pulmonary tuberculosis

结核病是对人类威胁最大的传染病之一, 由结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 感染所致。世界卫生组织《2021 年全球结核病报告》^[1] 指出, 2020 年估计有 990 万新发结核病例, 虽然很多国家加强了防控, 但结核病的疫情仍呈反弹的趋势, 约 300 万结核病患者未及时治疗。由于结核病可以治愈, 因此早期诊断、及时治疗对于终止结核病的传播非常关键。

肺结核是结核病中最常见的类型, 其诊断方法主要有影像学、免疫学、病原学、病理学等^[2], 根据中华人民共和国卫生行业标准—《肺结核诊断》(WS288-2017)^[3], 以病原学和病理学作为确诊依据, 其中病原学包括细菌学 (抗酸菌涂片镜检、结核分枝杆菌培养) 及分子生物学。但敏感性不能满足临床需要。特异性抗原也是病原微生物感染的诊断依据之一, 2017 年《中国结核病病理学诊断专家共

基金项目: 四川省南充市市校战略合作项目 (20SXQT0017); 四川省南充市市校科技战略合作项目 (19SXHZ0055); 川北医学院附属医院项目 (2020ZX003)

作者简介: 方诗宇 (1998 -), 男, 硕士研究生。E-mail: 450915759@qq.com

通讯作者: 刘凤君, 博士, 教授。E-mail: lfj116@126.com

识》^[4]指出,采用免疫组织化学染色(immunohistochemical staining, IHC)的方法检测结核病变组织中 MTB 特异性抗原的表达对结核病的诊断有帮助。

Ag85B 是 MTB 的主要分泌抗原之一,其表达量高^[5],目前已有研究发现利用 IHC 可以检测到肺结核、淋巴结及肾结核组织中 Ag85B 的表达。但有关研究较少,且由于目前尚无可用于临床诊断的免疫组化特异性抗体及统一的判读标准,需要开展更多的临床转化及评估研究。因此,本研究通过免疫组织化学染色检测石蜡包埋肺组织标本中 Ag85B 的表达情况,并与抗酸染色比较,了解其对于肺结核的诊断意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2019 年 5 月至 2021 年 8 月于川北医学院附属医院手术切除的 19 例经病理诊断为肺结核且已行抗酸染色的石蜡包埋肺组织标本为研究对象。纳入标准:符合 2017 年《中国结核病病理学诊断专家共识》^[4]I 类或 II 类诊断标准,且术后抗结核治疗有效。以非肺结核肺组织(肺癌切除标本正常组织断端)20 例为阴性对照。

1.2 方法

1.2.1 试剂 Ag85B 兔多克隆抗体(bs-9268R)购于北京博奥森古生物技术有限公司。柠檬酸组织抗原修复液(100×)购于北京博奥森古生物技术有限公司。即用型免疫组化 SP 试剂盒购于福州迈新生物技术有限公司。DAB 显色试剂盒(20×)购于福州迈新生物技术有限公司。

1.2.2 HE 染色 石蜡切片经脱蜡后置于梯度酒精中各 3 min,然后蒸馏水洗 1 min;苏木素染色 5~10 min 后流水洗 1 min,置于 1% 盐酸-乙醇中 3 s,水洗 2 s;1% 氨水返蓝 5~10 s,流水洗 2 min,蒸馏水水洗 2 min;0.5% 伊红染色 1~3 min,蒸馏水水洗 2 s;梯度酒精脱水各 3 min;最后置于二甲苯(I、II、III)中各 5 min,吹干后中性树胶封片。

1.2.3 免疫组织化学染色 采用 SP 法。一抗为 Ag85B 兔多克隆抗体,稀释比例 1:300;二抗为生物素标记的羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物。病理切片首先进行 HE 染色,由病理医生复核核实在结核病灶。所有切片均行脱蜡、抗原修复,操作步骤按免疫组化试剂盒说明书进行,DAB 染色室温孵育 5 min,苏木素染色 30 s,1% 盐酸-乙醇分化 2 s,蒸馏水水洗,梯度酒精脱水,吹干后中性树胶封片。每批染色使用 PBS 溶液代替一抗设置阴性对照。阳性结果:IHC 染色阳性结果为棕色颗粒,着色部位中心颜色较深,

周围较浅。

1.3 统计学分析

采用 SPSS22.0 软件进行数据处理和分析。计数资料以 $[n(\%)]$ 表示,组间比较以 Fisher 精确概率法分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺结核组织中 Ag85B 的表达特点

选取的 19 例肺结核标本均已由本院病理科行抗酸染色。选择抗酸染色(+++)的标本进行 Ag85B 的免疫组化染色,并通过与 HE 及抗酸染色对比以了解抗原阳性信号的分布特点。如图所示:肺结核组织切片经 HE 染色可见慢性肉芽肿改变,伴凝固型坏死;抗酸染色后可见大量红色杆状、细长略弯曲的抗酸杆菌,主要分布在干酪样坏死区及周围与肉芽肿交界处;Ag85B 的免疫组化染色阳性信号为棕色颗粒物,主要沉积在坏死灶及其周围,与抗酸染色比较可见 Ag85B 蛋白的分布与抗酸杆菌相关,范围更广。而阴性对照的免疫组化染色未见阳性信号或仅可见少许棕色信号,染色较肺结核组浅,且分布无特殊规律。见图 1。

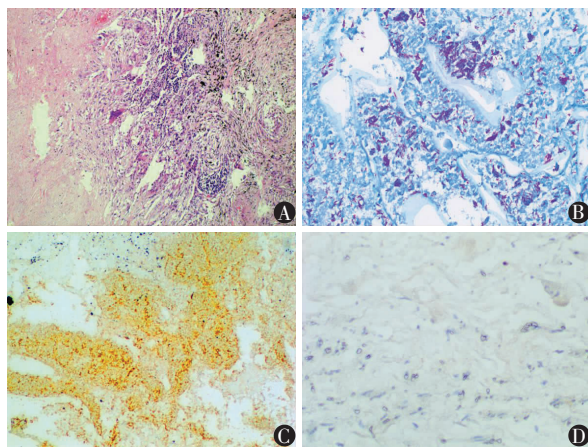


图 1 肺结核组织中 Ag85B 的表达特点

A-C. 同一肺结核标本连续切片;A. HE 染色;B. 抗酸染色(400×);C. Ag85B 的免疫组化染色(200×);D. 阴性对照标本的 Ag85B 的免疫组化染色(200×)。

2.2 免疫组化检测 Ag85B 及抗酸染色的结果

19 例肺结核组织标本中 Ag85B 免疫组化阳性 16 例,阴性 3 例,敏感度为 84.21%;抗酸染色阳性 10 例,阴性 9 例,敏感度为 52.63%。20 例正常肺组织标本中,Ag85B 检测阳性 3 例,阴性 17 例,其特异度为 85.00%;抗酸染色检测阳性 0 例,阴性 20 例,特异度为 100.00%。免疫组化的阳性和阴性预测值分别为 84.21%、85.00%;抗酸染色的阳性及阴性预测值分别为 100.00%、68.97%。见表 1。

表 1 免疫组化检测 Ag85B 蛋白及抗酸染色的结果

	组别	结核组	非结核组	敏感度(%)	特异度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)
免疫组化	阳性	16	3	84.21	85.00	84.21	85.00
	阴性	3	17				
抗酸染色	阳性	10	0	52.63	100.00	100.00	68.97
	阴性	9	20				

2.3 免疫组化染色与抗酸染色检测结果对比

19 例肺结核标本中,10 例抗酸染色阳性,9 例抗酸染色阴性,抗酸染色敏感度为 52.63% (10/19)。Ag85B 蛋白的免疫组织化学染色结果如下:10 例抗酸染色阳性的标本中,Ag85B 的免疫组化染色全部阳性;9 例抗酸阴性的标本中,6 例免疫组化呈阳性,因此 Ag85B 的敏感度为 84.21% (16/19)。与抗酸染色相比,免疫组化敏感性提高 31.58%,差别有统计学意义 ($P=0.039$)。采用同样的统计学方法,依次对两种检测手段的特异度、阳性预测值及阴性预测值进行对比,二者差异均无统计学意义 ($P=0.115$, $P=0.265$, $P=0.173$)。

3 讨论

病理学检查是结核病的重要诊断手段之一,结核典型的大体标本呈灰黄色的干酪样坏死,而镜下典型的病变是肉芽肿伴干酪样坏死,外周有纤维结缔组织和慢性炎症细胞浸润,病变周边可见朗格汉斯巨细胞^[6]。需要注意的是,结核病的大体观察、组织学表现及细胞学表现虽然具有一定的特异性,但所有上述表现亦可出现在其他感染性和非感染性肉芽肿性病变中^[3],且仍有 14% 的结核病未出现坏死性病变^[7]。所以常规的病理学特点结合病原学依据对于确诊结核的价值更大。在坏死性肉芽肿基础上行抗酸染色经济、简便,是目前临床寻找 MTB 最常用的方法,但抗酸染色敏感性较低^[8-9],目前不能满足临床需要,且需使用高倍镜及油镜,寻找抗酸杆菌费时费力。近年来,分子病理学检测技术发展迅速,虽敏感性较抗酸染色有所提高,但可能因气溶胶污染容易出现假阳性结果^[10],对实验室及操作人员有较高的要求,在结核病负担较重的发展中国家难以广泛开展。

随着对结核病免疫机制的深入研究,一些结核分支杆菌抗原为结核诊断提供了新思路。近年来,研究发现采用 IHC 的方法可以检测出在结核病变组织切片中 MTB 特异性抗原的表达,对结核病的诊断有参考价值。目前的研究主要针对 MPT64、ES-AT-6、Ag85B 等 MTB 分泌性抗原,但相关研究均较少,更重要的是由于目前尚无可应用于临床诊断的特异性抗体及统一的判读标准,专业人员呼吁开展

更多的临床转化及评估研究。本实验采用免疫组化法检测肺结核组织中的 Ag85B 蛋白,发现抗原阳性信号沉积在结核坏死灶及其周围,分布与抗酸杆菌有关,范围更广,符合 Ag85B 作为分泌性抗原不仅存在细胞内,也分泌到细胞周围的特点。与车南颖等^[11]、Wang 等^[12]的研究结果相似,以上结果提示免疫组化检测 Ag85B 可用于结核的诊断。

本研究发现在抗酸染色阳性的 10 例标本中,Ag85B 免疫组化均为阳性,在抗酸染色阴性的 9 例标本中仍有 6 例为阳性,其敏感度为 84.21%,远远高于抗酸染色的 52.63%。20 例正常肺组织标本中,Ag85B 检测阳性 3 例,特异度为 85.00%。前期研究^[13-16]报道 Ag85B 的敏感性为 39.3% ~ 64.4%,而特异性均为 100%。敏感性和特异性的差异可能与组织来源的不同有关,也可能与 IHC 结果判读标准不完全一致有关。本研究中阴性对照的阳性信号弱且分布无规律,如果提高阳性信号的强度并把分布规律纳入阳性判定标准,特异性即为 100%,但敏感性可能会降低。因此,该方法的临床应用需临床医生、病理专家等相关专业人士统一判定标准。虽然不同研究的结果有差异,但大部分实验结果提示免疫组化的敏感性高于抗酸染色,且免疫组织化学阳性信号易于观察,可以有效提高工作效率。因此 Ag85B 的免疫组化在结核诊断中具有潜在的应用价值,与其他抗原联合检测意义更大。

参考文献

- [1] World health organization global tuberculosis report 2021 [EB/OL]. Geneva: World health organization. (2021-10-14) [2023-03-01]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>.
- [2] Azadi D, Motallebirad T, Ghaffari K, et al. Mycobacteriosis and tuberculosis: laboratory diagnosis [J]. The Open Microbiology Journal, 2018, 12: 41-58.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断标准 (WS 288—2017) [J]. 新发传染病电子杂志, 2018, 3(1): 59-61.
- [4] 中华医学会结核病学分会, 结核病理学诊断专家共识编写组. 中国结核病病理学诊断专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(6): 419-425.
- [5] Mälen H, Sjøfteland T, Wiker HG. Antigen analysis of Mycobacterium tuberculosis H37Rv culture filtrate proteins [J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2008, 67(3): 245-252.
- [6] 刘彤华. 诊断病理学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社,

- 2013.
- [7] Öztomurcuk D, Terzi Ö, Demirci C, et al. Investigation of granulomatous inflammations in terms of tuberculosis diagnosis; a 5-year multi-center laboratory study[J]. Turkish Thoracic Journal, 2022, 23(1): 11 - 16.
- [8] Crothers JW, Laga AC, Solomon IH. Clinical performance of mycobacterial immunohistochemistry in anatomic pathology specimens[J]. American Journal of Clinical Pathology, 2021, 155(1): 97 - 105.
- [9] Polepole P, Kabwe M, Kasonde M, et al. Performance of the Xpert MTB/RIF assay in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues[J]. International Journal of Mycobacteriology, 2017, 6(1): 87 - 93.
- [10] Machado D, Couto I, Viveiros M. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: from probes to genomes[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2019, 72: 93 - 112.
- [11] 车南颖, 曲杨, 张晨, 等. 结核分枝杆菌 Ag85B 蛋白表达特点及其病理学诊断价值[J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(9): 600 - 603.
- [12] Wang L, Shang X, Qi X, et al. Clinical significance of M1/M2 macrophages and related cytokines in patients with spinal tuberculosis [J]. Disease Markers, 2020, 2020: 2509454.
- [13] Che N, Qu Y, Zhang C, et al. Double staining of bacilli and antigen Ag85B improves the accuracy of the pathological diagnosis of pulmonary tuberculosis [J]. Journal of Clinical Pathology, 2016, 69(7): 600 - 606.
- [14] 董宇杰, 张莉, 王宇轩, 等. 免疫组织化学及 PCR 技术在淋巴结结核病理诊断中的应用价值[J]. 中国防痨杂志, 2018, 40(4): 348 - 352.
- [15] 陈辉娥, 姜训忠, 袁鸿, 等. 免疫组织化学及 PCR 技术对淋巴结结核病的诊断价值[J]. 实用临床医学, 2020, 21(3): 4 - 5, 8.
- [16] 李雪, 孟禹彤, 周翔, 等. 结核病病理诊断的新方法研究[J]. 诊断病理学杂志, 2020, 27(5): 300 - 305.
- (收稿日期: 2023 - 03 - 01 修回日期: 2023 - 04 - 20)

(上接第 1164 页)

综上, 加味大黄附子汤可改善慢性肾脏病小鼠认知功能, 其作用可能与激活 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。本研究的浓度范围内, 16、24 g/kg 加味大黄附子汤指标改善效果更佳, 后期研究将从拆方及组分方面深入分析加味大黄附子汤与慢性肾脏病认知功能障碍的关系。

参考文献

- [1] 印中鹏, 吴嘉, 汪俊军. 慢性肾脏病患者血清脂蛋白(a)颗粒浓度与质量浓度检测结果的差异比较[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(7): 596 - 601.
- [2] 张慧, 杨薇, 魏丹, 等. 中国终末期肾病患者认知障碍影响因素的 Meta 分析[J]. 中国全科医学, 2022, 25(21): 2651 - 2660.
- [3] Otake Y, Yamada M, Hiraki K, et al. Physical exercise improves cognitive function in older adults with stage 3 - 4 chronic kidney disease: a randomized controlled trial [J]. American Journal of Nephrology, 2021, 52(12): 929 - 939.
- [4] 闫蕾, 郎睿, 王殿文, 等. 从痰瘀论治慢性肾脏病理论源流述略[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5155 - 5158.
- [5] 郝鹏飞, 钟书婷, 张超云, 等. 大黄附子汤治疗慢性肾衰竭的网络药理学研究及初证[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(5): 515 - 521.
- [6] 弓迎宾, 任建萍, 杨翠玲, 等. 大黄附子汤保留灌肠治疗慢性肾功能衰竭的观察及评估[J]. 中国药物与临床, 2020, 20(21): 3581 - 3582.
- [7] Gu M, Ying P, Miao Z, et al. Treatment of modified Dahuang Fuzi Decoction on cognitive impairment induced by chronic kidney disease through regulating AhR/NF- κ B/JNK signal pathway[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM, 2022, 2022: 8489699.
- [8] Xiao HH, Chen JC, Li H, et al. Icarisid II rescues cognitive dysfunction via activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway promoting hippocampal neurogenesis in APP/PS1 transgenic mice[J]. Phytotherapy Research: PTR, 2022, 36(5): 2095 - 2108.
- [9] 熊梦冉, 方吕贵, 袁博, 等. 慢性肾脏病轻度认知障碍与中医证候的关系研究[J]. 北京中医药, 2020, 39(9): 906 - 909.
- [10] 竺佳怡, 陈敏. 从“肾脑相关”分析维持性血液透析患者认知功能障碍的中西医研究进展[J]. 山东中医杂志, 2021, 40(10): 1153 - 1158.
- [11] 刘毓, 刘鹏, 韩晶雪, 等. 基于网络药理学大黄治疗慢性肾脏病机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 32 - 36, 262.
- [12] 于翔, 祝一叶, 孔薇, 等. 基于《金匱要略》角度的国医大师邹燕勤运用大黄治疗慢性肾脏病经验[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(11): 2759 - 2761.
- [13] 李梦雨, 张森, 张丽, 等. 维生素 D 对慢性肾脏病小鼠认知功能的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(7): 1083 - 1087.
- [14] 毛海霞, 康婷, 吴蔚桦, 等. 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型中 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 的表达及意义[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 70 - 77, 135.
- [15] Li C, Zhang B. The protective effects of acetazolamide against homocysteine-induced blood-brain-barrier disruption by regulating the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Neurotoxicity Research, 2022, 40(5): 1261 - 1271.
- [16] 钱红月, 肖移生, 侯吉华, 等. 黄精丸对 D-半乳糖和冈田酸所致学习记忆障碍小鼠海马 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 63 - 71.
- [17] Mohamed AM, Habib MZ, Ebeid MA, et al. Amisulpride alleviates chronic mild stress-induced cognitive deficits: role of prefrontal cortex microglia and Wnt/ β -catenin pathway[J]. European Journal of Pharmacology, 2020, 885: 173411.
- [18] Wang Q, Huang X, Su Y, et al. Activation of Wnt/ β -catenin pathway mitigates blood-brain barrier dysfunction in Alzheimer's disease[J]. Brain, 2022, 145(12): 4474 - 4488.
- (收稿日期: 2023 - 03 - 15 修回日期: 2023 - 04 - 24)