

T 细胞免疫功能检测平台的建立及在感染性疾病中的应用

李文娟, 李太生

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院感染内科, 北京 100730

通信作者: 李太生 电话: 010-65295048, E-mail: litsh@263.net

【关键词】流式细胞术; T 淋巴细胞亚群; 细胞免疫; 感染性疾病

【中图分类号】R392.12 【文献标志码】A 【文章编号】1674-9081(2010)01-0049-04

细胞免疫功能在人体抗感染中发挥着重要作用, 各种感染性疾病的转归与细胞免疫功能密切相关, 尤其是与 T 淋巴细胞功能的关系更加密切。然而临床上缺乏体内直接检测 T 细胞功能的手段, 主要靠体外间接方法进行评估, 如检测外周血 T 淋巴细胞及各亚群数量和比例、增殖功能及产生细胞因子的能力, 主要方法有酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、酶联免疫斑点试验 (enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)、流式细胞术 (flow cytometry, FCM), 其中 FCM 鉴于其独特的优势在感染性疾病中广泛应用。

国际上很早就开展了用 FCM 检测 T 和 B 细胞各亚群, 以评估免疫功能并指导临床医生进行感染性疾病的诊治, 如笔者早年在法国巴黎学习的 Pitié-Salpêtrière 医院于 1993 年就在临床上常规开展 FCM 检测淋巴细胞亚群及淋巴细胞增殖功能, 帮助对感染性疾病诊疗的指导。而国内到目前为止也仅在少数医院临床上开展了最基本的辅助 T 细胞和抑制 T 细胞的检测, 与国际社会存在很大的差距。

北京协和医院感染内科于 1999 年率先在国内建立了用 FCM 检测 T、B 淋巴细胞亚群的平台, 并于 2001 年开始应用于临床, 先后对人类免疫缺陷病毒感染/获得性免疫缺陷综合征 (human immunodeficiency viruses infection, HIV 感染/acquired immunodeficiency syndrome, AIDS, 艾滋病)、病毒性肝炎、严重急性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 等常见或新发传染病进行了一系列的研究。

流式细胞术简介

流式细胞术是 20 世纪 70 年代发展起来的一种

测量悬浮在液体中的细胞、细胞器、染色体或其他微粒的各种物理、化学、生物学、免疫学或遗传学等特性的动态分析技术, 以每秒数百、数千个细胞的速率进行多参数定性或定量分析^[1]。应用 FCM 可测量细胞大小、DNA/RNA 含量、细胞表面抗原表达等多种参数, 是细胞分析和分选的有力工具, 其功能包括: 细胞表型分析、DNA 含量及细胞周期分析、细胞内及核膜成分分析、细胞分选、自身抗体检测等^[2]。在临床医学中可广泛应用于肿瘤学、血液病、感染性疾病、免疫缺陷病、自身免疫性疾病等多种疾病的诊治。近年来 FCM 发展迅速, 多色流式细胞术 (polychromatic flow cytometry, PFC) 由 5 色 (20 世纪 90 年代), 发展到 13 色 (2001 年), 甚至 18 色 (2006 年) 的先进 PFC^[3]。目前临床上应用 FCM 最广的是对 T 淋巴细胞及其亚群进行测定, 较新的还用于测定 T 淋巴细胞特异性胞内细胞因子、结合荧光染料标记测定淋巴细胞增殖能力等。

T 淋巴细胞各亚群及其意义

FCM 根据淋巴细胞表面标志的不同可检测各亚群细胞的数量和比例, 包括 T 淋巴细胞 (CD3 +)、B 淋巴细胞 (CD19 +)、NK 细胞 (CD16 + CD56 +), 其中 T 淋巴细胞可进一步测定辅助/诱导 T 淋巴细胞 (CD3 + CD4 +)、抑制/细胞毒 T 淋巴细胞 (CD3 + CD8 +)、CD4 + T 细胞纯真亚群 (CD4 + CD45RA + / CD4 + CD45RA + 62L +) 和记忆亚群 (CD4 + CD45RA - / CD4 + CD45RO +)、功能亚群 (CD28 +)、激活亚群 (CD38 +、HLA-DR +)、凋亡亚群 (CD95 +) 等^[2]。

T淋巴细胞主要反映机体的细胞免疫功能状态,不同的亚群有不同的临床意义。CD4 + T 纯真亚群经特异性抗原刺激后,可转变为记忆亚群,当再次暴露于相同的抗原时能迅速参与对特异性抗原的有效免疫应答,根据纯真/记忆的比例可进一步揭示疾病对 CD4 + T 细胞的影响。CD28 是 T 细胞正常激活所必须的协同刺激分子受体,缺乏 CD28 的 CD4 + T 细胞不能完成正常的免疫功能,因此 CD28 的表达比例可用于衡量 CD4 + T 细胞的功能。CD38、HLA-DR 是 T 细胞激活的分子标志物,激活亚群可用于评价细胞的免疫激活状态。CD95 (Fas 受体) 是介导细胞凋亡的主要受体之一,凋亡亚群可评价细胞的凋亡情况。

T 淋巴细胞亚群检测平台的建立 及在感染性疾病中的应用

T 淋巴细胞亚群受生态环境、社会经济等多种因素影响,不同地区、不同种族之间存在差异^[4]。北京协和医院感染内科 2002 年在国内较早建立了我国青壮年健康人 T 细胞各亚群的参考范围^[5],并随后研究了不同年龄 T 细胞亚群的差异,发现大部分 T 细胞及各亚群(包括 CD3、CD4、纯真 CD4、CD4 + CD28 +)和年龄呈负相关,而 NK、记忆 CD4 和年龄呈正相关,并确立了中国健康人不同年龄段 T 细胞亚群的参考范围^[6]。

T 细胞亚群检测在 HIV/AIDS 诊治中的临床意义

随着 HIV/AIDS 患者人数的逐年上升,我国面临着艾滋病疫情的严峻挑战。北京协和医院感染内科经过 20 多年对 HIV/AIDS 患者 T 细胞亚群改变的研究,主要有以下发现。

首次发现中国 HIV/AIDS 患者 T 细胞亚群改变特点和规律:国际上已公认 HIV/AIDS 的特征是 HIV 特异性侵犯 CD4 + T 淋巴细胞,引起 CD4 + T 细胞数量进行性减少和功能进行性的破坏以及全身异常的免疫激活,从而导致机会性感染和肿瘤。但中国 HIV 感染者的免疫病理改变特点如何呢? 2006 年,北京协和医院感染内科通过对 263 例中国 HIV/AIDS 患者淋巴细胞亚群改变的研究,首次大样本证实了中国艾滋病患者的免疫病理改变特点,包括 CD4 + T 及其纯真亚群数量显著减少; CD28 表达比例显著减低,即 CD4 + T 细胞功能障碍;免疫系统异常激活^[7]。同时发现 CD4 + T 细胞 CD28 表达比例与 CD4 + T 细胞

计数呈显著正相关,与血浆病毒载量呈显著负相关; CD8 + T 细胞激活亚群 CD38、HLA-DR 表达比例与血浆病毒载量呈显著正相关,提示艾滋病晚期患者 CD4 + T < 200/μl 时, CD4 + T 纯真亚群及 CD28 表达下降较感染早中期更严重,异常的免疫激活更明显^[7-9]。提出我国艾滋病患者接受治疗的标准应为 CD4 + T 细胞数低于 350/μl,而非当时世界卫生组织推荐的 200/μl。CD4 + T 细胞数过低,预示着机体免疫损伤的严重程度显著增加,治疗效果明显降低。最终,世界卫生组织于 2009 年更改了其推荐的艾滋病治疗标准,而我国标准的调校较其提前了近 2 年。

提出 CD4 + T 细胞在 AIDS 诊治中的重要地位并发现其替代检测方法:应用 FCM 检测 HIV/AIDS 患者的 CD4 + T 淋巴细胞计数在艾滋病领域已成为必不可少的常规检测工具,主要用于:(1) 疾病诊断和分期的依据;(2) 疾病进展的依据^[10];(3) 确定开始高效联合抗逆转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 的时机^[11];(4) 判断机会性感染的发生及预防性治疗时机、疗程;(5) 判断 HAART 的疗效, CD4 + T 细胞计数增加是治疗后判断疗效最重要的指标之一。但由于我国的 HIV/AIDS 患者多在农村地区,很难常规开展 CD4 + T 淋巴细胞检测。为此,北京协和医院感染内科观察了外周血淋巴细胞数 (total lymphocyte count, TLC) 和 CD4 + T 的相关性,进而提出可以用简便而价廉的血常规中 TLC 检测代替 CD4 + T 检测,一定程度上缓解了我国广大农村地区艾滋病治疗检测困难的问题^[12-13]。

在国际上首先提出艾滋病免疫重建理论并在国内大样本人群中得到验证:随着 20 世纪 90 年代开始应用 HAART 以来, AIDS 患者的临床预后大大改善。1997 年笔者及其导师 Autran 等^[14]首先提出艾滋病免疫重建理论,但 HAART 对中国 HIV/AIDS 患者是否具有相同的免疫重建功能及疗效并不清楚。2005 年,笔者对 103 例就诊于本院的患者进行了 1 年 HAART 的规律随访,证实 HAART 对中国 HIV/AIDS 患者具有同样的免疫重建功能,包括 CD4 + T 的两相增长(即早期以记忆细胞重分布为主的快速增长,后期以纯真细胞持久增长为主的缓慢增长), CD4 + CD28 + 功能亚群的恢复,激活亚群 CD8 + CD38 +、CD8 + HLA-DR + 的下降^[15]。

证实激活亚群可作为 HIV 病毒载量的替代检测方法: HIV 病毒载量测定是判断艾滋病疾病进展和

治疗效果的另一个重要指标,但由于实验仪器及条件的限制目前仅能在国内少数医院开展,因此寻求 HIV 病毒载量的替代检测方法尤为重要。北京协和医院感染内科发现 CD8 + T 细胞 CD38、HLA-DR 激活亚群和血浆病毒载量呈显著正相关,故可以用 CD8 + T 细胞的激活亚群作为 HIV 病毒载量的替代工具,有较高的灵敏度和特异性^[9]。

T 细胞亚群检测对尽早诊断 SARS 患者和遏制疫情的重要意义

2002 年年底我国爆发了一种新发的表现为非典型肺炎的呼吸道传染病,该病传染性极强,病情进展迅速,当时病原学尚不明确,更没有实验室诊断手段。2003 年 3 月,北京协和医院感染内科通过对北京地区首批急性期患者 T 细胞亚群的观察,发现这些患者的 CD4 + T 细胞、CD8 + T 细胞计数均快速显著下降,并且这些改变多发生在发病 1 周内(有些发生在胸片改变之前)。据此,于 2003 年 4 月在国内最早提出检测发热患者 T 细胞计数有助于 SARS 患者的早期诊断和鉴别诊断,且此提法是在病原体新型冠状病毒(SARS-CoV)被发现之前,为当时及时发现病例、遏制疫情起到了极为重要的作用^[16]。笔者进一步随访 SARS 康复者 2 年,发现这些患者虽然临床症状和免疫应答均有恢复,但外周血淋巴细胞及各亚群计数(包括淋巴细胞、CD4 + T 细胞、CD8 + T 细胞、NK 细胞)仍较健康对照者低,进一步揭示了 SARS 患者的免疫发病机制^[17]。

T 细胞亚群和慢性乙肝病毒感染不同临床转归的相关性

我国是乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染高发流行区,HBV 感染人体后,机体主要通过细胞免疫功能清除病毒,但同时也会间接损伤肝细胞而导致慢性肝炎,部分患者甚至发展为肝硬化、肝癌,从而严重影响着人类的健康。慢性乙型肝炎的免疫发病机制复杂,其外周血淋巴细胞亚群的变化尚有争议。北京协和医院感染内科对 HBV 携带者、慢性乙肝患者不同人群的 T 淋巴细胞各亚群的变化进行研究,分析 HBV 感染后不同临床转归者细胞免疫功能的变化^[18]。初步结果显示:(1)与正常对照相比,慢性乙肝患者和 HBV 携带者 CD4 + T 细胞、CD8 + T 细胞、CD4 + CD28 + T 细胞、CD8 + CD28 + T 细胞计数均减少,提示机体参加免疫反应的免疫活性细胞不足,导致机体清除病毒的能力降低;(2)与正常对照和 HBV 携带者相比,慢性乙肝患者 CD8 +

CD38 + T 细胞比例升高,提示患者体内存在 T 淋巴细胞的明显激活,这可能正是其肝细胞损伤的原因之一;(3)慢性乙肝患者 CD4 + CD45RA-记忆 T 细胞比例显著升高,CD4 + CD45RA + 62L + 纯真 T 细胞比例及计数均显著减少;(4)与正常对照和 HBV 携带者相比,慢性乙肝患者外周血调节性 T 细胞(regulatory T-cell, Treg)(CD4 + CD25 + CD45RO +)比例升高,可能是对肝脏组织炎症坏死作出的反应,用以保护宿主。

T 细胞亚群在手足口病儿童患者中的改变特征和临床意义

近年来,肠道病毒 71 型(human enterovirus, EV71)感染引起的手足口病儿童患者在我国广泛流行,重症患儿发病率和病死率也明显增加,对人民的健康造成了严重威胁,为此卫生部于 2008 年将手足口病规定为法定上报的传染病。

手足口病的发病机制并非十分清楚,其淋巴细胞亚群改变的特点和临床意义相关报道也比较少。2008 年,笔者与安徽阜阳市第一人民医院合作,通过研究该院确诊的 41 例患儿,发现脑炎组患儿的 T、NK 细胞比例较轻症组明显减少,但 B 淋巴细胞比例明显增加,与疾病的严重程度有密切相关性。提示淋巴细胞亚群检测在鉴别手足口病轻重症患者中具有一定作用,为其治疗提供了重要帮助^[19]。

T 细胞亚群在其他感染性疾病中的应用

其他病原菌感染人体后也能导致 T 淋巴细胞亚群出现各种改变。目前已公认在活动性 EB 病毒(EB virus, EBV)及巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染患者中 CD8 + T 细胞比例增高,尤其是 CD8 + CD38 + 激活亚群明显增高,在本科的研究中也得到证实^[16]。其他 CD8 + T 细胞比例增高的疾病还可见于麻疹病毒(measles virus, MV)感染后的出疹期^[20]、肾综合征出血热患者等^[21]。甲型 H1N1 流感患者与正常人相比 T、CD4 + T、CD8 + T 细胞计数均下降^[22-23]。肺结核患者外周血 CD4 + T 细胞以初始细胞(CD45RA + CCR7 +)为主,BCG 刺激后产生的抗原特异性 CD4 + T 细胞则以中央记忆细胞(CD45RA-CCR7 +)为主,可能在防止或者降低再感染的严重程度方面起重要作用^[24]。脓毒症患者外周血 T、CD4 + T 及 CD8 + T 淋巴细胞计数均显著减少,且淋巴细胞减少的程度与疾病的严重性和预后不良相关^[25]。

综上所述,应用 FCM 检测 T 淋巴细胞亚群评估

细胞免疫功能已成为各种感染性疾病诊断及治疗监测的一项重要手段,能帮助临床医生提高对疾病的诊治水平,需进一步在临床上广泛开展。此外,T细胞免疫功能与其他疾病,如肿瘤、自身免疫性疾病、变态反应性疾病和器官移植等关系也非常密切,更需做进一步的研究和观察。

参 考 文 献

- [1] 王建中. 临床流式细胞分析 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 27.
- [2] 李春海. 临床诊疗指南免疫学分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 31-34.
- [3] Chattopadhyay PK, Hogerkerp CM, Roederer M. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry [J]. *Immunology*, 2008, 125: 441-449.
- [4] Laurence J. T-cell subsets in health, infectious disease, and idiopathic CD4 + T lymphocytopenia [J]. *Ann Intern Med*, 1993, 119: 55-62.
- [5] 邱志峰, 李太生, 王爱霞, 等. 健康人T淋巴细胞亚群的测定及其临床意义 [J]. *中国临床实验室*, 2002, 1: 26-28.
- [6] Jiao Y, Qiu Z, Xie J, et al. Reference ranges and age-related changes of peripheral blood lymphocyte subsets in Chinese healthy adults [J]. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2009, 52: 643-650.
- [7] 谢静, 邱志峰, 李太生, 等. 263 例人类免疫缺陷病毒感染/艾滋病患者免疫病理改变特点研究 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86: 965-969.
- [8] 谢静, 韩扬, 李太生, 等. T细胞第二信号受体-CD28分子在 HIV/AIDS 患者中的异常改变 [J]. *中国医学科学院学报*, 2006, 28: 618-621.
- [9] 韩扬, 邱志峰, 李太生, 等. CD8 + T 细胞激活分子 CD38、HLA-DR 与 HIV-1 载量的相关性研究 [J]. *中华内科杂志*, 2006, 45: 459-462.
- [10] Barnett D, Walker B, Landay A, et al. CD4 immunophenotyping in HIV infection [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: S7-S15.
- [11] Liu ZY, Guo FP, Han Y, et al. Impact of baseline CD4 (+) T cell counts on the efficacy of nevirapine-based highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV/AIDS patients: a prospective, multicentric study [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122: 2497-2502.
- [12] 谢静, 李太生, 邱志峰, 等. 人类免疫缺陷病毒感染及艾滋病患者外周血总淋巴细胞数和 CD4 + T 细胞计数的相关性研究 [J]. *中国实用内科杂志*, 2007, 27: 867-869.
- [13] 韩扬, 邱志峰, 李太生, 等. 艾滋病患者淋巴细胞数和 CD4 + T 细胞计数的相关性研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29: 596-600.
- [14] Autran B, Carcelain G, Li TS, et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4 + T cell homeostasis and function in advanced HIV disease [J]. *Science*, 1997, 277: 112-116.
- [15] Dai Y, Qiu ZF, Li TS, et al. Clinical outcomes and immune reconstitution in 103 advanced AIDS patients undergoing 12-month highly active antiretroviral therapy [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119: 1677-1682.
- [16] Li TSH, Qiu ZF, Zhang LQ, et al. Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. *J Infect Dis*, 2004, 189: 648-651.
- [17] Li T, Xie J, He Y, et al. Long-term persistence of robust antibody and cytotoxic T cell responses in recovered patients infected with SARS coronavirus [J]. *PLoS ONE*, 2006, 1: e24.
- [18] 田瑛, 邱志峰, 李太生, 等. 慢性乙型肝炎患者和乙型肝炎病毒携带者外周血 T 细胞亚群的变化和意义 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 85: 3354-3358.
- [19] 毛国顺, 罗玲, 刘晓琳, 等. 手足口病轻症与重症患者临床特征比较 [J]. *中华传染病杂志*, 2008, 26: 387-390.
- [20] 洪玲珍. 出疹期麻疹患者 30 例 T 淋巴细胞亚群分析 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25: 1344.
- [21] 王璐, 李旭丽, 戴懿, 等. 肾综合征出血热患者淋巴细胞亚群的动态变化 [J]. *中华内科杂志*, 2008, 47: 654-657.
- [22] 沈芳, 金鑫, 毛会军, 等. 2009 甲型流行性感冒病毒感染者常规免疫学检测的临床意义 [J]. *微生物与感染*, 2009, 4: 198-202.
- [23] 王宇, 陈凤欣, 张铭, 等. 24 例甲型 H1N1 流行性感冒病例报告 [J]. *中华预防医学杂志*, 2009, 43: 856-860.
- [24] 曹志红, 程小星, 王心静. 肺结核患者 CD4 + 记忆 T 细胞亚群的检测分析 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25: 2845-2848.
- [25] Monneret G, Venet F, Pachot A, et al. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony [J]. *Mol Med*, 2008, 14: 64-78.

(收稿日期: 2010-05-24)