

• 论 著 •

## HIV 感染者脑脊液淋巴细胞亚群分析

乔 曦, 刘毓刚<sup>△</sup>, 李艳梅, 沈金兰, 曾 平, 刘 彤, 王艳艳

(成都军区总医院实验医学中心生化科/高湿医学全军重点实验室, 四川成都 610083)

**摘要:**目的 了解 HIV 感染者脑脊液淋巴细胞亚群分布, 探讨脑脊液淋巴细胞亚群在 HIV 中枢神经系统并发症发生中的意义。方法 选取 HIV 感染者 34 例, 其中 20 例无神经系统症状(单纯 HIV 组), 14 例伴有神经系统症状(神经系统 HIV 组), 另选取 15 例健康人(健康对照组)。使用流式细胞术检测脑脊液淋巴细胞亚群, 采用免疫比浊法检测 IgG 水平, 并进行比较分析。结果 单纯 HIV 组和神经系统 HIV 组脑脊液 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分率高于健康对照组, CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞百分率低于健康对照组, HIV 感染者 IgG 水平高于健康对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); 而 B 淋巴细胞、NK 细胞百分率差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ); 单纯 HIV 组和神经系统 HIV 组间脑脊液各淋巴细胞亚群百分率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 HIV 感染者在早期未发生神经系统并发症时就出现脑脊液免疫功能紊乱, 淋巴细胞亚群变化趋势与外周血中一致, T 淋巴细胞亚群可能与 HIV 神经系统症状相关。

**关键词:** 人类免疫缺陷病毒; 淋巴细胞亚群; 流式细胞术; 脑脊液

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.08.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)08-1052-03

## Analysis of the lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid in patients with HIV infection

Qiao Xi, Liu Yugang<sup>△</sup>, Li Yanmei, Shen Jinlan, Zeng Ping, Liu Tong, Wang Yanyan

(Department of Clinical Chemistry, Center of Laboratory Medicine/Key Laboratory of High Humidity Medicine, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

**Abstract:** Objective To explore the lymphocyte subsets distribution in cerebrospinal fluid in patients with HIV infection, and to investigate the clinical significance of the lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid in HIV central nervous system complication.

**Methods** 34 patients with HIV infection, including 20 patients without nervous system symptoms (simple HIV group) and 14 patients with nervous system symptoms (neurological HIV group), and 15 cases of healthy people (control group) were selected. Flow cytometry was used to detect lymphocyte subsets, and immunoturbidimetry was used to detect the level of IgG in cerebrospinal fluid. **Results** The percentage of CD8<sup>+</sup>T cells was higher and percentage of CD4<sup>+</sup>T cells was lower in the simple HIV group and neurological HIV group than those in the healthy control, with statistically significant differences ( $P < 0.01$ ). The level of IgG in patients with HIV infection was higher than that in the healthy control group ( $P < 0.01$ ). While no significant difference were found in the percentage of B cells and NK cells among the three groups ( $P > 0.05$ ). There were also no significant difference between the simple HIV group and neurological HIV group in the ratio of each lymphocyte subset in cerebrospinal fluid ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The immune disorder in cerebrospinal fluid in patients with HIV infection may appear in the early time before the nervous system complication. The changing trends of lymphocyte subsets are consistent with the peripheral blood, which demonstrate that the T lymphocyte subsets may be correlated with the nervous system symptoms of HIV.

**Key words:** human immunodeficiency virus; lymphocyte subsets; flow cytometry; cerebrospinal fluid

近年来, 国内外研究发现在不同神经系统疾病中脑脊液淋巴细胞亚群存在明显差异, 利用脑脊液淋巴细胞亚群分析可以对其进行有效的鉴别诊断<sup>[1-2]</sup>。目前临床检测脑脊液的细胞学方法尚局限于传统的手工计数法, 手工检测具有高随机误差及无法对淋巴细胞亚群进行区分的缺陷。流式细胞术是分析液体内多细胞成分的常用方法, 尤其是多色流式细胞术能同时测定一个细胞的多个标志<sup>[3]</sup>, 更加适用于脑脊液等低细胞数体液的分析。人类免疫缺陷病毒(HIV)感染常伴随脑脊液淋巴细胞增多, 但这些淋巴细胞的组成目前还不是很清楚, 特别是 HIV 感染者与健康人群脑脊液细胞成分的差异尚未见文献报道。为此, 本研究使用流式细胞法检测了 HIV 感染者与健康人群脑脊液的主要细胞组分, 并重点分析主要淋巴细胞亚群(CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞, B 淋巴细胞和 NK 细胞)的相对浓度。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2012 年 6 月至 2013 年 6 月成都军区总医院收治的 HIV 感染者 34 例, 所有诊断均为本院实验医学中心初筛阳性后送至四川省疾病预防控制中心进行确认, 20 例无神

经系统症状(单纯 HIV 组)患者, 其中男 15 例, 女 5 例, 平均年龄( $48.5 \pm 13.3$ )岁; 14 例伴随神经系统症状(神经系统 HIV 组)患者, 包括 10 例中枢神经系统感染、3 例原发性颅内高压、1 例 HIV 相关痴呆(HAD), 其中男 10 例, 女 4 例, 平均年龄( $53.5 \pm 18.8$ )岁。另选取 15 例同期非 HIV 感染, 无其他神经系统疾病且脑脊液常规及生化检查正常者设为健康对照组, 其中男 9 例, 女 6 例, 平均年龄( $43.1 \pm 21.3$ )岁。各组间年龄及性别分布差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 具有可比性。脑脊液由专业人员通过腰椎穿刺采集。本研究征得所有受试者的知情同意及成都军区总医院伦理委员会的批准。

## 1.2 方法

**1.2.1 脑脊液白细胞计数** 脑脊液白细胞计数使用改良牛鲍氏计数板, 计数 10 个大方格内白细胞数总和为每微升脑脊液中白细胞数, 再换算成每升脑脊液中白细胞数。

**1.2.2 淋巴细胞亚群检测** 淋巴细胞亚群检测使用 Beckman Coulter 公司生产的 EPICS XL4 型流式细胞仪, 以及各荧光抗体和相关试剂, 具体方法如下: 将 2 mL 脑脊液以 500 g 离心 5

min,弃上清,重悬于 200  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液(PBS)。向各管加入 Flow-Count 标准荧光微球 50  $\mu$ L,同型对照管每管加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 IgG2a 抗体(IgG2a-FITC)/藻红蛋白(PE)标记的 IgG1(IgG1-PE)抗体组合 10  $\mu$ L 进行标记,所有测定管中加入 10  $\mu$ L 藻红蛋白-德州红-X (ECD) 标记的 CD45 抗体(CD45-ECD),T 淋巴细胞测定管加入 10  $\mu$ L CD4<sup>+</sup> FITC/CD8<sup>+</sup> PE/藻红蛋白-花青苷 5(PC5)标记的 CD3(CD3<sup>+</sup> PC5)混合抗体,B 淋巴细胞管加入 10  $\mu$  L CD3<sup>+</sup> FITC/CD19<sup>+</sup> PE 混合抗体,NK 细胞管加入 10  $\mu$ L CD3<sup>+</sup> FITC/CD16/CD56 混合抗体,避光孵育 30 min。以 PBS 洗涤 1 次,重悬于 200  $\mu$ L PBS,向试管加入溶液 C 265  $\mu$ L 混匀固定细胞。制备好的标本上流式细胞仪进行检测。根据 CD45/侧向角散色光(SSC)设定淋巴细胞门,在门内检测获得 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞)、CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞)、CD3<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> (B 淋巴细胞)、CD3<sup>+</sup> CD16/CD56<sup>+</sup> (NK 细胞) 占总淋巴细胞的百分比及绝对浓度。

1.2.3 脑脊液 IgG 检测 脑脊液 IgG 检测使用 Simens BN

prospec 特定蛋白仪及其配套试剂,具体操作由专业人员按照仪器及试剂说明书进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理与统计学分析。外周血和脑脊液淋巴细胞亚群及脑脊液 IgG 水平经 Kolmogorov-Sruinov 检验发现均为非正态分布,数据以中位数、四分位数、最低值、最高值表示,各组间比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$  或  $P<0.01$  为差异有统计学意义。

2 结 果

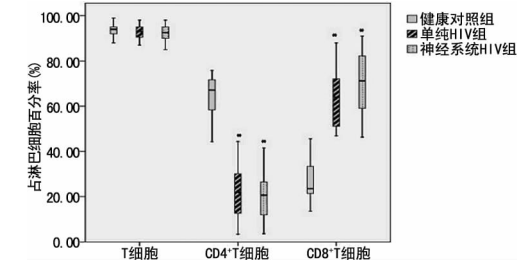
2.1 各组脑脊液白细胞、淋巴细胞计数及淋巴细胞百分率比较 白细胞计数显示两组 HIV 感染患者和健康对照组中淋巴细胞都是白细胞的主要成分,神经系统 HIV 组和单纯 HIV 组白细胞总数均高于健康对照组,且神经系统 HIV 组高于单纯 HIV 组,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。淋巴细胞百分率在健康对照组和单纯 HIV 组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但神经系统 HIV 组淋巴细胞百分率低于其他两组( $P<0.01$ ),绝对值高于其他两组( $P<0.01$ )。见表 1。

表 1 各组间脑脊液白细胞分析

组别	白细胞总数( $\times 10^6$ /L)	淋巴细胞	
		百分率(%)	绝对值( $\times 10^6$ /L)
健康对照组	1(0~3.5)	85(0~95)	0.93(0~4.3)
单纯 HIV 组	6(3~16)*	91(73~96)	5.02(1.5~12.64)*
神经系统 HIV 组	42(12~512)*#	55(21~92)*#	26.53(9.66~121.8)*#

\*: $P<0.01$ ,与健康对照组比较;#: $P<0.01$ ,与单纯 HIV 组比较。

2.2 各组脑脊液 T 淋巴细胞百分率比较 在各组脑脊液中,T 淋巴细胞均占淋巴细胞的 80% 以上,单纯 HIV 组和神经系统 HIV 组间各 T 淋巴细胞亚群百分率比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),但与健康对照组比较,CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率均明显降低,CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞百分率、CD4/CD8 明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。见图 1。



\*: $P<0.01$ ,与健康对照组比较。

图 1 各组间脑脊液 T 淋巴细胞亚群分析

2.3 HIV 感染者与健康者 B 淋巴细胞、NK 细胞百分率及 IgG 水平比较 将单纯 HIV 组和神经系统 HIV 组合并为 HIV 感染组,结果显示 HIV 感染组和健康对照组 B 淋巴细胞和 NK 细胞百分率都非常低,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但脑脊液免疫球蛋白分析发现 HIV 感染组 IgG 水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。见表 2。

表 2 HIV 感染组与健康对照组脑脊液 B 淋巴细胞、NK 细胞百分率及 IgG 水平比较

组别	B 细胞百分率 (%)	NK 细胞百分率 (%)	IgG 水平 (mg/L)
HIV 感染组	1.41(0.16~10.27)	1.40(0.68~6.44)	58.8(23.1~203)*
健康对照组	1.08(0.17~2.17)	1.36(0.12~6.01)	20.6(10.3~51.3)

\*: $P<0.01$ ,与健康对照组比较。

3 讨 论

目前流式细胞术的临床应用主要集中在检测全血标本、骨髓标本或单个核细胞悬液的其他标本,用于分析其细胞表面标志,而对于其在脑脊液标本中的检测应用较少。国内外部分研究者已经开始应用流式细胞术检测多种神经系统疾病脑脊液 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞水平<sup>[2,4-5]</sup>,但 HIV 感染者脑脊液淋巴细胞亚群分布目前还不清楚。

本研究使用流式细胞法对 HIV 感染和健康对照者脑脊液中的淋巴细胞亚群分布百分率及绝对值进行了全面的分析。研究发现健康对照组脑脊液中细胞组成与血液明显不同,淋巴细胞占 80% 以上,CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞相对 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞等细胞较多,CD4/CD8 高于外周血,与过往研究发现的粒细胞稀少,而 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞占主导的结果一致<sup>[6]</sup>。这可能是由于在健康条件下 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞更容易通过血脑屏障,在脑脊液存在的时间更长,并在中枢神经系统中发挥免疫监视作用<sup>[7]</sup>。Ho 等<sup>[8]</sup>通过直线回归分析发现脑脊液 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的改变趋势与血液类似,说明脑脊液中淋巴细胞大部分来源于外周血中淋巴细胞的迁移。Male 等<sup>[9]</sup>模拟淋巴细胞黏附大脑内皮及跨内皮迁移的模型发现,虽然 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞均能有效地与大脑衍生的内皮细胞结合,但 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的跨内皮细胞转移能力最强。

本研究结果显示,不管是否出现中枢神经系统症状,都会出现脑脊液白细胞总数的增多,提示脑脊液淋巴细胞增多出现在 HIV 感染早期,与是否出现颅内感染无关,可能由淋巴细胞血脑屏障运输的改变引起。由于 HIV 引起的炎症导致外周血淋巴细胞激活增多,使其通过血脑屏障的能力增强,CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞通过血脑屏障都增多,但脑室内同样存在 HIV 导致的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞破坏,所以脑脊液中 CD4<sup>+</sup> T 淋

巴细胞依然表现为降低,大量活化的 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞移行至脑室内,进一步增殖、激活,出现 CD4/CD8 比例的逆转,且 CD4/CD8 比例降低程度比外周血中更为明显。在无神经系统症状的 HIV 感染者中均出现了脑脊液 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的升高,可能提示他们存在神经系统损伤的风险,尤其是 HAD 风险增高<sup>[10]</sup>。这种损伤机制目前尚不明确,大量 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的激活破坏中枢神经系统免疫自稳可能是重要原因。

神经系统 HIV 组白细胞升高最为明显,但淋巴细胞百分率与单纯 HIV 组比则相对降低,因为研究所选人群神经系统症状大多由颅内机会性感染引起,细菌感染引起的中性粒细胞增加明显。但本研究结果与蔡蓓等<sup>[2]</sup>报道的中枢神经系统感染患者脑脊液 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞明显升高的结论不一致,提示 HIV 引起的中枢神经系统感染过程中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞不能有效参与感染免疫调控。目前认为,HIV 引起的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞减少与颅内感染及神经免疫损伤有关<sup>[11]</sup>, CD4 极度减低是 HIV 神经损伤的重要预测因子<sup>[12]</sup>。

过往六色流式细胞研究表明,B 淋巴细胞和 NK 细胞在脑脊液中很少,在 HIV 感染者中将明显增加,但与其他中枢神经系统疾病(如多发性硬化、中枢神经系统感染)相比升高幅度较低<sup>[13]</sup>。本研究在 HIV 感染者中未发现这种明显差异,可能是由于本研究使用的四色检测方案,在检测低值时受到低灵敏度的限制,而本研究检测到脑脊液 IgG 的升高提示了 B 淋巴细胞免疫反应的增强。由于标本难以获得,本研究中各组人群例数较少以致检验效能不足,下一步仍需增加检测样本量。

综上所述,本研究使用流式细胞法对 HIV 感染者和健康者脑脊液淋巴细胞亚群分析后发现 HIV 感染者在早期未发生神经系统并发症时就出现脑脊液免疫功能紊乱,淋巴细胞亚群变化趋势与外周血中一致,并对 HIV 中枢神经系统并发症发生的机制进行了初步探讨,T 淋巴细胞亚群可能对 HIV 神经系统症状的发生发挥重要作用。

参考文献

[1] Maxeiner HG,Rojewski MT,Schmitt A,et al. Flow cytometric analysis of T cell subsets in paired samples of cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with neurological and psychiatric disorders[J]. Brain Behav Immun,2009,23(1):134-142.

[2] 蔡蓓,冯伟华,李立新,等. 流式细胞术分析神经系统疾病患者脑

脊液 T 淋巴细胞亚群[J]. 检验医学,2012,27(5):364-369.

[3] Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system[J]. Nat Rev Immunol,2004,4(8):648-655.

[4] Neuenburg JK, Cho TA, Nilsson A, et al. T-cell activation and memory phenotypes in cerebrospinal fluid during HIV infection[J]. J Acquir Immune Defic Syndr,2005,39(1):16-22.

[5] Cepok S, von Geldern G, Grummel V, et al. Accumulation of class switched IgD-IgM- memory B cells in the cerebrospinal fluid during neuroinflammation[J]. J Neuroimmunol,2006,180 (1-2):33-39.

[6] de Graaf MT, Smitt PA, Luitwieler RL, et al. Central memory CD4<sup>+</sup> T cells dominate the normal cerebrospinal fluid[J]. Cytometry B Clin Cytom,2011,80(1): 43-50.

[7] Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system[J]. Nat Rev,2003,3(7):569-581.

[8] Ho EL, Ronquillo R, Altmeyden H, et al. Cellular composition of cerebrospinal fluid in HIV-1 infected and uninfected subjects[J]. PLoS One,2013,18,8(6):66188.

[9] Male D, Pryce G, Linke A, et al. Lymphocyte migration into the CNS modelled in vitro[J]. J Neuroimmunol,1992,40(2/3):167-171.

[10] Lescure FX, Omland LH, Engsig FN, et al. Incidence and impact on mortality of severe neurocognitive disorders in persons with and without HIV infection: a Danish nationwide cohort study[J]. Clin Infect Dis,2011,52(2):235-243.

[11] Spudich S, Gonzalez-Scarano F. HIV-1-Related Central Nervous System Disease: Current Issues in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment[J]. Cold Spring Harbor perspectives in medicine,2012,2(6):007120.

[12] Ellis RJ, Badiee J, Vaida F, et al. CD4 nadir is a predictor of HIV neurocognitive impairment in the era of combination antiretroviral therapy[J]. Aids,2011,25(14):1747-1751.

[13] Cross AH, Stark JL, Lauber J, et al. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients[J]. J Neuroimmunol,2006,180(1/2):63-70.

(收稿日期:2015-01-11)

(上接第 1051 页)

尿病的治疗过程中要坚持长时间地应用降糖药物或胰岛素。还有研究指出,胰岛素泵的使用需要掌握其适应证,以防止高血糖和酮症酸中毒等并发症的出现<sup>[11]</sup>。

综上所述,诺和灵 30R 联合胰岛素泵治疗糖尿病合并肺部感染临床疗效明显,可改善患者预后。但仍然需要做好基础治疗,在此基础上使用诺和灵 30R 联合胰岛素泵治疗才能有效地提高临床治疗效果。

参考文献

[1] 杨玮,于瑞萍,莫晓虹. 糖尿病合并肺部感染的诊治体会[J]. 重庆医学,2010,37(16):1826-1827.

[2] 严宪才,缪英年,吴志光. 糖尿病合并肺部感染 56 例临床分析[J]. 山东医药,2010,50(29):77-79.

[3] 鲍哲,陈春青,柯赛赛,等. 糖尿病合并肺部感染危险因素分析及预防[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(6):1295-1297.

[4] 余彩霞. 3 种胰岛素治疗方案对糖尿病合并肺部感染的疗效比较[J]. 河南科技大学学报:医学版,2012,30(1):26-27.

[5] 梅坚. 胰岛素泵与诺和灵 30R 治疗糖尿病合并肺部感染的临床效果比较[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(6):1298-1299.

[6] 俞先长,蒋丽珍. 胰岛素泵治疗糖尿病合并肺部感染的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志,2011,4(1B):49-50.

[7] 张书清,杨华勤. 胰岛素治疗糖尿病合并肺部感染的疗效观察[J]. 实用心脑血管病杂志,2011,19(7):1163-1164.

[8] 李利辉,陈凯东,邹辉建,等. 胰岛素泵强化治疗 2 型糖尿病合并肺部感染的疗效观察[J]. 中国基层医药,2010,17(14):1921-1922.

[9] 刘宴成. 胰岛素泵治疗老年 2 型糖尿病合并肺部感染患者的临床分析[J]. 中国现代药物应用,2010,3(23):128-129.

[10] 虞美珍. 胰岛素泵治疗 2 型糖尿病合并肺部感染 45 例的临床评价[J]. 中国药业,2013,22(12):70-71.

[11] 李国霞. 胰岛素泵应用于糖尿病合并感染 44 例的效果评价[J]. 中国基层医药,2012,19(7):1071-1072. .

(收稿日期:2015-01-12)