

• 论 著 •

流式细胞术检测早期梅毒患者外周血细胞 T 淋巴细胞亚群

梁 平, 李喜英, 陈 宏, 何晓丹, 薛强东, 饶 娟
(东莞康华医院皮肤科, 广东东莞 523080)

摘要:目的 通过检测早期梅毒患者外周血 T 淋巴细胞亚群, 了解机体在梅毒早期感染时的细胞免疫状况, 以指导临床治疗。**方法** 应用流式细胞仪检测 59 名志愿者外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞亚群, 其中健康对照组 20 例, 一期梅毒(PS)组 10 例, 二期梅毒(SS)组 15 例, 早期潜伏梅毒(ELS)组 14 例。**结果** 早期梅毒各组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 均高于对照组, CD3⁺ 是 SS 组最高, PS 组次之, ELS 组第 3, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$), SS 组高于对照组且差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD4⁺ 为 ELS 组最高, SS 组次之, PS 组第 3, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD8⁺ 为 PS 组最高, SS 组次之, ELS 组第 3, 组间差异无统计学意义($P > 0.05$), CD4⁺/CD8⁺ 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 早期梅毒细胞免疫有增强, 这对清除 TP 是非常有利的。

关键词:梅毒; 外周血; 细胞免疫

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)10-1395-03

Flow cytometric detection of peripheral blood T lymphocyte subpopulations in patients with early syphilis

Liang Ping, Li Xiying, Chen Hong, He Xiaodan, Xue Qiangdong, Rao Juan

(Department of Dermatology and Venereology, Dongguan Kanghua Hospital, Dongguan, Guangdong 523080, China)

Abstract: **Objective** To detect the lymphocyte subpopulations in patients with early syphilis, so as to know their immunity condition and guide clinical treatment. **Methods** Flow cytometry was used to detect CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subpopulations in peripheral blood from 59 volunteers, including 20 normal individuals (Cont group), 10 patients with primary syphilis (PS group), 15 patients with secondary syphilis (SS group) and 14 patients with early latent syphilis (ELS group). **Results** CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subpopulations in each syphilis groups were higher than Cont group. SS group had the highest CD3⁺ level, second was PS group, and third was ELS group. There was significant difference among three groups ($P < 0.05$). The CD3⁺ level of SS group was significantly higher than that of Cont group ($P < 0.05$). ELS group had the highest CD4⁺ level, second was SS group, third was PS group. The difference of CD4⁺ level was significant among three groups ($P < 0.05$). PS group had the highest CD8⁺ level, second was SS group, third was ELS group. However, the difference of CD8⁺ level among three groups was not significant ($P > 0.05$). There was no significant difference of CD4⁺/CD8⁺ among three groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Cytoimmunity in early syphilis enhances, which could be benefit to eliminate Treponema Pallidum.

Key words: syphilis; peripheral blood; cytoimmunity

2003 年以来, 梅毒蔓延态势迅速, 在我国以年均 14.3% 的比例增加^[1], 早期梅毒(一期、二期和早期潜伏)传染性强, 是最重要的传染源, 也是目前防控的重点人群。梅毒螺旋体(TP)的感染初期表现为在入侵部位出现软骨样溃疡面, 称为硬下疳, 这是一期梅毒的典型临床表现。未经治疗一期梅毒的溃疡可“自愈”, 但大多数未经治疗患者于硬下疳“自愈”6~8 周后, 会在生殖器周围出现扁平湿疣和/或出现四肢、躯干等部位的铜红色斑丘疹, 这是二期梅毒的表现, 二期梅毒未经治疗也可“自愈”, 其中 30%~40% 的患者发展为三期梅毒, 表现为心血管和神经系统损害。在这个过程中还可有潜伏梅毒, 并且潜伏可以发生在上述过程中的任何阶段, 机体的细胞免疫功能与病原体的相互作用在疾病的发展和结局中起到了关键的作用。研究发现, 在接受青霉素的治疗者中有 35.71% 以上失败, 免疫学治疗成为提高疗效的新方向, 体液免疫在梅毒中对 TP 的应答并不重要, 细胞免疫在抗 TP 中起重要作用。为了解梅毒早期感染时的细胞免疫状况, 本研究应用流式细胞仪对梅毒患者进行外周血 T 淋巴细胞亚群的检测, 并与健康人群对照, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

共收入在本院门诊就诊、体检或术前检查的

志愿者 59 名, 男 38 例, 女 21 例, 平均(31.9±10.8)岁。

1.2 纳入与排除标准 梅毒组: 根据病史、临床表现和血清学检查综合诊断的梅毒患者, 知情同意, 愿意加入本研究中, 人免疫缺陷病毒(HIV)抗体阴性并且未使用过激素和抗菌药物等药物, 无严重系统疾患。健康对照组: 螺旋体抗原血清试验阴性、非螺旋体抗原血清试验和 HIV 抗体检测均为阴性, 无严重系统疾患, 自愿加入本研究。排除标准: 患有系统性疾、不愿加入本研究, 螺旋体试验或非螺旋体试验有 1 项为阴性者。

1.3 方法 FACS Calibur 流式细胞仪、淋巴细胞亚群试剂盒、红细胞裂解液和破膜剂等仪器设备和试剂是由美国 BD 公司生产。非螺旋体抗原血清试验所用的是上海荣盛生物药业有限公司生产的甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)试剂盒; 螺旋体抗原血清试验所用的是日本富士瑞必欧株式会社生产的 TP 明胶凝集试验(TPPA)试剂盒, HIV 抗体试剂盒是由北京万泰生物药业股份有限公司提供。上述各项试验的操作分别参照各种仪器及试剂说明书, 按规程由专人负责进行。

1.4 统计学处理 应用 STATA 8.0 软件包进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析; 计数资料以例数表示, 组间比较采用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

对照组20例,男16例,女4例,平均(29.6±6.7)岁,TPPA、TRUST和HIV抗体均为阴性。梅毒组中,一期梅毒(PS组)10例,男6例,女4例,平均(35.0±9.7)岁,其中TPPA阴性2例,TPPA阳性患者滴度1:320~1:10240,中位数1:2560,TRUST阴性1例,TRUST阳性患者的滴度1:8~1:64,中位数1:16,HIV抗体均为阴性;二期梅毒(SS组)15例,男10例,女5例,平均(30.3±9.8)岁,TPPA均为阳性,滴度1:1280~1:10240,中位数1:2560,TRUST滴度1:2~1:128,中位数1:32,HIV抗体均为阴性;早期潜伏梅毒(ELS组)14例,男6例,女8例,平均(34.6±16.1)岁,TPPA均为阳性,滴度1:1280~1:10240,中位数1:2560,TRUST滴度1:4~1:64,中位数1:32,HIV抗体均为阴性。对照组与梅毒各亚组间性别和年龄差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

梅毒各亚组CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺均高于对照组,CD3⁺是SS组最高,PS组次,ELS组第3,组间差异有统计学意义($P<0.05$),两两比较SS组高于对照组且差异有统计学意义($P<0.05$)。CD4⁺为ELS组最高,SS组次,PS组第3,组间差异有统计学意义($P<0.05$),两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。CD8⁺为PS组最高,SS组次,ELS组第3,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。CD4⁺/CD8⁺在对照组中最大值为1.92,最小值为0.51;PS组中最大值为3.02,最小值为0.33;SS组中最大值为1.74,最小值为0.51;ELS组中最大值为3.20,最小值为0.84,两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见表1。

表1 梅毒外周血T淋巴细胞亚群检测结果

组别	n	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ / CD8 ⁺
对照组	20	63.54±12.63	29.98±8.62	27.10±8.79	1.15±0.34
PS组	10	73.83±11.51	33.38±9.11	35.02±15.29	1.25±0.85
SS组	15	73.99±8.03	35.71±6.45	30.76±7.83	1.24±0.37
ELS组	14	68.13±8.91	37.40±7.38	29.52±5.70	1.14±0.34

3 讨 论

本研究中发现PS组有1例TPPA和TRUST均为阴性的患者,但通过病史、临床表现和随访TPPA和TRUST转阳的结果,确诊为PS;并发现另外1例患者TRUST为阳性、TPPA为阴性,也是通过病史、临床表现和随访TPPA和TRUST的结果,确诊为PS,可见TRUST转为阳性先于TPPA。对于PS的诊断,不能单纯依靠血清学,病史、临床表现及随访是很重要的。

T细胞以CD3⁺作为表面标记,反映细胞免疫功能状况,按生物学功能分为不同的亚群,各亚群相互作用但又各有其功能,共同完成免疫应答和免疫调节作用。在与颗粒性抗原接触时产生免疫作用,T淋巴细胞既可作为免疫效应细胞直接杀伤靶细胞,又可作为免疫调节细胞,辅助其他免疫细胞分化和调节免疫应答。T细胞按表型的不同可分为占外周血总淋巴细胞35%~50%的CD4⁺细胞和占外周血总淋巴细胞24%~30%的CD8⁺细胞两个细胞亚群,分别代表功能不同的两个群体。

CD4⁺细胞主要是辅助性T淋巴细胞(Th),又可以分为Th1和Th2两个亚群,TP感染刺激机体淋巴细胞活化形成

Th0细胞,并进而向Th1方向极化,Th1分泌白细胞介素-2(IL-2)和γ-干扰素(IFN-γ)等细胞因子,促进巨噬细胞抑制和杀伤TP,并可抑制Th2的功能,增强细胞免疫。早期梅毒清除机制的关键是迟发性超敏反应巨噬细胞的活化,活化的Th1细胞分泌IL-2、IFN-γ等细胞因子上调巨噬细胞的免疫反应,参与反应的巨噬细胞不仅起到吞噬细胞的作用,又能起到抗原提呈细胞的作用,上调T细胞的功能,在机体抗TP感染的过程中发挥着重要作用^[2-3]。Th2分泌白细胞介素-4(IL-4)和白细胞介素-10(IL-10)等细胞因子,与B淋巴细胞增殖、成熟和促进抗体生成有关,可增强抗体介导的免疫应答,并可下调Th1对TP的免疫应答。

CD8⁺细胞主要介导一些抗病毒和抗真菌感染的细胞免疫反应,抗螺旋体感染的免疫功能可介导TP的清除,但主要是抑制机体免疫反应,在抑制自身反应性CD4⁺细胞活性的同时,也可抑制TP制动抗体的产生,降低机体抵抗和清除TP感染的能力,造成TP的繁殖、扩散和梅毒的潜伏。CD8⁺细胞可以分为在数量上占多数的抑制性T淋巴细胞(Ts)和占少数的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)两个亚群,Ts细胞通过转化生长因子(TGF)、IL-10等细胞因子抑制Th1对TP的免疫应答,Ts增高表明细胞免疫功能受到抑制,CTL通过细胞裂解和细胞凋亡作用介导杀伤TP,而CTL增高则对清除TP有增强作用。

本研究结果表明早期梅毒CD3⁺和CD4⁺均高于对照,虽然最终只是发现SS组CD3⁺高于对照组的统计学意义,可能还在于样本量的不足,有待今后进一步增大样本量,但已经初步表明早期梅毒细胞免疫有增强,这对清除TP是非常有利的。

CD4⁺/CD8⁺综合了CD4⁺和CD8⁺两者的信息,比单独CD4⁺或CD8⁺的结果更能反映机体免疫状况。大多数感染性疾病发生时CD4⁺/CD8⁺下降,但该比值的下降只能表明存在T细胞免疫功能紊乱,还需要进一步检查,动态观察其变化更有意义。本研究中CD4⁺/CD8⁺最大值在ELS组,最小值在PS组,统计学无异常发现,早期梅毒感染者细胞免疫功能属正常范围。由于研究结果采用的是均数,不能很好地反映动态变化,如能根据感染后时间进行相应测定,可能更有利免疫学改变的解释,这种动态监测肯定是非常有帮助的。

细胞水平上的认识是有差异的,有学者认为梅毒感染者细胞免疫受抑制,从而认为临床治疗梅毒时加用免疫调节剂可以增强疗效^[4-5],尽管目前关于免疫调节治疗对梅毒的疗效有肯定的一面,但这种应用的结果还有待进一步证实。

事实上在梅毒感染过程中CD4⁺、CD8⁺和CD4⁺/CD8⁺既可以升高也可以下降,这应是人体免疫对TP应答的正确表述,即便在HIV感染早期,CD4⁺也升高,只在疾病的发展过程中CD4⁺的破坏超过合成才出现CD4⁺和CD4⁺/CD8⁺比值的下降。

本研究没有进行Th1及Th2亚群及其淋巴因子分子水平的检测,这是基于一期梅毒向二期梅毒的发展过程中始终是Th1优势这一结论。Fitzgerald^[6]综合多项动物实验的研究结果,推测在人体一期梅毒向二期梅毒的发展过程中CD4⁺亚群从Th1占优势转变为Th2占优势的漂移学说,但同时也发现有充足的实验数据支持的几乎完全相矛盾的两种结果,即人体在TP感染时外周血T淋巴细胞亚群检测既有升高也有降低。尽管目前仍有学者非常推崇Th1/Th2漂移学说,在较早期的研究中,Van等^[7]和Wicher等^[8]就完全否认一期梅毒向二期梅毒的发展过程中有Th1亚群向Th2亚群漂移,并认为在一

期梅毒向二期梅毒的发展过程中始终是 Th1 优势, 只有如此才能达到早期梅毒患者的皮疹自行消退和无症状潜伏, 近期 Leader 等^[9] 和李军等^[10] 研究再次证实与早期研究结果相一致。

外周血中 CD4⁺ 的降低和 CD8⁺ 的升高与病情的严重程度相关^[11], CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 在潜伏梅毒时升高, 在一期梅毒向二期梅毒和三期神经梅毒的发展过程中, CD4⁺ 逐步下降而 CD8⁺ 逐步升高, 但 CD4⁺ 始终高于 CD8⁺, 只是在恶性梅毒和严重的神经梅毒时, CD4⁺ 明显下降、CD8⁺ 升高才表现出 CD4⁺/CD8⁺ 明显降低。梁平等^[12] 在观察一期梅毒患者的研究中表明在硬下疳溃疡的第一周细胞免疫功能受抑制, 第二周时增强。孙莉等^[13] 研究发现随血浆反应素环状卡片试验 (RPR) 滴度增高, CD8⁺ 细胞数量升高、CD4⁺/CD8⁺ 比值降低。

目前梅毒的免疫学研究不仅是外周血或组织中 CD4⁺、CD8⁺ 等细胞和 Th1、Th2 亚群及其细胞因子的水平, 而是已经到了脑脊液的 Th17 和调节性 T 细胞的层面上^[14-15], 这是下一步研究的着眼点。总之, 梅毒感染时机体的细胞免疫可能既有抑制也有增强, 不能一味地强调梅毒感染者就是免疫抑制, 毕竟早期梅毒不经治疗只有 30%~40% 的患者发展为三期梅毒, 也就是说大部分患者的确是自愈了, 免疫调节剂的应用价值还有待进一步观察。

参考文献

- 胡冰雪, 曲波, 刘洁, 等. 中国 1990~2011 年梅毒流行特征分析与趋势预测[J]. 现代预防医学, 2014, 41(6): 961-963.
- Podwinska J, Lusiak M, Zaba R, et al. The pattern and level of cytokines secreted by Th1 and Th2 lymphocytes of syphilitic patients correlate to the progression of the disease[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000, 28(1): 1-14.
- Salazar JC, Hazlett KR, Radolf JD. The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen[J]. Microbes Infect, 2002, 4(11): 1133-1140.

(上接第 1394 页)

3 讨 论

AVE-763B 全自动尿沉渣分析仪通过全自动显微镜和数码图像采集单元的配合, 采用计算机图像处理与识别软件, 自动跟踪、识别和分类尿液中的有形成分。但在确认尿液有形成分性质方面, 显微镜检查仍是金标准^[3]。在检测过程中, 笔者发现, 该仪器对阴性标本的过筛较可靠, 但尿有形成分复杂、形态各异、干扰因素多, 会导致图像模糊, 难以辨认, 易被仪器误判造成假阳性。在审核报告时, 如因不能识别或误判有形成分而导致白细胞结果异常, 需要进行镜检复查^[4]。本研究显示 WBC 假阳性结果多由大量的红细胞引起, 占 49.5% (39/79)。当尿中出现大量红细胞时, 在机器摄取的图像中红细胞会出现蓝色的“+”, 显示是 WBC (如图 1), 而被机器误认。当尿液存在大量小圆上皮细胞时, 由于其细胞核与 WBC 体积和形态较相似, 会造成 WBC 假阳性, 占 27.9% (22/79)。笔者在检测过程中发现非晶形盐类结晶对 WBC 检测也有一定程度的影响, 会造成假阳性结果 (如图 2)。本研究中, 结晶造成的 WBC 假阳性占 16.5% (13/79)。同时, 细菌也会造成 WBC 假阳性, 占 6% (5/79)。

随着标本量的不断增多, 对每份标本都进行人工镜检是很困难的。全自动尿沉渣分析仪的普及, 解决了尿有形成分分析

- 刘金花, 杨日东, 吴志华. 免疫增强治疗对隐性梅毒患者 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 皮肤病与性病, 2013, 35(5): 257-259.
- 易恒安. 免疫增强治疗对二期梅毒预后影响的研究[J]. 贵阳医学院学报, 2013, 34(1): 151-152.
- Fitzgerald TJ. The Th1/Th2-like switch in syphilitic infection: is it detrimental[J]. Infect Immun, 1992, 60(9): 3475-3479.
- Van Voorhis WC, Barrett LK, Koelle DM, et al. Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines[J]. J Infect Dis, 1996, 173(2): 491-495.
- Wicher V, Zhao J, Dilwith R, et al. Immune abnormalities in guinea pigs with asymptomatic congenital syphilis[J]. Pediatr Res, 1997, 42(6): 794-798.
- Leader BT, Godornes C, VanVoorhis WC, et al. CD4⁺ lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis[J]. Infect Immun, 2007, 75(6): 3021-3026.
- 李军, 王林娜, 郑和义. 二期梅毒患者外周血白细胞介素-2 水平[J]. 协和医学杂志, 2012, 03(4): 395-397.
- Podwinska J, Zaba R, Chomik M, et al. The ability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of syphilitic patients to produce IL-2[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1995, 12(1): 17-27.
- 梁平, 陈宏, 何晓丹, 等. 流式细胞术分析一期梅毒外周血 T 淋巴细胞亚群[J]. 中国医疗前沿, 2013, 8(9): 8-9.
- 孙莉, 王翠玉, 李娟. 梅毒患者 T 细胞亚群测定及临床意义[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(2): 271-272.
- Li K, Wang C, Lu H, et al. Regulatory T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid of syphilis patients with and without neurological involvement[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(11): 2528-2531.
- Wang C, Zhu L, Gao Z, et al. Increased interleukin-17 in peripheral blood and cerebrospinal fluid of neurosyphilis patients[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(7): 3004-3009.

(收稿日期: 2015-01-15)

的主要问题。然而, 由于尿有形成分形态大小不一, 干扰因素多。因此, 当尿沉渣分析仪与镜检结果不符时, 应以镜检结果为准, 并结合临床资料综合分析, 必要时进行动态观察^[5]。AVE-763B 尿沉渣分析仪的检测图像需结合干化学分析结果进行人工修饰, 并认真审核结果, 从而发现问题和实施镜检复查。总之, 既要发挥仪器自动化、标准化的特点, 也应避免假阳性结果的产生, 提高结果准确度, 为临床提供准确的诊断依据。

参考文献

- 张时民. 尿液有形成分检查的进展和临床应用[J]. 中国医疗器械信息, 2006, 12(6): 7-20.
- 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 35-38.
- 丛玉隆. 尿液沉渣检查标准化的建议[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(6): 249-250.
- 黄平, 周云丽. 尿有形成分检验的现状和发展趋势[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1095-1096.
- 丛玉隆. 尿液有形成分检查及镜检筛选标准的制定[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(8): 481-483.

(收稿日期: 2015-03-12)