

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.15.006

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210409.1648.002.html\(2021-04-12\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210409.1648.002.html(2021-04-12))

HIV 感染患者外周血自然杀伤细胞的表达及其意义*

邹美银¹,朱晓红¹,陆雪峰¹,文小平¹,吴丛霞¹,庄 勋²,曹 力^{1△}

(1. 江苏省南通市第三人民医院感染科 226006; 2. 南通大学公共卫生学院, 江苏南通 226019)

【摘要】目的 探讨自然杀伤(NK)细胞对人获得性免疫缺陷病毒(HIV)感染分期的判断价值。

方法 选择 2017 年 1 月至 2019 年 12 月南通市第三人民医院首次就诊的 HIV 感染患者 1 188 例(艾滋病期 584 例、无症状期 604 例)作为 HIV 感染组,另外选取 2019 年 10—12 月体检健康者 55 例作为健康对照组,采用实时荧光 PCR 检测受试者外周血 HIV RNA,采用流式细胞技术检测外周血 CD4⁺T 淋巴细胞计数、CD8⁺T 淋巴细胞计数、NK 细胞计数并进行比较分析。绘制受试者工作特征(ROC)曲线,分析 NK 细胞计数判断 HIV 感染分期的价值。结果 HIV 感染组患者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞、NK 细胞计数与健康对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.005$);艾滋病期 HIV 感染患者 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞、NK 细胞计数及 HIV RNA 表达水平均明显低于无症状期患者($P < 0.001$);NK 细胞计数与 CD4⁺T 淋巴细胞计数、CD8⁺T 淋巴细胞计数呈正相关($r_s = 0.381, 0.354$, 均 $P < 0.001$),与 HIV RNA 呈负相关($r_s = -0.064$, $P = 0.028$);NK 细胞计数判断 HIV 感染分期的 ROC 曲线下面积为 0.694[95%CI(0.664, 0.724)], $P < 0.001$,截断值为 147 个/微升,灵敏度为 74.7%,特异度为 57.8%。多因素分析发现,NK 细胞计数判断 HIV 感染后进入艾滋病期的 Exp(B)值为 1.003[95%CI(1.002, 1.004)], $P < 0.001$ 。结论 HIV 感染患者 NK 细胞计数降低,且随疾病进展进一步下降,可作为 HIV 感染分期的判断指标之一。

【关键词】人获得性免疫缺陷病毒;感染;自然杀伤细胞;进展;相关性分析;受试者工作特征曲线

【中图分类号】R512.91 【文献标识码】A 【文章编号】1671-8348(2021)15-2544-04

Expression and significance of natural killer cells in peripheral blood of patients with HIV infection*

ZOU Meiyin¹, ZHU Xiaohong¹, LU Xuefeng¹, WEN Xiaoping¹, WU Congxia¹, ZHUANG Xun², CAO Li^{1△}

(1. Department of Infectious Diseases, Nantong Municipal Third People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226006, China; 2. School of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019, China)

【Abstract】Objective To explore the judging value of natural killer (NK) cells for the stage after human immunodeficiency virus (HIV) infection.

Methods A total of 1 188 patients with HIV infection (584 cases of AIDS stage and 604 cases of non-symptom stage) firstly visiting Nantong Municipal Third People's Hospital from January 2017 to December 2019 were selected as the HIV infection group. At the same time, 55 healthy subjects undergoing the physical examination from October to December 2019 were selected as the healthy control group. The real time fluorescent PCR was used to detect peripheral blood HIV RNA. The flow cytometry was used to detect peripheral blood CD4⁺T lymphocytes count, CD8⁺T lymphocytes count and NK cells count and the comparative analysis was conducted. The receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn. The value of NK cells count for judging HIV infection stage was analyzed. **Results** The peripheral blood CD4⁺T lymphocytes, CD8⁺T lymphocytes and NK cells counts had statistical differences between the HIV infection group and the healthy control group ($P < 0.005$). The counts of CD4⁺T lymphocytes, CD8⁺T lymphocytes and NK cells and the HIV RNA expression level in the AIDS stage of the HIV infected patients were significantly lower than those in the patients with non-symptom stage ($P < 0.001$). The NK cells count was positively correlated with the CD4⁺T lymphocytes count and CD8⁺T lymphocytes count ($r_s = 0.381, 0.354$, $P <$

* 基金项目:国家科技重大专项课题项目(2018ZX10721102);江苏省高校哲学社会科学重点项目(2018SJD11223);南通市科技局社会民生科技项目(MS12018001);南通市“十三五”科教强卫工程(青年 002)。 作者简介:邹美银(1979—),副主任医师,硕士,主要从事 HIV 临床诊疗研究。 △ 通信作者, E-mail: wowotou2002@163.com。

0.001), and negatively correlated with HIV RNA ($r_s = -0.064, P = 0.028$); the area under the ROC curve of NK cells count for judging the HIV infection stage was 0.694 [95%CI(0.664, 0.724), $P < 0.001$], the cutoff value was 147/ μL , the sensitivity was 74.7% and specificity was 57.8%. The multivariate analysis results showed that the EXP(B) value of NK cells count in judging the HIV infection entering the AIDS stage was 1.003 [95%CI(1.002, 1.004), $P < 0.001$]. **Conclusion** The NK cells count in HIV infected patients is decreased, moreover, which is further decreased with the progress of the disease, and can serve as one of the judgment indicators for HIV infection staging.

[Key words] human immunodeficiency virus; infection; natural killer cells; progression; correlation analysis; receiver operating characteristic curve

人获得性免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染人体后主要侵犯 CD4^+ T 淋巴细胞,但对其他类型的淋巴细胞是否存在影响,以及 HIV 感染人体后其他淋巴细胞与 CD4^+ T 淋巴细胞是否存在相关性,目前的报道还不多见。自然杀伤(natural killer, NK)细胞是淋巴细胞中的重要成员,占外周血单个核细胞数量的 5%~20%^[1],在抗菌、抗病毒、抗肿瘤过程中起到重要作用^[2]。但其对 HIV 感染者免疫功能是否存在影响目前尚少有报道,本研究通过对 HIV 感染后无症状期、艾滋病期患者外周血 NK 细胞的表达水平进行分析,研究 NK 细胞对 HIV 感染者免疫功能的影响,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 1 月至 2019 年 12 月在南通市第三人民医院就诊的 1 188 例 HIV 感染者作为研究对象,男 996 例,女 192 例,中位年龄 45.6(31.4, 54.7)岁;艾滋病期 584 例、无症状期 604 例;605 例通过同性性行为感染,573 例通过异性性行为感染,3 例通过静脉吸毒感染,不明感染途径 7 例。纳入标准:(1)诊断符合《中国艾滋病诊疗指南(2018 年版)》^[3]相关要求;(2)未接受过或正在接受抗逆转录病毒治疗。排除标准:(1)HIV 急性期感染者;(2)合并机会性肿瘤、机会性感染、自身免疫性疾病者;(3)合并乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、梅毒螺旋体感染者。另选取 2019 年 10—12 月在南通市第三人民医院体检中心体检健康人群 55 例作为健康对照组,男 44 例,女 11 例,中位年龄 39.1(28.2, 62.0)岁。本研究经南通市第三人民医院伦理委员会审核通过,并取得所有受试者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞检测

入选病例在就诊当天自外周静脉抽取空腹血液 2 mL,在 4 h 内采用流式细胞检测的方法检测 NK 细胞、 CD4^+ T 淋巴细胞、 CD8^+ T 淋巴细胞,严格按说明书进行操作。检测仪器采用 Bricyte E6 流式细胞仪,配套抗体为异硫氰酸荧光素标记的 $\text{CD3}(\text{CD3-FITC})$ /藻红蛋

白标记的 $\text{CD8}(\text{CD8-PE})$ /多甲藻叶绿素蛋白标记的 $\text{CD45}(\text{CD45-PerCP})$ /别藻蓝蛋白标记的 $\text{CD4}(\text{CD4-APC})$ 、 $\text{CD3-FITC}/\text{CD16} + 56\text{-PE}/\text{CD45-PerCP}/\text{CD19-APC}$ 两套抗体(抗体均由深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司提供)。以 $\text{FITC-CD3} + \text{APC-CD4}^+$ 细胞为 CD4^+ T 淋巴细胞, $\text{FITC-CD3} + \text{PE-CD8}^+$ 细胞为 CD8^+ T 淋巴细胞; $\text{FITC-CD3} + \text{PE-CD16} + 56$ 细胞为 NK 细胞。

1.2.2 HIV RNA 检测

入选病例在就诊当天自外周静脉抽取空腹血液 2 mL,采用实时荧光 PCR 技术检测,严格按说明书操作,试剂盒由美国 BD 公司提供。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析。正态分布或近似正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验或方差分析;偏态分布计量资料以中位数及其四分位数间距 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,比较采用秩和检验;计数资料以例数或百分比表示,比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法;相关分析采用 Pearson 相关或 Spearson 相关;绘制受试者工作特征(ROC)曲线,计算最佳预测值、灵敏度、特异度;采用 logistic 二元回归进行多因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组性别、年龄比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); HIV 感染组患者外周血 CD4^+ T 淋巴细胞、 CD8^+ T 淋巴细胞、NK 细胞计数均低于健康对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。HIV 感染组患者外周血 HIV RNA 表达水平为 $\lg 4.67(4.06, 5.24)$ 。

2.2 不同分期 HIV 感染患者淋巴细胞及 HIV RNA 表达水平比较

HIV 感染无症状期患者外周血 NK 细胞、 CD4^+ T 淋巴细胞、 CD8^+ T 淋巴细胞计数及 HIV RNA 表达水平均高于艾滋病期患者,差异有统计学意义 ($P < 0.001$),见表 2。

表 1 两组一般资料比较

组别	<i>n</i>	性别 (男/女, <i>n/n</i>)	年龄 [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅), 岁]	CD4 ⁺ T 淋巴细胞 [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅), 个/微升]	CD8 ⁺ T 淋巴细胞 [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅), 个/微升]	NK 细胞 [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅), 个/微升]
HIV 感染组	1 188	996/192	45.6(31.4, 54.7)	203(79, 317)	652(417, 980)	121(62, 210)
健康对照组	55	44/11	39.1(28.2, 62.0)	633(463, 926)	505(306, 736)	343(245, 516)
<i>Z/χ</i> ²		0.567	0.182	9.97	3.148	9.254
<i>P</i>		0.452	0.855	<0.001	0.002	<0.001

表 2 不同分期 HIV 感染患者淋巴细胞及 HIV RNA 表达水平比较

指标	艾滋病期 (<i>n</i> =584)	无症状期 (<i>n</i> =604)	<i>Z/χ</i> ²	<i>P</i>
性别(男/女, <i>n/n</i>)	508/76	488/116	8.401	0.004
感染途径			1.829	0.609
同性感染	300	305		
异性感染	278	295		
静脉吸毒	1	2		
不明途径	5	2		
年龄 [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅), 岁]	48.08 (35.34, 57.12)	42.08 (29.61, 52.89)	5.815	<0.001
CD4 ⁺ T 淋巴细胞 [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅), 个/微升]	78.0(26.0, 142.7)	316.0(251.0, 417.5)	29.833	<0.001
CD8 ⁺ T 淋巴细胞 [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅), 个/微升]	493.0 (304.5, 722.0)	834.0(593.0, 1193.7)	15.682	<0.001
NK 细胞 [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅), 个/微升]	87.0(46.0, 150.0)	165.0(94.3, 271.8)	11.592	<0.001
HIV RNA lg [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	4.51(3.89, 4.99)	4.87(4.34, 5.50)	8.204	<0.001

2.3 HIV 感染患者外周血 NK 细胞计数与 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞及 HIV RNA 的相关性

NK 细胞计数与 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞计数呈正相关($r=0.381, 0.354$, 均 $P<0.001$), 与 HIV RNA 表达水平呈负相关($r=-0.064, P=0.028$)。

2.4 NK 细胞计数对 HIV 感染后分期判断的多因素分析

采用不同分期 HIV 感染患者单因素分析中有统计学意义的因素, 包括年龄、HIV RNA、CD8⁺T 淋巴细胞、NK 细胞计数作为自变量, HIV 感染分期作为因变量, 应用 logistic 二元回归明确 NK 细胞能否作为判断指标, 结果显示年龄、HIV RNA、NK 细胞、CD8⁺T 淋巴细胞计数均为独立判断因素($P<0.05$), 见表 3。

2.5 NK 细胞计数对 HIV 感染分期的诊断价值

NK 细胞计数判断 HIV 感染后分期的 ROC 曲线

下面积为 0.694 [95%CI (0.664, 0.724)], $P<0.001$, 其截断值 (cutoff 值) 为 147 个/微升, 灵敏度为 74.7%, 特异度为 57.8%, 见图 1。

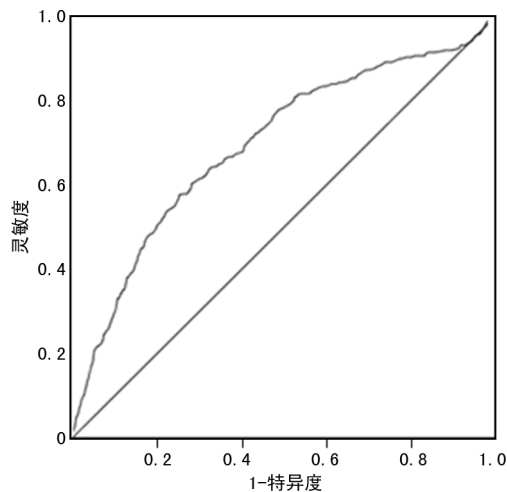


图 1 NK 细胞计数判断 HIV 感染后分期的 ROC 曲线

表 3 NK 细胞计数对 HIV 感染后分期判断的 logistic 二元回归多因素分析

指标	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Wals</i>	<i>P</i>	<i>Exp</i> (<i>B</i>)	95%CI	
						下限	上限
年龄	-0.014	0.005	7.678	0.006	0.987	0.977	0.996
Lg(HIV RNA)	-0.573	0.075	58.461	<0.001	0.564	0.487	0.653

续表 3 NK 细胞计数对 HIV 感染后分期判断的 logistic 二元回归多因素分析

指标	B	SE	Wals	P	Exp(B)	95%CI	
						下限	上限
NK 细胞	0.003	0.001	25.717	<0.001	1.003	1.002	1.004
CD8 ⁺ T 细胞	0.002	0.000	120.709	<0.001	1.002	1.002	1.003
常量	1.171	0.413	8.042	0.005	3.225		

3 讨 论

HIV 侵入人体后,主要影响 CD4⁺T 淋巴细胞,是否影响 NK 细胞,不同的研究结果存在差异。有研究认为 HIV 感染后,NK 细胞对 HIV 有直接或者间接的抗病毒作用^[4-6];还有研究认为,HIV 感染后 CD4⁺T 淋巴细胞高表达抑制 NK 细胞发挥杀伤作用的配体,低表达活化 NK 细胞发挥作用的配体,认为 NK 细胞对 HIV 感染后疾病的进程无明显作用^[7-8];还有研究认为,NK 细胞对 HIV 有负性调节作用^[5]。本研究对 HIV 感染患者 NK 细胞计数进行分析,结果表明 HIV 感染患者 NK 细胞计数明显低于健康对照组,与赵磊等^[9]的研究结果相似。且随着疾病的进展,NK 细胞计数明显降低,艾滋病期患者 NK 细胞计数明显低于无症状期患者,可作为 HIV 感染后不同分期的判断指标。此外,NK 细胞计数与 CD4⁺T 淋巴细胞、CD8⁺T 淋巴细胞呈正相关,与 HIV RNA 表达水平呈负相关,与孔万仲等^[10]的研究相似。从一定程度上说明 NK 细胞可能对 HIV 具有杀伤作用。分析原因:(1)慢性 HIV 感染后细胞凋亡因子上调^[11],NK 细胞凋亡增多;(2)由于 NK 细胞凋亡增多,对 HIV 的影响作用减弱,进一步加速了 CD4⁺T 淋巴细胞损伤;(3)同样,由于 CD8⁺T 淋巴细胞表面细胞凋亡因子上调,随着疾病进展 CD8⁺T 淋巴细胞计数也明显下降^[11],且与患者的预后密切相关^[12]。

由于 HIV 感染的不同阶段 NK 细胞计数存在明显差异。本研究采用 ROC 曲线分析 NK 细胞计数判断 HIV 感染不同分期的价值。结果表明,NK 细胞计数判断 HIV 感染分期的 ROC 曲线下面积为 0.694,cutoff 值为 147 个/微升,灵敏度达到 74.7%,提示 NK 细胞计数对 HIV 感染分期有一定的判断价值。本研究还发现,HIV 感染患者的年龄与 HIV 感染分期相关,这与既往多项研究结果相一致^[13-14],进一步证实了随着感染时间的延长,HIV 不断复制,导致患者 CD4⁺T 淋巴细胞耗竭、凋亡^[15]。

综上所述,HIV 感染患者 NK 细胞计数明显下降,且随着病情进展进一步下降,其对 HIV 感染分期有一定判断价值。但本研究有一定的局限性,只是单中心研究,且有关机制未能得到进一步研究。因此,NK 细胞对 HIV 感染患者抗病毒治疗效果是否具有

预测价值仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] CARREGA P, FERLAZZO G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues [J]. *Front Immunol*, 2012, 3:347.
- [2] NARANBHAI V, ALTFELD M, ABDOOL KARIM Q, et al. Natural killer cell function in women at high risk for HIV acquisition: insights from a microbicide trial [J]. *AIDS*, 2012, 26(14):1745-1753.
- [3] 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组, 中国疾病预防控制中心. 中国艾滋病诊疗指南 (2018 版) [J]. *中华临床感染病杂志*, 2018, 11(6):411-432.
- [4] HE X, SIMONEAU C R, GRANOFF M E, et al. Assessment of the antiviral capacity of primary natural killer cells by optimized in vitro quantification of HIV-1 replication [J]. *J Immunol Methods*, 2016, 434:53-60.
- [5] JIANG Y, YANG M, SUN X, et al. IL-10⁺ NK and TGF-β⁺ NK cells play negative regulatory roles in HIV infection [J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1):80.
- [6] MAY M E, POHLMAYER C W, KWAA A K, et al. Combined effects of HLA-B * 57/5801 elite suppressor CD8⁺ T cells and NK cells on HIV-1 replication [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10:113.
- [7] MAVILIO D, LOMBARDO G, KINTER A, et al. Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(10):2339-2350.
- [8] PRADA N, ANTONI G, COMMO F, et al. Analysis of NKp30/NCR3 isoforms in untreated HIV-1-infected patients from the ANRS SE-ROCO cohort [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(3):e23472.

(下转第 2553 页)

- eritoneal repair of an asymptomatic inguinal hernia[J]. *Surg Endosc*, 2018, 32(2):813-819.
- [8] ITANI K M F, FITZGIBBONS R. Approach to groin hernias[J]. *JAMA Surg*, 2019, 154(6):551-552.
- [9] RANA G, ARMIJO P R, KHAN S, et al. Outcomes and impact of laparoscopic inguinal hernia repair versus open inguinal hernia repair on healthcare spending and employee absenteeism[J]. *Surg Endosc*, 2020, 34(2):821-828.
- [10] POKALA B, ARMIJO P R, FLORES L, et al. Minimally invasive inguinal hernia repair is superior to open: a national database review[J]. *Hernia*, 2019, 23(3):593-599.
- [11] 程家平, 文坤明, 李建国, 等. 腹腔镜经腹腔腹膜前疝修补与开放式网塞填充式无张力修补术治疗腹股沟复发疝对比分析[J]. *重庆医学*, 2017, 46(20):2842-2844.
- [12] BITTNER IV J G, CESNIK L W, KIRWAN T, et al. Patient perceptions of acute pain and activity disruption following inguinal hernia repair: a propensity-matched comparison of robotic-assisted, laparoscopic, and open approaches[J]. *J Robot Surg*, 2018, 12(4):625-632.
- [13] TONG Y S, WU C C, BAI C H, et al. Effect of extraperitoneal bupivacaine analgesia in laparoscopic inguinal hernia repair: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Hernia*, 2014, 18(2):177-183.
- [14] 何文, 杨柳, 黄耿文, 等. 腹腔镜下腹股沟疝修补术后疼痛调查[J]. *中华疝和腹壁外科杂志(电子版)*, 2015, 9(5):53-54.
- [15] O'REILLY E A, BURKE J P, O'CONNELL P R. A meta-analysis of surgical morbidity and recurrence after laparoscopic and open repair of primary unilateral inguinal hernia. *Ann Surg*. 2012 May; 255(5):846-53.
- [16] CAPARELLI M L, SHIKHMAN A, RUNYAN B, et al. The use of tamsulosin to prevent postoperative urinary retention in laparoscopic inguinal hernia repair: a randomized double-blind placebo-controlled study[J]. *Surg Endosc*. (2020-10-06) [2020-12-10]. <https://doi.org/10.1007/s00464-020-08050-0>.
- [17] WEI W, FANOUS M. Tamsulosin in the prevention of postoperative urinary retention after laparoscopic inguinal hernia repair[J]. *Am Surg*. (2020-11-01) [2020-12-10]. <https://doi.org/10.1177/0003134820952428>.

(收稿日期:2020-12-29 修回日期:2021-04-03)

(上接第 2547 页)

- [9] 赵磊, 王念跃, 张红梅. AIDS 患者与正常人 CD8CD25、CD4CD25、B 淋巴细胞、NK 细胞与 NKT 细胞计数对照研究[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(10):1857-1859.
- [10] 孔万仲, 胡型忠, 梁世周, 等. 艾滋病患者 NK 细胞数量与疾病进展及 HAART 免疫应答相关性研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(15):2198-2201.
- [11] NORRIS S, COLEMAN A, KURI-CERVANTES L, et al. PD-1 expression on natural killer cells and CD8⁺ T cells during chronic HIV-1 infection[J]. *Viral Immunol*, 2012, 25(4):329-332.
- [12] HELLEBERG M, KRONBORG G, ULLUM H, et al. Course and clinical significance of CD8⁺ T-cell counts in a large cohort of HIV-infected individuals[J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(11):1726-1734.
- [13] HOVE-SKOVGAARD M, ZHAO Y, TINGSTEDT J L, et al. Impact of age and HIV status on immune activation, senescence and apoptosis[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:583569.
- [14] 余丰, 吴继周, 覃成龙, 等. 老年 HIV 感染者/AIDS 患者临床特点及治疗效果分析[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2017, 31(2):173-176.
- [15] DOITSH G, GREENE W C. Dissecting how CD4 T cells are lost during HIV infection[J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(3):280-291.

(收稿日期:2020-12-18 修回日期:2021-04-08)