

• 论 著 •

流式细胞术检测二期梅毒患者外周血淋巴细胞亚群^{*}

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

摘 要:目的 检测二期梅毒外周血淋巴细胞亚群, 了解机体在二期梅毒的免疫状况。方法 选择本院门诊就诊、体检或术前检查的 35 例志愿者, 按照其检测结果将其分为健康对照组与二期梅毒组。应用流式细胞仪检测两组患者外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 和 CD19⁺ 淋巴细胞亚群。结果 二期梅毒组 CD3⁺ 和 CD4⁺ 均高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P=0.008\ 5, 0.038\ 4$), CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 高于健康对照组, 但差异无统计学意义 ($P=0.210\ 8, 0.395\ 2$); 二期梅毒组 CD19⁺ B 淋巴细胞低于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P=0.006\ 0$)。结论 增强二期梅毒患者细胞免疫力有利于消除梅毒螺旋体。

关键词:二期梅毒; 外周血; 淋巴细胞亚群

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)02-0163-03

Flow cytometric detection of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with secondary syphilis^{*}

Liang Ping, Chen Hong, He Xiaodan, Xue Qiangdong

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

Abstract: Objective To detect lymphocyte subpopulations in patients with secondary syphilis and to know their immunity condition. **Methods** Flow cytometry was used to detect CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD19⁺ lymphocyte in peripheral blood from 35 volunteers, including 15 patients with secondary syphilis and 20 normal human. **Results** There were significant differences in CD3⁺ and CD4⁺ ($P=0.008\ 5, 0.038\ 4$), CD3⁺ and CD4⁺ in secondary syphilis group were higher than that in the normal group. There were not significant differences in CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ($P=0.210\ 8, 0.395\ 2$). There were significant differences in CD19⁺ ($P=0.006\ 0$), CD19⁺ in the normal group were higher than that in the secondary syphilis group. **Conclusion** Enhancing the immunity of patients with secondary syphilis is benefit to eliminating treponema pallidum.

Key words: secondary syphilis; peripheral blood; lymphocyte subsets

梅毒是由梅毒螺旋体(TP)感染引起的一种性传播疾病, 自然感染 TP 时在感染部位会出现富含病原体的硬下疳。硬下疳不经治疗可“自愈”, 大多数患者于硬下疳“自愈”6~8 周后出现皮肤黏膜、骨骼、眼等二期梅毒损伤, 是否发展为三期梅毒与二期梅毒时期的症状相关。二期梅毒损伤广泛者一般不会发生晚期活动性梅毒, 只有二期梅毒症状轻并有 TP 慢性病灶者才会发展为三期梅毒, 这可能与 TP 特异性抗原浓度低而免疫原性弱有关。人体免疫力与病原体相互作用在疾病的发展与结局中起到了重要的作用。但人体免疫力并不是完全有效的, 可表现为传染性免疫, 即当机体有 TP 感染时才产生免疫力。为了解机体在二期梅毒的免疫状况, 本研究应用流式细胞仪对二期梅毒患者进行外周血 T、B 淋巴细胞亚群的检测, 并与健康人群对照, 观察在二期梅毒时淋巴细胞亚群的变化, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院门诊就诊、体检或术前检查的 35 例志愿者为研究对象, 其中男 21 例, 女 14 例, 按照其检测结果将其分为健康对照组与二期梅毒组。健康对照组 20 例, 男 14 例, 女 6 例, 平均(29.5±6.75)岁; 二期梅毒组 15 例, 男 7 例, 女 8 例, 平均(30.3±9.8)岁; 15 例患者 TP 明胶凝集试验(TPPA)全部阳性, 滴度 1:1 280~1:10 240, 中位数 1:2 560, 甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)滴度 1:2~1:128, 中位数 1:32, 人类免疫缺陷病毒(HIV)检测均显示为阴性(一); 健康对照组 20 例 TPPA、TRUST 和 HIV 均为阴性。两

组被试一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$), 组间具有可比性。

1.2 纳入与排除标准 二期梅毒组纳入标准: (1)根据病史、临床表现和血清学检查综合诊断的二期梅毒患者; (2)患者知情同意, 并愿意加入本研究中; (3)HIV 抗体阴性并且未用过激素和抗菌药物等治疗; (4)无严重系统疾病。二期梅毒组排除标准: (1)有系统性疾病; (2)不愿加入本研究; (3)TP 或非螺旋体试验有一项为阴性者。健康对照组纳入标准: (1)TP 血清试验阴性、非螺旋体抗原血清试验和 HIV 均为阴性; (2)无严重系统疾病; (3)自愿加入本研究。

1.3 仪器与试剂 美国 BD 公司 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。上海荣盛生物药业有限公司的 TRUST 试剂盒; 日本富士瑞必欧株式会社的 TPPA 试剂盒, 北京万泰生物药业股份有限公司的 HIV 抗体试剂盒。各试验参照各种仪器及试剂说明书操作规程由专人进行。

1.4 方法 抽取患者外周静脉血 2 mL, 加肝素抗凝, 免疫样品制备前在 4℃下保存。样品制备: 取上述研究对象抗凝全血 100 μL, 分别加入前述单抗各 20 μL, 混匀; 再加入红细胞溶解液 2 mL, 放置 10 min, 以破坏红细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 用磷酸盐缓冲液(PBS)混匀, 离心 5 min, 弃上清液; 加 PBS 1 mL, 混匀进行检测, 标本采集 12 h 内完成检测。

1.5 统计学处理 应用 STATA8.0 软件包进行数据处理及统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验;

^{*} 基金项目: 广东省东莞市科学技术局资助项目(20131051010221)。 作者简介: 梁平, 男, 副主任医师, 主要从事梅毒临床和相关基础研究。

以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

二期梅毒组 $CD3^{+}$ 和 $CD4^{+}$ 均高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P=0.008\ 5, 0.038\ 4$), $CD8^{+}$ 、 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 高于健

康对照组, 但差异无统计学意义 ($P=0.210\ 8, 0.395\ 2$); 二期梅毒组 $CD19^{+}$ B 淋巴细胞低于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P=0.006\ 0$)。见表 1。

表 1 2 组被试外周血淋巴细胞亚群水平比较

组别	<i>n</i>	$CD3^{+}(\%)$	$CD4^{+}(\%)$	$CD8^{+}(\%)$	$CD4^{+}/CD8^{+}$	$CD19^{+}(\%)$
健康对照组	20	63.54±12.63	29.97±8.62	27.10±8.79	1.11±0.98	17.06±8.11
二期梅毒组	15	73.99±8.03	35.71±6.45	30.76±7.83	1.16±0.82	9.24±4.96
<i>t</i>	—	7.84	4.65	1.63	−0.85	9.09
<i>P</i>	—	0.008 5	0.038 4	0.210 8	0.395 2	0.006 0

—:无数据。

3 讨 论

近年来国内梅毒报告发病例数持续增长, 二期梅毒占 40% 以上, 30%~40% 未经治疗的二期梅毒最终发展为三期梅毒, 由于二期梅毒传染性大, 所以是控制梅毒发展的重要环节。梅毒感染时细胞免疫和体液免疫均对 TP 有清除作用, $CD3^{+}$ 是 T 淋巴细胞表面标志, $CD19^{+}$ 是 B 淋巴细胞表面标志。TP 是颗粒性抗原, 体液免疫在二期梅毒中对 TP 的应答并不重要^[1], 细胞免疫在抗 TP 中起重要作用。动物接种实验也表明, 死的 TP 并不能刺激机体产生免疫, 只有接种减毒的活 TP 才能激活机体免疫, 可见梅毒感染引起的免疫反应是细胞介导的。

外周血 $CD3^{+}$ 细胞代表 T 淋巴细胞的总体, 在梅毒皮疹中 $CD3^{+}$ 细胞是局部浸润的主要炎性细胞, 反应机体特异性免疫应答能力, 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, TP 的脂蛋白成分是 T 淋巴细胞趋化的动力^[2]。 $CD3^{+}$ 细胞按表型不同分为 $CD4^{+}$ 细胞和 $CD8^{+}$ 细胞两个细胞亚群。 $CD4^{+}$ 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, 并向 Th1 方向极化, Th1 分泌白细胞介素(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。Th2 分泌 IL-4 和 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, CTL 通过细胞裂解和细胞凋亡作用介导杀伤 TP。 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 比值综合了 $CD4^{+}$ 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, 二期梅毒组 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 比值虽高于健康对照组但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 总体反映二期梅毒的免疫功能并无明显下降。

目前国内流行的观点认为, 二期梅毒 $CD3^{+}$ 、 $CD4^{+}$ 和 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 均低于正常, 外周血与皮损组织中的 T 细胞分布相反, 并且 $CD4^{+}$ 亚群中 Th2 占优势^[3-4], 因此机体细胞免疫受抑制, 这是造成 TP 潜伏体内形成长期慢性感染的重要因素。这种观点是基于 Fitzgerald^[5]综合多项动物实验的研究结果进行的推测, 即一期梅毒向二期梅毒进展中 $CD4^{+}$ 亚群从 Th1 占优势转变为 Th2 占优势, 以上结论与本研究结果完全矛盾。本研究结果表明二期梅毒组 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$ 细胞均高于健康对照组, $CD4^{+}$ 上升且比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。说明二期梅毒患者细胞免疫功能有所增强, 有利于消除或抗 TP 感染, 这与传染性免疫是一致的。二期梅毒组 $CD19^{+}$ 低于健康

对照组, 这种降低也可能与高滴度抗体形成的反馈抑制作用有关, 从另一个侧面也反映二期梅毒患者中 Th1 占优势。

Leader 等^[6] 在免疫接种实验的研究结果表明, 兔睾丸中 $CD4^{+}$ 细胞随病情的进展分别在感染后第 18 天和第 39 天出现一个双峰波, 在第 25 天时出现一个波谷, 此时 $CD4^{+}$ 的下降可能是宿主体内 TP 清除、抗原刺激减少而导致细胞免疫反应下调的结果^[7]。整个过程中 $CD8^{+}$ 细胞缓慢上升, 但总量始终低于 $CD4^{+}$ 细胞, 这与本研究外周血中结果是相一致。Wicher 等^[8] 对豚鼠先天性梅毒的研究表明, 在外周血、脾和淋巴结中 $CD4^{+}$ 升高、 $CD8^{+}$ 降低、 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 比值均升高。van Voo-rhis 等^[9] 的研究发现, 在人体一期梅毒和二期梅毒的皮损中, 只含有 Th1 细胞因子的 IL-2、IFN- γ 和 IL-12, 完全没有 Th2 的细胞因子, 也就是说人体一期和二期梅毒的细胞免疫反应均以 Th1 细胞占优势。

看似矛盾的两种结果可能都是对二期梅毒免疫一个侧面的反映, 二期梅毒的 T 淋巴细胞亚群既可能下降也可能上升, 这与病情严重程度密切相关。人体免疫反应受到严格而复杂的调控, 在杀伤病原体的同时要避免自身误伤, 三期梅毒的损伤就是机体细胞免疫反应引起的组织损伤。人体接种试验表明, 树胶肿是小量具有毒力的 TP 在致敏的宿主体内, 通过激发宿主迟发性超敏反应造成的结果^[10]。Podwinska 等^[11] 对成人获得性梅毒的研究结果表明, 外周血中 $CD4^{+}$ 水平和 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 比值在潜伏梅毒时升高, 随病情从一期梅毒、二期梅毒向神经梅毒发展过程中, $CD4^{+}$ 逐步下降, $CD8^{+}$ 逐步升高, 但仍不改变 $CD4^{+}$ 高于 $CD8^{+}$ 的结果, 外周血中 $CD4^{+}$ 的降低和 $CD8^{+}$ 的升高与病情严重程度相关, 只有在恶性梅毒和严重神经梅毒时, $CD4^{+}$ 明显下降、 $CD8^{+}$ 升高才表现为 $CD4^{+}/CD8^{+}$ 比值明显降低。梁平等^[12] 对一期梅毒患者的研究表明, 在硬下疳溃疡的第 1 周细胞免疫功能受抑制, 第 2 周时增强, 这与本研究结果完全一致。当机体免疫杀伤作用使 TP 被大量清除时, 外来抗原对机体的免疫刺激作用下降, 机体通过免疫调节对下调特异性免疫应答, 此时的免疫接近于健康人群的结果, 可能由于机体免疫下调作用太强、太快, 部分未被清除的 TP 潜伏下来, 造成慢病程感染。

虽然有青霉素的特效治疗, 仍有 30% 以上患者治疗失败, 因此开发新的治疗方案一直在进行中, 免疫学治疗成为新的方向。但 TP 不同于其他病原体, 普通方法无法染色, 体外无法培养, 疫苗对预防 TP 的传播也没有成功, TP 与人体免疫系统的相互作用并不完全清楚, 研究结果也有许多矛盾之处, 免疫学调节剂的应用只是在免疫受抑制时才有效, 而且起效时间较长, 其可行性值得探讨, 还必须更深入、全面地了解 TP 的免疫学性质, 才能提出更好的治疗方案。

(下转第 167 页)

有文献报道了“快速抗菌药物敏感试验方法的建立”,该方法通过测定 6 h 时水解酪蛋白(M-H)液体培养基中蛋白质水平变化得到 AST 结果^[3],虽然快速(6 h 时获得 AST 结果),但试验方法操作繁琐。也有文献报道了“用显色半固体进行快速细菌药敏试验的方法”,结果显示,氯化三苯甲基四氮唑(TTC)显色半固体琼脂法与 K-B 法同时测定细菌药物敏感度的比较,两种药敏方法敏感度完全相同或基本相同的合计有 509 例,占 96.4%,标准菌株用 TTC 显色半固体琼脂法和 K-B 法进行药敏试验的结果比较,两者药敏抑菌环直径毫米数比较差异无统计学意义($P>0.05$),同时结果显示在 3 h 内有 96.8% 的菌株可得出 AST 结果,5 h 100.0% 的菌株可得出 AST 结果,但该试验方法操作也较繁琐^[4]。另有文献报道了“一种新的细菌药敏试验方法的探讨”^[5],该方法与文献[4]报道的方法基本一致,结果也近似。文献[6]报道了一种改进的快速 K-B 圆盘敏感度测试法,该方法使用四唑染料的衍生物来增强细菌生长区和抑制区之间的抑菌圈轮廓,6~7 h 可获得 AST 结果,该方法简单,但其获得 AST 结果的时间长于本研究的快速 K-B 法。K-B 法 AST 除了可用于细菌外,还可用于酵母菌^[7]、真菌^[5],也可用于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的检测^[8]。

细菌的耐药性日趋严重,已经成为医学界的重大难题,加强细菌耐药性的监测已经迫在眉睫。相关文献报道,金黄色葡萄球菌耐药率最高的前 4 位抗菌药物为青霉素 G(87.32%)、红霉素(87.32%)、苯唑西林(80.28%)、阿奇霉素(76.06%),都大于 76%^[9]。大量文献报道金黄色葡萄球菌有很高的耐药率^[10-11]。相关研究显示,多种细菌有很广的耐药谱和很高的耐药率^[12]。这些应引起医学界的高度重视。

综上所述,快速 K-B 法快速而准确,获得 AST 结果的时间,快速 K-B 法比细菌自动鉴定仪快数小时,比标准 K-B 法快许多,K-B 法虽然较快速 K-B 法慢,但也比细菌自动鉴定仪快 1 h 以上,比标准 K-B 法快许多。标准 K-B 法进行 AST,无需等待 18~24 h 观测抑菌环直径获得 AST 结果,只要肉眼可见

抑菌环,即可测试其直径。

参考文献

- [1] 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,2006:890-923.
- [2] Lubner P, Bartelt E, Genschow E, et al. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3): 1062-1068.
- [3] 李琳,田青友,曹蕾.快速抗生素敏感试验方法的建立[J].华北煤炭医学院学报,2005,7(3):280-281.
- [4] 李先斌,莫丽亚,赵蕊,等.用显色半固体进行快速细菌药敏试验的方法[J].实用预防医学,2006,13(2):443-444.
- [5] 李慧.一种新的细菌药敏试验方法的探讨[J].医药世界,2006,8(9):63-64.
- [6] Boyle VJ, Fancher ME, Ross RW Jr. Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1973, 3(3): 418-424.
- [7] 崔健丽,张辉,李春霞,等.改良纸片扩散法检测 172 株酵母菌对酮康唑的敏感性[J].中国抗感染化疗杂志,2005,5(4):235-236.
- [8] 周美容,龙伟清,凌寿坚.两种检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的 K-B 法应用评价[J].国际检验医学杂志,2006,27(12):1090-1091.
- [9] 王恒秋,张广清.上呼吸道感染儿童金黄色葡萄球菌感染率和药物敏感试验[J].国际检验医学杂志,2011,32(12):1090-1091.
- [10] 蒋彦芳,周黎.金黄色葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[J].检验医学与临床,2008,5(24):1501-1502.
- [11] 陈月燕,席云,肖刚,等.葡萄球菌医院感染及耐药谱分析[J].国际内科学杂志,2007,34(9):500-503.
- [12] 韩兰芳,方建平.化脓性中耳炎病原菌及耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2008,29(6):551-553.

(收稿日期:2014-11-30)

(上接第 164 页)

参考文献

- [1] 张晓东,脱朝伟,宋芳吉,等.二期梅毒皮肤组织超微结构的研究[J].中国皮肤性病杂志,2000,14(3):162-163.
- [2] Salazar JC, Cruz AR, Pope CD, et al. Treponema pallidum elicits innate and adaptive cellular immune responses in skin and blood during secondary syphilis: a flow-cytometric analysis[J]. J Infect Dis, 2007, 195(6): 879-887.
- [3] 邹循辉,樊翌明,吴志华.二期梅毒患者细胞免疫水平及与梅毒发病的相关性[J].中国热带医学,2008,8(3):393-394.
- [4] 黄小雄,邹循辉,樊翌明,等.二期梅毒患者外周血 Th1/Th2 及 Tc1/Tc2 的研究[J].中国皮肤性病杂志,2006,20(8):469-470.
- [5] Fitzgerald TJ. The Th1/Th2-like Switch in syphilitic infection: is it detrimental? [J]. Infect Immun, 1992, 60(9): 3475-3479.
- [6] Leader BT, Godornes C, Vanvoorhis WC. CD4(+) lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis[J]. Infect Immun, 2007, 75(6): 3021-3026.

- [7] Arroll TW, Centurion-Lara A, Lukehart SA, et al. T-cell responses to treponema pallidum subsp. pallidum antigens during the course of experimental syphilis infection[J]. Infect Immun, 1999, 67(9): 4757-4763.
- [8] Wicher V, Zhao J, Dilworth R, et al. Immune abnormalities in Guinea pigs with asymptomatic congenital syphilis[J]. Pediatr Res, 1997, 42(6): 794-798.
- [9] 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.
- [10] 吴志华.梅毒的病因与发病机理[M].2 版.广州:广东人民出版社,2002:71-84.
- [11] 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 Mic, 1995, 12(1): 17-27.
- [12] 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.

(收稿日期:2014-09-08)