

• 论 著 •

淋巴细胞亚群在新型冠状病毒肺炎患者外周血中的表达及临床意义^{*}

李 泉¹, 聂 珂^{1△}, 乔正荣², 代 涛¹, 吴小兰², 李勇朴³, 柏 艳¹, 左福林⁴, 周丽莉¹, 朱小岚¹, 彭孝斌⁵
(重庆市长寿区人民医院:1. 医学检验科;2. 感染科;3. 呼吸重症科;4. 放射科, 重庆 401220;
5. 重庆市长寿区疾病预防控制中心检验科, 重庆 401220)

摘 要:目的 探讨淋巴细胞亚群在新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者外周血中的表达及临床意义。方法 选取 2020 年 1 月 18 日至 2 月 25 重庆市长寿区人民医院收治的 25 例新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸检测为阳性的患者为研究对象,其中 21 例有临床症状、确诊为 COVID-19 的患者为 COVID-19 组;4 例无临床症状但 SARS-CoV-2 核酸检测为阳性的患者为无症状感染组;选取同期体检的 20 例健康者为对照组。检测各组淋巴细胞亚群,分析各组不同淋巴细胞水平的差异。结果 21 例 COVID-19 患者中,18 例患者的总淋巴细胞计数(Lym#)低于参考区间下限,3 例患者的 Lym# 在正常参考区间内;20 例患者的自然杀伤细胞计数(NK#)低于参考区间下限,1 例患者的 NK# 在参考区间内。COVID-19 组 T 淋巴细胞百分比、B 淋巴细胞百分比高于对照组($P<0.05$),NK 细胞百分比(NK%)、Lym#、T 淋巴细胞计数、CD4⁺ T 淋巴细胞计数、CD8⁺ T 淋巴细胞计数、NK# 低于对照组($P<0.05$)。COVID-19 组 NK# 及 NK% 低于无症状感染组($P<0.05$)。结论 COVID-19 患者存在淋巴细胞亚群水平异常,其中 NK 细胞下降显著;COVID-19 组、无症状感染组与健康组淋巴细胞亚群水平存在差异,提示淋巴细胞亚群在 COVID-19 的诊断、病情评估中可能具有一定的临床价值。

关键词:新型冠状病毒肺炎; 淋巴细胞亚群; 自然杀伤细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.010

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2020)17-2092-04

文献标识码:A

Expression of lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with novel coronavirus pneumonia and its clinical significance^{*}

LI Quan¹, NIE Ke^{1△}, QIAO Zhengrong², DAI Tao¹, WU Xiaolan²,
LI Yongpu³, BAI Yan¹, ZUO Fulin⁴, ZHOU Lili¹, ZHU Xiaolan¹, PENG Xiaobin⁵
(1. Department of Medical Laboratory; 2. Department of Infectious Diseases;
3. Department of Respiratory Critical Care; 4. Department of Radiology, People's Hospital of
Chongqing Changshou District, Chongqing 401220, China; 5. Department of Clinical Laboratory,
Center for Disease Control and Prevention of Changshou District, Chongqing 401220, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with corona virus disease 2019 (COVID-19). **Methods** A total of 25 patients who tested positive for the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) nucleic acid tested in People's Hospital of Chongqing Changshou District from January 18 to February 25, 2020 were selected as the research objects. Among them, 21 patients with clinical symptoms and confirmed as COVID-19 were included in the COVID-19 group, 4 patients with no clinical symptoms but positive with the SARS-CoV-2 nucleic acid test were included in the asymptomatic infection group, and 20 healthy patients who received physical examination during the same period were selected as control group. The lymphocyte subgroups of each group were detected and the differences in the levels of lymphocyte subgroups in each group were analyzed. **Results** Among the 21 COVID-19 patients, the total lymphocyte count (Lym#) of 18 patients was lower than the lower limit of reference interval, the Lym# of 3 patients was within the lower limit of reference interval; the natural killer cell count (NK#) of 20 patients was lower than the reference interval, and 1 patient's NK# was within the normal reference interval. The percentage of T lymphocytes and B lymphocytes in the COVID-19 group

^{*} 基金项目:重庆长寿区科技计划项目(CS2020XG009)。

作者简介:李泉,男,主任技师,主要从事血液骨髓细胞形态学分析相关研究。△ 通信作者, E-mail:1730868700@qq.com。

本文引用格式:李泉,聂珂,乔正荣,等.淋巴细胞亚群在新型冠状病毒肺炎患者外周血中的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2020,41(17):2092-2095.

were higher than those of the control group ($P < 0.05$), NK cell percentage (NK%), Lym#, T lymphocyte count, CD4⁺ T lymphocyte count. The CD8⁺ T lymphocyte count and NK# were lower than those in the control group ($P < 0.05$). The NK# and NK% in the COVID-19 group were lower than those in the asymptomatic infection group ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of lymphocyte subsets in COVID-19 patients are abnormal, among which NK cells decrease significantly. There are differences in the levels of lymphocyte subsets in the COVID-19 group, asymptomatic infection group and healthy control group, suggesting that the lymphocyte subsets may have certain clinical value in diagnosis and disease assessment in COVID-19.

Keywords: corona virus disease 2019; lymphocyte subsets; natural killer cells

2019 年 12 月,湖北省武汉市出现多起不明原因肺炎病例。目前,该肺炎被证实为一种新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染所致,且这种病毒存在人传人现象^[1-2]。该病毒属于冠状病毒科 β 属,直径 60~140 nm,具有多形性,外有包膜,内含圆形或椭圆形颗粒,国际病毒分类学委员会将其命名为 SARS-CoV-2^[3]。国家卫生健康委员会目前已将 SARS-CoV-2 感染所致新型冠状病毒肺炎(COVID-19)纳入乙类传染病,并采取甲类传染病的预防、控制措施进行管理^[4]。COVID-19 的主要临床表现以发热、乏力、干咳等呼吸道感染症状为主,少数患者伴有鼻塞、流涕、咽痛和腹泻等,但有部分患者表现为隐匿发病,无明显症状。重症 COVID-19 患者在发病 1 周后可出现呼吸困难和(或)低氧血症,并快速进展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和出、凝血功能障碍,最终导致患者死亡^[5-6]。目前实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 SARS-CoV-2 核酸阳性是 COVID-19 诊断的金标准^[4]。《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)》^[4]将发病早期白细胞总数正常或降低、淋巴细胞计数减少定为 COVID-19 的临床表现之一,但目前关于 COVID-19 患者淋巴细胞亚群检测的相关研究较少。本研究探讨了外周血淋巴细胞亚群在 COVID-19 患者中的表达水平及临床意义,以期对 COVID-19 的早期诊断和治疗提供实验室依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 1 月 18 日至 2 月 25 于重庆市长寿区人民医院住院治疗的 25 例 SARS-CoV-2 核酸检测阳性的患者为研究对象。其中 21 例确诊为 COVID-19,有发热、咳嗽、乏力等临床症状,SARS-CoV-2 核酸检测阳性的患者纳入 COVID-19 组;4 例无临床症状,但 SARS-CoV-2 核酸检测为阳性的患者纳入无症状感染者组。COVID-19 组男 10 例,女 11 例;年龄为 12~76 岁,平均(51.84±6.24)岁。无症状感染者组男 2 例,女 2 例;年龄为 50~57 岁,平均(53.00±0.51)岁。选取同期体检的 20 例健康者为对照组,其中男 9 例,女 11 例;年龄为 15~66 岁,平均(43.05±5.48)岁。COVID-19 诊断标准^[4-5]:符合流行病学相关特征、符合疾病相关临床表现,且咽拭子/痰液/纤维支气管镜灌洗液检测 SARS-CoV-2 核

酸为阳性。3 组研究对象年龄、性别等基本资料比较,差异无统计学意义($P < 0.05$),具有可比性。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪(型号 BriCyte E6)、CD3/CD16⁺56/CD45/CD19 检测试剂(流式细胞法-FITC/PE/PerCP/APC)和 CD3/CD8/CD45/CD4 检测试剂(流式细胞法-FITC/PE/PerCP/APC)均由深圳迈瑞科技有限公司提供。

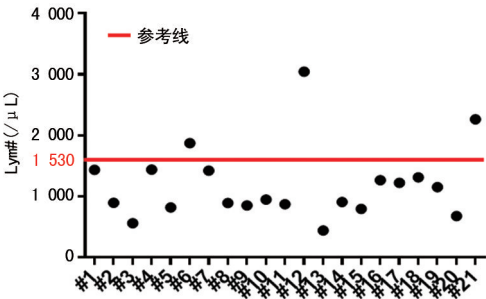
1.3 检测方法 研究对象均采集乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝静脉血 2 mL 作为待测标本。取试管 2 支,1 支试管中加入 20 μL CD3/CD8/CD45/CD4 试剂,标记为“T”,另 1 支试管中加入 20 μL CD3/CD16⁺56/CD45/CD19 试剂,标记为“BNK”;然后分别向 2 支试管中加入待测标本 50 μL,混匀,室温避光孵育 15 min;再分别向 2 支试管中加入 450 μL 1×溶血素,混匀,室温避光孵育 5~10 min,上机检测。总淋巴细胞计数参考区间:≥1 530/μL;自然杀伤细胞计数(NK#)参考区间:≥84/μL。

1.4 观察指标 分析 COVID-19 组与无症状感染者组患者总淋巴细胞计数(Lym#)及 NK# 水平;比较 3 组淋巴细胞亚群检测结果,包括 T 淋巴细胞百分比(T%)、B 淋巴细胞百分比(B%)、NK 细胞百分比(NK%)、CD4⁺ T 淋巴细胞百分比(CD4⁺ T%)、CD8⁺ T 淋巴细胞百分比(CD8⁺ T%)、Lym#、T 淋巴细胞计数(T#)、B 淋巴细胞计数(B#)、CD4⁺ T 淋巴细胞计数(CD4⁺ T#)、CD8⁺ T 淋巴细胞计数(CD8⁺ T#)、NK#、CD4⁺ T# 与 CD8⁺ T# 比值(CD4⁺ T/CD8⁺ T)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件进行数据分析,采用 GraphPad Prism 6.0 绘图。偏态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

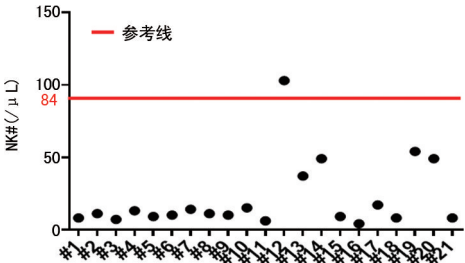
2 结果

2.1 COVID-19 组患者 Lym# 及 NK# 水平 21 例 COVID-19 患者中,18 例(85.71%)患者的 Lym# 水平低于参考区间下限,3 例(14.29%)患者的 Lym# 水平在正常参考区间内,见图 1。20 例(95.24%)患者的 NK# 水平低于参考区间下限,且 19 例患者的 NK# 水平均低于 50/μL,严重者仅为 4/μL;仅 1 例患者的 NK# 水平在正常参考区间内,见图 2。



注: #1~#21 分别代表 21 例确诊为 COVID-19 且有临床症状患者。

图 1 COVID-19 组患者的 Lym# 水平



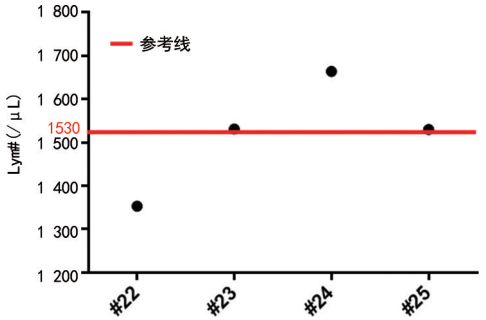
注: #1~#21 分别代表 21 例确诊为 COVID-19 且有临床症状患者。

图 2 COVID-19 组患者的 NK# 水平

2.2 无症状感染组患者 Lym# 及 NK# 水平 在 4 例无症状感染患者中, 仅有 1 例患者的 Lym# 水平为 1 353/ μ L, 略低于参考区间下限, 其他患者的 Lym#、NK# 水平均在参考区间内。见图 3~4。

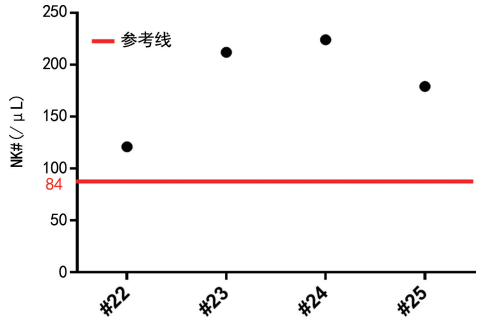
2.3 3 组淋巴细胞亚群检测结果比较 3 组间 T%、B%、NK%、Lym#、T#、CD4⁺T#、CD8⁺T#、NK# 水平比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。CO-

VID-19 组 T%、B% 水平高于对照组, NK%、Lym#、T#、CD4⁺T#、CD8⁺T#、NK# 水平低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。COVID-19 组 NK# 及 NK% 水平低于无症状感染者, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。



注: #22~#25 分别代表 4 例核酸检测阳性但无临床症状的患者。

图 3 无症状感染患者 Lym# 水平



注: #22~#25 分别代表 4 例核酸检测阳性但无临床症状的患者。

图 4 无症状感染组患者 NK# 水平

表 1 3 组淋巴细胞亚群结果分析 [$M(P_{25}, P_{75})$]

指标	COVID-19 组 ($n=21$)	无症状感染者 ($n=4$)	对照组 ($n=20$)	P
T%	72.78(57.22, 85.40)	75.98(70.74, 85.70)	65.98(38.76, 83.14)	0.023
CD4 ⁺ T%	38.42(1.26, 57.34)	44.98(38.32, 51.22)	36.20(25.32, 50.14)	0.103
CD8 ⁺ T%	27.63(0.90, 51.66)	29.41(17.56, 39.67)	25.41(9.94, 47.50)	0.649
B%	13.07(0.24, 26.36)	9.68(3.60, 15.76)	9.41(4.48, 23.60)	0.037
NK%	2.04(0.32, 8.34)	11.76(8.66, 13.98)	20.28(5.72, 51.34)	<0.000 1
CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T	1.69(0.29, 4.52)	1.72(1.13, 2.92)	1.67(0.54, 3.63)	0.983
Lym# ($/\mu$ L)	1 198(446, 3 045)	1 520(1 353, 1 664)	1 812(1 219, 2 971)	<0.000 1
T# ($/\mu$ L)	886(306, 2 600)	1 148(1 097, 1 177)	1 213(662, 2 188)	0.004
CD4 ⁺ T# ($/\mu$ L)	432(38, 894)	669(586, 799)	636(409, 1 103)	0.005
CD8 ⁺ T# ($/\mu$ L)	297(27, 682)	430(274, 517)	475(160, 1 171)	0.023
B# ($/\mu$ L)	143(7, 380)	156(50, 279)	170(69, 464)	0.499
NK# ($/\mu$ L)	22(4, 103)	184(121, 224)	359(115, 922)	<0.000 1

3 讨 论

淋巴细胞是人体的免疫细胞, 在不同部位分化成熟, 可分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞。淋巴细胞是在适应性免疫中起关键作用的细胞, 是免疫

系统的核心成分, 使免疫系统具备识别和记忆抗原等能力, 从而清除入侵机体的细菌、病毒等。

本文通过对 21 例 COVID-19 患者与 20 例健康体检者的淋巴细胞亚群进行分析发现, 85.71% 的

COVID-19 患者表现为 Lym# 减少, 95.24% 的 COVID-19 患者表现为 NK 细胞减少, 且与对照组比较, Lym#、T#、CD4⁺T#、CD8⁺T# 水平均降低 ($P < 0.05$)。SARS-CoV-2 可侵袭患者的淋巴结和脾等免疫器官, 不断增殖, 从而感染更多的淋巴细胞和单核细胞, 致其凋亡, 因此 COVID-19 患者表现为淋巴细胞减少。但有研究发现, 在 SARS-CoV-2 感染后, 短时间内机体为了对抗 SARS-CoV-2 感染, 会产生特异性 T 淋巴细胞免疫反应, 所以 COVID-19 患者感染早期可表现为 T% 和 B% 高于对照组^[7]。

NK 细胞具有细胞毒效应, 无需抗原预先致敏就能杀伤靶细胞, 其杀伤作用早于 T 淋巴细胞, 因此在病毒感染后的早期免疫反应中发挥着重要作用。然而, 为了适应 NK 细胞的选择压力, 许多病毒已经具备了逃逸宿主 NK 细胞免疫反应的策略, 大致包括上调 NK 细胞抑制信号^[8]、下调 NK 细胞激活信号^[9]、黏附分子^[10]及分子模拟策略^[11]。本研究发现, 与对照组比较, COVID-19 组患者 NK%, NK# 显著降低 ($P < 0.05$)。COVID-19 患者 NK 细胞减少的原因可能与以下相关: (1) 患者本身免疫功能存在缺陷, NK 细胞数量较少; (2) NK 细胞在对抗 SARS-CoV-2 时发生自身消耗, 机体的造血系统未能及时补充; (3) SARS-CoV-2 感染机体后, 侵犯机体免疫系统, 病变累及淋巴结、扁桃体、脾和骨髓, 出现多器官功能障碍, 破坏 NK 细胞或抑制 NK 细胞的生成^[9-10]。以上 3 点单独或同时存在都可能造成人体在感染初期无法通过 NK 细胞来及时清除被病毒感染的细胞, 最终导致 COVID-19 的发生。本研究 4 例无症状感染患者中, 仅有 1 例患者的总淋巴细胞计数为 $1\,353/\mu\text{L}$, 略低于正常参考值, 其他患者的 Lym#、NK# 均在正常参考区间内。可能是由于 SARS-CoV-2 感染后, 无症状感染者自身免疫功能强, 产生大量 NK 细胞杀伤病毒, 保护机体各器官不受损伤, 所以未表现出临床症状^[11]。此外, 本研究观察到部分治疗恢复期的 COVID-19 患者临床症状与 NK# 有关, NK# 恢复正常的患者其临床症状恢复时间短于 NK# 异常者, 但由于病例数较少, 未进行相关统计分析, 后续将进一步研究验证。

4 结 论

COVID-19 患者存在淋巴细胞亚群水平的异常, 其中 NK 细胞下降明显; COVID-19 患者、无症状感染者与健康者淋巴细胞亚群水平存在差异, 提示淋巴细胞亚群在 COVID-19 的诊断、病情评估中可能具有一定的临床价值; 此外, 通过淋巴细胞亚群检测还能了解患者的机体免疫情况, 有利于判断预后。

参考文献

[1] TAN W, ZHAO X, MA X, et al. A novel coronavirus ge-

nome identified in a cluster of pneumonia cases—Wuhan, China 2019—2020[J]. China CDC Weekly, 2020, 2(4): 61-62.

[2] CHAN J F, YUAN S, KOK K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 514-523.

[3] RALPH R, LEW J, ZENG T, et al. 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness[J]. J Infect Dev Ctries, 2020, 14(1): 3-17.

[4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第五版)的通知(国卫办医函[2020]103号)[EB/OL]. (2020-02-04)[2020-02-06]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440.shtml>.

[5] 李太生, 曹玮, 翁利, 等. 北京协和医院关于“新型冠状病毒肺炎”诊疗建议方案(V2.0)[J/OL]. 协和医学杂志, (2020-01-29)[2020-02-28]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182654.htm>.

[6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)的通知(国卫办医函[2020]145号)[EB/OL]. (2020-2-18)[2020-2-21]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.

[7] YANG Y, LU Q, LIU M, et al. Epidemiological and clinical features of the 2019 novel coronavirus outbreak in China[EB/OL]. (2020-02-12)[2020-02-24]. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.10.20021675v2>.

[8] ACHDOUT H, MANASTER I, MANDELBOIM O. Influenza Virus Infection Augments NK Cell Inhibition through Reorganization of Major Histocompatibility Complex Class I Proteins[J]. J Virol, 2008, 82(16): 8030-8037.

[9] STERN-GINOSSAR N, SALEH N, GOLDBERG M D, et al. Analysis of human cytomegalovirus-encoded microRNA activity during infection[J]. J Virol, 2009, 83(20): 10684-10693.

[10] BANERJEE P, FEUER G, BARKER E. Human T-Cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p12I Down-Modulates ICAM-1 and-2 and reduces adherence of natural killer cells, thereby protecting HTLV-1-Infected primary CD4⁺ T cells from autologous natural killer Cell-Mediated cytotoxicity despite the reduction of major histocompatibility complex class I molecules on infected cells[J]. J Virol, 2007, 81(18): 9707-9717.

[11] LAZEAR E, PETERSON L W, NELSON C A, et al. Crystal structure of the cowpox Virus-Encoded NKG2D ligand OMCP[J]. J Virol, 2013, 87(2): 840-850.