

• 论 著 •

免疫功能与新型冠状病毒肺炎康复患者核酸检测结果复阳的关系研究^{*}

佟 乐^{1,2,3}, 张崇唯⁴, 曹 钰^{1,2,3}, 叶 磊^{1,2,3,△}

(1. 四川大学华西医院急诊科, 四川成都 610041; 2. 四川大学华西护理学院, 四川成都 610041;

3. 四川大学灾难医学中心, 四川成都, 610041; 4. 四川大学华西医院实验医学科, 四川成都, 610041)

摘 要:目的 探讨免疫功能与新型冠状病毒肺炎(COVID-19)康复患者核酸检测结果复阳的关系。方法 选取 2020 年 1 月 23 日至 3 月 5 日四川大学华西医院收治的 100 例 COVID-19 确诊患者作为研究对象, 其中经治疗核酸检测结果转阴后再次复阳的患者 42 例为复阳组, 经治疗核酸检测结果转阴且未复阳的患者 58 例为非复阳组。比较两组细胞免疫相关指标[T 淋巴细胞(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)、B 淋巴细胞(CD19⁺)、NK 细胞(CD16⁺56⁺)]和体液免疫相关指标[免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 M(IgM)、免疫球蛋白 G(IgG)、补体 C3、补体 C4]的水平差异; 分析导致核酸检测结果复阳的独立危险因素。结果 复阳组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺ 水平均明显低于非复阳组, CD8⁺、CD16⁺56⁺ 水平均明显高于非复阳组, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 复阳组 IgA、IgM、IgG、补体 C3、补体 C4 水平均明显低于非复阳组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。多因素 Logistic 回归分析结果显示, CD4⁺/CD8⁺、IgG、补体 C3、补体 C4 是 COVID-19 康复患者核酸检测结果复阳的独立危险因素($P<0.05$)。结论 体液免疫、细胞免疫与 COVID-19 康复患者核酸检测结果复阳有关, 其中 CD4⁺/CD8⁺、IgG、补体 C3、补体 C4 是 COVID-19 康复患者核酸检测结果复阳的独立危险因素。

关键词:新型冠状病毒肺炎; 核酸检测; 体液免疫; 细胞免疫

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.18.018

中图法分类号:R563.1

文章编号:1673-4130(2020)18-2251-04

文献标识码:A

Study on the relationship between immune function and positive recurrence of nucleic acid test results of recovered patients with Corona Virus Disease 2019^{*}

TONG Le^{1,2,3}, ZHANG Chongwei⁴, CAO Yu^{1,2,3}, YE Lei^{1,2,3,△}

(1. Department of Emergency, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. West China School of Nursing, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 3. Institute of Disaster Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 4. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between immune function and positive recurrence of nucleic acid test results of recovered patients with Corona Virus Disease 2019 (COVID-19). **Methods** A total of 100 confirmed COVID-19 patients admitted to West China Hospital of Sichuan University from January 23 to March 5, 2020 were selected as the research objects. Among them, 42 patients whose nucleic acid test results return to positive again after the treatment of nucleic acid test results turned negative were selected as the positive recurrence group, and 58 patients whose nucleic acid test results turned negative after treatment and did not return to positive were selected as the non-positive recurrence group. The levels of cellular immune-related indicators [T lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺), B lymphocytes (CD19⁺), NK cells (CD16⁺56⁺)] and humoral immune-related indicators [immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin M (IgM), immunoglobulin G (IgG), complement C3 and complement C4] were compared between the two groups. The independent risk factors for the positive recurrence of nucleic acid test results were analyzed. **Results** The levels of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺ in the positive recurrence group were significantly lower than those in the non-positive recurrence group, and the levels of CD8⁺, CD16⁺56⁺ were significantly higher than those

^{*} 基金项目:四川省科学技术厅应对新型冠状病毒科技攻关应急项目(2020YFS0009);四川大学华西医院新型冠状病毒肺炎疫情科技攻关项目(HX-2019-nCoV-029)。

作者简介:佟乐,男,护师,主要从事急危重症和灾害救援研究。△ 通信作者, E-mail:yelei1117@126.com。

本文引用格式:佟乐,张崇唯,曹钰,等.免疫功能与新型冠状病毒肺炎康复患者核酸检测结果复阳的关系研究[J].国际检验医学杂志, 2020, 41(18): 2251-2254.

in the non-positive recurrence group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$); the levels of IgA, IgM, IgG, complement C3 and complement C4 in the positive recurrence group were significantly lower than those in the non-positive recurrence group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that the levels of $CD4^+/CD8^+$, IgG, complement C3 and complement C4 were the independent risk factors for the positive recurrence of nucleic acid test results in recovered patients with COVID-19 ($P < 0.05$). **Conclusion** Humoral immunity and cellular immunity are related to the positive recurrence of nucleic acid test results in recovered patients with COVID-19, and the levels of $CD4^+/CD8^+$, IgG, complement C3 and complement C4 were the independent risk factors for the positive recurrence of nucleic acid test results in recovered patients with COVID-19.

Key words: Corona Virus Disease 2019; nucleic acid test; humoral immunity; cellular immunity

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)属于 β 属冠状病毒,有包膜,颗粒呈圆形或椭圆形,常为多形性,直径60~140 nm。新型冠状病毒肺炎(COVID-19)目前已纳入乙类传染病,并按甲类传染病管理^[1]。SARS-CoV-2的基因特征与中东呼吸综合征冠状病毒有明显区别^[2-3]。SARS-CoV-2的潜伏期一般为1~14 d,多数为3~7 d,极个别患者潜伏期可达24 d^[4]。当SARS-CoV-2入侵机体后,机体会进行免疫防御并产生特异性抗体,其中特异性的免疫球蛋白M(IgM)抗体是机体感染后早期产生的抗体,可提示目前存在感染或近期感染;而免疫球蛋白G(IgG)抗体是再次免疫应答时产生的主要抗体,可提示患者处于恢复期或既往感染^[5]。此外,在SARS-CoV-2感染过程中,特异性T淋巴细胞通过释放淋巴因子发挥重要作用^[6-7]。有研究表明, $CD3^+$ 的水平随着机体免疫功能的提升而升高; $CD4^+$ 能够调节机体免疫功能,为机体

T淋巴细胞增生提供良好的条件;而 $CD8^+$ 可以有效抑制B淋巴细胞、T淋巴细胞活性,减少抗体产生^[8]。本研究初步分析了免疫功能与COVID-19康复患者SARS-CoV-2核酸检测结果复阳的关系,以期对COVID-19的防控工作提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2020年1月23日至3月5日四川大学华西医院收治的100例COVID-19确诊患者作为研究对象,其中经治疗核酸检测结果转阴后再次复阳的患者42例为复阳组,经治疗核酸检测结果转阴且未复阳的患者58例为非复阳组。COVID-19诊断标准参照《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》^[9]。两组患者年龄、性别、合并肺部疾病、合并慢性病、舒张压、收缩压、糖化血红蛋白水平、血脂异常情况等一般资料比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表1。

表 1 两组一般资料比较

组别	<i>n</i>	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	男/女 (<i>n</i> / <i>n</i>)	合并肺部疾病 (<i>n</i>)	合并慢性病 (<i>n</i>)	舒张压 ($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	收缩压 ($\bar{x} \pm s$, mm Hg)	糖化血红蛋白 ($\bar{x} \pm s$, %)	血脂异常 (<i>n</i>)
复阳组	42	52.90±18.32	23/19	8	13	75.69±22.18	121.69±24.25	7.3±2.2	12
非复阳组	58	53.43±15.77	29/29	13	18	76.31±21.95	124.11±19.67	7.0±2.5	16
<i>t</i> / χ^2		0.318	1.581	0.518	1.239	0.442	0.481	0.623	0.266
<i>P</i>		0.625	0.472	0.765	0.521	0.560	0.529	0.380	0.813

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 所有患者入院后给予化痰、抗感染、维持内环境稳定、对症支持等常规综合治疗。症状较重者在常规综合治疗的基础上,给予经鼻持续气道正压通气治疗^[3]。呼气末正压(PEEP)初次设定为4 cm H₂O,气流量设定为1~12 L,每分钟吸氧浓度控制在30%~60%。根据患者的动脉血二氧化碳分压和动脉血氧分压调节其氧气吸入浓度和PEEP,使其血气分析处于正常状态,即吸入氧浓度 $\leq 30\%$,PEEP降至2~3 cm H₂O,动脉血二氧化碳分压 $> 95\%$ 。治疗12~24 h后,改用鼻导管吸氧,随后逐渐停止供氧。若患者烦躁不安,则采用水合氯醛灌肠镇静;若患者的烦躁难以控制,可静脉持续泵入咪达唑

仑镇静。若以上治疗无效,则进行气管插管机械通气治疗,并在治疗前0.5 h和治疗后24 h观察患者的临床表现,积极预防心功能不全及消化道出血等并发症。

1.2.2 检测方法 两组患者确诊时采集外周静脉血5 mL,经4 000 r/min离心5 min后,收集血清标本,保存于-70 ℃冰箱中待测。采用流式细胞术检测T淋巴细胞、B淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞,包括 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、 $CD19^+$ 、 $CD16^+56^+$,仪器为BD FACSAria II流式细胞仪(美国BD公司),结合专用软件获取数据。采用免疫散射比浊法检测患者免疫球蛋白A(IgA)、IgM、IgG和血清补体C3、补体C4水平,试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子股

份有限公司,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 观察指标 细胞免疫相关指标:比较复阳组和非复阳组外周血 T 淋巴细胞(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺)、B 淋巴细胞(CD19⁺)、NK 细胞(CD16⁺56⁺)的水平差异。体液免疫相关指标:比较复阳组和非复阳组 IgA、IgM、IgG、补体 C3、补体 C4 的水平差异。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用多因素 Logistic 回

归进行独立危险因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组细胞免疫相关指标水平比较 复阳组 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺ 水平均明显低于非复阳组,CD8⁺、CD16⁺56⁺ 水平均明显高于非复阳组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 两组体液免疫相关指标水平比较 复阳组 IgA、IgM、IgG、补体 C3、补体 C4 水平均明显低于非复阳组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 两组细胞免疫相关指标水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺ (%)	CD16 ⁺ 56 ⁺ (%)
复阳组	42	64.21±7.54	34.97±5.47	26.17±4.01	1.34±0.31	11.64±1.97	23.01±5.41
非复阳组	58	71.26±8.06	40.28±6.28	24.41±3.87	1.65±0.43	12.41±2.08	16.21±4.28
<i>t</i>		5.365	5.395	2.625	5.043	2.255	8.038
<i>P</i>		<0.001	<0.001	0.010	<0.001	0.026	<0.001

表 3 两组体液免疫相关指标水平比较($\bar{x} \pm s$,g/L)

组别	<i>n</i>	IgA	IgM	IgG	补体 C3	补体 C4
复阳组	42	1.86±0.54	1.16±0.37	9.85±1.31	1.07±0.18	0.21±0.08
非复阳组	58	2.43±0.86	1.43±0.41	12.54±1.53	1.26±0.23	0.35±0.11
<i>t</i>		4.904	4.122	11.320	5.565	8.869
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 核酸检测结果复阳的危险因素 以复阳结果作为因变量,单因素分析中差异有统计学意义的指标作为自变量进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示,CD4⁺/CD8⁺、IgG、补体 C3、补体 C4 是 COVID-19 康复患者核酸检测结果复阳的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 核酸检测结果复阳的危险因素分析

变量	β	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>
补体 C3	1.822	0.390	21.826	<0.001	6.184	2.879~13.282
补体 C4	1.582	0.312	25.710	<0.001	4.865	2.639~8.967
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.523	0.642	5.628	0.018	4.586	1.303~16.140
IgG	2.261	0.874	6.692	0.010	9.593	1.730~53.199

3 讨 论

相关研究显示,CD4⁺/CD8⁺失衡,CD8⁺异常激活,调节性 T 淋巴细胞数目减少所致的免疫抑制效应是导致感染性疾病的主要原因^[10-11]。SARS-CoV-2 感染患者细胞免疫紊乱程度加重,主要表现为 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平明显降低,CD8⁺水平明显升高。CD4⁺是常见的辅助性 T 淋巴细胞,可促进细胞免疫效应;CD8⁺具有免疫抑制效应,并可对毒性细胞发挥抑制作用^[12-13]。本研究结果显示,复阳组患者 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺ 水平均明显低于非复阳组患者,CD8⁺、CD16⁺56⁺ 水平均明显高于非

复阳组患者,提示 SARS-CoV-2 感染可能通过抑制 T 淋巴细胞的活化功能,最终导致免疫炎症反应;同时,SARS-CoV-2 侵袭机体后通过黏附因子附着于宿主细胞,再释放毒性物质损伤宿主细胞的抗原结构,通过刺激 B 淋巴细胞释放自身抗体,最终导致免疫紊乱。但关于 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞分布平衡紊乱的具体机制尚有待进一步研究^[14]。结合本研究结果,T 淋巴细胞、NK 细胞和 B 淋巴细胞免疫失衡可能参与了 COVID-19 康复患者核酸检测结果复阳的过程。

抗体的本质是能与抗原特异性结合的具有免疫功能的球蛋白,但是非特异性的具有免疫功能的球蛋白也具有重要作用。体液免疫在病原微生物感染中发挥免疫防御的作用,在血液中表现为 IgA、IgM、IgG 的水平变化。IgA 对局部黏膜组织发挥重要的免疫保护效应,机体感染时,血清 IgA 水平明显降低;IgM 是机体早期体液免疫应答产生的抗体;IgG 属于抗感染抗体之一,其在抗细菌感染和抗病毒感染中发挥重要作用。相关研究显示,SARS-CoV-2 感染患者体液免疫功能明显降低,主要表现为血清 IgA、IgG、IgM 水平下降^[15]。另有研究显示,感染性疾病患者常常合并免疫功能紊乱,且与病情严重程度具有密切的关系,表现为 IgA 合成不足与 IgM、IgG 合成过度^[16]。病原体感染机体后,通过激活补体系统,抑制 T 淋巴细胞分泌细胞因子或 B 淋巴细胞分泌抗体而发挥免

疫抑制作用,但治愈后的二次感染则可能通过激活补体系统,导致中性粒细胞趋化因子和白细胞生成、聚集,最终导致自身免疫损伤。本研究结果显示,复阳组患者 IgA、IgM、IgG、补体 C3、补体 C4 水平均较非复阳组患者明显降低,提示 COVID-19 康复患者核酸检测结果复阳可能与体液免疫相关指标水平异常有关。进一步行危险因素分析发现,CD4⁺/CD8⁺、IgG、补体 C3、补体 C4 是 COVID-19 患者核酸检测结果复阳的独立危险因素。

4 结 论

体液免疫、细胞免疫与 COVID-19 康复患者核酸检测结果复阳有关,其中 CD4⁺/CD8⁺、IgG、补体 C3、补体 C4 是 COVID-19 康复患者核酸检测结果复阳的独立危险因素。但本研究样本量较小,后续需扩大样本量进一步研究验证。

参考文献

[1] 肖慧娟,谷艳博,梁盼,等. CT 征象及动态变化对 COVID-19 疑似病例鉴别诊断的价值[J/OL]. 郑州大学学报(医学版),2020(2020-03-20)[2020-03-22]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/41.1340.R.20200319.1909.001.html>.

[2] 宋江秀,张忠会,赵帅眉,等. 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)防治用中药专利信息研报[J]. 药物评价研究,2020,43(4):565-590.

[3] 刘钱,贺桢翔,杨慧,等. 基于网络药理学和分子对接法探索肺毒清治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的潜在活性成分[J]. 中草药,2020,51(7):1713-1722.

[4] 徐云云,李宗光,刘海燕,等. 新型冠状病毒肺炎特异性 IgM 抗体两种方法检测比较分析[J/OL]. 重庆医学,2020(2020-03-19)[2020-03-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200318.1431.024.html>.

[5] 喻鹏铭,ALICE Y M J,E-LIISA L. 应用超短波疗法治疗 COVID-19 患者需考虑的风险[J]. 康复学报,2020,30(2):100-102.

[6] 徐万洲,李娟,何晓云,等. 血清 2019 新型冠状病毒 IgM 和 IgG 抗体联合检测在新型冠状病毒感染中的诊断价值[J]. 中华检验医学杂志,2020,43(3):230-233.

[7] 赖媛媛,王宇婷,陈家倪,等. SARS-CoV-2 病原学特点、实验室检测及实验室生物安全防护[J]. 检验医学,2020,35(3):278-281.

[8] 刘宁,张泽灵,赵鹏飞,等. 新型冠状病毒肺炎的病因病机和防治思路探析[J]. 长春中医药大学学报,2020,36(2):209-212.

[9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. (2020-03-03)[2020-03-22]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03/04/content_5486705.htm.

[10] 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/OL]. 国际检验医学杂志,2020(2020-03-05)[2020-03-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20200305.1440.002.html>.

[11] 王馨语,廖静,陈俊. 新型冠状病毒肺炎免疫学特征及免疫治疗策略的研究进展[J]. 热带医学杂志,2020,20(5):571-575.

[12] 周红,李小丽,李斌. 重视 2019 冠状病毒病(COVID-19)诱导的脓毒症免疫抑制[J]. 第三军医大学学报,2020,42(6):539-544.

[13] 田成,向明,瑞德西韦与 α-干扰素联用治疗新型冠状病毒肺炎的可行性分析[J]. 医药导报,2020,39(4):477-482.

[14] 刘闰平,葛俊德,钟颖,等. 基于干预细胞因子风暴文献挖掘的中医药治疗重症新型冠状病毒肺炎探讨[J]. 中草药,2020,51(5):1096-1105.

[15] 何黎黎,龚普阳,封玥,等. 中药在抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)引起的细胞因子风暴中的应用分析[J]. 中草药,2020,51(6):1375-1385.

[16] 康乐,苗晋鑫,苗明三,等. 中药调节黏膜免疫系统用于防治 COVID-19 的思路探索[J/OL]. 中国实验方剂学杂志,2020(2020-03-02)[2020-03-22]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/11.3495.R.20200302.1521.002.html>.

(收稿日期:2020-03-26 修回日期:2020-06-23)

(上接第 2250 页)

[8] HAN H, THERIAULT J F, CHEN G, et al. Substrate inhibition of 17β-HSD1 in living cells and regulation of 17β-HSD7 by 17β-HSD1 knockdown[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2017, 172:36-45.

[9] 张哲,王宏竹,刘永惠,等. 大鼠肾脏细胞 17β-HSD1 的表达及参与性激素合成的能力[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(2):265-268.

[10] DEMURA T A, REVAZOVA Z V, KOGAN E A, et al. The molecular mechanisms and morphological manifestations of leiomyoma reduction induced by selective progesterone receptor modulators[J]. Arkh Patol, 2017, 79(3): 19-25.

[11] 李翠芬,刘燕燕,杨宇峰,等. NCoR 和 SRC-1 在子宫内膜重度不典型增生中的表达及意义[J]. 实用医学杂志,

2018, 34(13):2204-2208.

[12] 柳先廉,杨宇,霍炽文,等. 类固醇受体辅助活化因子-1、核受体辅助阻遏因子在子宫内膜癌患者中的表达[J]. 广东医学, 2018, 39(1):42-44.

[13] 邹云峰,熊雅波,杨春林,等. C-erbB-2、Ki67 在子宫内膜疾病诊断及病情分级中的作用[J]. 中国乡村医药, 2018, 25(4):52-53.

[14] 王丹,秦珍珠,梁运霞,等. C-erbB-2、ETS1、p53 在子宫内膜癌中的表达及其与临床特征的关系[J]. 癌症进展, 2019, 17(2):210-212.

[15] 吴坤英,张青,徐庆丽. ER、C-erbB-2 癌蛋白、SF-1 在子宫内膜息肉中的表达及其意义[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(10):1760-1761.

(收稿日期:2020-02-08 修回日期:2020-06-26)