

## HIV 感染者 Th17 和 Treg 细胞的变化及意义

吴敏泉<sup>1</sup>, 罗艳<sup>2</sup>, 何艳<sup>2</sup>, 李靖<sup>1</sup>, 郑煜煌<sup>2</sup>, 姚运海<sup>2</sup>

(1 长沙市中心医院, 湖南长沙 410004; 2 中南大学湘雅二医院, 湖南长沙 410011)

**[摘要]** **目的** 观察人免疫缺陷病毒(HIV)感染者辅助性 T 细胞(T help cell, Th)17 和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的数量、平衡状态变化及其意义。**方法** 选取确诊的 106 例 HIV 感染者和 30 例健康体检者(健康对照组), 采集静脉血, 以流式细胞术检测 CD4+ T 细胞及 Th17 细胞与 Treg 细胞百分比, RT-PCR 检测 HIV RNA 病毒载量。**结果** HIV 感染者 CD4+ T 细胞为 13~702 个/ $\mu$ L, 分为 4 组, 即 A 组:  $\leq 200$  个/ $\mu$ L, 19 例; B 组: 201~350 个/ $\mu$ L, 32 例; C 组: 351~500 个/ $\mu$ L, 26 例; D 组:  $> 500$  个/ $\mu$ L, 29 例; 上述各组均明显低于健康对照组(798~1 130 个/ $\mu$ L) ( $P < 0.05$ )。A、B、C、D 组 Th17 细胞在 CD4+ T 细胞中的百分比分别为(0.73  $\pm$  0.21)%、(1.52  $\pm$  0.33)%、(2.92  $\pm$  0.46)%、(3.74  $\pm$  0.58)% , 均低于健康对照组的(4.90  $\pm$  1.43)% ( $P < 0.05$ ) ; A、B、C、D 组及健康对照组 Treg 细胞在 CD4+ T 细胞中的百分比分别为(9.78  $\pm$  2.15)%、(7.23  $\pm$  1.72)%、(5.69  $\pm$  1.67)%、(4.62  $\pm$  0.97)%、(4.43  $\pm$  0.97)% , 除 D 组与健康对照组之差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) , 其余组均高于健康对照组 ( $P < 0.05$ )。HIV 感染者病毒载量水平为(0~5.36)  $\times 10^7$  拷贝/mL, 平均(5.36  $\pm$  1.21)  $\times 10^6$  拷贝/mL; A、B、C、D 组的病毒载量分别为(6.24  $\pm$  1.36)  $\times 10^7$  拷贝/mL、(4.36  $\pm$  1.02)  $\times 10^6$  拷贝/mL、(5.78  $\pm$  1.67)  $\times 10^4$  拷贝/mL、(3.54  $\pm$  1.25)  $\times 10^3$  拷贝/mL, 各组间比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) , 且与 CD4+ T 细胞计数呈负相关。**结论** HIV 感染导致 Th17 和 CD4+ T 细胞下降、Th17 和 Treg 细胞失衡, 与 HIV RNA 载量负相关; 与疾病进展密切相关。

**[关键词]** 人免疫缺陷病毒; 艾滋病; Th17 细胞; Treg 细胞; CD4+ T 细胞

**[中图分类号]** R512.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)04-0252-04

## Significance of change in Th17 and Treg cells in HIV-infected patients

WU Min-quan<sup>1</sup>, LUO Yan<sup>2</sup>, HE Yan<sup>2</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, ZHENG Yu-huang<sup>2</sup>, YAO Yun-hai<sup>2</sup> (1 Changsha Central Hospital, Changsha 410004, China; 2 Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the significance of change in T help cell 17(Th17) and regulatory T cell (Treg) in HIV-infected patients. **Methods** 106 HIV-infected patients and 30 healthy volunteers were selected. Flow cytometry was used to detect the CD4+ T, Th17 and Treg cells in peripheral blood. HIV RNA levels in serum were tested by RT-PCR. **Results** CD4+ T cells were 13-702/uL, 19 patients were  $\leq 200$ /uL (group A), 32 were 201-350/uL (group B), 26 were 351-500/uL (group C), 29 were  $> 500$ /uL (group D); All were significantly lower than (798-1130/uL) in healthy control group ( $P < 0.05$ ). The percentage of Th17 cells in CD4+ T cells were (0.73  $\pm$  0.21)%, (1.52  $\pm$  0.33)%, (2.92  $\pm$  0.46)%, and (3.74  $\pm$  0.58)% in group A, B, C and D, respectively, which were all lower than (4.90  $\pm$  1.43)% of control group ( $P < 0.05$ ); The percentage of Treg cells in CD4+ T cells were (9.78  $\pm$  2.15)%, (7.23  $\pm$  1.72)%, (5.69  $\pm$  1.67)%, and (4.62  $\pm$  0.97)% in group A, B, C and D, respectively, group A, B and C were higher than (4.43  $\pm$  0.97)% of control group ( $P < 0.05$ ), but group D had no significant difference compared with control group ( $P > 0.05$ ). HIV RNA levels were (0-5.36)  $\times 10^7$  copies/mL in HIV-infected patients, the average levels of HIV RNA were (5.36  $\pm$  1.21)  $\times 10^6$  copies/mL; HIV RNA levels in group A, B, C and D were (6.24  $\pm$  1.36)  $\times 10^7$  copies/mL, (4.36  $\pm$  1.02)  $\times 10^6$  copies/mL, (5.78  $\pm$  1.67)  $\times 10^4$  cop-

**[收稿日期]** 2011-05-23

**[基金项目]** 国家十一五重大科技专项(2008ZX10001-008)

**[作者简介]** 吴敏泉(1965-), 男(汉族), 湖南省长沙市人, 副主任医师, 主要从事传染病预防控制和公共卫生管理研究。

**[通讯作者]** 何艳 E-mail: hy3753@163.com

ies/mL, and  $(3.54 \pm 1.25) \times 10^3$  copies/mL, respectively, there was significant difference between each group ( $P < 0.05$ ), HIV RNA levels were negatively correlated with CD4 + T cells count. **Conclusion** HIV infection can result in the decrease of Th17 and CD4 + T cells, imbalance of Th17/Treg cells, and negative correlation with HIV RNA levels.

**[Key words]** human immunodeficiency virus; acquired immunodeficiency syndrome; Th17 cell; Treg cell; CD4 + T cell

[Chin Infect Control, 2011, 10(4): 252-255]

人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染是一个缓慢进展的免疫损伤过程。在急性感染期,病毒大量复制,淋巴外组织的CD4 + T细胞严重缺失,免疫系统显著受损;慢性无症状期,普遍免疫活化,进行性地摧毁免疫系统,降低其再生能力,最终导致免疫系统衰竭,致获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的各种机会性感染和肿瘤。

辅助性T细胞(T help cell, Th)17和调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)均来源于CD4 + T细胞,二者在细胞发育和分化上有密切联系。Th17主要促进免疫反应,而Treg细胞主要抑制免疫应答,在免疫活动中它们可相互转化,由此保持机体免疫平衡状态<sup>[1]</sup>。在HIV感染后它们如何变化以及有何临床意义?笔者对此进行了初步研究。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 2006年1月—2009年1月在中南大学湘雅二医院艾滋病专科就诊的HIV感染者106例,其中女性50例,男性56例;年龄23~74岁,平均 $(40.34 \pm 12.22)$ 岁。所有患者均经湖南省或长沙市疾病预防控制中心蛋白印迹试验(Western Blotting, WB)确证HIV-1抗体阳性,无其他重要脏器合并症等;艾滋病诊断标准符合2007年卫生部颁布的《艾滋病诊疗指南》。另设健康对照组30例,为健康体检者,其中女性13例,男性17例;年龄20~40岁,平均 $(33.41 \pm 15.12)$ 岁;经酶联免疫吸附试验(ELISA)初筛阴性,其余情况与HIV感染组一致。所有研究对象均符合医学伦理委员会要求,签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 样本采集** 用抗凝管采集研究对象清晨空腹全血8 mL, 2 h内用人淋巴细胞分离液分离血浆与外周血单个核细胞(PBMC)。显微镜下观察细胞形态并计数,重悬细胞并调整细胞浓度 $(1 \sim 5) \times 10^7$ /mL。血浆与PBMC于-80℃冻存。

**1.2.2 CD4 + T细胞检测** HIV感染者每6个月检测1次CD4 + T细胞,由湖南省或长沙市疾病预防控制中心采用流式细胞术检测。

**1.2.3 流式细胞术检测T细胞亚群** 将PBMC分成Th17和Treg管。Th17管加入佛波醇乙酯(PMA)  $2.5 \mu\text{g}/10^6$  细胞、离子霉素  $1 \mu\text{g}/10^6$  细胞和莫能霉素  $0.7 \text{pg}/10^6$  细胞,并避光加入异硫氰酸荧光素(FITC)-抗人CD3单克隆抗体(mAb)、藻红蛋白(PE)-抗人CD4mAb各  $20 \mu\text{L}/10^6$  细胞;Treg管避光加入FITC-抗人CD4 mAb和APC-抗人CD25 mAb  $20 \mu\text{L}/10^6$  细胞,置于37℃ CO<sub>2</sub> 细胞培养箱5 h, PBS洗涤3次,加入固定液100 μL及穿膜液1 mL,各避光1 h。再分别加入Alexa Fluor 647-抗人IL-17mAb  $5 \mu\text{L}/10^6$  细胞和PE-抗人Foxp3 mAb  $20 \mu\text{L}/10^6$  细胞,常温孵育2 h。穿膜缓冲液洗涤3次,加入固定液200 μL,重悬细胞,待测。采用MoFlo流式细胞仪进行流式检测,结果用FACS Express 3.0软件分析。

**1.2.4 血浆病毒载量检测** 将患者血浆于-80℃冻存,标本收集完成后一并检测。应用Light cycler PCR荧光定量扩增仪进行病毒载量检测,HIV RNA定量试剂为深圳匹基公司产品。严格按照说明书进行操作(检测下限 $< 5.0 \times 10^2$ )。

**1.3 统计学处理** 应用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验,相关性分析采用Spearman rank test,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HIV感染者外周血CD4 + T细胞检测** HIV感染者CD4 + T细胞数为13~702个/ $\mu\text{L}$ ,根据患者CD4 + T细胞数分为4组,即A组: $\leq 200$ 个/ $\mu\text{L}$ , 19例;B组:201~350个/ $\mu\text{L}$ , 32例;C组:351~500个/ $\mu\text{L}$ , 26例;D组: $> 500$ 个/ $\mu\text{L}$ , 29例。以上各组均明显低于健康对照组(798~1 130个/ $\mu\text{L}$ ),差异均有统计学意义( $t$ 值分别为-7.28、

- 5.36、- 4.62、- 2.24, 均  $P < 0.05$ )。

2.2 Th17 细胞在 CD4 + T 细胞中的百分比 A、B、C、D 组及健康对照组 Th17 细胞在 CD4 + T 细胞中的百分比分别为  $(0.73 \pm 0.21)\%$ 、 $(1.52 \pm 0.33)\%$ 、

$(2.92 \pm 0.46)\%$ 、 $(3.74 \pm 0.58)\%$ 、 $(4.90 \pm 1.43)\%$ ，其两两比较统计值见表 1。Th17 细胞所占百分比与 CD4 + T 细胞数量一致，随着 CD4 + T 细胞数量下降，其百分比降低，两者呈正相关。

表 1 各组间 Th17 细胞百分比比较的统计值

Table 1 Statistics of Th17 percentage comparison between different groups

Statistics	Group A vs group D	Group A vs group B	Group B vs group D	Group B vs group C	Group C vs group D	Group D vs healthy control group
<i>t</i>	- 10.708	5.095	- 5.486	3.678	- 2.288	- 2.697
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.001	0.033	0.024

2.3 Treg 细胞在 CD4 + T 细胞中的百分比 A、B、C、D 组及健康对照组外周血 Treg 细胞在 CD4 + T 细胞中的百分比分别为  $(9.78 \pm 2.15)\%$ 、 $(7.23 \pm 1.72)\%$ 、 $(5.69 \pm 1.67)\%$ 、 $(4.62 \pm 0.97)\%$ 、 $(4.43$

$\pm 0.97)\%$ ，其两两比较统计值见表 2。Treg 细胞百分比随着 CD4 + T 细胞数量降低而升高，除 D 组与健康对照组之差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，其余组均高于健康对照组 ( $P < 0.05$ )。

表 2 各组间 Treg 细胞百分比比较的统计值

Table 2 Statistics of Treg percentage comparison between different groups

Statistics	Group A vs group D	Group A vs group B	Group B vs group D	Group B vs group C	Group C vs group D	Group D vs healthy control group
<i>t</i>	- 6.059	- 2.185	4.153	- 2.496	2.574	- 1.236
<i>P</i>	0.000	0.041	0.000	0.021	0.018	0.087

2.4 病毒载量检测 HIV 感染者病毒载量水平为  $(0 \sim 5.36) \times 10^7$  拷贝/mL，平均  $(5.36 \pm 1.21) \times 10^6$  拷贝/mL。A、B、C、D 4 组的病毒载量分别为  $(6.24 \pm 1.36) \times 10^7$  拷贝/mL、 $(4.36 \pm 1.02) \times 10^6$  拷贝/mL、 $(5.78 \pm 1.67) \times 10^4$  拷贝/mL、 $(3.54 \pm 1.25) \times 10^3$  拷贝/mL。各组间比较，差异有统计学意义 (*t* 值分别为 - 5.52、- 4.74、- 4.13、- 3.27，均  $P < 0.05$ )。HIV 病毒载量与 CD4 + T 细胞有明显的相关性，随着 CD4 + T 细胞减少，病毒载量明显升高，两者呈负相关。但 A 组有 2 例患者 CD4 + T 细胞分别为 100 个/mL 和 89 个/mL，其病毒载量低于检测下限。

2.5 外周血 Th17 细胞及 Treg 细胞与病毒载量的相关性 HIV 感染者的病毒载量与 Th17 细胞呈负相关 ( $R = - 0.32, P = 0.038$ )，而与 Treg 细胞呈正相关 ( $R = 0.56, P = 0.019$ )。

### 3 讨论

Th17 和 Treg 细胞均来源于 CD4 + T 细胞亚群，两者在发育、分化成熟和功能上相互制约，甚至相互转化，从而保持机体免疫平衡。有文献报道<sup>[2]</sup>，两者的数量及功能状态与自身免疫性疾病、肿瘤及感染均有密切关系。然而，HIV 感染是否对 Th17

和 Treg 细胞造成大量破坏，从而引起 CD4 + T 细胞大量减少，国内外报道较少。

本研究结果显示，HIV 感染者 CD4 + T 细胞减少的同时，Th17 细胞明显下降，而且两者下降有明显的一致性；而 Treg 细胞随 CD4 + T 细胞减少，其百分比反而增加，但显著低于健康对照组，推测 HIV 感染激活免疫系统，使 Treg 免疫功能受抑制，Foxp3 表达水平下降，Treg 抑制免疫功能受损，进一步激活机体免疫，使大量的免疫细胞受到破坏，致使 CD4 + T 细胞减少<sup>[3]</sup>。

大量研究<sup>[4-5]</sup>显示，CD4 + T 细胞与病毒载量水平呈负相关，本研究结果与文献一致。随着 CD4 + T 细胞减少，病毒载量升高，但本研究 A 组有 2 例患者 CD4 + T 细胞分别为 100 个/mL 和 89 个/mL，其病毒载量低于检测下限，机制尚不清楚。

Th17 和 Treg 细胞的平衡状态是否与 HIV 感染及病情进展有关，目前尚不完全清楚。有研究<sup>[4]</sup>发现猿免疫缺陷病毒在体内及体外实验条件下均可直接感染 Th17 细胞。HIV 感染者 Th17 细胞表面 CCR5 的表达显著低于未感染者，提示 HIV 对 Th17 细胞有直接作用，可能是其减少的原因之一。Kanwar 等<sup>[6]</sup>研究慢病毒感染猴模型及 HIV 感染者，发现 Th17 细胞的丢失和 Treg 细胞频率的增加

与其发病机制及疾病进展密切相关。Th17 细胞分泌的 IL-17 是机体肠黏膜的免疫屏障, Th17 细胞的丢失可使肠内细菌转移, 导致局部免疫激活和病毒复制加速; 同时由于 Th17 细胞丢失, Treg 细胞增加, 使两者失去平衡, 亦可引起全身持续性免疫激活, 进而导致 CD4 + T 细胞进一步减少, 免疫系统最终彻底紊乱崩溃, 病情快速进展。

对 HIV 感染长期不进展者的研究<sup>[7]</sup>发现, 其 Treg 细胞及 Th17 细胞与正常对照组相比, 无明显改变。提示稳定的 Th17 细胞及 Treg 细胞水平有利于控制 HIV 感染。本研究结果亦显示 Treg 细胞与 CD4 + T 细胞及 Th17 细胞呈明显的负相关, Th17 细胞和 Treg 细胞水平及其平衡状态与 CD4 + T 细胞及病毒载量有明显的相关性, 因而有可能预测 HIV 感染者的疾病进展和预后<sup>[8]</sup>。

综上所述, HIV 感染者 Th17 细胞明显不足, 而 Treg 细胞占优势, Th17 细胞/Treg 细胞免疫平衡失衡; 而且与 CD4 + T 细胞密切相关, 表明 Th17 细胞和 Treg 细胞在 HIV 致病机制及疾病进展中发挥重要作用, 其免疫机制尚在进一步研究中, 可能将为预后判断和制定有效的免疫治疗方案提供重要的理论依据。

## [参 考 文 献]

- [1] Weaver C T, Harrington L E, Mangan P R, *et al.* Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties [J]. *Immunity*, 2006, 24(6):677-688.
- [2] 王伟伟, 沈茜. Th17 细胞和 Treg 细胞在人类常见疾病中的表达及相互关系[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(3):284-288.
- [3] Oswald-Richter K, Grill S M, Leelawong M, *et al.* HIV infection of primary human T cells is determined by tunable thresholds of T cell activation[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(6):1705-1714.
- [4] 周华英, 郑煜煌. HAART 和 HIV 感染的免疫重建[J]. *国外医学免疫学分册*, 2005, 28(5):270-274.
- [5] Zhou H Y, Zheng Y H, He Y, *et al.* Evaluation of a 6-year highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV-1 infected patients[J]. *Intervirology*, 2010, 53(4):240-246.
- [6] Kanwar B, Favre D, McCune J M. Th17 and regulatory T cells; implications for AIDS pathogenesis[J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010, 5(2):151-157.
- [7] 李璞, 郑煜煌, 李介民, 等. 艾滋病 100 例临床分析与机会感染治疗转归[J]. *中国感染控制杂志*, 2007, 6(5):311-315.
- [8] 彭巧丽, 张明霞, 李桂英, 等. HIV/AIDS 患者体内 Th17 及 Th1 应答失衡[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2010, 24(1):17-20.

## 欢迎订阅 2012 年《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内外公开发行的国家级期刊(ISSN1005-6947/CN43-1213/R), 面向广大从事临床、教学、科研的普外及相关领域工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新进展、新观点、新技术、新成果、实用性临床研究及临床经验, 是国内普外学科的权威刊物之一。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

本刊由国家教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。主编吕新生教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、郑树森、夏家辉、黄志强、黎介寿等多位国内外著名普通外科专家担任, 编委会成员由国内外普通外科资深专家学者组成。开设栏目有述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态, 病案报告。本刊已被多个国内外重要检索系统和大型数据库收录, 如: 美国化学文摘(CA), 俄罗斯文摘(AJ), 中国科学引文数据库(CSCD), 中文核心期刊(中文核心期刊要目总览 2008 年版), 中国科技论文与引文数据库(中国科技论文统计源期刊), 中国核心学术期刊(RCCSE), 中国学术期刊综合评价数据库, 中国期刊网全文数据库(CNKI), 中文科技期刊数据库, 中文生物医学期刊文献数据库(CMCC), 万方数据-数字化期刊群, 中国生物医学期刊光盘版等, 影响因子已居同类期刊前列, 并在科技期刊评优评奖活动中多次获奖。

本刊已全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期短, 时效性强。欢迎订阅、赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本(A4 幅面), 每期 112 页, 每月 15 日出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷, 图片彩色印刷, 封面美观大方。定价 20.0 元/册, 全年 240 元。国内邮发代号: 42-121; 国际代码: M-6436。编辑部可办理邮购。

本刊编辑部全体人员, 向长期以来关心、支持、订阅本刊的广大作者、读者致以诚挚的谢意!

编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号(湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话(传真): 0731-84327400 网址: <http://www.zpwz.net> E-mail: [pw4327400@126.com](mailto:pw4327400@126.com); [jcgxxych@126.com](mailto:jcgxxych@126.com)