

· 临床论著 ·

HIV 感染合并鼻窦炎患者鼻腔黏膜病毒抗原表达的研究

蔡超^{1,2} 张立松³ 韩俊燕⁴ 曾辉⁴ 王鹏⁵ 冯鑫⁶ 郝晓花⁶ 张罗^{7,8,9}

【摘要】目的 了解 HIV 感染合并鼻窦炎患者鼻黏膜病毒存储及免疫状态。**方法** 采集 9 例非 HIV 感染合并鼻窦炎和 11 例 HIV 感染合并鼻窦炎患者外周血和鼻黏膜标本, 采集患者外周血和鼻黏膜组织, 外周血采用流式细胞仪进行 CD4 计数和单核细胞比例分析, 血浆采用 RT-PCR 定量法进行病毒载量检测。对鼻黏膜石蜡切片采用 HE 染色分析病理情况和免疫组织化学染色分析 gp120 和 p24 表达水平。**结果** HIV 感染合并鼻窦炎患者 HE 染色结果表现为呼吸道黏膜呈慢性炎, 间质明显水肿伴大量炎性细胞浸润, 嗜酸性粒细胞多见。与非 HIV 感染合并鼻窦炎患者相比, 免疫组织化学结果表明, HIV 感染者合并鼻窦炎患者鼻黏膜 gp120 少量表达, p24 未见明显表达, 外周血具有调节功能的单核细胞亚群比例显著升高。**结论** HIV 感染合并鼻窦炎患者鼻黏膜局部组织可能含少量 HIV 病毒, 外周单核细胞比例显著增高, 这些 HIV 病毒存储细胞可能是 HIV 感染者鼻黏膜损伤和机会性感染的机制所在。

【关键词】 艾滋病; 鼻窦炎; 鼻黏膜; gp120

Observation of HIV virus related antigens in nasal mucosa of HIV-infected patients with nasosinusitis

Cai Chao^{1,2}, Zhang Lison³, Han Junyan⁴, Zeng Hui⁴, Wang Peng⁵, Feng Xin⁶, Hao Xiaohua⁶, Zhang Luo^{7,8,9}.

¹Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China; ²Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China; ³Ear-nose-throat Department, ⁴Institute of Infectious Diseases, ⁵Department of Pathology, ⁶Department of Research and Education Management, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; ⁷Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, ⁸Institute of Otolaryngology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China; ⁹Key Laboratory of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery Ministry of Education, Capital Medical University, Beijing 100069, China.

Corresponding author: Zhang Luo, Email: dr.luozhang@gmail.com

【Abstract】Objective To investigate the expression of HIV related antigens in nasal mucosa and the immune state of AIDS patients complicated with nasosinusitis. **Methods** The peripheral blood and nasal mucosa tissues were collected from 9 nasosinusitis patients without HIV infection and 11 AIDS patients with nasosinusitis. The count of CD4⁺ T cell and the percentage of monocyte subsets were analyzed by flow cytometry, respectively. Plasma viral load were detection by RT-PCR assay. Histological features of nasal mucosa sections were observed by HE staining. Expression levels of gp120 and p24 were detected by immunohistochemistry. **Results** The results of HE staining for HIV-nasosinusitis patients showed a chronic inflammation of respiratory tract mucosa. Interstitial edema with a large number of inflammatory cells invasion and acidophilic granular proliferation were seen. Compared to nasosinusitis patients without HIV infection, the HIV-nasosinusitis patients showed weakly positive of gp120 and negative of p24 expression, and the percentage of monocytes subgroup with regulating functions was increased significantly. **Conclusions**

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.02.006

基金项目: 北京市教育委员会科技计划面上项目 (No. KM201110025027)

作者单位: 101149 北京, 首都医科大学附属北京胸科医院¹; 101149 北京, 北京市结核病胸部肿瘤研究所²; 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院耳鼻喉科³、传染病研究所⁴、病理科⁵、科教处⁶; 100730 北京, 首都医科大学附属北京同仁医院耳鼻咽喉头颈外科⁷、北京市耳鼻咽喉科研究所⁸; 100069 北京, 耳鼻咽喉头颈科学教育部重点实验室 (首都医科大学)⁹

通讯作者: 张罗, Email: dr.luozhang@gmail.com

The affected tissues in AIDS patients complicated with nasosinusitis might contain a small amount of HIV and peripheral monocytes ratio was increased significantly. The HIV storage in nasal mucosa cells could contribute to the mechanism of nasal mucosa damage and opportunistic infection for HIV infected patients.

【Key words】 Acquired immune deficiency syndrome; Nasosinusitis; Nasal mucosa; gp120

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染导致的传染病。截至2009年底,中国存活艾滋病病毒感染者和患者约74万人,其中,艾滋病患者为10.5万例^[1]。由于HIV能够特异地破坏辅助性T细胞,使机体免疫功能严重受损,因此病原体可乘机侵袭人体造成机会性感染。鼻腔是一个开放的器官,鼻腔感染是艾滋病患者常见的感染,其中鼻窦炎最为常见。与其他机会性感染相比常常被忽视,治疗较为困难。黏膜组织中,不仅存在CD4⁺T淋巴细胞,还有大量的单核-巨噬细胞,而这两类细胞是HIV侵染的主要靶细胞和病毒存储细胞^[2]。既往研究表明,肠道黏膜免疫状态在艾滋病患者病情进展中有重要作用,但黏膜内免疫细胞的变化与外周血并不平行^[3-5]。

目前,对黏膜免疫状态的研究多基于肠道黏膜,鼻腔黏膜免疫状态的研究很少。明确不同临床分期艾滋病患者鼻腔黏膜的CD4⁺T细胞、单核巨噬细胞的亚群分布及功能状态,并与全身免疫情况和病毒复制相比较,将有助于进一步了解艾滋患者鼻腔黏膜免疫功能变化。因此,本研究通过检测鼻黏膜gp120和p24的表达水平,揭示鼻腔黏膜中HIV-1储存及免疫损伤的机制。

资料与方法

一、研究对象

选择2011至2013年就诊于首都医科大学附属北京地坛医院耳鼻咽喉科,HIV-1感染合并鼻窦炎患者11例,其中男性9例,女性2例,年龄(40±9)岁。非HIV-1感染鼻窦炎患者9例,无其他机会性感染。HIV合并鼻窦炎患者11例,临床诊断包括鼻息肉及慢性炎、呼吸道黏膜呈慢性炎症(咽喉部、鼻咽部和下鼻甲)、鳞状上皮乳头状瘤,其中鼻息肉占27%(3例)、呼吸道黏膜呈慢性炎症占55%(6例)、鳞状上皮乳头状瘤占18%(2例)。

二、HIV患者CD4计数和病毒载量检测

采用Trucount管、流式抗体组合及流式细胞仪(BD Biosciences公司)检测患者外周血CD4、CD8细胞数目,采用MultiSET(BD Biosciences公司)进行分析。采用Roche公司的Amplicor HIV Monitor试剂盒检测患者HIV载量。

三、鼻黏膜HE染色

鼻黏膜标本经10%中性甲醛固定后进行石蜡包埋,作5 μm厚度的连续切片。石蜡切片先后经过烤片、脱蜡(新鲜二甲苯I、II各浸泡15 min)、水化(依次在无水乙醇、85%乙醇、75%乙醇、蒸馏水中浸泡5 min)、苏木素染核(去离子水清洗后用苏木素复染核3~5 min,自来水冲洗反蓝)、分化(1%盐酸酒精分化数秒)、伊红容易染细胞浆(染色3~5 min)、脱水、透明(二甲苯I、II各浸泡5 min)和封片。显微镜下观察。

四、鼻黏膜gp120和p24免疫组织化学分析

将水化过的石蜡切片依次放入新鲜配制且避光的3%过氧化氢溶液当中放置10 min,中间稍加晃动,使过氧化氢与内源性过氧化物酶充分反应。将切片置于0.01 mmol/L的柠檬酸缓冲液中的切片放入微波炉,高火3 min,中低火10 min,进行抗原修复。采用山羊血清,37℃封闭1 h。将处理好的切片先与PBS稀释好的抗-gp120或抗-p24一抗(AbCam公司)4℃孵育过夜。然后分别与生物素标记鼠抗羊IgG反应2 h,DAB显色。

五、流式细胞仪测定单核细胞亚群外周血单核细胞

将0.2 ml EDTA抗凝全血加入流式检测管,加入2 ml的溶血素,室温孵育10 min,离心,轻弃上清,加入洗液(含5% FBS的PBS),离心后,轻弃上清,加入抗-CD14和抗-CD16组合,4℃避光孵育15 min,再次加入洗液,离心后上机检测,Cell Quest Pro软件分析。

六、统计学处理

运用SPSS 14.0软件进行统计学分析。检测数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较非HIV感染者鼻窦炎和HIV感染合并鼻窦炎患者外周血单核细胞比例的差异,采用独立样本t检验进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、患者免疫细胞CD4和CD8计数和病毒载量

本研究采用流式细胞仪结合绝对计数法对入组患者的外周血CD4⁺T和CD8⁺T淋巴细胞数目进行分

析, CD4⁺ T淋巴细胞为10~454个/ml, 平均(80 ± 137)个/ml, CD8⁺ T淋巴细胞为121~1 826个/ml, 平均(612 ± 496)个/ml。HIV感染者外周CD4⁺ T淋巴细胞显著降低, CD8⁺ T淋巴细胞显著升高。患者病毒载量为(40~1.4) × 10⁵拷贝/ml, 平均(8.1 ± 8.2) × 10⁴。

二、患者鼻黏膜 HE 染色结果

本研究对患者鼻黏膜组织进行 HE 染色, 呼吸道黏膜呈慢性炎患者鼻腔被覆呼吸假复层纤毛柱状上皮之水肿型黏膜息肉及黏膜组织呈慢性炎症, 间质明显水肿伴大量炎性细胞浸润, 嗜酸性粒细胞多见(图 1A)。鼻息肉患者可见鼻息肉, 炎症性息肉(图 1B)。鳞状上皮乳头状瘤患者[咽部肿物, 图 1C(1)]或[鼻腔肿物, 图 1C(2)]鳞状上皮乳头瘤, 间质淋巴细胞浸润, 上皮可见不典型挖空细胞(图 1C)。

三、患者鼻黏膜 gp120 和 p24 免疫组织化学结果

gp120 是 HIV 的壳膜蛋白, 是一种糖蛋白, HIV 感染 CD4⁺ T 淋巴细胞是通过 gp120 和细胞表面的受体 CD4 分子之间的相互作用进行的, 是 HIV 入侵的第一步, 可通过检测 gp120 的表达, 反映免疫或组织细胞的 HIV 感染情况。本研究对对照组(非 HIV 感染合并鼻炎或鼻窦炎患者)(图 A~C)和 HIV 感染合并呼吸道慢性炎症患者淋巴结(图 D~E)的鼻黏膜组织(F~L)进行 gp120 免疫组织化学染色。结果显示, 与对照组相比(A~C), 患者淋巴结中可见明显的 gp120 阳性细胞, 从细胞形态来看, 多为巨噬细胞。患者鼻

黏膜组织(F~L)中可偶见 gp120 阳性细胞, 上皮及组织细胞可见多处非特异性染色(图 2)。

p24 是 HIV 核心抗原, 有研究表明可通过检测淋巴或非淋巴组织内 p24 的表达来诊断未知 HIV 感染。因此, 本研究对对照组(非 HIV 感染鼻炎或鼻窦炎患者)和 HIV 感染合并呼吸道慢性炎症患者的淋巴结和鼻黏膜组织进行 p24 免疫组织化学染色。结果显示, 与对照组类似(A~C), 患者(D~E)淋巴结可散在 p24 阳性细胞, 患者鼻黏膜(F~L)中未见明显的 p24 阳性细胞(图 3)。

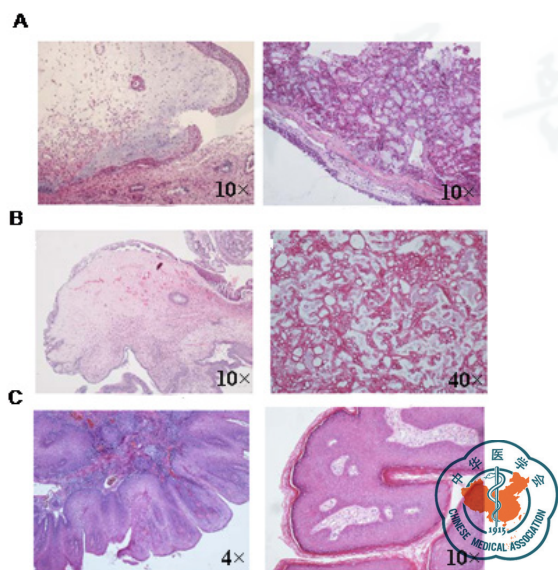
四、患者外周血单核细胞亚群分析

除 CD4 细胞外, 单核-巨噬细胞也是 HIV 感染的宿主细胞之一。因此, 检测正常对照和患者外周血单核细胞亚群的比例变化, 根据单核细胞表面 CD14 和 CD16 的表达差异, 将外周血单核细胞分为 CD14^{high}CD16⁻(Mo1)、CD14^{high}CD16⁺(Mo2)和 CD14^{low}CD16⁺(Mo3)亚群(图 4A)。结果显示, 与对照组相比, 患者外周血炎性单核细胞亚群 Mo1 所占比例显著降低[(94.08 ± 0.42)% vs (85.46 ± 6.09)%, $t = 3.953$ 、 $P = 0.0002$], 具有调节功能的单核细胞亚群 Mo2 细胞所占比例显著增高[(4.05 ± 0.30)% vs (13.72 ± 5.849)%, $t = 5.465$, $P < 0.0001$], 单核细胞亚群 Mo3 细胞所占比例无显著变化[(1.87 ± 0.16)% vs (0.82 ± 0.59)%, $t = 31.530$ 、 $P = 0.1306$](图 4B)。

讨 论

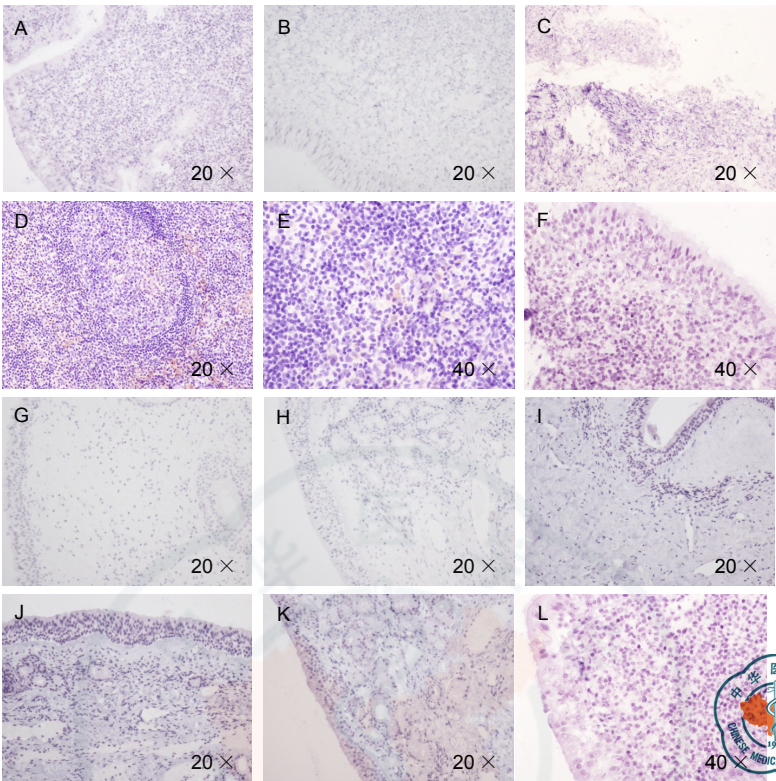
黏膜免疫在艾滋病疾病进展中发挥重要的作用, 既往研究多集中于肠黏膜的研究。本研究收集 HIV 感染和非 HIV 感染合并鼻窦炎患者, 采集患者鼻黏膜, 并通过免疫组织化学分析 gp120 和 p24 的表达情况, 并将其与患者外周免疫状态, 如 CD4 数目、病毒载量和单核细胞比例进行分析。结果发现, 与非 HIV 合并鼻窦炎患者相比, HIV 感染合并鼻窦炎患者淋巴结中 gp120 阳性细胞显著增多, 鼻黏膜组织偶见 gp120 阳性细胞, 但数量较少; p24 均未见显著表达。因此, HIV 感染合并鼻窦炎患者鼻黏膜可能有少量 HIV 存在。

由于 HIV 能够特异性地破坏辅助性 T 细胞, 使机体免疫功能严重受损, 因此病原体可乘机侵袭人体造成机会性感染。机会性感染是艾滋病患者最常见亦是最初的临床表现。鼻腔是一个开放的器官, 鼻腔黏膜发生病原微生物感染后能够促进 HIV-1 的繁殖, 而这些大量繁殖的病毒可能由鼻腔释放到外



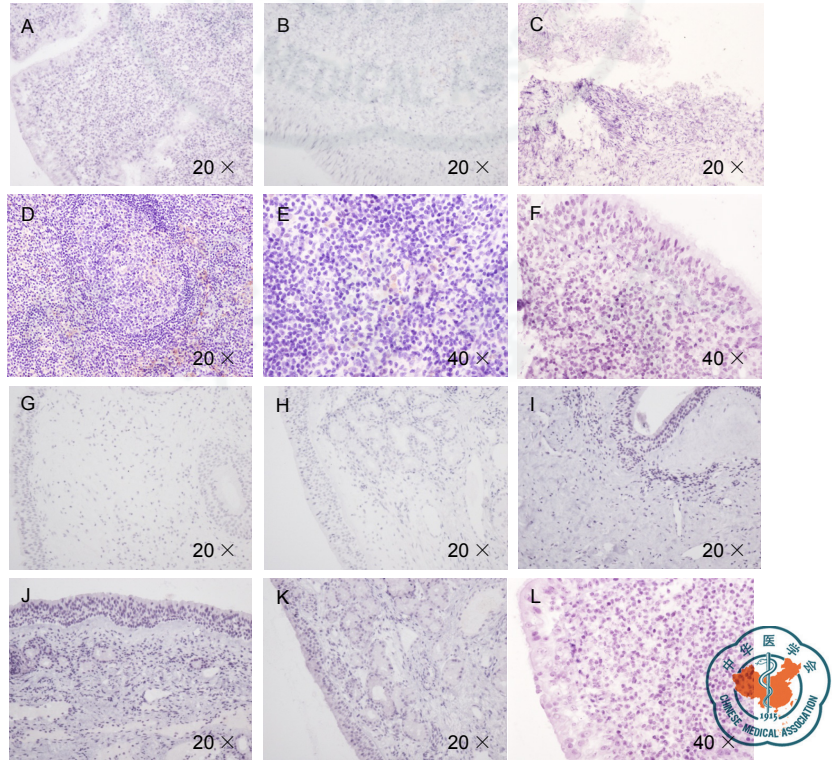
注: 呼吸道黏膜呈慢性炎(A)、鼻息肉患者(B)和鳞状上皮乳头状瘤患者(C)

图1 鼻黏膜 HE 染色结果



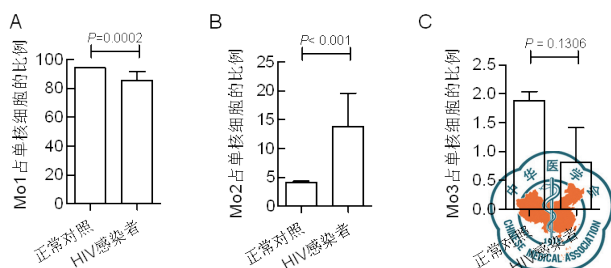
注: A ~ C 为对照组, D ~ E 为患者淋巴结染色结果, F ~ L 为鼻黏膜染色结果

图 2 对照组与 HIV 合并鼻腔慢性炎症患者淋巴结和鼻黏膜 HIV 壳膜蛋白 gp120 免疫组织化学染色



注: A ~ C 为对照组, D ~ E 为患者鼻黏膜染色结果, F ~ L 为鼻黏膜染色结果

图 3 对照组与 HIV 合并鼻腔慢性炎症患者鼻黏膜 HIV 核心抗原 p24 免疫组织化学染色



注: 正常对照 (con) 与患者 (HIV) 单核细胞亚群分析。根据单核细胞表面 CD14 和 CD16 的表达差异, 将外周血单核细胞分为 CD14^{high}CD16^{low} (Mo1)、CD14^{high}CD16^{high} (Mo2) 和 CD14^{low}CD16^{high} (Mo3) 亚群, 并对各亚群比例进行分析

图4 HIV 合并鼻腔炎性患者单核细胞亚群比例变化

部空间。慢性鼻窦炎在人群中的发病率为 13% ~ 14%^[6], 艾滋病患者虽然发病率更高, 但临床无特殊表现, 主要表现为鼻塞、流涕、头面部疼痛以及嗅觉障碍等临床症状^[7], 与其他机会性感染相比却常常被忽视。鼻窦炎本身就难以治愈, 当前最先进的内窥镜鼻窦手术后其复发率最高可达 30%^[8]; 艾滋病患者因为存在免疫缺陷, 其治疗更加困难。因此, 该研究对临床鼻窦炎诊治具有重要意义。

鼻腔组织表面为黏膜组织。与皮肤相比, 黏膜的绝大部分均由单层上皮细胞覆盖, 物理屏障作用相对薄弱, 是很多病原微生物侵入机体的门户。黏膜组织中, 不仅存在 CD4⁺ T 淋巴细胞, 还有大量的单核 - 巨噬细胞。而这两类细胞是 HIV 侵染的主要靶细胞^[9]。HIV 感染的 CD4⁺ T 细胞可以维持病毒快速、指数式复制, 并随之导致 CD4⁺ T 细胞的大量耗损; 相对而言, 单核 - 巨噬细胞被感染后可长期存活, 维持 HIV 的持续存在^[10-12], 因此, 这两类细胞均是 HIV 主要的储存池之一。本研究发现与对照组相比, HIV 患者外周血具有调节功能的 Mo2 单核细胞比例明显增多。有研究提示, 该亚群与 AIDS 疾病进展明确相关, 而且, HAART 治疗可明显降低该亚群的比例, 提示该亚群在 HIV 感染疾病进程中发挥至关重要的作用, 也可能进一步通过分化为巨噬细胞, 影响局部组织, 包括鼻黏膜组织的免疫状态, 此作用尚需进一步的研究。

黏膜在 HIV 感染和疾病进程中发挥重要的作用。研究表明, 在 HIV-1 感染及艾滋病的病程进展过程中, HIV-1 可以通过黏膜侵入人体, 随后进入血液。HIV-1 感染可以破坏黏膜防御系统。多项黏膜与外周血比研究表明, 肠黏膜中的 CD4⁺ T 淋巴细胞耗损更快、更早, 并且更加明显。免疫组织化学^[13-17] 及流式细胞术^[18-20] 对黏膜中淋巴细胞的检测发现, 在 HIV-1 感染后, CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比

例下降, CD8⁺ T 细胞增加。近年来, 更多的研究表明, 黏膜内免疫细胞与外周血的变化并不平行。在很多未治疗 HIV-1 感染者的肠黏膜中表达 FoxP3 的 Treg 细胞能够占 CD4⁺ T 淋巴细胞的 50%^[5]。因此, 黏膜免疫状态在艾滋病患者病情进展中有重要作用。虽然既往研究明确了艾滋病患者黏膜免疫状态的特殊性, 但这些研究多基于肠黏膜。目前, 鼻腔黏膜免疫状态的研究很少。本研究发现 HIV 感染合并鼻窦炎患者鼻黏膜中含有少量 HIV, 这些病毒存储细胞可能是 CD4 细胞, 而更多可能是单核 - 巨噬细胞, 因为 AIDS 患者外周血 CD4 计数降低, 其黏膜组织 CD4 计数也明显降低, 进一步分析鼻黏膜这些 HIV 存储细胞的比例及数目, 以及病毒存储情况将有助于更明确 HIV 感染合并鼻窦炎患者局部的病毒存储及组织损伤机制。

艾滋病患者的鼻腔感染是一种常见却常常被忽视的机会性感染。患者鼻腔黏膜的免疫变化是艾滋病患者免疫状态的重要组成部分。本研究为传染病学、耳鼻咽喉头颈外科学和免疫学的交叉学科, 通过分析 HIV 感染合并鼻窦炎患者鼻黏膜局部 gp120 和 p24 的表达水平, 提示鼻黏膜中可能存在极少量的 HIV, 可能是 HIV 的储存库之一。此研究为今后 HIV 感染不同黏膜免疫应答的研究奠定了基础, 为更好地指导临床治疗提供理论依据。

参考文献

- WHO. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2009[EB/OL]. 2009.
- Kedzierska K, Crowe SM. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection[J]. Curr Med Chem, 2002, 9(21):1893-1903.
- Krathwohl MD, Schacker TW, Anderson JL. Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects[J]. J Infect Dis, 2006, 193(4):494-504.
- Estes JD, Li Q, Reynolds MR, et al. Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection[J]. J Infect Dis, 2006, 193(5):703-712.
- Epple HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, et al. Mucosal but not peripheral FOXP3 regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART[J]. Blood, 2006, 108(9):3072-3078.
- Wang X, Kim J, McWilliams R, et al. Increased prevalence of chronic rhinosinusitis in carriers of a cystic fibrosis mutation[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2005, 131(3):237-240.
- Fokkens W, Lund V, Mullol J, et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007[J]. Rhinol Suppl, 2007, 20:1-136.
- Senior BA, Kennedy DW, Tanabodee J, et al. Long-term results of functional endoscopic sinus surgery[J]. Laryngoscope, 1998, 108(2):151-157.
- Kedzierska K, Crowe SM. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection[J]. Curr Med Chem, 2002, 9(21):1893-1903.
- Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, et al. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-

- 1-treated human monocytes: an ultrastructural study[J]. J Virol, 1988, 62(8):2578-2586.
- 11 Perno CF, Svicher V, Schols D, et al. Therapeutic strategies towards HIV-1 infection in macrophages[J]. Antiviral Res, 2006, 71(2-3):293-300.
- 12 Bagnarelli P, Valenza A, Menzo S, et al. Dynamics and modulation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts in vitro and in vivo[J]. J Virol, 1996, 70(11):7603-7613.
- 13 Budhraj M, Levendoglu H, Kocka F, et al. Duodenal mucosal T cell subpopulation and bacterial cultures in acquired immune deficiency syndrome[J]. Am J Gastroenterol, 1987, 82(5):427-431.
- 14 Ellakany S, Whiteside TL, Schade RR, et al. Analysis of intestinal lymphocyte subpopulations in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex[J]. Am J Clin Pathol, 1987, 87(3):356-364.
- 15 Jarry A, Cortez A, Rene E, et al. Infected cells and immune cells in the gastrointestinal tract of AIDS patients. An immunohistochemical study of 127 cases[J]. Histopathology, 1990, 16(2):133-140.
- 16 Lim SG, Condez A, Lee CA, et al. Loss of mucosal CD4 lymphocytes is an early feature of HIV infection[J]. Clin Exp Immunol, 1993, 92(3):448-454.
- 17 Ullrich R, Zeitz M, Heise W, et al. Mucosal atrophy is associated with loss of activated T cells in the duodenal mucosa of human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients[J]. Digestion, 1990, 46(Suppl 2):302-307.
- 18 Clayton F, Snow G, Reka S, et al. Selective depletion of rectal lamina propria rather than lymphoid aggregate CD4 lymphocytes in HIV infection[J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107(2):288-292.
- 19 Schneider T, Ullrich R, Bergs C, et al. Abnormalities in subset distribution, activation, and differentiation of T cells isolated from large intestine biopsies in HIV infection[J]. Clin Exp Immunol, 1994, 95(3):430-435.
- 20 Schneider T, Jahn HU, Schmidt W, et al. Loss of CD4 T lymphocytes in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 is more pronounced in the duodenal mucosa than in the peripheral blood[J]. Gut, 1995, 37(4):524-529.
- (收稿日期: 2014-09-27)
- (本文编辑: 孙荣华)

蔡超, 张立松, 韩俊燕, 等. HIV感染合并鼻窦炎患者鼻腔黏膜病毒抗原表达的研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(2): 174-179.

