

十色流式检测HIV/AIDS患者外周血中T淋巴细胞亚群及活化状态

宋洋子¹ 孔雅娴¹ 郝禹¹ 姜钰¹ 汪笛² 徐玲² 种雪静² 戴国瑞² 赵红心² 曾辉¹

【摘要】目的 建立十色流式方案检测HIV/AIDS患者外周血中T淋巴细胞亚群及活化状态。方法按多色流式配色原则,初步确立抗人CD3、CD4、CD8、CD45RA、CD25、CCR7、CD28、CD38、HLA-DR抗体及7-AAD的配色方案。采用1例HIV/AIDS患者外周血PBMC标本进行最适电压调节、荧光补偿设定和FMO对照;设定条件后,检测5例HIV/AIDS患者的外周血样本。**结果** 建立检测人外周血中T淋巴细胞亚群及活化状态的最优十色流式染色方案,采用此方案检测5例HIV/AIDS患者外周血标本,分析T淋巴细胞各亚群比例及活化程度,发现不同细胞亚群中活化分子HLA-DR、CD38、CD28的表达模式存在显著差异。**结论** 十色流式方案可检测HIV/AIDS患者外周血中T淋巴细胞亚群及其活化状态操作简便,结果可靠。

【关键词】 多色流式; 人类免疫缺陷病毒; 获得性免疫缺陷综合征; T细胞亚群; 活化

Ten-color flow cytometry for measuring T cell subpopulation and its activation state in the peripheral blood of HIV/AIDS patients Song Yangzi¹, Kong Yaxian¹, Hao Yu¹, Jiang Yu¹, Wang Di², Xu Ling², Chong Xuejing², Dai Guorui², Zhao Hongxin², Zeng Hui¹. ¹Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; ²Infectious Center, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Zeng Hui, Email: hzeng98@yahoo.com

【Abstract】Objective To establish the ten-color flow cytometry for measuring T cell subpopulations and their activated state in the peripheral blood of HIV/AIDS patients. **Methods** The monoclonal antibodies targeting cell surface antigen CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD25, CCR7, CD28, CD38 and HLA-DR to establish the ten-color panel were used. One peripheral blood PBMC sample from a HIV/AIDS patient was applied for adjustment of voltage, compensation and FMO control. After that peripheral blood samples, of 5 patients with HIV/AIDS were analyzed by ten-color flow cytometry. **Result** The ten-color flow cytometric staining method was established for the measurement of T cell subpopulations and activation state in human peripheral blood. This method was applied to detect peripheral blood samples from 5 patients with HIV/AIDS and was able to evaluate the immune status of these patients. And then the percentage of T lymphocyte subgroup and the activation level were detected, respectively. The expression patterns of HLA-DR, CD38 and CD28 in different subpopulations were with significant difference. **Conclusions** The ten-color flow cytometry was a simple and reliable method for the analysis of T cell subpopulations and their activation in HIV/AIDS patients.

【Key words】 Multi-color flow cytometry; Human immunodeficiency virus; Acquired immunodeficiency syndrome; T cell; Activated status

获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)是因人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染引

起人体免疫缺陷的综合征。患者由于免疫缺陷而引发一系列机会性感染及肿瘤,最终导致死亡。随着HIV感染者数目的逐年上升,AIDS已成为严重威胁人民健康的公共卫生问题。

T细胞是人体免疫系统的重要组成部分,其数量和功能的改变直接影响机体的免疫状态。HIV感染过程中,CD4⁺T细胞被HIV病毒直接攻击,导致数量进行性减少和功能下降;CD8⁺T细胞发挥杀伤功能的同时,在持续的病毒抗原刺激下发生功能耗

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.01.006

基金项目:北京市医院管理局“青苗”计划专项经费资助(No. QML20161803);北京市科技新星计划(No. Z171100001117016)

作者单位:北京 100015,首都医科大学附属北京地坛医院传染病学研究所¹,北京 100015,首都医科大学附属北京地坛医院感染中心²

通信作者:曾辉,Email: hzeng98@yahoo.com

竭以及凋亡^[1-2]。在此过程中,一些膜表面分子的表达也会发生相应变化。例如,CD28是T细胞活化过程中至关重要的第二信号分子,其表达下降是T细胞功能障碍的主要表现之一^[3-4];T细胞活化标志分子CD38、HLA-DR的表达变化,与HIV/AIDS患者的疾病进展密切相关^[5-6]。因此,目前在临床上广泛应用流式细胞术监测T细胞亚群比例及活化状态^[7],来间接评估病毒复制的活跃程度并判断抗病毒治疗的疗效^[8-9]。

既往研究中,由于传统四色流式技术的局限,需要大量临床样本来进行T细胞多项功能检测,并且缺乏进一步细分亚群后的功能研究。近年来由于多色流式细胞术的发展,研究者能够在一个细胞上同时标记多个膜表面分子,从而可以检测HIV/AIDS患者外周血中T细胞亚群及其相关活化分子的变化。但由于不同荧光素光谱之间存在干扰现象,为了获得更加准确、稳定的多色流式结果,研究者必须通过优化染色方案,准确选择电压与调节补偿,来消除荧光染料之间叠加所造成的误差^[10]。据此,本研究建立了十色流式方案来检测HIV/AIDS患者外周血中T淋巴细胞亚群多个活化分子表达情况,对关键细节进行重点介绍,为HIV/AIDS患者免疫状态的分析提供可靠的方法学依据,现报道如下。

资料与方法

一、材料

1. 样本采集:选取首都医科大学附属地坛医院皮肤科门诊就诊的AIDS患者6例,年龄29~60岁,用含有EDTA-K2的真空采血管取患者空腹6~8 h后外周静脉血8.0 ml。

2. 主要试剂:细胞表面标记抗体 CD3 BV786; CD4 APC-H7; CD8 BV510; CD45RA AF700; CD25 PE-CF594; CCR7 BV421; CD38 FITC; CD28 APC; HLA-DR PE; 死细胞采用7-AAD标记,均购自美国BD公司。

3. 仪器:美国BD LSR Fortessa流式细胞仪。

二、实验方法

1. 样本处理:登记患者信息。全血中加入适量PBS充分混匀,轻铺于淋巴细胞分离液之上,血样体积与淋巴细胞分离液体积比为2:1,注意保持两液界面清晰,离心2 000 r/s、20 min。吸取单个核细胞层,并将其重悬于10 ml PBS中,室温离心1 500 r/s、

10 min后弃去上清液。加入10 ml PBS再次重悬,离心1 200 r/s、5 min后弃去上清,再加入2 ml含2%胎牛血清FBS的PBS重悬,混匀计数后备用。

2. 抗体选择及染色:根据多色流式荧光搭配原则,弱表达抗原用强荧光抗体,强表达抗原用弱荧光抗体,同时结合设备滤光片配置,制定抗体荧光搭配方案,即CD3 BV786; CD4 APC-H7; CD8 BV510; CD45RA AF700; CD25 PE-CF594; CCR7 BV421; CD38 FITC; CD28 APC; HLA-DR PE; 用7-AAD染色区分死细胞。实验管和荧光扣除(fluorescence minus one, FMO)对照管各100 μ l未染色的单细胞悬液(含 1×10^6 细胞)。实验管加入抗体CD3 BV786 1 μ l、CD4 APC-H7 1 μ l、CD8 BV510 1 μ l、CD45RA AF700 1 μ l、CCR7 BV421 1 μ l、CD25 PE-CF594 0.5 μ l、HLA-DR PE 1 μ l、CD28 APC 2 μ l、CD38 FITC 5 μ l。FMO对照管加入对应的抗体,如PE FMO对照管按顺序加入抗体CD3 BV786 1 μ l、CD4 APC-H7 1 μ l、CD8 BV510 1 μ l、CD45RA AF700 1 μ l、CCR7 BV421 1 μ l、CD25 PE-CF594 0.5 μ l、CD28 APC 2 μ l、CD38 FITC 5 μ l。室温避光孵育30 min。实验管和FMO对照管均加入1 ml PBS 1 200 r/s、5 min离心洗涤后,加入200 μ l PBS重悬,除7-AAD FMO对照以外,每管加3 μ l 7-AAD,室温避光孵育5 min。

3. 流式检测HIV/AIDS外周血T细胞亚群及活化状态:据相关文献报道,通过CCR7、CD45RA的表达划分T细胞亚群为初始T细胞(T_N , $CD45RA^+CCR7^+$)、中央记忆性T细胞(T_{CM} , $CD45RA^-CCR7^+$)、效应记忆性T细胞(T_{EM} , $CD45RA^-CCR7^-$)、终末效应记忆T细胞(T_{EMRA} , $CD45RA^+CCR7^-$)^[11];通过CD45RA、CD25分子表达差异将调节性T细胞(Treg)划分为静息型Treg细胞(Fr I)、细胞因子分泌型Treg细胞亚群Fr III及活化的Treg细胞亚群(Fr II)^[12]。设置并调节LSR Fortessa流式细胞仪各个通道的电压和补偿,采用FACS Diva软件进行数据记录及多色分析,通过FMO对照确定细胞分群,分析T细胞亚群的比例改变和活化程度。

结 果

一、最适电压的调节

取未染色细胞的单细胞悬液300 μ l(细胞数为

3×10^6 个)。分别调节BV786、APC-H7、BV510、AF700、PE-CF594、BV421、FITC、APC、PE、7-AAD共10个荧光通道的电压。将这10个荧光信号最高峰控制在 10^2 的位置且最大值在数轴的1/4范围内,此时的电压即为检测样本的最适电压,如图1所示。

二、最适荧光补偿的调节

CompBeads阴性管加入BD 阴性 CompBeads Beads 80 μl 。CompBeads单阳管中均加入BD阴性、阳性beads各40 μl , 分别加入不同荧光标记的抗体。通过调整合适的抗体浓度 (CD3 BV786 0.5 μl 、CD4 APC-H7 1 μl 、CD8 BV510 1 μl 、CD45RA AF700 1 μl 、CD25 PE-CF594 0.1 μl 、CCR7 BV421 1 μl 、CD38 FITC 5 μl 、CD28 APC 5 μl 、HLA-

DR PE 0.2 μl), 使CompBeads单阳管阳性峰位于 $10^4 \sim 10^5$ 。使用流式细胞仪记录Beads阴性管及各CompBeads单阳管数据, Diva软件分析数据并自动调节CompBeads的荧光补偿, 如图2所示。

用于细胞死活染色的7-AAD无法采用CompBeads进行补偿调节, 我们可使用细胞制备7-AAD单染管。即取未染色细胞悬液100 μl (细胞数为 1×10^6 个), 置入70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中静置5 min, 取出后置于冰上降至0 $^{\circ}\text{C}$, 与等量的未染色细胞悬液混匀后加3 μl 7-AAD, 室温避光孵育5 min。

此外, 由于CompBeads和细胞结合抗体的方式和效能存在差异, 采用CompBeads所调节的补偿并不能真正适用于实际检测样本, 因此还需使用细胞单色染色管对自动补偿进行手动微调。本

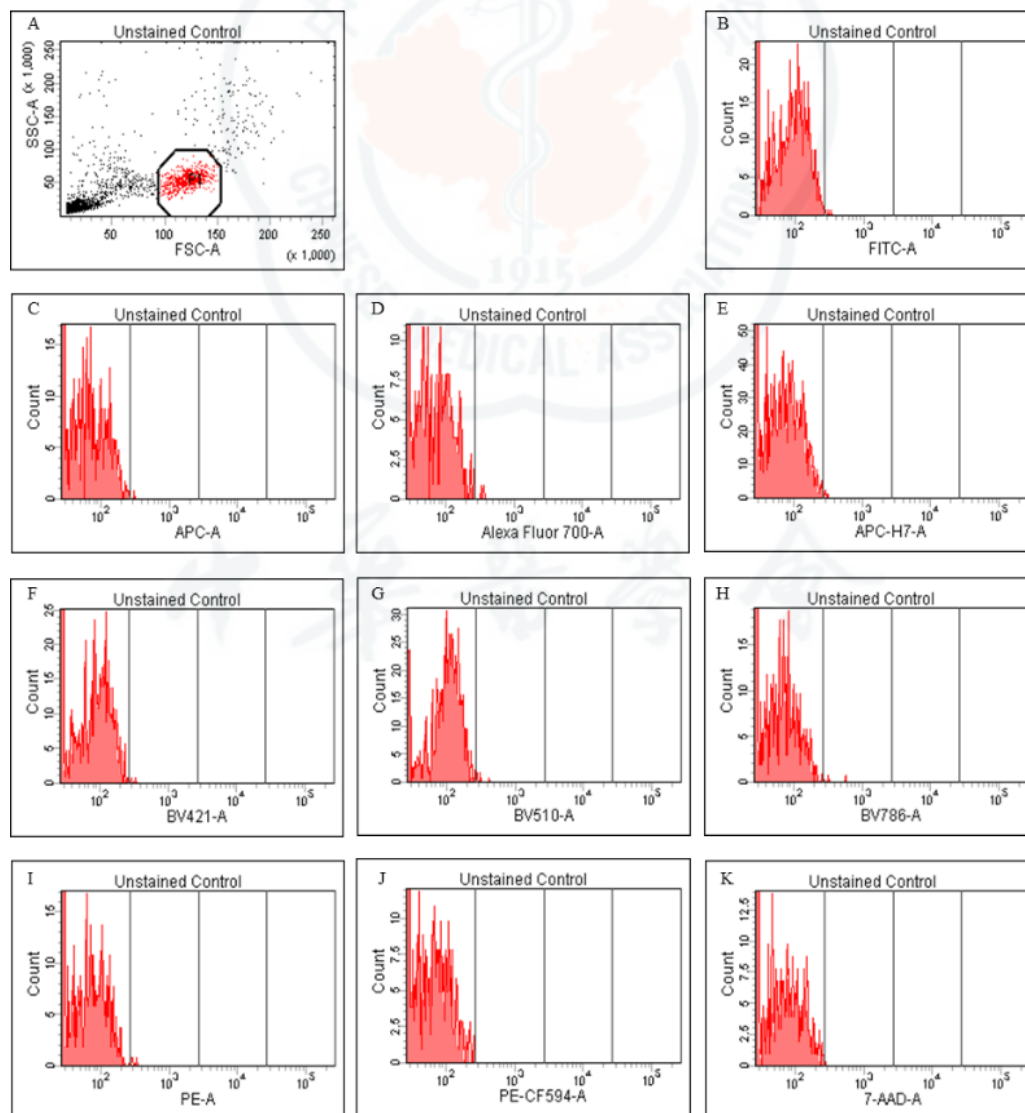


图1 荧光通道最适电压

实验中,分别采用CD4 BV786、CD4 APC-H7、CD4 BV510、CD4 AF700、CD4 PE-CF594、CD4 BV421、CD4 FITC、CD4 APC、CD4 PE抗体,对患者外周血PBMC进行染色,制成细胞单阳管。以PE-CF594为例,手动调节补偿,使PE-CF594⁺细胞亚群的FITC、APC、APC-H7等9个通道的平均荧光强度值(mean fluorescence intensity, MFI)尽量相等,如图3所示。

三、HIV/AIDS患者的外周血检测

利用建立的十色流式配色方案检测HIV/AIDS患者外周血标本。其设门策略可以依次FSC-H/FSC-A(去除粘连细胞),FSC-A/SSC-A(圈出淋巴细胞)、CD3/7-AAD(确定活的T细胞)、CD4/CD8(确定T细胞亚群),CD45RA/CCR7(分析CD4/CD8 T细胞亚群)^[13],CD45RA/CD25(分析Treg细胞亚群),CD28/CD38/HLA-DR(分析细胞

活化分子表达)^[14]。依次圈门如图4所示,在CD4/CD8细胞中划分出细胞亚群,通过FMO对照确定各活化分子染色的阴性边界。

应用此方法对5例未接受抗病毒治疗的HIV/AIDS患者外周血进行检测。如表1所示,5例患者CD4⁺T细胞亚群的比例分别为CD4⁺T_N(42.20 ± 9.65) %、CD4⁺T_{CM}(40.9 ± 7.85) %、CD4⁺T_{EM}(16.14 ± 7.13) %、CD4⁺T_{EMRA}(0.79 ± 0.47) %。与既往报道一致,T_{EMRA}和T_{EM}亚群中HLA-DR的表达显著高于T_N和T_{CM}^[15];同样,CD38在T_{EMRA}亚群中的表达量最高。CD28的表达趋势则恰恰相反,在T_{EMRA}和T_{EM}亚群中的表达远远低于T_N和T_{CM}。调节性T细胞(CD4⁺Treg)各亚群的比例分别为rTreg(Fr I)(2.55 ± 0.41) %、aTreg(Fr II)(0.71 ± 0.21) %、Treg Fr III(7.29 ± 2.85) %,aTreg中HLA-DR和CD38的表达显著高于rTreg(Fr I)和Treg Fr III。

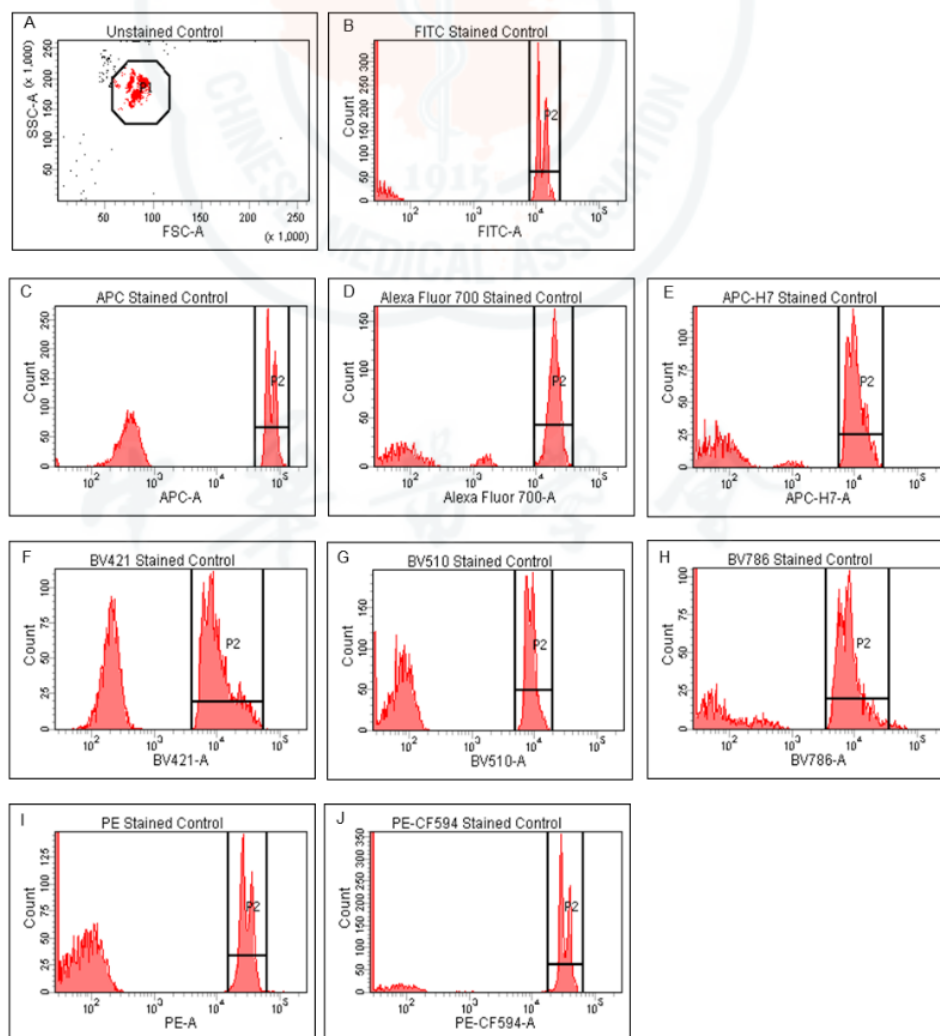


图2 CompBeads单色染色自动调节补偿

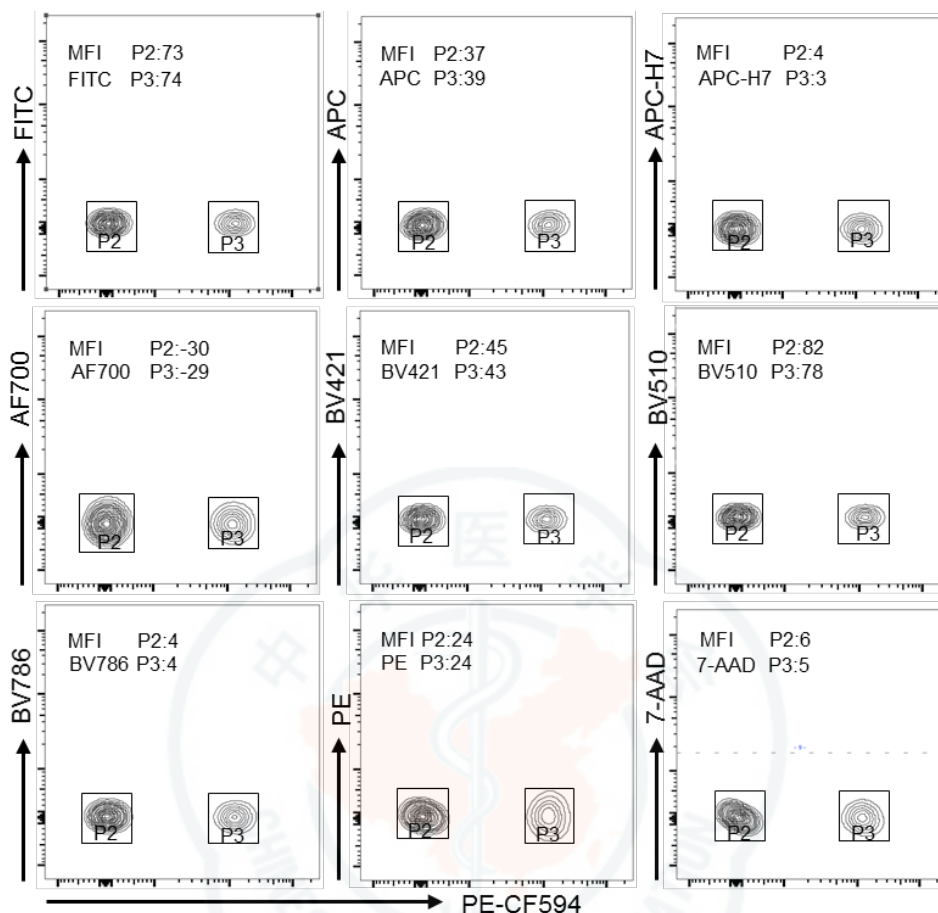


图3 细胞单色染色进行补偿微调

讨 论

尽管流式细胞技术已进入日新月异的多色时代,目前在临床研究中仍大多采用五色以下的常规流式细胞术检测T细胞亚群及其他指标。例如,Charles等^[16]采用四色流式分析方法进行T细胞相关研究,3管染色完成8个指标的检测;Mahnke等^[17]在T细胞淋巴瘤研究中采用五色流式分析方法,2管染色检测7个指标。上述实验在多管检测中难以准确获得特定T细胞亚群的生物学特性,并且对于样本的需求量较大。近年来,随着能同时检测6色以上的流式细胞术——多色流式分析技术(multicolor flowcytometry, MFC)的出现,研究者能够进行复杂实验,能够同时分析更多荧光参数,精确研究同一细胞上的多种表面分子之间的关系。本研究采用十色流式方案对HIV/AIDS患者外周血PBMC进行染色,通过CD3、CD4、CD8、CD45RA、CCR7将CD4⁺、CD8⁺T细胞进一步细分为T_N、T_{CM}、T_{EM}、T_{EMRA};通过CD45RA、CD25分子表达强弱将调节

性T细胞(Treg)划分rTreg(Fr I)、aTreg(Fr II)、Treg Fr III。在此基础上,分析以上多个T细胞亚群表面CD28、CD38和HLA-DR分子的表达水平,以全面了解HIV/AIDS患者的免疫状态。

在多色流式技术的应用过程中,使用的荧光通道越多,荧光之间的相互干扰越强,补偿的调节越为复杂。因此,合理选择荧光抗体、优化染色方案,才能获得可靠的数据。2010年,流式权威杂志《Cytometry Part A》中首次提出了优化的多参数流式分析(optimized multicolor immunofluorescence panels, OMIP)这一概念,对抗体荧光搭配、抗体最适反应浓度、检测电压以及抗体孵育条件等提出了多方面优化^[18]。到目前为止已经有多篇OMIP文章发表,涵盖了T细胞、B细胞和NK细胞等多种细胞的表型与功能检测^[19-22]。本研究首次在HIV/AIDS患者的临床研究中提出优化的十色流式方案,同时检测多个T细胞亚群与Treg亚群的活化状态。本方案根据多色流式荧光搭配原则,对低表达的CCR7、CD25采用强荧光素BV421、PE-CF594;

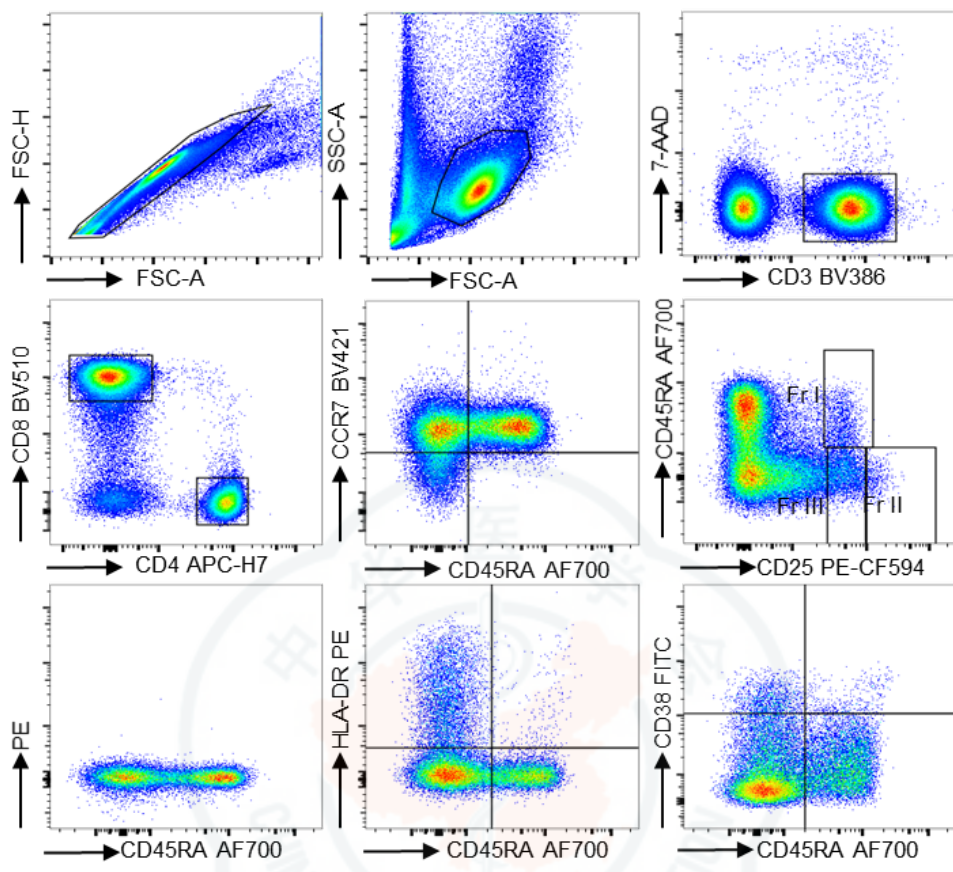


图4 HIV/AIDS 患者外周血 T 细胞分析策略

表 1 5 例 HIV/AIDS 患者外周血 T 细胞中各细胞亚群活化的情况 ($\bar{x} \pm s$)

细胞亚群	细胞亚群比例	HLA-DR	CD38	CD28
CD4 ⁺	33.06 ± 11.68	18.81 ± 10.06	6.00 ± 1.61	93.32 ± 7.75
CD4 ⁺ T _N	42.20 ± 9.65	2.29 ± 0.85	4.65 ± 2.19	99.90 ± 0.17
CD4 ⁺ T _{CM}	40.90 ± 7.85	19.23 ± 7.58	9.29 ± 2.20	98.50 ± 1.98
CD4 ⁺ T _{EM}	16.14 ± 7.13	58.90 ± 22.44	4.05 ± 2.44	71.58 ± 24.11
CD4 ⁺ T _{EMRA}	0.79 ± 0.47	52.34 ± 25.77	19.98 ± 11.39	74.82 ± 30.10
CD4 ⁺ rTreg (Fr I)	2.55 ± 0.41	3.99 ± 3.00	2.23 ± 1.14	99.62 ± 0.50
CD4 ⁺ aTreg (Fr II)	0.71 ± 0.21	71.50 ± 14.55	12.03 ± 5.58	99.84 ± 0.36
CD4 ⁺ Treg Fr III	7.29 ± 2.85	29.80 ± 12.36	6.63 ± 2.50	99.86 ± 0.17

对高表达的CD4、CD8、CD45RA和CD38采用弱荧光素如BV510、APC-H7、AF700、FITC；中等表达的CD3、HLA-DR选择BV786、PE等通道。由于需要区分CD25的阴性、弱阳性、强阳性表达来界定Treg不同亚群，CD25荧光素的选择尤为重要。本研究通过多次试验发现，仅PE-CF594或PE这两种强荧光素可以精确区分出CD25的不同表达强度。此外，由于荧光补偿并不能真正扣除所有的荧光泄漏，需要FMO对照来确定优化方案中泄漏的荧光并不影响细胞分群，本研究中尤其需要注意的

是弱表达或者连续表达的分子CCR7和CD25是否受到其他通道泄漏荧光的影响。

本研究应用此优化的十色方案能够准确识别HIV/AIDS患者外周静脉血中各细胞亚群,以及各亚群CD28、HLA-DR和CD38的表达量，从而分析各亚群细胞的异常活化水平。既往研究认为，CD38、HLA-DR参与T淋巴细胞存活、分化、增殖等主要生理过程，是T细胞活化的重要标志物，因此可作为HIV免疫活化的监测指标^[23]；CD28分子在T细胞多次重复活化后表达量下调，因而可用

于检测HIV/AIDS患者的T细胞功能障碍。本研究发现,HIV/AIDS患者 T_{EMRA} 、 T_{EM} 亚群中HLA-DR的表达远远高于 T_N 、 T_{CM} ,而CD28表达显著低于 T_N 、 T_{CM} ,提示T细胞的过度活化可能与重复的抗原刺激相关,并进一步导致T细胞功能障碍,这可能是HIV感染后免疫缺陷的重要原因之一^[24-25]。多个活化分子尤其是HLA-DR在aTreg中的表达显著高于其他Treg亚群,提示高表达HLA-DR可能是HIV/AIDS患者外周血中aTreg的表型特征之一,需进一步扩大样本量进行研究证实。本研究方法可正确了解HIV/AIDS患者的免疫功能变化及应答规律,对预测疾病转归及指导临床治疗有积极意义。

根据OMIP的要求,本研究依次进行合理搭配抗体荧光素、确定检测电压、调节补偿条件、合理设门,建立优化的十色流式方案。应用此方案能准确识别特定的T细胞各亚群,并同时分析这些亚群细胞的活化状态,克服了以前使用常规流式不能同时分析相应参数的缺点,节省了珍贵的临床样本,为深入理解T细胞亚群的比例变化与活化状态的研究提供了新的分析方法。

综上,本研究方案建立了一种简便、准确应用流式细胞术检测外周血T细胞及其亚群的数量和功能的多色流式检测方法,为HIV/AIDS患者细胞免疫状态的分析提供了可靠的方法学,也为研究HIV/AIDS患者的机制和病程监控提供了新途径。

参 考 文 献

- [1] Cockerham LR, Siliciano JD, Sinclair E, et al. CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4⁺ T cells[J]. PLoS One,2014,9(10):e110731.
- [2] Buzon MJ, Sun H, Li C, et al. HIV-1 persistence in CD4⁺ T cells with stem cell-like properties[J]. Nat Med,2014,20(2):139-142.
- [3] Weiss L, Chevalier MF, Assoumou L, et al. T-cell activation positively correlates with cell-associated HIV-DNA level in viremic patients with primary or chronic HIV-1 infection[J]. AIDS,2014,28(11):1683-1687.
- [4] Tanaskovic S, Price P, French MA, et al. Impaired upregulation of the costimulatory molecules, CD27 and CD28, on CD4⁺ T cells from HIV patients receiving ART is associated with poor proliferative responses[J]. AIDS Research and Human Retroviruses,2017,33(2):101-109.
- [5] Serrano-Villar S, Gutiérrez C, Vallejo A, et al. The CD4/CD8 ratio in HIV-infected subjects is independently associated with T-cell activation despite long-term viral suppression[J]. J infect,2013,66(1):57-66.
- [6] Szalóki G, Goda K. Compensation in multicolor flow cytometry[J]. Cytometry Part A,2015,87(11):982-985.
- [7] Deeks SG, Autran B, Berkhout B, et al. Towards an HIV cure: a global scientific strategy[J]. Nat Rev Immunol,2012,12(8):607-614.
- [8] Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis[J]. Nat Rev Immunol,2014,14(1):24-35.
- [9] Kwong PD, Mascola JR. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies[J]. Immunity,2012,37(3):412-425.
- [10] Morice WG, Chen D, Kurtin PJ, et al. Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenström's macroglobulinemia[J]. Modern Pathol,2009,22(6):807-816.
- [11] Tinago, Willard, et al. Clinical, immunological and treatment-related factors associated with normalised CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio: effect of naive and memory T-cell subsets[J]. PLoS One,2014,9(5):e97011.
- [12] Lugli E, Gattinoni L, Roberto A, et al. Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells[J]. Nat Protoc,2013,8(1):33-42.
- [13] den Braber I, Mugwagwa T, Vrisekoop N, et al. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans[J]. Immunity,2012,36(2):288-297.
- [14] Campion SL, Brodie TM, Fischer W, et al. Proteome-wide analysis of HIV-specific naive and memory CD4⁺ T cells in unexposed blood donors[J]. J Exper Med,2014,211(7):1273-1280.
- [15] Serrano-Villar S, Pérez-Eliás MJ, Dronda F, et al. Increased risk of serious non-AIDS-related events in HIV-infected subjects on antiretroviral therapy associated with a low CD4/CD8 ratio[J]. PLoS One,2014,9(1):e85798.
- [16] Charles J, Di Domizio J, Salameire D, et al. Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CC; R6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor[J]. J Invest Dermatol,2010,130(6):1646-1656.
- [17] Mahnke YD, Roederer M. OMIP-001: Quality and phenotype of Ag-responsive human T-cells[J]. Cytometry Part A,2010,77(9):819-820.
- [18] Wei C, Jung J, Sanz I. OMIP-003: Phenotypic analysis of human memory B cells[J]. Cytometry Part A,2011,79(11): 894-896.
- [19] De Rosa SC, Carter DK, McElrath MJ. OMIP-014: Validated multifunctional characterization of antigen-specific human T cells by intracellular cytokine staining[J]. Cytometry Part A,2012,81(12):1019-1021.
- [20] Biancotto A, Dagur PK, Chris Fuchs J, et al. OMIP-004: In-depth characterization of human T regulatory cells[J]. Cytometry Part A,2012,81(1):15-16.
- [21] Foulds KE, Donaldson M, Roederer M. OMIP-005: Quality and phenotype of antigen-responsive rhesus macaque T cells[J]. Cytometry Part A,2012,81(5):360-361.
- [22] Bocsi J, Melzer S, Dähnert I, et al. OMIP-023: 10-Color, 13 antibody panel for in-depth phenotyping of human peripheral blood leukocytes[J]. Cytometry Part A,2014,85(9):781-784.
- [23] Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology[J]. Physiol Rev,2008,88(3):841-886.
- [24] 谢静. 异常免疫激活与HIV/AIDS疾病进展和抗病毒治疗疗效的相关性及临床干预研究[D]. 北京协和医学院中国医学科学院 北京协和医学院 清华大学医学部 中国医学科学院,2013.
- [25] 谢静. 未经抗病毒治疗的HIV/AIDS患者CD8⁺ T细胞HLA-DR, CD38表达水平与CD4⁺ T细胞计数的相关性研究[J]. 中华医学杂志,2016,55(1):36-39.

(收稿日期: 2017-02-27)

(本文编辑: 孙荣华)

宋洋子, 孔雅娴, 郝禹, 等. 十色流式检测HIV/AIDS患者外周血中T淋巴细胞亚群及活化状态[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018,12(1):28-34.