

# 甲型流感病毒感染者CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞亚群分析

徐晓雪<sup>1</sup> 王蓓蓓<sup>1</sup> 宋蕊<sup>1</sup> 宋洋子<sup>2</sup> 赵雪<sup>1</sup> 姜钰<sup>2</sup> 曹钰<sup>2</sup> 曾辉<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 研究甲型流感病毒(IAV)感染者外周血中CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞亚群的特征。**方法** 收集2018年12月至2019年3月流感季就诊于北京大学地坛医院教学医院感染二科IAV感染者共37例及同期体检的健康对照者51例,应用多色流式细胞检测平台,检测外周血不同分化阶段CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的比例。**结果** 与健康对照相比,IAV感染者外周血T细胞中CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞比例下降[24.50% (14.70%, 44.10%) vs. 8.85% (5.14%, 18.15%)],差异有统计学意义( $U = 326.00$ 、 $P < 0.001$ )。IAV感染者与健康对照相比,其CD8<sup>+</sup>T中初始T细胞( $T_N$ ) [3.88% (1.28%, 9.48%) vs. 0.22% (0.12%, 0.60%) ]、中央记忆性T细胞( $T_{CM}$ ) [8.70% (4.43%, 15.80%) vs. 1.51% (0.69%, 2.54%) ]、效应记忆性T细胞( $T_{EM}$ ) [22.30% (13.80%, 30.40%) vs. 7.71% (5.23%, 16.25%) ]和终末效应记忆T细胞( $T_{EMRA}$ ) [(46.99 ± 22.91) % vs. (21.60 ± 13.38) %] 4个亚群中CD160<sup>+</sup>细胞的比例均下降,差异有统计学意义( $U = 238.50$ 、81.50、412.00,  $t = 6.03$ ;  $P$ 均 $< 0.001$ )。IAV感染者出院时较入院时CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞比例上升[(8.92 ± 7.84) % vs. (16.40 ± 9.43) %] ( $t = 4.09$ 、 $P = 0.001$ ),但仍低于正常水平[24.50% (14.70%, 44.10%) vs. (16.40 ± 9.43) %],差异有统计学意义( $U = 209.50$ 、 $P = 0.0029$ )。**结论** 甲型流感病毒感染者外周血中T淋巴细胞CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞亚群比例显著降低,可能是免疫失衡的重要表现。

**【关键词】** CD160共抑制分子; 多色流式; 季节性甲型流感; T淋巴细胞

**Analysis of CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocyte subsets of influenza A virus infectors** Xu Xiaoxue<sup>1</sup>, Wang Beibei<sup>1</sup>, Song Rui<sup>1</sup>, Song Yangzi<sup>2</sup>, Zhao Xue<sup>1</sup>, Jiang Yu<sup>2</sup>, Cao Yu<sup>2</sup>, Zeng Hui<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Peking University Ditan Teaching Hospital, 100015 Beijing, China; <sup>2</sup>Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, 100015 Beijing, China  
Corresponding author: Zeng Hui, Email: hzeng98@yahoo.com

**【Abstract】Objective** To investigate the characteristics of CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with influenza A virus (IAV) infection. **Methods** Total of 37 patients with IAV infection and 51 healthy controls in the same period were recruited in Peking University Ditan Teaching Hospital from December 2018 to March 2019, and the frequencies of CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells in peripheral blood of different differentiation stages were detected by multicolor flow cytometry. **Result** Compared with health controls, the frequencies of CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells in peripheral blood of patients with IAV infection decreased [24.50% (14.70%, 44.10%) vs. 8.85% (5.14%, 18.15%)], with significant difference ( $U = 326.00$ ,  $P < 0.001$ ). Compared with the controls, these decrease occurred in the four subsets of CD8<sup>+</sup>T cells that include the naive T cells ( $T_N$ ) [3.88% (1.28%, 9.48%) vs. 0.22% (0.12%, 0.60%)], central memory T cells ( $T_{CM}$ ) [8.70% (4.43%, 15.80%) vs. 1.51% (0.69%, 2.54%)], effector memory T cells ( $T_{EM}$ ) [22.30% (13.80%, 30.40%) vs. 7.71% (5.23%, 16.25%)] and effective memory re-expressing T cells ( $T_{EMRA}$ ) [(46.99 ± 22.91) % vs. (21.60 ± 13.38) %] of cases with IAV infection, with significant differences ( $U = 238.50$ , 81.50, 412.00,  $t = 6.03$ ; all  $P < 0.001$ ). The proportion of CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells in the discharged patients with IAV infection was higher than that of admission [(8.92 ± 7.84) % vs. (16.40 ± 9.43) %], with significant difference ( $t = 4.09$ ,  $P = 0.001$ ),

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2020.03.005

基金项目: 国家重点研发计划(No. 2016YFC1200805); 北京市留学人员科技项目择优资助(优秀类)项目; 2017年新发突发传染病研究北京市重点实验室开放研究课题(No. DTKF201701); 2017年北京地坛医院院内基金(No. DTZLX201709)

作者单位: 100015 北京, 北京大学地坛医院教学医院传染病学研究所<sup>1</sup>, 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院传染病学研究所<sup>2</sup>

通信作者: 曾辉, Email: hzeng98@yahoo.com

but still lower than that of health controls [24.50% (14.70%, 44.10%) vs (16.40 ± 9.43) %], with significant difference ( $U = 209.50, P = 0.0029$ ). **Conclusions** The frequency of CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cell subsets in peripheral blood T lymphocytes of patients with IAV infection decreased significantly, and may be an important manifestation of immune imbalance.

【Key words】CD160 inhibitory; Multi-color flow; Severe influenza A; T cells

甲型流感是由甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 引起的一种呼吸道疾病, 部分患者可发生肺炎等严重并发症, 甚至导致死亡<sup>[1]</sup>。

细胞毒性T细胞可通过多种作用机制清除病毒<sup>[2]</sup>, 其数量与功能与甲型流感预后密切相关<sup>[3]</sup>。目前研究一致认为, 在慢性病毒感染中, 长期抗原刺激诱导共抑制分子表达, 虽然可以抑制T细胞过度活化<sup>[4]</sup>, 减轻组织免疫损伤, 却可导致T细胞功能耗竭<sup>[5-6]</sup>, 不利于机体清除病毒。但急性病毒性感染中, 共抑制分子对T细胞的功能影响尚在争论。

CD160属于Ig超家族的糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定蛋白成员, 最初被鉴定为表达在NK细胞表面识别MHC I类分子的调节性受体<sup>[7]</sup>。在慢性HIV以及HBV感染中, CD160在CD8<sup>+</sup>T细胞上发挥免疫抑制作用, 因此被认为是共抑制分子<sup>[5, 8]</sup>。然而在急性病毒感染中, CD160在CD8<sup>+</sup>T细胞上的表达尚未被关注。因此, 本研究探讨IAV感染者CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞亚群的特点, 现报道如下。

## 资料与方法

### 一、研究对象

本研究共纳入2018年12月至2019年3月流感季就诊于北京大学地坛医院教学医院的季节性甲型流感病毒感染者37例; 招募与此性别、年龄匹配的51例同期体检的健康对照。入组患者均符合《流行性感动的诊疗方案(2018年版)》<sup>[9]</sup>的诊断标准。临床表现为重症病例, 符合以下至少1项: ①持续高热> 3 d, 伴有剧烈咳嗽, 咯脓痰、血痰, 或胸痛; ②呼吸频率快, 呼吸困难, 口唇紫绀; ③神志改变, 如反应迟钝、嗜睡、躁动、惊厥等; ④严重呕吐、腹泻, 出现脱水表现; ⑤合并肺炎; ⑥原有基础疾病明显加重。

甲型流感病毒核酸检测阳性, 入院时发病7 d及以内。排除了发病7 d以后的非急性期患者, 妊娠期患者, 18岁以下儿童患者, 合并乙型流感病毒

感染者。研究经本院医学伦理委员会批准(京地伦字[2012]8号), 研究对象均已签署知情同意书。

### 二、方法

1. 主要试剂: RPMI1640培养基、磷酸盐缓冲溶液(PBS, 美国Corning公司); 淋巴细胞分离液(lymphoprep, 加拿大Stem Cell公司); 胎牛血清(FBS, 美国Gibco公司); 流式荧光抗体CD3 BV786、CD4 APC-Fire750、CD8 BV510、CD160 PE、CD45RA AF700、7-AAD均购自美国BD Pharmingen公司。流式荧光抗体CCR7 BV421购自美国Biolegend公司。

2. 分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs): 采集EDTA-K2抗凝外周血4 ml, 将PBS与EDTA抗凝血按1:1充分混匀, 沿管壁缓慢加到2 ml淋巴细胞分离液上层, 室温离心2 000 r/min (离心半径 $r = 11.5$  cm)、20 min; 吸取淋巴细胞分离液与PBS中间层细胞, 加入PBS, 混匀后室温离心1 500 r/min ( $r = 11.5$  cm)、10 min, 去除淋巴细胞分离液。

3. 样品制备: 在100 ml阴性单细胞悬液(含 $5 \times 10^5$ 个细胞)中, 加入相应的流式荧光抗体, 4℃避光孵育20 min。加入1 ml PBS, 1 200 r/min, 离心5 min弃上清, 加入200  $\mu$ l PBS重悬, 每管加3 ml 7-氨基放线菌素D (7-Aminoactinomycin D, 7-AAD), 室温避光孵育5 min。设置并调节LSR Fortessa (美国BD公司) 各通道的电压及荧光补偿。使用FACS Diva软件进行数据记录, Flowjo 10.0 (美国BD公司) 对所获细胞流式数据进行分析。

根据CD45RA和CCR7表达, 将CD8<sup>+</sup>T细胞亚群划分为初始T细胞( $T_N$ , CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>)、中央记忆性T细胞( $T_{CM}$ , CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>)、效应记忆性T细胞( $T_{EM}$ , CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>)及终末效应记忆T细胞( $T_{EMRA}$ , CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>)<sup>[10]</sup>。

### 三、统计学处理

应用Graph Prism7.0软件进行统计分析。健康对照和IAV感染者正态分布资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 年龄、白细胞总数、红细胞计数、血小板计数、总胆

红素、 $T_{CM}$ 、 $T_{EM}$ 、 $CD160^+T_{EMRA}$ 细胞比例以及IAV感染者出院时与健康对照 $CD160^+T_{EMRA}$ 细胞比例,采用独立样本 $t$ 检验;同一患者入院时与出院时, $CD160^+CD8^+T$ 细胞比例、 $CD160^+T_{EMRA}$ 细胞比例比较采用配对样本 $t$ 检验。非正态分布资料采用中位数和四分位间距[M (P25, P75)]表示:中性粒细胞数、淋巴细胞数、肌酐、丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、直接胆红素、白蛋白、 $CD160^+CD4^+T$ 细胞和 $CD160^+CD8^+T$ 细胞的比例、 $T_N$ 、 $T_{EMRA}$ 、 $CD160^+T_N$ 细胞、 $CD160^+T_{CM}$ 、 $CD160^+T_{EM}$ 细胞的比例以及IAV感染者出院时分别与该组入院时和健康对照 $CD160^+T_N$ 、 $CD160^+T_{CM}$ 、 $CD160^+T_{EM}$ 细胞比例比较,IAV感染者出院时与健康对照 $CD160^+CD8^+T$ 细胞比例比较,采用非参数检验的Mann-Whitney检验。健康对照和IAV感染者性别构成比比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、IAV感染者和健康对照的一般资料

51例健康对照和37例IAV感染者年龄、性别、肌酐、丙氨酸氨基转移酶和直接胆红素水平差异无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ );白细胞计数、中性粒细胞计数、淋巴细胞计数、红细胞计数、血小板计数、天门冬氨酸氨基转移酶、总胆红素和白蛋白水

平差异均有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ ),见表1。

二、IAV感染者外周血 $CD160^+CD8^+T$ 细胞比例分析51例健康对照和37例急性期(发病1~7 d)的IAV感染者外周血 $CD160^+T$ 细胞亚群比例,见图1A。两组 $CD160^+CD4^+T$ 细胞比例[0.23% (0.09%, 0.48%) vs. 0.22% (0.13%, 0.45%)]差异无统计学意义( $U = 1106.00$ 、 $P = 0.7602$ ),见图1B;而IAV感染者 $CD160^+CD8^+T$ 细胞比例显著低于健康对照[24.50% (14.70%, 44.10%) vs. 8.85% (5.14%, 18.15%)],差异有统计学意义( $U = 326.00$ 、 $P < 0.001$ ),见图1C。

三、IAV感染者 $CD8^+T$ 细胞各亚群 $CD160^+$ 细胞比例均显著下降

分析IAV感染者 $CD8^+T$ 细胞各个亚群阶段计数变化,见表2。与健康对照相比,IAV感染者 $CD8^+T$ 细胞中, $T_{EM}$ 细胞比例显著增高( $t = 3.51$ 、 $P < 0.001$ ),而 $T_{EMRA}$ 细胞比例显著下降( $U = 496.50$ 、 $P < 0.001$ ),差异均有统计学意义。

与健康对照相比,IAV感染者 $CD160^+CD8^+$ 细胞比例在 $T_N$ 、 $T_{CM}$ 、 $T_{EM}$ 和 $T_{EMRA}$ 4个亚群中的比例均显著下降,差异有统计学意义( $P$ 均 $< 0.001$ ),见表3。

### 四、IAV感染者治疗前后 $CD160^+CD8^+T$ 细胞比例

分析16例(37例中仅16例在出院时采集样本)出院的IAV感染者(入院治疗时间3~19 d,中位数7 d)治疗前后 $CD160^+CD8^+T$ 细胞的比例。

表1 健康对照和 IAV 感染者的一般资料

指标	健康对照	IAV感染者	统计量	P值
年龄( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	62 $\pm$ 12	66 $\pm$ 13	$t = 1.56$	0.122
性别(例,男/女) <sup>a</sup>	22/29	20/17	$\chi^2 = 1.02$	0.312
血细胞				
白细胞总数( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ )	6.07 $\pm$ 1.38	7.38 $\pm$ 3.29	$t = 2.56$	0.012
中性粒细胞[M (P25, P75), $\times 10^9/L$ ]	3.19 (2.73, 4.02)	5.38 (4.03, 7.47)	$U = 456.00$	$< 0.001$
淋巴细胞[M (P25, P75), $\times 10^9/L$ ]	2.04 (1.58, 2.37)	0.98 (0.58, 1.19)	$U = 188.50$	$< 0.001$
红细胞( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ )	4.62 $\pm$ 0.47	4.68 $\pm$ 0.61	$t = 4.68$	$< 0.001$
血小板( $\bar{x} \pm s$ , $\times 10^9/L$ )	234.50 $\pm$ 55.52	136.70 $\pm$ 84.50	$t = 6.55$	$< 0.001$
肝肾功能指标				
肌酐[M (P25, P75), $\mu\text{mol/L}$ ]	69.00 (57.00, 78.75)	68.50 (56.55, 85.70)	$U = 807.00$	0.547
丙氨酸氨基转移酶[M (P25, P75), U/L]	15.80 (12.55, 23.25)	17.70 (14.05, 26.85)	$U = 785.50$	0.256
天冬氨酸氨基转移酶[M (P25, P75), U/L]	19.90 (16.80, 24.30)	29.75 (22.95, 42.30)	$U = 404.00$	$< 0.001$
总胆红素( $\bar{x} \pm s$ , U/L)	11.70 $\pm$ 3.59	9.58 $\pm$ 4.38	$t = 2.48$	0.015
直接胆红素[M (P25, P75), U/L]	3.80 (3.25, 4.60)	3.90 (2.78, 5.93)	$U = 814.50$	0.375
白蛋白[M (P25, P75), g/L]	47.30 (45.75, 48.80)	34.50 (31.85, 37.68)	$U = 42.00$	$< 0.001$

注:<sup>a</sup>:例数,其他数据:非正态分布数据均采用中位数(四分位数)[M (P25, P75)],正态分布数据采用 $\bar{x} \pm s$ ,表示; $U$ 值:Mann-Whitney 检验统计量; $t$ 值: $t$ 检验统计量

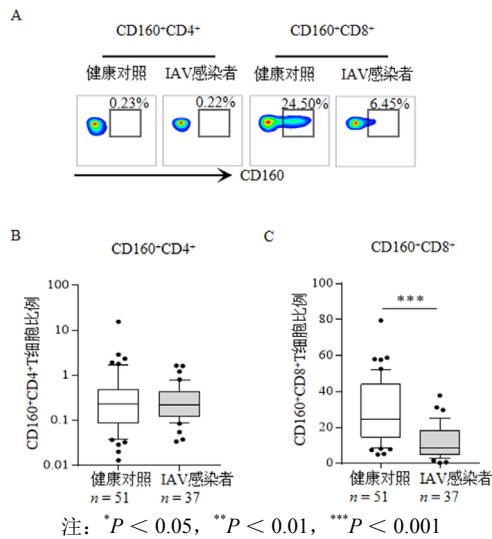


图1 健康对照和IAV感染者CD160<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞及CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞比例

结果显示,与治疗前相比,IVA感染者治疗后CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞比例显著升高[(8.92 ± 7.84)% vs. (16.40 ± 9.43)%],差异有统计学意义( $t = 4.09$ 、 $P = 0.001$ ),见图2A和2B;但较健康对照CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞比例仍下降[24.50% (14.70%, 44.10%) vs. (16.40 ± 9.43)%],差异有统计学意义( $U = 209.50$ 、 $P = 0.0029$ ),见图2A和2C。

分析IAV感染者出院时CD8<sup>+</sup>T细胞各亚群阶段CD160<sup>+</sup>细胞计数变化,发现与入院时相比,出院时CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞比例在T<sub>N</sub>、T<sub>CM</sub>和T<sub>EM</sub> 3个亚群中比例均显著升高,差异有统计学意义( $P$ 均< 0.05),见表4;但较健康对照CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞比例在T<sub>N</sub>、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>和T<sub>EMRA</sub> 4个亚群中的比例均显著下降,差异有统计学意义( $P$ 均< 0.05),见表5。

表2 健康对照和 IAV 感染者外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞各分化阶段的比例

组别	例数	CD8 <sup>+</sup> T细胞亚群			
		T <sub>N</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>CM</sub> ( $\bar{x} \pm s$ , %)	T <sub>EM</sub> ( $\bar{x} \pm s$ , %)	T <sub>EMRA</sub> [M (P25, P75), %]
健康对照	51	13.60 (5.17, 31.40)	5.54 ± 4.28	38.78 ± 14.00	34.80 (22.80, 48.80)
IAV感染者	37	12.60 (3.60, 26.95)	6.97 ± 6.69	52.38 ± 22.24	18.60 (8.86, 32.40)
统计量		$U = 852.00$	$t = 1.22$	$t = 3.51$	$U = 496.50$
P值		0.4425	0.2244	< 0.001	< 0.001

表3 健康对照和 IAV 感染者外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞各分化阶段 CD160<sup>+</sup> 细胞的比例

组别	例数	CD8 <sup>+</sup> T细胞亚群			
		T <sub>N</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>CM</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>EM</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>EMRA</sub> ( $\bar{x} \pm s$ , %)
健康对照	51	3.88 (1.28, 9.48)	8.70 (4.43, 15.80)	22.30 (13.80, 30.40)	46.99 ± 22.91
IAV感染者	37	0.22 (0.12, 0.60)	1.51 (0.69, 2.54)	7.71 (5.23, 16.25)	21.60 ± 13.38
统计量		$U = 238.50$	$U = 81.50$	$U = 412.00$	$t = 6.03$
P值		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表4 16例 IAV 感染者入院时和出院时外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞各分化阶段 CD160<sup>+</sup> 细胞的比例

时间点	CD8 <sup>+</sup> T细胞亚群			
	T <sub>N</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>CM</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>EM</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>EMRA</sub> ( $\bar{x} \pm s$ , %)
入院时	0.21 (0.00, 0.53)	1.21 (0.62, 1.74)	7.09 (4.87, 12.40)	20.62 ± 11.88
出院时	1.60 (0.83, 3.54)	4.69 (2.84, 9.23)	12.10 (8.33, 22.35)	28.20 ± 15.93
统计量	$U = 38.50$	$U = 23.00$	$U = 80.50$	$t = 1.57$
P值	0.001	< 0.001	0.027	0.126

表5 健康对照和 IAV 感染者出院时外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞各分化阶段 CD160<sup>+</sup> 细胞的比例

组别	例数	CD8 <sup>+</sup> T细胞亚群			
		T <sub>N</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>CM</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>EM</sub> [M (P25, P75), %]	T <sub>EMRA</sub> ( $\bar{x} \pm s$ , %)
健康对照	51	3.88 (1.28, 9.48)	8.70 (4.43, 15.80)	22.30 (13.80, 30.40)	46.99 ± 22.91
出院时采集样本IAV感染者	16	1.60 (0.83, 3.54)	4.69 (2.84, 9.23)	12.10 (8.33, 22.35)	28.20 ± 15.93
统计量		$U = 276.50$	$U = 266.00$	$U = 278.50$	$t = 3.13$
P值		0.0254	0.0169	0.0274	0.0026

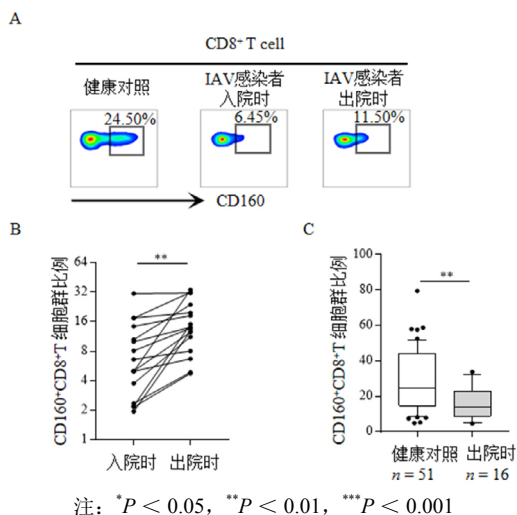


图2 IAV感染者入院时和出院时CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞比例

## 讨 论

既往研究发现,急性病毒感染通常导致共抑制分子表达上调,但其对T细胞功能的影响尚有争论。文献报道,多个共抑制分子包括程序性死亡受体1(programmed cell death 1, PD-1)、T细胞免疫球蛋白-3(T cell immunoglobulin-3, TIM-3)、淋巴细胞活化基因-3(lymphocyte activation gene-3, LAG-3)和白细胞分化抗原244(cluster of differentiation 244, 2B4)等在急性病毒感染中均可抑制肺组织中CD8<sup>+</sup> T细胞功能<sup>[11-12]</sup>。与之相反,也有研究表明PD1<sup>+</sup>或2B4<sup>+</sup>的CD8<sup>+</sup> T细胞促进EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)清除,具有保护性免疫功能<sup>[13]</sup>。

作为B7/CD28家族的成员,CD160是表达于有细胞毒性的细胞上,如CD8<sup>+</sup> T细胞、自然杀伤(natural killer cell, NK)细胞,以及上皮内淋巴细胞、骨髓细胞等表面。CD160可与抗原递呈细胞或者活化的T细胞表面的配体单纯疱疹病毒进入介导子(herpes virus entry mediator, HVEM)结合发挥作用<sup>[14-15]</sup>。CD160作为共刺激分子可增强TCR介导的细胞因子产生和细胞毒性效应,引起CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup> T细胞驱动的同种异体移植排斥反应<sup>[16]</sup>。在单核细胞增多性李斯特菌感染小鼠模型中,CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞功能增强,发挥免疫保护作用<sup>[17]</sup>。然而,亦有研究发现CD160通过与HVEM结合对健康人CD4<sup>+</sup> T细胞活化有抑制作用<sup>[15]</sup>。在多种病毒慢性感染中,存在高比例的CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞,且与CD8<sup>+</sup> T细胞

的功能损伤密切相关<sup>[18-21]</sup>。

本研究发现,与病毒慢性感染时CD160在CD8<sup>+</sup> T细胞上的表达显著上调不同,IAV患者CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞比例显著低于健康对照。虽然CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞比例随着病情好转而逐渐恢复,但出院时仍低于健康对照人群。因此,CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞比例下降在IAV发病早期已出现,且持续至IAV感染者出院。

研究表明,共抑制分子的表达与细胞的分化状态相关。随着细胞分化至晚期,多种共抑制分子表达上调<sup>[22-23]</sup>。在慢性HIV感染中,表达CD160的CD8<sup>+</sup> T细胞主要为中央记忆性细胞<sup>[24]</sup>;慢性HCV感染中,表达CD160的CD8<sup>+</sup> T细胞主要为终末分化效应细胞<sup>[25]</sup>。本研究发现在健康对照与IAV患者中,主要是效应记忆与终末分化效应CD8<sup>+</sup> T细胞表达CD160。本研究亦发现,尽管IAV患者效应记忆CD8<sup>+</sup> T细胞增加,终末分化效应CD8<sup>+</sup> T细胞减少,但因各亚群CD160<sup>+</sup>细胞均减少,最终仍导致IAV感染者的CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞比例下降。而治疗后CD8<sup>+</sup> T细胞T<sub>N</sub>、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>中CD160<sup>+</sup>细胞比例增加,但各亚群CD160<sup>+</sup>细胞比例仍低于健康对照,CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞比例有所恢复,但未恢复至正常水平。

综上,本研究利用多色流式细胞术,发现CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞在IAV感染急性期的变化,与慢性感染存在差异。虽然明确了IAV患者CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞的比例变化,但本研究样本量有限,且在IAV等急性病毒感染中CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞的免疫功能是否对机体有保护性作用,尚需进一步研究。后续研究将进一步探讨IAV感染者免疫状态和疾病进展及转归,为甲型流感的临床治疗提供新靶点。

## 参 考 文 献

- [1] Wendel I, Matrosovich M, Klenk HD. Snapshot: evolution of human influenza A viruses[J]. Cell Host Microbe, 2015, 17(3): 416-416. e1.
- [2] Hamada H, Bassity E, Flies A, et al. Multiple redundant effector mechanisms of CD8<sup>+</sup> T cells protect against influenza infection[J]. J Immunol, 2013, 190(1): 296-306.
- [3] Sun J, Braciale TJ. Role of T cell immunity in recovery from influenza virus infection[J]. Curr Opin Virol, 2013, 3(4): 425-429.
- [4] Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and coinhibitory receptor pathways in infectious disease[J]. Immunity, 2016, 44(5): 1052-1068.
- [5] Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection[J]. Nat Immunol, 2008, 10(1): 29-37.
- [6] Rutishauser RL, Hartogensis W, Deguit CD, et al. Early and delayed

- antiretroviral therapy results in comparable reductions in CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion marker expression[J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2017,33(7):658-667.
- [7] Maïza H, Leca G, Mansur IG, et al. A novel 80-kD cell surface structure identifies human circulating lymphocytes with natural killer activity[J]. *J Exp Med*, 1993,178(3):1121-1126.
- [8] Peretz Y, He Z, Shi Y, et al. CD160 and PD-1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells defines a subset with advanced dysfunction[J]. *PLoS Pathog*, 2012,8(8):1-13.
- [9] 中华人民共和国中央人民政府. 流行性感冒诊疗方案 (2018年版 修订版)[EB/OL]. 2018-11-19. [http://www.gov.cn/fuwu/2018-11/27/content\\_5343680.htm](http://www.gov.cn/fuwu/2018-11/27/content_5343680.htm).
- [10] Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells[J]. *J Exp Med*, 1997,186(9):1407-1418.
- [11] Erickson JJ, Rogers MC, Tollefson SJ, et al. Multiple inhibitory pathways contribute to lung CD8<sup>+</sup> T cell impairment and protect against immunopathology during acute viral respiratory infection[J]. *J Immunol*, 2016,197(1):233-243.
- [12] Alwis R D, Bangs D J, Angelo M A, et al. Immunodominant dengue virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses are associated with a memory PD-1<sup>+</sup> phenotype[J]. *J Virol*, 2016,90(9):4771-4779.
- [13] Chatterjee B, Deng Y, Holler A, et al. CD8<sup>+</sup> T cells retain protective functions despite sustained inhibitory receptor expression during Epstein-Barr virus infection in vivo[J]. *PLoS Pathog*, 2019,15(5):1-27.
- [14] Maeda M, Carpenito C, Russell R C, et al. Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and nonclassical MHC class I and regulates NK cell activation[J]. *J Immunol*, 2005,175(7):4426-4432.
- [15] Cai G, Anumanthan A, Brown J A, et al. CD160 inhibits activation of human CD4<sup>+</sup> T cells through interaction with herpesvirus entry mediator[J]. *Nat Immunol*, 2008,9(2):176-185.
- [16] D'Addio F, Ueno T, Clarkson M, et al. CD160Ig fusion protein targets a novel costimulatory pathway and prolongs allograft survival[J]. *PLoS One*, 2013,8(4):1-11.
- [17] Tan CL, Peluso MJ, Drijvers JM, et al. CD160 stimulates CD8<sup>+</sup> T cell responses and is required for optimal protective immunity to *Listeria monocytogenes*[J]. *Immunohorizons*, 2018,2(7):238-250.
- [18] Chibueze CE, Yoshimitsu M, Arima N. CD160 expression defines a uniquely exhausted subset of T lymphocytes in HTLV-1 infection[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014,453(3):379-384.
- [19] Cooksley H, Riva A, Katzarov K, et al. Differential expression of immune inhibitory checkpoint signatures on antiviral and inflammatory T cell populations in chronic hepatitis B[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2018,38(7):273-282.
- [20] Pombo C, Wherry E J, Gostick E, et al. Elevated expression of CD160 and 2B4 defines a cytolytic HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell population in elite controllers[J]. *J Infect Dis*, 2015,212(9):1376-1386.
- [21] El-Far M, Pellerin C, Pilote L, et al. CD160 isoforms and regulation of CD4 and CD8 T-cell responses[J]. *J Transl Med*, 2014,12(1):1-29.
- [22] Baitsch L, Legat A, Barba L, et al. Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization[J]. *PLoS One*, 2012,7(2):1-10.
- [23] Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013,13(4):227-242.
- [24] Yamamoto T, Price D A, Casazza J P, et al. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell exhaustion in HIV infection[J]. *Blood*, 2011,117(18):4805-4815.
- [25] Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, et al. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8<sup>+</sup> T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation[J]. *PLoS Pathog*, 2010,6(6):1-14.

(收稿日期: 2019-08-27)

(本文编辑: 孙荣华)

徐晓雪, 王蓓蓓, 宋蕊, 等. 甲型流感病毒感染者CD160<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞亚群分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2020,14(3):206-211.