

新型冠状病毒肺炎患者早期外周血淋巴细胞亚群及细胞因子特征

廖宝林 施海燕 刘艳霞 赵涵 焦倩 李丽雅 王信 曹意 何浩岚

【摘要】目的 分析新型冠状病毒肺炎(COVID-19)早期(起病14天内)外周血免疫学特征及其与疾病严重程度的关系。**方法** 收集2020年1月至3月广州医科大学附属市八医院收治的98例确诊COVID-19患者住院资料,分析COVID-19早期外周血淋巴细胞亚群[CD4⁺T、CD8⁺T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、NKT细胞与调节性T细胞]和细胞因子[白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α 和干扰素- γ]变化特征,以及上述指标与患者病情严重程度的关系。年龄、起病时间、白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、淋巴细胞亚群和细胞因子水平为非正态分布的计量资料,3组患者间比较采用Kruskal-Wallis检验;性别、基础疾病、吸烟、武汉流行病学史、家庭成员被感染、症状、实验室指标异常比例为计数资料,采用Pearson卡方检验或Fisher确切概率检验;以Logistic回归分析影响疾病严重性的高危因素。**结果** 根据病情严重程度将入组患者分为轻型组(17例)、普通型组(73例)和重型组(8例)。早期55.1%(54/98)患者CD4⁺T细胞、40.8%(40/98)患者CD8⁺T细胞和11.8%(10/85)患者B细胞计数下降。3组患者间CD4⁺T细胞($P=0.010$)、CD8⁺T细胞($P=0.003$)和B细胞($P=0.022$)计数存在显著差异,以重型组水平最低。3组患者IL-6表达差异有统计学意义($P=0.001$),以重型组水平最高,而其他细胞亚群及细胞因子水平则无显著差异(P 均 >0.05)。Logistic回归分析显示,IL-6升高($OR=12.277$, $P=0.024$)和年龄 >50 岁($OR=21.823$, $P=0.030$)分别为发生肺炎和重型化的独立预测因素。**结论** COVID-19早期即明显破坏患者机体细胞和体液免疫应答,与疾病进展密切相关。

【关键词】 新型冠状病毒; 急性期; 免疫; 白细胞介素6

Features of lymphocytes subsets and cytokines in peripheral blood of patients with coronavirus disease 2019 during early phase Liao Baolin, Shi Haiyan, Liu Yanxia, Zhao Han, Jiao Qian, Li Liya, Wang Xin, Cao Yi, He Haolan. Department of Infectious Diseases, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: He Haolan, Email: gz8hhl@126.com

【Abstract】Objective To investigate the immunological features from peripheral blood of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in early phase (within 14 days after symptom onset), and its association with the severity of disease. **Methods** Total of 98 patients with COVID-19 in Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou Medical University from January to March 2020 were included. The features of patients of lymphocytes [CD4⁺T, CD8⁺T, B, natural killer (NK), NKT and Treg cells] and cytokines [interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor- α and interferon- γ] were analyzed in early phase, and also their associations with the severity of disease were evaluated. The nonparametric data such as age, days after symptom onset, levels of white blood cells, neutrophil, lymphocytes, lymphocytes subsets and cytokines were analyzed by Kruskal-Wallis test. The categorical variables such as sex, complications, smoke, exposure to Wuhan, family members infected, symptoms, abnormal frequency of laboratory test were analyzed by Pearson's chi-squared test or Fisher's exact test. The independent risk factors associated with the severity of disease were analyzed by Logistical regression analysis. **Results** Patients were divided into three

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2021.03.007

基金项目: 广州市科技创新委员会健康医疗协同创新重大计划课题项目(No. 201803040002); 广州市高水平临床重点专科传染病专科(No. 2019-2021); “十三五”国家科技重大专项(No. 2017ZX10202102-004-001)

作者单位: 510060 广州市, 广州医科大学附属市八医院感染病中心

通信作者: 何浩岚, Email: gz8hhl@126.com

groups according to the relevant diagnostic criteria: the mild group (17 cases), the normal group (73 cases) and the severe group (8 cases). Decreased CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and B cells were found in 55.1% (54/98), 40.8% (40/98) and 11.8% (10/85) patients, respectively. The levels of CD4⁺ T cells ($P = 0.010$), CD8⁺ T cells ($P = 0.003$) and B cells ($P = 0.022$) were significantly different among the three groups, with the lowest levels in the severe group. The levels of IL-6 ($P = 0.001$) were different among three groups, with the highest levels in the severe group. Levels of other lymphocytes and cytokines were similar, without significant differences (all $P > 0.05$). Increased level of IL-6 ($OR = 12.277$, $P = 0.024$) was independently associated with pneumonia, and age over 50 years old ($OR = 21.823$, $P = 0.030$) was independently associated with the severe case by Logistic regression analysis. **Conclusion** The cellular and humoral immune response was significantly destroyed of patients with COVID-19 in early phase, which was significantly associated with the progression of disease.

【Key words】 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; Acute phase; Immunology; Interleukin-6

新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 是由新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染引起的急性传染病, 目前已有大量相关流行病学、临床及实验室特征资料。COVID-19除了累及主要靶器官肺部, 还可累及免疫系统及其他器官^[1]。本课题组前期研究发现广州33.5% COVID-19患者淋巴细胞计数下降, 重症患者COVID-19较非重症患者下降更明显^[2]。本研究拟继续深入分析病程早期患者免疫学特征及其与疾病严重程度关系, 为进一步阐明发病机制和治疗策略提供参考, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

纳入标准: 2020年1月至3月于广州医科大学附属市八医院住院诊治的COVID-19确诊患者, 患者呼吸道标本均经SARS-CoV-2核酸检测为阳性; 早期 (起病14天内) 完善免疫学检查 (淋巴细胞亚群及细胞因子检测)。

共98例COVID-19患者纳入本研究, 采样时间点为入院当天, 即病程第1~14天 (中位数为第4天)。对患者随访至出院并根据病情变化进行诊断, 分为轻型组、普通型组和重型组。COVID-19诊断和分组标准参照《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行第5版)》^[3]。本研究经广州医科大学附属市八医院伦理委员会审核批准 (批号: 202002135), 入组患者均签署书面知情同意书。

二、检测指标和方法

每间隔48 h采集患者咽拭子标本, 本院研究所使用SARS-CoV-2核酸检测试剂盒 (广州市中山大

学达安基因股份有限公司) 通过实时荧光反转录PCR检测咽拭子SARS-CoV-2核酸的N基因和ORF1ab基因, 病毒水平以循环阈值表示, 若循环阈值 > 40 为阴性^[4]。收集患者流行病学、临床表现、实验室和影像学检查资料。通过流式细胞技术分析外周血单个核细胞中6个淋巴细胞亚群CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、B细胞、自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞、NKT细胞和调节性T (regulatory T cells, Treg) 细胞水平, 以及采用Th1/Th2检测试剂盒 (广州市微米生物科技有限公司) 通过流式细胞技术分析血清中6种细胞因子: 白细胞介素 (interleukin, IL) -2、IL-4、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α 和干扰素 (interferon, IFN) - γ 水平, 具体参照说明书进行。

三、统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。非正态分布的计量资料 (年龄、起病时间、白细胞计数、中性粒细胞计数、淋巴细胞计数、淋巴细胞亚群和细胞因子) 采用中位数 (四分位分数) [M (P25, P75)] 表示, 3组间比较采用Kruskal-Wallis one-way ANOVA检验。3组整体比较后的组间两两比较采用Mann-Whitney U 检验; 计数资料 (性别、基础疾病、吸烟、流行病学史、家庭成员感染、症状和实验室指标升高) 用例数 (%) 表示, 3组间比较采用Fisher确切概率检验 (性别、基础疾病、吸烟、武汉流行病学史、家庭成员被感染、症状、实验室指标异常比例), 3组整体比较后组间两两比较采用Pearson卡方检验、连续校正卡方检验或Fisher确切概率法。先采用单因素Logistic回归分析各参数与肺炎或重型病例发生的关系, 有统计学意义的参数再纳入到多因素Logistic回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、患者一般资料、临床和炎性指标特征

入组98例COVID-19患者中男性62例(63.3%)，女性36例(36.7%)，年龄15~91岁，中位数为35岁；其中轻型组17例(17.3%)，普通型组73例(74.5%)，重型组8例(8.2%)。3组患者性别构成、指标采集时间差异无统计学

意义，重型组患者年龄大且更多合并慢性基础疾病，同时重型组患者出现发热、气促更为常见。入院时3组患者白细胞计数和中性粒细胞计数相似，淋巴细胞计数则存在显著差异，以重型组患者淋巴细胞计数最低。3组患者C-反应蛋白、D二聚体、降钙素原异常升高发生率均存在显著差异(P 均 < 0.05)，以重型组患者最为常见，详见表1。

表1 COVID-19 患者一般特征和感染性指标

指标	轻型组 (17例)	普通型组 (73例)	重型组 (8例)	统计值	P 值
男性 [例 (%)]	11 (64.7)	43 (58.9)	8 (100.0)	$\chi^2 = 5.258$	0.072 [*]
年龄 [M (P25, P75), 岁]	25 (21, 33)	38 (23, 50)	58 (52, 73)	$Z = 22.225$	< 0.001
起病时间 [M (P25, P75), d]	3 (2, 4)	5 (2, 7)	6.5 (1, 11)	$Z = 3.298$	0.192
基础疾病 [例 (%)]	1 (5.9)	17 (23.3)	4 (50.0)	—	0.052 [#]
吸烟 [例 (%)]	1 (5.9)	9 (12.3)	2 (25.0)	—	0.353 [#]
武汉流行病学史 [例 (%)]	2 (11.8)	6 (8.2)	1 (12.5)	—	0.573 [#]
家庭成员被感染 [例 (%)]	2 (11.8)	14 (19.2)	2 (25.0)	—	0.799 [#]
发热 [例 (%)]	6 (35.3)	33 (45.2)	8 (100.0)	—	0.005 [#]
干咳 [例 (%)]	6 (35.3)	29 (39.7)	3 (37.5)	—	0.938 [#]
咳痰 [例 (%)]	5 (29.4)	25 (34.2)	6 (75.0)	$\chi^2 = 5.627$	0.060 [*]
咽痛 [例 (%)]	3 (17.6)	14 (19.2)	1 (12.5)	—	1.000 [#]
乏力 [例 (%)]	3 (17.6)	22 (30.1)	4 (50.0)	—	0.258 [#]
腹泻 [例 (%)]	1 (5.9)	5 (6.8)	1 (12.5)	—	0.616 [#]
气促 [例 (%)]	1 (5.9)	6 (8.2)	4 (50.0)	—	0.011 [#]
胸闷 [例 (%)]	1 (5.9)	8 (11.0)	1 (12.5)	—	1.000 [#]
头痛 [例 (%)]	4 (23.5)	9 (12.3)	1 (12.5)	—	0.478 [#]
肌肉痛 [例 (%)]	3 (17.6)	11 (15.1)	0 (0)	—	0.624 [#]
胸痛 [例 (%)]	0 (0)	2 (2.7)	0 (0)	—	1.000 [#]
纳差 [例 (%)]	2 (11.8)	16 (21.9)	3 (37.5)	—	0.368 [#]
恶心 [例 (%)]	1 (5.9)	4 (5.5)	2 (25.0)	—	0.140 [#]
呕吐 [例 (%)]	0 (0)	2 (2.7)	1 (12.5)	—	0.297 [#]
白细胞计数 [M (P25, P75), $\times 10^9/L$]	5.5 (4.3, 7.2)	5.2 (4.4, 6.7)	5.2 (4.5, 6.2)	$Z = 0.217$	0.897
中性粒细胞计数 [M (P25, P75), $\times 10^9/L$]	3.7 (2.4, 4.9)	3.1 (2.5, 4.3)	3.9 (3.2, 5.3)	$Z = 2.191$	0.334
淋巴细胞计数 [M (P25, P75), $\times 10^9/L$]	1.6 (1.3, 2.0)	1.4 (1.0, 1.8)	1.0 (0.5, 1.1)	$Z = 12.327$	0.002
C-反应蛋白升高 [例 (%)]	0 (0.0)	10 (13.7)	6 (75.0)	—	< 0.001 [#]
D二聚体升高 [例 (%)]	3 (17.6)	27 (42.2) ^a	6 (85.7) ^c	—	0.006 [#]
降钙素原升高 [例 (%)]	5 (29.4)	27 (41.5) ^b	7 (100) ^c	—	0.003 [#]

注：^a检测64例；^b检测65例；^c检测7例；未标注则检测98例。计数资料采用Pearson卡方检验^{*}或Fisher确切概率检验（无统计量值）[#]。

组间两两比较：年龄（Mann-Whitney U 检验）：轻型组 vs. 普通型组： $Z = -2.708$ 、 $P = 0.007$ ，轻型组 vs. 重型组： $Z = -3.964$ 、 $P < 0.001$ ，普通型组 vs. 重型组： $Z = -3.730$ 、 $P < 0.001$ ；发热：轻型组 vs. 普通型组（Pearson 卡方）： $\chi^2 = 0.552$ 、 $P = 0.458$ ，轻型组 vs. 重型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 6.804$ 、 $P = 0.009$ ，普通型组 vs. 重型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 6.607$ 、 $P = 0.010$ ；气促：轻型组 vs. 普通型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 1.000$ 、 $P < 0.001$ ，轻型组 vs. 重型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 4.148$ 、 $P = 0.042$ ，普通型组 vs. 重型组（Fisher 确切概率法）： $P = 0.007$ ；淋巴细胞计数（Mann-Whitney U 检验）：轻型组 vs. 普通型组： $Z = -1.191$ 、 $P = 0.234$ ，轻型组 vs. 重型组： $Z = -3.613$ 、 $P < 0.001$ ，普通型组 vs. 重型组： $Z = -3.032$ 、 $P = 0.002$ ；C-反应蛋白升高：轻型组 vs. 普通型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 1.416$ 、 $P = 0.234$ ，轻型组 vs. 重型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 12.916$ 、 $P < 0.001$ ，普通型组 vs. 重型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 13.444$ 、 $P < 0.001$ ；D二聚体升高：轻型组 vs. 普通型组（Pearson 卡方）： $\chi^2 = 3.469$ 、 $P = 0.063$ ，轻型组 vs. 重型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 7.113$ 、 $P = 0.008$ ，普通型组 vs. 重型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 3.215$ 、 $P = 0.073$ ；降钙素原升高：轻型组 vs. 普通型组（Pearson 卡方）： $\chi^2 = 0.833$ 、 $P = 0.361$ ，轻型组 vs. 重型组（Pearson 卡方）： $\chi^2 = 1.372$ 、 $P = 0.242$ ，普通型组 vs. 重型组（连续校正卡方）： $\chi^2 = 6.479$ 、 $P = 0.011$

二、COVID-19早期免疫细胞变化特征

98例COVID-19患者中, 54例(55.1%)患者CD4⁺T细胞计数下降, 40例(40.8%)患者CD8⁺T细胞计数下降, 且3组差异有统计学意义, 其中以重型组患者CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞计数最低。3组患者CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞比例差异均无统计学意义(P 均 > 0.05), CD4⁺T/CD8⁺T细胞比值亦相似。研

究人群中85例(86.7%)患者外周血行B细胞、NK细胞和NKT细胞检测, 共10例(11.8%)患者B细胞计数下降。3组间B细胞计数差异有统计学意义, 其中重型组患者B细胞计数最低、下降发生率最高; 而NK细胞和NKT细胞计数和下降发生率差异均无统计学意义。81例(82.7%)患者行Treg细胞检测, 3组患者间Treg细胞比例、升高发生率均相似, 见表2。

表2 COVID-19 患者淋巴细胞亚群特征

指标	参考值	轻型组 (17例)	普通型组 (73例)	重型组 (8例)	统计值	P 值
CD4 ⁺ T细胞						
CD4 ⁺ T细胞计数 (个/ μ l)	550~1 440	493 (386, 752)	562 (395, 682)	320 (252, 446)	$Z = 9.245$	0.010
CD4 ⁺ T细胞计数下降 [例 (%)]		9 (52.9)	37 (50.7)	8 (100.0)	—	0.021
CD4 ⁺ T细胞比例 (%)		35.3 (31.5, 43.1)	37.8 (33.7, 43.7)	35.6 (31.2, 41.1)	$Z = 1.805$	0.406
CD4 ⁺ T细胞比例下降 [例 (%)]	26~61	1 (5.9)	1 (1.4)	1 (12.5)	—	0.159
CD8 ⁺ T细胞						
CD8 ⁺ T细胞计数 (个/ μ l)	320~1 250	430 (321, 534)	353 (271, 512)	209 (135, 281)	$Z = 11.632$	0.003
CD8 ⁺ T细胞计数下降 [例 (%)]		4 (23.5)	29 (39.7)	7 (87.5)	—	0.008
CD8 ⁺ T细胞比例 (%)	15~44	27.9 (24.9, 33.0)	26.1 (21.1, 31.5)	22.3 (16.4, 29.3)	$Z = 2.904$	0.234
CD8 ⁺ T细胞比例下降 [例 (%)]		0 (0)	1 (1.4)	1 (12.5)	—	0.186
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T						
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T比值	1.4~2.0	1.3 (1, 1.6)	1.5 (1.2, 1.9)	1.8 (1.2, 2.4)	$Z = 2.246$	0.325
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T比值下降 [例 (%)]		10 (58.8)	30 (41.4)	3 (37.5)	—	0.394
B细胞						
B细胞计数 (个/ μ l)	90~560	205 (144, 271) ^a	145 (110, 217) ^b	107 (62, 206) ^d	$Z = 7.652$	0.022
B细胞计数下降 [例 (%)]		0 (0.0) ^a	7 (10.8) ^b	3 (42.9) ^d	—	0.030
B细胞比例 (%)	5~18	12.0 (11.2, 16.8) ^a	12.1 (9.4, 13.8) ^b	9.7 (5.7, 16.7) ^d	$Z = 1.825$	0.402
B细胞比例下降 [例 (%)]		0 (0.0) ^a	2 (3.1) ^b	1 (14.3) ^d	—	0.284
NK细胞						
NK细胞计数 (个/ μ l)	150~1 100	133 (102, 276) ^a	191 (133, 316) ^b	271 (127, 330) ^d	$Z = 2.762$	0.251
NK细胞计数下降 [例 (%)]		8 (61.5) ^a	22 (33.8) ^b	2 (28.6) ^d	—	0.174
NK细胞比例 (%)	7~40	11.8 (5.6, 19.3) ^a	13.6 (9.9, 20.4) ^b	25.1 (15.9, 34.1) ^d	$Z = 9.848$	0.007
NK细胞比例下降 [例 (%)]		4 (30.8) ^a	6 (9.2) ^b	0 (0) ^d	—	0.090
NKT细胞						
NKT细胞计数 (个/ μ l)	40~300	27 (24, 46) ^a	26 (15, 45) ^b	13 (11, 30) ^d	$Z = 4.73$	0.094
NKT细胞比例下降 [例 (%)]		8 (61.5) ^a	44 (67.7) ^b	7 (100.0) ^d	—	0.188
NKT细胞比例 (%)	2~13	1.9 (1.5, 2.9) ^a	1.9 (1.2, 2.9) ^b	2 (1.4, 2.5) ^d	$Z = 0.360$	0.835
NKT细胞比例下降 [例 (%)]		7 (53.8) ^a	35 (53.8) ^b	3 (42.9) ^d	—	0.929
Treg细胞						
Treg细胞比例 (%)	3~8	10.5 (8.8, 11.5) ^a	9.3 (7.3, 11.2) ^c	11.4 (9.5, 12.6) ^d	$Z = 3.517$	0.172
Treg细胞比例升高 [例 (%)]		12 (92.3) ^a	39 (63.9) ^c	6 (85.7) ^d	—	0.079

注: ^a: 检测 13 例; ^b: 检测 65 例; ^c: 检测 61 例; ^d: 检测 7 例。计数资料均采用 Fisher 确切概率检验, 无统计量值。

组间两两比较: CD4⁺T 细胞计数 (Mann-Whitney U 检验): 轻型组 vs. 普通型组: $Z = -0.366$, $P = 0.714$, 轻型组 vs. 重型组: $Z = -2.826$, $P = 0.003$, 普通型组 vs. 重型组: $Z = -2.913$, $P = 0.004$; CD4⁺T 细胞计数下降: 轻型组 vs. 普通型组 (Pearson 卡方): $\chi^2 = 0.028$, $P = 0.867$, 轻型组 vs. 重型组 (连续校正卡方): $\chi^2 = 3.585$, $P = 0.058$, 普通型组 vs. 重型组 (连续校正卡方): $\chi^2 = 5.245$, $P = 0.022$; CD8⁺T 细胞计数 (Mann-Whitney U 检验): 轻型组 vs. 普通型组: $Z = -1.479$, $P = 0.139$, 轻型组 vs. 重型组: $Z = -3.321$, $P < 0.001$, 普通型组 vs. 重型组: $Z = -2.849$, $P = 0.004$; CD8⁺T 细胞计数下降: 轻型组 vs. 普通型组 (Pearson 卡方): $\chi^2 = 1.558$, $P = 0.212$, 轻型组 vs. 重型组 (连续校正卡方): $\chi^2 = 6.625$, $P = 0.010$, 普通型组 vs. 重型组 (连续校正卡方): $\chi^2 = 4.870$, $P = 0.027$; B 细胞计数 (Mann-Whitney U 检验): 轻型组 vs. 普通型组: $Z = -1.938$, $P = 0.053$, 轻型组 vs. 重型组: $Z = -2.417$, $P = 0.014$, 普通型组 vs. 重型组: $Z = -1.815$, $P = 0.069$; B 细胞计数下降: 轻型组 vs. 普通型组 (连续校正卡方): $\chi^2 = 0.502$, $P = 0.479$, 轻型组 vs. 重型组 (连续校正卡方): $\chi^2 = 3.624$, $P = 0.057$, 普通型组 vs. 重型组 (Fisher 精确检验): $P = 0.051$; NK 细胞比例 (Mann-Whitney U 检验): 轻型组 vs. 普通型组: $Z = -1.508$, $P = 0.131$, 轻型组 vs. 重型组: $Z = -2.734$, $P = 0.005$, 普通型组 vs. 重型组: $Z = -2.652$, $P = 0.008$

三、COVID-19患者早期细胞因子变化特征

入组98例COVID-19患者中有88例(89.8%)接受外周血6种细胞因子检测, 当中30例(34.1%)患者IL-6水平升高。3组患者血清IL-6水平差异有统计学意义, 以重型组患者IL-6升高发生率及水平最高($P=0.001$)。3组患者其他细胞因子IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 和IFN- γ 水平差异均无统计学意义($P>0.05$), 见表3。

四、COVID-19患者早期病情严重性的相关危险因素

分析影响早期COVID-19患者病情严重性的高

危因素, 本研究纳入患者性别、年龄、淋巴细胞亚群与细胞因子水平作为参数, 分别进行单因素Logistic回归分析, 结果显示NK细胞比例下降及IL-6升高分别与肺炎发生相关, 见表4; 再对有统计学意义的参数(NK细胞和IL-6)进行多因素回归分析, 发现仅IL-6升高为COVID-19早期患者发生肺炎的独立高危因素, 见表5。年龄 >50 岁、CD8 $^{+}$ T细胞计数下降、B细胞计数下降及IL-6升高均为COVID-19病情进展至重型化的危险因素, 见表4; 进一步多因素回归分析显示仅年龄 >50 岁为疾病重型化的独立高危因素, 见表5。

表3 COVID-19 患者的细胞因子特征

细胞因子	参考值	轻型组 (14例)	普通型组 (66例)	重型组 (8例)	统计值	P值
IL-2 [M (P25, P75), pg/ml]	0~5.71	0.8 (0.5, 1.1)	1.0 (0.7, 1.2)	0.9 (0.7, 1.5) ^a	Z=2.181	0.336
IL-2升高 [例 (%)]		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0) ^a	—	—
IL-4 [M (P25, P75), pg/ml]	0~2.80	1.6 (1.2, 2)	1.4 (1.1, 1.7)	1.5 (1.0, 2.0) ^a	Z=1.329	0.514
IL-4升高 [例 (%)]		0 (0.0)	2 (3.0)	0 (0.0) ^a	—	1.000
IL-6 [M (P25, P75), pg/ml]	0~5.30	3.3 (2.3, 5.1)	3.9 (2.7, 7.4)	17.7 (6.4, 33.0)	Z=13.705	0.001
IL-6升高 [例 (%)]		1 (7.1)	22 (33.3)	7 (87.5)	—	0.001
IL-10 [M (P25, P75), pg/ml]	0~4.91	3.3 (2.3, 4.1)	3.2 (2.5, 4.3)	3.8 (3.3, 5.3) ^a	Z=2.493	0.288
IL-10升高 [例 (%)]		1 (7.1)	9 (13.6)	2 (28.6) ^a	—	0.337
TNF- α [M (P25, P75), pg/ml]	0~2.31	1.2 (1.0, 1.5)	1.2 (0.9, 1.4)	1.3 (1.2, 1.4) ^a	Z=2.738	0.254
TNF- α 升高 [例 (%)]		0 (0.0)	1 (1.5)	0 (0.0) ^a	—	1.000
IFN- γ [M (P25, P75), pg/ml]	0~7.42	1.1 (1.0, 1.3)	1.1 (0.9, 1.8)	0.9 (0.8, 1.4) ^a	Z=0.989	0.610
IFN- γ 升高 [例 (%)]		0 (0.0)	2 (3.0)	0 (0.0) ^a	—	1.000

注: IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子; IFN 为干扰素。“—”为无数据。^a检测7例。计数资料均采用 Fisher 确切概率检验, 无统计量值。

组间两两比较: IL-6 (Mann-Whitney U 检验): 轻型组 vs. 普通型组: $Z=-1.304$ 、 $P=0.192$, 轻型组 vs. 重型组: $Z=-3.481$ 、 $P<0.001$, 普通型组 vs. 重型组: $Z=-3.273$ 、 $P=0.001$; IL-6 升高 (连续校正卡方): 轻型组 vs. 普通型组: $\chi^2=2.695$ 、 $P=0.101$, 轻型组 vs. 重型组: $\chi^2=10.946$ 、 $P=0.001$, 普通型组 vs. 重型组: $\chi^2=6.659$ 、 $P=0.010$

表4 单因素 Logistic 回归分析影响 COVID-19 早期患者疾病严重性的高危因素

病情	变量	OR值	Wald值	B值	SE值	95%CI	P值
发生肺炎	NK细胞比例下降	0.205	4.639	-1.587	0.737	0.048~0.867	0.031
	IL-6升高	8.378	3.986	2.126	1.065	1.040~67.518	0.046
疾病重型化	年龄 >50 岁	30.059	9.529	3.403	1.102	3.464~260.839	0.002
	CD8 $^{+}$ T细胞计数下降	12.091	5.217	2.492	1.091	1.424~102.632	0.022
	B细胞计数下降	7.607	5.562	2.029	0.860	1.409~41.076	0.018
	IL-6升高	17.348	6.763	2.853	1.097	2.020~149.003	0.009

注: IL: 白细胞介素

表5 多因素 Logistic 回归分析影响 COVID-19 早期患者疾病严重性的高危因素

病情	变量	OR值	Wald值	B值	SE值	95%CI	P值
发生肺炎	NK细胞比例下降	0.000	0.000	-18.035	11995.494	0.000~0.000	0.999
	IL-6升高	12.277	5.093	2.507	1.111	1.391~108.302	0.024
疾病重型化	年龄 >50 岁	21.823	4.714	3.083	1.420	1.352~352.776	0.030
	CD8 $^{+}$ T细胞计数下降	1.754	0.194	0.562	1.274	0.144~21.321	0.659
	B细胞计数下降	8.940	2.830	2.191	1.302	0.696~114.762	0.093
	IL-6升高	2.779	0.662	1.022	1.256	0.237~32.597	0.416

讨 论

SARS-CoV-2与蝙蝠严重急性呼吸综合征样冠状病毒高度同源^[5]。既往研究发现SARS-CoV和MERS-CoV感染者淋巴细胞计数与疾病严重程度相关^[6-7]。近期研究显示COVID-19患者淋巴细胞计数亦下降,可能为患者病情恶化的重要因素^[8-9]。但目前对于病程早期各淋巴细胞亚群改变特征及其与病情相关性报道较少。

Chen等^[10]发现与COVID-19存活组相比,死亡组COVID-19患者CD4⁺T和CD8⁺T细胞计数显著下降,其中以重症组患者下降最为显著。Wang等^[11]报道重症组和危重症组CD4⁺T、CD8⁺T和B细胞水平显著下降,但表面活化标志物HLA-DR和CD45RO表达升高,危重症组活化B细胞显著下降。本研究结果同样发现COVID-19重症患者CD4⁺T、CD8⁺T和B细胞计数显著下降,提示SARS-CoV-2可能在感染早期即同时破坏机体细胞免疫与体液免疫应答,为病情进展重要原因。有研究显示COVID-19患者早期固有免疫应答水平降低^[12-13],且NK细胞数量减少的同时伴随功能受损^[14-15],而本研究并未在早期重症COVID-19患者中发现NK细胞水平下降。

SARS-CoV和MERS-CoV通过诱导细胞凋亡导致T细胞下降,减弱T细胞应答^[16-17]。近期Wang等^[18]证实尽管T细胞表面的血管紧张素转化酶2受体表达水平较低,SARS-CoV-2可通过受体依赖S蛋白介导的膜融合直接感染T细胞,但尚不明确其是否可同样诱导T细胞凋亡。本研究发现不同组别COVID-19患者间CD4⁺T/CD8⁺T水平相似,但另有报道死亡组较存活组显著升高,CD8⁺T细胞水平显著下降导致COVID-19患者预后差^[10]。与CD4⁺T细胞主要通过间接机制起作用相比,病毒特异性CD8⁺T细胞则直接作用于被感染细胞,目前认为老年人感染SARS-CoV-2后病死率更高的可能原因是CD8⁺T细胞储备下降导致早期清除病毒功能受损^[19]。

目前认为细胞因子风暴参与COVID-19致病机制。Huang等^[20]发现COVID-19患者起促炎作用的Th1型细胞因子与起抑制炎症反应的Th2型细胞因子水平同样升高。与存活组比较,死亡组患者入院时外周血IL-6水平显著升高,且IL-6水平递增至死亡预测因素^[10];与本研究结果相似,提示早期(中位数为起病后4天)不同疾病严重程度比较仅IL-6水平存在差异,且为肺炎发生的高危因素。结合

近期对COVID-19后期患者的分析显示重症组患者IL-10较轻型组和普通型组显著升高、IL-6水平相对下降^[21],推测COVID-19患者随着疾病进展,免疫应答可能从早期以Th1型为主转变成后期以Th2型为主,而该转变可能由IL-6和IL-10相对水平来调节。

近期两项临床试验显示,瑞德西韦、羟氯喹、洛匹那韦等方案对COVID-19住院患者几乎无影响^[22-23]。托珠单抗抗体是一种IL-6拮抗剂,目前已有部分临床研究用于COVID-19患者,可有效改善临床症状和抑制重症、危重症患者病情恶化^[24-25]。故对于重症患者同时联合抗病毒治疗和抗炎症风暴疗效可能更佳。

综上,本研究进一步支持SARS-CoV-2感染早期即同时破坏细胞和体液免疫应答,重型患者更为显著,并以Th1型免疫应答为主,与疾病进展密切相关。因此早期抑制免疫系统受损及炎症风暴进展,可能降低病死率及进展为重症病例。但本研究为小样本量横断面研究,且未纳入危重型病例;未分析各淋巴细胞亚群功能变化;未研究肺组织局部免疫学特征,尚待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 陶哲影,刘嘉琳. COVID-19发病机制的免疫特征[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2020,40(9):649-653.
- [2] Wang YP, Liao BL, Guo Y, et al. Clinical characteristics of patients infected with the novel 2019 coronavirus (SARS-Cov-2) in Guangzhou, China[J]. Open Forum Infect Dis,2020,7(6):ofaa187.
- [3] 国家卫生健康委办公厅. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)[EB/OL]. 2020-02-05. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440/files/7260301a393845fc87fc6dd52965ecb.pdf>.
- [4] Chen W, Lan Y, Yuan X, et al. Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity[J]. Emerg Microbes Infect,2020,9(1):469-473.
- [5] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. Lancet,2020,395(10224):565-574.
- [6] Wong RS, Wu A, To KF, et al. Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis[J]. BMJ,2003,326(7403):1358-1362.
- [7] Hwang SM, Na BJ, Jung Y, et al. Clinical and laboratory findings of middle east respiratory syndrome coronavirus infection[J]. Jpn J Infect Dis,2019,72(3):160-167.
- [8] Chen NS, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study[J]. Lancet,2020,395(10223):507-513.
- [9] Zhou F, Yu T, Du RH, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China:

- aretrospective cohort study[J]. *Lancet*,2020,395(10229):1054-1062.
- [10] Chen R, Sang L, Jiang M, et al. Longitudinal hematologic and immunologic variations associated with the progression of COVID-19 patients in China[J]. *J Allergy Clin Immunol*,2020,146(1):89-100.
- [11] Wang F, Hou H, Luo Y, et al. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness[J]. *JCI Insight*,2020,5(10):e137799.
- [12] Chu H, Chan JF, Wang Y, et al. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19[J]. *Clin Infect Dis*,2020,71(6):1400-1409.
- [13] Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients[J]. *Science*,2020,369(6504):718-724.
- [14] Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019[J]. *J Clin Invest*,2020,130(5):2620-2629.
- [15] Zheng MJ, Gao Y, Wang G, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients[J]. *Cell Mol Immunol*,2020,17(5):533-535.
- [16] Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology[J]. *Semin Immunopathol*,2017,39(5):529-539.
- [17] Chu H, Zhou J, Wong BH, et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus efficiently infects human primary T lymphocytes and activates the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways[J]. *J Infect Dis*,2016,213(6):904-914.
- [18] Wang X, Xu W, Hu G, et al. SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fusion[J]. *Cell Mol Immunol*,2020,17(8):894.
- [19] Luo Y, Xie Y, Zhang W, et al. Combination of lymphocyte number and function in evaluating host immunity[J]. *Aging (Albany NY)*,2019,11(24):12685-12707.
- [20] Huang CL, Wang YM, Li XW, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *Lancet*,2020,395(10223):497-506.
- [21] 廖宝林, 施海燕, 王亚萍, 等. 广州市135例新型冠状病毒肺炎患者免疫学特征分析[J]. *中华传染病杂志*,2020,38(10):616-620.
- [22] Cao B, Wang Y, Wen D, et al. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19[J]. *N Engl J Med*,2020,382(19):1787-1799.
- [23] WHO Solidarity Trial Consortium. Repurposed antiviral drugs for Covid-19--interim WHO solidarity trial results[J]. *N Engl J Med*,2021,384(6):497-511.
- [24] Zhou YG, Fu BQ, Zheng XH, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients[J]. *Nat Sci Rev*,2020,7(6):998-1002.
- [25] Xu XL, Han MF, Li TT, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2020,117(20):10970-10975.
- (收稿日期: 2020-07-09)
(本文编辑: 孙荣华)

廖宝林, 施海燕, 刘艳霞, 等. 新型冠状病毒肺炎患者早期外周血淋巴细胞亚群及细胞因子特征[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志 (电子版)*, 2021,15(3):182-188.