

急性期恶性疟患者外周血 PD-1⁺TIGIT⁺ T细胞功能

黄雅倩¹ 王蓓蓓¹ 宋蕊² 徐晓雪¹ 赵雪² 王芯栋¹ 陈晨¹

【摘要】目的 研究急性期恶性疟患者外周血T淋巴细胞共抑制分子PD-1和TIGIT的表达模式及功能。**方法** 收集2019年4月至2019年10月首都医科大学附属北京地坛医院感染二科14例非洲输入型急性期恶性疟患者发病后4~12 d和28例健康对照者外周血单个核细胞。流式细胞术检测患者外周血CD4⁺ T和CD8⁺ T淋巴细胞PD-1⁻TIGIT⁻、PD-1⁻TIGIT⁺、PD-1⁺TIGIT⁻和PD-1⁺TIGIT⁺四个亚群比例,比较各细胞亚群凋亡(Annexin V⁺)、增殖(Ki67⁺)、分泌细胞因子(IFN- γ ⁺、IL-2⁺和TNF- α ⁺)和杀伤(Granzyme B⁺和Perforin⁺)能力差异,正态分布资料采用one-way ANOVA检验进行方差分析,Holm-Sidak's进行多重比较;偏态分布资料则采用Kruskal-Wallis检验进行分析,Bonferroni法进行多重比较。统计患者临床资料并分析急性期恶性疟患者T细胞各亚群比例和CD8⁺ T细胞杀伤能力与临床指标的相关性,正态分布资料采用Pearson相关性分析,非正态分布资料采用Spearman相关性分析。**结果** 与健康对照组相比,急性期恶性疟患者CD4⁺ T和CD8⁺ T细胞中PD-1⁺和PD-1⁺TIGIT⁺细胞比例均显著增高(CD4: $t=4.85$ 、 $P<0.001$, $t=4.77$ 、 $P=0.0002$; CD8: $t=3.90$ 、 $P=0.001$, $t=3.29$ 、 $P=0.0021$); CD4⁺ T细胞TIGIT⁺亚群增加($t=4.12$ 、 $P=0.0002$)。CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞PD-1⁻TIGIT⁻和PD-1⁺TIGIT⁺细胞亚群Annexin V⁺表达比例均显著高于PD-1⁻TIGIT⁻细胞亚群($F=4.67$ 、 $P=0.0125$, $F=3.19$ 、 $P=0.0460$),但CD4⁺ T细胞PD-1⁻TIGIT⁻和PD-1⁺TIGIT⁺细胞亚群Ki67⁺和IFN- γ ⁺表达比例均显著高于PD-1⁻TIGIT⁻细胞亚群($H=17.80$ 、 $P=0.0005$, $F=11.22$ 、 $P=0.0002$),CD8⁺ T细胞PD-1⁻TIGIT⁻和PD-1⁺TIGIT⁺细胞亚群IFN- γ ⁺、IL-2⁺和Granzyme B⁺表达比例均显著高于PD-1⁻TIGIT⁻细胞亚群($F=7.95$ 、 $P=0.047$, $H=8.29$ 、 $P=0.0404$, $F=12.18$ 、 $P<0.001$)。急性期恶性疟患者CD4⁺和CD8⁺ T细胞各亚群比例与患者临床参数相关性分析发现CD4⁺ T细胞PD-1⁺TIGIT⁺表达比例与RBC计数和HGB浓度呈负相关($r=-0.3861$ 、 $P=0.0116$, $r=-0.3980$ 、 $P=0.0091$)。CD8⁺ T细胞杀伤能力与患者临床参数相关性分析发现CD8⁺ T细胞Granzyme B⁺和Perforin⁺表达比例与Cr浓度呈显著负相关($r=-0.4812$ 、 $P=0.0201$, $r=-0.6255$ 、 $P=0.0014$)。**结论** 急性期恶性疟患者外周血T细胞PD-1和TIGIT表达上调,仍具有较强的增殖、杀伤和分泌细胞因子的能力,并未表现出典型的T细胞耗竭表型。患者CD4⁺ T细胞PD-1⁺TIGIT⁺表达比例增高可能与机体严重的红细胞破坏和溶血有关,CD8⁺ T细胞Granzyme B⁺和Perforin⁺表达比例增高可能与肾脏功能损伤程度有关。

【关键词】 恶性疟; 急性期; T淋巴细胞; 共抑制分子; 多色流式细胞术

Function of PD-1⁺TIGIT⁺ T cells in peripheral blood of falciparum malaria patients in acute phase
Huang Yaqian¹, Wang Beibei¹, Song Rui², Xu Xiaoxue¹, Zhao Xue², Wang Xinyue¹, Chen Chen¹. ¹Institute of Infectious Diseases, ²Infectious Diseases Department-III, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, 100015 Beijing, China

Corresponding author: Chen Chen, Email: chenchen.bj2008@163.com

【Abstract】Objective To investigate the expression patterns and potential functions of PD-1 and TIGIT, two co-inhibitory molecules, on T lymphocyte cells in peripheral blood of patients with acute falciparum malaria infection. **Methods** Fourteen African imported patients with acute falciparum malaria

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2021.06.005

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81971862); 北京市医院管理中心“登峰”计划专项经费资助(No. DFL20191801)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所¹、感染二科²

通信作者: 陈晨, Email: chenchen.bj2008@163.com

in Infectious Diseases Department- II of Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, from April to October 2019 were enrolled. Peripheral blood mononuclear cells at 4-12 d after symptom onset were collected, while 28 healthy were enrolled as controls. Flow cytometry was used to detect the proportions of four subsets (PD-1⁻TIGIT⁻, PD-1⁺TIGIT⁻, PD-1⁻TIGIT⁺ and PD-1⁺TIGIT⁺) of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in peripheral blood of patients, and the further expression level on apoptosis (Annexin V⁺), proliferation (Ki67⁺), cytokines secretion (IFN- γ ⁺, IL-2⁺ and TNF- α ⁺) and cytotoxicity (Granzyme B⁺ and Perforin⁺) in four subsets were compared, among which, variance analysis of normal distribution data were analyzed by one-way ANOVA test and multiple comparison were taken by holm-Sidak's test. Skewness distribution data were analyzed by Kruskal-wallis test for variance analysis and multiple comparison were taken by Bonferroni method. The clinical data of patients were collected, and correlations between the proportion of T cell subsets and clinical parameters as well as the cytotoxicity of CD8⁺ T cells and clinical parameters in patients with acute falciparum malaria were analyzed, among which, normal distribution data were analyzed by Pearson correlation analysis and skewness distribution data were analyzed by Spearman correlation analysis. **Results** Compared with healthy controls, the proportions of PD-1⁺ and PD-1⁺TIGIT⁺ subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in acute falciparum malaria patients were significantly increased (CD4: $t = 4.85$, $P < 0.001$; $t = 4.77$, $P = 0.0002$; CD8: $t = 3.90$, $P = 0.001$; $t = 3.29$, $P = 0.0021$). The proportion of TIGIT⁺ subsets of CD4⁺ T cells was increased ($t = 4.12$, $P = 0.0002$). The rates of Annexin V⁺ expressed by PD-1⁻TIGIT⁻ and PD-1⁺TIGIT⁺ subsets of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were significantly increased compared those of PD-1⁻TIGIT⁻ subsets ($F = 4.67$, $P = 0.0125$; $F = 3.19$, $P = 0.0460$), but the rates of Ki67⁺ and IFN- γ ⁺ expressed by PD-1⁺TIGIT⁻ and PD-1⁺TIGIT⁺ subsets of CD4⁺ T cells were significantly increased compared those of PD-1⁻TIGIT⁻ subsets ($H = 17.80$, $P = 0.0005$; $F = 11.22$, $P = 0.0002$), and the rates of IFN- γ ⁺, IL-2⁺ and Granzyme B⁺ expressed by PD-1⁺TIGIT⁻ and PD-1⁺TIGIT⁺ subsets of CD8⁺ T cells were also significantly increased compared those of PD-1⁻TIGIT⁻ subsets ($F = 7.95$, $P = 0.0470$; $H = 8.29$, $P = 0.0404$; $F = 12.18$, $P < 0.001$). Correlation analysis between the proportion of four subsets of T cells and clinical parameters showed a negative relationship between the proportion of PD-1⁺TIGIT⁺ subsets of CD4⁺ T cells and red blood cells count or hemoglobin concentration ($r = -0.3861$, $P = 0.0116$; $r = -0.3980$, $P = 0.0091$). Correlation analysis between the CD8⁺ T cells cytotoxic capacity and clinical parameters also showed the proportion of Granzyme B⁺ and Perforin⁺ subsets of CD8⁺ T cells were negatively correlated with the creatinine concentration ($r = -0.4812$, $P = 0.0201$; $r = -0.6255$, $P = 0.0014$). **Conclusions** In patients with acute falciparum malaria infection, the up-regulated expression of PD-1 and TIGIT induced T cells higher ability of proliferation, cytotoxic capacity and production of cytokines in peripheral blood, but they did not show typical T cells exhaustion phenotype. Moreover, the increased expression of PD-1⁺TIGIT⁺ subsets of CD4⁺ T cells may be related to severe red blood cells destruction and hemolysis, and the increased expression of Granzyme B⁺ and Perforin⁺ of CD4⁺ T cells may be related to the degree of renal function injury.

【Key words】 Plasmodium falciparum malaria; Acute phase; T lymphocyte cells; Co-inhibitory molecules; Multi-color flow cytometry

T淋巴细胞作为人体免疫系统中的重要组分, 对于机体清除入侵的病原微生物有重要作用^[1-2]。T细胞活化受共刺激分子和共抑制分子双重信号调节。既往研究发现, 在慢性病毒性感染性疾病患者中, 抗原长时间持续性刺激, 可导致T细胞表面多种共抑制分子表达增加, T细胞发生功能耗竭, 机体清除病原微生物能力减弱^[3]。此外, 在肿瘤和慢性病毒性感染性疾病中, 程序性死亡受体 (programmed cell death 1, PD-1) 和细胞免疫球蛋白和ITIM结构域 (T cell immunoglobulin and ITIM

domain, TIGIT) 等共抑制分子表达同时上调, 协同诱导T细胞功能耗竭^[4-9]。典型的功能耗竭T细胞表现为: 凋亡增加, 杀伤功能减弱和分泌细胞因子能力降低^[10]。

研究发现, 急性感染时患者外周血T细胞也有共抑制分子表达上调现象, 其中PD-1和TIGIT比例最高且有协同效应^[11-17]。但急性恶性疟感染时共抑制分子PD-1和TIGIT表达对于T细胞免疫功能有何影响, 是否具有协同效应, 目前尚未明确。

疟疾是由疟原虫感染引起的一种病媒传播的

热带寄生虫病^[18]。急性恶性疟患者可发生急性呼吸窘迫综合征、急性肾功能损伤等多器官功能障碍,甚至导致死亡^[19-22]。机体特异性免疫应答反应是急性恶性疟疾病情进展的关键因素之一^[1, 23]。本研究检测急性期恶性疟患者外周血T细胞共抑制分子PD-1和TIGIT表达,以及二者对T细胞功能的影响,以证实在急性期恶性疟患者中,PD-1⁺TIGIT⁺T细胞并不表现为典型的T细胞耗竭表型,而与患者器官损伤密切相关,报道如下。

资料与方法

一、研究对象

选取2019年4月至10月就诊于首都医科大学附属北京地坛医院感染二科的14例非洲输入型急性期恶性疟患者为研究对象,年龄22~55岁,男性12例,女性2例,于发病后4~12 d采血。招募性别和年龄相匹配的健康对照者28例。急性期恶性疟患者的诊断均符合国家2015年新修订的《疟疾的诊断》的诊断标准^[24]。本研究方案通过本医院医学伦理委员会批准(审批号:京地伦字[2019]059号),所有研究对象均已签署知情同意书。

二、实验方法

1. 外周血单个核细胞分离:采集静脉外周EDTA抗凝血标本4 ml,将抗凝血与RPMI 1640 (Corning公司)以1:1比例充分混匀,用Ficoll-Paque密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMCs),用RPMI 1640调整细胞浓度为 5×10^6 /ml待用。

2. T淋巴细胞表面分子和凋亡染色:取 5×10^5 个细胞于流式管中,加入相应的混合荧光抗体:CD3 BV786, CD4 BV395, CD8 BV510, PD-1 BV711, TIGIT PE-CY7 (BD Pharmingen公司),室温避光30 min,加入2 ml PBS (Corning公司)润洗,室温1 200 r/min离心5 min (离心半径 $r=11.5$ cm),弃上清后重悬,使用Annexin V FITC试剂盒 (BioLegend公司)检测T细胞凋亡水平,7-AAD用于评估细胞活性,用流式细胞仪收取数据。

3. T淋巴细胞体外刺激和胞内染色:用含10%胎牛血清 (Gibco公司)的RPMI 1640培养细胞,加入抗-CD3,抗-CD28 (eBioscience公司)和GolgiPlug刺激剂 (BD Pharmingen公司),放入5% CO₂, 37 °C孵箱中体外刺激5 h;收集细胞,加

入上述胞外混合荧光抗体,室温避光30 min;加入2 ml PBS润洗,室温1 200 r/min离心5 min,弃上清重悬,使用IntraSure™ Kit (Regant A和B) (BD Pharmingen公司)对细胞固定和破膜,加入胞内混合荧光抗体:IFN- γ AF700, IL-2 PE和TNF- α FITC (eBioscience公司),室温避光30 min;加入2 ml PBS润洗,室温1 200 r/min离心5 min,弃上清后进行流式检测。另取 5×10^5 个细胞于流式管中,加入上述胞外混合荧光抗体,使用Transcription Factor试剂盒 (BD Pharmingen公司)对细胞进行破膜处理,加入胞内混合荧光抗体:Ki67 FITC, Granzyme B AF700 (BD Pharmingen公司)和Perforin APC-CY7 (BioLegend公司),室温避光30 min;加入2 ml PBS润洗,室温1 200 r/min离心5 min,弃上清后进行流式检测。

4. 流式细胞仪检测:T淋巴细胞表面分子及功能利用多色流式细胞仪BD LSR Fortessa进行检测,设置并调节各通道的电压及荧光补偿,使用FACS Diva软件进行数据收集,Flowjo 10.0对所得细胞亚群流式数据进行分析。

三、统计学处理

利用GraphPad Prism 7.0进行数据统计分析。使用Kolmogorov-Smirnov检验评估每组计量资料是否符合正态分布。T淋巴细胞表面共抑制分子PD-1和TIGIT表达比例呈正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,采用独立样本 t 检验;若为偏态分布,则中位数(四分位数)[M (P25, P75)]描述,采用Mann-Whitney U 检验。急性期恶性疟患者T细胞各亚群比例和Granzyme B⁺CD8⁺T细胞比例分别与红细胞(red blood cell, RBC)计数、血红蛋白(hemoglobin, HGB)浓度和红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)的相关性均采用Pearson相关性分析;T细胞各亚群比例和Granzyme B⁺CD8⁺T细胞比例分别与C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、降钙素原(procalcitonin, PCT)、肌酐(creatinine, Cr)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和直接胆红素(direct bilirubin, DBil)浓度的相关性以及Perforin⁺CD8⁺T细胞比例与各临床指标的相关性均采用Spearman相关性分析。比较急性期恶性疟患者T细胞各亚群间凋亡、增殖、分泌细胞因子和杀伤

功能比例若呈正态分布则采用one-way ANOVA检验进行方差分析, Holm-Sidak' s进行多重比较; 若为偏态分布则采用Kruskal-Wallis检验进行分析, Bonferroni法进行多重比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、健康对照者和急性期恶性疟患者的一般资料

健康对照者(28例)和急性期恶性疟患者(14例)的年龄、性别、血小板(platelet, PLT)计数、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和总胆红素(total bilirubin, TBil)浓度差异无统计学意义(P 均 > 0.05), RBC计数、HGB、Cr、ALT、AST和DBil浓度差异均有统计学意义(P 均 < 0.05), 见表1。

二、急性期恶性疟患者外周血T淋巴细胞PD-1和TIGIT上调表达

采用流式细胞仪检测急性期恶性疟患者以及健康对照者外周血T淋巴细胞PD-1和TIGIT阳性细胞比例, 根据PD-1和TIGIT表达水平, 将急性期恶

性疟患者以及健康对照者CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞分成PD-1⁺、TIGIT⁺和PD-1⁺TIGIT⁺三个细胞亚群(表2)。与健康对照者相比, 急性期恶性疟患者CD4⁺T细胞中PD-1⁺、TIGIT⁺和PD-1⁺TIGIT⁺细胞比例均显著增高(P 均 < 0.001), CD8⁺T细胞中, PD-1⁺和PD-1⁺TIGIT⁺细胞比例显著高于对照(P 均 < 0.001), 但两组TIGIT⁺CD8⁺T细胞比例差异无统计学意义($U = 161.00$ 、 $P = 0.3617$)。

三、急性期恶性疟患者PD-1以及TIGIT表达与T细胞功能表型分析

1. 急性期恶性疟患者高表达PD-1的T细胞亚群凋亡易感性增高: 为研究急性期恶性疟患者高表达共抑制分子的T淋巴细胞是否表现典型的T细胞功能耗竭表型, 根据PD-1和TIGIT表达水平将急性期恶性疟患者外周血CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞分成PD-1⁻TIGIT⁻、PD-1⁺TIGIT⁻、PD-1⁻TIGIT⁺和PD-1⁺TIGIT⁺四个细胞亚群。急性期恶性疟患者外周血中T细胞各亚群凋亡水平(表3和表4)检测发现, 无论CD4⁺T还是CD8⁺T细胞, PD-1⁺TIGIT⁺群体中Annexin V⁺比例显著高于PD-1⁻TIGIT⁻细胞, 提示PD-1⁺TIGIT⁺细胞更易发生凋亡, 且PD-1⁺TIGIT⁻细胞Annexin V⁺表达比例均显著高

表1 健康对照者和急性期恶性疟患者的临床资料

参数	健康对照者 (28例)	急性期恶性疟患者 (14例)	统计量	P值
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	38.93 \pm 10.38	39.64 \pm 9.24	$t = 0.23$	0.8218
性别(男/女, 例)	12/2	12/2	—	1.0000 ^a
血细胞				
RBC($\bar{x} \pm s$, $\times 10^{12}/L$)	4.55 \pm 0.47	3.60 \pm 0.95	$t = 4.37$	< 0.001
HGB($\bar{x} \pm s$, g/L)	132.80 \pm 12.62	107.60 \pm 26.17	$t = 3.41$	0.0035
PLT($\bar{x} \pm s$, $\times 10^9/L$)	228.70 \pm 55.89	166.20 \pm 112.50	$t = 1.95$	0.0679
肝肾功能				
BUN[M(P25, P75), mmol/L]	4.43 (3.92, 5.14)	3.70 (2.98, 9.21)	$U = 177.00$	0.6214 ^b
Cr[M(P25, P75), μ mol/L]	59.40 (52.70, 67.20)	72.55 (62.23, 142.20)	$U = 98.00$	0.0057 ^b
ALT[M(P25, P75), U/L]	16.90 (11.65, 23.70)	70.60 (47.68, 162.80)	$U = 38.00$	< 0.001 ^b
AST[M(P25, P75), U/L]	18.60 (16.40, 22.15)	50.80 (41.28, 72.78)	$U = 33.00$	< 0.001 ^b
TBil($\bar{x} \pm s$, μ mol/L)	11.01 \pm 3.63	14.00 (10.04, 21.89)	$U = 155.00$	0.2806 ^b
DBil[M(P25, P75), μ mol/L]	3.80 (2.40, 4.50)	6.95 (4.20, 15.85)	$U = 65.00$	0.002 ^b
其他指标				
CRP(mg/L)	< 5	18.00 (10.15, 54.75)	—	—
PCT(ng/ml)	< 0.5	0.53 (0.13, 3.03)	—	—
ESR($\bar{x} \pm s$, mm/h)	< 15	38.00 \pm 39.47	—	—

注: RBC: 红细胞计数, HGB: 血红蛋白, PLT: 血小板, BUN: 尿素氮, Cr: 肌酐, ALT: 丙氨酸氨基转移酶, AST: 天门冬氨酸氨基转移酶, TBil: 总胆红素, DBil: 直接胆红素, CRP: C-反应蛋白, PCT: 降钙素原, ESR: 红细胞沉降率。“—”无相关数据。^a: Fisher' s 确切概率法; ^b: 非正态分布资料, 采用 Mann-Whitney U 检验

表2 健康对照者和急性期恶性疟患者 T 淋巴细胞表面共抑制分子 PD-1 和 TIGIT 表达比例

组别	例数	CD4 ⁺ T细胞 (%)			CD8 ⁺ T细胞		
		PD-1 ⁺	TIGIT ⁺	PD-1 ⁺ TIGIT ⁺	PD-1 ⁺	TIGIT ⁺	PD-1 ⁺ TIGIT ⁺
健康对照者	28	10.14 ± 3.94	17.27 ± 4.92	5.08 ± 1.54	11.57 ± 4.74	34.75 (28.13, 44.3)	9.01 ± 3.97
急性期恶性疟患者	14	16.93 ± 4.88	24.70 ± 6.63	9.14 ± 2.99	20.03 ± 7.39	34.2 (20.07, 42.58)	13.78 ± 5.25
统计量		$t = 4.85^a$	$t = 4.12^a$	$t = 4.77^a$	$t = 3.90^a$	$U = 161.00^b$	$t = 3.29^a$
P值		0.0001	0.0002	0.0002	0.0010	0.3617	0.0021

注: ^a: 正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 t 检验; ^b: 非正态分布资料以 M (P25, P75) 表示, 采用 Mann-Whitney U 检验

表3 急性期恶性疟患者 CD4⁺ T 细胞各亚群及功能表型比例 (%)

指标	PD-1 ⁻ TIGIT ⁻	PD-1 ⁺ TIGIT ⁻	PD-1 ⁻ TIGIT ⁺	PD-1 ⁺ TIGIT ⁺	统计量	P值
细胞比例	67.5 ± 6.7	7.79 ± 3.4	15.6 ± 4.5	9.1 ± 3.0	$F = 529.30^a$	< 0.001
Annexin V ⁺	15.7 ± 6.5	41.1 ± 14.5	29.5 ± 12.6	31.9 ± 12.5	$F = 4.67^a$	0.0125
Ki67 ⁺	1.3 (0.9, 3.0)	16.5 (13.7, 34.2)	2.0 (1.3, 6.3)	19.2 (14.9, 27.1)	$H = 17.80^b$	0.0005
IFN- γ ⁺	1.0 ± 0.3	5.8 ± 2.2	0.3 ± 0.4	3.7 ± 3.0	$F = 11.22^a$	0.0002
TNF- α ⁺	5.5 (1.8, 6.8)	10.3 (4.3, 13.7)	1.6 (0.8, 2.5)	2.3 (0.7, 3.6)	$H = 7.01^b$	0.0490
IL-2 ⁺	0.6 (0.4, 4.1)	1.8 (0.9, 11.1)	2.5 (1.6, 4.2)	4.0 (2.9, 5.7)	$H = 5.09^b$	0.1656

注: ^a: 正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; ^b: 非正态分布资料以 M (P25, P75) 表示。CD4⁺ T 细胞各亚群细胞比例、Annexin V⁺ 和 IFN- γ ⁺ 比例采用 one-way ANOVA 检验进行方差分析, Holm-Sidak's 进行多重比较; Ki67⁺、IL-2⁺ 和 TNF- α ⁺ 比例采用 Kruskal-Wallis 检验进行分析, Bonferroni 法进行多重比较

表4 急性期恶性疟患者 CD8⁺ T 细胞各亚群及功能表型比例 (%)

指标	PD-1 ⁻ TIGIT ⁻	PD-1 ⁺ TIGIT ⁻	PD-1 ⁻ TIGIT ⁺	PD-1 ⁺ TIGIT ⁺	统计量	P值
细胞比例	59.1 (52.7, 67.8)	5.0 (2.9, 7.0)	15.1 (9.5, 27.9)	12.6 (10.3, 18.8)	$H = 41.03^a$	< 0.001
Annexin V ⁺	21.7 ± 9.2	45.1 ± 14.6	39.3 ± 17.2	43.4 ± 16.6	$F = 3.19^b$	0.0460
Ki67 ⁺	5.4 ± 5.1	22.2 ± 17.7	20.1 ± 14.3	28.3 ± 24.0	$F = 2.04^b$	0.1412
IFN- γ ⁺	3.1 ± 2.6	11.2 ± 7.3	8.2 ± 4.1	7.6 ± 3.7	$F = 7.95^b$	0.0470
TNF- α ⁺	1.6 (0.8, 8.6)	7.6 (2.8, 13.7)	6.6 (2.3, 12.6)	4.5 (1.2, 11.1)	$H = 2.69^a$	0.4425
IL-2 ⁺	0.5 (0.3, 2.3)	2.3 (1.1, 7.7)	3.4 (2.1, 6.4)	4.2 (2.8, 7.0)	$H = 8.29^a$	0.0404
Granzyme B ⁺	13.5 ± 12.4	50.6 ± 26.2	66.1 ± 16.5	70.1 ± 14.1	$F = 12.18^b$	< 0.001
Perforin ⁺	0.9 (0.7, 3.3)	5.1 (1.4, 15.4)	6.9 (5.3, 12.5)	6.3 (2.6, 16.3)	$H = 6.72^a$	0.0815

注: ^a: 非正态分布资料以 M (P25, P75) 表示; ^b: 正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。CD8⁺ T 细胞各亚群 Annexin V⁺、Ki67⁺、IFN- γ ⁺ 和 Granzyme B⁺ 比例采用 one-way ANOVA 检验进行方差分析, Holm-Sidak's 进行多重比较; 各亚群细胞比例、IL-2⁺、TNF- α ⁺ 和 Perforin⁺ 比例采用 Kruskal-Wallis 检验进行分析, Bonferroni 法进行多重比较

于PD-1⁻TIGIT⁻细胞 ($t = 3.69$ 、 $P = 0.0043$, $t = 2.76$ 、 $P = 0.0359$), 但PD-1⁻TIGIT⁺与PD-1⁻TIGIT⁻亚群Annexin V⁺比例差异无统计学意义 ($t = 2.01$ 、 $P = 0.0581$, $t = 2.07$ 、 $P = 0.0518$), 提示PD-1可能是导致细胞凋亡的主要分子。

2. 患者高表达PD-1和TIGIT的CD4⁺ T细胞亚群增殖能力增强: T细胞各亚群Ki67⁺表达水平(表3~4)检测发现与T细胞功能耗竭表型不同, 急性期恶性疟患者表达PD-1和TIGIT的T细胞增殖能力并未降低。CD4⁺ T细胞亚群中, PD-1⁺TIGIT⁻和PD-1⁺TIGIT⁺亚群Ki67⁺表达比例显著高于PD-1⁻TIGIT⁻细胞亚群 ($H = 17.80$ 、 $P = 0.0005$)。CD8⁺ T

细胞各亚群间Ki67⁺表达比例差异无统计学意义 ($F = 2.04$ 、 $P = 0.1412$)。

3. 高表达PD-1和TIGIT患者的T细胞亚群细胞因子水平增高: T细胞各亚群分泌细胞因子IFN- γ ⁺、IL-2⁺和TNF- α ⁺的比例见表3和表4。CD4⁺ T细胞各亚群中, PD-1⁺TIGIT⁻细胞IFN- γ ⁺表达比例显著高于PD-1⁻TIGIT⁻细胞 ($t = 4.55$ 、 $P = 0.0010$), PD-1⁺TIGIT⁻细胞TNF- α ⁺表达比例显著高于PD-1⁻TIGIT⁺细胞 ($t = 3.20$ 、 $P = 0.0219$)。CD8⁺ T细胞各亚群中, PD-1⁺TIGIT⁻细胞IFN- γ ⁺和PD-1⁺TIGIT⁺细胞IL-2⁺表达比例均显著高于PD-1⁻TIGIT⁻细胞 ($t = 2.95$ 、 $P = 0.0463$, $t = 2.65$ 、 $P =$

0.048)。而CD4⁺ T细胞各亚群间IL-2⁺比例和CD8⁺ T细胞各亚群之间TNF- α ⁺比例差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

4. 急性期恶性疟患者高表达PD-1和TIGIT的CD8⁺ T细胞亚群杀伤能力增强: 为评价CD8⁺ T细胞杀伤能力, 进一步检测CD8⁺ T细胞各亚群Granzyme B⁺和Perforin⁺表达比例(表4)。结果发现PD-1⁺TIGIT⁻、PD-1⁻TIGIT⁺和PD-1⁺TIGIT⁺亚群Granzyme B⁺表达比例显著高于PD-1⁻TIGIT⁻细胞亚群($t = 3.55$ 、 $P = 0.0080$; $t = 5.04$ 、 $P = 0.0003$, $t = 5.41$ 、 $P = 0.0002$), 而各亚群间Perforin⁺表达比例差异无统计学意义($H = 6.72$ 、 $P = 0.0815$)。提示急性期恶性疟感染者外周血中, 高表达共抑制分子PD-1和TIGIT的T细胞并未表现出典型的耗竭

表型和功能, 而是保持较高的增殖、杀伤和分泌细胞因子的能力。

四、急性期恶性疟患者CD4⁺ T细胞PD-1⁺TIGIT⁺表达比例与红细胞计数和血红蛋白浓度相关性

分析急性期恶性疟患者外周血CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞各亚群比例与患者临床指标(RBC计数、HGB、CRP、PCT、Cr、ALT、AST、DBil浓度和ESR)的相关性(表5), 结果显示, CD4⁺ T细胞PD-1⁺TIGIT⁺表达比例与RBC计数和HGB浓度均呈负相关(图1A和B)。

五、急性期恶性疟患者CD8⁺ T细胞杀伤能力与肌酐浓度相关性

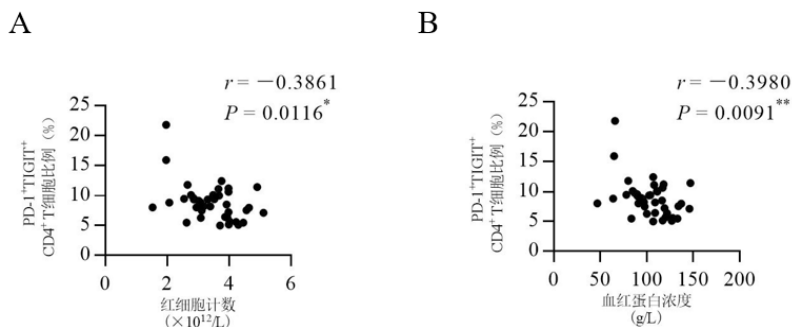
急性期恶性疟患者外周血CD8⁺ T细胞Granzyme B⁺和Perforin⁺表达比例与患者临床指

表5 急性期恶性疟患者T细胞各亚群比例与临床指标的相关性 [r 值(P 值)]

指标	CD4 ⁺ T细胞亚群				CD8 ⁺ T细胞亚群			
	PD-1 ⁻ TIGIT ⁻	PD-1 ⁺ TIGIT ⁻	PD-1 ⁻ TIGIT ⁺	PD-1 ⁺ TIGIT ⁺	PD-1 ⁻ TIGIT ⁻	PD-1 ⁺ TIGIT ⁻	PD-1 ⁻ TIGIT ⁺	PD-1 ⁺ TIGIT ⁺
RBC	0.2684 (0.0857)	0.0765 (0.6299)	-0.1082 (0.4953)	-0.3861 (0.0116)	0.1193 (0.4516)	0.1315 (0.4066)	-0.1591 (0.3142)	-0.1265 (0.4247)
HGB	0.2666 (0.0879)	0.0928 (0.5587)	-0.1207 (0.4466)	-0.3980 (0.0091)	0.1169 (0.4611)	0.1460 (0.3561)	-0.1982 (0.2082)	-0.0382 (0.8103)
CRP	-0.3740 (0.0546)	0.1951 (0.3295)	0.2350 (0.2380)	0.3249 (0.0982)	0.0382 (0.8501)	0.2791 (0.1586)	-0.1011 (0.6160)	-0.2932 (0.1378)
PCT	0.2210 (0.3357)	0.0325 (0.8888)	-0.1690 (0.4640)	-0.0787 (0.7347)	0.0858 (0.7115)	-0.0488 (0.8338)	-0.0182 (0.9376)	-0.2715 (0.2338)
ESR	-0.1824 (0.5321)	-0.0418 (0.8915)	0.1848 (0.5244)	0.1473 (0.6158)	-0.4286 (0.1281)	0.0506 (0.8676)	0.5165 (0.0741)	0.2885 (0.3147)
Cr	-0.1873 (0.2472)	-0.2098 (0.1939)	0.1029 (0.5276)	-0.0483 (0.7672)	-0.1995 (0.2170)	0.0956 (0.5573)	0.0848 (0.6029)	0.0487 (0.7654)
ALT	0.1964 (0.2733)	-0.1641 (0.3615)	-0.0271 (0.8811)	-0.3353 (0.0565)	-0.0702 (0.6979)	0.0358 (0.8434)	0.1414 (0.4326)	-0.1611 (0.3704)
AST	0.3062 (0.0883)	-0.3013 (0.0884)	-0.0652 (0.7229)	-0.3478 (0.0511)	-0.0213 (0.9080)	-0.0749 (0.6834)	0.2399 (0.1859)	-0.3183 (0.0759)
DBil	0.0156 (0.9293)	0.3127 (0.0674)	-0.1264 (0.4695)	-0.1320 (0.4498)	-0.2477 (0.1515)	0.1938 (0.2647)	0.2141 (0.2169)	0.0310 (0.8595)

注: RBC: 红细胞计数, HGB: 血红蛋白, Cr: 肌酐, ALT: 丙氨酸氨基转移酶, AST: 天门冬氨酸氨基转移酶, DBil: 直接胆红素, CRP: C-反应蛋白, PCT: 降钙素原, ESR: 红细胞沉降率。

T细胞各亚群比例与RBC计数、HGB浓度和ESR的相关性采用Pearson检验, 与CRP、PCT、Cr、ALT、AST和DBil浓度的相关性采用Spearman相关性分析。 r 值(P 值): r 值为相关性系数, P 值表示差异有无统计学意义



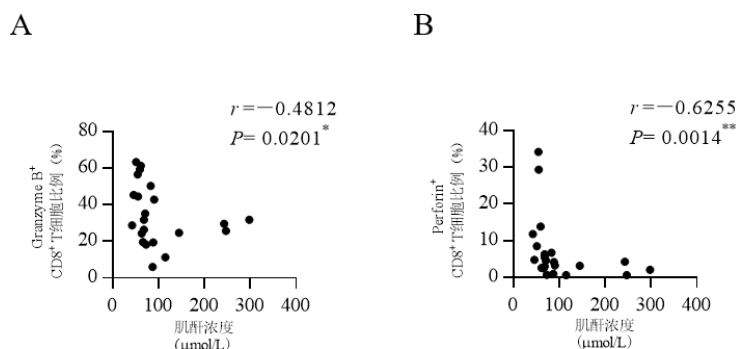
注: 采用Pearson相关性分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图1 患者CD4⁺ T细胞PD-1⁺TIGIT⁺表达比例与红细胞计数和血红蛋白浓度的相关性

表6 急性期恶性疟患者CD8⁺T细胞杀伤能力与临床指标的相关性

指标	Granzyme B ⁺ CD8 ⁺ T细胞		Perforin ⁺ CD8 ⁺ T细胞	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
RBC	0.0226	0.9167	0.2080	0.3295
HGB	0.0079	0.9706	0.2370	0.2648
CRP	0.4126	0.1845	0.2378	0.4573
PCT	0.3604	0.4262	0.6667	0.1556
ESR	-0.4286	0.1281	0.8000	0.3333
Cr	-0.4812	0.0201	-0.6255	0.0014
ALT	0.2721	0.2897	-0.0750	0.7664
AST	0.1520	0.5594	0.3375	0.1708
DBil	-0.2487	0.3196	0.1476	0.5590

注: RBC: 红细胞计数, HGB: 血红蛋白, Cr: 肌酐, ALT: 丙氨酸氨基转移酶, AST: 天门冬氨酸氨基转移酶, DBil: 直接胆红素, CRP: C-反应蛋白, PCT: 降钙素原, ESR: 红细胞沉降率



注: 均采用Spearman相关性分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 急性期恶性疟患者Granzyme B⁺CD8⁺T细胞和Perforin⁺CD8⁺T细胞比例与肌酐浓度的相关性

标(RBC计数、HGB、CRP、PCT、Cr、ALT、AST、DBil浓度和ESR)的相关性分析显示,CD8⁺T细胞Granzyme B⁺和Perforin⁺表达比例[Granzyme B⁺: (35.22 ± 16.15)%, Perforin⁺: 4.45 (2.54, 7.73)%]均与Cr浓度呈显著负相关(表6和图2)。

讨 论

既往研究表明,肿瘤和慢性病毒感染性疾病通常导致共抑制分子PD-1和TIGIT上调表达,从而诱导T细胞功能耗竭^[4-9]。急性感染性疾病可诱导共抑制分子上调表达,但对T细胞功能的调节作用尚存在争议^[25-27]。本研究发现急性期恶性疟患者外周血CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞表面高表达PD-1和TIGIT,同时相应表达这两种共抑制分子的T细胞

比例增高,提示在恶性疟原虫感染急性期,可迅速上调机体T细胞共抑制分子表达水平。同时有多项研究也发现,急性期恶性疟患者T细胞表面多种共抑制分子表达上调,但PD-1和TIGIT表达比例最高(PD-1: 20%~50%, TIGIT: 30%~40%)^[11-16, 28],且PD-1和TIGIT协同表达模式对急性期恶性疟感染T细胞功能的影响尚无报道。

既往研究认为,共抑制分子表达上调抑制机体清除疟原虫^[14, 16]。急性恶性疟患者外周血PD-1和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4)上调表达抑制效应CD4⁺T细胞增殖和分泌细胞因子IFN-γ和IL-10的能力^[14],PD-1阻断可促使CD4⁺T细胞分泌IFN-γ能力增强^[16]。本研究发现,虽然急性期恶性疟患者外周血高表达PD-1和TIGIT的T细

胞凋亡水平升高,但未表现出耗竭的典型特征。 $CD4^+$ T细胞中PD-1⁺TIGIT⁻和PD-1⁺TIGIT⁺亚群不仅增殖能力增强,且分泌IFN- γ 增加。 $CD8^+$ T细胞中PD-1⁺TIGIT⁻亚群分泌IFN- γ 以及PD-1⁺TIGIT⁺亚群分泌IL-2亦显著增加;同时, $CD8^+$ T细胞PD-1⁺TIGIT⁻、PD-1⁻TIGIT⁺和PD-1⁺TIGIT⁺亚群Granzyme B⁺表达比例显著高于PD-1⁻TIGIT⁻细胞亚群。本研究 and 近期其他相关研究均提示,共抑制分子PD-1和TIGIT在急性感染中可能不作为T细胞功能抑制的标志物,而是一个活化性标志物。这些活化的T细胞分泌细胞因子增加可能与组织损伤有关^[29-30]。本研究发现患者 $CD4^+$ T细胞PD-1⁺TIGIT⁺表达比例与RBC计数和Hb浓度均呈负相关,提示 $CD4^+$ T细胞表面共抑制分子PD-1和TIGIT上调表达可能与机体严重的红细胞破坏和溶血有关,但是否与该群细胞分泌IFN- γ 增多有关尚需进一步研究。同时,本研究发现 $CD8^+$ T细胞Granzyme B⁺和Perforin⁺表达比例均与患者肌酐水平呈负相关,提示 $CD8^+$ T细胞杀伤能力增强可能与患者肾脏功能重度损伤有关。

综上,本研究发现急性期恶性疟患者外周血共抑制分子PD-1和TIGIT上调表达并未抑制T细胞功能,虽然T细胞凋亡易感性增加,但仍具有较高的增殖、杀伤和分泌细胞因子的能力。同时还发现 $CD4^+$ T细胞中PD-1⁺TIGIT⁺比例和 $CD8^+$ T细胞杀伤功能可能与该疾病的临床损伤有关。因我国急性期恶性疟患者多为输入型病例,样本量有限,本研究结果还需扩大样本量进一步验证。此外,急性期恶性疟患者T淋巴细胞共抑制分子表达上调导致炎性表型的机制也尚需进一步研究,从而为疟疾患者临床治疗提供更新的免疫学依据。

参 考 文 献

- [1] Ashley EA, PyaePhyo A, Woodrow CJ. Malaria[J]. Lancet,2018,391(10130):1608-1621.
- [2] Van Braeckel-Budimir N, Kurup SP, Harty JT. Regulatory issues in immunity to liver and blood-stage malaria[J]. Curr Opin Immunol,2016,42(3):91-97.
- [3] Schönrich G, Raftery MJ. The PD-1/PD-L1 axis and virus infections: A delicate balance[J]. Front Cell Infect Microbiol,2019,9(9):207.
- [4] 高学松, 郭江, 段雪飞. 疟疾患者炎症指标变化特点及临床意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2018,12(3):240-243.
- [5] Sugiura D, Maruhashi T, Okazaki IM, et al. Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses[J]. Science,2019,364(6440):558-566.
- [6] Fromentin R, DaFonseca S, Costiniuk CT, et al. PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in $CD4^+$ T cells from ART-suppressed individuals[J]. Nat Commun,2019,10(1):814-819.
- [7] Chew GM, Fujita T, Webb GM, et al. TIGIT marks exhausted T cells, correlates with disease progression, and serves as a target for immune restoration in HIV and SIV infection[J]. PLoS Pathog,2016,12(1):e1005349.
- [8] Guillerey C, Harjunpää H, Carrié N, et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores $CD8^+$ T cell immunity against multiple myeloma[J]. Blood,2018,132(16):1689-1694.
- [9] Meng X, Liu X, Guo X, et al. FBXO38 mediates PD-1 ubiquitination and regulates anti-tumour immunity of T cells[J]. Nature,2018,564(7734):130-135.
- [10] Wherry EJ. T cell exhaustion[J]. Nat Immunol,2011,12(6):492-499.
- [11] Kong Y, Zhu L, Schell TD, et al. T-Cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) associates with $CD8^+$ T cell exhaustion and poor clinical outcome in AML patients[J]. Clin Cancer Res,2016,22(12):3057-3066.
- [12] Herrmann M, Schulte S, Wildner NH, et al. Analysis of co-inhibitory receptor expression in COVID-19 infection compared to acute plasmodium falciparum malaria: LAG-3 and TIM-3 correlate with T cell activation and course of disease[J]. Front Immunol,2020,11(2):1870-1884.
- [13] Edwards CL, Ng SS, Corvino D, et al. Early changes in $CD4^+$ T cell activation during blood-stage plasmodium falciparum infection[J]. J Infect Dis,2018,218(7):1119-1129.
- [14] Mackroth MS, Abel A, Steeg C, et al. Acute malaria induces PD1⁺CTLA4⁺ effector T cells with cell-extrinsic suppressor function[J]. PLoS Pathog,2016,12(11):e1005909.
- [15] Abel A, Steeg C, Aminkiah F, et al. Differential expression pattern of co-inhibitory molecules on $CD4^+$ T cells in uncomplicated versus complicated malaria[J]. Sci Rep,2018,8(1):4789-4819.
- [16] Butler NS, Moebius J, Pewe LL, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection[J]. Nat Immunol,2011,13(2):188-195.
- [17] Liu X, Li M, Wang X, et al. PD-1⁺TIGIT⁺ $CD8^+$ T cells are associated with pathogenesis and progression of patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 2019,68(12):2041-2054.
- [18] Escalante AA, Pacheco MA. Malaria molecular epidemiology: an evolutionary genetics perspective[J]. Microbiol Spectr,2019,7(4):e0010.
- [19] World Health Organization. World malaria report 2018[EB/OL]. Geneva: 2019. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653>.
- [20] Su XZ, Lane KD, Xia L, et al. Plasmodium genomics and genetics: New insights into malaria pathogenesis, drug resistance, epidemiology, and evolution[J]. Clin Microbiol Rev,2019,32(4):e00019.
- [21] Taylor WRJ, Hanson J, Turner GDH, et al. Respiratory manifestations of malaria[J]. Chest,2012,142(2):492-505.
- [22] Karnad DR, Nor MBM, Richards GA, et al. Intensive care in severe malaria: Report from the task force on tropical diseases by the World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine[J]. J

- Crit Care,2018,43(43):356-360.
- [23] Milner DA Jr. Malaria Pathogenesis[J]. Cold Spring Harb Perspect Med,2018,8(1):a025569.
- [24] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS259-2015疟疾的诊断[EB/OL]. 2015-11-16.http://www.nhc.gov.cn/.
- [25] Jubel JM, Barbati ZR, Burger C, et al. The role of PD-1 in acute and chronic infection[J]. Front Immunol,2020,11(8):487-501.
- [26] Lafon M, Mégret F, Meuth SG, et al. Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to rabies virus encephalitis[J]. J Immunol,2008,180(11):7506-7515.
- [27] De Alwis R, Bangs DJ, Angelo MA, et al. Immunodominant dengue virus-specific CD8⁺ T cell responses are associated with a memory PD-1⁺ phenotype[J]. J Virol,2016,90(9):4771-4779.
- [28] Zhang Y, Jiang N, Zhang T, et al. Tim-3 signaling blockade with α -lactose induces compensatory TIGIT expression in plasmodium berghei ANKA-infected mice[J]. Parasit Vectors,2019,12(1):534.
- [29] Ruibal P, Oestereich L, Lüdtkke A, et al. Unique human immune signature of Ebola virus disease in Guinea[J]. Nature,2016,533(7601):100-104.
- [30] Hafalla JC, Claser C, Couper KN, et al. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitory pathways independently regulate host resistance to Plasmodium-induced acute immune pathology[J]. PLoS Pathog,2012,8(2):e1002504.
- (收稿日期: 2020-12-16)
(本文编辑: 孙荣华)

黄雅倩, 王蓓蓓, 宋蕊, 等. 急性期恶性疟患者外周血PD-1⁺TIGIT⁺ T细胞功能[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志 (电子版), 2021,15(6):385-393.