

# 基于多色流式降维聚类方法的自发性细菌性腹膜炎患者T淋巴细胞亚群分析

王锟涛<sup>1</sup> 王宪波<sup>2</sup> 曹钰<sup>3</sup> 郝禹<sup>3</sup> 韩俊燕<sup>3</sup> 曾辉<sup>1,3</sup>

**【摘要】目的** 建立多色流式降维聚类分析方法,检测自发性细菌性腹膜炎(SBP)患者外周血和腹水中T细胞亚群,探讨SBP患者外周以及腹腔局部T淋巴细胞的表面标志物表达差异。**方法** 选取2021年12月至2022年1月就诊于首都医科大学附属北京地坛医院的4例SBP患者为研究对象。根据多色流式荧光搭配原则,初步确立检测外周血及腹水T淋巴细胞亚群比例的多色流式配色方案。利用健康对照者外周血单个核细胞(PBMCs)调节最适检测电压及荧光补偿;设定条件后,检测4例SBP患者的外周血及腹水样本。建立多色流式降维聚类分析方案以检测SBP患者外周血和腹水中T淋巴细胞的差异。**结果** 采用统一流形逼近和投影(UMAP)结合FlowSOM插件的多色流式降维分析法将CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞均分为12个细胞群。该降维聚类方法通过可视化UMAP图定位,并结合统计学分析初步发现,与外周血相比,SBP患者腹水中CD69<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> ( $t = 3.427$ ,  $P = 0.0416$ )以及CD25<sup>-</sup>TIGIT<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> ( $t = 3.203$ ,  $P = 0.0492$ )比例较高,差异有统计学意义。**结论** 多色流式降维聚类分析法用于检测SBP患者外周血及腹水样本中T淋巴细胞分群及功能,具有快速、准确、多维度并且可视化强的优点。

**【关键词】** 多色流式; 自发性细菌性腹膜炎; 降维聚类分析; T细胞亚群

**Dimensionality reduction and clustering method of flow cytometric data for measuring T cell subpopulations in patients with spontaneous bacterial peritonitis** Wang Zengtao<sup>1</sup>, Wang Xianbo<sup>2</sup>, Cao Yu<sup>3</sup>, Hao Yu<sup>3</sup>, Han Junyan<sup>3</sup>, Zeng Hui<sup>1,3</sup>. <sup>1</sup>Institute of Infectious Diseases, <sup>2</sup>Center of Integrative Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; <sup>3</sup>Biomedical Innovation Center, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Corresponding author: Zeng Hui, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To establish a dimensionality reduction and clustering method of flow cytometric data for measuring T cell subpopulations in peripheral blood and ascites of patients with spontaneous bacterial peritonitis (SBP), and to explore the differences in the expression of markers of T lymphocytes in the peripheral blood and ascites. **Methods** Total of 4 patients with SBP were recruited in Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University from December 2021 to January 2022. The monoclonal antibodies targeting cell surface antigen were used to establish the multi-color flow cytometry analysis panel. The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) sample from one healthy donor was applied to adjust optimal detection voltage and fluorescence compensation. This panel was applied to detect peripheral blood and ascites samples from 4 patients with SBP. Uniform manifold approximation and projection (UMAP) and FlowSOM were used to analyze the results from multicolor flow cytometric data. **Results** Using UMAP combined with FlowSOM, CD4<sup>+</sup>T cells and CD8<sup>+</sup>T cells were both divided into 12 clusters, respectively. Through the visual UMAP map positioning and statistical analysis, compared with the peripheral blood, the proportion of CD69<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> cells ( $t = 3.427$ ,  $P = 0.0416$ ) and CD25<sup>-</sup>TIGIT<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub> cells ( $t =$

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2023.02.004

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(No. LDFL20191801); 北京市科学技术委员会2019年“首都临床诊疗技术研究与转化应用”项目(No. Z201100005520035)

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<sup>1</sup>、中西医结合中心<sup>2</sup>; 100038 北京, 首都医科大学附属北京世纪坛医院生物医学创新中心<sup>3</sup>

通信作者: 曾辉, Email: zenghui@ccmu.edu.cn

3.203,  $P = 0.0492$ ) in ascites of patients with SBP were increased, with significant differences. **Conclusions** The dimensionality reduction and clustering method of flow cytometric data can be used to detect the groups and functions of T lymphocyte in peripheral blood and ascites samples of patients with SBP, which has the advantages of rapidity, accuracy, multi-dimensionality and strong visualization.

**【Key words】** Multi-color flow cytometry; Spontaneous bacterial peritonitis; Dimensionality reduction and cluster analysis; T cell subset

自发性细菌性腹膜炎 (spontaneous bacterial peritonitis, SBP) 是指在无明确腹腔病变来源 (如肠穿孔或肠脓肿) 的情况下, 病原微生物侵入腹腔, 造成明显损害的腹腔感染<sup>[1]</sup>, 是肝硬化合并腹水患者常见且严重的并发症之一。

SBP发病机制复杂, 而肠道屏障功能障碍是造成SBP的重要原因之一<sup>[2]</sup>, 其主要机制是由于SBP患者肠道通透性增加, 从而导致细胞间的紧密连接破坏<sup>[3]</sup>。此外, 由于患者肠道菌群失调, 有害细菌代谢物积累会逐渐破坏肠上皮屏障<sup>[4]</sup>, 并且通过改变肠道中微生物群所产生短链脂肪酸的组成进而导致肠道免疫失调, 这种免疫失调会导致肠道免疫屏障破坏和细菌异位<sup>[5]</sup>。细菌从肠道异位进入血液循环后, 血液中脂多糖、脂多糖结合蛋白、细菌DNA含量均升高, 细菌或其产物到达全身各处<sup>[6]</sup>, 当细菌通过肠系膜淋巴结异位至腹腔时, 倘若患者腹腔免疫细胞功能低下, 就会造成腹腔局部感染。一旦发生SBP, 患者预后往往不佳, 1个月、6个月和1年病死率分别为33%、50%和58%<sup>[7]</sup>。

T细胞是免疫系统重要的组成部分, 在适应性免疫应答中发挥重要作用, 其数量和功能的改变直接影响机体的免疫状态。既往研究观察到在伴有腹水的肝硬化患者中, 外周血T细胞总数显著减少, 活化的CD4<sup>+</sup>T细胞和衰老的CD8<sup>+</sup>T细胞数量显著增加<sup>[8]</sup>。此外, 与健康对照组相比, 肝硬化患者CD4和CD8记忆T细胞中, 凋亡标志物CD95<sup>+</sup>细胞比例显著增加, 共刺激分子CD28表达下调。因此, 肝硬化患者适应性免疫的改变可能在其免疫抑制过程中发挥重要作用, 导致患者对细菌感染的易感性增加<sup>[9]</sup>。因此, 探究SBP患者腹水中T细胞亚群分布以及功能状态, 对了解患者腹腔局部免疫状态, 辅助改善患者细菌感染状态具有重要意义。

既往研究中<sup>[10]</sup>, 受传统四色流式技术局限性的影响, 通常需要大量临床样本来进行腹水中免疫细胞不同分群的检测, 并且缺乏进一步细分亚群后的功能研究。随着多色流式细胞染色技术的迅猛发

展, 研究者能够在1个细胞上通过标记免疫细胞表面标记物可区分不同免疫细胞亚群, 同时标记多个功能性膜表面分子<sup>[11]</sup>, 从而实现快速、多维度对SBP患者外周血及腹水中免疫细胞亚群及其相关功能性分子的比较。

随着分析方法的发展, 有一些降维分析技术可以帮助研究人员, 使得高维数据可视化。其中, 统一流形逼近和投影 (uniform manifold approximation and projection, UMAP) 是一种新兴的降维分析方法, 与t分布-随机近邻嵌入 (t-distributed stochastic neighbor embedding, t-SNE) 相比, 其保留了与t-SNE一样多的局部数据结构和更多的全局数据结构, 且运行时间更短<sup>[12]</sup>。鉴于SBP患者免疫细胞的复杂性和在不同环境中的异质性, 本研究通过多色流式细胞术联合UMAP可以实现外周血及腹水免疫细胞的精准分型、绘制不同环境下免疫细胞流式降维图, 探讨免疫细胞亚群的组成、功能改变, 进而理解患者腹水稳态, 研究局部免疫细胞对抗感染可能的机制, 现报道如下。

## 材料与方法

### 一、研究对象

选择首都医科大学附属北京地坛医院2021年12月至2022年1月收治住院的SBP患者4例, 年龄38~73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, 用无菌离心管取患者腹水30.0 ml。SBP诊断标准: 腹水中性粒细胞  $> 250$  个/ $\text{mm}^3$  ( $250 \times 10^6/\text{L}$ ) 或  $< 250$  个/ $\text{mm}^3$  ( $250 \times 10^6/\text{L}$ ), 但腹水培养阳性<sup>[13]</sup>。

### 二、试剂和仪器

1. 试剂: 淋巴细胞分离液 (lymphoprep) 购自加拿大STEMCELL公司; 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 购自美国Corning公司; 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 购自美国Gibco公司; 小鼠抗人单克

隆抗体细胞表面标记物TIM3BB515、HLA-DRAPC、CD45RAAF700、CD4APC-Fire750、CCR7BV421、CD8BV510、CD27BV605、CD38BV650、PD-1BV711、CD3BV785、VISTAPE、CD25PE-CF594、TIGITPE-cy7、CD31BUV395和CD69BUV737均购自美国BD公司；RBC裂解液(RBCLysisBuffer)购自美国Biolegend公司。

2. 仪器：美国BDLSRFortessa流式细胞仪。

### 三、实验方法

1. 全血样本处理：在EDTA管中采集患者空腹血8 ml。全血中加入适量PBS充分混匀，沿管壁缓慢加入到5 ml淋巴细胞分离液上层，血样体积与淋巴细胞分离液体积比约为2:1，注意保持两液界面清晰，在室温下2 000 r/min离心20 min（离心半径 $r = 11.5\text{ cm}$ ）。待离心缓慢停止后，轻轻吸取上、中层界面相交处白色云雾状外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)层，加入10 ml PBS溶液，清洗所得PBMC，再经1 500 r/min，离心10 min后，去除淋巴细胞分离液；加入10 ml PBS再次重悬，离心1 200 r/min、5 min后弃去上清，再加入2 ml含2% FBS的PBS重悬，混匀计数后备用。

2. 腹水样本处理：加入适量PBS充分混匀后，用70  $\mu\text{m}$ 的筛网缓慢过滤至新的试管中，离心1 200 r/min、5 min后弃去上清；加入2 ml RBC裂解液，室温静置5 min，离心1 200 r/min、5 min后弃去上清；加入10 ml PBS再次润洗，去除残余的RBC裂解液，离心1 200 r/min、5 min（ $r = 11.5\text{ cm}$ ）后弃去上清，混匀计数后备用。

3. 抗体选择及染色：根据多色流式荧光搭配原则，弱表达抗原采用强荧光抗体，强表达抗原采用弱荧光抗体，同时结合设备滤光片配置，制定抗体荧光搭配方案。根据样本种类分类标记试管，外周血管和腹水管各加入100  $\mu\text{l}$ 未染色的单细胞悬液（含 $1 \times 10^6$ 细胞），每个试管各加入抗体CD4APC-Fire750 1  $\mu\text{l}$ 、CD8BV510 1  $\mu\text{l}$ 、CCR7BV421 1  $\mu\text{l}$ 、CD45RAAF700 1  $\mu\text{l}$ 、CD31BUV395 2  $\mu\text{l}$ 、CD69BUV737 1  $\mu\text{l}$ 、HLA-DRAPC 1  $\mu\text{l}$ 、CD27BV605 1  $\mu\text{l}$ 、CD38BV650 1  $\mu\text{l}$ 、CD25PE-CF594 1  $\mu\text{l}$ 、PD-1BV711 1  $\mu\text{l}$ 、VISTAPE 1  $\mu\text{l}$ 、TIGITPE-CY7 1  $\mu\text{l}$ 和TIM3BB515 1  $\mu\text{l}$ ；室温避光孵育30 min。每个试管均加入1 ml PBS，1 200 r/min、

5 min离心洗涤后，加入100  $\mu\text{l}$  PBS重悬，每管加3  $\mu\text{l}$  7-AAD用于区分死细胞，室温避光孵育5 min。

4. 流式细胞术检测SBP患者外周血及腹水T淋巴细胞分群和活化状态：设置并调节LSRFortessa流式细胞仪各个通道的电压和补偿，将先前制备的样品在LSRFortessa流式细胞仪上进行数据采集，使用FlowJo10.8.1软件进行数据记录及多色分析。首先将流式数据按照标志物7AAD、CD3、CD4和CD8分别得到CD4和CD8T细胞群体，其设门策略依次为FSC-A/SSC-A（圈出淋巴细胞）、FSC-H/FSC-A（去除粘连细胞）、CD3/7-AAD（排除死细胞）、CD4/CD8（T细胞亚群鉴定），圈门策略如图1A所示。然后使用Down Sample V3插件将各个样本的CD4<sup>+</sup> T和CD8<sup>+</sup> T细胞进行数量的统一；接着对数量统一后的数据通过UMAP插件进行降维；最后使用FlowSOM插件把细胞聚类成12个不同的细胞群，以此来分析SBP患者外周血及腹水中不同T细胞细胞群比例改变和功能状态，流程图如图1B所示。其中CD4、CD8、CCR7和CD45RA用于T细胞亚群的分类；CD69、HLA-DR、CD27和CD38可用于评估T细胞的活化程度，而PD-1、VISTA、TIGIT和TIM3可用于评估T细胞的功能状态。

### 四、统计学处理

采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计学分析及绘图。以CD4<sup>+</sup> T细胞为例，对UMAP以及FlowSOM降维聚类后所分成的12个细胞群所占外周血或腹水中总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例进行正态检验和方差齐性检验，若为正态分布，则将该细胞群所占外周血中总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与占腹水中总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例进行配对 $t$ 检验；若为偏态分布，则将该细胞群所占外周血中总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例与占腹水中总CD4<sup>+</sup> T细胞的比例进行Wilcoxon检验。CD8<sup>+</sup> T细胞用同样的方法进行分析，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、SBP患者的外周血、腹水多色流式检测联合UMAP降维聚类分析

应用方法中所述建立的多色流式配色方案检测SBP患者的外周血及腹水CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞得到相应的流式数据后，在FlowJo 10.8.1软件中，对4个患者的外周血和腹水样本进行单独

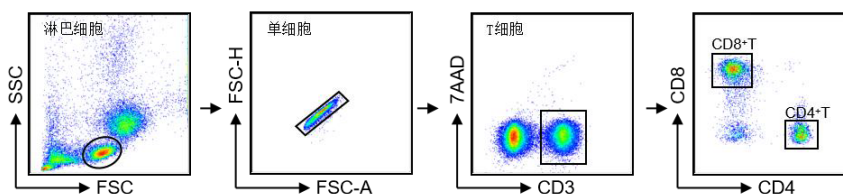
分组和标记(样本类型和样本编号)。分组后对所有样本 $CD4^+$ T和 $CD8^+$ T细胞的数据进行聚合聚类。使用UMAP插件对聚类结果进行分析,得到降维聚类后的UMAP总降维图。以 $CD4^+$ T细胞为例,根据上述流程,将腹水以及外周血所有 $CD4^+$ T细胞降维聚类后得到 $CD4^+$ T细胞总的UMAP降维图见图2A。聚类后将各个分群的各个表面标志物表达通过直方图进行展示,如图2B所示,再根据其各个表面标志物直方图表达不同将 $CD4^+$ T淋巴细胞亚群进行分类及命名,其中阳性标记为(+),阴性标记为(-),有表达强弱的之分以low和med来区分,而后首先根据CCR7、CD45RA分子表达不同将T细胞分为初始T细胞(Naïve T,  $CD45RA^+CCR7^+$ )、中央记忆性T细胞( $T_{CM}$ ,  $CD45RA^-CCR7^+$ )、效应记忆性T细胞( $T_{EM}$ ,  $CD45RA^-CCR7^-$ )和终末效应记忆T细胞( $T_{EMRA}$ ,  $CD45RA^+CCR7^-$ )四个亚群<sup>[14]</sup>,同时依据其不同的功能性标志物表达进行命名以区分各个T细胞亚群,最终整理成表格如图2C所示。同样将 $CD8^+$ T细胞也根据上述方法进行分析,如图3所示。

三、SBP患者的外周血及腹水UMAP降维图分析在聚类后的数据中,根据样本分组,从总

UMAP降维图中分别得出SBP患者外周血UMAP降维图和腹水UMAP降维图,根据UMAP降维图,结合每个亚群在各个样本中所占比例,比较SBP患者外周血及腹水中T细胞亚群比例以及功能差异,以 $CD4^+$ T细胞为例,根据聚类时样本分组不同,分别做出患者外周血与腹水UMAP降维图如图4A所示,再根据聚类时患者编号单独计算比例,可以得到每例患者外周血和腹水中某一细胞亚群所占总细胞群体的比例,将这些数据在GraphPad Prism 8.0软件中进行绘图及统计分析最终得到统计学结果,如图4B所示。

同样,将 $CD8^+$ T细胞也根据上述方法进行分析如图5A和5B所示。从 $CD4^+$ T细胞UMAP降维图初步看出,相比于外周血,腹水中naïve  $CD4^+$ T细胞比例较低,但推测因样本例数过少,差异无统计学意义( $t = 2.142$ 、 $P = 0.1216$ )。结合统计学分析发现,较外周血,患者腹水中 $CD69^+PD-1^+$  $CD4^+$  $T_{EM}$ 细胞( $t = 3.427$ 、 $P = 0.0416$ )以及 $CD25^-TIGIT^-CD4^+$  $T_{EM}$ ( $t = 3.203$ 、 $P = 0.0492$ )细胞比例较高。同样, $CD8^+$ T细胞UMAP降维图初步显示,较外周血,腹水中naïve  $CD8^+$ T细胞比例较低,但可能由于样本例数过少,差异亦无统计学意义( $t = 2.912$ 、 $P = 0.0619$ )。

A. 流式细胞数据圈门策略



B. FlowJo软件分析流程

T细胞流式细胞数据

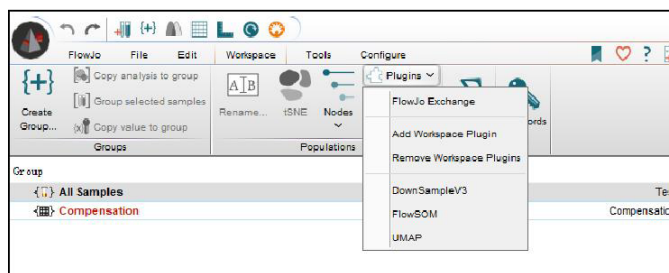
FlowJo软件

DownSample V3

UMAP降维

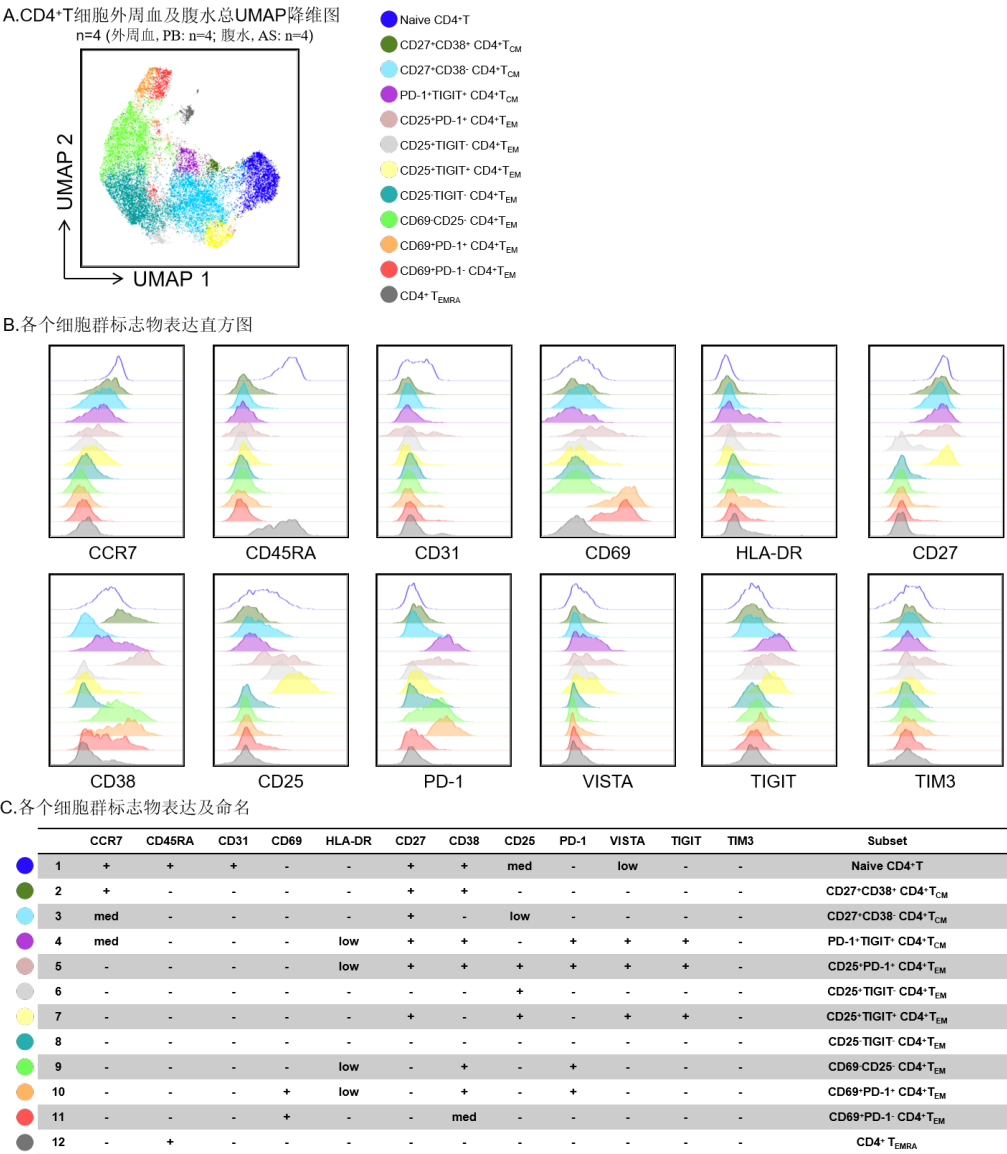
FlowSOM聚类

寻找有已知甚至是未知的亚群差异



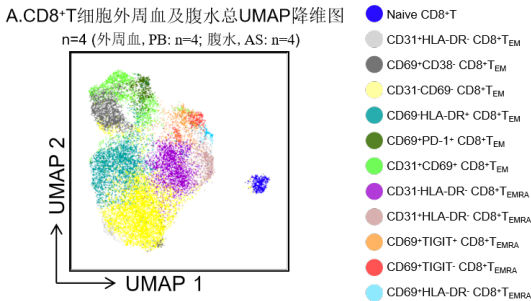
注: A: T细胞亚群圈门策略; B: FlowJo软件中T细胞流式数据UMAP降维聚类分析法流程图

图1 多色流式降维聚类分析流程



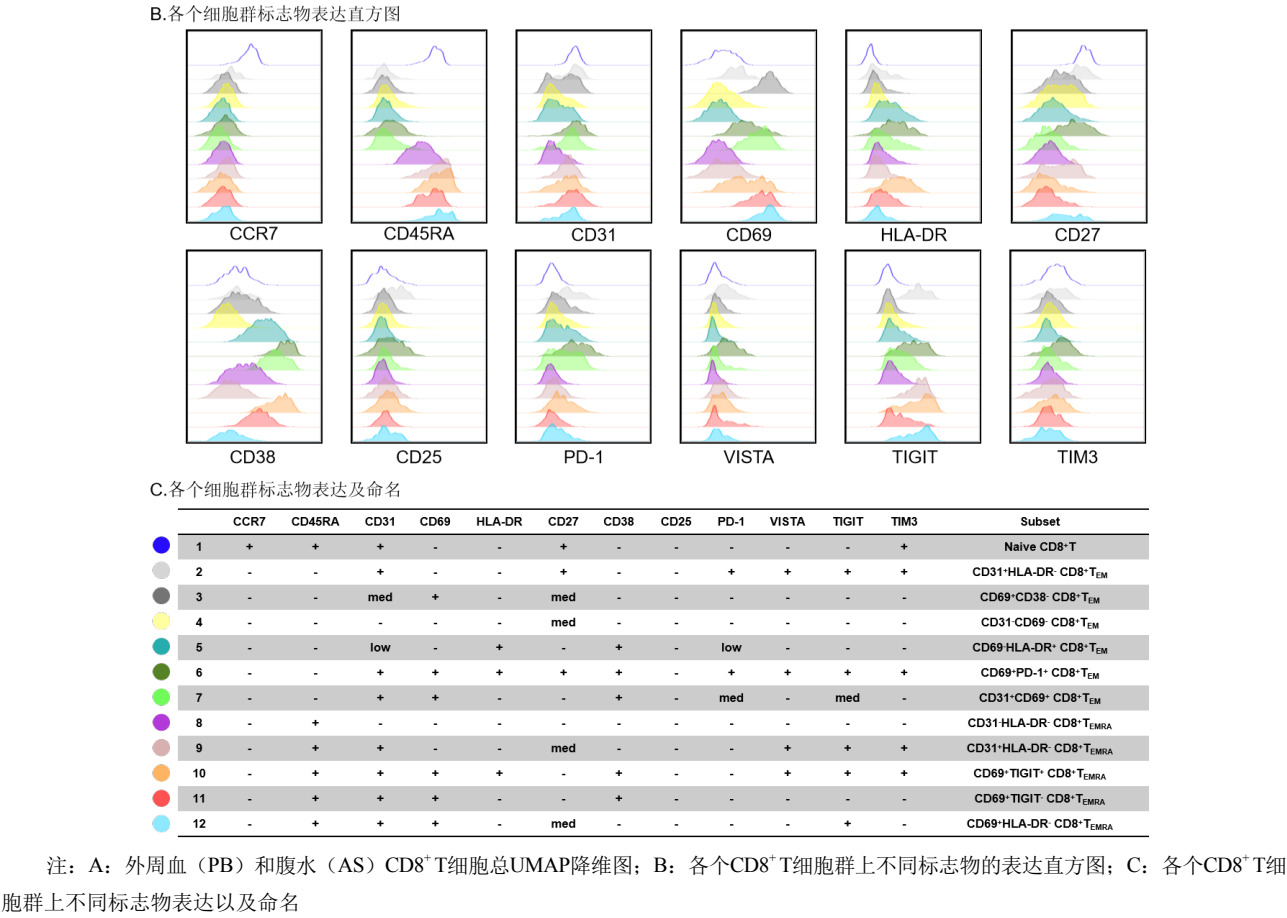
注: A: 外周血 (PB) 和腹水 (AS) CD4<sup>+</sup>T细胞总UMAP降维图; B: 各个CD4<sup>+</sup>T细胞群不同标志物的表达直方图; C: 各个CD4<sup>+</sup>T细胞群不同标志物的表达以及命名

图2 SBP患者CD4<sup>+</sup>T细胞降维聚类分析



注: A: 外周血 (PB) 和腹水 (AS) CD8<sup>+</sup>T细胞总UMAP降维图; B: 各个CD8<sup>+</sup>T细胞群上不同标志物的表达直方图; C: 各个CD8<sup>+</sup>T细胞群上不同标志物表达以及命名

图3 SBP患者CD8<sup>+</sup>T细胞降维聚类分析



续图3 SBP患者CD8<sup>+</sup>T细胞降维聚类分析

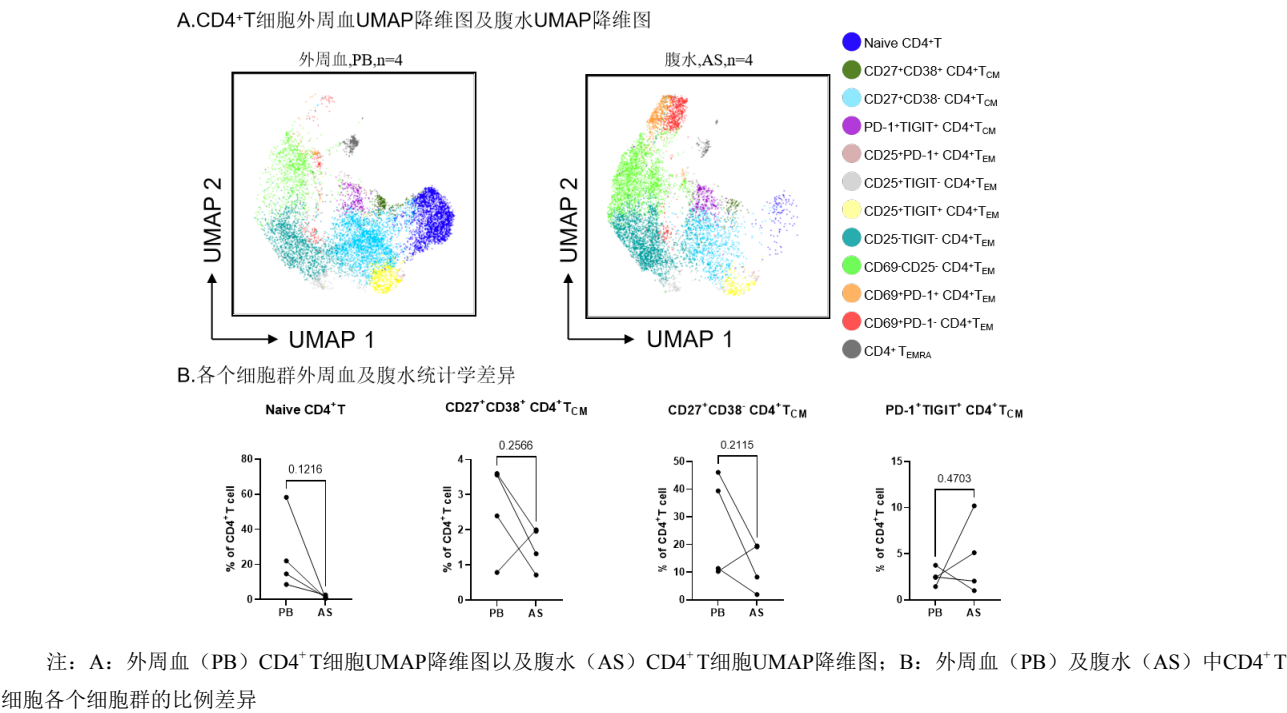
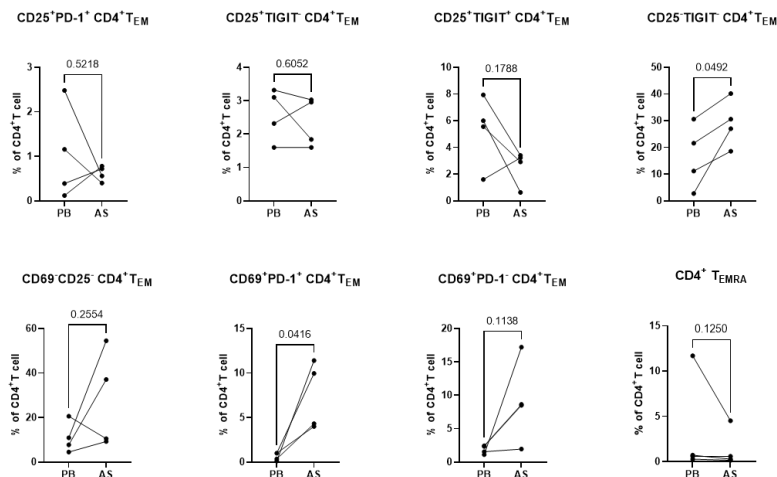
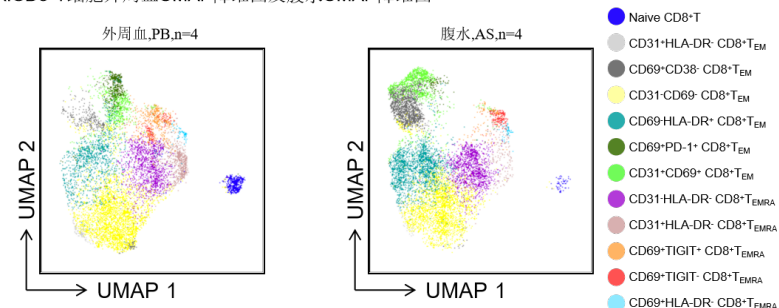


图4 SBP患者CD4<sup>+</sup>T细胞统计分析

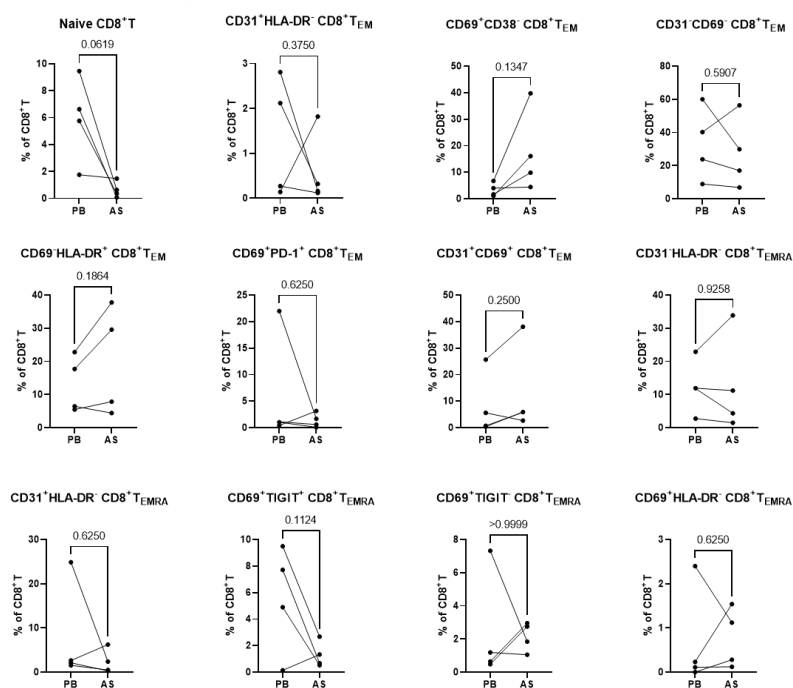
## B. 各个细胞群外周血及腹水统计学差异



注: A: 外周血 (PB) CD4<sup>+</sup>T细胞UMAP降维图以及腹水 (AS) CD4<sup>+</sup>T细胞UMAP降维图; B: 外周血 (PB) 及腹水 (AS) 中CD4<sup>+</sup>T细胞各个细胞群的比例差异

续图4 SBP患者CD4<sup>+</sup>T细胞统计分析A. CD8<sup>+</sup>T细胞外周血UMAP降维图及腹水UMAP降维图

## B. 各个细胞群外周血及腹水统计学差异



注: A: 外周血 (PB) CD8<sup>+</sup>T细胞UMAP降维图以及腹水 (AS) CD8<sup>+</sup>T细胞UMAP降维图; B: 外周血 (PB) 及腹水 (AS) 中CD8<sup>+</sup>T细胞各个细胞群的比例差异

图5 SBP患者CD8<sup>+</sup>T细胞统计分析



## 讨 论

流式细胞术是T淋巴细胞鉴别和分型的一种重要手段,但是目前在临床研究中仍大多采用四色及以下常规流式细胞术检测T细胞亚群及其他指标,故在实验中往往需要多管染色来分析1个样本,这就导致难以准确的获得特定T细胞亚群的生物学特性<sup>[15]</sup>。随着流式细胞术的发展,多色流式分析技术可以帮助研究者进行更复杂的实验,能够同时分析更多的荧光参数,实现多角度对细胞表面多种分子进行精确研究。

随着多色流式检测细胞表面标志物的增多,需要方法以对多参数的数据进行分析,而降维分析技术可以帮助研究人员将高维数据可视化。降维方法有线性降维法,例如主成分分析(principal-component analysis, PCA)广泛被使用于检测样本间异质性,而在最近开发的非线性方法,如t-SNE和UMAP,可以有效地将样本聚类。不同于PCA等线性降维方法,t-SNE和UMAP可以直接将多维数据的结构特征投影成低维形式表现<sup>[16]</sup>,即将原本多维数据中的差异通过二维图形中点的疏密远近表现。尽管t-SNE和UMAP在算法上总体思路相似,但也存在部分差异:第一,在计算高维距离时,t-SNE会计算各个点之间的距离,通过参数调整全局结构与局部结构间的软边界,而UMAP则只计算各点与最近k个点之间的距离,以此严格限制局部的范围;第二,t-SNE使用KL散度衡量信息损失,这或许在全局结构上会出现失真,而UMAP则使用二元交叉熵,全局和局部结构均有保留。简而言之,UMAP相比于t-SNE而言,保留了更多的全局数据结构,且运行时间更短,更重要地是,UMAP结果揭示了样本的不同生物学特征和临床意义,在分析大量数据时使用UMAP,可以实现更高效地分析不同类型样本<sup>[17]</sup>。但近期也有研究认为,当使用相同的初始化过程时,UMAP保留全局数据结构的能力似乎与t-SNE相似<sup>[18]</sup>。与传统的流式分析方法相比,本研究创新性建立的多色流式降维聚类分析方法能快速、准确并可视化地研究免疫细胞亚群的变化及功能,并初步应用于SBP患者T细胞亚群的分析。

本研究采用多色流式方案对SBP患者外周血以及腹水中T淋巴细胞进行染色,同时使用UMAP降维聚类分析法对多色流式数据进行可视化分析,

通过CD3、CD4、CD8、CD45RA、CCR7的表达强度将CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T细胞进一步细分为naïve T、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>、T<sub>EMRA</sub>四个亚群;再通过CD31、CD69、HLA-DR、CD27、CD38、CD25、PD-1、VISTA、TIGIT和TIM3等功能性细胞表面分子对T细胞进行亚群分类。在此基础上,分析上述多个T细胞亚群的功能状态以及在外周血和腹水之间的差异,以探讨SBP患者腹腔局部免疫状态。在既往流式细胞术中,往往通过常规经验圈门法对细胞进行分析,这使得实验结果存在一定的人为误差,且随着通道的增多,两两比较功能性标志物过程十分繁琐;以本实验为例,倘若使用经验圈门法,即使除去分群的细胞标志物,两两比较各个功能性标志物的表达,也需要45种搭配才可完成,不可避免地增加了分析数据时间,而通过UMAP降维聚类分析,如图3A所示,可以清晰地看到患者外周血和腹水中naïve T细胞群体以及CD69<sup>+</sup>T细胞群体的差异,不仅减少了分析数据的时间成本,且一定程度上避免了人为误差,提示UMAP降维聚类分析法具有可视性强、快速以及准确的特点,故此办法也可应用于不同群组患者标本之间的比较,可帮助研究者迅速地找到不同群组患者之间有差异的免疫细胞亚群,以此为探究不同群组患者的免疫状态。

SBP发生机制复杂,目前认为主要是由于肠道细菌易位和腹腔应对感染能力减弱。SBP作为一种在肝硬化合并腹水患者中常见且严重的并发症,其免疫功能减弱离不开肝脏损伤。众所周知,肝脏对于机体免疫的作用十分重要,主要体现在两个方面:第一,免疫监测,肝脏通过不同种群的常驻抗原呈递细胞和淋巴细胞发挥其抗菌监测功能<sup>[19]</sup>;第二,参与全身免疫反应,肝细胞是参与先天性和适应性免疫反应的蛋白质的主要来源,包括补体成分和许多分泌型模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)<sup>[20]</sup>。肝硬化的发展势必会伴随着肝脏结构和功能的损伤,这就导致肝脏的免疫监视功能受损及参与全身免疫反应能力减弱,削弱了机体对感染的抵抗力,构成机体免疫缺陷<sup>[21]</sup>。所以无论其病因如何,晚期肝硬化的病程都伴随着肝硬化相关的免疫功能障碍,称为肝硬化相关免疫功能障碍(cirrhosis-associated immune dysfunction, CAID),这导致机体对细菌感染易感性增加<sup>[22]</sup>,而当细菌易位至腹腔时,若腹腔局部免疫无法抵抗,则易诱发SBP,故探究腹腔局部的免疫状态十



分重要。既往研究表明,肝癌患者腹水中有一部分淋巴细胞与外周血淋巴细胞十分相似<sup>[23]</sup>,此外在胃肠癌患者中发现,相比于外周血,腹水中T淋巴细胞的共抑制分子TIM3和PD-1均有不同程度的升高<sup>[24]</sup>,或许会是疾病潜在的治疗靶点<sup>[25]</sup>,提示腹水所处的腹腔免疫环境并不是独立的,其中免疫细胞与外周血很有可能存在某种程度上的联系。了解SBP患者中外周血与腹水中总体免疫细胞分群与功能状态的差异,可探究患者腹腔局部免疫状态,或有助于改善患者腹腔感染状态。

naïve T细胞是T淋巴细胞中十分重要的亚群之一。naïve T细胞可以对免疫系统尚未遇到的新病原体作出反应,并进一步分化为记忆T细胞,拥有足够数量的naïve T细胞对于免疫系统持续应对陌生病原体至关重要<sup>[26]</sup>,此外,有研究表明naïve T在免疫衰老中占据了十分重要的地位<sup>[27]</sup>,伴随着年龄的增长,naïve T细胞会出现显著的下降,从而导致老年人免疫功能下降。而本研究发现,相比于外周血,SBP患者腹水中naïve CD4<sup>+</sup>T细胞较少,或许是因为naïve CD4<sup>+</sup>T细胞缺失导致了腹腔局部应对细菌能力的下降,从而引发SBP,但也可能是由于naïve CD4<sup>+</sup>T细胞长期应对易位至腹腔中的细菌,从而导致了其比例缺乏,又或者腹腔中所存在的naïve CD4<sup>+</sup>T细胞本身就少于外周血,但受限于样本量较少以及患者队列较为单一,仍需进一步实验来证明。

CD69是一种膜结合的2型C-凝集素受体,由于其在刺激后迅速出现在质膜表面,其参与T细胞增殖并作为其中的信号传递受体发挥作用,因此通常被认为是T淋巴细胞活化的经典早期标志物<sup>[28]</sup>,本研究发现,腹水中CD69<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>细胞要多于外周血,这或许可以说明腹腔中T淋巴细胞具有某种程度上的活化,从而试图应对腹腔感染。但近来也有文献表明,位于肝脏中的CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞大多表达CD69<sup>[29]</sup>,也可能腹水中这些T淋巴细胞是由肝脏中迁移而来,也仍需进一步的实验来验证,本研究中发现增加或减少的这几类免疫细胞亚群是否为SBP患者所独有,尚需进一步探讨,仍需进一步扩大样本量并增加患者队列来研究证实。

综上,本研究方案建立了一种快速、准确、多维度可视化的方法,即多色流式降维聚类分析法,基于这种方法检测SBP患者外周血及腹水中T淋巴细胞的亚群及其功能差异,为分析SBP患者腹

腔局部免疫状态提供了可靠的方法学,也为进一步研究SBP患者腹腔局部免疫状态的发生机制提供了新途径。更重要的是,本研究建立的多色流式降维聚类分析方法,在技术层面具有创新性,该方法也适用于其他免疫细胞如单核细胞、粒细胞等在其他疾病中的比例、功能变化及临床意义的研究和探讨。

## 参 考 文 献

- [1] 周小兵,李玉鑫,高方媛,等.肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎133例的危险因素分析[J].中华消化杂志,2019,39(4):268-270.
- [2] De Vaca RPC, Vairappan B, Espinoza TC, et al. Spontaneous bacterial peritonitis: physiopathological mechanism and clinical manifestations[J]. Adv Hepatol,2021:175-189.
- [3] Hasa E, Hartmann P, Schnabl B. Liver cirrhosis and immune dysfunction[J]. Int Immunol,2022,34(9):455-466.
- [4] Philips CA, Schnabl B, Bajaj JS. Gut microbiome and alcohol-associated liver disease[J]. J Clin Exp Hepatol,2022,12(5):1349-1359.
- [5] Muñoz L, Borrero MJ, Úbeda M, et al. Intestinal immune dysregulation driven by dysbiosis promotes barrier disruption and bacterial translocation in rats with cirrhosis[J]. Hepatology, 2019,70(3):925-938.
- [6] Du Plessis J, Vanheel H, Janssen CEI, et al. Activated intestinal macrophages in patients with cirrhosis release NO and IL-6 that may disrupt intestinal barrier function[J]. J Hepatol,2013,58(6):1125-1132.
- [7] Dever JB, Sheikh MY. spontaneous bacterial peritonitis-bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention[J]. Aliment Pharmacol Ther,2015,41(11):1116-1131.
- [8] Márquez M, Fernández-Gutiérrez C, Montes-de-Oca M, et al. Chronic antigenic stimuli as a possible explanation for the immunodepression caused by liver cirrhosis[J]. Clin Exp Immunol,2009,158(2):219-229.
- [9] Dahabra L, Kreidieh M, Abureesh M, et al. Proton pump inhibitors use and increased risk of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: A retrospective cohort analysis[J]. Gastroenterology Res,2022,15(4):180-187.
- [10] Charles J, Di Domizio J, Salameire D, et al. Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor[J]. J Invest Dermatol,2010, 130(6):1646-1656.
- [11] 姜钰,王蓓蓓,孔雅娴,等.多色流式细胞术检测CHB患者外周血多重细胞因子分泌的Th细胞亚群[J/CD].中国肝脏病杂志(电子版),2017,9(4):43-48.
- [12] Becht E, McInnes L, Healy J, et al. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP[J]. Nat Biotechnol,2019, 37(1):38-44.
- [13] European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis[J]. J Hepatol,2010,53(3):397-417.
- [14] Tinago W, Coghlan E, Macken A, et al. Clinical, immunological and treatment-related factors associated with normalised CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-cell ratio: effect of naive and memory T-cell subsets[J]. PLoS One,2014, 9(5):e97011.
- [15] 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.
- [16] Kobak D, Linderman GC. Initialization is critical for preserving global data structure in both t-SNE and UMAP[J]. *Nat Biotechnol*, 2021,39(2):156-157.
- [17] Yang Y, Sun H, Zhang Y, et al. Dimensionality reduction by UMAP reinforces sample heterogeneity analysis in bulk transcriptomic data[J]. *Cell Rep*,2021,36(4):109442.
- [18] Kobak D, Linderman GC. UMAP does not preserve global structure any better than t-SNE when using the same initialization[J]. *BioRxiv*,2019,2019:877522.
- [19] Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver[J]. *Nat Immunol*,2013,14(10): 996-1006.
- [20] Gao B, Jeong W I, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity[J]. *Hepatology*,2008,47(2):729-736.
- [21] Irvine KM, Ratnasekera I, Powell EE, et al. Causes and consequences of innate immune dysfunction in cirrhosis[J]. *Front Immunol*, 2019,10:293.
- [22] Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance[J]. *J Hepatol*, 2014,61(6):1385-1396.
- [23] Zhang Q, He Y, Luo N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell*,2019,179(4):829-845. e20.
- [24] Nakano M, Ito M, Tanaka R, et al. PD-1<sup>+</sup> TIM-3<sup>+</sup> T cells in malignant ascites predict prognosis of gastrointestinal cancer[J]. *Cancer Sci*, 2018,109(9):2986-2992.
- [25] Jiang X, Liu G, Li Y, et al. Immune checkpoint: The novel target for antitumor therapy[J]. *Genes Dis*,2021,8(1):25-37.
- [26] Pulko V, Davies JS, Martinez C, et al. Human memory T cells with a naive phenotype accumulate with aging and respond to persistent viruses[J]. *Nat Immunol*,2016,17(8):966-975.
- [27] Marrella V, Facoetti A, Cassani B. Cellular senescence in immunity against infections[J]. *Int J Mol Sci*,2022,23(19):11845.
- [28] Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper[J]. *Eur J Immunol*,2017,47(6):946-953.
- [29] You Z, Li Y, Wang Q, et al. The clinical significance of hepatic CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> resident-memory T cells in autoimmune hepatitis[J]. *Hepatology*,2021,74(2):847-863.
- (收稿日期: 2022-10-24)  
(本文编辑: 孙荣华)

王锒涛, 王宪波, 曹钰, 等. 基于多色流式降维聚类方法的自发性细菌性腹膜炎患者 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), 2023,17(2):92-101.