

# 新型冠状病毒肺炎患者外周血淋巴细胞亚群的分析研究

孟凡萍<sup>1</sup>, 郝坡<sup>2</sup>

(1. 重庆三峡中心医院, 重庆 404000; 2. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 400020)

**摘要:**目的 研究新型冠状病毒肺炎患者的淋巴细胞亚群的变化。方法 选取2020年2月于重庆三峡中心医院就诊的轻新型冠状病毒肺炎患者(轻症组)35例、重新型冠状病毒肺炎患者(重症组)11例,以健康体检者(NC组)20例为对照组,通过流式细胞检测三组淋巴细胞总数、T淋巴细胞(CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>)、B淋巴细胞数及NK细胞数量的变化。结果 两组患者的淋巴细胞总数、T淋巴细胞数(比例)、CD4<sup>+</sup>T细胞数(比例)、CD8<sup>+</sup>T细胞数(比例)、B淋巴细胞数(比例)、NK细胞数(比例)的差异均有统计学意义( $t=-0.774\sim-0.121$ ,  $P<0.05$ ),且重症组比轻症组降低的更为显著,差异具有统计学意义( $t=-0.852\sim-1.208$ , 均 $P<0.05$ );两组患者的CD8<sup>+</sup>T细胞数和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>较对照组有所升高( $t=-0.142\sim-0.256$ ,  $P<0.05$ ),但轻症组与重症组组间差异不明显,差异无统计学意义( $P>0.05$ );两组患者B淋巴细胞数及B淋巴细胞比例较对照组显著升高( $t=0.065$ ,  $-0.352$ ,  $P<0.05$ ),且重症组明显高于轻症组( $t=-0.744$ ,  $-0.114$ ,  $P<0.05$ ),差异均有统计学意义;NK细胞比例在重症组可见明显升高( $t=0.011$ ,  $P<0.05$ ),而在轻症组和对照组差异则无统计学意义( $t=0.059\sim0.201$ ,  $P>0.05$ )。结论 新型冠状病毒肺炎患者存在免疫功能紊乱,患者机体细胞免疫水平降低,重症患者可见免疫监视水平升高。

**关键词:**新型冠状病毒;新型冠状病毒肺炎;淋巴细胞亚群

中图分类号: R373.19; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 02-114-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.02.027

## Analysis of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Patients with Novel Coronavirus Pneumonia

MENG Fan-ping<sup>1</sup>, HAO Po<sup>2</sup>(1.Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China;2. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404000, China)

**Abstract : Objective** To study the changes of lymphocyte in patients with mild and severe 2019-ncov pneumonia. **Methods** In this study, 45 patients with mild coronavirus pneumonia (mild group) and 11 patients with severe coronavirus pneumonia (severe group) were selected from Chongqing Three Gorges Central Hospital in February 2020, and 20 healthy subjects (NC group) were selected as controls, the changes of total lymphocyte, T-lymphocyte (CD4<sup>+</sup>T, CD8<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), B-lymphocyte number and NK cell number were measured by flow cytometry. **Results** There were statistically significant differences in the total number of lymphocytes, the number of T lymphocytes (proportion), the number of CD4<sup>+</sup> T cells (proportion), the number of CD8<sup>+</sup> T cells (proportion), the number of B lymphocytes (proportion), and the number of NK cells (proportion) between the two groups were statistically significant ( $t=-0.774\sim-0.121$ ,  $P<0.05$ ), and the number of CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in the severe group was significantly lower than that in the mild group ( $t=-0.852\sim-1.208$ ,  $P<0.05$ ). Compared with the control group, it was increased ( $t=-0.142\sim-0.256$ ,  $P<0.05$ ), but there was no significant difference between the mild group and the severe group ( $P>0.05$ ). The proportion of B lymphocyte in the two groups was significantly higher than that in the control group ( $t=0.065$ ,  $-0.352$ ,  $P<0.05$ ), and the proportion of NK cells in the severe group was significantly higher than that in the mild group ( $t=0.011$ ,  $P<0.05$ ). There was no statistical significance ( $t=0.059\sim0.201$ ,  $P>0.05$ ). **Conclusion** Patients with novel coronavirus pneumonia have immune dysfunction, and their cellular immunity level is reduced, increased level of immune surveillance in severe patients.

**Keywords:** 2019-nCoV; COVID-19; lymphocyte

新型冠状病毒(novel coronavirus pneumonia, NCP)即“2019-nCoV”,因2019年武汉病毒性肺炎病例而被发现,于2020年1月12日被世界卫生组织命名。人群普遍易感,主要的传播途径是呼吸道

飞沫传播和近距离接触传播。最新研究提示,有人从大便中分离出冠状病毒,因而可能还存在消化道等传播途径,粪便标本存在潜在的传染性,可能成为新的传播途径<sup>[1]</sup>。新型冠状病毒引起的肺炎叫新

作者简介:孟凡萍(1980-),女,医学博士,副主任检验师,研究方向:脂代谢和胰岛素抵抗, E-mail:63405353@qq.com。

通讯作者:郝坡(1979-),男,医学硕士,副教授,研究方向:分子生物学检验, E-mail:hpo1979@126.com。

型冠状病毒肺炎,潜伏期3~7天,多低于14天,也有34天的个例。以发热、乏力、干咳为主要表现,少数患者伴有流涕、腹泻等症状,重症患者多在一周出现呼吸困难,胸片呈双肺浸润性病灶,严重者快速进展为急性呼吸窘迫综合症。

因本课题组目前的工作主要负责万州片区新冠病毒的筛查,在日常检测中发现新冠病毒感染者可见淋巴细胞降低的现象。为进一步探讨淋巴细胞降低与新冠病毒感染的内在联系,课题组决定开展本研究。本研究对轻型和重型病患的淋巴细胞亚群进行分析研究,旨在为新型冠状病毒肺炎患者与其免疫系统之间的相互联系提供一些理论依据,并为其治疗提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 选取2020年2月于本院就诊的新型冠状病毒肺炎患者(轻型组)35例、重型冠状病毒肺炎患者(重型组)11例,以健康体检者(NC组)20例为对照,年龄8个月~71岁,平均年龄52.3岁。所有病例均经过流行病学、临床表现及核酸检测确诊,排除其他呼吸道疾病及免疫性疾病,以及对本研究所涉及疾病有影响的其他疾病,患者亦未接受过免疫治疗。

**1.2 仪器与试剂** Cobas Z480 荧光定量PCR仪购自德国Cobas公司,淋巴细胞亚群分析试剂盒、BD FAS CALIBUR 流式细胞分析仪以及FCAP CELLQUEST 分析软件为美国BD公司产品,病毒核酸提取试剂盒(磁珠法)及GeneRotex96核酸提取仪为西安天隆科技有限公司产品,新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒(荧光PCR法)为湖南圣湘生物科技有限公司产品。

## 1.3 方法

**1.3.1 2019-nCoV 核酸的提取:**将病人样本(咽拭子、鼻拭子、肛拭子等)置于56℃孵箱中30min灭活后,取200μl拭子洗液加入到试剂板中,放入核酸提取仪中,经裂解、洗涤、洗脱,进行自动化提取2019-nCoV RNA。

**1.3.2 荧光定量PCR:**将提取的病毒RNA加入到PCR反应液中,在荧光定量PCR仪上检测。选择FAM通道检测2019-nCoV ORF-lab区域,ROX通道检测2019-nCoV N基因,HEX通道检测内标。PCR反应程序:50℃30min;95℃1min;95℃15s,60℃30s,45 cycles;25℃10s。 $Ct \leq 40$ 判断为阳性。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)测定:PCR操作、反应过程及结果判定按照标准操作程序进行,并设立阳性质控品和阴性对照,共同进行检测和分析。

**1.3.3 流式细胞检测淋巴细胞亚群变化:**用CD3<sup>+</sup>

(PE标记)和CD4<sup>+</sup>(PerCP标记)、CD8<sup>+</sup>(FITC标记)分别设门,分别圈出辅助性T细胞和细胞毒性T细胞,用CD22<sup>+</sup>(FITC标记)和CD3<sup>+</sup>(PE标记)设门,圈出B细胞,用CD3<sup>+</sup>(PE标记)和CD56<sup>+</sup>(PerCP标记)设门,圈出NK细胞,用CD3<sup>+</sup>(PE标记)设门,圈出淋巴细胞。通过对数据进行采集和分析,计算淋巴细胞总数、T淋巴细胞数及比例、B淋巴细胞数及比例、NK细胞数及比例、CD4<sup>+</sup>T细胞数及比例、CD8<sup>+</sup>T细胞数及比例,以及CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值。

**1.4 统计学分析** 采用SPSS19.0统计软件,计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,三组间的均数比较采用单因素方差分析,两组间的均数比较采用t检验。

## 2 结果

**2.1 核酸检测** 35例轻症患者和11例重症患者和20例健康体检者的核酸分别进行ORF-lab基因和N基因的阳性检测。经检测,35例轻症患者和11例重症患者的两个基因均为阳性,而20例健康体检者两个基因均为阴性。

**2.2 淋巴细胞亚群分析** 见表1。两组患者的淋巴细胞总数、T淋巴细胞数(比例)、CD4<sup>+</sup>T细胞数(比例)、CD8<sup>+</sup>T细胞数(比例)、B淋巴细胞数(比例)、NK细胞数(比例)的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ ),且重症组比轻症组降低的更为显著,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );两组患者的CD8<sup>+</sup>T细胞数和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>较对照组升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但轻症组与重症组差异不明显,无统计学意义( $P > 0.05$ );两组患者B淋巴细胞比例较对照组显著升高( $P < 0.05$ ),且重症组明显高于轻症组( $P < 0.05$ ),差异均有统计学意义;NK细胞比例在重症组可见明显升高( $P < 0.05$ ),而在轻症组和对对照组则差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

2019新型冠状病毒(2019-nCoV)是2019新型冠状病毒性肺炎的病原体,感染病毒的人会出现程度不同的症状,轻症有发烧或咳嗽症状,重度会发展为肺炎,更严重可导致死亡<sup>[2-3]</sup>。2020年1月30日,世界卫生组织发布新型冠状病毒感染肺炎疫情为国际关注的突发公共卫生事件,3月11日,世界卫生组织总干事谭德赛宣布,新型冠状病毒已构成全球大流行。新型冠状病毒主要的传播途径是呼吸道飞沫传播和接触传播。各个年龄段的人都可能被感染,其中老年人和体弱多病的人更容易被感染。

2020年1月24日,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所成功分离了我国第一株病毒,同时

发布了毒种信息、病毒在电镜下的形态、核酸检测引物和探针序列重要权威信息<sup>[4-7]</sup>,对病毒有了一定的认识。研究发现,新冠病毒的刺突蛋白结构与

中东呼吸综合征(MERS病毒)和“非典”(SARS病毒)的刺突蛋白结构非常相近,并已确认SARS病毒的中和抗体可与新冠病毒蛋白相结合<sup>[8]</sup>。

表1 三组淋巴细胞亚群检测结果分析( $\bar{x} \pm s$ )

项 目	轻症组	重症组	对照组	轻症组 vs 对照组		重症组 vs 轻症组	
				<i>t</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
总淋巴细胞数 (cell/L)	1 049 ± 493	609 ± 279	2 115 ± 311	0.121	0.010	-0.307	0.031
T 淋巴细胞数 (cell/L)	739 ± 388	399.45 ± 236.06	1 447 ± 209	0.511	0.012	0.536	0.041
T 淋巴细胞比例 (%)	68.97 ± 12.68	59.62 ± 16.9	79.4 ± 17.4	0.029	0.009	1.208	0.021
CD4 <sup>+</sup> T (cell/L)	388.75 ± 208.16	208.82 ± 111.37	782 ± 249	-1.201	0.020	1.036	0.020
CD4 <sup>+</sup> T/总淋巴细胞 (%)	37.77 ± 9.52	32.73 ± 9.33	40.0 ± 12.44	-0.774	0.006	-0.852	0.030
CD8 <sup>+</sup> T (cell/L)	263.75 ± 131.66	194.19 ± 154.26	631 ± 41	0.045	0.001	-0.043	0.062
CD8 <sup>+</sup> T/总淋巴细胞 (%)	27.98 ± 8.94	27.12 ± 13.12	24.2 ± 12.49	0.632	0.005	0.129	0.070
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1.47 ± 0.6	1.5 ± 0.84	1.24 ± 0.19	-0.142	0.005	0.256	0.112
B 淋巴细胞数 (cell/L)	172 ± 106	110.36 ± 51.75	322 ± 65	0.065	0.020	-0.744	0.011
B 淋巴细胞比例 (%)	18.98 ± 8.23	21.82 ± 11.6	12.9 ± 5.3	-0.352	0.013	-0.114	0.016
NK 细胞数 (cell/L)	135.75 ± 92.1	89.72 ± 79.68	315 ± 41	0.201	0.021	0.059	0.098
NK 细胞比例 (%)	12.19 ± 10.0	16.68 ± 10.58	12.7 ± 14.9	0.105	0.151	0.066	0.011

华中科技大学团队率先完成了9例新冠肺炎死者遗体的病理解剖工作。他们发现,新冠病毒不仅损害感染者的肺脏,而且还损害感染者的免疫系统及其他组织器官。有学者对新冠病毒患者不同病情状态下淋巴细胞、白细胞介素-6及炎症指标的变化及淋巴细胞亚群与CT肺炎影像指数的相关性进行研究,发现不同程度的重症患者的IL-6与CRP水平均显著高于轻症患者( $P < 0.01$ ),呼吸困难越严重的患者,其淋巴细胞计数、T淋巴细胞数、B淋巴细胞数、CD4<sup>+</sup>T和CD8<sup>+</sup>T水平越低,且不同程度重症患者与轻症患者均有显著差异( $P < 0.05$ );症状越严重的患者其淋巴细胞比率越低,故IL-6,淋巴细胞亚群、CRP等指标能预测新型冠状病毒肺炎患者的病情变化,新冠肺炎患者T淋巴细胞数值越低,CT显示肺部炎症越严重,病情越严重<sup>[9-11]</sup>。有研究在对重型和危重型新型冠状病毒肺炎患者外周血淋巴细胞计数和淋巴细胞亚群进行分析,发现重型组、危重组的淋巴细胞计数、T淋巴细胞计数、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞计数、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞计数和B淋巴细胞计数均低于普通组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),而危重组的淋巴细胞计数、T淋巴细胞计数、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞计数和NK细胞计数低于重型组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),反映了COVID-19患者机体免疫系统受损及其严重程度<sup>[12-13]</sup>。许娇等<sup>[14]</sup>在对不同临床分型的COVID-19患者的外周血淋巴细胞分析发现,COVID-19患者外周血淋巴细胞数量降低,且重症患者的淋巴细胞水平显著低于轻症患者。

王琳琳等<sup>[15]</sup>发现新冠组患者外周血中WBC计数,Neu计数及NLR值均低于甲流组,差异具有统计学意义。淋巴细胞计数低于健康组,差异具有统计学意义。外周血细胞检测中WBC计数、Neu计数、Lym计数及NLR值指标可用于辅助鉴别COVID-19患者、甲流患者、健康人群,对COVID-19诊断有一定临床意义。

本课题的主要研究目的就是了解新型冠状病毒对患者外周血淋巴细胞亚群的影响。研究发现,轻症和重症患者的淋巴细胞总数、T淋巴细胞数(比例)、CD4<sup>+</sup>T细胞数(比例)、CD8<sup>+</sup>T细胞数(比例)、B淋巴细胞数(比例)、NK细胞数(比例)的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),且重症组比轻症组降低的更为显著,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。两组患者的CD8<sup>+</sup>T细胞数和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>较对照组有所升高( $P < 0.05$ ),但轻症组与重症组组间差异不明显,无统计学意义( $P > 0.05$ )。两组患者B淋巴细胞比例较对照组显著升高( $P < 0.05$ ),且重症组明显高于轻症组( $P < 0.05$ ),差异均有统计学意义。NK细胞比例在重症组可见明显升高( $P < 0.05$ ),而在轻症组和对照组则差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

综合近期发表的新冠病毒对感染者淋巴细胞和免疫功能相关文献及本课题的研究结果,充分说明新型冠状病毒对患者的免疫系统影响比较复杂,不仅存在免疫功能紊乱,还存在一定的免疫缺陷,甚至是免疫监视水平的变化,尤其是对机体细胞免疫水平影响较大,主要表现为淋巴细胞总数、淋巴细



胞亚群数量和比例下降,导致机体免疫功能降低,尤其是细胞免疫功能降低,可以肯定新型冠状病毒肺炎改变了患者的免疫功能和免疫状态,研究其免疫功能的变化对于新冠肺炎的治疗具有重要价值。

# 参考文献:

- [1] 李波,张浩,李伯安,等.新型冠状病毒肺炎病例粪便及咽拭子核酸平行检测结果比对分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2020,34:E008-E008.DOI:10.3760/cma.j.cn112866-20200303-00041.  
LI Bo, ZHANG Hao, LI Bo'an, et al. The comparison of nucleic acid detections between throat swab and stool specimens in SARS-CoV-2 infection patients[J]. Chinese J Exp Clin Virol, 2020, 34: E008-E008. DOI: 10.3760/cma.j.cn112866-20200303-00041.
- [2] LI Qun, GUAN Xuhua, WU Peng, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia [J]. N Engl J Med, 2020, 382(13): 1199-1207.
- [3] HUANG Chaolin, WANG Yeming, LI Xingwang, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. Lancet, 2020, 395(1223): 497-506.
- [4] LESCURE F X, BOUADMA L, NGUYEN D, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2020, 20(6): 697-706.
- [5] ZHOU Fei, YU Ting, DU Ronghui, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study[J]. Lancet, 2020, 395(1229): 1054-1062.
- [6] KOO J R, COOK A R, PARK M, et al. Interventions to mitigate early spread of SARS-CoV-2 in Singapore: a modelling study[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2020, 20(6): 678-688.
- [7] The Lancet. Emerging understandings of 2019-nCoV[J]. Lancet, 2020, 395(10221): 311.
- [8] LIU Jia, ZHENG Xin, TONG Qiaoxia, et al. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV [J]. Journal of Medical Virology, 2020, 92(5): 491-494.
- [9] 靳云洲,李明芳,郑胜,等.新型冠状病毒肺炎患者不同病情状态下淋巴细胞、白细胞介素-6及炎症指标的变化[J].实用临床医药杂志,2020,24(6):1-4.  
JIN Yunzhou, LI Mingfang, ZHENG Sheng, et al. Changes of lymphocyte, interleukin-6 and inflammatory indexes in patients with coronavirus disease 2019

- under different conditions of disease [J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2020, 24 (6): 1-4.
- [10] 于恪,黄河,邓海燕,等.淋巴细胞计数对新型冠状病毒肺炎的诊断价值[J].广东医学,2020,41(8):776-780.  
YU Ge, HUANG He, DENG Haiyan, et al. The diagnostic value of lymphocyte count in COVID-19 [J]. Guangdong Medical Journal, 2020, 41 (8): 776-780.
- [11] 李妹玲,刘丹,杨全,等.新型冠状病毒病患者淋巴细胞亚群与CT肺炎指数相关性分析[J].第三军医大学学报,2020,42(9):872-878.  
LI Meiling, LIU Dan, YANG Quan, et al. Correlation between lymphocyte subsets and CT pneumonia index in patients with coronavirus disease 2019 [J]. Journal of Third Military Medical University, 2020, 42(9): 872-878.
- [12] 刘艳霞,区静怡,黄颖,等.新型冠状病毒肺炎患者外周血淋巴细胞及其亚群检测的临床意义[J].现代检验医学杂志,2020,35(4):94-96,105.  
LIU Yanxia, QU Jingyi, HUANG Ying, et al. Clinical significance of detection of peripheral blood lymphocyte and its subgroups in patients with coronavirus disease 2019 [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35 (4): 94-96, 105.
- [13] 陈婉玲,王伟峰,李文涛,等.COVID-19患者外周血T淋巴细胞计数动态变化研究[J].中华微生物学和免疫学杂志,2020,40(7):495-498.  
CHEN Wanling, WANG Weifeng, LI Wentao, et al. Dynamic changes of peripheral blood T lymphocytes in COVID-19 patients [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2020, 40(7): 495-498.
- [14] 许娇,尚鹏程,毕雷,等.不同临床分型的COVID-19患者外周血免疫细胞水平分析[J].国际检验医学杂志,2020,41(20):2469-2472.  
XU Jiao, SHANG Pengcheng, BI Lei, et al. Analysis of peripheral blood immune cells in COVID-19 patients with different clinical types[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2020, 41 (20): 2469-2472.
- [15] 王琳琳,张晓凝,王刚,等.外周血白细胞参数对于新型冠状病毒肺炎诊断的临床意义[J].现代检验医学杂志,2020,35(5):110-112,146.  
WANG Linlin, ZHANG Xiaoning, WANG Gang, et al. Clinical significance of peripheral blood leukocyte parameters in the diagnosis of COVID-19 [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35 (5): 110-112, 146.

收稿日期:2020-05-20

修回日期:2020-11-30

(上接第84页)

- [26] DHABHAR F S. Stress-induced augmentation of immune function-the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines[J]. Brain Behavior and Immunity, 2002, 16(6): 785-798.
- [27] 史福平,杨观涛,冯慧玲,等.血清细胞因子与脑卒中后抑郁的相关性研究[J].现代预防医学,2013,

40(4): 796-798.

SHI Fuping, YANG Guantao, FENG Huiling, et al. Serum cell factor and the correlation of depression after stroke[J]. Modern Preventive Medicine, 2013, 40(4): 796-798.

收稿日期:2020-10-16

修回日期:2020-11-10