

Clinical Significance of CD4 Cell Enumeration in AIDS Diagnosis and Therapy

Zhanglong Huang, Ting Lei, Yu Chang

College of Life Science and Bio-Engineering, Beijing University of Technology, Beijing
Email: changyu@bjut.edu.cn

Received: Nov. 25th, 2016; accepted: Dec. 23rd, 2016; published: Dec. 26th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) is caused by the invasion of HIV viruses and resultant damages to the immune-system. AIDS is a disease characterized by high infectivity, severe harm. So far, there is no cure for AIDS. Thus, it brings great burden to patients' families and the society. Early detection and treatment of AIDS can significantly improve the quality of patients' life and reduce the risk of disease expansion. The disease course of AIDS is closely linked with the number of CD4 positive T cells in the peripheral blood. Thus, monitoring the number of CD4 cells is of great significance for the guidance of drug use and the evaluation of drug efficacy.

Keywords

AIDS, HIV, CD4 Cell, Flow Cytometry

CD4细胞检测在艾滋病诊疗中的意义

黄章泷, 雷霆, 常宇

北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京
Email: changyu@bjut.edu.cn

收稿日期: 2016年11月25日; 录用日期: 2016年12月23日; 发布日期: 2016年12月26日

摘要

艾滋病是由HIV病毒感染机体CD4细胞后, 损伤患者的免疫系统所引发的一种疾病。艾滋病具有传染性

强、危害大、不可治愈的特点，给患者的家庭和社会都造成极大的负担。及早的发现病情，并积极接受治疗可显著提升病人生活质量，降低传染风险。艾滋病的病程与患者的CD4阳性T细胞数量紧密相连，所以监测CD4细胞对于用药指导和药效评价都具有重大意义。

关键词

艾滋病, HIV, CD4细胞, 流式细胞术

1. 引言

艾滋病(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS, 获得性免疫缺陷综合征)是由 HIV (human immunodeficiency virus)感染所引起的一种免疫缺陷病。艾滋病于 1981 年被首次发现, 我国在 1985 年报道首例病例。艾滋病在我国的传播可分为三个阶段: 1985~1988 年为第一阶段, 为传入期或散发期, 感染者主要为外来者, 病例零星发现; 1989~1994 年是第二个阶段, 为扩散期, 此阶段感染率较低, 6 年内报道了 1221 例, 疫情主要在局部地区流行; 第三个阶段是 1995 年至今, 艾滋病的发展进入了增长期或广泛流行期[1]。《2016 年中国艾滋病防治进展报告》显示, 2015 年我国存活的艾滋病患者达到 57.74 万, 其中新增患者为 10.78 万。

因为 HIV 病毒对于人体的免疫系统造成严重的破坏, 不仅影响患者的劳动能力, 而且大大降低了患者的寿命; 此外, 目前艾滋病者并没有治愈手段, 需要长期服用药物抑制病毒扩增, 给患者家庭和社会都带来沉重的经济负担。因此, 艾滋病不仅是医学问题, 也是严重的社会问题, 给社会、经济、家庭和个人带来灾难性的结果[2]。

2. HIV 感染

HIV 病毒颗粒表面具有类似于细胞膜的膜结构。起吸附作用的糖蛋白穿透膜结构、通过与宿主细胞表面受体的结合而发挥作用。HIV 病毒颗粒的核心由衣壳蛋白包裹, 内部包含着 HIV 的遗传物质(两条 RNA)和活性蛋白。

病毒的 mRNA 有三个开放读码框, 分别为 gag、pol 和 env 多聚蛋白。gag 蛋白翻译成熟为 p24、p9 和 p17 蛋白, 它们组成 HIV 病毒颗粒的核衣壳。pol 多聚蛋白成熟后分裂为蛋白酶、逆转录酶和整合酶。env 多聚蛋白成熟为 gp41 和 gp120 蛋白, 它们组成了 HIV 病毒的针形吸附糖蛋白结构。

与众多其他病毒类似, HIV 病毒的扩增在宿主细胞中进行。在相当长的一段时间内, CD4 被认为是 HIV 病毒唯一的受体。近期研究发现, 趋化因子受体(CCR)发生缺失突变的 HIV 病毒感染者, 其艾滋病病程发展较为迟缓; 约有 1% 的高加索人因为携带 $\delta 32$ 位置的突变而大大降低他们对于 HIV 的易感性, 并且延缓了感染者发病进程。这些结果逐渐揭示了 CD4 受体附近的趋化因子受体也是 HIV 病毒入侵宿主细胞所必须的。

在人体中主要有 CCR5 (一种 β 趋化因子受体)和 CCR4 (一种 α 趋化因子受体)两种趋化因子受体涉及 HIV 的感染。在感染初期, 病毒颗粒主要趋向于和 CCR5 结合, 此类病毒体外扩增较慢, 并不诱导合胞体的产生。在感染后期, 病毒转变为合胞体诱导型, 其主要识别的趋化因子受体为 CCR4, 这类病毒扩增病毒在体外的扩增速度较快。在 HIV 感染者体内, 病毒数量巨大, 通常既含有识别 CCR4 病毒也包含识别 CCR5 的病毒[3]。

当病毒颗粒通过 CD4 和趋化因子受体吸附在宿主细胞后, 病毒的核衣壳及其内含物被注入宿主细胞内。在宿主细胞的胞浆中, 病毒的逆转录酶以单链 RNA 为模板, 合成双链 DNA; 双链 DNA 随后形成环

形结构，并进入宿主细胞的细胞核中；在整合酶的作用下，病毒 DNA 整合进入宿主的基因组。

当 HIV 病毒的遗传信息整合进宿主的 DNA 中后，它将利用宿主细胞的转录和翻译机器，消耗宿主细胞氨基酸和能量，大量合成病毒扩增需要的糖蛋白和多聚蛋白。这些产物随后在病毒蛋白酶的作用下成熟为病毒外膜、核衣壳和活性蛋白的组成单元。结构单元组合产生大量的新 HIV 病毒颗粒。新病毒颗粒从宿主细胞中释放后将继续感染下一个宿主细胞。

HIV 病毒是一种非常原始的病毒，其遗传物质在复制的过程中并不进行校正过程，这导致扩增产生的 RNA 与母体 RNA 相比，出现非常多的突变，而且突变的方向具有非常大的不确定性。高突变率在产生一些无活性病毒颗粒的同时，也为病毒颗粒适应环境中的各种应力(药物等)提供了可能性。同时，HIV 的高扩增能力在一定程度上弥补了其遗传物质扩增时保真度低的缺点。据估计，一个艾滋病患者体内每天新生成约 10^9 个病毒颗粒[4]。

3. 艾滋病病程

机体感染 HIV 病毒以后，体内病毒扩增和免疫状态处于不断的变化，并导致患者表现不同的临床症状。根据这些参数，艾滋病的病程可分为四个阶段，分别为急性感染期、潜伏期、潜伏末期和艾滋病期。

AIDS 病毒进入体内后，快速的扩增对宿主细胞 CD4 T 细胞造成严重的破坏，部分病人 CD4 细胞降低至 $100/\text{mm}^3$ [5]。辅助淋巴细胞数量的急剧降低导致病人的免疫能力严重受损，并伴随着一系列症状。常见的症状有低烧、扁桃体炎、喉咙疼、皮疹、肌肉酸痛、头疼、持续腹泻、呕吐等。急性感染期持续时间一般为 5~30 天，最长可维持 6 个月之久。在急性感染期，高浓度的 HIV 病毒载量使得病人具有非常高的传染性，约有 30% 的传染发生在急性感染期。因此尽早的发现和诊断对于艾滋病的防治具有至关重要的作用[6]。

急性感染期后，病人的免疫系统开始发挥效应，产生针对 AIDS 的抗体，并对 HIV 病毒的扩增达到制约效果，将病毒的载量降至 2000~6000 拷贝/mL，这个时期称为潜伏期。潜伏期内 HIV 病毒载量越高，越容易导致患者的免疫机能衰退。统计数据显示，潜伏期内病毒载量超过 100,000 拷贝/mL 时，患者在 5 年内发展为艾滋病期的概率将比病毒载量低的患者高 10 倍[7]。在潜伏期内，HIV 病毒的扩增和患者免疫系统形成平衡状态，CD4 细胞数目维持在正常生理范围之内，因此患者在此阶段无任何临床症状。一般而言，潜伏期可长达 8~10 年，大部分病人在这个阶段被确诊[8]。

潜伏期末期，HIV 病毒与免疫系统的平衡逐渐被打破，HIV 病毒载量逐渐上升并超过 12,000 拷贝/mL。与之对应，CD4 淋巴细胞逐渐被破坏，其数目下降至正常生理水平下限 $500/\text{mm}^3$ 以下，这个阶段又称为艾滋病前期。在这个阶段，病人逐渐表现出艾滋病特异性的症状，包括：血细胞减少症、贫血症、嗜中性白细胞减少症、血小板减少症、牛皮癣、脂溢性皮炎、无菌性脑膜炎、顽固性头疼等。此外，很多患者在此阶段也表现出急性感染期中出现的诸多症状[9]。

HIV 病毒的扩增持续对免疫系统造成破坏，当 CD4 细胞降至 $200/\text{mm}^3$ 时，免疫功能受到极大的抑制，患者容易被各种机会性感染影响并出现以下并发症：痴呆，食管、气管、支气管、肺部真菌感染，腺病毒感染，单纯疱疹病毒感染，真菌感染，宫颈癌，卡波氏肉瘤，肺炎等。这个阶段，病人进入艾滋病期，各种并发症逐渐威胁到患者的生命[9]。

CD4+细胞的检测

如前所述，CD4 淋巴细胞是 HIV 病毒的主要宿主细胞，也是 HIV 病毒抑制免疫系统活性的靶点。因此，CD4 细胞数目与艾滋病病程密切相关，所以监测 CD4 细胞具有非常重要的临床意义。CD4 细胞的检测可用于：筛查 HIV 感染者，特别是急性感染期的患者；根据 CD4 的绝对计数或者百分比计数对感染者

进行分期；辅助判断 ART 用药时机；评价抗病毒药物的有效性。

目前市场上 CD4 细胞计数的产品种类繁多，其中大部分产品是基于流式细胞术开发的。流式细胞术也是 CD4 阳性 T 细胞计数的金标准方法[10]。

流式细胞术是一种结合了细胞生物学、流体力学、光学、电学等多种学科的临床检测技术。其原理是采用荧光分子偶联的单克隆抗体标记细胞表面或者细胞内部的目标分子，当单个悬浮细胞流过流动室时被激光激发并发射出相应的荧光信号，流式细胞仪的光学系统和电子系统对荧光信号进行收集、转化、分子、整合，最终完成对样本信号的采集和分析。流式细胞术的优点在于可以快速的单个细胞进行信号分子检测、以获取细胞整体的信息。在 CD4 阳性 T 细胞计数中，通常将荧光分子标记 CD4 抗体与其他表面抗原(CD45、CD3 等)抗体联用，对 CD4 细胞进行染色识别，然后完成细胞的计数。

流式细胞术对 CD4 细胞计数，有双平台和单平台两种模式。双平台法涉及血细胞分析仪和流式细胞仪两个平台的综合应用：利用血细胞分析仪得到淋巴细胞或者白细胞的数量，通过流式细胞仪得到 CD4 细胞在淋巴细胞或者白细胞中的占比，再将两个结果相乘得到 CD4 细胞的浓度[11]。此方法因为涉及两个计数平台，增加了误差源，准确性质控难度较高；同时，血细胞计数仪和流式细胞仪的操作难度大，仪器成本高，不适用于经济落后的区域。目前临床较少采用此方法。

相对于双平台法，单平台法有诸多方面的优势：仅涉及单种仪器，减少了计数操作的复杂程度；减少引入误差机会、提高结果的准确性和可重复性；同时，此方法还大大降低报告结果的时间，提高临床检验的时效性。单平台方法中，一种方式是通过向临床样本中加入已知浓度的荧光微球以实现 CD4 细胞计数，BD 的 TruCount 和 Beckman coulter 的 PLG-CD4 试剂均采用这一原理[12]。此方法因进入市场较早，在临床检验和疾病研究中被广泛采用。但其缺点在微球的加入增加了耗材的成本，而且检测者在添加微球过程中极易引入误差，降低检测的准确性和可重复性；另一种方式则在计数过程中同时准确测量血液样本体积，将 CD4 计数结果除以样本体积以获得 CD4 细胞浓度，规避了对微球的需求，迈瑞的 Bright E6 系统则利用了这一原理。

4. 展望

艾滋病对于患者的免疫系统造成严重损伤，艾滋病并发症极大的影响患者的生活质量，并造成非常高的死亡率。因此艾滋病的诊断和治疗逐渐引起越来越多的关注。

CD4 淋巴细胞是 HIV 病毒的主要靶细胞。CD4 细胞的绝对数量与患者体内的 HIV 病毒载量密切相关，所以对 CD4 细胞进行绝对计数具有重要的临床意义。根据患者 CD4 细胞浓度，可以筛查患者、对患者进行分析、辅助判断用药试剂、评估药效等。

目前，CD4 细胞计数有双平台法和单平台法。双平台法因涉及血细胞分析仪和流式细胞仪，操作难度高，目前临床应用较少。单平台法中，BD 的 Trucount 和 Beckman Coulter 的 PLG-CD4 采用荧光磁珠辅助细胞计数。但各自都有一定的缺点，Trucount 的成本非常高，不适用于贫困地区的推广和使用；PLG-CD4 中采用检验者添加荧光微球，导致增加了误差引入过程，影响结果准确性。迈瑞新开发的流式细胞仪采用测量样本体积的方式计算 CD4 细胞浓度，操作相对简单易行，具有非常大的优势。此方法的推广可有力的推动临床 CD4 细胞计数工作的开展。

参考文献 (References)

- [1] 查淑玲. 2012-2015 年中国艾滋病流行现状分析[J]. 渭南师范学院学报, 2016, 31(8): 25-30.
- [2] 曾毅. 艾滋病的流行趋势、研究进展及遏制策略[J]. 中国公共卫生, 2001, 17(12): 1061-1062.
- [3] Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., *et al.* (1996) HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Sev-

- en-Transmembrane G Protein-Coupled Receptor. *Science*, **272**, 872-877. <https://doi.org/10.1126/science.272.5263.872>
- [4] Manavi, K. (2006) A Review on Infection with Human Immunodeficiency Virus. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, **20**, 923-940. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2006.06.002>
- [5] Hidalgo, J.A., Macarthur, R.D. and Crane, L.R. (2000) An Overview of HIV Infection and AIDS: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, Epidemiology, and Occupational Exposure. *Seminars in Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **12**, 130-139. <https://doi.org/10.1053/ct.2000.7128>
- [6] Cooper, D.A., Gold, J., Maclean, P., *et al.* (1985) Acute AIDS Retrovirus Infection. Definition of a Clinical Illness Associated with Seroconversion. *The Lancet*, **325**, 537-540. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(85\)91205-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(85)91205-x)
- [7] Mellors, J.W., Kingsley, L.A., Rinaldo, C.R., *et al.* (1995) Quantitation of HIV-1 RNA in Plasma Predicts Outcome after Seroconversion. *Annals of Internal Medicine*, **122**, 573-579. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-122-8-199504150-00003>
- [8] Berger, E.A., Murphy, P.M. and Farber, J.M. (1999) Chemokine Receptors as HIV-I Correceptors, Roles in Viral Entry, Tropism and Disease. *Annual Review of Immunology*, **17**, 657-700. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.657>
- [9] Manavi, K. (2007) A Review on Infection with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **20**, 923-940. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2006.06.002>
- [10] Centers for Disease Control (1997) Revised Guidelines for Performing CD4+ T-Cell Determinations in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). *MMWR Recommendations and Reports*, **46**, 1-29.
- [11] 洪坤学, 陈刚, 等. 两种平台法测定 HIV 感染者 CD4 计数的比较[J]. 现代预防医学, 2007, 34(5): 801-803.
- [12] 徐建青, 彭虹, 等. 单平台 TruCount 和 PLG-CD4 测定 CD4 T 细胞绝对计数的比较[J]. 中国艾滋病性病, 2006, 10(12): 393-395.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org