# 多色流式细胞术检测 HIV/AIDS 患者 CD4$^+$ T 细胞亚群变化

王芯栎，汪　笛，魏雨晴，张瑺丹，李　蓓，杜　娟，赵红心，孔雅娴

[ 摘要 ]　**目的**　以多色流式细胞术为基础，检测 HIV/AIDS 患者外周血单个核细胞中辅助性 T 细胞（helper T cell, Th）亚群的比例。**方法**　用 11 种细胞表面抗体 CD3、CD4、CD8、7-AAD、CD45RA、CCR7、CXCR5、CCR4、CCR6、CCR10、CXCR3 建立多色流式方案，识别 7 种主要的 Th，并对 15 例 HIV/AIDS 患者和 15 例健康对照外周血中 Th 的比例进行分析。**结果**　根据多种趋化因子受体组合搭配，明确 Th1、Th2、Th9、Th17、Th22、滤泡辅助性 T 细胞、ThG 分析策略。通过检测分析发现，与健康对照相比，HIV/AIDS 患者中 Th2 亚群比例增高，Th22 亚群比例降低。**结论**　建立的多色流式表面标志物检测方案可以方便快捷地检测外周血中 Th 的比例，所需样本量少，操作步骤简单且结果稳定，并能精准定量。

[ 关键词 ]　多色流式细胞术；人类免疫缺陷病毒；获得性免疫缺陷综合征；辅助性 T 细胞亚群；表面标志物

[ 中国图书资料分类号 ]　R392.12；R392.114　　[ 文献标志码 ]　A　　[ 文章编号 ]　1007-8134(2021)05-0434-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2021.05.011

## Change of CD4$^+$ T cell subsets of HIV/AIDS patients by multi-color flow cytometry

WANG Xin-yue, WANG Di, WEI Yu-qing, ZHANG Lei-dan, LI Bei, DU Juan, ZHAO Hong-xin*, KONG Ya-xian*

Institute of Infectious Diseases, Peking University Ditan Teaching Hospital, 100015, China

*Corresponding author. KONG Ya-xian, E-mail: kongyaxian@ccmu.edu.cn; ZHAO Hong-xin, E-mail: Drzhao66@ccmu.edu.cn

**[Abstract]**　**Objective**　To detect the proportion of CD4$^+$ helper T cell (Th) subsets in peripheral blood monocyte cells of HIV/AIDS patients by multi-color flow cytometry. **Methods**　The multi-color flow cytometry strategy was established by using 11 cell surface antibodies including CD3, CD4, CD8, 7-AAD, CD45RA, CCR7, CXCR5, CCR4, CCR6, CCR10 and CXCR3. Seven major Th cells were recognized, and the proportion of Th in peripheral blood from 15 HIV/AIDS patients and 15 healthy controls was analyzed. **Results**　Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T follicular helper cell and ThG analytical strategies were identified through the combination of different chemokine receptors. The detection results showed an elevated proportion of Th2 subset and decreased proportion of Th22 subset in HIV/AIDS patients, compared to healthy controls. **Conclusions**　The established multi-color flow cytometric protocol by using surface markers can evaluate the proportions of multiple Th in peripheral blood conveniently and rapidly, which has small sample size, simple steps, stable results and precise quantitation.

**[Key words]**　multi-color flow cytometry; HIV; AIDS; helper T cell subsets; surface marker

AIDS 是由 HIV 感染引起的一种病死率极高的恶性传染病。CD4$^+$ T 细胞是 HIV 攻击的主要靶细胞 [1-2]，其数量减少和功能下降是导致 HIV/AIDS 患者免疫应答水平低下、各种机会性感染高发的主要原因。初始的 CD4$^+$ T 细胞活化后分化成不同的辅助性 T 细胞（helper T cells, Th）亚群，包括 Th1、Th2、Th9、Th17、滤泡辅助性 T 细胞（T follicular helper cell, Tfh）等。Th 的分化过程受 T 细胞受体信号、特异的细胞因子和转录因子的协同调控，并产生谱系特异性的细胞因子 [3]。Th1 分泌 IFN-γ、TNF-α、IL-12，并特异性表达转录因子 T-bet；Th2 分泌 IL-4、IL-5、IL-13，并选择性地依赖于 GATA3 的表达；Th17 在转录因子 RORγt 的调节下特异性地产生 IL-17；Th22 的特征是分泌 IL-22 及表达转录因子 AHR；Th9 是 Th 的一个新亚群，它分泌 IL-9 和 IL-10 并表达转录因子 PU.1[3-5]。Th 不仅通过分泌细胞因子引起慢性炎症来参与 HIV 的感染进程，还是 HIV 复制的场所 [1, 7]。因此，检测 Th 亚群的数量与比例，对于研究 HIV/AIDS 患者的免疫状态与预后判断至关重要。

既往研究通过检测细胞因子来确定 Th 亚群的数量和比例。最初利用酶联免疫斑点法或原位杂交等方法，只能确定单一细胞因子，也不能准确地确定细胞类型 [8-9]。随着多色流式细胞术的发展，后续研究能在单细胞水平检测多种细胞因子指标，弥补了检测单一细胞因子的不足。然而，多色流式检测胞内细胞因子的实验过程和分析方法复杂 [10-11]，并且细胞在体外被长时间刺激后已不能反映体内的真实情况。

不同的 Th 亚群除了产生的细胞因子具有谱系特异性，其迁移能力也具有高度保守的专一性，

[ 基金项目 ]　首都临床特色应用研究（Z171100001017052）；北京市医院管理局临床医学发展专项（ZYLX202126）；北京市医管中心项目（DFL20191802）

[ 作者单位 ]　100015，北京大学地坛医院教学医院传染病研究所（王芯栎、张瑺丹、赵红心、孔雅娴）；100015，首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所（汪笛、魏雨晴、李蓓、杜娟）

[ 通信作者 ]　孔雅娴，E-mail: kongyaxian@ccmu.edu.cn；赵红心，E-mail: Drzhao66@ccmu.edu.cn

因此才能介导不同的免疫反应。趋化因子受体分子表达水平的异质性是协调 Th 迁移、定位到适当位置的分子基础。Th1 表达的趋化因子受体包括 CXCR3 和 CCR5，这些分子有利于 Th1 向感染或炎症部位迁移和与抗原提呈细胞相互作用；Th2 则表达 CCR3、CCR4 和 CCR8 等趋化因子受体；Th17 表面的 CCR6 与细胞迁移至中枢神经系统密切相关[12-14]。细胞表面特异的分子表达不仅起着协调 Th 发挥免疫功能的作用，也是替代细胞因子识别 Th 的关键分子。因此，使用表面趋化因子受体识别 Th 更有利于研究其在体内的真实数量和比例。近年来，有研究使用不同趋化因子受体组合来区分 Th 亚群，比如：Th1（$CXCR3^+$）、Th2（$CCR10^-CCR4^+CCR6^-$）、Th9（$CCR4^-CCR6^+$）等；但仅局限于 1 种或少数几种 Th，并没有同时检测多个亚群[15-21]。综上，本研究建立了十一色流式方案，通过 11 种表面标志物的不同组合对 Th1、Th2、Th9、Th17、Th22、Tfh、ThG 亚群进行检测分析。

## 1 对象与方法

**1.1** 对象 选取 2019 年 9 月 24 日—12 月 18 日在首都医科大学附属北京地坛医院皮肤科门诊就诊的未治疗 HIV/AIDS 患者 15 例和性别、年龄匹配的健康对照 15 例作为研究对象。15 例患者皆为男性，年龄 19 ～ 56 岁，平均（31.4±10.89）岁；$CD4^+$ T 细胞计数处于 43 ～ 742 个 /μl 之间，HIV 载量在 2.2 ～ 5.5 lg copies/ml 之间。纳入标准为：①年龄 18 ～ 65 周岁；② ELISA 检测 HIV-1 抗体阳性并通过 Western Blot 法确认；③在北京地坛医院初始治疗并未服用抗病毒药物者。排除标准：①合并 HBV/HCV 感染者；②合并梅毒螺旋体感染者；④留取血液标本时有现症机会性感染或 AIDS 相关恶性肿瘤者；⑤妊娠期、哺乳期的妇女。本研究经首都医科大学附属北京地坛医院伦理委员会的批准，所有参与者均签署知情同意书。

**1.2** 试剂和仪器 抗体（美国 BD Biosciences 公司，美国 BioLegend 公司）、7-AAD 染料（美国 BD Biosciences 公司）、淋巴细胞分离液（德国 Stemcell Technologies 公司）、流式细胞仪 Fortessa（美国 BD Biosciences 公司）、含 EDTA-K2 的真空采血管（奥地利 Greiner Bio-One 公司）。

**1.3** 方法

**1.3.1** 细胞的分离 通过密度梯度离心法提取外周血单个核细胞。在 15 ml 离心管中加入 4 ml 淋巴细胞分离液，随后将 8 ml 全血轻轻铺在淋巴细胞分离液上；2000 r/min，20 min 离心；吸取血浆层和分层液界面之间的白膜状单个核细胞进行重悬和洗涤；1500 r/min，10 min 离心，弃去上清，加入 10 ml 1640 培养液再次重悬洗涤细胞，1200 r/min，5 min 离心；用 1640 培养液重悬细胞至 $1\times10^7$ 个细胞 /ml，取 $1\times10^6$ 个细胞 / 管至流式管中染色。

**1.3.2** 抗体的选择和表面标志物的染色 根据多色流式细胞术检测配色原则：弱表达的抗原搭配强荧光抗体，高表达的抗原选择较低强度荧光抗体。选择 CD3-BV786、CD4-APC-fire750、CD8-BV510、CD45RA-BV711、CCR7-BV421、CXCR5-FITC、CXCR3-APC、CCR10-PE、CCR6-PE-CF594、CCR4-PE-Cy7，室温避光染色 30 min 后，PBS 洗涤；加入 3 μl 7-AAD 染色 3 min，区分细胞的生存状态。

**1.3.3** 流式细胞术检测人外周血中 Th 的比例 用流式细胞仪（BD LSRFortessa）检测，在淋巴细胞中以 FSC-A 和 FSC-H 设门，去除粘连的细胞。根据前向角（FSC）和侧向角（SSC）圈出淋巴细胞，而后使用 7-AAD 表达圈出活的 $CD3^+$ T 细胞，再进一步圈出 $CD4^+$ T 细胞（图 1A）。确定 CD4 亚群后，根据各亚群趋化因子搭配圈出 Th，采用 Flowjo 软件进行多色分析，并计算各 Th 亚群比例。

**1.4** 统计学处理 采用 GraphPadPrism 8.0 软件进行数据统计分析制图。计量资料采用中位数和四分位数表示，即 $M$（$Q_1$, $Q_3$），通过 Kolmogorov-Smirnov test 检测数据是否满足正态分布，若符合正态分布，组间比较采用非配对 $t$ 检验；若数据为偏态分布，组间比较采用非参数 Mann-Whitney $U$ 检验，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1** 基于表面标志物的人外周血 Th 分析策略 利用建立的多色流式细胞术检测方案检测 HIV/AIDS 患者外周血标本，其设门策略在圈出 $CD4^+$ T 细胞以后主要分成三步。首先，排除 CD45RA 阳性的细胞群（初始 $CD4^+$ T 细胞），在 CD45RA 阴性细胞群（记忆 $CD4^+$ T 细胞）里，根据 CXCR5 和 CCR10 设门圈出 $CXCR5^+CCR10^-$ 的 Tfh，这些细胞特异性表达 CXCR5，使生发中心的滤泡状树突状细胞归巢，辅助浆细胞的成熟。第二步是在 CXCR5 阴性细胞群里根据 CCR4 和 CCR6 设门，将细胞分成 4 群，即 $CCR4^+CCR6^-$、$CCR4^+CCR6^+$、$CCR4^-CCR6^+$ 和 $CCR4^-CCR6^-$（图 1B）。最后，根据 CXCR3 和 CCR10 的表达确定 Tfh 以外的 6 种 Th，分别是 ThG（$CXCR5^-CCR4^+CCR6^-CCR10^+CXCR3^-$）、Th2（$CXCR5^-CCR4^+CCR6^-$

CCR10⁻CXCR3⁻）、Th22（CXCR5⁻CCR4⁺CCR6⁺CCR10⁺CXCR3⁻）、Th17（CXCR5⁻CCR4⁺CCR6⁺CCR10⁻CXCR3⁻）、Th9（CXCR5⁻CCR4⁻CCR6⁺CCR10⁻CXCR3⁻）和 Th1（CXCR5⁻CCR4⁻CCR6⁻CCR10⁻CXCR3⁺）（图 1C），并计算各亚群的比例。

**2.2　HIV/AIDS 患者和健康对照中 Th 的比例情况**　基于上述检测，15 例 HIV/AIDS 患者和 15 例健康对照外周血中 7 种 Th 和初始 CD4⁺ T 细胞的比例情况见表 1。在 HIV/AIDS 患者中比例增加的 Th 包括 Th1、Th2、Tfh、ThG。其中 Th2 在 HIV/AIDS 患者中的比例为 6.0（4.8，10.6）% 显著高于健康对照组 4.3（3.2，6.3）%，（$P$=0.029）；健康对照的 Tfh 比例为 10.1（9.3，11.1）%，而 HIV/AIDS 患者的 Tfh 比例为 11.6（8.8，15.5）%，差异无统计学意义（$P$=0.052）。Th1、ThG 比例在 2 组之间差异均无统计学意义（$P$ 均＞0.05）。Th9、Th17 以及 Th22 的比例在 HIV/AIDS 患者中均低于健康对照，其中 Th22 比例下降最为显著（$P$=0.032）。

## 3　讨　　论

初始 CD4⁺ T 细胞活化后分化为多个 Th 亚群，并且分泌谱系特异性细胞因子。不同 Th 亚群通过这些特异性的细胞因子，参与多种感染的免疫应答，以及过敏、哮喘等多种自身免疫性疾病的发病机制 [18]。Th 作为 HIV 靶细胞 CD4⁺ T 细胞的主要亚群，其数量与功能的改变严重影响 AIDS 的疾病进展。因此，建立与优化 Th 亚群的检测方法对于深入研究 HIV/AIDS 患者的免疫状态与预后判断至关重要。

根据 Th 亚群分泌的特异性细胞因子确定 Th 的

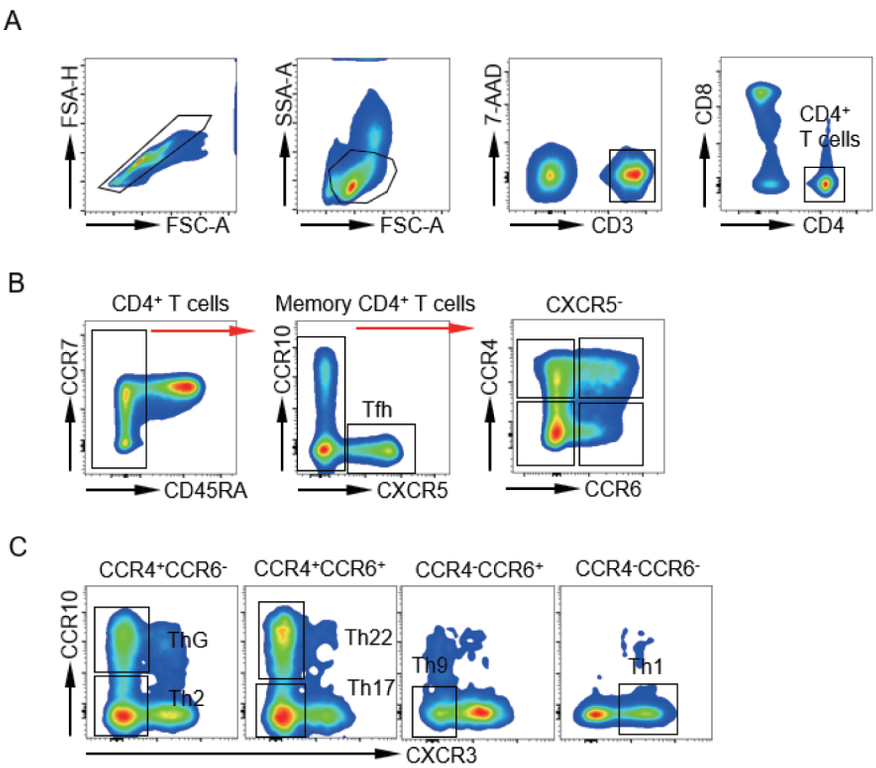


**图 1　HIV/AIDS 患者外周血中 Th 的分析策略**

A. 用 SSC 和 FSC 圈出淋巴细胞后，通过 CD3 和 CD4 圈出 CD4⁺ T 细胞；B. 选择 CD45RA 阴性细胞，根据 CXCR5 圈出阳性的 Tfh，在 CXCR5⁻ 群中根据 CCR6 和 CCR4 将细胞分为 4 个亚群；C. 根据 CXCR3 和 CCR10 圈出其他 6 种 Th

**Figure 1　Analysis strategies of Th in peripheral blood from HIV/AIDS patients**

**表 1　HIV/AIDS 患者和健康对照者外周血中 Th 的比例情况（%）**

**Table 1　Comparisons of Th proportion in peripheral blood between HIV/AIDS patients and healthy controls(%)**

| 组别 | Th1 | Th2 | Th9 | Th17 | Th22 | Tfh | ThG | 初始 CD4⁺ T |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 健康对照者 ($n$=15) | 2.3(1.1, 5.4) | 4.3(3.2, 6.3) | 2.3(1.6, 2.8) | 3.0(2.5, 4.1) | 2.2(0.9, 3.7) | 10.1(9.3, 11.1) | 1.6(0.9, 2.9) | 40.4(21.1, 52.5) |
| HIV/AIDS 患者 ($n$=15) | 2.9(2.1, 4.6) | 6.0(4.8, 10.6) | 1.7(1.0, 2.3) | 3.0(2.3, 3.9) | 1.2(0.9, 2.4) | 11.6(8.8, 15.5) | 1.9(1.6, 3.3) | 43.7(30.5, 53.7) |
| $t$/ $U$ 值 | 0.832 | 55.000* | 73.000* | 0.467 | 2.259 | 2.033 | 86.000* | 0.166 |
| $P$ 值 | 0.413 | 0.029 | 0.106 | 0.644 | 0.032 | 0.052 | 0.285 | 0.870 |

注：*. $U$ 值

亚型，是既往研究中经常用到的实验方法[11，19-20]。酶联免疫斑点法和流式细胞术是最典型的 2 种方法，它们通过对胞浆内细胞因子的染色，在单细胞水平上检测 Th。2 者相比，流式细胞术不仅能同时检测多种细胞因子，而且可以结合转录因子和表面标志物，较为准确地确定 Th 亚群的数量和比例。此外，根据荧光强度的强弱还可以判断细胞因子的分泌情况，从侧面分析细胞的功能。然而检测细胞因子的实验方法都基于在体外对细胞的额外刺激，不仅实验过程复杂、不易控制变量，且不能客观地反映 Th 在体内真实的数量和比例。Th 的异质性一方面源于分泌的细胞因子的特异性，另一方面是归巢受体（选择素、整合素、趋化因子受体）的表达水平，这些受体不同的组合方式便决定了不同类型的 Th 归巢到不同组织的能力[21]。因此，使用趋化因子受体作为替代细胞因子和转录因子的工具将有助于 Th 的识别和检测。目前基于趋化因子区分 Th 亚群方式还没有明确的定义，有文献报道称 Th1 表型为 $CCR4^-CCR6^-CCR10^-CXCR3^+$，Th2 为 $CCR4^+CCR6^-CXCR3^-$，Th17 为 $CCR4^+CCR6^+CCR10^-CXCR3^-$；其他的研究则认为 Th1 为 $CXCR3^+$，Th2 为 $CCR10^-CCR4^+CCR6^-$，Th17 为 $CCR10^-CCR4^+CCR6^+$ [17，22]。目前文献里报道的趋化因子的分析策略纷繁复杂，不同的策略各有重点，大多数的研究偏向于分析某一种或少数几种的 Th。这些因素都导致了研究者不能很好地分析目前大部分的 Th 在体内的数量和比例。故本研究建立了十一色流式染色策略，能够同时对 7 种 Th 进行检测，实验步骤简单快捷，且对细胞的人为伤害相对较小，能够较为真实地反映细胞的体内状态，有利于纯化细胞进行后续的实验安排。

基于上述的染色方案，本研究检测了 15 例 HIV/AIDS 患者和 15 例健康对照外周血中 Th 的比例，并且对比分析 2 组之间的差异。研究发现，Th2 和 Tfh 数量在 HIV/AIDS 患者体内均有不同程度的增加。既往文献表明 HIV/AIDS 患者的 $CD4^+$ T 细胞表达 IL-2 和 IFN-γ 的细胞百分比降低，同时产生 IL-4 和 IL-10 的细胞比例增加[23]。在本研究中，HIV/AIDS 患者体内 Th2 比例确实高于健康对照，但是并没有观察到 Th1 数量的显著变化，推测可能与样本量小和患者都处于感染早期有关。本研究中观察到的 Tfh 变化趋势与既往文献报道是一致的，在机体受到 HIV 攻击以后，Tfh 的数量不减反增，其作为 HIV 增殖的场所，为 HIV 的长期潜伏创造了一个良好的环境[24]。

Th 具有各自的特点，它们在 HIV 感染过程中的变化也不相同。本研究发现 Th22 的比例在 HIV/AIDS 患者体内显著降低。既往研究表明 Th22 的比例变化与全身的炎症状态和黏膜免疫能力密切相关，如牛皮癣和哮喘等[23，25-27]。Th22 数量和比例的减少能够在一定程度上促进 HIV 引起的慢性感染，使得疾病进一步地恶化[28-29]。此外，有文献报道了 Th17 数量在 HIV 感染进程中会减少，降低机体对 HIV 感染的抵御能力[30]；Th9 分泌的 IL-9 在 HIV 急性感染与慢性感染中浓度不同[29]。但是在本研究中，并没有观察到 Th17 和 Th9 以及 ThG 比例在 2 组之间的差异。推测这与样本量小，并且与患者感染时间短、病程都处于初级阶段有关，有待在今后的研究中进一步扩大样本量和在不同疾病进程的患者体内检测 Th 的数量和比例。

总之，Th 及其分泌的细胞因子在 HIV 感染中发挥的作用不尽相同。本研究设计的十一色流式染色策略使得分析 Th 的亚群更加方便和快捷。全面且详实地了解 Th 在 HIV 感染过程中的变化有利于研究 HIV/AIDS 患者的免疫状态和判断预后。

**【参考文献】**


[1] Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, *et al*. HIV preferentially infects HIV-specific $CD4^+$ T cells［J］. Nature, 2002, 417(6884):95-98.

[2] Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges［J］. AIDS, 2009, 23(2):147-160.

[3] Wang W, Sung N, Gilman-Sachs A, *et al*. T helper (Th) cell profiles in pregnancy and recurrent pregnancy losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh cells［J］. Front Immunol, 2020, 11:2025. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02025.

[4] Zhu X, Zhu J. CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders［J］. Int J Mol Sci, 2020, 21(21):8011. DOI: 10.3390/ijms21218011.

[5] Schmitt E, Klein M, Bopp T. Th9 cells, new players in adaptive immunity［J］. Trends Immunol, 2014, 35(2):61-68.

[6] Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells［J］. Cell Res, 2010, 20(1):4-12.

[7] Aid M, Dupuy FP, Moysi E, *et al*. Follicular CD4 T helper cells as a major HIV reservoir compartment: a molecular perspective［J］. Front Immunol, 2018, 9:895. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00895.

[8] Lalvani A, Hill AV. Cytotoxic T-lymphocytes against malaria and tuberculosis: from natural immunity to vaccine design［J］. Clin Sci (Lond), 1998, 95(5):531-538.

[9] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, *et al*. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins［J］. J Immunol, 1986, 136(7):2348-2357.

[10] Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, *et al*. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer［J］. Cancer Res, 2011, 71(4):1263-1271.

[11] 汪笛，孔雅娴，宋洋子，等. 多色流式细胞术检测 HIV/AIDS 病人中的 Th 细胞亚群［J］. 中国艾滋病性病，2017，23(5):372-376.


（下转第 442 页）

[10] Messina JP, Brady OJ, Golding N, *et al*. The current and future global distribution population at risk of dengue［J］. Nat Microbiol, 2019, 4(9):1508-1515.
[11] 陈志高，孙梦婷，李媛，等 . 2014—2018 年深圳市登革热疫情流行特征分析［J］. 实用预防医学，2020，27(2):176-179.
[12] 叶凌，谭启龙，赵剑刚，等 . 渐江省一起海岛地区登革热本地暴发疫情的隐性感染情况调查［J］. 中国媒介生物及控制杂志，2020，31(3):353-357.
[13] 洪文昕，王建，邱 爽，等 . 121 例成人重症登革热的临床特征及救治体会［J］. 中山大学学报，2016，37(3):333-336.
[14] 陈巧彬，陈木兴，林振德 . 安溪县 2019 年革热流行病学及临床特征分析［J］. 海峡预防医学杂志，2020，26(6):33-35.
[15] Wang J, Chen Q, Jiang Z, *et al*. Epidemiology and clinical analysis of the breakout of dengue fever in Zhangshu City, Jiangxi Province in 2019［J］. Med et Mal Infect, 2021, 40(1). DOI: 10.1016/j.medmal.2020.09.017.
[16] Chen D, Zhang Y, Wu J, *et al*. A survey of clinical and laboratory characteristics of dengue fever epidemic from 2014 to 2018 in Guangzhou, China［J］. Ann Palliat Med, 2020, 9(1):70-81.
[17] Liu X, Zhang X, Wang H, *et al*. Clinical and pathological analysis of eleven adult patients with inflammatory myofibroblastic tumor［J］. J Clin Oncol, 2018, 36(15 Suppl):11545. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.11545.
[18] 刘淦，胡婷婷，李磊，等 . 皖南地区 10 例输入性登革热流行病学及临床特征分析［J］. 沈阳医学院学报，2020，22(5):408-411.
[19] 冯石军，管娇琼，陈珺，等 . 2018 年湖南省祁阳县 96 例登革热病例临床及实验室特征分析［J］. 中国生物制品学杂志，2020，33(4):423-428，433.
[20] Rajan M, Geminiganesan S, Sankaranarayanan S, *et al*. Renal manifestations in children with dengue fever hospitalized in pediatric intensive care unit［J］. Indian J Pediatr, 2020, 87(12):1014-1017.

（2021-01-20 收稿 2021-08-13 修回）
（本文编辑 揣征然）

（上接第 437 页）

[12] Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, *et al*. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE［J］. Nat Immunol, 2009, 10(5):514-523
[13] O'Garra A, McEvoy LM, Zlotnik A, *et al*. T-cell subsets: chemokine receptors guide the way［J］. Curr Biol, 1998, 8(18):R646-R649.
[14] Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, *et al*. Chemokine receptor expression and function in $CD4^+$ T lymphocytes with regulatory activity［J］. J Immunol, 2001, 166(2):996-1002.
[15] McKinnon LR, Kaul R. Quality and quantity: mucosal $CD4^+$ T cells and HIV susceptibility［J］. Curr Opin HIV AIDS, 2012, 7(2):195-202.
[16] Paulissen SM, van Hamburg JP, Davelaar N, *et al*. CCR6(+) Th cell populations distinguish ACPA positive from ACPA negative rheumatoid arthritis［J］. Arthritis Res Ther, 2015, 17:344. DOI: 10.1186/s13075-015-0800-5.
[17] Wingender G, Kronenberg M. OMIP-030: characterization of human T cell subsets via surface markers［J］. Cytometry A, 2015, 87(12):1067-1069.
[18] Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)［J］. Annu Rev Immunol, 2010, 28:445-489.
[19] Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, *et al*. Phenotypic and functional features of human Th17 cells［J］. J Exp Med, 2007, 204(8):1849-1861.
[20] Watanabe S, Yamada Y, Murakami H. Expression of Th1/Th2 cell-related chemokine receptors on $CD4^+$ lymphocytes under physiological conditions［J］. Int J Lab Hematol, 2020, 42(1):68-76.
[21] Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, *et al*. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells［J］. Nat Immunol, 2009, 10(8):857-863.
[22] Mahnke YD, Beddall MH, Roederer M. OMIP-017: human CD4(+) helper T-cell subsets including follicular helper cells［J］. Cytometry A, 2013, 83(5):439-440.
[23] Klein SA, Dobmeyer JM, Dobmeyer TS, *et al*. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry［J］. AIDS, 1997, 11(9):1111-1118.
[24] 赵爽，陈威巍，赵敏 . 滤泡辅助性 T 细胞与 HIV 感染研究进展［J］. 中国艾滋病性病，2017，23(8):766-770.
[25] Gronke K, Hernández PP, Zimmermann J, *et al*. Interleukin-22 protects intestinal stem cells against genotoxic stress［J］. Nature, 2019, 566(7743):249-253.
[26] Akdis M, Palomares O, van de Veen W, *et al*. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection［J］. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(6):1438-1449.
[27] Keir M, Yi Y, Lu T, *et al*. The role of IL-22 in intestinal health and disease［J］. J Exp Med, 2020, 217(3):e20192195. DOI: 10.1084/jem.20192195.
[28] Kim CJ, Nazli A, Rojas OL, *et al*. A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis［J］. Mucosal Immunol, 2012, 5(6):670-680.
[29] Gorenec L, Zidovec Lepej S, Grgic I, *et al*. The comparison of Th1, Th2, Th9, Th17 and Th22 cytokine profiles in acute and chronic HIV-1 infection［J］. Microb Pathog, 2016, 97:125-130.
[30] Elhed A, Unutmaz D. Th17 cells and HIV infection［J］. Curr Opin HIV AIDS, 2010, 5(2):146-150.

（2021-07-26 收稿 2021-08-17 修回）
（本文编辑 赵雅琳）