

· 临床研究 ·

外周血双阴性 T 细胞升高与临床疾病的关系*

赵雪^{1,2}, 吴丽娟^{1△}, 刘毓刚¹

(1. 成都军区总医院检验科/成都军区检验医学中心, 成都 610083; 2. 四川省达州市中心医院检验科 635000)

摘要:目的 了解外周血双阴性 T 细胞(DNT)含量升高的临床疾病谱,探讨 DNT 升高的临床意义。方法 回顾性分析 2010 年 1 月至 2012 年 2 月,收治患者中接受外周血 T 淋巴细胞亚群检测且 DNT 升高的病历资料,以临床诊断为金标准,按照疾病分类统计分析。T 淋巴细胞亚群检测采用流式细胞学检测技术。结果 健康人外周血 DNT 占淋巴细胞的(7.36±2.13)%,含量达(0.13±0.06)×10⁹/L。送检患者中约有 5.45% 的外周血 DNT 增高,主要见于肺部细菌感染、全身性病毒感染、不明原因发热、胸膜炎、急性扁桃体炎、创伤、脑膜炎等。DNT 在外周血淋巴细胞中的比例增高和绝对含量增高均以急性扁桃体炎为最高,不明原因的发热次之。增高患者中又以 13~17 岁青少年患者 DNT 升幅为最大。结论 外周血 DNT 主要是在临床急性炎症性疾病时明显升高,可能参与了急性感染、严重创伤等患者的细胞免疫调节。

关键词:流式细胞术;外周血;双阴性 T 细胞;疾病谱

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.35.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)35-3702-02

The relationship between the increase of double negative T cell in peripheral blood and clinical disease*

Zhao Xue^{1,2}, Wu Lijuan^{1△}, Liu Yugang¹

(1. Department of Medical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China;

2. Department of Medical Laboratory, Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan 635000, China)

Abstract: Objective To analyze the clinical spectrums of disease of abnormal elevation of double negative T cells in peripheral blood, and identify the clinical significance of double negative T cells(DNT) increase. **Methods** We did a retrospective analysis of the medical data of patients who were DNT increased in peripheral blood obtained from January 2010 to February 2012. Our research set clinical diagnosis as gold standard and we conducted the statistical analysis in accordance with the classification of diseases. T lymphocyte subsets were assessed by flow cytometry. **Results** The DNT percentage and absolute quantity was (7.36±2.13)% and (0.13±0.06)×10⁹/L in healthy people. There were about 5.45% patients had an increased DNT levels in all delivered T cell subset examination patients. DNT increasing in peripheral blood mainly found in pneumonic bacterial infection, general viral infection, innubibus fever, pleuritis, acute tonsillitis, trauma and cephalomeningitis, etc. Acute tonsillitis patients had the highest percentage and absolute quantity increase of DNT, followed by innubibus fever. In addition, adolescents aged 13 to 17 had the highest increase of DNT. **Conclusion** DNT were significantly increased in peripheral blood of acute inflammation patients, and it maybe take part in regulating cell immunity in patients with acute infection, severe trauma, etc.

Key words: flow cytometry; peripheral blood; double negative T cell; disease spectrum

双阴性 T 细胞(double-negative T-cell, DNT)是淋巴细胞亚群中的一种,免疫学标志为 CD3⁺CD4⁻CD8⁻,因其细胞表面没有 CD4、CD8 表达而被称为双阴性^[1-2]。近年来,由于多色流式细胞分析仪的诞生,DNT 细胞的检测成为可能。在日常外周血 T 淋巴细胞亚群分析中,只要采用 CD3-CD4-CD8 的三色流式细胞术即可从淋巴细胞群中很容易地将 DNT 细胞区分出来并加以测定^[3]。本文回顾性分析本院近期外周血淋巴细胞亚群检测中 DNT 异常升高的患者资料,以明确外周血 DNT 含量的参考范围及其异常升高与临床疾病的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 1 月至 2012 年 2 月,本院临床送验 T 细胞亚群的病例 1 780 例,DNT 细胞升高 97 例,其中男 72 例,女 25 例,年龄 1~77 岁,平均 28.2 岁。对照组 63 例,为近期健康体检被证实的健康个体,其中男 33 例,女 30 例,年龄 15~63 岁,平均 30.5 岁。

1.2 标本采集 清晨采集静脉血 2~3 mL,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-2K)抗凝(紫头真空采血管),立即检验。

1.3 流式 T 细胞亚群的检测 采用双平台三色荧光全血细胞直接染色免洗流式测定法、SSC/FSC 设门淋巴细胞,分析总 T 细胞(CD3⁺)、T4 细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻)、T8 细胞(CD3⁺CD4⁻CD8⁺)、DNT(CD3⁺CD4⁻CD8⁻)百分含量和绝对含量,计算 T4/T8 细胞比值。全部试剂如同型对照抗体 IgG1-FITC/IgG1-PE/IgG1-PC5,测定抗体 CD4⁻FITC/CD8⁻PE/CD3⁻PC5、标本预处理试剂等均为美国 Beckman-Coulter 公司产品,仪器采用 Beckman-Coulter XL4-MCL 型流式细胞仪。具体检测方法参照文献^[3]进行。

1.4 诊断标准 以对照组 DNT 细胞百分含量和绝对含量的(+2s)为临界值,大于该水平即被认为增高。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料组间比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差

异有统计学意义。

2 结 果

2.1 外周血 DNT 增高的疾病分布 1 780 例患者中 DNT 增高 97 例,增高率 5.45%。97 例 DNT 增高患者中临床资料齐全的共 54 例,包括肺部细菌感染 14 例(26.4%),全身性病毒感染 11 例(20.8%),不明原因发热 6 例(11.3%),胸膜炎 6 例(11.3%),急性扁桃体炎 5 例(9.4%),创伤 3 例(5.6%),脑膜炎 2 例(3.7%),溃疡性结肠炎 1 例(1.9%),退行性椎炎 1 例(1.9%),椎间盘突出 1 例(1.9%),气胸 1 例(1.9%),慢性肾功能不全 1 例(1.9%),高血压 1 例(1.9%),白内障 1 例(1.9%)。

2.2 DNT 增高患者的外周血 DNT 水平 DNT 在外周血淋巴细胞中的比例以急性扁桃体炎患者最高,约占淋巴细胞的 1/2;其次是不明原因的发热患者,约占淋巴细胞的 1/4;其余依次是肺部细菌感染、全身性病毒感染、胸膜炎和创伤。DNT 绝对含量以急性扁桃体炎患者最高,其余依次是不明原因的发热患者、创伤、肺部细菌感染、全身性病毒感染、胸膜炎,见表 1。

表 1 外周血 DNT 增高患者的流式检测结果($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 绝对含量($\times 10^9/L$) |
|----------|----|-------------------------|
| 对照组 | 63 | 0.13±0.06 |
| 肺部细菌感染组 | 14 | 0.27±0.26 ^b |
| 全身性病毒感染组 | 11 | 0.21±0.15 ^b |
| 不明原因发热组 | 6 | 0.82±1.30 ^b |
| 胸膜炎组 | 6 | 0.19±0.05 ^a |
| 急性扁桃体炎组 | 5 | 2.68±1.36 ^b |
| 创伤组 | 3 | 0.29±0.05 ^a |
| 其他疾病组 | 9 | 0.25±0.13 ^a |

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 外周血 DNT 增高与患者年龄的关系 将 97 例外周血 DNT 增高患者按照年龄进行分组。数据显示 13~17 岁青少年人群 DNT 升幅最大,DNT 平均可增高到占淋巴细胞的 1/3 以上,绝对含量可增加一个数量级,结果见表 2。

表 2 不同年龄外周血 DNT 细胞含量升高水平($\bar{x}\pm s$)

| 年龄组 | n | 绝对含量($\times 10^9/L$) |
|----------|----|-------------------------|
| 0~3 岁组 | 12 | 0.89±1.01 ^e |
| 4~12 岁组 | 23 | 0.53±0.59 ^f |
| 13~17 岁组 | 7 | 2.07±1.79 ^{bd} |
| 18~60 岁组 | 48 | 0.24±0.16 ^{af} |
| >60 组 | 7 | 0.18±0.06 ^{af} |

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 0~3 岁组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与 4~12 岁组比较; e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$, 与 13~17 岁组比较。

3 讨 论

正常情况下,T 细胞占淋巴细胞总数的 65% 以上,是人类最重要的免疫效应细胞。T 细胞(CD3⁺淋巴细胞)包括 T4 细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁻,也称 CD4⁺T 细胞)、T8 细胞(CD3⁺CD4⁻CD8⁺,也称 CD8⁺T 细胞)、DNT(CD3⁺CD4⁻CD8⁻)和双阳性 T 细胞(CD3⁺CD4⁺CD8⁺,简称 DPT)等亚群^[3-4]。Fischer 等^[5]采用密度梯度离心法分离了 20 例健康人的外周血单

个核细胞,以 CD3、CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 荧光标记抗体染色,用流式细胞仪对其中的 DNT 进行了分析,结果发现 DNT 占 CD3⁺细胞的 4.1%(1.9%~7.7%)。对这些 DNT 的进一步鉴定证实,健康人外周血中的 DNT 细胞主要表达 TCR $\gamma\delta$ (平均 3.2%,范围 2.1%~3.6%),TCR $\alpha\beta$ ⁺ 的 DNT 细胞仅占 0.9%(0.4%~1.9%)。上述结果表明,健康人外周血中是存在一定数量的 DNT 细胞的。本实验室 2005 年采用全血细胞直接染色免洗流式测定法,对 200 例健康人进行了外周血 DNT 含量调查,结果显示健康人外周血中 DNT 的百分含量占淋巴细胞的 12.33% 以内,绝对含量达到(0.24~1.08) $\times 10^9/L$ 水平^[3]。之后立即在流式细胞术外周血 T 细胞亚群检测中向临床回报 DNT 百分含量和绝对含量检测结果。本研究对本院近一段时间临床标本中 DNT 含量增高的患者进行了调查分析,同样证实健康人外周血中含有(7.36±2.13)%、(0.13±0.06) $\times 10^9/L$ 的 DNT;发现在临床送验的各种疾病患者的外周血样中大约有 5.45% 的患者存在 DNT 增高的情况,其中主要是肺部细菌感染、全身性病毒感染、不明原因发热、胸膜炎、急性扁桃体炎等;急性扁桃体炎时,外周血 DNT 甚至可以占到淋巴细胞的一半以上,每升全血中的 DNT 含量可以达到 10^9 水平;并且发现在 13~17 岁年龄阶段的患者,其 DNT 增高的幅度最大。本研究与 Fischer K 等^[5]的报道在数值上存在一定差异,这可能与采取的方法以及观察对象人种不同有关。采用传统方法在单个核细胞提取时可能造成部分 DNT 丢失,而染色后的洗涤过程可能引起荧光抗体的部分脱落,导致检验结果偏低。因此,笔者推荐外周血淋巴细胞亚群分析应尽量采取新一代全血细胞直接染色免洗流式测定法,其检测结果更为准确。

外周血 DNT 细胞的来源目前尚不清楚。有学者以鼠为动物模型研究提示,DNT 可能来自 CD8⁺T 细胞的前体细胞^[6],但是 MacDonald^[7]则认为 DNT 细胞有自己独特的分化途径并非依赖 CD8⁺细胞,肯定存在一种胸腺分化外途径。Zhang 等^[8]发现存在 $\alpha\beta$ -TCR⁺、CD3⁺、CD4⁻、CD8⁻、CD25⁺、CD28⁻、CD44⁻、NK1.1-这样一群独特的 DNT 细胞,也提示可能存在胸腺以外的形成途径。

在功能方面,目前已证实 DNT 细胞能够抑制具有相同 T 细胞受体的 CD8⁺T 细胞和 CD4⁺T 细胞的功能^[1]。Strober 等^[9]首次发现 $\alpha\beta$ -TCR⁺ 双阴性 NKT 细胞具有抑制功能并诱导免疫耐受,随后 Johansson 等^[10]在转基因小鼠体内分离出无反应性的 NK1.1-DN T 细胞。也有学者报道人类 DNT 细胞具有一定的抑制性免疫调节功能^[11]。本研究显示,外周血 DNT 升高主要见于临床炎症性疾病,包括感染性和非感染性疾病,结合上述国外研究成果,笔者推测炎症性疾病时外周血 DNT 增高可能参与了对体内 T4、T8 细胞功能的调节,通过对过高 T4 或 T8 细胞应答的抑制来预防体内细胞免疫应答的过度亢进,防止过度免疫反应对机体造成免疫损伤。基于上述推测,笔者认为青少年患者外周血 DNT 细胞增高的幅度远远大于其他年龄段患者的情况,是因为青少年人群 T 细胞发育已经完全成熟,且 T 细胞的功能正值旺盛时期,机体遭遇外来抗原刺激时其反应性强于低龄段和高龄段人群的 T 细胞,因此需要更多的 DNT 细胞来平衡强烈的 T 细胞应答。

因此,检测外周血 DNT 十分重要,它是(下转第 3706 页)

性,而且同样可以达到治疗效果。

本研究中,治疗组在研究初期,没有胃肠道反应发生,与小剂量给药有关;研究中、后期胃肠道及血液系统的不良反应亦没有出现,仅有 2 例出现血压升高,治疗依从性良好,显示了联合治疗的安全性。有研究提出,为减少来氟米特治疗的不良反应,可以省去负荷剂量;如果联合用药则更宜采用小剂量治疗。对照组 2 例因病情控制不理想,改为联合治疗,退出本研究。

总之,小剂量来氟米特联合甲氨喋呤治疗 RA 疗效较好,安全性高;药物剂量的减少亦符合药物经济学原则,并且提高了治疗的顺应性。本研究不足的是样本量较小,观察时间较短,需要扩大研究例数,延长观察时间来了解联合治疗的疗效持久情况。

参考文献:

- [1] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31(3): 315-324.
- [2] Strangfeld A, Hierse F, Kekow J, et al. Comparative effectiveness of tumour necrosis factor inhibitors in combination with either methotrexate or leflunomide [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(12): 1856-1862.
- [3] Finckh A, Dehler S, Gabay C, et al. The effectiveness of leflunomide as a co-therapy of tumour necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis: a population-based study [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(1): 33-39.
- [4] Curtis JR, Beukelman T, Onotrei A, et al. Elevated liver enzyme tests among patients with rheumatoid arthritis or

psoriatic arthritis treated with methotrexate and/or leflunomide [J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(1): 43-47.

- [5] Singer O, Gibofsky A. Methotrexate versus leflunomide in rheumatoid arthritis; what is new in 2011 [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2011, 23(3): 288-292.
- [6] Leca N. Leflunomide use in renal transplantation [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2009, 14(4): 370-374.
- [7] Maddison P, Kiely P, Kirkham B, et al. Leflunomide in rheumatoid arthritis: recommendations through a process of consensus [J]. *Rheumatology*, 2005, 44(3): 280-286.
- [8] Jakez-Ocampo J, Richaud-Patin Y, Simón JA, et al. Weekly dose of leflunomide for the treatment of refractory rheumatoid arthritis: an open pilot comparative study [J]. *Joint Bone Spine*, 2002, 69(3): 307-311.
- [9] Jorge JH, Manuel RR, Rodrigo SO, et al. Rheumatoid arthritis treatment with weekly leflunomide: an open-label study [J]. *J Rheumatol*, 2004, 31(2): 235-237.
- [10] Poor G, Strand V. Efficacy and safety of leflunomide 10 mg versus 20 mg once daily in patients with active rheumatoid arthritis: multinational, double-blind, randomized trial [J]. *Rheumatology*, 2004, 43(7): 744-749.
- [11] Lee SS, Park YW, Park JJ, et al. Combination treatment with leflunomide and methotrexate for patients with active rheumatoid arthritis [J]. *Scand J Rheumatol*, 2009, 38(1): 11-14.

(收稿日期: 2012-06-13 修回日期: 2012-09-12)

(上接第 3703 页)

急性感染、严重创伤等患者体内的免疫功能状态、病情监测的一个新指标。进一步开展有关外周血 DNT 来源、特性、功能、表达及激活机制的研究,或许能探索出一条崭新的临床治疗路径,推动未来相关疾病的免疫治疗。

参考文献:

- [1] Naito T, Tanaka H, Naoe Y, et al. Transcription control of T-cell development [J]. *Int Immunol*, 2011, 23(11): 661-668.
- [2] Lev A, Simon AJ, Amariglio N, et al. Hymic functions and gene expression profile distinct double-negative cells from single positive cells in the autoimmune lymphoproliferative syndrome [J]. *Autoimmun Rev*, 2012, 11(10): 723-730.
- [3] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 78-88.
- [4] 窦肇华, 张远强, 郭顺根. 免疫细胞与疾病 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 1-127.
- [5] Fischer K, Voelkl S, Heymann J, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR $\alpha\beta$ + CD4⁻ CD8⁻ double-negative regulatory T cells [J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2828-2835.

[6] Zhang ZX, Yong KJ, Zhang L. CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ $\alpha\beta$ -T cell as immune regulatory cell [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2001, 79(8): 419-427.

- [7] MacDonald HR. Development and selection of NKT cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14(2): 250-254.
- [8] Zhang ZX, Yang L, Young KJ, et al. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression [J]. *Nat Med*, 2000, 6(7): 782-789.
- [9] Strober S, Cheng L, Zeng D, et al. Double negative (CD4⁻ CD8⁻ $\alpha\beta$ +) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity [J]. *Immunol Rev*, 1996, 149(1): 217-230.
- [10] Johansson M, Lycke N. A unique population of extrathymically derived $\alpha\beta$ TCR + CD4⁻ CD8⁻ T cells with regulatory functions dominates the mouse female genital tract [J]. *J Immunol*, 2003, 170(4): 1659-1666.
- [11] 张竹虚, 张丽. $\alpha\beta$ -TCR + CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ 双阴性 T 细胞: 一种新发现的免疫调节 T 细胞 [J]. *现代免疫学*, 2004, 24(1): 5-8.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-08-22)