

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.22.012

## 间质性肺病患者外周血双阴性 T 淋巴细胞的变化及意义\*

张平骥, 谢 通, 戴 丽, 李天水, 夏国光, 张运剑, 王 卓

(北京积水潭医院呼吸科 100035)

**[摘要]** **目的** 研究间质性肺疾病中外周血双阴性 T 淋巴细胞(DNT)的变化及其临床意义。**方法** 收集该院 86 例间质性肺病患者(病例组)的临床资料(结缔组织病相关性间质性肺疾病 37 例,特发性肺间质纤维化 36 例,其他类型间质性肺疾病 13 例),选取同期健康人群 45 例作为对照组。收集研究对象的外周血标本,利用 FC500 流式细胞仪检测 DNT 细胞的表达水平。**结果** 病例组 DNT 细胞表达水平明显低于对照组( $t=4.194, P<0.01$ )。其中,特发性肺间质纤维化患者( $t=-4.790, P<0.01$ )及结缔组织病相关性间质性肺疾病患者( $t=-4.321, P<0.01$ )的 DNT 表达水平与对照组相比差异有统计学意义。结缔组织病相关性间质性肺病患者与特发性肺间质纤维化患者的外周血 DNT 表达水平差异无统计学意义( $t=-0.065, P=0.948$ )。**结论** DNT 水平低表达在间质性肺疾病中可能起到一定病理生理作用。

**[关键词]** 间质性肺疾病;双阴性 T 淋巴细胞;炎症

**[中图分类号]** R563

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)22-2928-03

### Change and significance of peripheral blood double-negative T-lymphocytes in patients with interstitial lung disease\*

ZHANG Pingji, XIE Tong, DAI Li, LI Tianshui, XIA Guoguang, ZHANG Yunjian, WANG Zhuo

(Department of Respiratory Disease, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the changes and clinical significance of peripheral blood double-negative T-lymphocytes (DNT) in interstitial lung disease (ILD). **Methods** The clinical data in 86 cases of ILD(case group) treated in this hospital from April 2015 to November 2017 were collected, including 37 cases of connective tissue disease related ILD, 36 cases of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and 13 cases of other types of ILD. Forty-five healthy people in corresponding period were selected as the control group. The peripheral blood samples in the research subjects were collected and expression level of ONT cells was detected by FC500 flow cytometry. **Results** The expression level of DNT in the case group was significantly lower than that in the control group ( $t=4.194, P<0.01$ ). Among them, the expression level of DNT in the IPF group and connective tissue disease related ILD group had statistical difference compared with that in the control group( $t=-4.790, -4.321; P<0.01$ ). The expression level of peripheral blood DNT lymphocytes had no statistical difference between the connective tissue disease related ILD and IPF( $t=-0.065, P=0.948$ ). **Conclusion** The low expression of DNT lymphocytes may play a certain pathophysiological role in ILD.

**[Key words]** interstitial lung disease; double-negative T-lymphocyte; inflammation

间质性肺疾病是以弥漫性肺泡单位慢性炎症和间质纤维化为主要病理特征的一大组疾病<sup>[1]</sup>。其中弥漫性肺泡慢性炎症在间质性肺疾病的发生、发展中起到重要作用。外周血双阴性 T 淋巴细胞(double-negative T-cell, DNT)是免疫调节 T 淋巴细胞的一种,其表面既不表达 CD4 也不表达 CD8 抗原。DNT 的免疫功能较为复杂,一方面可通过细胞介导的细胞毒作用抑制效应 T 细胞的功能从而发挥免疫抑制作

用,另一方面可分泌多种促进炎症的细胞因子,参与机体多种炎症反应过程。DNT 与感染、肿瘤、结缔组织病等密切相关,成为近期研究热点,但其在间质性肺疾病中的作用并不明确。本研究选取间质性肺病患者及健康对照者作为研究对象,将其分为特发性肺间质纤维化、结缔组织病相关性间质性肺疾病和其他类型 3 组,采集其外周血并通过流式细胞术进行 DNT 计数,比较不同组间 DNT 表达水平以探究

\* 基金项目:北京市卫生和计划生育委员会十百千层次人才培养资助项目(20111118010)。 作者简介:张平骥(1978—),主治医师,本科,主要从事呼吸与急重症方面的研究。

DNT 与间质性肺疾病的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 将 2015 年 4 月至 2017 年 11 月就诊于本院完善肺部 CT 并确诊为间质性肺疾病的 86 例患者作为病例组,其中结缔组织病相关性间质性肺疾病 37 例、特发性肺间质纤维化 36 例和其他类型肺间质纤维化 13 例(矽肺 3 例,淋巴管滑肌瘤 1 例,IPAF 5 例,不明原因的 4 例)。病例组中男 43 例,女 43 例,平均年龄(69.48±10.29)岁。选取 45 例同期健康体检者作为对照组,其中男 20 例,女 25 例,平均年龄(54.44±16.68)岁。排除标准:重症感染、肿瘤、结核等其他疾病。

**1.2 仪器与试剂** 采用四色流式细胞术检测 DNT,检测仪器(EPIC SXL)及荧光标记单克隆抗体均购自贝克曼-库尔特公司。

**1.3 方法** 采集研究对象空腹静脉血 2 mL 置于含有乙二胺四乙酸抗凝剂的真空采血管,在采集后 6 h 内处理标本。按照检测标准,向编好顺序的流式试管内分别加入 10  $\mu$ L 单克隆抗体,随即加入 100  $\mu$ L 抗凝血,再混匀,避光,室温孵育 15 min 后,分别加入溶血剂,溶解未标记细胞及红细胞,按照操作程序上机检测。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,所有定量资料均进行方差齐性检验和正态性检验。计量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示,采用 *t* 检验。检验标准为  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

病例组患者的外周血 DNT 表达水平明显低于对照组( $t=4.194, P<0.01$ )。结缔组织病相关性肺间质性肺疾病及特发性肺间质纤维化患者外周血 DNT 表达水平明显低于对照组( $P<0.01$ )。结缔组织病相关性间质性肺疾病与特发性肺间质纤维化患者外周血 DNT 表达水平差异无统计学意义( $P=0.948$ ),见表 1。

表 1 病例组与对照组 DNT 表达水平比较

组别	<i>n</i>	DNT( $\bar{x}\pm s, \%$ )
病例组	86	2.64±2.28
结缔组织病相关性肺疾病	37	2.50±2.17
特发性肺间质纤维化	36	2.53±1.77
对照组	45	4.19±1.33

## 3 讨论

间质性肺疾病的病因及分类较为复杂,人们目前发现的间质性肺疾病的病因约 300 余种,其发病机制具有一定的异质性<sup>[2]</sup>。间质性肺疾病起病原因各不相同,但最终病理特征大多表现为弥漫性肺泡炎症和

间质纤维化。其中重要的病理表现为弥漫性肺泡慢性炎症、多种淋巴细胞及炎症因子参与慢性肺泡炎症的过程。T 淋巴细胞是其中重要的一种,其表面可表达多种抗原分子,根据这些分化抗原分子的不同,基本可划分为 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞,而 DNT 是免疫调节 T 淋巴细胞的一种,其表面既不表达 CD4 也不表达 CD8 抗原。DNT 约占人体外周血中 CD3<sup>+</sup> T 细胞的 1%~3%,在机体免疫调节功能中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。目前大多数研究发现 DNT 能够抑制并杀死同种同源的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞。有研究表明,DNT 可通过细胞接触 Fas-FasL 结合从而抗原特异性地抑制效应 T 细胞功能,并且能通过分泌白细胞介素(IL)-10 等细胞因子,抑制 T 细胞和 B 细胞功能减少抗体产生<sup>[4]</sup>。但在其一些体外细胞研究中,人们发现 DNT 可分泌多种促进炎症的细胞因子,如 IL-1、IL-8、IL-17 等,在感染性疾病中起到关键作用<sup>[5]</sup>。DNT 是当前免疫学领域研究的热点之一,在免疫调节、器官移植、排斥反应、自身免疫性疾病及肿瘤免疫耐受过程中发挥重要作用。本研究发现,与对照组相比较间质性肺疾病患者的 DNT 表达水平明显下降。其中,特发性肺间质纤维化及结缔组织病相关肺间质性肺疾病患者的 DNT 与对照组相比差异均有统计学意义。DNT 低表达减弱对 T 淋巴细胞的抑制作用,从而加重了慢性肺泡炎的发生,提示 DNT 水平低表达在间质性肺疾病中可能起到一定病理生理作用。

近年来人们对于特发性肺间质纤维化的危险因素及发病机制研究取得较大的进展。CHU 等<sup>[6]</sup>研究发现,特发性肺间质纤维化具有一定的遗传易感性。通过全基因组测序,人们已经发现了多个与特发性肺间质纤维化发病相关的基因位点。在特发性肺间质纤维化的发病机制中肺泡上皮损伤学说获得普遍认可。当外界损伤因素,如吸烟、环境污染、药物等对肺泡上皮-间质造成损伤后可激发炎症反应,多种炎性细胞及 T 淋巴细胞被激活,并释放多种细胞因子促进成纤维细胞的迁移与分化形成肺内多发纤维灶<sup>[7]</sup>。Th1/Th2 细胞分泌的细胞因子失衡在其中起到关键作用,其中 Th2 细胞分泌的细胞因子明显增加<sup>[8]</sup>。而 DNT 细胞表达水平的降低导致对 Th2 细胞抑制的减少可能参与该过程。

结缔组织病可造成多系统损害,约 30% 的间质性肺病与结缔组织病相关<sup>[9]</sup>。与特发性肺间质纤维化不同,自身免疫在本病中起到更为重要的作用。自身抗体可导致肺泡的上皮炎性反应和血管内皮损伤。同时肺泡内有多种细胞因子和生长因子的聚集,如:转化生长因子- $\beta$ 、内皮素-1、胰岛素样生长因子、IL-1

等。这些细胞因子和生长因子可激活纤维母细胞的活化促进肺间质纤维化的发生<sup>[10]</sup>。本研究发现,与对照组相比结缔组织相关间质性肺疾病患者的 DNT 表达明显下降,DNT 表达水平的下调可能减弱对 T 淋巴细胞的抑制作用从而促进了 CD4<sup>+</sup> T 细胞的活化,从而导致促进肺泡和血管的炎性反应。

在诊断特发性肺间质纤维化时,排除结缔组织病相关性肺间质纤维化十分重要。2011 年美国胸科指南推荐,即使没有相关的临床症状所有特发性肺间质纤维化患者均应进行血清学自身抗体检测<sup>[11]</sup>。在诊断特发性肺间质纤维化的患者中可以发现自身抗体轻度升高,但结缔组织病表现较轻,没有达到结缔组织病相关性肺间质纤维化的诊断标准,但这部分患者经过数月或数年的随访后可表现出结缔组织病特征性改变,进而修改间质性肺疾病的诊断<sup>[12]</sup>。在本研究中,特发性肺间质纤维化患者与结缔组织病相关性肺间质性疾病患者的外周血 DNT 表达水平没有差异,提示 DNT 可能在二者的发病过程中起到相似的作用,部分特发性肺间质纤维化患者只是某些结缔组织病早期表现。临床上对于二者的鉴别需要呼吸科与风湿免疫科医生的密切合作<sup>[13]</sup>。

本研究通过比较不同间质性肺疾病患者与健康对照组 DNT 表达水平发现,DNT 水平低表达可能在间质性肺疾病中起到一定的病理生理作用,从而进一步揭示了间质性肺疾病的发病机制,为寻找间质性肺疾病有效的治疗靶点提供了新思路。但本研究也存在一些不足,如临床样本量尤其是其他类型的间质性肺疾病患者的例数较少,故本研究其他组间质性肺疾病的病例数据未作具体的统计分析。另外,有一些其他的研究发现系统性红斑狼疮、干燥综合征等结缔组织病患者外周血中的 DNT 表达明显升高<sup>[14-15]</sup>,与本试验的结果相反,可能与 DNT 本身存在不同来源和表型相关,不同表型的 DNT 发挥不同的免疫功能。本研究只回顾性分析了不同类型的间质性肺疾病中 DNT 表达水平的差异,而其在细胞、分子水平上的作用机制还有待进一步的探究。

## 参考文献

- [1] 陆志伟. 辅助性 T 淋巴细胞与特发性肺间质纤维化关系的初步研究[D]. 北京:协和医学院,2011.
- [2] JONES M G, RICHELDI L. Recent advances and future needs in interstitial lung diseases[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37(3): 477-484.
- [3] HILLHOUSE E E, LESAGE S. A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells [J]. *J Autoimmun*, 2013, 40(1): 58-65.
- [4] 黄立锋, 姚咏明. 双阴性调节性 T 细胞在免疫抑制中的作用及其机制[J]. *临床与病理杂志*, 2007, 27(2): 93-99.
- [5] 赵雪, 吴丽娟, 刘毓刚. 外周血双阴性 T 细胞升高与临床疾病的关系[J]. *重庆医学*, 2012, 41(35): 3702-3703.
- [6] CHU S G, EL-CHEMALY S, ROSAS I O. Genetics and idiopathic interstitial pneumonias[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37(3): 321.
- [7] HARARI S, CAMINATI A. IPF: new insight on pathogenesis and treatment[J]. *Allergy*, 2010, 65(5): 537-553.
- [8] HOROWITZ J C, THANNICKAL V J. Idiopathic pulmonary fibrosis: new concepts in pathogenesis and implications for drug therapy[J]. *Treat Respir Med*, 2006, 5(5): 325-342.
- [9] FISCHER A, BOIS R D. Interstitial lung disease in connective tissue disorders[J]. *Lancet*, 2012, 380(9842): 689-698.
- [10] CASTELINO F V, VARGA J. Interstitial lung disease in connective tissue diseases: evolving concepts of pathogenesis and management[J]. *Arthr Res Ther*, 2010, 12(4): 213.
- [11] RAGHU G, COLLARD H R, EGAN J J, et al. An official ats/ers/jrs/alat statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(6): 788-824.
- [12] DEMORUELLE M K, MITTOO S, SOLOMON J J. Connective tissue disease-related interstitial lung disease[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2016, 30(1): 39-52.
- [13] FLAVIA V C, HILARY G, PAUL F D. The impact of rheumatological evaluation in the management of patients with interstitial lung disease[J]. *Rheumatology*, 2010, 50(3): 489-493.
- [14] CRISPÉN J C, OUKKA M, BAYLISS G, ET A L. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys[J]. *J Immunol*, 2008, 181(12): 8761-8766.
- [15] ALUNNO A, BISTONI O, BARTOLONI E, et al. IL-17-producing CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjogren's syndrome[J]. *Anna Rheu Dis*, 2013, 72(2): 286-292.

(收稿日期:2018-02-30 修回日期:2018-05-18)