

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.022

双阴性 T 淋巴细胞在急性发作期慢性阻塞性肺疾病患者的变化及意义

李天水,张平骥,胡萍,蔡颖,刘法永,夏国光,戴丽[△]

(北京积水潭医院呼吸与危重症医学科,北京 100035)

[摘要] **目的** 探讨慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)患者双阴性 T 淋巴细胞(DNT)的变化规律及意义。**方法** 回顾分析 2015 年 1 月 1 日至 2017 年 11 月 1 日住院的 252 例 AECOPD 患者(AECOPD 组)和 115 例非 AECOPD 患者(对照组)的临床资料,并进行统计学分析。**结果** 与对照组比较,AECOPD 组 CD3⁺、DNT%和 DNT 均降低($P<0.05$);按 AECOPD 患者急性发作次数分为大于或等于 2 次/年组和小于或等于 1 次/年组,两组清蛋白、淋巴细胞(L)、CD3⁺、CD4⁺、DNT%和 DNT 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。相关性分析发现清蛋白水平与 L 总数存在相关性($P<0.05$),与 DNT 无明显相关性。二元 Logistic 回归分析发现 L、DNT%与 AECOPD 存在相关性($P<0.05$)。**结论** DNT 在 AECOPD 患者外周血比例降低,可能参与了 AECOPD 发生、发展的炎症过程。

[关键词] 肺疾病,慢性阻塞性;急性加重;双阴性 T 淋巴细胞

[中图法分类号] R562.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)01-0087-04

The changes and significance of double-negative T cells in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease

LI Tianshui, ZHANG Pingji, HU Ping, QI Ying, LIU Fayong, XIA Guoguang, DAI Li[△]

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

[Abstract] **Objective** To explore the changes and significance of the double-negative T cells (DNT) in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD) patients (the AECOPD group). **Methods** According to the inclusion and exclusion criteria, a total of 252 AECOPD patients and 115 non-AECOPD patients (the control group) were included. The clinical data of the patients with AECOPD were retrospectively collected and analyzed. **Results** CD3⁺, DNT% and DNT decreased in the AECOPD group compared with the control group ($P<0.05$). AECOPD patients were divided into two subgroups according to the number of acute exacerbation in one year. There were significant differences ($P<0.05$) in globulin, lymphocyte (L), CD3⁺, CD4⁺, DNT% and DNT between the two groups. The correlation analysis found that globulin levels were correlated with L ($P<0.05$), but no correlation with DNT. The binary Logistic regression analysis found that L and DNT% were associated with AECOPD ($P<0.05$). **Conclusion** The decrease of DNT cells may involve in the inflammatory response of the AECOPD exacerbation.

[Key words] pulmonary disease, chronic obstructive; acute exacerbation; double-negative T cells

外周血 T 淋巴细胞检测时可以检测出一种 $\alpha\beta$ TCR⁺ CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ T 淋巴细胞,即双阴性 T 淋巴细胞(double negative T cells, DNT)^[1-2]。STROBER 等^[3]发现 DNT 具有抑制功能并能诱导免疫耐受和抑制性免疫调节作用,能够抑制骨髓移植患者的移植物抗宿主病;能通过抑制同种同源效应性 T 细胞来抑制受者抗供者器官的移植排斥反应^[4-5];在一些自身免疫性疾病中有下调免疫反应的作用^[6],并且可能在肿瘤患者的发病和治疗中存在价值^[7]。也有研究发现各种炎症性疾病如细菌、病毒感染,扁桃

体炎创伤等可导致 DNT 的升高,并推测 DNT 增高可能通过免疫调节来防止过度的免疫反应,对机体起保护作用^[8]。

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary, COPD)存在慢性气道炎症及机体免疫功能调节紊乱,研究报道 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞在其发生、发展起一定作用^[9-10],推测 DNT 在 COPD 急性加重(acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD)患者的发病中可能同样存在一定的作用,但目前尚未见此类报道。本研究通过回顾性

作者简介:李天水(1977-),主治医师,硕士,主要从事慢性气道病变、肺癌、呼吸介入诊疗学研究。 [△] 通信作者, E-mail: dailimd@hotmail.com。

研究 AECOPD 患者的 DNT 变化,探讨 DNT 在 AECOPD 发病中的变化及意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月 1 日至 2017 年 11 月 1 日本院住院的 AECOPD 患者(AECOPD 组)252 例和同期住院的非 COPD 患者(对照组)115 例。AECOPD 组纳入标准:(1)中华医学会呼吸病学分会制订的 COPD 和 AECOPD 的诊断标准^[11];(2)进行 T 淋巴细胞检测。对照组纳入标准为有 T 淋巴细胞检测数据的非 COPD 患者。排除标准:(1)合并呼吸系统慢性疾病,包括支气管哮喘、过敏性鼻炎、支气管扩张、结核;(2)急性上呼吸道感染、肺炎、泌尿系统感染、消化系统感染、软组织感染等急性感染患者;(3)恶性肿瘤患者;(4)急性骨折患者;(5)急性心肌梗死患者;(6)急性脑血管病患者;(7)肾功能不全患者;(8)自身免疫病患者。

1.2 方法

1.2.1 观察指标 选取性别、年龄、淋巴细胞(L)、总 T 淋巴细胞(CD3⁺)、CD3⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞(CD4⁺)、CD3⁺ CD8⁺ T 淋巴细胞(CD8⁺)、CD4⁺/CD8⁺、DNT、DNT 占淋巴细胞比例(DNT%),合并症包括:冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)、高血压病(HBP)、心律失常(ARR)、糖尿病(DM)、心力衰竭(HF)、睡眠呼吸暂停综合征(SAS)、前列腺增生(BPH)、高脂血症(HLP)、反流性食管炎(RE)。

1.2.2 分组 将研究对象分为 AECOPD 组和对照组,再根据急性加重频率将 AECOPD 患者分为大于或等于 2 次/年(高发组, $n=95$)和小于或等于 1 次/年(低发组, $n=157$)两组^[12]。

1.2.3 仪器与试剂 仪器与试剂采用四色流式细胞术检测 DNT,仪器购自贝克曼-库尔特公司,型号为 EPIC SXL,荧光标记单克隆抗体均购自贝克曼-库尔特公司。

1.2.4 标本采集 所有研究对象均采集空腹静脉血 2 mL 置于含有乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝剂的真空采血管中,按操作程序处理标本并上机检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用独立样本 t 检验;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验;计量资料相关性采用 Pearson 相关分析,等级资料相关性采用二元 Logistic 回归分析,变量筛选采用后退法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料情况 两组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,见表 1。

2.2 两组免疫学指标比较 两组 CD3⁺、DNT% 和 DNT 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 不同 AECOPD 发作频率组免疫学指标比较

两组 CD3⁺、CD4⁺ 比较、DNT% 和 DNT 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 1 两组患者一般资料比较

项目	AECOPD 组	对照组	t/χ^2	P
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	72.92 ± 8.80	71.05 ± 9.64	1.84	0.066
男/女(n/n)	166/86	71/44	0.59	0.442
CHD[$n(\%)$]	94(37.30)	35(30.43)	1.63	0.201
HBP[$n(\%)$]	103(40.87)	59(51.30)	3.49	0.062
ARR[$n(\%)$]	49(19.44)	32(27.83)	3.23	0.073
DM[$n(\%)$]	41(16.27)	24(20.87)	1.15	0.284
HF[$n(\%)$]	26(10.32)	14(12.17)	0.28	0.597
SAS[$n(\%)$]	11(4.36)	5(4.35)	0.00	0.994
BPH[$n(\%)$]	15(5.95)	10(8.69)	0.94	0.333
HLP[$n(\%)$]	27(10.71)	17(14.78)	1.24	0.266
RE[$n(\%)$]	34(13.49)	14(12.17)	0.12	0.728

表 2 两组免疫学指标比较($\bar{x} \pm s$)

项目	水平	t	P
L($\times 10^9/L$)		-6.96	0.000
AECOPD 组	1.37 ± 0.72		
对照组	1.91 ± 0.62		
CD3 ⁺ (%)		-2.13	0.034
AECOPD 组	66.93 ± 12.50		
对照组	69.48 ± 9.68		
CD4 ⁺ (%)		-1.81	0.072
AECOPD 组	39.51 ± 11.33		
对照组	41.53 ± 9.20		
CD8 ⁺ (%)		1.08	0.283
AECOPD 组	25.37 ± 9.90		
对照组	24.35 ± 7.66		
CD4 ⁺ /CD8 ⁺		-0.19	0.837
AECOPD 组	1.89 ± 1.16		
对照组	1.91 ± 0.90		
DNT%(%)		-3.95	0.000
AECOPD 组	2.71 ± 2.00		
对照组	4.01 ± 3.26		
DNT($\times 10^6/L$)		-5.81	0.000
AECOPD 组	25.68 ± 24.42		
对照组	53.15 ± 47.92		
清蛋白(g/L)		6.25	0.000
AECOPD 组	23.62 ± 4.43		
对照组	26.65 ± 4.02		

2.4 AECOPD 患者血浆清蛋白水平与免疫学指标相关性分析 清蛋白水平与 L 总数存在弱相关($P < 0.05$),与 DNT 无明显相关性($P > 0.05$),见表 4。

2.5 二元 Logistic 回归分析 AECOPD 的相关因素 L、CD3⁺、DNT% 与 AECOPD 发作次数有相关性, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表 5。

表 3 不同 AECOPD 发作频率组免疫学指标比较

项目	水平	t	P
L($\times 10^9/L$)		4.22	0.000
低发组	1.51 \pm 0.73		
高发组	1.13 \pm 0.64		
CD3 ⁺ (%)		4.65	0.000
低发组	69.67 \pm 11.37		
高发组	62.41 \pm 13.02		
CD4 ⁺ (%)		2.27	0.024
低发组	40.76 \pm 10.73		
高发组	37.45 \pm 12.04		
CD8 ⁺ (%)		1.64	0.102
低发组	26.16 \pm 9.74		
高发组	24.05 \pm 10.06		
CD4 ⁺ /CD8 ⁺		-0.62	0.537
低发组	1.85 \pm 0.99		
高发组	1.95 \pm 1.41		
DNT(%)		6.53	0.000
低发组	3.25 \pm 2.13		
高发组	1.81 \pm 1.37		
DNT($\times 10^6$)		8.01	0.000
低发组	33.32 \pm 26.25		
高发组	13.06 \pm 13.80		
清蛋白(g/L)		2.05	0.041
低发组	24.07 \pm 4.17		
高发组	22.89 \pm 4.76		

表 4 血浆清蛋白与其他免疫学指标的 Pearson 相关性分析

项目	r	P
L	0.131	0.038
CD3 ⁺	0.009	0.886
CD4 ⁺	0.049	0.438
CD8 ⁺	-0.020	0.753
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.037	0.560
DNT%	0.004	0.953
DNT	0.044	0.484

表 5 AECOPD 发作次数的 Logistic 回归分析

项目	β	S. E.	Wald	P	OR	95%CI	
						下限	上限
L	-0.90	0.24	13.77	0.000	0.41	0.252	0.653
CD3 ⁺	-0.04	0.01	8.90	0.003	0.96	0.940	0.987
DNT%	-0.49	0.11	21.10	0.000	0.61	0.497	0.755
常数	4.35	0.91	22.69	0.000	77.09		

3 讨 论

COPD 发病机制十分复杂, 目前并不完全清楚。研究认为 T 淋巴细胞及其介导的炎性反应参与了 COPD 和肺气肿的发生、发展^[13-14]。T 淋巴细胞亚群中存在的 DNT 具有独特的免疫功能^[15-20]; 有研究证实 COPD 患者的免疫功能状态存在异常^[13], 但其外周血 DNT 的变化规律及在发病中的作用目前却并不清楚。

本研究发现 AECOPD 组和对照组在 L 总数存在差异。T 淋巴细胞亚群检测发现两组外周均存在一定数量的 DNT, 且 AECOPD 组 DNT 的相对比例和绝对值均较对照组有明显降低, 表明两组患者的细胞免疫状态确实存在差异。

按照急性发作频率将 AECOPD 患者分为高发组和低发组, 发现高发组患者的 DNT 相对数、绝对数更低。进一步回归分析发现 DNT 与 AECOPD 的发病存在相关性, 提示 DNT 水平可能与 AECOPD 存在关系, DNT 降低可能导致急性加重的频率增加。已有的研究发现在自身免疫性疾病、肿瘤^[21]、传染性疾病^[22-23]等多种疾病中 DNT 明显增加, 与 AECOPD 患者存在显著不同。DNT 可以抑制免疫细胞及炎性因子, 发挥免疫抑制功能。DNT 在体内调节免疫的作用机制十分复杂。研究发现 DNT 对具有相同 T 细胞受体的特异性 CD8⁺ 和 CD4⁺ 产生抑制作用; DNT 可通过抗原提呈细胞(APC)途径转变成既表达特异性抗原又表达 FasL 的“杀伤”细胞, 并通过其 FasL 将凋亡信号传递给 CD8⁺ 细胞^[4]。有学者认为 CD4⁺、CD8⁺ 及 DNT 均可从 APC 上获得主要组织相容性复合体(MHC)短肽复合物并递呈此抗原肽于其邻近的 T 淋巴细胞, 可能是免疫调节 T 淋巴细胞诱导免疫耐受的中心机制。DNT 在 AECOPD 患者外周血显著降低可能会导致其免疫抑制功能降低, 并引起 AECOPD 患者气道炎症调节的紊乱的持续存在, 可能是 DNT 参与 AECOPD 发生、发展的机制。

AECOPD 组患者血浆清蛋白水平与对照组比较有明显降低, 急性加重高发组患者血浆清蛋白水平比低发组患者低, 提示 AECOPD 患者的血浆清蛋白水平存在异常降低, 并可能与急性加重的发作频率有关。相关分析发现 AECOPD 患者血浆清蛋白水平与淋巴细胞水平存在相关性(P<0.05), 但相关系数仅为 0.131, 而与 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、DNT%、DNT 均无明显相关性。由此可见, AECOPD 患者体液免疫的改变可能是独立于细胞免疫的变化。

综上所述, 本研究发现 AECOPD 患者存在细胞免疫和体液免疫改变, DNT 减少和免疫清蛋白的降低可能是 AECOPD 的一个表现, 并且提示可能是 COPD 急性发作频率高的风险。

参考文献

- [1] ZHANG Z X, YOUNG K, ZHANG L. CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ αβ-TCR⁺ T cell as immune regulatory cell[J]. *J Mol Med*, 2001, 79(8): 419-427.
- [2] 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.
- [3] STROBER S, CHENG L, ZENG D, et al. Double negative (CD4-CD8-αβ⁺) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity[J]. *Immunol Rev*, 1996, 149(1): 217-230.
- [4] ZHANG Z X, YANG L, YOUNG K J, 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.
- [5] XI H, KERSH G J. Sustained early growth response gene 3 expression inhibits the survival of CD4/CD8 double-positive thymocytes[J]. *J Immunol*, 2004, 173(1): 340-348.
- [6] PRIATEL J J, UTTING O, TEH H S. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells[J]. *J Immunol*, 2001, 167(11): 6188-6194.
- [7] YOUNG K J, KAY L S, PHILLIPS M J, et al. Antitumor activity mediated by double-negative T cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 8014-8021.
- [8] 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, 3706.
- [9] 李思聪, 卓宋明. T 淋巴细胞免疫在慢性阻塞性肺疾病急性发作中的影响及相关免疫干预进展 [J]. *临床肺科杂志*, 2015, 20(10): 1898-1901.
- [10] 贾长龙, 隋金华, 鹿志军, 等. 老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者 T 淋巴细胞亚群的变化及免疫干预观察 [J]. *国际呼吸杂志*, 2013, 33(19): 1449-1451.
- [11] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版) [J/OL]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2014, 36(2): 67-80.
- [12] VOGELMEIER C F, CRINER G J, MARTINEZ F J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. Gold executive summary[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(5): 557-582.
- [13] 邱诗林, 钟小宁. 免疫反应在慢性阻塞性肺疾病和肺气肿发生和发展过程中的作用 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2010, 33(4): 789-791.
- [14] SIENA L, GJOMARKAJ M, ELLIOT J, et al. Reduced apoptosis of CD8⁺ T-Lymphocytes in the airways of smokers with mild/moderate COPD [J]. *Respir Med*, 2011, 105(10): 1491-1500.
- [15] LANDOLFI M M, VANHOUTEN N, RUSSELL J Q, et al. CD2⁻ CD4⁻ CD8⁻ lymph-node t-lymphocytes in mrl lpr lpr mice are derived from a CD2⁺ CD4⁺ CD8⁺ thymic precursor[J]. *J Immunol*, 1993, 151(2): 1086-1096.
- [16] TAKAHAMA Y, KOSUGI A, PHENOTYPE S A. Ontogeny, and repertoire of CD4-CD8-T cell receptor αβ⁺ thymocytes; variable influence of self-antigens on T cell receptor Vβ usage [J]. *J Immunol*, 1991, 146(4): 1134-1141.
- [17] ERARD F, WILD M T, GARCIASANZ J A, et al. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4-cells that make TH2 cytokines and help B cells [J]. *Science*, 1993, 260(5115): 1802-1805.
- [18] HAN M, HARRISON L, KEHN P, et al. Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative(CD3⁺ CD4-CD8-) and CD8⁺ T cells [J]. *J Immunol*, 1999, 163(1): 301-311.
- [19] CHEN W, FORD M S, YOUNG K J, et al. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses [J]. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1(5): 328-335.
- [20] FORD M S, ZHANG Z-X, CHEN W, et al. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8⁺ T cell precursors [J]. *J Immunol*, 2006, 177(5): 2803-2809.
- [21] 任林广, 张健, 徐广伟, 等. 肺癌患者外周血 T 细胞亚群与 NK、NKT 细胞检测的临床意义 [J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(10): 1873-1874.
- [22] 梁骑, 焦艳梅, 计云霞, 等. 慢性丙型肝炎患者 DNT 细胞及 T 细胞亚群的研究 [J]. *首都医科大学学报*, 2012, 33(2): 214-217.
- [23] 秦艳, 黄杰, 陈永香, 等. 传染性单核细胞增多症患儿细胞免疫功能变化及意义 [J]. *实验与检验医学*, 2015, 38(3): 2186-2188.

(收稿日期: 2018-05-28 修回日期: 2018-08-11)