

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.16.004  
文章编号: 1005-8982 (2019) 16-0022-05

临床研究·论著

## 双阴性 T 细胞对抗中性粒细胞胞质抗体 相关性血管炎的影响\*

张娜<sup>1</sup>, 郭琿<sup>1</sup>, 罗静<sup>2</sup>

(山西医科大学第二医院 1. 肾内科, 2. 风湿科, 山西 太原 030001)

**摘要: 目的** 分析抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎(AAV)患者外周血中双阴性T细胞(DNT)的表达情况。**方法** 选取50例AAV患者(AAV组),按照疾病活动情况分为活动组36例和缓解组14例;按照有无肾损害分为肾损害组32例和非肾损害组18例。同期招募30例健康志愿者作为对照组。比较AAV组患者与对照组DNT细胞及胞内细胞因子白细胞介素17(IL-17)、白细胞介素4(IL-4)和 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )水平的差异及与患者临床指标的相关性。**结果** AAV组患者DNT、IL-17及IFN- $\gamma$ 水平高于对照组( $P < 0.05$ ),而IL-4低于对照组( $P < 0.05$ )。AAV患者活动组DNT、IL-17水平高于缓解组( $P < 0.05$ )。AAV患者肾损害组DNT和IL-17水平高于非肾损害组( $P < 0.05$ )。AAV患者DNT与红细胞沉降率(ESR)、血清肌酐(Scr)、24h尿蛋白、伯明翰评分、抗中性粒细胞胞质抗体滴度呈正相关( $P < 0.05$ );IL-17与Scr、24h尿蛋白呈正相关( $P < 0.05$ ),而IL-4、IFN- $\gamma$ 与临床指标无相关性( $P > 0.05$ )。**结论** DNT与AAV的发病有相关性。

**关键词:** 抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎;双阴性T细胞;肾损害;细胞因子

**中图分类号:** R543.6

**文献标识码:** A

### Influence of double-negative T cells on ANCA associated vasculitis\*

Na Zhang<sup>1</sup>, Hui Guo<sup>1</sup>, Jing Luo<sup>2</sup>

(1. Department of Nephrology, the Second Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Department of Rheumatology, the Second Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

**Abstract: Objective** To analyze the expression level of double-negative T cells in peripheral blood of patients with ANCA-associated vasculitis (AAV). **Methods** Fifty patients with ANCA-related vasculitis were selected. They were divided into active group ( $n = 36$ ), inactive group ( $n = 14$ ), renal damage group ( $n = 32$ ) and non-renal damage group ( $n = 18$ ). At the same time, thirty healthy volunteers were taken as control group. The levels of DNT cells, IL-17, IL-4 and IFN- $\gamma$  in DNT cells were compared between normal persons and different types of AAV patients. Correlation between the level of DNT cells and the levels of IL-17, IL-4, IFN- $\gamma$  in patients with AAV and clinical indicators were analyzed. **Results** The expression levels of DNT cells and IL-17, IFN- $\gamma$  in AAV patients were higher than those of normal persons, while the level of IL-4 was lower than that of normal persons ( $P < 0.05$ ). The levels of DNT cells and IL-17 in AAV active group were higher than those in non-active group ( $P < 0.05$ ). The levels of DNT cells and IL-17 in AAV patients with renal impairment were higher than those in non-renal impairment patients ( $P < 0.05$ ). In AAV patients, DNT was positively correlated with ESR, creatinine, 24-hour urinary protein and Birmingham score; IL-17 was positively correlated with creatinine and 24-hour urinary protein, while IL-4 and IFN- $\gamma$

收稿日期: 2019-02-22

\* 基金项目: 山西省回国留学人员科研项目 (No: 2017-116)

[通信作者] 郭琿, E-mail: ghty966@126.com; Tel: 15834166336

were not correlated with all clinical indicators. **Conclusions** DNT cells are associated with the incidence of ANCA-associated vasculitis.

**Keywords:** antibodies, antineutrophil cytoplasmic; double negative T cells; kidney injury; cytokines

抗中性粒细胞胞质抗体相关性血管炎 (associated vasculitis, AAV) 是一种累及全身小血管的自身免疫性血管炎, 其特征为坏死性小血管炎性损伤<sup>[1]</sup>。近年来, 对 AAV 的发病机制研究多集中于 CD4<sup>+</sup> T 或 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的紊乱对 AAV 的影响<sup>[2-3]</sup>, 而对 CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T 细胞研究很少。双阴性 T 细胞 (double-negative T cells, DNT) 即 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T 细胞, 是近年新发现的 T 细胞亚群, 其细胞表面不表达 CD4 分子和 CD8 分子, 可分泌多种细胞因子, 在多种疾病中发挥作用<sup>[4]</sup>。本研究通过检测 AAV 患者外周血中 DNT 细胞的比例及其胞内因子白细胞介素 17 (Interleukin-17, IL-17)、白细胞介素 4 (Interleukin-4, IL-4) 及  $\gamma$  干扰素 (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 的水平, 探讨 DNT 在 AAV 发病机制中的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2017 年 9 月—2018 年 9 月山西医科大学第二医院就诊的 50 例 AAV 患者 (AAV 组)。伯明翰评分 <0 分为活动组 34 例, 伯明翰评分 =0 分为缓解组 16 例。活动组: 男性 20 例, 女性 16 例; 年龄 41 岁 (22 ~ 64 岁)。缓解组: 男性 8 例, 女性 6 例; 年龄 43 岁 (23 ~ 66 岁)。按照有无肾损害分为肾损害组 32 例和非肾损害组 18 例。肾损害组: 男性 18 例, 女性 14 例; 年龄 42 岁 (22 ~ 66 岁)。非肾损害组: 男性 10 例, 女性 8 例; 年龄 43 岁 (21 ~ 66 岁)。肾损害组患者经肾穿刺活检证实符合 AAV 肾损害的病理改变。同期招募 30 例健康志愿者作为对照组。其中, 男性 17 例, 女性 13 例。年龄 44 岁 (20 ~ 67 岁)。纳入标准: ① AAV 患者符合 2012 年美国 Chapel Hill 共识会议关于显微镜下多血管炎、肉芽肿性血管炎或嗜酸性肉芽肿性多血管炎的定义及分类标准<sup>[5]</sup>; ② 患者初次诊断为 AAV, 未接受糖皮质激素及免疫抑制治疗。排除标准: ① 严重感染疾病; ② 系统性红斑狼疮、干燥综合征及类风湿关节炎等其他自身免疫性疾病; ③ 血液疾病或最近 2 个月输过血; ④ 恶性肿瘤; ⑤ 重大精神疾病。本研究通过本院伦理委员会批准

(2016KY007), 患者及其家属签署知情同意书。两组年龄、性别比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 1.2 方法

**1.2.1 主要仪器和试剂** 流式细胞仪 FACS Canto II 购自美国 BD 公司, 叶绿素 (PerCP) 标记的 CD3 抗体、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isocyanate, FITC) 标记的 CD4 抗体、藻红蛋白 (P-phycoerythrin, PE) 标记的 CD8 抗体、别藻蓝素 (Allophycocyanin, APC) 标记的 IL-17 抗体、PE 标记的 IL-4 抗体、FITC 标记的 IFN- $\gamma$  抗体、APC 标记的鼠免疫球蛋白 G1 (Immunoglobulin G, IgG1) 同型对照抗体、PE 标记的兔免疫球蛋白 G2b (Immunoglobulin G2b, IgG2b)、k 同型对照抗体、FITC 标记的兔 IgG1、k 同型对照抗体购自美国 BD 公司, 佛波酯和离子霉素购自美国 Sigma 公司, 溶血素购自北京索莱宝科技有限公司。

**1.2.2 细胞培养** 在所有纳入患者知情的前提下, 采集静脉血 2 ~ 3 ml, 并使用肝素抗凝, 与 IMDM 培养基按 1 : 1 充分混匀, 加入 20 ng/ml 佛波酯和 1  $\mu$ mol/L 离子霉素联合刺激; 同时加入 2  $\mu$ mol/L 蛋白质转运抑制剂进行阻断。充分混合后, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5 h。

**1.2.3 细胞染色** 取 100  $\mu$ l 全血于流式管中, 同时加入 PerCP 标记的 CD3、FITC 标记的 CD4 及 PE 标记的 CD8 抗体各 10  $\mu$ l 进行表面染色, 同时设置同型对照管, 室温避光孵育 20 min。加入 1 ml 溶血素, 孵育 10 min, 2 ml 缓冲液洗涤后 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清。再于每管加入 500  $\mu$ l 4% 多聚甲醛进行固定, 20 min 后 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 每管分别加入含 0.1% 皂素的缓冲液 2 ml 进行破膜, 10 min 后 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清。之后进行胞内染色, 加入 APC 标记的 IL-17、PE 标记的 IL-4 及 FITC 标记的 IFN- $\gamma$  抗细胞因子抗体及相应的同型对照抗体各 0.1  $\mu$ l, 孵育 30 min 后用 2 ml 含 0.1% 皂素的缓冲液洗涤, 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清。最后每管加入磷酸缓冲盐溶液 2% 多聚甲醛重悬细胞。

**1.2.4 流式细胞术检测** 完成染色的细胞用流式细胞仪进行检测。每一样品检测 20 000 个细胞, 并使用

FlowJo V.7.6.1 软件进行数据分析。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用  $t$  检验或方差分析, 进一步两两比较用 LSD- $t$  检验, 相关性分析用 Spearman 法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 组 DNT、IL-17、IFN- $\gamma$ 及 IL-4 表达水平比较

活动组、缓解组与对照组 DNT、IL-17、IFN- $\gamma$  及 IL-4 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 活动组及缓解组 DNT、IL-17 及 IFN- $\gamma$  较对照组高 ( $P < 0.05$ ); 而 IL-4 较对照组低 ( $P < 0.05$ ); 活动组 DNT、IL-17 较缓解组高 ( $P < 0.05$ ); 活动组 IL-4、IFN- $\gamma$  与缓解组比较, 差异无统计学意义

( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 肾损害组与非肾损害组 DNT、IL-17、IFN- $\gamma$ 及 IL-4 水平比较

肾损害组与非肾损害组 DNT、IL-17 水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 肾损害组 DNT、IL-17 较非肾损害组高 ( $P < 0.05$ ); 肾损害组与非肾损害组 IL-4、IFN- $\gamma$  比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

### 2.3 AAV 患者 DNT 及胞内因子与临床指标的相关性分析

AAV 患者 DNT 与红细胞沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、伯明翰评分、血清肌酐 (serum creatinine, Scr)、抗中性粒细胞胞质抗体 (ANCA) 滴度 24 h 尿蛋白水平呈正相关 ( $P < 0.05$ ); IL-17 与 Scr、24 h 尿蛋白呈正相关 ( $P < 0.05$ ); 而 IL-4、IFN- $\gamma$  与各项临床指标无相关性 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

表 1 3 组 DNT、IL-17、IFN- $\gamma$  及 IL-4 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	DNT/%	IL-17/ (pg/ml)	IFN- $\gamma$ / (pg/ml)	IL-4/ (pg/ml)
对照组	30	0.953 $\pm$ 0.324	0.853 $\pm$ 0.242	1.052 $\pm$ 0.384	3.025 $\pm$ 0.673
缓解组	16	2.284 $\pm$ 0.475	2.244 $\pm$ 0.471	2.649 $\pm$ 0.556	1.152 $\pm$ 0.712
活动组	34	4.537 $\pm$ 0.852	4.342 $\pm$ 1.183	2.875 $\pm$ 0.675	1.256 $\pm$ 0.328
<i>F</i> 值		267.044	149.004	93.546	97.695
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 肾损害组与非肾损害组 DNT、IL-17、IFN- $\gamma$  及 IL-4 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	DNT/%	IL-17/ (pg/ml)	IFN- $\gamma$ / (pg/ml)	IL-4/ (pg/ml)
肾损害组	32	4.322 $\pm$ 0.842	4.842 $\pm$ 1.183	2.949 $\pm$ 0.556	2.573 $\pm$ 0.857
非肾损害组	18	2.153 $\pm$ 0.328	1.944 $\pm$ 0.471	3.083 $\pm$ 0.663	2.594 $\pm$ 0.465
<i>t</i> 值		10.453	9.924	0.763	0.096
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.449	0.924

表 3 AAV 患者临床指标与 DNT 及胞内因子的相关性分析

指标	DNT		IL-17		IL-4		IFN- $\gamma$	
	<i>r<sub>s</sub></i> 值	<i>P</i> 值						
伯明翰评分	0.403	0.004	0.174	0.227	0.075	0.603	-0.216	0.132
24 h 尿蛋白	0.382	0.006	0.715	0.000	0.097	0.504	-0.084	0.562
Scr	0.415	0.003	0.313	0.027	0.192	0.182	0.162	0.262
C 反应蛋白	0.026	0.860	0.041	0.778	0.168	0.245	-0.136	0.345
ESR	0.623	0.000	0.173	0.230	0.174	0.227	-0.028	0.845
ANCA 滴度	0.342	0.015	0.183	0.203	-0.109	0.451	0.266	0.062
红细胞数	0.258	0.070	0.137	0.342	0.004	0.978	0.180	0.211
白细胞数	0.183	0.203	0.041	0.778	0.145	0.315	0.209	0.146

### 3 讨论

AAV 是一种自身免疫性疾病, 可累及全身的小动脉、小静脉和毛细血管, 进而引起多脏器、多系统损伤, 其中肾脏受累率最高<sup>[1]</sup>。DNT 在多种自身免疫性疾病<sup>[6]</sup>、移植排斥<sup>[7]</sup>、肿瘤免疫<sup>[8]</sup>及感染性疾病<sup>[9]</sup>中发挥重要作用。本研究发现, AAV 活动组患者外周血 DNT 水平高于缓解组和对照组, 提示 DNT 细胞参与 AAV 的发病进程, 并影响疾病的活动度。MARTINA 等<sup>[10]</sup>研究发现, DNT 在早期急性肾损伤患者的外周血中增加, 且沉积于损伤的肾组织中。本实验也证实 AAV 肾损害组 DNT 水平高于非肾损害组, 提示 DNT 与 AAV 肾损害有相关性。

DNT 可通过分泌多种胞因子参与疾病进程<sup>[11]</sup>。一般来说, IL-17 主要由 Th17 细胞分泌, 其能诱导组织中多种炎症细胞因子和趋化因子的表达, 导致中性粒细胞在炎症组织中的浸润, 参与 AAV 的发病进程<sup>[12]</sup>。CRISPÍN 等<sup>[13]</sup>发现, 系统性红斑狼疮患者中, IL-17 主要由 DNT 产生, 并沉积于肾组织中, 促进狼疮肾炎的发病进程。ALUNNO 等<sup>[14]</sup>发现, DNT 在原发性干燥综合征患者外周血中增加, 且 98% ~ 100% DNT 都表达 Th17 细胞的特异性转录因子视黄酸孤儿核受体 (ROR  $\gamma$ t), 并分泌大量 IL-17。本研究也发现, AAV 活动组患者 DNT 分泌的 IL-17 水平较缓解组和对照组升高, 且肾损害组较非肾损害组 IL17 升高, 由此猜测 DNT 可能通过分泌 IL-17 加重疾病进程, 参与肾脏的损害。

一般来说, IFN- $\gamma$  主要由 Th1 细胞产生, 可上调免疫反应, 促进中性粒细胞浸润和局部肉芽肿的形成, 在 AAV 发病机制中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。IL-4 主要由 Th2 细胞产生, 能下调免疫反应, 维持免疫耐受。FISCHER 等<sup>[16]</sup>发现, 刺激 DNT 后其分泌的 IFN- $\gamma$  水平是 CD4<sup>+</sup> T 细胞分泌 IFN- $\gamma$  的 3 ~ 4 倍; MÜLLER 等<sup>[15]</sup>发现, 韦纳肉芽肿患者外周血中 IFN- $\gamma$  的水平升高, IL-4 降低。本实验表明, AAV 患者外周血 DNT 分泌的 IFN- $\gamma$  水平升高, IL-4 减少, 提示 DNT 可能通过诱导 IFN- $\gamma$  及 IL-4 分泌紊乱, 进而促进 AAV 的疾病进程, 同时也使免疫反应向促炎性细胞 Th1 型偏斜。但在活动组与缓解组、肾损害组与非肾损害组的 AAV 患者中, DNT 内 IL-4、IFN- $\gamma$  的水平比较无差异, 猜测 DNT 分泌的 IL-4 和 IFN- $\gamma$  可能只参与 AAV 发病的始动过程, 而对其疾病活动度和肾功能损害无影响。

相关性分析发现, AAV 患者 DNT 与 ESR、伯明翰评分呈正相关, 两者能从整体反映疾病活动度, 猜想 DNT 可影响 AAV 疾病的活动性。而 DNT 及其分泌的 IL-17 与反映肾脏功能的指标, 如 Scr、24 h 尿蛋白水平呈正相关, 提示 DNT 及其分泌的 IL-17 可能参与 AAV 患者的肾脏损害, 也证实本文前述的观点。

综上所述, DNT 在 AAV 的发病机理中起一定作用, 且与肾脏损害关系密切。通过对 DNT 研究可能对 AAV 的诊断、疾病活动程度的监测以治疗提供一定的依据, 但本实验也有一定的局限性, 首先纳入病例的数量相对较少; 同时并未对 DNT 细胞的影响机制进行更深入的探讨, 因此需要后期进行更大规模、更深入的临床研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] HUTTON H L, HOLDSWORTH S R, KITCHING A R. ANCA-associated vasculitis: pathogenesis, models, and preclinical testing[J]. *Semin Nephrol*, 2017, 37(5): 418-435.
- [2] LILLIEBLADH S, JOHANSSON A, PETTERSSON A, et al. Phenotypic characterization of circulating CD4<sup>+</sup> T cells in ANCA-associated vasculitis[J]. *J Immunol Res*, 2018, 22(7): 89-100.
- [3] CHANG J, EGGENHUIZEN P, OSULLIVAN K M, et al. CD8<sup>+</sup> T cells effect glomerular injury in experimental anti-myeloperoxidase GN[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(1): 47-55.
- [4] BRANDT D, HEDRICH C M. TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (double negative) T cells in autoimmunity[J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(4): 422-430.
- [5] JENNETTE J C, FALK R J, BACON P A, et al. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(1): 1-11.
- [6] UEYAMA A, IMURA C, FUSAMAE Y, et al. Potential role of IL-17-producing CD4/CD8 double negative  $\alpha\beta$  T cells in psoriatic skin inflammation in a TPA-induced STAT3C transgenic mouse model[J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 85(1): 27-35.
- [7] ACHITA P, DERVOVIC D, LY D, et al. Infusion of ex-vivo expanded human TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup> double-negative regulatory T cells delays onset of xenogeneic graft-versus-host disease[J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 193(3): 386-399.
- [8] LEE J B, MINDEN M D, CHEN W C, et al. Allogeneic human double negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(2): 370-382.
- [9] MENG Q, CANADAY D H, MCDONALD D J, et al. Productive HIV-1 infection is enriched in CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> double negative (DN) T cells at pleural sites of dual infection with HIV and Mycobacterium tuberculosis[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(1): 181-187.
- [10] MARTINA M N, NOEL S, SAXENA A, et al. Double-negative  $\alpha\beta$  T cells are early responders to AKI and are found in human

- kidney[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(4): 1113-1123.
- [11] 赵欣楠, 王晓非. CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T 细胞与自身免疫性疾病的研究进展 [J]. *医学综述*, 2017, 23(13):2522-2525.
- [12] ZHU S, QIAN Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential[J]. *Clin Sci*, 2012, 122(11): 487-511.
- [13] CRISPÍN J C, OUKKA M, BAYLISS G, et al. 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.
- [14] ALUNNO A, BISTONI O, BOCCI E B, et al. IL-17-producing double-negative T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate the salivary gland and are partially resistant to corticosteroid therapy in patients with Sjögren's syndrome[J]. *Reumatismo*, 2013, 65(4): 192-198.
- [15] MÜLLER A, TRABANDT A, HOFMANN K, et al. Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN- $\gamma$  expression[J]. *J Pathol*, 2000, 192(1): 113-120.
- [16] FISCHER K, VOELKL S, HEYMANN J, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> double-negative regulatory T cells[J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2828-2835.

(唐勇 编辑)