

## 双阴性调节性 T 细胞(DN Tregs) 在系统性红斑狼疮患者外周血中的变化及意义\*

胡 伟,王 森,黄太宏,徐学静,夏永泉

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科,南京 210008)

**摘要:**目的 研究系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者外周血中  $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD}3^+ \text{CD}4^- \text{CD}8^-$  T 细胞即双阴性调节性 T 细胞(double negative regulatory T cells, DN Tregs)的表达水平及功能,并探讨 DN Tregs 在 SLE 疾病进程中的作用。方法 通过流式细胞术检测 20 例 SLE 患者及 20 例健康对照者外周血  $\text{CD}3^+ \text{TCR}\alpha\beta^+$  细胞中 DN Tregs 细胞的比例;采用 ELISA 的方法检测 SLE 患者及健康对照者血浆中 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 和 IL-17A 的表达水平,并分析 DN Tregs 与各细胞因子的相关性。结果 与健康对照组相比, SLE 患者组 DN Tregs 占  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  细胞的比例升高,两组之间差异有统计学意义( $t=3.54, P<0.01$ ), SLE 患者血浆中 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平高于对照组,两组之间差异均具有统计学意义( $t=2.824, 2.085, 2.304$ , 均  $P<0.05$ )。DN Tregs 的水平与 IFN- $\gamma$  的含量呈正相关( $r=0.52, P=0.02$ ),而与 TNF- $\alpha$ , IL-6 的含量无相关性( $r$ 值分别为 0.17 和 0.16,  $P$ 值分别为 0.47 和 0.49)。结论 SLE 患者外周血 DN Tregs 细胞比例显著上升, DN Tregs 细胞可能在 SLE 发病及进展中发挥重要作用。

**关键词:** 系统性红斑狼疮; 调节性 T 细胞;  $\text{CD}4/\text{CD}8$  双阴性 T 细胞

中图分类号: R593.241; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)04-025-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.007

## Change and Clinical Significance of Peripheral Blood DN Tregs in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

HU Wei, WANG Sen, HUANG Tai-hong, XU Xue-jing, XIA Yong-quan

(Department of Clinical Laboratory, Drum Tower Hospital

Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** Objective To study the expression and function of  $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD}3^+ \text{CD}4^- \text{CD}8^-$  T (Double negative regulatory T cells, DN Tregs) in peripheral blood of Systemic lupus erythematosus (SLE) patients, and investigate their function in pathogenesis of SLE. Methods  $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD}4^- \text{CD}8^-$  T cells were quantified as percentage of total  $\text{CD}3^+$  T cells in peripheral blood from 20 SLE patients and 20 healthy controls by flow cytometry. Used ELISA to test the cytokine levels (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A) in the plasma of SLE patients. And analyzed the relationship between the percentage of DN Tregs and cytokines levels. Results The ratio of DN Tregs in  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  T cells was significantly increased in SLE patients compared to healthy donors ( $t=3.54, P<0.01$ ). The levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in plasma of SLE patients were higher than healthy donors ( $t=2.824, 2.085, 2.304, P<0.05$ ). The frequency of DN Tregs was found to correlate with IFN- $\gamma$  ( $r=0.52, P=0.02$ ) but not TNF- $\alpha$  ( $r=0.17, P=0.16$ ) and IL-6 ( $r=0.47, P=0.49$ ). Conclusion This study reveals frequency of DN Tregs in peripheral blood of SLE patients was higher than healthy controls, the frequency of DN Tregs was also found to correlate with IFN- $\gamma$  levels, which means that DN Tregs may play an important role in pathogenesis of SLE.

**Keywords:** SLE; regulatory cell; DN Tregs

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种以大量自身抗体产生并累及多种脏器为特点的自身免疫性疾病,本病多发于育龄女性,临床表现复杂,累及全身各大系统,严重危害人类健康。SLE 的病因至今尚未完全明确,大量研究表明机体免疫系统调节功能紊乱与本病的发病有关<sup>[1,2]</sup>。调节性 T 细胞是一类具有免疫调节功能的 T 细胞亚群,在控制自身免疫反应及维持免

疫耐受方面发挥关键作用<sup>[3]</sup>。根据细胞表面标志、产生细胞因子的不同,调节性 T 细胞分为不同亚类,既往研究较多的一类调节性 T 细胞是  $\text{CD}4^+ \text{CD}25^+ \text{FoxP}3^+$  T 细胞,而  $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD}3^+ \text{CD}4^- \text{CD}8^-$  T 细胞即双阴性 T 细胞(double negative regulatory T cells, DN Tregs)是近年来新发现的一类调节性 T 细胞。正常情况下, DN Tregs 在淋巴细胞中占的比例较低,但在疾病状态下会显著升

\* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助(81601765)。

作者简介:胡 伟(1983—),女,硕士,主管技师,主要从事免疫学研究, E-mail: yf523180@163.com。

通讯作者:夏永泉,男,副主任技师, E-mail: xyq2002xyq@aliyun.com。

高,并在疾病的发病过程中发挥重要作用<sup>[4,5]</sup>。但在SLE发病过程中,DN Tregs的表达及作用尚不明确,为此,本研究检测并分析了SLE患者外周血中DN Tregs细胞的表达及可能的致病作用,现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集2017年3月~5月就诊于南京大学医学院附属鼓楼医院风湿免疫科门诊及住院的系统性红斑狼疮(SLE)患者共20例,SLE诊断均符合美国风湿病学会1997年SLE分类诊断标准。20例SLE患者均为女性,平均年龄34.1岁,健康志愿者20例,均为女性,平均年龄33.5岁,患者组与对照组之间年龄差异无统计学意义。

**1.2 试剂和仪器** CD3(PerCP),CD4(FITC),CD8(APC),TCR $\alpha\beta$ (PE)流式抗体均购于BD公司;红细胞裂解液(BD公司);流式检测所用流式细胞仪(BD公司,Calibur);TNF- $\alpha$ ,IL-6,IFN- $\gamma$  ELISA检测试剂盒(BD公司);IL-17A ELISA试剂盒购自R&D Systems。检测步骤及结果判断均严格按照说明书提供的方法,使用Bio-Rad公司的IMark酶标仪进行酶标板比色判读。

## 1.3 方法

**1.3.1 CD3/TCR $\alpha\beta$ /CD4/CD8的流式检测:**取CD3,TCR $\alpha\beta$ ,CD4,CD8流式抗体各5  $\mu$ l加至流式管管底,将各患者及健康对照者EDTA抗凝全血颠倒混匀,用移液器分别取50  $\mu$ l全血加至流式管中。震荡混匀后室温避光孵育,15 min后加入红细胞裂解液1 ml,室温避光裂解,5 min后,加入3 ml Staining Buffer,1 500 r/min离心5 min洗涤两遍后流式上机检测。

**1.3.2 ELISA检测细胞因子水平:**使用包被缓冲液按1:250的比例稀释包被抗体,计算所需孔数,在Corning板中每孔加入100  $\mu$ l包被液,4℃孵育过夜。甩掉包被液后每孔加入300  $\mu$ l PBST洗涤

3次,再加入200  $\mu$ l封闭液(含10 ml/dl胎牛血清的PBS),室温封闭1 h。准备待测样本及标准品,按说明书溶解及稀释标准品。甩掉封闭液,洗涤3次后分别取100  $\mu$ l待测样本、标准品及阴性对照加入不同孔中,封板并室温孵育2 h。洗涤5次后每孔加入100  $\mu$ l含相应抗体及HRP的工作液,室温孵育1 h。甩去工作液,洗涤7次后,每孔加入100  $\mu$ l显色液,室温避光孵育15 min,观察显色情况,每孔加入100  $\mu$ l终止液。放入酶标仪,使用波长450 nm读取A值。

**1.3.3 流式检测:**使用BD Cellquest软件获取数据,在前向散射光(FSC)及侧向散射光(SSC)点图上大致圈选出淋巴细胞,然后使用CD3设门,进一步在CD3<sup>+</sup>细胞中圈选TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>T细胞,最后在TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>细胞中分析CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>T所占的比例。流式数据分析及作图使用Flowjo软件(Tree Star公司)。

**1.4 统计学分析** 患者组与对照组之间差异比较用Student's *t*检验,当 $P<0.05$ 时为差异有统计学意义。DN Tregs与细胞因子相关性使用Pearson相关性分析。统计学分析及作图使用Graph-Pad Prism5软件完成。

## 2 结果

**2.1 SLE患者组与健康对照组DN Tregs的表达情况** 本研究使用流式细胞术检测了20例SLE患者及20例健康对照外周血中DN Tregs细胞的表达情况,见图1A。依次圈选出CD3<sup>+</sup>及TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>的细胞,并分析CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>细胞所占的比例,图1A上方和下方分别展示的是一例SLE患者及一例健康对照DN Tregs的设门策略。研究发现,与对照组相比,SLE患者组DN Tregs的比例高于对照组,两组之间差异有统计学意义( $t=3.54, P<0.01$ ),见图1B。

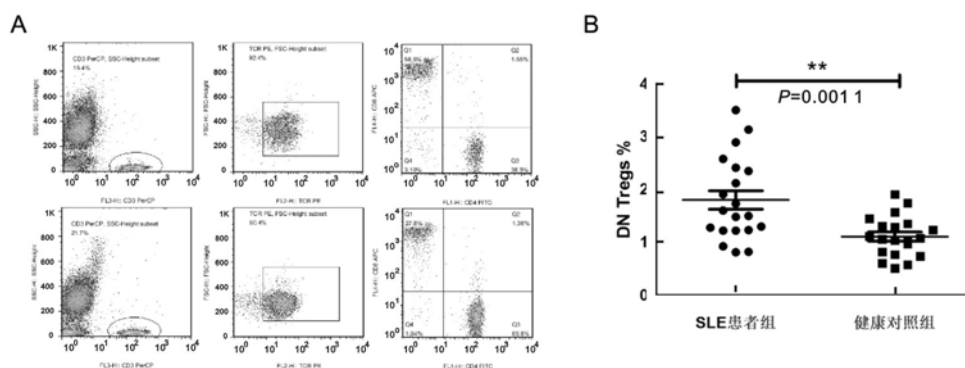


图1 SLE患者组与健康对照组之间DN Tregs表达水平的比较

2.2 SLE患者组与健康对照组血浆中细胞因子的表达情况 见表1。本研究同时使用ELISA的方法分别检测了患者组及对照组外周血浆中细胞因子IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6和IL-17A的含量。SLE患者组血浆中IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6水平高于对照组, 两组之间差异均具有统计学意义( $t=2.824, 2.085, 2.304$ , 均 $P<0.05$ ), 而IL-17A的水平低于检测下限。

2.3 SLE患者DN Tregs与细胞因子间的相关性分析 为研究DN Tregs在SLE发病过程中的临床意义, 本研究分析了DN Tregs的比例与相应患者血浆中细胞因子含量的关系, 结果表明, DN Tregs的水平与IFN- $\gamma$ 的含量具有显著正相关( $r=0.52, P=0.02$ ), 而与TNF- $\alpha$ , IL-6的含量无明显相关性( $r$ 值分别为0.17和0.16,  $P$ 值分别为0.47和0.49), 见图2。

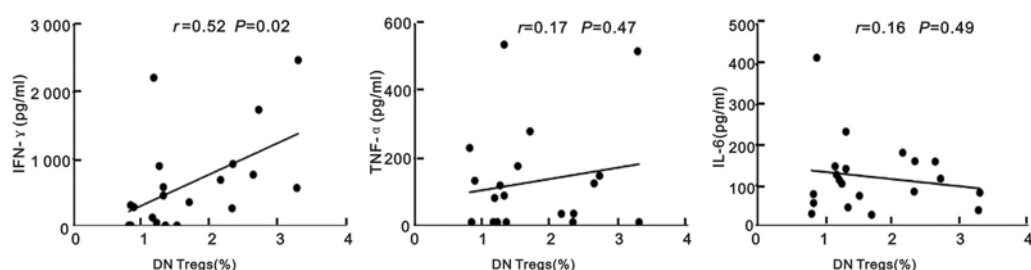


图2 SLE患者DN Tregs比例与细胞因子间的相关性分析

表1 SLE患者组与健康对照组之间血浆中细胞因子水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

项目	患者组( $n=20$ )	对照组( $n=20$ )	$t$	$P$
IFN- $\gamma$	$636.7 \pm 161.3$	$157.8 \pm 52.5$	2.824	$<0.01$
TNF- $\alpha$	$129.4 \pm 35.5$	$49.6 \pm 14.5$	2.085	$<0.05$
IL-6	$120.7 \pm 19.8$	$67.7 \pm 11.7$	2.304	$<0.05$

3 讨论 系统性红斑狼疮(SLE)是一种多发于育龄女性的自身免疫性疾病, 主要免疫特征是多种免疫细胞表达异常, 产生大量自身抗体、释放大量细胞因子、形成免疫复合物等, 最终导致患者多器官功能受损。DN Tregs是近年来被关注的一类新的调节性T细胞亚群, 但其在SLE发病及进展中的作用还不明确。本研究检测了DN Tregs在SLE患者外周血中的表达, 发现与对照组相比DN Tregs占TCR $\alpha\beta^+$ 细胞中的比例显著升高, 本研究同时也检测到SLE患者血浆中多种细胞因子(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6)的表达异常上升, 并且DN Tregs的比例与IFN- $\gamma$ 的含量显著相关。

调节性T细胞是机体诱导和维持自身免疫耐受的重要机制, 同时也在控制移植排斥、肿瘤免疫及变态反应性疾病中发挥关键作用<sup>[3]</sup>。机体的免疫调节性细胞是由多种特殊的细胞亚群构成, CD4 $^+$ CD25 $^+$ FoxP3 $^+$ T细胞是最为经典也是研究最多的一种, 此外CD8 $^+$ CD28 $^-$ T, NKT, TCR $\alpha\beta^+$ CD3 $^+$ CD4CD8 $^-$ T(DN Tregs)也被证实具有免疫抑制作用<sup>[6]</sup>。DN Tregs在人和小鼠外周血中占T细胞的比例较低, 分别为1%~5%和1%~3%, 但在一些疾病进程中DN Tregs会显著上升。研究

表明, 在小鼠模型DN Tregs可以通过对效应T细胞的直接杀伤抑制CD4 $^+$ CD8 $^+$ T细胞介导的免疫应答, Yang等<sup>[7]</sup>人的研究表明, 人的DN Tregs细胞也具有类似的效应。关于DN Tregs的来源, 有观点认为可能是胸腺组织中 $\alpha\beta^+$ T细胞通过某种途径逃脱了胸腺的阴性选择和阳性选择, 也有观点认为DN Tregs可以不需要在胸腺组织中生长, 可由CD4 $^+$ T细胞转化而成。DN Tregs发挥免疫调节作用主要通过以下途径: ①通过分泌IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 等细胞因子作用于靶细胞; ②通过Fas/FasL途径诱导靶细胞凋亡; ③通过颗粒酶、穿孔素途径直接杀伤靶细胞<sup>[8]</sup>。

国内的一些研究检测了强直性脊柱炎、银屑病、SLE等自身免疫性疾病中CD3 $^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ 双阴性T细胞的表达情况<sup>[9~11]</sup>, 但这些研究中的DN Tregs由于未检测TCR $\alpha\beta^+$ 的表达, 可能混杂有其他的细胞亚群, 并不是真正的DN Tregs细胞。国内外关于SLE中DN Tregs表达的研究较少, 本研究发现SLE患者外周血中DN Tregs显著高于对照组, 由于DN Tregs可能通过产生IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 和IL-6这些细胞因子发挥作用, 本研究也检测了患者血浆中这几种细胞因子的表达, 结果表明IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 和IL-6都显著升高, 这也与以往的研究相符<sup>[12]</sup>, 而这3种细胞因子已被证实在SLE致病中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。DN Tregs虽属于调节性T细胞, 并被认为是可通过多种机制抑制机体的免疫反应<sup>[6]</sup>, 可能在疾病过程中起到一定的保护作用, 但也有研究认为DN Tregs可通过产生IFN- $\gamma$ , IL-

17等在疾病过程中发挥致病作用<sup>[13]</sup>。本研究发现DN Treg的比例和IFN- $\gamma$ 呈正相关,但DN Tregs在SLE发病中具体起致病作用还是保护作用还有待更深入的研究加以证实。

综上所述,本研究检测了SLE患者外周血中DN Tregs的表达情况,发现SLE患者DN Tregs显著上升,并与患者血浆中IFN- $\gamma$ 的含量相关。这些结果表明DN Tregs可能在SLE疾病进程中发挥重要作用,但具体是保护作用还是致病作用还有待进一步研究。本研究进一步加深了对SLE发病机制及DN Tregs作用的认识,并为寻找新的SLE治疗靶点及治疗药物提供理论及实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2005, 17(5): 518-522.
- [2] 宋宏岩,王红,李雷,等. 系统性红斑狼疮患者并发EB病毒或巨细胞病毒感染的回顾性分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(1): 144-146.  
Song HY, Wang H, Li L, et al. Retrospective analysis of epstein barr virus or cytomegalovirus infection in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Mod Lab Med*, 2016, 31(1): 144-146.
- [3] Pellerin L, Jenks JA, Begin P, et al. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy[J]. *Immunol Res*, 2014, 58(2/3): 358-368.
- [4] 贺少龙,许莲蓉. DN Treg细胞的研究新进展[J]. *国际移植与血液净化杂志*, 2010, 8(2): 10-13.  
He SL, Xu LR. The advances in DN Tregs[J]. *International Journal of Transplantation and Hemopurification*, 2010, 8(2): 10-13.
- [5] Thomson CW, Lee BP, Zhang L. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators[J]. *Immunol Res*, 2006, 35(1/2): 163-178.
- [6] 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]. *国际病理科学与临床杂志*, 2007, 27(2): 93-99.  
Huang LF, Yao YM. T cells in the suppression of immune responses[J]. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2007, 27(2): 93-99.
- [7] Yang MH, Suen JL, Li SL, et al. Identification of T-cell epitopes on U1A protein in MRL/lpr mice: double-negative T cells are the major responsive cells[J]. *Immunology*, 2005, 115(2): 279-286.
- [8] 杨仁保,陈炯. DN Treg细胞发挥免疫调节机制的研究进展[J]. *国际外科学杂志*, 2012, 39(11): 777-780.  
Yang RB, Chen J. Progress of immune regulation mechanism of DN Treg cell on immunotherapy[J]. *International Journal of Surgery*, 2012, 39(11): 777-780.
- [9] 尤海燕,郑东海,裴影影,等. SLE患者外周血CD3+CD16+CD56+NK T细胞和CD3+CD4-CD8-DN T细胞的流式细胞分析及意义[J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(1): 11-13.  
You HY, Zheng DH, Qiu YY, et al. Analysis and significance of CD3+CD16+CD56+natural killer T cells and CD3+CD4-CD8-double negative T cells from peripheral blood using flow cytometry in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2013, 31(1): 11-13.
- [10] 袁伟,崔刘福,宋海澄,等. 强直性脊柱炎患者外周血CD4-CD8-双阴性T细胞的检测及意义[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2017, 20(1): 44-48.  
Yuan W, Cui LF, Song HC, et al. The significance of double negative T cells in patients with ankylosing spondylitis[J]. *Chinese Journal of Coal Industry Medicine*, 2017, 20(1): 44-48.
- [11] 郑昭璟,胡少龙,王美燕,等. 银屑病外周血CD3+CD(16+56)+NK T细胞和CD3+CD4-CD8-双阴性T细胞显著减少[J]. *检验医学*, 2010, 25(7): 573-575.  
Zheng SJ, Hu SL, Wang MY, et al. Decreasing of peripheral blood CD3+CD(16+56)+NK T cells and CD3+CD4-CD8-double negative T cells in patients with psoriasis [J]. *Laboratory Medicine*, 2010, 25(7): 573-575.
- [12] 王森,黄太宏,高硕,等. 系统性红斑狼疮患者乙型肝炎病毒感染的分析研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(1): 41-43.  
Wang S, Huang TH, Gao S, et al. Prevalence of hepatitis B virus infection in systemic lupus erythematosus patients[J]. *J Mod Lab Med*, 2016, 31(1): 41-43.
- [13] Crispin JC, 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.

收稿日期:2017-05-23

修回日期:2017-06-30