

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.16.020

严重细菌感染患者外周血 DNT 淋巴细胞检测及其临床价值

曾 文,龙亚男,钱 净,唐树荣,田 敏,赵明洁,太继琼,吕 甜,胡大春[△]

云南省昆明市第一人民医院/昆明医科大学附属甘美医院检验科,云南昆明 650011

摘 要:目的 探讨严重细菌感染患者外周血 CD4⁺CD8⁻ 双阴性 T 淋巴细胞(DNT 淋巴细胞)的表达水平及其在细菌感染中的作用。**方法** 选取 2014 年 1 月至 2017 年 3 月该院血培养阳性且临床明确诊断为严重细菌感染的 87 例患者纳入研究组,其中 40 例血培养转阴时间 ≥ 7 d 者为 A 组,47 例转阴时间 < 7 d 者为 B 组;选取 30 例该院健康体检者作为健康对照组。采用流式细胞术对 3 组人群外周血免疫细胞:CD3⁺T 淋巴细胞比例、CD4⁺T 淋巴细胞比例、CD8⁺T 淋巴细胞比例、自然杀伤(NK)细胞比例、B 淋巴细胞比例、DNT 淋巴细胞比例,以及 CD4⁺/CD8⁺ 进行检测与对比分析。**结果** (1)A 组和 B 组患者 CD3⁺T 淋巴细胞比例、CD8⁺T 淋巴细胞比例显著低于健康对照组,CD4⁺/CD8⁺ 显著高于健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);(2)A 组患者的 DNT 淋巴细胞比例高于 B 组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);(3)A 组 B 淋巴细胞比例显著高于 B 组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);(4)B 组 NK 细胞比例高于 A 组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** T 淋巴细胞亚群、B 淋巴细胞和 NK 细胞水平变化均影响严重细菌感染患者病原体清除效率,其中 DNT 淋巴细胞可能参与了对 CD4⁺T 淋巴细胞免疫应答的抑制过程,不利于机体对病原体的清除。检测外周血 DNT 淋巴细胞对患者治疗方案的调整有一定的参考价值。

关键词:细菌感染; CD4⁺CD8⁻ 双阴性 T 淋巴细胞; 免疫应答**中图法分类号:**R446.11**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)16-2339-04

Detection of peripheral blood double negative T lymphocytes and its clinical value in patients with severe bacterial infection

ZENG Wen, LONG Yanan, QIAN Jing, TANG Shurong, TIAN Min, ZHAO Mingjie,
TAI Jiqiong, LYU Tian, HU Dachun[△]

Department of Clinical Laboratory, Kunming Municipal No. 1 People's Hospital / Affiliated Ganmei
Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650011, China

Abstract: Objective To investigate and analyze the expression level of CD4⁺CD8⁻ double negative T lymphocytes (DNT lymphocytes) and its role in bacterial infection for the patients with serious bacterial infections. **Methods** Eighty-seven cases of serious bacterial infections by blood culture positive and clinical diagnosis in this hospital from January 2014 to March 2017 were chosen into the research group. Among them, 40 cases with blood culture negative conversion ≥ 7 d served as the group A and 47 cases with blood culture negative conversion < 7 d served as the group B. Thirty individuals undergoing the physical examination in this hospital were selected as the control group. The peripheral blood immune cells were detected by flow cytometry, including the proportions of CD3⁺T lymphocytes, CD4⁺T lymphocytes, CD8⁺T lymphocytes, NK lymphocytes, B lymphocytes, DNT lymphocytes, and CD4⁺/CD8⁺. **Results** (1) The proportions of CD3⁺T lymphocytes and CD8⁺T lymphocytes in the group A and B were significantly lower than those in the healthy control group. The CD4⁺/CD8⁺ was significantly higher than that in the healthy control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); (2) the proportion of DNT lymphocytes in the group A was higher than that in the group B and healthy control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); (3) the proportion of B lymphocytes in the group A was significantly higher than that in the group B and healthy control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); (4) the proportion of NK lymphocytes was the group B higher than group A and healthy control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The balance of T lymphocytes, and changes of B lymphocytes and NK lymphocytes affect the efficiency of pathogens clearing in the patients with severe bacterial infection, in which DNT lymphocytes may participate in the inhibiting effect on CD4⁺T lymphocytes immune response and

is not conducive to the body to clear the pathogens. Clinical detection of peripheral blood DNT lymphocytes has a certain reference value for adjusting the treatment scheme of the patients.

Key words: bacterial infection; $CD4^+CD8^-$ double negative T lymphocytes; immune response

感染性疾病的发生与发展依赖于机体与病原菌的相互作用。临床治疗效果不仅是抗感染药物治疗的结果,而且机体免疫调节机制也发挥了不可缺少的作用。在临床诊疗观察中发现,不少细菌感染患者在相同抗感染治疗措施下却表现出不同的疗效,其中宿主免疫调节可能发挥了重要作用。但机体的免疫调节机制复杂多样,哪些机制参与了这些过程,值得临床研究。30 多年前, $CD4^+CD8^-$ 双阴性 T 淋巴细胞(DNT 淋巴细胞)由 DAVIGNON 等^[1]首次偶然发现,但至今其来源和功能仍不清楚。新近在各个领域的研究认为,DNT 是正常淋巴细胞中一类数量极少(1%~5%)的细胞,具有免疫抑制功能^[2-5]。也有研究指出,DNT 淋巴细胞甚至具有抑制肿瘤生长的作用^[6]。然而,这种细胞是否在严重细菌感染疾病过程中扮演角色,临床治疗中检测此类细胞是否具有价值,目前尚不明确。本文就此方面问题进行了初步探讨,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2017 年 3 月本院收治的严重细菌感染患者 87 例纳入研究组,其中菌血症 10 例(男 4 例、女 6 例,中位年龄 60 岁),败血症 71 例(男 40 例、女 31 例,中位年龄 66 岁),脓毒血症 6 例(男 4 例、女 2 例,中位年龄 45 岁)。所有研究对象血培养阳性,结合临床表现分别确诊为菌血症、败血症、脓毒血症,并在抗菌药物治疗过程中间隔 2~3 d 进行 1 次血培养,观察血液细菌转阴情况。排除标准:严重细菌感染并发自身免疫性疾病、恶性肿瘤、血液疾病或最近两个月有输血治疗者。研究组分组:A 组为患者血培养转阴时间 ≥ 7 d 者,40 例;B 组为患者血培养转阴时间 < 7 d 者,47 例。随机选取 30 例来本院健康体检未发现异常者作为健康对照组。

1.2 研究对象的伦理学控制措施 本文的研究方法为临床回顾性研究,研究未涉及不利于患者利益的措施;所有患者临床特征及实验室检测数据来源于研究对象的临床病历资料,并向患者说明了所取资料的用途,对患者进行保密性承诺,获得了患者的知情同意;所有健康体检者知晓研究的内容,并签署了知情同意书。

1.3 仪器与试剂 采用贝克曼库尔特公司生产的 FC-500 流式细胞仪检测外周血免疫细胞。采用法国梅里埃公司生产 BACT/ALERT3D-240 全自动血培养仪及其配套试剂进行血培养。免疫细胞检测试剂:荧光标记抗体组合试剂 $CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5$ 、 $CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/$

$CD3-PC5$ 、标准荧光微球(flowcheck)及室内质控品均为贝克曼库尔特公司产品;FACS 溶血剂为 BD 公司产品。

1.4 方法 外周血免疫细胞检测:空腹采集肝素锂抗凝静脉血 2 mL,24 h 内完成处理和检测。避免使用严重溶血、黄疸和脂血标本。免疫细胞标记:取 10 μ L 荧光抗体与 100 μ L 抗凝血标本在流式细胞检测管中混匀,室温避光孵育 30 min,加入溶血剂工作液 1 mL,避光溶血 15 min,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL 磷酸盐缓冲液重悬细胞,混匀后采用流式细胞仪进行检测,采用 4 色分析, $CD45-SS$ 设门。

1.5 观察指标 外周血免疫细胞: $CD3^+$ T 淋巴细胞比例、 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例、 $CD8^+$ T 淋巴细胞比例、 $CD4^+/CD8^+$ 、B 淋巴细胞比例、DNT 淋巴细胞比例、自然杀伤(NK)细胞比例。

1.6 免疫细胞检测结果质量保证措施 免疫细胞检测前使用 flowcheck 评估仪器状态,检测室内质控品,评价结果在控后方进行检测。

1.7 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行分析。正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析;非正态分布计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 T 淋巴细胞亚群的变化 A 组和 B 组患者 $CD4^+$ T 淋巴细胞比例与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);A 组和 B 组患者 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞比例显著低于健康对照组($P < 0.05$), $CD4^+/CD8^+$ 显著高于健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组 DNT 淋巴细胞的变化 A 组患者的 DNT 淋巴细胞比例高于 B 组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);但 B 组和健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 各组 B 淋巴细胞的变化 A 组患者 B 淋巴细胞比例显著高于 B 组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);但 B 组与健康对照组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.4 各组 NK 细胞的变化 NK 细胞比例在严重细菌感染患者中 B 组高于 A 组和健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);但 A 组与健康对照组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.5 不同组别严重细菌感染患者血培养时间比较 A 组患者血培养转阴时间为 (8.9 ± 2.1) d,明显高于

B 组 $[(4.7\pm1.0)\text{d}]$,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 严重细菌感染患者与健康对照者各指标的变化

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ T 淋巴细胞 比例($\bar{x}\pm s, \%$)	CD4 ⁺ T 淋巴细胞 比例($\bar{x}\pm s, \%$)	CD8 ⁺ T 淋巴细胞比例 [$M(P_{25}, P_{75})$ 或 $\bar{x}\pm s, \%$]	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ [$M(P_{25}, P_{75})$ 或 $\bar{x}\pm s$]
A 组	40	60.0 $\pm$ 15.0 [*]	33.5 $\pm$ 10.0	13.9(10.4, 2.4) [*]	2.1(1.5, 3.5) [*]
B 组	47	59.0 $\pm$ 16.2 [*]	37.2 $\pm$ 12.5	18.4(10.4, 24.8) [*]	2.2(1.7, 3.5) [*]
健康对照组	30	67.1 $\pm$ 5.6	35.6 $\pm$ 7.2	27.5 $\pm$ 5.9	1.4 $\pm$ 0.6
<i>F/Z</i>		3.451	1.348	23.842	20.951
<i>P</i>		0.035	0.264	0.000	0.000

组别	<i>n</i>	DNT 淋巴细胞比例[$M(P_{25}, P_{75}), \%$]	B 淋巴细胞比例[$M(P_{25}, P_{75}), \%$]	NK 细胞比例[$M(P_{25}, P_{75}), \%$]
A 组	40	8.7(5.8, 11.9) ^{*#}	19.6(14.7, 31.8) ^{*#}	11.1(8.6, 19.5) [#]
B 组	47	2.5(1.8, 3.2)	14.0(10.1, 22.5)	20.2(15.2, 25.5) [*]
健康对照组	30	3.1(1.3, 5.9)	12.8(11.3, 14.7)	13.9 $\pm$ 3.7
<i>F/Z</i>		48.914	17.066	24.128
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

注:与健康对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 B 组比较,[#] $P<0.05$

3 讨 论

在细菌感染过程中,天然免疫细胞(中性粒细胞、单核巨噬细胞、NK 细胞)和免疫应答(体液免疫和细胞免疫)在宿主的免疫防御机制中发挥重要作用。对于胞外菌感染,吞噬作用(中性粒细胞、单核巨噬细胞)、补体激活以及体液免疫是最重要的防御机制,CD4⁺T 淋巴细胞也发挥了重要的辅助作用。对于胞内菌感染,特异性细胞免疫起主要作用,在适应性免疫应答之前,NK 细胞发挥重要的一线防御作用。上述免疫防御效能的差异决定着宿主细菌感染的进展与结局。严重细菌感染是临床常见的疾病。病原菌耐药机制的不断增加,带来了日益严峻的治疗难题和经济负担。人类当前正在寻求除抗菌药物以外的其他治疗策略,其中对患者的免疫调节辅助治疗是一种重要途径。通过对严重细菌感染患者机体免疫防御状态的分析,有助于通过免疫调节治疗,促进患者抵御病原菌,改善病情,提升疗效。本研究结果显示,与健康对照者比较,严重细菌感染患者机体免疫防御状态呈现以下特点:

(1)外周血 NK 细胞增加,其中血培养转阴时间 $<7\text{ d}$ 者 NK 细胞增加更加显著。NK 细胞是天然免疫细胞,在细菌感染细胞后,通过被感染细胞表达的 NK 细胞配体或激活树突状细胞和巨噬细胞分泌白细胞介素(IL)-12 激活,发挥杀伤被感染细胞和病原体的作用。同时 NK 细胞通过分泌 γ -干扰素(IFN- γ)促进巨噬细胞的吞噬功能。本研究结果提示,严重细菌感染免疫过程中 NK 细胞的一线防御效能被提升,即 NK 细胞增加显著者血培养转阴时间短于 NK 细胞增加不显著者。

(2)外周血中,介导特异性体液免疫应答的主要

组分 B 淋巴细胞显著增加。在病原菌感染后,体内 B 淋巴细胞通过 B 细胞抗原受体识别抗原,活化增殖与分化,转变为浆细胞,产生针对病原菌的特异性抗体。后者通过抑制病原菌黏附、调理中性粒细胞和巨噬细胞的吞噬作用、中和细菌毒素、与补体联合溶菌、辅助抗体依赖性的细胞毒作用等发挥抵御病原菌的作用。本研究结果提示,严重细菌感染免疫过程中,B 淋巴细胞介导的上述体液免疫防御功能显著加强,但这种加强与体内病原菌存在时间有关(血培养转阴时间 $\geq 7\text{ d}$ 和 $<7\text{ d}$ 的患者 B 淋巴细胞比例差异有统计学意义)。由于本研究病例数有限,该现象有待于进一步研究证实。

(3)A 组和 B 组患者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞比例与健康对照者差异无统计学意义($P>0.05$),但 CD8⁺T 淋巴细胞比例显著降低,CD4⁺/CD8⁺显著升高。机体抵抗病原菌感染过程中,CD4⁺T 淋巴细胞可识别 MHC II 类分子提呈的病原菌抗原肽,并活化为辅助性 T 淋巴细胞,分泌多种细胞因子,参与对病原菌的抵御;CD8⁺T 淋巴细胞可识别 MHC I 类分子提呈病毒感染后在细胞内产生的病毒性抗原,活化并分化为杀伤性 T 淋巴细胞,通过穿孔素/颗粒酶或 Fas 与 FasL 作用途径杀伤感染的细胞,从而抵御病原体。本研究结果提示,严重细菌感染状态下,患者体内抵抗病毒感染的能力也随之降低,治疗过程中,应预防病毒侵袭机体。

(4)特别值得关注的是,严重细菌感染患者 DNT 淋巴细胞比例在血培养转阴时间 $\geq 7\text{ d}$ 的患者中为 8.7%,显著高于转阴时间 $<7\text{ d}$ 的患者和健康者,也高于既往文献[7]的健康人水平。自 DNT 淋巴细胞被发现以来,研究者初步认为其能抑制 CD4⁺T 淋巴

细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞的增殖,并能下调高度活化的、具有细胞因子产生能力的效应 T 淋巴细胞^[7-8]。但其在机体免疫平衡中的具体作用尚不清楚。近年来,国内外学者对此进行了深入研究。LI 等^[9]的研究提示,体外转化的 DNT 淋巴细胞具有抑制活化 B 淋巴细胞的作用。WU 等^[10]的研究发现,DNT 淋巴细胞可通过效应分子纤维蛋白原样蛋白 2 对小鼠暴发性病毒性肝炎的转归起作用。HEDRICH 等^[11]的研究显示,在健康和疾病状态下,cAMP 反应元件调制器 α 可反式抑制跨膜糖蛋白 CD8,并有助于 DNT 淋巴细胞的产生。CONG 等^[12]的研究发现,IL-2 可增强 DNT 淋巴细胞增殖和免疫抑制调节功能。在疾病状态下 DNT 淋巴细胞的表现方面,LING 等^[13]的研究显示,白塞氏病患儿外周血 DNT 淋巴细胞增加。赵雪等^[14]发现,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、脑膜炎等患者,且增高幅度以急性扁桃体炎患者更显著。

综合以上研究信息,笔者推测,在严重细菌感染状态下,患者 DNT 淋巴细胞升高,而本应提升防御能力的 CD4⁺ T 淋巴细胞得不到有效增加,实质上降低了患者免疫应答机制对病原菌的清除能力,致使病原菌在患者血液中持续存在。而 DNT 淋巴细胞比例保持不变者,机体的免疫应答机制能够发挥正常的抵御作用,患者在抗菌药物和机体的防御机制综合作用下,在较短的时间内可清除病原菌。本研究结果还提示,检测感染患者外周血 DNT 淋巴细胞比例,有助于针对患者的自身免疫抵御能力,适当调整抗菌药物的使用剂量和使用时间,为临床合理使用抗菌药物提供线索。但本研究病例数有限,并且在血培养转阴时间的基础上还应综合考虑其他影响研究对象免疫状态的因素,如细菌感染程度、机体免疫力、抗菌药物使用强度等。未来还应进一步完善研究,证实以上推论。

参考文献

- [1] DAVIGNON J L, COHEN P L, EISENBERG R A. Rapid T cell receptor modulation accompanies lack of in vitro mitogenic responsiveness of double negative T cells to anti-CD3 monoclonal antibody in MRL/Mp-lpr mice[J]. J Immunol, 1988, 141(6): 1848-1854.
- [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] ZHANG Z K, YOUNG K, ZHANG L, et al. CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ $\alpha\beta$ -TCR⁺ T cell as immune regulatory cell[J]. J Mol Med, 2001, 79(8): 419-427.
- [4] LEE J, 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.
- [5] BRANDT D, HEDRICH C M. TCR $\alpha\beta^+$ CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ (double negative) T cells in autoimmunity[J]. Autoimmun Rev, 2018, 17(4): 422-430.
- [6] XU H, ZHU X X, CHEN J, et al. DNT cell inhibits the growth of pancreatic carcinoma via abnormal expressions of NKG2D and MICA in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469(2): 145-50.
- [7] VOELKL S, GARY R, MACKENSEN A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta^+$ CD4⁻ CD8⁻ double-negative T cells[J]. Euro J Immunol, 2011, 41(3): 739-748.
- [8] KIM E Y, JUVET S C, ZHANG L, et al. Regulatory CD4⁻ CD8⁻ double negative T cells[J]. Methods Mol Biol, 2011, 677(1): 85-98.
- [9] LI W, TIAN Y, LI Z, GAO J, et al. Ex vivo converted double negative T cells suppress activated B cells[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20(1): 164-169.
- [10] WU D, WANG H, YAN W, et al. A disparate subset of double-negative T cells contributes to the outcome of murine fulminant viral hepatitis via effector molecule fibrinogen-like protein 2[J]. Immunol Res, 2016, 64(2): 518-530.
- [11] HEDRICH C M, RAUEN T, CRISPIN J C, et al. cAMP-responsive element modulator α (CREM α) trans-represses the transmembrane glycoprotein CD8 and contributes to the generation of CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ T cells in health and disease[J]. J Biol Chem, 2013, 288(44): 31880-31887.
- [12] CONG M, LIU T, TIAN D, et al. Interleukin-2 enhances the regulatory functions of CD4⁺ T Cell-Derived CD4⁻ CD8⁻ double negative T Cells[J]. J Interferon Cytokine Res, 2016, 36(8): 499-505.
- [13] LING E, SHUBINSKY G, PRESS J. Increased proportion of CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ double-negative T cells in peripheral blood of children with Behcet's disease[J]. Autoimmune Rev, 2007, 6(4): 237-240.
- [14] 赵雪, 吴娟娟, 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): 3702-3704.

(收稿日期: 2018-12-20 修回日期: 2019-02-22)