

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2026.05.002

✦基础医学研究✦

低压缺氧致急性高原肺水肿大鼠双阴性 T 细胞的表型与功能变化

马佳雪^{1,2}, 马秀敏², 苏昭泉², 孔维娜², 董玲玲³, 李德伟³, 魏雪梅^{1,2,3}

(新疆医科大学, 1. 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室; 2. 附属肿瘤医院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆维吾尔自治区人民医院呼吸与危重症医学中心, 新疆 乌鲁木齐 830063)

【摘要】目的: 研究低压缺氧所致急性高原肺水肿大鼠双阴性 T 细胞(DNT)表型和功能变化, 探讨以 DNT 细胞作为治疗或缓解高原肺水肿的潜能。**方法:** 建立常氧对照组(NC)、低压缺氧组(HH), 利用流式细胞术分析两组大鼠肺组织中 DNT 细胞比例、表型(CD44、CD62L)和功能(IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10)变化。建立 HH 和 HH+TNF- α 组, 通过流式细胞术进一步分析 TNF- α 对低压缺氧大鼠肺组织和脾脏中 DNT 细胞分化、表型和功能的影响。通过转输 DNT 细胞, 分析 DNT 细胞治疗 HAPE 的潜力。**结果:** HH 组大鼠肺组织 DNT 细胞比例为(1.43 \pm 0.20)%, 低于 NC 组(1.75 \pm 0.28)% ($P<0.05$)。HH 组 DNT 细胞表型(CD44、CD62L)和部分细胞因子水平(IFN- γ 、TNF- α 、IL-4)与 NC 组差异无统计学意义($P>0.05$), 而 IL-10 水平(2.29 \pm 0.20)% 较 NC 组(1.57 \pm 0.22)% 升高($P<0.05$)。通过向 HH 组大鼠体内注射 TNF- α , 发现 HH+TNF- α 组肺中 DNT 细胞 CD44 表达水平(36.22 \pm 2.44)较 HH 组(29.75 \pm 3.29)升高($P<0.05$), 而两组肺和脾脏中 DNT 细胞比例、CD62L 表达及细胞因子水平(IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10)差异无统计学意义($P>0.05$)。通过转输 DNT 细胞, HAPE 大鼠肺损伤程度减轻。**结论:** 低压缺氧抑制 DNT 细胞分化并促进 IL-10 分泌, 并不受到 TNF- α 的调控。相较于 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞, DNT 细胞在低压缺氧条件下分泌较低水平的 IFN- γ 和 TNF- α 及较高水平的 IL-4 和 IL-10。通过转输 DNT 细胞, 在一定程度上缓解了 HAPE, 表明 DNT 细胞具有减轻炎症并缓解肺水肿的潜力。

【关键词】 高原肺水肿; 低压缺氧; 双阴性 T 细胞; 白细胞介素 10

【中图分类号】 R594.3

【文献标志码】 A

The study on the phenotype and functional changes of double-negative T cells in rats with acute high altitude pulmonary edema induced by hypobaric hypoxia

MA Jia-xue^{1,2}, MA Xiu-min², SU Zhao-quan², KONG Wei-na², DONG Ling-ling³, LI De-wei³, WEI Xue-mei^{1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Xinjiang Medical University; 2. Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang; 3. Respiratory and Critical Care Medicine Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830063, Xinjiang, China)

【Abstract】Objective: To investigate the phenotype and functional changes of double negative T cells (DNT) in rats with acute high altitude pulmonary edema induced by hypobaric hypoxia, and to explore the potential of DNT cells as treatment or relief for high altitude pulmonary edema. **Methods:** Normoxic control (NC) and hypobaric hypoxia (HH) groups were established. The proportion, phenotype (CD44, CD62L) and function (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10) of DNT cells in lung tissues of rats in NC and HH group were analyzed by flow cytometry. The HH group and HH + TNF- α group were established, and the effects of TNF- α on the differentiation, phenotype and function of DNT cells in lung tissue and spleen of hypobaric hypoxia rats were further analyzed by flow cytometry. Finally, the potential of DNT cell therapy for HAPE was analyzed by adoptive transfer of DNT cells. **Results:** The proportion of DNT cells in lung tissue of rats in HH group was (1.43 \pm 0.20)%, which was statistically significant compared with that in NC group (1.75 \pm 0.28)% ($P<0.05$). Further detection showed that there was no significant difference in DNT cell phenotype (CD44, CD62L) and some cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-4) between the HH

基金项目: 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题资助项目(SKL-HIDCA-2024-GY3); 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2024D01C340); “天山英才”医药卫生高层次人才培养计划(TSYC202301A047)

作者简介: 马佳雪(2002-), 女, 硕士研究生。E-mail: 1638459248@qq.com

通讯作者: 魏雪梅, 博士。E-mail: weixuemei@163.com。

group and the NC group ($P > 0.05$). However, the level of IL-10 of DNT cells in NC group (2.29 ± 0.20) % was higher than that in NC group (1.57 ± 0.22) % ($P < 0.05$). By injecting TNF- α into rats in HH group, it was found that the expression level of CD44 in DNT cells in the lungs of HH+TNF- α group (36.22 ± 2.44) was higher than that of HH group (29.75 ± 3.29) ($P < 0.05$). However, there were no significant differences in DNT cell proportion, CD62L expression and cytokine levels (IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-10) in lung and spleen between the two groups ($P > 0.05$). Furthermore, the degree of lung injury in HAPE rats was alleviated by adoptive transfer of DNT cells. **Conclusion:** Hypobaric hypoxia inhibits DNT cell differentiation and promotes IL-10 secretion, which is not regulated by TNF- α . When compared with CD4⁺ and CD8⁺ T cells, DNT cells secrete lower levels of IFN- γ and TNF- α , and higher levels of IL-4 and IL-10 under hypobaric and hypoxia conditions. Moreover, the adoptive transfer of DNT cells alleviated HAPE to a certain extent. These results suggest that DNT cells have the potential to reduce inflammation and relieve pulmonary edema.

【Key words】 High altitude pulmonary edema; Hypobaric hypoxia; Double negative T cell; Interleukin-10

高原肺水肿 (high altitude pulmonary edema, HAPE) 是一种高原特发性肺水肿, 属于急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)。该病发病迅猛, 是高原病致死的常见原因, 其特征为由低海拔地区快速攀升至 2 500 m 及以上高海拔地区后出现的呼吸困难、咳嗽和发热^[1]。随着高海拔地区旅游业和登山活动的发展, HAPE 发病总数也在持续上升^[2]。HAPE 对冒险进入高海拔地区的个人健康构成重大风险。目前, HAPE 的主要治疗手段为物理治疗 (下降到低海拔、补充氧气) 和药物治疗 (硝苯地平)^[3]。虽然这些措施已极大缓解了 HAPE, 但物理手段并不适用于所有场合。此外, 硝苯地平等药物治疗效果有限, 部分患者会产生较严重的副作用^[1]。亟待找寻具有潜力能够更有效缓解 HAPE 且副作用较小的新药或治疗手段。研究^[4-5]发现, HAPE 患者血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) 水平升高。HAPE 大鼠肺组织中缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 信号通路激活, 炎症细胞 (巨噬细胞、中性粒细胞) 浸润程度增加、细胞因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 和细胞黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 表达增加, 提示 HAPE 中缺氧和炎症具有相关性^[6-7]。因此, 抗炎治疗可能是缓解 HAPE 的有效手段。双阴性 T 细胞 (double negative T cell, DNT) 是一种独特的细胞亚群, 表达 CD3, 但不表达 CD4 和 CD8^[8]。DNT 细胞在外周血及组织中仅占 T 细胞亚群的 1%~5%, 同时具有先天性和适应性免疫功能, 这与 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞不同^[9-10]。目前研究^[11-15]发现, 利用 DNT 细胞能够预防自身免疫病、移植物抗宿主病以及缺血性脑卒中, 表明其具有免疫抑制作用。然而, 既往文献^[16-17]也表明 DNT 细胞具有促炎作用。因此, DNT 细胞在低压缺氧条件下的功能变化及其能否作为一种免疫手段缓解 HAPE 仍待研究。本试验主要研究 DNT 细胞的分化、表型及功能变化, 探讨

利用 DNT 细胞治疗 HAPE 的可能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 体质量为 (250 \pm 25) g 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自新疆医科大学实验动物中心。大鼠被随机分为 4 组: 常氧对照组 (normoxic control, NC)、低压缺氧组 (hypobaric hypoxia, HH)、HH+TNF- α 组、HH+DNT 组。在造模前 3 d 置于新疆军区总医院新疆特殊环境医学重点实验室动物中心进行适应性喂养。本研究经新疆医科大学实验动物伦理委员会审核与批准 (20240514-185)。

1.1.2 主要试剂 PE/Cyanine7 anti-rat CD3、PE anti-rat CD62L、Alexa Fluor 647 anti-rat IFN- γ 、APC anti-mouse/rat TNF- α 、PE anti-rat IL-4、Alexa Fluor 700 anti-rat CD45、FITC-anti rat CD161 均购自 BioLegend 公司; BV605 anti-rat CD4、BV510 anti-rat CD8、BV421 anti-rat CD44、PE anti-rat IL-10 均购自 BD Biosciences 公司; 大鼠 TNF- α 购自 MCE 公司, IL-10-ELISA 试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HAPE 模型建立 将 SD 大鼠置于西北特殊环境人工实验仓中 3 d, 仓内模拟高度设置为 6 000 m, 并以 10 m/s 的速度上升。72 h 后即能成功建立 HAPE 大鼠模型。

1.2.2 大鼠肺单细胞分离 颈椎脱臼处死大鼠, 打开胸腔取出肺组织, 称重后将肺组织剪碎。每 500 mg 肺组织中添加 5 mL 消化液 (RPMI 1640: 胶原酶 IV: 脱氧核糖核酸酶 I=35:4:1) 并于 37 $^{\circ}$ C 振荡消化 (220 r/min, 60 min)。用注射器活塞柄在 200 目钢网上研磨肺组织, 并将细胞悬液通过 200 目尼龙网过滤至 15 mL 离心管。离心 (2 000 r/min, 5 min)、弃上清并加入 3 mL 红细胞裂解液重悬细胞, 在冰上孵育 12 min。加入 12 mL PBS 离心, 弃

上清并加入 1 mL PBS 重悬,将细胞悬液转至新 15 mL 离心管备用。

1.2.3 大鼠脾脏单细胞分离 根据文献^[18]报道的方法,用注射器活塞研磨脾脏,将研磨液通过 200 目尼龙网过滤到 15 mL 离心管,离心(2 000 r/min, 5 min)收集细胞沉淀。添加适量红细胞裂解液,冰上孵育 12 min 以去除红细胞,PBS 洗涤和重悬后用于后续实验。

1.2.4 腹腔注射 TNF- α 用 ddH₂O 溶解 TNF- α 冻干粉,配置成 500 μ g/mL 的母液。根据每只大鼠注射 10 μ g TNF- α 取出相应液体量,并用 ddH₂O 定容至 500 μ L 的工作液。将工作液通过 1 mL 注射器注射进大鼠腹腔中。该实验从大鼠进仓前 1 d 开始,以 1 次/d 的频率维持到造模结束。

1.2.5 流式细胞术 DNT 细胞表面染色 取肺或脾脏单细胞悬液,离心、弃上清并加入小鼠血清重悬,4 $^{\circ}$ C 避光 30 min。加入配置好的抗体进行标记,30 min 后用 PBS 洗涤、重悬并上机检测。

1.2.6 流式细胞术 DNT 细胞内细胞因子染色 取肺或脾脏单细胞悬液,离心、弃上清并加入配置好的含 cocktail 的培养基重悬,于 CO₂ 培养箱中培养 4 h。根据上述方法进行细胞表面染色,并依据试剂说明书进行细胞固定、破膜。加入配置好的内标抗体,室温孵育 45 min,PBS 洗涤、重悬并上机检测。

1.2.7 DNT 细胞过继转移 从正常大鼠肺中分离单细胞,利用抗体标记 DNT 细胞(CD45⁺、CD3⁺、CD161⁻、CD4⁻、CD8⁻),并通过流式细胞分选仪分选 DNT 细胞。将分选出来的 DNT 细胞通过尾静脉注射的方式提前 1 d 输入到准备造模的大鼠体内。每只大鼠转移 5 \times 10⁶ 个 DNT 细胞。

1.2.8 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色 取出大鼠一半左肺,在 4%多聚甲醛中固定 48 h。经脱水、包埋后,制备 4 μ m 的肺组织切片。梯度脱水后分别用苏木素和伊红染色,1%盐酸乙醇分化,以观察肺组织形态。

1.2.9 肺干湿重比 取出大鼠右肺并称重,用锡纸包好后放于 65 $^{\circ}$ C 烘箱中 24 h,再次称重,计算肺干湿重比。

1.2.10 ELISA 取出大鼠一半左肺,称重后将组织切成小块。取出 100 mg 肺组织,与相应体积的 PBS(1:9)一起加入组织匀浆器充分匀浆。离心并收集上清液,用 ELISA 试剂盒检测 IL-10 水平。

1.3 统计学分析

利用 FlowJoTM v10.6 进行流式数据分析,SPSS 软件进行统计学分析,GraphPad Prism 8 进行图表制作。计量资料用($\bar{x}\pm s$)描述,组间比较采用独立样本

t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低压缺氧组大鼠肺 DNT 细胞表型变化

造模结束后,通过流式细胞术检测 CD45⁺、CD3⁺、CD161⁻、CD4⁻、CD8⁻ DNT 细胞表型变化。低压缺氧组大鼠肺 DNT 细胞比例(1.43 \pm 0.20)% 低于常氧对照组(1.75 \pm 0.28)%($P<0.05$) (图 1A);HH 组肺 CD44⁺ DNT 细胞比例(49.09 \pm 6.85)%与 NC 组(57.45 \pm 9.52)%比较,差异无统计学意义($P>0.05$) (图 1B-C);HH 组肺 CD62L⁺ DNT 细胞比例(8.36 \pm 3.84)%与 NC 组(6.87 \pm 3.41)%比较,差异无统计学意义($P>0.05$) (图 1D-E)。

2.2 低压缺氧组大鼠肺 DNT 细胞功能变化

HH 组肺 IFN- γ + DNT 细胞比例(1.52 \pm 0.64)%与 NC 组(1.67 \pm 0.68)%比较,差异无统计学意义($P>0.05$) (图 2A-B);HH 组肺 IL-4 + DNT 细胞(1.61 \pm 0.36)%比例与 NC 组(1.14 \pm 0.55)%比较,差异无统计学意义($P>0.05$) (图 2C-D);此外,HH 组肺 TNF- α + DNT 细胞比例(2.64 \pm 0.62)%较 NC 组(2.10 \pm 0.34)%也无统计学差异($P>0.05$) (图 2E-F)。然而,HH 组肺 IL-10 + DNT 细胞比例(2.29 \pm 0.20)%高于 NC 组(1.57 \pm 0.34)%($P<0.05$) (图 2G-H)。

2.3 TNF- α 干预后低压缺氧组大鼠肺和脾脏 DNT 细胞表型变化

HH + TNF- α 组肺和脾 DNT 细胞分别为(2.31 \pm 1.15)%、(2.66 \pm 0.92)% ,与 HH 组肺(2.24 \pm 0.42)%和脾(3.84 \pm 0.41)% DNT 细胞比较,差异均无统计学意义($P>0.05$) (图 3A);HH + TNF- α 组肺 CD44⁺ DNT 细胞比例(36.22 \pm 2.44)%较 HH 组(29.75 \pm 3.29)%升高($P<0.05$),而脾 CD44⁺ DNT 细胞比例(41.40 \pm 4.44)%与 HH 组(38.55 \pm 7.64)%比较,差异无统计学意义($P>0.05$) (图 3B-C);同时,HH + TNF- α 组肺和脾 CD62L⁺ DNT 细胞比例分别为(20.63 \pm 8.38)%、(23.53 \pm 6.22)% ,分别与 HH 组肺(25.78 \pm 6.70)%和脾(29.33 \pm 6.19)% CD62L⁺ DNT 细胞比较,差异均无统计学意义($P>0.05$) (图 3D-E)。

2.4 TNF- α 干预后低压缺氧组大鼠肺和脾脏 DNT 细胞功能变化

HH + TNF- α 组肺 DNT 细胞分泌 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 、IL-10 的比例分别为(0.83 \pm 0.59)%、(1.34 \pm 0.53)%、(2.36 \pm 1.05)%、(2.80 \pm

0.46)%，与 HH 组 (0.47 ± 0.40)%、(1.39 ± 0.38)%、(2.18 ± 0.59)%、(2.59 ± 0.83)% 比较，差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4A-H)；同时，HH + TNF- α 组脾 DNT 细胞分泌 IFN- γ 、IL-4、TNF- α 、IL-10 的比例分别为 (0.20 ± 0.08)%、

(1.46 ± 0.18)%、(1.35 ± 0.29)%、(2.38 ± 0.39)%，与 HH 组 (0.28 ± 0.14)%、(1.40 ± 0.46)%、(1.16 ± 0.13)%、(2.32 ± 0.51)% 比较，差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4A-H)。

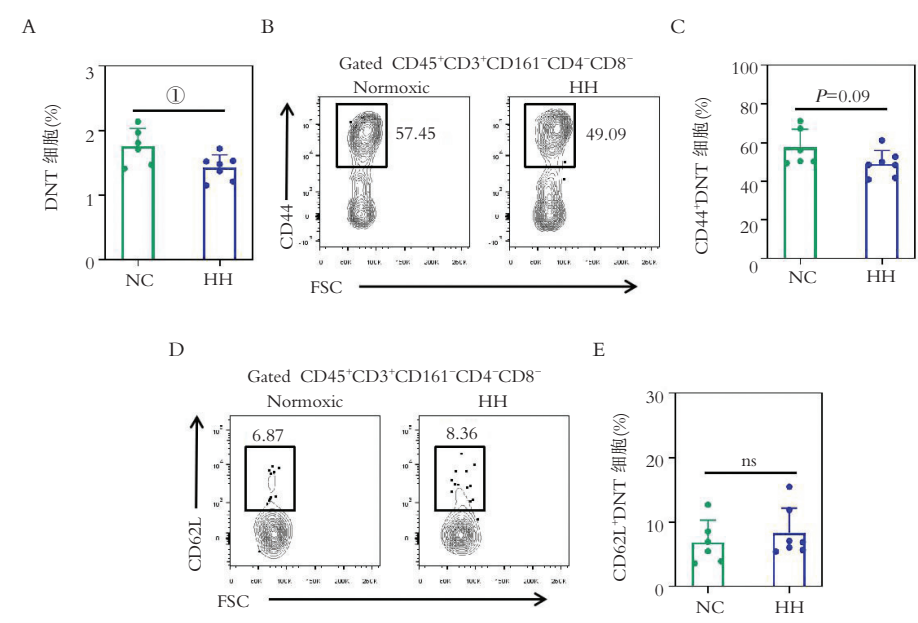


图 1 低压缺氧组大鼠肺 DNT 细胞表型变化

A. DNT 细胞百分比; B. CD44⁺ DNT 细胞代表性流式图; C. CD44⁺ DNT 细胞百分比;
D. CD62L⁺ DNT 细胞代表性流式图; E. CD62L⁺ DNT 细胞比例。① $P < 0.05$; ns $P > 0.05$ 。

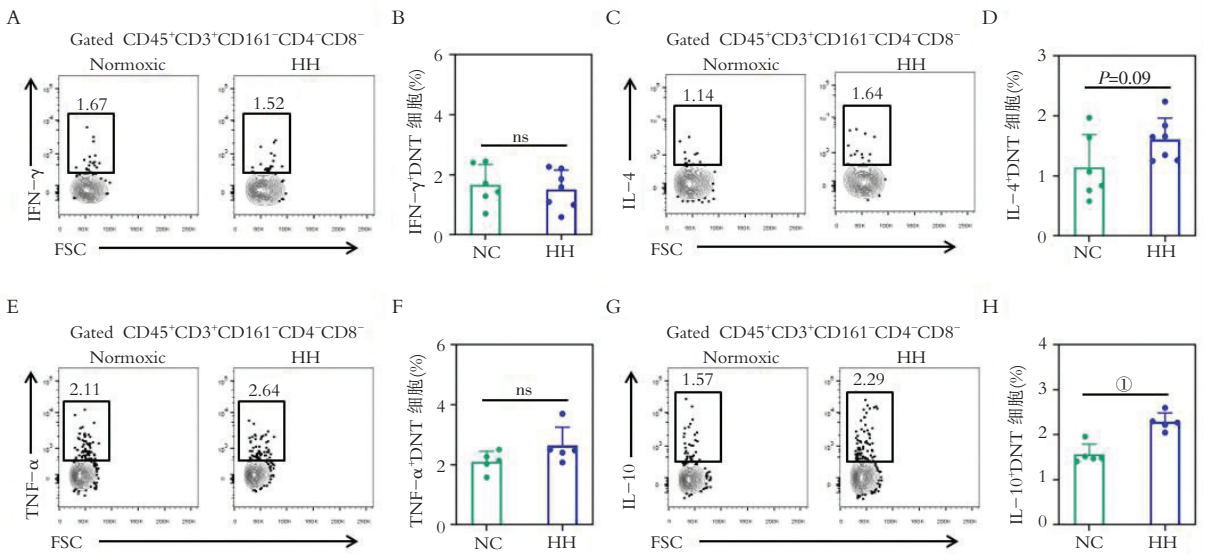


图 2 低压缺氧组大鼠肺 DNT 细胞功能变化

A. IFN- γ ⁺ DNT 细胞代表性流式图; B. IFN- γ ⁺ DNT 细胞百分比; C. IL-4⁺ DNT 细胞代表性流式图; D. IL-4⁺ DNT 细胞百分比; E. TNF- α ⁺ DNT 细胞代表性流式图; F. TNF- α ⁺ DNT 细胞百分比; G. IL-10⁺ DNT 细胞代表性流式图; H. IL-10⁺ DNT 细胞百分比。① $P < 0.05$; ns $P > 0.05$ 。

2.5 低压缺氧组大鼠肺 DNT 细胞与 CD4 和 CD8⁺ T 细胞的功能比较

比较 DNT 细胞与 CD4 和 CD8⁺ T 细胞产生细胞因子的能力，能够明确这些细胞亚群相对趋向促

炎还是抑炎状态。HH 组肺 DNT 细胞与 CD4⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 能力的比值分别为 (0.75 ± 0.50)、(0.53 ± 0.09)、(1.54 ± 0.37)、(1.77 ± 0.46)；CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 、

IL-4、IL-10 能力的比值分别为(0.30±0.10)、(1.30±0.61)、(1.60±0.27)、(6.69±2.08)。DNT 细胞与 CD4⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的能力比值显著高于 DNT/CD8 组($P<0.05$),分泌 TNF- α 和 IL-10 的能力显著低于 DNT/CD8 组(均 $P<0.05$)。此外,DNT 细胞与 CD4⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 的能力的比值更接近 1。这些结果提示 DNT 细胞的功能与 CD4⁺ T 细胞更为相似。见图 5A-D。

2.6 DNT 细胞过继转输对 HAPE 进展的影响

为进一步阐明 DNT 细胞治疗 HAPE 的潜力,

将分选出的 DNT 细胞转输进大鼠体内,随后建立 HAPE 模型。HE 染色发现,转输 DNT 细胞的大鼠肺损伤程度减轻,主要表现为部分肺泡间隔变窄和肺泡壁变薄(图 6A)。转输 DNT 细胞的大鼠肺干湿比重为(17.55±0.48)%,与未转输组(16.92±0.66)%比较,差异无统计学意义($P>0.05$) (图 6B)。转输 DNT 细胞组大鼠肺部 IL-10 浓度为(13.86±1.46),与未转输组(12.20±0.67)比较,差异无统计学意义($P>0.05$) (图 6C)。

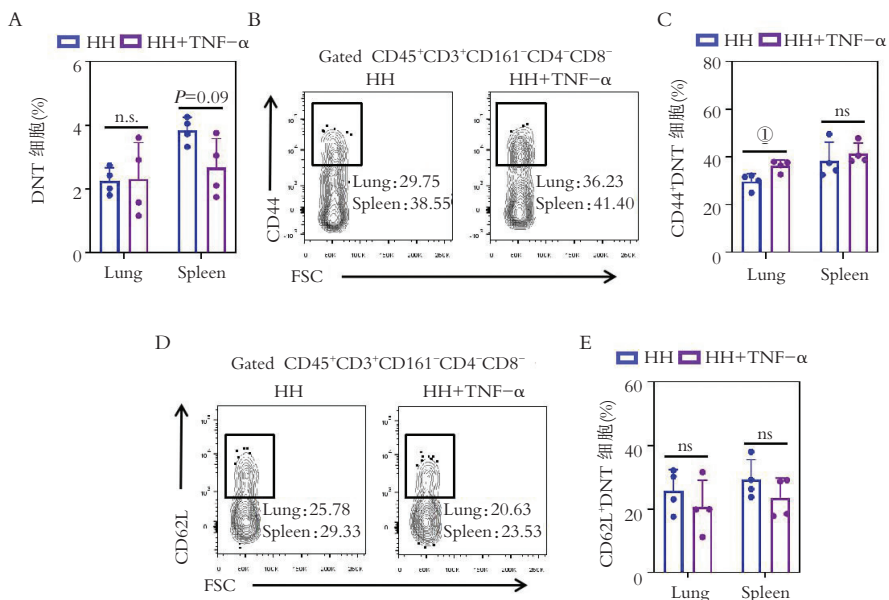


图3 TNF- α 干预后低压缺氧组大鼠肺和脾脏 DNT 细胞表型变化

A. DNT 细胞百分比;B. CD44⁺ DNT 细胞代表性流式图;C. CD44⁺ DNT 细胞百分比;D. CD62L⁺ DNT 细胞代表性流式图;E. CD62L⁺ DNT 细胞比例。① $P<0.05$;ns $P>0.05$ 。

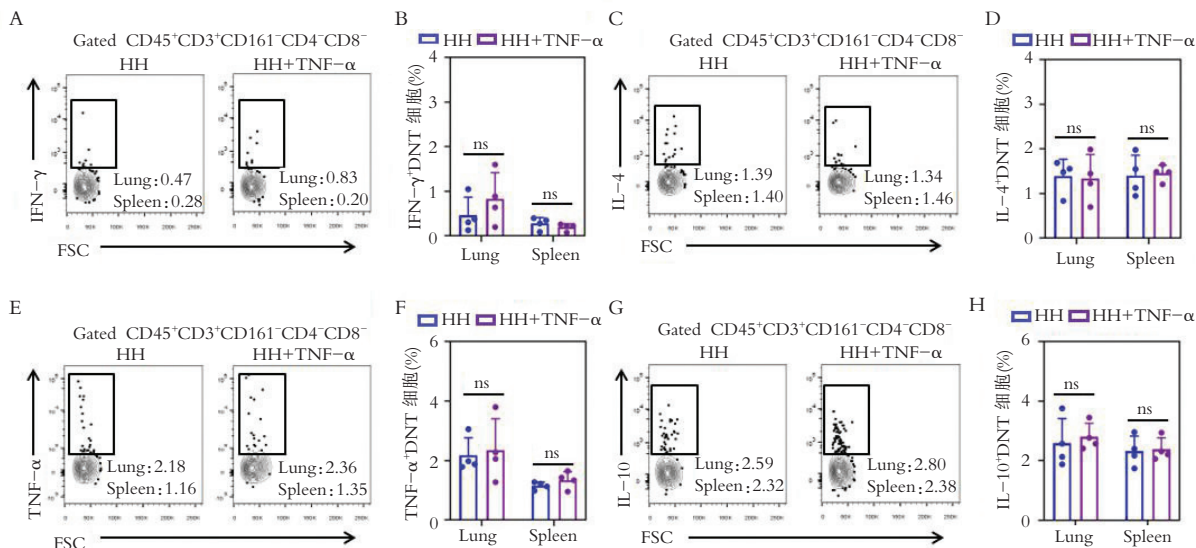


图4 TNF- α 干预后低压缺氧组大鼠肺和脾脏 DNT 细胞功能变化

A. IFN- γ ⁺ DNT 细胞代表性流式图;B. IFN- γ ⁺ DNT 细胞百分比;C. IL-4⁺ DNT 细胞代表性流式图;D. IL-4⁺ DNT 细胞百分比;E. TNF- α ⁺ DNT 细胞代表性流式图;F. TNF- α ⁺ DNT 细胞百分比;G. IL-10⁺ DNT 细胞代表性流式图;H. IL-10⁺ DNT 细胞百分比。ns $P>0.05$ 。

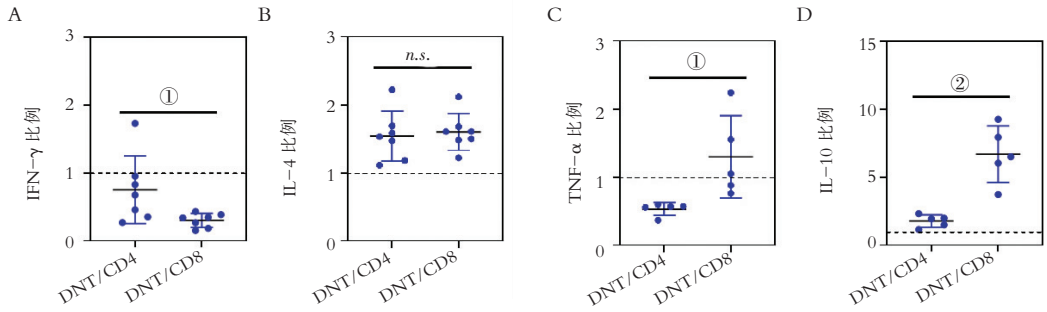


图 5 低压缺氧组大鼠肺 DNT 细胞与 CD4 和 CD8⁺ T 细胞的功能比较

A. DNT 细胞与 CD4 和 CD8⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 的比值; B. DNT 细胞与 CD4 和 CD8⁺ T 细胞分泌 IL-4 的比值; C. DNT 细胞与 CD4 和 CD8⁺ T 细胞分泌 TNF- α 的比值; D. DNT 细胞与 CD4 和 CD8⁺ T 细胞分泌 IL-10 的比值。① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$; ns $P > 0.05$ 。

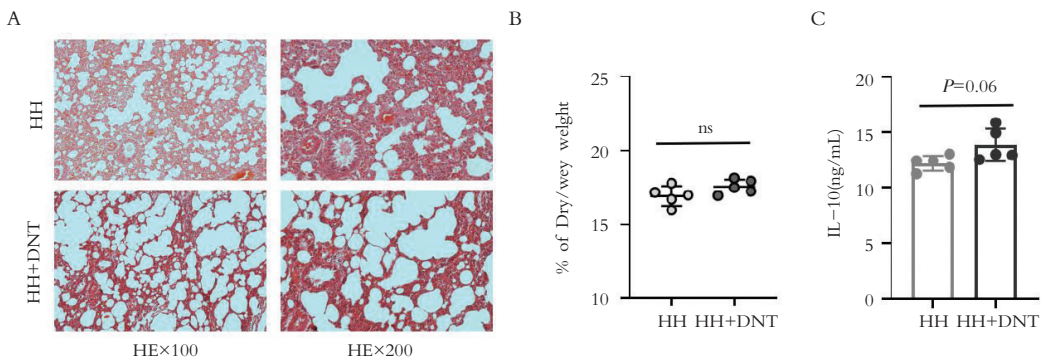


图 6 DNT 细胞过继转移对 HAPE 进展的影响

A. HAPE 大鼠肺部切片代表图像; B. HAPE 大鼠肺干湿比重变化; C. HAPE 大鼠肺部 IL-10 水平变化。ns $P > 0.05$ 。

3 讨论

HAPE 是一种非心源性肺水肿, 炎症并不是其主要病因^[19]。然而, 研究^[20-22]发现, 机体炎症水平升高能够增加内皮细胞通透性并加重 HAPE, 抑制炎症则能够使其得到缓解, 表明通过降低体内炎症水平从而缓解或治疗 HAPE 具有潜力。

DNT 细胞已被证实能够在多种疾病中调节免疫功能^[11-17]。该细胞存在多种亚型, 其中以免疫抑制型为主^[8, 23]。研究^[24-29]证实, DNT 细胞由 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞共同发育而来, 但分别具有抑制和促炎两种截然不同的作用。在该研究中, 低压缺氧抑制 HAPE 大鼠肺 DNT 细胞分化(图 1 A)。这表明低压缺氧可能有利于 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞维持其表型。为了进一步研究低压缺氧对 HAPE 中 DNT 细胞具体调节机制, 功能分析显示, HAPE 大鼠肺 DNT 细胞产生抗炎细胞因子(IL-4、IL-10)的能力有所增加(图 2)。一项研究^[30]证实, 在肺部缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)中, DNT 细胞产生更高水平的 IL-10, 转输 DNT 细胞能够减少 IRI 中的间质性水肿。这些结果共同提示, DNT 细胞具有治疗 HAPE 的潜力。

前期报道^[19-22]表明, HAPE 患者或动物模型

中体内炎症细胞因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)升高, 但其对 DNT 细胞分化和功能影响尚不明确。TNF- α 是引起肺水肿的一个重要细胞因子, 其升高能够降低肺内皮细胞中连接蛋白的表达和激活凋亡信号通路, 从而增加内皮细胞通透性并诱导肺水肿^[21, 31]。本研究^[32]发现, 注射 TNF- α 促进 DNT 细胞表达 CD44。CD44 被认为是效应 T 细胞的标志。然而, TNF- α 并不影响低压缺氧诱导 HAPE 大鼠模型中肺和脾 DNT 细胞产生 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 及 IL-10 的能力, 证明 HAPE 大鼠模型 DNT 细胞产生更多 IL-10 并非由 TNF- α 介导。目前, 并未有报道表明 IL-10⁺ DNT 细胞分化的具体机制, 明确该机制将更有助于 HAPE 的治疗。

CD4⁺、CD8⁺ T 细胞中的一些亚群也能够抑制炎症反应。研究^[30]表明, 转输 DNT 细胞减轻间质性水肿的效果较转输 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞更好。本研究同样显示, DNT 细胞的免疫抑制作用较 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞更强, 且转输 DNT 细胞后 HAPE 有所缓解(图 5-6), 进一步证实了未来利用 DNT 细胞治疗 HAPE 的可能。此外, 在组织损伤的小鼠中, 中性粒细胞缺陷使巨噬细胞浸润减少和 DNT 细胞数量增加, 导致组织炎症水平降低^[33]。这提供了一个新的视角, 即通过改变其他细胞类型

的数量和功能,促进肺中 DNT 细胞募集,从而降低 HAPE 患者肺部炎症水平,恢复内皮细胞屏障功能,最终缓解 HAPE。

综上,现有结果提示通过 DNT 细胞缓解肺水肿十分具有潜力。在现有工作基础上,进一步利用缺陷小鼠研究 DNT 细胞分化机制,或通过 DNT 细胞进行联合治疗,能够为 HAPE 治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Tenzing D, Suolang P, Gesang D, *et al.* Effect of furosemide in the treatment of high-altitude pulmonary edema[J]. *BMC Pulmonary Medicine*, 2024, 24(1): 109.
- [2] Nuss R. Medical conditions and high-altitude travel[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2022, 386(19): 1866.
- [3] Stream JO, Grissom CK. Update on high-altitude pulmonary edema: pathogenesis, prevention, and treatment[J]. *Wilderness & Environmental Medicine*, 2008, 19(4): 293–303.
- [4] Nourkami-Tutdibi N, Küllmer J, Dietrich S, *et al.* Serum vascular endothelial growth factor is a potential biomarker for acute mountain sickness[J]. *Frontiers in Physiology*, 2023, 14: 1083808.
- [5] Ran YH, Zhang DX, Xiao ZH, *et al.* Changes of VEGF, TNF- α , IL-6 and NO in serum of patients with HAPE[J]. *Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi*, 2011, 27(2): 201–203.
- [6] El Alam S, Pena E, Aguilera D, *et al.* Inflammation in pulmonary hypertension and edema induced by hypobaric hypoxia exposure[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(20): 12656.
- [7] Shi J, Liu Z, Li M, *et al.* Polysaccharide from *Potentilla anserina* L ameliorate pulmonary edema induced by hypobaric hypoxia in rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 139: 111669.
- [8] Wu Z, Zheng Y, Sheng J, *et al.* CD3⁺CD4(-)CD8(-) (double-negative) T cells in inflammation, immune disorders and cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 816005.
- [9] 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.
- [10] Tian D, Yang L, Wang S, *et al.* Double negative T cells mediate Lag3-dependent antigen-specific protection in allergic asthma[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4246.
- [11] Zhang ZX, Yang L, Young KJ, *et al.* Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression[J]. *Nature Medicine*, 2000, 6(7): 782–789.
- [12] Young KJ, Zhang L. The nature and mechanisms of DN regulatory T-Cell mediated suppression[J]. *Human Immunology*, 2002, 63(10): 926–934.
- [13] Zhang ZX, Ma Y, Wang H, *et al.* Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, fas-fas ligand-independent pathway[J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 177(10): 6920–6929.
- [14] Tian D, Pan Y, Zhao Y, *et al.* TCR $\alpha\beta^+$ NK_{1.1}⁻CD4⁻CD8⁻ double-negative T cells inhibit central and peripheral inflammation and ameliorate ischemic stroke in mice[J]. *Theranostics*, 2023, 13(3): 896–909.
- [15] Zhang D, Zhang W, Ng TW, *et al.* Adoptive cell therapy using antigen-specific CD4⁺CD8⁻T regulatory cells to prevent autoimmune diabetes and promote islet allograft survival in NOD mice[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(8): 2082–2092.
- [16] Yang L, Zhu Y, Tian D, *et al.* Transcriptome landscape of double negative T cells by single-cell RNA sequencing[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2021, 121: 102653.
- [17] Passos LA, Magalhães LD, Soares RP, *et al.* Specific activation of CD4-CD8-double-negative T cells by *Trypanosoma cruzi*-derived glycolipids induces a proinflammatory profile associated with cardiomyopathy in Chagas patients[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2017, 190(1): 122–132.
- [18] Li D, Ainiwaer A, Zheng X, *et al.* Upregulation of LAG3 modulates the immune imbalance of CD4⁺T-cell subsets and exacerbates disease progression in patients with alveolar echinococcosis and a mouse model[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(5): e1011396.
- [19] Swenson ER, Maggiorini M, Mongovin S, *et al.* Pathogenesis of high-altitude pulmonary edema: inflammation is not an etiologic factor[J]. *Jama*, 2002, 287(17): 2228.
- [20] Yang X, Li J, Ma Y, *et al.* Curcumin-mediated enhancement of lung barrier function in rats with high-altitude-associated acute lung injury via inhibition of inflammatory response[J]. *Respiratory Research*, 2024, 25(1): 354.
- [21] Ge YL, Li PJ, Bu YR, *et al.* TNF- α and RPLP0 drive the apoptosis of endothelial cells and increase susceptibility to high-altitude pulmonary edema[J]. *Apoptosis*, 2024, 29(9): 1600–1618.
- [22] Wang Y, Shen Z, Pei C, *et al.* Eleutheroside B ameliorated high altitude pulmonary edema by attenuating ferroptosis and necroptosis through Nrf2-antioxidant response signaling[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 156: 113982.
- [23] Haug T, Aigner M, Peuser MM, *et al.* Human double-negative regulatory T-cells induce a metabolic and functional switch in effector T-cells by suppressing mTOR activity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 883.
- [24] Mehal WZ, Crispe IN. TCR ligation on CD8⁺T cells creates double-negative cells in vivo[J]. *The Journal of Immunology*, 1998, 161(4): 1686–1693.
- [25] Ford MS, Zhang ZX, Chen W, *et al.* Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8⁺T cell precursors[J]. *Journal of Immunology*, 2006, 177(5): 2803–2809.
- [26] Zhang D, Yang W, Degauque N, *et al.* New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses[J]. *Blood*, 2007, 109(9): 4071–4079.
- [27] Hu SH, Zhang LH, Gao J, *et al.* NKG2D enhances double-negative T cell regulation of B cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 650788.

- [28] Rensing-Ehl A, Vökl S, Speckmann C, *et al.* Abnormally differentiated CD4⁺ or CD8⁺ T cells with phenotypic and genetic features of double negative T cells in human Fas deficiency[J]. *Blood*, 2014, 124(6): 851–860.
- [29] Crispin JC, Tsokos GC. Human TCR- $\alpha\beta$ +CD4-CD8-T cells can derive from CD8⁺ T cells and display an inflammatory effector phenotype[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 183(7): 4675–4681.
- [30] Hsu J, Krishnan A, Lee SA, *et al.* CD3⁺CD4-CD8-Double-negative $\alpha\beta$ T cells attenuate lung ischemia-reperfusion injury[J]. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2021, 161(1): e81–e90.
- [31] Fang M, Zhong WH, Song WL, *et al.* Ulinastatin ameliorates pulmonary capillary endothelial permeability induced by sepsis through protection of tight junctions via inhibition of TNF- α and related pathways[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 823.
- [32] Kmiecik M, Gowda M, Graham L, *et al.* Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2009, 7(1): 89.
- [33] Halász H, Papp AB, Lesinszki LS, *et al.* Neutrophil deficiency increases T cell numbers at the site of tissue injury in mice[J]. *FEBS Letters*, 2025, 599(18): 2644–2662.

(收稿日期: 2025-06-27

修回日期: 2026-01-06)

(上接第 520 页)

- [21] Sun X, Feng X, Zheng D, *et al.* Ergosterol attenuates cigarette smoke extract-induced COPD by modulating inflammation, oxidative stress and apoptosis in vitro and in vivo[J]. *Clinical Science*, 2019, 133(13): 1523–1536.
- [22] Zhou R, Luo F, Lei H, *et al.* Liujunzi Tang, a famous traditional Chinese medicine, ameliorates cigarette smoke-induced mouse model of COPD[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 193: 643–651.
- [23] Zhou P, Yu W, Zhang C, *et al.* Tiao-bu-Fei-Shen formula promotes downregulation of the caveolin 1-p38 mapk signaling pathway in COPD-Associated tracheobronchomalacia cell model[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 293: 115256.
- [24] Pan K, Lu J, Song Y. Artesunate ameliorates cigarette smoke-induced airway remodelling via PPAR- γ /TGF- β 1/Smad2/3 signalling pathway[J]. *Respiratory Research*, 2021, 22(1): 91.
- [25] Luo J, Zhang T, Zhu C, *et al.* Asiaticoside might attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by activating cAMP and Rap1 signalling pathway assisted by A2AR[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(14): 8248–8261.
- [26] Birukova AA, Meng F, Tian Y, *et al.* Prostacyclin post-treatment improves LPS-induced acute lung injury and endothelial barrier recovery via Rap1[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2015, 1852(5): 778–791.
- [27] Uehara M, Enomoto N, Mikamo M, *et al.* Impact of angiopoietin-1 and-2 on clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respiratory Medicine*, 2016, 114: 18–26.
- [28] Calvi C, Podowski M, Lopez-Mercado A, *et al.* Hepatocyte growth factor, a determinant of airspace homeostasis in the murine lung[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(2): e1003228.
- [29] Sakamaki Y, Matsumoto K, Mizuno S, *et al.* Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2002, 26(5): 525–533.
- [30] Gazdhar A, Fachinger P, van Leer C, *et al.* Gene transfer of hepatocyte growth factor by electroporation reduces bleomycin-induced lung fibrosis[J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2007, 292(2): L529–L536.

(收稿日期: 2025-08-08

修回日期: 2026-01-19)