

# Treg 在慢性阻塞性肺疾病患者外周血及肺组织中的表达

章颖妹 严青 刘辉 石建邦 夏淮玲 徐晓玲

**摘要** 目的 观察慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者外周血及肺组织中调节性T淋巴细胞(Treg)的表达并与肺功能正常者进行对照比较,探讨Treg在COPD患者气道炎症中的作用以及吸烟对其表达的影响。方法 收集24例肺功能正常的非吸烟者(NS组)、22例肺功能正常的吸烟者(S组)、25例患有COPD的吸烟者(COPD组)为研究对象,分别采用流式细胞术、免疫组织化学染色法检测3组研究对象外周血及肺组织中Treg表达。结果 COPD组的外周血中Treg表达均显著高于S组及NS组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),S组的外周血Treg表达高于NS组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );COPD组的肺组织中Treg表达均显著低于S组及NS组,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),S组的肺组织中Treg表达水平低于NS组,差异无统计学意义;3组外周血Treg总表达与第1秒用力呼气容积( $FEV_1$ )/预计值(%)负相关( $P < 0.0001$ ),与吸烟量(年支)呈显著正相关( $P < 0.0001$ ),3组肺组织中Treg总表达与 $FEV_1$ /预计值(%)无相关性( $P = 0.338$ ),与吸烟量(年支)呈显著负相关( $P = 0.031$ )。结论 COPD患者外周血中Treg表达上调,其肺组织中Treg表达下调。吸烟量与外周血中Treg表达呈正相关,与肺组织中Treg表达呈负相关。

**关键词** T淋巴细胞;调节性;慢性阻塞性肺疾病;吸烟;气道炎症

中图分类号 R 563.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0679-04

2015-02-02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1208085MH158)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院呼吸内科,合肥 230001

作者简介:章颖妹,女,硕士研究生;

徐晓玲,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xxlahh08@163.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是气道慢性炎症性疾病,以不完全可逆、进行性发展的气流受限为特征性疾病,发病机制未明确。目前主要认为吸烟为COPD主要危险因素,但是在所有吸烟者中只有近乎50%为COPD<sup>[1]</sup>。调节性T淋巴细胞(regulatory T lymphocytes, Treg)是一个 $CD4^+$ T细胞亚群,其主要功能为调节效应T淋巴细胞和维持自身免疫功能平衡<sup>[2]</sup>,叉头状转录因子(forkhead box P3, Foxp3)的表达可作为其标志分子。近年研究<sup>[3]</sup>提示Treg可能参与调节吸烟烟雾等有害气体或颗粒诱导的气道免疫炎症反应。该研究旨在观察COPD患者外周血及肺组织中Treg表达并与肺功能正常者进行对照比较,探讨Treg在COPD患者气道炎症中的作用以及吸烟对其表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 收集安徽医科大学附属省立医院2012年1月~2013年12月胸外科行肺部切除手术的71例患者,男女不限,年龄 $>35$ 岁。根据患者的术前肺功能检查结果以及患者吸烟史,分为肺功能正常非吸烟组(NS组,  $n = 24$ ),肺功能正常吸烟组(S组,  $n = 22$ ),患有COPD吸烟组(COPD组,  $n = 25$ )。COPD定义根据《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》(2007年修订版)<sup>[4]</sup>诊断标准,吸入支气管舒张剂后第一秒用力呼气容积(forced expiratory volume in one second,  $FEV_1$ )/用力肺活量(forced vital capacity, FVC)  $<70\%$ ;排除标准(满足其中之一):①患有风湿免疫系统疾病或者自身免疫缺陷者或过敏

ney tissue and serum from 20 patients with LN and 12 healthy control subjects respectively. **Results** ① There was significant difference between juvenile LN patients and healthy controls by RT-PCR, immunohistochemistry and ELISA. Positive rate were 65.9% vs 8.3%, 95.1% vs 16.7%, 22.0% vs 8.3%, respectively ( $P < 0.05$ ). ② Positive rates of LMP-1 in juvenile LN were significantly different among three methods and the positive rate detected by immunohistochemistry was higher than the other two methods ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The results demonstrate that there are aberrant expression of LMP-1 gene in juvenile LN, the positive rate of LMP-1 in kidney tissue is highest, suggesting that LMP-1 gene may contribute to the pathogenesis of juvenile LN.

**Key words** juvenile; lupus nephritis; latent membrane protein 1; Epstein-Barr virus

性疾病如支气管哮喘; ② 合并肺部及其他系统感染; ③ 1 个月内服用糖皮质激素; ④ 术前已行放疗或化疗; ⑤ 结合术后病理患有病毒性疾病或结核性疾病。

1.2 主要试剂和仪器 淋巴分离液(北京索来宝公司); RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司); 抗人 CD4-FITC 单克隆抗体、抗人 CD25-PE 单克隆抗体、抗人 Foxp3-PECy5 单克隆抗体、固定破膜剂(美国 eBioscience 公司); 浓缩型鼠抗人 Foxp3 单克隆抗体(英国 Abcam 公司); SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司); 肺功能仪(美国森迪斯公司); 高水平冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 流式细胞术检测 抽取受试者清晨空腹静脉血 2 ml 置于肝素抗凝管中, PBS 与血液等比稀释, 平铺于淋巴分离液之上, 2 500 r/min 离心 30 min 后提取白膜层至流式管中, 加入 PBS, 2 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液。加 RPMI 培养液将细胞密度调整为  $2 \times 10^6$  /ml, 取 100  $\mu$ l 至流式管, 分别先后加入 CD4-FITC、CD25-PE、破膜剂、Foxp3-PECy5, 避光孵育、洗涤, 弃上清液, 上机检测。分析软件为 Flow Jo 7.6, 应用散点图, 设门, 分析 Treg 占 CD4<sup>+</sup>T 细胞百分比。

1.3.2 免疫组织化学染色检测 选取安徽医科大学附属省立医院胸外科符合入选标准患者的术后新鲜肺组织标本, 常规行石蜡切片, 厚约 3  $\mu$ m, 首先行 HE 染色; 然后免疫组化染色按试剂说明书行 SP 二步法染色。光镜下计数和摄片。Foxp3 的阳性信号主要定位于细胞核上呈棕黄色或者黄褐色颗粒状。染色评估采用半定量积分法: 光镜下(400 倍)观察阳性细胞染色比例(0: <5%; 1: 5% ~ 25%; 2: 26% ~ 50%; 3: 51% ~ 75%; 4: >76%) 以及染色强度(0: 基本不着色; 1: 浅黄色; 2: 棕黄色; 3: 棕褐色), 将这两项得分相乘得出最后的评分。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 3 组间的差异运用 One-Way ANOVA 检验; 符合正态分布的数据的相关性分析采用 Pearson 相关, 而不符合正态分布的数据的相关性分析采用 Spearman 秩相关。

2 结果

2.1 研究对象一般情况特点 与 NS 组及 S 组比

较, COPD 组 FEV<sub>1</sub>/预计值(%)、FEV<sub>1</sub>/FVC(%) 减低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), S 组 FEV<sub>1</sub>/预计值(%) 与 NS 组相比, 差异无统计学意义, S 组 FEV<sub>1</sub>/FVC(%) 与 NS 组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); COPD 组吸烟量(年支)与 S 组比较, 差异无统计学意义; COPD 组年龄与 S 组比较, 差异无统计学意义, 而 NS 组年龄与 S 组、COPD 组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 此外, NS 组中男女比例以女性为主, 而 S 组与 COPD 组男性占绝大多数比例。见表 1。

表 1 各组研究对象一般资料( $\bar{x} \pm s$ )

项目	NS 组(n=24)	S 组(n=22)	COPD 组(n=25)	F 值
年龄(岁)	48.17 $\pm$ 15.398	59.32 $\pm$ 10.987**	63.88 $\pm$ 9.034**	10.844
性别(男/女)	7/17	21/1	25/0	
吸烟量(年支)	0	834.09 $\pm$ 571.420	864.00 $\pm$ 538.424	28.277
FEV <sub>1</sub> /预计值(%)	94.87 $\pm$ 14.032	90.64 $\pm$ 9.781	65.24 $\pm$ 17.025***##	31.619
FEV <sub>1</sub> /FVC(%)	84.39 $\pm$ 4.851	76.27 $\pm$ 4.108**	59.88 $\pm$ 8.303***##	101.993

与 NS 组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 S 组比较: ## $P < 0.01$

2.2 外周血中 Treg 表达 3 组间的外周血中 Treg 表达差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 见图 1。COPD 组外周血 Treg 表达显著高于 S 组及 NS 组, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); S 组外周血 Treg 表达高于 NS 组, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表 2。

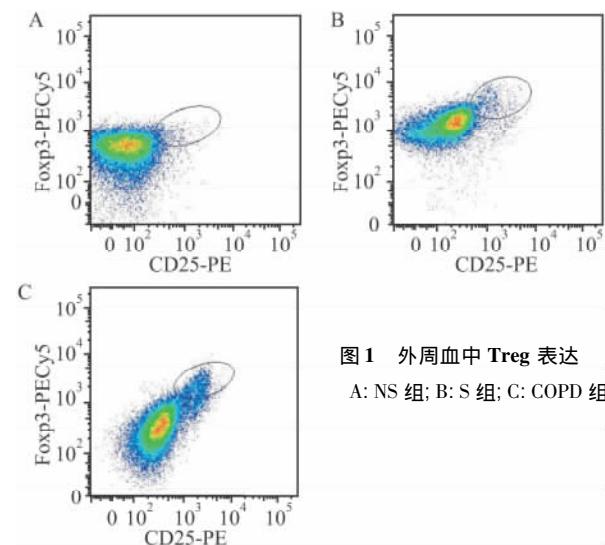


图 1 外周血中 Treg 表达 A: NS 组; B: S 组; C: COPD 组

2.3 肺组织中 Treg 表达 3 组间的肺组织中 Treg (Foxp3<sup>+</sup>) 表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 2。Treg 在 COPD 组的肺组织中表达显著低于 S 组及 NS 组, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); S 组的

肺组织中 Treg 表达低于 NS 组,但差异无统计学意义。见表 2。

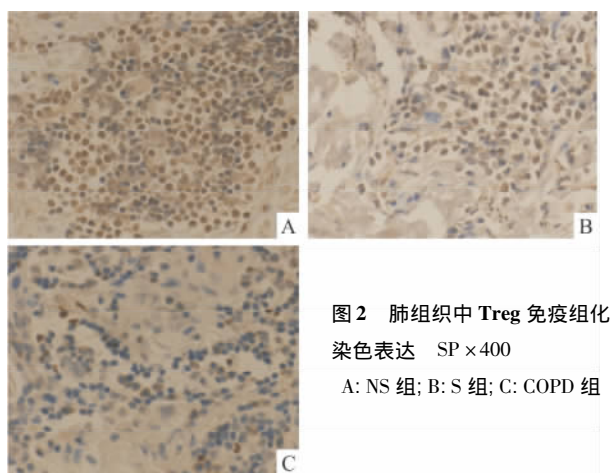


表 2 各组的 Treg 在外周血、肺组织中的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	NS 组	S 组	COPD 组	F 值
外周血 Treg (%)	2.14 ± 0.82	3.97 ± 1.13**	5.50 ± 1.00***##	45.33
肺组织 Treg (分)	3.67 ± 1.71	3.23 ± 2.02	2.20 ± 1.26***##	4.94

与 NS 组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 S 组比较: ## $P < 0.01$

**2.4 相关性分析** ① 3 组资料汇总分析,外周血 Treg 总表达与 FEV<sub>1</sub>/预计值(%) 呈负相关(Pearson 相关) ( $r = -0.541, P < 0.0001$ ); 外周血 Treg 总表达与吸烟量(年支) 呈正相关(Pearson 相关) ( $r = 0.616, P < 0.0001$ )。② 3 组资料汇总分析,肺组织 Treg 总表达与 FEV<sub>1</sub>/预计值(%) 之间无相关性(Spearman 秩相关) ( $r_s = 0.115, P = 0.338$ ); 肺组织 Treg 总表达与吸烟量(年支) 呈负相关(Spearman 秩相关) ( $r_s = -0.256, P = 0.031$ )。

### 3 讨论

目前认为 COPD 的主要病理特征为小气道壁上多种炎症细胞浸润,以中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞为主,炎症导致气道壁的损失-修复过程反复发生,进而引起气道结构重塑,导致 COPD 气流受限的主要病理基础之一。研究<sup>[5]</sup>不仅证实 COPD 小气道壁上存在上述炎症细胞浸润,小气道壁厚与 FEV<sub>1</sub>/预计值(%) 呈负相关,且发现 COPD 疾病进展与 CD8<sup>+</sup> T、B 淋巴细胞数量呈正相关,提示 COPD 存在着获得性免疫介导的气道炎症反应。而 Treg 通过产生和诱导各种细胞因子(如 IL-10、TGF- $\beta$ 、IL-4、IFN- $\gamma$  等)在 COPD 气道炎症中发挥着重要的抗炎作用。

本研究结果显示 COPD 组外周血中 Treg 表达比 S 组、NS 组显著升高,与 Smyth et al<sup>[6]</sup> 研究结果一致,而与 Wang et al<sup>[7]</sup> 研究结果不一致。目前认为 COPD 不仅仅表现为气道和肺的异常炎症反应,也有显著的全身效应,如 Gan et al<sup>[8]</sup> 的荟萃分析发现,炎症性细胞因子(包括 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-18、CRP 等)浓度在 COPD 患者外周血中升高,并且随着疾病进展更加显著。本研究中 COPD 组及 S 组外周血中 Treg 高表达,与吸烟量呈正相关,可能与香烟烟雾直接与间接刺激下外周血中存在持续炎症介质,Treg 在外周血中发挥持续抗炎作用有关。

本研究结果显示 COPD 组的肺组织中 Treg 表达比 S 组、NS 组显著减低;S 组的肺组织中 Treg 表达比 NS 组稍减低,差异无统计学意义。与 Isajevs et al<sup>[9]</sup> 的研究结果一致,不同的是其研究结果显示吸烟组的小气道中 Foxp3<sup>+</sup> 表达比不吸烟组升高。亦与 Chu et al<sup>[10]</sup> 的研究结果一致。此外,本研究中 S 组与 COPD 组的吸烟量(年支)比较,差异无统计学意义,然而相同吸烟强度暴露下,某些吸烟者能够维持正常的肺功能,有些却发展为 COPD。Cosio et al<sup>[11]</sup> 从分子免疫角度阐述 COPD 疾病进展与体内免疫调节机制(Treg 与  $\gamma\delta$  CD8<sup>+</sup> T 细胞)功能损伤程度呈正相关。结合以上研究推测,肺功能正常吸烟者及 COPD 患者肺组织中 Treg 表达降低引起 Treg 免疫调节抑制、抗炎等功能受损,导致机体气道炎症、重塑等 COPD 病理改变而无法维持正常的肺功能及肺功能进一步下降。这些本研究中目前肺功能正常的吸烟者仍是罹患 COPD 高危人群。

综上所述,本研究显示 COPD 患者外周血中 Treg 表达上调,其肺组织中 Treg 表达下调;吸烟量与外周血中 Treg 表达呈正相关,与肺组织中 Treg 表达呈负相关。本研究反映 Treg 在 COPD 外周血与肺内表达不一致,为其在 COPD 外周及气道炎症中作用提供理论依据;Treg 在肺功能正常吸烟者及不吸烟者外周血与肺内表达不同,也为香烟烟雾暴露人群易患 COPD 的发病机制的探讨提供新的线索。

### 参考文献

- [1] Mannino D M, Buist A S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends [J]. Lancet, 2007, 370(9589): 765-73.
- [2] Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation [J]. J Clin Invest, 2004, 114(9): 1198-208.

- [3] Brusselle G G , Joos G F , Bracke K R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lancet* , 2011 , 378( 9795) : 1015 - 26.
- [4] 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(2007年修订版) [J]. *中华结核和呼吸杂志* 2007 30( 1) : 8 - 17.
- [5] Hogg J C , Chu F , Utokaparch S , et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *N Engl J Med* , 2004 , 350( 26) : 2645 - 53.
- [6] Smyth L J , Starkey C , Vestbo J , et al. CD4-regulatory cells in COPD patients [J]. *Chest* , 2007 , 132( 1) : 156 - 63.
- [7] Wang H , Peng W , Weng Y , et al. Imbalance of Th17/Treg cells in mice with chronic cigarette smoke exposure [J]. *Int Immunopharmacol* , 2012 , 14( 4) : 504 - 12.
- [8] Gan W Q , Man S F , Senthilselvan A , et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis [J]. *Thorax* , 2004 , 59 ( 7) : 574 - 80.
- [9] Isajevs S , Taivans I , Strazda G , et al. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD [J]. *Eur Respir J* , 2009 , 33( 1) : 61 - 7.
- [10] Chu S , Zhong X , Zhang J , et al. The expression of Foxp3 and ROR gamma t in lung tissues from normal smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *Int Immunopharmacol* , 2011 , 11( 11) : 1780 - 8.
- [11] Cosio M G , Saetta M , Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *N Engl J Med* , 2009 , 360 ( 23) : 2445 - 54.

## The expression of Treg in peripheral blood and lung tissue of COPD

Zhang Yingmei , Yan Qing , Liu Hui , et al

( Dept of Respiratory Medicine , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

**Abstract Objective** To observe the expression of regulatory T lymphocytes ( Treg) in peripheral blood and lung tissue of patients with chronic obstructive pulmonary disease( COPD) and investigate the role of Treg in the airway inflammation of COPD and how smoking impacts the expression of Treg compared with population of normal lung function. **Methods** A total of 24 subjects were nonsmokers with normal lung function ( NS group) , 22 subjects were smokers with normal lung function ( S group) and 25 subjects were smokers with COPD ( COPD group) . The percentage of Treg in peripheral blood was measured by flow cytometry , and the immune-histochemical methods were used to evaluate Treg expression in lung tissue. **Results** The percentage of Treg in peripheral blood significantly increased in COPD group compared with S group and NS group , the difference was statistically significant(  $P < 0.01$ ) ; the percentage of Treg in peripheral blood significantly increased in S group compared with NS group , the difference was statistically significant(  $P < 0.01$ ) ; the Treg levels in lung tissue were significantly decreased in COPD group between S group and NS group , the difference was statistically significant(  $P < 0.01$ ) . The Treg levels in lung tissue were significantly decreased in S group between NS group , the difference was not statistically significant. The total percentage of Treg in peripheral blood with  $FEV_1\%$  pred was a negative correlation (  $P < 0.0001$ ) , and there was a positive correlation with smoking index (  $P < 0.0001$ ) ; there was no significant correlation between Treg levels in total of lung tissue with  $FEV_1\%$  pred (  $P = 0.338$ ) , but with smoking index there was a negative correlation (  $P = 0.031$ ) . **Conclusion** In COPD patients , the percentage of Treg in peripheral blood is up-regulated , but Treg levels in lung tissue are down-regulated. There is a positive correlation between smoking index and the percentage of Treg , but it is negatively correlated with Treg levels in lung tissue.

**Key words** T lymphocytes; regulatory; chronic obstructive pulmonary disease; smoking; airway inflammation