

稳定期 COPD 患者外周血中 Th17 和 Treg 的表达及平衡关系变化

严青 徐晓玲 夏淮玲 徐飞 陈军 刘辉 石建邦 李庆

摘要 目的 观察辅助性 T 细胞 17(Th17) 和调节性 T 淋巴细胞(Treg) 在稳定期慢性阻塞性肺疾病(COPD) 患者外周血中的表达及平衡关系变化,探讨其在 COPD 发病机制中的作用。方法 选取 22 例肺功能正常不吸烟者(A 组)、22 例肺功能正常吸烟者(B 组) 以及 36 例稳定期 COPD 患者(C 组) 作为研究对象。运用流式细胞术检测外周血提取外周单个核细胞(PBMC) 中的 Th17 和 Treg 的表达及平衡关系的变化。结果 C 组外周血 Th17 的表达率明显高于 B 组及 A 组,差异有统计学意义($P < 0.01$); B 组 Th17 细胞外周血中的表达高于 A 组($P < 0.01$); C 组外周血中 Treg 细胞的表达率高于 A 组($P < 0.01$) 和 B 组($P < 0.01$), B 组高于 A 组,差异有统计学意义($P < 0.01$); Th17/Treg 比值 C 组明显高于 A 组和 B 组, A 组和 C 组的差异有统计学意义($P < 0.01$), 但 A 组与 B 组及 B 组与 C 组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 组数据汇总分析外周血中 Th17 细胞和 Treg 细胞的表达与吸烟量呈正相关($P < 0.01$), Th17/Treg 的比值与吸烟量无明显相关性($P > 0.05$); 3 组数据分析 Th17 细胞、Treg 细胞以及 Th17/Treg 比值与第 1 秒用力呼气容积(FEV_1)/预计值(%) 和 FEV_1 /用力肺活量(FVC)(%) 呈负相关。结论 C 组外周血中 Th17 细胞和 Treg 细胞表达水平明显升高,可能参与 COPD 的发病机制; C 组的 Th17/Treg 比值升高,平衡失调,可能是 COPD 发病的免疫机制; Th17 和 Treg 细胞表达水平与吸烟量呈正相关,与 FEV_1 /预计值(%) 及 FEV_1 /FVC(%) 呈负相关。

关键词 慢性阻塞性肺疾病; Th17 细胞; T 淋巴细胞; 调节性; 吸烟者

中图分类号 R 563.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0800-04

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 已经成为全球第 4 位死亡原因,且逐年增加,预计到 2020 年将上升为全球第 3 位死亡原因和经济负担的第 5 位^[1],目前普遍认为 COPD

是一种与肺部对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关,发病机制未明确,近年的研究^[2]提示 COPD 的发病可能与自身免疫系统调节紊乱有关。辅助性 T 细胞 17(T help cell 17, Th17) 和调节性 T 淋巴细胞(T regular cell, Treg) 均来源于 $CD4^+$ T 细胞,正常情况下促炎的 Th17 细胞和抑制性的 Treg 细胞之间保持平衡,维持机体免疫的稳定^[3]。该研究通过检测稳定期 COPD 患者外周血中 Th17 和 Treg 的表达及比值变化,探讨 Th17 与 Treg 在 COPD 的发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集安徽医科大学附属省立医院 2012 年 1 月~2013 年 8 月住院患者,根据肺功能及吸烟情况分为肺功能正常不吸烟组(A 组),肺功能正常吸烟组(B 组),稳定期 COPD 组(C 组); A 组 22 例, B 组 22 例, C 组 36 例。

纳入标准: A 组年龄 40~80(46.59 ± 14.40) 岁和 B 组年龄 40~80(56.73 ± 11.76) 岁,男女不限,肺功能正常, B 组吸烟量 ≥ 200 年支; C 组年龄 40~80(56.73 ± 11.76) 岁,男女不限,根据《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》(2009 年修订版) 诊断标准,吸入支气管舒张剂后第 1 秒用力呼气容积/用力肺活量(FEV_1 /FVC) < 70% 且半年内无急性发作史纳入 C 组。排除标准(满足其中任 1 条): ① 处于急性发作期或者半年内有急性发作史的 COPD 患者; ② 患有风湿免疫系统疾病或者自身免疫缺陷者或过敏性疾病; ③ 1 个月内服用糖皮质激素; ④ 合并肺部及其他系统感染; ⑤ 疑似或者确诊恶性肿瘤患者。见表 1。

表 1 各组研究对象一般资料($\bar{x} \pm s$)

项目	A 组(n=22)	B 组(n=22)	C 组(n=36)
年龄(岁)	46.59 ± 14.40	56.73 ± 11.76	61.67 ± 9.71
性别(男/女)	6/16	21/1	34/2
吸烟量(年支)	0	720.45 ± 601.32	796.67 ± 637.45
FEV_1 /预计值(%)	94.77 ± 14.41	90.05 ± 9.12	66.78 ± 15.79
FEV_1 /FVC(%)	84.05 ± 3.95	77.18 ± 4.48	61.81 ± 9.04

2014-03-20 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:严青,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

1.2 仪器与试剂 高速水平冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); CO₂ 培养箱(美国 Thermo scientific 公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司); 淋巴细胞分离液(北京索来宝公司); RPMI 1640 培养液、胎牛血清(美国 Gibco 公司); 抗人 CD4-FITC 单克隆抗体、抗人 IL-17-PE 单克隆抗体、抗人 CD25-PE 单克隆抗体、抗人 Foxp3-PECy5 单克隆抗体、固定破膜剂及莫能霉素(Monensin) (美国 eBioscience 公司); 佛波酯(PMA) 及离子霉素(ionomycin) (美国 Enzo Life Science 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本收集和 PBMC 的制备 抽取受试者清晨空腹静脉血 6 ml 置 2 支肝素抗凝管中, PBS 与血液等比稀释, 平铺于淋巴分离液之上, 离心后, 提取白膜层至流式管中, 加入 PBS, 离心, 弃上清液。分别取 100 μl 至 A 管和 B 管将细胞浓度调整为 2 × 10⁶ 个/ml。

1.3.2 流式细胞术检测 Th17 和 Treg ① Th17 将 A 管中加入 RPMI 1640 培养液、PMA(5 ng/ml)、ionomycin(500 ng/ml)、Monensin(2 μm/ml) 置 CO₂ 培养箱培养 4 h, 加入 PBS, 离心, 弃上清液, 加入 CD4-FITC 4 °C 避光孵育 30 min, 洗涤, 弃上清液后加入破膜剂, 避光孵育 1 h, 洗涤, 弃上清液, 加入 IL-17-PE 避光孵育 30 min, 洗涤, 弃上清液, 上机检测。② Treg 将 B 管中加入 CD4-FITC、CD25-PE 避光孵育 30 min, 洗涤, 弃上清液, 加入破膜剂, 避光孵育 1 h, 洗涤, 弃上清液, 加入 Foxp3-PECy5 避光孵育 1 h, 洗涤, 弃上清液, 上机检测。分析软件为 Flow Jo7.6, 应用散点图, 设门, 分析 Th17 和 Treg 占 CD4⁺T 细胞的百分比。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行

分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本两两比较采用单因素方差分析。两变量关联性分析, 吸烟量与 Th17、Treg 及 Th17/Treg 相关性采用 Spearman 相关, Th17、Treg、Th17/Treg 与 FEV₁/预计值(%) 及 FEV₁/FVC(%) 的相关性分析采用 Pearson 相关。

2 结果

2.1 3 组外周血中 Th17 细胞的表达率 3 组外周血中 Th17 细胞表达流式散点图分析, 见图 1。C 组外周血 Th17 细胞的表达率(%) 为(4.52 ± 1.54), 明显高于 B 组(3.13 ± 1.05) 以及 A 组(1.16 ± 0.50), 差异有统计学意义(P < 0.01); B 组 Th17 细胞外周血中的表达高于 A 组(P < 0.01)。3 组之间的差异有统计学意义(P < 0.01)。见表 2。

2.2 3 组外周血中 Treg 细胞表达率 C 组外周血中 Treg 细胞的表达率(%) 是(5.10 ± 1.36), 高于 A 组(2.10 ± 0.87) (P < 0.01) 和 B 组(4.15 ± 0.96) (P < 0.01); B 组高于 A 组(P < 0.01); 3 组间的差异有统计学意义(P < 0.01)。见表 2。3 组外周血中 Treg 细胞表达流式散点图分析见图 2。

2.3 3 组之间 Th17/Treg 的比值差异 Th17/Treg 比值 C 组(0.98 ± 0.50) 明显高于 A 组(0.59 ± 0.27) 和 B 组(0.78 ± 0.32), A 组和 C 组的差异具有统计学意义(P < 0.01), 但 A 组与 B 组及 B 组与 C 组差异无统计学意义(P > 0.05)。见表 2。

表 2 各组的 Th17、Treg 表达率以及 Th17/Treg 比值的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	A 组	B 组	C 组	F 值	P 值
Th17(%)	1.16 ± 0.50	3.13 ± 1.05 ^{☆☆}	4.52 ± 1.54 ^{☆☆▲▲}	53.17	< 0.01
Treg(%)	2.10 ± 0.87	4.15 ± 0.96 ^{☆☆}	5.10 ± 1.36 ^{☆☆▲▲}	47.59	< 0.01
Th17/Treg	0.59 ± 0.27	0.78 ± 0.32	0.98 ± 0.50 ^{☆☆}	4.81	< 0.01

与 A 组比较: ^{☆☆}P < 0.01; 与 B 组比较: ^{▲▲}P < 0.01

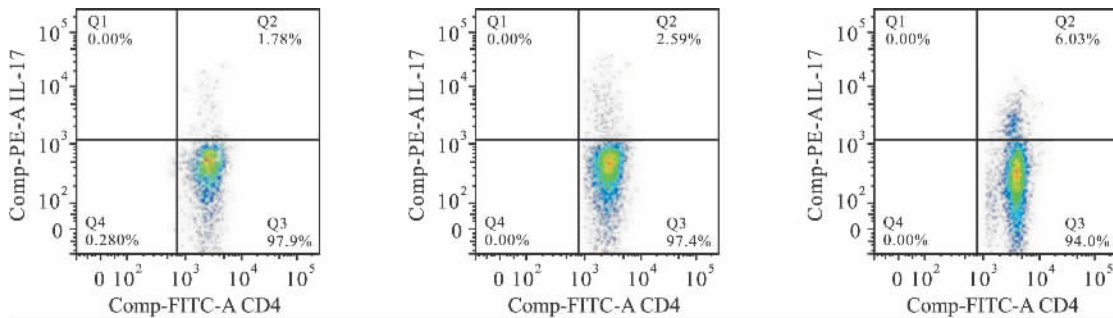


图 1 在外周血中 Th17 细胞表达流式散点图

A: 肺功能正常不吸烟组; B: 肺功能正常吸烟组; C: 稳定期 COPD 组

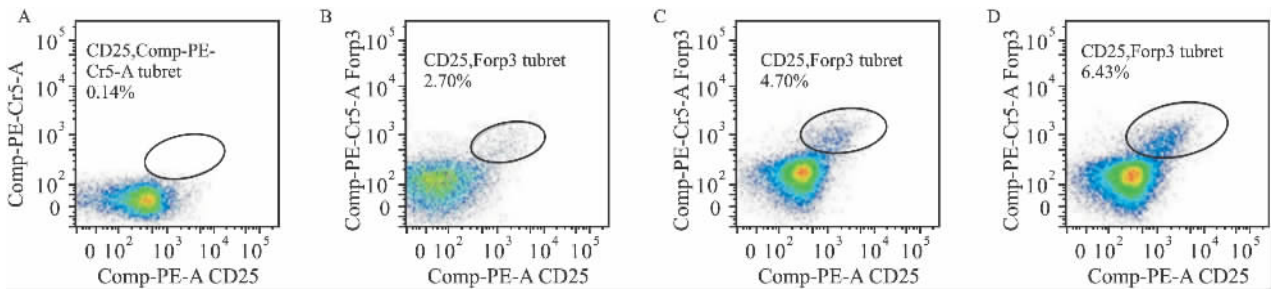


图2 3组外周血中Treg细胞表达流式散点图

A: 荧光扣除对照; B: 肺功能正常不吸烟组; C: 肺功能正常吸烟组; D: 稳定期 COPD 组

2.4 相关性分析 ① 3组数据汇总分析外周血中 Th17 细胞和 Treg 细胞的表达与吸烟量呈正相关 ($r = 0.50$ $r = 0.65$ $P < 0.01$); Th17/Treg 的比值与吸烟量无明显相关性 ($r = 0.13$ $P > 0.05$)。② 3组数据分析 Th17 细胞与 FEV₁/预计值(%) ($r = -0.38$ $P < 0.01$) 和 FEV₁/FVC(%) ($r = -0.34$ $P < 0.01$) 呈负相关; Treg 细胞表达率与 FEV₁/预计值(%) ($r = -0.65$ $P < 0.01$) 以及 FEV₁/FVC(%) ($r = -0.54$ $P < 0.01$) 呈负相关; Th17/Treg 比值与 FEV₁/预计值(%) ($r = -0.36$ $P < 0.01$) 和 FEV₁/FVC(%) ($r = -0.34$ $P < 0.01$) 呈负相关。

3 讨论

已有研究^[4]显示仅在吸烟所致的 COPD 的患者的炎症特点是以 CD8⁺ T_H1 淋巴细胞增加为主要表现。COPD 小气道壁上中性粒细胞、巨噬细胞、CD4 细胞、CD8 细胞、B 细胞、淋巴滤泡增多,并且随着 COPD 病情的严重程度加重而增加,这提示 COPD 存在着固有免疫和获得性免疫的异常 T 淋巴细胞影响 COPD 的炎症反应^[5]。

Th17 是一个新的 Th 亚群,主要通过分泌 IL-17 发挥促炎功能,是 Th17 的主要效应分子。Vargas-Rojas et al^[6]研究发现 COPD 患者外周血中 Th17 细胞数高于吸烟者和健康对照者,并与 FEV₁/预计值(%) 和 FEV₁/FVC(%) 呈反比,并随着气流受限的程度加重, Th17 的细胞数也随之增加,与本研究结果相一致。Harrison et al^[7]在动物试验中发现长期暴露于香烟烟雾后肺组织内的 IL-17 含量明显升高,小鼠肺上皮细胞大量分泌 IL-17 能够引起类似于 COPD 的肺部感染。这提示 Th17 在吸烟引起的肺气肿的免疫应答中起着重要作用。

Tregs 是一群具有抑制功能的 T 细胞亚群,其抑制效应性 T 细胞的增殖、激活以及 B 细胞产生免疫

球蛋白等。本研究结果显示与肺功能正常不吸烟组和肺功能正常吸烟组比较,稳定期 COPD 组的外周血中 Treg 百分比增加,并与 FEV₁/预计值(%) 和 FEV₁/FVC(%) 呈反比,与吸烟量呈正比,且肺功能正常吸烟组中的 Treg 的表达率高于不吸烟组。本实验与 Smyth et al^[8]研究结果相一致:健康吸烟组和 COPD 组的肺泡灌洗液中的 Treg 表达是上调的,且 Foxp3 T 细胞数与吸烟量呈正相关。在 COPD 患者和肺功能正常的吸烟组的外周血中的 Treg 表达率也是增加的^[6]。由此推测,烟草成分直接刺激或持续性炎症反应的产物有关。COPD 是一种慢性气道炎症,在 COPD 的稳定期, Treg 处于高表达状态可能与其持续发挥抗炎作用有关。

Th17 和 Treg 细胞均来源于初始 T 细胞,促炎的 Th17 细胞和抗炎的 Treg 细胞在分化和功能上相互制约,正常生理情况下二者保持平衡才能保持机体的稳态,一旦这种平衡被打破就会导致免疫调节失常,引起疾病的发生,如感染、肿瘤及自身免疫性疾病。本实验结果显示 COPD 组 Th17/Treg 的比值明显高于肺功能正常不吸烟组,并与吸烟量呈正相关,与肺功能呈负相关。虽然 COPD 患者外周血中的 Th17 和 Treg 均是上调的,但是这种上调更倾向于 Th17 细胞, Th17 的增加幅度高于 Treg,这表明 Th17 的促炎比 Treg 的抗炎功能强, Treg 上调不足,来不及有效的抑制炎症,最终导致 Th17 和 Treg 细胞之间的平衡被打破,使得气道内的炎症反应持续存在,这种 Th17/Treg 失衡在 COPD 的动物模型中也得出相同的结论^[9]。因此,这进一步为 COPD 的发病存在自身免疫应答的假说提供了依据,也为未来 COPD 新的治疗方案的发现引导一个新的方向。

参考文献

[1] Rabe K F, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diag-

- nosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176(6): 532–55.
- [2] Agusti A, MacNee W, Donaldson K, et al. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? [J]. *Thorax*, 2003, 58(10): 832–4.
- [3] Heo Y J, Joo Y B, Oh H J, et al. IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4⁺ T cell population of rheumatoid arthritis patients [J]. *Immunol Lett*, 2010, 127(2): 150–6.
- [4] Barnes P J, Shapiro S D, Pauwels R A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms [J]. *Eur Respir J* 2003, 22(4): 627–88.
- [5] Hogg J C, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstruction pulmonary disease [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(26): 2645–53.
- [6] Vargas-Rojas M I, Ramírez-Venegas A, Limón-Camacho L, et al. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Respir Med*, 2011, 105(11): 1648–54.
- [7] Harrison O J, Foley J, Bolognese B J, et al. Airway infiltration of CD4 + CCR6 + Th17 type cells associated with chronic cigarette smoke induced airspace enlargement [J]. *Immunol Lett* 2008, 121(1): 13–21.
- [8] Smyth L J, Starkey C, Vestbo J, et al. CD4-regulatory cells in COPD patients [J]. *Chest* 2007, 132(1): 156–63.
- [9] 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.

The expression and imbalance of Th17 and Treg in peripheral blood of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease

Yan Qing, Xu Xiaoling, Xia Huailing, et al

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

Abstract Objective To investigate the expression and imbalance of T help cell 17(Th17) and T regular cell (Treg) in peripheral blood of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. **Methods** We chose a total of 80 subjects. They were subdivided into three groups: 22 subjects were nonsmokers with normal lung function (A group), 22 subjects were current smokers with normal lung function (B group) and 36 subjects with stable COPD (C group). The percentage of Th17 and Treg in peripheral blood was determined with flow cytometry. **Results** The percentage of Th17 was significantly increased in C group compared with A and B ($P < 0.01$); the percentage of Treg was increased in C group compared with A group ($P < 0.01$) and B group ($P < 0.01$), B group was higher than A group and the difference was statistically significant; the ratio of Th17 to Treg was significantly higher in C group than in A group and B group, but the difference between A group and B group, and the difference between B group and C group being insignificant ($P > 0.05$). There was a positive correlation between percentage of Th17 and the pack-yrs smoked, and between percentage of Treg and the pack-yrs smoked when all patients were analysed together ($P < 0.01$). There was no significant correlation between the ratio of Th17 to Treg and smoked pack-yrs ($P > 0.05$). Th17 cells, Treg cells as well as Th17/Treg ratio with FEV₁% pred and FEV₁/FVC (%) was negatively correlated ($P < 0.01$). **Conclusion** In C group the percentage of Th17 and Treg is upregulated, the imbalance of Th17/Treg plays an important role in the pathogenesis of COPD. The percentage of Th17 and Treg in PBMC are positively correlated with pack-yrs smoked. Th17 and Treg with FEV₁% pred and FEV₁/FVC (%) is negatively correlated.

Key words chronic obstructive pulmonary disease; Th17 cell; T regular cell; smokers