

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160709

慢性阻塞性肺疾病患者外周血 Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg 比率的变化

何燕超, 揭志军, 施劲东, 梅周芳, 钱 凌, 黄琦慧, 鄢莉宏*

复旦大学附属上海市第五人民医院呼吸内科, 上海 200240

[摘要] **目的:** 研究慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者外周血中 CD25⁺Foxp3⁺Treg 和 Th17 细胞介导的免疫失衡与该疾病进展之间的相关性。**方法:** 选择 2012 年 1 月至 2015 年 3 月在上海市闵行区江川社区及复旦大学附属上海市第五人民医院接受门诊或住院治疗的稳定期和急性发作期 COPD 患者共 69 例, 同时收集吸烟或不吸烟的健康对照组各 20 例。测定受试者的肺功能。采用流式细胞术测定受试者外周血中 Th17 和 CD25⁺Foxp3⁺Treg 占 CD4⁺ 细胞的百分比, 分析 Th17/CD4⁺ 和 CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺ 比率以及 Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg 比值在不同分组中的变化及其临床意义。**结果:** 与健康对照组相比, 稳定期 COPD 患者外周血中 Th17/CD4⁺ 和 Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg 明显升高($P < 0.05$), 而 CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺ 明显降低($P < 0.05$); 急性发作期 COPD 患者的 Th17/CD4⁺、CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺ 和 Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg 均比对照组明显升高($P < 0.05$)。轻度、中度、重度和极重度的 COPD 患者中 Th17/CD4⁺ 和 Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg 逐步升高($P < 0.05$), 而 CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺ 逐步降低($P < 0.05$); COPD 患者的 Th17/CD4⁺ 和 Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg 与肺功能负相关($P < 0.05$), CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺ 与肺功能正相关($P < 0.05$)。**结论:** Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg 失衡参与了 COPD 的疾病进展过程, 提示 Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg 免疫调节治疗可能成为 COPD 治疗的新途径。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 免疫调节; Th17 细胞; T 淋巴细胞**[中图分类号]** R 563.9**[文献标志码]** AChange of Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg ratio in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease and its significance

HE Yan-chao, JIE Zhi-jun, SHI Jin-dong, MEI Zhou-fang, QIAN Ling, HUANG Qi-hui, YAN Li-hong*

Department of Respiratory Medicine, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between peripheral CD25⁺Foxp3⁺Treg and Th17 cell-mediated immune imbalance and the progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods:** A total of sixty-nine patients with COPD in stable stage or acute exacerbation of COPD were recruited from Shanghai Fifth People's Hospital of Fudan University from January 2012 to March 2015. At the same time, the non-smokers and smokers with normal lung function, each 20 cases, were also used as the healthy controls. The pulmonary function of all subjects was evaluated. The percentages of Th17 and CD25⁺Foxp3⁺Treg cells in CD4⁺ cells from peripheral blood were determined by flow cytometry. The changes of Th17/CD4⁺, CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺ and Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg ratios in the different groups and their clinical significance were analyzed. **Results:** Compared with the healthy control group, the ratios of Th17/CD4⁺ and Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg in peripheral blood of patients with stable COPD were significantly increased ($P < 0.05$), while the ratio of CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺ was significantly decreased ($P < 0.05$). The ratios of Th17/CD4⁺, CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺ and Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg in patients with acute exacerbation of COPD were all increased as compared with the healthy control (all $P < 0.05$). With the decline of lung function, the ratios of Th17/CD4⁺ and Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg were gradually up-regulated in patients with mild, moderate, severe, very severe COPD ($P < 0.05$), while the ratio of CD25⁺Foxp3⁺Treg/CD4⁺ was gradually down-regulated ($P < 0.05$). Moreover, the ratios of Th17/CD4⁺ and Th17/CD25⁺Foxp3⁺Treg in COPD

[收稿日期] 2016-07-01**[接受日期]** 2016-11-29

[基金项目] 上海市闵行区自然科学基金(2011MHZ03), 上海市科学技术委员会自然科学基金生物引导类项目(134119b1200), 上海市卫生系统优秀学科带头人资助项目(13B034), 复旦大学青年骨干科研启动基金(11L-34). Supported by Natural Science Foundation of Minhang District in Shanghai (2011MHZ03), Natural Foundation-Biological Guide Project of Shanghai Municipal Science and Technology Commission (134119b1200), Excellent Academic Leaders of Shanghai Health System (13B034) and Foundation of Start-Up Research by Youth Cadre of Fudan University (11L-34).

[作者简介] 何燕超, 硕士, 住院医师. E-mail: 360699058@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-52880000, E-mail: yanlihong1973@aliyun.com

patients were negatively correlated with lung function ($P < 0.05$), while the ratio of $CD25^+ Foxp3^+ Treg/CD4^+$ was positively correlated with lung function ($P < 0.05$). **Conclusions:** Th17/ $CD25^+ Foxp3^+ Treg$ imbalance involves in the progression of COPD, suggesting that Th17/ $CD25^+ Foxp3^+ Treg$ immunomodulatory therapy may become a new approach for the treatment of COPD.

[Key Words] chronic obstructive pulmonary disease; immunomodulation; Th17 cells; T-lymphocytes

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续气流受限为特征的可以防治的呼吸系统疾病。近年来, COPD 的发病率和病死率居高不下, 成为备受关注的疾病之一^[1]。越来越多的研究证明, $CD4^+$ T 细胞在 COPD 相关的慢性炎症反应中发挥作用^[2]。辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 是 $CD4^+$ T 细胞的一种亚型。在转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的作用下, $CD4^+$ T 细胞可以表达核孤儿受体家族成员 ROR γ t 并向 Th17 分化, 随后分化成熟的 Th17 分泌细胞因子 IL-17A, 从而发挥生物学效应^[3]。调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是 $CD4^+$ T 细胞的另一种亚型, 它是一种重要的免疫调节细胞。Treg 中异位表达的叉头翼状螺旋转录因子 p3 (forkhead or winged helix transcription p3, Foxp3) 可以通过接触抑制、分泌抑制性因子 IL-10 和 TGF- β , 维持免疫环境的稳态^[4]。Th17/Treg 平衡是 Th1/Th2 经典模型的补充, Th17/Treg 平衡在机体免疫应答和免疫耐受中具有重要作用^[5]。因此, 本研究通过检测各个阶段的 COPD 患者外周血中 Th17/ $CD25^+ Foxp3^+ Treg$ 的百分比, 探讨 COPD 的免疫学发病机制, 并试图寻找可以干预 COPD 进展的有效靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 1 月至 2015 年 3 月在上海市闵行区江川社区及复旦大学附属上海市第五人民医院接受门诊或住院治疗的 COPD 患者 69 例。所有病例均符合中华医学会呼吸病学分会制定的诊断标准^[1], 且均不合并支气管哮喘、其他肺部疾病、心力衰竭及自身免疫性疾病。除 19 例急性发作期 COPD (acute exacerbation of COPD, AECOPD) 患者外, 所有 50 例稳定期 COPD (stable COPD, SCOPD) 患者均完成肺功能检查, 相关指标包括一秒用力呼气容积 (forced expiratory volume in one second, FEV₁)、用力肺活量 (forced vital capacity, FVC)、FEV₁ 占预计值的百分比 (EFV₁%

pred)、FVC 占预计值的百分比 (FVC%pred) 以及 FEV₁/FVC 比率。根据 COPD 全球策略 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD) 的分级标准 (依据肺功能评估气流受限程度), 将 SCOPD 患者分为 GOLD1 级 (轻度) 11 例、GOLD2 级 (中度) 14 例、GOLD3 级 (重度) 11 例和 GOLD4 级 (极重度) 14 例。同时, 收集在本院体检中心进行体检的非吸烟健康志愿者及肺功能正常的吸烟者各 20 例, 作为对照组; 所有对照均不合并其他疾病。本研究方案经上海市第五人民医院伦理委员会批准, 所有研究对象均签署知情同意书。所有入组患者及对照的具体临床资料见表 1。

1.2 主要试剂和设备 流式细胞术使用的所有抗体以及细胞刺激培养所需的豆蔻酰佛波醇乙酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、离子霉素、布雷菲德菌素 A (Brefeldin A, BFA) 和 Fix&Perm Kit Reagent 均购自美国 BD 公司; 淋巴细胞分离液 (Ficoll-Hypaque) 购自美国 Sigma 公司; 人 Treg 染色试剂盒购自美国 eBioscience 公司。流式细胞仪 (FACScalibur) 购自美国 BD 公司。

1.3 标本收集与处理 采集受试者外周血 3 mL, 置入肝素锂抗凝管内。将外周血用 0.9% 氯化钠溶液等倍稀释后, 将其沿离心管边缘轻轻加至 Ficoll-Hypaque 分离液上面, 室温 $500 \times g$ 离心 20 min, 分离白膜层细胞即为外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。用 RPMI 1640 培养液洗涤细胞 3~5 次后, 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 将细胞铺至 24 孔板中培养, 用于流式细胞学检测。

1.4 流式细胞术检测 Th17/ $CD4^+$ 细胞比率 将细胞密度为 1×10^6 个/mL 的新鲜 PBMC 接种于 24 孔板, 每孔 100 μ L, 然后分别加入 1 μ g/mL 离子霉素、50 ng/mL PMA 和 1 μ g/mL BFA, 于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 条件下培养细胞 6 h。分别加入 PE 标记的鼠抗人 CD8 单克隆抗体和 FITC 标记的鼠抗人 CD3 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min, 用 PBS 缓冲液洗涤。用固定破膜试剂盒 (Fix & Perm Kit) 中的 Reagent A 固定, Reagent B 破膜, 然后加入 APC 标

记的鼠抗人 IL-17A 单克隆抗体或同型 IgG₁ 标记的细胞内抗体,4℃避光反应 30 min,用 PBS 缓冲液洗涤。最后用 0.4 mL PBS 重悬细胞,上流式细胞

仪检测 CD3⁺ CD8⁻ IL-17A⁺ 细胞(即 Th17)占 CD3⁺ CD8⁻ 细胞(即 CD4⁺ T 细胞)的百分比(简称 Th17/CD4⁺ 比率);每次检测均设立同型对照。

表 1 COPD 患者及对照的临床资料

参数

对照组

SCOPD 组

AECOPD 组

	非吸烟者	吸烟者	轻度	中度	重度	极重度	
<i>n</i>	20	20	11	14	11	14	19
年龄(岁)	64±5	66±7	65±6	66±4	66±4	68±5	68±5
性别(男/女)	16/4	20/0	9/2	12/2	10/1	10/4	15/4
吸烟指数	0	480	532	677	562	554	637
FEV ₁ /L	3.2±0.5	2.8±0.1 ^a	2.1±0.3 ^{ab}	1.8±0.2 ^{abc}	1.2±0.1 ^{abcd}	0.8±0.1 ^{abcde}	-
FEV ₁ %pred/%	101.8±4.0	99±2.3 ^a	87.1±5.7 ^{ab}	64.5±8.8 ^{abc}	40.0±6.5 ^{abcd}	25.1±3.5 ^{abcde}	-
FVC/L	3.8±0.6	3.6±0.2	3.2±0.4 ^{ab}	3.0±0.5 ^{ab}	2.6±0.5 ^{abcd}	2.1±0.6 ^{abcde}	-
FVC%pred/%	103.0±4.4	101.6±3.1	91.2±6.9 ^{ab}	90.3±10.1 ^{ab}	77.3±2.9 ^{abcd}	73.5±7.4 ^{abcd}	-
FEV ₁ /FVC/%	85.9±5.4	80.1±3.3 ^a	67.3±1.8 ^{ab}	58.7±6.9 ^{abc}	49.5±9.6 ^{abcd}	37.8±9.0 ^{abcde}	-

^a*P*<0.05 与非吸烟者比较;^b*P*<0.05 与吸烟者比较;^c*P*<0.05 与轻度 COPD 组比较;^d*P*<0.05 与中度 COPD 组比较;^e*P*<0.05 与重度 COPD 组比较。吸烟指数=每天吸烟支数×吸烟年数,所有 COPD 组中戒烟者的吸烟指数为戒烟前的吸烟指数;FEV₁:1 秒用力呼气容积;FVC:用力肺活量;FEV₁%pred:1 秒用力呼气容积占预计值的百分比;FVC%pred:用力肺活量占预计值的百分比

1.5 流式细胞术检测 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 细胞比率 将细胞密度为 1×10⁶ 个/mL 的新鲜 PBMC 接种于 24 孔板,每孔 100 μL,然后加入 PE 标记的鼠抗人 CD25 单克隆抗体和 FITC 标记的鼠抗人 CD4 单克隆抗体,4℃避光反应 30 min,用 PBS 缓冲液洗涤。用 Treg 染色试剂进行破膜、固定, PBS 洗涤、离心后,加入 APC 标记的鼠抗人 Foxp3 单克隆抗体及同型 IgG₁ 标记细胞内抗体,4℃避光 30 min,用 PBS 缓冲液洗涤。最后用 0.4 mL 含 1% 多聚甲醛溶液的 PBS 重悬细胞,上流式细胞仪检测 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 占 CD4⁺ T 细胞的百分比(简称 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率);每次检测设立同型对照。

1.6 统计学处理 采用 Flowjo 10.0 软件对流式细胞术检测结果进行分析。所有数据采用 SPSS 19.0 软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,有意义的进一步行*t* 检验。采用 Pearson 相关分析法进行相关性分析,相关系数用 *r* 表示。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 受试者临床资料分析 本实验共纳入受试者 109 例,其中对照组 40 例,SCOPD 患者 50 例,AECOPD 患者 19 例。在对照组中,吸烟者的 FEV₁、FEV₁%pred 和 FEV₁/FVC 比率均低于非吸烟者,这说明吸烟可能引起肺功能下降。SCOPD 组的 FEV₁、FEV₁%pred 和 FEV₁/FVC 比率均低于对照组,并随着 COPD 分级增加,肺功能逐步降低(表 1)。

2.2 COPD 患者外周血中 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 失衡 为了探索 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 平衡在 COPD 发生及进展中的作用,本研究采用流式细胞术分析了对照组、SCOPD 组和 AECOPD 组患者的外周血 Th17 和 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 占 CD4⁺ T 细胞的百分率变化。结果(图 1、表 2)显示:与对照组相比,SCOPD 组的 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率明显降低(*P*<0.05),AECOPD 组的 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率明显升高(*P*<0.05),而 SCOPD 和 AECOPD 组的 Th17/CD4⁺ 比率和 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比值均明显升高(*P*<0.05)。

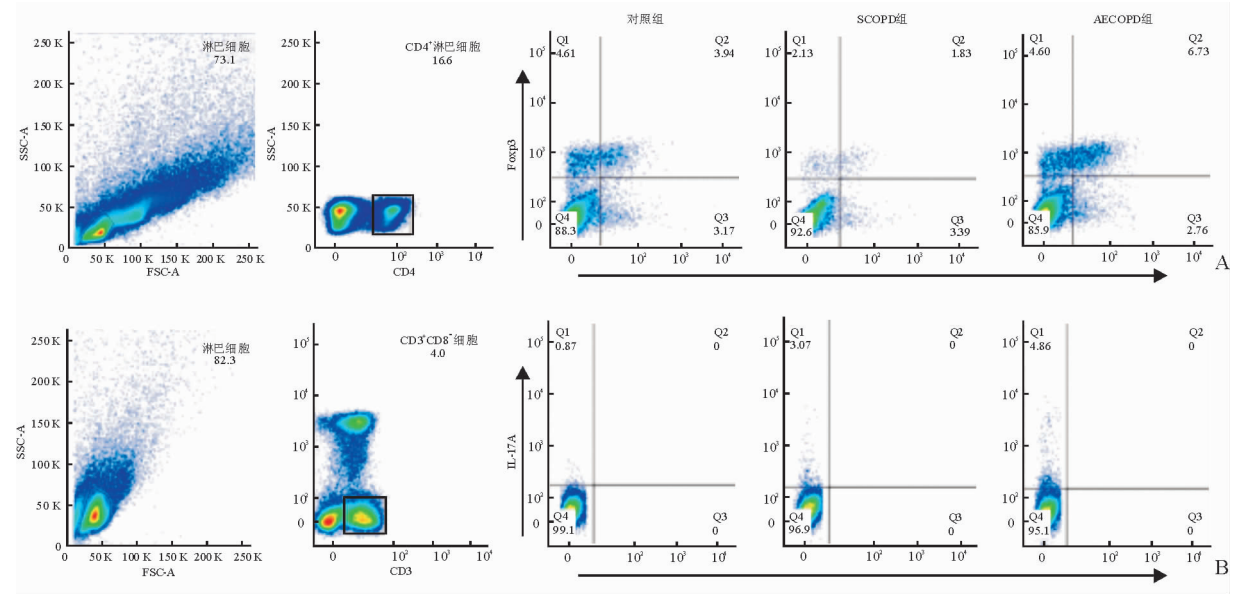


图 1 各组受试者的 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 和 Th17 细胞流式检测结果

A: CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺; B: Th17/CD4⁺

表 2 对照组、SCOPD 组和 AECOPD 组外周血 Th17 细胞和 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的表达以及 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比值

细胞	对照组 (n = 40)			SCOPD 组 (n = 50)			AECOPD 组 (n = 19)		
	$\bar{x} \pm s$			$\bar{x} \pm s$			$\bar{x} \pm s$		
Th17/% [#]	0.95 ± 0.27			2.3 ± 1.07 ^a			3.48 ± 0.75 ^a		
CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg/% [#]	4.11 ± 0.79			2.62 ± 1.11 ^a			5.25 ± 1.37 ^a		
Th17/CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg	0.24 ± 0.08			1.22 ± 0.96 ^a			0.73 ± 0.33 ^a		

[#]指 Th17 和 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 占 CD4⁺ T 细胞的百分比。 ^aP<0.05 与对照组比较

2.3 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 失衡与 SCOPD 患者肺功能的关系 为了探讨 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 与肺功能的关系,本研究将对照组分为非吸烟组和吸烟组,将 SCOPD 组按肺功能分为轻度、中度、重度和极重度组。分析发现,Th17/CD4⁺ 比率和 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比值在吸烟组高于非吸烟组(P<0.05),在 SCOPD 各组均高于非吸烟组(P<0.05),并且随着肺功能分级进展,Th17/CD4⁺ 比率和 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比值均逐步升高(P<0.05)。CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率在吸烟组高于非吸烟组(P<0.05),轻度组与非吸烟组差异无统计学意义,而中度组 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率低于轻度组和非吸烟组(P<0.05),并且重度组和极重度组的 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率低于中度组(P<0.05,表 3)。

表 3 非吸烟者、吸烟者和 SCOPD 患者外周血 Th17 细胞、CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的表达及 Th17/ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比值

细胞	对照组		SCOPD 组			
	非吸烟者 (n = 20)	吸烟者 (n = 20)	轻度(n = 11)	中度(n = 14)	重度(n = 11)	极重度(n = 14)
Th17/% [#]	0.74 ± 0.16	1.16 ± 0.19 ^a	1.12 ± 0.27 ^a	1.72 ± 0.33 ^{abc}	2.74 ± 0.48 ^{abcd}	3.54 ± 0.80 ^{abcde}
CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg/% [#]	3.83 ± 0.32	4.37 ± 1.02 ^a	3.98 ± 0.41	3.18 ± 0.78 ^{abc}	1.75 ± 0.19 ^{abcd}	1.66 ± 0.61 ^{abcd}
Th17/ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg	0.19 ± 0.03	0.28 ± 0.09 ^a	0.28 ± 0.05 ^a	0.57 ± 0.15 ^{abc}	1.57 ± 0.19 ^{abcd}	2.35 ± 0.87 ^{abcde}

[#]指 Th17 和 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 占 CD4⁺ T 细胞的百分比。 ^aP<0.05 与非吸烟者比较;^bP<0.05 与吸烟者比较;^cP<0.05 与轻度 COPD 组比较;^dP<0.05 与中度 COPD 组比较;^eP<0.05 与重度 COPD 组比较

2.4 Th17、CD25⁺ Foxp3⁺ Treg、Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 与肺功能的相关性分析 本研究进一步分析 SCOPD 患者外周血 Th17/CD4⁺、CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率、Th17/CD25⁺ Foxp3⁺

Treg 比值与肺功能下降程度的相关性。结果发现, Th17/CD4⁺ 比率与 FEV₁% pred、FVC% pred 和 FEV₁/FVC 比率均负相关 ($P<0.05$); CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率与 FEV₁% pred、FVC% pred 和 FEV₁/FVC 比率均正相关 ($P<0.05$);

Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比值与 FEV₁% pred、FVC% pred、FEV₁/FVC 比率也均负相关 ($P<0.05$)。这些数据说明,COPD 患者体内 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 失衡与肺功能下降有高度的相关性(表 4)。

表 4 外周血 Th17 和 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 与肺功能的相关性分析

肺功能指标	Th17/CD4 ⁺		CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg/CD4 ⁺		Th17/CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ Treg	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
FVC%pred/%	0.663	<0.05	0.567	<0.05	-0.643	<0.05
FEV ₁ %pred/%	-0.844	<0.05	0.785	<0.05	-0.813	<0.05
FEV ₁ %pred/FVC	-0.785	<0.05	0.725	<0.05	-0.769	<0.05

3 讨 论

COPD 与气管和肺组织对香烟烟雾等有害颗粒的异常慢性炎性反应有关^[6-7]。这些有害颗粒不仅会引起上皮细胞损伤,激活固有免疫,而且会使机体自身的抗原性发生改变,进而激活特异性免疫。近期有很多研究显示,香烟烟雾的刺激会激活 T 细胞免疫^[8-9]。Treg 对 T 细胞亚群的分化具有重要的调节作用,Treg 表达 Foxp3 后对 Th17 有明显的负向调节作用^[4]。因此,研究 Th17/Treg 平衡在不同阶段、不同程度 COPD 患者体内的变化具有重要的临床意义。已有一些研究^[10]发现, Th17/CD25⁺ Treg 平衡在 SCOPD 患者中有变化,但没有研究 Foxp3⁺ Treg 在 COPD 患者体内的变化。COPD 患者的主要临床表现为气流受限呈进行性进展,肺功能的变化是 COPD 进展的重要指标。因此,本研究选取了健康对照人群、SCOPD 患者及 AECOPD 患者作为研究对象,检测各组外周血中 Th17 和 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 占 CD4⁺ T 细胞百分比的变化,分析 Th17、CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 与肺功能的相关性,并从免疫学角度探索 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 失衡在 COPD 发生及进展中的病理生理学机制。

本研究分析 Th17、CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 在对照组、SCOPD 组和 AECOPD 组的表达情况,结果发现 SCOPD 组的 Th17/CD4⁺ 比率高于对照组,而 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率低于对照组; AECOPD 组的 Th17/CD4⁺ 和 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率均高于对照组。遂进一步分析 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比值,发现 SCOPD 组和 AECOPD 组均高于对照组。这说明 COPD 患者体内处于 Th17 优势状态,AECOPD 患者的 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率升高可能是由于 COPD 急

性发作的情况下存在其他促 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 分化的因素(如感染等)。

为了进一步探索 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 在 COPD 中的作用,本研究将对照组分为非吸烟组和吸烟组,将不同严重程度的 SCOPD 患者按肺功能分级分为 4 组。分析发现,吸烟者的 Th17/CD4⁺、CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 和 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 均高于非吸烟者;并且,随着 COPD 严重程度的进展,Th17/CD4⁺ 和 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 在 SCOPD 组逐步升高;从中度 COPD 开始,CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率明显下降,并随着疾病进展逐步降低。表 1 数据显示,吸烟者的 FEV₁%pred、FEV%pred 和 FEV₁/FVC 均低于非吸烟者;结果提示在 COPD 前期(FEV₁%pred 开始下降时)已经开始出现 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 失衡,并且随着肺功能下降,Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 失衡逐步加重。Wang 等^[8]通过香烟烟雾刺激建立小鼠 COPD 模型,检测不同肺功能阶段小鼠 Th17/CD4⁺ 和 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 的变化,结果发现:短期香烟刺激的小鼠 PBMC 和肺部 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg、Th17 均比对照组明显增加,但是 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 无明显变化;长期刺激的小鼠 PBMC 和肺部 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比对照组明显减少,Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比对照组明显升高。本研究结果与之类似。

从本研究临床试验和 Wang 等^[8]的动物实验结果可见,CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 的变化不同于 Th17 呈现一个稳步同方向的变化,而在吸烟组 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 所占比例相对于肺功能正常的非吸烟者出现了升高,呈现出一个波动的变化;这表明 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 可能在 Th17/Treg 平衡中起到单独调节作用。已有研究证明,Treg 细胞是体内

重要的调节细胞,它可以通过接触抑制和分泌 IL-10 而抑制 Th17 的分化及功能^[10-12]。而 Th17 是一种促炎性反应细胞,它可分泌 IL-6 和 IL-21 等因子,激活 STAT-3 通路,抑制 Foxp3 的表达,进而抑制 Treg 分化^[13-15]。因此,CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率在吸烟组出现升高,可能是由于 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 对 Th17 分化的抑制作用。COPD 前期可能通过 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 比率升高而抑制 Th17 分化,从而保护内环境稳态;但是随着 COPD 进展,继续升高的 Th17 反过来抑制 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 的调节作用,使内环境失衡;到 COPD 晚期, Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 完全失衡, Th17 占绝对优势。

本研究中, COPD 患者的 Th17/CD4⁺、CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 和 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 随着肺功能分级逐步变化,因此进一步分析 COPD 患者 Th17、CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 和 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 与肺功能的相关性。结果显示, Th17/CD4⁺ 和 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 均与 FEV₁%pred、FVC%pred 及 FEV₁/FVC 负相关,而 CD25⁺ Foxp3⁺ Treg/CD4⁺ 与 FEV₁%FVC%pred 及 FEV₁/FVC 正相关。以上结果进一步说明, COPD 患者体内 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 失衡的过程与肺功能的下降程度高度相关。

综上所述, Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 失衡参与了 COPD 患者疾病进展的过程,与肺功能下降高度相关, CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 对 Th17/Treg 平衡起到了重要的调节作用。本研究结果从免疫学角度为揭示 COPD 的病理生理机制提供了新的视角。同时,本研究也为 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 应用于临床评估 COPD 的严重程度,指导 COPD 的治疗方案提供了一定的理论依据。然而,本研究尚存在性别比率不均衡和样本量小等不足,因此检测 Th17/CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 是否可以应用于评估 COPD 预后、指导 COPD 治疗,还有待更完善的大样本研究来明确。

参考文献

[1] 黄俊芳,王广发.慢性阻塞性肺病全球倡议慢性阻塞性肺病指南(2013 更新版)解读[J].中国医学前沿杂志(电子版),2013,5(3):58-60.

[2] FREEMAN C M, MCCUBBREY A L, CRUDGINGTON S, et al. Basal gene expression by lung CD4⁺ T cells in chronic

obstructive pulmonary disease identifies independent molecular correlates of airflow obstruction and emphysema extent[J]. PLoS One, 2014, 9(5):e96421.

[3] BEDOYA S K, LAM B, LAU K, et al. Th17 cells in immunity and autoimmunity[J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013:986789.

[4] OHKURA N, KITAGAWA Y, SAKAGUCHI S. Development and maintenance of regulatory T cells[J]. Immunity, 2013, 38(3):414-423.

[5] 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,2007,46(1):254-261.

[6] HERNANDEZ C P, MORROW K, VELASCO C, et al. Effects of cigarette smoke extract on primary activated T cells[J]. Cell Immunol, 2013, 282(1):38-43.

[7] ALMANZAR G, EBERLE G, LASSACHER A, et al. Maternal cigarette smoking and its effect on neonatal lymphocyte subpopulations and replication[J]. BMC Pediatr, 2013, 13:57.

[8] 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):504-512.

[9] NADIGEL J, PRÉFONTAINE D, BAGLOLE C J, et al. Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8⁺ T cells in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respir Res, 2011, 12:149.

[10] O'SULLIVAN D, PEARCE E L. Fatty acid synthesis tips the TH17-Treg cell balance[J]. Nat Med, 2014, 20(11):1235-1236.

[11] VANDER GEEST K S, ABDULAHAD W H, TETE S M, et al. Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4⁺ T cells[J]. Exp Gerontol, 2014, 60:190-196.

[12] GUO M M, TSENG W N, KO C H, et al. Th17- and Treg-related cytokine and mRNA expression are associated with acute and resolving Kawasaki disease[J]. Allergy, 2015, 70(3):310-318.

[13] ZHOU L, IVANOV I I, SPOLSKI R, et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways [J]. Nat Immunol, 2007, 8(9):967-974.

[14] YANG X O, PANOPOULOS A D, NURIEVA R, et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells[J]. J Biol Chem, 2007, 282(13):9358-9363.

[15] KORN T, BETTELLI E, GAO W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells [J]. Nature, 2007, 448(7152):484-487.