

• 诊治分析 •

不同慢性阻塞性肺疾病全球倡议分级慢性阻塞性肺疾病稳定期患者外周血辅助性 T 细胞 17、调节性 T 细胞含量的对比分析

金晶¹, 王晶^{2, 3}, 荆晶^{2, 3}, 李风森^{2, 3}

【摘要】 目的 对比不同慢性阻塞性肺疾病全球倡议 (GOLD) 分级慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 稳定期患者外周血辅助性 T 细胞 17 (Th17)、调节性 T 细胞 (Treg) 含量, 以期为临床有效治疗 COPD 稳定期患者提供新的靶点。方法 选取 2017 年 6—12 月于新疆医科大学附属中医医院接受门诊随访的 COPD 稳定期患者 96 例, 参照 2013 版 GOLD 分级标准分为 B 级组 40 例、C 级组 23 例、D 级组 33 例; 另选取同期体检且年龄匹配的健康者 30 例作为对照组。比较 4 组受试者一般资料 (包括性别、年龄、身高、体质量), 外周血白介素 17a (IL-17a)、白介素 10 (IL-10) 水平, 外周血 Th17、Treg 含量及 Th17/Treg 比值。结果 (1) 4 组受试者性别、年龄、身高比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$) ; B 级组、C 级组、D 级组患者体质量小于对照组, C 级组、D 级组患者体质量小于 B 级组, D 级组患者体质量小于 C 级组 ($P<0.05$) 。(2) B 级组、C 级组、D 级组患者外周血 IL-17a 水平高于对照组, C 级组、D 级组患者外周血 IL-17a 水平高于 B 级组, D 级组患者外周血 IL-17a 水平高于 C 级组 ($P<0.05$) ; B 级组、C 级组、D 级组患者外周血 IL-10 水平低于对照组, C 级组、D 级组患者外周血 IL-10 水平低于 B 级组, D 级组患者外周血 IL-10 水平低于 C 级组 ($P<0.05$) 。(3) B 级组、C 级组、D 级组患者外周血 Th17 含量及 Th17/Treg 比值高于对照组, C 级组、D 级组患者外周血 Th17 含量及 Th17/Treg 比值高于 B 级组, D 级组患者外周血 Th17 含量及 Th17/Treg 比值高于 C 级组 ($P<0.05$) ; B 级组、C 级组、D 级组患者外周血 Treg 含量低于对照组, C 级组、D 级组患者外周血 Treg 含量低于 B 级组, D 级组患者外周血 Treg 含量低于 C 级组 ($P<0.05$) 。结论 随着 GOLD 分级增加, COPD 稳定期患者外周血 Th17 含量逐渐升高、Treg 含量逐渐降低, 炎性反应、免疫功能紊乱程度逐渐加重; 有效控制 Th17/Treg 失衡有可能成为中医宏观、西医微观防治稳定期 COPD 的新靶点。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病; Th17 细胞; T 淋巴细胞, 调节性; 白介素 10; 白介素 17

【中图分类号】 R 563.9 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.05.014

金晶, 王晶, 荆晶, 等. 不同慢性阻塞性肺疾病全球倡议分级慢性阻塞性肺疾病稳定期患者外周血辅助性 T 细胞 17、调节性 T 细胞含量的对比分析 [J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2019, 27 (5) : 68-71. [www.syxnf.net]

JIN J, WANG J, JING J, et al. Contrastive analysis on peripheral blood Th17 and Treg contents in stable COPD patients with different GOLD grades [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2019, 27 (5) : 68-71.

Contrastive Analysis on Peripheral Blood Th17 and Treg Contents in Stable COPD Patients with Different GOLD Grades JIN Jing¹, WANG Jing^{2, 3}, JING Jing^{2, 3}, LI Fengsen^{2, 3}

1.Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2.The Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

3.Xinjiang Key Laboratory of Respiratory Disease, Urumqi 830000, China

Corresponding author: LI Fengsen, E-mail: fengsen602@163.com

【Abstract】 Objective To compare the peripheral blood Th17 and Treg contents in stable COPD patients with different GOLD grades, to provide a new target for clinical effective treatment of patients with stable COPD. **Methods** From June to December 2017, a total of 96 stable COPD patients received outpatient follow-up were selected in the Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, and they were divided into B-grade group ($n=40$), C-grade group ($n=23$) and D-grade group ($n=33$) according to 2013 GOLD grading standard; meanwhile a total of 30 age-matched healthy volunteers admitted to this hospital for physical examination were selected as control group. General information (including gender, age, height and weight), peripheral blood IL-17a and IL-10 levels, peripheral blood Th17 and Treg contents,

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题 (2016D03024)

1.830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学 2.830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学附属中医医院
3.830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆呼吸病研究重点实验室

通信作者: 李风森, E-mail: fengsen602@163.com

and Th17/Treg ratio were compared in the four groups. **Results** (1) No statistically significant difference of gender, age or height was found in the four groups ($P>0.05$) ; weight in B-grade group, C-grade group and D-grade group was statistically significantly lower than that in control group, respectively, weight in C-grade group and D-grade group was statistically significantly lower than that in B-grade group, respectively, and weight in D-grade group was statistically significantly lower than that in C-grade group ($P<0.05$) . (2) Peripheral blood IL-17a level in B-grade group, C-grade group and D-grade group was statistically significantly higher than that in control group, respectively, peripheral blood IL-17a level in C-grade group and D-grade group was statistically significantly higher than that in B-grade group, respectively, and peripheral blood IL-17a level in D-grade group was statistically significantly higher than that in C-grade group ($P<0.05$) ; peripheral blood IL-10 level in B-grade group, C-grade group and D-grade group was statistically significantly lower than that in control group, respectively, peripheral blood IL-10 level in C-grade group and D-grade group was statistically significantly lower than that in B-grade group, respectively, and peripheral blood IL-10 level in D-grade group was statistically significantly lower than that in C-grade group ($P<0.05$) . (3) Peripheral blood Th17 content and Th17/Treg ratio in B-grade group, C-grade group and D-grade group were statistically significantly higher than those in control group, peripheral blood Th17 content and Th17/Treg ratio in C-grade group and D-grade group were statistically significantly higher than those in B-grade group, and peripheral blood Th17 content and Th17/Treg ratio in D-grade group were statistically significantly higher than those in C-grade group ($P<0.05$) ; peripheral blood Treg content in B-grade group, C-grade group and D-grade group was statistically significantly lower than that in control group, respectively, peripheral blood Treg content in C-grade group and D-grade group was statistically significantly lower than that in B-grade group, respectively, and peripheral blood Treg content in D-grade group was statistically significantly lower than that in C-grade group ($P<0.05$) . **Conclusion** In patients with stable COPD, as GOLD grade increases, peripheral blood Th17 content increases, peripheral blood Treg content reduces, inflammatory reaction and degree of immune dysfunction aggravates, respectively; effective control of imbalance of Th17/Treg may be a new target for preventing and treating stable COPD at macro level of TCM and micro level of Western medicine.

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary disease; Th17 cells; T-lymphocytes, regulatory; Interleukin-10; Interleukin-17

长期气道慢性炎症持续状态是导致慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease, COPD）患者急性加重的主要原因^[1]，近年来辅助性T细胞17（T helper 17 cells, Th17）/调节性T细胞（regulatory T cells, Treg）失衡所致免疫应答反应过度或免疫抑制作用过强在COPD发病机制中的作用逐渐受到关注^[2-3]。Th17与Treg共同维持机体免疫平衡，其中Th17可在一定程度上评估COPD患者病情严重程度及预后^[4]，而Treg可反映有害气体或颗粒等所致气道炎症严重程度，并具有一定抑制炎症作用^[5]。本研究旨在对比不同慢性阻塞性肺疾病全球倡议（Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD）分级^[6] COPD稳定期患者外周血Th17、Treg含量，以期为临床有效治疗COPD稳定期患者提供新的靶点，现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2017年6—12月于新疆医科大学附属中医医院接受门诊随访的COPD稳定期患者96例，年龄45~80岁，均符合2013版GOLD中的COPD稳定期诊断标准^[6]，排除标准：（1）伴有气胸、胸腔积液、活动性肺结核等其他肺部疾病者；（2）伴有严重心、脑血管疾病，肝、肾功能不全，造血系统疾病等者；（3）伴有精神异常者；（4）妊娠期或哺乳期妇女；（5）伴有恶性肿瘤者；（6）存在先天或后天性免疫缺陷者。参照2013版GOLD分级标准将所有患者分为B级组40例、C级组23例、D级组33例；另选取同期于新疆医科大学附属中医医院体检中心体检且年龄匹配的健

康者30例作为对照组。本研究经新疆医科大学附属中医医院医学伦理委员会审核批准（审批号：20170214-116），4组受试者对本研究知情同意并签署知情同意书。

1.2 2013版GOLD分级标准 2013版GOLD分级标准涉及肺功能、慢性阻塞性肺疾病评估测试（COPD Assessment Test, CAT）评分、入组前12个月内急性加重次数及住院次数4项，以症状少病情轻为A级，症状多病情轻为B级，症状少病情重为C级，症状多病情重为D级。

1.3 仪器及试剂 流式细胞检测仪（guava easy Cyte8HT, MILLIPORE公司生产，中国），Multiskan Spectrum全波长酶标仪（德国Thermo Fisher公司生产），流式上样管（12 mm×75 mm, 5 ml, Falcon）；Treg抗体：CD4（美国BD公司生产，生产批号：555346），CD25（美国BD公司生产，生产批号：555434），CD127（美国BD公司生产，生产批号：557938）；Th17抗体：CD4（美国BD公司生产，生产批号：555346），CD183（美国BD公司生产，生产批号：550967），CD196（美国BD公司生产，生产批号：559562）；人白介素17a(IL-17a)、白介素10(IL-10)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒（武汉基因美生物科技有限公司生产，生产批号：96T\48TCY40067、96T\48TCY40062）。

1.4 观察指标

1.4.1 一般资料 比较4组受试者性别、年龄、身高、体质量。
1.4.2 外周血IL-17a、IL-10水平 采集4组受试者外周血

5 ml, 3 000 r/min (离心半径3 cm) 离心10 min, 采用EP管留取血清并保存于-80℃冰箱; 采用ELISA双抗夹心法检测外周血IL-17a、IL-10水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。1.4.3 外周血Th17、Treg含量及Th17/Treg比值 采集4组受试者外周血2 ml, 加入100 μl肝素钠抗凝, Th17的检测依次加入表面标记抗体CD4 FITC 20 μl、CD3 PCP5.5 5 μl、CD183 APC 20 μl、CD196 PE 5 μl, 混匀; Treg的检测依次加入表面标记抗体CD4 FITC 20 μl、CD25 APC 20 μl、CD127 PE 5 μl、CD4 FITC 20 μl、CD3 PCP5.5 5 μl、CD183 APC 20 μl、CD196 PE 5 μl, 混匀; 避光孵育30 min后加入溶血素裂解红细胞, 300×g离心5 min, 弃上清并加入磷酸盐缓冲液(PBS)2 ml, 300×g离心5 min, 弃上清并加入PBS 500 μl, 混匀后上机检测, 将测得的数据存盘后采用CELL Quest软件进行分析, 并计算Th17/Treg比值。

1.5 统计学方法 采用SPSS 18.0软件进行数据分析, 年龄、身高、体质量、外周血IL-10及IL-17a水平、外周血Th17及Treg含量、Th17/Treg比值均符合正态分布, 以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 q 检验; 性别以相对数表示, 采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 4组受试者性别、年龄、身高比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。4组受试者体质量比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); B级组、C级组、D级组患者体质量小于对照组, C级组、D级组患者体质量小于B级组, D级组患者体质量小于C级组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 见表1)。

表1 4组受试者一般资料比较

Table 1 Comparison of general information in the four groups

组别	例数 (男/女)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	身高 ($\bar{x} \pm s$, cm)	体质量 ($\bar{x} \pm s$, kg)
对照组	30	16/14	64.7 ± 4.6	168.4 ± 8.4
B级组	40	18/22	65.6 ± 4.4	169.0 ± 8.5
C级组	23	11/12	64.2 ± 3.9	168.0 ± 6.6
D级组	33	19/14	66.2 ± 4.6	166.1 ± 7.5
F (χ^2) 值		3.018 ^d	2.967	3.312
P 值		0.059	0.056	0.034

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与B级组比较, ^b $P<0.05$; 与C级组比较, ^c $P<0.05$; ^d为 χ^2 值

2.2 外周血IL-17a、IL-10水平 4组受试者外周血IL-17a、IL-10水平比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); B级组、C级组、D级组患者外周血IL-17a水平高于对照组, C级组、D级组患者外周血IL-17a水平高于B级组, D级组患者外周血IL-17a水平高于C级组, 差异有统计学意义($P<0.05$); B级组、C级组、D级组患者外周血IL-10水平低于对照组, C级组、D级组患者外周血IL-10水平低于B级组, D级组患者外周血IL-10水平低于C级组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 见表2)。

2.3 外周血Th17、Treg含量及Th17/Treg比值 4组受试者外周血Th17、Treg含量及Th17/Treg比值比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); B级组、C级组、D级组患者外周血Th17含量及Th17/Treg比值高于对照组, C级组、D级组患者外周血Th17含量及Th17/Treg比值高于B级组, D级组患者外周血Th17含量及Th17/Treg比值高于C级组, 差异有统计学意义($P<0.05$); B级组、C级组、D级组患者外周血Treg含量低于对照组, C级组、D级组患者外周血Treg含量低于B级组, D级组患者外周血Treg含量低于C级组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 见表3)。

表2 4组受试者外周血IL-17a、IL-10水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 2 Comparison of peripheral blood IL-17a and IL-10 levels in the four groups

组别	例数	IL-17a	IL-10
对照组	30	18.46 ± 5.17	14.87 ± 1.39
B级组	40	105.77 ± 55.79 ^a	11.85 ± 1.31 ^a
C级组	23	154.80 ± 60.53 ^{ab}	7.73 ± 0.84 ^{ab}
D级组	33	190.19 ± 94.17 ^{abc}	3.65 ± 0.68 ^{abc}
F 值		20.597	10.916
P 值		<0.01	<0.01

注: IL-17a=白介素17a, IL-10=白介素10; 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与B级组比较, ^b $P<0.05$; 与C级组比较, ^c $P<0.05$

表3 4组受试者外周血Th17、Treg含量及Th17/Treg比值比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of peripheral blood Th17 and Treg contents, and Th17/Treg ratio in the four groups

组别	例数	Th17 (%)	Treg (%)	Th17/Treg比值
对照组	30	13.74 ± 5.82	17.85 ± 5.52	1.07 ± 0.65
B级组	40	26.97 ± 13.30 ^a	13.69 ± 5.47 ^a	3.47 ± 0.83 ^a
C级组	23	33.25 ± 13.90 ^{ab}	7.55 ± 4.87 ^{ab}	5.90 ± 1.16 ^{ab}
D级组	33	53.47 ± 5.82 ^{abc}	3.31 ± 4.63 ^{abc}	9.71 ± 1.59 ^{abc}
F 值		20.550	11.020	9.878
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: Th17=辅助性T细胞17, Treg=调节性T细胞; 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与B级组比较, ^b $P<0.05$; 与C级组比较, ^c $P<0.05$

3 讨论

近年来, 炎症/免疫机制在COPD发病机制中的作用备受关注^[7-8], Th17、Treg均属 $CD4^+$ T淋巴细胞亚群, 二者分化过程及功能相互对抗, 生理条件下保持着动态平衡, 有利于维持机体免疫状态稳定, 在免疫应答及免疫抑制方面具有重要作用^[9]。中医辨证论治体系认为, 疾病的发生与阴阳失衡有关, 需通过“调和阴阳”而达到“阴平阳秘, 邪不可干”的治疗疾病目的^[10], Th17与Treg的关系犹如中医学阴阳关系, 此消彼长、协调平衡^[11]。

本研究结果显示, B级组、C级组、D级组患者体质量

小于对照组, C 级组、D 级组患者体质量小于 B 级组, D 级组患者体质量小于 C 级组, 提示 COPD 稳定期患者体质量较低, 且随着 GOLD 分级增加, COPD 稳定期患者体质量逐渐降低, 提示体质量可能与 COPD 稳定期患者病情严重程度有关^[12]; 但由于 COPD 稳定期患者长期慢性炎症不仅局限于肺组织, 还常伴有全身系统性炎症, 因此不能排除全身系统性炎症所致 COPD 患者体质量降低。

研究表明, 炎性反应和免疫功能紊乱在 COPD 发生、发展过程中具有重要作用^[13]。本研究结果显示, B 级组、C 级组、D 级组患者外周血 IL-17a 水平、Th17 含量及 Th17/Treg 比值高于对照组, C 级组、D 级组患者外周血 IL-17a 水平、Th17 含量及 Th17/Treg 比值高于 B 级组, D 级组患者外周血 IL-17a 水平、Th17 含量及 Th17/Treg 比值高于 C 级组, 而 B 级组、C 级组、D 级组患者外周血 IL-10 水平、Treg 含量低于对照组, C 级组、D 级组患者外周血 IL-10 水平、Treg 含量低于 B 级组, D 级组患者外周血 IL-10 水平、Treg 含量低于 C 级组, 提示 COPD 稳定期患者存在炎性反应、免疫功能紊乱, 且随着 GOLD 分级增加, COPD 稳定期患者炎性反应、免疫功能紊乱程度逐渐加重, 分析其可能原因为: Th17 可通过 IL-17a 而促进免疫应答并促使中性粒细胞聚集、活化及分泌多种炎性因子, 而 Treg 介导免疫抑制, 可通过释放 IL-10 而抑制 T 细胞及抗原呈递细胞功能, Th17/Treg 失衡可导致促炎性因子分泌增多及机体抑制炎性反应作用不足, 继而加重 COPD 患者炎性反应及病情严重程度^[14-16]。

综上所述, 随着 GOLD 分级增加, COPD 稳定期患者外周血 Th17 含量逐渐升高、Treg 含量逐渐降低, 炎性反应、免疫功能紊乱程度逐渐加重, 而有效控制 Th17/Treg 失衡、升高 Treg 含量对于改善 COPD 稳定期患者病情严重程度可能具有重要意义, 并有可能成为中医宏观、西医微观防治稳定期 COPD 的新靶点。

参考文献

- [1] 冉丕鑫.慢性阻塞性肺疾病的危险因素与社区综合防治 [J].实用医学杂志, 2014, 30(1) : 4-5.DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2014.01.003.
- [2] TAN D B A, TEO T H, SETIAWAN A M, et al.Increased CTLA-4⁺ T cells may contribute to impaired T helper type 1 immune responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J].Immunology, 2017, 151 (2) : 219-226.DOI: 10.1111/imm.12725.
- [3] XU W H, HU X L, LIU X F, et al.Peripheral Tc17 and Tc17/Interferon- γ Cells are Increased and Associated with Lung Function in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease [J].Chin Med J (Engl), 2016, 129 (8) : 909-916.DOI: 10.4103/0366-6999.179798.
- [4] 汪露, 江涛.外周血 Th17 细胞对慢性阻塞性肺疾病症状严重程度及预后的评估价值 [J].中国病理生理杂志, 2016, 32 (2) : 273-277.DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2016.02.014.
- [5] 陈博, 蒋永亮, 胡瑞成, 等.调节性 T 细胞在 COPD 的免疫机制研究进展 [J].国际呼吸杂志, 2017, 37 (9) : 711-716. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2017.09.016.
- [6] 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(2013 年修订版) [J].中国医学前沿杂志(电子版), 2014, 36 (2) : 67-80.
- [7] 夏杰, 谢俊刚, 徐永健.慢性阻塞性肺疾病发病机制的研究进展 [J].国际呼吸杂志, 2014, 34 (1) : 53-57.DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2014.01.011.
- [8] 孙沛, 丁毅鹏.慢性阻塞性肺疾病危险因素及发病机理研究进展 [J].海南医学, 2015, 26 (9) : 1324-1327.DOI: 10.3969/j.issn.1003-6350.2015.09.0475.
- [9] 张奕, 张兰英, 欧阳璠.Th17/Treg 失衡与肺部疾病发病机制的研究进展 [J].中国医药导报, 2017, 14 (35) : 20-24.
- [10] 赵宗辽.阴阳平衡是中医把握疾病的思维核心 [J].中医药导报, 2015, 21 (12) : 1-3.DOI: 10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2015.12.001.
- [11] 彭立, 钱林超, 文磊, 等.中医药对 Th17/Treg 平衡调节的影响及在炎性疾病中的作用 [J].中华中医药杂志, 2015, 30 (10) : 3598-3601.
- [12] COLLINS B F, RAMENOFSKY D, AU D H, et al.The association of weight with the detection of airflow obstruction and inhaled treatment among patients with a clinical diagnosis of COPD [J].Chest, 2014, 146 (6) : 1513-1520.DOI: 10.1378/chest.13-2759.
- [13] ROVINA N, KOUTSOUKOU A, KOULOURIS N G.Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? [J].Mediators Inflamm, 2013: 413735.DOI: 10.1155/2013/413735.
- [14] WANG H, YING H, WANG S, et al.Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J].Clin Respir J, 2015, 9 (3) : 330-341. DOI: 10.1111/crj.12147.
- [15] MANEECHOTESUWAN K, WONGKAJORN SILP A, ADCOCK I M, et al.Simvastatin Suppresses Airway IL-17 and Upregulates IL-10 in Patients With Stable COPD [J].Chest, 2015, 148 (5) : 1164-1176.DOI: 10.1378/chest.14-3138.
- [16] SUN J, LIU T, YAN Y, et al.The role of Th1/Th2 cytokines played in regulation of specific CD4⁺ Th1 cell conversion and activation during inflammatory reaction of chronic obstructive pulmonary disease [J].Scand J Immunol, 2018, 88 (1) : e12674.DOI: 10.1111/sji.12674.

(收稿日期: 2019-01-25; 修回日期: 2019-05-15)

(本文编辑: 鹿飞飞)