

哮喘-慢阻肺重叠综合征患者外周血 Th17 和 Treg 细胞水平表达与肺功能的关系研究

夏清, 薛珉, 张亚娟, 洪伟俊, 赵华, 余苏云, 俞婷

(复旦大学附属闵行医院 / 上海市闵行区中心医院呼吸科, 上海 201100)

摘要: 目的 分析哮喘-慢阻肺重叠综合征 (ACOS) 患者辅助性 T 细胞 17 (Th17) 和调节性 T 细胞 (Treg) 表达水平, 及其与肺功能的相关性。方法 采用流式细胞术检测 60 例 ACOS 患者 (ACOS 组)、60 例哮喘患者 (哮喘组) 和 60 例慢性阻塞性肺疾病患者 (COPD 组) 外周血 Th17 和 Treg 细胞的表达, 比较分析其与肺功能指标的关系。结果 与哮喘组比较, COPD 组、ACOS 组外周血 CD4⁺ 细胞中 Th17 细胞表达及 Th17/Treg 比例明显升高, 而 Treg 细胞表达明显下降, 差异均有统计学意义 ($F=15.36\sim36.61$, 均 $P<0.05$); 与 COPD 组比较, ACOS 组外周血 CD4⁺ 细胞中 Th17 细胞表达及 Th17/Treg 比例明显升高, 而 Treg 细胞表达明显下降, 差异有统计学意义 ($F=36.61, 21.18, 15.26, P<0.05$)。ACOS 组患者 FVC%pred, FEV1%pred 和 FEV1/FVC 明显低于哮喘组, 差异均有统计学意义 ($F=7.36, 11.36, 9.68, P<0.05$), 但 FVC%pred 与 COPD 组患者比较, 差异无统计意义 ($t=0.52, P>0.05$)。ACOS 患者外周血 Th17 和 Th17/Treg 表达与 FVC%pred, FEV1%pred 和 FEV1/FVC 呈显著负相关 ($r=-0.502\sim-0.407$, 均 $P<0.05$)。Treg 与 FVC%pred, FEV1%pred 和 FEV1/FVC 呈显著正相关 ($r=0.019\sim0.033$, 均 $P<0.05$)。结论 ACOS 患者外周血 Th17 和 Treg 细胞表达异常, 存在 Th17/Treg 比例失衡, 且与肺功能下降密切相关。

关键词: 哮喘-慢阻肺重叠综合征; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞; 免疫失衡; 相关

中图分类号: R563;R392.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 02-104-04

doi:10.3969 / j.issn.1671-7414.2020.02.029

Study on the Relationship between the Expression of Th17 and Treg Cells in Peripheral Blood and Lung Function in Patients with Asthma-COPD Overlap Syndrome

XIA Qing, XUE Min, ZHANG Ya-juan, HONG Wei-jun, ZHAO Hua, YU Su-yun, YU Ting

(Department of Respiratory, Minhang Hospital Affiliated to Fudan University

(Minhang District Central Hospital, Shanghai 201100, China)

Abstract: Objective To analyze the expression levels of T help cell 17(Th17), T regular cell (Treg) in patients with asthma-COPD overlap syndrome (ACOS), and their correlation with lung function. **Methods** Flow cytometry was used to detect the expression of Th17 and Treg cells in peripheral blood of 60 ACOS patients (ACOS group), 60 asthma patients (asthma group) and 60 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD group), and the relationship between expression of Th17 and Treg lung function indexes was compared and analyzed. **Results** Compared with the asthma group, the expression of Th17 cells and the proportion of Th17/Treg in peripheral blood CD4⁺ cells in the COPD group and ACOS group were significantly increased, while the expression of Treg cells was significantly decreased, the difference was statistically significant ($F=15.26\sim36.61$, all $P<0.05$). Compared with the COPD group, the expression of Th17 cells and the proportion of Th17/Treg in the ACOS group's peripheral blood CD4⁺ cells were significantly increased, while the expression of Treg cells was significantly decreased, the difference was statistically significant ($F=36.61, 21.18, 15.26, P<0.05$). FVC%pred, FEV1%pred and FEV1/FVC in ACOS group were significantly lower than those in asthma group, the difference was statistically significant ($F=7.36, 11.36, 9.68, P<0.05$), but there was no significant difference between FVC%pred and COPD group ($t=0.52, P>0.05$). The expression of Th17 and Th17/Treg in the peripheral blood of ACOS patients was negatively correlated with FVC%pred, FEV1%pred and FEV1/FVC ($r=-0.502\sim-0.407$, all $P<0.05$). Treg was significantly positively correlated with FVC%pred, FEV1%pred, and FEV1/FVC ($r=0.019\sim0.033$, all $P<0.05$). **Conclusion** There was abnormal expression of Th17 and Treg cells in

基金项目: 上海市闵行区自然基金项目 (编号: 2019MHZ016)。

作者简介: 夏清 (1987-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 哮喘, E-mail: xiaqin198710@sina.com。

通讯作者: 俞婷 (1986-), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 睡眠, COPD。

peripheral blood of patients with ACOS, and resulting in imbalance of Th17/Treg ratio, which was closely related to reduction of lung function.

Keywords: asthma-COPD overlap syndrome; T help cell 17; T regular cell; immune imbalance; correlation

哮喘-慢阻肺重叠综合征 (asthma-COPD overlap syndrome, ACOS) 是一种以持续性气流受限为临床特征的临床综合征, 同时具有哮喘、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 两种疾病的相关症状, 其多以中老年人为主, 发病率约占慢性气道阻塞性疾病的15%~30%^[1-2]。目前, ACOS 仍缺乏标准定义与相应的治疗建议, 因此明确 ACOS 病理生理特点对指导治疗及预后改善具有重要意义。辅助性 T 细胞 17 (T help cell 17, Th17) 和调节性 T 细胞 (T regular cell, Treg) 均来源于 CD4⁺ 细胞, 二者功能与分化过程相互对抗, 分别发挥着促炎和抗炎的作用, 共同维护机体的免疫平衡和稳定^[3-4]。目前已有研究发现哮喘、COPD 等疾病的炎症损伤与外周血 Th17 和 Treg 的表达水平及比例失衡有关^[5], 但与其与 ACOS 病情的关系研究仍鲜有报道。本研究拟采用流式细胞技术检测 ACOS 患者外周血 Th17, Treg 表达水平, 探讨其与患者肺功能的相关性, 旨在为 ACOS 的临床治疗提供指导。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 1 月~2019 年 9 月

表 1 各组一般资料比较

项目	哮喘组 (n=60)	COPD 组 (n=60)	ACOS 组 (n=60)	F/χ^2	P
年龄 (岁)	55.14 ± 5.85	55.09 ± 4.07	54.83 ± 4.81	0.69	>0.05
性别 (男/女)	30/30	30/30	34/26	0.71	>0.05
BMI (kg/m ²)	26.19 ± 1.85	25.78 ± 1.49	25.97 ± 1.53	1.06	>0.05
病程 (年)	7.05 ± 1.35	6.93 ± 1.87	7.20 ± 2.54	0.92	>0.05

1.2 试剂和仪器 淋巴细胞分离液 (北京宝来生物科技有限公司), EPICS 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特公司), Master Screen PFT System 肺功能监测仪 (德国耶格)。

1.3 方法

1.3.1 Th17, Treg 检测: 采集各组患者清晨空腹静脉血 3 ml, 装于 EDTA 抗凝管中, 采用 PBS 按 1 : 1 稀释, 加入淋巴细胞分离液, 3 000 r/min 离心 20 min, 吸取中间的白色絮状淋巴细胞层, 分离外周血单核细胞悬液, 并调整为 2×10^6 个/ml 的浓度。将单核细胞铺至 24 孔板, 染色、孵育后, 采用 EPICS 流式细胞仪测定 CD4⁺ 细胞中 Th17, Treg 表达水平及细胞比例。

1.3.2 肺功能: 采用肺功能监测仪, 检测所有患者的肺功能指标, 主要包括用力肺活量占预计值百分比 (FVC%pred)、第 1 秒用力呼气量占预计值百

在我院呼吸内科住院治疗的 ACOS 患者 (ACOS 组) 共 60 例。入组标准: ①均符合 2014 年慢性阻塞性肺疾病全球倡议 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD) 及支气管哮喘全球倡议 (Global Initiative on Bronchial Asthma, GINA) 联合发布的指南中的诊断标准^[6], 即: 同时被诊断为支气管哮喘和 COPD; 支气管舒张剂使用后第一秒用力呼气容积 (forced expiratory volume in one second, FEV1) / 用力肺活量 (forced vital capacity, FVC) < 70%; 总 IgE 水平升高, 支气管舒张试验呈阳性; ②近 1 个月未接受糖皮质激素治疗, 均签署知情同意书; ③排除肺癌、肺栓塞、肺结核、支气管扩张等严重肺部疾病。其中男性 34 例, 女 26 例; 年龄 42~70 (54.83 ± 4.81) 岁; 体质指数 (body mass index, BMI) 22.16~28.69 (25.97 ± 1.53) kg/m²; 病程: 2~11 (7.20 ± 2.54) 年。选取本院同期收治的哮喘患者 (哮喘组, n=60) 及 COPD 患者 (COPD 组, n=60)。三组患者的年龄、性别构成比、BMI, 病程等一般资料, 差异均无统计学意义 (P>0.05)。见表 1。

分比 (FEV1%pred) 和 FEV1/FVC 水平。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 版软件包。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验; 计数资料采用例数表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 采用 Pearson 线性相关进行相关性分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组外周血 Th17, Treg 细胞表达及其比例比较 见表 2。与哮喘组比较, COPD 组、ACOS 组外周血 CD4⁺ 细胞中 Th17 细胞表达及 Th17/Treg 比例明显升高, 而 Treg 细胞表达明显下降, 差异均有统计学意义 (均 P<0.05); 与 COPD 组比较, ACOS 组外周血 CD4⁺ 细胞中 Th17 细胞表达及 Th17/Treg 比例明显升高, 而 Treg 细胞表达明显下降, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。

2.2 各组肺功能指标比较 见表3。各组 FVC%pred, FEV1%pred, FEV1/FVC 比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。ACOS 组患者

FVC%pred, FEV1%pred, FEV1/FVC 明显低于哮喘组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 但 FVC%pred 与 COPD 组患者比较, 差异无统计意义 ($P>0.05$)。

表2 各组外周血 Th17, Th17 表达及其比例比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	哮喘组 ($n=60$)	COPD 组 ($n=60$)	ACOS 组 ($n=60$)	F	P
Th17 (%)	3.14 ± 0.85	4.51 ± 1.07	6.44 ± 1.62	36.61	<0.001
Treg (%)	3.31 ± 0.76	2.56 ± 0.61	1.52 ± 0.57	21.18	<0.001
Th17/Treg	0.95 ± 0.35	2.03 ± 0.77	4.15 ± 1.34	15.26	<0.001

表3 各组肺功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	哮喘组 ($n=60$)	COPD 组 ($n=60$)	ACOS 组 ($n=60$)	F	P
FVC% Pred	87.14 ± 14.85	73.51 ± 12.07	72.44 ± 10.62	7.36	<0.001
FEV% Pred	70.54 ± 11.50	62.19 ± 9.63	55.59 ± 9.24	11.36	<0.001
FEV1/FVC	73.64 ± 10.64	68.03 ± 8.75	59.10 ± 7.06	9.68	<0.001

2.3 ACOS 患者外周血 Th17, Treg 表达与肺功能的相关性 见表4。Pearson 相关性分析显示, ACOS 患者外周血 Th17, Th17/Treg 表达与 FVC%pred, FEV1%pred, FEV1/FVC 呈显著负相关 ($P<0.05$)。Treg 与 FVC%pred, FEV1%pred, FEV1/FVC 呈显著正相关 ($P<0.05$)。

表4 ACOS 患者外周血 Th17, Treg 表达与肺功能的相关性

项目	Th17		Treg		Th17/Treg	
	r	P	r	P	r	P
FVC%pred	-0.381	0.034	0.389	0.033	-0.407	0.018
FEV1%pred	-0.428	0.022	0.402	0.019	-0.439	0.009
FEV1/FVC	-0.442	0.017	0.427	0.020	-0.502	0.002

3 讨论

基于大量临床研究与专家共识, GOLD, GINA 相继制定了 ACOS 的指南, 认为 ACOS 是在哮喘基础上诱发 COPD, 或存在不完全可逆的气道阻塞并发可逆性阻塞症状, 随着病情进展导致 ACOS^[7]。2017 版 GOLD 指南提出哮喘、COPD 重叠不是一种单一的疾病实体, 但对于 ACOS 的发病机制、病理特征及治疗方案等研究并不多见^[8-9], 且对该疾病的诊断及病情评估尚缺乏有效指标, 仅靠肺功能指标无法全面客观反映 ACOS 患者的病情变化, 给 ACOS 的治疗及效果评估造成一定困难^[10]。相比哮喘、COPD 而言, ACOS 的发作更为频繁, 病情呈进行性加重, 严重影响患者的生活质量。因此, 寻找 ACOS 临床诊断的辅助检测指标尤为关键。

免疫学机制在 COPD, 哮喘的发生发展中的作用已得到广泛认同, CD4+T 细胞亚群紊乱均与气道炎症密切相关, 其中 Th17, Treg 细胞参与了内

分泌-免疫系统调节^[11-12], 但目前关于 Th17, Treg 细胞与 ACOS 的发病机制研究不多。Th17 可通过分泌 IL-6, IL-17 等炎症介质募集巨噬细胞及中性粒细胞, 放大炎症反应^[13]; Treg 具有免疫抑制性, 不仅可维持感染信号存在保证记忆细胞的持续生成, 还可阻断导致组织破坏的病理性免疫应答发生, 从而保护组织器官^[14]。本研究中, ACOS 组外周血 Th17 细胞表达及 Th17/Treg 较哮喘组和 COPD 组明显升高, 而 Treg 细胞表达则明显下降 ($P<0.05$), 表明 ACOS 患者免疫细胞分布异常, Th17/Treg 比例失衡, 与 IWAMOTO 等^[15]研究结果一致。由于“Th17 反应”异常增强而 Treg 介导的免疫调节作用相对不足, 打破了 ACOS 患者促炎/抑炎的免疫平衡, 从而产生气道局部以及全身的促炎反应^[9]。此外, Th17, Treg 在哮喘、COPD 患者中也存在显著性差异, 说明外周血 Th17/Treg 对于进一步明确 ACOS 诊断, 鉴别哮喘、COPD 以及深入了解三者的免疫功能异常具有重要的临床价值。

本组研究中, ACOS 组患者肺功能指标明显低于哮喘组 ($P<0.05$), 但 FVC%pred 与 COPD 组患者无显著性差异 ($P>0.05$), 说明肺功能指标在鉴别 ACOS 和 COPD 上存在一定局限性。进一步分析发现, 随着 ACOS 患者肺功能的下降, 外周血 Th17 细胞、Th17/Treg 比值相应增加, 提示 Th17 型免疫应答强度、Th17/Treg 免疫失衡程度与 ACOS 患者的肺功能呈显著负相关。与之相反, Treg 细胞表达水平及其介导的免疫抑制作用随着肺功能逐渐降低, 表明全身免疫功能失调可反映 ACOS 患者肺功能的下降及 ACOS 的病情严重程度, 与王华英等^[6]研究结果一致。肖钦文等^[7]遵照“以肾治肺”原则, 采用金匮肾气丸行固本培元法治疗 ACOS, 可

有效调节 Th17, Treg 细胞失衡状态, Th17, Treg 与 ACOS 患者的疗效存在明显的相关性。

综上所述, ACOS 患者外周血 Th17, Treg 细胞表达异常, 存在 Th17/Treg 比例失衡, 且与肺功能下降密切相关, 调节 Th17/Treg 比例失衡可能有助于减轻肺功能损伤, 并有望成为 ACOS 免疫治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] GOLD Executive Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (Updated 2014) [J/OL]. [2014-05-08]. <http://www.Goldcopd.org>.
- [2] CHRISTENSON S, STEILING K, VAN DEN BERGE M, et al. Asthma-COPD overlap. Clinical relevance of genomic signatures of type 2 inflammation in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 191(12): 758-766.
- [3] WANG Huaying, YING Huajuan, WANG Shi, et al. Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. The Clinical Respiratory Journal, 2015, 9(3): 330-341.
- [4] 屠昌明, 田园. 支原体肺炎患儿外周血 Th17, Treg 细胞亚群和细胞因子表达及 CRP, PCT 水平的研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34 (4): 108-111.
TU Changming, TIAN Yuan. Expression of Th17 and Treg cell subsets and cytokines in peripheral blood of children with mycoplasma pneumoniae and study on CRP and PCT levels[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34 (4): 108-111.
- [5] 张兰英, 陈杰, 欧阳瑶. DCs, Th17 及 Treg 在 COPD 发病机制中作用的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45 (7): 18-20, 24.
ZHANG Lanying, CHEN Jie, OUYANG Yao. Research progress on the role of DCs, Th17 and Treg in the pathogenesis of COPD [J]. Journal of Medical Research, 2016, 45(7): 18-20, 24.
- [6] GINA-GOLD G. Diagnosis of disease of chronic airflow limitation: asthma, COPD and asthma-COPD overlap syndrome (ACOS) [EB/OL] [2019-11-27]. <http://www.goldcopd.org/asthma-copd-overlap.html>.
- [7] POSTMA D S, REDDEL H K, TEN HACKEN N H, et al. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: similarities and differences[J]. Clinics in Chest Medicine, 2014, 35(1): 143-156.
- [8] VOGELMEIER C F, CRINER G J, MARTINEZ F J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD executive summary[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2017, 195(5): 557-582.
- [9] DING Bo, ENSTONE A. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome (ACOS): structured literature review and physician insights[J]. Expert Rev Respir Med, 2016, 10(3): 363-371.
- [10] HORAK F, DOBERER D, EBER E, et al. Diagnosis and management of asthma - Statement on the 2015 GINA Guidelines[J]. Wiener Klinische Wochenschrift, 2016, 128(15/16): 541-554.
- [11] PROFITA M, ALBANO G D, RICCOBONO L, et al. Increased levels of Th17 cells are associated with non-neuronal acetylcholine in COPD patients[J]. Immunobiology, 2014, 219(5): 392-401.
- [12] LIU Ying, SUN Jiakui, QI Xiang, et al. Expression and significance of Th17 and Treg cells in pulmonary infections with Gram-Negative bacteria[J]. Immunological Investigations, 2017, 46(7): 730-741.
- [13] Gao Li, ZHAO Yajing, WANG Panpan, et al. Detection of Th17/Treg cells and related factors in gingival tissues and peripheral blood of rats with experimental periodontitis[J]. Iranian Journal of Basic Medical Science, 2017, 20 (3): 294-300.
- [14] LI Bowen, REN Qian, LING Jizu, et al. The change of Th17/Treg cells and IL-10/IL-17 in Chinese children with Henoch-Schönlein Purpura: A PRISMA-compliant Meta-analysis[J]. Medicine, 2019, 98(3): e13991.
- [15] IWAMOTO H, GAO Jing, KOSKELA J, et al. Differences in plasma and sputum biomarkers between COPD and COPD-asthma overlap[J]. The European Respiratory Journal, 2014, 43(2): 421-429.
- [16] 王华英, 翁跃颂, 应华娟, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者 Th17/Treg 细胞失衡与肺功能相关性研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 34 (7): 527-532.
WANG Huaying, WENG Yuesong, YING Huajuan, et al. Correlation between Th17/Treg ratio imbalance and impaired lung function in patients with COPD [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2014, 34 (7): 527-532.
- [17] 肖钦文, 李海梅, 曾珠, 等. Th17, Treg 细胞失衡与哮喘 - 慢阻肺重叠综合征的相关性及金匮肾气丸干预的影响研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34 (2): 5-9.
XIAO Qinwen, LI Haimei, ZENG Zhu, et al. Study on the correlation between ACOS and Th17/Treg cells imbalance and on the influence of Jinkui Shenqi pills intervention[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2018, 34 (2): 5-9.

收稿日期: 2019-11-07

修回日期: 2019-11-22