

· 临床研究 ·

68 例支气管哮喘患者中 Th17 和 Treg 联合检测的临床意义*

张 维, 王新卫, 刘新年

(湖北省中山医院呼吸内科, 湖北武汉 430033)

摘要:目的 检测支气管哮喘患者外周血中 Th17 和 Treg 细胞比例的变化, 探讨其在支气管哮喘发生、发展中的作用。方法 收集 2011 年 1~6 月该院呼吸内科诊治的支气管哮喘患者 68 例, 哮喘患者分为稳定期组($n=34$)和发作期组($n=34$), 另取健康体检者 20 例(对照组)。用流式细胞仪检测 Th17 和 Treg 细胞的表达百分比。结果 对照组、稳定期组和发作期组 $CD4^+ IL-17+ Th17$ 细胞的比例分别为 $(1.32 \pm 0.41)\%$ 、 $(5.64 \pm 1.23)\%$ 和 $(8.87 \pm 2.18)\%$, $CD4^+ CD25^+ Treg$ 细胞的比例分别为 $(3.47 \pm 1.33)\%$ 、 $(1.86 \pm 0.76)\%$ 和 $(0.81 \pm 0.52)\%$, Th17/Treg 比值分别为 $(0.38 \pm 0.12)\%$ 、 $(3.03 \pm 0.94)\%$ 和 $(10.95 \pm 2.36)\%$ 。Th17 细胞比例和 Th17/Treg 比值在稳定期组和发作期组均显著高于对照组($P < 0.01$), 发作期组又高于稳定期组($P < 0.01$)。Treg 细胞比例在稳定期组和发作期组均显著低于对照组($P < 0.05$), 发作期组又高于稳定期组($P < 0.01$)。相关性分析显示, Th17 细胞比例与 Tregs 细胞呈负相关($r = -0.437, P < 0.05$)。结论 支气管哮喘患者中存在 Th17 细胞的升高和 Treg 细胞的降低, 调控 Th17/Treg 细胞的失衡, 可能成为支气管哮喘治疗的新思路。

关键词:哮喘; T 淋巴细胞; 辅助性 T 细胞 17

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.14.008

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)14-1583-02

Clinical significance of combined detection of Th17 and Treg cells in 68 cases of bronchial asthma*

Zhang Wei, Wang Xinwei, Liu Xinnian

(Department of Respiration, Hubei Provincial Zhongshan Hospital, Wuhan, Hubei 430033, China)

Abstract: Objective To detect the change of proportions of peripheral blood Th17 and Treg cells in the patients with bronchial asthma and to investigate their role in the occurrence and development of bronchial asthma. Methods 68 patients with bronchial asthma treated in the respiration department of this hospital from January to June 2011 were collected and divided into two groups, the stable group($n=34$) and the attack group($n=34$). Other 20 healthy individuals were taken as the control group. The expression percentage of Th17 and Treg cells in blood were detected by flow cytometry. Results The proportions of $CD4^+ IL-17+ Th17$ cells in the control, stable and attack groups were $(1.32 \pm 0.41)\%$, $(5.64 \pm 1.23)\%$ and $(8.87 \pm 2.18)\%$ respectively. The proportions of $CD4^+ CD25^+ Treg$ cells were $(3.47 \pm 1.33)\%$, $(1.86 \pm 0.76)\%$ and $(0.81 \pm 0.52)\%$ respectively. The ratios of Th17/Treg were $(0.38 \pm 0.12)\%$, $(3.03 \pm 0.94)\%$ and $(10.95 \pm 2.36)\%$ respectively. The proportion of Th17 cells and ratio of Th17/Treg in the stable and attack groups were significantly lower than those in the control group($P < 0.01$), and which in the attack group were higher than those in the stable group($P < 0.01$). The correlation analysis showed that the proportion of Th17 cells was negatively related with Treg cells($r = -0.437, P < 0.05$). Conclusion The upregulation of Th17 cells and downregulation of Treg cells are found in the patients with bronchial asthma. Regulating the imbalance of Th1/Th2 cells may become a new thinking for treating bronchial asthma.

Key words: asthma; t-lymphocytes; Th17 cells

支气管哮喘(bronchial asthma)是一种常见的呼吸道慢性炎症性疾病,全球约有 3 亿哮喘患者,人群发病率在 10% 左右,每年因哮喘引起的死亡高达 25 万人,近年来因为环境污染、烟草等因素的影响,哮喘发病率有逐渐增加的趋势^[1-2]。哮喘的主要病理改变是气道的慢性炎症,以及由此引发的气道高反应性和气道结构的重构,其具体发病机制目前仍不清楚^[3],近年来 T 淋巴细胞在哮喘中的致病作用受到学者们的关注,例如辅助性 T 细胞 1/2(Th1/Th2)失衡理论已被学者们所接受,但 Th1/Th2 失衡理论并不能解释哮喘的免疫学异常表现^[4],辅助性 T 细胞 17(Th17)和调节性 T 细胞(Treg)是新发现的一类辅助性 T 细胞,其与多种人类免疫异常性疾病密切相关^[5],本研究使用流式细胞仪检测哮喘患者外周血 Th17 和 Treg 细胞的改变,探讨 Th17/Treg 平衡的改变在支气管哮喘

致病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 1~6 月本院呼吸内科诊治的支气管哮喘患者 68 例,其中男 38 例,女 30 例;年龄 19~55 岁,平均 (34.8 ± 14.5) 岁。哮喘患者分为稳定期组($n=34$)和发作期组($n=34$),支气管哮喘的诊断符合中华医学会呼吸病学分会哮喘学组 2008 年制定的《支气管哮喘防治指南》^[6]。临床表现以及辅助检查,例如支气管激发试验、运动激发试验或支气管舒张试验阳性;呼气流量峰值日内(或 2 周)变异率大于或等于 20%。排除标准:急慢性炎症性疾病,恶性肿瘤,孕妇、哺乳期妇女,糖尿病、肾炎、狼疮等其他自身免疫炎症性疾病及过敏体质者,1 月内未服用免疫抑制剂或免疫调节剂等药物。另取本院保健门诊健康体检者 20 例作为对照组,3 组在年龄、性

别、体质量等一般临床资料方面差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 异硫氰酸荧光素 (FITC)-CD4、异位藻蓝蛋白 (APC)-IL-17、藻红蛋白 (PE)-CD25 抗体以及相应同型对照购自美国 R&D 公司, 红细胞裂解液为天津灏洋生物制品科技有限责任公司产品, FC500 流式细胞仪为美国 Beckman 公司产品。

1.2.2 CD4、CD17 双阳性 Th17 细胞和 CD4、CD25 双阳性 Treg 细胞的检测 采集所有受试者过夜空腹 12 h 抗凝静脉血 5 mL, 1 500 $g \times 10$ min, 沉淀中加入 2 mL 红细胞裂解液混匀, 1 500 $g \times 10$ min, 去上清液, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤两次, 500 μ L PBC 重悬细胞, 将样本分为两份, 按照抗体说明书一份加入 FITC-CD4、APC-IL-17、PE-CD25 抗体, 室温避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测。前向散射光 (FSC) 和侧向散色光 (SSC) 设门去杂细胞, 同型对照调零, IL-1、IL-3 通道检测 CD4⁺ IL-17⁺ Th17 细胞, IL-1 和 IL-2 通道检测 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞。

1.3 统计学处理 应用 SPSS12.0 统计软件处理数据, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 t 检验, 组间均数的比较采用单因素方差分析, Pearson 相关性分析分析各检测指标的相关关系, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 支气管哮喘患者外周血中 Th17、Treg 细胞分布的改变

Th17 细胞的比例在支气管哮喘稳定期组患者显著高于对照组 ($t = 7.64, P < 0.01$), 发作期组又显著高于稳定期组 ($t = 2.43, P < 0.05$)。支气管哮喘发作期患者 Th17 细胞的比例较稳定期组明显升高 ($t = 2.14, P < 0.05$)。Treg 细胞比例在支气管哮喘患者外周血中显著低于对照组 ($t = 2.54, P < 0.05$), 发作期组患者 Treg 细胞比例又显著低于稳定期组 ($t = 2.32, P < 0.05$)。Th17/Treg 比值更能反映各组间的不同, 稳定期和发作期组均显著高于对照组 ($t = 6.26, t = 6.58$, 均 $P < 0.01$), 发作期组也显著高于稳定期组 ($t = 5.76, P < 0.01$)。见表 1 及图 1、2。

表 1 3 组 Th17、Treg 细胞所占百分比的改变 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	Th17 细胞	Treg 细胞	Th17/Treg
对照组	20	1.32 ± 0.41	3.47 ± 1.33	0.38 ± 0.12
稳定期组	34	5.64 ± 1.23**	1.86 ± 0.76*	3.03 ± 0.94**
发作期组	34	8.87 ± 2.18**▲	0.81 ± 0.52**▲	10.95 ± 2.36**▲▲

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与对照组比较; ▲: $P < 0.05$; ▲▲: $P < 0.01$, 与稳定组比较。

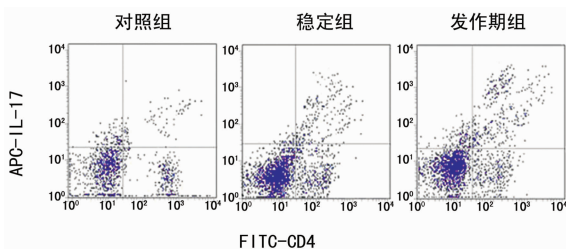


图 1 CD4⁺ IL-17⁺ Th17 细胞的流式细胞仪检测

2.2 支气管哮喘患者外周血中 Th17 和 Treg 细胞的相关性分析 相关性分析显示支气管哮喘患者外周血中 Th17 细胞的比例与 Treg 细胞呈负相关 ($r = -0.437, P < 0.05$)。

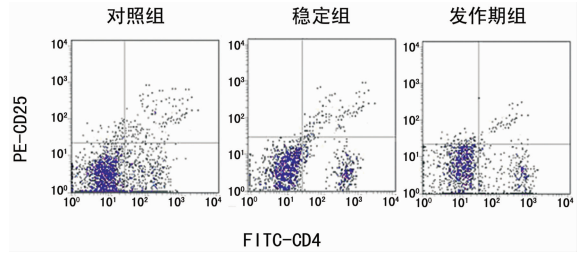


图 2 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的流式细胞仪检测

3 讨论

辅助性 T 细胞是一类 CD4⁺ T 细胞, 由未分化的 CD4⁺ T 细胞分别在 IL-4、IL-12、IL-23、IL-6 和 TGF- β_1 的作用下, 分化为 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞, 分别参与细胞免疫、体液免疫、炎症反应和免疫抑制调节功能, 机体内的免疫系统存在着 Th1/Th2 和 Th17/Treg 两个平衡, 其平衡的失调往往是一些自身免疫性疾病的发病基础^[7-8]。哮喘是呼吸道的炎症细胞和结构细胞参与的呼吸道慢性炎症性疾病, 过多的炎症因子参与其中必然会导致机体免疫平衡的紊乱, 虽然经过了数十年的研究, 哮喘的确切机制仍未明了, 故而目前临床上的治疗仅仅是控制症状, 因此, 揭示哮喘的发病机制为临床治疗提供准确的靶点是一个急需解决的问题^[9]。本研究从 Th17/Treg 的免疫平衡紊乱为出发点, 检测发现 Th17 细胞在支气管哮喘患者中出现了升高, 而 Treg 细胞则表达减低, Th17/Treg 比值在哮喘患者中也相应的升高, 说明 Th17/Treg 平衡的紊乱参与了支气管哮喘的发病。

Th17 和 Treg 细胞是最近确认的 CD4⁺ T 细胞家族成员, 致炎因子例如 IL-6 激活时可以通过转录信号转导子与激活子 3 (STAT3) 信号通路活化孤独核受体 γ (ROR γ t), 促发原始的 CD4⁺ T 细胞向 Th17 细胞分化, Th17 细胞是一个强烈的致炎细胞, 分泌 IL-17 发挥生物学效应, 已有研究认为 Th17 及其细胞因子是嗜酸性粒细胞浸润型气道炎症的主要诱导者, 而哮喘气道浸润的炎症细胞主要为嗜酸性粒细胞^[10-11]。Treg 细胞主要通过分泌 IL-10 和 TGF- β 细胞因子发挥加强免疫耐受, 抑制炎症反应, 维持内环境稳定的生物学效应, 同时 Treg 细胞也受到 TGF- β 的反馈调控^[12], 有研究显示呼吸道过敏症模型小鼠的体内存在 Treg 细胞的缺陷, 将 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞转移到模型鼠体内可以抑制过敏性炎症的发生^[13-14]。本研究显示哮喘患者稳定期与发作期 Th17 和 Treg 细胞存在显著性差异, Th17/Treg 比值在发作期组显著高于稳定期组, 说明 Th17/Treg 平衡的失调参与了支气管哮喘病情的发展。相关性分析显示支气管哮喘患者外周血中 Th17 细胞的比例与 Treg 细胞呈负相关。有研究显示 Th17 和 Treg 细胞的表达调控都可以被 TGF- β 所调节^[15], 是否哮喘患者是因为 TGF- β 表达的紊乱导致了 Th17/Treg 的失衡还有待进一步的研究来证实。

综上所述, 本研究显示支气管哮喘患者中存在 Th17/Treg 细胞的失衡, Th17 细胞的升高以及 Treg 细胞的降低参与了哮喘的发生、发展, 调控 Th17/Treg 细胞的平衡有可能成为支气管哮喘潜在的治疗靶点。

参考文献:

- [1] Moore WC, Pascual RM. Update in asthma 2009[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(11):1181-1187.
- [2] Stapleton M, Howard-Thompson A, George(下转第 1588 页)

2010,12(10):1360-1420.

- [9] Patton KK, Ellinor PT, Heckbert SR, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide is a major predictor of the development of atrial fibrillation: the Cardiovascular Health Study[J]. *Circulation*, 2009, 120(18):1768-1774.
- [10] Smith JG, Newton-Cheh C, Almgren P, et al. Assessment of conventional cardiovascular risk factors and multiple biomarkers for the prediction of incident heart failure and atrial fibrillation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(21):1712-1719.
- [11] Rienstra M, Van Gelder IC, Van den Berg MP, et al. Natriuretic peptides in patients with atrial fibrillation and advanced chronic heart failure: determinants and prognostic value of (NT-) ANP and (NT-pro) BNP[J]. *Europace*, 2006, 8(7):482-487.
- [12] Hussein AA, Saliba WI, Martin DO, et al. Plasma B-type natriuretic peptide levels and recurrent arrhythmia after successful ablation of lone atrial fibrillation[J]. *Circulation*, 2011, 123(19):2077-2082.
- [13] Lee SH, Jung JH, Choi SH, et al. Determinants of brain natriuretic peptide levels in patients with lone atrial fibrillation[J]. *Circ J*, 2006, 70(1):100-104.
- [14] Wozakowska-Kaplon B, Bartkowiak R, Grabowska U, et al. B-type natriuretic peptide level after sinus rhythm restoration in patients with persistent atrial fibrillation - clinical significance[J]. *Kardiologia Pol*, 2010, 68(7):781-786.
- [15] Shin DI, Jaekel K, Schley P, et al. Plasma levels of NT-

pro-BNP in patients with atrial fibrillation before and after electrical cardioversion[J]. *Z Kardiol*, 2005, 94(12):795-800.

- [16] Yamada T, Murakami Y, Okada T, et al. Plasma atrial natriuretic Peptide and brain natriuretic Peptide levels after radiofrequency catheter ablation of atrial fibrillation[J]. *Am J Cardiol*, 2006, 97(12):1741-1744.
- [17] Nilsson B, Goetze JP, Chen X, et al. Increased NT-pro-B-type natriuretic peptide independently predicts outcome following catheter ablation of atrial fibrillation[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2009, 69(8):843-850.
- [18] den Uijl DW, Delgado V, Tops LF, et al. Natriuretic peptide levels predict recurrence of atrial fibrillation after radiofrequency catheter ablation[J]. *Am Heart J*, 2011, 161(1):197-203.
- [19] Mohanty S, Mohanty P, Di Biase L, et al. Baseline B-type natriuretic peptide: a gender-specific predictor of procedure-outcome in atrial fibrillation patients undergoing catheter ablation[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2011, 22(8):858-865.
- [20] Ellinor PT, Low AF, Patton KK, et al. Discordant atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide levels in lone atrial fibrillation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(1):82-86.

(收稿日期:2012-09-08 修回日期:2013-01-18)

(上接第 1584 页)

- C, et al. Smoking and asthma[J]. *J Am Board Fam Med*, 2011, 24(3):313-322.
- [3] Lemanske RF Jr, Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(2 Suppl 2):S95-102.
- [4] 时国朝, 万欢英. 支气管哮喘的免疫发病机制-从 Th1/Th2 细胞失衡到 Th2/Treg 细胞失衡[J]. *内科理论与实践*, 2011, 6(2):92-95.
- [5] 王伟伟, 沈茜. Th17 细胞和 Treg 细胞在人类常见疾病中的表达及相互关系[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(3):284-288.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义, 诊断, 治疗管理方案)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2008, 31(3):177-185.
- [7] Nanba T, Watanabe M, Inoue N, et al. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease[J]. *Thyroid*, 2009, 19(5):495-501.
- [8] Kanai Y, Satoh T, Igawa K, et al. Impaired expression of Tim-3 on Th17 and Th1 cells in psoriasis[J]. *Acta Derm Venereol*, 2012, 92(4):367-371.
- [9] 尹静波, 黄永富. 炎性细胞因子在支气管哮喘发病机制中的作用[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(10):1087-1089.

- [10] Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(1):8-18.
- [11] 尚云飞, 陈洁玉, 朱立成. Th17/Treg 平衡与支气管哮喘的关系研究进展[J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(4):699-700.
- [12] Chapoval S, Dasgupta P, Dorsey NJ, et al. Regulation of the T helper cell type 2(Th2)/T regulatory cell(Treg) balance by IL-4 and STAT6[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(6):1011-1018.
- [13] 秦静, 赵铭山. 调节性 T 细胞在支气管哮喘发病机制中的作用[J]. *山东医药*, 2011, 51(33):112-113.
- [14] Li YN, Huang F, Liu L, et al. Effect of oral feeding with *Clostridium leptum* on regulatory T-cell responses and allergic airway inflammation in mice[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2012, 109(3):201-207.
- [15] Hong M, Zheng J, Ding ZY, et al. Imbalance between Th17 and Treg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2013, 20(1):39-50.

(收稿日期:2012-10-08 修回日期:2013-02-19)