

## 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者 T 细胞免疫机制变化初探\*

曾文<sup>1</sup>, 秦雯<sup>2△</sup>, 胡大春<sup>1</sup>, 李梅华<sup>3</sup>, 唐树荣<sup>1</sup>

(云南省昆明市第一人民医院:1. 检验科;2. 输血科;3. 呼吸科 650011)

**[摘要]** **目的** 探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)病理机制中 T 淋巴细胞免疫平衡的变化。**方法** 选取 2015 年 1 月至 2016 年 12 月该院收治的 48 例 COPD 急性加重期(AECOPD)患者为研究组;30 例健康体检者为对照组;流式细胞技术检测外周血 T 细胞功能亚群,酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测细胞因子,比较两组间观察指标及其相关性变化;因子分析方法分析两组间主成分变化。**结果** 研究组 CD8<sup>+</sup>T 细胞较对照组降低[23.8%(17.5%,30.1%) vs. 28.2%(23.8%,31.5%), $P<0.05$ ];Treg 和 Th17 较对照组升高[8.5%(8.3%,9.0%) vs. 5.6%(4.9%,6.1%), $P<0.01$ ;2.9%(2.8%,3.0%) vs. 1.2%(1.2%,1.4%), $P<0.01$ ]。研究组 IL-12[54.97 pg/mL(31.20,161.59)pg/mL]、IL-22 [17.70 pg/mL(15.60,35.99)pg/mL]、IL-23 [120.28 pg/mL(82.97,169.27)pg/mL]、IL-23R[0.15 pg/mL(0.15,0.71)pg/mL]和 TNF- $\alpha$ [1 000 pg/mL(1 000,1 000)pg/mL]高于对照组[31.20 pg/mL(31.20,56.23)pg/mL、15.60 pg/mL(15.60,15.60)pg/mL、78.10 pg/mL(78.10,99.08)pg/mL、0.15 pg/mL(0.15,0.15)pg/mL、722.16 pg/mL(494.25,941.44)pg/mL,均  $P<0.05$ ]。相关性分析显示:研究组 Th17 与 Treg 呈负相关( $r=-0.883, P<0.01$ ),IL-22 与 IL-23 呈正相关( $r=0.340, P<0.05$ )。对照组 CD4 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞、Th17 与 CD3<sup>+</sup>T 细胞、Th17 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的呈负相关( $r$ 分别为-0.578、-0.393、-0.569, $P<0.05$ );Th17 与 Treg、IL-23 与 CD4<sup>+</sup>T 细胞及 TNF- $\alpha$ 与 DNT 呈正相关( $r$ 分别为0.403、0.440、0.392, $P<0.05$ )。两组均有 5 个主成分,但研究组负荷变量较对照组有变化:依次为 Th17/Treg、Th17、Treg vs. CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞;CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞 vs. Th17/Treg、Treg; CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD3<sup>+</sup>T 细胞 vs. IL-12、IL-23R;IL-12、IL-23R vs. CD3<sup>+</sup>T 细胞;IL-23、IL-22 vs. TNF- $\alpha$ 、DNT。**结论** COPD 病理机制中,以 IL-22 与 IL-23 参与为主的 Th17 细胞功能超强所致免疫损伤可能是主要矛盾;并伴 CD8 细胞毒和双阴性 T 细胞(DNT)调节作用减弱。

**[关键词]** 肺疾病,慢性阻塞性;T 淋巴细胞亚群;细胞因子;主成分分析**[中图分类号]** R563.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)17-2298-05

## Changes of T cell immune mechanism in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease\*

ZENG Wen<sup>1</sup>, QIN Wen<sup>2△</sup>, HU Dachun<sup>1</sup>, LI Meihua<sup>3</sup>, TANG Shurong<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Blood Transfusion; 3. Department of Respiratory Medicine Kunming, the First People's Hospital of Kunming, Yunnan 650011, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the changes of T lymphocyte immune balance in the patients with COPD. **Methods** Forty-eight patients with AECOPD from January 2015 to December 2016 in this hospital were selected as study group and 30 healthy subjects as control. T cells and cytokines in peripheral blood were detected by flow cytometry and ELISA, respectively. The levels of them were compared between the two groups. The correlations of them and principal components were analyzed among the two groups. **Results** (1) CD8<sup>+</sup>T cells in the study group decreased [23.8%(17.5%,30.1%) vs. 28.2%(23.8%,31.5%), $P<0.05$ ], Treg and Th17 increased [8.5%(8.3%,9.0%) vs. 5.6%(4.9%,6.1%), $P<0.01$ ;2.9%(2.8%,3.0%) vs. 1.2%(1.2%,1.4%), $P<0.01$ ], respectively. (2) In the study group, IL-12 [54.97 pg/mL(31.20,161.59)pg/mL], IL-22 [17.70 pg/mL(15.60,35.99)pg/mL], IL-23 [120.28 pg/mL(82.97,169.27)pg/mL], IL-23R [0.15 pg/mL(0.15,0.71)pg/mL] and TNF- $\alpha$  [1 000 pg/mL(1 000,1 000)pg/mL] were higher than that of the control group [31.20 pg/mL(31.20,56.23)pg/mL, 15.60 pg/mL(15.60,15.60)pg/mL, 78.10 pg/mL(78.10,99.08)pg/mL, 0.15 pg/mL(0.15,0.15)pg/mL, 722.16 pg/mL(494.25,941.44)pg/mL,  $P<0.05$ ]. (3) Correlation analysis showed that there was a negative correlation between Th17 and Treg ( $r=-0.883, P<0.01$ ) in the study group ( $r=-0.883, P<0.01$ ), and IL-22 was positively correlated with IL-23 ( $r=0.340, P<0.05$ ).

In the control group, there was a negative correlation between  $CD4^+$  T cells and  $CD8^+$  T cells, Th17 and  $CD3^+$  T cells, Th17 and  $CD8^+$  T cells ( $r$  was  $-0.578$ ,  $-0.393$  and  $-0.569$ , respectively,  $P < 0.05$ ), and a positive correlation between Th17 and Treg, IL-23 and  $CD4^+$  T cells, TNF- $\alpha$  and DNT ( $r = 0.403$ ,  $0.440$  and  $0.392$ , respectively). (4) There were 5 main components among each group, but the variable factors differed in the study group from the controls, as that: Th17/Treg, Th17, Treg vs.  $CD4^+$  T/ $CD8^+$  T cells,  $CD4^+$  T cells,  $CD8^+$  T cells and  $CD4^+$  T/ $CD8^+$  T cells,  $CD8^+$  T cells vs. Th17/Treg, Treg and  $CD4^+$  T cells,  $CD3^+$  T cells vs. IL-12, IL-23R and IL-12, IL-23R vs.  $CD3^+$  T cells and IL-23, IL-22 vs. TNF- $\alpha$ , DNT. **Conclusion** The increasing immune function of Th17 cells with IL-22 and IL-23 may be involved in the pathological mechanism of COPD, which accompanied with the weakened toxicity of  $CD8^+$  T cells and regulation of DNT.

**[Key words]** pulmonary disease, chronic obstructive; T-lymphocyte subsets, cytokines; principal component analysis

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种吸入有害气体或颗粒产生异常慢性炎性反应导致气道受阻继而发展为慢性气管炎或伴随肺气肿的慢性疾病<sup>[1]</sup>。我国 40 岁以上人群的患病率高达 8.2%<sup>[2]</sup>。预计到 2020 年,该病将成为世界第 3 位致死原因<sup>[3]</sup>,将位居世界疾病经济负担第 5 位,是严重影响公共健康水平的重要疾病之一。COPD 的发病机制复杂,至今尚未明了。已有的研究提示多种免疫机制失衡参与其中,尤其是 Th1 细胞、Th17 细胞、调节性 T 细胞(regulatory T lymphocytes, Treg)等细胞免疫调节改变突出<sup>[4-7]</sup>。COPD 动物模型研究显示 Th17 细胞及 Treg 细胞水平变化显著<sup>[8]</sup>。T 淋巴细胞是一群异质性细胞的总称,均表达 CD3 分子,包括  $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD3^+CD4^-CD8^-$  双阴性 T 细胞(double negative T cell, DNT)等。依据其功能分为辅助性 T 细胞(Th1 细胞、Th2 细胞、Th17 细胞),具有抑制性功能的 Treg、细胞毒 T 细胞等。它们通过细胞因子及其信号通路相互协助与相互制约,维持机体免疫动态平衡。先前的临床研究文献报道中对 COPD 疾病状态下,有关这些免疫细胞间及其与细胞因子间相互作用机制变化的阐述并不多见。为更深入理解 COPD 患者免疫机制的变化,以便临床更好地实施 COPD 免疫辅助治疗,预防急性加重期 COPD(AECOPD)的发生、延缓病程进展,本研究选择 COPD 急性加重期患者 48 例和健康对照者 30 例,对外周血各类 T 淋巴细胞和相关的细胞因子的变化进行检测与多因素分析,初步探讨了 COPD 细胞免疫机制的变化,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2015 年 1 月至 2016 年 12 月本院收治的 48 例 AECOPD 患者作为研究组。入选标准:(1)均符合美国呼吸病学会 2009 年修订的 COPD 诊断标准<sup>[1]</sup>,并符合 AECOPD 的定义,即稳定期 COPD 患者急性起病、呼吸系统症状恶化,表现为呼吸困难、咳嗽、痰量最多或/和痰液呈脓性,临床或/和实验室检查没有发现其他可以解释的特异病因,导致

需要改变药物治疗。(2)近 3 个月未患其他部位的感染性疾病。排除自身免疫病、糖尿病、肿瘤、各种慢性消耗性疾病及肝肾功能严重受损者、免疫抑制剂治疗者。其中男 27 例,女 21 例,年龄 51~82 岁,平均 66.5 岁。同时抽取 30 例健康体检者作为对照组。入选标准:(1)既往健康,无慢性呼吸系统疾病史;(2)近 3 个月未患感染性疾病;(3)血、尿、便常规及 X 线片检查正常。其中男 13 例,女 17 例,年龄 20~50 岁,平均 35.0 岁。本研究获得了本院伦理委员会批准;研究病例和对照者选取中,已告知研究对象本研究目的、内容,可能造成的明显和潜在不利影响,经知情同意后入选。

**1.2 仪器与试剂** 仪器:细胞免疫项目采用贝克曼库尔特 FC-500 流式细胞仪检测。细胞因子项目采用 Thermo 酶标仪检测。试剂:细胞免疫项目试剂(荧光抗体 CD4-FITC, CD127-PE, CD25-PC5, CD3-PC5, CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5)、标准荧光微球(flowcheck)及室内质控品由贝克曼库尔特公司生产。荧光抗体 anti-IL-17-PE 由 eBiosciences 公司生产。流式细胞荧光分选技术(FACS)溶血剂由 BD 公司生产。细胞因子项目试剂由 D1develop 公司生产。

## 1.3 方法

**1.3.1 样本采集与处理** 用 BD 公司生产真空采集管,空腹采集静脉血 1 管(肝素锂抗凝管),采集量 2 mL、无抗凝血 3 mL,前者 24 h 内进行处理和上机检测,后者 2 h 内离心分离血清,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。样本处理过程中,排除严重溶血,黄疸和脂血样本。

**1.3.2  $CD3^+$  T 细胞、 $CD4^+$  T 细胞、 $CD8^+$  T 细胞、DNT 细胞检测** 先将 10  $\mu\text{L}$  荧光抗体 CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 加入到标准流式管底,再将 100  $\mu\text{L}$  抗凝血加入流式管中,轻轻混匀,室温避光孵育 30 min,然后加入 FACS 溶血剂工作液 1 mL,避光溶血 15 min 后,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞,混匀后上流式细胞仪进行检测,采用 4 色分析,CD45-SS

设门。

**1.3.3 Treg 检测** 先将 10  $\mu\text{L}$  荧光抗体 CD4-FITC, CD127-PE, CD25-PC5 加入到标准流式管底, 再将 100  $\mu\text{L}$  抗凝血加入流式管中, 轻轻混匀, 室温避光孵育 30 min, 然后加入 FACS 溶血剂工作液 1 mL, 避光溶血 15 min 后, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 1 mL PBS 重悬细胞, 混匀后上流式细胞仪进行检测, 采用 3 色分析, CD4-SS 设门。CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> 细胞群为 Treg。

**1.3.4 Th17 细胞检测** 分离收集外周血单个核细胞, 置入标准流式管中并调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL, 加入细胞刺激液, 5% 浓度 CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱中放置 8 h 后, 用 PBS 清洗细胞, PBS 重悬。加入 10  $\mu\text{L}$  荧光抗体 CD4-FITC、CD3-PC5、anti-IL-17-PE 后避光 4 °C 孵育 30 min, 上流式细胞仪检测。采用 3 色分析, CD3-SS 设门。

**1.3.5 细胞因子的检测** IL-12、IL-22、IL-23R、IL-23、TNF- $\alpha$  均采用酶联免疫吸附试验(ELISA)双抗体夹心法进行检测。按照试剂说明书配制好酶标抗体、标准品、清洗液; 将标准品逐倍稀释成 7 个浓度(1:2~1:64)后和样本一起逐个加入相应酶标孔。封板 37 °C 孵育 1 h 后, 加入酶标抗体, 37 °C 孵育 1 h 后显色 15 min, 终止反应后使用酶标仪读取各酶标孔吸光度(OD)值, 并用软件进行标准曲线拟合计算。

**1.3.6 肺功能检查** 由本院呼吸科肺功能检查室完成, 设备为德国耶格 APS-PRO 肺功能检查仪。选用力肺活量(FVC)、第 1 秒用力呼出量(FEV1.0)、FEV1.0/FVC 比值为肺功能分析指标。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件完成所有统计分析。正态分布的计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用 *t* 检验, 由于有较多观察指标结果为非正态分布计量资料, 用 4 分位数 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 表示; 研究组与对照组观察指标差异的显著性检验用秩和检验中的 Mann-Whitney 检验; 相关性分析用多因素偏相关分

析, 双侧显著性检验; 因子分析抽取主成分分析, 抽取特征值大于 1 的因子进入主成分, 用最大方差旋转法进行因子旋转。检验水准  $\alpha=0.05$ , 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各类 T 细胞水平的变化** 研究组与对照组人群外周血 CD3<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞、DNT、Treg、Th17 细胞百分比检测结果见表 1。研究组外周血 CD8<sup>+</sup> T 细胞水平较对照组低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); Treg、Th17 细胞水平较对照组高, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); CD3<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞/CD8<sup>+</sup> T 细胞比值和 DNT 水平与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.2 外周血细胞因子水平的变化** 研究组与对照组人群外周血细胞因子 IL-12、IL-22、IL-23、IL-23R、和 TNF- $\alpha$  水平检测结果见表 2。所检测的 5 种细胞因子在研究组患者外周血中水平较对照组高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 T 细胞及细胞因子间的相关性变化** 研究组与对照组人群外周血 T 细胞及细胞因子间的相关性分析中, 两组间存在相关性改变的结果见表 3、4、5。其中: (1) 研究组 CD4<sup>+</sup> T 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞、Th17 与 CD3<sup>+</sup> T 细胞、Th17 与 CD8<sup>+</sup> T 细胞无明显相关性( $P>0.05$ ), 但对对照组为负相关关系, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); (2) 研究组 Th17 与 Treg 为负相关关系, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ), 但对对照组为正相关关系, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); (3) 研究组 IL-23 与 CD4<sup>+</sup> T 细胞、TNF- $\alpha$  与 DNT 无明显相关性, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 但对对照组为正相关关系, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); (4) 研究组 IL-22 与 IL-23 为正相关关系, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 但对对照组无明显相关关系, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 其余相关性在同向存在相关程度的差异。

表 1 2 组人群 T 细胞亚群水平分布 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ]

组别	<i>n</i>	CD8 <sup>+</sup> T 细胞	CD4 <sup>+</sup> T 细胞	CD8 <sup>+</sup> T 细胞	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T 细胞	DNT	Treg	Th17
研究组	48	63.1(55.5, 73.1)	35.5(28.6, 42)	23.8(17.5, 30.1)	1.6(1.0, 2.0)	2.4(1.3, 3.7)	8.5(8.3, 9.0)	2.9(2.8, 3.0)
对照组	30	67.1(65.0, 70.0)	33.9(29.4, 38.3)	28.2(23.8, 31.5)	1.2(0.9, 1.6)	3.0(1.2, 6.0)	5.6(4.9, 6.1)	1.2(1.2, 1.4)
<i>Z</i>		-1.692	-0.460	-2.051	-1.950	-1.187	-8.536	-8.541
<i>P</i>		0.091	0.646	0.04	0.051	0.237	<0.01	<0.01

表 2 2 组人群细胞因子水平分布 [ $M(Q_{25}, Q_{75})$ ]

组别	<i>n</i>	IL-12	IL-22	IL-23	IL-23R	TNF- $\alpha$
研究组	48	54.97(31.20, 161.59)	17.70(15.60, 35.99)	120.28(82.97, 169.27)	0.15(0.15, 0.71)	1000(1000, 1000)
对照组	30	31.20(31.20, 56.23)	15.60(15.60, 15.60)	78.10(78.10, 99.08)	0.15(0.15, 0.15)	722.16(494.25, 941.44)
<i>Z</i>		-2.081	-4.198	-4.697	-2.850	-6.503
<i>P</i>		0.037	0.000	0.000	0.004	0.000

表 3 两组患者 T 细胞间相关性变化

组别	CD8 <sup>+</sup> T vs. CD4 <sup>+</sup> T		CD4 <sup>+</sup> T vs. CD8 <sup>+</sup> T		CD4 <sup>+</sup> T vs. CD4/CD8 <sup>+</sup> T		CD8 <sup>+</sup> T vs. CD4/CD8 <sup>+</sup> T		CD8 <sup>+</sup> T vs. CD8 <sup>+</sup> T	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
研究组	0.698	0.000	0.014	0.924	0.428	0.002	-0.662	0.000	0.711	0.000
对照组	0.419	0.020	-0.578	0.001	0.849	0.001	-0.848	0.000	0.191	0.312

表 4 两组患者 Th17 与其他 T 细胞相关性的变化

组别	Th17 vs. Treg		Th17 vs. CD3 <sup>+</sup> T 细胞		Th17 vs. CD8 <sup>+</sup> T 细胞		Th17 vs. CD4/CD8 <sup>+</sup> T 细胞	
	r	P	r	P	r	P	r	P
研究组	-0.883	0.000	-0.189	0.199	-0.079	0.593	-0.07	0.961
对照组	0.403	0.020	-0.393	0.032	-0.569	0.001	0.374	0.042

表 5 两组患者细胞因子间及与 T 细胞相关性的变化

组别	IL-12 vs. IL-23R		IL-22 vs. IL-23		IL-23 vs. CD4 <sup>+</sup> T 细胞		IL-12 vs. CD8 <sup>+</sup> T 细胞		TNF-α vs. DNT	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
研究组	0.448	0.001	0.340	0.018	-0.040	0.787	0.311	0.032	0.124	0.403
对照组	0.526	0.003	-0.122	0.522	0.440	0.015	0.125	0.413	0.392	0.032

2.4 AECOPD 患者 T 细胞及细胞因子潜在联系分析 用因子分析方法对研究组和对照组 13 项观察指标进行潜在联系的分析,研究组和对照组分别存在 5 个公因子(即主成分),其总方差解释度分别为 75.74%和 77.89%。研究组和对照组 5 个主成分的特征值见表 6。进入 5 个主成分的观察指标(负荷变

量)及其系数与得分见表 7、8。研究组与对照组比较,进入 5 个主成分的负荷变量发生了变化。

表 6 2 组主成分特征值

组别	第 1 主成分	第 2 主成分	第 3 主成分	第 4 主成分	第 5 主成分
研究组	3.327	2.212	1.762	1.427	1.174
对照组	3.312	2.457	1.685	1.497	1.173

表 7 研究组慢性阻塞性肺病急性加重期患者 T 细胞及细胞因子主成分变化

项目	第 1 主成分		第 2 主成分		第 3 主成分		第 4 主成分		第 5 主成分		
	Th17/Treg	Th17	Treg	CD4/CD8	CD8	CD4	CD8	IL-23R	IL-12	IL-23	IL-22
系数	0.993	0.970	-0.955	-0.873	0.864	0.928	0.847	0.841	0.830	0.801	0.693
系数得分	0.354	0.349	-0.335	-0.438	0.397	0.532	0.449	0.611	0.555	0.571	0.470

CD4:CD4<sup>+</sup>T 细胞;CD8:CD8<sup>+</sup>T 细胞;CD4/CD8:CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞

表 8 慢性阻塞性肺病急性加重期患者 T 细胞及细胞因子主成分变化

项目	第 1 主成分			第 2 主成分		第 3 主成分		第 4 主成分	第 5 主成分	
	CD4/CD8	CD4	CD8	Th17/Treg	Treg	IL-12	IL-23R	CD8	TNF-α	DNT
系数	0.954	0.921	-0.816	-0.985	0.971	0.797	0.755	0.934	0.758	0.757
系数得分	0.338	0.347	-0.263	-0.520	0.495	0.440	0.352	0.584	0.481	0.505

CD4:CD4<sup>+</sup>T 细胞;CD8:CD8<sup>+</sup>T 细胞;CD4/CD8:CD4<sup>+</sup>T 细胞/CD8<sup>+</sup>T 细胞

2.5 AECOPD 患者 T 细胞及细胞因子与 FVC、FEV1.0、FEV1.0/FVC 的相关性 AECOPD 患者的 FVC、FEV1.0 平均水平分别为 (2.82±0.62) L、(2.11±0.43) L。Spearman 相关性分析结果中,FEV1.0 与第一主成分主要变量 Th17/Treg、Th17、Treg 存在相关性,相关系数 r 分别为 -0.446(P=0.043)、-0.496(P=0.032)、0.467(P=0.033);FEV1.0/FVC 与 TNF-α 和 IL-22 存在相关性,相关系数 r 分别为 -0.507(P=0.019)、-0.439(P=0.046);其余相关性差异无统计学意义(P>0.05)。

3 讨论

COPD 的主要病理改变为有害气体或颗粒导致气道黏膜的慢性炎症并持续发展,患者持续出现以咳

嗽、咳痰、喘憋等为主要临床表现的慢性气管炎或合并伴随肺气肿。AECOPD 即在稳定期 COPD 患者短期内出现上述等症加重、吐脓痰或黏液痰,并伴发热等症出现,其发病原因常可分为感染和非感染因素。COPD 或 AECOPD 其病理生理分子机制仍不清楚。在遗传易感的基础上,气道受到吸烟等释放的有害物质刺激,引发局部固有免疫防御,进而适应性免疫应答参与其中,在修复有害物质对气道黏膜伤害的同时,产生炎症反应并反复持续发生,甚至停止吸烟后仍持续发展。大量的研究显示许多免疫细胞参与其中,主要有中性粒细胞、单核巨噬细胞、T 淋巴细胞及多种细胞因子。免疫失衡是导致该病持续发展的重要病理生理机制,有学者提出其中还有自身免疫机

制<sup>[9-10]</sup>。广泛的临床和动物模型研究均显示 COPD 病程中存在 T 淋巴细胞各亚群功能平衡紊乱,普遍观察到 Th17、Treg 细胞平衡紊乱,但存在不一致结果。有研究显示 COPD 病程中 Th17 细胞和 IL-17 表达增强,Treg 降低;也有研究显示 Treg 细胞是升高而非降低,只是升高的幅度不及 Th17 细胞;也有学者认为在 COPD 不同阶段,Th17、Treg 细胞平衡变化存在差异<sup>[11]</sup>。这些结果提示,COPD 与 AECOPD 发生发展中,免疫失衡机制复杂,观察单方面或少数免疫细胞的增加或降低,难以找到其内在的免疫失衡机制。为此,本研究从多角度观察了 AECOPD 外周血不同功能分类的 T 淋巴细胞百分比变化,相关的细胞因子变化及它们相互关系的变化,并通过因子分析的统计学处理,寻找 COPD 疾病状态下主要免疫失衡机制。结果显示:(1)AECOPD 患者外周血中各类 T 淋巴细胞水平的变化中,CD8<sup>+</sup> T 细胞水平较健康对照人群降低;Treg、Th17 细胞水平较健康对照人群升高,但 Treg 升高的幅度不及 Th17。(2)细胞因子层面观察到 AECOPD 患者外周血 IL-12、IL-22、IL-23、IL-23R 和 TNF- $\alpha$  水平较健康对照人群均升高。(3)通过对各类 T 细胞及细胞因子间的相关性分析发现,AECOPD 疾病状态下,CD4<sup>+</sup> T 细胞与 CD8<sup>+</sup> T 细胞、CD3<sup>+</sup> T 细胞与 Th17、Th17 与 CD8<sup>+</sup> T 细胞由负相关变为无相关;Th17 与 Treg 由正相关( $r=0.403$ )变为高度负相关( $r=-0.883$ );IL-23 与 CD4<sup>+</sup> T 细胞、TNF- $\alpha$  与 DNT 由正相关变为无明显相关性;IL-22 与 IL-23 由无相关性变为正相关;其余指标之间的相关性存在相同方向相关程度的变化。(4)因子分析的结果显示,在 AECOPD 状态下,主成分中负荷变量发生了诸多变化:健康状态时处于第 2 主成分的 Th17、Treg 平衡机制上升为第 1 主成分,成为主要的免疫平衡机制;而健康状态时以 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞平衡为首的机制退居第 2,以 IL-12、IL-23R 为主要变量的第 3 主成分退居第 4,出现 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD3<sup>+</sup> T 细胞为主要变量的第 3 主成分。以 TNF 和 DNT 为主要变量的第 5 主成分退出主成分,但出现了以 IL-23 和 IL-22 为主要变量的第 5 主成分。(5)T 细胞及细胞因子与 FVC、FEV1.0、FEV1.0/FVC 的相关性显示,AECOPD 患者 FEV1.0 与 Th17 呈负相关,与 Treg 呈正相关;FEV1.0/FVC 与 TNF 和 IL-22 呈负相关。

以上这些结果提示:(1)通过患者外周血中免疫细胞和细胞因子的监测,可以观察到 AECOPD 状态下机体免疫功能的变化,有助于指导其免疫辅助治疗,因此,可以作为 COPD 的实验室监测指标。(2)AECOPD 状态下,原有的机体免疫平衡机制受到破坏,产生了以 Th17、Treg 变化为主的平衡紊乱;更多的 CD4 细胞向 Th17 极化,促进 Th17 细胞增多,而具有免疫抑制功能的 Treg 细胞增多不到位,并出现负

相关性改变;IL-12、IL-22、IL-23、IL-23R 和 TNF- $\alpha$  等细胞因子均参与其中,但以 IL-22 与 IL-23 为主,且 IL-23 主要促进 T 淋巴细胞向 Th17 分化与增殖,并分泌 IL-22,后者进一步诱导中性粒细胞集落刺激因子的分泌并促进中性粒细胞的趋化到气道,加重炎症反应和气道受阻的程度;CD8 的细胞毒作用、DNT 的调节作用受到弱化。由此可以推测,COPD 病理生理机制中的主要矛盾可能是:外因引发的 Th17 细胞功能增强超过抵御外因所致的损伤,进而导致过度免疫甚至自身免疫。

由于到本院住院救治的 COPD 患者均为 AECOPD 患者,本研究中研究对象主要从住院患者中募集,因此,未能募集到稳定期 COPD 患者,未对稳定期患者进行分组对比分析,上述观察到的免疫平衡紊乱是否也存在于 COPD 稳定期患者,有待进一步观察。

## 参考文献

- [1] RABE K F, HURD S, ANZUETO A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: Gold executive summary[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(6): 532-555.
- [2] 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/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2014, 36(2): 67-79, 80.
- [3] Raheison C. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Nihon Rinsho, 2009, 38(3): 400.
- [4] ZHANG J, CHU S, ZHONG X, et al. Increased expression of CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> cells in the lung tissue of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and smokers[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 15(1): 58-66.
- [5] SMYTH L J, STARKEY C, VESTBO J, et al. CD4-regulatory cells in COPD patients[J]. Chest, 2007, 132(1): 156-163.
- [6] ISAJEV S, TAIIVANS I, STRAZDA G, et al. Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD[J]. Eur Respir J, 2009, 33(1): 61-67.
- [7] PLUMB J, SMYTH L J, ADAMS H R, et al. Increased T-regulatory cells within lymphocyte follicles in moderate COPD[J]. Eur Respir J, 2009, 34(1): 89-94.
- [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] HONG S C, LEE S H. Role of th17 cell and autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Immune Netw, 2010, 10(4): 109-114.
- [10] ROVINA N, KOUTSOUKOU A, KOULOURIS N G. Inflammation and immune response in COPD: where do we stand[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013(5): 1-9.
- [11] 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.