



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.06.015

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.06.015

## • 论著摘要 •

# 支气管肺泡灌洗液中辅助性 T 淋巴细胞 17 和调节性 T 淋巴细胞相关细胞因子与稳定期慢性阻塞性肺疾病患者临床表型的相关性

李霞 荣庆娜 江丽娟 王欢

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病； 临床表型； 辅助性 T 细胞 17 相关因子； 调节性 T 细胞相关因子； 支气管肺泡灌洗液

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以渐进性气流受限为特征的慢性持续性气道炎症性疾病,在临床表现、影像学特征、病程发展、治疗反应等方面存在明显的个体差异性<sup>[1]</sup>。因此,单纯依靠肺功能分级并不能完全反映患者的临床状态和异质性。2010 年 Han 等<sup>[2]</sup>提出“COPD 表型”的概念,依据一系列可观察且与临床预后相关的结构和功能特征对患者进行个体化治疗,包括影像学特征分型、病程时机分型、多维指标分型等。但由于 COPD 表型分类众多,且缺乏统一的分型标准,探讨与表型相关的生物学标志物具有重要临床意义。辅助性 T 淋巴细胞 17 (Th17)和调节性 T 淋巴细胞(Treg)免疫失衡是 COPD 的重要发病机制之一<sup>[3]</sup>。我们通过比较不同病程时期、肺功能分级、影像学表型的稳定期 COPD 患者支气管肺泡灌洗液(BALF)中 Th17 及 Treg 相关细胞因子白细胞介素(IL)-17A、IL-6、IL-10、转化生长因子(TGF)- $\beta_1$ 、干扰素(IFN)- $\gamma$ 水平,旨在为协助诊断、指导个体化治疗和判断预后提供参考。

## 对象与方法

1. 对象:选取 2018 年 7 月~2019 年 5 月于我科就诊的稳定期 COPD 患者 52 例作为稳定期 COPD 组,同期于我院体检的健康者 50 例作为对照组。纳入标准:(1)COPD 患者符合《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)》<sup>[4]</sup>关于 COPD 的诊断和稳定期的分期标准;(2)对照组受试者年龄、性别与 COPD 患者相匹配。排除标准:(1)存在纤维支气管镜检查禁忌证;(2)标本收集前 1 个月有全身或呼吸道感染史;(3)合并活动性肺结核、支气管扩张、肺炎、肺癌、肺间质纤维化等非 COPD 肺部疾病;(4)合并恶性肿瘤、免疫系统疾病、糖尿病、严重心脑血管疾病。其中稳定期 COPD 组男 32 例,女 20 例,年龄 43~80 岁,平均年龄(62.73 $\pm$ 12.76)岁,BMI(23.58 $\pm$ 2.81)kg/m<sup>2</sup>,有吸烟史者 20 例;对照组男 25 例,女 25 例,年龄 40~80 岁,平均年龄(63.46 $\pm$ 13.18)岁,BMI(24.12 $\pm$ 3.10)kg/m<sup>2</sup>,有吸烟史者 18 例。两组受试者年龄、性别、吸烟史较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。依据《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订

版)》,采用过去 1 年 COPD 急性加重次数作为风险评估标准,若<2 次或因急性加重住院<1 次则为低风险,若 $\geq 2$  次或因急性加重住院 $\geq 1$  次则为高风险;采用改良版英国医学研究委员会呼吸问卷(mMRC)分级作为症状评估标准,<2 级为症状轻, $\geq 2$  级为症状重。根据风险分级和症状严重程度将 52 例稳定期 COPD 患者分为 4 组:A 组:低风险,症状轻,23 例;B 组:低风险,症状重,14 例;C 组:高风险,症状轻,9 例;D 组:高风险,症状重,6 例。依据胸部高分辨率电子计算机断层扫描(HRCT)结果,将 52 例稳定期 COPD 患者分为气管炎型 19 例、肺气肿型 17 例、混合型 16 例。根据慢性阻塞性肺疾病全球倡议(GOLD)分级将 52 例稳定期 COPD 患者分为 GOLD 1 级 12 例、GOLD 2 级 20 例、GOLD 3 级 14 例、GOLD 4 级 6 例。本研究经我院伦理委员会审核批准,所有受试者均签署知情同意书。

## 2. 方法

(1)肺功能检查:采用意大利科迈 PonyFX 型便携式肺功能测试仪检测稳定期 COPD 患者的肺功能,包括第 1 秒用力呼气容积(FEV<sub>1</sub>)、用力肺活量(FVC)及 FEV<sub>1</sub>/FVC。每次测试均重复 $\geq 3$  次,选取图形最好的 1 次作为最终结果。根据 FEV<sub>1</sub>占预测值的百分比(FEV<sub>1</sub>% pred)进行 GOLD 分级,GOLD 1 级:FEV<sub>1</sub>% pred $\geq 80\%$ ;GOLD 2 级:FEV<sub>1</sub>% pred 为 50%~79%;GOLD 3 级:FEV<sub>1</sub>% pred 为 30%~49%;GOLD 4 级:FEV<sub>1</sub>% pred<30%。

(2)BALF 中 Th17 和 Treg 相关细胞因子水平检测:经纤维支气管镜采集两组受试者肺段或肺亚段 BALF,自活检孔快速灌注 20ml 生理盐水,并立即负压吸回灌洗液,重复 5~6 次,总灌洗液量达 100~120 ml,以 1 500 r/min 离心 10 min,取上清液,保存于-20℃冰箱中备用。取血清复溶后,将待测样本加入反应板中,再加入 IL-17A、IL-6、IL-10、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$  抗体,反应 1 h 后终止,采用酶标仪检测 450 nm 吸收波长处的吸光度值。

3. 统计学处理:应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- $t$  检验;计数资料以例数表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**表 1** 稳定期 COPD 组和对照组受试者 BALF 中 Th17 和 Treg 相关细胞因子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	IL-17A (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TGF- $\beta_1$ (ng/ml)	IFN- $\gamma$ (ng/ml)
对照组	50	15.38 $\pm$ 7.30	29.53 $\pm$ 12.47	19.27 $\pm$ 3.64	2.97 $\pm$ 1.45	4.55 $\pm$ 1.79
稳定期 COPD 组	52	38.76 $\pm$ 26.49	52.98 $\pm$ 23.37	3.12 $\pm$ 1.29	6.04 $\pm$ 2.75	6.68 $\pm$ 2.67
<i>t</i> 值		6.024	6.286	30.094	7.011	4.713
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**表 2** A、B、C、D 组稳定期 COPD 患者 BALF 中 Th17 和 Treg 相关细胞因子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	IL-17A (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TGF- $\beta_1$ (ng/ml)	IFN- $\gamma$ (ng/ml)
A 组	23	32.77 $\pm$ 19.56	46.74 $\pm$ 18.10	3.46 $\pm$ 1.08	5.50 $\pm$ 1.52	3.75 $\pm$ 1.50
B 组	14	35.82 $\pm$ 20.14	47.87 $\pm$ 18.95	3.13 $\pm$ 1.15	5.94 $\pm$ 1.73	4.17 $\pm$ 1.46
C 组	9	36.72 $\pm$ 15.85	50.28 $\pm$ 19.39	3.02 $\pm$ 0.99	6.12 $\pm$ 1.41	6.56 $\pm$ 1.28
D 组	6	57.59 $\pm$ 14.35 <sup>abc</sup>	70.15 $\pm$ 12.62 <sup>abc</sup>	1.87 $\pm$ 0.68 <sup>abc</sup>	7.78 $\pm$ 1.19 <sup>abc</sup>	7.98 $\pm$ 1.74 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值		2.845	2.794	3.659	3.539	18.109
<i>P</i> 值		0.047	0.050	0.019	0.021	<0.001

注:与 A 组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与 B 组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05;与 C 组比较,<sup>c</sup>*P*<0.05

**表 3** 不同胸部 HRCT 分型稳定期 COPD 患者 BALF 中 Th17 和 Treg 相关细胞因子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	IL-17A (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TGF- $\beta_1$ (ng/ml)	IFN- $\gamma$ (ng/ml)
气管炎型	19	28.78 $\pm$ 16.49	42.05 $\pm$ 21.45	3.04 $\pm$ 1.37	5.67 $\pm$ 1.74	6.25 $\pm$ 1.73
肺气肿型	17	34.82 $\pm$ 13.15 <sup>a</sup>	50.88 $\pm$ 20.76 <sup>a</sup>	2.71 $\pm$ 1.29	5.92 $\pm$ 2.13	6.38 $\pm$ 2.11
混合型	16	48.10 $\pm$ 13.95 <sup>ab</sup>	63.17 $\pm$ 20.84 <sup>ab</sup>	2.49 $\pm$ 1.35	6.31 $\pm$ 2.09	6.79 $\pm$ 1.94
<i>F</i> 值		7.714	4.365	0.753	0.455	0.363
<i>P</i> 值		0.001	0.018	0.476	0.637	0.698

注:与气管炎型比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与肺气肿型比较,<sup>b</sup>*P*<0.05

**表 4** 不同 GOLD 分级稳定期 COPD 患者 BALF 中 Th17 和 Treg 相关细胞因子水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	IL-17A (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TGF- $\beta_1$ (ng/ml)	IFN- $\gamma$ (ng/ml)
GOLD 1 级	12	27.95 $\pm$ 15.09	40.72 $\pm$ 16.76	3.50 $\pm$ 0.78	5.42 $\pm$ 1.63	2.78 $\pm$ 1.22
GOLD 2 级	20	39.73 $\pm$ 18.15 <sup>a</sup>	49.40 $\pm$ 19.24 <sup>a</sup>	3.13 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	6.40 $\pm$ 1.47 <sup>a</sup>	4.42 $\pm$ 1.37 <sup>a</sup>
GOLD 3 级	14	47.24 $\pm$ 17.53 <sup>ab</sup>	56.02 $\pm$ 16.60 <sup>ab</sup>	2.82 $\pm$ 1.17 <sup>ab</sup>	7.56 $\pm$ 1.76 <sup>ab</sup>	7.10 $\pm$ 1.80 <sup>ab</sup>
GOLD 4 级	6	59.08 $\pm$ 11.10 <sup>abc</sup>	63.29 $\pm$ 11.70 <sup>abc</sup>	2.04 $\pm$ 0.70 <sup>abc</sup>	8.43 $\pm$ 0.92 <sup>abc</sup>	11.15 $\pm$ 3.28 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值		5.477	2.864	3.114	6.935	36.706
<i>P</i> 值		0.003	0.046	0.035	0.001	<0.001

注:与 GOLD 1 级比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与 GOLD 2 级比较,<sup>b</sup>*P*<0.05;与 GOLD 3 级比较,<sup>c</sup>*P*<0.05

## 结 果

1. 稳定期 COPD 组和对照组受试者 BALF 中 Th17 和 Treg 相关细胞因子水平比较:稳定期 COPD 组患者 BALF 中 IL-17A、IL-6、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$  水平均高于对照组,IL-10 水平低于对照组(*P*<0.05)。见表 1。

2. A、B、C、D 组稳定期 COPD 患者 BALF 中 Th17 和 Treg 相关细胞因子水平比较:D 组稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$  水平均高于 A、B 及 C 组,IL-10 水平均低于 A、B 和 C 组(*P*<0.05)。A、B、C 稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6、IL-10、TGF- $\beta_1$  及 IFN- $\gamma$  水平比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2。

3. 不同胸部 HRCT 分型稳定期 COPD 患者 BALF 中 Th17 和 Treg 相关细胞因子水平比较:气管炎型、肺气肿型、混合型稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6 比较,差异有统计学意义(*P*<0.05),而 3 组患者 BALF 中 IL-10、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$  水平比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05)。肺气肿型和混合型稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6 水平均高于气管炎型,混合

型稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6 水平均高于肺气肿型(*P*<0.05)。见表 3。

4. 不同 GOLD 分级稳定期 COPD 患者 BALF 中 Th17 和 Treg 相关细胞因子水平比较:随着 GOLD 分级增高,稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$  水平逐渐升高,而 IL-10 水平逐渐降低,各组间比较差异均有统计学意义(*P*<0.05)。见表 4。

## 讨 论

持续性气道炎症反应和气流受限是 COPD 的两大基本特征,但不同患者的临床表现、病情进展、治疗效果等均存在一定个体差异性,单纯依靠肺功能检查结果作为临床治疗的依据并不可靠。由于 COPD 的发病机制尚未完全明确,目前尚未找到能够取代 FEV<sub>1</sub>/FVC 成为疾病诊断、管理及预后评估更理想的指标。

从已知的发病机制角度出发,COPD 属于一类气道慢性炎症反应性疾病,而这种炎症反应主要由 T 淋巴细胞介导,因此有学者提出了 COPD“自身免疫应答”假说<sup>[5]</sup>。Treg 和 Th17 是

由初始 T 淋巴细胞分化的两大细胞亚群,二者相互遏制,共同维持机体内环境的免疫平衡。2005 年 Harrington 等<sup>[6]</sup>和 Park 等<sup>[7]</sup>同时发现 Th17 细胞亚群的存在,证实 IL-17、IL-6 是其分泌的特征分子。IL-17 是一种前炎症细胞因子,主要由 Th17 分泌,另外 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞、CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T 淋巴细胞等也可以少量分泌,其中临床和文献中检测的 IL-17 多为 IL-17A<sup>[8]</sup>。IL-17A 广泛表达于呼吸道上皮细胞,通过诱导 IL-6 的产生,加重炎症反应,并参与气道重构。本研究结果显示,稳定期 COPD 组患者 BALF 中 IL-17A 和 IL-6 水平均高于对照组,推测 Th17 在 COPD 发病过程中发挥着重要作用,与既往文献报道基本一致。凌燕君<sup>[9]</sup>的研究证实 Th17 相关细胞因子 IL-23、IL-1 $\beta$ 、IL-17A、IL-17F 均参与 COPD 的发生和发展,且急性期各指标水平与 BODE 指数和 GOLD 分级呈正相关。汪露等<sup>[10]</sup>的研究也发现,外周血 Th17 水平及相关细胞因子 IL-17、IL-6 与 COPD 患者的肺功能指标有较好的相关性,在判断预后方面具有一定的参考价值。本研究中,随着 GOLD 分级增高,稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$  水平逐渐升高,而 IL-10 水平逐渐降低,表明 Th17 相关细胞因子水平在一定程度上反映了 COPD 患者肺功能下降程度,考虑与 IL-17A、IL-6 的促炎反应机制有关,二者通过分泌基质金属蛋白酶等促进血管内皮损伤,破坏支气管结构,加重肺功能恶化。

本研究中,肺气肿型和混合型稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6 水平均高于气管炎型,混合型稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6 水平均高于肺气肿型。肺气肿型、气管炎型、混合型是临床上 COPD 最经典的影像学分型,肺气肿型患者主要表现为呼吸困难和运动耐量降低,且常伴过度通气体征。Casanova 等<sup>[11]</sup>通过收集 5 年的随访数据发现,肺气肿型患者的肺功能和预后更差,且肺过度充气程度与生存率呈负相关。O'Donnell 等<sup>[12]</sup>发现肺气肿型 COPD 患者痰液中多数可分离出独立潜在的病原微生物,且较非肺气肿型患者合并症的发生率更高。有研究结果显示,气道病理变化、肺气肿及气流受限是相互独立又彼此影响的 3 个病理过程<sup>[13]</sup>。与气管炎型比较,肺气肿型发病机制更复杂,慢性炎症、氧化应激、免疫失衡等均可能参与其中。IL-17 是免疫反应和炎症反应的交汇点,具有促进炎症和趋化免疫细胞的作用,可募集并诱导肺组织内中性粒细胞的聚集、成熟和分化,从而进一步加重炎症反应,促进肺实质损伤,导致肺气肿的发生。这也解释了本研究中肺气肿型和混合型稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-17A、IL-6 水平均高于气管炎型的原因。

除了 Th17 诱导的炎症反应外,Th17/Treg 免疫失衡也是 COPD 发病的重要机制之一。IL-10 属于 Treg 分化相关细胞因子,可促使初始 T 淋巴细胞向 Treg 分化,同时 Treg 又可分泌 IL-10,进而抑制 T 淋巴细胞介导的病理性免疫应答<sup>[14]</sup>。而 IL-6 可抑制初始 T 淋巴细胞向 Treg 分化,甚至可促使已经分化的 Treg 向 Th17 细胞转化。Th17 可通过分泌 IL-17A、IL-6 等促炎因子参与 COPD 的发病机制,并抑制 Treg 分化,而 Treg 可通过免疫抑制和炎症抑制作用降低有害物质对肺组织的损伤。

TGF- $\beta_1$  由气道上皮细胞和巨噬细胞等合成并分泌,可促进炎症反应的发生。本研究中,稳定期 COPD 组患者 BALF 中 IL-10 低于对照组,TGF- $\beta_1$  和 IFN- $\gamma$  水平均高于对照组,而根据《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)》分组的 A、B、C 组稳定期 COPD 患者 BALF 中 TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$  水平比较差异均无统计学意义,且气管炎型、肺气肿型、混合型稳定期 COPD 患者 BALF 中 IL-10、TGF- $\beta_1$ 、IFN- $\gamma$  水平比较差异均无统计学意义,提示 Th17 和 Treg 相关细胞因子可能并不能评估稳定期 COPD 患者的预后相关风险程度,且不能依据炎症反应程度鉴别肺气肿型、气管炎型、混合型稳定期 COPD 患者。

综上所述,Th17 和 Treg 相关因子与稳定期 COPD 患者的预后相关风险程度的相关性不明显,但 Th17 相关因子可能可作为肺气肿型稳定期 COPD 患者的异质性标志物,为临床个体化治疗提供一定的理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] Gülşen A. Bronchoscopic lung volume reduction: a 2018 review and update[J]. Turk Thorax J, 2018, 19(3): 141-149.
- [2] Han MK, Agustí A, Calverley PM, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(5): 598-604.
- [3] 顾娜,刘洪斌. Th17/Treg 免疫失衡在肺部疾病中的研究进展[J]. 天津药学, 2019, 31(2): 58-62.
- [4] 蔡柏蔷. 慢性阻塞性肺疾病急性加重诊治中国专家共识(草案)[J]. 中国呼吸与危症监护杂志, 2013, 12(6): 541-551.
- [5] Agarwal AR, Kadam S, Brahme A, et al. Systemic Immuno-metabolic alterations in chronic obstructive pulmonary disease(COPD)[J]. Respir Res, 2019, 20(1): 171.
- [6] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [7] Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17[J]. Nat Immunol, 2005, 6(11): 1133-1141.
- [8] 杨晓蕾,张金桃,范敏娟. IL-17 与慢性阻塞性肺疾病肺气肿表型的关系[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(12): 2309-2312.
- [9] 凌燕君. COPD 患者诱导痰 Th17 相关细胞因子与 BODE 指数和 GOLD 分级的相关性[J]. 中华全科医学, 2017, 15(5): 802-804.
- [10] 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.
- [11] Casanova C, Cote C, de Torres JP, et al. Inspiratory-to-total lung capacity ratio predicts mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(6): 591-597.
- [12] O'Donnell DE, James MD, Milne KM, et al. The pathophysiology of dyspnea and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Clin Chest Med, 2019, 40(2): 343-366.
- [13] Choe YH. Vena Caval Flow Regurgitation at Four-dimensional Flow MRI: A New Sign for a Hemodynamic Phenotype of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Emphysema? [J]. Radiology, 2019, 292(3): 595-596.
- [14] 张奕,张兰英,欧阳瑶. 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.

(收稿日期:2019-09-03)

(本文编辑:周三凤)