

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.025

老年 COPD 患者 Treg 与 TGF- β 1 的变化及其意义

黄 芪,刘先玲,徐 海,付东伟

(重庆三峡中心医院老年科,重庆万州 404000)

[摘要] **目的** 通过观察老年慢性阻塞性肺疾病(COPD)急性加重期、稳定期患者和健康老年人外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(Treg)比例变化及 COPD 患者血清中转化生长因子- β 1(TGF- β 1)水平的相关性,探讨 Treg、TGF- β 1 在老年 COPD 发病中的作用。**方法** 选择 2012 年 3 月至 2014 年 2 月在该院老年科的 COPD 急性加重期患者 26 例(急性期组)、稳定期患者 23 例(稳定期组),选择同期 20 例健康体检者为对照组,用流式细胞仪检测外周血中 Treg 表达比例,用 ELISA 法检测血清 TGF- β 1。**结果** 3 组受检者外周血 Treg 比例,各病例组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),急性期组与稳定期组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);TGF- β 1 水平,急性期组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);各组 Treg 与 TGF- β 1 均无相关性($P > 0.05$)。**结论** Treg 细胞在老年 COPD 急性加重过程中有重要作用,但 Treg 与 TGF- β 1 无明显相关性,老年患者体内存在免疫功能紊乱或异常。

[关键词] 肺疾病,慢性阻塞性;老年人;CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞;转化生长因子- β 1

[中图分类号] R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)29-4106-02

The change and clinical significance of T cells and TGF- β 1 in the senile COPD patients

Huang Qi, Liu Xianling, Xu Hai, Fu Dongwei

(Department of Geriatric, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression level of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of acute and stable senile COPD patients, and analyze the correlation between Treg cells and TGF- β 1 of senile COPD, then investigate the role of Treg cells and TGF- β 1 in the onset of senile COPD. **Methods** Totally 26 patients with acute stage and 23 patients with stable stage were investigated as acute group and stable group, they came from the department of geriatric of our hospital from March, 2012 to February, 2014. Meanwhile, 20 healthy people were selected as control group. The proportion of Treg cells in peripheral blood was measured by flow cytometry method and the level of TGF- β 1 in serum was measured by ELISA. **Results** The percentage of Treg on peripheral blood in acute and stable groups were significantly higher than control group ($P < 0.01$), the difference also existed in acute and stable group ($P < 0.05$); the level of TGF- β 1 in serum of acute group was higher than control group ($P < 0.01$), there was no correlation between the proportion of Treg and TGF- β 1 ($P > 0.05$). **Conclusion** Treg cells may be involved in the process of the pathogenesis of senile COPD and acute exacerbation. There is no correlation between the proportion of Treg cells and TGF- β 1, and it indicates immune disorders may exist in senile COPD patients.

[Key words] pulmonary disease, chronic obstructive; aged; CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells; transforming growth factor beta 1

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以气流受限为特征的慢性气道炎症性疾病, COPD 患病率占 40 岁以上人群的 8.2%。目前认为 COPD 的发病机制与遗传易感性、氧化/抗氧化、气道炎症(包括炎性细胞浸润、细胞因子释放及细菌病毒感染)等有关,但尚未完全阐明。CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(Treg)是 T 细胞中可以抑制免疫应答的细胞群^[1],主要通过抑制性调节 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的活化与增殖,达到免疫的负调节作用。其在维持机体免疫自稳、免疫应答的负调节及自身免疫耐受中发挥重要作用,并且具有抗炎作用。转化生长因子- β (TGF- β)是一种具有调节 T 细胞生长及发育的多功能细胞因子, TGF- β 在维持 Treg 功能并诱导其生成中发挥重要作用^[2]。本文通过检测外周血中 Treg、TGF- β 1 的表达水平,从而初步探讨其在老年 COPD 发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组:选择 2012 年 3 月至 2014 年 2 月在本院老年科收治住院和门诊随访的老年 COPD 患者共 49 例,急性期患者 26 例(急性期组),其中男 16 例,女 10 例,年龄 64~88 岁,平均(72.7 \pm 5.8)岁,稳定期患者 23 例(稳定期组),其中男 13 例,女 10 例,年龄 62~82 岁,平均(70.6 \pm 6.1)

岁。对照组:同期在本院体检中心健康体检者 20 例,其中男 11 例,女 9 例,年龄 62~80 岁,平均(68.7 \pm 4.7)岁。病例组与对照组的年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。纳入标准:参照 COPD 诊治指南(2007 年修订版)中急性加重期和稳定期的诊断标准。急性加重期是指患者出现超越日常状况的持续恶化,并需改变基础 COPD 的常规用药者,通常在疾病过程中,患者咳嗽、咳痰、气短和(或)喘息加重,痰量增多,呈脓性或黏脓性,可伴发热等炎症明显加重的表现。稳定期则指患者咳嗽、咳痰、气短等症状稳定或轻微^[4]。排除标准:某些肺部疾病如哮喘、间质性肺炎、支扩、肺结核;心脑血管疾病如冠心病、老年痴呆等;内分泌疾病如甲状腺功能亢进、糖尿病等;肿瘤及自身免疫性疾病。对照组近 1 个月内无呼吸道感染史。入组患者均通过医院伦理认证及签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 Treg 的测定 Foxp3 和淋巴细胞亚群测定采用美国 BD 公司的 FACS Calibur 流式细胞仪检测。各组受试者均清晨应用抗凝负压真空采血管采集空腹外周静脉血 3 mL,将静脉血采用淋巴细胞分离液分离外周单个核细胞(PMBC),标本在 1 h 内进行检测。单克隆抗体包括抗 CD4-PerCP、CD25-

FITC 和各阴性对照 IgG 均为美国 BD 公司产品,抗 Foxp3-PE 单抗和染色缓冲液为美国 eBioscience 公司产品。取两支试管,首先分别加入分离后标本 100 μ L,将抗人 CD4-PerCP/CD25-FITC 抗体及其阴性同型对照 IgG 各 10 μ L 加入后混匀,室温避光放置 30 min;加入红细胞裂解液,避光室温孵育,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 清洗,离心弃上清液;再加入新鲜配制的固定/破膜应用液 1 mL,混匀并避光 15 min;然后加入破膜缓冲液 1 mL 孵育 20 min,离心弃上清液;最后,各管中加入 5 μ L 的抗 Foxp3-PE 单抗及阴性同型对照 IgG,混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,用破膜缓冲液 2 mL 清洗两遍,分别离心弃上清液,加入 500 μ L PBS 后混匀上机,经 FAC Sort 流式细胞仪分选细胞、在 FSC-SSC 点图上选定淋巴细胞群,用 Cell Quest 软件分析数据,以荧光抗体染色阳性细胞的百分数记录结果。

1.2.2 TGF- β 1 的测定 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 TGF- β 1 水平,试剂盒购于武汉博士德公司,按照试剂盒说明进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,Treg 的比例与 TGF- β 1 的关系采用 Spearman 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组的基线资料 急性期组的淋巴细胞比例与稳定期组、对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 各组间调节性 T 细胞比例及 TGF- β 1 水平的比较 3 组受检者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 细胞比例,急性期组、对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞比例,急性期组、稳定期组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);各病例组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。TGF- β 1 水平,急性期组为(34.05 \pm 6.56) μ g/L、稳定期组为(30.61 \pm 6.58) μ g/L,对照组为(27.22 \pm 8.43) μ g/L,急性期组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 各组间外周血中调节性 T 细胞的比例($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	淋巴细胞	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺
急性期组	26	11.71 \pm 2.66 ^a	9.71 \pm 4.59 ^b	4.34 \pm 1.58 ^{ac}
稳定期组	23	30.72 \pm 5.35	8.48 \pm 3.61	3.33 \pm 1.34 ^a
对照组	20	28.86 \pm 4.67	6.81 \pm 2.25	2.05 \pm 1.16

^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^c: $P < 0.05$, 与稳定期组比较。

2.3 相关性分析 COPD 急性期、稳定期组及对照组的 Treg 与 TGF- β 1 均无相关性($r = -0.118, -0.049, -0.021, P > 0.05$)。

3 讨 论

Treg 是一类有负调节作用的 T 细胞亚群,但目前对其产生、成熟及迁移等机制尚不完全清楚,具有免疫无能和免疫抑制特性,分为 CD4⁺ Treg、CD8⁺ Treg、自然杀伤性 T 细胞(NKT Treg)、双阴性调节性 T 细胞(DN Treg)。Treg 在人和小鼠的外周血及淋巴组织中约占 CD4⁺ T 细胞 5%~10%,包括在胸腺内自然发育的天然 Treg(nTreg)和诱导性调节性 T 细胞(iTreg)。nTreg 大部分为 CD4⁺ CD25⁺ Treg,在预防病理性自身免疫反应方面起作用;iTreg 是外周 CD4⁺ Foxp3⁺ T 细胞在受到特异性抗原刺激并在 IL-2、TGF- β 等细胞因子的诱导下分化而来^[5]。Sakaguchi 等^[6]于 1995 年首次报道在正常人和小鼠的外周血和脾脏组织的 CD4⁺ T 细胞约有 5%~10%持续高表达 CD25 分子(IL-2 受体 α 链),去除这群细胞后可引发各种自身免疫性疾病,提示 CD4⁺ Treg 直接参与了自

身免疫反应的抑制过程。除了 CD4、CD25、CD4⁺ CD25⁺ Treg 表面还表达了叉状头/翅膀状螺旋转录因子(Foxp3)、细胞毒 T 细胞相关抗原 4(CTLA4)等。Foxp3 持续表达于 Treg,低表达于活化的效应 T 细胞,作为特异性表达的转录因子,是 CD4⁺ CD25⁺ Treg 发育、活化、发挥功能的关键,常被作为鉴定或筛选标志^[7-9]。另外,有研究证实,通过应用 CTLA4 特异性阻断抗体或 CTLA4 缺失的 Treg 都显示功能性 CTLA4 的缺失,使 Treg 通过树突状细胞介导的效应 T 细胞的抑制效应降低^[10]。TGF- β 抑制大多数 T、B 细胞系在体外的增殖和分化,抑制中性粒细胞和 T 细胞黏附于内皮细胞,从而限制了炎症细胞补充到损伤部位,上调抑制性细胞因子。TGF- β 在维持 Treg 功能并诱导其生成中发挥重要作用,它能诱导 Foxp3 和 Treg 分化,动物实验表明,敲除 TGF- β 基因的小鼠 Treg 数量明显减少,而且 TGF- β 培养幼稚 CD4⁺ Treg 可诱导 Foxp3 的表达^[3]。

本研究中老年 COPD 患者,无论在急性期还是稳定期,外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞比例均显著高于对照组,且急性期与稳定期组的差异也有统计学意义($P < 0.05$),但 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞的比例,仅急性期组与对照组有差异。在 Domagala-Kulawik 等^[11]的研究中,COPD 患者 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞比例虽是低于对照组的,但 CD4⁺ CD25⁺ CTLA4⁺ T 细胞却显著高于对照组,这表明 Treg 不仅参与老年 COPD 的发病,而且在急性加重期 Treg 控制了 COPD 患者由细胞免疫介导的病理反应,降低了机体病理损害,但同时也会造成病原体在体内的持续存在,这可能是 COPD 患者急性加重期感染不易控制的原因之一。然而,也有学者认为在吸烟和 COPD 稳定期患者的支气管肺泡灌洗液中 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞并未发挥免疫调节作用^[12],本文的缺陷在于未能将各组患者吸烟指数是否存在差异进行搜集和分析。尽管在动物实验中 TGF- β 1 在 Treg 细胞的生成及分化中有重要调节作用^[3],但本研究里 TGF- β 1 水平仅在急性期组与对照组中有显著差异,各病例组与对照组的 Treg 比例与 TGF- β 1 水平均无相关性,说明在总体环境下,尤其是老年患者体中 Treg 的诱导及生成不是取决于某一细胞因子的独立作用,而是综合多种细胞因子及信号通路共同作用后的结果^[13-14],新近研究也进一步显示局部微环境中细胞因子的差异可显著影响 Treg 的分化过程,反映机体免疫应答调节的复杂性^[15]。老年人免疫功能紊乱或异常也导致其易患慢性感染性疾病,细胞免疫尤其是调节性 T 细胞在 COPD 的发生、发展及预后中发挥着重要作用、联系紧密,说明了 COPD 极有可能是一种自身免疫性疾病,这也为临床上针对该疾病的免疫治疗及新策略的开发提供了重要理论依据^[16-17]。

参考文献

[1] Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells[J]. N Engl J Med, 2006, 354(1): 1166-1176.
 [2] Fantini MC, Becker C, Monteleone G, et al. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺ CD25⁺ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7[J]. J Immunol, 2004, 172(9): 5149-5153.
 [3] Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, et al. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells[J]. J Exp Med, 2005, 201(7): 1061-1067.
 [4] 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(2007 年修订版)[J]. 中华内科杂志, 2007, 30(3): 254-261. (下转第 4111 页)

作为截骨端时宜同期固定踝关节以避免踝跖屈畸形的发生。本组患者中多数患者在骨搬运过程中出现不同程度膝关节疼痛,予以暂停牵引好转后继续骨搬运,或辅助使用止痛药物。(8)胫骨延长过程中患肢可部分负重,延长结束后骨痂矿化密度未达到正常前为骨痂矿化初期,患者可逐步增加负重重量,骨痂矿化达到正常骨密度后属矿化后期,患肢可逐步完全负重,6~8 周后分次拆除骨外固定,钢针拆除根据“阶段性最佳固定刚度”概念^[13],随着骨愈合强度的增加而逐渐减少钢针固定的数量,来减少再次骨折的发生率。

目前,骨搬运技术是国内外治疗长骨骨缺损、骨髓炎的首选方法,Ilizarov 技术通过胫骨骨端截骨-延长术同时解决了大段骨缺损和大面积软组织缺损的问题,减少了手术次数,尽可能保留患肢功能,疗效确切,所以 Ilizarov 技术是治疗胫骨感染性骨缺损合并软组织缺损的有效方法,提高了此类创伤的治愈率并改善了患者的生活质量。

参考文献

[1] Jain AK, Sinha S. Infected nonunion of the long bones[J]. Clin Orthop Relat Res, 2005(431):57-65.
 [2] Paley D, Maar DC. Ilizarov bone transport treatment for tibial defects[J]. J Orthop Trauma, 2000, 14(2):76-85.
 [3] May JW Jr, Jupiter JB, Weiland AJ, et al. Clinical classification of posttraumatic tibial osteomyelitis[J]. J Bone Joint Surg(Am), 1989(71):1422-1428.
 [4] Sen C, Kocaoglu M, Eralp L, et al. Bifocal compression-distraction in the acute treatment of grade III open tibia fractures with bone and soft-tissue loss: a report of 24 cases[J]. J Orthop Trauma, 2004, 18(3):150-157.
 [5] El-Rosasy MA. Acute shortening and re-lengthening in

the management of bone and soft-tissue loss in complicated fractures of the tibia[J]. J Bone Joint Surg Br, 2007, 89(1):80-88.

[6] 吴其常, 张志刚, 卞传华, 等. 骨段输送治疗下肢大段骨缺损[J]. 骨与关节损伤杂志, 2003, 18(2):94-96.
 [7] Robert Rozbruch S, Weitzman AM, Tracey Watson J, et al. Simultaneous treatment of tibial bone and soft-tissue defects with the Ilizarov method[J]. J Orthop Trauma, 2006, 20(3):197-205.
 [8] 任义军, 严立, 胡锐, 等. Ilizarov 技术治疗 Cierny-Mader III、IV 型胫骨创伤性骨髓炎的疗效评价[J]. 中华创伤骨科杂志, 2013, 15(10):845-848.
 [9] Paley L, Catagni M, Argnani F, et al. Ilizarov treatment of tibial nonunions with bone loss[J]. Clin Orthop Relat Res, 1998(241):146-165.
 [10] Lacobellis C, Berizzi A, Aldegheri R. Bone transport using the Ilizarov method: a review of complications in 100 consecutive cases[J]. Strategies Trauma Limb Reconstr, 2010(5):17-22.
 [11] Mahaluxmivala J, Nadarajah R, Allen PW, et al. Ilizarov external fixator: acute shortening and lengthening versus bone transport in the management of tibial non-unions [J]. Injury, 2005, 36(5):662-668.
 [12] 秦泗河. Ilizarov 技术概述[J]. 中华骨科杂志, 2006, 26(9):642-645.
 [13] 夏和桃. 关于骨折固定的适应性刚度概念[J]. 中华创伤骨科杂志, 2007, 9(12):1170-1172.

(收稿日期:2015-04-21 修回日期:2015-07-26)

(上接第 4107 页)

[5] Han Y, Guo Q, Zhang M, et al. CD69⁺ CD4⁺ CD25⁻ T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1[J]. J Immunol, 2009, 182(1):111-120.
 [6] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3):1151-1164.
 [7] Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3[J]. Immunol Rev, 2011, 241(1):260-268.
 [8] Qin A, Wen Z, Zhou Y, et al. MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4⁽⁺⁾ Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T cells through PI3K/AKT pathway[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(2):252-264.
 [9] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. Science, 2003, 299(569):1057-1061.
 [10] Oderup C, Cederbom L, Makowska A, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression[J]. Immunology, 2006, 118(2):240-249.
 [11] Domagala-Kulawik J, Hoser G, Dabrowska M, et al.

CD4⁺/CD25⁺ cells in systemic inflammation in COPD [J]. Scand J Immunol, 2011, 73(1):59-65.

[12] Roos-Engstrand E, Pourazar J, Behndig AF, et al. Expansion of CD4⁺ CD25⁺ helper T cells without regulatory function in smoking and COPD [J]. Respir Res, 2011(12):74.
 [13] Pridgeon C, Bugeon L, Donnelly L, et al. Regulation of IL-17 in chronic inflammation in the human lung[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 120(12):515-524.
 [14] Lane N, Robins RA, Corne J, et al. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells[J]. Clin Sci (Lond), 2010, 119(2):75-86.
 [15] Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances[J]. Nat Immunol, 2010, 11(8):674-680.
 [16] Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease[J]. N Engl J Med, 2009, 360(23):2445-2454.
 [17] Hou J, Sun Y, Hao Y, et al. Imbalance between subpopulations of regulatory T cells in COPD[J]. Thorax, 2013, 68(12):1131-1139.

(收稿日期:2015-04-13 修回日期:2015-05-16)