

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.02.023

## 信必可都保对慢性阻塞性肺疾病患者树突细胞的调节\*

朱咪咪<sup>1</sup> 赵丽丽<sup>2</sup> 别福鑫<sup>1</sup> 吴珊珊<sup>1</sup> 张丽<sup>2△</sup>

(1 牡丹江医学院 黑龙江 牡丹江 157001; 2 牡丹江医学院附属红旗医院呼吸科 黑龙江 牡丹江 157001)

**摘要 目的:**探讨布地奈德/福莫特罗吸入剂(商品名:信必可都保)对于慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease COPD)患者外周血中树突状细胞(dendritic cell DCs)亚群、肺功能以及炎症反应因子的影响。**方法:**选取符合入组标准的 COPD 急性加重期患者,共 80 例,随机分成 2 组,每组 40 人。对照组给予常规对症治疗,实验组在此基础上给予信必可都保吸入,观察入组对象治疗前、治疗 4 周后两组患者外周血树突状细胞亚群(mDCs 和 pDCs)的水平、C 反应蛋白(C-reactive protein CRP)、白细胞计数表达水平及 CAT 评分、肺功能的变化。**结果:**用药后 mDCs 和 pDCs 占外周血的百分比及 mDCs/pDCs 实验组及对照组均较用药前明显降低( $P>0.05$ ),实验组优于对照组低,但差异无明显的统计学意义( $P>0.05$ )。用力肺活量(FVC)、FEV1 占预计值百分比(FEV1%)、FEV1/FVC、CAT 评分两组均较用药前有所改善,实验组较与对照组更明显( $P<0.05$ )。用药后 C 反应蛋白(CRP)、白细胞计数(WBC)较用药前有所改善,但用药后实验组与对照组相比无统计学差异( $P>0.05$ )。**结论:**信必可都保可有效改善 COPD 患者肺功能,改善其临床症状,但对树突细胞亚群的影响不明显。

**关键词:**慢性阻塞性肺疾病;树突细胞;信必可都保;流式细胞分析术

**中图分类号:**R563 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)02-308-04

## Effect of Symbicort Turbuhaler on Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease of Peripheral Blood Dendritic Cells\*

ZHU Mi-mi<sup>1</sup>, ZHAO Li-li<sup>2</sup>, BIE Fu-xin<sup>1</sup>, WU Shan-shan<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2△</sup>

(1 Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang, 157001, China;

2 Department of respiration, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang, 157001, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of Budesonide/formoterol on the peripheral blood dendritic cell subgroup, lung function and inflammatory factors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Methods:** The patients with acute exacerbation of COPD were selected as the target group, 80 cases were randomly divided into 2 groups, each group was 40. The control group was treated with conventional symptomatic treatment, The experimental group was given symbicort turbuhaler inhalation on the basis of this. after 4 weeks by flow cytometry respectively four fluorescence detection of two groups of patients with peripheral blood dendritic cell subsets analysis treatment before treatment, (mDCs and pDCs), the level of C reactive protein (CRP), the expression level of white blood cell count and CAT score, pulmonary function. **Results:** The percentage of mDCs and pDCs in the peripheral blood and the mDCs/pDCs experimental group and the control group were significantly lower than those before the medication ( $P>0.05$ ), and the experimental group was lower than the control group, but there was no significant difference between the experimental group and the control group ( $P>0.05$ ). The two groups of the forced vital capacity (FVC), the percentage of FEV1 (FEV1%), FEV1/FVC and CAT were all better than those before the medication, and the experimental group was more obvious than the control group ( $P<0.05$ ). After treatment, C reactive protein (CRP) and white blood cell count (WBC) were improved compared with those before treatment, but there was no significant difference between the experimental group and the control group after treatment ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** Symbicort can significantly improve lung function, reduce medical costs and improve clinical symptoms in patients with chronic obstructive pulmonary disease, but has little effect on dendritic cell subsets.

**Key words:** COPD; Dendritic cells; Symbicort turbuhaler; Flow cytometry

**Chinese Library Classification(CLC):** R563 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2019)02-308-04

### 前言

当前,全球 40 岁以上人群中约十分之一患有 COPD,预测

2030 年,将达全球死因第 3 位<sup>[1]</sup>。最新版 GOLD 指南推荐对 COPD 急性加重患者,LABA 联用 ICS 较单用 LABA 相比能改善患者的肺功能,急性加重的次数将会降低<sup>[2]</sup>。ICS 与 LABA 具

\* 基金项目:黑龙江省卫生计生委科研基金项目(2016-389)

作者简介:朱咪咪(1990-),女,硕士研究生,主要研究方向:呼吸内科学,E-mail: 1441959885@qq.com

△ 通讯作者:张丽,女,硕士生导师,教授,主要研究方向:呼吸内科学,E-mail: zhangli.mdj@126.com,电话:13945315677

(收稿日期:2018-04-12 接受日期:2018-05-04)

有协同、互补的作用,可使 ICS 在小剂量下也可产生强的抗炎作用,继而可以减少其用量<sup>[2]</sup>。在一项对照临床研究中,布地奈德/福莫特罗 160/4.5  $\mu\text{g}$  2 吸/次,2 次/天,与单药和安慰剂比较,患者的呼气峰流速(PEF)可得到明显改善<sup>[3]</sup>。COPD 的发病机制与免疫反应有关,而 DCs 参与了 COPD 的发病过程<sup>[4]</sup>。关于 DCs 与 COPD 的研究有许多,COPD 患者中 DCs 的数量和功能均发生了改变,但是国内外关于两者关系的研究并不完全一致。本研究通过流式细胞术检测 COPD 急性加重患者用药前后外周血树突状细胞亚群的变化,观察信必可都保对慢阻肺患者外周血 DCs 亚群的影响,以说明信必可都保是否可以调节 DCs 亚群,进而调节 COPD 免疫反应。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取我院呼吸内科住院并确诊为 COPD 急性加重的患者。入选标准为:(1)年龄 40~80 岁;(2)至少 1 年戒烟史;(3)患者的诊断依据 2013 版《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》<sup>[5]</sup>。结合相应的病史、表现、肺功等综合诊断。排除标准:(1)心、脑血管严重疾病;(2)肝、肾功能严重损害;(3)血液、风湿免疫疾病,近期服用免疫抑制剂、激素等治疗者;(4)其他肺部疾病或其他部位严重感染者。剔除标准:(1)纳入不符合标准的病例;(2)依从性差及失访者;(3)实验中病情突然加重,需更换治疗方案者;(4)出现药物不良反应,不能耐受者。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 试剂及仪器** Lin-FITC 混合抗体(包括 CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD235a、CD56)、CD11c-PE、CD123-PE、CD1c-PC7、CD303a-PC7 以及 HLA-DR-PC5、溶血素(FCM lysing solution)、淋巴细胞分离液(Ficoll 液)、流式细胞缓冲液(phosphate buffer saline)均购自美国的 eBioscience 公司。流式细胞仪购美国 BECKMAN COULTER 公司;肺功能仪购自德国耶格公司。

**1.2.2 流式细胞分析** 取入组对象的肝素抗凝静脉血 3 mL 与 PBS 缓冲液 1:1 混匀;离心管中加入 3 mL Ficoll 液;管壁倾斜

45°,用滴管将混匀血缓慢加入 Ficoll 液上,3000 r/min,水平离心 15 min。液面分为 3 层,第 1 层为血浆,第 2 层为淋巴细胞,第 3 层主要是红、粒细胞,在 1、2 层之间有一棉絮样漂浮以单个核细胞为主的白色狭窄带,用滴管将其吸出至干净试管中,加入 2 mL PBS 缓冲液,1500 r/min、15 min,洗涤细胞 2 次。弃上清液,留 2 mL 单个核细胞液备用。采用两管 4 色抗体组合(Lin1/HLA-DR/CD11c/CD1c 和 Lin1/HLA-DR/CD123/CD303)检测外周血中 Lin1-HLA-DR+ 群体中的 DCs 细胞,DCs 亚群分为髓样 DCS(mDCs、CD11c+CD1c+)和浆细胞样 DCS(pDCs、CD123+CD303+)。具体操作如下:取 FALCIN 管 2 只,管 1 中加入 Lin1/HLA-DR/CD11c/CD1c,管 2 中加入 Lin1/HLA-DR/CD123/CD303;各管中分别加入单个核细胞液 200  $\mu\text{L}$ ,混匀避光常温下反应 30 min;加入 2 mL 溶血素,避光常温下反应 15 min;然后离心 1300 r/min、15 min,弃上清液,加入 2 mL PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次;弃上清液,最后加入 0.5 mL PBS 缓冲液混匀,上机检测。结果以 CD123+CD303+ 和 CD11c+CD1c+ 双阳性细胞占外周血细胞的百分比(%)表示。

**1.2.3 实验室相关检查** 所有入组对象用药前及用药后 4 周行血细胞分析、C 反应蛋白(CRP)等相关指标的检测。

**1.2.4 肺功能指标检测** 所有入组对象用药前及用药后 4 周进行肺功能检测 FVC、FEV1%、FEV1/FVC 等指标。

**1.2.5 CAT 评分** 所有入组对象用药前后进行 CAT 评分。

### 1.3 统计学方法

所有的数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,分析统计软件采用 SPSS15.0,组间比较用两样本的 t 检验,组内比较用配对 t 检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组患者外周血中 DCs 亚群的结果比较

用药后 mDCs 和 pDCs 占外周血的百分比及 mDCs/pDCs 实验组及对照组均较用药前明显降低( $P > 0.05$ ),实验组优于对照组低,但差异无明显的统计学意义( $P > 0.05$ )。见下表 1 及附图 1。

表 1 各组患者外周血中 DCs 亚群的结果比较

Table 1 Comparison of the DCs subgroups in peripheral blood between two groups

| Groups           | mDCs              |                      | pDCs              |                      | mDCs/pDCs         |                      |
|------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|                  | Before medication | After the medication | Before medication | After the medication | Before medication | After the medication |
| Treatment Groups | 0.36 $\pm$ 0.22   | 0.23 $\pm$ 0.18*     | 0.17 $\pm$ 0.10   | 0.12 $\pm$ 0.09      | 2.18 $\pm$ 0.43   | 1.88 $\pm$ 0.46*     |
| Control Groups   | 0.37 $\pm$ 0.23   | 0.32 $\pm$ 0.23      | 0.17 $\pm$ 0.10   | 0.14 $\pm$ 0.09      | 2.20 $\pm$ 0.46   | 2.00 $\pm$ 0.53      |

Note: \*  $P > 0.05$ , (comparison with control group).

### 2.2 各组对象肺功能检测指标的结果

治疗后,两组 FEV1、FEV1%、FEV1/FVC 比值均较治疗前提高( $P < 0.05$ ),实验组改善的更加明显( $P < 0.05$ )。

### 2.3 各组患者外周血炎症指标及 CAT 评分的结果比较

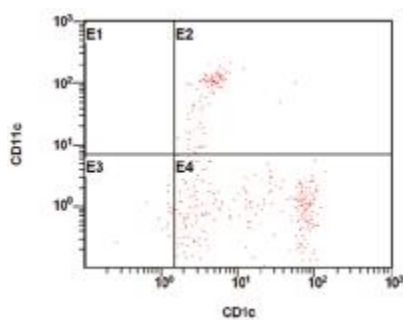
两组用药后 C 反应蛋白(CRP)均较用药前降低,实验组明显优于对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );用药后白细胞计数(WBC)实验组与对照组相比无统计学差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

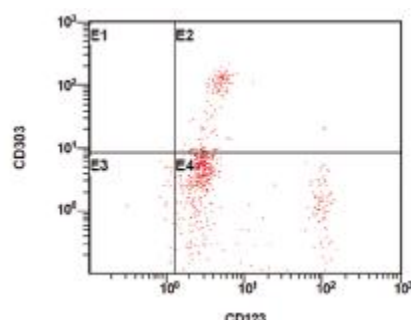
目前,对于 DCs 与 COPD 关系的研究有许多,不同学者由

于实验方法、实验标本以及试剂的不同,其实验结果并不完全一致。但均有相同的发现就是 COPD 患者中的 DCs 数量以及功能均发生了改变<sup>[6]</sup>,吸烟是 COPD 等慢性炎症性肺病的主要危险因素<sup>[7]</sup>。香烟烟雾(CS)含有化学物质、细菌和真菌成分(包括 LPS)的复杂混合物<sup>[8]</sup>,能够发挥免疫调节作用。有大量实验证据表明,在 COPD 患者中 DC 浓度是增高<sup>[9]</sup>,但也有报道发现 COPD 患者中 DCs 浓度是降低的<sup>[10,11]</sup>。我们的研究并没有发现实验组与对照组患者外周血 pDCs 浓度差异。Pottelberge 研究发现 GOLD 分级越严重,pDCS 的水平降低的越明显<sup>[9]</sup>,也有研

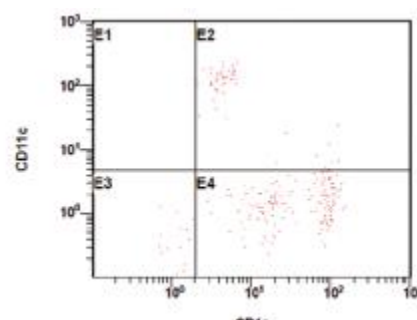
研究发现 pDC 和 mDC 的浓度和 mDC/pDC 比值在吸烟组间没有差异,发现这些变化与烟雾暴露有关,而不是 COPD 的存在<sup>[12]</sup>。本实验选取已戒烟一年以上患者作为入组对象,从而避免了吸烟因素对 DCs 的影响。



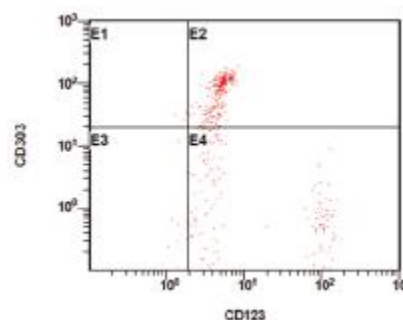
Note: Figure 1 mDCs Dendritic cell in the peripheral blood of COPD patient in acute exacerbation.



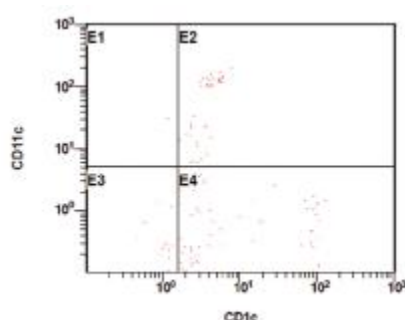
Note: Figure1 pDCs Dendritic cell in the peripheral blood of COPD patient in acute exacerbation.



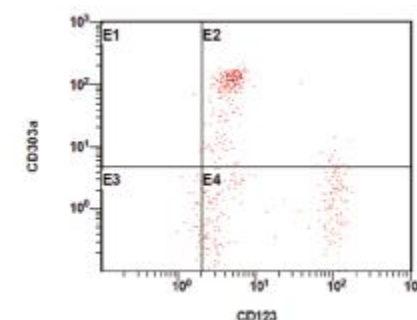
Note: Figure 1 mDCs dendritic cells in the experimental group after administration.



Note: Figure 1 pDCs dendritic cells in the experimental group after administration.



Note: Figure 1 mDCs dendritic cells were treated with the control group.



Note: Figure 1 pDCs dendritic cells were treated with the control group.

Fig.1 The percentage of mDCs and pDCs in the peripheral blood and the changes of mDCs/pDCs before and after drug use in the experimental group and the control group

表 2 各组患者肺功能指标的结果比较

Table 2 Comparison of the results of lung function index between two groups

| Groups           | FVC               |                      | FEV1%             |                      | FEV1/FVC          |                      |
|------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|                  | Before medication | After the medication | Before medication | After the medication | Before medication | After the medication |
| Treatment Groups | 2.31± 0.67        | 2.92± 0.97*          | 56.71± 13.53      | 69.85± 11.08*        | 58.71± 7.30       | 65.46± 4.83*         |
| Control Groups   | 2.24± 0.71        | 2.35± 0.70           | 57.57± 14.88      | 63.29± 12.89         | 59.68± 6.72       | 60.08± 6.35          |

Note: \* P<0.05, (comparison with control group).

表 3 两组患者外周血炎症指标及 CAT 评分的结果的比较

Table 3 Comparison of peripheral the blood inflammation and CAT score between two groups of patients

| Groups           | WBC× 10 <sup>9</sup> (L <sup>-1</sup> ) |                      | CAT               |                          | CRP(mg/L)         |                      |
|------------------|-----------------------------------------|----------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|----------------------|
|                  | Before medication                       | After the medication | Before medication | After the medication     | Before medication | After the medication |
| Treatment Groups | 9.89± 2.92                              | 6.84± 2.15*          | 22.48± 4.81       | 27.10± 4.61 <sup>△</sup> | 8.43± 5.04        | 3.43± 2.59*          |
| Control Groups   | 9.77± 2.18                              | 6.19± 1.74           | 21.25± 5.36       | 24.35± 5.34              | 7.79± 4.33        | 2.74± 2.58           |

Note: \* P>0.05, <sup>△</sup>P<0.05 (comparison with control group).

DC 是必不可少的抗原呈递细胞(APC),通过细胞与细胞之间相互作用或细胞因子刺激 T 细胞的活化协调先天性免疫应答和适应性免疫应答<sup>[13-15]</sup>。肺 DC 分布于上皮细胞下、间质和

胸膜腔,通常以不成熟的抗原呈递细胞形式存在。未成熟的 DC 在抗原摄取方面是有效的,但是在 DC 成熟期间,抗原摄取能力随着抗原呈递能力的增强而降低。本研究应用流式细胞术检

测 COPD 急性加重期患者用药前后外周血 DCs, 结果显示: 实验组与对照组 mDCs 和 pDCs 占外周血白细胞的百分比在用药后均较用药前明显降低, 表明 DCs 参与了 COPD 的发病过程。另外, 实验组与对照组 mDCs/pDCs 在用药后均较用药前明显降低, 提示 mDCs/pDCs 比例失衡对于 COPD 发病过程有着一定影响, 进而可以说明 mDCs/pDCs 的平衡对于维持自身稳态及诱导正常的免疫反应有着重要的意义。而 Paul Stoll 等人<sup>[12]</sup>研究发现, 人类外周血的 pDC、mDC 的浓度和 mDC/pDC 比值在组间没有差异。Paul Stoll<sup>[7]</sup>另外一个实验比较了用 ICS 加 LABA 治疗的患者的 mDC 与未接受该治疗的患者的 mDC。分析发现, ICS 加 LABA 治疗与 COPD 患者气道 mDC 的浓度降低有关。而本研究发现, 用药后 mDCs、pDCs、mDCs/pDCs 实验组及对照组均较用药前明显降低 ( $P > 0.05$ ), 实验组优于对照组低, 但差异无明显的统计学意义 ( $P > 0.05$ )。考虑产生此结果的原因: ① ICS 是一种糖皮质激素, 虽然有研究发现糖皮质激素可影响 DCs 的功能与成熟, 但是具体其机制仍不明确<sup>[16]</sup>。而且人体内还存在其他相关激素的调节, 也可引起 DCs 质和量的改变<sup>[17]</sup>; ② 本实验用药疗程为 4 周, 用药时间不长, 药物作用效果还未完全显效; ⑤ 研究的样本只是外周血 DCs, 而不是位于气道壁内的 DC。气道各个亚段中 DC 的表型可能有很大不同。因此, 此报告所述的表型可能并不代表 COPD 患者的所有气道亚段。外周血中 DCs 的表现反映的是机体全身的免疫状况, 但可受肺部其它炎症因子作用的影响。在本次实验中, 外周血 DCs 亚群的变化与国内外一些实验的结果相符, 因此, 我们可以以此来反映 COPD 病人体内免疫反应的变化。

FVC、FEV1%、FEV1/FVC 两组均较用药前均有所改善, 实验组较与对照组更明显 ( $P < 0.05$ )。用药后 C 反应蛋白(CRP)、CAT 评分改善实验组明显优于对照组, 白细胞计数(WBC)变化无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。这些结果表明, 吸入信必可都保可改善患者肺功能, 减少患者急性发作次数, 改善患者的临床症状, 降低其住院率以及医疗花费等, 提倡急性发作缓解后患者长期、规律、适量吸入信必可都保并定期复查肺功及各项指标。

目前, 我们正在逐渐了解 DCs 的功能及其亚群之间的比例调节, 但仍是九牛一毛。后续工作中, 我们还需要对 DCs 的水平变化进行动态监测, 以更深入地探索其在 COPD 发展中的变化, 为临床中 COPD 的诊断治疗提供新的方法与思路。

#### 参考文献(References)

- [1] Adeyoye D, Chua S, Lee C, et al. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis [J]. *J Glob Health*, 2015, 5(2): 1-17
- [2] 王蕾, 杨汀, 王辰, 等. 2017 年版慢性阻塞性肺疾病诊断、处理和预防全球策略解读[J]. *中国临床医生杂志*, 2017, 45(1): 104-108
- [3] 朱健武, 孟丹, 张晓燕, 等. 信必可都保对稳定期慢性阻塞性肺疾病患者血气指标和肺功能的影响[J]. *中国药业*, 2017, 26(13): 30-32
- [4] Zhu Jian-wu, Meng Dan, Zhang Xiao-yan, et al. Effect of Symbicort Turbuhaler on blood gas index and lung function in patients with stable chronic obstructive pulmonary diseases [J]. *China Pharmaceuticals*, 2017, 26(13): 30-32
- [5] Kopf M, Schnierder C, Nobb SP. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells[J]. *Nat Immunol*, 2014, 16(1): 36-44
- [6] 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]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2014, 6(2): 67-80
- [7] 蔡雪敏, 宋卫东. COPD 大鼠肺树突细胞表面分子的表达与相关细胞因子的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27(10): 1103-1106
- [8] Cai Xue-Min, Song Wei-Dong. The relationship between the expression of dendritic cell surface molecules and related cytokines in COPD rats[J]. *J Clin Exp Pathol*, 2011, 27(10): 1103-1106
- [9] Stoll P, Heinz AS, Bratke K, et al. Impact of smoking on dendritic cell phenotypes in the airway lumen of patients with COPD [J]. *Respir Res*, 2015, 15(1): 48
- [10] Larsson L, Pehrson C, Dechen T, et al. Microbiological components in mainstream and sidestream cigarette smoke [J]. *Tob Induc Dis*, 2012, 10(1): 13
- [11] Van Pottelberge GR, Bracke KR, Van den Broeck S, et al. Plasmacytoid dendritic cells in pulmonary lymphoid follicles of patients with COPD[J]. *Eur Respir J*, 2010, 36(4): 781-791
- [12] Vassallo R, Walters PR, Lamont J, et al. Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study[J]. *Respir Res*, 2010, 11(1): 45
- [13] Kalathil SG, Lugade AA, Pradhan V, et al. T-regulatory cells and programmed death 1+T cells contribute to effector T-cell dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 190(1): 40-50
- [14] Stoll P, Ulrich M, Bratke K, et al. Imbalance of dendritic cell co-stimulation in COPD[J]. *Respir Res*, 2015, 16(1): 1-11
- [15] Lambrecht BN, Hammad H. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation[J]. *Lancet*, 2010, 376(9743): 835-843
- [16] Mackern-Oberti Juan P, Vega Fabián, Lianos Carolina, et al. Targeting Dendritic Cell Function during Systemic Autoimmunity to Restore Tolerance[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(9): 16381-16417
- [17] 李建锋, 赵自刚, 牛春雨. 树突细胞及其调节细胞免疫功能的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(9): 2323-2325
- [18] 陈亚欧, 宋卫东. 树突状细胞在慢性阻塞性肺疾病发病过程中的作用[J/CD]. *中华肺部疾病杂志: 电子版*, 2012, 5(1): 74-77
- [19] 洪永锋. miR-29b, miR-29c 在 Toll 样受体调控糖皮质激素诱导浆细胞样树突状细胞凋亡中的作用[D]. 安徽: 安徽医科大学, 2014