

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.12.004

· 论 著 ·

尖锐湿疣患者外周血 Treg/Th17 细胞平衡及相关转录因子的表达

陈 华^{1,2}, 熊 琦¹, 陈永艳¹

(1 遵义医学院附属医院, 贵州 遵义 563000; 2 重庆市綦江区人民医院, 重庆 綦江 401420)

[摘要] **目的** 探讨 Treg/Th17 细胞失衡在尖锐湿疣(CA)发病及复发机制中的作用及意义。**方法** 选取 52 例 CA 患者(初发 27 例, 复发 25 例)作为研究组, 30 例健康者为正常对照组, 采用流式细胞术(FCM)检测其外周血 Treg、Th17 细胞的比例, 实时荧光定量 PCR 检测外周血单个核细胞中 Foxp3 mRNA 和 ROR γ t mRNA 的表达水平。**结果** CA 患者外周血 Treg 细胞比例、Foxp3 mRNA 表达水平高于正常对照组, 复发组高于初发组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); Th17 细胞比例、ROR γ t mRNA 表达水平低于正常对照组, 复发组 Th17 细胞比例低于初发组, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); Treg/Th17 比值高于正常对照组[4.60(3.20, 8.68) vs 1.39(1.05, 2.05)], 复发组高于初发组[8.19(4.21, 10.81) vs 3.52(2.47, 4.85)], 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** CA 患者存在 Treg/Th17 细胞失衡, 复发患者 Treg/Th17 细胞失衡更显著, 并可能在 CA 发病及复发机制中起重要作用。

[关键词] 尖锐湿疣; Foxp3; ROR γ t; Treg; Th17; Treg/Th17

[中图分类号] R752.5⁺3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)12-1120-06

Balance of Treg/Th17 cells and the expression of related transcription factors in peripheral blood of patients with condyloma acuminatum

CHEN Hua^{1,2}, XIONG Qi¹, CHEN Yong-yan¹ (1 Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China; 2 Chongqing Qijiang District People's Hospital, Qijiang 401420, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the role and significance of Treg/Th17 cells imbalance in pathogenesis and recurrence mechanism of condyloma acuminatum (CA). **Methods** 52 patients with CA were selected as study group (CA group, 27 with initial occurrence of CA, 25 with recurrence of CA), 30 healthy persons were as control group, flow cytometry was used to detect the proportion of Treg cells and Th17 cells in the peripheral blood, the expression level of Foxp3 mRNA and ROR γ t mRNA in peripheral blood mononuclear cells was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. **Results** The proportion of Treg cells and the expression level of Foxp3 mRNA in peripheral blood in CA group was higher than that in control group, recurrence CA group was higher than initial occurrence CA group, difference was significant (both $P < 0.05$); the proportion of Th17 cells and expression level of ROR γ t mRNA in CA group was significantly lower than that in control group, proportion of Th17 cells in recurrence CA group was lower than initial occurrence CA group, there was significant difference (both $P < 0.05$). The proportion of Treg/Th17 in CA group was higher than that in healthy controls [4.60 [3.20, 8.68] vs 1.39 [1.05, 2.05], $P < 0.05$], recurrence CA group was higher than initial occurrence CA group [8.19 [4.21, 10.81] vs 3.52 [2.47, 4.85], $P < 0.05$]. **Conclusion** There is an imbalance between Treg cells and Th17 cells in patients with CA, especially in patients with recurrence of CA, the imbalance of Treg/Th17 cells may play an important role in the pathogenesis and recurrence mechanism of CA.

[收稿日期] 2017-04-08

[基金项目] 贵州省科学技术厅社会发展攻关项目(黔科合 SY 字[2013]3051 号)

[作者简介] 陈华(1992-), 女(汉族), 重庆市人, 硕士研究生, 主要从事皮肤分子生物学研究。

[通信作者] 陈永艳 E-mail: cyyzy@126.com

[Key words] condyloma acuminatum; Foxp3; ROR γ t; Treg; Th17; Treg/Th17

[Chin J Infect Control, 2017, 16(12): 1120 - 1125]

尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA)是由人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染所致的性传播疾病,传染性强、复发率高^[1-2],目前发病及复发机制尚不完全清楚。有资料^[3-4]表明,CA 的发生、迁延不愈、顽固难治及多次复发与机体的细胞免疫功能低下有关。既往研究^[5-6]表明,CA 患者存在 Th1/Th2 失衡,导致机体不能完全清除 HPV,是促进 CA 多次复发的重要因素之一。但 Th1/Th2 失衡不能完全阐明 CA 的免疫发病机制,推测 CD4⁺ T 细胞中存在一些新的细胞亚群也可能与 CA 的发病有关。近年来,随着对调节性 T 细胞(regulatory cell, Treg)、辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)两类新的 CD4⁺ T 细胞的深入研究,有文献报道 Treg/Th17 细胞平衡的异常在感染性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤等疾病的发生、发展中起重要作用^[7-8]。CA 患者是否也存在 Treg/Th17 细胞平衡的偏移,目前研究较少。本研究通过检测初发和复发 CA 患者外周血 Treg 和 Th17 细胞的比例,相关转录因子 Foxp3 和 ROR γ t mRNA 的表达水平,探讨 Treg/Th17 细胞失衡在 CA 发病及复发机制中的作用及意义,为 CA 的免疫治疗提供新的思路。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2015 年 11 月—2016 年 6 月在本院皮肤性病门诊就诊,符合 CA 诊断标准患者 52 例^[9],男性 30 例,女性 22 例,年龄 15~74 岁,平均年龄(33.9±13.5)岁,进一步分为初发组和复发组。CA 初发组 27 例:首次就诊并符合 CA 诊断者,均未经过治疗,男性 17 例,女性 10 例,平均年龄(36.3±14.5)岁;CA 复发组 25 例:既往诊断 CA,经治疗后 3 个月内复查,在原发皮损处或邻近部位出现新发疣体者,男性 13 例,女性 12 例,平均年龄(31.4±12.1)岁。排除标准:患有自身免疫性疾病、恶性肿瘤、严重的系统性疾病、感染性疾病及 1 个月内使用过免疫调节剂、免疫抑制剂及抗菌药物的患者,以及妊娠妇女。选择同期本院的健康体检者 30 例作为对照组,其中男性 17 例,女性 13 例,平均年龄(30.6±8.7)岁,各组的性别、年龄比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。本研究遵循伦理学标

准,所有受试者均在知情同意的情况下留取标本。

1.2 主要试剂和仪器 BD FACSCantoTM II 流式细胞仪(美国 BD 公司),PMA/ionomycin mixture (250×)和 BFA/monensin mixture (250×)(美国 Sigma 公司),FIX&PERM 试剂盒(联科生物技术股份有限公司),流式荧光抗体 CD4-FITC/CD25-PE/CD127-PECY5/CD3-eFluor[®] 660/CD8-FITC/IL-7-PE/CD69-PE 单克隆抗体及相应荧光标记同型对照均购自 eBioscience 公司。MyIQTM 2 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司),酶标仪(BIO-RAD 公司)ABI 7300 Real-Time PCR System(美国 ABI 公司),人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司),RNA 提取试剂 Trizol[®] Reagent(美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 流式细胞术(flow cytometry, FCM) 检测外周血 Treg 细胞、Th17 细胞在 CD3⁺ CD4⁺ 细胞中的比例。Treg 细胞:抽取外周静脉血 5 mL,用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,依次加入 CD25-PE 抗体、CD4-FITC 抗体、CD127-PECY5 抗体,进行避光、孵育、洗涤、离心。0.1%多聚甲醛固定液 150 μ L 重悬细胞,使用流式细胞仪射门检测,分选分析 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg 细胞比例。Th17 细胞:取外周血 250 μ L 接种于细胞培养孔中,加入等体积的 RPMI 1640 培养基,同时加入 PMA/ionomycin mixture (250×)和 BFA/monensin mixture (250×),置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 5 h。取 2 个流式管各加入 200 μ L 刺激培养后的全血样本,其后按说明依次加入 CD3-eFluor[®] 660、CD8-FITC 抗体,室温孵育 30 min,再进行固定、破膜,其后在检测管加入 IL-7 PE 抗体,对照管加入同型对照抗体,最后进行避光、孵育、洗涤、离心,0.1%多聚甲醛固定液 150 μ L 重悬细胞,使用流式细胞仪设门法检测,分选分析 CD3⁺ CD8⁻ IL17⁺ Th17 细胞比例。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, real-time PCR) 检测外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 Foxp3、ROR γ t mRNA 的表达水平:抽取外周静脉血 5 mL,用淋巴细胞分离液分离外周

血单个核细胞。Trizol 一步法提取总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。按照试剂盒说明书合成 cDNA 操作,并以此模板进行 Real-time PCR 扩增。Real-time PCR 特异性引物均由宝生物工程(大连)有限公司设计并合成。内参基因 β -actin 上游:5'-ACAGCCTCGCCTTTGCCGATCC-3', 下游:5'-CATGCCGGAGCCGTTGTTCGAC-3', 扩增产物片段长度 101 bp; 目的基因 *Foxp3* 上游:5'-CCTGGGCTCCTCGCCTGACC-3', 下游:5'-TCTCTCTGCCTCAGCCTTGCC-3', 扩增产物片段长度 184 bp。目的基因 ROR γ t 上游:5'-CTGCTGAGAAGGACAGGAGCCAA-3', 下游:5'-AGGAGTAGGCCGCGTTACAGC-3', 扩增产物片段长度 184 bp。逆转录反应条件:37 $^{\circ}$ C 15 min;85 $^{\circ}$ C 5 s,完成 cDNA 合成。RT-PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。循环结束后应用系统软件绘制扩增曲线、熔解曲线。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量, $\Delta Ct = Ct(\text{目的}) - Ct(\text{内参})$ 。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,统计结果若为正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 *t* 检验;若为非正态分布用中位数(下四分位数,上四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,若为非正态分布及方差不齐则采用 Mann-whitney 秩和检

验,以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血 Treg、Th17 细胞的比例 CA 组患者外周血 Treg 细胞比例高于正常对照组, Th17 细胞比例低于正常对照组, Treg/Th17 细胞比值高于正常对照组,差异均有统计学意义 ($t = -7.38, P < 0.001; t = 3.383, P = 0.001; Z = -5.425, P < 0.001$)。CA 患者不同组比较:CA 复发组 Treg 细胞比例高于 CA 初发组, Th17 细胞比例低 CA 初发组, Treg/Th17 细胞比值高于 CA 初发组,差异均有统计学意义 ($t = -3.294, P = 0.002; t = 2.726, P = 0.009; Z = -3.086, P = 0.002$)。见表 1,图 1、2。

表 1 CA 组和对照组外周血 Treg、Th17 细胞比例的检测结果

Table 1 Proportion of Treg cells and Th17 cells in peripheral blood of CA group and control group

组别	例数	Treg (%)	Th17 (%)	Treg/th17
CA 组	52	4.74 \pm 1.47 ^a	1.06 \pm 0.63 ^a	4.60(3.20, 8.68) ^a
CA 初发组	27	4.14 \pm 1.08	1.27 \pm 0.70	3.52(2.47, 4.85)
CA 复发组	25	5.38 \pm 1.59 ^b	0.82 \pm 0.46 ^b	8.19(4.21, 10.81) ^b
对照组	30	2.52 \pm 0.97	1.57 \pm 0.71	1.39(1.05, 2.05)

a: 与正常组比较 $P < 0.05$; b: 与 CA 初发组比较, $P < 0.05$

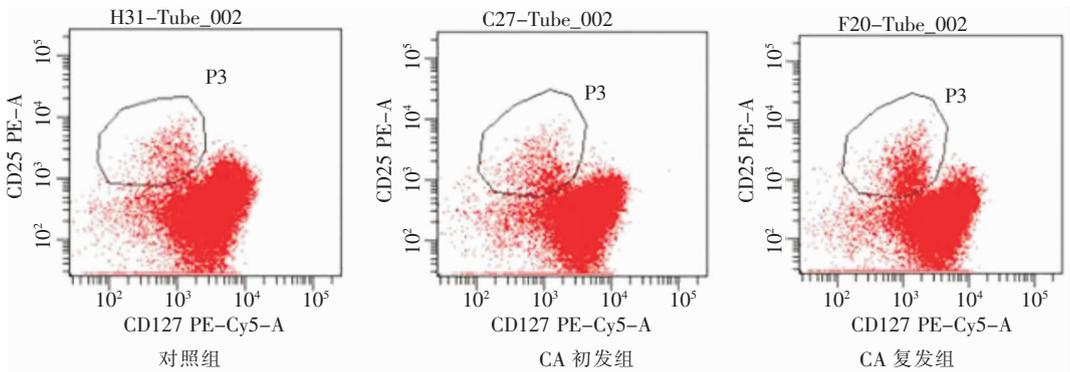


图 1 各组 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg 细胞比例

Figure 1 Proportion of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Treg cells in in each group

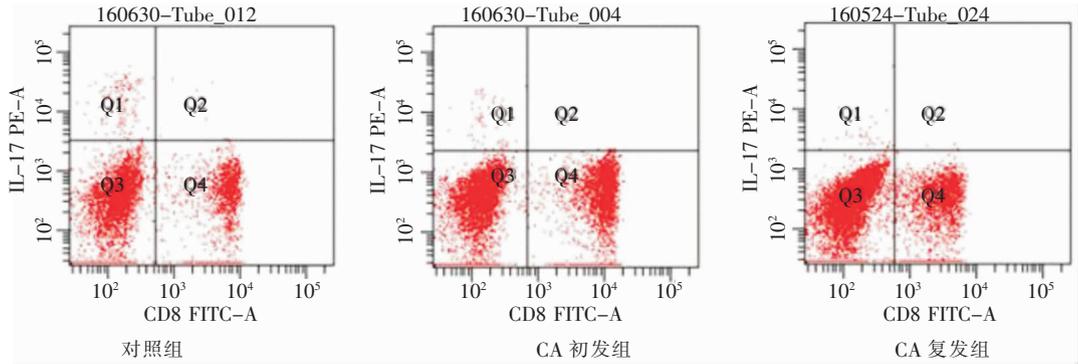


图 2 各组 CD3⁺ CD8⁻ IL17⁺ Th17 细胞的比例

Figure 2 Proportion of CD3⁺ CD8⁻ IL17⁺ Th17 cells in in each group

2.2 Foxp3 mRNA、RORγt mRNA 的表达水平

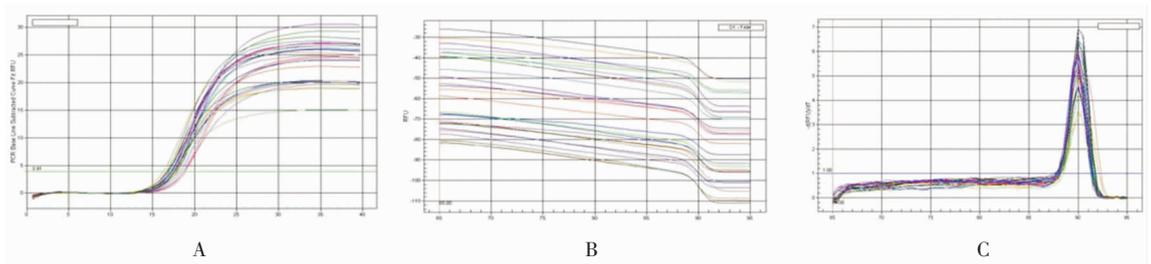
CA 患者外周血 PBMC 中 Foxp3 mRNA 表达水平高于对照组, RORγt mRNA 表达水平低于对照组, 差异均有统计学意义(Z 值分别为 -5.122、-4.188, 均 $P < 0.001$)。CA 患者不同组比较: CA 复发组 Foxp3 mRNA 表达水平高于 CA 初发组, 差异有统计学意义($t = -3.236, P = 0.003$), RORγt mRNA 表达水平与 CA 初发组比较差异无统计学意义($Z = -1.713, P = 0.087$)。见表 2。内参基因和目的基因实时荧光定量 PCR 见图 3~5。

表 2 CA 组和对照组外周血 Foxp3 和 RORγt mRNA 的表达水平

Table 2 Expression of Foxp3 and RORγt mRNA in peripheral blood of CA group and control group

组别	例数	Foxp3 mRNA	RORγt mRNA
CA 组	52	3.09(1.46, 6.75) ^a	0.36(0.23, 0.63) ^a
CA 初发组	27	3.74 ± 3.58	0.34(0.23, 0.72)
CA 复发组	25	8.70 ± 6.84 ^b	0.37(0.25, 0.59)
对照组	30	1.20(0.44, 1.63)	0.93(0.68, 1.62)

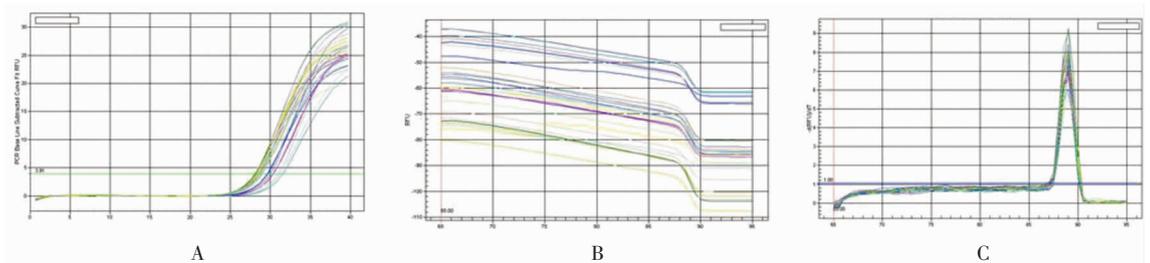
a: 与正常组比较 $P < 0.05$; b: 与 CA 初发组比较, $P < 0.05$



A: 扩增曲线; B: 熔解曲线; C: 熔解峰图

图 3 CA 组和对照组内参基因(β -actin)扩增曲线、熔解曲线和熔解峰图

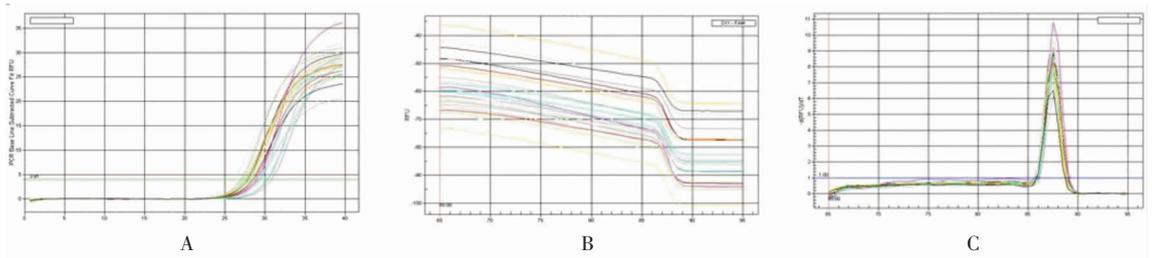
Figure 3 Diagram of amplification curve, melting curve, and melting peak of β -actin in CA group and control group



A: 扩增曲线; B: 熔解曲线; C: 熔解峰图

图 4 CA 组和对照组 Foxp3 基因扩增曲线、熔解曲线和熔解峰图

Figure 4 Diagram of amplification curve, melting curve, and melting peak of Foxp3 in CA group and control group



A: 扩增曲线; B: 熔解曲线; C: 熔解峰图

图 5 CA 组和对照组 ROR γ t 基因扩增曲线、熔解曲线和熔解峰图Figure 5 Diagram of amplification curve, melting curve, and melting peak of ROR γ t in CA group and control group

3 讨论

CA 患者存在局部和全身细胞免疫异常,包括 T 细胞、NK 细胞(自然杀伤细胞)的异常以及细胞因子失衡等^[10],且随着病情的反复及病程延长,细胞免疫功能降低更明显^[3],说明细胞免疫功能抑制在 CA 的发病及复发中扮演重要的角色。

Treg 细胞是 CD4⁺ T 细胞的新亚群,在维持机体免疫自稳、调控免疫应答方面起重要作用,在一些病毒感染性疾病中 Tregs 起着非常重要的平衡作用,一方面可以抑制过度免疫反应造成的组织损伤,另一方面还可抑制宿主对某些病原体感染时发挥有效的保护性免疫反应,不利于宿主对病原体的清除。Foxp3 是目前公认的 Tregs 最特异的分子标记,也是其生长发育和发挥抑制功能的关键^[11]。本研究结果显示,CA 患者外周血 Treg 细胞比例、Foxp3 mRNA 表达水平较对照组高,复发患者高于初发患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与文献^[12-13]研究结果一致。笔者推测 HPV 感染可诱导 Treg 细胞活化和增殖,抑制宿主对 HPV 的特异性细胞免疫反应,不利于宿主对 HPV 的清除,导致了 HPV 的持续感染。

Th17 细胞是近年来发现的一种 CD4⁺ T 细胞亚群,主要分泌 IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22 等炎症细胞因子,促进中性粒细胞的动员、募集和活化,介导促炎症反应,在感染性疾病、自身免疫性疾病和肿瘤的病理过程中发挥重要作用^[14]。ROR γ t 是维甲酸相关孤儿核受体家族成员之一,在 IL-6 与 TGF- β 协同作用下,可诱导 Th17 细胞生成,是 Th17 细胞特异性的转录因子。本研究结果显示,CA 患者外周血 Th17 细胞比例、ROR γ t mRNA 表达水平低于正常对照组,复发患者 Th17 细胞比例

低于 CA 初发患者,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$),与孙广政^[15]的研究结果一致,但与翁智胜等^[16]的研究不同。笔者推测 CA 患者 Th17 细胞比例及 ROR γ t mRNA 表达水平降低,使机体抑制 HPV 病毒复制的能力下降,导致机体出现免疫抑制,不能有效清除 HPV 病毒。尽管目前研究结果不一致,但都认为 Th17 细胞可能与 CA 的发生、发展及复发有关,但具体机制尚有待进一步研究。

Treg 细胞与 Th17 细胞之间存在复杂的相关性,分化上密切相关,功能上相互拮抗,生理情况下 Treg 细胞与 Th17 细胞处于平衡状态,维持机体免疫功能的平衡与稳定,TGF- β 和 IL-6 在这一平衡中起到关键的作用。当感染存在时,TGF- β 联合 IL-6 共同促进 Th17 细胞分化;感染清除后,IL-6 表达下降,TGF- β 可促进 Treg 细胞的分化。本研究结果还显示,CA 患者外周血 Treg/Th17 细胞比值高于正常对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明 CA 患者外周血存在 Treg/Th17 细胞失衡,其平衡向 Treg 细胞方向偏移。Treg 细胞比例升高,导致机体免疫抑制和免疫无能,同时抑制 Th1 和 Th2 分化,从而负向调节 Th1 和 Th2 介导的细胞毒性 T 细胞活化、免疫应答及炎症反应;Th17 细胞降低,会减弱机体对炎症因子和趋化因子级联反应等,从而导致 HPV 病毒持续感染。进一步分析发现,CA 复发患者 Treg/Th17 比值高于 CA 初发患者,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示 CA 复发患者 Treg/Th17 平衡紊乱更显著,表明 Treg/Th17 细胞平衡紊乱与 CA 复发有关,并可能在 CA 复发机制中起重要作用。

综上所述,CA 患者存在 Treg/Th17 细胞失衡,复发患者 Treg/Th17 细胞失衡更显著,Treg/Th17 细胞失衡在 CA 发病及复发机制中可能起重要作用,临床上可通过恢复 Treg/Th17 细胞之间平

衡,促进 HPV 病毒的清除,减少 CA 的复发。本实验结果对传统的 CA 患者 Th1/Th2 失衡理论进行了补充,但 Th17、Treg 与 Th1、Th2 细胞之间如何进行调节以及与感染 HPV 亚型的相关性还有待进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 梁齐飞, 王晓, 汤希凡, 等. 尖锐湿疣亚临床感染转归与局部 T 淋巴细胞亚群检测[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2016, 30(1): 44-46.
- [2] Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, et al. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(6): 1271-1285.
- [3] 曹嘉力, 何焱玲, 张秀英. 尖锐湿疣患者 HPV 感染与细胞免疫功能的相关性[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2012, 26(5): 383-385.
- [4] Shi YJ, Yang J, Yang W. Mechanistic investigation of immunosuppression in patients with condyloma acuminata[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(2): 480-486.
- [5] 陈金兰, 许仕军. 超脉冲 CO₂ 激光联合胸腺肽治疗尖锐湿疣的疗效及机制分析[J]. 中国性科学, 2015, 24(7): 55-58.
- [6] 涂权梅, 吕杰强, 陈小鸣, 等. 复发与未复发女性尖锐湿疣患者 Th1/Th2 细胞因子检测[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23(8): 498-499.
- [7] Zhao J, Ma J, Zhang X, et al. Equilibrium of Treg/Th17 cells of peripheral blood in syphilitic patients with sero-resistance

[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(6): 2300-2304.

- [8] Geng X, Xue J. Expression of Treg/Th17 cells as well as related cytokines in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Pak J Med Sci*, 2016, 32(5): 1164-1168.
- [9] 中华人民共和国卫生行业标准. 尖锐湿疣诊断标准及处理原则: WS 235-2003 [S]. 北京, 2003: 1-6.
- [10] 任荣鑫, 郑和义. 尖锐湿疣局部免疫功能抑制及其机制的研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2014, 28(2): 200-201, 204.
- [11] Haque R, Lei F, Xiong X, et al. The regulation of Foxp3-expressing regulatory T cells[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2011, 11(4): 334-346.
- [12] 王剑磊, 王琪, 徐宏俊, 等. 尖锐湿疣患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的检测及其与 HPV 亚型的相关性[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2014, 28(6): 560-562, 566.
- [13] 张慧, 王丽. 尖锐湿疣患者外周血辅助性 T 细胞 17/调节性 T 细胞的检测及其临床意义[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(1): 43-44.
- [14] 戴超, 李向培. 系统性红斑狼疮 Th17 细胞分子调控机制研究进展[J]. 安徽医药, 2016, 20(5): 817-820.
- [15] 孙广政. 尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒感染与调节性 T 淋巴细胞和辅助性 T 细胞 17 的关系[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(9): 4069-4071.
- [16] 翁智胜, 李晓辉, 彭洁雯, 等. 尖锐湿疣患者外周血中 Th17 细胞及 IL-17 的检测[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2013, 20(5): 327-330.

(本文编辑:左双燕)