

分类号：
学 号：20222114028

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



Tfh、Bregs 及 KL-6 在饲鸽者肺纤维化中临床诊断的应用研究

学 位 申 请 人	张文文
指 导 教 师	刘冬
申 请 学 位 类 别	专业硕士
专 业 名 称	临床医学
研 究 领 域	内科学
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2025 年 5 月

分类号：
学 号：20222114028

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



Tfh、Bregs 及 KL-6 在饲鸽者肺纤维化中临床诊 断的应用研究

学 位 申 请 人	张文文
指 导 教 师	刘冬
申 请 学 位 类 别	专业硕士
专 业 名 称	临床医学
研 究 领 域	内科学
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2025 年 5 月

**An applied study of Tfh, Bregs and KL-6 in the clinical
diagnosis of pulmonary fibrosis in pigeon breeders' lung**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Clinical Medicine

By

Zhang Wen-wen

(Internal Medicine)

Dissertation Supervisor: Liu Dong

May, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：张 文 文

时间： 2025 年 05 月 20 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：张 文 文

时间： 2025 年 05 月 20 日

导师签名：刘 冬

时间： 2025 年 05 月 20 日

摘要

目的: 通过对滤泡辅助性 T 细胞 (Tfh)、调节性 B 细胞 (Bregs) 及血清涎液化糖链抗原-6 (KL-6) 在饲养者肺 (PBL) 患者中的研究, 探讨 Tfh、Bregs 及 KL-6 在饲养者肺疾病临床诊断的应用价值, 为其病情判断、治疗提供理论依据。

方法: 根据纳入、排除标准收集 2023 年 5 月至 2024 年 10 月于石河子大学第一附属医院及新疆维吾尔自治区人民医院就诊的符合诊断标准的饲养者肺患者 40 例 (其中 20 例为非纤维化型、20 例为纤维化型) 作为病例组分为非纤维化组和纤维化组, 并且根据性别、年龄匹配同期于本院体检的健康人群 20 例作为对照组。运用流式细胞术检测各组 Tfh 细胞与 Bregs 细胞的百分比, 并收集各组白细胞计数 ($\times 10^9/L$)、淋巴细胞百分比 (%)、淋巴细胞计数 ($\times 10^9/L$)、嗜酸性粒细胞百分比 (%)、C 反应蛋白 (mg/L)、血沉 (mm/h)、KL-6 (U/ml)、 PO_2 (mmHg) 及肺功能的相关指标 (FVC%pred、FEV1%pred、FEV1/FVC、DLCO%pred)。并通过组间比较总结归纳三组之间一般资料、临床特点及相关临床指标水平的差异有无统计学意义, 使用 Spearman 相关性分析非纤维化组与纤维化组两组组内 KL-6 与 PO_2 、FEV1/FVC、FVC%pred、FEV1%pred、DLCO%pred、Tfh、Bregs 的相关性; 采用二元 Logistic 回归分析法分析 PBL 患者发生纤维化的影响因素; 采用 ROC 曲线评价显著指标对 PBL 患者发生纤维化的诊断价值。

结果:

1. 经流式细胞术检测 PBL 纤维化组的 Tfh 明显高于其余两组, 且 PBL 非纤维化组高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PBL 纤维化组的 Bregs 低于 PBL 非纤维化组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);

2. 使用 Spearman 相关性分析纤维化组中, KL-6 与 DLCO%pred、Bregs 均存在显著负相关性 ($P < 0.05$), Spearman 相关系数分别为 -0.450、-0.465;

3. 多因素二元 Logistic 回归分析得出 KL-6 ($OR = 1.004$, 95%CI: 1.001-1.007)、Tfh ($OR = 3.447$, 95%CI: 1.115-10.653) 是 PBL 患者发生纤维化的独立危险因素;

4. ROC 曲线分析得出单个指标中 KL-6 的 AUC 为 0.814, 灵敏度 85.0%, 特异度 75.0%; 预测模型 Tfh+Bregs+KL-6 的 AUC 为 0.918, 灵敏度 80.0%, 特异度 95.0%。

结论: 1. Tfh、Bregs、KL-6 可能与饲养者肺纤维化的发生相关, 饲养者肺患者的 KL-6、Tfh 水平越高, 提示发生纤维化的可能性越大; 2. KL-6 水平与肺功能指标中 DLCO%pred 呈负相关, KL-6 水平越高, DLCO%pred 越低, 肺弥散功能越差; 3. Tfh 联合 Bregs 与 KL-6 对于诊断 PBL 纤维化有一定的价值。

关键词: 饲养者肺; 过敏性肺炎; 滤泡辅助性 T 细胞; 调节性 B 细胞; 涎液化糖链抗原-6

Abstract

Objective: Through the study of follicular helper T cells (Tfh), regulatory B cells (Bregs) and serum krebs von den lungen 6 (KL-6) in pigeon breeders' lung (PBL) patients, we explored the application value of Tfh, Bregs and KL-6 in the clinical diagnosis of pigeon breeders' lung disease, in order to provide a theoretical basis for its condition determination and treatment.

Methods: According to the inclusion and exclusion criteria, 40 pigeon-feeders' lung patients (20 non-fibrotic and 20 fibrotic) who met the diagnostic criteria were collected from the First Affiliated Hospital of Shihezi University and the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region from May 2023 to October 2024, and were divided into non-fibrotic and fibrotic groups, with 20 healthy people who underwent medical examination in our hospital at the same time according to gender and age as the control group. Flow cytometry was used to detect the percentage of Tfh cells and Bregs cells in each group, and leukocyte count ($\times 10^9/L$), lymphocyte percentage (%), lymphocyte count ($\times 10^9/L$), eosinophil percentage (%), C-reactive protein (mg/L), haematological sedimentation (mm/h), KL-6 (U/ml), PO_2 (mmHg) and relevant indexes of pulmonary function were collected in each group (FVC%pred, FEV1%pred, FEV1/FVC, DLCO%pred). The differences in general information and clinical characteristics and the levels of relevant indicators among the three groups were summarised by intergroup comparison, and the factors associated with the development of PBL fibrosis were explored using logistic regression analysis. Spearman's correlation was used to analyse the correlation between KL-6 and PO_2 , FEV1/FVC, FVC%pred, FEV1%pred, DLCO%pred, Tfh and Bregs in the non-fibrotic and fibrotic groups; binary logistic regression analysis was used to analyse the factors influencing the occurrence of fibrosis in patients with PBL; the diagnostic value of significant indicators for the occurrence of fibrosis in patients with PBL was evaluated using the receiver operator characteristic (ROC) curve.

Results:

1. Tfh was significantly higher in the PBL fibrosis group than in the remaining two groups as detected by flow cytometry, and in the PBL non-fibrosis group the levels were greater compared to the control group, showing a statistically significant difference ($P<0.05$); Bregs in the PBL fibrosis group was lower than that in the PBL non-fibrosis group, showing a statistically significant difference ($P<0.05$).

2. Using Spearman's correlation analysis of the fibrosis group, the difference in the percentage of KL-6 and DLCO%pred, and Bregs were significantly negatively correlated ($P<0.05$), with Spearman correlation coefficients of -0.450 and -0.465, respectively.

3. Multifactorial binary logistic regression analyses yielded a significant negative correlation between KL-6 ($OR=1.004$, 95% CI : 1.001-1.007), Tfh ($OR=3.447$, 95% CI : 1.115-10.653) were independent risk factors for the development of fibrosis in PBL patients.

4. ROC curve analysis yielded an AUC of 0.814, sensitivity of 85.0%, and specificity of 75.0% for KL-6 among the individual metrics, and an AUC of 0.918, sensitivity of 80.0%, and specificity of 95.0% for the predictive model Tfh+Bregs+KL-6.

Conclusion: 1. Tfh, Bregs, KL-6 may be related to the occurrence of pulmonary fibrosis in pigeon feeders, the higher the levels of KL-6 and Tfh in pigeon feeders' lung patients, the higher the possibility of fibrosis; 2. The level of KL-6 is negatively correlated with the DLCO%pred in the index of lung function, the higher the level of KL-6 and the lower the DLCO%pred. The lower the DLCO%pred, the worse the lung diffusion function; 3. Tfh combined with Bregs and KL-6 has a certain value for diagnosing fibrosis in PBL.

Key words: pigeon breeders' lung; hypersensitivity pneumonitis; follicular helper T cells; regulatory B cells; krebs von den lungen 6

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
中英文缩略词表.....	VI
第1章 前言.....	1
第2章 材料与方法.....	4
2.1 研究对象.....	4
2.1.1 纳入标准.....	4
2.1.2 诊断标准.....	4
2.1.3 排除标准.....	4
2.2 研究方法.....	5
2.2.1 一般资料.....	5
2.2.2 实验室检测相关指标的收集.....	5
2.2.3 实验试剂及实验仪器.....	5
2.2.4 流式细胞仪检测各组外周血中 Tfh 及 Bregs 的比例.....	5
2.2.5 KL-6 的测定.....	6
2.2.6 肺功能测定.....	6
2.2.7 HRCT 结果判读.....	7
2.2.8 统计学方法.....	7
2.2.9 技术路线图.....	7
第3章 结果.....	9
3.1 一般临床资料分析.....	9
3.1.1 三组间一般资料分析.....	9
3.1.2 三组间实验室检查结果分析.....	10
3.1.3 非纤维化组与纤维化组 KL-6 与其他指标的相关性分析.....	11
3.1.4 二元 Logistic 回归分析 PBL 发生纤维化的相关因素.....	12
3.1.5 ROC 曲线分析显著变量对 PBL 纤维化的诊断价值.....	13
3.2 Tfh 及 Bregs 在 PBL 患者及对照组外周血的百分比.....	15
3.2.1 Tfh 在 PBL 患者及对照组外周血的百分比.....	15
3.2.2 Bregs 在 PBL 患者及对照组外周血的百分比.....	16
第4章 讨论.....	18
第5章 结论.....	24

第 6 章 文献综述	25
6.1 前言	25
6.2 过敏性肺炎的流行病学	26
6.3 过敏性肺炎的 HRCT 影像特征	26
6.4 过敏性肺炎的临床特征	27
6.5 T 细胞在过敏性肺炎中的应用	27
6.6 B 细胞在过敏性肺炎中的应用	28
6.7 T 细胞与 B 细胞在过敏性肺炎中的共同作用	28
6.8 结语	29
参考文献	30
致谢	38
作者简介	39
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表	40

中英文缩略词表

英文缩写	英文名称	中文名称
PBL	pigeon breeders' lung	饲鸽者肺
HP	hypersensitivity pneumonitis	过敏性肺炎
ILD	interstitial lung disease	间质性肺疾病
Tfh	T follicular helper cell	滤泡辅助性 T 细胞
Bregs	regulatory B cells	调节性 B 细胞
KL-6	krebs von den lungen 6	涎液化糖链抗原-6
BMI	body mass index	体质指数
FVC%pred	forced vital capacity as a percentage of the expected value	用力肺活量占预计值的百分比
FEV1%pred	forced expiratory volume in 1 second as a percentage of the expected value	一秒用力呼气容积占预计值的百分比
FEV1/FVC	forced expiratory volume in 1 second / forced vital capacity	一秒用力呼气容积与用力肺活量的比值
DLCO%pred	diffusing capacity of the lung for carbon monoxide as a percentage of the expected value	一氧化碳弥散量
CRP	c-reactive protein	C 反应蛋白
ESR	erythrocyte sedimentation Rate	红细胞沉降率
TLS	tertiary lymphoid structures	三级淋巴结构

第 1 章 前言

Introduction

饲鸽者肺 (pigeon breeders' lung, PBL) 是敏感个体反复吸入鸽子羽毛、皮屑等脱落物蛋白后诱发的肺部炎症反应性疾病, 是外源性过敏性肺泡炎 (extrinsic allergic alveolitis, EAA) 或过敏性肺炎 (hypersensitivity pneumonitis, HP) 的一种^[1]。过敏性肺炎是以 III 型和 IV 型超敏反应为特征的一种免疫介导性疾病, 属于间质性肺疾病 (interstitial lung disease, ILD) 的一种。暴露于鸽子粪便、羽毛、皮屑中的抗原会引发 III 型免疫复合物介导的超敏反应以及肺泡巨噬细胞和 T 淋巴细胞的激活, 从而导致炎症反应, 这可能是过敏性肺炎的致病机制^[2]。饲鸽者肺发病与个体易感性和环境抗原暴露有关, 其临床表现、严重程度和自然病程具有高度异质性^[3]。尽管致病机制尚不明确, 但在过敏性肺炎患者的系列研究中表明, 鸽子或其他鸟类已占致病暴露原的 34-81%^[4-6]。有研究表明, 饲养鸽子者最终发展至饲鸽者肺的比例在 0-10% 之间^[7], 定期高剂量的鸟类抗原暴露后, 致敏率可能高达 32%^[8], 且与当地气候、医疗服务供应、环境、习俗、吸烟习惯以及接触强度和时间的长短有关^[9]。饲鸽者常常因“咳嗽咳痰、胸闷气短”等症状多次就诊于当地医院, 因其症状不典型, 常被误诊其他常见的肺部疾病, 导致迁延病程, 继续暴露于致病抗原环境中, 最终出现肺间质纤维化、慢性呼吸衰竭、肺源性心脏病等慢性疾病^[10], 严重影响患者的身心健康, 给家庭也带来了极大的经济负担。

目前认为过敏性肺炎最初由 III 型超敏反应介导, 而后转向 IV 型超敏反应。急性 HP 患者既往常有明确的职业暴露或接触特定致敏原的病史, 当患者再次吸入相同的致敏原时, 先天免疫细胞会将加工的抗原呈递给 B 淋巴细胞, 促使 B 细胞产生免疫球蛋白, 在肺泡间与抗原结合形成免疫复合物, 进而通过经典途径激活补体, 促进炎性细胞与渗出液在肺泡间质积聚, 引发局部炎症反应。在 HP 的发病过程中, IV 型超敏反应同样起着重要作用。T 淋巴细胞和巨噬细胞参与的免疫反应会导致肉芽肿的形成以及间质纤维化的出现^[11]。随着 HP 病情的持续发展, 纤维化型 HP 患者即使完全避免暴露源, 也可能演变为进行性表型。

过敏性肺炎中的 IV 型超敏反应是以 T 细胞介导的迟发型免疫应答为核心, 已有研究证明了 T 淋巴细胞中的 CD4⁺T 细胞与 HP 的发生发展密切相关^[12]。虽然早有研究表明, B 细胞介导的体液免疫应答主要受经典 CD4⁺T 细胞亚群 (如 Th2) 的直接调控。然而, 近几年研究成果显示出, 一种定位于淋巴滤泡的滤泡性 CD4⁺T 淋巴细胞-滤泡辅助性 T 细胞 (T follicular helper cell, Tfh) 在调控 B 细胞功能中的核心作用: 这类特异

性表达 CXC 趋化因子受体 5 (CXCR5)、诱导共刺激分子 (ICOS)、程序性死亡受体 -1 (PD-1)、B 细胞淋巴瘤-6 (BCL-6) 和 IL-21 表面标记的 CD4+ T 细胞亚群 (Tfh)，在多因素的共同作用下定位于生发中心 (germinal center, GC)，成为驱动 B 细胞抗体亲和力的成熟及记忆性 B 细胞生成的关键调控者^[13]。而缺少 Tfh 辅助的低亲和力 B 淋巴细胞则在接受抗原递呈后于 24 小时内死亡^[14]。目前已经通过大量实验证实，Tfh 的异常会引起免疫系统的紊乱，与多种疾病的发生有关，如过敏、自身免疫性疾病（系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、系统性硬化症等）、动脉粥样硬化、慢性移植物抗宿主病、肿瘤（乳腺癌、结直肠癌、黑色素瘤等）、感染性疾病（HIV、结核病等）等^[15]。

Tfh 分泌的细胞因子 IL-21 通过激活 JAK/STAT3 和 AKT 信号通路，进而调节参与 B 细胞的增殖、抗体的分泌以及细胞因子的表达^[16]。传统的免疫学观点一直以来将 B 淋巴细胞的功能归纳为两大核心作用：其一，通过抗原呈递及抗体分泌介导体液免疫应答，即 B 细胞在抗原刺激下终末分化为浆细胞，合成分泌高亲和力抗体以清除病原体；其二，通过分泌 IL-6、TNF- α 等促炎因子，参与固有免疫细胞（如巨噬细胞、树突状细胞）的活化调控。基于此，B 细胞在适应性免疫应答中长期被视为有着“正向”的调节作用。直到在 1974 年 Ruth Neta 等学者通过建立的小鼠迟发型超敏反应 (DTH) 模型首次观察到，特定 B 细胞亚群可通过分泌抑制性因子显著减弱 T 细胞介导的炎症反应，由此提出了“抑制性 B 细胞” (suppressor B cells) 的概念，表明了 B 细胞在免疫调节中的负向调控的可能^[17]。这一突破性发现并未立即获得广泛关注，直至 1996 年 Susan D. Wolf 团队在实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 模型中发现：与对照组相比 B 细胞缺陷小鼠的疾病发作、严重程度，尤其是恢复情况存在显著差异，在没有 B 细胞的情况下其很难恢复至正常水平，提示 B 细胞可能在炎症反应中发挥一定的抑制作用，为抑制性 B 细胞的功能研究奠定了实验基础^[18]。在之后的研究中发现，类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病患者的外周血及靶器官浸润淋巴细胞中，均存在一类高表达 IL-10、TGF- β 等抑制性细胞因子的 B 细胞亚群，通过抑制 T 细胞和其他免疫细胞的活化，减少炎症反应的发生，从而缓解组织的炎症损伤。基于上述发现，国际免疫学会联盟 (IUIS) 于 2002 年正式将此类具有免疫抑制功能的 B 细胞命名为“调节性 B 细胞” (regulatory B cells, Bregs)，Bregs 的功能异常已被证实与多种病理过程密切相关，Bregs 在自身免疫和移植物排斥反应中抑制炎症反应的作用已得到一致证明，而最近的研究中表明 Bregs 在其他免疫相关疾病中亦有作用，例如感染性疾病、过敏反应、癌症和慢性代谢性疾病^[19]。

目前，血清涎液化糖链抗原-6 (krebs von den lungen 6, KL-6) 作为间质性肺病的辅助诊断工具，已成为临床研究的热点^[20]。KL-6 是一种具有高分子量的糖蛋白，属于跨膜黏蛋白 MUC1 家族之一，最初发现于肺腺癌患者中，在之后的研中究进一步揭示了在肺纤维化患者中 KL-6 的水平升高，不仅有助于早期识别肺纤维化，更是与疾病的进

展、预后及治疗效果密切相关^[21]。研究表明，KL-6 水平的变化与肺纤维化患者的临床症状和影像学改变密切相关^[22]。此外，KL-6 也被用于评估其他肺部疾病的严重程度，如急性呼吸窘迫综合征（ARDS）^[23]和慢性阻塞性肺疾病（COPD）^[24]。经临床实践证实，在特发性肺纤维化（IPF）、过敏性肺炎^[25]、结节病、特发性间质性肺炎（IIP）^[26]及结缔组织病相关间质性肺病（CTD-ILD）等多种弥漫性肺实质疾病中，KL-6 可作为其活动性评估的标志物，成为量化评估肺组织炎症与纤维化进程的重要生物标志物。尽管 KL-6 在临床诊断中的应用前景广阔，但其确切的生物学功能以及在疾病中的作用机制仍需进一步深入研究。当肺泡基底膜损伤时可触发肺泡 II 型上皮细胞（AT2）代偿性增生反应，由于 KL-6 作为该细胞膜表面特异性表达的糖蛋白分子，伴随着 AT2 的增生，KL-6 表达水平在此过程中呈现显著上调^[27]。与此同时，病理状态下肺泡毛细血管屏障发生通透性改变，致使 KL-6 通过受损的血管内皮进入外周循环系统入血^[28]。在间质性肺疾病的病理过程中，II 型肺泡上皮细胞功能障碍的一个表现就是血清中 KL-6 水平的上升。

由以上研究可知 Tfh 参与体液免疫的调节，对 B 细胞的分化起重要辅助作用，调控 B 细胞分化和自身抗体的产生，其过度的辅助会导致免疫反应的发生。Bregs 在维持免疫稳态和调节炎症反应中起着关键作用，通过分泌 IL-10 和 TGF- β 等抗炎细胞因子，抑制过度的免疫反应，从而保护组织免受损伤。鉴于 Tfh 和 Bregs 在免疫调节中的重要作用，以及它们在多种肺部疾病中的异常表达，我们推测 Tfh 与 Bregs 之间可能存在某种关联，共同参与了饲养者肺纤维化的发病过程，KL-6 作为特异的血清学标志物在肺纤维化中也起到了一定作用。我们针对非纤维化及纤维化型饲养者肺，开展了 Tfh、Bregs、KL-6 在饲养者肺纤维化中的相关性研究，以期能够发现他们对于 PBL 纤维化的临床诊断的应用价值，为早期发现诊断纤维化型 PBL 提供理论依据，为患者制定个体化的干预策略提供帮助。

第2章 材料与方法

Materials and methods

2.1 研究对象

2.1.1 纳入标准

根据纳入、排除标准收集 2023 年 5 月至 2024 年 10 月于石河子大学第一附属医院及新疆维吾尔自治区人民医院就诊的符合诊断标准的 PBL 患者 40 例（其中 20 例为非纤维化型、20 例为纤维化型）作为病例组，并且根据性别、年龄匹配同期于本院体检的健康人群 20 例作为对照组。所有研究对象均具有独立行为能力并已经签署知情同意书。且本研究已通过石河子大学第一附属医院科技伦理委员会审查，伦理审查号：KJ2023-430-01。

2.1.2 诊断标准

- （1）目前 PBL 的诊断标准主要参照 2020 年 ATS/JRS/ALTA 制定的成人过敏性肺炎的指南^[29]。
- （2）病例组均存在明确鸽子接触史。

2.1.3 排除标准

- （1）临床上已确诊的结节病、特发性肺纤维化、结缔组织相关 ILD、药物相关性 ILD、尘肺等其他类型的 ILDs、肺部恶性肿瘤、肺结核、自身免疫性疾病等患者；
- （2）已确诊为慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘、支气管扩张及其它可能影响检测值的患者；
- （3）近 30 天内存在急性感染性疾病的患者；
- （4）近 30 天内有抗生素类药物使用的患者；
- （5）对照组研究对象有职业性或环境性致敏原接触史、呼吸系统器质性病变及胸部影像学明显异常者。

2.2 研究方法

2.2.1 一般资料

采集符合入选标准的研究对象的一般临床资料包括人口学特征（性别、年龄）、吸烟史、体重指数（BMI）、临床表现（发热、咳嗽咳痰、呼吸困难）、抗原暴露史及具体接触鸽子的年限。

2.2.2 实验室检测相关指标的收集

通过查询病历系统获取以下多项相关研究指标包括：白细胞计数（ $\times 10^9/L$ ）、淋巴细胞百分比（%）、淋巴细胞计数（ $\times 10^9/L$ ）、嗜酸性粒细胞百分比（%）、C反应蛋白（mg/L）、血沉（mm/h）、KL-6（U/ml）、 PO_2 （mmHg）等，并对结果进行统计分析。

2.2.3 实验试剂及实验仪器

表 2-1 主要仪器设备实验试剂及生产厂家

Table 2-1 Main Instruments and Equipment Experimental Reagents and Manufacturers

使用仪器设备及试剂	生产厂家
BD FACSLytic 流式细胞仪	美国 BD 公司
医用超低温保存箱	日本 Panasonic
离心机	山东 BIOBASE
Lysing Buffer	美国 BD 公司
Phosphate Buffered Saline (PBS)	美国 BD 公司
CD4 FITC 荧光单克隆抗体试剂	美国 BD 公司
CD185 PE 荧光单克隆抗体试剂	美国 BD 公司
CD279 BV605 荧光单克隆抗体试剂	美国 BD 公司
CD19 PE-Cy7 荧光单克隆抗体试剂	美国 BD 公司
CD38 FITC 荧光单克隆抗体试剂	美国 BD 公司
CD24 AF647 荧光单克隆抗体试剂	美国 BD 公司

2.2.4 流式细胞仪检测各组外周血中 Tfh 及 Bregs 的比例

使用 EDTA-K2 抗凝管收集完成各组新鲜外周静脉血 4ml 后，及时完成流式细胞检测，避免超过 6 小时。

Tfh 检测步骤:

- (1) 取外周静脉血 200ul, 加 1ug 相应预混好的抗体 (CD4 FITC、CD185 PE、CD279 BV605), 震荡混匀, 避光孵育 15min;
- (2) 加 2ml Lysing Buffer (BD 溶血素), 震荡混匀, 避光孵育 8-10min;
- (3) 以 1500 rpm 离心 5min;
- (4) 弃去上清液, 加 2ml PBS (鞘液) 重悬;
- (5) 以 1500 rpm 再次离心 5min;
- (6) 弃去上清液, 加 200ul PBS 重悬, 上机。

Bregs 检测步骤:

- (1) 取外周静脉血 200ul, 加入 1ug 相应预混好的抗体 (CD19 PE-Cy7、CD38 FITC、CD24 AF647), 震荡混匀, 避光孵育 30min;
- (2) 加入 BD 溶血素 2ml, 震荡混匀, 室温避光孵育 8-10min;
- (3) 以 1500 rpm 离心 5min;
- (4) 弃去上清液, 加入 2ml PBS, 震荡混匀;
- (5) 以 1500 rpm 再次离心 5min;
- (6) 弃去上清液, 加入 200-300ul PBS, 震荡混匀, 上机。

最后进行数据分析: 使用 FlowJo 10 软件进行数据分析。

2.2.5 KL-6 的测定

各组的外周静脉血样本采集 4ml, 以 3000r/min 的速度离心 10min, 离心后取上清液至 -80 °C 超低温冰箱中进行保存。应用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清中 KL-6 水平。具体步骤如下: 血清样本按照规定的比例稀释, 将稀释的血清样本及标准品加入 ELISA 板的孔中, 随后加入相应抗体, 混匀后在 37°C 条件下孵育 1 小时; 孵育完成后, 重复洗板 5 次。加入底物反应试剂后, 在避光条件下孵育 15 分钟后加入终止液以终止反应进程, 在加入终止液后的 5 分钟时间窗内, 利用酶标仪对各孔在 450nm 波长的吸光值进行测定。

2.2.6 肺功能测定

各组均进行肺功能测定, 主要统计指标为: 用力肺活量 (forced vital capacity, FVC), 一秒用力呼气容积 (forced expiratory volume in 1 second, FEV1), 一秒用力呼气容积与用力肺活量的比值 (FEV1/FVC), 单次呼吸法测定的肺一氧化碳弥散量 (diffusing capacity of the lung for carbon monoxide, DLCO)。在进行肺功能指标判读时将 FVC 占正常预计值百分比 (FVC% pred) < 80%, 且 FEV1/FVC > 70% 作为判断限制性通气功能障碍的诊断标准; FVC% pred ≥ 80%, 且 FEV1/FVC < 70% 作为判断阻塞性通气功能