

布地奈德对嗜中性粒细胞性鼻息肉中 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的作用

蔺林¹ 戴飞¹ 魏瑾瑾¹ 陈峥¹

[摘要] 目的:探讨布地奈德对 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的影响,并评估其在嗜中性粒细胞性鼻息肉(NP)中的作用。方法:招募 8 例嗜中性粒细胞性 CRSwNP 患者,并予以布地奈德鼻喷剂治疗 3 个月。分别从正常鼻黏膜组织和 NP 中获取样本,进行体外培养,分别从正常鼻黏膜组织和 NP 中分离和提纯 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞,也进行体外培养。随后检测该 Treg 细胞培养液中转化生长因子-β(TGF-β)及其 mRNA 的含量。将体外培养的 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞加入 NP 培养液中,并对该组织培养液中髓过氧化物酶(MPO)和 IFN-γ 的浓度进行检测。结果:NP 中 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞所占 CD8⁺T 细胞的百分比比较正常黏膜组织有所降低,而布地奈德喷鼻治疗并未升高该 Treg 细胞的百分比,TGF-β 及其 mRNA 在该细胞培养液中的浓度高于正常黏膜组织来源的 Treg 细胞,CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞干预体外培养的 NP 后,组织培养液中 MPO 和 IFN-γ 的浓度较干预前降低。结论:CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞可以调节嗜中性粒细胞性 NP 中的炎症反应,而布地奈德的治疗对该细胞的作用有限。

[关键词] 中性粒细胞;鼻息肉;Treg 细胞;布地奈德

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.08.006

[中图分类号] R765.25 **[文献标志码]** A

The role of budesonide on CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells in neutrophilic nasal polyps

LIN Lin DAI Fei WEI Jinjin CHEN Zheng

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Huashan Hospital North of Fudan University, Shanghai, 201907, China)

Corresponding author: LIN Lin, E-mail: linlinhsn@aliyun.com

Abstract Objective: CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺regulatory T(Treg) cells are reduced in chronic rhinosinusitis with nasal polyps(CRSwNP). However, the role of these cells in nasal polyps(NP) has not been fully investigated. The aim of this study was to evaluate the influence of budesonide treatment on these cells and to assess their roles in neutrophilic NP. **Method:** Eight neutrophilic CRSwNP patients were enrolled and received budesonide nasal spray treatment for three months. Nasal samples were obtained from normal mucosa or NP and cultured in vitro. CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells were isolated and purified from normal or NP tissues and cultured in vitro. Then transforming growth factor-β(TGF-β) and its mRNA were examined in those cell cultures. After that, those cells were administered into NP cultures. Finally, the concentrations of myeloperoxidase(MPO) and interferon(IFN)-γ were evaluated in those tissue cultures. **Result:** CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells were decreased in NP compared to normal tissues. Budesonide treatment did not increase the percentage of those cells in NP. TGF-β and its mRNA were enhanced in CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cell cultures from NP versus those from normal tissues. In addition, levels of MPO and IFN-γ were reduced after CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells administration. **Conclusion:** These findings indicated that CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg cells may play a role in the regulation of neutrophilic inflammation, and budesonide treatment may not influence these Treg cells.

Key words neutrophils; nasal polyps; treg cells; budesonide

慢性鼻窦炎(chronic rhinosinusitis, CRS)的病理特点主要表现为黏膜内炎症细胞浸润、炎症因子增多、上皮损伤和组织重建^[1]。临床上常分为两型:CRS 不伴鼻息肉(chronic rhinosinusitis without nasal polyps, CRSsNP)和 CRS 伴有鼻息肉(chronic rhinosinusitis with nasal polyps, CRSw-

NP)^[2]。越来越多的证据表明,西方国家的 CRSwNP 患者有 65%~90% 表现为嗜酸粒细胞性炎症^[3],而东亚各国则以嗜中性粒细胞性炎症为主^[4]。

众所周知,T 细胞在调节免疫方面有着重要作用,而 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T(regulatory T, Treg)细胞在维持免疫耐受和免疫平衡方面更是不可或缺^[5]。最近有研究证实,CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞也具有抑制免疫系统活动的功

¹复旦大学附属华山医院北院耳鼻咽喉头颈外科(上海, 201907)

通信作者:蔺林, E-mail: linlinhsn@aliyun.com

能,但其机制还有待进一步研究^[6]。至于 CRSw-NP 的治疗,口服和局部用糖皮质激素仍是主要手段。但该类药物对嗜酸粒细胞性 NP 具有良好疗效^[7],而对嗜中性粒细胞性 NP 则疗效较差^[8],其机制尚不十分清楚。本研究旨在探讨局部用糖皮质激素布地奈德鼻喷剂对 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的影响,并评估上述细胞在嗜中性粒细胞性 NP 中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本课题为尝试性研究,研究时间为 2018-03—2019-02,研究期限为 3 个月(90 d)。正常鼻黏膜(相对于 NP 组织)来源于 15 例因鼻塞而行鼻中隔矫正和下鼻甲成形手术患者的下鼻甲黏膜,其中男 8 例,女 7 例;年龄 28~58 岁,中位年龄 41 岁。NP 组织来源于 8 例就诊于我院并行鼻内镜检查的 CRSwNP 患者,其中男 4 例,女 4 例;年龄 29~59 岁,中位年龄 38.5 岁。分别在治疗前就诊时和治疗后复诊时获取。CRSwNP 诊断标准依据 EPOS 2012(European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012)和中国 CRS 诊断和治疗指南(2018)^[2,9]。本研究中嗜中性粒细胞性 NP 患者均在入组前先行门诊活检,病理确诊后再进行下一步研究。所有患者在入组前至少 1 个月均未服用或局部用过任何药物;均接受包括屋尘螨和其他 12 种常见的呼吸道过敏原在内的皮肤点刺试验以评估其特异性状态。本研究阳性标准为皮肤表面风团面积 >7 mm²(直径 >3 mm),患者的检测结果均为阴性。排除哮喘的依据包括病史、体检和肺功能测试,其他排除标准包括变应性真菌性鼻窦炎、囊性纤维化、阿司匹林不耐受、免疫缺陷、Churg-Strauss 综合征、凝血功能障碍及孕妇等。本研究得到复旦大学附属华山医院伦理委员会的批准,患者均签署知情同意书。

1.2 干预方法

采用布地奈德鼻喷剂(32 μg/喷,浓度为 1.28 mg/mL),2 次/d,分别在早醒时和晚睡前,每次每侧鼻腔 2 喷,每日总剂量为 256 μg。

1.3 样品制备

获取的正常鼻黏膜和 NP 组织用于组织学分析、流式细胞仪检测及体外培养 3 个部分。

1.4 免疫荧光染色

部分标本用于免疫荧光染色,将制备好的组织切片与嗜酸粒细胞阳离子蛋白(eosinophil cation protein,ECP)或髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)单克隆抗体在室温下孵育过夜,磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)清洗 3 次,5 min/次,然后与结合了别藻蓝蛋白(allophycocyanin,APC)或异硫氰酸荧光素(fluorescein iso-

thiocyanate,FITC)的二抗在室温下黑暗中孵育 1 h,再将样品用含有 0.2% Triton X-100 的 PBS(PBS-T)洗涤 2 次,接着以浓度为 10 mg/mL 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)在室温下进行细胞核染色 5 min,再用 PBS-T 及 PBS 清洗,最后以防荧光淬灭剂封片,用徕卡激光扫描共聚焦显微镜(TCS SP5)拍照,图片分析用 LCS Lite 相关软件。细胞计数根据每高倍视野(×400)下细胞数目的平均值(3 次观察和计数),由两位对本项目完全不知情的研究者进行评估。

1.5 流式细胞仪检测

所获细胞悬液经过离心(200×g)10 min 处理后,将细胞浓度调成 5×10⁵/mL,细胞膜染色用抗 CD8 和 CD25 抗体,细胞内染色用 Foxp3 染色试剂盒,严格按照说明书的步骤完成操作,对 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞进行分离、提纯,其提纯效率 >95%,最后用流式细胞仪相关软件 FlowJo 对该 Treg 细胞所占 CD8⁺ T 细胞百分比进行分析,所得数据用 Becton Dickinson Cell Quest 软件进行分析。

1.6 细胞培养

CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞分离、提纯后,调成 5×10⁵ 个/孔进行体外培养,培养液中加入抗-CD3 抗体和 IL-2(1 000 IU/mL)。

1.7 器官培养

将正常鼻黏膜组织和 NP 组织进行体外器官培养^[10]。将组织在无菌条件下分割成 2~3 mm³ 的组织块,用含有 5 μg/mL 两性霉素 B 和 300 μg/mL 青霉素 G 的 PBS 清洗 3 次,以含有 10% 小牛血清和 20 μg/mL 的庆大霉素的 98% DMEM(Dulbecco's minimum essential medium)再清洗,接着加入 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞(5×10⁵ 个)(布地奈德治疗后),共孵育 1 h,然后将组织块放置到 1 cm×1 cm 的湿明胶海绵上,黏膜面或息肉面朝上,另一面朝下,明胶海绵放到含有 3 mL 培养液的 6 孔板上,使黏膜或息肉高于液面,6 孔板置入温度为 37 °C 和含有 5% CO₂ 空气的潮湿孵育箱中,并给予 24 h 的连续转动(转速为 15 r/min),最后收集组织上清液进行下一步试验。

1.8 ELISA 试验

收集 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞培养液上清液,以转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)ELISA 试剂盒检测其中 TGF-β 浓度;将组织块再次分割,并用 RIPA 裂解液分解,以 MPO ELISA 试剂盒和 IFN-γELISA 试剂盒检测组织培养液中 MPO 和 IFN-γ 的含量,上述试验操作严格按照说明书的步骤进行。

1.9 实时定量反转录聚合酶链反应

收集 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞培养液中细

胞成分,采用实时定量反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测其中 TGF- β mRNA 的含量。TGF- β 的引物由上海捷兰生物技术有限公司设计,上游引物:5'-GGACATCAACGGGTTCACTA-3',下游引物:5'-GCCATG AGAAGCAGGAAAG-3',内参 β -actin 上游引物:5'-CACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3',下游引物:5'-GTACAGGTCTTTGCGGATGT-3',方法是按照实时定量 RT-PCR 试剂盒所规定的实验步骤进行,实验所得数据用 Δ Ct 法表示。

1.10 统计学分析

运用 GraphPad Prism 6.0 统计学软件分析研究中所得数据,因为所得数据经检验呈非正态分布,所以用非参数检验方法进行分析。如果组间 Kruskal-Wallis 检验有统计学差异,则用 Mann-Whitney 检验对数据进一步分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例资料分析

本研究中,嗜中性粒细胞性 CRSwNP 患者中男女例数相当,且均为非特异性体质,说明 NP 组织可能以 I 型炎症反应为主。患者入组前 1 个月内也未应用局部或口服激素、抗组胺药及抗菌药,说明本研究受外界影响较小,误差相对较小。

2.2 不良反应

患者均对布地奈德鼻喷剂耐受较好,不良反应主要包括鼻出血 1 例,鼻内干燥感 2 例,鼻内刺激感 3 例,无严重不良反应发生。

2.3 组织中炎性细胞浸润情况

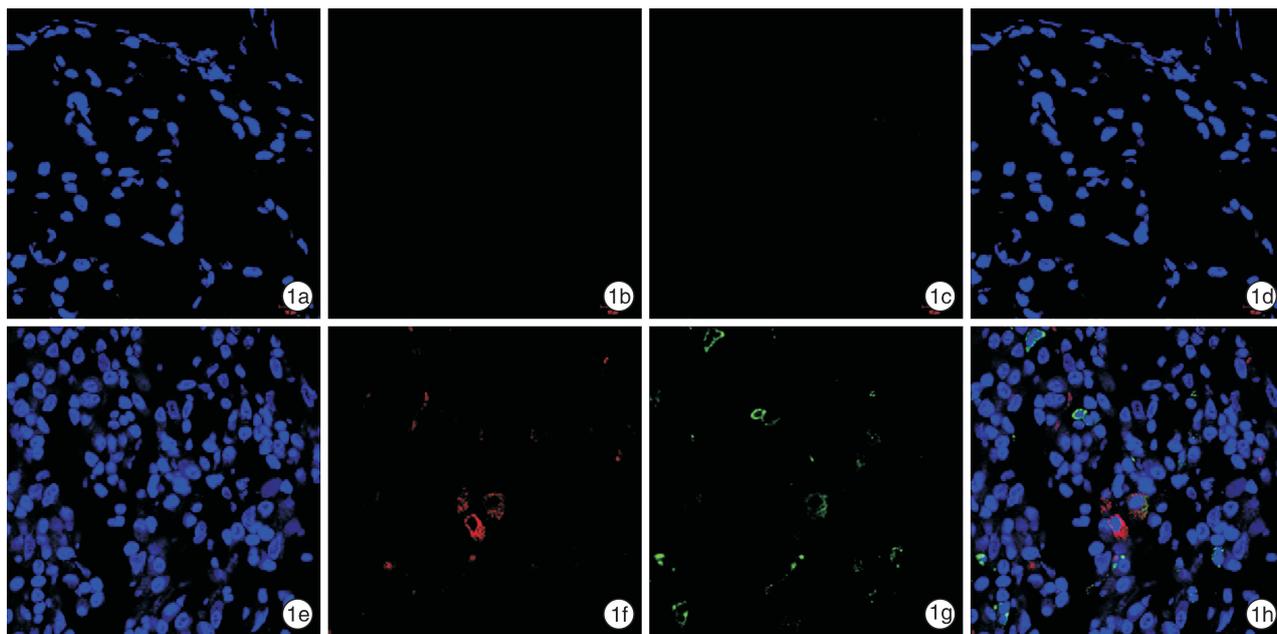
采用免疫荧光染色方法对正常鼻黏膜组织和 NP 组织中的 2 种细胞进行分析,结果表明,所有正常鼻黏膜组织标本中几乎未出现 2 种炎症细胞(图 1a~d),而所有 NP 标本中的 2 种细胞都有,但嗜酸粒细胞数均 < 10 个/高倍视野,而嗜中性粒细胞数均 > 10 个/高倍视野(图 1e~h),因此本研究中 NP 组织均属于嗜中性粒细胞性 NP^[11]。

2.4 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞所占 CD8⁺T 细胞百分比的变化

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞可以调节 Th1/Th2 免疫平衡,并削弱 Th1 细胞的活力^[5],但对于 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞功能的研究尚鲜有报道。本研究中笔者对该细胞在组织的 CD8⁺T 细胞中所占的百分比进行了检测,发现该 Treg 细胞在正常鼻黏膜中的比例显著高于嗜中性粒细胞性 NP(图 2a、b、d)($P < 0.001$),而布地奈德的干预没有明显增加 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的比例(图 2b~d)。

2.5 TGF- β 在 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞培养液中的表达

为了探讨 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的特点,笔者对该细胞培养液中 TGF- β 及其 mRNA 的浓度进行了检测,发现其含量在嗜中性粒细胞性 NP 中较正常组织中显著升高($P < 0.0001$),但布地奈德治疗后与治疗前相比,这些物质的浓度并未发生有统计学意义的改变(图 3a、b)。



1a~1d:正常鼻黏膜组织;1e~1h:鼻息肉组织;1b、c:未显示阳性染色细胞;1f、g:显示阳性染色细胞;红色荧光表示嗜酸粒细胞染色,绿色荧光表示嗜中性粒细胞染色,蓝色荧光表示 DAPI 染色($\times 400$)。

图 1 正常鼻黏膜和鼻息肉组织的免疫荧光染色

2.6 炎症因子在 NP 培养液中的表达

为了研究 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的功能,笔者将布地奈德治疗后的该 Treg 细胞加入 NP 培养液中,并对其中的 I 型炎症因子 MPO

和 IFN- γ 的浓度进行了检测。发现 MPO 和 IFN- γ 在 NP 中的表达显著上调(图 4a、b)($P < 0.0001$),布地奈德鼻喷剂治疗后,MPO($P < 0.05$)和 IFN- γ ($P < 0.01$)在 NP 培养液中的浓度显著下降。

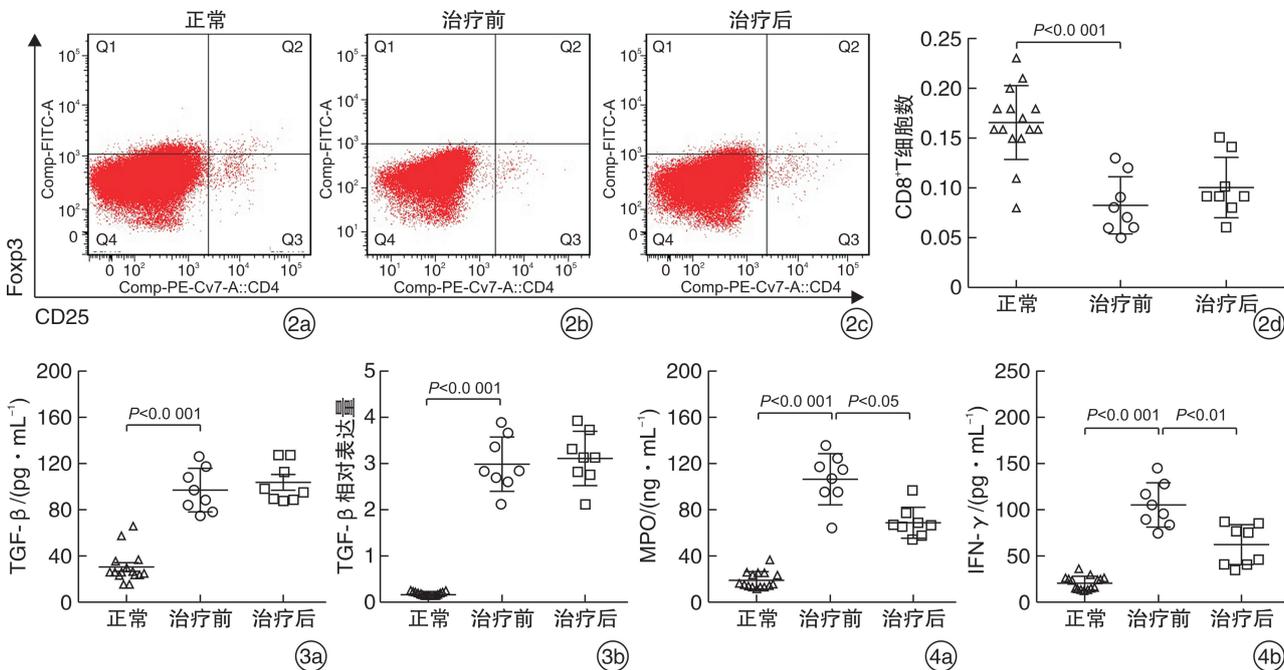


图 2 治疗前和治疗后 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞流式细胞仪检测 2a:正常鼻黏膜组织;2b:治疗前鼻息肉组织;2c:治疗后鼻息肉组织;2d:CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞所占百分比的比较; 图 3 治疗前和治疗后培养液中 TGF- β 浓度的比较 3a:TGF- β 蛋白的比较;3b:TGF- β mRNA 的比较; 图 4 治疗前和治疗后培养液中 MPO 和 IFN- γ 浓度的比较 4a:MPO 的比较;4b:IFN- γ 的比较。

3 讨论

嗜酸粒细胞性炎症主要存在于西方国家 CRSwNP 患者^[12],而东亚的患者主要表现为嗜中性粒细胞增多^[13]。该病严重影响人类生活质量,而且治疗比较棘手。据报道局部用糖皮质激素效果较佳而且安全,但诸多研究显示,其疗效不甚满意^[14]。该药物适合于嗜酸粒细胞性 NP,而嗜中性粒细胞性炎症据报道以低剂量大环内酯类抗菌药治疗较佳^[15],其机制尚待研究。

笔者之前的研究显示,布地奈德不能减轻嗜中性粒细胞性 CRSwNP 中的炎症反应,不能改善患者的临床症状,也不能减少 NP 中 CD8⁺ T 细胞百分比和 I 型炎症因子的浓度,更不能上调 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的比例,且未对 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的功能进行相关探讨。

CD8⁺ Treg 细胞首次被发现是在 1970 年^[16],但直到近些年才被鉴定出来,并发现该细胞具有抑制免疫系统的功能^[17]。一项关于前列腺癌的研究发现,CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞可以通过细胞直接接触的方式抑制初始 T 细胞的增殖^[18]。最近的一项研究证实,该 Treg 细胞在 CRSwNP 中减少,这种细胞数目的减少可以改变局部炎症偏向,

并导致黏膜疾病的失控^[19]。但 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞在 CRSwNP 发病机制中的作用仍不明确。基于此,本课题组提出布地奈德对嗜中性粒细胞性 NP 疗效不佳的原因可能涉及该药对 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞的影响,而且笔者也对该细胞的功能进行了初步的探讨。

本研究发现所有 NP 组织中嗜酸粒细胞数均 < 10 个/高倍视野,而嗜中性粒细胞数均 > 10 个/高倍视野,而且后者呈现集中或散在的浸润,符合嗜中性粒细胞性 CRSwNP 的组织表现^[11]。数据显示,CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞在 NP 组织中较正常黏膜组织中的百分比下降,这与其他学者的研究结果类似^[19]。而且研究还发现,布地奈德鼻喷剂治疗前后该 Treg 细胞的比例无限制改变,这说明糖皮质激素类药物对嗜中性粒细胞 NP 中的 CD8⁺ Treg 细胞没有明显作用。随后又分析了细胞培养液中抑制性细胞因子 TGF- β 及其 mRNA 的浓度,发现 NP 来源的 CD8⁺ Treg 细胞培养液中 TGF- β 的产生和释放较正常黏膜组织来源的细胞显著增加,由此说明,嗜中性粒细胞性炎症情况下 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞处于激活状态,而正常黏膜组织中的 CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞

则处于静息状态。值得强调的是,布地奈德的治疗并未显著升高 TGF- β 及其 mRNA 在 NP 组织中的表达量,即糖皮质激素类药物对上述抑制性细胞的活动不会产生显著影响。为了进一步分析 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的功能,笔者将其加入到 NP 培养液中,分析和探讨其对 NP 的影响。由于治疗前和治疗后的 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞表达 TGF- β 及其 mRNA 的量比较差异无统计学意义,因此我们仅将治疗后的 Treg 细胞对 NP 组织进行了干预,并未加入组织培养液进行对比研究。该细胞被干预后,检测了培养液中 I 型炎症因子 MPO 和 IFN- γ 的含量,发现其浓度在 NP 中较在正常组织中高,NP 来源的 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞干预后,上述炎症物质的含量显著下降,结果表明该 Treg 细胞的功能主要是抑制 NP 中炎症细胞释放炎症因子,但其具体机制尚需进一步探讨。

本研究的主要局限性在于样本数较少,研究期限相对较短,我们将在今后的研究中给予纠正。虽然布地奈德的治疗对 CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞的作用有限,但其仍可以调节嗜中性粒细胞性 NP 中的炎症反应。

参考文献

- [1] Soyka MB, Wawrzyniak P, Eiwegger T, et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: The regulation of tight junctions by IFN-gamma and IL-4 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 130(5): 1087-1096. e10.
- [2] Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012 [J]. *Rhinol Suppl*, 2012, 23: 3p preceding table of contents: 1-298.
- [3] Jankowski R, Bouchoua F, Coffinet L, et al. Clinical factors influencing the eosinophil infiltration of nasal polyps [J]. *Rhinology*, 2002, 40(4): 173-178.
- [4] Zhang N, Van Zele T, Perez-Novo C, et al. Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(5): 961-968.
- [5] Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(1): 7-13.
- [6] Robb RJ, Lineburg KE, Kuns RD, et al. Identification and expansion of highly suppressive CD8(+)FoxP3(+) regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation [J]. *Blood*, 2012, 119(24): 5898-5908.
- [7] Vaidyanathan S, Barnes M, Williamson P, et al. Treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis with oral steroids followed by topical steroids: a randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2011, 154(5): 293-302.
- [8] Wen W, Liu W, Zhang L, et al. Increased neutrophilia in nasal polyps reduces the response to oral corticosteroid therapy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(6): 1522-1528. e5.
- [9] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会鼻科组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会鼻科学组.中国慢性鼻窦炎诊断和治疗指南(2018) [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 54(1): 81-100.
- [10] Park SK, Lee WJ, Yang YI. Organ culture at the air-liquid interface maintains structural and functional integrities of inflammatory and fibrovascular cells of nasal polyps [J]. *Am J Rhinol*, 2007, 21(4): 402-407.
- [11] Ho J, Bailey M, Zaunders J, et al. Group 2 innate lymphoid cells(ILC2s)are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia [J]. *Clin Exp Allergy*, 2015, 45(2): 394-403.
- [12] Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, et al. Rhinosinusitis: Establishing definitions for clinical research and patient care [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(6): 155-212.
- [13] Cao PP, Li HB, Wang BF, et al. Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(3): 478-484, 484. e1-2.
- [14] Hissaria P, Smith W, Wormald PJ, et al. Short course of systemic corticosteroids in sinonasal polyposis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial with evaluation of outcome measures [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 118(1): 128-133.
- [15] Peric A, Vojvodic D, Matkovic-Jozin S. Effect of long-term, low-dose clarithromycin on T helper 2 cytokines, eosinophilic cationic protein and the 'regulation activation, normal T cell expressed and secreted' chemokine in the nasal secretions of patients with nasal polyposis [J]. *J Laryngol Otol*, 2012, 126(5): 495-502.
- [16] Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes [J]. *Immunology*, 1970, 18(5): 723-737.
- [17] Cosmi L, Liotta F, Lazzari E, et al. Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes [J]. *Blood*, 2003, 102(12): 4107-4114.
- [18] Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, et al. CD8⁺Foxp3⁺ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(23): 6947-6958.
- [19] Pant H, Hughes A, Schembri M, et al. CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells in chronic rhinosinusitis mucosa [J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2014, 28(2): 83-89.

(收稿日期:2020-02-08)