

2型糖尿病外周血调节性T细胞和脂肪因子水平与下肢动脉病变的关系

周小娟*, 何媛, 荀春华, 冷耀明, 张娅, 周洁, 高恬 (九江学院附属医院检验科, 江西九江332000)

[关键词] 2型糖尿病; 调节T细胞; 脂联素; 瘦素; 下肢动脉病变; 踝肱指数

[中图分类号] R587.1, R392.12 [文献标志码] B

2型糖尿病(type 2 diabetes, T2D)是一种伴有自身免疫反应、慢性低度炎症性疾病;免疫功能紊乱及脂肪细胞因子参与了T2D的发生发展。T2D患者中有5%~20%出现周围动脉病变(peripheral arterial disease, PAD),而PAD的主要病理变化是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)。CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是一类具有免疫调节功能的T淋巴细胞,在维持机体免疫自稳、调控免疫应答方面起重要作用。Foxp3作为Treg发育关键的核转录因子^[1],是目前公认的Treg特异性标记物。研究表明,CD4⁺CD25⁺Treg在AS的发生、发展过程中,可以抑制Th1和Th2病理反应,控制多种免疫炎症疾病的发展,在免疫耐受的维持中起重要作用^[2]。脂肪细胞因子是一组主要由脂肪细胞分泌的、具有免疫调节效应的激素,主要包括脂联素(adiponectin, APN)和瘦素(leptin, LP)。APN不仅与肥胖、胰岛素抵抗、T2D有关,还具有抑制炎症、抗糖尿病和动脉粥样硬化的作用^[3];而高瘦素水平与AS密切相关,是AS独立的危险因素^[4]。本研究通过流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测T2D患者外周血CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg的比例,采用ELISA法测定血浆脂肪因子表达水平,探讨其与PAD的发生发展相互关系。

1 对象和方法

1.1 对象 选择2010-01/2011-12在我院内分泌科住院的T2D患者106例,其中男56例、女50例,年龄40~82岁,平均年龄(59.1±18.7)岁,均符合1997年美国糖尿病学会诊断标准。根据踝臂指数(ankle-brachial index, ABI)值将其分为周围动脉病变组(PAD组,ABI<0.9)56例,男30例、女26例,年龄45~82岁,平均年龄(63.8±17.9)岁;非周围动脉病变组(NPAD组,0.9≤ABI<1.4)50例,男26例、女24

例,年龄41~74岁,平均年龄(57.8±16.6)岁。另外随机选取我院健康体检者48例为对照组(normal control, NC组)男25例、女23例,年龄40~78岁,平均年龄(58.7±19.2)岁。所有研究对象均排除各种急性感染性疾病、踝肱指数>1.4、自身免疫性疾病、恶性肿瘤及严重的肝、肾功能不全等疾病,近一个月未服用免疫调节剂等。且各组性别、年龄均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经九江学院附属医院伦理学委员会批准,患者均已签署知情同意书。

本研究所用主要试剂与仪器信息如下:PE-Cy5标记的小鼠抗人CD4抗体、FITC标记的小鼠抗人CD25抗体、PE标记的小鼠抗人Foxp3抗体及同型对照、FACSCanto II流式细胞仪(BD公司);adiponectin试剂盒(Linco公司);leptin试剂盒(Assay Pro公司);Model 680酶标仪(Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 外周血Treg比例检测 采集受检者EDTA抗凝晨起空腹肘静脉血2 mL。经淋巴细胞分离液密度梯度离心法获取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),用FBS将PBMC调整细胞密度至 1×10^6 /mL。取细胞悬液100 μ L加入PE-Cy5标记的CD4抗体、FITC标记的CD25抗体各20 μ L,4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。用PBS洗涤1次,加入1 mL破膜、固定剂,4 $^{\circ}$ C避光反应40 min。洗涤后加入20 mL/L小鼠血清2 μ L,4 $^{\circ}$ C避光反应15 min,加入PE标记的Foxp3及PE标记的IgG2a同型对照,4 $^{\circ}$ C避光反应30 min,洗涤后加入400 μ L 10 g/L多聚甲醛的PBS重悬, FACSCanto II流式细胞仪检测,分析CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg比例。

1.2.2 血浆APN、LP水平测定 用己二胺聚乙酸抗凝管收集空腹静脉血液5 mL,立即放入4 $^{\circ}$ C冰箱,1 h内于4 $^{\circ}$ C,2 500 r/min离心15 min,留取上层血浆,集中统一编号后于-80 $^{\circ}$ C保存待测。采用ELISA测定血浆APN、LP浓度。待测血标本加样品稀释液稀释至1:10,具体步骤按试剂盒说明书进行。用Bio-Rad model 680酶标仪进行比色分析,获取样本的吸光度值,根据试剂盒提供的标准品绘制标准曲线,将待测样本的吸光度值转化为浓度值。

1.2.3 ABI测定 检查前患者平卧位休息10 min,采用

收稿日期:2012-11-14; 接受日期:2012-11-22

作者简介:周小娟(1984-),女,江西新余人,检验师,本科

Tel: 13979245136; E-mail: 37404851@qq.com

*Corresponding author, 周小娟, E-mail: 37404851@qq.com

Nicolet Versalab SE 彩色双向多普勒血流探测仪按操作要求测量 ABI。依据 ABI 值将患者分为 PAD 组 (ABI < 0.9) 和非 PAD 组 (0.9 ≤ ABI < 1.4)。

1.2.4 统计学分析 采用 SPSS11.5 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 相关分析采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAD 组、NPAD 组和 NC 组 Treg、ANP 及 LP 水平比较 NPAD 组外周血 Treg、血浆 APN 水平显著低于 NC 组, PAD 组外周血 Treg、血浆 APN 水平也显著低于 NPAD 组, 而 PAD 组血浆 LP 水平则显著高于 NPAD 组和 NC 组, 组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 PAD 组、NPAD 组和 NC 组 Treg、ANP 及 LP 水平比较

组别	n	$(\bar{x} \pm s)$		
		Treg (%)	ANP (mg/L)	LP ($\mu\text{g/L}$)
NC 组	48	5.66 ± 1.21	8.21 ± 1.13	4.25 ± 0.98
NPAD 组	50	4.38 ± 0.70*	5.70 ± 1.03*	7.38 ± 2.42*
PAD 组	56	3.09 ± 0.78**	3.51 ± 1.02**	13.31 ± 2.45**

* $P < 0.05$ vs 对照组; ** $P < 0.05$ vs NPAD 组。

2.2 不同 ABI 值 PAD 组患者 Treg、ANP 及 LP 水平比较 PAD 组中不同 ABI 值进行比较, 发现 ABI < 0.5 组患者 Treg 与 ANP 明显低于 ABI > 0.5 组的患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且两者均与 ABI 呈显著正相关, 而血浆 LP 与 ABI 呈负相关。

表 2 不同 ABI 值 PAD 组患者 Treg、ANP 及 LP 水平比较

ABI 值	n	$(\bar{x} \pm s)$		
		Treg (%)	ANP (mg/L)	LP ($\mu\text{g/L}$)
0.5 ~ 0.9	49	3.24 ± 0.83	3.66 ± 1.12	11.75 ± 2.31
< 0.5	6	1.84 ± 0.79*	2.05 ± 1.30*	16.33 ± 3.52*

* $P < 0.05$ vs ABI > 0.5 患者组。

2.3 外周血 Treg 与 ANP、LP 水平及 ABI 的相关分析 Treg 与 ANP、ABI 呈正相关 ($r = 0.54$, $r = 0.62$, $P < 0.01$), 而与 LP 呈负相关 ($r = -0.48$, $P < 0.01$); ANP 与 LP 呈负相关 ($r = -0.57$, $P < 0.01$), 而与 ABI 呈正相关 ($r = 0.47$, $P < 0.01$)。

3 讨论

糖尿病下肢血管病变是 T2D 最为常见的并发症之一, 发病早, 进展快, 其主要病理变化是 AS。Treg 属于 T 淋巴细胞中表达 CD4⁺ CD25⁺ 的一类 T 细胞亚群, 能够负向调节机体的免疫炎症反应, 具有抗 AS 的作用^[5]。Foxp3 是 Treg 的特征性标志^[6], 动物实验表明 Foxp3 可通过调控体内炎症反应而产生抗 AS

的作用^[7]。本研究结果显示, NPAD 组外周血 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg 显著低于对照组, PAD 组外周血 Treg 也显著低于 NPAD 组, 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 T2D 患者外周血低水平的 Treg 可能是导致 T2D 发生发展的原因之一, 与迟林等^[8]的报道基本一致, 而与李洪等^[9]研究结果不符。ABI 是评估外周动脉病变严重程度的简单、无创指标, 具有很高的敏感性、特异性和准确性。为进一步研究 PAD 患者外周血 Treg 与 ABI 的关系, 以 ABI = 0.5 为界限, 结果发现 ABI < 0.5 患者 Treg 明显低于 ABI > 0.5 的患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 Treg 与 ABI 呈显著正相关, 提示 T2D 患者外周血 Treg 水平高低可作为衡量下肢血管病变严重程度的指标。

血浆 ANP 与 LP 均为脂肪组织释放入循环对远端组织起作用的一种肽类激素, 与糖尿病、动脉粥样硬化形成、炎症等的发生、发展有密切的关系。ANP 具有抗炎、抗动脉粥样硬化的作用^[10]。并有文献研究表明血浆低 ANP 水平是动脉粥样硬化的独立危险因素^[11]。LP 是一种肽类激素, 具有调节脂、糖代谢的作用, 其代谢效应与胰岛素相拮抗, 从而参与 T2D 的发病。高 LP 血症可能是 LP 抵抗的结果, 可导致血管内皮功能紊乱和诱发炎症反应^[12]。本研究结果显示, PAD 组血浆 ANP 水平明显低于 NPAD 组和 NC 组, 而血浆 LP 水平则显著高于 NPAD 组和 NC 组, 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步对 PAD 组不同 ABI 值患者血浆 ANP、LP 水平进行比较, 结果发现随着 ABI 值降低, 血浆 ANP 水平也显著降低, 而 LP 水平则明显升高, 表明 ANP 对动脉粥样硬化具有明确的保护作用, 而高瘦素水平则可能是瘦素抵抗的结果^[13], 且与下肢血管病变严重程度密切相关。相关分析显示, 外周血 Treg 与 ANP、ABI 呈正相关, 而与 LP 呈负相关, 提示外周血 Treg 比例减少、血浆 ANP 水平降低及高 LP 血症是促使 T2D 进展的重要因素。De Rosa 等^[14]证实在没有瘦素及其受体存在的情况下 Treg 增殖增强, 提示瘦素对 Treg 起负调节作用。本研究相关分析显示, LP 与 Treg 呈负相关, 进一步证实 T2D 患者高 LP 血症可下调 Treg 的表达水平, 与文献的结论基本一致^[14-15]。

综上所述, T2D 患者存在细胞免疫调节功能紊乱, 外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 比例、ANP 水平降低及高 LP 血症可能在 T2D 的发生发展中起着重要作用, 并与 PAD 的严重程度密切相关。

参考文献:

- [1] 郭庆明, 王青青. 调节性T细胞 Foxp3 基因表达的表现遗传学调控[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(3): 296-299.
- [2] Mallat Z, Tedgui A. Immunomodulation to combat atherosclerosis: the potential role of immune regulatory cells[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(9): 1387-1393.
- [3] Puglisi MJ, Fernandez ML. Modulation of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and adiponectin by diet, exercise, and weight loss[J]. *J Nutr*, 2008, 138(12): 2293-2296.
- [4] Alsaema M, Newson RS, Bakker SJ, et al. One risk assessment tool for cardiovascular disease, type 2 diabetes, and chronic kidney disease[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(4): 741-748.
- [5] Eiwegger T, Gruber S, Szépfalusi Z, et al. Novel developments in the mechanisms of immune tolerance to allergens[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8(10). [Epub ahead of print]
- [6] 张小娟, 孔璐璐, 顾榕, 等. 糖尿病患者外周血 FOXP3⁺ 调节性T细胞的检测及其临床意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2012, 32(4): 509-513.
- [7] 王治校, 林静, 陈彬, 等. Foxp3 基因对 ApoE-Knockout 小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(2): 154-161.
- [8] 迟林, 李昊森, 许晓风. 2型糖尿病患者外周血淋巴细胞亚群及 Treg 细胞检测及临床应用[J]. 山东医药, 2011, 51(40): 87-89.
- [9] 李洪, 张志哲, 李舒萍. 糖尿病合并血管并发症患者血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性T细胞的变化及其意义[J]. 内科, 2012, 7(2): 104-106.
- [10] 张南, 李菊香. 脂联素的抗动脉粥样硬化作用[J]. 国际老年医学杂志, 2011, 32(6): 274-277.
- [11] Zhang H, Cui J, Zhang C. Emerging role of adipokines as mediators in atherosclerosis[J]. *World J Cardiol*, 2010, 2(11): 370-376.
- [12] Katagiri H, Yamada T, Oka Y. Adiposity and cardiovascular disorders disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals[J]. *Circ Res*, 2007, 101(1): 27-39.
- [13] 王学英, 高炜, 薛军, 等. 血浆瘦素水平与冠心病患者冠状动脉病变程度及预后的相关性分析[J]. 中国心血管杂志, 2011, 16(1): 12-15.
- [14] De Rosa V, Procaccini C, Cali G, et al. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation[J]. *Immunity*, 2007, 26(2): 241-255.
- [15] Hersoug LG, Linneberg A. The link between the epidemics of obesity and allergic diseases; does obesity induce decreased immune tolerance[J]. *Allergy*, 2007, 62(10): 1205-1213.
-
- (上接 640 页)
- [4] Bao CJ, Guo XL, Qi X, et al. A family cluster of infections by a newly recognized Bunyavirus in eastern China, 2007; further evidence of person-to-person transmission[J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(12): 1208-1214.
- [5] Zhang YZ, He YW, Dai YA, et al. Hemorrhagic fever caused by a novel Bunyavirus in China; pathogenesis and correlates of fatal outcome[J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(4): 527-533.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 发热伴血小板减少综合征防治指南(2010版)[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsyjbg/s8348/201010/49272.htm>, 2010-10-08/2012-12-18.
- [7] 韩亚萍, 李军, 万玉峰, 等. HBV 组织相容性复合物-抗原肽五聚体在特异性细胞毒T淋巴细胞检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(7): 763-767.
- [8] 李德新. 发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒概述[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(2): 81-84.
- [9] Rea IM, Mcnedan SE, Alexander HD. CD69, CD25 and HLA-DR activation antigen expression on CD3⁺ lymphocytes and relationship to serum IFN-alpha, IFN-gamma and SIL-2R level in aging[J]. *Exp Gerontol*, 1999, 34(1): 79-93.
- [10] Bour-Jordan H, Bluestone JA. CD28 function; a balance of costimulatory and regulatory signals[J]. *J Clin Immunol*, 2002, 22(1): 1-7.
- [11] Allison JP. CD28-B7 interactions in T-cell activation[J]. *Curr Opin Immunol*, 1994, 6(3): 414-419.
- [12] Silva MV, Machado JR, Rocha LP, et al. CD28 family and chronic rejection; "to belatacept... And beyond!" [J/OA]. *J Transplant*, 2012, 2012: 203780.
- [13] Duttagupta PA, Boesteanu AC, Katsikis PD. Costimulation signals for memory CD8⁺ T cells during viral infections[J]. *Crit Rev Immunol*, 2009, 29(6): 469-486.
- [14] Lichtman AH. T cell costimulatory and coinhibitory pathways in vascular inflammatory diseases[J]. *Front Physiol*, 2012, 3(18): 1-10.
- [15] Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily[J]. *Nature Rev Immunol*, 2002, 2(2): 116-126.
- [16] Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation[J]. *J Exp Med*, 1996, 183(6): 2541-2550.
- [17] Lucas PJ, Negishi I, Nakayama K, et al. Naive CD28-deficient T-cells can initiate but not sustain an *in vitro* antigen-specific immune response[J]. *J Immunol*, 1995, 154(11): 5757.