

FOXP3 在儿童 I 型糖尿病患者中的表达及临床意义

陈 艳¹, 申卫红², 朱 岚²

(¹南京医科大学附属无锡市人民医院检验科, 江苏 无锡 214023; ²无锡市第三人民医院检验科, 江苏 无锡 214041)

[摘要] 目的:通过研究儿童 I 型糖尿病患者中转录因子 FOXP3 的表达,探讨其在儿童 I 型糖尿病发病的临床意义。方法:选择患儿与正常人各 30 例,用电化学发光法检测血清中 C 肽的含量;全自动生化分析仪检测空腹血糖;流式细胞仪检测外周血 CD4⁺ CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的数量;实时定量 PCR(RT-PCR)检测 FOXP3 的 mRNA 表达。结果: I 型糖尿病患儿组中血清 C 肽含量(0.71 ± 0.06)ng/ml 明显低于正常对照组(2.45 ± 0.28)ng/ml;血糖含量(7.51 ± 5.06)mmol/L 明显高于正常对照组(4.85 ± 0.68)mmol/L;外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 约占 CD4⁺ T 细胞(1.57 ± 0.15)%,低于正常对照组(3.13 ± 0.29)%($P < 0.05$); I 型糖尿病患儿组外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞低表达 FOXP3。结论:儿童 I 型糖尿病患者外周血 FOXP3 表达降低,导致机体不能抑制效应性 CD4⁺ T 细胞的增殖对胰岛的破坏,从而参与了 I 型糖尿病的发生。

[关键词] FOXP3; C 肽; I 型糖尿病

[中图分类号] R725.8

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2013)06-852-02

doi: 10.7655/NYDXBNS20130631

I 型糖尿病(type 1 diabetes, T1DM)是一种以 T 细胞介导的胰岛 β 细胞破坏、胰岛素分泌绝对减少为特征的慢性自身免疫性疾病。患者持续高血糖,并能导致一系列严重的并发症,如心血管疾病、失明、肾脏疾病等,但其发病机制尚未完全阐明。研究显示,在 I 型糖尿病患者体内低表达 CD4⁺ CD25⁺调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)^[1]。Treg 是一类具有免疫抑制功能的 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,特征性表达转录因子 FOXP3(forkhead transcription factor 3)^[2]。国外的许多研究表明,在一些 I 型糖尿病患者外周血中 FOXP3 的表达缺乏或功能障碍可能导致机体不能抑制效应性 CD4⁺ T 细胞的增殖对胰岛的破坏,从而参与 I 型糖尿病的发生^[3-4]。本研究通过检测 I 型糖尿病患儿体内 FOXP3 的基因表达水平,探讨 FOXP3 与 I 型糖尿病免疫功能紊乱发生发展的关系,以期免疫治疗提供一个新的方向。

1 对象和方法

1.1 对象

2012 年在无锡市人民医院住院治疗的 I 型糖尿病患儿 30 例,符合世界卫生组织诊断标准(2010 年)^[6],其中男 16 例,女 14 例,平均年龄(7.5 ± 3.5)岁。本院健康体检者 30 例作对照组,男 16 例,女 14 例,平均年龄(20.0 ± 1.0)岁,均无糖尿病史。所有研

究对象均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 空腹 C 肽和空腹血糖的检测

所有试验者清晨空腹抽取静脉血 2 ml 各 2 份,分别检测空腹 C 肽和空腹血糖。空腹 C 肽测定采用电化学发光免疫分析法(罗氏全自动免疫分析仪),空腹血糖测定采用全自动生化分析仪葡萄糖氧化酶法(日立全自动生化分析仪)。

1.2.2 外周血 CD4⁺ CD25⁺ T 淋巴细胞亚群的检测

分别抽取 I 型糖尿病患儿和健康者静脉血 2 ml,枸橼酸钠抗凝后取全血标本 100 μ l,分别加入 PE 标记的 CD4、FITC 标记的 CD25 抗体(均购自美国 BD 公司)各 10 μ l,室温避光孵育 30 min。然后再加入红细胞裂解液(美国 BD 公司),振荡混匀。离心后弃上清液,用 PBS 洗涤后混匀,用流式细胞仪进行计数(FACS Calibur,美国 BD 公司)。以 Cellquest 软件分析数据,获得 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的百分数。

1.2.3 FOXP3 mRNA 表达的检测

采用实时定量 PCR 检测 FOXP3 mRNA 的表达,以 GAPDH 做为内参基因。按照 RT-PCR 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)操作方法提取 RNA,FOXP3 的引物为:正义:5'-GAACGCCATCCGCCACAACCTGA-3',反义:5'-CCCTGCCCCACCACCTCTGC-3'。PCR 循环条件:95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性,然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 69 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min,共 30 次循环。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计分析软件对样本数据进行处理,所得计量资料描述为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)。两组间均数比较采用 *t* 检验,若数据方差不齐,采用两样本比较秩和检验 (Wilcoxon 两样本比较法), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

采用电化学发光免疫分析法和全自动生化分析仪分别检测实验组和对照组血清中 C 肽和血糖的含量,通过流式细胞仪检测外周血中 T 细胞亚群的

数量,结果见表 1。I 型糖尿病患儿组中血清 C 肽含量明显低于正常对照组,血糖含量明显高于正常对照组,外周血中 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞百分比低于正常人对照组,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

由于 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是一类具有免疫抑制功能的细胞群,特征性表达转录因子 FOXP3,因此我们进一步检测 I 型糖尿病患儿外周血中是否表达 FOXP3 mRNA。通过 RT-PCR 技术分别扩增 I 型糖尿病患儿组和正常对照组外周血中 FOXP3 的 mRNA,发现 I 型糖尿病患儿组和正常对照组均未见或低表达 FOXP3 mRNA。

表 1 I 型糖尿病患者空腹 C 肽和血糖含量的比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(<i>n</i>)	C 肽(ng/ml)	血糖(mmol/L)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg (%)
实验组	30	0.71 ± 0.06	7.51 ± 5.06	1.57 ± 0.15
对照组	30	2.45 ± 0.28	4.85 ± 0.68	3.13 ± 0.29
<i>P</i> 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05

3 讨 论

近年来调控免疫反应的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是免疫抑制治疗的研究焦点。而 Treg 特征性地表达转录因子 FOXP3,有着调控 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞发育及功能的作用。天然 Treg 细胞在胸腺内发育成熟后赋予了 FOXP3 免疫抑制功能,能在缺乏抗原刺激的情况下保持相对稳定的数量。Treg 细胞发挥抑制作用的分子基础主要有以下几个方面:①通过 CTLA-4 依赖的直接细胞接触抑制方式来抑制效应细胞的功能;②分泌抑制性细胞因子如白介素(IL)-10 来抑制 CD4⁺ T 细胞的活化和增殖;③ Treg 细胞形成使效应细胞转变成免疫抑制细胞的微环境,使一些 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞能被 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞诱导并分泌 IL-10 等细胞因子^[5]。

本研究结果显示,在 I 型糖尿病患者体内 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量明显低于正常对照组,而 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞高表达 FOXP3,意味着 FOXP3 的缺失或低表达可能在 I 型糖尿病的发病机制中起重要作用。Ryba 等^[6]研究发现,在新发现的儿童 I 型糖尿病患者体内 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的含量明显低于正常人,这与本研究的结果相一致。另外,儿童 I 型糖尿病患者体内 C 肽含量也明显低于正常人,FOXP3 的表达与 C 肽的含量正相关。因此,在儿童 I 型糖尿病的治疗中,对 FOXP3

介导的免疫耐受进行干预是十分必要的,这为进一步研究 FOXP3 在儿童 I 型糖尿病的免疫机制中的作用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: From cause to cure[J]. Diabetologia, 2003, 46 (3): 305-321
- [2] Zhang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road [J]. J Cell Physiol, 2007, 211(3): 590-597
- [3] Luczynski W, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Stasiak-Barmuta A, et al. Diminished expression of ICOS, GITR and CTLA-4 at the mRNA level in T regulatory cells of children with newly diagnosed type 1 diabetes [J]. Acta Biochim Pol, 2009, 56(2): 361-370
- [4] Bluestone JA, Tang Q, Sedwick CE. T regulatory cells in autoimmune diabetes: Past challenges, future prospects [J]. J Clin Immunol, 2008, 28(6): 677-684
- [5] 申卫红, 杨春香, 朱 岚, 等. 胃癌患者外周血 FOXP3 的检测及临床意义[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2012, 32(11): 1559-1560
- [6] Ryba M, Hak L, Zorena K, et al. Regulatory T lymphocytes expressing L-selectin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus [J]. Pediatr Endocrinol Diabetes Metab, 2010, 16(1): 12-16

[收稿日期] 2013-02-22