

糖尿病患者外周血 FOXP3⁺调节性 T 细胞的检测及其临床意义

张小娇,孔璐璐,顾 榕,陈 恒,许馨予,徐宽枫,王知笑,杨 涛,张 梅*

(南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨不同类型糖尿病患者外周血 FOXP3⁺调节性 T 细胞表达的差异及其临床意义。方法:研究分为 1 型糖尿病组($n = 43$)、2 型糖尿病组($n = 16$)和健康对照组($n = 19$)。采用放射配体法检测糖尿病患者外周血中自身抗体:锌转运体 8 蛋白抗体(zinc transporter 8 antibody, ZnT8A)、谷氨酸脱羧酶抗体(glutamic acid decarboxylase antibody, GADA)和胰岛细胞抗体(islet cell antibody, ICA)。采用细胞膜打孔和三色荧光标记流式细胞术检测外周血 CD4⁺T 细胞群中 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 细胞所占百分比、CD4⁺CD25⁺T 细胞所占百分比。结果:①1 型和 2 型糖尿病患者的外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比均低于健康志愿者,差异有统计学意义($P < 0.05$);②1 型糖尿病患者的外周血中 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比低于健康志愿者和 2 型糖尿病患者,差异有统计学意义($P < 0.05$);③1 型糖尿病患者的病程与外周血 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 细胞数量、CD4⁺CD25⁺T 细胞数量均无相关性。结论:1 型糖尿病患者外周血 FOXP3⁺调节性 T 细胞百分比下降,FOXP3⁺调节性 T 细胞数量的下降程度与病程无关。FOXP3⁺调节性 T 细胞可能参与了 1 型糖尿病的发生和发展,与 2 型糖尿病无显著相关性。FOXP3 是调节性 T 细胞的特征性标志。

[关键词] 调节性 T 淋巴细胞;糖尿病;流式细胞术

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)04-509-05

Percentages of FOXP3⁺ regulatory T cells in patients with diabetes

ZHANG Xiao-jiao, KONG Lu-lu, GU Rong, CHEN Heng, XU Xin-yu, XU Kuan-feng, WANG Zhi-xiao, YANG Tao, ZHANG Mei*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the percentage of FOXP3⁺ regulatory T cells in peripheral blood from patients with diabetes of different types. **Methods:** Three groups were included: type 1 diabetes ($n = 43$ cases), type 2 diabetes ($n = 16$ cases) and healthy control ($n = 19$ cases). Zinc transporter 8 antibody (ZnT8A), glutamic acid decarboxylase antibody (GADA) and islet cell antibody (ICA) were detected by radioligand binding assay. The proportions of regulatory T cells, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T cells and CD4⁺CD25⁺T cells, in peripheral blood were determined by flow cytometry. **Results:** ① In the peripheral blood, the percentages of CD4⁺CD25⁺T cells in CD4⁺T lymphocytes from patients with type 1 diabetes or type 2 diabetes were lower than those of healthy control; ② In the peripheral blood, patients with type 1 diabetes showed lower ratio of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T cells compared with healthy control and patients with type 2 diabetes; ③ There was no significant correlation between the duration of diabetes and the percentage of peripheral CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells or CD4⁺CD25⁺T cells. **Conclusion:** In the peripheral blood, the FOXP3⁺ regulatory T cells population was deficiency in patients with type 1 diabetes. Type 2 diabetes had small influence in the percentage of FOXP3⁺ regulatory T cells. There was no significant relationship between the percentage of FOXP3⁺ regulatory T cells and duration of type 1 diabetes.

[Key words] regulatory T cell; diabetes; flow cytometry

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(4): 509-513]

[基金项目] 国家自然科学基金(81070622);江苏省自然科学基金(BK2008444);南京市科技发展项目(009010684);江苏六大人才高峰项目(2010-022)

*通讯作者, E-mail: zhangmei@njmu.edu.cn

1 型糖尿病(type 1 diabetes, T1DM)是一种 T 细胞介导的对胰岛自身抗原耐受缺失的自身免疫病,以分泌胰岛素的胰岛 β 细胞破坏为特征^[1]。患者持续性高血糖,继发严重并发症。调节性 T 细胞(reg-

ulatory 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。健康机体主要通过 Treg 介导的免疫耐受维持对自身抗原的耐受。研究显示 Treg 细胞的缺乏或功能障碍可能导致 T1DM 患者对自身抗原耐受的缺失。Treg 细胞参与 T1DM 发病过程已有报道^[2-4], 然而 Treg 数目变化在 T1DM 所起的作用仍然有争议^[5-8]。本研究旨在通过分析调节性 T 细胞特征性标志 FOXP3 与糖尿病的关系, 以进一步阐明它们在 1 型糖尿病患者免疫功能紊乱中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

2011 年参加本科糖尿病夏令营的 T1DM 患者 43 例(男 21 例, 女 22 例), 年龄 11~64(24.5 ± 12.5) 岁, 病程 1~21(7.1 ± 5.2) 年。参加本科社区流行病学调查的 2 型糖尿病(T2DM)患者 16 例(男 11 例, 女 5 例), 年龄 57~78(67.3 ± 6.0) 岁, 病程 2~25(13.4 ± 6.3) 年, 符合 WHO 诊断标准(1999 年), 自身抗体检测阴性。所有患者均不伴有 Graves 病、系统性红斑狼疮等自身免疫相关性疾病。健康对照 19 例(男 7 例, 女 12 例), 年龄 19~22(19.8 ± 0.9) 岁, 均无糖尿病家族史及其他急、慢性疾病史。所有参加实验者均获得了知情同意。

核酸酶处理的兔网织红细胞裂解液(Promega 公司, 美国), 蛋白 A 琼脂糖(GE Amersham Biosciences 公司, 美国), Wallac Microbeta 液体闪烁计数(Perkin Elmer Life and Analytical Sciences 公司, 美国)。抗 CD4-FITC 荧光抗体、抗 CD25-PE 荧光抗体、抗 FOXP3-APC 荧光抗体、IgG₁-APC 荧光抗体、Permeabilization Buffer 液和 Fixation/Permeabilization 液(eBioscience 公司, 美国)。流式细胞仪溶血剂(康源生物制品有限公司, LS-01-500, 中国)。流式细胞仪(BD FACSCanto II, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)和糖化血红蛋白(HbA1c)检测

早晨抽取空腹静脉血 2 份各 3 ml 分装于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管和促凝管中, 分别检测 FPG 及 HbA1c。FPG 血糖测定采用全血自动生化分析仪葡萄糖氧化酶法。HbA1c 测定为高压液相色谱法, 严格按说明书操作; 总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、脂蛋白(a)[Lp(a)] 均采用酶法

测定(全自动生化仪)。并对研究对象分别记录其年龄、性别、测量身高和体质量。

1.2.2 自身抗体检测

采用放射配体法检测患者外周血自身抗体锌转运体 8 蛋白抗体(zinc transporter 8 antibody, ZnT8A)、谷氨酸脱羧酶抗体(glutamic acid decarboxylase antibody, GADA)和胰岛细胞抗体(islet cell antibody, ICA)的表达。抗体阳性标准: 免疫沉淀指数=(样本-阴性对照)/(阳性对照-阴性对照), ZnT8A、GADA、ICA 阳性界限值定义为 0.015、0.048、0.018, 具体方法详见[9-10]。抗体水平转化为相应的免疫沉淀指数。

1.2.3 外周血 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 淋巴细胞亚群的检测

所有检查对象取静脉血 2 ml, EDTA 抗凝。混匀后吸 100 μl 全血于流式管中。加 CD4-FITC/CD25-PE 单克隆抗体混合液 20 μl, 混匀, 4℃避光孵育 20 min。加入新配制的 1×流式细胞仪溶血剂 2 ml, 混匀裂解红细胞 5 min, 1 200 r/min, 离心 5 min, 弃上清。再加入 1 ml PBS 洗涤 1 次。加入 2 ml 新配制的 Fixation/Permeabilization(固定/透化液, 1:3), 混匀后避光孵育 30 min。1 ml Permeabilization Buffer 洗涤细胞 2 次。加入 20 μl anti-human FOXP3 抗体, 避光孵育 30 min。1 ml Permeabilization Buffer 洗涤细胞 2 次。加入 200~300 μl 生理盐水重悬细胞, 流式细胞仪检测, 以 CD4⁺T 细胞设门。数据经 Flowjo 软件获取和分析, 每个样本每次检测 10⁴ 个细胞。

1.3 统计学方法

数据用 SPSS13.0 软件处理。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。三组间比较采用单因素方差分析, 两个变量的关系采用 Pearson 相关进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料比较

三组患者的基本资料比较结果见表 1。其中 T1DM 组和 T2DM 组的 FBG、餐后 2 h 血糖(PBG)、HbA1c 等比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。1 型糖尿病自身抗体阳性率见表 2。

2.2 各组外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞群的比较

1 型糖尿病患者和 2 型糖尿病患者的外周血中 CD4⁺CD25⁺T 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比均低于健康志愿者, 差异有统计学意义($P < 0.05$); T1DM 组和 T2DM 组两组间差异无统计学意义($P = 0.321$,

表 1 三组患者的基本情况

Table 1 The base data of the type 1,2 diabetes patients and health controls

项 目	健康对照组	1 型糖尿病组	2 型糖尿病组
性别(男/女)	19(7/12)	43(21/22)	16(11/5)
年龄(岁)	19.8 ± 0.9	24.5 ± 12.5*	67.3 ± 6.0* [△]
病程(年)	-	7.12 ± 5.24	13.40 ± 6.33 [△]
体重指数(kg/m ²)	19.32 ± 3.04	18.77 ± 3.37	21.08 ± 4.12* [△]
FBG(mmol/L)	4.96 ± 0.74	7.57 ± 5.22*	7.93 ± 2.86*
PBG(mmol/L)	5.63 ± 1.45	8.89 ± 4.73*	9.57 ± 3.78*
HbA1c(%)	5.39 ± 0.46	7.30 ± 5.22*	7.51 ± 4.67*
TG(mmol/L)	1.03 ± 0.32	1.09 ± 0.71	1.36 ± 0.69* [△]
LDL-C(mmol/L)	1.25 ± 0.37	2.06 ± 0.93*	2.27 ± 0.67*
HDL-C(mmol/L)	1.33 ± 0.24	1.31 ± 0.37	1.24 ± 0.38* [△]

与正常对照组相比,* $P < 0.05$;与 1 型糖尿病组相比,[△] $P < 0.05$ 。

表 2 1 型糖尿病患者自身抗体阳性率

Table 2 The positive percent of anti-islet autoantibodies from type 1 diabetes [n(%)]

自身抗体	n	抗体阳性率(%)
ZnT8A	32	22(68.75)
GADA	33	22(66.67)
ICA	33	11(33.33)

图 1,表 3)。

2.3 各组外周血中 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 细胞群的比较

T1DM 患者的外周血中 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比低于健康志愿者和 T2DM 患者,差异有统计学意义($P < 0.05$);健康志愿者和 T2DM 患者两组之间差异无统计学意义($P = 0.563$,图 1,表 3)。

2.4 糖尿病病程与 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 细胞的相关性分析

相关性分析显示 1 型糖尿病患者的病程与外周血 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 细胞数量、CD4⁺CD25⁺T 细胞数量均无相关性 ($r = 0.118, P = 0.470; r = 0.264, P = 0.099$)。

3 讨 论

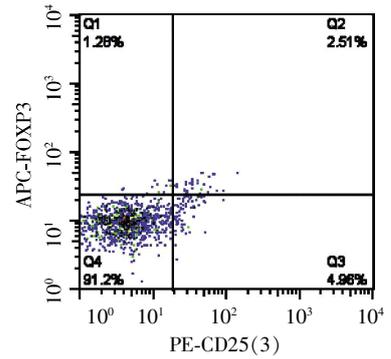
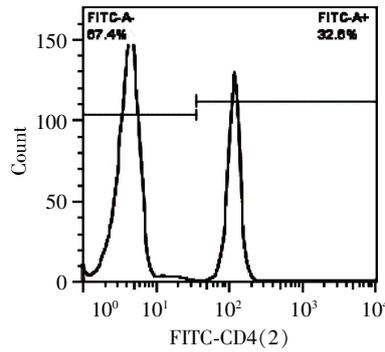
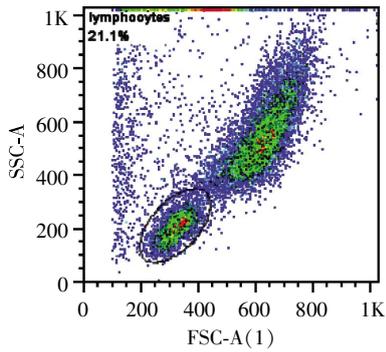
近年来,具有免疫调节功能的调节性 T 细胞引起了研究者的广泛关注。此类细胞在肿瘤、自身免疫性疾病、移植免疫及感染性疾病等的发生发展中起重要的作用^[11-12]。常见的具有抑制功能的调节性 T 细胞亚群主要包括以下 3 种:Tr1 细胞 (type 1 Treg)、Th3 细胞(T helper 3)和 CD4⁺CD25⁺Treg。CD4⁺CD25⁺Treg 是最有特征的调节性 T 细胞亚群,也是目前研究最多的调节性 T 细胞亚群。该表型的调节

性 T 细胞又分为两群,一群是胸腺来源的天然型调节性 T 细胞(nature Treg, nTreg);另外一群是外周诱导产生的诱导型调节性 T 细胞(induced Treg, iTreg)。其中,胸腺来源的调节性 T 细胞约占人外周血 CD4⁺T 细胞的 5%~10%,是最重要的调节性 T 细胞亚群之一,其主要功能是维持内环境稳定、抑制机体对同种异体移植物的排斥反应以及影响其他 T 细胞的功能等^[13]。

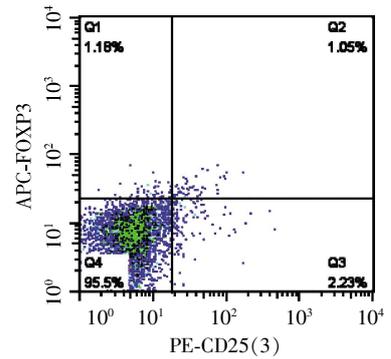
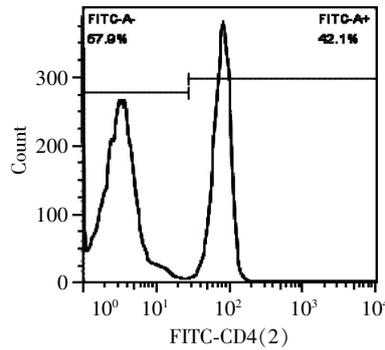
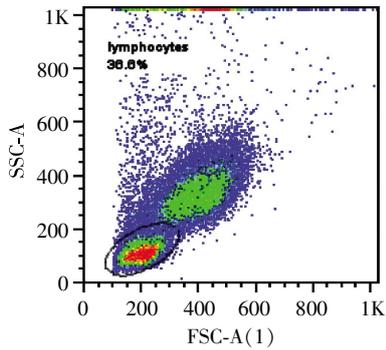
nTreg 细胞表达 CD25 分子。既往研究发现 CD25 组成性表达于调节性 T 细胞表面,是调节性 T 细胞慢性活化阶段的分子标记,影响其增殖、生存及功能。然而,进一步研究发现 CD25 同时是 T 细胞活化的标志之一,CD4⁺CD25⁺T 细胞包含 FOXP3⁺调节性 T 细胞、1 型调节性 T 细胞、3 型辅助 T 细胞、活化的效应 T 细胞等,不能反映体内调节性 T 细胞的真实水平,因此,其作为调节性 T 细胞的标志分子有一定的局限性。表型分析显示 CD4⁺CD25^{high}-Treg 细胞比 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞具有更高的均一性。研究显示,nTreg 细胞表面表达特异性转录抑制因子 FOXP3,被认为是 CD4⁺CD25⁺Treg 发育及启动抑制功能的关键基因,其表达水平能更为精确地反映 CD4⁺CD25⁺Treg 的活性^[14-15],被认为是 nTreg 细胞的特征性标志。

本研究结果显示,如以 CD25 作为 nTreg 细胞检测标志,则 T2DM 患者体内的 CD4⁺CD25⁺T 细胞在 CD4⁺T 细胞中比例减少,然而,采用 FOXP3 为检测标志后 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 细胞在 CD4⁺T 细胞中比例无明显减少,进而提示 T2DM 患者体内无 FOXP3⁺调节性 T 细胞数量的改变。FOXP3⁺调节性 T 细胞具有免疫抑制性和免疫无能性两大特性。许多研究表明 FOXP3⁺调节性 T 细胞在 T1DM 的免疫调

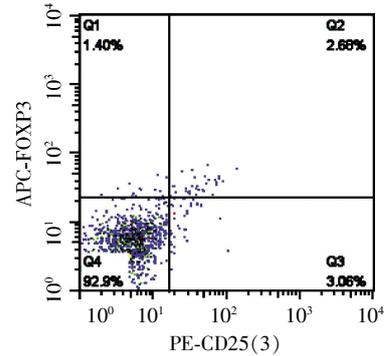
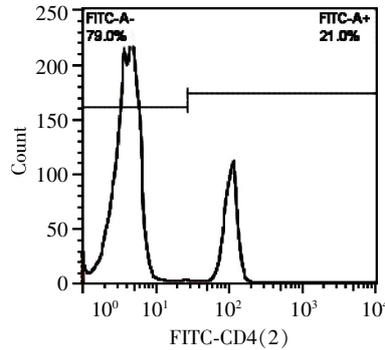
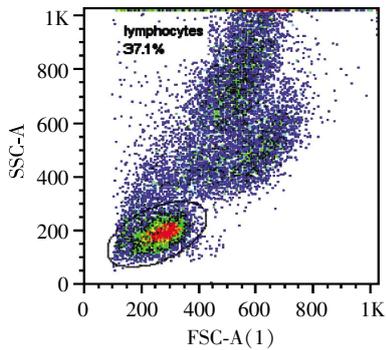
健康对照组



T1DM 组



T2DM 组



待测细胞表面标记的流式抗体:CD4-FITC、CD25-PE、FOXP3-APC;(1)从单个核细胞中分出淋巴细胞群;(2)从淋巴细胞群中分出 CD4 阳性细胞群;(3)在 CD4 阳性细胞群中标记 CD25-PE、FOXP3-APC。

图 1 流式细胞仪检测外周血 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 表达水平

Figure 1 The percentage of peripheral CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cell by flow cytometric analysis

表 3 各组外周血 CD4⁺CD25⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T 表达水平比较

Table 3 Comparison of peripheral CD4⁺CD25⁺T cells and CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T cells levels in each group

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

组别	n	CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ T 细胞
T1DM 组	43	4.68 ± 1.68*	1.13 ± 0.48*
T2DM 组	16	5.29 ± 2.60*	2.21 ± 0.92
健康对照组	19	9.75 ± 2.13	2.32 ± 0.60

与健康对照组比较, *P < 0.05。

节中发挥重要的作用,但其作用机制不明^[16],其数量和功能改变的观点也存在分歧^[3,7,9]。本组资料显示 T1DM 患者外周血 FOXP3⁺调节性 T 细胞水平低于健康对照组和 T2DM 组,这提示 T1DM 患者体内存在调节性 T 细胞生成障碍,FOXP3⁺调节性 T 细

胞处于低表达,从而不能有效抑制 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞的活化增殖。推测 FOXP3⁺调节性 T 细胞数量减少可能是导致 T1DM 发病的重要原因之一,这一观点与既往研究结论相符^[17]。本研究进一步分析显示不同病程的 T1DM 患者外周血 FOXP3⁺调节

性 T 细胞数量无明显差异,提示 FOXP3⁺调节性 T 细胞数量的下降程度与糖尿病病程无关,这与其他研究者的研究结果相似^[18]。有研究者发现 T1DM 患者体内的调节性 T 细胞免疫调节功能存在缺陷^[3],目前,本研究仅完成 FOXP3⁺调节性 T 细胞数量的检测,今后将进一步检测 FOXP3⁺调节性 T 细胞对自身效应 T 细胞的抑制功能。

综上所述,FOXP3⁺调节性 T 细胞与 T2DM 无相关性。CD25⁺T 细胞检测不能全面体现患者体内调节性 T 细胞的数量变化。FOXP3⁺是调节性 T 细胞的特征性标志。本研究显示 T1DM 患者外周血 FOXP3⁺调节性 T 细胞数量下降,从而使得 FOXP3⁺调节性 T 细胞介导的免疫抑制信号减弱,表明 FOXP3⁺调节性 T 细胞参与了 T1DM 的 T 细胞免疫紊乱。

[参考文献]

- [1] Szypowska A, Stelmaszczyk-Emmel A, Demkow U, et al. Evaluation of T regulatory cell apoptosis in children with newly recognized type 1 diabetes mellitus[J]. *Eur J Med Res*, 2010, 15 (Suppl 2): 198-201
- [2] Badami E, Sorini C, Coccia M, et al. Defective differentiation of regulatory FoxP3⁺ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2011, 60(8): 2120-2124
- [3] Lawson JM, Tremble J, Dayan C, et al. Increased resistance to CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154(3): 353-359
- [4] Ferraro A, Socci C, Stabilini A, et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2011, 60(11): 2903-2913
- [5] Luczynski W, Stasiak-Barmuta A, Urban R, et al. Lower percentages of T regulatory cells in children with type 1 diabetes - preliminary report[J]. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*, 2009, 15(1): 34-38
- [6] Kukreja A, Cost G, Marker J, et al. Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(1): 131-140
- [7] Luczynski W, Stasiak-Barmuta A, Mysliwiec M, et al. Higher percentages of T regulatory cells in children at risk for developing type 1 diabetes mellitus [J]. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*, 2010, 16(1): 7-10
- [8] Zhen Y, Sun L, Liu H, et al. Alterations of peripheral CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells in mice with STZ-induced diabetes[J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9(1): 75-85
- [9] Gu Y, Zhang M, Chen H, et al. Discordant association of islet autoantibodies with high-risk HLA genes in Chinese type 1 diabetes [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011, 27(8): 899-905
- [10] Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(43): 17040-17045
- [11] Esensten JH, Wofsy D, Bluestone JA. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2009, 5(10): 560-565
- [12] Klages K, Mayer CT, Lahl K, et al. Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20): 7788-7799
- [13] Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(8): 585-598
- [14] Tang J, Li BQ, Ruan J, et al. Expression of Foxp3 in CD4⁺CD25^{high} Treg cells of neonatal cord blood [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(4): 365-367
- [15] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1701-1711
- [16] 冯宁翰, 吴宏飞, 吴军, 等. CD4⁺CD25⁺Treg 细胞调节 T 细胞作用机制的实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2004, 24(2): 178-182
- [17] Zheng Q, Xu Y, Liu Y, et al. Induction of Foxp3 demethylation increases regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells and prevents the occurrence of diabetes in mice [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2009, 87(12): 1191-1205
- [18] Lindley S, Dayan CM, Bishop A, et al. Defective suppressor function in CD4⁺CD25⁺ T-cells from patients with type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(1): 92-99

[收稿日期] 2011-12-23