

CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-}**调节性 T 细胞在 1 型糖尿病中表达及功能分析**刘西凤¹, 王 勇¹, 王芝涛¹, 翟志敏²

摘要 目的 检测 1 型糖尿病 (T1DM) 患者外周血中调节性 T 细胞 (Tregs) 的表达及功能变化, 探讨 Tregs 在 1 型糖尿病发生、发展中的作用。方法 收集 36 例初诊 T1DM 患者 (T1DM 组) 和 20 例青年健康志愿者 (对照组) 外周血, 留取血浆, 密度梯度离心法分离出单个核细胞 (PBMCs)。以 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} 作为 Tregs 的分子标记, 分别应用流式细胞术、RT-PCR 法及 ELISA 法检测外周血中 Tregs 的比例、FoxP3 mRNA 表达水平及血浆细胞因子白细胞介素-10 (IL-10)、转化生长因子- β (TGF- β) 浓度。采用 CCK-8 法检测 Tregs 对效应性 T 细胞 (Teffs) 的增殖抑制作用。结果 初诊 T1DM 患者外周血 Tregs 比例、FoxP3 mRNA 表达水平及血浆细胞因子 IL-10 浓度较对照组均显著降低 ($P < 0.05$)。T1DM 患者外周血 Tregs 对 Teffs 的增殖抑制作用较对照组显著减弱 ($P < 0.05$)。结论 Tregs 的表达和调控功能降低可能是 T1DM 发生和发展的重要原因。

关键词 1 型糖尿病; 调节性细胞; 免疫耐受

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)09-1316-04

1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 是由自身 T 淋巴细胞过度活化产生的一种以胰岛 β 细胞进行性免疫损伤为表现的自身免疫性疾病。在其发病过程中有多种免疫细胞参与, 其中自身反应性 T 淋巴细胞过度活化起重要作用^[1]。

调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 是一类具有免疫调节功能的细胞亚群, 于 1995 年 Sakaguchi et al^[2] 在对小鼠自身免疫性疾病的研究中被首次发现。近年研究^[3] 显示, Tregs 在维持自身免疫耐受、避免自身免疫性疾病的发生中具有重要作用。该细胞亚群可以通过细胞间直接接触或分泌抑制性细胞因子如转化生长因子- β (transforming growth

factor β , TGF- β) 以及白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 等, 调控自身反应性 T 细胞的过度活化, 防止自身免疫性疾病的发生。当其数量降低或功能缺陷时, 会诱发多种自身免疫性疾病^[3]。该研究旨在通过检测分析 T1DM 患者外周血 Tregs 的数量以及功能状况, 探讨该细胞亚群在 T1DM 发生和发展中所起的作用, 为该疾病的临床诊治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择 2014 年 12 月 ~ 2015 年 8 月于解放军第 105 医院初次诊断的 36 例 T1DM 患者 (T1DM 组), 年龄 12 ~ 36 (22.25 \pm 6.64) 岁; 男 20 例, 女 16 例; 均符合 1999 年 WHO 糖尿病诊断及分型标准。筛选标准: ① 空腹血糖 (FPG) ≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dl); ② 有糖尿病症状, 并且任意时间血浆葡萄糖 ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dl); 典型的糖尿病症状是多尿、多饮和难以解释的体重减轻; ③ 口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 2 h 血浆葡萄糖 (PG) ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dl)。符合上述标准之一的患者, 在次日复诊仍符合 3 条标准之一者即诊断为糖尿病, 且空腹 C-肽 < 0.4 nmol/L, 谷氨酸脱羧酶抗体 (GAD-Ab) 阳性。排除标准: 凡伴急慢性感染、肿瘤、严重器质性疾病、妊娠以及其他自身免疫性疾病者均予排除。对照组 (healthy control, HC 组) 20 例, 均为解放军第 105 医院健康体检中心志愿者, 男 10 例, 女 10 例; 年龄 14 ~ 33 (21.45 \pm 6.94) 岁, OGTT 排除糖尿病, 且无糖尿病家族史, 无其他急、慢性疾病。两组受试者的性别、年龄差异无统计学意义。研究方案经中国人民解放军第 105 医院伦理委员会批准, 所有受试者签署书面知情同意书。

1.2 外周血 Tregs 测定 抽取 T1DM 组患者和对照组志愿者静脉血 5 ml 加入肝素抗凝管, 2 000 r/min 离心 15 min, 留取血浆 2 ml 于 -80°C 冰箱中备用。离心后剩余细胞采用 Ficoll 淋巴细胞分离液, 密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 并计细胞总

2016-05-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 811411104)

作者单位: ¹解放军第 105 医院内分泌科, 合肥 230031

²安徽医科大学第二附属医院血液内科, 合肥 230022

作者简介: 刘西凤, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: woaiwojia0506@

126.com

数。取 100 μl 细胞悬液 (1×10^6) 加入 CD4-PE、CD25-FITC、CD127-PC5 单克隆抗体各 20 μl , 室温避光孵育 30 min 后, 洗涤 2 次, 加入 500 μl 染色缓冲液混匀, 使用流式细胞仪 (FC500 MPL, 美国 Beckman Coulter 公司) 收集 10 000 个细胞/管, Flowjo 软件获取数据, 分析 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Tregs 占 CD4⁺ 细胞百分比。

1.3 RT-PCR 法检测外周血 PBMCs 中 FoxP3 mRNA 表达水平 采用 TRIzol 试剂提取上述剩余外周血 PBMCs 中总 mRNA, 反转录为 cDNA, 加入 25 μl Real-time PCR 反应体系中。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s; 64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s; 40 个循环。反应结束后根据扩增曲线和溶解曲线判断反应质量, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 T1DM 组和对照组间 FoxP3 mRNA 的差异表达倍数, 检测 FoxP3 mRNA 的相对表达量。人 GAPDH 作为管家基因, 各引物序列见表 1。

表 1 人 FoxP3 和 GAPDH 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: CACATCGCTCAGACACCAT
	R: CCAGGCGCCCAATACG
FoxP3	F: AGCTGCTACAGTGCCCTAG
	R: TTTGCCAGCAGTGGGTAG

1.4 细胞因子检测 在分离 T1DM 组和对照组 PBMCs 同时, 预留的血浆放置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 集中待测。血浆细胞因子 IL-10、TGF- β 检测采用 ELISA 法, 试剂盒购于美国 R&D 公司, 并严格按照说明书进行操作。

1.5 Tregs 免疫抑制功能测定 因 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Tregs 仅占 PBMCs 约 1%, 难以获取足够数量的 Tregs。细胞功能测定中, 以 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 为研究对象。选取 3 例初诊 T1DM 患者和 3 例健康对照者, 抽取 15 ml 静脉血, 密度梯度离心法分离 PBMCs, 经 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 细胞分离纯化试剂盒 (德国 Mihenyi 公司) 分离, 并严格按照说明书操作, 分离出 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 和 CD4⁺ CD25⁻ 效应性 T 细胞 (Teffs)。经流式细胞仪检测提示细胞纯度均在 90% 以上。

以 10 mmol/L 无菌磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 将抗人 CD3 单克隆抗体稀释成 1 mg/L 溶液, 包被 96 孔微孔板, 100 μl /孔 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 弃去反应板内液体, PBS 洗板 3 次, 每次 3 min, 备用。

将上述分离的 Teffs 与 Tregs 用 PBS 洗涤, Teffs 单独培养以及按照 1:1、1:2、1:4、0:1 的比例接种于抗 CD3 包被的 96 孔板中, 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调至终体积为 200 μl , 细胞总数为 1×10^5 。再加入终浓度为 1 mg/L 的抗 CD28 抗体, 每组设 3 孔。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育, 培养 5 d, 加入 CCK-8 溶液, 酶标仪测定吸光度 (optical density, OD) 值。细胞增殖抑制率 (%) = [100 - (OD 实验 - OD 本底)] / (OD 对照 - OD 本底)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间数据的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 外周血中 Tregs 定量检测结果 T1DM 患者和健康对照者外周血中 CD4⁺ T 细胞数量差异无统计学意义 ($t = 1.16, P > 0.05$); 而 T1DM 组患者 CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} Tregs 所占 CD4⁺ T 细胞百分比比较对照组显著降低, 差异有统计学意义 ($t = -6.81, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 T1DM 组和对照组外周血 CD4⁺ T 细胞及 Tregs 百分比 (% $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	T1DM 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	(<i>n</i> = 20)	(<i>n</i> = 36)		
CD4 ⁺ T 细胞	35.97 \pm 1.21	37.71 \pm 0.84	1.16	0.252
Tregs	4.51 \pm 1.44	2.23 \pm 0.72	-6.81	0.001

2.2 外周血中 Foxp3 mRNA 定量检测结果 Foxp3 作为 Tregs 特异性的转录因子, 对于 Tregs 分化发育及发挥作用具有重要作用。本实验中, T1DM 组患者外周血中 Foxp3 mRNA 表达水平为 (0.61 \pm 0.07), 与对照组 (0.99 \pm 0.08) 比较显著降低 ($t = -18.68, P < 0.01$)。

2.3 外周血中 IL-10、TGF- β 浓度定量检测结果 T1DM 组患者血浆 IL-10 浓度为 (1.17 \pm 0.13) ng/ml, 对照组为 (1.87 \pm 0.72) ng/ml; 与对照组比较, T1DM 组患者 IL-10 浓度显著降低 ($t = 13.67, P < 0.01$)。T1DM 组患者血浆 TGF- β 浓度为 (13.76 \pm 3.47) ng/ml, 对照组为 (16.86 \pm 7.35) ng/ml。T1DM 组患者血浆中 TGF- β 浓度虽有所降低, 但差异无统计学意义。

2.4 T1DM 患者外周血中 Tregs 免疫抑制功能分析 T1DM 组患者 Teffs 与 Tregs 按照 1:1、1:2、1

: 4.0 : 1 的比例培养的平均抑制率分别为(50.2 ± 4.3) % 、(26.4 ± 3.6) % 、(17.5 ± 5.3) % 、0% ; 对照组的平均抑制率分别为(68.5 ± 3.9) % 、(46.3 ± 5.1) % 、(28.6 ± 4.5) % 、0% 。T1DM 组与对照组相比平均抑制率均明显降低, 差异有统计学意义($t = -2.147$ $P < 0.05$) 。

3 讨论

T1DM 的发病机制较复杂, 涉及遗传、免疫、年龄等多种因素, 但普遍认为 Teffs/Tregs 细胞功能失衡可能在 1 型糖尿病的发病过程中起较为关键的作用。Teffs 主要功能为增加胰腺免疫反应, 介导对 β 细胞的破坏而致 1 型糖尿病的发生; 而 Tregs 则发挥免疫调节、保护胰岛细胞的作用。既往研究^[4]表明, Tregs 过度累积、功能亢进会导致宿主产生恶性肿瘤等疾病的风险大大增加; 而 Tregs 数量降低及功能缺陷又会诱发多种自身免疫性疾病。

研究^[5-7]显示, 在 Graves 病、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病患者外周血中, Tregs 数量较对照组明显降低。与先前 Michalek et al^[8] 结果类似, 本研究显示, T1DM 患者外周血 Tregs 的数量显著降低, 导致 Tregs 对 Teffs 抑制功能不足, 持续激活患者体内的自身反应性 T 细胞, 进而无法保护正常胰岛细胞受到免疫攻击, 可能是 1 型糖尿病发病的一种起始因素。最近一项研究^[9]指出, 1 型糖尿病患者接受直接输注 Tregs 的干预后, 其 C 肽水平升高, 胰岛细胞功能得到改善。

一直以来, FoxP3 是较公认的 Tregs 的特异性标志, 也是 Tregs 发育过程中必不可少的调控基因^[10]。但是由于 FoxP3 在细胞内表达, 只有破膜后才得以测定。而且, CD127 与 FoxP3 相关性良好, 也是反映 Tregs 比较理想的分子标记^[11]。因此本研究中采用 $CD4^+ CD25^+ CD127^{low/-}$ 作为 Tregs 的免疫标记。

研究^[12]表明, 在多种自身免疫性疾病患者中均发现 Tregs 表达 FoxP3 mRNA 水平减少, 可能导致在一定程度上对于自身反应性 T 细胞抑制能力降低, 不足以维持自身免疫耐受, 是自身免疫性疾病发病的重要因素。另有研究^[13]显示, NOD 鼠转导 TGF- β 使 Foxp3 mRNA 水平高表达后, 胰岛内 Tregs 数目增多, 糖尿病的发生延迟。本研究中, T1DM 患者外周血 FoxP3 mRNA 水平较对照组显著降低, 可能是 1 型糖尿病发病的重要原因之一。

Tregs 可以通过产生具有负向调节作用的细胞因子 IL-10 和 TGF- β , 抑制 Teffs 过度活化, 其中 IL-10 占主要作用^[14]。IL-10 作为一种负性调节因子, 具有较强的免疫调控作用, 主要抑制 Teffs 的增殖和抑制 Teffs 产生细胞因子如 IL-2 等。已有研究^[15]证实, 用 IL-10 干预 NOD 鼠, IL-10 可上调 Tregs 水平, 减少糖尿病的发生。本研究中, T1DM 组患者细胞因子 IL-10 水平显著降低, 从另一方面也反映了 T1DM 组患者 Tregs 存在数量降低或者功能缺陷。此外, T1DM 组患者细胞因子 TGF- β 水平较对照组有所降低, 但无统计学差异, 可能与本研究中样本量偏少有关, 并有待进一步研究证实。

Tregs 不仅数量上降低会导致自身免疫性疾病的发生, 其功能上的缺陷亦是不可忽略的重要因素^[16]。Ferreira et al^[17] 发现, 在 NOD 鼠体内存在 Tregs 数量减少, 且在发生自身免疫糖尿病之前, 就已出现 Tregs 功能异常, 表现为体外不能抑制多克隆活化的 $CD25^+$ 细胞增殖。本实验中, T1DM 患者外周血 Tregs 抑制功能较对照组存在明显缺陷, Teffs 的增殖活化能力增强, 可能是 T1DM 发病的重要因素之一。

综上所述, 初诊 T1DM 患者外周血 Tregs 不仅数量明显降低, 其对 Teffs 的抑制作用亦存在明显缺陷。此外, T1DM 患者外周血 IL-10 浓度和 FoxP3 mRNA 水平降低从另一方面也反映 T1DM 患者 Tregs 存在数量降低和功能缺陷。深入研究 T1DM 患者 Tregs 表达及功能状况, 有可能为研究 T1DM 的发病机制提供新的思路。

参考文献

- [1] Zheng C, Zhou Z, Yang L, et al. Fulminant type 1 diabetes mellitus exhibits distinct clinical and autoimmunity features from classical type 1 diabetes mellitus in Chinese[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011, 27(1): 70-8.
- [2] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains(CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [J]. *J Immunol*, 1995, 155(3): 1151-64.
- [3] Brusko T M, Putnam A L, Bluestone J A. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities [J]. *Immunol Rev*, 2008, 223: 371-90.
- [4] Arpaia N, Green J A, Moltedo B, et al. A distinct function of regulatory T cells in tissue protection [J]. *Cell*, 2015, 162(5): 1078-89.

- [5] Pan D, Shin Y H, Gopalakrishnan G, et al. Regulatory T cells in Graves' disease [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009, 71(4): 587-93.
- [6] Lawson C A, Brown A K, Bejarano V, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+ CD25^{high} regulatory T cell population in peripheral blood [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45(10): 1210-7.
- [7] Lee J H, Wang L C, Lin Y T, et al. Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Immunology*, 2006, 117(2): 280-6.
- [8] Michalek J, Vrabelova Z, Hrotekova Z, et al. Immune regulatory T cells in siblings of children suffering from type 1 diabetes mellitus [J]. *Scand J Immunol*, 2006, 64(5): 531-5.
- [9] Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszyk A, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets—results of one year follow-up [J]. *Clin Immunol*, 2014, 153(1): 23-30.
- [10] Yagi H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells [J]. *Int Immunol*, 2004, 16(11): 1643-56.
- [11] 王会平, 翟志敏, 张爱梅, 等. CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 识别人外周血 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的优势 [J]. *中国免疫学杂志*, 2008, 24(12): 1059-62.
- [12] Pop S M, Wong C P, Culton D A, et al. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFβ1 coexpressing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells during autoimmune diabetes [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(8): 1333-46.
- [13] Jaecel E, von Boehmer H, Manns M P. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes [J]. *Diabetes* 2005, 54(2): 306-10.
- [14] Kaser T, Gerner W, Saalmuller A. Porcine regulatory T cells: mechanisms and T-cell targets of suppression [J]. *Dev Comp Immunol*, 2011, 35(11): 1166-72.
- [15] Yi S, Ji M, Wu J, et al. Adoptive transfer with *in vitro* expanded human regulatory T cells protects against porcine islet xenograft rejection *via* interleukin-10 in humanized mice [J]. *Diabetes*, 2012, 61(5): 1180-91.
- [16] 孙伟莉, 申勇, 李卫鹏, 等. Graves'病患者 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞功能初探 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(2): 202-5.
- [17] Ferreira C, Palmer D, Blake K, et al. Reduced regulatory T cell diversity in NOD mice is linked to early events in the thymus [J]. *J Immunol*, 2014, 192(9): 4145-52.

Quantitation and functional analysis of CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} regulatory T cells in patients with type 1 diabetes mellitus

Liu Xifeng, Wang Yong, Wang Zhitao, et al

(Dept of Endocrinology, The 105th Hospital of PLA, Hefei 230031)

Abstract Objective To investigate the role of regulatory T cells (Tregs) in type 1 diabetes mellitus (T1DM). **Methods** 36 newly diagnosed T1DM patients and 20 healthy controls were involved in this study. Plasma was collected, then density gradient centrifugation was used for separation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low/-} was used as molecular marker for Tregs. Flow cytometry (FCM), RT-PCR and ELISA were used for detecting the Tregs frequency, FoxP3 mRNA expression and concentrations of plasma cytokines IL-10 and TGF-β. The inhibitory effect of Tregs on T effector cells (Teffs) was assayed by CCK-8 proliferation experiment. **Results** The expression of Tregs, FoxP3 mRNA expression and concentration of plasma cytokine IL-10 were significantly decreased in comparison with that in the healthy controls ($P < 0.05$). The inhibitory function of Tregs from T1DM patients was decreased significantly compared with the healthy controls ($P < 0.05$). **Conclusion** The decrease quantitation and function of Tregs may play an important role in the occurrence and development of type 1 diabetes mellitus.

Key words type 1 diabetes mellitus; regulatory T cells; immune tolerance