

老年 2 型糖尿病周围神经病变患者外周血调节性 T 细胞的检测及其临床意义

杨 雪^{1△}, 汤 玮^{2△}, 石勇铨^{2*}

1. 济南军区总医院干部四科, 济南 250031
2. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨 2 型糖尿病(T2DM)周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(Treg)的变化及其检测的临床应用。**方法** 采用流式细胞技术多色荧光分析法,对 20 例初诊老年 2 型 DPN 患者(DPN 组)、20 例初诊老年 T2DM 不伴并发症患者(T2DM 组)及 20 例性别、年龄匹配的健康对照者(CON 组)外周血中 Treg 细胞进行测定,对各组结果进行统计分析并进行比较。**结果** 与 CON 组相比,DPN 组和 T2DM 组患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞数量均减少($P<0.05$),且 DPN 组少于 T2DM 组患者($P<0.05$)。DPN 组患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞比例与密歇根神经病变筛查量表(Michigan neuropathy screening instrument, MNSI)评分呈负相关,但无统计学意义;与密歇根糖尿病神经病变评分量表(Michigan diabetic neuropathy score, MDNS)评分负相关,有统计学意义($r=-0.339, P<0.05$)。**结论** 老年 DPN 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞数量减少,可能在 DPN 的发生、发展中起到一定作用。

[关键词] 2 型糖尿病;糖尿病神经病变;调节性 T 淋巴细胞

[中图分类号] R 785.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)09-1007-05

Detection and clinical significance of regulatory T cells in peripheral blood of elderly patients with type 2 diabetic peripheral neuropathy

YANG Xue^{1△}, TANG Wei^{2△}, SHI Yong-quan^{2*}

1. The Fourth Department of Cadre Ward, General Hospital, PLA Jinan Military Area Command, Jinan 250031, Shandong, China
2. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell (Treg) in the peripheral blood of elderly patients with type 2 diabetic peripheral neuropathy (DPN) and its clinical implication. **Methods** Treg cells were detected by flow cytometry in the peripheral blood of elderly patients with type 2 DPN (DNP group, 20 cases), type 2 diabetes mellitus (T2DM) with no complications (T2DM group, 20 cases) and age-matched healthy volunteers (CON group, 20 cases). The results were statistically analyzed and compared between different groups. **Results** The numbers of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg in DPN group and T2DM group were significantly less than that in the healthy volunteers ($P<0.05$), and the number of Treg cells in DPN group was significantly less than that in T2DM group ($P<0.05$). The proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg was negatively associated with Michigan neuropathy screening instrument (MNSI) scores in DPN group, but with no statistical significance; however, the proportion had a significantly negative correlation with Michigan diabetic neuropathy score ($r=-0.339, P<0.05$). **Conclusion** The number of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg is decreased in the peripheral blood of elderly patients with DPN, which may play a role in the development and progression of DPN in elderly patients.

[Key words] type 2 diabetes mellitus; diabetic neuropathies; regulatory T-lymphocytes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(9):1007-1011]

[收稿日期] 2015-05-17 **[接受日期]** 2015-08-30

[基金项目] 国家自然科学基金(81300672, 81100585). Supported by National Natural Science Foundation of China (81300672, 81100585).

[作者简介] 杨 雪, 硕士, 住院医师. E-mail: quizas1984@163.com; 汤 玮, 博士, 讲师、主治医师. E-mail: a_ginko_tree@126.com

△共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885371, E-mail: young.stone@163.com

随着社会不断进步与发展,人口老龄化现象日益明显。2007~2008 年的 2 型糖尿病(T2DM)患病率的调查结果显示,我国老年人(≥ 60 岁)的患病率已高达 20.4%^[1]。老年人是糖尿病防治的重点人群,老年糖尿病的治疗目的是减少大血管和微血管并发症,以提高生活质量和预期寿命。糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是老年 T2DM 患者最常见的慢性并发症之一,其病程较长,累及范围较广,临床表现多样,常导致糖尿病足的发生,是造成老年糖尿病患者致残、致死的主要原因之一。DPN 发病机制复杂,自身免疫在其中可能起重要作用^[2]。随着年龄增长,机体免疫功能发生调整,而老年 DPN 患者免疫系统的改变情况尚不清楚。本研究拟采用流式细胞技术检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(Treg)在老年 DPN 患者外周血中的比例,探讨其与老年患者 DPN 的关系及可能的临床意义。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 1 月至 2014 年 1 月在长征医院就诊的初诊老年 T2DM 患者 40 例,根据 2010 年中国 T2DM 防治指南诊断标准,将患者分为 DPN 组 20 例,男性 10 例、女性 10 例,平均年龄(71.0 ± 4.6)岁(62~77 岁),病程(7 ± 3)年;T2DM 无并发症组(T2DM 组)20 例,男性 10 例、女性 10 例,平均年龄(69.0 ± 4.9)岁(61~76 岁),病程(3.0 ± 2.5)年;对照组 20 例为长征医院的健康体检者(CON 组),男性 10 例、女性 10 例,平均年龄(71.0 ± 4.3)岁(61~77 岁)。所有对象均排除糖尿病肾病、心脑血管病变、周围血管病等,排除糖尿病急性并发症,排除自身免疫性病变及其他内分泌代谢疾病,排除感染、过敏反应,无严重肝、肾功能损害。本研究通过了长征医院医学伦理学委员会审核批准,并获得患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 一般情况 仔细询问病史、详细体格检查,包括血压、身高、体质量,计算体质指数(BMI)等,并做记录。

1.2.2 DPN 量表评分 采用密歇根糖尿病神经病变评分量表(Michigan diabetic neuropathy score,

MDNS)和密歇根神经病变筛查量表(Michigan neuropathy screening instrument, MNSI)^[3] 对患者的症状和体征进行评价。

1.2.3 实验室检查 单克隆抗体抗 CD4-FITC、CD25-APC 和各阴性对照 IgG 均为美国 Becton Dickinson(BD)公司产品;抗 Foxp3-PE 单抗和染色缓冲液为美国 eBioscience 公司产品。应用美国 BD 公司的 Accuri C6 流式细胞仪进行检测,分析软件为 Cell Quest。

各组受试者近 2 个月内未服用过不明成分中药、乙醇及免疫调节药物,空腹 6 h 后于清晨 8:00 时,应用 EDTA-K₂ 抗凝负压真空采血管采集肘正中静脉血 2 mL,混匀,室温保存。标本在 1 h 内处理。具体步骤如下:取 2 mL 全血,1:1 PBS 稀释;取复温后的人淋巴细胞分离液 3 mL,置于离心管;将 4 mL 稀释后的血液缓铺于淋巴细胞分离液上;1 500 r/min(离心半径为 15 cm)离心 30 min,取中段白色淋巴细胞层;加 PBS 2 mL 后,1 500 r/min(离心半径为 15 cm)离心 10 min,去上清,加 300 μ L DMEM 培养液,加入 CD4-FITC、CD25-APC 标记抗体;加 4℃预冷的 PBS 2 mL 洗 2 遍,1 500 r/min(离心半径为 15 cm)离心 5 min,弃上清;旋涡震荡重悬细胞后加入 1 mL 新鲜制备的固定/破膜剂(1:3 稀释),再次旋涡混匀,4℃避光孵育 60 min;加入破膜剂缓冲液(1:10 稀释)2 mL 孵育 20 min,离心、弃上清;洗涤细胞;加入 2 μ L 正常鼠血清,避光 4℃孵育 15 min;加入 5 μ L Foxp3-PE 标记的抗体,混匀,4℃避光孵育 45 min;用 2 mL 破膜剂缓冲液洗 2 遍,分别离心弃上清,加入 0.5 mL PBS,混匀。取分离好的外周血单核细胞(peripheral mononuclear blood cell, PMBC)上流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 SNK 检验,检验水准(α)=0.05。Treg 细胞比例与 MNSI、MDNS 评分的相关性采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 基线资料的比较 结果(表 1)显示:各组间年

龄、性别比例、BMI、腰臀比(WHR)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)、促甲状腺激素(TSH)等水平差异均无统计学意义;DPN组与T2DM组糖化血红蛋白(HbA1c)水平高于CON组($P<0.05$),但DPN组与T2DM组间HbA1c水平差异无统计学意义。

2.2 各组患者外周血 Treg 细胞比例的比较 流式细胞仪检测结果(图 1)显示:DPN 组和 T2DM 组患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞比例较 CON 组下降($P<0.05$),且 DPN 组较 T2DM 组患者亦下降($P<0.05$)。

表 1 各组间研究对象基线资料的对比

n=20			
指标	糖尿病周围神经病变组	2 型糖尿病无并发症组	健康对照组
男/女 n/n	10/10	10/10	10/10
年龄(岁), $\bar{x}\pm s$	71.0 $\pm$ 4.6	69.0 $\pm$ 4.9	71.0 $\pm$ 4.3
体质指数(kg·m ⁻²), $\bar{x}\pm s$	26.90 $\pm$ 2.37	27.90 $\pm$ 2.06	26.70 $\pm$ 2.32
腰臀比 $\bar{x}\pm s$	0.98 $\pm$ 0.10	1.02 $\pm$ 0.12	0.99 $\pm$ 0.09
糖化血红蛋白(%), $\bar{x}\pm s$	7.50 $\pm$ 1.07*	7.50 $\pm$ 1.03*	5.70 $\pm$ 0.32
低密度脂蛋白胆固醇 c _B /(mmol·L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	4.07 $\pm$ 0.89	4.11 $\pm$ 0.52	3.99 $\pm$ 0.83
促甲状腺激素 z _B /(mIU·L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	3.31 $\pm$ 0.64	3.08 $\pm$ 0.77	3.25 $\pm$ 0.58
吸烟/不吸烟 n/n	4/16	5/15	5/15

* $P<0.05$ 与健康对照组比较

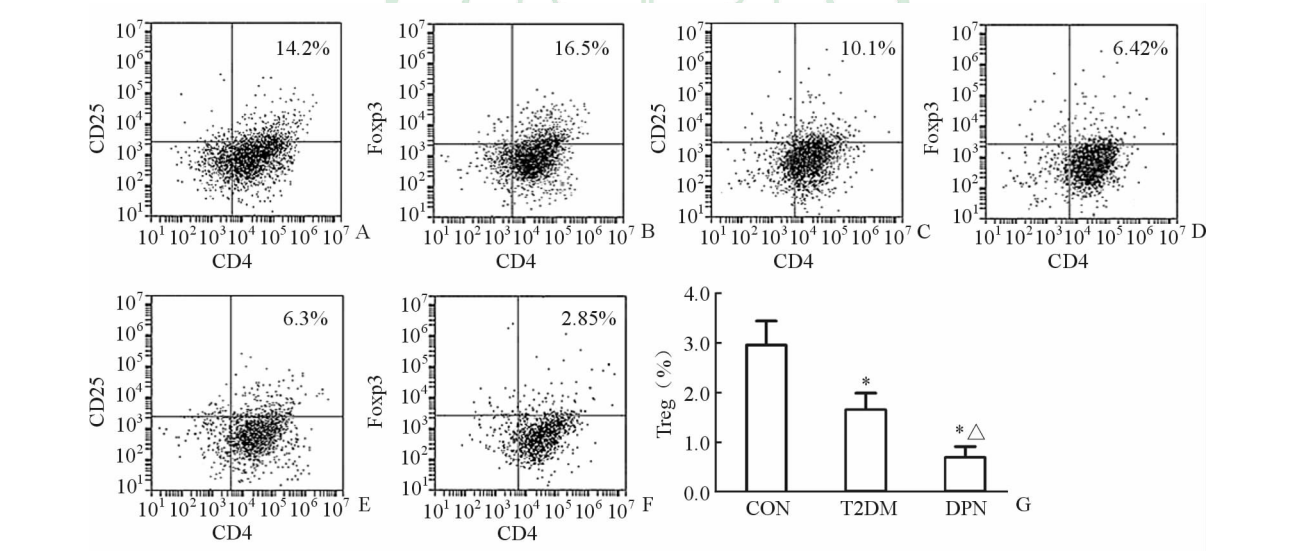


图 1 各组外周血中 Treg 细胞比例的比较

A、B: 健康对照组(CON); C、D: 2 型糖尿病无并发症(T2DM); E、F: 糖尿病周围神经病变(DPN); G: 统计分析结果, * $P<0.05$ 与 CON 组比较; $\Delta P<0.05$ 与 T2DM 组比较; $n=20$, $\bar{x}\pm s$

2.3 患者 MDNS、MNSI 评分与外周血 Treg 细胞相关性分析 结果显示:DPN 组外周血 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞比例与 MNSI 评分(5.9 ± 1.69)呈负相关,但差异无统计学意义($r=-0.208$, $P=0.19$),而与 MDNS 评分(22.6 ± 6.72)呈负相关,并且差异有统计学意义($r=-0.399$, $P=0.041$)。

3 讨论

CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是调控机体免疫反应的重要 T 细胞功能亚群,可通过主动调节的方式抑制自身反应性 T 细胞的活化与增殖,对维持自身免疫耐受和避免免疫过度损伤机体有重要意义。CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞数量上的增高或降低都可

能导致机体平衡被打破,免疫功能紊乱,从而导致疾病发生。近年来研究表明,CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞在风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、重症肌无力、病毒性肝炎疾病中发挥重要致病作用^[4-6]。

在机体衰老的过程中,免疫系统进行性减退是其重要生理变化之一。随着年龄增长,Treg 细胞的数量和功能会发生变化,而这种变化可能参与了老年人疾病的发生、发展。CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞表达多种表面分子,Foxp3 是目前公认的 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞的特异性标志。Zhao 等^[7]研究发现,与幼鼠相比,老龄小鼠胸腺中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞数量显著下降,但其较胸腺 CD4 单阳性细胞的比例增加,说明相对于胸腺中其他细胞,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞更耐受衰老。有关人 Treg 细胞与衰老的研究亦显示,老年人与青年人外周血 Treg 细胞数量水平相似,而 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 比例显著降低^[8]。

糖尿病是一种以高血糖为特点的常见慢性病,T2DM 患者的胰岛素合成、分泌、作用缺陷破坏了糖稳态,可能出现高血糖、糖毒性及糖尿病并发症^[9]。除了遗传、环境因素外,越来越多的证据提示免疫功能紊乱可能参与了 T2DM 的发病。Mahmoud 等^[10]发现,T2DM 患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 等 T 细胞数目减少,与本实验中老年 T2DM 患者 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 比例与正常健康对照组相比降低结果一致,提示免疫功能紊乱与 T2DM 的发生、发展有关。

糖尿病及其慢性并发症的发生发展与慢性免疫和炎症反应密切相关^[11]。Zhang 等^[12]研究表明,外周血 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞比例在 T2DM 肾病并发症患者中显著减少,与糖尿病肾病的病情进展显著相关,提示低水平的 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞可能是糖尿病并发症发生发展重要病因。DPN 患者周围神经典型病理改变为轴索变性和节段性脱髓鞘损害。Milicevic 等^[13]对糖尿病性神经病变患者的腓肠神经进行活检,在神经束膜和神经内膜处发现免疫球蛋白 IgG、IgM 和补体沉积,证实糖尿病时神经组织自身免疫性损伤的原因可能与高血糖引起神经血管屏障破坏,导致机体对某些神经组织产生免疫反应有关。本课题组前期研究亦显示,DPN 患者周围神经存在 T 淋巴细胞浸润,亦提示其发生发展可

能与免疫紊乱有一定的关系^[14]。

本研究结果证实,老年 DPN 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞水平明显低于单纯 2 型糖尿病患者及健康对照者,且 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞比例与 DPN 病情评分负相关。我们推测,随着机体衰老,高糖环境加重了免疫系统功能异常,易诱发并发症。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞的持续减少可能在 DPN 病变的发生和加重过程中发挥重要作用。然而,本研究尚有一定的局限性,需要在今后的研究中扩大样本量,探讨糖尿病不同病程、糖尿病神经病变亚组(特别是痛性神经病变作为临床关注的重点之一)以及性别差异与 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞水平的关系,进一步揭示 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞在老年 DPN 中的作用,为临床应用提供理论基础。

随着人口老龄化,机体免疫系统衰老到一定程度,老年人患病概率大大增加。T2DM 患者易出现多种代谢紊乱和免疫功能异常,老年 T2DM 患者外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞比例显著下降,诱发持续存在的轻度慢性炎症及免疫功能异常加重,导致患者并发周围神经病变的危险性显著增加。因此,对老年 T2DM 患者免疫功能监测和调节应予重视,对外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞比例的监测有助于对糖尿病及其慢性并发症,尤其是 DPN 做出早期诊断和准确预测。通过研究调控 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞比例的机制,对今后探索 DPN 治疗策略和方法提供了有益的启迪。调节老年 DPN 患者体内 Treg 水平的平衡,以改善机体免疫炎症状态,对最终实现防治 DPN 发生发展的目的有重要意义。

[参考文献]

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, Ji L, Xiao J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362: 1090-1101.
- [2] Tang W, Lv Q, Chen X F, Zou J J, Liu Z M, Shi Y Q. CD8⁺ T cell-mediated cytotoxicity toward Schwann cells promotes diabetic peripheral neuropathy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32: 827-837.
- [3] Feldman E L, Stevens M J, Thomas P K, Brown M B, Canal N, Greene D A. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment

- p>for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy [J]. Diabetes Care, 1994, 17: 1281-1289.
- [4] Haque M, Fino K, Lei F, Xiong X, Song J. Utilizing regulatory T cells against rheumatoid arthritis [J]. Front Oncol, 2014, 4: 209.
- [5] Xu W H, Zhang A M, Ren M S, Zhang X D, Wang F, Xu X C, et al. Changes of Treg-associated molecules on CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in myasthenia gravis and effects of immunosuppressants[J]. J Clin Immunol, 2012, 32: 975-983.
- [6] Zhai N, Chi X, Li T, Song H, Li H, Jin X, et al. Hepatitis C virus core protein triggers expansion and activation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in chronic hepatitis C patients[J]. Cell Mol Immunol, 2014 Dec 22. doi: 10. 1038/cmi. 2014. 119. [Epub ahead of print]
- [7] Zhao L, Sun L, Wang H, Ma H, Liu G, Zhao Y. Changes of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in aged BALB/c mice[J]. J Leukoc Biol, 2007, 81: 1386-1394.
- [8] Chatila T A. Role of regulatory T cells in human diseases[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116: 949-959.
- [9] Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Diabetic patients have an increased risk of vertebral fractures independent of BMD or diabetic complications[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24: 702-709.
- [10] Mahmoud F, Al-Ozairi E. Inflammatory cytokines and the risk of cardiovascular complications in type 2 diabetes[J]. Dis Markers, 2013, 35: 235-241.
- [11] Bour-Jordan H, Salomon B L, Thompson H L, Szot G L, Bernhard M R, Bluestone J A. Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells[J]. J Clin Invest, 2004, 114: 979-987.
- [12] Zhang C, Xiao C, Wang P, Xu W, Zhang A, Li Q, et al. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus; relationship with diabetic nephropathy[J]. Hum Immunol, 2014, 75: 289-296.
- [13] Milicevic Z, Newlon P G, Pittenger G L, Stansberry K B, Vinik A I. Anti-ganglioside GM1 antibody and distal symmetric “diabetic polyneuropathy” with dominant motor features[J]. Diabetologia, 1997, 40: 1364-1365.
- [14] 汤 玮, 闫 倩, 梁 翠, 宋 艳, 邹俊杰, 刘志民, 等. 高糖激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路诱导 CD8⁺ T 淋巴细胞表达辅助性 T 淋巴细胞 1 型趋化因子受体 3[J]. 上海医学, 2013, 36: 438-440.

[本文编辑] 贾泽军