

• 论 著 •

Vδ2 T 细胞在 2 型糖尿病中的功能及临床研究*

陈 康,傅 强,卢建强,王伟佳[△]

(广东省中山市人民医院检验医学中心,广东中山 528403)

摘 要:**目的** 探讨 Vδ2 T 细胞在 2 型糖尿病中的功能并与临床指标进行相关性分析。**方法** 收集 2018 年 6 月至 2019 年 6 月在该院诊治的 40 例 2 型糖尿病患者(2 型糖尿病组)和 35 例体检健康者(健康对照组),采用流式细胞术检测 2 型糖尿病组和健康对照组 Vδ2 T 细胞的比例;采用 CD4 磁珠阴性分选法和流式细胞术分选法分选 2 型糖尿病组和健康对照组 Vδ2 T 细胞,体外刺激后采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞因子白细胞介素(IL)-17 和干扰素-γ(IFN-γ)水平;统计分析 Vδ2 T 细胞的比例与空腹血糖、糖化血红蛋白和空腹 C 肽的相关性。**结果** 2 型糖尿病组空腹血糖和糖化血红蛋白水平高于健康对照组,提示血糖控制不佳。流式细胞术结果显示,Vδ2 T 细胞的数量在 2 型糖尿病组中降低;ELISA 结果显示,在 2 型糖尿病组 Vδ2 T 细胞释放的 IL-17 和 IFN-γ 减少。相关性分析发现,Vδ2 T 细胞的比例与空腹血糖和糖化血红蛋白水平呈负相关($r = -0.411, -0.324; P < 0.05$),与空腹 C 肽无相关性($P > 0.05$)。**结论** 在 2 型糖尿病中 Vδ2 T 细胞的数量和细胞因子释放的功能均降低,且 Vδ2 T 细胞的数量与空腹血糖和糖化血红蛋白水平呈负相关,提示 Vδ2 T 细胞可能与糖尿病患者血糖控制情况存在相关性。

关键词: 2 型糖尿病; Vδ2 T 细胞; 空腹血糖; 糖化血红蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.13.006

中图法分类号: R587.1

文章编号: 1673-4130(2020)13-1560-04

文献标识码: A

The function and clinical study of Vδ2 T cell in patients with type 2 diabetes mellitus*

CHEN Kang, FU Qiang, LU Jianqiang, WANG Weijia[△]

(Center of Laboratory Medicine, People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract:**Objective** To explore the function of Vδ2 T cells in patients with type 2 diabetes mellitus and to analyze the correlation between Vδ2 T cells and clinical indexes.**Methods** According to the criteria of diagnosis and elimination of type 2 diabetes mellitus, 40 cases of type 2 diabetes mellitus and 35 healthy persons from June 2018 to June 2019 in the hospital were collected in the study. Flow cytometry was used to detect the proportion of Vδ2 T cells in type 2 diabetes mellitus group and healthy control group. Vδ2 T cells were selected from patients with type 2 diabetes mellitus group and healthy control group by CD4 magnetic beads negative sorting and flow cytometry. The levels of interleukin (IL)-17 and interferon-γ (IFN-γ) were detected by ELISA after stimulation in vitro. The correlation between the proportion of Vδ2 T cells and fasting blood glucose, glycosylated hemoglobin and fasting C-peptide was analyzed statistically.**Results** The levels of fasting blood glucose and glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic group were higher than those in healthy control group. Flow cytometry results showed that the number of Vδ2 T cells decreased in type 2 diabetes mellitus group. The results of ELISA showed that IL-17 and IFN-γ released by Vδ2 T cells decreased in type 2 diabetes mellitus group. Correlation analysis showed that the proportion of Vδ2 T cells was negatively correlated with fasting blood glucose and glycosylated hemoglobin ($r = -0.411, -0.324; P < 0.05$), but was not correlated with fasting C-peptide ($P > 0.05$).**Conclusion** The number of Vδ2 T cells and its cytokine secretion ability are decreased in patients with type 2 diabetes mellitus, and the number of Vδ2 T cells are negatively correlated with fasting blood glucose and glycosylated hemoglobin, suggesting that Vδ2 T cells may be correlated with the control of glucose in patients with type 2 diabetes mellitus.

Key words: type 2 diabetes mellitus; Vδ2 T cells; fasting blood glucose; hemoglobin A1c

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81401645);广东省医学科研基金项目(B2014447);中山市科技计划重大项目(2017B1009);中山市科技计划一般项目(2014A1FC098)。

作者简介:陈康,女,副主任技师,主要从事临床免疫检验工作。 [△] 通信作者, E-mail: wwj0760@163.com。

本文引用格式:陈康,傅强,卢建强,等. Vδ2 T 细胞在 2 型糖尿病中的功能及临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(13): 1560-1562.

2 型糖尿病是以血糖增高为特点的一种代谢紊乱性疾病。据报道,全国近 5 000 万人患有 2 型糖尿病,且预测在 22 世纪患病人数可达到 6 000 多万^[1-2]。研究报道,初始免疫应答和适应性免疫应答参与 2 型糖尿病的发生、发展^[3]。Vδ2 T 细胞是具有抗原提呈功能,参与初始免疫应答的 γδT 细胞亚群,占 γδT 细胞的 80%^[4]。Vδ2 T 细胞通过识别坏死细胞的非肽类抗原成分,释放炎症因子如白细胞介素(IL)-17 和干扰素-γ(IFN-γ),激活初始 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞转换为效应 T 细胞^[5-7]。研究报道,Vδ2 T 细胞可发挥感染免疫的作用^[8-9],参与脊柱关节炎的发生^[10],γδT 细胞的数量在 1 型糖尿病患者体内降低,提示其与 1 型糖尿病的致病相关^[11]。然而,Vδ2 T 细胞在 2 型糖尿病中的作用尚不清楚。本研究旨在探讨 Vδ2 T 细胞在 2 型糖尿病中的功能及与临床指标的相关性。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 6 月至 2019 年 6 月来本院内分泌科就诊的 40 例 2 型糖尿病患者作为 2 型糖尿病组,其中男 25 例、女 15 例,平均年龄(55.5±14.7)岁。2 型糖尿病的诊断符合世界卫生组织颁布的诊断标准,且患者未合并其他疾病。排除标准:恶性肿瘤、自身免疫性疾病、急慢性感染、急性并发症。收集同期本院体检的健康体检者 35 例为健康对照组,其中男 16 例、女 19 例,平均年龄(55.6±11.0)岁,两组间性别和年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 流式细胞术检测 Vδ2 T 细胞亚群的比例 采用密度梯度离心法分离所有研究对象单个核细胞,裂解红细胞后,制备单个核细胞悬液,加入 Pacific Blue 标记的小鼠抗人 CD3 抗体(货号:558124,美国 BD 公司)和 FITC 标记的小鼠抗人 Vδ2 TCR 流式抗体(货号:562088,美国 BD 公司),避光孵育 30 min,FACS-

Canto II 进行流式检测,FlowJo 软件进行结果分析。

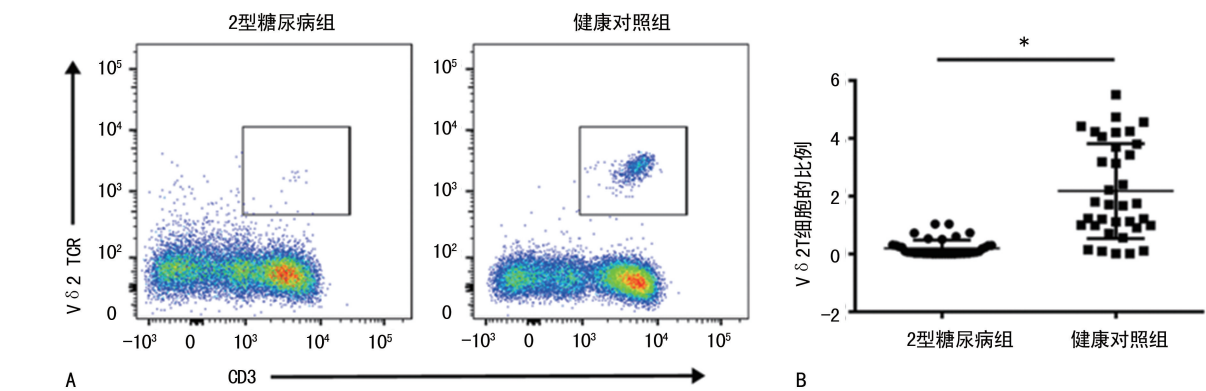
1.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 Vδ2 T 细胞 IL-17 和 IFN-γ 的分泌 收集所有研究对象的单个核细胞,采用 CD4⁺ 阴性磁珠分离试剂盒(货号:MAGH102,R&D 公司)去除 CD4⁺ T 细胞,FACSria 流式分选出 Vδ2 T 细胞。将分选后的细胞铺入细胞培养板中,加入 50 ng/mL 波醇酯(PMA,货号:P1585, Sigma 公司)和 1 mg/mL 离子霉素(ionomycin,货号:407953, Sigma 公司)刺激 6 h,收集细胞培养上清液,采用 ELISA 检测 IL-17 和 IFN-γ 的水平(货号:D1700 和 DIF50,R&D 公司)。

1.4 空腹血糖、空腹 C 肽和糖化血红蛋白的检测 收集两组的血清,采用西门子 ADVIA2400 生化分析仪检测空腹血糖;采用西门子 CENTAUR XP 生化分析仪检测空腹 C 肽的水平。收集两组乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血采用 BIO-RAD 糖化血红蛋白测定仪,检测糖化血红蛋白的水平。

1.5 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计分析软件进行数据分析,采用非配对 t 检验的方法分析两组之间的差异,采用 Pearson 进行相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基本信息比较 2 型糖尿病组中空腹血糖水平为(9.36±3.40)mmol/L,糖化血红蛋白水平为(8.32±2.25)%,均高出参考值范围;且 2 型糖尿病组的空腹血糖水平明显高于健康对照组[(4.95±0.35)mmol/L],差异有统计学意义($P<0.001$);糖化血红蛋白水平明显高于健康对照组[(4.78±0.34)%],差异有统计学意义($P<0.001$)。2 型糖尿病组空腹 C 肽水平为(1.42±0.9)ng/mL,在参考值范围内,但低于健康对照组[(1.76±0.38)ng/mL],差异有统计学意义($P<0.05$)。



注:A 为代表性的流式细胞术的结果;B 为 Vδ2 T 细胞比例的统计分析;* 表示 $P<0.001$ 。

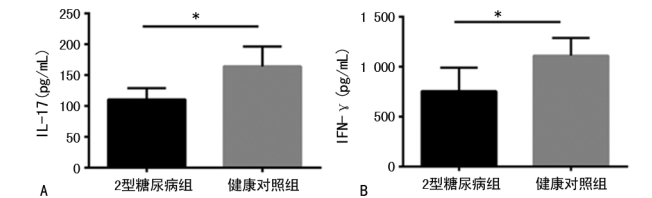
图 1 在 2 型糖尿病组和健康对照组中 Vδ2 T 细胞比例的差异

2.2 2 型糖尿病组和健康对照组中 Vδ2 T 细胞比例的差异 结果显示,2 型糖尿病组中 Vδ2 T 细胞比例

为(0.20±0.28)%,明显低于健康对照组[(2.17±1.64)%],差异有统计学意义($P<0.001$)。以 CD3

标记淋巴细胞, V δ 2 TCR 标记 V δ 2 T 细胞, 流式细胞术的结果显示, 在 2 型糖尿病组和健康对照组中, CD3 和 V δ 2 TCR 双阳性细胞的比例分别为 0.13% 和 3.20%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.3 两组 V δ 2 T 细胞分泌细胞因子的情况 结果发现, 相较于健康对照组, 2 型糖尿病组中 V δ 2 T 细胞比例明显下降, 进一步用磁珠阴性分选法和流式细胞术分选法分选 V δ 2 T 细胞, 用 ELISA 检测细胞因子 IL-17 和 IFN- γ 水平时发现, 2 型糖尿病组中 V δ 2 T 细胞分泌的 IL-17 和 IFN- γ 水平均低于健康对照组, 见图 2。



注: A 为在 2 型糖尿病组和健康对照组中 V δ 2 T 细胞分泌 IL-17 的情况; B 为在 2 型糖尿病组和健康对照组中 V δ 2 T 细胞分泌 IFN- γ 的情况; * 表示 $P < 0.01$ 。

图 2 两组 V δ 2 T 细胞分泌细胞因子的情况

2.4 V δ 2 T 细胞与空腹血糖、糖化血红蛋白和空腹 C 肽相关性分析 相关性分析发现, V δ 2 T 细胞比例与空腹血糖水平呈负相关 ($r = -0.411, P < 0.01$); 与糖化血红蛋白水平呈负相关 ($r = -0.324, P < 0.05$); 进一步分析 V δ 2 T 细胞是否与患者的胰岛 β 细胞的功能相关, 结果发现 V δ 2 T 细胞比例与空腹 C 肽水平无相关性 ($r = 0.062, P > 0.05$)。

3 讨论

2 型糖尿病在全球普遍发病率高, 且呈逐年增长的趋势^[1-2]。2 型糖尿病患者免疫功能紊乱是疾病发生、发展的重要原因^[3]。V δ 2 T 细胞是一类具有抗原提呈功能的 T 细胞亚群, 是初始免疫应答和适应性免疫应答的桥梁, 可发挥抗感染的作用, 也可参与疾病的发生^[4-11]。然而, V δ 2 T 细胞在 2 型糖尿病中的作用未知。本研究发现, V δ 2 T 细胞在 2 型糖尿病患者中数量减少, 其细胞因子释放功能降低, 且与空腹血糖和糖化血红蛋白水平呈负相关 ($r = -0.411, -0.324; P < 0.05$)。

T 细胞分为两个主要的亚群, $\alpha\beta$ T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞。 $\alpha\beta$ T 细胞参与适应性免疫应答, 主要包括 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞^[12]。 $\gamma\delta$ T 细胞是初始免疫应答和适应性免疫应答的桥梁, 其中 V δ 2 T 细胞占 $\gamma\delta$ T 细胞的 80%^[4]。研究报道, $\gamma\delta$ T 细胞的数量在 1 型糖尿病患者体内降低, 提示与 1 型糖尿病的致病相关^[11]。在 2 型糖尿病中, T 细胞的数量和功能紊乱, CD4⁺ T 细胞分化的促炎性的 Th1 细胞和 Th17 细胞以及抑炎性的 Treg 细胞和 Th2 细胞比例紊乱, 导致患者系统炎症和胰岛素耐受^[13-14]。CD8⁺ T 细胞通过

诱导巨噬细胞的迁移促进疾病的发生^[15]。而在 2 型糖尿病患者中 V δ 2 T 细胞的数量和功能如何变化鲜有报道。本研究发现在 2 型糖尿病患者中 V δ 2 T 细胞的数量减少, 且其分泌的细胞因子 IL-17 和 IFN- γ 减少。研究报道, 肥胖引起的慢性炎症中, V δ 2 T 细胞释放的细胞因子 IL-17 减少, 不能有效发挥抗感染的作用^[16]。本研究发现, 在 2 型糖尿病患者中 V δ 2 T 细胞数量减少, 分泌的细胞因子 IL-17 和 IFN- γ 减少, 这提示 V δ 2 T 细胞可能与 2 型糖尿病易于继发感染有关。

作为抗原提呈细胞, V δ 2 T 细胞可在非肥胖糖尿病小鼠动物模型中识别胰岛素肽段 B:9-23, 释放 IL-17 和 IFN- γ , 促进 1 型糖尿病发病^[17-18]。空腹 C 肽是反映胰岛 β 细胞功能的指标之一, 相关性分析发现 V δ 2 T 细胞的比例与空腹 C 肽无相关性。这提示在 2 型糖尿病患者中 V δ 2 T 细胞数量与胰岛 β 细胞功能无相关性, 究其原因可能是 V δ 2 T 细胞减少不能发挥有效的自身抗体识别功能。同样, 本研究发现 V δ 2 T 细胞比例与空腹血糖和糖化血红蛋白水平呈负相关, 这提示 V δ 2 T 细胞可能与 2 型糖尿病血糖控制情况相关。

4 结论

本研究检测了 2 型糖尿病组和健康对照组 V δ 2 T 细胞的比例和功能并进行相关性分析, 结果发现在 2 型糖尿病患者中 V δ 2 T 细胞比例减少, 释放的细胞因子减少, 且与空腹血糖和糖化血红蛋白水平呈负相关。

参考文献

- [1] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 138(3): 271-281.
- [2] OGURTSOVA K, DA ROCHA FERNANDES J D, HUANG Y, et al. IDF diabetes Atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2017, 128(6): 40-50.
- [3] ZHOU T, HU Z, YANG S, et al. Role of adaptive and innate immunity in type 2 diabetes mellitus [J]. J Diabetes Res, 2018, 2018: 1-9.
- [4] BRANDES M, WILLIMANN K, MOSER B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells [J]. Science, 2005, 309(5732): 264-268.
- [5] ZOU C, ZHAO P, XIAO Z, et al. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy [J]. Oncotarget, 2017, 8(5): 8900-8909.
- [6] BRANDES M, WILLIMANN K, BIOLEY G, et al. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8⁺ alphabeta T cell responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(7): 2307-2312.
- [7] PETRASCA A, DOHERTY D G. Human V δ 2(+) $\gamma\delta$ T cells differentially induce maturation, cytokine production, and alloreactive T cell stimulation by dendritic cells and B cells [J]. Front Immunol, 2014, 5(1): 650-655. (下转第 1567 页)

- [6] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版)[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2015, 30(3):26-89.
- [7] 中国医师协会内分泌代谢科医师分会. 中国胰岛素泵治疗指南(2014 版)节选(下)[J]. 糖尿病天地(临床), 2014, 8(9):404-409.
- [8] 苗润, 李万根, 麦坤仪, 等. 老年 2 型糖尿病患者血糖控制情况及影响因素[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(4):828-830.
- [9] 许献荣, 倪俊, 陈瑞彩, 等. 难愈性创面修复手术疗效及其影响因素分析[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2017, 12(3):236-239.
- [10] PÉREZ-GARCÍA L, GOÑI-IRIARTE M J, GARCÍA-MO URIZ M. Comparison of treatment with continuous subcutaneous insulin infusion versus multiple daily insulin injections with bolus calculator in type 1 diabetes[J]. Endocrinol Nutr, 2015, 62(7):331-337.
- [11] BETHEL M A, ENGEL S S, GREEN J B, et al. Assessing the safety of sitagliptin in older participants in the trial evaluating cardiovascular outcomes with sitagliptin (TECOS)[J]. Diabetes Care, 2017, 40(4):494-501.
- [12] VILLA-RODRIGUEZ J A, AYDIN E, GAUER J S, et al. Green and chamomile Teas, but not acarbose, attenuate glucose and fructose transport via inhibition of GLUT2 and GLUT5[J]. Mol Nutr Food Res, 2017, 61(12):145-157.
- [13] MORI A, UEDA K, LEE P, et al. Effect of acarbose, sitagliptin and combination therapy on blood glucose, insulin, and incretin hormone concentrations in experimentally induced postprandial hyperglycemia of healthy cats[J]. Res Vet Sci, 2016, 106(4):131-134.
- [14] 范丹, 冯湘生, 曹妃. 西格列汀联合阿卡波糖治疗难治性 2 型糖尿病患者效果分析[J]. 医学综述, 2015, 15(14):2639-2641.
- [15] 王素莉, 李敬华, 孙冠媛, 等. 短期胰岛素泵强化对初诊 2 型糖尿病并阿尔茨海默病患者氧化应激及炎症反应的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(4):406-408.
- [16] 徐海波, 闫晓光, 钟威. 新诊断 2 型糖尿病患者血清 Nesfatin-1、肿瘤坏死因子- α 水平与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(1):45-48.
- [17] 巫小燕, 李锐, 吴丽群, 等. 妊娠期糖尿病患者血清 NUCB/nesfatin-1 水平的变化[J]. 实用医学杂志, 2014, 14(6):912-914.
- [18] 中华护理学会糖尿病专业委员会. 高血糖患者围手术期血糖护理工作指引[J]. 中华护理杂志, 2017, 64(7):794-798.
- [19] 陈宽林, 卓铁军, 王健, 等. 沙格列汀对 2 型糖尿病 Nesfatin-1 分泌及代谢调节的临床研究[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(13):68-74.
- [20] FEI Y, SUN L Q, YUAN C G, et al. CFTR ameliorates high glucose-induced oxidative stress and inflammation by mediating the NF- κ B and MAPK signaling pathways in endothelial cells[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(6):3501-3508.

(收稿日期:2019-10-18 修回日期:2019-12-13)

(上接第 1562 页)

- [8] KULICKE C A, LEWINSOHN D A, LEWINSOHN D M. Clonal enrichments of $\gamma\delta$ -T cells in Mycobacterium tuberculosis-infected human lungs[J]. J Clin Invest, 2019, 130(1):68-70.
- [9] HANNAWAY R F, WANG X, SCHNEIDER M, et al. Mucosal-associated invariant T cells and $\gamma\delta$ -T cells in community acquired pneumonia: association of abundance in sputum with clinical severity and outcome[J]. Clin Exp Immunol, 2019, 199(2):201-215.
- [10] CUTHBERT R J, WATAD A, FRAGKAKIS E M, et al. Evidence that tissue resident human enthesitis $\gamma\delta$ -T-cells can produce IL-17A independently of IL-23R transcript expression [J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(11):1559-1565.
- [11] ZUBKIEWICZ-KUCHARSKA A, NOCZYNSKA A. Abnormal distribution of gamma-delta T lymphocytes and their subsets in type 1 diabetes[J]. Adv Clin Exp Med, 2016, 25(4):665-671.
- [12] NIKOLICH-ZUGICH J, SLIFKA M K, MESSAOUDI I. The many important facets of T-cell repertoire diversity [J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(2):123-132.
- [13] MCLAUGHLIN T, LIU L, LAMENDOLA C, et al. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(12):2637-2643.
- [14] SELL H, HABICH C, ECKEL J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance[J]. Nat Rev Endocrinol, 2012, 8(12):709-716.
- [15] NISHIMURA S, MANABE I, NAGASAKI M, et al. $CD8^{+}$ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity[J]. Nat Med, 2009, 15(8):914-920.
- [16] COSTANZO A E, TAYLOR K R, DUTT S, et al. Obesity impairs $\gamma\delta$ -T cell homeostasis and antiviral function in humans[J]. PLoS One, 2015, 10(3):e0120918.
- [17] ZHANG L, JIN N, NAKAYAMA M, et al. Gamma delta T cell receptors confer autonomous responsiveness to the insulin-peptide B: 9-23 [J]. J Autoimmun, 2010, 34(4):478-484.
- [18] MARKLE J G, MORTIN-TOTH S, WONG A S, et al. $\gamma\delta$ -T cells are essential effectors of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model[J]. J Immunol, 2013, 190(11):5392-5401.

(收稿日期:2019-10-20 修回日期:2019-12-24)