

## 2 型糖尿病伴冠心病患者外周血 Th17 和 Treg 细胞水平

化晓莉<sup>1</sup>, 刘志明<sup>1</sup>, 夏思良<sup>2</sup>, 杨莉<sup>1</sup>

1. 南通大学附属南京江北人民医院检验科, 江苏 南京 210048;

2. 南通大学附属南京江北人民医院心内科, 江苏 南京 210048

**摘要:** **目的** 检测 2 型糖尿病 (T2DM) 合并冠状动脉粥样硬化性心脏病 (CHD) 患者外周血调节性 T 细胞 (Treg)、辅助性 T 细胞 (Th) 17 水平的变化, 分析其与 T2D 合并 CHD 的关系。 **方法** 选取 2017 年 11 月到 2019 年 4 月南京江北人民医院心内科收治的 84 例疑似 CHD 的 T2DM 患者, 根据冠状动脉造影结果将其分为 T2DM 并 CHD 组 (43 例) 和 T2DM 组 (未合并 CHD, 41 例), 同时选择 40 例健康体检者为对照组。采用流式细胞术检测三组受试者外周血 Th17 细胞、Treg 细胞比例, 用 ELISA 方法检测白细胞介素 (IL)-17A、IL-10 水平。 **结果** Th17 细胞比例、IL-17A 水平呈 T2DM 并 CHD 组 > T2DM 组 > 对照组, 差异有统计学意义 ( $P$  均 < 0.01); Treg 细胞比例、IL-10 水平 T2DM 合并 CHD 组分别低于 T2DM 组和对照组 ( $P$  均 < 0.05)。 **结论** T2DM 合并 CHD 患者 Treg 细胞显著降低, Th17 细胞显著升高, 这可能与 T2DM 患者 CHD 的发生发展有关。

**关键词:** 冠状动脉粥样硬化性心脏病; 2 型糖尿病; 调节性 T 细胞; 辅助性 T 细胞 17

**中图分类号:** R 587.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2020)10-1370-03

### Levels of Th17 and Treg cells in peripheral blood of patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease

HUA Xiao-li\*, LIU Zhi-ming, XIA Si-liang, YANG-Li

\* Department of Clinical Laboratory, Nanjing Jiangbei People's Hospital Affiliated to Nantong University, Nanjing, Jiangsu 210048, China

Corresponding author: YANG Li, E-mail: 8371336@163.com

**Abstract: Objective** To detect the levels of regulate T (Treg) cells and helper T (Th) 17 cells in peripheral blood of type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients complicated with coronary atherosclerotic heart disease (CHD) and analyze the relationship between them. **Methods** Eighty-four T2DM patients treated in Nanjing Jiangbei People's Hospital from November 2017 to April 2019 were selected and divided into T2DM combined with CHD group ( $n=43$ ) and T2DM group (without CHD,  $n=41$ ) according to the results of coronary angiography. At the same time, 40 healthy people were served as control group. Flow cytometry was used to detect the percentages of Treg cells and Th17 cells in peripheral blood, and ELISA was used to detect the levels of IL-10 and IL-17. **Results** The proportion of Th17 cells and the level of IL-17A were in the order of T2DM combined with CHD group > T2DM group > control group (all  $P < 0.01$ ); the percentage of Treg cells and the level of IL-10 were significantly higher than those in T2DM group and control group (all  $P < 0.05$ ), respectively. **Conclusion** In T2DM patients complicated with CHD, the decrease of Treg cells and the increase of Th17 cells may be related to the occurrence and development of CHD.

**Key words:** Coronary atherosclerotic heart disease; Type 2 diabetic mellitus; Regulate T cells; Helper T 17 cells

**Fund program:** General Project of Nanjing Medical Science and Technology Development Plan (YKK16264)

糖尿病患者发生冠状动脉粥样硬化性心脏病 (CHD) 的几率是非糖尿病患者的 2~4 倍, 心内并发症是糖尿病患者的主要并发症及死亡原因, 严重影响到患者的生活质量及预期寿命<sup>[1]</sup>。目前越来越多的

证据表明动脉粥样硬化是一种免疫调节下的炎性反应性疾病<sup>[2]</sup>, 固有免疫细胞及适应性免疫细胞均参与动脉粥样硬化的发生发展<sup>[3-4]</sup>。辅助性 T 细胞 (Th) 17 和调节性 T 细胞 (Treg) 由初始 CD4<sup>+</sup> T 淋巴

细胞分化而来<sup>[5]</sup>。已有研究显示, Th17 及 Treg 细胞在糖尿病、CHD 等的发生发展中均有重要作用<sup>[6-8]</sup>。因此, 本研究观察 2 型糖尿病 (T2DM) 合并 CHD 患者外周血 Th17 细胞、Treg 细胞水平变化。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 11 月至 2019 年 4 月南京江北人民医院心内科收治的 84 例疑似 CHD 的 2 型糖尿病 (T2DM) 患者, 根据冠状动脉造影 (CAG) 结果将其分为 T2DM 并 CHD 组 (43 例) 和 T2DM 组 (未合并 CHD, 41 例), 同时选择 40 例健康体检者作为对照组。纳入标准: (1) T2DM 患者诊断均符合 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准; (2) CHD 经 CAG 明确诊断。排除患有急性心肌梗死、心力衰竭、严重心律失常及严重心脏、肿瘤、慢性疾病、免疫性疾病、严重肝肾功能不全、精神疾病、对碘或造影剂过敏者。三组年龄、性别等一般资料比较差异无统计学意义 ( $P$  均  $>0.05$ )。见表 1。

表 1 各组一般资料比较

组别	例数	男/女 (例)	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$ )	糖尿病病程 (年, $\bar{x} \pm s$ )
对照组	40	17/23	65.40 $\pm$ 8.61	-
T2DM 组	41	18/23	63.88 $\pm$ 9.79	14.59 $\pm$ 5.12
T2DM 并 CHD 组	43	17/26	65.88 $\pm$ 7.18	15.63 $\pm$ 4.94
$\chi^2/F/t$ 值		0.262	0.620	0.902
$P$ 值		0.877	0.540	0.345

1.2 标本采集 糖尿病患者行 CAG 术前及对照组对象体检时, 取静脉血 4 ml 于肝素抗凝无菌管中, 用于检测 Th17 细胞和 Treg 细胞。另取不加肝素的静脉血 2 ml, 离心后分离血清, 在  $-80^\circ\text{C}$  的保存, 用于相关细胞因子的检测。

1.3 流式细胞术检测外周血 Th17 细胞 取肝素钠抗凝血 250  $\mu\text{l}$ , 用 250  $\mu\text{l}$  RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司) 等体积稀释到 500  $\mu\text{l}$ , 同时加入 500  $\times$  Cell Stimulation Cocktail (eBioscience 公司) 1  $\mu\text{l}$ 。37 $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱刺激培养 4~5 h, 相隔 2 h 混匀 1 次。体外刺激活化后的外周血, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 100  $\mu\text{l}$  PBS 重悬, 同时加入 CD3-PC5、CD8a-PC7 各 5  $\mu\text{l}$  室温避光温育 30 min。加入固定破膜剂 Fix&Perm reagent A 50  $\mu\text{l}$ , 室温避光温育 15 min, 2 ml PBS 洗涤, 加入 Fix&Perm reagent B 50  $\mu\text{l}$ , 同时加入 5  $\mu\text{l}$  IL-17-PE (eBioscience 公司), 室温避光温育 20 min, 洗涤后上 FC-500 流式细胞仪 (Beckman-colouter 公司) 检测。以  $\text{CD}3^+ \text{CD}8^-$  反向圈定  $\text{CD}3^+ \text{CD}4^+ \text{IL-17}^+$  为待测的 Th17 细胞。

1.4 流式细胞术检测外周血 Treg 细胞 取肝素钠

抗凝血 4 ml, 低速离心 10 min, 吸取白细胞层, 1:1 加入  $1 \times \text{RBC Lysis Buffer}$ , 室温摇动 15 min, 低速离心弃上清, 裂红后用 2 ml PBS 洗涤, 150  $\mu\text{l}$  PBS 重悬。取 100  $\mu\text{l}$  白细胞悬液, 同时加入 10  $\mu\text{l}$  CD4-FITC、10  $\mu\text{l}$  CD25-PE-Cy5, 室温避光温育 30 min, PBS 洗涤。按 Fixation/Permeabilization Concentrate: Fixation/Permeabilization Diluent (eBioscience 公司) 1:3 配制工作液。1 ml/管, 室温避光 45 min。配制  $10 \times \text{Permeabilization buffer}$  (eBioscience 公司) 工作液, 2.5 ml/管, 洗 2 遍。100  $\mu\text{l}$  工作液重悬, 同时加 5  $\mu\text{l}$  FoxP3-PE, 室温避光温育 30 min, PBS 洗涤后检测。以  $\text{CD}4^+ \text{CD}25^+ \text{FoxP3}^+$  为待测 Treg 细胞。

1.5 血清白细胞介素 (IL)-10、IL-17A 水平的检测 取保存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中的血清, 用双抗夹心法 ELISA 试剂盒检测研究对象外周血清中 IL-10、IL-17A 水平, 试剂购自上海磐超生物科技, 具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。计数资料采用例数表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两组比较采用独立样本  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 三组外周血中 Th17 及 Treg 细胞比例的变化 Th17 细胞比例呈 T2DM 并 CHD 组  $>$  T2DM 组  $>$  对照组 ( $P < 0.01$ ); Treg 细胞比例 T2DM 并 CHD 组低于 T2DM 组和对照组 ( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 2。

2.2 三组血清中 IL-10、IL-17A 水平的比较 IL-17A 水平呈 T2DM 并 CHD 组  $>$  T2DM 组  $>$  对照组 ( $P <$

表 2 三组外周血中 Th17 及 Treg 细胞比例的变化 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	Th17	Treg
对照组	40	1.20 $\pm$ 0.45	3.40 $\pm$ 1.28
T2DM 组	41	2.16 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	3.55 $\pm$ 1.08
T2DM 并 CHD 组	43	3.11 $\pm$ 0.99 <sup>ab</sup>	2.02 $\pm$ 0.85 <sup>ab</sup>
$F$ 值		24.861	9.814
$P$ 值		0.000	0.002

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 T2DM 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 3 各组血清中 IL-10、IL-17A 水平的比较 (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	IL-17A	IL-10
对照组	40	12.23 $\pm$ 3.65	24.52 $\pm$ 9.54
T2DM 组	41	17.02 $\pm$ 6.88 <sup>a</sup>	26.25 $\pm$ 9.12
T2DM 并 CHD 组	43	20.87 $\pm$ 6.85 <sup>ab</sup>	18.35 $\pm$ 6.75 <sup>ab</sup>
$F$ 值		11.981	7.266
$P$ 值		0.001	0.009

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 T2DM 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

0.01); IL-10 水平 T2DM 并 CHD 组低于 T2DM 组和对照组( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 3。

### 3 讨论

糖尿病是一种较严重的慢性代谢性疾病,其中以 T2DM 最常见,占全部糖尿病 90% 以上的 T2DM 患者比普通人群更易发生 CHD,其发病机制主要为糖异常代谢状态引起内皮细胞、平滑肌细胞和血小板等多种类型的细胞功能发生变化,易于造成冠状动脉损伤。而在其后,动脉粥样硬化的发展过程中,炎症反应发挥了重要作用。

Treg 细胞与 Th17 细胞是  $CD4^+$  T 细胞的两种亚型,它们的作用相互拮抗,呈动态平衡。单独转化生长因子(TGF)- $\beta$  作用下诱导初始 T 细胞分化为 Treg 细胞,而在 TGF- $\beta$  和 IL-6 共同作用下诱导初始 T 细胞分化为 Th17。分化成熟的 Th17 细胞分泌一系列的细胞因子,其特征性的细胞因子就是 IL-17。IL-17 一般被认为是促炎因子,它能够促进炎症细胞因子、趋化因子的产生,募集中性粒细胞和巨噬细胞<sup>[9]</sup>。Th17 细胞在介导炎症反应、清除胞外病原体感染、自身免疫性疾病和肿瘤中有重要作用<sup>[10-11]</sup>。天然  $CD4^+CD25^+$  Treg 细胞是体内存在的一类具有免疫抑制作用的 T 淋巴细胞亚群。能够分泌 IL-4、IL-10 和 TGF- $\beta$ 。Treg 细胞是机体内具有免疫抑制功能的 T 细胞,能够控制免疫应答的强度,减轻其对机体组织的损伤<sup>[12]</sup>。

有研究表明,使用 IL-17A 抗体中和处理后,小鼠动脉粥样硬化斑块的进展明显受到抑制<sup>[13]</sup>,表明对 Th17 细胞的干预能够调节 CHD 患者体内炎症平衡的状态。本研究发现,在 T2DM 患者的外周血中, Th17 细胞比例显著上升,说明 Th17 细胞在 T2DM 病情发展中发挥一定的作用,可能与其血管病变相关;但 Treg 细胞比例下降,意味着 Treg/Th17 细胞失衡,提示 T2DM 并 CHD 患者异常增强的免疫反应及免疫调节受损,而随着免疫调节受损加重,冠状动脉病变的数量和狭窄程度进一步加重。然而,本研究的样本量较小,仍然需要更多标本的检测来支持以上结论。

综上所述,T2DM 患者冠状动脉病变的发生发展与 Treg 细胞和 Th17 细胞水平相关,Treg 细胞及

Th17 细胞的测定或可作为监测 T2DM 患者冠状动脉病变状态的生物学指标,有效干预 Treg 细胞及 Th17 细胞的平衡也有望成为 CHD 的潜在治疗手段。

### 参考文献

- [1] van Dieren S, Beulens JWJ, van der Schouw YT, et al. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic[J]. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2010, 17 Suppl 1: S3 - S8.
- [2] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. Nature, 2011, 473 (7347): 317.
- [3] Chávez-Sánchez L, Espinosa-Luna JE, Chávez-Rueda K, et al. Innate immune system cells in atherosclerosis[J]. Arch Med Res, 2014, 45 (1): 1 - 14.
- [4] Tousoulis D, Psarros C, Demosthenous M, et al. Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease: the emerging role of statins[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63 (23): 2491 - 2502.
- [5] Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of  $CD4^+$  memory T cells: functional modules for tailored immunity[J]. Eur J Immunol, 2009, 39 (8): 2076 - 2082.
- [6] Li Q, Wang YP, Yu F, et al. Peripheral Th17/Treg imbalance in patients with atherosclerotic cerebral infarction [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6 (6): 1015 - 1027.
- [7] Hasib L, Lundberg AK, Zachrisson H, et al. Functional and homeostatic defects of regulatory T cells in patients with coronary artery disease[J]. J Intern Med, 2016, 279 (1): 63 - 77.
- [8] Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes[J]. J Immunol, 2010, 185 (3): 1959 - 1967.
- [9] Waite JC, Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases[J]. Int J Inflamm, 2012, 2012: 819467.
- [10] Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, et al. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease [J]. Clin Exp Immunol, 2007, 148 (1): 32 - 46.
- [11] Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, treg, Th17) in patients with colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2011, 71 (4): 1263 - 1271.
- [12] Dasgupta A, Saxena R. Regulatory T cells: a review[J]. Natl Med J India, 2012, 25 (6): 341 - 351.
- [13] Madhur MS, Funt SA, Li L, et al. Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31 (7): 1565 - 1572.

收稿日期: 2020-03-10 修回日期: 2020-03-27 编辑: 王宇