

· 论 著 ·

NK 细胞对妊娠期糖尿病高脂血症的影响

杨钦灵¹, 王立芳²

1. 广西壮族自治区妇幼保健院产科, 广西 南宁 530003;

2. 广西壮族自治区妇幼保健院遗传代谢中心实验室, 广西 南宁 530003

摘要: **目的** 探讨自然杀伤细胞(NK)对妊娠期糖尿病高脂血症患者的影响。**方法** 选择2012年1月至2013年12月确诊的妊娠期糖尿病高脂血症患者108例作为观察组,同期健康孕妇108例作为对照组。采用流式细胞术检测NK细胞,ELISA检测 γ 干扰素(IFN- γ),全自动生化检测仪检测血糖、血脂各项指标。分析和比较两组孕妇的NK细胞活性及血糖、血脂情况。**结果** 与对照组比较,观察组的NK细胞数量、CD4⁺/CD3⁺、CD4⁺/CD8⁺和CD56⁺+CD4⁺/CD3⁺水平均降低(P 均 <0.01);CD8⁺/CD3⁺、CD19⁺/CD3⁺、CD18⁺/CD8⁺水平均升高(P 均 <0.01);CD28⁺/CD8⁺水平与对照组无统计学差异($P>0.05$)。与对照组比较,观察组孕妇IL-2水平降低($P<0.01$),IL-6水平升高($P<0.01$),IFN- γ 水平降低($P<0.01$)。观察组空腹血糖、餐后2h血糖、糖化血红蛋白、体质指数以及甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等水平均较对照组升高(P 均 <0.01),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平较对照组降低($P<0.01$)。NK细胞数量与TG($r=-0.603$)、TC($r=-0.541$)、LDL-C($r=-0.498$)均呈负相关(P 均 <0.05),与HDL-C水平($r=0.537$)呈正相关($P<0.05$)。**结论** 妊娠期糖尿病孕妇的NK细胞数量减少、活性降低,可能通过改变不同表型细胞的含量参与免疫反应,引发其调节血脂能力降低,影响妊娠糖尿病高脂血症的发生。

关键词: 自然杀伤细胞;妊娠;糖尿病;高脂血症

中图分类号: R 714.256 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)05-0545-04

Influence of NK cells on hyperlipidemia in patients with gestational diabetes mellitus

YANG Qin-ling*, WANG Li-fang

* Department of Obstetrics, Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530003, China

Abstract: Objective To observe the effects of nature killer (NK) cells on hyperlipidemia in patients with gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods** A total of 108 patients with concurrent GDM and hyperlipidemia confirmed between January 2012 and December 2013 were selected as observation group, and 108 healthy pregnant women at the same time were selected as control group. The NK cell was detected by flow cytometry; the interferon γ (IFN- γ) was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); the indicators of blood glucose and blood lipid profile were detected by automatic chemistry analyzer. The NK cell activation, blood glucose and blood lipid profile in two groups were analyzed and compared. **Results** Compared with control group, the number of NK cells and the levels of CD4⁺/CD3⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD56⁺+CD4⁺/CD3⁺ decreased significantly (all $P<0.01$), and the levels of CD8⁺/CD3⁺, CD19⁺/CD3⁺, CD18⁺/CD8⁺ increased significantly (all $P<0.01$), while the level of CD28⁺/CD8⁺ was similar in observation group ($P>0.05$). Compared with control group, the levels of interleukin (IL)-2 and IFN- γ decreased (all $P<0.01$), and the levels of IL-6 increased in observation group ($P<0.01$). Compared with control group, the levels of fasting glucose, 2 hours postprandial blood glucose and glycosylated hemoglobin, body mass index, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) increased significantly (all $P<0.01$), while the level of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) decreased in observation group ($P<0.01$). The number of NK cells was negatively correlated with TG ($r=-0.603$), TC ($r=-0.541$) and LDL-C ($r=-0.498$) and was positively correlated with HDL-C ($r=0.537$, all $P<0.05$). **Conclusions** Due to the decrease of number and activity of NK cell in pregnant women with GDM, it could participate in immune response via changing the content of different phenotype cells, initiate the reduction of regulating blood lip-

ids and affect the occurrence of hyperlipidemia of GDM.

Key words: Natural killer cell; Pregnancy; Diabetes; Hyperlipidemia

自然杀伤细胞(nature killer cell, NK)是机体先天性免疫系统的组成部分,能快速诱导宿主免疫抵抗,在抗肿瘤细胞、抗病原微生物中发挥重要作用^[1],其通过产生细胞因子、趋化因子参与免疫反应等^[2-5]影响机体的血脂变化,本文观察 NK 细胞对妊娠期糖尿病高血脂症的影响作用,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 1 月至 2013 年 12 月在我院确诊的妊娠期糖尿病高脂血症患者 108 例作为观察组,年龄 24 ~ 34 岁,平均(26.21 ± 3.16)岁;孕周 12⁺² ~ 36⁺³周,平均孕周(21.09 ± 4.48)周。纳入标准:均为妊娠期糖尿病高脂血症患者;无家族糖尿病史;无心、脑、肝等器质性病变;均知情同意。选择同期健康的孕妇 108 例作为对照组,年龄 23 ~ 35 岁,平均(26.78 ± 3.34)岁;孕周为 12⁺⁴ ~ 36⁺²周,平均(21.18 ± 4.31)周。分别检测和比较两组孕妇的 NK 细胞活性及血糖、血脂情况。两组孕妇年龄、孕周等一般资料均衡(P 均 > 0.05)。

1.2 流式细胞仪检测 NK 细胞的方法

1.2.1 效应细胞 首先采集两组孕妇的外周血 5 ~ 8ml,玻璃珠抗凝,以聚蔗糖(ficoll)常规分离外周血单个核细胞(PBMC),PBS 洗 2 遍,悬浮于 10% 的牛血清 RPMI1640 培养基中,于 1 h 后收集悬浮细胞,在显微镜下计数得到效应细胞浓度。

1.2.2 靶细胞 将 NK 细胞的天然靶细胞 K562(对数期)悬浮于无血清培养基上,接种于 24 孔板,抽取纯化的 Pegfp-N1 质粒 2 μg 与阳离子脂质体 X-treme GENE Q2 12 μl 混合孵育 5 min 后加入 K562 中,4 h 后加入全培养基,72 h 后经 G418 筛选,10 d 后阳性筛选的细胞进行有限稀释法培养,7 d 后得到稳定均已表达的绿色荧光蛋白的 K562 细胞。

1.2.3 细胞亚型表面标志物及活性检测 将得到的效应细胞分别稀释为 4 × 10⁶ ml、2 × 10⁶ ml、1 × 10⁶ ml、0.5 × 10⁶ ml。取浓度为 1 × 10⁵ ml 对数期 K562-EGFP 细胞与不同浓度的效应细胞分别按 1:40、1:20、1:10 和 1:5 混合,每个效应比例设 3 复孔,同时设靶细胞的自然释放孔、最大释放孔、培养基对照孔、体系校正孔和效应细胞自然释放孔,250 g 离心 4 min,37 °C 5% CO₂ 孵育箱培养 0.5、1、2 和 4 h,加入 10 μl (100 μg/ml) 的 PI 标记,上流式细胞仪 FACS caliber(美国 BD 公司生产)进行分析,收集细

胞前散射光、侧向散射光、EGFP(绿色)和 PI(红色)荧光,并以 FACSDIVE 软件分析绿色或红色荧光的细胞数,并通过反向设门取出细胞碎片。所有细胞亚型试剂盒均由 BD 公司生产。

1.3 外周血炎症因子和干扰素(IFN)-γ 检测 取两组 4 × 10⁶ ml PMBC,加入 1ml RPMI 1640 培养基(含 0.2% BSA 和 25 mmol/L HEPES),1 000 U 的白细胞介素(IL)-2,孵育 24 h,收集上清液,采用 ELISA 检测,试剂由 GM 公司生产。

1.4 血糖与血脂检测方法 采用美国贝克曼 210 型全自动生化检测仪检测。两组均空腹采集静脉血 5 ml,以酶偶联比色法测定血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平;空腹血糖采用葡萄糖氧化酶法测定;糖化血红蛋白采用糖化血红蛋白仪测定;胰岛素及胰岛素抗体采用放射免疫法测定,仪器为 γ 放射免疫计数器。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布资料采用成组 t 检验,非正态数据经对数转换为正态分布,再经反对数计算;采用 Person 相关进行相关性分析。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组孕妇 IFN-γ、IL-2 和 IL-6 检测结果比较 与对照组比较,观察组孕妇 IL-2 水平降低($P < 0.01$);IL-6 水平升高($P < 0.01$)。观察组 IFN-γ 为(1.34 ± 1.98)pg/ml,对照组 IFN-γ 为(1.69 ± 2.31)pg/ml,呈非正态分布,数据经对数转换为正态分布,再经反对数计数其浓度,组间比较显示,观察组 IFN-γ 水平低于对照组($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 两组孕妇 PBMC 表型检测比较 与对照组比较,观察组的 NK 细胞数量、CD4⁺/CD3⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD56⁺ + CD4⁺/CD3⁺ 水平均降低(P 均 < 0.01);CD8⁺/CD3⁺、CD19⁺/CD3⁺、CD18⁺/CD8⁺ 水平均升高(P 均 < 0.01);CD28⁺/CD8⁺ 水平与对照组比较无统计学差异($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 两组孕妇 BMI、血糖、血脂比较 观察组空腹血糖、餐后 2 h 血糖、糖化血红蛋白、体质指数(BMI)以及 TG、TC、LDL-C 等水平均较对照组升高(P 均 < 0.01),HDL-C 水平较对照组降低($P < 0.01$)。见表 3。

2.4 NK 细胞与血脂相关性分析 NK 细胞、TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 均为正态分布的计量资料,对 NK 细胞数量与几项血脂指标的相关性采用 Person 相关性分析,结果显示,NK 细胞数量与 TG($r = -0.603$)、TC($r = -0.541$)、LDL-C 水平($r = -0.498$)均呈负相关(P 均 < 0.05),与 HDL-C 水平($r = 0.537$)呈正相关($P < 0.05$)。

表 1 两组孕妇 IFN- γ 、IL-2 和 IL-6 检测结果比较

($n = 108, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-2 (ng/L)	IL6 (ng/L)	IFN- γ (pg/ml)
观察组	45.53 \pm 17.08	8.38 \pm 7.99	5.73 \pm 1.21 *
对照组	57.38 \pm 19.78	7.79 \pm 5.43	6.37 \pm 2.09 *
t 值	5.948	3.843	4.282
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: * 表示数据经对数转换再经反对数计算的结果。

表 2 两组孕妇 PBMC 表型检测比较 ($n = 108, \% , \bar{x} \pm s$)

组别	NK 细胞数量	CD4 ⁺ /CD3 ⁺	CD8 ⁺ /CD3 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD18 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺ /CD3 ⁺	CD28 ⁺ /CD8 ⁺	CD56 ⁺ +CD4 ⁺ /CD3 ⁺
观察组	22.98 \pm 7.56	35.23 \pm 4.89	27.54 \pm 4.67	1.22 \pm 0.74	66.11 \pm 8.14	19.87 \pm 6.12	60.33 \pm 7.67	17.65 \pm 6.96
对照组	29.56 \pm 7.64	38.31 \pm 5.09	24.59 \pm 4.73	1.51 \pm 0.65	54.23 \pm 9.78	11.65 \pm 5.67	61.43 \pm 7.73	22.23 \pm 7.75
t 值	4.039	4.832	4.756	3.368	11.039	8.385	0.574	6.948
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 0.05	< 0.01

表 3 两组孕妇 BMI 和血糖、血脂相关指标比较 ($n = 108, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	空腹血糖	餐后 2h 血糖	糖化血红蛋白(%)	BMI(kg/m ²)	TG	TC	LDL-C	HDL-C
观察组	9.90 \pm 2.64	15.31 \pm 3.09	9.59 \pm 1.73	29.12 \pm 6.65	2.98 \pm 2.27	6.21 \pm 2.04	2.98 \pm 0.78	1.28 \pm 0.19
对照组	7.97 \pm 1.99	9.34 \pm 2.07	6.87 \pm 1.03	26.54 \pm 4.21	1.45 \pm 1.88	5.82 \pm 1.47	2.22 \pm 0.43	1.53 \pm 0.88
t 值	6.985	12.039	6.261	7.003	5.030	4.318	3.104	4.012
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

3 讨论

妊娠糖尿病是指妊娠期发生或首次发现的不同程度的糖代谢异常^[6-8],其发病机制目前考虑与胰岛素抵抗、激素分泌异常、细胞因子、基因等^[7-9]密切相关,人体的内分泌、免疫和神经系统之间可通过相同的肽类激素和共同的受体相互影响,高血糖状态亦可使机体免疫稳定性遭到破坏,导致胰岛素抵抗,使机体脂肪、蛋白质等代谢异常因而发生高脂血症^[10-12]。

NK 细胞是一群异质性多功能的免疫细胞,其细胞活性是评价固有性免疫应答的指标之一,是非特异免疫中最主要细胞,可在免疫早期无需预先致敏,迅速产生细胞因子和趋化因子,如杀伤介质穿孔素、细胞因子 IL-2、IL-6、IFN- γ 等,上述细胞因子既能促进 T 细胞的增殖、分化和成熟,且能增强 NK 细胞自身的活性;又可因 NK 细胞能杀伤胸腺中未成熟 T 细胞,影响 B 细胞发育,抑制 B 细胞的增殖,杀伤或抑制树突细胞而干扰抗原提呈,使抗体形成受抑制。NK 细胞通过对巨噬细胞、粒细胞、树突细胞的调节作用而控制天然免疫,作用于 CD4⁺ 细胞和 CD8⁺ 细胞以强化特异性免疫^[13]。有报道发现 NK/T 细胞在 1 型糖尿病患者和非肥胖糖尿病小鼠中存在着数量和功能上的缺陷^[14],因此 NK/T 细胞可干预胰岛自身免疫反应的发展并防止糖尿病的发生。

本研究发现,观察组 NK 细胞数量、CD4⁺/CD3⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 CD56⁺ + CD4⁺/CD3⁺ 较对照

组水平均降低,CD8⁺/CD3⁺、CD19⁺/CD3⁺、CD18⁺/CD8⁺ 水平较对照组均升高。NK 细胞表达 CD56⁺ 和 CD4⁺,而不表达 CD3⁺^[14],本研究结果中 CD56⁺ + CD4⁺/CD3⁺ 降低,且 PMBC 培养上清液中 IFN- γ 水平降低,均提示 NK 细胞活性降低。由于 NK 细胞活性降低抑制细胞的增殖、分化和成熟,导致 CD4⁺/CD3⁺ 降低,CD8⁺/CD3⁺ 升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值异常,当 NK 细胞活性降低,使上述细胞的免疫监视、抗原提呈、免疫调节和分泌功能异常^[15],出现 IL-2 水平的下降。IL-2 为炎症因子,可激活 T 细胞核因子 4,选择性抑制脂联素的表达,因此其含量下降可导致脂联素水平升高,从而使胰岛素敏感性增高,使机体血糖异常和血脂代谢紊乱^[13]。

NK 细胞通过细胞毒作用和分泌细胞因子参与机体免疫反应,当发生妊娠糖尿病时可能通过抑制 NK 细胞增殖和促进 NK 细胞凋亡两个途径导致 NK 细胞数量的减少,这是导致孕妇外周循环中 NK 细胞活性降低和数量减少的重要机制。本研究观察组与正常对照组比较,其 TG、TC、LDL-C 含量升高,HDL-C 含量降低,相关性分析发现,NK 细胞与 TG、TC、LDL-C 水平均呈负相关,与 HDL-C 水平呈正相关。

综上所述,妊娠期糖尿病孕妇的 NK 细胞数量减少、活性降低,可能通过改变不同表型细胞的含量,参与免疫反应,引发其调节血脂能力降低,成为影响妊娠糖尿病高脂血症发生的重要因素。

(下转第 555 页)

- neck squamous cell cancer (LAHNSCC) [J]. *Radiother Oncol*, 2011, 98(1):38-41.
- [4] 唐冬寒,张钰霞,蔡静. 西妥昔单抗联合放化疗治疗局部晚期鼻咽癌的临床疗效观察[J]. *肿瘤药学*, 2013(2):119-121.
- [5] Feng HX, Guo SP, Li GR, et al. Toxicity of concurrent chemoradiotherapy with cetuximab for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(9):170.
- [6] 刘德传,刘庆春,钟志凯. 鼻咽癌 PF 方案时辰化疗的临床研究[J]. *中国医药指南*, 2011, 9(23):182-183.
- [7] Lin HX, Hua YJ, Chen QY, et al. Randomized study of sinusoidal chronomodulated versus flat intermittent induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil followed by traditional radiotherapy for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(9):502-511.
- [8] 谢国丰,黄赖机,叶家才,等. 调强放疗同期时辰化疗治疗局部晚期鼻咽癌[J]. *广东医学*, 2014, 35(1):127-129.
- [9] Ma BB, Kam MK, Leung SF, et al. A phase II study of concurrent cetuximab-cisplatin and intensity-modulated radiotherapy in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(5):1287-1292.
- [10] Chen L, Hu CS, Chen XZ, et al. Concurrent chemoradiotherapy plus adjuvant chemotherapy versus concurrent chemoradiotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: a phase 3 multicentre randomised controlled trial[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(2):163-171.
- [11] 蒋华,刘燕文,姜维美. 顺铂的时辰化疗[J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(9):714-715.
- [12] 任庆兰,吴永忠,陈晓晶,等. 放疗联合时辰化疗治疗局部晚期鼻咽癌的疗效观察[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(14):2761-2764.
- [13] 杨益群. 鼻咽癌放射性口腔黏膜炎的临床分析及护理[J]. *护士进修杂志*, 2010, 25(9):807-808.
- [14] Ueda HR, Chen W, Minami Y, et al. Molecular-timetable methods for detection of body time and rhythm disorders from single-time-point genome-wide expression profiles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(31):11227-11232.

收稿日期:2014-12-14 修回日期:2015-01-20 编辑:王娜娜

(上接第 547 页)

参考文献

- [1] 袁玲,应豪,王德芬. 膳食多不饱和脂肪酸改善妊娠期糖尿病 SD 大鼠胰岛素抵抗的研究[J]. *实用妇产科杂志*, 2013, 29(4):308-311.
- [2] 薛丽丽,陈丹青. 妊娠期糖尿病患者视黄醇结合蛋白 4 的变化及其与血糖和血脂的代谢关系[J]. *实用妇产科杂志*, 2013, 29(6):450-453.
- [3] 刘静,周莉,范玲. 妊娠期糖尿病血脂与胰岛素抵抗及妊娠结局的研究[J]. *医学综述*, 2012, 18(18):3067-3068, 3074.
- [4] 孔令英,杨慧霞. 妊娠期糖尿病孕妇血脂变化与胎盘脂质转运[J]. *中华妇幼临床医学杂志(电子版)*, 2013, 9(1):5-9.
- [5] Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, et al. TGF beta promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9):3378-3383.
- [6] 王翠花. 妊娠期糖尿病患者的血脂变化[J]. *医学综述*, 2014, 20(9):1618-1621.
- [7] 熊俊,唐卉,王素梅,等. GDM 患者血同型半胱氨酸水平及其与血脂相关性研究[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(12):1874.
- [8] 吴艳,柯旭,谢穗,等. 妊娠期糖尿病 PAI-1、D-2 聚体、血脂相关因子检测的临床意义[J]. *中国医药科学*, 2013, 3(4):123.
- [9] 钱惠勤,任慕兰. 孕妇妊娠中晚期 C-反应蛋白与胰岛素抵抗及血脂的相关性研究[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2009, 28(6):516-519.
- [10] 赵明红,徐先明. 妊娠期糖尿病患者血脂的变化[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2010, 31(4):524-527.
- [11] 朴顺福,杨晓菊,吴洪婧. 妊娠期糖尿病血液流变学及血脂变化的研究[J]. *基层医学论坛*, 2009, 13(7):205-207.
- [12] 姚家勇,张蔚起,韦天彬,等. 妊娠期糖代谢异常及妊娠高血压综合征孕妇血脂分析[J]. *临床医学*, 2011, 31(12):70-71.
- [13] Nakayama M, Takeda K, Kawano M, et al. Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4⁺ T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(45):18360-18365.
- [14] Alba A, Planas R, Clemente X, et al. Natural killer cells are required for accelerated type 1 diabetes driven by interferon-beta [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 151(3):467-475.
- [15] Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, et al. TGFβ promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9):3378-3383.

收稿日期:2014-12-11 修回日期:2015-01-20 编辑:石嘉莹