

• 论 著 •

妊娠糖尿病患者外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的改变及临床意义*

代玉梅¹, 凌雪莹¹, 李彦媚², 刘云锋¹, 刘海英¹

(广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心: 1. 临床检验部; 2. 血液科, 广州 510623)

摘要:目的 比较分析妊娠糖尿病(GDM)患者及健康孕妇外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞的组成变化, 为探讨 $\gamma\delta$ T 细胞在 GDM 发病中的作用和意义提供线索。方法 采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 GDM 患者(病例组)及健康孕妇(对照组)外周血单个核细胞(PBMC), 加入荧光标记鼠抗人 T 细胞抗原抗体(TCR) $\gamma\delta$ 单克隆抗体(McAb)及鼠抗人 CD3 McAb 双染, 流式细胞术分析 $\gamma\delta$ T 细胞所占比例。结果 病例组 PBMC 中 $\gamma\delta$ T 细胞的比例为 $(6.89 \pm 3.22)\%$, 占 $CD3^+$ T 细胞的 $(10.87 \pm 4.91)\%$, 对照组为 $(4.26 \pm 1.64)\%$, 占 $CD3^+$ T 细胞的 $(8.21 \pm 0.35)\%$, 病例组显著高于对照组, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$); 初诊组 GDM 患者外周血 PBMC 中 $\gamma\delta$ T 细胞的比例为 $(8.79 \pm 2.33)\%$, 占 $CD3^+$ T 淋巴细胞的 $(12.27 \pm 5.45)\%$, 显著高于对照组, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 GDM 患者 $\gamma\delta$ T 细胞在外周血 PBMC 及 $CD3^+$ T 细胞中的比例增高, 提示疾病发生影响和改变了 T 细胞亚群的分布。

关键词:妊娠糖尿病; $\gamma\delta$ T 细胞; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)18-2497-03

Composition and clinical significance of $\gamma\delta$ T lymphocytes in peripheral blood of Gestational Diabetes Mellitus patients*

DAI Yumei¹, LING Xueying¹, LI Yanmei², LIU Yunfeng¹, LIU Haiying¹

(1. Department of Clinical Laboratory Medicine, 2. Department of Hematology, Guangzhou Women & Children's Medical Centre, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

Abstract: Objective To compare the composition of $\gamma\delta$ T cells in the peripheral blood of gestational diabetes mellitus(GDM) patients with those of normal pregnant women, so as to explore the association of $\gamma\delta$ T cells with the onset and progression of GDM. Methods The peripheral blood mononuclear cells(PBMC) of GDM patients(case group) and normal pregnant women(control group) were separated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. $\gamma\delta$ T cells were labeled with FITC conjugated anti-TCR $\gamma\delta$ monoclonal antibody(McAb) and PE conjugated anti-CD3 McAb and analyzed by flow cytometry. Results $\gamma\delta$ T cells in GDM patients' peripheral blood were about $(6.89 \pm 3.22)\%$, which was higher than normal control group $(4.26 \pm 1.64)\%$. The percentage of $\gamma\delta$ T cells in non-treated GDM group was significantly increased to $(8.79 \pm 2.33)\%$, while in treated GDM group, the percentage of $\gamma\delta$ T cells was drop to normal $(3.76 \pm 1.62)\%$. Conclusion $\gamma\delta$ T cells in GDM patients' peripheral blood and $CD3^+$ T Cells were slightly increased. The alteration may be related to the onset of GDM.

Key words: gestational diabetes mellitus; $\gamma\delta$ T cells; flow cytometry

妊娠糖尿病(GDM)是指在妊娠期发生或首次发现的不同程度的糖耐量降低, 是围产期最常见的并发症, 在不同人群妊娠妇女中的发病率为 $1\% \sim 14\%$ ^[1]。有 GDM 病史的妇女未来患 2 型糖尿病的风险为 $20\% \sim 60\%$, 其后代发生儿童或青春期超重、肥胖、糖耐量受损的概率亦大大增加^[2]。 $\gamma\delta$ T 细胞是人外周血 T 细胞中的一个特殊群体, 占 $CD3^+$ T 细胞的 $5\% \sim 10\%$ 。近年的研究表明, 该细胞群体与多种自身免疫性疾病的发生、发展存在密切联系^[3-5]。本项目通过研究本院 2013 年 8—12 月收治的 GDM 患者及年龄孕周匹配的健康对照人群外周血中 $\gamma\delta$ T 细胞的组成变化, 观察其与 GDM 发病及预后间的联系, 为探讨 $\gamma\delta$ T 细胞在 GDM 发病中的作用和意义提供线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 8—12 月在广州市妇女儿童医疗中心住院及门诊的 GDM 患者 30 例(无糖尿病史), 均符合

2013 年美国糖尿病协会颁布的 GDM 诊断标准^[6], 即口服 75 g 糖耐量实验(OGTT)空腹血糖超过 5.1 mmol/L , 或服糖后 1 h 后血糖超过 10.0 mmol/L , 或服糖后 2 h 后血糖超过 8.5 mmol/L , 符合上述 3 条标准中的任 1 项即可诊断为 GDM, 另选取同期进行 OGTT 检测的健康孕妇 30 例作为对照组。病例组 30 例, 平均年龄 (28.4 ± 3.68) 岁, 平均孕周 (21.8 ± 3.79) 周。对照组 30 例, 平均年龄 (30.0 ± 3.57) 岁, 平均孕周 (23.54 ± 3.18) 周。

1.2 仪器与试剂 ROTOFIX 32A 离心机(德国 HETTICH 公司); CX41 显微镜(日本奥林巴斯公司); BD 流式细胞仪 FACS Canto II (美国 BD Sciences 公司); 人外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物科技有限公司); $1 \times$ PBS 缓冲液(EURO-IMMUN, pH=7.2); 2% 台盼蓝(碧云天生物技术有限公司); 牛血清白蛋白(美国 Amresco 公司); 1% 多聚甲醛(北京赛默生物技术有限公司); FITC 标记鼠抗人 T 细胞抗原抗体

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81572804), 广东省自然科学基金博士启动项目(S2013040015845)

作者简介: 代玉梅, 女, 副主任技师, 主要从事肿瘤免疫方向的研究。

(TCR) $\gamma\delta$ 单克隆抗体(McAb)及 PE 标记鼠抗人 CD3 McAb (美国 Biolegend 公司)。

1.3 纳入排除标准 纳入标准:根据 2013 年美国糖尿病协会发表的关于 GDM 诊断标准的新建议^[6],空腹血糖、服糖后 1 h、服糖后 2 h 这 3 项指标中的任一点血糖异常即可诊断为 GDM。故选择 OGTT 试验空腹血糖超过 5.1 mmol/L 或服糖 1 h 血糖超过 10.0 mmol/L 或服糖后 2 h 血糖超过 8.5 mmol/L 的 GDM 人群为病例组,选择无 GDM 风险及年龄、孕周相匹配的健康孕妇为对照组。排除标准包括:(1)有慢性疾病史,如糖尿病、高血压、血液病、哮喘、结缔组织病、炎症肠病、慢性肝病、其他内分泌疾病者;(2)长期使用类固醇激素者;(3)首次产检前 2 周内急性感染者。

1.4 外周血单个核细胞的分离 用加样枪吸取淋巴细胞分离液 1.5 mL 至玻璃试管中,缓慢加入抗凝血 1.5 mL(1.5~2.2 mg 的 EDTA-K₂ 抗凝 1 mL 的全血),3 000 r/min 离心 20 min;小心吸取白膜层至另一玻璃试管中,加 4 倍以上体积量 1×PBS 缓冲液,混匀后,3 000 r/min 离心 15 min,吸弃上清,重复洗涤 1 次;加入 1 mL 1×PBS 缓冲液悬浮细胞,台盼蓝染色计数,并计算细胞活率。比较病例组及对照组一般资料(年龄、孕周)、白细胞计数(WBC)以及分离前后淋巴细胞计数

(LYM)及活细胞得率的差异。

1.5 外周血天然 $\gamma\delta$ T 细胞的组成分析 取分离的 PBMC,用 1×PBS 配制成 1×10^6 cells/mL 的单细胞悬液。3 500 r/min 离心 5 min,吸弃上清,用 1% BSA 重复洗涤 2 遍;分别加入 FITC 标记的鼠抗人 TCR $\gamma\delta$ McAb 及 PE 标记的鼠抗人 CD3 McAb 进行双染(每管 3 μ L),4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;同时设立阴性对照及 FITC、PE 单染对照;用 1% BSA 洗涤 3 遍,细胞沉淀悬于 300 μ L 1×PBS 缓冲液或用 1% 多聚甲醛固定;流式细胞术分析 $\gamma\delta$ T 细胞在 GDM 患者和健康孕妇外周血单个核细胞中的比例。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组受试者一般资料比较 如表 1 所示,60 例受试者中 GDM 患者 30 例,其中 20 例为初诊 GDM 患者(初诊组),10 例为经治疗后 GDM 患者(经治组),另 30 例为健康孕妇。病例组及对照组年龄、孕周、WBC 经统计学分析差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 病例组与对照组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	孕周(周)	WBC($\times 10^9$ /L)	OGTT(mmol/L)		
					空腹	1 h	2 h
病例组	30	30.07 $\pm$ 4.40	21.80 $\pm$ 3.79	10.01 $\pm$ 2.08	4.80 $\pm$ 0.49	10.60 $\pm$ 0.92	8.37 $\pm$ 1.00
对照组	30	28.53 $\pm$ 3.90	23.54 $\pm$ 3.18	9.09 $\pm$ 2.80	4.29 $\pm$ 0.34	7.55 $\pm$ 1.37	6.67 $\pm$ 1.00

2.2 两组受试者外周血分离前后 LYM 比较 如表 2 所示,病例组及对照组分离前后 LYM 和活细胞率差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 病例组与对照组分离前后 LYM 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	分离前($\times 10^9$ /L)	分离后($\times 10^9$ /L)	活细胞率(%)
病例组	30	1.84 $\pm$ 0.52	0.49 $\pm$ 0.28	85.15 $\pm$ 6.06
对照组	30	1.76 $\pm$ 0.36	0.40 $\pm$ 0.24	87.27 $\pm$ 5.60

2.3 两组受试者外周血 $\gamma\delta$ T 细胞组成比较 (1)病例组及对照组孕妇外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的比例:FCM 分析结果如表 3 所示, $\gamma\delta$ T 细胞在病例组外周血 PBMC 及 CD3⁺ T 细胞中的比例显著高于对照组($P<0.05$)。图 1 为病例组及对照组外周血 CD3⁺ $\gamma\delta$ T 细胞流式分析的代表性结果。(2)病例组外周血 $\gamma\delta$ T 细胞比例与对照组的比较:病例组 GDM 及对照组外周血 PBMC 及 CD3⁺ T 细胞中 $\gamma\delta$ T 细胞的比例如表 4 所示。初诊组外周血 $\gamma\delta$ T 细胞比例显著高于对照组($P<0.05$),经治组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 病例组与对照组外周血 $\gamma\delta$ T 细胞组成比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	PBMC	CD3 ⁺ T 细胞
病例组	30	6.89 $\pm$ 3.22	10.87 $\pm$ 4.91
对照组	30	4.26 $\pm$ 1.64	8.21 $\pm$ 0.35

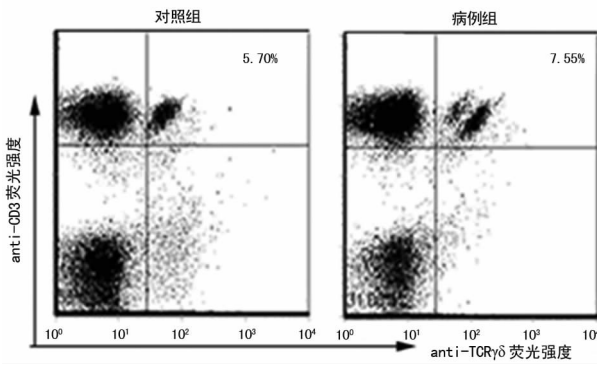


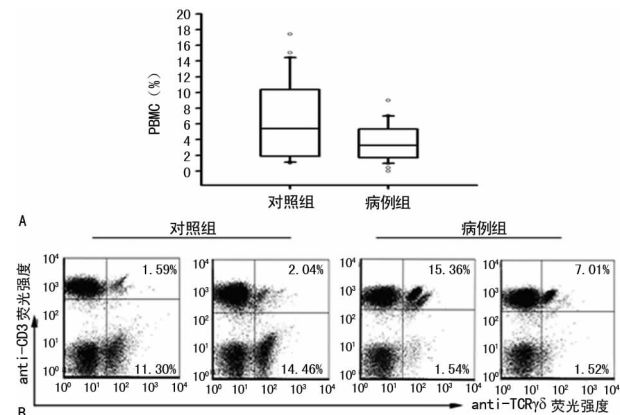
图 1 GDM 患者及健康孕妇外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的流式分析代表性结果

表 4 初诊组、经治组外周血 $\gamma\delta$ T 细胞比例与对照组的比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	<i>n</i>	PBMC	CD3 ⁺ T 细胞
初诊组	10	8.79 $\pm$ 2.33	12.27 $\pm$ 5.45
经治组	20	3.76 $\pm$ 1.62	8.58 $\pm$ 2.76
对照组	30	4.26 $\pm$ 1.64	8.21 $\pm$ 0.35

2.4 GDM 患者外周血中 CD3-TCR $\gamma\delta$ ⁺ 比例 本研究发现,在两组人群的 PBMC 中均存在 CD3-TCR $\gamma\delta$ ⁺ 细胞,此群细胞在对照组 PBMC 中的比例为(6.81 $\pm$ 5.01)%,在病例组中的

比例则有所降低,为(3.62±2.19)%,见图 2。



注:A 为病例组及外周血 CD3-TCRγδ⁺ 细胞的比较分析;B 为病例组及对照组外周血 CD3-γδ T 细胞流式分析的代表性结果。

图 2 病例组及对照组外周血 CD3-TCRγδ⁺ 细胞的比较分析

3 讨 论

GDM 的病理学基础是孕期胎盘激素水平变化及胰岛 β 细胞功能障碍引起的妊娠期胰岛素耐受及胰岛素分泌缺陷。除血糖或尿糖增高外,还会出现脂质代谢异常、自身抗体阳性、促炎症因子及氧化应激水平升高等多项特征,提示其发生及预后与机体的免疫状态存在密切联系。

γδ T 细胞在 GDM 中的角色和地位尚未得到清楚认识。有研究提示胰腺炎患者病理组织中有 γδ T 细胞浸润,1 型胰岛素依赖性糖尿病患者的 γδ T 细胞分布异常^[7-8]。γδ T 细胞识别的配体 Hsp60 在胰岛素信号传导及促炎性细胞因子[如白细胞介素(IL)-6,IL-8]的产生中发挥作用^[9]。这些研究说明 γδ T 细胞可能参与了 GDM 的发生、发展。

本文比较了病例组和对照组外周血 γδ T 细胞的比例,发现病例组外周血 PBMC 及 CD3⁺ T 细胞中 γδ T 细胞的比例显著高于对照组,初诊组升高得更为明显,提示 GDM 的发生影响和改变了患者外周血中 γδ T 细胞的分布。治疗后回落至正常水平,提示 γδ T 细胞的比例与 GDM 预后存在一定的相关性。此外,本研究发现,对照组及病例组的外周血中均存在一定数量的 CD3-TCRγδ⁺ 细胞,且对照组该群细胞的比例显著高于病例组。值得注意的是,在前期的研究中,课题组曾多次分离过健康非孕成年人志愿者外周血中的 γδ T 细胞,CD3-TCRγδ⁺ 细胞在健康非孕成人志愿者外周血淋巴细胞的比例不足 1%^[10-12]。由于 CD3-TCR 复合物的形成是 γδ T 细胞活化的重要条件,这群细胞的存在可能在健康妊娠中具有某些积极的保护意义,其数量减少与 GDM 患者临床免疫病理特征间的关系值得进一步关注。

参考文献

[1] American Diabetes Association. Diagnosis and classifica-

tion of diabetes mellitus[J]. Diabetes care,2014,37(Suppl 1):S81-90.

[2] Bo S, Valpreda S, Menato G, et al. Should we consider gestational diabetes a vascular risk factor? [J]. Atherosclerosis,2007,194(2):e72-79.

[3] Su D, Shen M, Li X, et al. Roles of gammadelta T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases[J]. Clin Dev Immunol,2013,2013:985753.

[4] Marcu-Malina V, Balbir-Gurman A, Dardik R, et al. A novel prothrombotic pathway in systemic sclerosis patients: possible role of bisphosphonate-activated gammadelta T cells[J]. Front Immunol,2014,5(5):414.

[5] Segawa S, Goto D, Horikoshi M, et al. Involvement of CD161⁺ Vdelta1⁺ gammadelta T cells in systemic sclerosis: association with interstitial pneumonia[J]. Rheumatology(Oxford),2014,53(12):2259-2269.

[6] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Diabetes care,2013,36(Suppl 1):S67-74.

[7] Lapolla A, Sanzari M, Betterle C, et al. Evaluation of T-cell receptor CD3⁺ gamma delta in gestational diabetes mellitus[J]. Acta diabetologica,2000,37(4):207-211.

[8] Kretowski A, Mysliwiec J, Kinalska I. Abnormal distribution of gammadelta T lymphocytes in Graves' disease and insulin-dependent diabetes type 1[J]. Arch Immunol Ther Exp(Warsz),2000,48(1):39-42.

[9] Marker T, Sell H, Zillesen P, et al. Heat shock protein 60 as a mediator of adipose tissue inflammation and insulin resistance[J]. Diabetes,2012,61(3):615-625.

[10] Dai Y, Chen H, Mo C, et al. Ectopically-expressed human tumor biomarker MutS homologue 2 is a novel endogenous ligand that is recognized by human gammadelta T cells to induce innate anti-tumor/virus immunity[J]. J Biol Chem,2012,287(20):16812-16819.

[11] Mo C, Dai Y, Kang N, et al. Ectopic expression of human MutS homologue 2 on renal carcinoma cells is induced by oxidative stress with interleukin-18 promotion via p38 MAPK and JNK signaling pathways [J]. J Biol Chem, 2012,287(23):19242-19254.

[12] 代玉梅,莫辰,陈慧,等. MutS 同源蛋白 2 可介导 Vγ9δ2T 细胞对人宫颈癌细胞的杀伤[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2013,33(11):845-849.

(收稿日期:2017-02-25 修回日期:2017-04-25)