

• 论 著 •

Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 水平与 T1DM 患者病情发生发展的关系

王智峰,李秋梅,姜 啸,徐心悦[△]

(大连大学附属新华医院内分泌科,辽宁大连 116021)

摘要:目的 分析 Foxp3+调节性 T 淋巴细胞(Treg)、T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3(Tim-3)和细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA-4)水平与 1 型糖尿病(T1DM)患者病情发生、发展的关系。方法 选取该院 2017 年 1 月至 2019 年 7 月收治的 80 例 T1DM 患者作为观察组,80 例健康者作为对照组;检测外周血中 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 水平;各指标与 T1DM 的相关性采用 Pearson 相关,以分组结果作为“金标准”,应用受试者工作特征曲线分析各指标单独及联合检测对 T1DM 的预测作用。结果 观察组外周血中 Foxp3+Treg 水平明显低于对照组, Tim-3 和 CTLA-4 水平均明显高于对照组,且差异有统计学意义($P<0.05$);T1DM 患者外周血中 Tim-3 和 CTLA-4 水平与其病情严重程度呈正相关($r=0.518, 0.502, P<0.05$);而 Foxp3+Treg 水平与其病情严重程度呈负相关($r=-0.483, P<0.05$)。采用 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 联合检测鉴别 T1DM 的灵敏度、特异度及曲线下面积分别为 93.75%, 92.50% 和 0.957,均明显高于各指标单独检测,且差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 水平与 T1DM 病情呈正相关,且各指标联合检测可显著提高鉴别诊断 T1DM 的效能。

关键词: Foxp3+调节性 T 淋巴细胞; T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3; 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4; 1 型糖尿病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.24.021

中图法分类号:R587.1

文章编号:1673-4130(2020)24-3028-04

文献标识码:A

Relationship between the levels of Foxp3+Treg, Tim-3, CTLA-4 and the pathogenesis of T1DM patients

WANG Zhifeng, LI Qiumei, JIANG Xiao, XU Xinyue[△]

(Department of Endocrinology, Xinhua Hospital Affiliated to Dalian University, Dalian, Liaoning 116021, China)

Abstract: **Objective** To analyze the relationship between the levels of Foxp3+Treg, Tim-3 and CTLA-4 and the occurrence and development of T1DM patients. **Methods** A total of 80 patients with T1DM treated in the hospital from January 2017 to July 2019 were selected as the observation group and 80 healthy persons were used as the control group. The levels of Foxp3+Treg, Tim-3 and CTLA-4 in peripheral blood were measured. Pearson correlation analysis was used to analyze the relationship between each index and T1DM. Receiver operating characteristic curve was used to analyze the predictive effect of each index individually and jointly on T1DM. **Results** The level of Foxp3+Treg in the blood of the observation group was significantly lower than that of the control group, and the levels of Tim-3 and CTLA-4 were significantly higher than those of the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of Tim-3 and CTLA-4 in peripheral blood of T1DM patients were positively correlated with the severity of the disease ($r=0.518, 0.502, P<0.05$), while the level of Foxp3+Treg was negatively correlated with the severity of the disease ($r=-0.483, P<0.05$). The sensitivity, specificity, and AUC (93.75%, 92.50%, and 0.957) of Foxp3+Treg, Tim-3, and CTLA-4 in identifying T1DM were significantly higher than those applied alone, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Foxp3+Treg, Tim-3 and CTLA-4 levels were positively correlated with T1DM disease, and the combined application of various indicators could significantly increase the value of differential diagnosis of T1DM.

Key words: Foxp3+Treg; Tim-3; CTLA-4; type 1 diabetes

作者简介:王智峰,男,副主任医师,主要从事糖尿病及甲状腺疾病的研究。 [△] 通信作者, E-mail:165143819@qq.com。

本文引用格式:王智峰,李秋梅,姜啸,等. Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 水平与 T1DM 患者病情发生发展的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(24): 3028-3030.

糖尿病是临床常见的慢性疾病,其主要是由于机体胰岛素分泌不足或机体存在胰岛素抵抗而导致的代谢紊乱^[1]。糖尿病又分为 1 型和 2 型,其中 1 型糖尿病(T1DM)多受遗传易感基因影响,其发病机制主要是自身抗原特异性、致病性 T 淋巴细胞攻击胰岛导致 β 细胞损伤而无法分泌胰岛素^[2]。T1DM 的临床症状主要为多饮、多食和消瘦,早期难以预测及诊断,当患者就诊时,血糖已经明显高于正常水平,胰岛 β 细胞受损严重,患者难以治愈,且需要长期给予胰岛素进行治疗^[3]。因此,寻求特异性指标对疾病的诊断及治疗靶点的选择具有重要意义。CD4⁺、CD25⁺ 调节性 T 淋巴细胞(Treg)是机体重要的免疫调节 T 淋巴细胞,参与机体调控免疫应答及维持免疫自稳^[4-5]。近年来有研究指出,Treg 抑制功能低下及数量的降低和 T1DM 的发生、发展密切相关^[6]。人转录因子 Foxp3 是 Treg 分化及生长的主要基因;细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA-4)是 Treg 表面代表性的免疫表型^[7]。T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3(Tim-3)是一种新发现的与糖尿病进展相关的蛋白分子^[8]。本研究以本院收治的 T1DM 患者和健康者为研究对象,比较患者 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 水平与健康者之间的差异,从而探讨这 3 种指标与 T1DM 患者病情发生、发展的关系,旨在为 T1DM 的早期诊断及治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 经伦理委员会审议并批准,将本院 2017 年 1 月至 2019 年 7 月收治的 80 例符合纳入及排除标准的 T1DM 患者作为观察组,并选取同期行正常体检的 80 例体检健康者作为对照组。观察组中,男 45 例,女 35 例;年龄 23.5~63.2 岁,平均(42.6±10.2)岁。对照组中,男 42 例,女 38 例;年龄 22.8~65.3 岁,平均(43.2±10.6)岁;两组受试者基线资料差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 纳入标准 (1)患者符合世界卫生组织糖尿病诊断标准^[9];(2)患者体内胰岛素自身抗体、锌转运体 8 抗体、谷氨酸脱羧酶抗体、蛋白酪氨酸磷酸酶抗体至少一项为阳性;(3)患者确诊后一直采用胰岛素替代治疗;(4)发病时患者空腹 C 肽<300 pmol/L;(5)受试者均对本研究知情并签署知情同意书。

1.3 排除标准 (1)合并严重糖尿病并发症;(2)合并心脑血管疾病;(3)合并心肝肾功能不全;(4)入组前 3 个月存在急性疾病、创伤或严重感染;(5)主动申请退出本研究。

1.4 方法 在所有受试者入组后采集空腹静脉血 3 mL 两管,一管使用梯度密度离心法分离收集外周血中单个核细胞,后采用流式细胞术法检测外周血中 Foxp3+Treg 水平。另一管使用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,后采用 PCR 法检测其中 Tim-3、CTLA-4 及 β -actin mRNA 水平,以 Tim-3/ β -actin 及 CTLA-4/ β -

actin 分别表示 Tim-3、CTLA-4 的表达量,所用引物见表 1,引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司提供,所有操作均严格遵照标准作业程序进行操作。

表 1 引物列表

基因	序列	引物
Tim-3	正向	5'-ACTCTACCTACATCTGGGACACT-3'
	反向	5'-GTAGGTCCCATGGTCATCCAG-3'
CTLA-4	正向	5'-TCTTGAATTCATGGCTTGCCTTGGATTTCAG-3'
	反向	5'-CGGACGGTACCTCAATGTATGGGAATAAAATAAG-3'
β -actin	正向	5'-GAGACCTTCAACACCCCAGC-3'
	反向	5'-GTAGGTCCCATGGTCATCCAG-3'

1.5 统计学处理 采用 SPSS20.0 行统计分析,计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,后行 Pearson 相关性分析来分析血中 Tim-3、Foxp3+Treg 和 CTLA-4 水平与 T1DM 的关系,以分组结果作为“金标准”,应用受试者工作特征(ROC)曲线分析外周血中 Tim-3、Foxp3+Treg 和 CTLA-4 单独及联合检测对 T1DM 的预测作用,其中以 Logistic 回归模型分析各指标的联合应用价值,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 水平检测结果 观察组外周血中 Foxp3+Treg 水平明显低于对照组, Tim-3 和 CTLA-4 水平均明显高于对照组,且差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 水平检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Foxp3+Treg (%)	Tim-3/ β -actin	CTLA-4/ β -actin
观察组	80	2.54±0.62	2.76±0.33	1.02±0.23
对照组	80	5.41±1.31	0.63±0.12	0.45±0.09
<i>t</i>		12.946	54.255	20.642
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 水平与 T1DM 的关系 患者外周血中 Foxp3+Treg 水平与其病情严重程度呈负相关($r=-0.483, P<0.05$), Tim-3 和 CTLA-4 水平与其病情严重程度呈正相关($r=0.518, 0.502, P<0.05$)。

2.3 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 诊断预测 T1DM 的价值 采用 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 联合检测鉴别 T1DM 的灵敏度、特异度及曲线下面积(AUC)均明显高于各指标单独或两项指标联合检测,且差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3、图 1。

表 3 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 诊断预测 T1DM 的价值

指标	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC
Foxp3+Treg	81.25	76.25	0.859
Tim-3	76.25	77.50	0.862
CTLA-4	85.00	81.25	0.883
Foxp3+Treg 联合 Tim-3	87.50	86.25	0.892
Foxp3+Treg 联合 CTLA-4	88.75	90.00	0.921
Tim-3 联合 CTLA-4	90.00	88.75	0.933
3 项联合	93.75	92.50	0.957

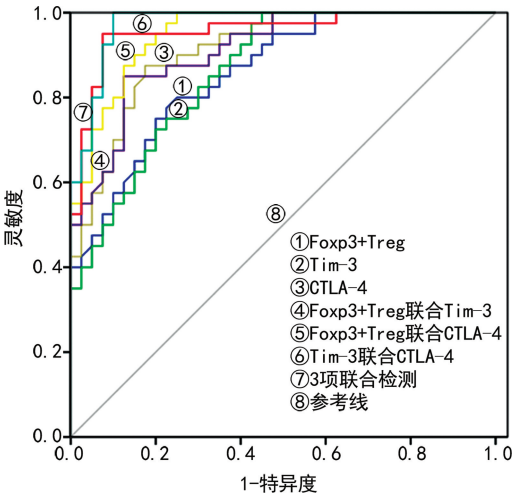


图 1 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 诊断预测 T1DM 的 ROC 曲线图

3 讨论

近年来,人们生活习惯及饮食结构出现显著改变,导致糖尿病的临床发病率呈逐年上升趋势^[10]。其中 T1DM 主要与遗传易感基因密切相关,是由致病性 T 淋巴细胞、自身抗原特异性等直接攻击胰岛组织并导致 β 细胞出现特异性损伤、胰岛素分泌量不足的自身免疫性疾病^[11]。Treg 属于人体内重要的表达白细胞介素(IL)-2 受体 α 链的 $CD4^+$ T 淋巴细胞,其可有效抑制外来抗原或胰岛自身抗原的异常免疫反应,与 T1DM 发生、发展密切相关^[12]。转录因子 Foxp3 是有效维持 $CD4^+$ 细胞发育和功能的重要因子,其在 $CD4^+ CD25^{High}$ Treg 中特异性表达,且细胞活化方式出现改变后其水平并未随之变化,是目前公认的识别 Treg 的重要标志物^[13]。

Tim-3 是体内重要的由 281 个氨基酸组成的蛋白,其在多种免疫系统疾病中均呈现异常表达状态。有研究指出, Tim-3 在 Th1 细胞中特异性地选择性表达和分化,并通过与配体的相互作用有效调节 Th1 免疫应答效应^[14]。有研究结果显示,在糖尿病患者体内 Tim-3⁺ 水平明显升高,且随着患者病情加重其水平也明显升高^[15]。CTLA-4 是人体内 T 淋巴细胞增殖活性的重

要负性调控因子,有研究指出其可与 B7 分子特异性结合并有效抑制 T 淋巴细胞活化,且可有效抑制 $CD4^+$ Treg 细胞功能,属于必要的负性调控分子^[16]。

本研究结果显示,观察组外周血中 Foxp3+Treg 水平低于对照组, Tim-3 和 CTLA-4 水平均明显高于对照组。此外,患者外周血中 Foxp3+Treg 与其病情严重程度呈负相关, Tim-3 和 CTLA-4 水平与其病情严重程度呈正相关。且采用 Foxp3+Treg、Tim-3 和 CTLA-4 3 项联合检测鉴别诊断 T1DM 的灵敏度、特异度及 AUC 均高于各指标单独或两项指标联合检测。分析认为, Foxp3 作为脊椎动物叉头样转录因子,特异性表达于 Treg,是 Treg 发育的关键因子,亦是 Treg 的特征性标志,因此, Foxp3+Treg 水平能更准确地反映 Treg 的活性。在糖尿病前期,虽然糖耐量受损患者体内 T 细胞水平降低,但 Foxp3+Treg 水平并无改变,随着疾病的发展,患者体内可溶性 IL-2 受体大量聚集,导致 IL-2 对 T 细胞作用下降,影响 T 细胞增殖,导致 Treg 生成障碍,从而导致 Foxp3+Treg 水平降低。Tim-3 及 CTLA-4 水平在 T1DM 患者体内呈现异常升高状态,其可能导致患者 Th1 等免疫细胞分泌大量 IL-4 及 γ -干扰素,导致体内 Th1/Th2 水平失衡,进而导致患者胰岛 β 细胞受损,并加重患者病情。相较于各指标两两联合或单独检测,采用 3 项指标联合检测可更为全面地评估体内免疫及炎症状态,有助于提高鉴别诊断准确率和有效性。

4 结论

综上所述, Foxp3+Treg 与 T1DM 病情呈负相关, Tim-3 和 CTLA-4 水平与 T1DM 病情呈正相关,且 3 项指标联合检测可明显提高鉴别诊断 T1DM 的效能。但本研究临床研究样本数较少,且并未对患者进行长期随访研究,有待后续深入研究分析。

参考文献

[1] AHMED A, SARKHYA L, ZAFAR A, et al. Glycogenic hepatopathy, an underdiagnosed cause of relapsing hepatitis in uncontrolled type 1 diabetes mellitus[J]. Saudi Med J, 2017, 38(1): 89-92.

[2] ROSEANNE O Y, FADY H, KAREN N, et al. Not quite type 1 or type 2, what now? Review of monogenic, mitochondrial, and syndromic diabetes[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2018, 19(8): 1-18.

[3] 罗说明, 马小茜, 周智广. 暴发性 1 型糖尿病的遗传学特征[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(8): 561-563.

[4] SHANKER K S, VIVEK K S, PRIYAMBADA K, et al. Trypanosoma evansi induces detrimental immuno-catabolic alterations and condition like type-2 diabetes in buffalo[J]. Parasitol Int, 2018, 67(2): 140-143.

[5] VARUNA V, VANDANA J. Celiac disease and type 1 diabetes mellitus: connections and implications[J]. Indian J Med Res, 2017, 145(1): 4-8.

(下转第 3036 页)

- 111-117.
- [5] CHEN W, ZHENG R, ZHANG S, et al. The incidences and mortalities of major cancers in China, 2009[J]. Chin J Cancer, 2013, 32(3):106-112.
- [6] 周晓梅, 刘杰, 林洪生. 国内外癌症康复研究现状[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2017, 24(9):1148-1149.
- [7] 刘佳, 春梅. 结直肠癌早期诊断筛查热点问题[J]. 癌症进展, 2011, 33(5):524-527.
- [8] YANG K L, YANG S H, LIANG W Y, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) level, CEA ratio, and treatment outcome of rectal cancer patients receiving pre-operative chemoradiation and surgery [J]. Radiat Oncol, 2013, 8(1):43-45.
- [9] GROSSMANN I, VERBERNE C, DE BOCK G, et al. The role of high frequency dynamic threshold (HiDT) serum carcinoembryonic antigen (CEA) measurements in colorectal cancer surveillance: a (revisited) hypothesis paper [J]. Cancers (Basel), 2011, 3(2):2302-2315.
- [10] PARK I J, CHOI G S, JUN S H. Prognostic value of serum tumor antigen CA19-9 after curative resection of colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2009, 29(10):4303-4308.
- [11] ICHIHARA T, NAGURA H, NAKAO A, et al. Immunohistochemical localization of CA19-9 and CEA in pancreatic carcinoma and associated diseases [J]. Cancer, 2015, 61(2):324-333.
- [12] 韩晓颖, 王劲松, 李小芬, 等. 血清 CRP、CA72-4 水平变化与结直肠癌发生发展的关系[J]. 癌症进展, 2017, 15(6):657-659.
- [13] CHOI C H, KIM W D, LEE S J, et al. Clinical predictive factors of pathologic tumor response after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer[J]. Radiat Oncol J, 2012, 30(3):99-107.
- [14] MALLAPPA S, SINHA A, GUPTA S, et al. Preoperative neutrophil to lymphocyte ratio >5 is a prognostic factor for recurrent colorectal cancer[J]. Colorectal Dis, 2013, 15(3):323-328.
- [15] CAPUTO D, COPPOLA A, LA VACCARA V, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio predicts risk of nodal involvement in T1 colorectal cancer patients[J]. Minerva Chir, 2018, 73(5):475-481.
- [16] 庄肃非, 孟光冉, 王恩龙, 等. 结直肠癌患者术前术后中性粒细胞与淋巴细胞比值的变化及意义[J]. 宁夏医学杂志, 2016, 38(5):414-416.

(收稿日期:2020-02-21 修回日期:2020-06-10)

(上接第 3030 页)

- [6] 张妍, 宋翔, 时立新. 1 型糖尿病小鼠体内树突状细胞亚群变化的初步研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2018, 38(6):420-426.
- [7] JUAN S, YIMING Y, XIAONA H, et al. Efficient therapeutic function and mechanisms of human polyclonal CD8⁺ CD103⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells on collagen-induced arthritis in mice[J]. J Immunol Res, 2019, 2019(2):1-12.
- [8] CATHERINE H, PARTH N, ROBERT C A, et al. Qualitative study of barriers to clinical trial retention in adults with recently diagnosed type 1 diabetes[J]. Bmj Open, 2018, 8(7):e022353.
- [9] 李雪莉, 姜亚云, 张景玲, 等. WHO 与美国糖尿病学会糖尿病诊断标准异同的探讨[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2000, 16(2):87-90.
- [10] TRACY L, RAGHU L I, KATE L, et al. Parent-reported prevalence and persistence of 19 common child health conditions[J]. Arch Dis Child, 2018, 103(6):191-194.
- [11] ELIANA M, JAMES L R, KEIRAN H M, et al. Erratum: Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes[J]. Nat Immunol, 2017, 18(8):951.
- [12] WILLIAM H P, JOYCE A, LAWRENCE F, et al. Initiating insulin: how to help people with type 2 diabetes start and continue insulin successfully [J]. Int J Clin Pract, 2017, 71(1):895-899.
- [13] BARTOSZ H, ILONA K, JANUSZ S, et al. Prognostic impact of multimorbidity in patients with type 2 diabetes and ST-elevation myocardial infarction[J]. Oncotarget, 2017, 8(61):467-477.
- [14] TINGTING C, YIMIN C, WENTING B, et al. T-lymphocyte subsets and Th1/Th2 cytokines in convalescent patients with Epstein-Barr virus-associated aplastic anemia [J]. Hematology, 2020, 25(1):11-16.
- [15] JEFFREY T K, BRADLEY Y, SHAINA S, et al. Forging new paths in diabetes prevention (FINDIT): study protocol for a randomized controlled trial[J]. Trials, 2017, 18(1):167-170.
- [16] YANJUE S, RONGRONG C, JIE S, et al. Diabetes mellitus as a risk factor for incident chronic kidney disease and end-stage renal disease in women compared with men: a systematic review and Meta-analysis [J]. Endocrine, 2017, 55(1):66-76.

(收稿日期:2020-03-19 修回日期:2020-08-10)