

# 糖尿病视网膜病变患者外周血 DC 细胞数量和功能的分析研究

金鑫,刘铁城,张卯年

作者单位:(100853)中国北京市,解放军总医院眼科  
作者简介:金鑫,博士,主治医师,研究方向:眼底病、眼科遗传病。  
通讯作者:金鑫.jinxin301@sina.com  
收稿日期:2013-07-10 修回日期:2013-09-25

## Functional analysis of dendritic cells from peripheral blood in patients with diabetic retinopathy

Xin Jin, Tie-Cheng Liu, Mao-Nian Zhang

Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

**Correspondence to:** Xin Jin. Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. jinxin301@sina.com

Received:2013-07-10 Accepted:2013-09-25

### Abstract

• **AIM:** To analyze the functions of dendritic cells (DC) from peripheral blood in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients with diabetic retinopathy (DR), and investigate the role of DC in the pathogenesis of DR.

• **METHODS:** The subjects were divided into simple T2DM group, T2DM with DR group and normal control group. Flow cytometry was used to analyze classification and number of DC in peripheral blood, and ELISA was used to detect the level of Interleukin -12 (IL-12).

• **RESULTS:** Compared with the simple T2DM and normal control groups, the number and percentage of myeloid dendritic cells (mDC) in peripheral blood increased significantly in T2DM with DR group ( $P < 0.05$ ). The contents of IL-12 in plasma also increased significantly in T2DM with DR group, while the contents of IL-12 in cultured mDC supernatant and the IL-12 secretion of single mDC reduced significantly ( $P < 0.05$ ). The number and percentage of plasmacytoid dendritic cells (pDC) had no significant difference among the three groups ( $P > 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Drift of the mDC/pDC subtype causes Th1/Th2 immune function disorders and promotes the immune inflammatory reaction, which may play an important role in the occurrence and development of DR.

• **KEYWORDS:** dendritic cells; type 2 diabetes mellitus; diabetic retinopathy

**Citation:** Jin X, Liu TC, Zhang MN. Functional analysis of

dendritic cells from peripheral blood in patients with diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(11):2270-2272

### 摘要

**目的:**观察糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)患者外周血树突状细胞(dendritic cells, DC)数量和功能的变化,探讨DC在DR发病中的作用及其机制。

**方法:**将受试者分为单纯2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)组、T2DM合并DR组以及正常对照组。流式细胞仪检测外周血DC细胞分类及数量,ELISA法检测白介素-12(IL-12)水平。

**结果:**与单纯T2DM组和正常对照组相比,T2DM合并DR组外周血中髓样树突状细胞(myeloid dendritic cells, mDC)绝对数以及占单个核细胞的百分比显著上升( $P < 0.05$ ),血浆中IL-12含量显著升高,mDC培养上清中IL-12含量与单个mDC的IL-12分泌量显著降低( $P < 0.05$ );而各组浆细胞样外周血树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDC)绝对数以及占单个核细胞的百分比无显著性差别( $P > 0.05$ )。

**结论:**mDC/pDC亚型漂移引起Th1/Th2免疫功能失调,mDC特性和功能异常启动免疫炎症反应可能在DR的发生发展中产生了重要作用。

**关键词:**树突状细胞;2型糖尿病;糖尿病视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.11.31

**引用:**金鑫,刘铁城,张卯年.糖尿病视网膜病变患者外周血DC细胞数量和功能的分析研究.国际眼科杂志2013;13(11):2270-2272

### 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是常见的糖尿病微血管病变之一,DR严重影响了患者的视功能,目前关于DR的发病机制尚不清楚。近年来研究表明免疫系统的激活参与了2型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)的发病,T2DM患者免疫功能的变化与其微血管病变的发生和发展密切相关<sup>[1]</sup>。树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内最重要的抗原呈递和免疫调节应答细胞,糖基化终产物可促进DC成熟并诱导T淋巴细胞反应增强<sup>[2-4]</sup>。本研究对T2DM合并DR患者外周血中DC细胞的数量和功能进行了检测,以期探讨DC与DR发病之间的联系。

### 1 对象和方法

**1.1 对象** 解放军总医院2011-10/2012-10内分泌科就诊的2型糖尿病患者共37例,均符合1999年WHO关于DM的诊断及分型标准。眼底镜联合眼底荧光血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)检查,以全国眼底病协作组1985年制定的DR分级为依据,将T2DM患者为分

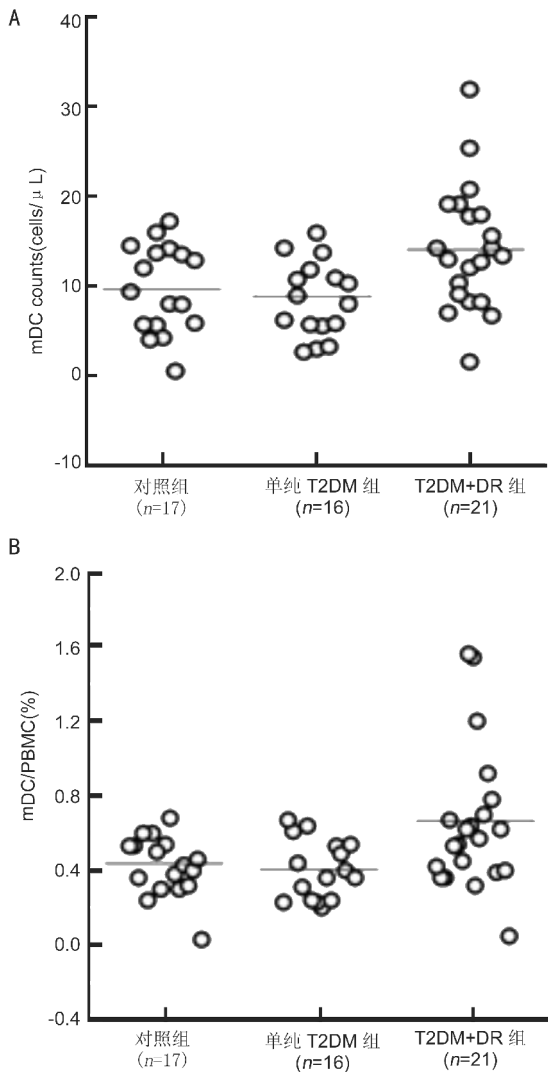


图1 三组外周血 mDCs 计数比较 A:外周循环 mDC 绝对数; B:外周循环 mDC 占 PBMC 百分比。

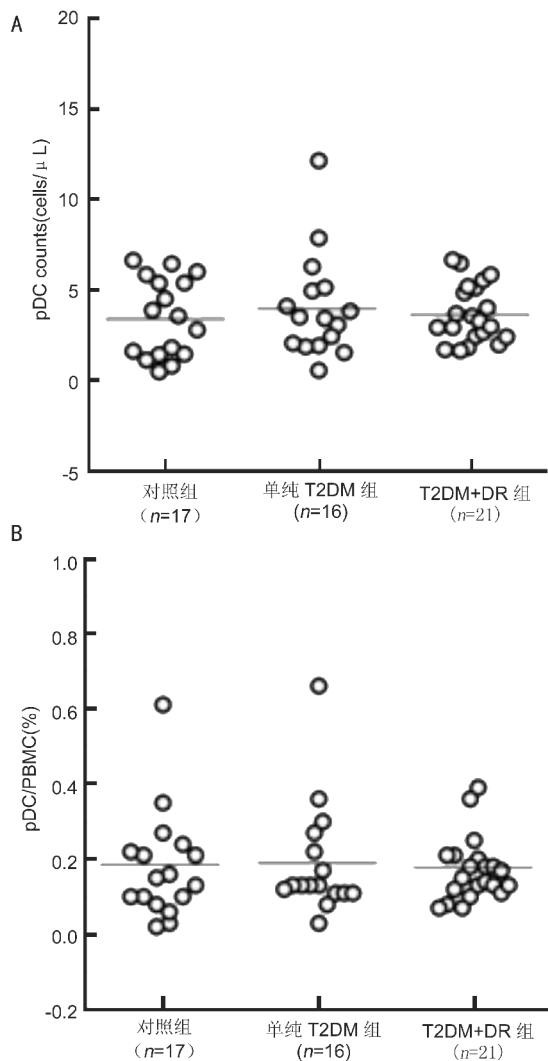


图2 三组外周血 pDCs 计数比较 A:外周循环 pDC 绝对数; B:外周循环 pDC 占 PBMC 百分比。

T2DM+DR 组 (合并 DR) 21 例,单纯 T2DM 组 (未合并 DR) 16 例。T2DM+DR 组中非增殖型 8 例、增殖型 13 例,男 10 例、女 11 例,平均年龄  $58.2 \pm 9.7$  岁;单纯 T2DM 组男 8 例、女 8 例,平均年龄  $56.7 \pm 7.3$  岁。对照组 17 例,均来自健康体检者,其中男 9 例、女 8 例,年龄  $57.3 \pm 6.8$  岁。病例组及对照组均排除自身免疫性疾病,近 3 个月内无特异和非特异感染史;肝肾功能、血脂、心电图、尿常规基本正常。年龄、性别分布无统计学差异。病例组经正规内科治疗,控制血糖水平至正常范围。

**1.2 方法** 流式细胞三色分析法检测 DC 数量及亚型比率:流式细胞仪 (BD 公司,美国)。PerCP 标记的 HLA-DR 单抗、PE 标记的 CD123 单抗、APC 标记的 CD11c 单抗 (BD Pharmingen 公司,美国)。数据采集分析采用 FACSCalibur 和 CELLQuest 软件 (Becton Dickinson 公司,美国)。细胞因子检测: Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法 (1000r/10min, 2500r/20min, 1500r/10min, 1200r/10min) 分离外周血单核细胞接种于 96 孔板 ( $4 \times 10^5$  cells/0.2mL/well),青霉素、链霉素、L-谷氨酰胺和 10% FCS (Thermo Scientific HyClone)、50μg/mL poly (I:C) (Amersham) 37°C 培养,24h 收集培养上清。按 ELISA 试剂盒 (Bio-Source International) 说明重复检测 IL-12 水平。每个 mDCs 的 IL-12

产量以 IL-12 的总量除以每孔中 CD11c<sup>+</sup> mDCs 数量计算,计算公式:  $IL-12 / (mDC\% \times 2 \times 10^6)$ 。

统计学分析:利用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料采用均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多重组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 非参数检验。两组间比较采用 Mann-Whitney 非参数 U 检验。*P* < 0.05 表示具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 三组外周血 DC 数量变化** T2DM+DR 组、单纯 T2DM 组与对照组间外周循环 mDC 绝对数具有显著性差异 (*P* = 0.013),如图 1,2 所示,T2DM+DR 组 ( $14.19 \pm 6.89$ ) 与单纯 T2DM 组 ( $8.52 \pm 4.18$ ) 相比显著升高 (*P* = 0.006)、与对照组 ( $9.70 \pm 4.90$ ) 相比显著升高 (*P* = 0.036),而单纯 T2DM 组与对照组相比无显著性差异 (*P* = 0.444);三组间外周循环 mDC 占单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 百分比具有显著性差异 (*P* = 0.022),T2DM+DR 组 ( $0.65 \pm 0.38$ ) 与单纯 T2DM 组 ( $0.41 \pm 0.16$ ) 相比显著升高 (*P* = 0.015)、与对照组 ( $0.42 \pm 0.15$ ) 相比显著升高 (*P* = 0.026),而单纯 T2DM 组与对照组相比无显著性差异 (*P* = 0.606);三组间外周循环 pDC 绝对数 (T2DM+DR 组:  $3.70 \pm 1.60$ 、单纯 T2DM 组:  $4.40 \pm 2.87$ 、对照组:  $3.48 \pm 2.18$ ) 无显著性差异 (*P* = 0.831);三组间外周循环 pDC

占PBMC百分比(T2DM+DR组:0.17±0.08、单纯T2DM组:0.19±0.15、对照组:0.18±0.14)无显著性差异( $P=0.931$ )。

**2.2 三组外周血 mDCs 功能变化** T2DM+DR组、单纯T2DM组与对照组间血浆中IL-12含量具有显著性差异( $P=0.013$ ),如图3所示,T2DM+DR组血浆中IL-12含量(56.23±18.20)与单纯T2DM组(43.08±7.93)相比显著升高( $P=0.016$ )、与对照组(42.58±11.63)相比显著升高( $P=0.009$ )。而单纯T2DM组与对照组相比无显著性差异( $P=0.657$ );三组间培养上清中IL-12总量以及每个mDC IL-12分泌量均有显著性差异( $P=0.043, P=0.000$ ),T2DM+DR组培养上清中IL-12总量与每个mDC IL-12分泌量(184.78±70.35;0.012±0.019)与单纯T2DM组(230.91±73.21;0.017±0.009)相比显著降低( $P=0.044, P=0.002$ )、与对照组(236.16±69.44;0.019±0.018)相比显著降低( $P=0.029, P=0.000$ ),而单纯T2DM组与对照组相比无显著性差异( $P=0.763, P=1.000$ )。

### 3 讨论

DR是糖尿病微血管病变之一,其基本病理改变包括视网膜微血管病变、视网膜神经细胞病变及神经胶质细胞病变。在视网膜微血管病变的研究中慢性免疫炎症反应的作用逐渐引起人们的重视,白细胞停滞以及细胞因子的释放是引起视网膜微血管无灌注,加重视网膜缺血,促进新生血管生成的重要因素。近年来研究表明免疫炎症反应是动脉粥样硬化和糖尿病血管病的共同致病基础<sup>[5,6]</sup>。T淋巴细胞激活引起一系列特异性细胞免疫及体液免疫反应,通过分泌细胞因子放大炎症反应,进一步激活巨噬细胞、血小板和平滑肌细胞,从而导致炎性产物的暴增,促进动脉粥样硬化进展和斑块的破裂。T淋巴细胞激活首先需要抗原的递呈,而DC是目前已知体内最重要的抗原递呈细胞和免疫应答调节细胞。DC起源于体内多能造血干细胞,分为mDC和pDC两种亚型,广泛分布在外周淋巴组织,最大限度地捕捉抗原,是启动、调控和维持免疫的重要环节,决定免疫反应的最终走向。

在本研究中,我们对T2DM合并与不合并DR患者外周血中DCs及两种亚型mDC、pDC的数量及功能进行了检测,与单纯T2DM组和对照组相比,T2DM+DR组外周循环mDC绝对数和相对数显著升高,而pDC绝对数和相对数无显著性差异;T2DM+DR组血浆中IL-12含量显著升高,但培养上清中IL-12含量与每个mDC IL-12分泌量则显著降低。提示在T2DM合并DR患者中,外周血循环中的mDC分泌IL-12功能降低,代偿性引起mDC数量增加,而pDC无明显改变,从而导致mDC/pDC比例发生改变出现亚型漂移。mDC和pDC的平衡是决定Th1/Th2免疫应答的关键,mDC可产生大量促炎因子IL-12,优先诱导Th1应答,而pDC分泌少量的IL-12,主要产生Th2应答。DR患者DC细胞亚型漂移引起Th1/Th2免疫功能失调,在DR的发生发展中产生作用。

DCs发展包括三个阶段:前体、未成熟及成熟阶段,外周循环中的DCs多以未成熟形式存在,具有极强的摄取和加工处理抗原的能力;捕捉到抗原后未成熟DCs开始迁移并逐渐分化成熟,进入外周淋巴器官或靶病变部位,其激活T淋巴细胞功能显著增强。近年来大量研究显示:DC在动脉粥样硬化免疫发病中发挥着重要作用,主要存在于组织间隙和血管内膜下,其作为动脉壁血管相关淋巴组织重要“前哨”,对血管组织中可能有害的内源性或外

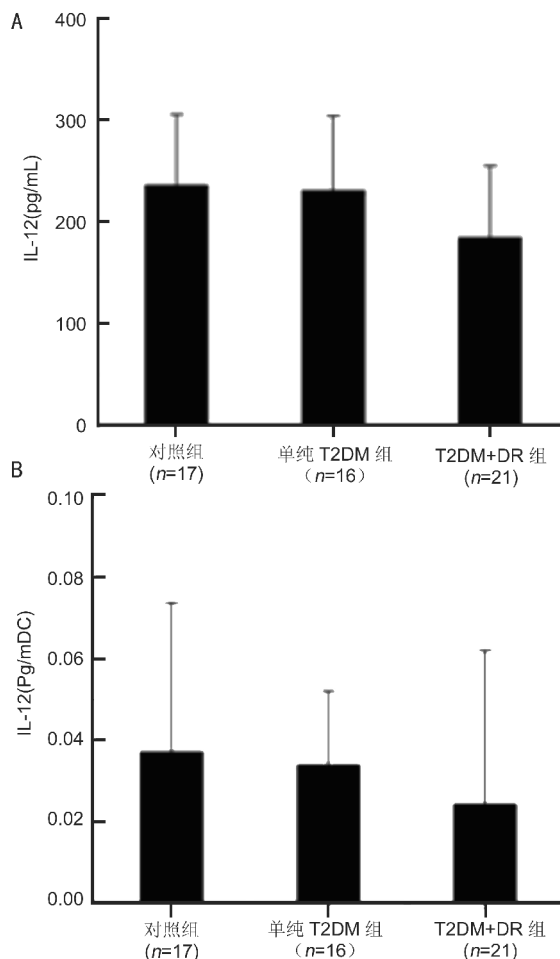


图3 三组mDCs培养上清中IL-12含量比较 A:培养上清中IL-12总量;B:每个mDC IL-12分泌量。

源性抗原进行监视和筛查<sup>[7]</sup>。另外有研究表明,高糖条件可以促进DCs成熟,并增强其激活T淋巴细胞的功能,促进其自身释放炎症因子,加速并放大炎症免疫反应<sup>[8]</sup>。我们推测外周循环中mDC数量的增加可能导致视网膜血管组织局部的mDC数量的升高,从而在组织局部启动并加速免疫损伤,引起或促进DR的发生发展。目前关于DC在糖尿病视网膜病变中的变化和作用尚无文献报道。本研究结果提示DC亚型迁移性改变以及mDC特性和功能改变可能在DR的炎症免疫反应中起着重要作用。

#### 参考文献

- 1 Mandrup - Poulsen T. Type 2 diabetes mellitus; a metabolic autoinflammatory disease. *Dermatol Clin* 2013;31(3):495-506
- 2 Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells; immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002;82(1):97-130
- 3 Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells; specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;106(3):255-258
- 4 Ge J, Jia Q, Liang C, et al. Advanced glycosylation end products might promote atherosclerosis through inducing the immune maturation of dendritic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(10):2157-2163
- 5 Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 2001;22(12):665-669
- 6 Plutzky J. Inflammation in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 2004;5(3):255-259
- 7 Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(12):1876-1890
- 8 Surendar J, Mohan V, Pavankumar N, et al. Increased levels of serum granulocyte - macrophage colony - stimulating factor is associated with activated peripheral dendritic cells in type 2 diabetes subjects (CURES-99). *Diabetes Technol Ther* 2012;14(4):344-349