

# 糖尿病视网膜病变患者外周血中炎症细胞因子和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的表达水平变化

蒋文君<sup>1,2</sup>, 赵柏林<sup>3</sup>, 马善波<sup>4</sup>, 马为梅<sup>5</sup>, 王至允<sup>1,2</sup>, 于敬妮<sup>5</sup>, 李 娅<sup>2</sup>

引用: 蒋文君, 赵柏林, 马善波, 等. 糖尿病视网膜病变患者外周血中炎症细胞因子和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的表达水平变化. 国际眼科杂志, 2025, 25(4): 638-643.

基金项目: 陕西省自然科学基金面上项目 (No. 2023-JC-YB-685); 西安市医学研究一般项目 (No. 24YXYJ0117)

作者单位: <sup>1</sup>(712046) 中国陕西省咸阳市, 陕西中医药大学; <sup>2</sup>(710004) 中国陕西省西安市人民医院 (西安市第四医院) <sup>2</sup> 临床检验中心; <sup>3</sup>(710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学医学部生物化学与分子生物学系; <sup>4</sup>(710032) 中国陕西省西安市, 空军军医大学西京医院药理学部

作者简介: 蒋文君, 女, 硕士研究生, 初级检验师, 研究方向: 分子生物学。

通讯作者: 李娅, 女, 硕士研究生, 副主任检验师, 研究方向: 分子生物学. 1612234@sntcm.edu.cn

收稿日期: 2024-09-27 修回日期: 2025-03-05

## 摘要

目的: 探讨糖尿病视网膜病变 (DR) 患者外周血中炎症细胞因子和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群的表达水平变化。

方法: 回顾性研究。选取 2022-04/07 西安市人民医院 (西安市第四医院) 收治的 2 型糖尿病患者 40 例, 根据患者视网膜是否发生病变分为单纯 2 型糖尿病 (DM) 组 20 例和糖尿病视网膜病变 (DR) 组 20 例, 另选取同一时间体检正常 20 例作为对照组。采用 ELISA 法检测所有参与者外周血中 IL-6、IL-8、IL-10 细胞因子的表达水平; 流式细胞术分析 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 PD-1、TIM-3、CD28、CD57 分子表达水平。

结果: ELISA 法检测出 DR 患者外周血 IL-6、IL-8、IL-10 炎症细胞因子表达较 DM 组和对照组均显著升高 (均  $P < 0.001$ ); 流式细胞术分析显示, DR 患者外周血 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 PD-1、TIM-3、CD57 表达较 DM 组和对照组均升高 (均  $P < 0.001$ ), CD28 表达均降低 (均  $P < 0.001$ )。

结论: DR 患者体内可能由于 IL-6、IL-8、IL-10 促炎细胞因子的表达增多导致 CD8<sup>+</sup> T 细胞出现耗竭与衰老。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 流式细胞术; T 细胞耗竭

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.4.21

## Changes in the expression levels of inflammatory cytokines and CD8<sup>+</sup> T cell subsets in the peripheral blood of patients with diabetic retinopathy

Jiang Wenjun<sup>1,2</sup>, Zhao Bolin<sup>3</sup>, Ma Shanbo<sup>4</sup>, Ma Weimei<sup>5</sup>, Wang Zhiyun<sup>1,2</sup>, Yu Jingni<sup>5</sup>, Li Ya<sup>2</sup>

Foundation items: Project on Basic Research Program of Natural Science in Shaanxi Province (No. 2023-JC-YB-685); Xi'an

Science and Technology Plan Project (No. 24YXYJ0117)

<sup>1</sup>Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an 710004, Shaanxi Province, China; <sup>4</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; <sup>5</sup>Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Li Ya. Department of Clinical Laboratory, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. 1612234@sntcm.edu.cn

Received: 2024-09-27 Accepted: 2025-03-05

## Abstract

• AIM: To investigate alterations in the expression levels of inflammatory cytokines and subsets of CD8<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood of patients with diabetic retinopathy (DR).

• METHODS: Retrospective study. A total of 40 patients with type 2 diabetes admitted to Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital) from April to July 2022 were recruited for this study and categorized into two groups: 20 cases in the simple type 2 diabetes mellitus (DM) group, and 20 cases in the DR group. Additionally, 20 healthy individuals undergoing routine physical examinations served as the control group. The expression levels of cytokines, including interleukin (IL)-6, IL-8, and IL-10 in peripheral blood were quantified using ELISA. Flow cytometry was employed to analyze the expression of programmed cell death-1 (PD-1), T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein-3 (TIM-3), CD28, and CD57 on CD8<sup>+</sup> T cells.

• RESULTS: The peripheral blood expression of IL-6, IL-8, and IL-10 inflammatory cytokines were significantly elevated in DR patients as detected by ELISA (all  $P < 0.001$ ); flow cytometry analysis showed that the expression of PD-1, TIM-3, and CD57 were elevated in peripheral blood CD8<sup>+</sup> T cells of DR patients (all  $P < 0.001$ ), and the expression of CD28 was decreased (all  $P < 0.001$ ).

• CONCLUSION: In DR patients, CD8<sup>+</sup> T cells may undergo depletion and senescence as a result of elevated pro-inflammatory cytokines, including IL-6, IL-8, and IL-10.

• KEYWORDS: diabetic retinopathy; flow cytometry; T cell depletion

Citation: Jiang WJ, Zhao BL, Ma SB, et al. Changes in the expression levels of inflammatory cytokines and CD8<sup>+</sup> T cell subsets in the peripheral blood of patients with diabetic retinopathy. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2025, 25(4): 638-643.

## 0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一个全球性的公共卫生问题,预计到2045年全球将有大约7亿人患有糖尿病<sup>[1]</sup>,其中约1.6亿成年人将患上糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)<sup>[2]</sup>。DR患者免疫系统长时间接触诱发全身炎症的抗原,容易让T细胞出现耗竭、衰老现象,使得细胞因子产量变少,细胞毒性减弱,增殖能力也下降,最终加重病情<sup>[3]</sup>。目前DR防治早期预防手段少、发展延缓措施有限,有效应对方案稀缺,亟需探究其发病机制与危险因素<sup>[4]</sup>。

T细胞耗竭是指由于长期暴露于抗原刺激,T细胞出现失能状态,CD8<sup>+</sup>T细胞耗竭的主要特征为抑制性受体(inhibitory receptors, IRs)如程序性死亡受体-1(programmed cell death-1, PD-1)、T细胞免疫球蛋白及黏蛋白域蛋白-3(T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein-3, TIM-3)等持续性高表达<sup>[5]</sup>。T细胞衰老表现为端粒缩短、端粒酶功能受损以及CD28和CD57等表面标志物表达改变<sup>[6]</sup>。细胞因子是具有广泛生物活性的小分子蛋白,它们可以相互作用并参与细胞病理过程,最终导致糖尿病并发症的发生。

本研究着重检测CD8<sup>+</sup>T细胞亚群(PD-1、TIM-3、CD28、CD57)与血清细胞因子(IL-6、IL-8、IL-10)表达水平,探究炎症因子、T细胞耗竭及衰老与DR的相关性。预期通过精细剖析CD8<sup>+</sup>T细胞亚群以及上述特定炎症因子在DR进程中的动态变化与调控模式,精准识别出具有标志性意义的细胞亚群标志物组合,辅助临床医生在患者尚未出现明显视力损害之前,提前预判DR的发病风险,为后续及时且精准的干预争取宝贵时间,有效延缓疾病的进展。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

回顾性研究。选取2022-04/07西安市人民医院(西安市第四医院)收治的2型糖尿病(T2DM)患者40例,根据患者视网膜是否病变分为单纯2型糖尿病组(DM组)20例和糖尿病视网膜病变组(DR组)20例。T2DM诊断标准:空腹血糖 $\geq 7.0$  mmol/L、餐后2 h血糖 $\geq 11.1$  mmol/L、糖化白蛋白 $\geq 17.1\%$ 、糖化血红蛋白 $\geq 6.5\%$ 中任一指标阳性即被判定为T2DM。DR诊断标准:两位专业的眼科技术人员使用裂隙灯检查患者散瞳后的眼底血管,对符合入组标准的糖尿病患者进行眼底血管造影(FFA),并根据2002年国际临床分期要求进行确诊和分期。纳入标准:DM组均出现多尿、多食等临床症状,并符合《中国2型糖尿病防治指南(2020年版)》的诊断标准;FFA结果符合2002年国际临床分期。排除标准:(1)1型糖尿病;(2)合并有糖尿病肾病、高渗高血糖综合征、糖尿病酮症酸中毒、糖尿病性乳酸酸中毒等糖尿病急性并发症;(3)合并有心肝肾等重要脏器功能不全;(4)合并有恶性肿瘤疾病、内分泌疾病、免疫系统疾病、急性或慢性传染病者;(5)长期服用激素等影响内分泌代谢的药物;(6)合并有眼疾影响眼底血管检查或无法配合眼底镜检查。另选取同一时间体检正常者20例为对照组,纳入标准:年龄与性别与DM组和DR组整体相符的同期体检正常者。排除标准:(1)糖尿病患者或患有其他内分泌疾病;(2)眼部有其他疾病或病变。本研究经西安市人民医

院(西安市第四医院)医学伦理委员会审查通过(批准号:20220024),并获得所有参与者的知情同意并签署知情同意书。

## 1.2 方法

### 1.2.1 主要试剂与仪器

IL-6、IL-8、IL-10的ELISA检测试剂盒购自中国欣博盛公司;全波长酶标仪购自美国Thermo Fisher公司;流式细胞仪、单克隆抗体(CD3-PerCP、CD8-FITC、PD-1-PE、TIM-3-APC、CD28-PE、CD57-APC)和溶血素均购自BD biosciences公司;人单个核细胞分离液购自四正柏公司。

### 1.2.2 样本采集

所有参与者清晨空腹时抽取2 mL静脉血于EDTA-K<sub>2</sub>抗凝管中,颠倒混匀;再抽取3 mL静脉血于含有促凝剂的真空采血管中,4 000 r/min离心15 min后收集上清。

### 1.2.3 细胞因子检测

使用ELISA试剂盒检测血清中的细胞因子水平;按照IL-6、IL-8、IL-10试剂盒说明书的操作步骤进行测定,每个样本设置2个复孔,结果取复孔平均值。

### 1.2.4 CD8<sup>+</sup>T细胞亚群检测

(1)将EDTA-K<sub>2</sub>抗凝血室温4 000 r/min离心5 min后细胞分层;(2)15 mL离心管中加入PBS,将(1)中白细胞层加入离心管后混匀;(3)取另一15 mL离心管加入与血标本量相同的外周血分离缓冲液;(4)将(2)中的白细胞延管壁缓慢加入(3)离心管中;(5)室温4 000 r/min离心25 min;(6)再取一15 mL离心管,加入3 mL PBS,将PBMC加入PBS中洗涤混匀;(7)室温4 000 r/min离心10 min;(8)弃上清后加入300  $\mu$ L BSA配制的PBS重悬细胞后,均匀分配至流式管中;(9)流式管室温4 000 r/min离心5 min;(10)弃上清后加入抗体避光孵育30 min;(11)加入1 mL PBS清洗抗体,室温4 000 r/min离心5 min后弃上清;(12)加入100  $\mu$ L溶血素,10 min后混匀上机,同时做单染管及阴性管用于补位调节;(13)使用FlowJo软件进行流式细胞数据分析。

统计学分析:使用SPSS 26.0软件对研究数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )描述,多组间比较采用单因素方差分析,CD28<sup>+</sup>、IL-10、TIM-3<sup>+</sup>方差齐采用LSD-*t*多重比较,CD57<sup>+</sup>、IL-6、IL-8、PD-1<sup>+</sup>方差不齐采用Tamhane's T2多重比较。非正态分布的计量资料使用 $M(P_{25}, P_{75})$ 描述,组间比较采用非参数Kruskal-Wallis *H*检验,进一步两两比较采用Bonferroni检验( $\alpha' = 0.0167$ )。计数资料用*n*表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 三组参与者基本资料比较

三组参与者性别和年龄比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),HbA1c水平和血糖浓度比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),见表1。

### 2.2 三组参与者外周血中IL-6和IL-8及IL-10表达水平比较

三组参与者外周血中IL-6和IL-8及IL-10表达水平比较差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),进一步两两比较见表2。

### 2.3 三组参与者外周血中CD8<sup>+</sup>T细胞亚群表达水平比较

#### 2.3.1 三组参与者外周血中CD8<sup>+</sup>T细胞中PD-1<sup>+</sup>与TIM-3<sup>+</sup>T细胞表达比较

三组参与者外周血中CD8<sup>+</sup>T细胞中PD-1<sup>+</sup>与TIM-3<sup>+</sup>T细胞表达比较差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),进一步两两比较见表3,图1。

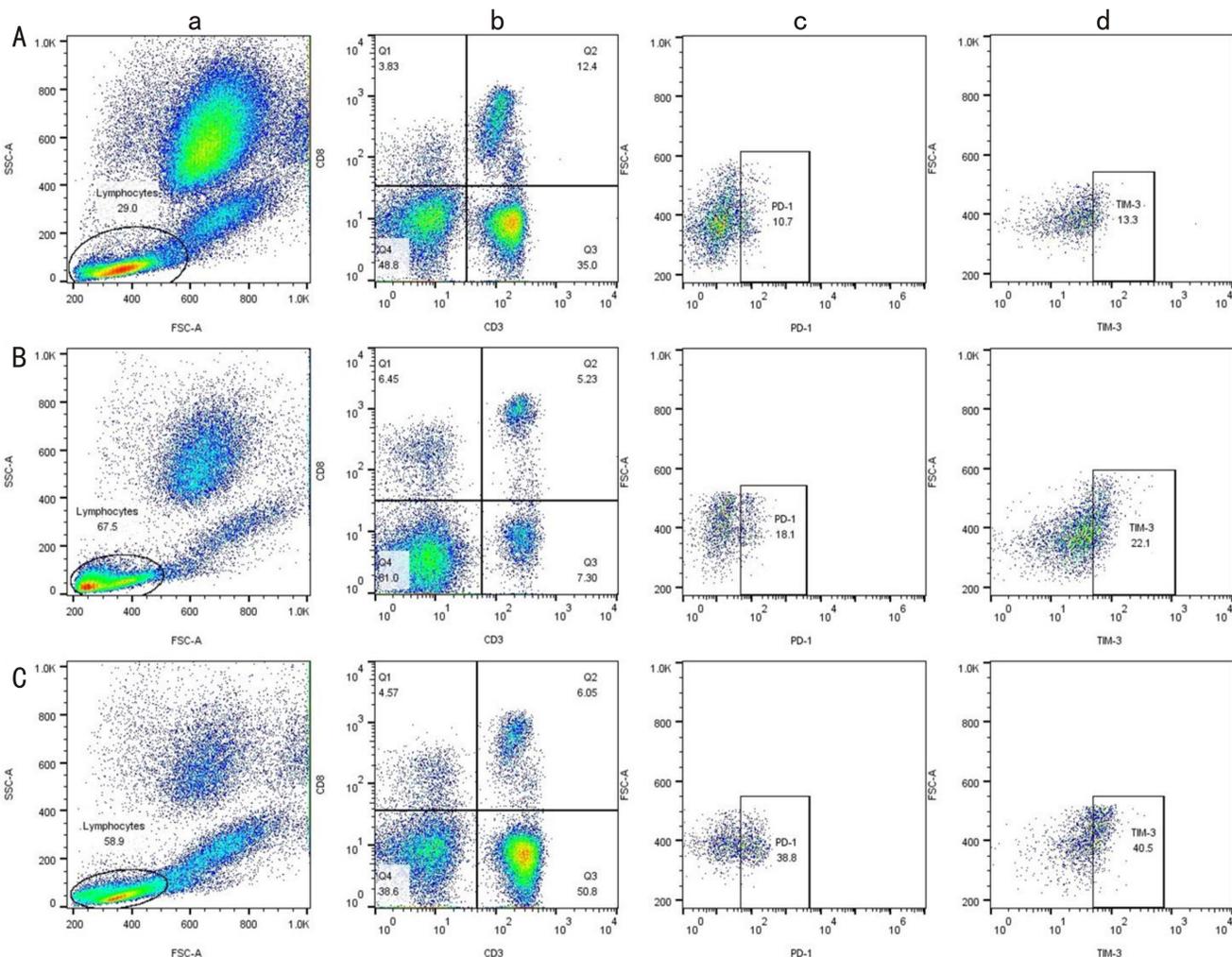


图1 流式细胞术检测三组参与者外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞中 PD-1<sup>+</sup>T 细胞和 TIM-3<sup>+</sup>T 细胞表达水平 A:对照组;B:DM 组;C:DR 组; a:依据前向散射光(FSC-A)与侧向散射光(SSC-A)特征参数,圈定淋巴细胞群;b:CD3 特异性表达于成熟外周 T 细胞表面, CD8 特异性表达于细胞毒性 T 细胞表面,根据对 CD3 和 CD8 的联合表达检测,圈定 CD8<sup>+</sup>T 细胞群;c:在 Q2 细胞群中,根据 FSC-A、PD-1 和 FSC-A、TIM-3 水平圈定 PD-1<sup>+</sup>T 细胞群;d:在 Q2 细胞群中,根据 FSC-A、PD-1 和 FSC-A、TIM-3 水平圈定 TIM-3<sup>+</sup>T 细胞群。

表1 三组参与者基本资料比较

分组	例数	男/女(例)	年龄[M(P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ), 岁]	HbA1c( $\bar{x} \pm s$ , %)	血糖浓度[M(P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ), mmol/L]
对照组	20	9/11	59.5(56.0, 66.0)	5.825±0.45639	5.18(4.81, 5.60)
DM 组	20	11/9	60.5(53.5, 69.0)	8.55±1.7766 <sup>a</sup>	6.84(5.89, 12.01) <sup>b</sup>
DR 组	20	8/12	55.5(51.0, 61.25)	8.775±1.07404 <sup>a,c</sup>	8.15(7.18, 12.50) <sup>b,d</sup>
F/H $\chi^2$		0.937	3.616	35.808	24.982
P		0.626	0.164	<0.001	<0.001

注:对照组为体检正常者;<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.0167 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.0167 vs DM 组。

表2 三组参与者外周血中 IL-6 和 IL-8 及 IL-10 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

分组	例数	IL-6	IL-8	IL-10
对照组	20	2.04±0.50	6.97±1.75	8.22±1.46
DM 组	20	3.68±0.77 <sup>a</sup>	8.53±2.21	10.12±2.98 <sup>a</sup>
DR 组	20	5.24±1.52 <sup>a,c</sup>	11.32±3.56 <sup>a,c</sup>	12.14±1.77 <sup>a,c</sup>
F		48.70	14.16	16.34
P		<0.001	<0.001	<0.001

注:对照组为体检正常者;<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05 vs DM 组。

### 2.3.2 三组参与者外周血中 CD8<sup>+</sup>T 细胞中 CD28<sup>+</sup> 与 CD57<sup>+</sup>T 细胞表达比较

三组参与者外周血中 CD8<sup>+</sup>T 细

胞中 CD28<sup>+</sup>T 细胞和 CD57<sup>+</sup>T 细胞表达比较差异均有统计学意义(P<0.001), 进一步两两比较见表4, 图2。

### 3 讨论

DR 具有高发病率、致盲率以及高复发率的特点, 因此深入了解并有效控制其进展的影响因素对于改善患者预后、降低致盲风险具有至关重要的意义<sup>[7]</sup>。以往多数研究仅聚焦于特定炎症因子在玻璃体液或眼内液的作用, 然而, 随着研究的不断深入, 炎症因子的全身循环变化在 DR 发生发展中的重要性日益凸显, 不容忽视。越来越多的证据表明, 全身性炎症是 DR 发生、发展的内在关键机制<sup>[8]</sup>。长期高血糖会引发机体炎症反应, 这种炎症会严重破坏视网膜的结构, 导致血管通透性变化、毛细血管阻塞和血管生成, 进而损害血-视网膜屏障受损, 最终引发视网膜纤

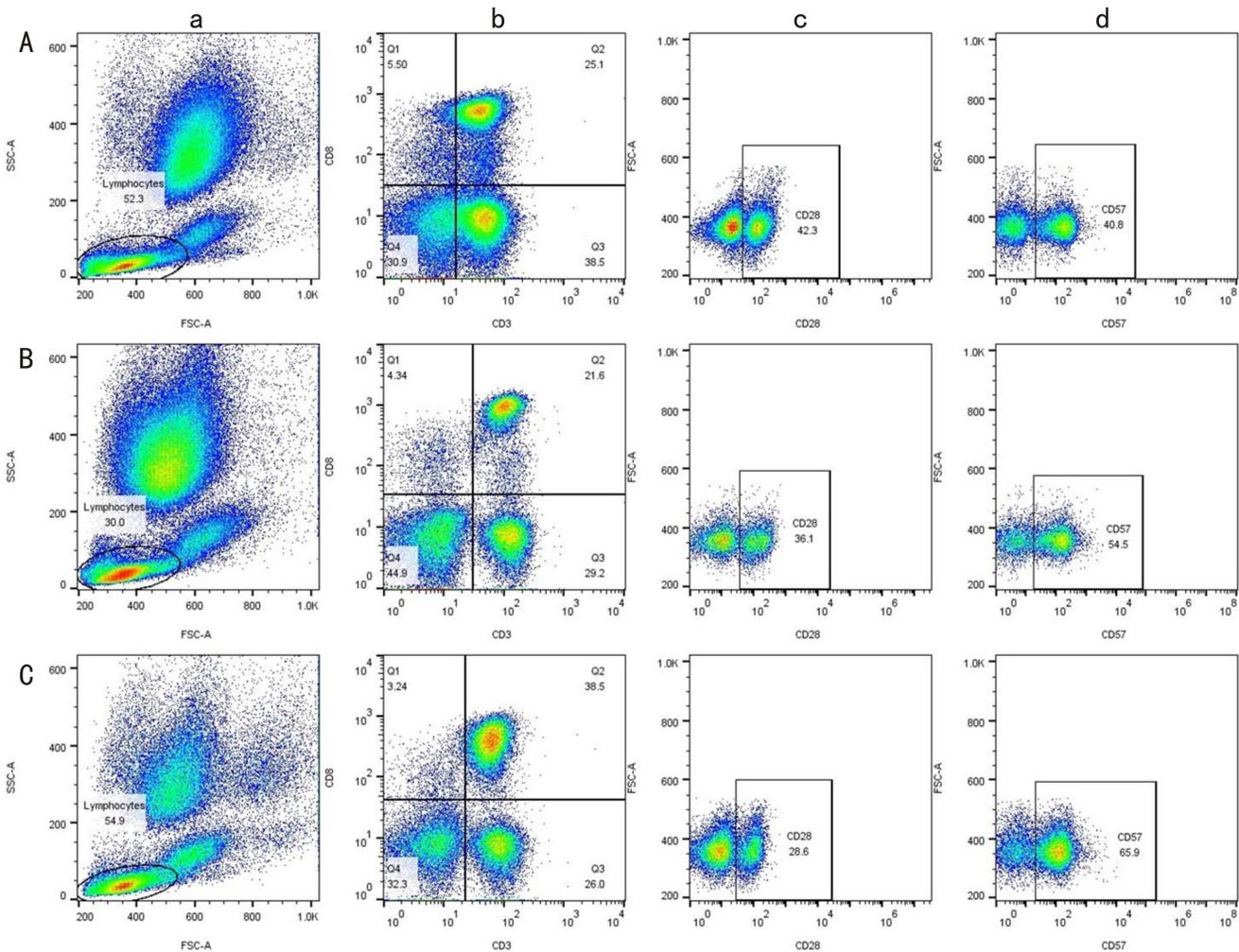


图2 流式细胞术检测三组参与者外周血 CD8<sup>+</sup>T 细胞中 CD28<sup>+</sup>T 细胞和 CD57<sup>+</sup>T 细胞表达水平 A:对照组;B:DM 组;C:DR 组; a:根据 FSC-A 和 SSC-A 圈定淋巴细胞群;b:根据 CD3 和 CD8 的表达圈出 CD8<sup>+</sup>T 细胞群;c:在 Q2 细胞群中,根据 FSC-A、CD28 和 FSC-A、CD57 水平圈定 CD28<sup>+</sup>T 细胞群;d:在 Q2 细胞群中,根据 FSC-A、CD28 和 FSC-A、CD57 水平圈定 CD57<sup>+</sup>T 细胞群。

表3 三组参与者外周血中 CD8<sup>+</sup>T 细胞中 PD-1<sup>+</sup>与 TIM-3<sup>+</sup>T 细胞表达比较 [M(P<sub>25</sub>,P<sub>75</sub>),%]

分组	例数	PD-1	TIM-3
对照组	20	8.75(6.83,12.13)	12.25(8.93,15.03)
DM 组	20	20.75(16.50,24.05) <sup>a</sup>	16.10(13.23,17.28) <sup>a</sup>
DR 组	20	32.60(27.88,35.53) <sup>a,b</sup>	26.90(25.95,28.60) <sup>a,b</sup>
H		47.07	43.50
P		<0.001	<0.001

注:对照组为体检正常者;<sup>a</sup>P<0.0167 vs 对照组;<sup>b</sup>P<0.0167 vs DM 组。

表4 三组参与者外周血中 CD8<sup>+</sup>T 细胞中 CD28<sup>+</sup>与 CD57<sup>+</sup>T 细胞表达比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

分组	例数	CD28	CD57
对照组	20	68.17±6.04	21.48±6.71
DM 组	20	55.81±5.79 <sup>a</sup>	32.90±6.75 <sup>a</sup>
DR 组	20	34.59±6.76 <sup>a,c</sup>	45.74±10.52 <sup>a,c</sup>
F		149.53	43.91
P		<0.001	<0.001

注:对照组为体检正常者;<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组;<sup>c</sup>P<0.05 vs DM 组。

维化<sup>[9]</sup>。ILs 通过与受体相互作用,在免疫细胞的生长、分化和激活以及其他组织驻留细胞中发挥重要作用<sup>[10]</sup>,这使其有望成为 DR 的潜在治疗靶点<sup>[11]</sup>。

在炎症因子方面,本研究发现与对照组和 DM 组相比,DR 患者中 IL-6、IL-8 和 IL-10 的表达都明显升高。这一结果与众多类似研究结果具有一致性。已有研究指出,IL-6 升高对 T2DM、T1DM 和 DR 的发病率具有预测价值<sup>[12]</sup>,且在缺血、视网膜脱离、眼压升高和高血糖情况下,引起氧化应激和损伤血管功能<sup>[13]</sup>。IL-8 可调节血管壁中的慢性炎症,导致毛细血管闭塞和视网膜缺血<sup>[14]</sup>,玻璃体中 IL-8 水平升高与 DR 患者视网膜缺血和大血管胶质闭塞程度增加有关<sup>[15]</sup>。此外,IL-6 和 IL-8 等促炎细胞因子在细胞衰老过程中,可通过直接增加 p53 和 p21 的活性促进细胞衰老<sup>[16]</sup>。同时,随着 DR 程度的增加,IL-10 的浓度也逐渐增加<sup>[17]</sup>。这些炎症因子水平的升高可能与 CD8<sup>+</sup>T 细胞出现 PD-1、TIM-3、

CD28 以及 CD57 表达明显改变有关。

当然,本研究结果与部分其他研究也存在一定差异。一些研究更侧重于单一炎症因子在局部微环境中的作用机制,而本研究则强调多种炎症因子在全身循环中的综合影响,以及它们与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的动态关联。这种差异可能源于研究方法和样本选择的不同。本研究选取了西安市人民医院的患者作为研究对象,该医院在糖尿病与眼科诊疗方面经验丰富且病例资料完备,使得本研究的样本具有一定的代表性。但不可否认,与其他地区或不同类型的研究样本可能存在差异。同时,本研究检测的是血浆中的炎症因子水平,而部分研究可能检测的是视网膜局部的炎症因子,检测部位的不同也可能导致结果的差异。本研究中,DM 组用于呈现发病初期的状态,作为对比参照以分析病情进展指标变化;DR 组则着重反映眼部并发症阶段的特征,通过对比追踪 DR 所引发的外周血指标改变,深入剖析发病机制。同期选取的体检正常作为对照组,代表着健康基线,与患病群体进行对照,能够清晰地凸显出疾病引发的炎症、免疫细胞等方面与健康状态的差异,有助于探寻 DR 发生发展的关键影响因素。

CD8<sup>+</sup>T 细胞是免疫系统的主要细胞,受抗原刺激后会活化扩增产生大量特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞,活化的 CD8<sup>+</sup>T 细胞还能产生肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 和白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 促进细胞凋亡<sup>[18]</sup>。在持续感染时,它们可能逐渐耗竭,表面出现 PD-1、TIM-3 等耗竭受体,这些受体抑制 CD8<sup>+</sup>T 细胞的扩增和细胞因子分泌功能,使其杀伤靶细胞能力受损,无法清除抗原<sup>[19]</sup>。PD-1 及其配体在自身免疫性疾病、器官移植排斥、微生物感染和肿瘤免疫逃逸中发挥重要作用<sup>[20]</sup>。TIM-3 是一种免疫负调控受体,表达过少会导致自身免疫炎症反应过强,损伤机体。在慢性病毒感染中,TIM-3 表达通常上调。研究表明,TIM-3 在减缓糖尿病肾病炎症进展方面起着防御作用<sup>[21]</sup>,树突状细胞靶向疫苗与抗 TIM-3 治疗的联合免疫治疗可提高抗肿瘤功效<sup>[22]</sup>。本研究结果表明,三组间 PD-1 表达存在明显差异 ( $H=47.07, P<0.001$ ),对照组的 PD-1 水平在正常生理状态下的 CD8<sup>+</sup>T 细胞群中是相对较低占比水平,呈现出稳定且偏低的表达特性;DM 组表明随着糖尿病病情出现,未累及视网膜阶段时,PD-1<sup>+</sup>T 细胞占比已显著上升,相较于对照组呈现明显的增长态势;DR 组意味着当疾病进展至视网膜病变阶段,该细胞在 CD8<sup>+</sup>T 细胞群中的占比进一步大幅攀升,凸显出与病情严重程度的紧密关联。与此同时,针对 TIM-3<sup>+</sup>T 细胞, Kruskal-Wallis  $H$  检验分析显示,三组间 TIM-3 表达存在明显差异 ( $H=43.50, P<0.001$ )。对照组展现出正常状态下其在 CD8<sup>+</sup>T 细胞群中的基础表达情况;DM 组说明了糖尿病发病后,TIM-3<sup>+</sup>T 细胞占比亦有所增加,虽幅度相较于 PD-1<sup>+</sup>T 细胞在 DM 组的增长稍缓,但仍体现出病情对其表达的影响;DR 组再次印证随着糖尿病视网膜病变的加剧,TIM-3<sup>+</sup>T 细胞在 CD8<sup>+</sup>T 细胞群中的占比急剧上升,成为疾病发展进程中的一个显著特征。

通过对各组数据深入剖析可知,在 CD8<sup>+</sup>T 细胞群中,对照组的 PD-1<sup>+</sup>T 细胞和 TIM-3<sup>+</sup>T 细胞表达水平相较于 DM 组与 DR 组,存在极为显著的落差,明显处于低位;进

一步对比 DM 组与 DR 组发现,DM 组在这两类细胞的表达水平上同样显著低于 DR 组。综上,这些结果强有力地揭示出随着糖尿病病情逐步向视网膜病变阶段演进,CD8<sup>+</sup>T 细胞群中的 PD-1<sup>+</sup>T 细胞和 TIM-3<sup>+</sup>T 细胞呈现出持续上扬、愈发显著的表达态势,为深度解析 DR 发病机制中的免疫失衡环节筑牢了数据根基,也从侧面彰显出本研究创新性地采用多维度联合检测手段探究 DR 的关键意义与实践价值。

CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞衰老的标志是 CD28 丢失及 CD57 表达增强<sup>[23]</sup>,同时促炎细胞因子和 KLRG1 等标志上调<sup>[24]</sup>。虽然已有研究表明 CD8<sup>+</sup>T 可以通过复杂途径影响 DM 向 DR 的转变<sup>[25]</sup>,但目前该领域相关研究通路仍然较少,存在一定局限性。综合上述研究可知,细胞衰老时,促炎细胞因子与 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞变化联系紧密,这些发现为探究 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群、细胞因子与 DR 的关联筑牢根基。

在 CD8<sup>+</sup>T 细胞方面,本研究结果表明,DR 患者 CD8<sup>+</sup>T 细胞上 CD28 表达较 DM 组和对照组显著降低,CD57 表达明显升高,提示 DR 患者存在 CD8<sup>+</sup>T 衰老。这与已知的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞衰老标志 (CD28 丢失及 CD57 表达增强) 相符,且与一些研究中发现的细胞衰老时促炎细胞因子与 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞变化紧密相关的结论一致<sup>[26]</sup>。如在恶性腹水中,IL-10 可以增加 CD8<sup>+</sup>T 细胞的细胞毒性并直接激活耗尽的肿瘤浸润性 CD8<sup>+</sup>T 细胞<sup>[27]</sup>。此外,本研究还发现所检测的血清炎症因子 (IL-6、IL-8、IL-10) 水平变化与 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群 (PD-1、TIM-3、CD28、CD57 等) 在 DR 进程中呈现动态关联,随着病情加重,IL-6、IL-8、IL-10 水平升高的同时,CD8<sup>+</sup>T 细胞表面的 PD-1、TIM-3、CD57 表达也上升,与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的 CD28 表达下调在时间节点上具有协同性,这与以往报道的研究结果一致<sup>[28]</sup>,这为探究炎症因子如何影响 T 细胞耗竭和衰老提供了初步线索。但与部分仅关注 CD8<sup>+</sup>T 细胞某一特定功能或分子变化的研究不同,本研究更全面地分析了 CD8<sup>+</sup>T 细胞多个亚群分子与炎症因子的关系,这种差异可能是由于研究重点和深度的不同。

本研究将多种血清炎症因子 (IL-6、IL-8、IL-10) 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群 (PD-1、TIM-3、CD28、CD57 等) 在 DR 进程中的变化进行综合分析,发现了它们之间的动态关联,为深入理解 DR 的发病机制提供了新的视角。在临床应用价值方面,这些发现有助于开发新的生物标志物,用于早期诊断 DR 以及评估疾病的进展程度;同时,针对炎症因子与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的相互作用机制,有望开发新的治疗靶点和治疗策略,为 DR 的治疗提供新的方向,推动该领域的研究向更成熟的方向发展。

当然,本研究也提出了更多的科学问题有待进一步研究:(1) IL-6、IL-8 和 IL-10 水平是在血浆中而非视网膜内检测的,若从视网膜转录水平测量炎症因子,可能会得到更多关键信息,这应纳入后续研究。(2) 虽然本研究发现了炎症因子与 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群的动态关联,但对于其中具体的内在调控机制仍未完全明确,需要进一步深入研究。

**利益冲突声明:** 本文不存在利益冲突。

**作者贡献声明:** 蒋文君初稿撰写;赵柏林文献检索;马善波

样本的采集与预处理;马为梅、于敬妮数据录入与整理;王至允数据分析;李娅选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

#### 参考文献

- [1] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edition. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019,157:107843.
- [2] Teo ZL, Tham YC, Yu M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045 systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 2021,128(11):1580-1591.
- [3] Mesquida M, Drawnel F, Fauser S. The role of inflammation in diabetic eye disease. *Semin Immunopathol*, 2019,41(4):427-445.
- [4] Jiang JY, Liu WM, Zhang QP, et al. Trimethylamine N-oxide aggravates vascular permeability and endothelial cell dysfunction under diabetic condition; *in vitro* and *in vivo* study. *Int J Ophthalmol*, 2024,17(1):25-33.
- [5] Cheng HC, Ma KL, Zhang LJ, et al. The tumor microenvironment shapes the molecular characteristics of exhausted CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Lett*, 2021,506:55-66.
- [6] Goronzy JJ, Weyand CM. Successful and maladaptive T cell aging. *Immunity*, 2017,46(3):364-378.
- [7] Li R, Chen L, Yao GM, et al. Effects of quercetin on diabetic retinopathy and its association with NLRP3 inflammasome and autophagy. *Int J Ophthalmol*, 2021,14(1):42-49.
- [8] Simó-Servat O, Simó R, Hernández C. Circulating biomarkers of diabetic retinopathy: an overview based on physiopathology. *J Diabetes Res*, 2016,2016:5263798.
- [9] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 2005,54(6):1615-1625.
- [10] Yang M, Zhang CY. Interleukins in liver disease treatment. *World J Hepatol*, 2024,16(2):140-145.
- [11] Banerjee M, Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*, 2012,413(15-16):1163-1170.
- [12] Jin ZS, Zhang QQ, Liu K, et al. The association between interleukin family and diabetes mellitus and its complications: an overview of systematic reviews and meta-analyses. *Diabetes Res Clin Pract*, 2024,210:111615.
- [13] Robinson R, Srinivasan M, Shanmugam A, et al. Interleukin-6 trans-signaling inhibition prevents oxidative stress in a mouse model of early diabetic retinopathy. *Redox Biol*, 2020,34:101574.
- [14] Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M, et al. Vitreous levels of

interleukin-8 in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*, 2007,143(1):175-176.

- [15] Sun C, Zhang HS, Jiang JJ, et al. Angiogenic and inflammatory biomarker levels in aqueous humor and vitreous of neovascular glaucoma and proliferative diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol*, 2020,40(2):467-475.
- [16] Qiu HB, Bian WG, Zhang LJ, et al. Inhibition of p53/p21 by TWIST alleviates TNF- $\alpha$  induced nucleus pulposus cell senescence *in vitro*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020,24(24):12645-12654.
- [17] Wu HL, Hwang DK, Song XD, et al. Association between aqueous cytokines and diabetic retinopathy stage. *J Ophthalmol*, 2017,2017:9402198.
- [18] Gao S, Chen J, Xie J, et al. The effects of BAFF on T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 2020,21(1):66.
- [19] McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. *Annu Rev Immunol*, 2019,37:457-495.
- [20] Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*, 2007,8(3):239-245.
- [21] Chen XJ, Tang RY, Zha J, et al. A potential defensive role of TIM-3 on T lymphocytes in the inflammatory involvement of diabetic kidney disease. *Front Immunol*, 2024,15:1365226.
- [22] Fu C, Wang J, Ma T, et al.  $\beta$ -catenin in dendritic cells negatively regulates CD8 T cell immune responses through the immune checkpoint molecule tim-3. *Vaccines (Basel)*, 2024,12(5):460.
- [23] Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T cells and their role in health and disease. *Immunology*, 2011,134(1):17-32.
- [24] Mittelbrunn M, Kroemer G. Hallmarks of T cell aging. *Nat Immunol*, 2021,22(6):687-698.
- [25] Huang J, Zhou Q. CD8<sup>+</sup>T cell-related gene biomarkers in macular edema of diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022,13:907396.
- [26] Zhao L, Hu HR, Zhang L, et al. Inflammation in diabetes complications: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *MedComm*, 2024,5(4):e516.
- [27] Huang Y, Zou KN, Jiang H, et al. The complex role of IL-10 in malignant ascites: a review. *Cancer Immunol Immunother*, 2024,73(2):32.
- [28] Brower V. Checkpoint blockade immunotherapy for cancer comes of age. *J Natl Cancer Inst*, 2015,107(3):djv069.