

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.18.009

文章编号: 1005-8982 (2018) 18-0045-05

## 2 型糖尿病周围神经病变患者外周血 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 细胞与 25-(OH) D<sub>3</sub> 的关系及其意义\*

秦宏超, 张真稳

(扬州大学临床医学院 内分泌科, 江苏 扬州 225100)

**摘要:目的** 探讨 2 型糖尿病 (T2DM) 周围神经病变 (DPN) 患者与外周血 25-羟维生素 D<sub>3</sub>[25-(OH) D<sub>3</sub>] 和 CD4<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (Tregs) 的关系。**方法** 收集 42 例 T2DM, 根据临床症状、体征及电生理检查, 将患者分为 28 例 DPN 组和 14 例非 DPN 组。采用电化学发光免疫法检测 T2DM DPN 组和非 DPN 组外周血 25-(OH) D<sub>3</sub> 水平;用流式细胞仪检测所有患者 CD4<sup>+</sup> Tregs 变化。**结果** ① DPN 组 25-(OH) D<sub>3</sub> 水平比非 DPN 组低 ( $P < 0.05$ ); ② 两组外周血 CD4<sup>+</sup> Tregs 百分比比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 神经病变组患者低; ③ T2DM DPN 组外周血 25-(OH) D<sub>3</sub> 与 CD4<sup>+</sup> Tregs 百分比呈正相关 ( $P < 0.05$ )。**结论** 25-(OH) D<sub>3</sub> 和 CD4<sup>+</sup> Tregs 可能与 T2DM 患者 DPN 的发生有关。

**关键词:** 糖尿病神经病变; 2 型糖尿病; 25-羟维生素 D<sub>3</sub>; 调节性 T 细胞

**中图分类号:** R587.1

**文献标识码:** A

## Peripheral blood CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and their clinical significance in patients with type 2 diabetic peripheral neuropathy\*

Hong-chao Qin, Zhen-wen Zhang

(Department of Endocrinology, Clinical Medical School, Yangzhou University,  
Yangzhou, Jiangsu 225100, China)

**Abstract: Objective** To investigate potential association between 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> [25-(OH) D<sub>3</sub>], CD4<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) in peripheral blood and patients with type 2 diabetes peripheral neuropathy (DPN). **Methods** A total of 42 cases with type 2 diabetes were enrolled into the study; 28 patients were identified as DPN and 14 cases as non-DPN according to clinical symptoms, signs and electrophysiological tests. Electrochemiluminescence immunoassay was performed to measure the peripheral blood 25-(OH) D<sub>3</sub>. CD4<sup>+</sup> Tregs cells was measured by flow cytometry. **Results** Serum levels of 25-(OH) D<sub>3</sub> decreased significantly in DPN group when compared with non-DPN ( $P < 0.05$ ). Percentage of CD4<sup>+</sup> Tregs decreased significantly in DPN group when compared with non-DPN ( $P < 0.05$ ). Positive correlation between 25-(OH) D<sub>3</sub> and percentage of CD4<sup>+</sup> Tregswas identified ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Peripheral blood 25-(OH) D<sub>3</sub> and the percentage of CD4<sup>+</sup> Tregs may be related with the occurrence of DPN in patients with T2DM.

**Keywords:** diabetic neuropathy; type 2 diabetes; 25-hydroxy vitamin D<sub>3</sub>; regulatory T cell

收稿日期: 2017-09-04

\* 基金项目: 国家卫生和计划生育委员会课题 (No: W201309)

[通信作者] 张真稳, E-mail: yzzw@medmail.com.cn

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathies, DPN) 是 DM 主要的慢性并发症之一。≥ 50% 的 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 患者合并有 DPN, ≥ 1/3 的 DPN 患者存在针刺、烧灼及电击等疼痛症状<sup>[1]</sup>, 严重影响患者正常的工作和生活, 也是 DM 晚期致死、致残的主要原因之一。T2DM 及其并发症的发病机制涉及多方面, 免疫机制也参与其中。由于疾病病因和长期病程, 患者免疫功能多受到影响, 细胞免疫平衡被破坏, 其中 T 淋巴细胞亚群的变化尤为显著。调节性 T 细胞 (T-regulatory cell, Tregs) 是一类具有独特免疫调节功能的 T 细胞亚群, 在维持机体的免疫稳态和控制自身免疫病的进展方面具有重要作用<sup>[2]</sup>。维生素 D (vitamin D, VD) 除作为钙、磷代谢调节剂参与骨代谢外, 还具有免疫调节作用 (包括调节 Tregs 各个亚群比例、促进 CD4<sup>+</sup> T 分化及上调 Tregs 活性等)。血清 25-羟维生素 D<sub>3</sub> [25-(OH)D<sub>3</sub>] 在 DPN 患者的糖代谢、营养神经、氧化应激及免疫调节方面均发挥作用<sup>[3-5]</sup>, 与 DPN 具有相关性<sup>[6]</sup>。本文旨在探讨 DPN 患者 25-(OH)D<sub>3</sub> 和 CD4<sup>+</sup> Tregs 的关系及其意义, 为 DPN 的发生机制和治疗提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月-2017 年 7 月该院就诊的 T2DM 患者 42 例。其中, 男性 26 例, 女性 16 例; 病程 1 ~ 40 年, 平均 10.5 年; 年龄 35 ~ 86 岁, 平均 (60.36 ± 12.22) 岁。所有患者均符合 1999 年世界卫生组织的 DM 诊断标准。排除标准: ①非 DM 因素导致的神经病变 (如腰椎病变、VB12 缺乏及格林-巴利综合征等)、甲状腺功能亢进症及恶性肿瘤等; ②合并有 DM 高渗昏迷、低血糖及 DM 酮症酸中毒等急性并发症; ③合并有各类急性或慢性感染; ④有骨质疏松和其他骨代谢异常疾病病史; ⑤肝肾功能障碍、心功能不全及甲状旁腺疾病; ⑥半年内使用过甲状旁腺激素、降钙素、类固醇激素、VD 制剂及性激素等药物。

### 1.2 方法

**1.2.1 一般资料采集** 记录每位患者性别、年龄、DM 病程等一般数据, 测量身高、体重, 计算体重指数 (body mass index, BMI)。

**1.2.2 实验室检查** 所有受试者空腹 ≥ 8 h, 于次日清晨抽取静脉血, 采用 AU2700 型全自动生化分析仪 (美国

贝克曼库尔特公司) 测定 TG、TC、HDL-C、LDL-C、Scr、BUM 及尿微量白蛋白 (urine microalbuminuria, UMA); 采用糖化血红蛋白测定仪 (美国 Bio-rad 公司) 对 HbA1c 水平进行测定。

**1.2.3 VD<sub>3</sub> 水平测定及分类** 抽取所有受试对象空腹静脉血, 采用 25-(OH)D<sub>3</sub> 试剂盒 (英国 IDS 公司) 用酶联免疫吸附测定法测定。依据 25-(OH)D<sub>3</sub> 的水平: ≤ 50 nmol/L 为 VD<sub>3</sub> 缺乏; 50 ~ 75 nmol/L 为 VD<sub>3</sub> 不足; ≥ 75 nmol/L 为 VD<sub>3</sub> 充足<sup>[7]</sup>。

**1.2.4 CD4<sup>+</sup> Tregs 检测** 使用 PF-anti-CD25/FITC-anti-CD4 荧光标记抗体 (美国 Serotec 公司) 标记两组分离好的单个核细胞样本, 采用流式细胞仪 (美国 BD 公司) 进行 Tregs 检测, 采用 CXP Cytometer (美国贝克曼库尔特公司) 对数据进行收集和分析。

**1.2.5 DPN 诊断** 对受试者使用肌电诱发仪 (日本光电工业株式会社) 进行肌电图检查。确诊 DPN 标准<sup>[8]</sup>: 在明确诊断 DM 同时或之后出现神经病变, 临床表现与 DPN 表现 (麻木、疼痛及感觉异常等) 相符; 5 项检查 (温度觉、足部感觉、踝反射、振动觉及神经传导速度) ≥ 2 项为异常。

## 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 或中位数 (四分位数) 表示, 比较用 *t* 检验, 不满足或用秩和检验, 相关分析采用 Pearson 法或 Spearman 法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组临床资料比较

两组年龄、25-(OH)D<sub>3</sub> 水平及 Tregs 百分比比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05); 两组 BMI、HbA1c、UMA、BUM、Scr 及血脂分析等比较, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见表 1。

### 2.2 两组外周血 25-(OH)D<sub>3</sub> 水平和 Tregs 百分比的比较

两组外周血 25-(OH)D<sub>3</sub> 水平比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), DPN 组外周血 25-(OH)D<sub>3</sub> 水平比非 DPN 组更低 (*P* < 0.05); 两组外周血 Tregs 百分比比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), DPN 组外周血 Tregs 百分比比非 DPN 组更低 (*P* < 0.05)。见表 1 和附图。

### 2.3 DPN 组外周血 Tregs 百分比与各临床指标相关性分析

DPN 组外周血 Tregs 百分比与 25-(OH)D<sub>3</sub> 呈

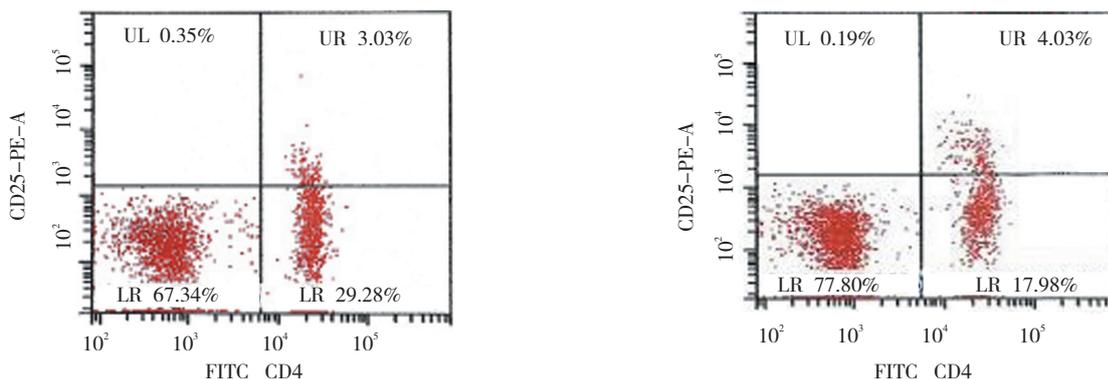
正相关 ( $P < 0.05$ ), 与年龄、BMI、HbA1c、UMA、BUM、Scr、TC、TG、HDL-C、LDL-C 无相关性 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 1 两组临床资料比较

组别	年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$ )	BMI / (kg/m <sup>2</sup> , $\bar{x} \pm s$ )	HbA1c / (% , $\bar{x} \pm s$ )	UMA/[mg/24 h, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ) ]	BUM / (mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	Scr/[ $\mu$ mol/L, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ) ]
DPN 组 (n=28)	62.43 ± 12.48	25.24 ± 3.89	9.33 ± 2.26	26.20 (17.57, 80.67)	6.10 ± 2.07	78.50 (67.75, 89.25)
非 DPN 组 (n=14)	48.36 ± 14.57	24.84 ± 2.13	8.74 ± 2.33	32.35 (23.07, 38.75)	6.75 ± 2.99	70.00 (60.50, 84.75)
t / Z 值	3.257	0.357	0.789	0.774	-0.824	0.325
P 值	0.002	0.72	0.433	0.439	0.414	0.745

组别	TC / (mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	TG/[mmol/L, M (P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> ) ]	HDL-C / (mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	LDL-C / (mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	25-(OH) D <sub>3</sub> / (mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	Tregs / (% , $\bar{x} \pm s$ )
DPN 组 (n=28)	4.72 ± 1.11	1.48 (1.06, 2.17)	1.10 ± 0.28	2.77 ± 0.77	50.00 ± 13.94	3.05 ± 0.16
非 DPN 组 (n=14)	4.20 ± 1.05	1.48 (1.05, 1.85)	1.03 ± 0.27	2.41 ± 0.89	63.42 ± 25.11	3.19 ± 0.15
t / Z 值	1.456	0.413	0.772	1.356	-2.236	-2.727
P 值	0.153	0.679	0.444	0.182	0.031	0.009



附图 两组 Tregs 百分比的比较

表 2 DPN 组外周血 Tregs 百分比与临床指标相关性

	年龄 /	BMI	HbA1c	24 h UMA /	Scr /	BUM /
r 值	-0.327	-0.222	0.103	0.001	0.061	-0.143
P 值	0.102	0.286	0.602	0.697	0.735	0.348

	25-(OH) D <sub>3</sub> /	TC	TG	HDL-C /	LDL-C
r 值	0.544	0.175	0.139	0.122	0.109
P 值	0.003	0.281	0.238	0.454	0.504

### 3 讨论

近年来, Tregs 作为维持机体免疫耐受的一个重要调控者备受关注。研究显示, T2DM 外周血淋巴细胞的数量和比例以及相关炎症因子的改变, 支持 CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup> Tregs 参与 DM 微血管病变过程。杨雪等<sup>[9]</sup>研究

发现, DPN 患者外周血中 CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs 数量减少, 可能是导致 DPN 患者神经组织自身免疫性损伤的原因之一。但 DPN 发病过程中 Tregs 所起作用进行的深入研究仍然较少。

VD 作为一种脂溶性维生素, 主要通过与其受体结

合,调控基因转录,进一步发挥其生物学作用。VD 在体内的主要存在形式为血清 25-(OH)D<sub>3</sub>,是目前评价 VD 营养状况最有效指标<sup>[10]</sup>。多项研究表明,T2DM 中 VD 缺乏与 DPN 相关,且 VD 缺乏可作为 DPN 发病的危险因子<sup>[11-12]</sup>。SHEHAB 等<sup>[13]</sup>给 57 例 VD 缺乏 DPN 患者补充外源性 VD 后发现,VD 能有效缓解 DPN 患者的临床症状,使疼痛评分得到改善。充足的 VD 还可降低中老年人罹患 T2DM 的风险<sup>[14-15]</sup>。而低于人群 VD 水平中位数的 T2DM 患者,5 年后发生微血管并发症的概率增高<sup>[16]</sup>。VD 对 DPN 的影响机制还不明确,研究证实 VD 可通过影响微血管功能、抑制炎症反应因子及直接保护作用对外周神经发挥作用<sup>[17-21]</sup>。笔者早期研究结果显示,T2DM DPN 与 VD 水平有关<sup>[22]</sup>,本研究也证实 DPN 组 25-(OH)D<sub>3</sub>水平较对照组降低,DPN 患者普遍存在 VD 缺乏现象,进一步证实 25-(OH)D<sub>3</sub>或参与 DPN 发生、发展。

近期研究表明,VD 除经典的钙磷调节功能外,还在免疫调节中发挥重要作用,其主要的靶细胞(包括 T 淋巴细胞、树突状细胞及巨噬细胞等)抗原递呈细胞。VD 可抑制 T 淋巴细胞的增殖、介导 T 细胞的凋亡并且改变 Th1 与 Th2 细胞之间的比例<sup>[23]</sup>。有研究表明,25-(OH)D<sub>3</sub>和转化生长因子 β 的联合刺激下,可增加 FoxP3<sup>+</sup>调节性 T 细胞的表达,同时促进原始 CD4<sup>+</sup>T 细胞向 Tregs 分化<sup>[24]</sup>,此结论在 URRY 等<sup>[25]</sup>体外实验中也得到证实。PRIETL 等<sup>[26]</sup>临床研究指出,在血清 25-(OH)D<sub>3</sub>充足的正常对照组的外周血淋巴细胞中,Tregs 所占比例增高,两者呈正相关。王琦等<sup>[27]</sup>在动物实验中发现,VD 能刺激 Tregs 分泌的抑制性细胞因子产生白细胞介素 10,从而发挥生物学作用。

综上所述,本研究结果支持 DPN 患者外周血 CD4<sup>+</sup>Tregs 与 25-(OH)D<sub>3</sub>水平相关。25-(OH)D<sub>3</sub>可通过影响 DPN 患者 Tregs 表达而影响 DPN 的发生、发展,为进一步揭示 DPN 发病机制提供新方向,VD 或成为未来治疗 DPN 的一个新靶点,其能否通过补充外源性 VD 来调节 T 细胞的免疫功能,进而改变 DPN 进程,则需要更多的临床实验进一步证实。

#### 参 考 文 献:

- TESFAYE S. Recent advances in the management of diabetic distal symmetrical polyneuropathy[J]. *Diabetes Investig*, 2011, 2(1): 33-42.
- JOSEFOWICZ S Z, LU L F, RUDENSKY A Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30(1): 531-564.
- VON HURST P R, STONEHOUSE W, COAD J. Vitamin D supplementation reduces insulin resistance in South Asian women living in New Zealand who are insulin resistant and vitamin D deficient—a randomised, placebo-controlled trial[J]. *Br J Nutr*, 2010, 103(4): 549-555.
- GUILLOT X, SEMERANO L, SAIDENBERG-KERMANAC'H N, et al. Vitamin D and inflammation[J]. *Joint Bone Spine*, 2010, 77(6): 552-557.
- NIKOOYEH B, NEYESTANI T R, TAYEBINEJAD N, et al. Daily intake of vitamin D-or calcium-vitamin D-fortified persian yogurt drink (doogh) attenuates diabetes-induced oxidative stress: evidence for antioxidative properties of vitamin D[J]. *J Hum Nutr Diet*, 2014, 27(2): 276-283.
- HE R, HU Y, ZENG H, et al. Vitamin D deficiency increases the risk of peripheral neuropathy in Chinese patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2017, 33(2): e2820.
- HOLICK M F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8): 2062-2072.
- 胡仁明,樊东升,崔丽英,等. 糖尿病周围神经病变诊疗规范[J]. *中国糖尿病杂志*, 2009, 17(8): 638-640.
- 杨雪,汤玮,石勇铨. 老年 2 型糖尿病周围神经病变患者外周血调节性 T 细胞的检测及其临床意义[J]. *第二军医大学学报*, 2015, 36(9): 1007-1011.
- DELUCA H F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80(6): 1689S-1696S.
- SHEHAB D, A1-JARAUH K, MOJIMINIYI O, et al. Does vitamin D deficiency play a role in peripheral neuropathy in type 2 diabetes[J]. *Diabetic Med*, 2012, 29(1): 43-49.
- AHMADIEH H, AZAR S T, LAKKIS N, et al. Hypovitaminosis D in patients with type 2 diabetes mellitus: a relation to disease control and complications[J]. *ISRN Endocrinol*, 2013, 2013(2013): 641098.
- SHEHAB D, A1-JARALLAH K, ABDELLA N, et al. Prospective evaluation of the effect of short-term oral vitamin D supplementation on peripheral neuropathy in type 2 diabetes mellitus[J]. *Med Princ Pract*, 2015, 24(3): 250-256.
- NAM H, KIM H Y, CHOI J S, et al. Association between serum 25-hydroxyvitamin D levels and type 2 diabetes in Korean adults[J]. *Chonnam Med J*, 2017, 53(1): 73-77.
- 黄燕飞,韩岳萍,刘瑛. 老年糖尿病患者血清 25 羟维生素 D 水平的分析[J]. *宁夏医学杂志*, 2016, 38(10): 970-972.
- HERRMANN M, SULLIVAN D R, VEIURD A S, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D: a predictor of macrovascular and microvascular complications in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(3): 521-528.
- WU-WONG J R, NAKANE M, MA J, et al. Effects of vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 186(1): 20-28.
- LI Y C, KONG J, WEI M, et al. 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(2): 229-238.

- [19] MÜLLER K, HAAHR P M, DIAMANT M, et al. 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level[J]. *Cytokine*, 1992, 4(6): 506-512.
- [20] 张丽丽, 卢艳慧, 成晓玲, 等. 中老年人群血清 25 羟维生素 D 水平与血脂异常相关性分析 [J]. *中华内科杂志*, 2016, 55(8): 599-603.
- [21] PARK S, KIM DA S, KANG S. Vitamin D deficiency impairs glucose-stimulated insulin secretion and increases insulin resistance by reducing PPAR- $\gamma$  expression in nonobese type 2 diabetic rats[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 27: 257-265.
- [22] 余敦敏, 朱妍, 冯尚勇, 等. 血清 25 羟维生素 D<sub>3</sub> 与 2 型糖尿病周围神经病变的相关性 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2014(3): 240-243.
- [23] JEREMY A, GOETTEL, HOLLY M, SCOTT ALGOOD, et al. KSR1 protects from interleukin-10 deficiency-induced colitis in mice by suppressing T lymphocyte interferon- $\gamma$  production[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(1): 265-274.
- [24] CHAMBERS E S, SUWANNASAEN D, MANN E H, et al. 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in combination with transforming growth factor- $\beta$  increases the frequency of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells through preferential expansion and usage of interleukin-2[J]. *Immunology*, 2014, 143(1): 52-60.
- [25] URRY Z, CHAMBERS E S, XYSTRAKIS E, et al. The role of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and cytokines in the promotion of distinct Foxp3<sup>+</sup> and IL-10 CD4<sup>+</sup> T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(10): 2697-2708.
- [26] PRIETL B, PILZ S, WOLF M, et al. Vitamin D supplementation and regulatory T cells in apparently healthy subjects: vitamin D treatment for autoimmune diseases[J]. *Isr Med Assoc J*, 2010, 12(3): 136-139.
- [27] 王琦, 黄赤兵, 郑峻松, 等. 腹腔注射 1, 25 (OH) -2D<sub>3</sub> 对调节性 T 细胞及大鼠肾移植存活的影响 [J]. *重庆医学*, 2006(24): 2228-2230.

(唐勇 编辑)