

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.14.019

外周血 IL-6 可能通过促进滤泡辅助性 T 细胞的分化参与 1 型糖尿病的发生

牛腾耀,崔振华,高 强,岳晓琪,詹静慧,张艳丽[△]

宁夏医科大学基础医学院病原生物学与免疫学系,宁夏银川 750004

摘 要:目的 观察白细胞介素(IL)-6 是否作用于滤泡辅助性 T(Tfh)细胞参与 1 型糖尿病(T1DM)的发病。**方法** 选择 2019 年 10 月至 2020 年 10 月在宁夏医科大学总医院内分泌科住院的 30 例 T1DM 患者为研究组,同时募集 20 例健康者作为健康对照组。采集外周血,使用流式细胞术分析外周血 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞百分比;采用酶联免疫吸附试验检测血清中 IL-6、IL-21 的表达水平,并分析 T1DM 患者外周血 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞百分比与血清 IL-6、IL-21 水平的相关性。**结果** 研究组、健康对照组中 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞百分比分别为(23.8±0.68)%、(14.1±0.46)%;研究组、健康对照组中 IL-6 水平分别为(34.45±8.31)、(23.46±5.52)ng/L;研究组、健康对照组 IL-21 水平分别为(202.0±46.51)、(102.9±32.78)ng/L。研究组 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞百分比、IL-6、IL-21 水平均明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。T1DM 患者 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞百分比与外周血血清 IL-6、IL-21 水平均呈正相关($r=0.449\ 2,0.572\ 9,P<0.05$)。**结论** IL-6 可能通过促进 Tfh 细胞的分化进而辅助 B 细胞产生自身抗体,其在 T1DM 的发生中起重要作用。

关键词:自身抗体; 1 型糖尿病; 滤泡辅助性 T 细胞; 白细胞介素-6; 白细胞介素-21
中图法分类号:R446.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)14-1955-03

IL-6 may promote the differentiation of follicular helper T cells and participate in the pathogenesis of type 1 diabetes

NIU Tengyao, CUI Zhenhua, GAO Qiang, YUE Xiaoqi, ZHAN Jinghui, ZHANG Yanli[△]
Department of Pathogen Biology and Immunology, School of Basic Medical Sciences,
Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

Abstract: Objective To observe whether interleukin(IL)-6 act on follicular helper T (Tfh) cells and participate in the pathogenesis of type 1 diabetes (T1DM) or not. **Methods** A total of 30 patients with T1DM who were hospitalized in the Department of Endocrinology, the General Hospital of Ningxia Medical University from October 2019 to October 2020 were selected as the research group, and 20 healthy person were recruited as the healthy control group. The percentage of CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺T cells in CD4⁺T cells in peripheral blood was analyzed by flow cytometry, the serum expression levels of IL-6, IL-21 were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The percentage of CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺T cells in CD4⁺T cells in research group and healthy control group were (23.8±0.68)% and (14.1±0.46)% respectively. The levels of IL-6 in research group and healthy control group were (34.45±8.31) and (23.46±5.52) ng/L respectively. IL-21 levels in research group and healthy control group were (202.0±46.51) and (102.9±32.78) ng/L respectively. The percentage of CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺T cells in CD4⁺T cells, IL-6 and IL-21 levels in research group were significantly higher than those in healthy control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The percentage of CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺T cells in CD4⁺T cells in T1DM patients positively correlated with the levels of IL-6 and IL-21 in peripheral blood ($r=0.449\ 2,0.572\ 9,P<0.05$). **Conclusion** IL-6 might promote the differentiation of Tfh cells, thereby assisting B cells to produce autoantibodies, and play an important role in the pathogenesis of T1DM.

Key words: autoantibody; type 1 diabetes; follicular helper T cells; interleukin-6; interleukin-21

1 型糖尿病(T1DM)是由 T 细胞介导的胰岛 β 细胞破坏引起的自身免疫性疾病,严重威胁人体健康。T1DM 患者因自身免疫及胰岛 β 细胞被损伤,引起胰岛素分泌不足,必须长期采用胰岛素进行治疗,而我国 T1DM 的发病率为 1.01/10 000^[1]。定位于淋巴滤泡的滤泡辅助性 T(Tfh)细胞是发挥免疫效应的

CD4⁺ T 细胞亚群,是一种辅助 B 细胞^[2]。研究表明,CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞是与淋巴滤泡中的 Tfh 细胞功能对应的细胞群体,可分泌白细胞介素(IL)-21,并促使 B 细胞增殖分化,使体液免疫增强^[3-4]。众所周知 IL-6 是趋化因子家族成员之一,主要由单核巨噬细胞、血管内皮细胞等生成,其作用靶细胞较多,是一种具有复杂生理功能的细胞因子,与感染性疾病有关,可促进 B 细胞的增殖分化。IL-21 是 Tfh 细胞活化后分泌的特征性细胞因子,主要存在于生发中的 B 细胞卵泡中,可以调节 B 细胞的活性^[5]。但 IL-6 能否作用于 Tfh 细胞参与自身免疫性疾病的发生尚不清楚,本研究通过分析 T1DM 患者外周血中 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比与 IL-6、IL-21 之间的相互关系,尝试为 T1DM 的发病机制与诊断提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 10 月至 2020 年 10 月在宁夏医科大学总医院(以下简称“本院”)内分泌科住院的 30 例 T1DM 患者为研究组。所有患者均符合 1999 年世界卫生组织(WHO)制定的 T1DM 诊断标准,以无任何自身免疫性疾病、C 肽释放正常为排除标准。选择同期在本院体检的 20 例健康者作为健康对照组,均无感染性疾病、自身免疫性疾病及糖尿病。所有研究对象均签署知情同意书,本研究经过本院医学伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 FC 酶标仪购自美国 Thermo 公司,Accuri C6 流式细胞仪购自美国 BD 公司。使用的主要试剂盒包括 Anti-human Percp cy5. 5-CD4 试剂盒(美国, Biolegend)、Anti-human AF488-CXCR5 试剂盒(美国, BD)、Human-IL-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海,江莱生物技术有限公司)、Human-IL-21 ELISA 试剂盒(上海,江莱生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 T1DM 患者外周血淋巴细胞分离及处理 抽取所有研究对象外周血 3 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,磷酸盐缓冲液(PBS)与全血按照 1 : 1 比例稀释,采用密度梯度离心法分离周围淋巴细胞,PBS 洗涤,调整细胞数后采用流式细胞术检测 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比。

1.3.2 流式细胞术检测人 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比 取细胞悬液 100 μL 于试管中,依次加入抗体 Anti-human Percp cy5. 5-CD4、Anti-human AF488-CXCR5,4 ℃、振荡、避光、孵育 30 min,洗涤,以 300 μL 冷 PBS 重悬,于流式细胞仪上进行检测。所得数据用配套软件进行分析,在 FSC-SSC 图上选定淋巴细胞群,然后以 CD4 和 SSC 设门分析 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比。

1.3.3 T1DM 患者血清中 IL-6、IL-21 水平检测 采用 ELISA 法检测血清中 IL-6、IL-21 水平,严格按照 Human-IL-6 ELISA 试剂盒和 Human-IL-21 ELISA

试剂盒中的说明书操作。

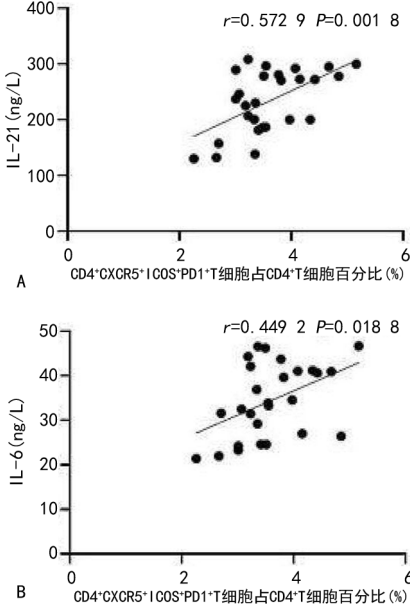
1.4 统计学处理 采用 SPSS19. 0 统计软件进行数据处理及统计学分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;相关性分析采用 Pearson 相关。以 *P* < 0. 05 为差异有统计学意义,采用 GraphPad prism 8 软件作图。

2 结 果

2.1 两组外周血 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比比较 研究组、健康对照组中 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比分别为(23. 8 ± 0. 68)%、(14. 1 ± 0. 46)%,研究组明显高于健康对照组,差异有统计学意义(*P* < 0. 05)。

2.2 两组外周血 IL-6、IL-21 水平比较 研究组、健康对照组 IL-6 水平分别为(34. 45 ± 8. 31)、(23. 46 ± 5. 52)ng/L;研究组、健康对照组 IL-21 水平分别为(202. 0 ± 46. 51)、(102. 9 ± 32. 78)ng/L。研究组 IL-6、IL-21 水平均明显高于健康对照组,差异有统计学意义(*P* < 0. 05)。

2.3 T1DM 患者 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比与血清 IL-6、IL-21 水平的相关性 采用 Pearson 相关分析发现,T1DM 患者 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比与外周血血清 IL-6、IL-21 水平均呈正相关(*r* = 0. 449 2、0. 572 9,*P* < 0. 05),见图 1。



注:A 为 IL-21 与 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比相关分析;B 为 IL-6 与 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比相关分析。

图 1 T1DM 患者血清 IL-6、IL-21 与 CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比的相关分析

3 讨 论

T1DM 是一种由遗传易感性和环境危险因素相互作用导致胰岛 β 细胞被破坏,进而造成胰岛素分泌不足的自身免疫性疾病^[6]。Tfh 细胞是位于次级淋巴组织(SLOs)生发中心的可辅助 B 细胞产生抗体的

CD4⁺ T 细胞,其特征性膜表面分子主要有程序性细胞死亡蛋白(PD-1)、趋化性细胞因子受体(CXCR5)、诱导共刺激分子(ICOS)等,具有辅助 B 细胞的功能,可参与生发中心的形成及 B 细胞发育、活化增殖与功能调节,也可高亲和力抗体的产生提供帮助,是机体适应性免疫的重要组成部分,同时参与多种自身免疫性疾病的发病^[7-10]。

在自身抗体产生的过程中,生发中心中的 Tfh 细胞识别 B 细胞或 B 细胞所呈递的抗原,通过 CD40L、ICOS 和 OX40 等共刺激,分子与细胞间产生稳定的相互作用,在这种相互作用中,Tfh 细胞与 B 细胞互相依赖,并分泌 IL-21、IL-4、IL-9 和 IL-10 等效应细胞因子,它们可促进生发中心反应并可促使 B 细胞分化为浆细胞和记忆细胞^[11]。

IL-6 主要由单核巨噬细胞、血管内皮细胞等生成,其作用靶细胞较多,是一种具有复杂生理功能的细胞因子。IL-6 参与了多种生物学过程,如免疫应答、炎症反应,同时,低水平 IL-6 可促进胰岛素的分泌,高水平 IL-6 则可抑制胰岛素分泌,但年龄、种族、病程则对血清 IL-6 水平无影响^[12-14]。IL-21 是 Tfh 细胞活化后分泌的特征性细胞因子,可诱导 Tfh 细胞分化,促进生发中心的 B 细胞分化为浆细胞,并产生不同类型的抗体。

在本研究中,研究组 CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ PD1⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞百分比、IL-6 水平明显高于健康对照组,且 CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ PD1⁺ T 细胞与 IL-6 水平呈正相关。IL-6 有两条信号通路传导途径,一条为 IL-6 与其受体膜蛋白结合,即与 IL-6R α 相结合形成一种复合物;另一条则是 IL-6 与 gp130 膜蛋白相结合,使体内对 IL-6 有反应的细胞数量增加^[15]。IL-21 通过与生发中心 B 细胞表面或 Tfh 细胞自身表达的 IL-21 受体结合,促进浆细胞分化产生大量抗体,诱导 Tfh 细胞表达 CXCR5 并迁移至生发中心,维持 T-B 细胞动态平衡^[16]。血清中 IL-4、IL-9 与人体的免疫反应具有一定的关系。IL-10 也称为细胞因子合成抑制因子(CSIF),是一种多效性细胞因子,可以在多种类型细胞中发挥免疫抑制或免疫刺激的作用^[17]。结合本研究可推测,T1DM 自身免疫的发生原因为体内 IL-6 大量增多,促使 CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ PD1⁺ T 细胞的过量分化,并分泌 IL-21,IL-21 与 CD4⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ PD1⁺ T 细胞自身表达受体结合,辅助作用于 B 细胞的分化;同时,IL-4、IL-9、IL-10 的分泌也会增多,其促进生发中心反应并促使 B 细胞分化为浆细胞和记忆细胞,浆细胞分泌蛋白酪氨酸磷酸酶抗体、谷氨酸脱羧酶抗体、胰岛细胞自身抗体、抗胰岛 β 细胞抗体等多种自身抗体,损伤胰岛细胞,造成胰岛素分泌不足,进而导致 T1DM 的发生。

综上所述,IL-6 可能促进 Tfh 细胞的活化并分泌 IL-21 进而辅助 B 细胞产生自身抗体参与 T1DM 的发生。但研究样本量较小,还需进一步扩大临床样本

量,并结合动物模型进行更深入的机制研究。

参考文献

[1] 翁建平. 我国 1 型糖尿病的流行病学研究与疾病负担[J]. 中国科学(生命科学),2018,48(8):834-839.

[2] SCHAEERLI P, WILLIMANN K, LANG A B, et al. CXCR5 chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function[J]. J Exp Med, 2000, 192(11):1553-1562.

[3] MORITA R, SCHMITT N, BENTEBIBEL S E, et al. Human blood CXCR5⁺ CD4⁺ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion[J]. Immunity, 2011, 34(1):108-121.

[4] TAHER M Y, DAVIES D M, MAHER J. The role of the interleukin (IL)-6/IL-6 receptor axis in cancer[J]. Biochem Soc Trans, 2018, 46(6):1449-1462.

[5] REN H M, LUKACHER A E, RAHMAN Z S, et al. New developments implicating IL-21 in autoimmune disease[J]. J Autoimmun, 2021, 122:102689.

[6] 刘鲁豫, 刘爱霞. 1 型糖尿病的发病机制与治疗的新进展[J]. 医学综述, 2019, 25(22):4504-4508.

[7] 惠晓艳, 朱克强, 王晨, 等. 滤泡辅助性 T 细胞参与结缔组织病的发病机制[J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(1):179-184.

[8] BEURIER P, RICARD L, ESHAGH D, et al. TFH cells in systemic sclerosis[J]. J Transl Med, 2021, 19(1):375.

[9] CROTTY S. T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases[J]. Immunity, 2019, 50(5):1132-1148.

[10] 曹干, 王宁萍, 崔振华, 等. 氧化苦参碱调节 CIA 小鼠滤泡辅助性 T 细胞的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(19):2371-2374.

[11] 张楠, 倪兵. 滤泡辅助性 T 细胞和滤泡调节性 T 细胞与自身免疫病[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(5):442-449.

[12] CHEN Y L, QIAO Y C, PAN Y H, et al. Correlation between serum interleukin-6 level and type 1 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. Cytokine, 2017, 94:14-20.

[13] 刘苏颖. 初发 1 型糖尿病患者血清白介素-33 水平变化及意义[D]. 沈阳:中国医科大学, 2020.

[14] XIAO J W, WANG R S, ZHOU W J, et al. LncRNA NEAT1 regulates the proliferation and production of the inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by targeting miR-204-5p[J]. Hum Cell, 2021, 34(2):372-382.

[15] 范星宇, 洪梦琴, 杨敏. IL-6 与类风湿关节炎的关系及作用机制的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(86):65.

[16] ROSANNE S, WARREN J L. IL-21 and T follicular helper cells[J]. Int Immunol, 2009, 22(1):7-12.

[17] POOLE E, NEVES T C, OLIVEIRA M T, et al. Human cytomegalovirus interleukin 10 homologs: facing the immune system[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:245.