

## 基础研究

## • 综述 •

## 天然免疫细胞在 1 型糖尿病中的作用

陈晔 李艳玲 王坚

【摘要】 1 型糖尿病(T1DM)是一种复杂的自身免疫性疾病,主要是由 T、B 细胞破坏胰岛  $\beta$  细胞所致。虽然病因不明,但最终一系列天然免疫细胞及特异性免疫细胞相互作用,导致胰岛  $\beta$  细胞损伤和 T1DM 的发生。对动物模型和 T1DM 患者的研究发现,单核/巨噬细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤 T 细胞、树突状细胞和淋巴细胞相互作用可影响 T1DM 的发生、发展。因此,研究天然免疫细胞在 T1DM 发生、发展中的作用,可能为防治 T1DM 提供新的方向。

【关键词】 1 型糖尿病;天然免疫细胞;自身免疫

**Role of innate immune cells in type 1 diabetes mellitus** Chen Ye, Li Yanling, Wang Jian. Department of Endocrinology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China  
Corresponding author: Wang Jian, Email: wangjndcrn@aliyun.com

【Abstract】 Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a complex autoimmune disease resulting from the specific destruction of islet  $\beta$  cells by T cells and B cells. The pathogenesis of T1DM remains elusive. Ultimately, the interplay between natural immune cells and specific immune cells triggers the destruction of  $\beta$  cells and onset of T1DM. The interaction of macrophage, natural kill cell, natural killer T cells and dendritic cells induced by susceptible gene and environmental factors with antigen-specific lymphocytes has been implicated in the development of autoimmune diabetes in animal models and patients with T1DM. Studies of the role of natural immune cells in initiating T1DM may provide innovative clinical approaches for prevention or treatment of T1DM.

【Key words】 Type 1 diabetes mellitus; Innate autoimmune cells; Autoimmune

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 184-187)

T1DM 是一种慢性自身免疫性疾病,遗传易感基因和环境因素共同作用导致了 T、B 细胞对  $\beta$  细胞的破坏。其发病机制尚不十分明确,对非肥胖糖尿病(NOD)小鼠和 T1DM 患者的研究发现,胰岛细胞表达 Toll 样受体(TLRs)并且可以促进促炎性因子的分泌<sup>[1]</sup>。表明在 T1DM 发病早期,胰岛细胞 TLR 的激活可能增加趋化因子的分泌,从而使巨噬细胞、树突状细胞及 T 细胞等聚集。另外,在胰岛组织和胰腺引流淋巴结亦发现有自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤 T(NKT)细胞和树突状细胞(DCs)亚群浸润,参与  $\beta$  细胞的破坏<sup>[2]</sup>。相反,改变这些免疫细胞的活性,可以有效抑制  $\beta$  细胞的破坏<sup>[2-3]</sup>。本文论述了天然免疫细胞,包括 NK 细胞、NKT 细胞、单核/巨噬细胞及 DCs 对 T1DM 发生、发展的重要作用。

## 1 NK 细胞

NK 细胞是一种细胞毒性淋巴细胞,在对抗病原菌及肿瘤细胞时发挥重要作用。NK 细胞可以通过与抗原递呈细胞作用影响自身免疫反应的起始阶段;可以通过影响 B 细胞和 T 细胞的产生和增殖影响自身免疫的下游反应。另外, NK 细胞可以通过抑制 DCs 的抗原递呈作用来抑制免疫反应,在 B 细胞或 T 细胞免疫起始阶段起重要作用。NK 细胞亦可分泌大量细胞因子抑制 B 细胞和 T 细胞的免疫反应。

多重证据表明, NK 细胞介导了一个或者多个阶段的免疫反应,导致了 1 型糖尿病的发生。近期的研究表明随着胰岛炎向 T1DM 进展, NK 细胞配体在人类和 NOD 小鼠的胰岛  $\beta$  细胞表达增多,识别 NK 细胞表面受体 NKG2D 和 Nkp46, NK 细胞逐渐浸润胰岛组织<sup>[4]</sup>。胰岛中浸润的 NK 细胞与 T1DM 严重程度呈正相关。同时研究发现 T 细胞浸润前,胰岛中已有 NK 细胞浸润,可能是 NK 细胞引起了局部的炎性反应并介导了  $\beta$  细胞的损伤。对去除了调

节性 T 细胞后的 NOD 小鼠的研究发现, NK 细胞有促进糖尿病发生的作用<sup>[5]</sup>。

虽然以上研究表明 NK 细胞对 T1DM 有致病作用, 但另一些研究发现 NK 细胞有保护性作用。研究发现, 来源于 T1DM 患者血液和 NOD 小鼠淋巴组织的 NK 细胞功能降低。在病程较长的 T1DM 患者也发现有这种现象<sup>[6]</sup>。对 NOD 小鼠使用弗氏完全佐剂可以延缓其糖尿病的发展, 机制与 NK 细胞介导的干扰素- $\gamma$  的分泌增加, 使致病性 T 细胞数量减少有关。同样, 当使用胰岛抗原刺激 NOD 小鼠, 加用聚肌胞苷酸后, NK 细胞可以诱导脾细胞呈现 Th2 反应。在胰岛移植实验中, NK 细胞可通过分泌穿孔素的方式杀死 DCs, 调节免疫应答, 极化并使致病性 T 细胞免疫耐受。这些发现使 NK 细胞成为研究 T1DM 免疫机制的热点。

## 2 NKT 细胞

与常规的 T 淋巴细胞不同, NKT 细胞具有 NK 细胞的特点, 如表达 NKR-P1 和 Ly49, 并且表达一条半恒定的 T 细胞受体链。NKT 细胞不能识别肽类抗原, 而接受表达 CD1d 分子的细胞递呈的脂类抗原。目前发现, NKT 细胞被激活后可以迅速产生大量细胞因子及趋化因子, 向其他免疫细胞如 DCs、NK 细胞和淋巴细胞等传递信号<sup>[7]</sup>。

NKT 细胞不仅可以促进对抗原的免疫反应, 亦对自身免疫性疾病有保护作用, 尤其是 T1DM。如 NOD 小鼠向 T1DM 进展过程中 NKT 细胞数量减少、功能降低。给 NOD 小鼠移植富含 NKT 细胞的胸腺组织或脾脏来源的 Val4-Ja18 NKT 细胞, 可以预防 T1DM 的发生。CD1d<sup>-/-</sup> 的 NOD 小鼠可加速进展为 T1DM, 而上调胰岛中 CD1d 的表达, 可以预防 T1DM 的发生, 其机制与 NKT 细胞的功能改变相关。NKT 细胞的糖脂类激活剂  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺或类似物, 可以使 NOD 小鼠糖尿病的患病率降低 30% ~ 70%, 机制为 NKT 细胞诱导的细胞因子种类和数量改变,  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺诱导 DCs 成熟, 招募成熟的 DCs 至胰腺淋巴结, 这些耐受性 DCs 可以抑制效应 T 细胞对  $\beta$  细胞的破坏, 并且使免疫细胞向 Th2 细胞极化, 激活调节性 T 细胞抑制免疫反应, 从而缓解 T1DM<sup>[8-10]</sup>。通过在胰腺淋巴结植入胰岛特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞, NKT 细胞可以抑制这些 T 细胞分化为效应性 T 细胞。

虽然对 NOD 小鼠的研究显示, NKT 细胞对 T1DM 发挥保护性作用, 但在人类试验的结果却不尽一致。与健康对照组相比, T1DM 患者循环中 NKT 细胞数

量正常、减少或者增加<sup>[3, 11]</sup>。NKT 细胞缺少特异性的表面标记物及被检测人员的个体差异, 或许可以用来解释 T1DM 患者体内 NKT 细胞数量不等的原因。另有研究发现, 1 号染色体的 Nkt1 和 Slamf1、Slamf6 的基因突变对人类 NKT 的数量和功能有影响, 进而影响 T1DM 的发生。利用基因的差异来控制 NKT 细胞的数量和功能, 可能为预测和诊断 T1DM 提供帮助。

尽管在 T1DM 患者, NKT 细胞的作用机制尚不十分明确, 但在小鼠模型已经证实利用 NKT 细胞可以预防甚至治愈 T1DM。对 NOD 小鼠使用  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺类似物或衍生物如 C20:2, 可以促进白细胞介素(IL)-4 和干扰素- $\gamma$  的分泌<sup>[12]</sup>。OCH(一种  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺类似物, 一个鞘氨醇基含有 9 到 18 个碳原子, 一条酰基链含有 2 个碳原子) 也可以增加 NOD 小鼠 Th2 型细胞因子的反应, 但对人类 NKT 细胞没有明显的作用, 还需进一步研究。研究显示, 通过添加  $\alpha$ -半乳糖神经酰胺、DCs 和细胞因子如 IL-2 和 IL-7, 已经在体外成功扩增了人类外周血来源的 NKT 细胞, 然而实验方法和技术仍需进一步改进。

## 3 单核/巨噬细胞

单核/巨噬细胞对识别和吞噬外源性抗原物质有重要作用, 其亦可导致机体局部损伤。在一些自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、T1DM 等, 单核/巨噬细胞发挥关键作用。自身免疫介导的  $\beta$  细胞损伤与单核/巨噬细胞密切相关。在 NOD 小鼠和 BB 大鼠, 单核/巨噬细胞和 DCs 最先侵入胰岛组织, 随后是 NK 细胞、T 细胞和 B 细胞入侵, 如果清除这些免疫细胞, 可阻止胰岛炎及 T1DM 的发生<sup>[13]</sup>。CD8<sup>+</sup> T 细胞亦是通过单核/巨噬细胞表面的 T 细胞受体识别  $\beta$  细胞的抗原, 发挥致病性作用<sup>[14]</sup>。

实验发现, NOD 小鼠单核/巨噬细胞的发育和功能有缺陷, 可增加 T 细胞的致病性。NOD 小鼠的单核/巨噬细胞的数量低于正常小鼠, 同时, 单核/巨噬细胞的同种混合淋巴细胞反应也较低。可能是由于 NOD 小鼠单核/巨噬细胞功能不全, 影响调节性 T 细胞的增殖和功能<sup>[15]</sup>。NOD 小鼠和 T1DM 患者由于前列腺素合成酶 2 表达增多, 使体内前列腺素产生较多, 可能限制了抗原递呈细胞介导的 T 细胞激活作用, 抑制 IL-2 的信号通路。而高水平的 IL-2 可以通过调节性 T 细胞的作用维持效应性 T 细胞的免疫耐受。IL-2 基因敲除小鼠可表达高亲和力的 IL-2 受体  $\alpha$  链 CD25, 同时调节性 T 细胞的功能损伤, 易发生自身免疫性疾病。

单核/巨噬细胞对促炎性细胞因子的分泌起重要作用。与正常小鼠相比, NOD 小鼠经刺激后, 单核/巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$  显著增加<sup>[6]</sup>。在 T1DM 患者中, 单核/巨噬细胞分泌基础及激活后 IL-1 $\beta$  和 IL-6 均显著升高, 可能与核因子- $\kappa$ B 的活性增强有关。在 NOD 小鼠, 单核/巨噬细胞分泌高水平的 IL-12 有促进致病性 T 细胞分化的作用。在体外实验中, 这些细胞因子直接促进 Th17 的扩增, 说明在 T1DM 的发展过程中单核细胞可能通过促进 Th17 的分化起作用<sup>[7]</sup>。与对照组相比, T1DM 患者在接受脂多糖的刺激后, TNF- $\alpha$ 、 $O_2^-$  的产生显著增加, TLR-2 和 TLR-4 的表达明显升高。

无需淋巴细胞的参与, 单核/巨噬细胞即可破坏  $\beta$  细胞。在某些情况下, 无需成熟 T 细胞和 B 细胞存在, 通过引起 CCL2 在  $\beta$  细胞上过度表达(CCL2 具有招募单核/巨噬细胞的作用), 单核细胞即可促使  $\beta$  细胞凋亡。另有实验发现, 通过阻滞巨噬细胞表面的黏附受体, 阻止巨噬细胞进入胰岛组织, 输注致病性 T 细胞, 可以阻止 NOD 小鼠发生糖尿病<sup>[18]</sup>。在 NOD 小鼠发病早期, T 细胞未浸润时, 表达 TNF- $\alpha$  的巨噬细胞及 DCs 即在胰岛中浸润。另外, 在非肥胖/重症联合免疫缺陷小鼠的胰岛中发现巨噬细胞和 DCs 表达 TNF- $\alpha$ 。以上研究结果提示, 在疾病早期抗原递呈细胞浸润无需 T 细胞参与。新发糖尿病患者胰腺组织的病理切片显示巨噬细胞/DCs 是 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的主要来源。提示单核/巨噬细胞通过多种途径, 在 T1DM 的不同时期起致病性作用<sup>[19]</sup>。

#### 4 DCs

根据来源可以将 DCs 分为髓性 DCs 和浆细胞性 DCs。两种细胞亚群表达不同的抗原识别受体, 且功能尚不十分明确, 但已有证据证实, 浆细胞性 DCs 可以诱导 T 细胞介导的免疫耐受。但是在 NOD 小鼠和 BB 大鼠的基因背景下, DCs 的功能有所改变, 如在 NOD 小鼠胰腺淋巴结, 产生干扰素的髓性 DCs 数量增加, BB 大鼠脾脏 DCs 数量减少, 表面主要组织相容性复合物-II 表达下调。对于 T1DM 患者, DCs 数量的变化和疾病是否相关, 尚存有争议<sup>[20-21]</sup>。这种差异可能是由于筛选 DCs 时选取不同的分子标志, 选取的患者不一致, 缺乏统一的试验对照, 亦可能是 DCs 的数量及亚群功能随着病程的进展而变化。目前对不同亚群的 DCs 在 T1DM 中所起的作用尚不明确。有研究发现, 在 NOD 小鼠和 T1DM 患者, 活性氧自由基产生增加, 核因子- $\kappa$ B 通路被激活并上调, 导致 DCs 分泌过多的前炎性因子, 进入 Th1

极化的免疫应答状态, 激活致病性 T 细胞, 导致  $\beta$  细胞损伤及 T1DM 的发生<sup>[22]</sup>。

调节性 DCs 有望成为治疗 T1DM 的新选择。目前有研究者正在尝试数种生成调节性 DCs 的方法。Giannoukakis 等<sup>[23]</sup>在体外使用针对 CD40、CD80 和 CD86 初级转录产物的反义寡核苷酸的混合物处理自体同源的调节性 DCs, 使 NOD 小鼠 T 细胞免疫无能, 从而达到预防和治疗糖尿病的目的。将这种方法用于临床 I 期试验, 未出现不良反应, 初步结果表明, 这种方法安全且可以耐受。虽然调节性 DCs 治疗不能显著改善自身免疫, 但是增加了 B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>B 细胞的数量, 可能有利于改善 T1DM 患者的症状。

应用 DCs 治疗的一个缺点是潜在的免疫可塑性, 目前仍需努力改进 DCs 治疗 T1DM 的方法。小干扰 RNA 可以抑制内源性基因表达, 可以改进 DCs 的表型及功能, 为调节免疫应答提供新的思路。

#### 5 小结

先前对 T1DM 发病机制的研究关注于 T 细胞和 B 细胞。但是近来许多证据表明天然免疫细胞, 如单核/巨噬细胞、DCs、NK 细胞和 NKT 细胞的异常可以促进 T1DM 的发生、发展。通过调整特异性免疫应答反应, 天然免疫细胞可诱发或调节自身免疫, 从而促进或影响特异性免疫应答。因此, 天然免疫细胞可能对防治 T1DM 有重要意义, 但还需进一步深入研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Roep BO, Kleijwegt FS, van Halteren AG, et al. Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes[J]. Clin Exp Immunol, 2010, 159(3): 338-343.
- [2] Diana J, Simoni Y, Furio L, et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes[J]. Nat Med, 2013, 19(1): 65-73.
- [3] Ghazarian L, Diana J, Beaudoin L, et al. Protection against type 1 diabetes upon coxsackievirus B4 infection and iNKT-cell stimulation: role of suppressive macrophages[J]. Diabetes, 2013, 62(11): 3785-3796.
- [4] Gur C, Porgador A, Elboim M, et al. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes[J]. Nat Immunol, 2010, 11(2): 121-128.
- [5] Feuerer M, Shen Y, Littman DR, et al. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets[J]. Immunity, 2009, 31(4): 654-664.
- [6] Qin H, Lee IF, Panagiotopoulos C, et al. Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling[J]. Diabetes, 2011, 60(3): 857-866.
- [7] Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT cells: regulation



- and function during viral infection[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(8): e1002838.
- [8] Blumenfeld HJ, Tohn R, Haeryfar SM, et al. Structure-guided design of an invariant natural killer T cell agonist for optimum protection from type 1 diabetes in non-obese diabetic mice[J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 166(1): 121-133.
- [9] Joyee AG, Uzonna J, Yang X. Invariant NKT cells preferentially modulate the function of CD8 alpha+ dendritic cell subset in inducing type 1 immunity against infection[J]. *J Immunol*, 2010, 184(4): 2095-2106.
- [10] Diana J, Griseri T, Lagaye S, et al. NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner[J]. *Immunity*, 2009, 30(2): 289-299.
- [11] Roman-Gonzalez A, Moreno ME, Alfaro JM, et al. Frequency and function of circulating invariant NKT cells in autoimmune diabetes mellitus and thyroid diseases in Colombian patients[J]. *Hum Immunol*, 2009, 70(4): 262-268.
- [12] Ly D, Tohn R, Rubin B, et al. An alpha-galactosylceramide C20: 2 N-acyl variant enhances anti-inflammatory and regulatory T cell-independent responses that prevent type 1 diabetes[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 160(2): 185-198.
- [13] Grieco FA, Vendrame F, Spagnuolo I, et al. Innate immunity and the pathogenesis of type 1 diabetes[J]. *Semin Immunopathol*, 2011, 33(1): 57-66.
- [14] Graham KL, Krishnamurthy B, Fynch S, et al. Intra-islet proliferation of cytotoxic T lymphocytes contributes to insulinitis progression[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(7): 1717-1722.
- [15] Tonkin DR, Haskins K. Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF-beta-dependent manner[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(5): 1313-1322.
- [16] Lee MS, Kwon HJ, Kim HS. Macrophages from nonobese diabetic mouse have a selective defect in IFN-gamma but not IFN-alpha/beta receptor pathway[J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(4): 753-761.
- [17] Zhang J, Huang Z, Sun R, et al. IFN-gamma induced by IL-12 administration prevents diabetes by inhibiting pathogenic IL-17 production in NOD mice[J]. *J Autoimmun*, 2011, 38(1): 20-28.
- [18] Parsa R, Andresen P, Gillett A, et al. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice[J]. *Diabetes*, 2012, 61(11): 2881-2892.
- [19] Sia C, Hänninen A. Functional alterations of proinflammatory monocytes by T regulatory cells: implications for the prevention and reversal of type 1 diabetes[J]. *Rev Diabet Stud*, 2010, 7(1): 6-14.
- [20] Allen JS, Pang K, Skowera A, et al. Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture[J]. *Diabetes*, 2009, 58(1): 138-145.
- [21] Nieminen JK, Vakkila J, Salo HM, et al. Altered phenotype of peripheral blood dendritic cells in pediatric type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(11): 2303-2310.
- [22] Delmastro MM, Piganelli JD. Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes[J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011: 593863.
- [23] Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, et al. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients[J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(9): 2026-2032.

(收稿日期: 2013-11-25)

(上接第 175 页)

- endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(37): 14855-14860.
- [25] Sung MM, Soltys CL, Masson G, et al. Improved cardiac metabolism and activation of the RISK pathway contributes to improved post-ischemic recovery in calorie restricted mice [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89(3): 291-302.
- [26] Edwards AG, Donato AJ, Lesniewski LA, et al. Life-long caloric restriction elicits pronounced protection of the aged myocardium: a role for AMPK[J]. *Mech Ageing Dev*, 2010, 131(11-12): 739-742.
- [27] Zou Y, Jung KJ, Kim JW, et al. Alteration of soluble adhesion molecules during aging and their modulation by calorie restriction [J]. *FASEB J*, 2004, 18(2): 320-322.
- [28] Luo SF, Lin CC, Chen HC, et al. Involvement of MAPKs, NF-kappaB and p300 co-activator in IL-1beta-induced cytosolic phospholipase A2 expression in canine tracheal smooth muscle cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 232(3): 396-407.
- [29] Csiszar A, Ungvari Z, Koller A, et al. Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries [J]. *FASEB J*, 2003, 17(9): 1183-1185.
- [30] Broderick TL, Belke T, Driedzic WR. Effects of chronic caloric restriction on mitochondrial respiration in the ischemic reperfused rat heart[J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 233(1-2): 119-125.
- [31] Lanza IR, Zabielski P, Klaus KA, et al. Chronic caloric restriction preserves mitochondrial function in senescence without increasing mitochondrial biogenesis[J]. *Cell Metab*, 2012, 16(6): 777-788.
- [32] Lee CK, Allison DB, Brand J, et al. Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(23): 14988-14993.
- [33] Shinmura K, Tamaki K, Bolli R. Impact of 6-mo caloric restriction on myocardial ischemic tolerance: possible involvement of nitric oxide-dependent increase in nuclear Sirt1[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(6): H2348-H2355.
- [34] Wohlgemuth SE, Julian D, Akin DE, et al. Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction[J]. *Rejuvenation Res*, 2007, 10(3): 281-292.
- [35] Ahn J, Kim J. Nutritional status and cardiac autophagy [J]. *Diabetes Metab J*, 2013, 37(1): 30-35.

(收稿日期: 2013-12-20)