

# 1 型糖尿病与免疫耐受

孙纳新, 杨桂文, 安利国

孙纳新, 杨桂文, 安利国, 山东师范大学生命科学学院动物抗性重点实验室 山东省济南市 250014  
山东省自然科学基金资助课题, No. Z2003D01  
通讯作者: 安利国, 250014, 山东省济南市文化东路 88 号, 山东师范大学生命科学学院动物抗性重点实验室. anlg@sdu.edu.cn  
电话: 0531-6180143 传真: 0531-6180107  
收稿日期: 2005-02-08 接受日期: 2005-05-30

## 摘要

1 型糖尿病是一种自身免疫性疾病, 免疫系统选择性攻击胰腺中的胰岛  $\beta$  细胞, 导致  $\beta$  细胞的损害以及胰岛素的绝对缺乏. 虽然临床上 1 型糖尿病的发病是一个突发事件, 但根据对 1 型糖尿病患者发病的跟踪研究发现, 在出现高血糖的几年前就可检测到患者体内存在抗胰岛细胞自身抗体, 通常在发病的 1 a 前, 葡萄糖耐量试验也会发生恶化. 因此, 通过应用 1 型糖尿病动物模型, 研究明显糖尿病出现前机体的异常变化, 有助于深入了解糖尿病发病机制, 为预防或治疗 1 型糖尿病提供科学依据. 本文主要以 NOD 小鼠为例, 总结了机体免疫耐受在维持自身稳定、调节免疫平衡中的机制和 NOD 小鼠免疫耐受的缺陷及其对糖尿病发病的影响.

孙纳新, 杨桂文, 安利国. 1 型糖尿病与免疫耐受. 世界华人消化杂志 2005; 13(16):2001-2003  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2001.asp>

## 0 引言

1 型糖尿病是一种 T 细胞依赖性自身免疫疾病, 其胰岛素缺乏是由于胰腺中的大量  $\beta$  细胞被免疫系统攻击破坏所致<sup>[1]</sup>. 过去十几年中, 通过对动物模型的研究, 如自发性糖尿病动物模型 NOD 小鼠和 BB 大鼠, 在 1 型糖尿病的易感基因和病理生理学的认识方面都有了显著的发展. 人们逐渐意识到 1 型糖尿病可能存在许多截然不同的致病机制. 尽管如此, 仍存在一些一般性规律, 如疾病的多基因性、T 细胞的参与以及疾病的不完全外显率显示出环境或随机因素对疾病易感性的影响等. 此外, 在许多动物模型中, 都能在糖尿病发病期以前检测到两种类型的异常: 一种是胰腺局部出现异常, 在明显的淋巴浸润之前, 出现巨噬细胞和树突状细胞在胰腺局部的异常聚集; 另一种是系统性免疫系统出现异常, 免疫耐受的机制被打破, 从而触发了一系列针对自身抗原的强烈免疫反应.

许多研究表明, 实验动物的胰腺中可长期存在胰岛炎症, 却并不会导致 1 型糖尿病的发病; 此外, 非糖尿病患者群的 B 细胞和 T 细胞同样能识别胰岛素蛋白<sup>[2]</sup>, 健康人群中的血液中也存在这些抗胰岛素等自身抗原的抗体. 但在正常状态下, 这些自身反应性 T 细胞在外周保持无

活性, 并在严格的调控下保持稳定状态. 因此, 免疫耐受的破坏被认为是 1 型糖尿病发病的关键因素之一. 本文主要以 1 型糖尿病实验动物模型 NOD 小鼠为例, 介绍 1 型糖尿病在免疫耐受方面的缺陷及其对糖尿病发病的影响.

## 1 中枢耐受(central tolerance)

T 细胞耐受的主要机制是在胸腺中自身反应性 T 细胞被淘汰. 不成熟的 T 细胞自骨髓迁移至胸腺, 在胸腺中经过阳性选择(positive selection)和阴性选择(negative selection)后成为成熟的 T 细胞进入外周循环. 如果在胸腺的阳性选择或阴性选择过程中出现异常, 则有可能造成中枢耐受缺陷, 从而导致自身反应性 T 细胞的逃逸或调节性 T 细胞的发育缺陷.

1.1 胸腺阳性选择 胸腺阳性选择主要发生于胸腺皮质区. 发育中的  $CD4^+CD8^+$  双阳性胸腺细胞(double positive, DP)表面表达其特异性 T 细胞受体(T-cell receptor, TCR), 只有那些能够识别皮质上皮细胞表达的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子的 DP 才能存活下来, 并继续发育至  $CD4^+$  或  $CD8^+$  单阳性胸腺细胞(single positive, SP), 该过程称为阳性选择. 因此, 皮质上皮细胞在阳性选择过程中起着关键作用. 将 NOD 小鼠胚胎中纯化的皮质上皮细胞移植至新生 C57BL/6 裸鼠中, 可导致受体小鼠发生胰岛炎, 这说明 NOD 小鼠糖尿病的发病与胸腺中 T 细胞阳性选择的异常有关<sup>[3]</sup>. 尽管 NOD 小鼠皮质上皮细胞异常的致病机制并不完全清楚, 但有研究<sup>[4]</sup>显示 NOD 小鼠的皮质细胞表达异常的 MHC, 提高了阳性选择的阈值, 导致不能正常地选择出调节 T 细胞(regulatory T cell, Treg).

1.2 胸腺阴性选择 在阴性选择中, 骨髓衍生的抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APCs)呈递 MHC-自身抗原肽复合物, 能够识别复合物的胸腺细胞通过一个称为激活诱导的细胞死亡(activation-induced cell death, AICD)过程发生细胞凋亡, 从而淘汰了潜在的自身反应性 T 细胞. 许多研究<sup>[5-8]</sup>表明, NOD 小鼠的骨髓衍生 APCs 在数目和功能上具有广泛的缺陷, 极有可能造成不完全的胸腺阴性选择. 此外, NOD 小鼠的胸腺结构也有改变<sup>[9]</sup>, 正常情况下仅存在于髓质的某些上皮细胞亚群出现在 NOD 小鼠的胸腺皮质中. 这种髓质上皮细胞的再定位可能表示 NOD 小鼠的胸腺细胞在不正常阶段进行了阴性选择. 另外, 某些 MHC 相关基因(如 *taq1* 和 *taq2*)编码与抗原呈递有关的蛋白<sup>[10]</sup>, 这些蛋白的表达量在 NOD 小

鼠中的显著减少直接影响到阴性选择所需的抗原呈递过程, 自身反应性CD8<sup>+</sup> T细胞因此可能得以逃脱. 胸腺细胞自身的缺陷也是造成胸腺中阴性选择的不彻底因素之一. NOD小鼠的胸腺细胞在功能上存在凋亡缺陷<sup>[11]</sup>, 该凋亡抗性与胸腺细胞中抗凋亡蛋白Bcl-X表达上调有关, 这可能是导致外周存在过高频率的自身反应性T细胞的原因.

尽管胸腺中的阴性选择能够删除自身反应性T细胞, 但是这种淘汰是不完全的<sup>[12]</sup>. 其原因在于有些自身抗原并不出现在胸腺中, 能够识别这些自身抗原的胸腺细胞因而得以存活下来; 另外, 某些能够识别自身抗原的胸腺细胞因与自身抗原肽的亲合力较低而未被淘汰, 但在外周的某些情况下能针对自身抗原发生免疫反应. 因此, 免疫系统中同样存在几种外周耐受机制以控制自身免疫反应, 而1型糖尿病易感人群中出现自身耐受的缺失也与外周耐受(peripheral tolerance)的破坏有关.

## 2 外周耐受

2.1 忽视(ignorance) 前T细胞通常只存在于淋巴器官中, 与其他器官隔离, 因此不能诱导器官的损伤. 显然, 在正常情况下, 潜在的自身反应性T细胞可忽略其自身抗原, 维持自身耐受. 尽管NOD小鼠早期存在胰岛的异常, 但其他机制并无异常. 许多实验<sup>[13-16]</sup>证实, 针对胰岛自身抗原的免疫初始反应发生在胰腺部淋巴结, 而非胰岛内部.

2.2 删除(deletion) APCs在激活T细胞的同时, 细胞表面表达CD95(Fas)和其他肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员, T细胞在被激活后也开始表达Fas和Fas配体(Fas ligand, FasL), 因此, 细胞间的相互作用或T细胞自身都可最终诱导T细胞发生AICD而凋亡. AICD是诱导T细胞外周耐受、淘汰效应T细胞的主要方式. NOD小鼠外周循环中的CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞, 其AICD都显著低于同种的非糖尿病小鼠, 而且抵抗多种凋亡信号诱导的死亡<sup>[17]</sup>. NOD小鼠T细胞对AICD表现出的抗性, 既可由APCs缺陷所致<sup>[18-19]</sup>, 也可由T细胞本身的缺陷所致<sup>[17]</sup>. 对细胞和分子途径的研究<sup>[17]</sup>表明, NOD小鼠T细胞内caspase-8水平显著低于其他小鼠, T细胞表面Fas和FasL的基因表达水平也低于非糖尿病小鼠, 同时激活后的T细胞分泌细胞因子水平, 如白介素-2(IL-2), 也低于正常水平. NOD特异性AICD抵抗模式严重干扰了外周免疫系统对激活T细胞反应进程的控制, 是导致外周耐受破坏的直接原因之一.

### 2.3 调节(regulation)

2.3.1 无能(nergy) 某些T细胞在结合抗原时, 因无法产生IL-2而不能被完全激活的状态称为无能<sup>[20]</sup>. 无能T细胞分泌IL-10抑制自身及其他T细胞的激活. 但因尚未找出其特异性标志, 所以无法确定其在自身免疫反应中的作用<sup>[21]</sup>.

2.3.2 抑制(suppression) 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4, 即CD152)是表达于激活的T细胞上的一种糖

蛋白. 像CD28一样, CTLA-4能够与B7家族分子B7-1(CD80)和B7-2(CD86)形成配体-受体复合物, 交联后可通过下调IL-2的产生、阻止细胞周期的进程而对T细胞起负调节作用, 是调节外周T细胞的耐受和分化的重要分子<sup>[22]</sup>. 近年研究<sup>[23]</sup>进一步表明, CTLA-4的功能在于提高自身反应性T细胞激活的阈值, 在其缺失的情况下, 无需外周免疫, 自身抗原就可以激发自身免疫反应. 因此, 许多学者对CTLA-4在NOD小鼠T细胞的表达及其功能做了大量研究工作. 但出乎意料的是, NOD小鼠T细胞表达的CTLA-4的调节功能并无显著缺陷<sup>[24]</sup>. 另外, 有学者<sup>[25]</sup>认为既然在T细胞的激活中, CTLA-4与CD28作用相反, 那么CTLA-4/CD28的比值, 而非仅仅CTLA-4的表达水平, 应该更能反映T细胞激活后的综合状态. 实验<sup>[25]</sup>表明, NOD小鼠T细胞被抗CD-3抗体激活后, 其CTLA-4/CD28的比值果然显著低于C57BL/6和BALB/c小鼠. 其原因可能在于NOD小鼠的树突状细胞(dendritic cells, DCs)、巨噬细胞(macrophages, Mps)和T细胞上表达CD86的水平较低, 从而导致激活的自身反应性T细胞不能有效提高CTLA-4水平来控制免疫反应.

2.3.3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节T细胞 Treg是一类功能和表型独特的免疫调节性T细胞<sup>[26]</sup>. 不同于CD25<sup>+</sup>T细胞, Treg细胞表面在激活前后均组成型表达白介素-2受体 $\alpha$ 链(IL-2R $\alpha$ , 即CD25)分子, 在接受APCs的刺激后, Treg细胞不但自身处于无能状态, 还通过抑制IL-2的形成来抑制其他CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T的激活或增殖. 虽然Treg细胞在外周只占CD4<sup>+</sup>T细胞的5-10%, 但在维持免疫耐受、调节反应强度方面起着关键作用<sup>[26]</sup>. 有研究表明, NOD小鼠的胸腺和脾脏中, 其Treg细胞数目明显低于BALB/c小鼠, 在胸腺和脾脏中Treg所占T细胞总数的比例也显著低于BALB/c小鼠. 胰腺淋巴结中的Treg细胞平均数目在第8 wk和15 wk时低于非糖尿病小鼠水平(无显著性差异). 其原因主要在于Treg细胞的发育、激活和存活都需要APCs的辅助, 尤其是CD28/B7的相互作用, 而NOD小鼠的APCs在细胞表面分子表达、细胞因子分泌水平等形态及功能上都有严重缺陷.

2.3.4 自然杀伤T(NKT)细胞 NKT细胞是一类重要的免疫调节T细胞群, 因其表面标志中既有NK细胞的标志, 如NK1.1和Ly49家族的成员, 又有T细胞的表面标志-TCR. 不同于其他T细胞, NKT细胞只识别来自CD1抗原呈递分子呈递的抗原, 而且识别的抗原性质也不是肽类, 而是脂类或糖脂. Sharif *et al*在研究中发现, 抗原刺激的早期, NKT细胞不仅能够迅速分泌大量细胞因子, 而且是IL-4的主要来源, 因而可能在免疫反应的速度和类型方面起着关键的调节作用. 1型糖尿病属于Th1型自身免疫疾病(Th1-driven autoimmune diseases), 其发病机制与系统性及局部的CD4<sup>+</sup>T细胞的Th1/Th2失衡密切相关. 在糖尿病易感个体内, Th1和Th2细胞的平衡被打破, Th2调节性细胞功能渐进性降低, 自身反应性Th1

细胞持续激活, 并进一步激活 Mps 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 从而导致 $\beta$ 细胞的毁灭. 然而Treg细胞同时抑制Th1和Th2细胞的发育与效应, 现认为与T细胞分化直接相关的调节T细胞主要是NKT细胞. 对NOD小鼠的研究显示, 3周龄时在胸腺、肝脏以及外周淋巴器官的NKT细胞数量, 与非糖尿病小鼠相比显著减少, 并且这些细胞在单个细胞水平上缺乏产生IL-4的能力. NKT细胞的数量和功能上的缺陷可能会直接影响Th细胞向Th2的分化, 并最终导致Th1/Th2的失衡.

总之, NOD小鼠在免疫耐受的各种机制中几乎都存在不同程度的缺陷, 这些缺陷以不同的方式共同引起了对机体免疫耐受的破坏, 从而触发了针对自身抗原的免疫反应. 迄今为止, 1型糖尿病尚未有完全治愈的方法, 目前一个重要的治疗方向是及早发现易感高危人群, 并进行免疫干涉以防止疾病的发生. 过去十几年中, 借助于各种糖尿病动物模型, 包括转基因动物模型和基因敲除动物模型, 人们对1型糖尿病的发病机制的认识, 特别是有关免疫耐受方面的知识不断扩展. 尽管有文章对研究动物模型的发病机制能否应用于人类持怀疑态度, 但大量证据<sup>[32]</sup>证明, 糖尿病动物模型中出现的胰岛异常、免疫耐受破坏以及免疫反应失调, 同样发生在1型糖尿病的高危易感人群中. 基于动物模型的致病机制研究, 必将为人类1型糖尿病提供有效的预防和治疗方案.

### 3 参考文献

- Kolb H, Kolb-Bachofen V, Roep BO. Autoimmune versus inflammatory type I diabetes: a controversy? *Immunol Today* 1995;16:170-172
- Naquet P, Ellis J, Tibensky D, Kenshole A, Singh B, Hodges R, Delovitch TL. T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals. *J Immunol* 1988;140:2569-2578
- Thomas-Vaslin V, Damotte D, Coltey M, Le Douarin NM, Coutinho A, Salaun J. Abnormal T cell selection on nod thymic epithelium is sufficient to induce autoimmune manifestations in C57BL/6 athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4598-4603
- Ridgway WM, Fasso M, Fathman CG. A new look at MHC and autoimmune disease. *Science* 1999;284:749-751
- Wheat W, Kupfer R, Gutches DG, Rayat GR, Beilke J, Scheinman RI, Wegmann DR. Increased NF-kappa B activity in B cells and bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice. *Eur J Immunol* 2004;34:1395-1404
- Silveira PA, Dombrowsky J, Johnson E, Chapman HD, Nemazee D, Serreze DV. B cell selection defects underlie the development of diabetogenic APCs in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2004;172:5086-5094
- Poligone B, Weaver DJ Jr, Sen P, Baldwin AS Jr, Tisch R. Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J Immunol* 2002;168:188-196
- Charre S, Rosmalen JG, Pelegri C, Alves V, Leenen PJ, Drexhage HA, Homo-Delarche F. Abnormalities in dendritic cell and macrophage accumulation in the pancreas of nonobese diabetic (NOD) mice during the early neonatal period. *Histol Histopathol* 2002;17:393-401
- Savino W, Boitard C, Bach JF, Dardenne M. Studies on the thymus in nonobese diabetic mouse. I. Changes in the microenvironmental compartments. *Lab Invest* 1991;64:405-417
- Fu Y, Yan G, Shi L, Faustman D. Antigen processing and autoimmunity. Evaluation of mRNA abundance and function of HLA-linked genes. *Ann N Y Acad Sci* 1998;842:138-155
- Lamhamedi-Cherradi SE, Luan JJ, Eloy L, Fluteau G, Bach JF, Garchon HJ. Resistance of T-cells to apoptosis in autoimmune diabetic (NOD) mice is increased early in life and is associated with dysregulated expression of Bcl-x. *Diabetologia* 1998;41:178-184
- Akkaraju S, Ho WY, Leong D, Canaan K, Davis MM, Goodnow CC. A range of CD 4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity* 1997;7:255-271
- Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, Hering BJ, Hafler DA. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature* 2005;435:224-228
- Aspord C, Rome S, Thivolet C. Early events in islets and pancreatic lymph nodes in autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 2004;23:27-35
- Jaakkola I, Jalkanen S, Hanninen A. Diabetogenic T cells are primed both in pancreatic and gut-associated lymph nodes in NOD mice. *Eur J Immunol* 2003;33:3255-3264
- Levisetti MG, Suri A, Frederick K, Unanue ER. Absence of lymph nodes in NOD mice treated with lymphotoxin-beta receptor immunoglobulin protects from diabetes. *Diabetes* 2004;53:3115-3119
- Decallonne B, van Etten E, Giulietti A, Casteels K, Overbergh L, Bouillon R, Mathieu C. Defect in activation-induced cell death in non-obese diabetic (NOD) T lymphocytes. *J Autoimmun* 2003;20:219-226
- Radosevic K, Casteels KM, Mathieu C, Van Ewijk W, Drexhage HA, Leenen PJ. Splenic dendritic cells from the non-obese diabetic mouse induce a prolonged proliferation of syngeneic T cells. A role for an impaired apoptosis of NOD T cells? *J Autoimmun* 1999;13:373-382
- Piganelli JD, Martin T, Haskins K. Splenic macrophages from the NOD mouse are defective in the ability to present antigen. *Diabetes* 1998;47:1212-1218
- Falb D, Briner TJ, Sunshine GH, Bourque CR, Luqman M, Geffer ML, Kamradt T. Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur J Immunol* 1996;26:130-135
- Teague TK, Hildeman D, Kedl RM, Mitchell T, Rees W, Schaefer BC, Bender J, Kappler J, Marrack P. Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12691-12696
- Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Blue-stone JA. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 1996;184:783-788
- Walker LS, Ausubel LJ, Chodos A, Bekarian N, Abbas AK. CTLA-4 differentially regulates T cell responses to endogenous tissue protein versus exogenous immunogen. *J Immunol* 2002;169:6202-6209
- Piganelli JD, Poulin M, Martin T, Allison JP, Haskins K. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CD152) regulates self-reactive T cells in BALB/c but not in the autoimmune NOD mouse. *J Autoimmun* 2000;14:123-131
- Dahlen E, Hedlund G, Dawe K. Low CD86 expression in the nonobese diabetic mouse results in the impairment of both T cell activation and CTLA-4 up-regulation. *J Immunol* 2000;164:2444-2456
- Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 2000;12:1145-1155