

• 论 著 •

2 型糖尿病患者自体血细胞葡萄糖细胞膜转运研究^{*}

黄中伟, 葛才保

(江苏省南京市溧水区人民医院检验科 211200)

摘要:目的 对 2 型糖尿病(T2DM)患者自体血细胞葡萄糖细胞膜转运进行研究。方法 T2DM 组(40 例)、T2DM 前期组(前期组, 34 例)、对照组(40 例)抗凝全血分别加入同体积生理盐水和 ATP, 37 ℃ 水浴 3 h, 观察葡萄糖水平变化, 计算葡萄糖下降值和下降比例。结果 组内比较, 加 ATP 管葡萄糖下降值高于盐水管($P < 0.01$)。组间比较, 盐水管葡萄糖下降比例, T2DM 组、前期组、对照组依次增加, T2DM 组低于对照组($P < 0.01$), T2DM 组低于前期组($P < 0.05$)。ATP 管葡萄糖下降比例, T2DM 组低于对照组($P < 0.05$)。T2DM 患者加 ATP 后葡萄糖下降值由盐水管的(2.81 ± 0.52) mmol/L 增加到(4.73 ± 0.69) mmol/L。结论 T2DM 患者存在葡萄糖细胞膜转运障碍, 与病程进展相关, ATP 能够改善葡萄糖的细胞膜转运。

关键词: 2 型糖尿病; ATP; 细胞膜转运; 葡萄糖

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)18-2520-03

Glucose membrane transport studies of blood cells in type 2 diabetes^{*}

HUANG Zhongwei, GE Caibao

(Lishui District People's Hospital, Jiangsu, Nanjing 211200, China)

Abstract: Objective To explore the transport capacity of glucose membrane with blood cells in type 2 diabetes. **Methods** The anticoagulated blood of T2DM(40 cases), Pre-diabetes(34 cases), control group(40 cases) were added to the same volume of saline and ATP, 37 ℃ 3 h. The changes of glucose was observed, the level and Rate of glucose decreased were calculated. **Results** The drop-out value in the groups of ATP was higher than which of salt water($P < 0.05$). In salt groups, the drop ratio in the T2DM, Pre-diabetes, control groups were increased in turn, the value of glucose in T2DM was lower than which in control group and in Pre-diabetes($P < 0.05$). In the ATP groups, the drop-out value in T2DM was lower than which in control group($P < 0.05$). To T2DM patients, the drop-out value was (2.81 ± 0.52) mmol/L in salt groups, which was (4.73 ± 0.69) mmol/L, respectively. **Conclusion** The glucose membrane transporters for T2DM were obstacles, the obstacles associated with progression of T2DM, ATP can improve membrane transporter of glucose.

Key words: type 2 diabetes; ATP; membrane transport; glucose

细胞外三磷酸腺苷(eATP)作为细胞外信号分子调控细胞并参与细胞膜的物质转运, eATP 不足影响细胞内能量代谢^[1]。2 型糖尿病(T2DM)糖代谢紊乱, 其组织细胞的葡萄糖摄取利用能力下降, 形成细胞外高糖、细胞内低糖、能量代谢障碍。骨骼肌细胞、脂肪细胞、血细胞等组织细胞依赖 eATP 进行葡萄糖细胞膜转运, eATP 不足成为 T2DM 的关键因素^[2]。本文通过将 T2DM 患者组(下称 T2DM 组)、糖尿病前期组(下称前期组)、对照组全血样本放置 37 ℃ 水浴 3 h, 观察葡萄糖水平变化, 并外加 ATP 分析 eATP 对 T2DM 患者自体血细胞葡萄糖细胞膜转运的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 T2DM 组, 40 例初诊 T2DM 患者, 其中, 男 27 例, 女 13 例, 平均年龄(59.3 ± 12.0) 岁。前期组 34 例, 其中男 22 例, 女 12 例, 平均年龄(57.9 ± 11.8) 岁; $6.1 \text{ mmol/L} \leq$ 空腹血糖(FBG) $< 7.0 \text{ mmol/L}$, $7.8 \text{ mmol/L} \leq$ 餐后 2 h 血糖 $< 11.1 \text{ mmol/L}$ 。对照组为健康体检者, 共 40 例, 其中男 25 例, 女 15 例, 平均年龄(53.3 ± 10.6) 岁; 无心血管、高血压史及近期用药史。空腹采集静脉血 5~6 mL, 3 mL 以枸橼酸钠抗凝, 剩余分离血清作常规生化检测。

1.2 仪器与试剂 HITACHI 7600 全自动生化分析仪, Ab-

bott i2000 化学发光分析仪; 总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)和葡萄糖(GLU), Di Lab 试剂; 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), 日本协和试剂; 游离脂肪酸(FFA), 北京华宇亿康生物试剂; 胰岛素(INSULIN), Abbott 试剂。三磷酸腺苷(ATP)注射液(20 mg/2 mL), 徐州莱恩药业有限公司生产, 批号: 1301211。

1.3 方法 3 组人员抗凝血离心测定血浆 GLU 后, 轻轻混匀, 各吸 1 mL 抗凝全血于 A 管和 B 管。A 管加 0.2 mL 生理盐水(NS), B 管加 0.2 mL ATP (eATP), 37 ℃ 水浴 3 h, 其间每 30 min 轻轻混匀 1 次, 避免溶血。3 h 后低速离心, 检测各管血浆 GLU 水平, 比较各组间加 NS 后血浆葡萄糖(NS-GLU)和加 ATP 后血浆葡萄糖(eATP-GLU)下降的绝对值及下降比例。

1.4 统计学处理 试验数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS16.0 统计软件分析, 两组间比较采用成组 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时组间比较用 LSD 检验, 方差不齐时用 Tamhane's T_2 检验。组间 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组患者血清检测一般资料, 见表 1。TC: T2DM 组高于

* 基金项目: 江苏大学医学临床科技发展基金资助项目(JLY20140084)。

作者简介: 黄中伟, 男, 副主任技师, 主要从事临床生化及流式细胞术检测分析。

对照组 ($P<0.05$);TG:T2DM 组高于对照组 ($P<0.01$),T2DM 组高于前期组 ($P<0.05$),前期组高于对照组 ($P<0.05$);HDL-C:T2DM 组低于对照组 ($P<0.01$),前期组低于对照组 ($P<0.05$);LDL-C:T2DM 组高于对照组 ($P<0.05$);FFA:T2DM 组高于对照组 ($P<0.01$),T2DM 组高于前期组 ($P<0.01$),前期组高于对照组 ($P<0.01$)。

2.2 全血样本加生理盐水和 ATP,37 ℃ 3 h,测定盐水管葡萄糖(NS-GLU)和 ATP 管葡萄糖(eATP-GLU),计算下降值

和下降比例,见表 2。组内比较,eATP 管显著低于盐水对照管 ($P<0.01$)。组间比较,盐水管葡萄糖下降值,T2DM 组高于对照组 ($P<0.01$),T2DM 组高于前期组 ($P<0.05$),前期组高于对照组 ($P<0.05$);葡萄糖下降比例,T2DM 组、前期组、对照组依次增加,T2DM 组低于对照组 ($P<0.01$),T2DM 组低于前期组 ($P<0.05$)。ATP 管葡萄糖下降值,T2DM 组显著高于对照组和前期组 ($P<0.01$),前期组高于对照组 ($P<0.05$);葡萄糖下降比例,T2DM 组低于对照组 ($P<0.05$)。

表 1 3 组一般资料比较(±s)

检测项目	对照组(n=40)	前期组(n=34)	T2DM 组(n=40)
TC(mmol/L)	5.030±0.810	5.340±0.925	5.510±1.250*
TG(mmol/L)	1.540±0.770	1.890±1.440*	2.450±1.600**△
FBG(mmol/L)	4.930±0.380	6.490±0.340	9.140±2.080
HDL-C(mmol/L)	1.550±0.320	1.390±0.260*	1.340±0.280**
LDL-C(mmol/L)	2.820±0.712	3.030±0.850	3.300±1.150*
FFA(μmol/L)	369.000±69.000	456.000±64.000**	526.000±102.000**△△
INSULIN(mU/L)	5.000±2.270	7.360±4.390	9.110±5.530

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 T2DM 前期组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

表 2 各组间盐水管和 ATP 管 37 ℃ 3 h 后葡萄糖下降值和下降比例(±s)

检测项目	对照组(n=40)	前期组(n=34)	T2DM 组(n=40)
FBG(血浆)	4.23±0.36	5.09±0.54	7.74±1.73
NS-GLU	2.27±0.31	2.94±0.39	4.95±1.38
eATP-GLU	1.32±0.39 [#]	1.79±0.47 [#]	3.01±1.36 [#]
NS-GLU 下降值	1.96±0.21	2.15±0.34*	2.81±0.52**△
eATP-GLU 下降值	2.90±0.38	3.24±0.56*	4.73±0.69**△△
NS-GLU 下降率(%)	46.50±4.60	42.20±5.00	36.90±5.50**△
eATP-GLU 下降率(%)	68.90±8.30	63.90±10.00	60.60±8.90*

注:同组间加 ATP 管和盐水对照管比较,[#] $P<0.01$;组间比较,T2DM 组与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;T2DM 组与前期组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

3 讨 论

本文以枸橼酸钠抗凝全血样本,在短时间内完成试验,保证了试验过程中全血细胞的活体能量代谢,通过 37 ℃ 水浴孵育 3 h,测定葡萄糖水平的变化,观察葡萄糖细胞膜转运带来的细胞外葡萄糖改变。本文 ATP 以外加方法加入试验体系中,表现为 eATP 的作用。通过加同体积生理盐水和 ATP 的试验管比较,分析 eATP 对葡萄糖细胞膜转运的影响。本文一般资料显示,T2DM 组、前期组、对照组符合 T2DM 诊断筛选标准,TC、TG、HDL-C、LDL-C、FFA 等组间差异也符合 T2DM 脂代谢紊乱规律。

本文观察到全血样本经 37 ℃ 3 h 孵育后的葡萄糖水平变化,T2DM 组、前期组、对照组加 ATP 管都显著低于同样条件下的生理盐水管 ($P<0.01$),充分说明外加 ATP 促进了细胞外葡萄糖向细胞内的转运,即 eATP 促进了葡萄糖的细胞膜转运。加盐水管,对照组、前期组、T2DM 组葡萄糖下降比例依次下降,表明 T2DM 疾病进展中葡萄糖的细胞膜转运速率不断下降,T2DM 患者存在葡萄糖细胞膜转运障碍。有学者测定健康者、糖耐量异常者、糖尿病患者 37 ℃ 水浴 1~3 h 的血糖下降速率,结果平均每小时分别为 0.080、0.051、0.038,也使

T2DM 患者葡萄糖下降速率明显减低。全血样本加 ATP 后进一步增加了 T2DM 患者的葡萄糖下降值,由盐水管的(2.81±0.52)mmol/L 增加到(4.73±0.69)mmol/L,前期组也是同样效应;葡萄糖下降比例 T2DM 组与对照组的差异由 $P<0.01$ 缩小到 $P<0.05$,T2DM 和前期组的差异由 $P<0.05$ 缩小到无差异,外加 ATP 改善了 T2DM 组和前期组的葡萄糖细胞膜转运。数据表明,T2DM 患者存在葡萄糖的细胞膜转运障碍,并与疾病进展相关,eATP 对葡萄糖的细胞膜转运具有促进作用,能够部分缓解 T2DM 患者的葡萄糖细胞膜转运障碍,eATP 通过细胞膜转运与 T2DM 的相关性值得深入研究。

病因学研究表明,肠道菌群影响机体能量代谢,与 T2DM 的发生密切相关^[3]。通过 eATP 测定、肠道菌群定量分析、细胞膜转运研究建立的细胞膜转运障碍发病机制研究表明,食品防腐剂等因素使肠道菌群数量下降,导致血浆 eATP 下降,葡萄糖细胞膜转运障碍,形成细胞外高糖、细胞内低糖;葡萄糖细胞膜转运障碍,使胰岛素效应下降,表现为胰岛素抵抗;葡萄糖细胞膜转运障碍,使细胞内能量供给不足,特别是餐后 2 h 血浆 eATP 最低点,形成细胞即时分泌功能障碍,导致胰岛素等多激素、多细胞因子分泌缺陷^[4-5]。本文结果进一步论证了细

胞膜转运障碍发病机制。

胃肠道调节血糖因素、改善 β 细胞功能是 T2DM 基础研究中的难点^[6]。有研究发现, T2DM 患者中性粒细胞和正常血浆孵浴后的吞噬功能得到改善^[7-8]。Marchetti 等^[9]研究表明, β 细胞的糖代谢异常导致 ATP 生成不足和胰岛素分泌缺陷。Bajpeyi 等^[10]研究也发现, 线粒体能量代谢障碍是细胞功能障碍的主要原因。这些研究表明, β 细胞等机体细胞功能障碍的原因在细胞外, 细胞外因素使细胞内能量代谢障碍进一步导致细胞分泌功能缺陷, eATP 不足和细胞膜转运障碍都是需要研究的重点, 本文 eATP 促进了 T2DM 患者的葡萄糖细胞膜转运, 能否改善细胞内能量代谢和细胞功能值得探讨。

有研究显示, eATP 不足与胰岛素分泌缺陷相关。Na⁺-葡萄糖转运体、K-Na、ATPase 等膜蛋白能感受细胞膜电位的变化, 并与 ATP 消耗相关^[11]。胰岛素分泌研究表明, 储存池囊泡胰岛素的分泌需要消耗 ATP^[12]。Rosenthal^[13]进一步研究证实, 囊泡运输伴随着 eATP 的下降。通过全内反射显微术和一种 ATP 敏感荧光记录仪进行了人和小鼠 β 细胞细胞膜离子通道的 ATP 动力学试验, 当葡萄糖水平升高到 11~20 mmol/L 时, 相邻 β 细胞的 ATP 出现波动, ATP PM 浓度级波动与 Ca²⁺ 内流形成负反馈, ATP 水平下降促进 Ca²⁺ 内流, 导致胰岛素的分泌; 该试验 ATP 能够被测定, 结合 ATP 水平下降和 Ca²⁺ 内流的特点, 表明 eATP 促进了胰岛素分泌。IL-1、IL-6 等炎性因子水平异常与 T2DM 患者的细胞功能相关^[14]。Bustamante 等^[15]研究显示, 通过 eATP 促进了骨骼肌细胞的 IL-6 表达, eATP 能否改善 β 细胞的胰岛素分泌缺陷, 值得研究。

热休克蛋白 72 (eHSP72) 是重要逆境蛋白, 有研究显示, eHSP72 与胰岛素抵抗指数、体质量指数呈正相关, 在 ROS 形成、 β 细胞功能障碍发生中具有一定作用^[16]。说明 T2DM 发生机制中存在逆境因素, 细胞膜 K、Na-ATPase 活性下降、葡萄糖转运蛋白的异常表达等可能与此相关。有研究发现, eATP 不足形成逆境损害, 并进一步形成逆境适应, 导致受损环节的适应性过度表达^[17]。所以, 通过 eATP 促进葡萄糖细胞膜转运, 改善细胞内能量代谢逆境, 进一步改善细胞功能, 可能是实现 β 细胞胰岛素分泌缺陷逆转的途径之一。本文结果也显示, eATP 体外降血糖试验获得成功, 对 T2DM 患者的治疗具有一定指导意义。因此, 通过粪菌移植 (FMT)、活菌制剂改善 T2DM 患者肠道菌群状况, 通过 eATP 等改善胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷, 通过苯甲酸钠等食品防腐剂建立食源性、肠道菌群抑制、细胞膜转运障碍的 T2DM 模型以及减少食品防腐剂使用抑制 T2DM 流行等都将是笔者的工作方向, 期望 T2DM 的最终克服。

参考文献

- [1] Alvarez CL, Schachter J, De Sá Pinheiro AA, et al. Regulation of extracellular ATP in human erythrocytes infected with plasmodium falciparum[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96216.
- [2] 葛才保, 陈六生, 张力, 等. 细胞外 ATP 促葡萄糖细胞膜转运的回顾性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(S1): 39-43.

- [3] 张永顶, 李兴武. 体外血糖降低速率与糖耐量异常关系探讨[J]. 实用全科医学, 2006, 4(6): 678-679.
- [4] Caricilli AM, Saad MJ. Gut microbiota composition and its effects on obesity and insulin resistance[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2014, 17(4): 312-318.
- [5] 葛才保. 以细胞膜转运理论分析 2 型糖尿病发病机理[J]. 实用糖尿病杂志, 2011, 7(4): 11-13.
- [6] 张立平, 葛才保, 张力, 等. 定量分析肠道细菌总数及其与 2 型糖尿病的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(16): 2091-2092.
- [7] 甘立霞. 2 型糖尿病基础研究中的难题与突破[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(15): 1543-1547.
- [8] Shurtz-Swirski R, Sela S, Herskovits AT, et al. Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Care, 2001, 24(1): 104-110.
- [9] Marchetti P, Lupi R, Del G, et al. The beta-cell in human type 2 diabetes[J]. Adv Exp Med Bio, 2010, 654: 501-514.
- [10] Bajpeyi S, Pasarica M, Moro C, et al. Skeletal muscle mitochondrial capacity and insulin resistance in type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(4): 1160-1168.
- [11] 陈兴娟, 张熙东, 张璇, 等. 细胞膜电位对非离子通道膜蛋白功能的调节[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(2): 216-220.
- [12] 马晓松. β 细胞的电活动和细胞内胰岛素囊泡与第二信使的对话[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(9): 794-795.
- [13] Rosenthal. The progressive ankylosis gene product ANK regulates extracellular ATP levels in primary articular chondrocytes[Z], 2013; R154.
- [14] 邵秋园, 陈六生, 葛才保, 等. 2 型糖尿病患者单核/巨噬细胞功能研究[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(18): 2196-2197.
- [15] Bustamante M, Fernández-Verdejo R, Jaimovich E, et al. Electrical stimulation induces IL-6 in skeletal muscle through extracellular ATP by activating Ca(2+) signals and an IL-6 autocrine loop[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014, 306(8): E869-882.
- [16] Krause M, Keane K, Rodrigues-Krause J, et al. Elevated levels of extracellular heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic β -cell dysfunction and death in vitro[J]. Clin Sci(Lond), 2014, 126(10): 739-752.
- [17] Lim MH, Wu J, Yao J, et al. Apyrase suppression raises extracellular ATP levels and induces gene expression and cell wall changes characteristic of stress responses[J]. Plant Physiol, 2014, 164(4): 2054-2067.