

• 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3h,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 $(2.81\pm0.52)\text{mmol/L}$ 增加到 $(4.73\pm0.69)\text{mmol/L}$ 。

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 Caobao

(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, he 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 increaseed 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 $(2.81\pm0.52)\text{mmol/L}$ in salt grops, which was $(4.73\pm0.69)\text{mmol/L}$, 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3h,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2h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5~6mL,3mL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1mL抗凝全血于A管和B管。A管加0.2mL生理盐水(NS),B管加0.2mL ATP(eATP),37℃水浴3h,其间每30min轻轻混匀1次,避免溶血。3h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 T₂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

* 基金项目:江苏省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 °C 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

表 1 3 组一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

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 °C 3 h 后葡萄糖下降值和下降比例($\bar{x} \pm s$)

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 °C 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 °C 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 °C 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

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($P < 0.05$)。

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 Ca^{2+} 内流形成负反馈,ATP水平下降促进 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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、体质量指数组呈正相关,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] 郁秋园,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.