

- 7 Ishizu T, Seo Y, Machino T, et al. Prognostic impact of plaque echolucency in combination with inflammatory biomarkers on cardiovascular outcomes of coronary artery disease patients receiving optimal medical therapy[J]. *Atherosclerosis*, 2011,216(1):120-124.
- 8 张若青,杨春燕,胡 静,等. 血脂水平与冠心病患者颈动脉粥样

硬化斑块关系研究[J]. *河北医药*,2010,32(12):1571-1572.

- 9 周 璐. 冠心病患者 CRP 及血脂水平变化的临床价值[J]. *中国民康医学*, 2007,19(4):98.

[收稿日期 2013-10-28][本文编辑 黄晓红 吕文娟]

博硕论坛·论著

糖尿病大鼠高血糖持续时间对细胞免疫功能的影响

余劲明, 蔡德鸿, 张 桦, 陈 宏

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院内分泌代谢科(余劲明); 510282 广州,南方医科大学附属珠江医院内分泌代谢科(蔡德鸿,张 桦,陈 宏)

作者简介: 余劲明(1971-),女,医学博士,副主任医师,研究方向:胰岛临床病理生理研究及胰岛移植及干细胞治疗糖尿病等基础与临床研究。E-mail:yujinming1@163.com

[摘要] 目的 探讨糖尿病大鼠的高血糖状态持续时间对大鼠体内细胞免疫功能的影响。方法 采用链脲佐菌素注射成功制备糖尿病大鼠模型共 20 只,随机分为四组,每组 5 只。A 组:成模后血糖升高 4 d 皮下注射胰岛素,控制血糖在 8~12 mmol/L 之间;B 组:成模后血糖升高持续 8 d 皮下注射胰岛素控制血糖;C 组:成模后血糖升高持续 2 周皮下注射胰岛素控制血糖;D 组:未控制血糖。以正常血糖大鼠 5 只为正常对照组。对糖尿病大鼠分别于 4 d、8 d、15 d 及 4 周取外周血用流式细胞仪检测 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 及 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ T 淋巴细胞比率,以评价不同高血糖持续状态对正常机体细胞免疫功能的影响。结果 (1)与正常对照组相比,A 组及 B 组大鼠 4、8、15 d 及 4 周的各项细胞免疫指标无明显变化。(2)C 组大鼠在 15 d 外周血 CD4⁺ 比例下降,CD8⁺ 比例升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值明显下降($P<0.05$)。经控制血糖后,C 组大鼠在 4 周时外周血 CD4⁺ 比例较 15 d 时明显升高($P<0.05$),但仍明显低于正常对照组($P<0.05$)。(3)D 组大鼠在 15 d 及 4 周外周血 CD4⁺ 比例下降,CD8⁺ 比例升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值明显下降($P<0.05$)。(4)各组大鼠各阶段的 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ T 淋巴细胞比值与正常对照组大鼠差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 高血糖持续时间超过 2 周以上即可对大鼠体内细胞免疫功能产生部分影响。在高血糖持续时间超过 2 周后糖尿病大鼠体内细胞免疫功能明显紊乱,表明长期高血糖可以对糖尿病个体免疫功能产生较大影响。

[关键词] 糖尿病; 高血糖; 细胞免疫

[中图分类号] R 587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)03-0211-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.03.08

Effects of duration of hyperglycemia on cellular immunity function in diabetic rats YU Jin-ming, CAI De-hong, ZHANG Hua, et al. Department of Endocrinology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of the duration of hyperglycemia on cellular immune function in diabetic rat. **Methods** Animal model of diabetes mellitus was establish via continuously intraperitoneal injection of streptozotocin. Twenty rats with successful modeling were randomly divided into 4 groups, each group include five rats. Group A: on the 4th day of successful modeling, insulin was injected to control glucose between 8~12 mmol/L. Group B: After 8 d of successful modeling, insulin was injected to control glucose. Group C: After 2 weeks of successful modeling, insulin was injected to control glucose. Group D: After successful modeling, blood glucose did not controlled in entire experiment course. 5 normal rats were used as control group at the same time. Peripheral blood

cells were collected at 5 d, 8 d, 15 d and 4 weeks. The ratio of the $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$, $CD4^+CD25^+/CD4^+$ T cells were detected by FCM. **Results** (1) It showed no significant change of the ratio of $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$, $CD4^+CD25^+/CD4^+$ T cells on 4 d, 8 d, 15 d and 4 weeks in group A and group B when compared with the control group. (2) In group C, there was a significant decrease of $CD4^+$ T lymphocytes on 15 d, and the proportion of $CD8^+$ T cell increased instead. The ratio of $CD4^+/CD8^+$ had a significant decrease ($P < 0.05$). The ratio of the $CD4^+$ T cells had significant increased between 15 d and 4 weeks after controlling glucose, but it was still obviously lower than that of control group ($P < 0.05$). (3) In group D, there was a significant decrease of $CD4^+$ T lymphocytes on 15 d, and the proportion of $CD8^+$ T cell increased. The ratio of $CD4^+/CD8^+$ also had a significant decrease ($P < 0.05$). (4) The ratio of $CD4^+CD25^+/CD4^+$ T cells hadn't a significant difference between experimental groups and control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Diabetic rats have cellular immune dysfunction mediated by hyperglycemia with duration time more than two weeks. It means that chronic hyperglycemia have great effect on cellular immune function.

[Key words] Diabetes; Hyperglycemia; Cellular immunity

糖尿病是以持续性血糖升高为主要特征的慢性疾病。血糖控制不良的患者易并发各种感染,可能与机体免疫功能降低有关。然而高血糖状态不同的持续时间对机体免疫功能的影响却鲜有报道。本研究通过测定高血糖持续时间不同的糖尿病大鼠外周T淋巴细胞亚群($CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、 $CD4^+CD25^+/CD4^+$ T 细胞比率),探讨高血糖持续时间对机体细胞免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年雄性SD大鼠25只,重量180~220 g,由中山医科大学实验动物中心提供(动物许可证号SCXK(粤)2004-0011,粤监证号2008A010),常规饲养观察1周后使用。

1.2 主要试剂和仪器 链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, Sigma公司,美国)。淋巴细胞分离液(达科为公司), Mouse Anti Rat CD4-FITC/CD25-PE, Mouse Anti RatCD8 ALPHACHAIN-FITC均购自AbD Serotec公司。鱼精蛋白锌胰岛素(江苏万邦)。BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 方法

1.3.1 糖尿病大鼠制备 20只成年雄性SD大鼠,随机抽取编号,按编号分配在代谢笼中常规饲养,每笼1~2只。大鼠禁食12 h后,予腹腔内注射1% STZ,注射剂量按照体重35 mg/kg,连续5 d。STZ溶液用0.1 M的柠檬酸缓冲液(pH=4.2)新鲜配制,用前涡旋混匀器充分混匀。现配现用,注射时冰上放置,在5~8 min内使用完。注射STZ后48 h取尾静脉血以微量血糖仪检测大鼠血糖水平,监测随机血糖2次,血糖>16.7 mmol/L者认为造模成功。造模成功后随机分为四组,每组5只。另选5只正常大鼠为正常对照组。

1.3.2 糖尿病大鼠血糖控制 在糖尿病大鼠成模后,按照实验设计要求分别予A组(4 d后)、B组(8 d后)、C组(2周后)胰岛素皮下注射普通胰岛素2~8 U/d,分2~3次注射。注射后每天取鼠尾静脉血检测血糖,控制血糖8~12 mmol/L。D组一直未注射胰岛素。

1.3.3 大鼠外周血 $CD4^+CD8^+CD25^+$ 染色 分别取外周血100 μ l,调整细胞数至 1×10^6 /ml,加入Mouse Anti RatCD8 ALPHACHAIN-FITC、Mouse Anti Rat CD4-FITC/CD25-PE,避光室温孵育20 min,外周血加入红细胞裂解液(BD公司),流式细胞仪检测。

1.4 统计学方法 每管样品经BD FACSCalibur流式细胞仪检测10 000个细胞,获得的数据用CELLQuest软件进行分析。应用SPSS16.0软件进行数据处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用两因素多水平重复数据方差分析,组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组别大鼠血糖变化情况 在糖尿病大鼠成模后各组大鼠胰岛素治疗前血糖无明显差别;A、B、C三组大鼠使用胰岛素治疗后血糖较治疗前明显下降。见表1。

表1 不同组别大鼠血糖变化情况[($\bar{x} \pm s$), mmol/L]

组别	例数	4 d	8 d	15 d	4周
A组	5	18.2 $\pm$ 2.2*	9.3 $\pm$ 1.9	10.4 $\pm$ 1.4	9.1 $\pm$ 1.6
B组	5	19.4 $\pm$ 2.6*	17.4 $\pm$ 2.1*	9.4 $\pm$ 1.1	10.2 $\pm$ 2.0
C组	5	17.8 $\pm$ 1.9*	20.1 $\pm$ 1.8*	14.8 $\pm$ 1.9	10.1 $\pm$ 2.4
D组	5	19.1 $\pm$ 2.7*	17.9 $\pm$ 2.1*	19.8 $\pm$ 3.1*	18.4 $\pm$ 1.6*
正常对照组	5	4.5 $\pm$ 1.2	5.1 $\pm$ 1.7	5.6 $\pm$ 1.4	4.7 $\pm$ 1.3

注: $F_A=6.489$, $F_B=10.780$, $F_{AB}=1.535$, $P_A=0.039$, $P_B=0.002$, $P_{AB}=0.244$; *与注射后比较, $P < 0.05$

2.2 不同高血糖持续时间大鼠淋巴细胞亚群的变化情况 (1)第 4 天及第 8 天 A、B、C 及 D 组大鼠外周血 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值较正常对照组无明显变化。(2)第 15 天 C 与 D 组大鼠外周血 CD4⁺ T 细胞较正常对照组显著降低 ($P < 0.05$), CD8⁺ T 细胞与正常对照组相比明显增加 ($P < 0.05$), 两组 CD4⁺/CD8⁺ 比值较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$)。 (3)第 4 周 C 组 CD4⁺ T 细胞与治疗前相比仍比正常对照组明显偏低 ($P < 0.05$), 但与未使用降糖治疗的 D 组大鼠相比有明显上升 ($P < 0.05$); C 组 CD8⁺ T 细胞与治疗前相比未恢复, 仍明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 与未使用降糖治疗的 D 组大鼠相似。C 组 CD4⁺/CD8⁺ 比值较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$)。 (4)各组大鼠的 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 比值与正常对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2~4。

表 2 各组大鼠 CD4⁺ T 细胞变化情况[($\bar{x} \pm s$), %]

组别	例数	4 d	8 d	15 d	4 周
A 组	5	37.46 ± 3.21	36.25 ± 2.46	38.09 ± 1.06	36.02 ± 3.40
B 组	5	36.70 ± 3.01	36.47 ± 2.78	37.25 ± 3.14	38.25 ± 3.14
C 组	5	38.01 ± 2.79	38.25 ± 3.12	24.05 ± 2.04*	30.17 ± 4.41 [△]
D 组	5	36.12 ± 2.96	37.16 ± 2.87	23.14 ± 3.42*	22.46 ± 3.25*
正常对照组	5	37.78 ± 2.46	39.01 ± 3.01	38.58 ± 2.57	39.04 ± 2.98

注: $F_A = 8.789$, $F_B = 7.200$, $F_{AB} = 6.150$, $P_A = 0.001$, $P_B = 0.027$, $P_{AB} = 0.040$; * 与本组 4 d 相比, $P < 0.05$; [△] 与 D 组 4 周相比, $P < 0.05$

表 3 各组大鼠 CD8⁺ T 细胞变化情况[($\bar{x} \pm s$), %]

组别	例数	4 d	8 d	15 d	4 周
A 组	5	21.10 ± 2.87	20.25 ± 3.16	19.97 ± 2.01	22.02 ± 1.40
B 组	5	23.09 ± 2.26	22.47 ± 3.08	22.05 ± 1.42	23.27 ± 2.16
C 组	5	21.97 ± 2.53	20.47 ± 2.42	27.32 ± 3.05*	26.17 ± 3.14*
D 组	5	20.14 ± 3.06	20.56 ± 2.49	26.14 ± 2.78*	28.37 ± 2.42*
正常对照组	5	22.13 ± 2.41	20.03 ± 1.90	20.58 ± 2.37	20.04 ± 2.02

注: $F_A = 4.377$, $F_B = 3.901$, $F_{AB} = 3.988$, $P_A = 0.012$, $P_B = 0.051$, $P_{AB} = 0.016$; * 与本组 4 d 相比, $P < 0.05$

表 4 各组大鼠 CD4⁺/CD8⁺ 比值变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	4 d	8 d	15 d	4 周
A 组	5	1.78 ± 0.92	1.79 ± 0.74	1.90 ± 0.44	1.92 ± 0.66
B 组	5	1.59 ± 0.87	1.62 ± 0.90	1.68 ± 0.45	1.85 ± 0.71
C 组	5	1.61 ± 0.79	1.86 ± 0.78	1.28 ± 0.64*	1.17 ± 0.41*
D 组	5	1.79 ± 1.06	1.81 ± 0.87	1.34 ± 0.59*	1.06 ± 0.45*
正常对照组	5	1.66 ± 0.46	1.95 ± 3.01	1.88 ± 0.97	1.94 ± 0.98

注: $F_A = 6.015$, $F_B = 4.281$, $F_{AB} = 3.964$, $P_A = 0.006$, $P_B = 0.021$, $P_{AB} = 0.027$; * 与本组 4 d 相比, $P < 0.05$

3 讨论

3.1 T 淋巴细胞是机体最重要的免疫细胞群, 在正常机体内各 T 淋巴细胞亚群相互作用维持着机体的正常免疫功能。外周血成熟 T 淋巴细胞可分为 CD4 和 CD8 两大亚群, 其中 CD4⁺ T 淋巴细胞识别主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 递呈的抗原肽, 促进 B 细胞、T 细胞和其他免疫细胞的免疫分化与增殖, 协调细胞间的相互作用; CD8⁺ T 淋巴细胞则通过识别 MHC I 递呈的抗原肽, 发挥抑制各种免疫细胞的功能。在临床上, CD4⁺/CD8⁺ 比值常作为了解机体细胞免疫功能的敏感指标^[1]。

3.2 近年来的研究表明, 糖尿病与免疫反应密切相关, 免疫调节异常可能在糖尿病的发生发展中起核心作用^[2]。糖尿病患者因内分泌免疫网络调节失控而引起糖代谢紊乱, 大量代谢产物的累积可导致机体免疫功能异常, 而异常免疫应答又加重患者病情发展^[3]。在正常人体内发生免疫反应时, 胰岛素可以促进活化的 T 细胞内糖脂代谢及蛋白质的合成, 维持 T 淋巴细胞的激活状态, 增加其反应性, 支持或促进免疫派生的调节生长及分化因子的作用。但是, 当体内胰岛素缺乏时, 除了使机体血糖明显升高, 还出现不适当的免疫应答反应。国外研究证实, 在糖尿病患者中由于胰岛素水平下降, 可使淋巴细胞凋亡增加, C 反应蛋白、肿瘤坏死因子及白介素-6 等炎症细胞因子水平下降, 促进淋巴细胞凋亡, 使得血液中淋巴细胞减少, 导致免疫功能缺陷^[4]。国内杨巧云等^[5]在临床上的观察表明在应激性高血糖患者中存在有严重的细胞免疫功能下降, 并与血糖升高的程度密切相关。而慢性糖尿病患者及糖尿病鼠模型的感染发生率及感染相关的病死率均颇高, 提示高血糖状态下伴有免疫功能紊乱^[6]。以上研究均提示了糖尿病患者高血糖状态与机体细胞免疫功能密切相关。本研究使用胰岛功能完全损毁的糖尿病大鼠模型, 通过胰岛素降血糖治疗使大鼠高血糖状态维持不同的持续时间, 可直接反应出高血糖持续状态和细胞免疫功能变化之间的功能关系。观察结果表明在高血糖持续时间较短的大鼠中 T 淋巴细胞亚群比例无明显变化, 表现为高血糖持续时间 4 d 及 8 d 的大鼠中无 T 淋巴细胞亚群比例的变化。但在高血糖持续 2 周以后, 糖尿病大鼠细胞免疫功能明显紊乱, 检测提示高血糖持续 2 周及 4 周的大鼠 CT4⁺ 细胞百分率下降, CD8⁺ 细胞百分率升高, CD4⁺/CD8⁺ 比值降低。但在高血糖持续 2 周使

用胰岛素控制血糖后,该组大鼠 $CT4^+$ 细胞百分率有所回升,说明控制血糖可以一定程度改善机体的细胞免疫功能。出现上述情况的原因是长期高血糖状态可能使粒细胞功能受损,其趋化性、吞噬杀菌功能降低,T 淋巴细胞对有丝分裂原反应减低。当长期血糖控制不理想时,高血糖状态可加重细胞免疫功能紊乱,抑制 T 淋巴细胞分化与增殖,导致 CD3 水平下降,从而使 CD4 细胞活化受抑制而表达下降,产生细胞因子减少,协助 B 细胞产生抗体和辅助其他淋巴细胞功能减弱,进而使 CD8 细胞活化增强,释放可溶性白细胞介素 2 受体,又进一步降低 CD3 和 CD4 水平,导致 $CD4^+/CD8^+$ 比值下降。由此可见,良好的血糖控制有助于提高机体的免疫功能。

3.3 此外我们还检测了糖尿病大鼠外周血 $CD4^+CD25^+/CD4^+$ 比率的变化。 $CD4^+CD25^+$ T 细胞是一群增殖能力低、具有免疫抑制功能的细胞^[7],通过所分泌的抑制性细胞因子或细胞接触抑制自身反应性 T 细胞,具有免疫无能及免疫抑制两大功能。既往对该类 T 细胞的研究在内分泌代谢领域主要集中在少数自身免疫性糖尿病,在常见糖尿病患者中研究较少。近年来大部分针对 2 型糖尿病患者 $CD4^+CD25^+$ T 细胞的研究提示,该类细胞在 2 型糖尿病患者体内数量正常^[8],仅有极少数研究提示少数 2 型糖尿病患者体内存在 $CD4^+CD25^+$ T 细胞异常^[9],为机体自身免疫损伤的表现之一。本研究也观察了持续高血糖不同时间的糖尿病大鼠体内 $CD4^+CD25^+/CD4^+$ 比值的变化,发现各组大鼠之间均无明显异常,表明使用化学药物造成胰岛功能损毁的糖尿病大鼠模型体内不存在自身免疫损害的相关变化。

总之,持续高血糖状态和免疫功能紊乱之间相

互促进、恶性循环,促使糖尿病患者出现血管损害、胰岛功能衰竭及感染几率增加,从而加重糖尿病患者病情。通过使用胰岛素尽快合理地控制血糖,必要时采取提高免疫功能的药物,对缓解病情、改善预后具有重要意义。

参考文献

- 1 周光炎,主编. 免疫学原理[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2000:31-32.
- 2 李 蓉,刘 青. 2 型糖尿病和细胞免疫[J]. 中国免疫学杂志,2010,5(26):475-477.
- 3 Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes[J]. Diabetes Care,2004,27(3):813-823.
- 4 Gupta D,Varma S,Khandelwal RL. Long-term effect of tumor necrosis factor-alpha treatment on insulin signaling pathway in HepG2 cells and HepG2 cells over-expressing constitutively active Ak/PKB[J]. J Cell Biochem,2007,100(3):593-607.
- 5 杨巧云,刘文明,俞建峰. 严重多发伤患者血糖和细胞免疫功能变化及与预后的关系[J]. 实用临床医药杂志,2011,15(5):115-116.
- 6 Stentz FB,Kitabchi AE. Activated T lymphocytes in Type 2 diabetes: implications from in vitro studies[J]. Curr Drug Targets,2003,4(6):493-503.
- 7 Sakaguchi S,Sakaguchi N,Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol,1995,155(3):1151-1164.
- 8 Yang Z,Zhou Z,Huang G, et al. The $CD4^+$ regulatory T-cells is decreased in adult with latent autoimmune diabetes[J]. Diabetes Res Clin Pract,2007,76(1):126-131.
- 9 徐 静,苏鸿莉,王俊宏,等. $CD4^+CD25^+$ Foxp3 调节性 T 细胞与 2 型糖尿病肾病的关系[J]. 南方医科大学学报,2009,29(1):137-139.

[收稿日期 2013-07-29][本文编辑 杨光和 韦所苏]

书写文稿摘要、关键词和作者简介的要求

根据国家新闻出版署发出的(1999)17号文件精神,入编正式期刊要执行《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》,为此,来稿中请书写摘要、关键词和作者简介。论著摘要采用结构式摘要,内容包括目的、方法、结果、结论,“四要素”连排,不分段。其它文体可采用报道指示性摘要。摘要均用第三人称写法。关键词尽可能选用《医学索引》(Index Medicus)的医学主题词表(MeSH)中的词语。重点文稿还须增加英文摘要及关键词。作者简介包括姓名、出生年、性别、学历、学位、职称、研究方向(任选)等。

· 本刊编辑部 ·