

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.24.022

不同葡萄糖培养浓度对健康成人外周血白细胞 G6PD 活性及呼吸爆发功能的影响

曾慧妍¹, 曹 瑛², 薛耀明^{2Δ}

(1. 广东省中医院内分泌科, 广州 510120; 2. 南方医科大学南方医院内分泌及代谢病科, 广州 510000)

摘要:目的 探讨健康成人离体外周血白细胞经葡萄糖不同浓度培养 8 h 后, 白细胞内葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)活性的改变, 及其对白细胞呼吸爆发功能的影响。方法 观察不同浓度葡萄糖培养环境下健康成人外周血白细胞 G6PD 活性变化, 并通过检测白细胞细胞内活性氧(ROS)产量观察其呼吸爆发功能, 研究葡萄糖培养浓度对白细胞呼吸爆发功能的影响。结果 与正常对照组比较, 15 mmol/L 组及 25 mmol/L 组的 G6PD 活性及 ROS 产量均出现下降($P < 0.01$)。而上述改变以 25 mmol/L 组更为显著, 与 15 mmol/L 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 随着培养基里葡萄糖浓度的升高, 白细胞 G6PD 活性明显降低。白细胞的呼吸爆发功能改变与葡萄糖培养浓度存在负相关关系。

关键词: 白细胞; 呼吸爆发; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

中图分类号: R587.2; R363.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)24-3182-02

Effects of glucose concentration on G6PD activity and respiratory burst of normal human's neutrophils in vitro

Zeng Huiyan¹, Cao Ying², Xue Yaoming^{2Δ}

(1. Department of Endocrinology, Guangdong Province Traditional Chinese Medical Hospital, Guangzhou, Guangdong, 510120, China; 2. Department of Endocrinology, Nanfang Hospital Affiliated to Nanfang Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510000, China)

Abstract: Objective To determine the effects of glucose concentration on G6PD activity and respiratory burst of normal human's neutrophils in vitro. Methods Normal human's neutrophils were cultured in different glucose concentration for 8 hours, assayed G6PD activity by spectrophotometric method and determining ROS content by fluorescent probe DCFH-DA. Results G6PD activity and ROS of 15 mmol/L group and 25 mmol/L group were significant lower than before, when the 5 mmol/L group and L-GLU group didn't have significant change with time goes by. And G6PD activity and ROS of 25 mmol/L group were the lowest in all groups ($P < 0.01$). Conclusion High glucose may induce G6PD activity decreased and cause respiratory burst dysfunction as a stimulating factor. The stimulation intensity was increased with the increase of glucose concentration. It's the probable mechanism on susceptibility to infections in patients with diabetes mediated by dysfunction of respiratory burst in leucocyte.

Key words: neutrophils; respiratory burst; G6PD

糖尿病患者存在易感染的特点, 既往研究显示这与白细胞功能受损密不可分^[1-2]。外周血白细胞是固有免疫系统的重要组成部分, 其杀菌能力在抵御外界微生物侵袭方面发挥着至关重要的作用。白细胞杀灭细菌的主要手段为呼吸爆发。因此, 呼吸爆发功能正常与否决定了白细胞是否能有效实现机体免疫, 减少感染发生。同时, 呼吸爆发功能与糖代谢存在密切联系。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)作为戊糖磷酸途径的关键酶, 为呼吸爆发提供必需物质——还原型辅酶 II (NADPH)。因此, G6PD 活性直接关系到呼吸爆发功能的正常发挥。作者的前期研究已发现, 与健康成人相比, 2 型糖尿病患者外周血白细胞 G6PD 活性及细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平均明显降低, 存在明显的白细胞呼吸爆发功能障碍^[3]。那么, 正常人外周血白细胞在高浓度葡萄糖培养环境下是否也会和糖尿病患者一样出现白细胞呼吸爆发功能障碍呢? 白细胞呼吸爆发改变是否与葡萄糖培养浓度有关? 本实验拟以健康成人外周血离体白细胞为研究对象, 探讨高糖环境培养浓度与健康成人白细胞 G6PD 活性及呼吸爆发功能之间的关系, 为进一步研究糖尿病患者易感染的发病机制提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集健康成人外周血标本 24 例, 其中, 男 14

例, 女 10 例, 平均年龄(25.0±1.3)岁, 为南方医院和广东省中医院健康体检者。无糖尿病家族史、无 G6PD 缺乏症家族史。无冠心病、肝肾功能不全等慢性病史。无恶性肿瘤、结缔组织病、器官移植术后、白血病等需使用细胞毒制剂和非选择性免疫抑制剂的病史。近期无服药史。白细胞计数在正常范围(4~10)×10⁹/L; RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone 公司; G6PD 活性检测试剂盒购自中山生物工程有限公司; ROS 检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 收集健康成人外周血标本(EDTA 抗凝)后, 使用红细胞裂解液进行外周血白细胞的分离, 离心后取管底白色沉淀, 加入含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液, 轻轻吹打使其彻底混匀, 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养, 培养液中加青霉素、链霉素为 1×10⁵ U/L。

1.2.2 实验分组 根据实验需要随机分为 4 组: 5 mmol/L 组(5 mmol/L D-葡萄糖培养)、15 mmol/L 组(15 mmol/L D-葡萄糖培养)、25 mmol/L 组(25 mmol/L D-葡萄糖培养)、高渗对照组(L-GLU 组, 20 mmol/L L-葡萄糖+5 mmol/L D-葡萄糖培养)。培养 8 h 后, 每组分别取样本检测 G6PD 活性及 ROS 产量。

1.3 检测指标 四氮唑蓝定量测定法检测 G6PD 活性、荧光探针法检测细胞内 ROS 产量,操作均按照相关试剂盒说明书进行。各组细胞装载 DCFH-DA 荧光探针后,用激光共聚焦显微镜观察。每例样本随机抽取 30 个细胞,用 Leica 专用图像分析处理软件,对细胞内荧光密度进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组 G6PD 活性及 ROS 产量的比较 5 mmol/L 组与 L-GLU 组的 G6PD 活性及 ROS 产量均无明显差异(均 $P > 0.05$)。与 5 mmol/L 组相比,15 mmol/L 组及 25 mmol/L 组均出现不同程度的 G6PD 活性降低及 ROS 产量减少,且 25 mmol/L 组 G6PD 活性及 ROS 产量均显著低于 15 mmol/L 组($F = 9.095, P < 0.001$),见表 1。

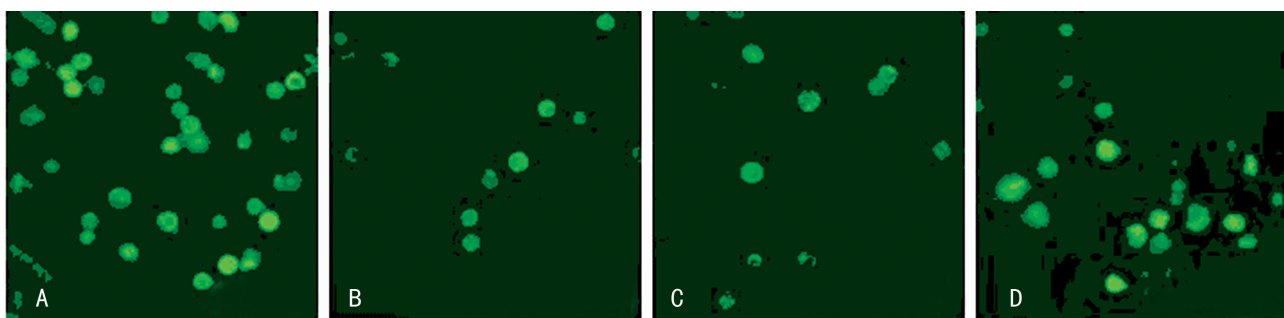
2.2 4 组 G6PD 活性及 ROS 产量变化 4 组 ROS 荧光激光

共聚焦显微镜下观察培养 8 h 后,5 mmol/L 组及 L-GLU 组细胞内荧光无明显改变,保持中等强度荧光,多数细胞可见细胞核,部分细胞可见高强度荧光。15 mmol/L 组及 25 mmol/L 组细胞内均出现荧光分布不均,荧光强度弱,个别细胞肉眼难以辨认细胞外形(图 1)。

表 1 4 组 G6PD 活性及 ROS 产量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	G6PD 活性	ROS 产量
5 mmol/L 组	1.37 ± 0.14	196.73 ± 19.79
15 mmol/L 组	0.98 ± 0.13*	130.30 ± 17.59*
25 mmol/L 组	0.73 ± 0.09*#	106.48 ± 18.09*#
L-GLU 组	1.32 ± 0.11	197.68 ± 19.34
F	53.601	1 111.634
P	0.000	0.000

*: $P < 0.01$,与 5 mmol/L 组比较;#: $P < 0.01$,与 15 mmol/L 组比较。



A: 5 mmol/L 组; B: 15 mmol/L 组; C: 25 mmol/L 组; D: L-GLU 组。

图 1 各组 ROS 荧光变化

2.3 4 组 G6PD 活性及 ROS 产量与葡萄糖培养浓度的相关性分析 培养 8 h 后,5 mmol/L 组、15 mmol/L 组及 25 mmol/L 组 G6PD 活性逐渐降低,ROS 产量亦随之减少,G6PD 活性、ROS 产量分别与葡萄糖培养浓度呈负相关($r = -0.916, P < 0.001; r = -0.951, P < 0.001$)。而 L-GLU 组 ROS 产量及 G6PD 活性与葡萄糖浓度之间无相关性。

3 讨论

糖尿病患者易感染部分归咎于白细胞的吞噬杀菌作用降低。吞噬细胞的吞噬杀菌作用降低是糖尿病患者免疫功能紊乱的主要表现之一,这为细菌的侵入及繁殖创造了有利条件。大量研究发现,糖尿病患者血中的中性粒细胞的黏附、趋化、吞噬和杀菌能力均显著低于正常对照组,提示其易感染性与白细胞功能有一定的关系^[4-5]。有学者将糖尿病患者外周血白细胞与葡萄糖和胰岛素一起培养可恢复其趋化性,提示其功能与糖代谢有关。血糖控制不良的糖尿病患者,其白细胞杀菌能力明显低于血糖控制良好者,提示白细胞内的杀菌能力与血糖控制程度有关。但高血糖改变白细胞功能的具体机制尚未有明确答案,目前关于该方面的国内外研究甚少。既往有学者研究发现,与健康成人相比,糖尿病患者中性粒细胞的吞噬能力明显下降且与血糖呈负相关关系,高糖环境是导致白细胞吞噬功能降低的重要因素^[6]。

呼吸爆发是白细胞激活后行使杀菌功能的主要途径。当白细胞被激活后,能产生大量的 ROS,并通过 ROS 杀死入侵的微生物和病原体。由于在这个过程中,白细胞的耗氧量急剧上升,甚至可达正常量的 2~20 倍,葡萄糖的代谢活动也明显增加,故将该现象称为“呼吸爆发”。NADPH 作为呼吸爆发反应的惟一供氢体,是呼吸爆发的必需物质,其产量直接影响

ROS 的产生。而 NADPH 的生成仅仅来源于细胞内磷酸戊糖途径。因此,G6PD 作为磷酸戊糖途径的限速酶,其活性对于呼吸爆发的正常发挥就显得尤为重要。前期研究发现,与健康成人比较,2 型糖尿病患者存在明显的白细胞功能障碍,该结果与既往研究结果相符^[4]。在本研究中,通过离体外周血白细胞培养再次验证了高糖培养环境对白细胞呼吸爆发功能的影响。本研究结果发现,在培养 8 h 后,15 mmol/L 组和 25 mmol/L 组均出现 G6PD 活性及 ROS 产量显著下降,而 5 mmol/L 组无明显改变,L-GLU 组用 20 mmol/L 的 L-葡萄糖 + 5 mmol/L 的 D-葡萄糖联合培养细胞作为高渗对照则排除了渗透压引起各指标的改变。该结果进一步证实了上述葡萄糖浓度增高可导致白细胞呼吸爆发功能降低的观点。本研究还发现,随着培养基葡萄糖浓度的升高,健康成人白细胞的 G6PD 活性减弱,ROS 释放量也随之下降低且 G6PD 活性、ROS 产量分别与培养基葡萄糖浓度呈负相关,提示细胞吞噬杀菌功能与其所处环境有关,高糖环境对离体培养的白细胞是一个刺激因素,糖浓度越高刺激强度越大。因此,推测高糖环境中 G6PD 活性降低导致细胞吞噬杀菌功能低下可能是糖尿病患者易于感染的主要原因之一。目前对两者关系的研究较少,国外仅 Alba-Loureiro 等^[7]对此进行了研究,发现糖尿病可导致小鼠白细胞代谢与功能的明显改变,与正常小鼠相比,糖尿病小鼠的中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞 G6PD 活性均明显降低,提出白细胞 G6PD 缺乏可导致吞噬功能障碍、杀菌能力下降及过氧化物生成减少的观点,这与 Moutschen^[8]的观点一致。国内暂未发现类似的研究报道。本研究通过人离体细胞培养,对葡萄糖培养浓度、白细胞 G6PD 活性及呼吸爆发功能三者的内在联系进行了探讨,其结果与上述(下转第 3186 页)

2.3 药动学参数 每例受试犬血药浓度-时间数据采用计算机 3p97 程序自动拟合,结果表明空腹和进食脂质状态下 Lfox 的药-时数据均符合二室药动学模型。求得有关药动学参数见表 3。由图 1、表 2 可见, t_{max} 加快,但对 $t_{1/2\beta}$ 、 C_{max} 和 $AUC_{0\rightarrow t}$ 均无影响。

3 讨论

国内外早期对 Lfox 血药浓度测定采用微生物法,由于专属性不强,误差大。采用 L/MS/MS 价高,一般医院难于承受;采用 HPLC 测定较为准确,但 HPLC 法在配制流动相中,配方各有不同。本文参考文献[14],采用甲醇、磷酸盐缓冲液和离子极化剂四丁基溴化铵,其比例为 25:75:4,结果 Lfox 和 CF 分离良好,准确性高,其检测范围为 9.760 0~0.097 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$,结果较为满意,符合实验要求。

文献报道,空腹或进食对口服 Lfox 药动学无影响^[11]。而本研究结果显示,进食脂质较空腹 K_a 、 $t_{1/2K_a}$ 、 t_{max} 、 $t_{1/2\beta}$ 和 Cl/F (s) 明显改变,且 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。脂质使药物吸收速度加快,达峰时间提前,消除延长,其原因可能是药物在脂质的作用下,吸收迅速,达峰时间加快,更易达到组织,使药物更快地到达血和周围组织,如文献报道^[15-16]。Lfox 相对分子质量相对较小,脂溶性高,血浆蛋白结合率低,在结构上具有促进水溶性的恶嗪环与具有适度脂溶性的 N-甲基哌嗪,使其穿透性增高,吸收不易受到食物的干扰,脂质反而促进了 Lfox 的吸收。就其 $t_{1/2\beta}$ 参数而言,与空腹组间虽无显著差异,但明显延长,也符合 Lfox 广泛分布于组织中,被动转移消除延缓。

总之,脂质饮食同 Lfox 同时服用,可加快 Lfox 的吸收,而消除减慢。提示脂质饮食对 Lfox 的吸收和消除有一定的帮助,有益于 Lfox 在体内的储留,与文献[11]有不同的见解。

参考文献:

- [1] 邵蔚,张芳玲.左氧氟沙星滴眼液治疗儿童急性结膜炎 172 例疗效观察[J].内蒙古中医药,2013,32(5):87-88.
- [2] 曹小川.左氧氟沙星滴眼液治疗细菌性角膜炎的临床观察[J].中国医学创新,2013,10(24):111-112.
- [3] 周春霞.盐酸左氧氟沙星治疗盆腔炎的临床效果及其安

全性分析[J].海峡医学,2013,25(8):131-133.

- [4] 肖玉凤,李雪鹏,孙宝华,等.左氧氟沙星联合甲硝唑辅助妇科治疗仪治疗慢性盆腔炎 71 例[J].中国药业,2013,22(19):106-107.
- [5] 范金花,王义国,刘长虹,等.左氧氟沙星三联疗法治疗幽门螺杆菌感染的临床研究[J].中华消化病与影像杂志:电子版,2013,3(3):26-29.
- [6] 肖清平,黄丽芳,刘辉英,等.左氧氟沙星治疗幽门螺杆菌感染的应用研究[J].临床探讨,2013,51(31):157-158.
- [7] 梁一娟.加替沙星和左氧氟沙星治疗下呼吸道感染疗效分析[J].中国药物与临床,2013,13(7):915-916.
- [8] 杨国华.左氧氟沙星治疗下呼吸道感染 86 例疗效观察[J].中国现代药物应用,2013,7(16):109-110.
- [9] 陈力,唐玲,沈正泽,等.脂质饮食对犬体内莫西沙星药代动力学的影响[J].中国药房,2010,21(41):3875-3876.
- [10] 岳建农,李飞,罗斌,等.高蛋白饮食对犬体内左氧氟沙星药动学的影响研究[J].中国药房,2013,24(5):410-412.
- [11] 赵秀丽,王淑民,李嘉静,等.进食对口服甲磺酸左氧氟沙星片药动学的影响[J].中国药房,2006,17(2):119-121.
- [12] 徐叔云,卞如廉,陈修,等.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1982:404.
- [13] 曾洋,肖明朝,周远大,等.特拉唑嗪对左氧氟沙星治疗前列腺炎药动学的影响[J].中国抗生素杂志,2010,35(12):941-944.
- [14] 孔令希,李秀英,杨辉,等.氨溴索对左氧氟沙星在大鼠血浆、肺组织、支气管液中分布的影响[J].中国新药与临床杂志,2013,32(10):789-793.
- [15] 唐建国.氟喹诺酮药物左氧氟沙星[J].国外医药:抗生素分册,1996,17(5):380-387.
- [16] Wimer SM, Schoonover L, Garrison MW. Levofloxacin: a therapeutic review [J]. Clin Ther, 1998, 20(6): 1049-1070.

(收稿日期:2014-02-05 修回日期:2014-04-02)

(上接第 3183 页)

国外的研究结果相符^[7-8]。

结合作者的前期研究,本研究从人离体细胞培养和临床研究两个层面对糖尿病血糖控制水平、白细胞 G6PD 活性及呼吸爆发功能三者的内在联系进行了初步探讨。然而,高糖是否单纯通过抑制 G6PD 活性来抑制白细胞呼吸爆发功能?是否还通过其他机制来抑制白细胞呼吸爆发呢?高糖导致 G6PD 活性降低的机制是什么?有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Fedosova NF, Alisievich SV, Lyadov KV, et al. Mechanisms underlying diquertin-mediated regulation of neutrophil function in patients with non-insulin-diabetes mellitus[J]. Bull Exp Biol Med, 2004, 137(2): 143-146.
- [2] McManus LM, Bloodworth RC, Prihoda TJ, et al. Agonist-dependent failure of neutrophil function in diabetes correlates with extent of hyperglycemia[J]. J Leukoc Biol, 2001, 70(3): 395-404.
- [3] 曾慧妍,曹瑛,薛耀明,等.糖尿病患者外周血白细胞 PPP

途径代谢与呼吸爆发关系的初步研究[J].广东医学,2012,33(8):1136-1138.

- [4] Cheadle WG. Risk factors for surgical site infection[J]. Surg Infect(Larchmt), 2006, 7(Suppl 1): S7-11.
- [5] Metha R, Petrova A. Neutrophil function in neonates born to gestational diabetic mothers [J]. J Perinatol, 2005, 25(3): 178-181.
- [6] Peleg AY, Weerarathna T, McCarthy JS, et al. Common infections in diabetes; pathogenesis, management and relationship to glycaemic control [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2007, 23(1): 3-13.
- [7] Alba-Loureiro TC, Hirabara SM, Mendonca JR, et al. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils [J]. J Endocrinol, 2006, 188: 295-303.
- [8] Moutschen M. Alterations in natural immunity and risk of infection in patients with diabetes mellitus [J]. Rev Med Liege, 2005, 60(5-6): 541-544.

(收稿日期:2014-01-08 修回日期:2014-03-22)