维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)02-0133-03

2型糖尿病患者细胞内钙离子浓度变化的研究

唐晓琼，邓华聪，万 青，邱鸿鑫
（重庆医科大学临床学院血液内科 重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨2型糖尿病患者血中单个核细胞内Ca^{2+}浓度变化及其与胰岛素受体TPK活性变化的关系。方法：荧光分光分析法测定40例2型糖尿病及20例正常对照单个核细胞内Ca^{2+}浓度，并用酶联免疫法测定单个核细胞胰岛素受体酪氨酸激酶（TPK）活性。结果：2型糖尿病患者单个核细胞内Ca^{2+}浓度显著高于正常对照组，胰岛素受体TPK活性显著低于正常对照组。相关分析显示2型糖尿病患者单个核细胞内Ca^{2+}浓度与FBG、FINS显著正相关，与受体TPK活性显著负相关。结论：细胞内Ca^{2+}浓度升高可能通过影响胰岛素受体TPK活性参与胰岛素抵抗的发生。

【关键词】细胞内钙离子浓度；2型糖尿病；胰岛素抵抗
【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-06-18

Study on the changes of cytosolic free calcium concentration in type 2 diabetes mellitus patients

TANG Xiaoqiong, et al
(Department of Hematology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*:To investigate the change of $[Ca^{2+}]i$ in type 2 diabetes mellites patients and its relationship with insulin receptor tyrosine kinase activity. *Methods*: The $[Ca^{2+}]i$ was assayed with fluorescence spectroscopic analysis and the insulin receptor tyrosine kinase activity was assayed with enzyme-linked immunosorbent assay method in circulating mononuclear cells in 40 type 2 diabetes mellites patients and 20 normal subjects. *Results*:The $[Ca^{2+}]i$ of circulating mononuclear cells in type 2 diabetes mellites patients was significantly higher than that in normal controls. The insulin receptor tyrosine kinase activity was significantly decreased in patients. The $[Ca^{2+}]i$ of circulating mononuclear cells in type 2 diabetes mellites patients was positively correlated with FBG, FINS, and negatively with the insulin receptor tyrosine kinase activity. *Conclusion*: The results suggest that elevation of $[Ca^{2+}]i$ may affect the insulin receptor tyrosine kinase activity and thus contributes to the insulin resistance.

【Key words】Cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]i$); Type 2 diabetes mellitus; Insulin resistance

Ca^{2+}是一种重要的细胞内第二信使，它可作为许多酶类的调节因子和激素、细胞因子的效应因子，广泛参与细胞的生理活动。已公认Ca^{2+}在胰岛素信号传导途径中发挥一定作用，适宜的细胞内钙离子浓度是胰岛素正常发挥的一个重要环节。近年国外的一些研究表明胰岛素信号传导及生物学效应的发挥均依赖受体TPK活性，受体TPK活性的变化参与胰岛素抵抗的发生。作为TPK的调节因子——Ca^{2+}在胰岛素抵抗的发生中与TPK活性的变化关系尚不清楚。本研究通过同时测定单个细胞核内$[Ca^{2+}]i$及胰岛素受体TPK活性，探讨二者之间的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

正常对照组：健康志愿者20例FBG、HbA1C和血脂正常，并测定口服葡萄糖耐量试验排除糖尿病及糖耐量异常，无心、肺、肝、肾、高血压、感染及肿瘤病史。其中男性11名，女性9名，年龄49.95±9.82岁（36～69岁），BMI23.91±3.80kg/m^2（17.36～29.39kg/m^2）。

糖尿病组：按1985年世界卫生组织(WHO)糖尿病诊断标准确诊为2型糖尿病的重庆医科大学附属第一院门诊及住院患者40例，无心、肺、肝、感染、肿瘤病史，其中男性16名，女性24名，年龄56.08±12.54岁(31～84岁)，病程0.5～18年(中位数3.1年)，BMI23.91±2.83kg/m^2(19.15～30.10kg/m^2)。所有患者行饮食治疗和口服降血糖药物（美吡哒、达美康、优降糖、二甲双胍等）治疗，并且近期未服用影响跨膜离子转运的药物。

正常对照组与糖尿病组的性别构成、年龄、BMI等均具

作者介绍：唐晓琼（1972- ），女，助教，硕士。
主要研究方向：糖尿病胰岛素抵抗的发生机制。

维普资讯 http://www.cqvip.com

有可比性($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 所有受试者空腹安静状态下抽取静脉血一部分用作空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素（FINS）、HbA1C、血脂等的测定，另一部分用作单个核细胞的提取。FBG、FINS、HbA1C、血脂测定用常规实验法。

1.2.2 采用fura-2作为荧光标记物，荧光分光光度计分别测定单个核细胞的基础荧光强度F0、最大荧光强度Fmax、最小荧光强度Fmin，根据公式计算：$[Ca^{2+}]i = k_d \times \frac{F_0 - F_{min}}{F_{max} - F_0}$（Kd为fura-2与$Ca^{2+}$反应的解离常数，在37℃时为224nmol/L）。

1.2.3 提取所得单个核细胞的膜蛋白中加入抗胰岛素受体（α亚基）单克隆抗体可分离含有TPK的胰岛素受体，以此催化ATP与生物素标记的Tyr-寡肽底物的磷酸化反应。根据ELISA法测定原理将含有生物素标记的磷酸酪氨酸反应产物结合到用链霉素包被的酶标板上，再用抗P-Tyr-POD单克隆抗体与反应生成的磷酸酪氨酸特异结合，加入POD底物液显色，410nm波长下测定光密度A值。绘制剂量反应曲线，通过检测产物量多少来反映酶活性高低。

1.3 统计处理

数据均用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，并经正态检验及方差齐性检验，两组间比较用t检验。各指标间关系直线相关分析。

2 结 果

2.1 糖尿病组与正常对照组$[Ca^{2+}]i$、TPK、FBG、FINS等指标的比较

见表1。

表1 糖尿病组与正常对照组$[Ca^{2+}]i$、TPK、FBG、FINS等指标的比较

	正常对照组	糖尿病组
例数	20	40
$[Ca^{2+}]i$(nm)	193.2 ± 9.28	269.2 ± 32.58**
TPK(uU)	21.4 ± 9.20	9.95 ± 4.40**
FBG(mmol/L)	5.24 ± 0.65	10.05 ± 3.93**
HbA_1C(%)	6.16 ± 1.26	8.81 ± 2.63**
FINS(Uu/ml)	9.84 ± 3.73	17.59 ± 8.37**
ISI	3.04 ± 0.37	1.90 ± 0.65**
TG (mmol/L)	1.40 ± 0.60	1.85 ± 1.02**
HDL(mmol/L)	4.71 ± 1.09	5.34 ± 1.42
HDL(mmol/L)	1.41 ± 0.34	1.32 ± 0.38
HDL_2(mmol/L)	0.60 ± 0.24	0.60 ± 0.36
HDL_3(mmol/L)	0.84 ± 0.22	0.72 ± 0.25

注：**与正常对照组比较$P<0.01$

2.2 糖尿病患者$[Ca^{2+}]i$与TPK、FBG、FINS等行单因素相关分析

结果见表2。由表2可见，$[Ca^{2+}]i$与FBG、FINS显著正相关，与TPK、ISI显著负相关。

表2 糖尿病患者$[Ca^{2+}]i$与TPK、FBG、FINS等行单因素相关分析结果

相关因数	相关系数
性别	0.067
年龄	0.242
病程	-0.400*
TPK	-0.756*
BMI	0.154
FBG	-0.311*
FINS	-0.294*
HbA_1C	0.260*
ISI	0.387*
TG	0.072
TC	-0.133
HDL	-0.164
HDL_2	-0.101
HDL_3	-0.039

注：**与正常对照组比较$P<0.05$

3 讨 论

大量的动物实验和临床实验发现糖尿病的各种组织细胞都存在胞内$[Ca^{2+}]i$的变化，包括红细胞、血小板、心肌、脂肪细胞[1]等，这表明胞内$[Ca^{2+}]i$的变化可能是糖尿病的一个基本病变。Draznin B等[2]发现作为胰岛素的效应细胞其胞内$[Ca^{2+}]i$应在140～370nm范围内，低于或高于这个范围、胰岛素刺激的葡萄糖转运及摄取能力明显降低，从而胰岛素不能有效的发挥其生理功能。Draznin B等[3]也发现糖尿病小鼠脂肪细胞$[Ca^{2+}]i$较正常对照组明显升高（$P<0.05$），虽仍在140～370nm范围内，但胰岛素刺激的葡萄糖摄取能力也降低。本研究也得到同样的结果。糖尿病患者细胞内$[Ca^{2+}]i$升高的机制尚不清楚，可能与糖尿病组织细胞膜上的Na^+-K^+-ATPase和Ca^{2+}-ATPase活性降低、细胞内贮存钙释放增加、膜通透性升高胞外Ca^{2+}内流增加等有关。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验研究40例2型糖尿病患者发现其单个核细胞膜上胰岛素受体TPK活性显著低于正常对照组（$P<0.01$）、下降约53%。同其他学者对不同组织细胞的研究结果一致。目前，糖尿病患者胰岛素受体TPK活性降低的原因尚未完全明确。可能与不具有TPK活性的胰岛素受体增加[4]、受体结构的改变[5]、胰岛素受体的磷酸化状态的改变[6]等有关。

胰岛素抵抗（IR）是2型糖尿病的重要特征。本研究发现糖尿病组FBG、FINS均显著高于正常对照组($P<0.01$)，ISI显著低于正常对照组($P<0.01$)，说明本文所选病人高血糖和高胰岛素血症并存，胰岛素敏感性下降，即存在IR。同时直线相关分析发现$[Ca^{2+}]i$与FBG、FINS显著正相关（$r=0.378$，$r=0.361$、P均<0.05），与ISI显著负相关($r=-0.482$，$P<0.05$)。这就提示$[Ca^{2+}]i$的升高与胰岛素抵抗有关。Draznin B等也得出相同结论。胰岛素生理作用的发挥是通过与效应细胞膜上的胰岛素受体结合后发生的，$[Ca^{2-}]i$升高使胰岛素的生物学效应不能正常发挥，可能发生在胰岛素与受体结合水平和/或受体后水平（包括受体自身磷酸化、受体TPK活性激活、各种蛋白底物磷酸化或去磷酸化的级联反应）。曾有学者研究发现胞内$[Ca^{2+}]i$升高对受体结合无影响，表明胞内$[Ca^{2+}]i$升高使效应细胞对胰岛素敏感性下降可能发生在受体后水平。国外大量实验表明胰岛素受体TPK活性降低、引起受体跨膜信号障碍是2型糖尿病发生IR的直接原因。本实验也发现胰岛素受体TPK活性与FBG、FINS显著负相关（$r=-0.311$、$r=-0.294$、P均<0.05），与ISI显著正相关($r=0.387$、$P<0.05$)。提示糖尿病患者胰岛素受体TPK活性降低可影响受体跨膜信号传递、导致胰岛素的生物学效应减弱、发生胰岛素抵抗。本研究还发现，胞内$[Ca^{2+}]i$与受体TPK活性显著负相关（$r=-0.756$，$P<0.05$）。表明胞内Ca^{2+}作为胰岛素受体TPK的调节因子影响受体TPK活性而减弱胰岛素功能发挥，参与胰岛素抵抗的发生。近来、人们发现高血糖时激活细胞蛋白激酶C（PKC）[7]，而PKC的激活改变了胰岛素受体的磷酸化状态，增加胰岛素受体β亚基上的某些Ser/Thr残基的磷酸化。胞内$[Ca^{2+}]i$升高进一步加强PKC的激活。已有实验表明Ser/Thr磷酸化可引起INSR的自身磷酸化减弱和受体TPK活性下降[6]。

综上所述，胞内$[Ca^{2+}]i$的变化在受体TPK介导的胰岛素信号传递中有一定的作用，可能通过影响受体TPK活性而减弱胰岛素功能发挥，参与胰岛素抵抗的发生。

参 考 文 献

[1] Missianen L, Robbrecht W, Vanden Bosch L, et al. Abnormal intracellular (Ca^{2+}) homeostasis and disease[J]. Cell Calcium, 2000;28(1):1-21.

[2] Draznin B, Sussman K E, Eckel R H, et al. Possible role of cytosolic free calcium concentrations in mediating insulin resistance of obesity and byperinsulinemia[J]. J Clin Invest, 1988;28:1848-1852.

[3] Draznin B, Lewis D, Hoalder N, et al. Mechanism of insulin resistance induced by sustained levels of cytosolic free calcium in rat adipocytes[J]. Endocrinology, 1989;125:23541-23549.

[4] Brillon D J, Freidenberg G R, Henry R R, et al. Mechanism of defective insulin receptor kinase activity in NIDDM[J]. Diabetes, 1989;38:397-443.

[5] Mosthaf L, Grako K, Dull T J, et al. Functionally distinct insulin receptors generrated by Tissue-specific alternative splicing[J]. EMBO J, 1990;9:2409-2413.

[6] Shaol, Catalano PM, Yamashita H, et al. Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprdo-I overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus(GDM):evidence for increased serine/threonine phosphorylation in preynancy and GDM[J]. Diabetes, 2000;49(4):603-610.

[7] King G L, Banskota N K. Mechanism of diabetic vascular complications[J]. Diabetes, 1995;46:184-189.

（上接第132页）

[10] 罗治彬，徐采朴. 幽门螺杆菌工程免疫苗研究进展[J]. 世界华人消化杂志，2000;8(4):449-451.

[11]Alm RA, Bina J, Andrews BM, et al. Comparative genomic of Helicobacter pylori: analysis of the outer membrane protein families[J]. Infect Immun, 2000;68(7):4155-4167.

[12] Raymond J, Sauvestre C, Kalach N, et al. Immunoblotting and serology for diagnosis of Helicobacter pylori infection in children[J]. Pediatr Infect Dis J, 2000; 19(2):118-121.

[13] Shiesh SJ, Sheu BY, Yang SB, et al. Serologic response to lower-molecular-weight proteins of Helicobacter pylori is related clinical outcome of Helicobacter pylori infection in Taiwmn[J]. Dig Dis Sci, 2000,45(4):781-788.

[14] 钟 平，吴昆祥，徐帆洪，等. 中国幽门螺杆菌cagA克隆和基因序列分析[J]. 世界华人消化杂志，1999;7(8):669-672.