维普资讯 http://www.cqvip.com

链脲霉素糖尿病小鼠外周血T淋巴细胞数量和腹腔巨噬细胞吞噬功能研究

第一医院内科内分泌 *李启富 舒昌达 何 军

提 要 采用链脲霉素诱导C_{57}小鼠发生糖尿病并研究在糖尿病状态下，外周血T淋巴细胞数量和腹腔巨噬细胞吞噬功能。结果显示糖尿病小鼠外周血淋巴细胞数量无明显改变，而T淋巴细胞百分比显著下降；腹腔巨噬细胞体外吞噬酵母菌的能力明显低于正常对照。T淋巴细胞数量减少和巨噬细胞吞噬功能减弱，提示链脲霉素糖尿病小鼠细胞免疫功能低下

关键词 糖尿病；T淋巴细胞；巨噬细胞；链脲霉素

糖尿病患者感染易患性增高，且感染重、不易控制，提示机体抗感染免疫功能受损。近年来，国内外学者进行了大量研究，发现胰岛素依赖型糖尿病患者存在着多种体液和细胞免疫功能缺损[1]。但有关糖尿病动物模型免疫功能的研究，报道甚少。我们采用链脲霉素诱导C_{57}小鼠发生糖尿病，动态观察外周血淋巴细胞数量、T淋巴细胞百分比，并探讨腹腔巨噬细胞体外吞噬功能，旨在了解糖尿病状态下细胞免疫功能状态。

材料和方法

1. **糖尿病小鼠模型的建立** C_{57}纯种小鼠，均为雌性，鼠龄50～70天，自由进食和饮水。链脲霉素（Sigma产品），用pH4.5的柠檬酸缓冲液配成1%浓度，按190mg/kg体重，一次性腹腔注射。对照组小鼠只注射柠檬酸缓冲液。于注药前、注药5d、11d、15d及19d分别取尾血测定血糖（邻甲苯胺法）。小鼠在注射链脲霉素后48h内，出现神萎、多尿、多饮、皮毛皱缩、食量增加、体重下降及尿糖阳性。所有糖尿病小鼠模型第5d时血糖均超过16.67mmol/L（300mg/dl），且有进行性增高。本资料共获得糖尿病小鼠模型35只，其注射前血糖为6.62±0.83mmol/L，注药后第5d为23.30±5.26mmol/L，第11d为27.59±1.71mmol/L，第15d为36.19±3.76mmol/L及第19天为31.07±3.58mmol/L。

* 研究生

cases of Type II diabetes mellitus. It was found that plasma magnesium in diabetic patients was much lower than that in normal controls. Plasma magnesium was negatively correlated with plasma cholesterol, triglyceride, and LDL-C, and positively correlated with plasma HDL-C, HDL2, and HDL-C/LDL-C, suggesting that hypomagnesemia was closely related with disturbance in lipid metabolism in diabetes mellitus. Hypomagnesemia seemed to worsen the disturbance of lipid metabolism, and might be one of the factors causing vascular complications in diabetes mellitus

KEY WORDS *Diabetes mellitus; Hypomagnesemia; Lipids*

维普资讯 http://www.cqvip.com

2. 外周血淋巴细胞数量 按白细胞计数及分类计数常规方法操作。淋巴细胞数量为白细胞总数与淋巴细胞百分比之积。

3. 外周血T淋巴细胞百分比测定 采用T淋巴细胞酸性α-醋酸萘酯酶（ANAE）染色法，基本按Horwity等的方法操作[2]，略有改进。在血片体尾交界区域计数100个淋巴细胞，获得淋巴细胞ANAE阳性率即为T淋巴细胞百分比。在实验中，采用同一厂家的同一批号试剂，并尽量保持各种实验条件的恒定，以保证结果的可靠性及可比性。

4. 腹腔巨噬细胞体外吞噬酵母菌试验 基本上参照林飞卿等方法[3]，仅将孵育时间延长至60min。显微镜下计数200个巨噬细胞，记录其吞噬酵母菌的情况，计算吞噬酵母菌的巨噬细胞百分比（即吞噬率），及每个细胞内的平均菌数（即吞噬指数）。

5. 统计学处理 采用双因素及单因素方差分析、t检验。数据用$\bar{X}\pm SD$表示。

结　果

1. 糖尿病小鼠外周血淋巴细胞数量的变化 从表1中可见，注射链脲霉素后，小鼠淋巴细胞数量有上升趋势，但经统计学处理（双因素方差分析）显示差别无显著意义，P值大于0.05，说明链脲霉素诱导的糖尿病小鼠外周血淋巴细胞数量无改变。

2. 糖尿病鼠小外周血T淋巴细胞百分比的变化 从表1中可见，注射链脲霉素后，小鼠T淋巴细胞百分比明显低于注射前，统计学处理P值小于0.01。提示糖尿病小鼠外周血T淋巴细胞百分比降低。而且，糖尿病小鼠T淋巴细胞百分比减少发生于注射链脲霉素后第一周内，此后，T淋巴细胞百分比维持在较低水平。

表 1　糖尿病小鼠淋巴细胞数量、T淋巴细胞百分比的变化　（n=20）

	注药前	注药后（天）					
		5	7	9	11	13	15	17
淋巴细胞数量（×10⁹/L）	7.37 ±4.34	9.00△ ±2.60	8.79△ ±3.10	7.06△ ±2.87	7.14△ ±2.26	7.17△ ±2.84	7.04△ ±1.47	7.09△ ±2.59
T淋巴细胞百分比（%）	58.1 ±8.6	51.3* ±10.5	42.4* ±7.7	40.2* ±6.0	43.1* ±8.4	41.5* ±5.0	50.5* ±6.4	42.4 ±8.8

* P<0.01（与注药前比较）　△ P>0.05（与注药前比较）

3. 糖尿病小鼠腹腔巨噬细胞体外吞噬功能的改变

腹腔巨噬细胞取自病程二周以上的糖尿病小鼠和正常对照小鼠。结果显示糖尿病小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数明显低于正常（表2），提示糖尿病状态下，小鼠腹腔巨噬细胞体外吞噬功能受损。

讨　论

有关糖尿病的T淋巴细胞数量的研究，国内外报道多采用E花环形成试验或单克隆

表 2　小鼠腹腔巨噬细胞吞噬酵母菌的测定

	正常对照（n=15）	糖尿病（n=15）
吞噬率（%）	34.97±10.91	19.97±6.61*
吞噬指数	0.7660±0.3534	0.3587±0.1362*

* P<0.01（与正常对照小鼠比较）

维普资讯 http://www.cqvip.com

抗体法，但结果差异较大。单克隆抗体法特异性高，且能区分T淋巴细胞亚群，而由于国内未能提供检查小鼠T淋巴细胞亚群的单克隆抗体，故开展此项研究有困难。E花环形成试验必须分离淋巴细胞进行试验，耗血量多，故不适合于小动物如小鼠的实验。而我们选用的ANAE染色法以测定T细胞数量，由于方法可靠，结果稳定，需血量极少，故特别适合对小鼠进行多次的连续性观察研究，因此能动态地了解注射链脲霉素前后糖尿病小鼠T淋巴细胞的数量，而获得较为满意的结果。测得正常C_{57}小鼠外周血T淋巴细胞百分比为58.1±8.6%，与文献报道相符[4]。注射链脲霉素后，糖尿病小鼠外周血T淋巴细胞百分比下降。

我们的研究结果与多数作者的临床观察相似。Cattaneo等采用E花环试验，发现青年型糖尿病患者T细胞百分比(38.1%)明显低于正常对照(56.5%)，而成年型糖尿病患者T细胞百分比无明显变化[5]。Rodier等报导早期Ⅰ型糖尿病患者T细胞百分比下降[6]。而也有作者报导Ⅰ型糖尿病患者外周血T淋巴细胞数量无明显减少[1]。

对某些糖尿病动物模型的研究，则取得一致的结果。应用单克隆抗体技术，Elder等对糖尿病BB大鼠的研究，表明不同年龄的糖尿病BB大鼠均有严重的T细胞减少，而B细胞数量正常[7]。Kataoka等研究遗传性、非肥胖性糖尿病小鼠，发现外周血淋巴细胞总数和T细胞数量均下降[8]。Boillot等在糖尿病db/db小鼠上，亦发现淋巴细胞，特别是T淋巴细胞减少[9]。

巨噬细胞是一类重要的免疫细胞。Pasko等采用四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠，获取腹腔渗出细胞，体外与白色念珠菌按1:2混合，显示腹腔巨噬细胞吞噬功能正常[10]。Saiki等选用链脲霉素诱导的糖尿病小鼠，腹腔内注射绿脓杆菌，数分钟后收集腹腔细胞，测定巨噬细胞内吞噬的细菌数量，发现糖尿病小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力仅为正常对照的1/10[11]。我们用营养液冲洗小鼠腹腔获取腹腔细胞，测定腹腔巨噬细胞体外对酵母菌的吞噬能力，结果显示糖尿病小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力明显低于正常对照。

我们的研究结果认为链脲霉素糖尿病小鼠，既有T细胞数量减少，又有巨噬细胞功能的损害，从而影响糖尿病小鼠免疫功能，特别是细胞免疫功能。免疫功能的缺损，导致糖尿病小鼠抗感染能力减弱。

糖尿病时感染易患性增高，而细胞免疫功能减弱是糖尿病感染易患性增高的原因之一。对糖尿病小鼠细胞免疫功能的观察，为进一步研究提高糖尿病患者机体免疫功能，增强抗感染能力，奠定了基础。

参考文献

[1] Drell DW, et al. Diabetologia 1987; 30:132

[2] Horwitz DA, et al. Clin Exp Immunol 1977; 30:289

[3] 林飞卿. 等. 中华微生物和免疫学杂志. 1981; 1:274

[4] 姜世勃. 等. 上海免疫学杂志. 1983; 3:254

[5] Cattaneo R, et al. Diabetes 1976; 25:223

[6] Rodier M, et al. Diabetologia 1984; 27:136

[7] Elder M, et al. J Immunol 1983; 130:1723

[8] Kataoka S, et al. Diabetes 1983; 32:247

[9] Boillet D, et al. Diabetes 1986; 35:198

[10] Pasko KL, et al. Cell Immunol 1981; 62:205

[11] Saiki O, et al. Infect Immun 1980; 28:127