

流式细胞术对2型糖尿病大鼠红细胞凋亡的研究

王磊^{1,2}, 肖洪彬¹, 牛雯颖¹, 姜广坤¹, 冯月楠¹, 卞敬琦¹, 乔玉良¹

1. 黑龙江中医药大学教学实验中心, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨技师学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

【摘要】目的:采用 Annexin V-FITC/PI 双染色、激光流式细胞术(Annexin V-FITC-FITC/PI-FCM)对2型糖尿病大鼠红细胞、老龄大鼠红细胞、正常大鼠红细胞的凋亡情况进行研究,同时分析上述模型的血液流变情况,对比病理情况和生理情况对红细胞凋亡和血液流变学的影响。**方法:**采用 Annexin V-FITC/PI 双染色、激光流式细胞术对3种大鼠模型红细胞凋亡情况进行测试,用Z血液流变分析仪对3种大鼠模型的血液粘度进行分析。**结果:**糖尿病大鼠红细胞存在凋亡,与此同时糖尿病大鼠血液粘度明显增大。**结论:**糖尿病大鼠红细胞存在凋亡,老龄大鼠和正常大鼠红细胞不存在凋亡,且凋亡与年龄无关,红细胞凋亡与血液粘度之间存在关联性。

【关键词】流式细胞术; 2型糖尿病; 红细胞; 凋亡

【中图分类号】R363; R587.1

【文献标识码】A

【文章编号】1005-202X(2015)05-0660-04

Erythrocytes apoptosis of rats with type 2 diabetes mellitus by flow cytometry

WANG Lei^{1,2}, XIAO Hong-bin¹, NIU Wen-ying¹, JIANG Guang-kun¹, FENG Yue-nan¹, BIAN Jing-qi¹, QIAO Yu-liang¹

1. Teaching and Experiment Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Harbin Technician College, Harbin 150030, China

Abstract: Objective To analyze the blood rheological of three rat models built in this paper, and compare the effect of physiological and pathological conditions on the erythrocytes apoptosis and blood rheological by researching the erythrocytes apoptosis of rats with type 2 diabetes mellitus, aging rats and normal rats based on Annexin V-FITC/PI double-staining and Annexin V-FITC-FITC/PI-FCM. **Methods** Annexin V-FITC/PI double-staining and Annexin V-FITC-FITC/PI-FCM were applied to study on the erythrocytes apoptosis of three rat models, rats with rats with type 2 diabetes mellitus, aging rats and normal rats. The blood viscosities of these three rat models were analyzed by Z hemorheology analyzer. **Results** Apoptosis appeared in the erythrocytes of diabetic rats and the blood viscosity of diabetic rats increased significantly. **Conclusion** Apoptosis appears in the erythrocytes of diabetic rats, not in the erythrocytes of aging rats and normal rats. And the apoptosis is not associated with age. However, there are correlations between erythrocytes apoptosis and blood viscosity.

Key words: flow cytometry; type 2 diabetes mellitus; erythrocytes; apoptosis

前言

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,以胰岛素分泌缺陷或其生物作用受损,或两者兼有引起^[1]。糖尿病长期存在高血糖,会导致眼、肾、心脏、血管、神经等组织的慢性损害和功能障碍^[2]。其中,微血管病变是糖尿病的主要合并症,严重威胁糖

尿病患者生存质量^[3]。以往对糖尿病微血管病变的研究主要集中在血管基底膜增厚、微血管生长畸形、血小板活化、血管内皮生长因子过度表达等方面^[4],未对细胞凋亡进行深入的研究。而细胞凋亡与发病机制存在密切关系。流式细胞术是一种能在液流系统中快速测定单个细胞或细胞器的生物学性质,对特定的细胞或细胞器进行分类并加以收集的定量检测技术^[5],是目前检测细胞凋亡的主要方法之一。本实验应用流式细胞仪检测糖尿病大鼠、健康大鼠和老龄大鼠红细胞的凋亡情况,以期对糖尿病微血管病变的治疗提供理论基础。

【收稿日期】2015-05-14

【基金项目】国家自然科学基金(81173186, 81473555)

【作者简介】王磊(1983-),女,博士研究生,讲师。E-mail: lgdhit@163.com。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级雄性SD大鼠30只,购于黑龙江中医药大学GLP中心。链脲佐菌素(STZ, Sigma公司), Annexin V-FITC试剂、PI Staining Solution试剂、 $1\times$ Binding Buffer缓冲液(上海翊圣生物科技有限公司),PBS缓冲液(Biotopped公司)。普通饲料购于黑龙江中医药大学GLP中心,自制脂肪乳(脂肪含量占58%、蛋白质25%、其余成分为碳水化合物等)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型的制备 大鼠随机均分为糖尿病组、老龄组 and 对照组。糖尿病组每日给予脂肪乳灌胃(2.5 mL/kg),连续灌胃56 d后腹腔注射STZ 70 mg/kg,注射7 d之后,用葡萄糖氧化法测量每只大鼠的空腹血糖值 ≥ 16 mmol/L(Glamour 2000全自动生化仪,美国MD器公司)。接着对葡萄糖的耐受量进行测试,用0.4 U胰岛素(Sigma公司 I-5500)进行腹腔注射,分别于2.5 h和5 h后用25%葡萄糖溶液10 mL/kg灌胃,葡萄糖耐受情况均成不耐受,证明模型制备成功。继续饲养8周使其达到糖尿病中期水平。对照组和老龄组正常饲养,老龄组饲养20个月以上。

1.2.2 细胞模型制作 对大鼠采用乙醚麻醉,眼丛取血,用肝素钠抗凝,每只约取1 mL,用PBS缓冲液洗涤,以1500 r/min离心5 min (BECKMAN超速离心机,美国贝克曼库尔特有限公司),弃上清液,除去血小板等,保留下层红细胞,从每个样品中取出红细胞约20 μ L混匀,留存待用。

1.2.3 采用流式细胞仪检测细胞凋亡 (1)对待测红细胞用PBS将下层红细胞浓度调整为 $1\times 10^6/\mu$ L;(2)吸取10 μ L放置流式检测试管后添加400 μ L Binding

Buffer重新悬浮细胞;(3)加入10 mL Annexin V-FITC和10 μ L PI Staining Solution后混匀,室温下避光孵育30 min;(4)1 h内将待测样品送入流式细胞仪检测,绿色荧光Annexin最大激发波长Ex为488 nm,最大发射波长Em为530 nm。V-FITC通过FITC通道(FL1)检测。PI-DNA复合物的最大激发波长为535 nm,最大发射波长为615 nm,PI的红色荧光在(FL2)通道检测。

应用BD C6全自动流式细胞分析系统(美国BD生命科学公司)检测荧光信号以计算红细胞的凋亡率。

1.2.4 血液流变测试 每只大鼠乙醚麻醉眼丛取血约5 mL,用肝素钠进行抗凝处理,用Z系列全自动血液流变测试仪(南京志伦科技有限公司)进行血液流变半量分析。

1.2.5 统计学处理 数据以均数 \pm 标准差的形式表示,数据间比较用SPSS13.0统计软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 血糖测定结果

对照组、老年组、糖尿病组大鼠空腹血糖(FBG)分别为 3.8 ± 0.2 mmol/L、 4.0 ± 0.2 mmol/L和 24.3 ± 0.3 mmol/L。除糖尿病组以外,其他两组血糖测试值均处于正常范围之内。

2.2 流式细胞术分析结果

利用流式细胞仪对检测样本进行测定,结果如图1所示。由图1可知,糖尿病组测定的红细胞存在早期凋亡(Q1LR=1.1%),晚期凋亡及死亡(Q1UR=0.5%)。对照组和老龄组测定的红细胞均为活细胞,不存在凋亡的细胞,说明年龄并不能作为判定细胞凋亡的依据。

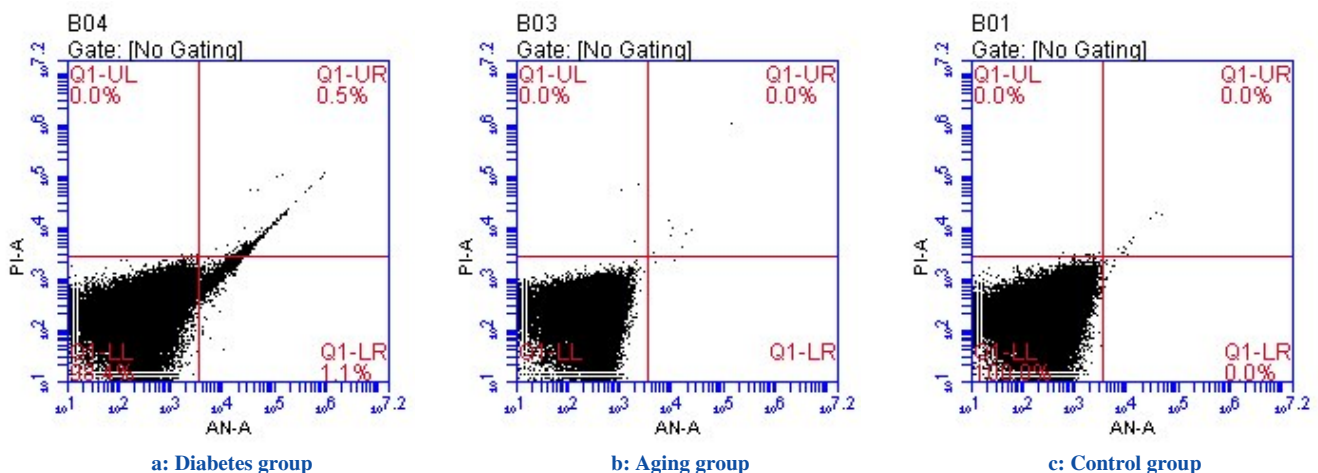


图1 红细胞流式散点图

Fig.1 Scatter plot of flow cytometry

2.3 血液流变测试结果

血液粘度高于老龄鼠组和对照组。

血液流变测试结果如表1所示,可见糖尿病大鼠

表1 各组血液流变测试结果
Tab.1 Results of blood rheological in three groups

	Diabetes group	Aging group	Control group
Plasma viscosity	1.8±0.2	1.4±0.2	1.2±0.2
Whole blood viscosity3.0(1/s)	18.2±0.6	14.2±0.5	10.2±0.4
Whole blood viscosity 30(1/s)	8.8±0.3	8.1±0.3	6.7±0.2
Whole blood viscosity 50(1/s)	7.6±0.4	5.1±0.3	4.9±0.3
Whole blood viscosity 100(1/s)	6.7±0.4	5.7±0.4	5.3±0.4
Whole blood viscosity 180(1/s)	6.2±0.4	4.6±0.3	4.2±0.3
Reduced viscosity3.0(1/s)	29.1±2.8	25.5±2.5	24.4±1.8
Reduced viscosity 30(1/s)	8.2±0.7	9.8±0.8	10.4±0.9
Reduced viscosity 50(1/s)	9.3±0.8	9.0±0.7	9.8±0.8
Reduced viscosity 100(1/s)	5.7±0.5	6.1±0.5	7.3±0.6
Reduced viscosity 180(1/s)	3.8±0.4	3.9±0.4	5.5±0.4
Erythrocyte deposited	50.0±2.8	48.0±2.6	47.0±2.6
Erythrocyte sedimentation rate	30.0±2.9	5.0±0.6	2.0±0.4
Fibrinogen	5.2±0.8	3.2±0.4	2.2±0.4
Erythrocyte rigidity index	0.7±0.6	0.8±0.5	0.9±0.7
Erythrocyte aggregation index	11.1±1.0	11.4±1.3	12.5±1.3
Blood sedimentation equation K value	481.5±19	120.3±10	8.9±4
Erythrocyte electrophoresis time	22.1±2.2	15.3±1.5	13.6±1.4
Erythrocyte deformation index	3.8±0.4	4.4±0.4	5.5±0.5

3 讨论

糖尿病组红细胞存在凋亡现象可能是血液内环境中的高糖使红细胞进入了氧化应激状态,极大地缩短了红细胞的寿命及天龄^[6]。过氧化损伤导致了红细胞膜上的脂肪酸氧化饱和,高价铁离子的形成增加了血红蛋白的糖基化水平,导致细胞形变能力下降。红细胞聚集性增强^[7]和糖尿病后期糖基化终产物(Advanced Glycationedn Products, AGES)的积累,都会对细胞膜造成影响,导致红细胞早期凋亡出现^[8]。红细胞膜由双层磷脂膜构成,而磷脂丝氨酸(Phosgha tidylserine, PS)位于磷脂质膜的内层。在正常情况下,老化凋亡的红细胞存在PS外翻的情况,携带PS受体的巨噬细胞能迅速对其进行识别并对老化细胞进行吞噬^[9-12]。但是糖尿病大鼠红细胞长期暴露在高糖状态下导致脂质代谢紊乱,PS外翻增多,导致巨噬细胞识别出现了障碍,来不及对所有凋亡的细胞进行吞噬,所以血液内仍存有凋亡细胞,同时PS外翻使红细胞间彼此粘度增大、红细胞与血管壁摩擦

力增加,细胞凋亡导致细胞膜通透性增加,胞浆内所释放出的Ca²⁺激活纤维蛋白酶和血小板,活化的血小板使纤维蛋白成明显的丝状发射状态粘附并且聚集细胞,最终导致全血粘度增大,甚至产生血管堵塞并出现血栓^[13-15]。所以红细胞凋亡可以作为微血管病变的诱因进行分析,从红细胞活化的角度对治疗做出进一步评价。

红细胞凋亡的具体原因和作用机制还需进一步探索,从细胞膜脂质代谢,离子通道激活离子内流,和网织红细胞的RNA表达等方面做进一步深入的研究,从而为糖尿病合并微血管病变治疗提供更全面的依据。

【参考文献】

[1] Zhang F, Ye C, Li G, et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters[J]. Exp Anim, 2003, 52(5): 401-407.
[2] Takebayashi K, Suetsugu M, Wakabayashi S, et al. Association between plasma visfatin and vascular endothelial function in

- patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Metabolism*, 2007, 56(4): 451-458.
- [3] Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, et al. Molecular mechanisms of insulin resistance[J]. *Diabet Med*, 2005, 22(6): 674-682.
- [4] Zhang M, Lü XY, Li J, et al. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model[J]. *Exp Diabetes Res*, 2008, 2008: 1-9.
- [5] 刘艳荣. 实用流式细胞术-血液病篇[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2010: 2-3.
- Liu YR. *Applied flow cytometry: blood disease*[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2010: 2-3.
- [6] 雍军光, 阮 萍, 冯博华, 等. 糖尿病肾病患者红细胞形态功能变化与病程发展的关联性研究[J]. *暨南大学学报(医学版)*, 2013, 34(6): 611-614.
- Yong JG, Ruan P, Feng BH, et al. Study on the relevance of changes in red blood cell morphology and function of patients with diabetic nephropathy to the development of diabetes[J]. *Journal of Jinan University (Medicine Edition)*, 2013, 34(6): 611-614.
- [7] 周慧敏, 刘 瑶, 张庆富, 等. 2型糖尿病大鼠HbA_{1c}与RCD的相关性[J]. *山东医药*, 2010, 50(37): 18-20.
- Zhou HM, Liu Y, Zhang QF, et al. Correlation of HbA_{1c} and RCD in type2 diabetes mellitus rat [J]. *Shandong Medical Journal*, 2010, 50(37): 18-20.
- [8] 陈丽娜, 张良才, 何月涵, 等. 2型糖尿病患者红细胞膜流动性和血浆自体荧光变化的实验研究[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2013, 47(5): 421-424.
- Chen LN, Zhang LC, He YH, et al. Research on red cell membrane fluidity and plasma autofluorescence of type 2 diabetes mellitus[J]. *Journal of Harbin Medical University*, 2013, 47(5): 421-424.
- [9] Lang F, Qadri SM. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes[J]. *Blood Purif*, 2012, 33(1-3):125-130.
- [10] Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications[J]. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2012, 12(1): 5-18.
- [11] Basu S, Bakeries D, Chandra S, et al. Eryptosis in hereditary spherocytosis and thalassemia: role of glycoconjugates[J]. *Glycoconj*, 2010, 27: 717-722.
- [12] Bhavsar SK, Bobbala D, Xuan NT. Stimulation of suicidal erythrocyte death by alpha-lipoic acid[J]. *Cell Physiol Bioc hem*, 2010, 26: 859-868.
- [13] Bortner CD, Cidlowski JA. The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis [J]. *Pflugers Arch*, 2004, 448: 313-318.
- [14] Rivera A, Jarolim P, Brugnara C. Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes[J]. *Blood*, 2002, 99: 357-603.
- [15] 崔 瑾, 邱明才, 李德环, 等. 环孢素A对链脲菌素诱导的糖尿病大鼠主动脉免疫损伤的保护作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2010, 38(5): 440-443.
- Cui J, Qiu MC, Li DH, et al. The protective effects of cyclosporine A on aortic immunological injuries in STZ-induced diabetic rats [J]. *Chin J Cardiol*, 2010, 38(5): 440-443.

(上接642页)

- [9] Pressnitzer D, Patterson RD. Distortion products and the pitch of harmonic complex tones, in physiological and psychophysical bases of auditory function[M]//Breebaart DJ. Shaker: Maastricht. 2001: 97-103.
- [10] Goldstein JL. Aural combination tones in frequency analysis and periodicity detection in hearing[M]//Sijthoff: Leiden, 1970: 230-247.
- [11] Moore BCJ, Glasberg BR, Baer T. A model for the prediction of thresholds, loudness and partial loudness[J]. *J Audio Eng Soc*, 1997, 45: 224-240.
- [12] Chen ZL, Hu GS. A revised method of calculating auditory excitation patterns and loudness for time-varying sounds[C]. 2012 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP), Kyoto. 2012: 157-160.
- [13] Moore GA, Moore BC. Perception of the low pitch of frequency-shifted complexes[J]. *J Acoust Soc Am*, 2003, 113: 977-985.
- [14] Hall JW, Buss E, Grose JH. Modulation rate discrimination for unresolved components: temporal cues related to fine structure and envelope[J]. *J Acoust Soc Am*, 2003, 113(2): 986-993.
- [15] Moore BC, Gockel H. Resolvability of components in complex tones and implications for theories of pitch perception[J]. *Hear Res*, 2011, 276: 88-97.
- [16] Moore BC, Huss M, Vickers DA, et al. A test for the diagnosis of dead regions in the cochlea[J]. *Br J Audiol*, 2000, 34: 205-224.
- [17] Glasberg BR, Moore BC. Derivation of auditory filter shapes from notched-noise data[J]. *Hear Res*, 1990, 47: 103-138.