

文章编号 1006-8147(2017)02-0138-04

论著

肥胖患者炎性单核细胞 Caspase 活性的研究

张诗田¹, 张达², 牛文彦¹

(1.天津医科大学免疫学系,天津 300070;2.天津医院超声科,天津 300211)

摘要 目的:探讨外周血炎性单核细胞(CD14⁺CD16⁺)的 Caspase 活性与肥胖相关指标、空腹血糖(FBG)之间的相关性。方法:招募志愿者,测量身高、体质量、腰围,计算体质指数(BMI),血糖仪测定 FBG。根据 BMI 分为3组:正常组、超重组、肥胖组。密度梯度离心提取外周血单个核细胞,流式细胞术检测 CD14⁺CD16⁺单核细胞的数量以及细胞内 Caspase 活性。结果:肥胖组炎性单核细胞 Caspase 活性显著高于正常组和超重组,炎性单核细胞 Caspase 活性与 BMI、腰围以及 FBG 正相关。结论:肥胖和高空腹血糖可能在炎性单核细胞 Caspase 活性升高中发挥作用。

关键词 肥胖;空腹血糖;单核细胞;Caspase

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

Caspase activity of pro-inflammatory monocytes in obese patients

ZHANG Shi-tian¹, ZHANG Da², NIU Wen-yan¹

(1.Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Ultrasound, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To explore the correlation between Caspase activity of pro-inflammatory monocytes (CD14⁺CD16⁺) and obese parameters, fast blood glucose (FBG). **Methods:** Volunteers were recruited. Height, weight and waistline were measured and BMI was calculated. FBG was analyzed by glucometer. Volunteers were grouped based on BMI into normal group, overweight group, and obese group. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation. The number of CD14⁺CD16⁺ monocytes and the Caspase activity in these cells were measured by flow cytometry. **Results:** Compared with normal and overweight groups, Caspase activity of pro-inflammatory monocytes in obese group was significantly higher. Caspase activity of pro-inflammatory monocytes was positively correlated with BMI, waistline and FBG. **Conclusion:** Obesity and high fast blood glucose may play a role in the increase of Caspase activity of pro-inflammatory monocytes.

Key words obesity; fast blood glucose; monocyte; Caspase

肥胖是许多疾病如高血压、高脂血症、代谢综合征以及2型糖尿病发病的重要危险因素,与胰岛素抵抗有关^[1]。肥胖诱发的胰岛素抵抗与系统性慢性低度炎症密切相关^[2]。外周血中的单核细胞依据 CD14 和 CD16 分子的表达情况分为 CD14⁺CD16⁻和 CD14⁺CD16⁺两类^[3],其中 CD14⁺CD16⁺单核细胞可以在脂多糖的刺激下产生较高水平的炎性因子^[4],并且具有很强的抗原提呈能力^[5],所以被认为是炎性单核细胞^[3]。Caspase 是细胞程序性死亡过程中关键酶,其中炎性 Caspase 通过激活炎症小体,促进炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放^[6]。本研究通过流式细胞术检测肥胖个体外周血中炎性单核细胞 Caspase 活性,分析与体质指数(BMI)、腰围以及空腹血糖

基金项目 国家自然科学基金资助(81170740,81161120545);高等学校博士学科点专项基金资助(20121202110014);天津市科委应用基础研究重点项目基金资助(15JCZDJC35500);天津市卫计委重点攻关项目基金资助(15KG102)

作者简介 张诗田(1990-),女,硕士在读,研究方向:免疫学;通信作者:牛文彦,E-mail:wniu@tmu.edu.cn。

(FBG)的相关性,为今后临床上肥胖的诊断和治疗提供新方向。

1 资料与方法

1.1 实验材料 人外周血淋巴细胞分离液购自天津市灏洋华科生物科技公司,Alexa Fluor 647 标记的鼠抗人的 CD14 单克隆抗体、PE-Cy7 标记的鼠抗人的 CD16 单克隆抗体、Alexa Fluor 647 鼠源 IgG2b κ 同型对照、PE-Cy7 鼠源 IgG1 κ 同型对照均购自美国 BD 公司,Caspase 活性检测试剂盒 FAM-FLICA 购自美国 ImmunoChemistry 公司,1 \times PBS 缓冲液购于美国 Gibco 公司

1.2 方法

1.2.1 研究对象 2015年8月-11月共招募47名志愿者,年龄40~70岁,测量身高、体质量和腰围,计算 BMI, BMI=体质量(kg)/身高平方(m²)。根据 BMI 将志愿者分为3组:正常组(BMI<24 kg/m²)、超重组(24 kg/m² \leq BMI<28 kg/m²)、肥胖组(BMI \geq 28 kg/m²)。排除有以下情况的志愿者:(1)患有肝肾等内脏

系统慢性炎症性疾病;(2) 心脑血管病急性期;(3) 近期有感染、发热、手术等应激状态。本研究通过天津医科大学伦理委员会的批准,所有志愿者均签署了知情同意书。

1.2.2 临床指标的检测 所有志愿者于检测前日晚8点后禁食,于次日清晨8点抽取外周静脉血,用血糖测定仪检测 FBG。

1.2.3 外周血单个核细胞的提取 取 1.5 mL EDTA 抗凝血,用 1×PBS 按 1:1 比例稀释并缓慢加于 4 mL 人外周血淋巴细胞分离液之上,400×g 室温离心 20 min,用吸管弃去上层血浆后缓慢吸取单个核细胞层,提取的单个核细胞用 1×PBS 洗 2 次。

1.2.4 流式细胞术检测单核细胞 Caspase 活性 取 1×10^6 个细胞,重悬于 290 μ L 1×PBS 中,加入 10 μ L 30×FLICA Caspase 检测试剂,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,加入 1×凋亡清洗液洗两次,250×g 室温离心 5 min,弃去上清,加入 1 μ L CD14 抗体和 2.5 μ L CD16 抗体,室温避光孵育 30 min,用 1×PBS 洗两遍,重悬细胞于 300 μ L 1×PBS 中加入 35 μ L 10×固定液,室温孵育 15 min。将处理好的标本用 LSR Fortessa 流式细胞仪进行检测,并用 FlowJo 软件分析流式数据。

炎性单核细胞 Caspase 活性 (%)=(Caspase 被激活状态下的炎性单核细胞数/炎性单核细胞数)×100%

1.3 统计学分析 采用 GraphPad Prism6 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s_x$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两个变量之间的相关性采用线性回归分析, $P < 0.05$ 为均值的差异有统计学意义。

2 结果

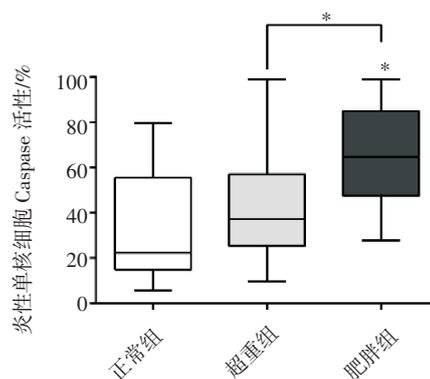
2.1 研究对象临床资料分析 正常组、超重组和肥胖组间年龄无显著差异($P > 0.05$),超重组和肥胖组的 BMI、腰围均显著高于正常组($P < 0.001$),而且超重组($P < 0.01$)和肥胖组($P < 0.001$)的 FBG 也显著高于正常组(表 1)。

表 1 志愿者临床资料分析($\bar{x} \pm SEM$)

组别	例数(男/女)	年龄/岁	BMI/(kg/m ²)	腰围/cm	FBG/(mmol/L)
正常组	9(9/0)	48.4±2.6	22.7±0.4	83.9±0.9	4.8±0.1
超重组	27(26/1)	51.4±1.7	25.6±0.2**	92.8±0.9**	7.3±0.5*
肥胖组	11(7/4)	50.2±1.9	31.0±0.9**	102.5±2.4**	11.0±1.1**

* 与正常组相比 $P < 0.01$, ** 与正常组相比 $P < 0.001$

2.2 炎性单核细胞 Caspase 活性 图 1 示,与正常组和超重组相比,肥胖组炎性单核细胞 Caspase 活性显著升高,分别为正常组的(1.9±0.30)倍($P < 0.05$)、超重组的(1.6±0.01)倍($P < 0.05$)。



* $P < 0.05$

图 1 Caspase 在炎性单核细胞中的活性

Fig 1 The Caspase activity in pro-inflammatory monocytes

2.3 炎性单核细胞 Caspase 活性与肥胖相关指数的相关性分析 将炎性单核细胞 Caspase 活性与 BMI 和腰围进行线性回归分析,结果见图 2,炎性单核细胞与 BMI 呈正相关($r^2 = 0.1450$, $P = 0.0083$),与腰围呈正相关($r^2 = 0.2011$, $P = 0.0016$)。

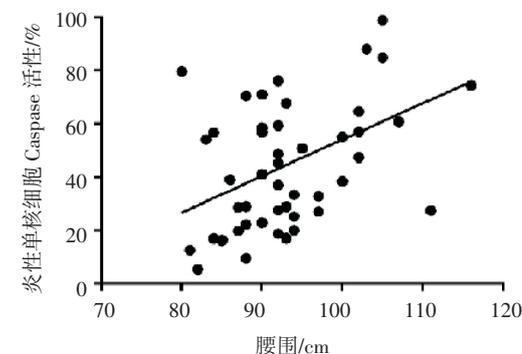
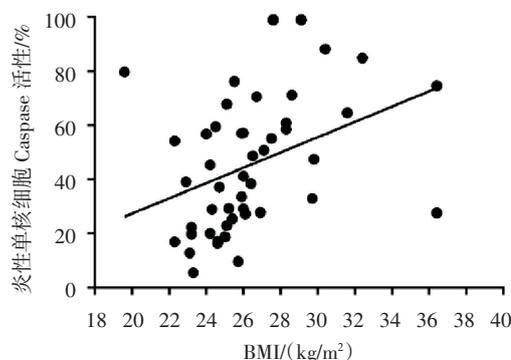


图 2 炎性单核细胞 Caspase 活性与 BMI 和腰围的相关性

Fig 2 The correlation between the Caspase activity of pro-inflammatory monocytes and BMI, waistline

2.4 炎性单核细胞 Caspase 活性与 FBG 的相关性分析 对炎性单核细胞 Caspase 活性和 FBG 做线性回归分析,结果见图 3,炎性单核细胞 Caspase 活性与 FBG 呈正相关($r^2 = 0.1942$, $P = 0.0019$)。

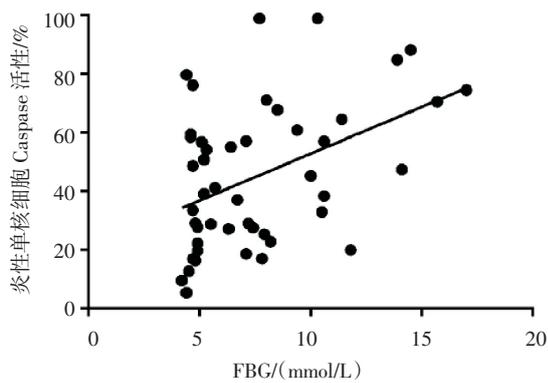


图 3 炎性单核细胞 Caspase 活性与 FBG 的相关性

Fig 3 The correlation between the Caspase activity in pro-inflammatory monocytes and FBG

3 讨论

肥胖已成为全球重大公共健康问题^[7], 每年约有 300 万人死于肥胖^[8-9]。代谢组织中的慢性低度炎症是肥胖发展为胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的主要因素^[10], 慢性低度炎症的产生主要是通过炎性细胞在内脏脂肪组织中聚集产生的, 研究发现肥胖可导致内脏脂肪组织中 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B 细胞、巨噬细胞增多^[11-14]。单核细胞是组织中巨噬细胞的重要来源, 在 Toll 样受体的配体刺激下, 主要由 CD14⁺CD16⁻单核细胞分泌 TNF- α 和 IL-1^[15-18], 而且与 CD14⁺CD16⁻单核细胞相比, CD14⁺CD16⁺单核细胞分泌 IL-10 较少^[16-17], 所以 CD14⁺CD16⁺单核细胞被认为是炎性单核细胞。Caspase 在炎症和细胞程序性死亡中发挥重要作用, Caspase-1、-4、-5 通过 NOD 样受体激活炎症小体, 将细胞死亡和炎性因子释放联系在一起^[19-20]。本研究发现, 肥胖组炎性单核细胞 Caspase 活性升高, 而且炎性单核细胞 Caspase 与 BMI、腰围呈正相关, 提示肥胖可能诱发炎性单核细胞 Caspase 活性升高。

肥胖是导致胰岛素抵抗和 2 型糖尿病发生的主要危险因素^[21], 已知高糖刺激可以诱导 H9C2 大鼠心肌细胞 Caspase-3、-9 激活, 进而导致心肌细胞凋亡^[22]。为了探讨肥胖组炎性单核细胞 Caspase 活性升高是否与 2 型糖尿病有关, 本实验将炎性单核细胞 Caspase 活性与空腹血糖进行线性相关分析, 发现炎性单核细胞 Caspase 活性与空腹血糖呈正相关, 提示高空腹血糖可能诱发炎性单核细胞 Caspase 活性升高。

综上所述, 肥胖和空腹血糖升高可能在炎性单核细胞 Caspase 活性升高机制中发挥作用, 详细的机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Kopelman P G. Obesity as a medical problem[J]. *Nature*, 2000, 404 (6778):635
- [2] Stienstra R, van Diepen J A, Tack C J, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(37):15324
- [3] Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(3):584
- [4] Belge K U, Dayyani F, Horelt A, et al. The proinflammatory CD14⁺ CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF [J]. *J Immunol*, 2002, 168(7):3536
- [5] Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock H W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood[J]. *Blood*, 1989, 74(7):2527
- [6] Man S M, Kanneganti T D. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(1):7
- [7] Finucane M M, Stevens G A, Cowan M J, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants[J]. *Lancet*, 2011, 377(9765):557
- [8] Emerging Risk Factors Collaboration, Wormser D, Kaptoge S, et al. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies[J]. *Lancet*, 2011, 377(9771):1085
- [9] Prospective Studies C, Whitlock G, Lewington S, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies[J]. *Lancet*, 2009, 373(9669):1083
- [10] Donath M Y, Shoelson S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2):98
- [11] Weisberg S P, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12):1796
- [12] Winer D A, Winer S, Shen L, et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies[J]. *Nat Med*, 2011, 17(5):610
- [13] Talukdar S, Oh da Y, Bandyopadhyay G, et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase[J]. *Nat Med*, 2012, 18(9):1407
- [14] Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity[J]. *Nat Med*, 2009, 15(8):914
- [15] Rossol M, Kraus S, Pierer M, et al. The CD14 (bright) CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64 (3):671
- [16] Wong K L, Tai J J, Wong W C, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets[J]. *Blood*, 2011, 118(5):e16
- [17] Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors[J]. *Immunity*, 2010, 33(3):375

- [18] Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, et al. Peripheral blood CD14 high CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10[J]. Scand J Immunol, 2008, 67(2):152
- [19] Aachoui Y, Sagulenko V, Miao E A, et al. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection[J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(3):319
- [20] Latz E, Xiao T S, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(6):397
- [21] Kahn S E, Hull R L, Utzschneider K M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. Nature, 2006, 444(7121): 840
- [22] Qin W D, Liu G L, Wang J, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 inhibition protects cardiomyocytes from inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy[J]. Oncotarget, 2016, 7(24):35618 (2016-07-28 收稿)

文章编号 1006-8147(2017)02-0141-02

论著

直肠前突与功能性便秘的关系

张冰^{1,2}, 刘筠², 甄雨声², 许亮²

(1.天津医科大学研究生院,天津 300070;2.天津市人民医院影像学部,天津 300121)

摘要 目的:探讨直肠前突与功能性便秘的关系,为直肠前突的临床处理提供依据。方法:回顾性分析 333 例便秘患者的结肠传输试验及排粪造影资料,分析直肠前突以及其中的重度直肠前突在不同便秘类型中的分布概率。结果:333 例便秘患者,结肠传输试验正常型占 42.9%(143/333),慢传输型 21.3%(71/333),出口梗阻相关型(出口梗阻型加混合型)35.7%(119/333)。重度直肠前突在上述各型便秘中的发生率差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:重度直肠前突是引起便秘的重要原因之一,明确直肠前突与功能性便秘的关系对临床制定治疗方案有重要指导意义。

关键词 便秘;直肠前突;结肠传输试验;排粪造影

中图分类号 R574.62

文献标志码 A

在过去,直肠前突一直被认为是出口梗阻型便秘的常见原因。但直肠前突是女性 X 线排粪造影检查常见的征象^[1],而且临床采用手术解决直肠前突治疗便秘的实践表明,术后治疗效果不够理想。因此,近年来的文献报道对于直肠前突是否会引便秘有不同的观点^[2-6]。本研究选取 2015 年 1-12 月在天津市人民医院便秘专科门诊就诊的 333 例便秘患者作为观察对象,分析直肠前突在各便秘类型中的分布,进一步探讨直肠前突与功能性便秘的关系,从而为临床治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料 333 例临床诊断为便秘的患者中,男性 75 例,女性 258 例,男女之比为 1:3.44。年龄 12~84 岁,平均 52.6 岁。纳入标准:便秘的诊断参照罗马 III 标准^[7],即诊断前症状出现至少 6 个月,近 3 个月症状符合以下 2 点或 2 点以上:(1)排便感到费力;(2)粪便呈块状或坚硬;(3)排便有不尽感;(4)排便时有肛门阻塞感;(5)排便需用手法帮助(如

用手指帮助排便、盆底支持);(6)便次<3 次/周。排除标准:(1)有肠道手术病史者;(2)肠道器质性疾病。

1.2 方法

1.2.1 结肠传输试验 患者于检查前 3 d 起禁食任何帮助排便的药物和食物,保持正常生活习惯不作特殊改变。检查前 1 d 上午口服 20 粒不透 X 线标志物胶囊,于服标志物 24、48、72 h 之后每日拍摄腹部平片 1 张。进行结肠传输试验标志物的划线分区及数量记录,并结合运输指数 TI,将便秘患者分为 4 型(运输指数 $TI^{[8]} = \frac{\text{第 3 天直乙部存留标记物数}}{\text{第 3 天大肠内存留的全部标记物数}}$)。

1.2.2 排粪造影 检查前 1 d 晚 8~10 时冲服泻剂,以清洁肠内积粪。检查时,患者侧卧于胃肠机检查床上,经患者肛门插管灌入硫酸钡悬液,使之进入乙状结肠及降结肠远端后拔出导管。让患者背向医务人员端坐于排粪造影桶上,调整患者位置,使双侧股骨头重合,分别摄取静息、提肛、力排充盈、力排黏膜直肠侧位片,必要时摄正位片。正常直肠前突深度应小于 5 mm。根据卢任华^[9]的诊断标准,前突程度通常分为 3 度:6~15 mm 为轻度;16~30 mm

作者简介 张冰(1990-),男,硕士在读,研究方向:中枢神经系统影像学诊断学;通信作者:刘筠,E-mail: cjr.liujun@vip.163.com。