

[文章编号] 1007-3949(2009)17-04-297-04

• 临床研究 •

血清晚期氧化蛋白产物与 2 型糖尿病患者 动脉粥样硬化的关系

史春虹¹, 姜一农²

(大连医科大学附属第一医院 1 内分泌科, 2 心血管内科, 辽宁省大连市 116011)

[关键词] 2 型糖尿病; 晚期氧化蛋白产物; 基质细胞衍生因子 1 α ; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨血清晚期氧化蛋白产物与 2 型糖尿病患者动脉粥样硬化性大血管并发症的关系。方法 选择 90 例 2 型糖尿病患者和 60 例健康对照者, 用酶联免疫吸附法及分光光度法分别检测血清基质细胞衍生因子 1 α 及晚期氧化蛋白产物水平, 采用高分辨超声测定大动脉内膜中膜厚度。结果 2 型糖尿病患者血清晚期氧化蛋白产物和基质细胞衍生因子 1 α 水平明显高于健康对照者 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 2 型糖尿病患者高晚期氧化蛋白产物组基质细胞衍生因子 1 α 、空腹血糖、糖化血红蛋白及血清甘油三酯水平和体质指数与正常晚期氧化蛋白产物组比较显著升高 ($P < 0.05$), 2 型糖尿病患者中动脉粥样硬化组晚期氧化蛋白产物及基质细胞衍生因子 1 α 水平明显高于非动脉粥样硬化组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。单因素相关分析显示, 血清晚期氧化蛋白产物水平与基质细胞衍生因子 1 α 呈正相关 ($r = 0.295, P = 0.03$), 与空腹血糖、糖化血红蛋白、甘油三酯及体质指数呈正相关 ($r = 0.286, P = 0.03; r = 0.310, P = 0.01; r = 0.461, P = 0.001; r = 0.257, P = 0.04$)。结论 2 型糖尿病患者蛋白氧化损伤增强, 血清晚期氧化蛋白产物增加促进血管内皮细胞基质细胞衍生因子 1 α 表达, 晚期氧化蛋白产物增加可能与 2 型糖尿病动脉粥样硬化相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Relationship Between Serum Advanced Oxidation Protein Products and Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

SHI Chunhong¹, and JIANG Yirong²

(1 Department of Endocrinology, 2 Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

[KEY WORDS] Type 2 Diabetes Mellitus; Advanced Oxidation Protein Products; Stromal Cell-Derived Factor-1 α ; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between serum advanced oxidation protein products (AOPP) and atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** 90 T2DM patients and 60 healthy controls were enrolled. Serum levels of stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) and AOPP were measured by ELISA and spectrophotometry method separately. Carotid, femoral and common iliac artery intima-media thickness (MT) were determined with non-invasive high-resolution B-mode ultrasonography. **Results** Both serum AOPP and SDF-1 α levels were significantly higher in T2DM group as compared with those of healthy controls ($80.32 \pm 12.65 \mu\text{mol/L}$ vs $41.80 \pm 17.09 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$; $2652.05 \pm 362.07 \mu\text{g/L}$ vs $2160.37 \pm 424.79 \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$). Using the mean + 2SD of AOPP concentration as cut-off point, T2DM with AOPP more than or equal to $92.97 \mu\text{mol/L}$ were defined as high AOPP group, while less than $92.97 \mu\text{mol/L}$ as normal AOPP group. Of all the patients with T2DM, higher serum SDF-1 α levels were found in high AOPP group than those of normal AOPP group ($2813.04 \pm 330.25 \mu\text{mol/L}$ vs $2501.73 \pm 383.02 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$). Both SDF-1 α and AOPP levels were significantly increased in the atherosclerosis (As) group than those of non-As group ($2843.93 \pm 355.28 \mu\text{g/L}$ vs $2507.88 \pm 360.62 \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$; $89.69 \pm 12.58 \mu\text{mol/L}$ vs $75.10 \pm 13.09 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$) in the patients with T2DM. As was defined that carotid or femoral or common iliac artery MT was more than 1 mm or there was a plaque on the vessel wall according to the ultrasonography. Serum levels of AOPP were correlated positively with serum SDF-1 α ($r = 0.295, P = 0.03$). **Conclusions** Protein oxidation damages were increased in T2DM, increased levels of AOPP contribute to the increased expression of SDF-1 α on vascular endothelial cells, increased AOPP may be associated with accelerated atherosclerosis in T2DM.

[收稿日期] 2008-12-29

[修回日期] 2009-03-05

[作者简介] 史春虹, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为糖尿病大血管并发症的发病机制, E-mail 为 rexyu@vip.sina.com。姜一农, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化和高血压的发病机制及其干预。

2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus T2DM) 患者主要的致死致残因素是动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 所致大血管并发症, 动脉粥样硬化往往先于 T2DM 确诊, 并且血糖控制情况与动脉粥样硬化性大血管并发症的发生发展并无平行关系。氧化应激作为糖尿病动脉粥样硬化的促进因素近年来备受关注^[1,2], 晚期氧化蛋白产物 (advanced oxidation protein products AOPP) 被认为是氧化介导的蛋白损伤的新的标志物, 并且作为新一类的前炎症介质^[3] 在动脉硬化的发生机制中扮演重要角色。基质细胞衍生因子 1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α) 是一种高效的淋巴细胞、单核细胞趋化因子, 具有介导上述细胞通过内皮进入动脉粥样斑块的作用^[4]。本研究通过检测 T2DM 患者血清 AOPP 和 SDF-1 α 水平并分析两者间相关性, 探讨 AOPP 与糖尿病动脉粥样硬化的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

根据 1999 年 WHO 糖尿病诊断与分型标准, 选择 T2DM 患者 90 例, 男 48 例, 女 42 例, 年龄 35~69 岁, 平均 51.3 \pm 6.5 岁, 病程小于 1 年, 无临床证据表明有心、脑、肾及周围血管等动脉粥样硬化性疾病。排除急慢性感染、肿瘤、血液系统疾病、急性心脑血管疾病患者, 进入研究前 1 个月未服用抗氧化剂治疗。体检健康者 60 例, 男 31 例, 女 29 例, 年龄 28~66 岁, 平均 50.4 \pm 7.2 岁。

1.2 超声测定大动脉内膜中膜厚度

超声科医师专人操作, 使用 ALTHDI5000 型高分辨率多功能彩色多普勒超声诊断仪, 探头频率为 5.0~12.0 MHz。受检者取仰卧位, 测量动脉长轴后壁内膜内表面至中膜外表面之间的垂直距离作为动脉内膜中膜厚度 (intima-media thickness MT), 围绕测量点每隔 0.5 cm 进行测量, 连续测 3 次, 计算平均值。测量位置分别为: 颈总动脉近分叉处远端 1.0~1.5 cm 处、腹主动脉分叉远端 1.0~1.5 cm 处、股浅及深动脉分叉近端 1.0~1.5 cm 处。MT > 1.5 mm, 局部内膜表面隆起, 凸向管腔者, 视为粥样斑块。

1.3 血标本的留取

所有 T2DM 患者及健康对照者隔夜空腹 10 h 清晨抽取静脉血 5 mL 加入含 10% EDTA 的抗凝管中, 充分混匀后于 0 $^{\circ}$ C ~ 4 $^{\circ}$ C 3000 r/min 离心 10 min 收集上清液于 -20 $^{\circ}$ C 冻存待测。

1.3 晚期氧化蛋白产物的测定

参照文献 [5], 应用分光光度法测定。血清与 PBS 按 1:5 稀释, 以氯胺-T 同法稀释作空白对照, 加入 1.16 mmol/L KI 10 μ L 及乙酸 20 μ L 后立刻测 340 nm 处的吸收度值。AOPP 浓度以氯胺-T 含量表示。以 T2DM 患者血清 AOPP 浓度的均值 + 2SD (92.97 μ mol/L) 作为切点分为高 AOPP 组 (AOPP \geq 92.97 μ mol/L) 和正常 AOPP 组 (AOPP < 92.97 μ mol/L)。

1.4 基质细胞衍生因子 1 α 的测定

采用酶联免疫吸附法, 按照试剂说明书进行。加 100 μ L 标准液或样本至每孔中, 室温下震荡混匀孵育 2 h, 吸干每孔并用洗涤缓冲液洗涤, 重复洗涤 3 次, 加 200 μ L SDF-1 α 共轭抗体至每孔中, 室温下震荡混匀孵育 2 h, 重复洗涤 3 次。最后加 200 μ L 显色剂溶液至每孔中, 室温避光孵育 30 min, 加 50 μ L 终止液至每孔中, 用荧光免疫分析仪检测每孔在 450 nm 处的吸光度。

1.5 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验。相关性检验采用直线相关分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床及生物化学指标比较

T2DM 组血清糖化血红蛋白 (GHbA1c)、空腹血糖 (FPG)、AOPP、SDF-1 α 、甘油三酯 (TG) 及总胆固醇 (TC) 水平明显增高 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 而体质指数 (BMI)、平均血压 (MBP)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 及高密度脂蛋白胆固醇 (HDLC) 水平在两组间差异无显著性 (表 1)。

2.2 2型糖尿病患者高晚期氧化蛋白产物组与正常晚期氧化蛋白产物组临床及生物化学指标比较

T2DM 患者高 AOPP 组 BMI、FPG、GHbA1c、TG 及 SDF-1 α 水平明显高于正常 AOPP 组 (*P* < 0.05), 而 TC、HDLC 及 LDLC 水平在两组间差异无显著性 (表 2)。

2.3 2型糖尿病患者动脉粥样硬化组与非动脉粥样硬化组临床及生物化学指标比较

T2DM 患者动脉粥样硬化组 AOPP 和 SDF-1 α 水平明显高于非动脉粥样硬化组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 而 TC、TG、HDLC、LDLC 及 GHbA1c 水平在两组间差异无显著性 (表 3)。

表 1 临床及生物化学指标比较

指 标	T2DM 组 (n=90)	对照组 (n=60)
年龄(岁)	51.3±6.5	57.4±10.2
男/女(例)	48/42	31/29
BM I (kg/m ²)	25.14±2.46	24.21±3.57
MBP (mmHg)	134/83±14/10	122/71±12/8
GHbA1c	7.9%±1.6% ^b	4.5%±0.4%
FPG (mmol/L)	8.37±1.09 ^b	4.82±0.15
TC (mmol/L)	5.02±1.14 ^a	4.25±1.34
TG (mmol/L)	2.41±1.68 ^a	1.20±0.73
HDLC (mmol/L)	1.35±0.28	1.26±0.14
LDLC (mmol/L)	2.83±0.67	2.31±0.75
AOPP (μmol/L)	80.32±12.65 ^b	41.80±17.09
SDF-1α (μg/L)	2652.05±362.07 ^a	2160.37±424.79

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2 T2DM 患者高 AOPP 组与正常 AOPP 组临床及生物化学指标比较

指 标	高 AOPP 组 (n=53)	正常 AOPP 组 (n=37)
年龄(岁)	52.8±7.5	50.4±6.2
BM I (kg/m ²)	27.01±2.56 ^a	24.67±2.38
FPG (mmol/L)	8.95±1.21 ^a	7.62±0.94
GHbA1c	8.4%±1.1% ^a	6.8%±0.5%
TC (mmol/L)	5.11±1.85	4.98±1.10
TG (mmol/L)	3.24±0.79 ^a	1.95±1.20
HDLC (mmol/L)	1.38±0.22	1.31±0.26
LDLC (mmol/L)	2.86±0.61	2.79±0.64
SDF-1α (μg/L)	2813.04±330.25 ^a	2501.73±383.02

a为 $P < 0.05$ 与正常 AOPP 组比较。

表 3 T2DM 患者 A s 组与非 A s 组临床及生物化学指标比较

指 标	A s 组	非 A s 组
AOPP (μmol/L)	89.69±12.58 ^b	75.10±13.09
SDF-1α (μg/L)	2843.93±355.28 ^a	2507.88±360.62
TG (mmol/L)	2.44±1.76	2.38±1.65
LDLC (mmol/L)	2.95±0.66	2.79±0.82
HDLC (mmol/L)	1.43±0.38	1.32±0.46
TC (mmol/L)	5.11±1.23	4.97±1.08
GHbA1c	8.0±1.3	7.8±1.7

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与非 A s 组比较。

2.4 相关性分析

单因素相关分析显示, T2DM 患者血清 AOPP

水平与 FPG、GHbA1c、TG、BMI 及 SDF-1α 呈正相关 ($r = 0.286, P = 0.03; r = 0.310, P = 0.01; r = 0.461, P = 0.001; r = 0.257, P = 0.04; r = 0.295, P = 0.03$), 与 TC、HDLC 及 LDLC 无相关关系。

3 讨论

动脉粥样硬化性大血管并发症是 T2DM 主要的死因, 这一并发症在良好的血糖、血压、血脂控制下仍然发生发展^[2], 增强的氧化应激与 T2DM 动脉粥样硬化性血管并发症之间的关系近来研究较多^[1, 2]。

直接测定体内氧化应激很困难, 因为自由基非常活跃, 寿命短, 并且浓度低。AOPP 是一种新发现的蛋白质大分子氧化应激标志物, 由 Witko-Sarsat 等^[6]于 1996 年在尿毒症患者血浆中首次发现, 是血清白蛋白被自由基和反应性氧系氧化后形成的蛋白交连产物, 相对于既往普遍关注的脂质过氧化物标志形成早, 存在时间长, 更加稳定, 是反映氧化应激蛋白损伤的可信指标。本研究中 T2DM 患者血清 AOPP 水平显著高于健康对照者, 与 Pan 等^[7]研究结果一致, 进一步证实 T2DM 患者体内氧化应激增强。Matteucci 等^[8]在非糖尿病的糖尿病亲属中发现 AOPP 增高, 表明氧化应激在糖尿病发生之前, 可能参与了糖尿病的发病机制。

本研究发现, T2DM 患者高 AOPP 组 FPG 和 GHbA1c 水平较正常 AOPP 组显著增高, AOPP 与 FPG 及 GHbA1c 显著正相关, 提示高血糖可能加重蛋白质氧化应激。TG 在 T2DM 患者高 AOPP 组较正常 AOPP 组显著增高, HDLC、LDLC 及 TC 在两组间无明显差异, AOPP 与 TG 水平呈正相关, 与 HDLC、LDLC 及 TC 无相关性, 与 Klousova 等^[9]结果一致, 表明蛋白质氧化应激增强可能有脂质代谢紊乱因素参与。Li 等^[10]用高脂膳食饲喂的大鼠 AOPP 水平较非高脂组增高, 也证实了高脂血症可能通过氧化应激的增强增加体内 AOPP 的生成。高 AOPP 组 BMI 显著高于正常 AOPP 组, 且 AOPP 水平与 BMI 正相关, 提示肥胖与氧化应激有关。

动脉 MT 增厚被认为是动脉粥样硬化的早期时相, 作为动脉粥样硬化存在的标志, 本研究中以 MT=1mm 为切点^[11]将 T2DM 分为动脉粥样硬化组和非动脉粥样硬化组, AOPP 水平在动脉粥样硬化组显著高于非动脉粥样硬化组, 表明蛋白质氧化应激与 T2DM 动脉粥样硬化相关, AOPP 增高可能促进动脉粥样硬化的形成。既往对于无并发症的糖

糖尿病的研究发现其血清氧化蛋白损伤增加,提示增加的蛋白氧化可能不是由于并发症,反而是促进并发症的发展^[12]。

AOPP通过何种机制促进动脉粥样硬化的发生尚不明确,但有证据表明 AOPP不仅是蛋白氧化应激的标志物,还起到炎症介质的作用^[13]。有报道 AOPP与内皮功能紊乱相关,外源性 AOPP的增加促进单核细胞分泌 TNF- α 增加^[10],体外实验证实 AOPP促进内皮细胞分泌单核细胞趋化因子^[14]。

SDF-1 α 是一种高效的淋巴细胞、单核细胞趋化因子,具有介导淋巴细胞及单核细胞黏附并通过内皮细胞紧密联结的作用^[4]。本研究发现 T2DM 患者血清 SDF-1 α 水平显著高于正常对照组,高 AOPP组与正常 AOPP组比较 SDF-1 α 水平显著增高,并且在 T2DM 动脉粥样硬化组显著高于非动脉粥样硬化组,AOPP水平与 SDF-1 α 水平显著正相关,表明 AOPP可能通过促进血管内皮细胞表达 SDF-1 α 增加,加速循环中单核细胞向内皮细胞的黏附,启动动脉粥样硬化的关键步骤,最终促进动脉粥样硬化的发生发展。

总之,T2DM 蛋白氧化应激增强,与增高的血糖、高 TG血症及肥胖相关,AOPP可能通过促进血管内皮细胞 SDF-1 α 表达增加启动单核细胞黏附、迁移,从而加速 T2DM 动脉粥样硬化的形成。以 AOPP为标靶的抗氧化治疗可能减缓 T2DM 动脉粥样硬化性血管并发症的发生发展。

[参考文献]

[1] Pennathur S, Heinecke JW. Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9 (7): 955-

- 969
- [2] Soro-Paavonen A, Forbes JM. Novel therapeutics for diabetic micro- and macrovascular complications [J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13 (15): 1777-788
- [3] Chen SX, Song T, Zhou SH, et al. Protective effects of ACE inhibitors on vascular endothelial dysfunction induced by exogenous advanced oxidation protein products in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 584 (2-3): 368-375
- [4] Kantele M, Kuk S, Jutila MA. Effects of continuous exposure to stromal cell-derived factor-1 alpha on T cell rolling and tight adhesion to monolayers of activated endothelial cells [J]. *J Immunol*, 2000, 164 (10): 5035-040
- [5] Santangelo F, Wilko-Sarsat V, Druke T, et al. Restoring glutathione as a therapeutic strategy in chronic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19 (8): 1951-955
- [6] Wilko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a new marker of oxidative stress in uremia [J]. *Kidney Int*, 1996, 49: 304-313
- [7] Pan HZ, Zhang H, Chang D, et al. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2008, 92 (4): 548-551
- [8] Matteucci E, Giampietro O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients [J]. *Diabetes Care*, 2000, 23 (8): 1182-186
- [9] Kalousova M, Skřiva J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus [J]. *Physiol Res*, 2002, 51 (6): 597-604
- [10] Liu SX, Hou FF, Guo ZJ, et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (5): 1156-162
- [11] 耿斌,曹铁生,段云友. 超声检查冠心病患者颈动脉、股动脉、髂总动脉内中膜厚度的研究 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2001, 10 (5): 592-594
- [12] Cakatay U, Telci A, Salman S, et al. Oxidative protein damage in type 1 diabetic patients with and without complications [J]. *Endocr Res*, 2000, 26 (3): 365-379
- [13] Kaneda H, Taquchi J, Ogasawara K, et al. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 162 (1): 221-225
- [14] 彭侃夫,吴雄飞,赵洪雯,等. 晚期氧化蛋白产物对血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1表达的影响 [J]. *中国血液净化*, 2006, 5 (5): 252-255

(此文编辑 文玉珊)