

影响 2 型糖尿病患者动脉硬化的多因素分析

胡利梅¹, 任卫东², 张 斌³, 王俊明¹, 刘宏强⁴, 马鸿伟¹, 许峥嵘², 谷 君², 史 丽²

(1. 河北北方学院, 2. 河北北方学院附属第一医院内分泌科, 3. 河北北方学院附属第一医院检验科, 4. 河北北方学院附属第一医院超声科, 河北省张家口市 075000)

[关键词] 内皮细胞微粒; 流式细胞术; 2 型糖尿病; 颈动脉内膜中膜厚度

[摘要] **目的** 探讨 2 型糖尿病(T2DM)患者动脉硬化的危险因素。**方法** 选取 T2DM 住院患者 164 例, 通过流式细胞术检测血浆内皮细胞微粒(EMP)水平及超声测定颈动脉内膜中膜厚度(IMT), 收集相关临床指标, 采用多因素 LR Logistic 回归分析 2 型糖尿病患者动脉硬化的危险因素。**结果** 根据超声测定 IMT 值分两组, T2DM 伴颈动脉硬化(CAS)组(120 例), T2DM 无 CAS 组(44 例)。与 T2DM 无 CAS 组比较, T2DM 伴 CAS 组年龄较大, 糖尿病病程较长($P < 0.01$), EMP、糖化血红蛋白、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、体质指数(BMI)水平升高($P < 0.05$)。多因素 LR Logistic 回归分析显示 EMP、LDL-C、BMI 是 CAS 独立危险因素(EMP OR = 1.382, $P = 0.023$; LDL-C OR = 5.992, $P = 0.050$; BMI OR = 1.837, $P = 0.017$)。**结论** 2 型糖尿病患者的 EMP、LDL-C、BMI 与 IMT 增厚有关, 为动脉硬化的独立危险因素, 可用于预测、评估其大血管病变风险。

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

Analysis of the Factors Influencing Artery Atherosclerosis of Type 2 Diabetic Patients

HU Li-Mei¹, REN Wei-Dong², ZHANG Bin³, WANG Jun-Ming¹, LIU Hong-Qiang⁴, MA Hong-Wei¹, XU Zheng-Rong², GU Jun², and SHI Li²

(1. Hebei North University, 2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, 3. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, 4. Department of Ultrasonography, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

[KEY WORDS] Endothelial Microparticles; Flow Cytometry; Type 2 Diabetes Mellitus; Carotid Intima-media Thickness

[ABSTRACT] **Aim** To explore the influence factors on atherosclerosis disease of type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Methods To investigate 164 cases of type 2 diabetes mellitus resident patients, flow cytometry was used to detect the plasma level of endothelial microparticles (EMP), ultrasonic was applied to measure the carotid intima-media thickness (IMT) and collect the relevant clinical indexes, risk factors of atherosclerosis in patients with type 2 diabetes were analyzed by multiple factor LR Logistic regression.

Results According to the ultrasonic measurement of IMT they were divided into two groups, T2DM with carotid atherosclerosis group (120 cases); T2DM without carotid atherosclerosis group (44 cases). Compared with T2DM without carotid atherosclerosis group, age was older, duration of diabetes were longer ($P < 0.01$) and EMP, glycosylated hemoglobin A1c (HbA1c), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), body mass index (BMI) levels were higher in T2DM with carotid atherosclerosis ($P < 0.05$). Multiple factor LR Logistic showed EMP, LDL-C, BMI were independent risk factors of carotid atherosclerosis (EMP OR = 1.382, 95% CI = 1.046 ~ 1.826, $P = 0.023$). **Conclusion** EMP, LDL-C, BMI were associated with IMT thickening in patients with type 2 diabetes, as the independent risk factors for atherosclerosis, can be used to predict and evaluate the risk of major vascular lesions.

血管内皮细胞在活化、损伤和(或)凋亡时,会 释放内皮细胞微粒(endothelial microparticle, EMP)。

[收稿日期] 2013-12-05

[作者简介] 胡利梅, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病血管并发症, E-mail 为 hulimei860720@163.com。通讯作者任卫东, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病并发症, E-mail 为 rwdlln@126.com。张斌, 主管检验师, 研究方向为流式细胞术的应用。

EMP 具有促凝、促炎症和改变血管功能、促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作用。颈动脉内膜中膜厚度(intima-media thickness, IMT)作为评价早期 As 的敏感指标,也可预测、评估糖尿病血管 As。有研究证实 EMP 在 As 和糖尿病视网膜病变过程中,具有促炎症反应的作用^[1,2]。而高血糖状态下,随着内皮功能的受损加重,血浆 EMP 水平会持续升高。2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者在发生血管 As 的过程中,EMP 是重要的参与因素。因此,探讨 EMP 与 T2DM 患者血管 As 危险程度的关系有一定意义。本研究通过检测 T2DM 患者 EMP 水平与 IMT,收集相关临床资料,探讨 2 型糖尿病患者动脉硬化的危险因素。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2012 年 6 月至 2013 年 8 月河北北方学院附属第一医院内分泌科住院的 2 型糖尿病患者(参考 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准)164 例,男 80 例,女 84 例,年龄 41~75 岁,平均 57.59 ± 9.62 岁。排除恶性肿瘤、糖尿病酮症、酮症酸中毒、高渗高血糖综合征、2 周内患有感染性疾病及 6 个月内有外伤、手术、精神刺激、急性心肌梗死等。

1.2 临床资料采集

记录入选患者的性别、年龄、糖尿病病程、既往病史(有无高血压、高血脂病史),常规测定患者糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin A1c, HbA1c)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、体质指数(body mass index, BMI)。

1.3 血浆 EMP 检测

采用 FACS Calibur 流式细胞仪进行检测。鼠抗人 CD31⁺藻红蛋白荧光素(phycoerythrin, PE)及鼠抗人 CD42b⁺异硫氰酸荧光素(fluoresceine isothiocyanate, FITC)均购自美国 BD 公司。(1)用含有柠檬酸钠的真空采血管采集清晨空腹静脉血 2 mL,采血后立即处理标本。(2)150 g 离心力离心 10 min 获得含丰富血小板血浆,1000 g 离心力离心 2 min 获得去血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)。(3)血浆 EMP 分析:取 50 μ L PPP 与 4 μ L PE 标记 CD31 单抗及 4 μ L FITC 标记 CD42b 单抗混合并室温下避光放置 20 min,0.5 mL PBS 稀释后,流式细胞仪上机进行分析。样本检测前以直径为 1.0 μ m 的标准微球于前向角定门,门内收集的微粒直径均 < 1.0 μ m。EMP 被定义为 CD31⁺/CD42b⁺的直径 < 1.0

μ m 的粒子,收集 10000 个微粒时停止计数,获得 CD31⁺/CD42b⁺的 EMP 百分比。

1.4 超声测定 IMT

采用 Aloka Prosound F75 彩色超声仪,探头频率 5~13 MHz。测量入选患者双侧颈动脉窦处、颈总动脉远端距分叉处 10 mm、颈内动脉起始端 10 mm 共 6 处 IMT 值,取其平均值。为保证测得 IMT 值的准确性,164 例患者均由同一位能够熟练操作并准确测量 IMT 值的超声科医师测量。根据 IMT 值将入选患者分为两组:(1)T2DM 伴颈动脉硬化(carotid atherosclerosis, CAS)组:120 例,IMT ≥ 1.0 mm,和/或有明显斑块;(2)T2DM 无 CAS 组:44 例,IMT < 1.0 mm,且无明显隆起斑块。

1.5 统计学处理

资料采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析。计数资料用百分比(%)表示,并进行 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行 t 检验;所有指标进行多因素 LR Logistic 回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 超声测定 IMT 结果

164 例入选的 2 型糖尿病患者颈部动脉 IMT 都清晰可见,彩色超声可清楚显示动脉斑块。根据 IMT 值分为两组:T2DM 伴 CAS 组,120 例,IMT ≥ 1.0 mm 和或有明显斑块;T2DM 无 CAS 组,44 例,IMT < 1.0 mm 且无明显隆起斑块(图 1)。

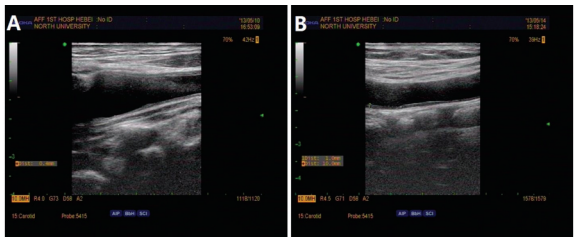


图 1 2 型糖尿病患者颈动脉超声图 A 为 T2DM 无 CAS 组,颈动脉内膜光滑,IMT = 0.4 mm;B 为 T2DM 伴 CAS 组,颈动脉内膜增厚,IMT = 1.0 mm。

Figure 1. Carotid artery in type 2 diabetes mellitus patients with echocardiography

2.2 两组血浆 EMP 水平比较

血浆 EMP 水平 T2DM 伴 CAS 组($11.94\% \pm 3.65\%$)明显高于 T2DM 无 CAS 组($7.76\% \pm 4.48\%$),有显著性差异($P < 0.01$;图 2)。

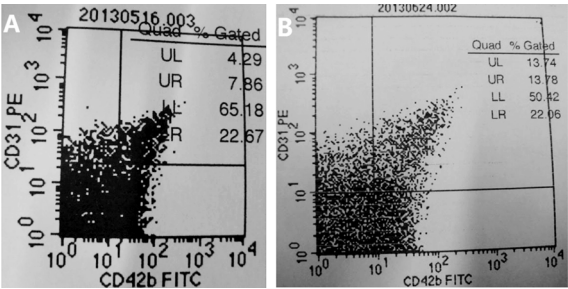


图 2. 2 型糖尿病患者血浆 CD31⁺/CD42b⁻ EMP 水平的流式图 A 为 T2DM 无 CAS 组,EMP 为 4.29%;B 为 T2DM 伴 CAS 组,EMP 为 13.74%;图中左上区为 CD31 阳性而 CD42b 阴性的内皮细胞微粒。

Figure 2. Flow chart of type 2 diabetes mellitus CD31⁺/CD42b⁻ EMP levels

表 1. 两组患者资料比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of patients data in two groups ($\bar{x} \pm s$)

项 目	T2DM 伴 CAS 组	T2DM 无 CAS 组	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄(岁)	60.07 ± 8.30 ^b	50.82 ± 10.08	2.985	0.005
病程(年)	9.87 ± 6.90 ^b	3.18 ± 5.23	2.913	0.006
内皮细胞微粒	11.94% ± 3.65% ^b	7.76% ± 4.48%	3.054	0.004
糖化血红蛋白	11.50% ± 2.48% ^a	9.70% ± 2.03%	2.157	0.037
LDLC(mmol/L)	3.33 ± 0.75 ^b	2.60 ± 0.65	2.840	0.007
体质指数(kg/m ²)	25.56 ± 2.53 ^a	23.57 ± 1.95	2.361	0.023
空腹血糖(mmol/L)	11.18 ± 4.06	13.74 ± 3.85	-1.777	0.083

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 T2DM 无 CAS 组比较。

表 2. 2 型糖尿病患者 IMT 单因素 Logistic 回归分析

Table 2. Carotid intima-media thickness of regression analysis of single factor Logistic in patients with type 2 diabetes

变 量	B	<i>P</i>	OR	95% CI
年龄	0.122	0.012	1.130	1.028 ~ 1.243
病程	0.199	0.015	1.220	1.039 ~ 1.432
内皮细胞微粒	0.278	0.010	1.320	1.068 ~ 1.632
糖化血红蛋白	0.378	0.046	1.459	1.008 ~ 2.114
LDLC	1.608	0.016	4.990	1.341 ~ 18.568
体质指数	0.486	0.036	1.625	1.031 ~ 2.560
空腹血糖	-0.156	0.091	0.856	0.714 ~ 1.025
男性	1.910	0.027	6.750	1.236 ~ 36.852
高血压病史	1.504	0.081	4.500	0.829 ~ 24.414
高血脂症病史	1.030	0.155	2.800	0.676 ~ 11.592

2.5 多因素 LR Logistic 回归分析

将单因素回归分析筛选出的具有统计学意义的因素进行多因素 LR Logistic 回归分析。EMP、LDLC、BMI 三个因素进入模块。结果显示:EMP、LDLC、BMI 是 CAS 独立危险因素(EMP OR = 1.382, P

2.3 两组患者临床参数对比分析

与 T2DM 无 CAS 组比较,T2DM 伴 CAS 组男性 72 例(60.0%, $\chi^2 = 22.534, P < 0.01$);有高血压病史 60 例(50.0%, $\chi^2 = 20.957, P < 0.01$);有高血脂症病史 84 例(70.0%, $\chi^2 = 8.361, P = 0.04$),均有显著性差异。与 T2DM 无 CAS 组比较,T2DM 伴 CAS 组年龄较高,糖尿病病程较长,差异有统计学意义($P < 0.01$);EMP、HbA1c、LDLC、BMI 水平升高,有显著性差异($P < 0.05$)(表 1)。

2.4 单因素 LR Logistic 回归分析

将所有指标进行单因素 LR Logistic 回归分析。其中性别、年龄、糖尿病病程、HbA1c、EMP、LDLC、BMI 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其余指标差异无统计学意义(表 2)。

= 0.023; LDLC OR = 5.992, $P = 0.050$; BMI OR = 1.837, $P = 0.017$; 95% CI 均不包含 1)。即在其他因素不变的情况下,EMP、LDLC、BMI 每增加一个单位,发生动脉硬化的相对危险度分别增加 0.382、4.992、0.837(表 3)。

表 3. 2 型糖尿病患者 IMT 多因素 Logistic 回归分析

Table 3. Carotid intima-media thickness of regression analysis of multi factor Logistic in patients with type 2 diabetes

变 量	B	<i>P</i>	OR	95% CI
内皮细胞微粒	0.324	0.023	1.382	1.046 ~ 1.826
LDLC	1.790	0.050	5.992	1.001 ~ 35.865
体质指数	0.608	0.017	1.837	1.113 ~ 3.030

3 讨 论

据流行病学调查,20 岁以上的成年人糖尿病患病率已达到 9.7%^[3]。糖尿病血管病变是导致患者致残、致死的主要并发症,其病理基础为动脉粥样

硬化。大量研究证实糖尿病患者多种致病因素(如持续高血糖、高血脂、肥胖等)共同参与血管内皮功能损伤及促炎症反应的发生,进而促进动脉硬化的发生、发展。

内皮细胞在损伤、缺氧或炎症刺激的过程中会释放 EMP。EMP 由细胞膜、表面蛋白和核物质组成,可作为反映内皮细胞功能的新型标记物,具有促凝、促炎症和改变血管功能、促进动脉硬化作用。Mezentsev 等^[4]发现随着 EMP 的浓度增加和作用时间的延长,内皮细胞凋亡加速,增殖率下降,损伤修复的能力降低,血管内皮损害加重。有研究证实 EMP 与核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6) 相关,具有促炎症反应和氧化应激的作用^[5,6],增加内皮功能损害;EMP 表面表达的许多黏附分子,如细胞间黏附分子 1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、E 选择素、F 选择素等,可稳固 EMP 与血小板的连接,促进血小板聚合物的形成,增加糖尿病患者血管狭窄、闭塞,甚至截肢的风险。由此推测定量检测 EMP 水平可能成为评估糖尿病血管 As 的指标。本研究通过流式细胞术检测 CD31⁺/CD42b⁻ 标记的 EMP 水平,发现 T2DM 伴 CAS 组 EMP 水平较 T2DM 无 CAS 组明显升高。而且通过多因素 LR Logistic 回归分析得出 EMP 是 CAS 的独立危险因素,OR 为 1.382;即在其他变量不变的情况下,EMP 每增加 1%,颈动脉内膜中膜厚度增加的相对危险度为 0.382。IMT 作为早期 As 的敏感指标,通过超声测得的 IMT 与解剖结果一致,可以反映全身血管 As 程度,因此本研究表明 EMP 是 As 的独立危险因素,EMP 定量检测可以作为预测、评估动脉硬化风险的敏感指标。有文献报道小檗碱、天麻钩藤颗粒干预治疗可降低 EMP 水平,有助于改善内皮功能,增加血管扩张^[7,8]。但把降低 EMP 水平作为潜在的治疗靶点应用于临床,还有待于进一步研究与探索。

动脉硬化的炎症学说认为氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)通过调节 NF- κB 的转录来调控、诱导内皮细胞的炎症反应^[9],促进动脉硬化的发生。同时有研究证实氧化应激也参与了颈动脉粥样硬化的发展^[10]。肥胖者过多的脂肪组织导致体内氧化应激水平升高,引起辅酶 II(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶亚基的表达增加,而糖尿病患者血管组织中 NADPH 氧化酶亚基的表达增加一直是公

认的。本研究表明,LDLC、BMI 为动脉硬化的独立危险因素,这与目前国内外的研究结果基本一致。因此,对糖尿病患者积极进行降脂治疗及控制体重有可能降低发生动脉硬化的风险,有利于延缓糖尿病患者血管并发症的发生、发展。

总之,EMP、LDLC、BMI 为 2 型糖尿病患者动脉硬化的独立危险因素,可以作为预测、评估 2 型糖尿病患者大血管病变风险的敏感指标。本研究也为将 EMP 作为潜在的治疗靶点提供了一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, et al. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1): 4-9.
- [2] Nomura S. Dynamic role of microparticles in type 2 diabetes mellitus[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2009, 5(4): 245-251.
- [3] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in china[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12): 1 090-101.
- [4] Mezentsev A, Merks RM, Riordan E, et al. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(3): H1 106-114.
- [5] Mesri M, Altieri DC. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in JNK1 signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(33): 23 111-118.
- [6] Chirinos JA, Zambrano JP, Virani SS, et al. Correlation between apoptotic endothelial microparticles and serum interleukin-6 and C-reactive protein in healthy men[J]. *Am J Cardiol*, 2005, 95(10): 1 258-260.
- [7] Cheng F, Wang Y, Li J, et al. Berberine improves endothelial function by reducing endothelial microparticles-mediated oxidative stress in humans[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(3): 936-942.
- [8] 沈智杰, 张莹, 王英杰, 等. 天麻钩藤颗粒治疗肝阳上亢型原发性高血压患者的临床疗效及对血管内皮功能的影响[J]. *中国医师杂志*, 2013, 15(06): 744-747.
- [9] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13(3): 249-253.
- [10] 王瑞良, 石晓欣. 氧化应激在成年男性颈动脉粥样硬化中的作用[J]. *中国医师杂志*, 2012, 2(22): 73-74.

(此文编辑 曾学清)