

新诊断 2 型糖尿病患者血浆中性粒细胞明胶酶相关脂蛋白与颈总动脉内膜中膜厚度的关系

李兴, 肖扬, 钟慧, 姚岚, 陈小燕, 冯琼, 唐炜立, 刘石平, 周智广

(中南大学湘雅二医院内分泌科 中南大学糖尿病中心 糖尿病免疫学教育部

重点实验室 国家代谢性疾病临床医学研究中心, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 2 型糖尿病; 血浆中性粒细胞明胶酶相关脂蛋白; 颈总动脉; 内膜中膜厚度

[摘要] **目的** 探讨新诊断 2 型糖尿病患者血浆中性粒细胞明胶酶相关脂蛋白(LCN2)浓度与颈总动脉内膜中膜厚度的关系。**方法** 共纳入 166 例年龄在 35~70 岁之间、病程在 1 年以内的新诊断 2 型糖尿病患者,同时选取同期的 65 例健康正常人作为对照。采用高分辨超声检测 2 型糖尿病患者颈总动脉内膜中膜厚度,用双抗体酶联免疫吸附法检测血浆 LCN2 浓度。**结果** 校正年龄、性别之后,2 型糖尿病组血浆 LCN2 浓度高于正常对照组($P < 0.05$)。将 2 型糖尿病组按照血浆 LCN2 浓度三分位分组,高浓度 LCN2 组颈总动脉内膜中膜厚度高于低浓度 LCN2 组($P = 0.026$)。在校正多个因素后,血浆 LCN2 浓度与颈总动脉内膜中膜厚度呈正相关($r = 0.197, P = 0.007$)。新诊断 2 型糖尿病患者的血浆 LCN2 浓度是其颈总动脉内膜中膜厚度增厚的相关因素之一。**结论** 新诊断 2 型糖尿病患者血浆 LCN2 浓度高于正常人,其血浆 LCN2 浓度与颈总动脉内膜中膜厚度呈正相关关系。血浆 LCN2 浓度上升可能是新诊断 2 型糖尿病患者颈总动脉内膜中膜厚度增厚的危险因素之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relationship Between the Concentration of Plasma Lipocalin-2 and Common Carotid Artery Intima-medial Thickness in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Patients

LI Xing, XIAO Yang, ZHONG Hui, YAO Lan, CHEN Xiao-Yan, FENG Qiong, TANG Wei-Li, LIU Shi-Ping, and ZHOU Zhi-Guang

(Department of Endocrinology, the Second Xiangya Hospital & Diabetes Center of Central South University & Key Laboratory of Diabetes Immunology of Educational Ministry & Center for Clinical and Medical Research of National Metabolic Disease, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Type 2 Diabetes Mellitus; Plasma Lipocalin-2; Common Carotid Artery; Intima-medial Thickness

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between the concentration of plasma lipocalin-2 (LCN2) and common carotid artery intima-medial thickness (CCA-IMT) in newly diagnosed type 2 diabetic patients. **Method** 166 newly diagnosed type 2 diabetic patients (age 35~70, duration ≤ 1 year) and 65 healthy people were recruited. CCA-IMT was detected by high-resolution ultrasonography, plasma concentration of LCN2 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Adjusting for age and sex, type 2 diabetics' plasma concentration of LCN2 was significantly higher than that in the healthy group ($P < 0.05$). According to the three tertile of plasma concentration of LCN2, the highest concentration group's CCA-IMT was significantly higher than that in the lowest concentration group ($P = 0.026$). In the multi-variables partial correlation analysis, adjusting for age, sex, body mass index (BMI), waist circumference

[收稿日期] 2014-08-15

[修回日期] 2014-10-06

[基金项目] 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT1195), 国家临床重点专科建设项目资助(卫办医政函[2011]873号)

[作者简介] 李兴, 硕士, 研究方向为糖尿病大血管病变及内分泌危重病, 现工作于长沙市中医医院重症医学科, E-mail 为 lixinghawk@aliyun.com。肖扬, 博士, 研究方向为糖尿病大血管病变及代谢综合征。钟慧, 硕士, 研究方向为糖尿病大血管病变, 现工作于南华大学第一附属医院诊断学教研室。通讯作者周智广, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为内分泌及糖尿病, E-mail 为 zhouzg@hotmail.com。

(WC), waist-to-hip ratio (WHR), diastolic blood pressure (DBP), hemoglobin A1c (HbA1c), fasting insulin (FIN), HOMA-IR, triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDLC), the positive relationship between circulating LCN2 and CCA-IMT was observed ($r=0.197, P=0.007$). Multiply linear regression analysis demonstrated that circulating LCN2 contributed to elevation of CCA-IMT in newly diagnosed type 2 diabetic patients. **Conclusion** Plasma concentration of LCN2 was much higher in newly diagnosed type 2 diabetic patients than that in healthy people. Plasma concentration of LCN2 was positively correlated with CCA-IMT in newly diagnosed type 2 diabetic patients. Elevation of plasma concentration of LCN2 was probably one of the independent risk factors contribute to the elevation of CCA-IMT in newly diagnosed type 2 diabetic patients.

糖尿病大血管病变是糖尿病主要慢性并发症之一,其主要病理基础是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)。颈总动脉内膜中膜厚度(common carotid artery intima-medial thickness, CCA-IMT)是反映早期 As 可靠的客观指标。目前认为 As 是一种多致病因素引起的疾病,主要相关因素有年龄、吸烟、高血糖、高血压、血脂代谢紊乱等,但其致 As 确切机制尚未完全清楚。探讨新的危险因素成了近年来糖尿病大血管病变研究的热点,新的脂肪因子中性粒细胞膜脂蛋白(lipoprotein, LCN2)就是其中之一。本研究将探讨新诊断 2 型糖尿病患者(type 2 diabetes mellitus, T2DM)血浆 LCN2 水平与 CCA-IMT 的关系,以寻找新诊断 T2DM 患者 CCA-IMT 增厚的危险因素,为临床监测和治疗 As 提供新的思路和靶点。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究共纳入 166 例新诊断 T2DM 患者,其中男性 90 例,女性 76 例,年龄 55 ± 6 岁,均来自 2001 年月至 2002 年 10 月在中南大学湘雅二医院内分泌科门诊新诊断 T2DM 的患者。纳入标准:符合 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准,病程 < 1 年;体质指数(body mass index, BMI) $19 \sim 35 \text{ kg/m}^2$;年龄 $35 \sim 70$ 岁;起病半年内无酮症或其他应激情况;无心、脑、肾及外周血管病变的相应临床表现,静息 12 导联心电图无明确心肌缺血表现。另外入选了同期 65 例健康人作为正常对照,其中男性 42 例,女性 23 例,年龄 42 ± 8 岁,均来源于长沙某社区居民体检资料。排除标准包括糖尿病家族史、糖耐量异常、合并感染或心脑血管等重要脏器病变及外周血管病变。本研究得到了中南大学湘雅二医院伦理委员会的批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 临床资料收集

所有研究对象均询问病史并进行体格检查。

进行身高、体重、腰围(waist circumference, WC)、血压、腰臀比(waist-to-hip ratio, WHR)测量,检测血脂、肝肾功能、空腹胰岛素(fasting insulin, FIN),心电图、颈动脉血管彩超检查。

1.3 颈总动脉内膜中膜厚度的检查

颈动脉血管彩超检查采用高分辨率彩色 B 超仪(美国 Acuson 128XP/10 型)测量 IMT,以右颈总动脉作为靶血管。颈总动脉主干内膜中膜测量位置为距颈动脉球部膨大起始处 10 mm 内最厚处,在同一位置连续测量三次取平均值。

1.4 循环血浆 LCN2 浓度的测定

采用香港大学李嘉诚医学院内科系和药理学系徐爱民教授实验室建立的双抗体夹心酶联免疫吸附法。检测步骤如下:(1)捕获抗体包被:LCN2 捕获抗体加入酶标板微孔中,每孔 $100 \mu\text{L}$,保鲜膜封口, 4°C 过夜。第二天,弃掉抗体,洗涤液洗 1 次,加封闭液,每孔 $300 \mu\text{L}$,室温 3 h。弃封闭液,室温干燥 1 h。保鲜膜封口,锡纸避光, 4°C 冷藏备用。(2)标准品稀释:用稀释液将标准品分别稀释至终浓度为 0.39、0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25 $\mu\text{g/L}$ 。(3)样本预处理:检测前从低温冰箱中取出置于室温中冻融后混匀,以 14000 r/min 离心 5 min 去脂。用稀释液将待测样本 1:20 稀释。(4)加样:已包被好 LCN2 捕获抗体的酶标板分别设空白孔、标准孔、待测样本孔。空白孔加稀释液 $100 \mu\text{L}$,余孔分别加标准品或待测样本 $100 \mu\text{L}$ 。室温孵育 1 h。每孔加入 $300 \mu\text{L}$ 洗涤液,放置 1 min 后拍干,洗涤 3 次。(5)加检测抗体:每孔 $100 \mu\text{L}$,室温孵育 1 h,用洗涤液洗涤 3 次。(6)加辣根过氧化物酶标记链霉亲和素:每孔 $100 \mu\text{L}$,室温孵育 20 min,用洗涤液洗涤 4 次。(7)显色:依序每孔加入显色试剂 $100 \mu\text{L}$,室温避光显色 15 min。(8)终止:依序每孔加入终止液 $50 \mu\text{L}$,终止反应。(9)比色:用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度值,减去空白孔的吸光度值,即得相对吸光度值。(10)计算浓度:用标准品的浓度与相对吸光度值计算出标准曲线的四参数

回归方程式,将样本的相对吸光度值代入方程式,计算出样本的 LCN2 浓度,再乘以稀释倍数,即为样本的实际 LCN2 浓度。此法批内变异系数 6.89%,批间变异系数 5.03%~7.64%。

1.5 统计学处理方法

统计分析均用 SPSS13.0 软件完成。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布的计量资料用中位数及四分位数间距表示,计数资料用例数或率表示。稳态模型评估的胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、LCN2、CCA-IMT 为非正态分布资料,经对数转换为正态分布资料后进行统计分析。多组均数比较采用单因素方差分析,多组间两两比较用 LSD 检验。LCN2 与其它代谢性指标相关性采用 Pearson 相关分析,LCN2 与 CCA-IMT 相关性采用偏相关分析;影响 CCA-IMT 多个危险因素采用多元逐步回归分析(逐步向前法), $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 T2DM 组与正常对照组临床指标的比较

与正常对照组相比,T2DM 组的年龄明显高于正常对照组 ($P < 0.01$),经年龄、性别校正后,T2DM 组的 LCN2、BMI、WC、WHR、收缩压 (SBP)、FIN、HOMA-IR、TG、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 均高于正常对照组 ($P < 0.05$),两组间舒张压 (DBP)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1)。

2.2 LCN2 不同浓度组 T2DM 患者 CCA-IMT 及其它临床指标水平

将 T2DM 患者按照血浆 LCN2 浓度三分位分组,三组患者 CCA-IMT 随 LCN2 浓度的增加而增加,组间比较显示,高浓度 LCN2 组的 CCA-IMT 高于低浓度 LCN2 组 ($P = 0.026$)。三组间糖化血红蛋白 (HbA1c)、FIN 比较差异有统计学意义,高浓度 LCN2 组的 HbA1c、FIN 高于中浓度 LCN2 组和低浓度 LCN2 组,高浓度 LCN2 组的 TG 高于低浓度 LCN2 组,中浓度 LCN2 组 FIN 高于低浓度 LCN2 组 ($P < 0.05$)。HOMA-IR 在三组间有随 LCN2 浓度增加而增加的趋势,但差异无统计学意义。三组间 TC、HDLC、LDLC 差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 2)。

表 1. T2DM 组与正常对照组临床指标的比较

Table 1. Comparison of the clinical features between T2DM group and normal group

临床指标	正常对照组 ($n = 65$)	T2DM 组 ($n = 166$)
年龄 (岁)	42 ± 8	55 ± 8 ^b
男/女 (例)	42/23	90/76
BMI (kg/m ²)	21.9 ± 1.4	24.5 ± 2.7 ^{bc}
WC (cm)	77.6 ± 6.3	87.1 ± 8.2 ^{bc}
WHR	0.84 ± 0.06	0.90 ± 0.06 ^{bc}
SBP (mmHg)	112 ± 14	118 ± 16 ^{ac}
DBP (mmHg)	75 ± 10	76 ± 10
FIN (mU/L)	7.5 ± 5.1	11.7 ± 4.5 ^{bc}
HOMA-IR	1.87 (0.23 ~ 8.51)	2.43 (0.75 ~ 15.10) ^{bc}
TG (mmol/L)	1.79 (0.40 ~ 4.58)	2.43 (0.43 ~ 15.50) ^{bc}
TC (mmol/L)	4.89 ± 0.88	5.32 ± 1.16 ^{ac}
HDLC (mmol/L)	1.28 ± 0.32	1.32 ± 0.35
LDLC (mmol/L)	3.00 ± 0.73	3.10 ± 0.97
LCN2 (μg/L)	32.8 (10.8 ~ 118.2)	118.3 (10.7 ~ 1546.0) ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;经年龄、性别校正后, c 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较。

表 2. LCN2 不同浓度组 T2DM 患者 CCA-IMT 及其它临床指标比较

Table 2. Comparison of CCA-IMT and other clinical indexes among the different concentration of LCN2 groups in T2DM patients

临床指标	低浓度 LCN2 组 ($n = 55$)	中浓度 LCN2 组 ($n = 55$)	高浓度 LCN2 组 ($n = 56$)
LCN2 (μg/L)	47.9 (10.7 ~ 68.3)	97.0 (69.2 ~ 135.9) ^b	209.0 (133.8 ~ 1546.0) ^b
HbA1c	7.1% ± 2.3%	8.1% ± 2.1%	8.4% ± 2.7% ^{ac}
FIN (mU/L)	12.4 ± 6.9	13.3 ± 8.6 ^a	16.9 ± 10.1 ^{bc}
HOMA-IR	3.87 (0.75 ~ 10.08)	4.87 (0.87 ~ 20.00)	5.18 (0.87 ~ 20.42)
TG (mmol/L)	1.95 (0.50 ~ 4.56)	2.58 (0.43 ~ 17.70)	2.79 (0.63 ~ 15.05) ^a
TC (mmol/L)	5.31 ± 1.00	5.28 ± 1.35	5.33 ± 1.12
HDLC (mmol/L)	1.36 ± 0.29	1.28 ± 0.29	1.30 ± 0.45
LDLC (mmol/L)	3.15 ± 0.90	3.01 ± 0.89	3.11 ± 1.11
CCA-IMT (mm)	0.73 ± 0.18	0.75 ± 0.17	0.81 ± 0.22 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$,与低浓度 LCN2 组比较; c 为 $P < 0.01$,与中浓度 LCN2 组比较。

2.3 相关分析

正常对照组 LCN2 与 CCA-IMT 无明显相关性 ($P > 0.05$)。将新诊断 T2DM 患者的 LCN2 与 CCA-IMT、年龄、性别、吸烟史、饮酒史、高血压史、高血脂史及各项物理、生化指标进行相关性分析,发现 LCN2 与 CCA-IMT、BMI、WC、WHR、DBP、HbA1c、FIN、HOMA-IR、TG 呈正相关。在校正年龄、性别、BMI、WC、WHR、DBP、HbA1c、FIN、HOMA-IR、TG、LDLC 后, LCN2 与 CCA-IMT 仍呈正相关 ($r = 0.197$, $P = 0.007$)。

2.4 多元回归分析

以 T2DM 组的 CCA-IMT 为应变量,年龄、吸烟史、饮酒史、高血压史、高血脂史、LCN2、BMI、WC、WHR、SBP、DBP、FIN、HOMA-IR、TG、TC、HDL、LDLC 为自变量 (X_1, \dots, X_{17}), 作多元逐步回归分析 (逐步向前法, $\alpha_{\text{入}} = 0.05$, $\alpha_{\text{出}} = 0.10$), 结果显示进入多元线性回归方程有 2 个, 按标准回归系数大小分别为 LCN2 和年龄 (表 3)。

表 3. 新诊断 T2DM 患者 CCA-IMT 影响因素的多元回归分析

Table 3. Multivariate stepwise regression analysis of the CCA-IMT in T2DM patients

变量	β	SE	P
LCN2	0.12	0.05	0.012
年龄	0.05	0.02	0.004

3 讨论

LCN2 又称铁转运蛋白、24p3, 是 Kjeldsen 等^[1]在 1993 年研究基质金属蛋白酶 9 时发现的一种分子量为 25 kDa 的蛋白质。LCN2 能运输疏水性小分子如白三烯、胆固醇、前列腺素、游离脂肪酸、血小板激活因子, 参与细胞内铁离子转运、免疫炎症反应, 是肾脏急性受损的生物标志。最新的研究认为 LCN2 是人体内的一种炎症因子, 其一级结构的核心部分由疏水性的芳香族氨基酸残基构成, 此位点可以结合中性粒细胞趋化肽 N-甲酰-1-甲硫-1-亮氨酸-L-苯丙氨酸^[2,3], 激活中性粒细胞产生大量活性氧 (ROS) 促进内皮细胞炎症反应, 促成 As 发生。此外, LCN2 能促进 LDLC 与其受体 Megalin 结合进入巨噬细胞内, 过多的 LDLC 在巨噬细胞内大量聚集, 导致巨噬细胞转化为泡沫细胞, 直接导致 As 发生, 引起动脉内膜中膜增厚。故 LCN2 可能是 As 发生

的独立危险因素, 而 CCA-IMT 是目前无创检查中评价 As 的金指标, 两者可能呈正相关关系。

Hemdahl 等人^[4]报道, LCN2 与基质金属蛋白酶 9 形成的二聚体在颈动脉狭窄患者 As 斑块脂质核心中检出水平明显高于正常人。该二聚体形成有利于基质金属蛋白酶 9 分解粥样硬化斑块, 分解后的物质进入血循环可导致急性心脑血管事件的发生^[5]。我国一项横断面研究^[6]亦发现血浆 LCN2 浓度上升与代谢综合征和冠状动脉粥样硬化性心脏病发生呈正相关。但目前 LCN2 与新诊断 T2DM 患者 CCA-IMT 相关性直接报道较少。本研究利用多变量偏相关分析发现, 在校正年龄、性别、血脂、肥胖程度、胰岛素抵抗、糖化血红蛋白因素后, 血浆 LCN2 浓度仍与新诊断 T2DM 患者 CCA-IMT 呈正相关。进一步研究显示血浆 LCN2 浓度是影响新诊断 T2DM 患者 CCA-IMT 最重要的因素。故初步认为随血浆 LCN2 浓度升高, 新诊断 T2DM 患者 CCA-IMT 增加, 其发生 As 风险增加。对血浆 LCN2 浓度升高的新诊断 T2DM 患者, 有必要采取综合干预措施, 以减少其心脑血管事件的发生。

综上所述, 血浆 LCN2 浓度是影响新诊断 T2DM 患者 CCA-IMT 增加的危险因素之一, 血浆 LCN2 浓度可能是新诊断 T2DM 患者超早期 As 标志物。

[参考文献]

- [1] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengel H, et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase[J]. J Biol Chem, 1993, 268(14): 10 425.
- [2] Allen RA, Erickson RW, Jesaitis AJ. Identification of a human neutrophil protein of Mr 24000 that binds N-formyl peptides: co-sedimentation with specific granules[J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 991(1): 123-133.
- [3] Sengelov H, Boulay F, Kjeldsen L, et al. Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils[J]. Biochem J, 1994, 299(2): 473-479.
- [4] Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(1): 136-142.
- [5] Smith C, Damas JK, Otterdal K, et al. Increased levels of neutrophil-activating peptide-2 in acute coronary syndromes; possible role of platelet-mediated vascular inflammation[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48: 1 591-599.
- [6] Ni J, Ma X, Zhou M, et al. Serum lipocalin-2 levels positively correlate with coronary artery disease and metabolic syndrome[J]. Cardiovascular Diabetology, 2013, 12: 176.

(此文编辑 许雪梅)