

可溶性程序性死亡因子 1 与 2 型糖尿病并 颈动脉粥样硬化斑块的相关性分析

顾静¹, 陆燕¹, 方勇², 仲怀琴¹, 缴克华¹

(华东疗养院 1. 内科, 2. 检验科, 江苏省无锡市 214065)

[关键词] 可溶性程序性死亡因子 1; 共刺激分子; 2 型糖尿病; 颈动脉粥样硬化; 斑块

[摘要] 目的 探讨血清可溶性程序性死亡因子 1 (sPD-1) 与 2 型糖尿病 (T2DM) 患者合并颈动脉粥样硬化 (CAS) 斑块的相关性。方法 选择 87 例 T2DM 患者作为研究对象, 另外选择 33 例糖耐量正常者作为对照组。T2DM 患者根据有无 CAS 斑块分为 2 组: T2DM 无 CAS 组 40 例和 T2DM 并 CAS 组 47 例。检测并比较各组血清 sPD-1 浓度和生物化学指标。分析 sPD-1 与各指标的相关性。用 ROC 曲线分析 sPD-1 对 T2DM 并 CAS 斑块的预测价值。结果 T2DM 无 CAS 组的 sPD-1 浓度显著高于对照组 ($P < 0.05$), T2DM 并 CAS 组的 sPD-1 浓度显著高于对照组和 T2DM 无 CAS 组 ($P < 0.05$)。sPD-1 与年龄、腰臀比、甘油三酯、空腹血糖、糖化血红蛋白、空腹胰岛素、高敏 C 反应蛋白呈正相关 ($P < 0.05$), 与性别 (以男性为参照)、高密度脂蛋白胆固醇、脂蛋白 (a) 呈负相关 ($P < 0.05$)。ROC 分析提示 sPD-1 对 T2DM 并 CAS 斑块形成的诊断价值为中等 ($P < 0.05$)。结论 血清 sPD-1 可能参与 T2DM 及动脉粥样硬化斑块的形成、发展过程, 对 T2DM 并 CAS 斑块形成有预测价值。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Correlation analysis between soluble programmed cell death-1 and type 2 diabetes mellitus with carotid atherosclerosis plaque

GU Jing¹, LU Yan¹, FANG Yong², ZHONG Huaiqin¹, JIAO Kehua¹

(1. Department of Medicine, 2. Clinical Laboratory, Huadong Sanatorium, Wuxi, Jiangsu 214065, China)

[KEY WORDS] soluble programmed cell death-1; costimulatory molecule; type 2 diabetes mellitus; carotid atherosclerosis; plaque

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the correlation between serum soluble programmed cell death-1 (sPD-1) and carotid atherosclerosis (CAS) plaque in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** 87 patients with T2DM were selected as the study subjects, and 33 cases with normal glucose tolerance were selected as the control group. According to the presence or absence of CAS plaque, T2DM patients were divided into two groups: 40 cases in T2DM without CAS group and 47 cases in T2DM with CAS group. Serum sPD-1 concentration and biochemical parameters were detected and compared in each group. The correlation between sPD-1 and each index was analyzed. ROC curve was used to analyze the predictive value of sPD-1 for T2DM with CAS plaque. **Results** The concentration of sPD-1 in T2DM without CAS group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The concentration of sPD-1 in T2DM with CAS group was significantly higher than that in control group and T2DM without CAS group ($P < 0.05$). sPD-1 was positively correlated with age, waist-hip ratio, triglyceride, fasting blood glucose, glycosylated hemoglobin A1c, fasting insulin and high-sensitivity C-reactive protein ($P < 0.05$), negatively correlated with gender (male as reference), high density lipoprotein cholesterol and lipoprotein (a) ($P < 0.05$). ROC analysis indicated that the diagnostic value of sPD-1 in T2DM with CAS plaque formation was moderate ($P < 0.05$). **Conclusion** Serum sPD-1 may be involved in the formation and development of T2DM and atherosclerotic plaque, and it has predictive value for T2DM with CAS plaque formation.

[收稿日期] 2019-01-18

[修回日期] 2019-04-08

[作者简介] 顾静, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病及其并发症, E-mail 为 g950324@163.com。通信作者陆燕, 副主任医师, 研究方向为动脉硬化性疾病, E-mail 为 lygj20189@163.com。

随着人口老龄化以及人们饮食结构、生活方式的变化,糖尿病已成为继心血管病及肿瘤之后的第三大非传染性疾病^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)疾病已经成为 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的重要并发症和主要死亡原因,其形成和发展是一低水平的慢性炎症的过程^[2-3]。可溶性共刺激分子是一种新近发现的炎症标志物,在免疫和炎症反应中起着重要的信号转导作用^[4-5]。程序性死亡因子 1(programmed cell death-1, PD-1)作为负性共刺激分子,在肿瘤免疫治疗领域应用广泛^[6],但 PD-1 在 T2DM 合并颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)斑块形成过程中所发挥的作用还缺乏了解。本研究拟通过检测和比较 T2DM 合并 CAS 患者血清可溶性共刺激分子 PD-1(soluble PD-1, sPD-1)的表达水平,探讨血清 sPD-1 与 T2DM 患者合并 CAS 的相关性以及 sPD-1 在 CAS 斑块形成中的作用及其潜在的临床价值。

1 资料和方法

1.1 研究对象及分组

以进行健康体检发现的 87 例 T2DM 患者作为研究对象,其中男 58 例,女 29 例,年龄 33~74 岁,平均(58.00±8.03)岁;另选择同期进行健康体检的 33 例糖耐量正常者作为对照组,其中男 24 例,女 9 例,年龄(59.52±10.34)岁。糖尿病的诊断参照世界卫生组织(WHO)1999 年的诊断及分型标准。排除标准:糖尿病合并急性并发症、恶性肿瘤、近期重大手术或外伤史、严重脏器功能障碍及妊娠或哺乳期妇女。所有入选的糖尿病患者均通过饮食、运动或口服药物的方式控制血糖,无胰岛素治疗者。根据有无合并 CAS 将 87 例 T2DM 患者进一步分为:T2DM 无 CAS 组 40 例,其中男 25 例,女 15 例,年龄(50.82±10.04)岁;T2DM 并 CAS 组 47 例,其中男 33 例,女 14 例,年龄(61.18±11.20)岁。3 组受试者的年龄和性别构成差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究获得医院伦理委员会批准,并获得所有受试者的书面知情同意。

1.2 一般资料采集

收集一般资料,包括年龄、性别、吸烟及饮酒情况,测量收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、身高、体质量、腰臀比(waist-to-hip ratio, WHR),并计算体质指数

(body mass index, BMI)。

1.3 实验室检测

所有研究对象于清晨、空腹、坐位抽取静脉血,使用日立 7180 型自动生物化学分析仪检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、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)及脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]。糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin A1c, HbA1c)的检测用高压液相离子交换层析法,高敏 C 反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)和纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)的测定采用免疫比浊法。酶联免疫吸附技术(ELISA)用于血清 sPD-1 浓度的测定;鼠抗人 sPD-1 试剂盒由苏州旭光科星生物技术有限公司提供。

1.4 颈动脉超声检查

所有受试者均由有资质的血管超声医师使用美国 GE 彩色多普勒超声检查,检测双侧颈总动脉、颈外动脉以及颈内动脉,测量颈动脉血管内膜中膜厚度(intima-media thickness, IMT)。IMT \geq 1.2 mm,且形态不规则,定义为 As 斑块形成^[7]。

1.5 统计学方法

所有数据采用 SPSS 17.0 进行分析。计量资料正态分布数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布数据采用中位数和四分位距表示,计数资料以例(%)表示;计量资料的比较采用方差分析,计数资料用 χ^2 检验;采用 Pearson 或 Spearman 法行两变量间的相关性分析;危险因素分析采用二元 Logistic 回归分析;sPD-1 对 T2DM 并 CAS 斑块的预测价值采用 ROC 曲线分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料、生物化学指标及 sPD-1 比较

3 组受试者的年龄和性别构成差异无统计学意义($P>0.05$)。T2DM 无 CAS 组的 BMI、WHR、吸烟、TG、HDLC、Lp(a)、HbA1c、FBG、FINS、sPD-1 显著高于对照组($P<0.05$);T2DM 并 CAS 组的 BMI、WHR、SBP、吸烟、饮酒、TG、HDLC、Lp(a)、HbA1c、FBG、FINS、hs-CRP、sPD-1 显著高于对照组($P<0.05$);T2DM 并 CAS 组的 WHR、SBP、饮酒、sPD-1 显著高于 T2DM 无 CAS 组($P<0.05$)(表 1)。

表 1. 3 组一般资料、生物化学指标及 sPD-1 比较

Table 1. Comparison of general data, biochemical indexes and sPD-1 in three groups

分 组	对照组 (n=33)	T2DM 无 CAS 组 (n=40)	T2DM 并 CAS 组 (n=47)
男/女 (例)	24/9	25/15	33/14
年龄 (岁)	59.52±10.34	58.00±8.03	61.18±11.20
BMI (kg/m ²)	23.06±3.60	24.80±3.28 ^a	26.14±3.57 ^a
WHR	0.83±0.05	0.87±0.46 ^a	0.90±0.05 ^{ab}
SBP (mmHg)	118.50±12.71	124.93±18.84	132.41±19.24 ^{ab}
DBP (mmHg)	70.36±6.75	72.88±10.75	74.59±10.68
吸烟 [例 (%)]	1 (3.03)	14 (35.00) ^a	14 (29.79) ^a
饮酒 [例 (%)]	2 (6.06)	4 (10.00)	21 (44.68) ^{ab}
TG (mmol/L)	1.29±0.59	2.24±1.55 ^a	2.74±0.39 ^a
TC (mmol/L)	5.03±1.01	5.18±0.86	5.12±1.39
LDLC (mmol/L)	2.98±0.76	3.13±0.74	2.99±0.77
HDLc (mmol/L)	1.60±0.44	1.29±0.44 ^a	1.25±0.35 ^a
Lp(a) (mg/L)	102.0 (74.0, 331.0)	72.5 (33.3, 137.0) ^a	47.0 (25.0, 124.5) ^a
HbA1c (%)	5.58±0.30	6.98±1.13 ^a	6.91±1.13 ^a
FBG (mmol/L)	5.54±0.40	8.00±1.63 ^a	7.89±1.84 ^a
FINS (mIU/L)	35.14 (26.97, 47.98)	75.54 (42.36, 120.57) ^a	45.84 (35.68, 61.25) ^a
hs-CRP (mg/L)	10.59 (0.46, 1.10)	1.43 (0.72, 4.13)	1.10 (0.57, 2.48) ^a
FIB (g/L)	2.83±0.44	2.93±0.63	2.91±0.66
sPD-1 (μg/L)	0.05 (0.03, 0.22)	0.87 (0.71, 0.97) ^a	1.38 (0.99, 1.63) ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 T2DM 无 CAS 组比较。

2.2 sPD-1 与各指标的相关性分析

sPD-1 与年龄、WHR、TG、FBG、HbA1c、FINS、hs-CRP 呈正相关 ($P < 0.05$), 与性别 (以男性为参

照)、HDLc、Lp(a) 呈负相关 ($P < 0.05$), 与 BMI、SBP、DBP、吸烟、饮酒、TC、LDLC、FIB 不相关 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2. sPD-1 与各指标的相关性

Table 2. Correlation between sPD-1 and each index

项目	年龄	WHR	TG	FBG	HbA1c	FINS	hs-CRP	性别	HDLc	Lp(a)
r 值	0.364	0.382	0.197	0.390	0.466	0.348	0.257	-0.256	-0.234	-0.356
P 值	0.000	0.000	0.030	0.000	0.000	0.001	0.022	0.003	0.010	0.000

2.3 二元 Logistic 回归分析 T2DM 并 CAS 斑块的影响因素

以 T2DM 是否合并 CAS 斑块作为因变量, 校正性别、吸烟、饮酒, 以本研究检测的所有指标为自变量, 行二元 Logistic 回归分析, 结果显示年龄 ($\beta = 0.072, P = 0.022$)、饮酒 (以不饮酒为参照) ($\beta = -1.926, P = 0.012$) 是 T2DM 合并 CAS 斑块的影响因素 (表 3)。

2.4 sPD-1 对 T2DM 并 CAS 斑块的诊断价值

T2DM 患者中, 以 sPD-1 为检验变量, 超声诊断的 CAS 作为状态变量, 进行 ROC 曲线分析 (图 1),

结果显示 sPD-1 诊断 CAS 的 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 0.79 ($P < 0.001$), 切点为 0.995 $\mu\text{g/L}$, 敏感度为 0.755, 特异度为 0.775, Youden 指数为 0.55。

表 3. T2DM 并 CAS 斑块的影响因素

Table 3. Influencing factors of T2DM with CAS plaque

变量	β	SE	Wals	P	OR	95% CI
年龄	0.072	0.031	5.259	0.022	1.075	1.011 ~ 1.143
饮酒	-1.926	0.765	6.344	0.012	0.146	0.033 ~ 0.652

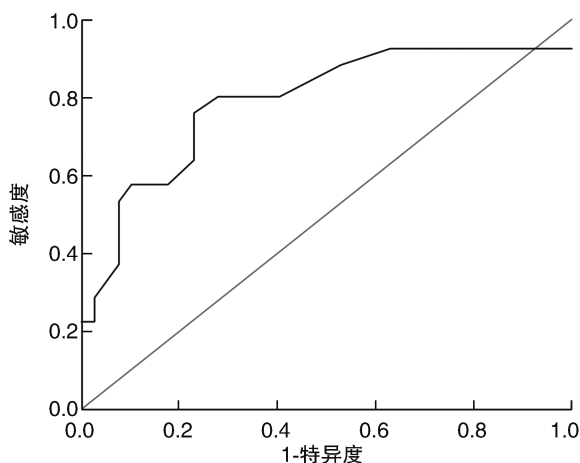


图 1. sPD-1 预测 T2DM 并 CAS 斑块的 ROC 曲线

Figure 1. ROC curve of sPD-1 predicting CAS plaque in T2DM

3 讨论

T 细胞的活化需 2 种信号的协同,第 1 信号为抗原信号,由 T 细胞表面的抗原受体识别,并向 T 细胞传递;第 2 信号为共刺激信号,是 T 细胞和抗原递呈细胞表面的共刺激分子之间的相互作用。共刺激信号决定了 T 细胞的转归,包括活化增殖、抑制、无反应或者凋亡^[8]。可溶型和膜型是共刺激分子的 2 种存在形式,膜型表达于细胞膜上,可溶型即可溶性共刺激分子存在于体液中,二者均参与了共刺激信号的介导和调节。可溶性共刺激分子参与血液循环,能和远隔部位的细胞表面的受体结合而发挥效应,它作用的广度和深度可能远远超过膜型,而且由于其存在于体液中,因此能够被更为便捷的检测到^[9-10]。

PD-1 属于共刺激分子 28 (CD28) 家族,介导负性信号,广泛表达于心、肺、肝等实质器官和各种免疫细胞表面。由于其负性信号功能基本确定,PD-1 在恶性肿瘤、器官移植、自身免疫性疾病及慢性病毒感染领域应用广泛^[11],但在糖尿病领域中研究不多。Ansari 等^[12]在 1 型糖尿病动物模型的研究中发现,PD-L1 的抑制性免疫应答可以对 β 胰岛细胞起到保护作用。阻断 PD-1/PD-L1 信号后发现模型动物的胰腺自身免疫应答反应明显增强,加重糖尿病病情。目前研究显示 sPD-1 是由 T 细胞表面的 PD-1 Δ ex3 异构体产生,天然阻断 PD-1 信号^[13]。本研究显示 T2DM 患者血清 sPD-1 水平较对照组显著升高,与上述研究结果基本一致。同时本文资料还显示 sPD-1 与 FBG、HbA1c、FINS 呈正相关,提示

sPD-1 表达与 T2DM 病情控制程度相关。

目前关于 PD-1 与 As 关系的研究不多, Lee 等^[14]利用冠心病患者外周血细胞进行体外培养,发现通过阻断 T 细胞上的 PD-1 分子,可以使 T 细胞激活,炎性因子干扰素 γ 和白细胞介素 4 的分泌增加,从而促进氧化应激,导致血管内皮损伤,加速 As 斑块的形成和发展,提示 PD-1 的负性功能对血管内皮有保护作用。而 sPD-1 具有阻断 PD-1/PD-L1 负性信号通路的作用^[15-16],引起负性与正性共刺激信号的调节失衡,促进了炎症进展及斑块形成。本研究也显示在 T2DM 患者中,伴有 CAS 斑块者血清 sPD-1 水平较不伴 CAS 斑块者显著升高,提示 sPD-1 可能参与 T2DM 并 CAS 斑块的发生、发展,但是 sPD-1 不是 T2DM 并 CAS 斑块形成的独立危险因素。ROC 曲线分析显示,血清 sPD-1 浓度为 0.995 μ g/L 可以作为 T2DM 并 CAS 斑块的诊断切点,诊断的敏感性为 0.755,特异性为 0.775, AUC 为 0.79,提示 sPD-1 对 T2DM 并 CAS 斑块具有中等诊断价值。

As 斑块的形成受多种因素影响^[17],sPD-1 及其配体的相互作用能够促进炎症反应,可能在 T2DM 患者合并 As 斑块的形成中发挥着重要的作用。未来还需要临床大样本前瞻性干预研究以进一步明确,为 T2DM 合并 As 斑块的治疗提供新的思路。

[参考文献]

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版) [J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(8): 2-42.
- [2] 李云攀, 刘美云, 赵文娜, 等. 瑞舒伐他汀联合普罗布考对大鼠动脉粥样硬化炎症与氧化应激的干预效果 [J]. 中国循证心血管杂志, 2014, 6(3): 352-355.
- [3] 苏珂, 龙艳, 黄漓莉, 等. 2 型糖尿病高尿酸患者动脉粥样硬化与白细胞介素 10 和脂联素的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4): 331-335.
- [4] Tse K, Tse H, Sidney J, et al. T cells in atherosclerosis [J]. Int Immunol, 2013, 25(11): 615-622.
- [5] Fan J, Watanabe T, 王燕, 等. 炎症反应在动脉粥样硬化发病学中的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(7): 706-708.
- [6] Riella LV, Paterson AM, Sharpe H, et al. Role of the PD-1 pathway in the immune response [J]. Am J Transplant, 2012, 12(10): 2575-2587.
- [7] Huang LC, Lin RT, Chen CF, et al. Predictors of carotid intima-media thickness and plaque progression in a Chinese population [J]. J Atheroscler Thromb, 2016, 23(8): 940-949.

- [8] Dong C, Nurieva RI, Prasad DV. Immune regulation by novel costimulatory molecules [J]. *Immunol Res*, 2003, 28(1): 39-48.
- [9] Pan XC, Li L, Mao JJ, et al. Synergistic effects of soluble PD-1 and IL-21 on antitumor immunity against H22 murine hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(1): 90-96.
- [10] Song MY, Park SH, Nam HJ, et al. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8⁺ T-cell responses by soluble PD-1 [J]. *J Immunother*, 2011, 34(3): 297-306.
- [11] 王娟, 姚刚. PD-1 信号通路在疾病治疗方面的应用 [J]. *生命的化学*, 2014, 34(6): 765-773.
- [12] Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulated autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(1): 63-69.
- [13] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharp AH. The B7 family revisited [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23(1): 515-548.
- [14] Lee YW, Hirani AA. Role of interleukin-4 in atherosclerosis [J]. *Arch Pharm Res*, 2006, 29(1): 11-15.
- [15] He YE, Zhang GM, Wang XH, et al. Blocking programmed death-1 ligand-PD-1 interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine [J]. *J Immunol*, 2004, 173(8): 4919-4928.
- [16] Geng H, Zhang GM, Xiao H, et al. HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(11): 2657-2664.
- [17] 周小莉, 林尤斌, 王斐, 等. 2 型糖尿病患者并发动脉粥样硬化的影响因素分析 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2016, 24(2): 155-157.
- (此文编辑 曾学清)

(上接第 974 页)

- [26] 彭红艳. 同型半胱氨酸致血管内皮细胞骨架肌动蛋白损伤的实验研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2008: 24-27.
- [27] 李春亚, 任颜颜, 范永省. 脉压差与老年高血压病患者动脉硬化形成的关系研究 [J]. *医药论坛杂志*, 2011, 32(1): 36-37.
- [28] 杨欣, 丁毅. 颈动脉粥样硬化危险因素及意义的研究进展 [J]. *医学综述*, 2015, 21(2): 239-241.
- [29] 王广娟, 赵颖馨, 张慧, 等. 吸烟及高同型半胱氨酸血症对冠心病的交互作用 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(3): 468-471.
- [30] 庞阳. 吸烟与冠状动脉粥样硬化程度的相关性研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2018: 17-20.
- [31] 张洁琼, 任力杰, 韩漫夫, 等. 吸烟与颈动脉斑块形成及其性质的相关性研究 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(30): 26-29.
- [32] 商鲁翔. 山东省中老年人颈动脉斑块的危险因素及聚集性分析 [D]. 济南: 济南大学, 2017: 29-31.
- [33] 张丽娟. 肥胖儿童血浆同型半胱氨酸的变化及其相关因素的分析 [D]. 大连: 大连医科大学, 2010: 20-23.
- [34] 钟华荣, 吕安康, 沈卫峰. 从分子机制探讨肥胖致动脉粥样硬化 [J]. *国际心血管病杂志*, 2007, 34(5): 327-330.
- [35] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南 (2016 年修订版) [J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(10): 937-953.
- [36] 中国成人血脂异常防治指南 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(5): 390-419.
- [37] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2015, 36(2): 141-152.
- (此文编辑 朱雯霞)