

血浆护骨素水平与内皮祖细胞在老年 2 型糖尿病患者血管病变中的关系探讨

毛文文¹⁾, 李会芳²⁾, 申政磊³⁾, 田伟盟¹⁾, 陈国强¹⁾, 郭伟昌⁴⁾

(1) 昆明市第二人民医院老年科, 云南昆明 650204; 2) 昆明医科大学第一附属医院内分泌二科, 云南昆明 650032; 3) 云南省肿瘤医院血液科, 云南昆明 650118; 4) 昆明医科大学体育部, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨老年 2 型糖尿病 (T2DM) 患者血浆护骨素 (OPG) 水平与外周血内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 含量的相关性, 并分析在老年 T2DM 血管病变中的作用. **方法** (1) 采用流式细胞仪测定 20 例初诊 T2DM 患者、20 例血糖控制良好 (HbA1c < 7%) T2DM 患者 (A 组)、20 例血糖控制中等 (HbA1c 7% ~ 11%) T2DM 患者 (B 组)、20 例血糖控制较差 (HbA1c > 11%) T2DM 患者 (C 组) 及 10 例糖耐量正常的健康对照者外周血中 EPCs 的含量; (2) 采用酶联免疫分析法检测上述患者的血浆 OPG 水平. **结果** (1) EPCs 在 T2DM 组低于健康对照组, OPG 在 T2DM 组高于健康对照组, 且均有统计学差异 ($P < 0.05$); (2) C 组血浆 EPCs 的水平低于 B 组及 A 组, B 组低于 A 组, 且有统计学差异 ($P < 0.05$); C 组血浆 OPG 的水平高于 B 组及 A 组 ($P < 0.01$), B 组血浆 OPG 的水平高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); (3) 单因素分析结果显示, 糖尿病患者外周血中 OPG 水平与 EPCs 含量呈负相关 ($r = -0.354$, $P < 0.05$); 多元回归分析结果显示, FPG、OPG、EPCs 为血管病变的影响因素 ($P < 0.05$). **结论** 老年 T2DM 患者中空腹血清 OPG 水平与 EPCs 存在一定关系, 二者可能在老年 T2DM 血管病变发生发展中发挥一定作用.

[关键词] 2 型糖尿病; 护骨素; 内皮祖细胞; 血管病变

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 05 - 0091 - 04

The Relationship of Plasma Osteoprotegerin Level and Endothelial Progenitor Cells in Vascular Lesions of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

MAO Wen - wen¹⁾, LI Hui - fang²⁾, SHEN Zheng - lei³⁾, TIAN Wei - meng¹⁾, CHEN Guo - qiang¹⁾, GUO Wei - chang⁴⁾

(1) Dept. of Geriatrics, The Second People's Hospital of Kunming City, Kunming Yunnan 650204; 2) Second Dept. of Endocrinology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 3) Dept. of Hematology, Yunnan Tumor Hospital, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118; 4) Physical Education Department, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between endothelial progenitor cells (EPCs) and plasma osteoprotegerin (OPG) level, and explore the role of vascular lesions in type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** 20 cases of untreated T2DM patients, 20 cases of well-controlled T2DM (group A, HbA1c < 7%), 20 cases of middle-controlled T2DM (group B, HbA1c 7-11%), and 20 cases of bad-controlled T2DM (group

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81360089, 81241122); 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (09z0031)

[作者简介] 毛文文 (1968 ~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事内分泌与代谢病临床和科研工作.

[通讯作者] 郭伟昌. E-mail: 1349037097@qq.com; 李会芳. E-mail: lhfk2003041@163.com

C, HbA1c > 11%) were treated by oral anti-diabetic drugs, while 10 normal glucose tolerance subjects were involved as control. EPCs was measured by FCM and plasma OPG level was determined using ELISA. **Results** (1) EPCs in untreated T2DM group was lower, while OPG was higher compared to healthy control group ($P < 0.05$). (2) There were significant differences in EPCs among groups A, B and C ($P < 0.05$). The better the control was, the lower of EPCs was. The OPG level in group C was higher than that in groups A and B ($P < 0.01$), and in group B was higher than that in group A ($P < 0.05$). (3) The results of univariate analysis showed that OPG level was negatively correlated with EPCs ($r = -0.354$, $P < 0.05$). And the results of multiple factor analysis suggested that FPG, OPG and EPCs were the critical influence factors of vascular lesions in elderly T2DM. **Conclusion** In elderly patients with T2DM, OPG level in fasting serum has a certain negative relationship with EPCs, and OPG and EPCs might have some roles in vascular lesions in elderly T2DM.

[**Key words**] Type 2 diabetes mellitus; Osteoprotegerin; EPCs; Vascular lesions

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 是指能分化增殖为成熟内皮细胞的一群祖细胞。目前, EPCs 介导的血管再生及损伤血管的修复已经成为糖尿病、心血管疾病、肿瘤等疾病中的研究热点^[1]。护骨素 (osteoprotegerin, OPG) 作为肿瘤坏死因子 (TNF) 受体超家族新成员, 主要通过促进破骨细胞分化的强诱导剂核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 的结合来抑制骨吸收。有研究显示, 在糖尿病患者中, OPG 浓度与微血管及大血管病变相关^[2]。那么, EPCs 介导的血管再生及损伤血管的修复与 OPG 之间是否存在一定关联, 目前未见文献报道。故本研究观察老年 2 型糖尿病患者外周血 EPCs 含量与 OPG 水平的变化, 探讨两者的相互关系。

1 材料与方法

1.1 材料

选取昆明市第二人民医院 2008 年 5 月至 2012 年 12 月收治的 80 例老年糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 患者及 10 例糖耐量正常的健康对照者。其中治疗组男性 40 例, 女性 40 例; 年龄 60~85 岁, 中位 71.2 岁。对照组男性 5 例, 女性 5 例; 年龄 62~75 岁, 中位 69.5 岁。80 例糖尿病患者包括测定 20 例初诊 T2DM 患者、20 例血糖控制良好 (HbA1c < 7%) T2DM 患者 (A 组)、20 例血糖控制中等 (HbA1c 7%~11%) T2DM 患者 (B 组)、20 例血糖控制较差 (HbA1c > 11%) T2DM 患者 (C 组)。常规采集外周血备用。同时收集患者年龄、性别、SBP、DBP、BMI、HbA1c、TG、TC、LDL-C、HDL-C、FPG、2hPG、血小板计数、纤维蛋白原等临床资料。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的检测 (1) 细胞表面标志: 采用

CD45 - Cy5, CD133 - RPE 等标记。内皮祖细胞 (EPCs): CD 133⁺/CD 45⁻。检测方法: 采用荧光抗体标记, 流式细胞仪检测。抽取外周血 3 mL, 抗凝, 血标本用 PBS 液 2 倍稀释, Ficoll 分离, 1 800 r/min 离心 20 min, PBS 洗 2 次。将细胞加入 96 孔板中, 每孔 5×10^5 个细胞, 加入抗体 5 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30~60 min, 用 PBS 液洗涤标本 2 次, 100 μ L 的 1% 多聚甲醛固定, 流式细胞仪检测。

1.2.2 血浆护骨素 (OPG) 的检测 (1) 标本的采集: DM 患者与对照组于入院清晨空腹抽静脉血, 留取外周静脉血 5 mL 放置在 EN TA22Na 抗凝管, 经 3 000 r/min 离心 15 min 后, 留取上层血浆并冻存在 -70 $^{\circ}$ C 低温冰箱备用 A; (2) 血浆护骨素 (OPG) 的检测: 采用酶联免疫吸附法测定, ELISA 检测试剂盒购自深圳晶美生物工程公司, 检测灵敏度为 10 ng/L, 板内板间变异系数 < 10%。操作严格按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理

测得出 EPCs 相对计数, 根据绝对计数计算公式 (目标细胞绝对计数 = 有核细胞总计数 \times 目标细胞百分比) 分别计算出 EPCs 的绝对计数。数据采用 SPSS 统计软件分析, 计量资料用表示, 两组间比较采用成组设计 t 检验, 组内治疗前后比较采用配对 t 检验。以 spearman 相关系数评价变量间相关性。多因素分析采用 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 老年 T2DM 初诊患者血浆 EPCs、OPG 水平的变化

EPCs 在 T2DM 组显著低于健康对照组 ($P < 0.05$); OPG 在 T2DM 组显著高于健康对照组, 见表 1。

2.2 不同血糖水平患者的血浆 EPCs、OPG 水平

变化

C 组血浆 EPCs 的水平明显低于 B 组及 A 组, B 组明显低于 A 组 ($P < 0.05$); C 组血浆 OPG 的水平高于 B 组及 A 组 ($P < 0.01$), B 组血浆 OPG 水平高于 A 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2.

2.3 T2DM 患者外周血中 OPG、EPCs 相关性分析

单因素分析结果显示, 糖尿病患者外周血中 OPG、EPCs 相关性分别为: EPCs 与 OPG 相关系

数 $r = -0.354$, $P < 0.05$.

以 T2DM 为整体, 是否有血管病变为因变量 (有 = 1, 无 = 0), 以年龄、性别、SBP、DBP、BMI、HbA1c、TG、TC、LDL-C、HDL-C、FPG、2hPG、血小板计数、纤维蛋白原、OPG、EPCs 作为自变量, 进行 logistic 回归分析, FPG、OPG、EPCs 进入回归方程, 再采用后退法的逐步回归 (α 入 = 0.050, α 出 = 0.100), 对血管病变及这三项自变量进行统计学分析, 得出其中三项自变量为血管病变的影响因素 ($P < 0.05$), 见表 3.

表 1 T2DM 组患者与对照组外周血中 OPG、EPCs 水平的比较

Tab. 1 Comparison of OPG and EPCs levels in peripheral blood between T2DM group and control group

组别	n	EPCs (外周血个/ μ L)	OPG (ng/L)
对照组	10	0.087 \pm 0.013	2.58 \pm 0.46
初诊 DM 组	20	0.051 \pm 0.003*	4.58 \pm 0.85*

与对照组比较, * $P < 0.05$.

表 2 不同血糖水平的 T2DM 患者血浆 OPG、EPCs 水平的比较

Tab. 2 Comparison of OPG and EPCs levels among T2DM groups with different blood glucose levels

组别	EPCs (外周血个/ μ L)	OPG (ng/L)
A 组	0.065 \pm 0.004	3.67 \pm 0.45
B 组	0.058 \pm 0.013**	4.93 \pm 0.62*
C 组	0.033 \pm 0.013** $\Delta\Delta$	6.58 \pm 0.74* Δ

与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

表 3 T2DM 的血管病变相关影响因素的逐步回归分析 (后退法)

Tab. 3 The results of the stepwise regression analysis of the related factors for T2DM with vascular lesions (back)

因变量	自变量	偏回归系数	标准误	标准化偏回归系数	t	P	偏回归系数的 95%
血管病变	FPG	0.110	0.047	0.264	2.132	0.045	0.015 ~ 0.289
	OPG	0.130	0.058	0.299	2.209	0.040	0.016 ~ 0.295
	EPCs	-0.291	0.165	-0.337	-2.326	0.036	-0.583 ~ -0.056
常量		-3.257	1.026	0.671	4.119	0.002	

3 讨论

OPG 为肿瘤坏死因子受体蛋白基因家族成员之一. 其主要通过与成骨细胞膜上的 RANKL 结合, 抑制前体破骨细胞的分化、以及成熟破骨细胞的活化, 并诱导其凋亡, 对骨骼代谢发挥重要作用^[2]. 研究显示^[2,3]: 在糖尿病患者中, OPG 浓度与微血管及大血管病变相关, OPG 与 DN 的血管内皮功能关系密切. 在动脉粥样硬化病变中, 研究^[4,5]认为 OPG 可阻止血管钙化, 是血管的保护因子. 该功能通过内皮依赖性血管舒张功能相关机制得以发挥. 同时有研究报道^[6], 蛋白尿常提示心血管危险增加, 是内皮功能紊乱的指标之一, T2DM 时血浆 OPG 水平在微量白蛋白尿组较正常白蛋白尿组升

高, 侧面揭示了 OPG 可能与内皮功能紊乱有关. 但 OPG 与 EPCs 的关系目前未见报道. 本研究发现老年 T2DM 患者外周血 EPCs 的含量与 OPG 水平存在一定的负相关性, 提示老年 T2DM 患者血管内皮功能存在异常, 这种异常不但表现在内皮层面, 而且也可能表现在与 EPCs 关联的干祖细胞层面.

但 T2DM 患者中骨骼系统损伤后 OPG 升高与血管内皮如何发生联系的呢? 有文献报道^[4]OPG mRNA 具有广泛的组织分布, 包括动脉平滑肌细胞、内皮细胞中均有表达, 在正常血管壁及早期动脉粥样硬化部位均有 OPG 的免疫活性表达. 据文献报道^[7]老年 2 型糖尿病患者冠脉钙化积分异常组的血 OPG 水平高于冠脉钙化积分正常组, 且血浆 OPG 水平随冠脉病变的加重及血糖水平的升高而增高. 细胞培养发现, 与血管病变有关的白介素 6

和 TNF- α 等炎性因子可刺激内皮细胞产生护骨素^[7-9], 这也提示有血管病变的 T2DM 患者 OPG 升高可能与内皮细胞及 EPCs 含量存在关联。从而推断 OPG 升高可能是血糖升高后机体代偿性保护的结果, 而 EPCs 含量的变化是长期血糖异常对血管影响的后果。本研究单因素分析提示血浆 OPG 水平与 EPCs 含量呈负相关, 且二者在糖尿病血管病变的发生中成反方向变化, 也提示老年 T2DM 患者中 OPG 水平可能与 EPCs 含量呈负相关。OPG 可能是血管钙化及骨代谢之间关联的纽带; 血糖水平是联系 OPG、内皮细胞、EPCs 三者之间的重要环节。

综上所述, OPG 作为骨代谢的重要调节因子, 其与血管钙化、血管内皮损伤关系密切。作为介导的血管再生及损伤血管修复的 EPC 的作用越来越受到重视, 能否通过改善糖尿病血管内皮损伤来调节血浆 OPG 的水平, 进而对糖尿病骨质破坏也产生一定的保护作用, 值得进一步深入探讨。

[参考文献]

- [1] BHASKAR A, GUPTA R, KUMAR L, et al. Circulating endothelial progenitor cells as potential prognostic biomarker in multiple myeloma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(4): 635 - 640.
- [2] ZHOU S, FANG X, XIN H, et al. Effects of alendronate on the Notch1-RBP-J κ signaling pathway in the osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(1): 89 - 94.
- [3] RIGOLIN G M, MAFFEI R, RIZZOTTO L, et al. Circulating endothelial cells in patients with chronic lymphocytic leukemia: clinical-prognostic and biologic significance [J]. *Cancer*, 2010, 116(8): 1 926 - 1 937.
- [4] KUNZ G A, LIANG G, CUCULOSKI F, et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity [J]. *Am Heart J*, 2006, 152(1): 190 - 195.
- [5] 石磊, 刘亚江, 蔡绪, 等. 2型糖尿病模型大鼠骨组织骨保护素及其配体含量变化与骨折愈合的关系 [J]. *现代医药卫生*, 2013, 29(5): 644 - 649.
- [6] 翟振艳, 向林, 王浩华, 等. 2型糖尿病患者血浆护骨素浓度与内皮依赖性血管舒张功能关系的研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2013, 21(1): 42 - 44.
- [7] 彭程, 楼慧玲. 老年2型糖尿病患者冠脉钙化积分与血清护骨素水平的关系 [J]. *中国实用医药*, 2011, 6(6): 1 - 2.
- [8] 涂昌, 兰军, 杨银广, 等. 冠脉介入治疗对不稳定心绞痛内皮功能及内皮祖细胞的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2012, 10(11): 1 529 - 1 532.
- [9] 罗英饰, 郭振峰, 袁斌斌, 等. 冠心病患者循环内皮祖细胞数量比较研究 [J]. *海南医学院学报*, 2012, 10(11): 1 577 - 1 580.
- (2014 - 02 - 15 收稿)
- (上接第 87 页)
- 的影响 [J]. *中国预防医学杂志*, 2005, 6(4): 306 - 309.
- [10] VAIDYA D, KELEMEN M D, BITTNER V, et al. Fasting plasma glucose predicts survival and angiographic progression in high risk postmenopausal women with coronary artery disease [J]. *J Women Health (Larchmt)*, 2007, 16(2): 228 - 234.
- [11] 刘兆平, 洪涛, 李建平, 等. 女性早发冠心病患者的临床及冠状动脉造影特征 [J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2009, 17(1): 39 - 42.
- [12] CHEN L, CHESTER M, KASKI J C. Clinical factors and angiographic features associated with premature coronary artery disease [J]. *Chest*, 1995, 108(2): 364 - 369.
- [13] 任国庆, 陈义坤, 张浩. 早发冠心病的危险因素及其冠状动脉病变特点 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(11): 938 - 940.
- [14] 邓根群, 汪浩, 关杰, 等. 青年和老年急性冠脉综合征患者危险因素及冠脉造影特点的对比研究 [J]. *中国心血管病研究*, 2009, 7(5): 324 - 327.
- (2014 - 02 - 01 收稿)