

[文章编号] 1007-3949(2006)14-09-0799-03

•临床研究•

## 内皮抑素和血管内皮生长因子与 2 型糖尿病 大血管病变的关系

段 薇<sup>1</sup>, 张 锦<sup>1</sup>, 张学梅<sup>2</sup>, 孙丽鹏<sup>3</sup>(1. 中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110001; 2. 大连大学药理学教研室;  
3. 大连医科大学附属第一医院超声波室)

[关键词] 内科学; 血管生成在 2 型糖尿病大血管病变发生中的作用; 酶联免疫吸附测定; 新生血管形成; 动脉粥样硬化; 内皮抑素; 血管内皮生长因子

[摘要] 目的 探讨内皮抑素和血管内皮生长因子与 2 型糖尿病大血管病变发生的关系。方法 用酶联免疫吸附测定法检测 100 例 2 型糖尿病患者(34 例 2 型糖尿病无合并症、40 例伴发一种大血管病变、26 例伴发多种大血管病变)和 30 例正常对照者血清内皮抑素和血管内皮生长因子表达水平的变化。结果 内皮抑素和血管内皮生长因子在 2 型糖尿病大血管病变各组(包括合并一种大血管病变组、合并两种以上大血管病变组)血清含量分别显著高于 2 型糖尿病无合并症和正常对照组(内皮抑素为  $32.4 \pm 15.6 \mu\text{g/L}$  和  $35.1 \pm 20.2 \mu\text{g/L}$  比  $11.2 \pm 8.6 \mu\text{g/L}$  和  $9.9 \pm 6.7 \mu\text{g/L}$ ; 血管内皮生长因子为  $133.5 \pm 36.8 \text{ ng/L}$  和  $302.1 \pm 52.4 \text{ ng/L}$  比  $90.2 \pm 42.4 \text{ ng/L}$  和  $81.3 \pm 33.5 \text{ ng/L}$ ,  $P < 0.01$ ), 两者在正常对照和 2 型糖尿病无合并症组间比较差异不显著; 血管内皮生长因子在伴发一种大血管病变、多种大血管病变组间比较表达水平显著上调( $133.5 \pm 36.8 \text{ ng/L}$  比  $302.1 \pm 52.4 \text{ ng/L}$ ,  $P < 0.01$ ), 而内皮抑素的表达差异不显著; 在 2 型糖尿病伴发一种大血管病变组, 内皮抑素和血管内皮生长因子成显著正相关( $r = 0.540$ ,  $P < 0.01$ )。结论 血管内皮生长因子的表达水平与 2 型糖尿病大血管病变程度密切相关, 内皮抑素和血管内皮生长因子可能以自稳态调节机制参与动脉粥样硬化的发生和发展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Study on Relationship between Endostatin, Vascular Endothelial Growth Factor and Macroangiopathy in Type 2 Diabetes Mellitus

DUAN Wei<sup>1</sup>, ZHANG Jin<sup>1</sup>, ZHANG Xue-Mei<sup>2</sup>, and SUN Li-Peng<sup>3</sup>

(1. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Medical University, Shengyang 110001; 2. Department of Pharmacology, Medical College of Dalian University, Dalian 116622; 3. Department of Supersonics, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116001, China)

[KEY WORDS] Type 2 Diabetes Mellitus; Macroangiopathy; ELISA technique; Angiogenesis; Atherosclerosis; Endostatin; Vascular Endothelial Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the possible association between serum endostatin, serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and the pathogenesis of macroangiopathy in type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** The determination of endostatin, VEGF levels in 100 T2DM patients including 34 cases without macroangiopathy (group N), 40 cases with only one kind of macroangiopathy (group A), 26 cases with much more macroangiopathy (group B) and 30 healthy control subjects (group C) was made by ELISA assay. **Results** The levels of endostatin and VEGF in T2DM patients complicated with macroangiopathy (group A, group B) were significantly higher than those without macroangiopathy (group N, group C), (endostatin:  $32.4 \pm 15.6 \mu\text{g/L}$  and  $35.1 \pm 20.2 \mu\text{g/L}$  vs.  $11.2 \pm 8.6 \mu\text{g/L}$  and  $9.9 \pm 6.7 \mu\text{g/L}$ ; VEGF:  $133.5 \pm 36.8 \text{ ng/L}$  and  $302.1 \pm 52.4 \text{ ng/L}$  vs.  $90.2 \pm 42.4 \text{ ng/L}$  and  $81.3 \pm 33.5 \text{ ng/L}$ ,  $P < 0.01$ ). There was no significant difference between endostatin, VEGF levels in group C and those in group N. It was not endostatin levels but VEGF levels that were significantly elevated between group A and group B in turn  $133.5 \pm 36.8 \text{ ng/L}$  vs.  $302.1 \pm 52.4 \text{ ng/L}$ ,  $P < 0.01$ . There was a significantly positive correlation between endostatin and VEGF levels in Group A ( $r = 0.540$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** The study suggests that the variation of serum VEGF levels is closely associated with the initiation and progression of T2DM macroangiopathy and meanwhile VEGF together with endostatin possibly plays an important role in the pathological course of As based on homeostasis regulation.

[收稿日期] 2005-11-10 [修回日期] 2006-09-05

[作者简介] 段薇, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向为糖尿病大血管并发症的发病机制, E-mail 为 duanwei34@hotmail.com。张锦, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化和糖尿病临床及基础研究。张学梅, 硕士, 副教授, 研究方向为药物防治糖尿病的作用机制。

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 大血管病变以迅速发展、多部位严重的动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 改变为特点, 是糖尿病患者致死和致残的主要原因。在诸多关于 As 发病机制的研究中, 越来越多的研究显示有新生血管形成<sup>[1]</sup>, 患

T2DM 时多种代谢紊乱加快了这一病理生理学进程。在众多参与新生血管形成的细胞因子中,血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和内皮抑素 (endostatin) 是两种分别发挥主要调节作用的生长因子。VEGF 与 As 病变相关已有报道<sup>[2]</sup>, 关于 T2DM 患者中 VEGF 和内皮抑素共同作用的研究较少, 新生血管形成是血管生长因子与抑制因子两者平衡打破的结果。本研究采用酶联免疫吸附法联合检测 VEGF 和内皮抑素在 2 型糖尿病大血管不同病变程度患者外周血中的表达水平, 从新生血管形成的视角探讨 2 型糖尿病大血管病变的发生机理。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

2004 年 10 月~2005 年 8 月随机收集糖尿病专科门诊和内分泌病房的 T2DM 患者 100 例, 其中男 58 例, 女 42 例; 年龄  $56.7 \pm 12.1$  岁, 均符合 WHO (1999) 糖尿病诊断分型标准; 同时对入选者行眼底镜、测尿微量白蛋白、行心脏 ECT 扫描及超声心动图检查除外微血管病变; 合并有严重心衰、肝、肾功能衰竭、感染性疾病, 以及肿瘤、自身免疫性疾病、内分泌疾病者予以剔除。将上述病人分为三组: ① 2 型糖尿病无合并症组 (无合并症组) 34 例; ② 2 型糖尿病合并一种大血管病变组 (一种血管病变组) 40 例; ③ 2 型糖尿病合并二至三种大血管病变组 (多种血管病变组) 26 例。大血管病变包括冠心病、脑血管病变和外周血管病变。同期体检中健康个体 30 例作为正常对照组, 其中男 18 例, 女 12 例, 年龄  $57.5 \pm 9.8$  岁。各组在年龄、性别、吸烟状况、体质指数、血压等方面无统计学差异, 具有可比性。

### 1.2 标本收集与保存

全部受检者均于清晨空腹抽取外周静脉血 5 mL, 不抗凝, 经室温静置 30~60 min 后, 1.5 kr/min 离心 10 min, 分离血清, 吸取上清液分别放入 2 mL Eppendorf 管中,  $-20^{\circ}\text{C}$  低温冷冻备用。

### 1.3 主要试剂及仪器

竞争法人内皮抑素酶联免疫试剂盒购自 Chemicon International 公司, 双抗体夹心法检测 VEGF 的 ELISA 试剂盒购自深圳晶美生物工程公司。美国 BIO-RAD550 型酶标仪; 高精度加液器及洗头; 双蒸水或去离子水。

### 1.4 血管内皮生长因子血清浓度检测

血清标本室温融化, 进行 2 倍稀释和倍比稀释

VEGF 标准品 (2000、1000、500、250、125 和 62.5 ng/L), 加入鼠抗人 VEGF 单克隆抗体包被的 96 孔板、100  $\mu\text{L}$ /孔, 样品和标准品均为双复孔, 按试剂盒说明书进行操作, 酶标仪测量 450 nm 吸光度值 (A450)。根据 VEGF 标准品吸光度值和浓度绘制标准曲线, 由吸光度值计算各样品浓度。

### 1.5 内皮抑素血清浓度检测

4 倍稀释被检测血清样品和 4 倍等比稀释重组人内皮抑素标准品 (500、125、31.25、7.81 和 1.95  $\mu\text{g}$ /L), 加入预先用羊抗兔多克隆 IgG 抗体 (二抗) 包被的 96 孔板 100  $\mu\text{L}$ /孔, 样品和标准品均为双复孔; 按说明书要求进行操作, 酶标仪测定 492 nm 吸光度值 (A492) 根据内皮抑素标准品吸光度值和浓度绘制标准曲线, 由吸光度值计算各样品浓度。

### 1.6 统计学处理

实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS10.0 统计软件包对多组数据比较采用  $F$  检验和  $q$  检验, 两组间相关分析采用 Person 相关分析法。  $P < 0.05$  为显著性判断标准。

## 2 结果

### 2.1 各组血清内皮抑素和血管内皮生长因子水平

各组血清内皮抑素和 VEGF 的测定结果见表 1。可见 2 型糖尿病大血管病变两组血清内皮抑素和 VEGF 含量分别显著高于 2 型糖尿病无合并症和正常对照组 ( $P < 0.01$ )。但内皮抑素水平在正常对照和 2 型糖尿病无合并症两组间比较, 以及在 2 型糖尿病伴发一种血管病变和多种血管病变两组间比较, 差异均无显著性 ( $P > 0.05$ ); VEGF 水平在正常对照和 2 型糖尿病无合并症两组间比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 但在 2 型糖尿病无合并症、2 型糖尿病伴发一种血管病变、伴多种血管病变三组中的表达呈上调趋势, 各组间差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。

表 1. 2 型糖尿病各组与正常对照组血清内皮抑素和血管内皮生长因子水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	例数	内皮抑素 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	VEGF ( $\text{ng}/\text{L}$ )
正常对照组	30	$9.9 \pm 6.7$	$81.3 \pm 33.5$
无合并症组	34	$11.2 \pm 8.6$	$90.2 \pm 42.4$
一种血管病变组	40	$32.4 \pm 15.6^{\text{ab}}$	$133.5 \pm 36.8^{\text{ab}}$
多种血管病变组	26	$35.1 \pm 20.2^{\text{ab}}$	$302.1 \pm 52.4^{\text{abc}}$

a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 2 型糖尿病无合并症组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与伴发一种血管病变组比较。

## 2.2 内皮抑素和血管内皮生长因子相关性分析

伴发一种血管病变组中内皮抑素和 VEGF 浓度成正相关( $r = 0.540, P < 0.01$ ), 其他各组中两者不相关(在正常对照、无合并症和多种血管病变三组中  $r$  值分别为 0.350、0.294 和 0.125,  $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

研究表明, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 斑块中, 增厚的血管内膜通常伴有血管化, 这些新生血管的形成与 As 病变的严重程度密切相关, 甚至可进一步促进斑块的发展, 导致斑块出血和破裂, 是不稳定型斑块的重要特征<sup>[3]</sup>。糖尿病状态下, 许多因素如高糖、糖基化终末产物(advanced glycation end-products, AGE)、缺血和缺氧等促进与血管生成相关的细胞因子表达。本研究发现, 2 型糖尿病伴发大血管病变时内皮抑素和 VEGF 表达水平显著高于无血管病变组, 虽然两细胞因子在 2 型糖尿病无合并症组含量高于正常对照组, 但差异不显著, 说明血管形成调节因子与 As 这一病理现象密切相关。

血管内皮生长因子(VEGF) 是内皮细胞特异性的促有丝分裂原, 能促进内皮细胞增殖, 增加血管通透性。2 型糖尿病伴发大血管病变时, 多种代谢紊乱, As 局部组织中的缺血和缺氧都可导致 VEGF 的产生, 始动斑块内新血管生成, 并伴有血管通透性增加。因此新生血管成为脂质浸润于斑块病灶的通路, 从而加重 As, 形成恶性循环。本研究发现, VEGF 在 2 型糖尿病无合并症、伴发一种血管病变、伴发多种血管病变三组中的表达显著上调( $P < 0.01$ ), 说明 VEGF 与 2 型糖尿病大血管病变的发生和发展有关。李建芝等<sup>[4]</sup>在家兔 As 模型研究中发现, 随 As 病变进展, VEGF 表达逐渐增强, 多少可以为本临床研究提供一定的实验依据。

内皮抑素是 O'Reilly 等<sup>[5]</sup>从培养的鼠内皮细胞瘤的上清液中发现的一种强有力的血管生成抑制因子, 分子质量为 20 kDa, 具有特异抑制内皮细胞增殖、血管生成和阻止肿瘤生长和转移的生物学作用。随着人们对新生血管形成与 As 相关性的认识, 有人

推测内皮抑素等血管抑制因子或许可以抑制 As 的发展进程<sup>[6,7]</sup>, 本研究对照组血清中检测到一定浓度的内皮抑素, 提示内皮抑素可能参与了血管形成的生理调节过程, 内皮抑素表达随 2 型糖尿病大血管病变的发生而显著上调, 可能因为 VEGF 升高, 内皮抑素也随之升高, 以期达到新的平衡。

本研究在进一步探讨内皮抑素和 VEGF 相互作用时, 发现两者只在 2 型糖尿病伴发一种大血管病变组呈正相关性表达( $r = 0.540, P < 0.01$ ), 可能病变初期, 二者试图通过自身调节达到新平衡; 不同于 VEGF, 内皮抑素在 2 型糖尿病伴发多种大血管病变组的含量与伴发一种大血管病变组相比, 差异不显著, 即相对于 VEGF 在上述两组的表达变化而言, 内皮抑素上调幅度不显著( $P > 0.05$ ), 在伴发多种大血管病变组, 两者无相关性( $r = 0.165, P > 0.05$ ), 这种变化不一致导致促血管生成因子过表达, 新血管大量生成加剧了 As 进程。

## [参考文献]

- [1] Lip GY, Blann AD. Thrombogenesis, atherogenesis and angiogenesis in vascular disease: a new 'vascular triad' [J]. *Ann Med*, 2004, 36 (2): 119-125
- [2] 李永强, 董吁钢, 李怡, 马虹, 关水源. 血管内皮生长因子与冠状动脉粥样硬化及侧枝循环形成的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, 7 (3): 197-200
- [3] Chen F, Eriksson P, Kimura T, Herzfeld I, Valen G. Apoptosis and angiogenesis are induced in the unstable coronary atherosclerotic plaque [J]. *Coron Artery Dis*, 2005, 16 (3): 191-197
- [4] 李建芝, 常青, 唐海兰, 黄华梅, 关洁宾, 李自成. 血管内皮生长因子与家兔动脉粥样硬化病变进展的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (6): 476-478
- [5] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS. ES: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88 (2): 277-285
- [6] Moulton KS, Olsen BR, Sonn S, Fukai N, Zurakowski D, Zeng X. Loss of collagen X enhances neovascularization and vascular permeability in atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2004, 110 (10): 1330-336
- [7] Ren B, Wang Y, Rabaseda X, Wang YZ. Recombinant human ES is beneficial to endothelial cell growth exposed to mildly oxidized low-density lipoproteins [J]. *Meth Find Exp Clin Pharmacol*, 2002, 24 (4): 195-199
- [8] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. *Cell*, 1996, 86 (3): 353-364
- [9] Deininger MH, Wybranietz WA, Graepler FT, Lauter UM, Meyer mann R, Schluessener HJ. Endothelial endostatin release is induced by general cell stress and modulated by the nitric oxide/cGMP pathway [J]. *FASEB J*, 2003, 17 (10): 1267-276

(此文编辑 胡必利)