

[文章编号] 1007-3949(2009)17-03-0213-04

· 临床研究 ·

## 2型糖尿病合并冠心病患者血小板表面 CD62P和 CD40L的表达水平

李忠艳, 曲鹏, 朱宁

(大连医科大学附属第二医院心血管内科, 辽宁省大连市 116027)

[关键词] CD62P; CD40L; 冠心病; 2型糖尿病

**[摘要]** 目的 探讨 2型糖尿病合并冠心病患者血小板表面 CD62P和 CD40L的表达水平及其和血清高敏 C反应蛋白的关系。方法 选择单纯冠心病患者 34例、单纯 2型糖尿病患者 33例、2型糖尿病合并冠心病患者 30例及对照者 30例,采用流式细胞术分别检测血小板表面 CD62P和 CD40L的表达水平,并与血清高敏 C反应蛋白作相关分析。结果 2型糖尿病合并冠心病组血小板 CD62P、CD40L和高敏 C反应蛋白水平较对照组、单纯冠心病组及单纯 2型糖尿病组显著升高 ( $P < 0.01$ ),血小板 CD62P和 CD40L与血清高敏 C反应蛋白水平呈正相关 ( $r$ 分别为 0.343和 0.495,  $P$ 均  $< 0.05$ )。结论 2型糖尿病合并冠心病患者的血小板表面 CD62P和 CD40L表达水平明显升高,并与血清高敏 C反应蛋白明显正相关。血小板表面 CD62P和 CD40L的表达水平可能是预示糖尿病患者合并冠状动脉粥样硬化的重要指标。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Analysis of Platelet Surface Expression CD62P and CD40L Levels in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Coronary Heart Disease

LI Zhong-Yan, QU Peng and ZHU Ning

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

[KEY WORDS] CD62P; CD40L; Coronary Heart Disease; Type 2 Diabetes Mellitus

**[ABSTRACT]** **Aim** To determine the platelet surface expression of CD62P and CD40L in type 2 diabetes mellitus patients (T2DM) with coronary heart disease (CHD) and to explore the relationship between them and serum high-sensitivity C reactive protein (hs-CRP) level. **Methods** The platelet surface expression of CD62P and CD40L were measured by flow cytometry at fasting state in 97 consecutive patients including 34 CHD patients, 33 T2DM patients and 30 T2DM with CHD patients. 30 subjects were served as a control group. The correlation between platelet CD62P and CD40L and serum level of hs-CRP were investigated. **Results** Platelet CD62P and CD40L levels and serum level of hs-CRP in the T2DM with CHD patients were significantly higher than those in the control group, CHD patients and T2DM patients ( $P < 0.01$ ). The levels of platelet CD62P and CD40L were positively correlated with serum level of hs-CRP ( $r = 0.343$  and  $0.495$ , both  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Platelet surface expression CD62P and CD40L levels, which are significantly higher in the T2DM with CHD patients and were positively correlated with serum level of hs-CRP, may be useful markers for predicting the presence of coronary artery disease in T2DM patients.

CD62P是血小板内 $\alpha$ 颗粒的膜蛋白,分子量为 140 kDa,又称 GMP-140、P-选择素。当血小板被激活后可表达于血小板表面,是血小板活化的分子标记物。它也是细胞黏附分子的成员之一,在血管炎症反应、血栓和斑块形成、动脉粥样硬化、血管舒缩调节功能以及血管内皮细胞代谢中发挥重要作用<sup>[1,2]</sup>。CD40配体(CD40L)是肿瘤坏死因子 $\alpha$

(TNF- $\alpha$ )家族的一种跨膜蛋白质,在动脉粥样硬化发生发展中起重要作用。已有的研究表明免疫与炎症反应参与了冠心病动脉粥样硬化斑块形成及破裂,CD40L可以诱导细胞黏附,趋化因子形成,诱导细胞外基质降解,引发血小板活化<sup>[3]</sup>。高敏 C反应蛋白(high sensitivity C reactive protein, hs-CRP)作为一种系统炎症的敏感指标,能独立预测冠状动脉事件发展的危险度<sup>[4]</sup>。糖尿病是冠心病的等危症,其 10年内发生心血管事件的危险较非糖尿病患者高 5~10倍,这两种疾病具有多个共同的危险因素,如胰岛素抵抗等。近年研究显示,血小板活性改变、炎症反应在糖尿病患者的病情发展及血栓性并发症的发生中起着一定的作用<sup>[5]</sup>。本研究对单纯冠心病

[收稿日期] 2008-12-03 [修回日期] 2009-02-01

[基金项目] 大连市科技局科技计划项目(2008J22H016)

[作者简介] 李忠艳,博士,副主任医师,研究方向为心血管疾病。Email为 lizhongyan2004@yahoo.com.cn。曲鹏,博士,主任医师,教授,研究方向为冠心病、高血压病的基础与临床以及心血管病介入诊疗技术。朱宁,主任医师,教授,研究方向为高血压病、心肌病、心力衰竭的基础与临床。

病患者及 2 型糖尿病 ( type 2 diabetes mellitus T2DM)有或无合并冠心病患者血小板表面 CD62P 和 CD40L 的表达水平及血清 hs-CRP 水平进行检测,并作相关分析。

### 1 对象和方法

#### 1.1 研究对象

住院患者 97 例,均接受冠状动脉造影检查,根据是否患有 T2DM (空腹血糖水平 > 7.0 mmol/L 或餐后 2 h 血糖水平 > 11.1 mmol/L,或服用降糖药物,或接受胰岛素治疗,排除继发性糖尿病及 iv 型糖尿病)将患者分为三组: ①冠心病患者 34 例,其空腹血糖水平 ≤ 5.6 mmol/L; ②T2DM 患者 33 例,冠状动脉造影结果正常; ③T2DM 合并冠心病患者 30 例。另选择对照者 30 名,其既往史及体检、心电图、胸片、心脏超声及肝肾功能、血糖等生物化学指标经检测分析,确诊无糖尿病及冠心病。采集所有入选对象的有关临床资料,剔除有急、慢性病毒或细菌感染史、有免疫系统异常或肿瘤病史的患者。

#### 1.2 血小板表面 CD62P 和 CD40L 表达水平检测

所有患者空腹 12 h 后于清晨采取肘静脉血 2

mL,抗凝,取 0.1 mL 新鲜血用 PBS 稀释,分别与荧光标记的单克隆抗体 CD62P-FITC ( Immunotech 法国)、CD40L-FITC ( Calbiochem, 德国)室温避光孵育 60 min,采用美国 BD 公司 FACS Calibur 型流式细胞仪分析测定血小板表面 CD62P 和 CD40L 的平均荧光强度 (MFI),用 CELLQuest 软件获取结果。

#### 1.3 血清高敏 C 反应蛋白水平检测

使用试剂盒检测血清 hs-CRP 水平 ( Biocheck Laboratories 美国),检测灵敏度为 0.62 ~ 119.3 mg/L,批间及批内变异系数 < 7.5%。

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件包进行统计分析,计数资料以率表示,采用  $\chi^2$  检验;计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 t 检验,以 Pearson 相关方程计算变量间关系。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 基线特征

各组间年龄、男女比例没有显著差异;在三组患者中主要危险因素也没有明显差异 (表 1)。

表 1. 一般临床资料

指 标	对照组 (n = 30)	冠心病组 (n = 34)	T2DM 组 (n = 33)	T2DM 合并冠心病组 (n = 30)
年龄 (岁)	59.36 ± 11.02	62.13 ± 11.27	59.06 ± 10.34	61.59 ± 9.37
男/女 (例)	17/13	22/12	21/12	19/11
血小板 (10 <sup>9</sup> /L)	213 ± 56	209 ± 65	223 ± 67	218 ± 53
体质指数 (kg/m <sup>2</sup> )	23.97 ± 2.74	25.31 ± 3.12	24.08 ± 3.07	24.70 ± 2.98
吸烟 [例 (%) ]	5 (16.7%)	7 (20.6%)	6 (18.2%)	6 (20.0%)
高血压 [例 (%) ]	19 (63.3%)	25 (73.5%)	23 (69.7%)	23 (76.7%)
高胆固醇血症 [例 (%) ]	16 (53.3%)	20 (58.8%)	20 (60.6%)	19 (63.3%)

### 2.2 血小板表面 CD62P 和 CD40L 的表达水平及血清高敏 C 反应蛋白水平

T2DM 合并冠心病组血小板表面 CD62P 和

CD40L 的表达水平及血清 hs-CRP 水平显著高于 T2DM 组、冠心病组和对照组, T2DM 组和冠心病组以上指标亦显著高于对照组 (P < 0.01; 表 2)。

表 2 血小板表面 CD62P 和 CD40L 的表达水平及血清 hs-CRP 水平

指 标	对照组 (n = 30)	冠心病组 (n = 34)	T2DM 组 (n = 33)	T2DM 合并冠心病组 (n = 30)
血小板 CD62P	18.63 ± 5.63	34.80 ± 9.56 <sup>a</sup>	25.35 ± 7.65 <sup>ab</sup>	41.72 ± 10.57 <sup>abc</sup>
血小板 CD40L	10.06 ± 3.35	22.25 ± 5.48 <sup>a</sup>	20.47 ± 4.30 <sup>a</sup>	31.01 ± 7.11 <sup>abc</sup>
血清 hs-CRP (mg/L)	3.14 ± 1.80	10.56 ± 3.99 <sup>a</sup>	10.39 ± 3.74 <sup>a</sup>	14.88 ± 5.05 <sup>abc</sup>

a 为 P < 0.01, 与对照组比较; b 为 P < 0.05, 与冠心病组比较; c 为 P < 0.05, 与 T2DM 组比较。

### 2.3 相关性分析

血小板表面 CD62P 和 CD40L 的表达水平与血清 hs-CRP 水平均呈正相关 ( $r$  分别为 0.343 和 0.495,  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

糖尿病为一种慢性代谢性疾病,除葡萄糖、蛋白质及脂质代谢紊乱外尚有血小板功能变化及凝血纤溶系统功能紊乱,可导致各种并发症尤其是血管并发症的出现。有报道认为糖尿病患者的血小板活性与其血管并发症的发生发展相关,与患者病情控制情况的好坏相关。故研究糖尿病患者的血小板功能变化有一定的临床意义。

CD62P 存在于血小板  $\alpha$  颗粒中,在静息血小板中 CD62P 不能被其特异性单抗识别。只有当血小板活化时,  $\alpha$  颗粒膜与胞质膜融合, CD62P 暴露于膜表面,在血小板表面的表达增加,是血小板活化的重要指标。它可介导活化血小板与中性粒细胞和单核细胞黏附,并促进单核细胞识别、清除活化血小板,其浓度增高可反应血小板活化<sup>[6]</sup>。CD62P 也参与炎症过程,在炎症反应的启动、介导白细胞在内皮细胞上的黏附和聚集中发挥重要作用,所以认为 CD62P 能反应内皮细胞病变、斑块形成和血小板活化水平<sup>[1]</sup>。

CD40L 存在于血小板及 T 淋巴细胞表面,可与 B 淋巴细胞、巨噬细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞的 CD40 相结合产生一系列炎症反应。目前认为 CD40L 是各种免疫炎症反应调节的信号通路,参与动脉粥样硬化斑块内主要细胞成分的炎症反应调节,阻断 CD40-CD40L 系统可使血清可溶性粘附分子浓度下降,抑制炎症反应,从而减轻动脉粥样硬化病变<sup>[7]</sup>。CD40L 能诱导巨噬细胞表达组织因子,是炎症反应、粥样斑块不稳定的基础。若阻断 CD40L,可以减缓斑块的发展,使其结构特征趋于稳定。CD40L 还可通过调节粥样斑块内基质金属蛋白酶的表达,降解细胞外基质,减弱粥样斑块稳定性<sup>[8]</sup>。另外,CD40L 调节机体免疫反应的信号通路,可能刺激血管内皮细胞、巨噬细胞、血管平滑肌细胞产生与动脉粥样硬化有关的生物活性因子,如选择素、细胞因子等,使它们在组织中的表达增强。CD40L 越高,冠状动脉危险性越大。因此,CD62P、CD40L 是预测心脏事件的危险因子,也是识别动脉粥样硬化斑块和血栓形成的外周血标志物。

有文献报道急性冠状动脉综合征患者 P 选择

素及 CD40L 等参数均升高<sup>[9]</sup>,与本研究中糖尿病患者情况相似,故糖尿病患者血小板活化与其冠状动脉的并发症相关。T2DM 患者由于在疾病过程中存在血管内皮细胞受损、脂质过氧化等原因,可导致血小板激活。患者的高血糖状态本身也可导致血小板活化,血小板被激活后其凝血活性增高,表现聚集功能增强、细胞表面  $\alpha$  颗粒膜蛋白表达量增多等。本研究中, T2DM 合并冠心病患者血小板 CD62P 和 CD40L 增高,反映 T2DM 患者体内存在血小板的活化及炎症反应,血小板激活在糖尿病患者病情发展、并发症的发生方面起一定的作用。对糖尿病患者进行抗血小板功能药物的治疗来降低血小板活化程度,有助于糖尿病病情的控制并可预防其冠状动脉粥样硬化的发生。

炎症反应在动脉粥样硬化的发生发展中具有重要作用。C 反应蛋白是一种非特异性的炎症标志物。其参与了动脉粥样硬化形成和进展的各个阶段<sup>[10-11]</sup>,包括内皮功能异常、内皮活化、斑块形成乃至斑块破裂。C 反应蛋白尤其是 hs-CRP 的水平与心血管事件的发生危险密切相关,是预测未来心血管危险最有力的炎症标记物。本研究发现,冠心病患者血清 hs-CRP 水平显著高于对照组,与国内外相关研究结果相一致。糖尿病也是一种慢性炎症疾病, C 反应蛋白是预测 T2DM 发病的独立危险因子<sup>[12]</sup>。本研究发现,单纯 T2DM 患者无论是否合并冠心病,其血清 hs-CRP 水平均明显升高。其机制可能与胰岛素抵抗及胰岛素分泌不足有关,高血糖可促进胰岛细胞分泌白细胞介素 6 后者作用于肝脏使 C 反应蛋白生成增加。本研究还发现, T2DM 合并冠心病患者血清 hs-CRP 较其他疾病组和对照组显著升高,这反映在糖尿病并发动脉粥样硬化过程中体内炎症状态进一步增强。在糖尿病的高血糖状态下,被修饰成糖基化终末产物 (AGE) 的大分子物质通过诱导人内皮细胞表达黏附分子,促进巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$  和白细胞介素 1 $\beta$ ,通过激活平滑肌细胞内蛋白激酶 C、MAPK/ERK 及核因子  $\kappa$ B 通路上调单核细胞趋化因子和白细胞介素 6 水平等<sup>[13]</sup>,使体内炎症反应进一步增强。

本研究中,血小板表面 CD62P 和 CD40L 的表达水平与血清 hs-CRP 水平呈正相关,提示血小板的活化与炎症反应在糖尿病大血管病变如冠心病的发生、发展中是密切关联的。血小板表面 CD62P、CD40L 的表达水平可能是预示糖尿病患者合并冠状动脉粥样硬化的重要指标,对糖尿病未来风险预测具有一定价值。目前,血小板及炎症因子与心血

管疾病和糖尿病间的关系受到广泛关注, 血小板的活性变化及炎性标志物的测定或许能为寻找更有效的早期诊断、治疗及预后评价手段提供新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Huo Y, Schober A, Forlow SB, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E [J]. *Nat Med*, 2003, **9** (1): 61-67.
- [2] Kappelmayer J, Nagy B Jr, Misztrik B, et al. The emerging value of P-selectin as a disease marker [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2004, **42** (5): 475-86.
- [3] Santilli F, Basili S, Ferroni P, et al. CD40/CD40L system and vascular disease [J]. *Intern Emerg Med*, 2007, **2** (4): 256-68.
- [4] Ridker PM. High sensitivity C reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2001, **103** (13): 1813-818.
- [5] Yazbek N, Bapat A, Klein A. Platelet abnormalities in diabetic mellitus [J]. *Coron Artery Dis*, 2003, **14** (5): 365-371.
- [6] Vandendriess ER, Furie BC, Furie B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis [J]. *Thromb Haemost*, 2004, **92** (3): 459-66.
- [7] 张峻, 陈纪林, 顾晴, 等. 阻断 CD40-CD40 配体系统对动脉粥样硬化的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (2): 119-122.
- [8] Rizvi M, Pathak D, Freedman JE, et al. CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease [J]. *Trends Mol Med*, 2008, **14** (12): 530-538.
- [9] 张庆成, 张向峰, 汪承炜. 选择素黏附分子和 CD40L 在冠脉斑块形成中相关性研究 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2008, **22** (8): 587-591.
- [10] 董红梅, 黄岚, 宋耀明, 等. 急性冠状动脉综合征患者血浆氧化型低密度脂蛋白、高敏 C 反应蛋白与血管内皮损伤的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (3): 227-229.
- [11] Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C reactive protein, and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, **352** (1): 29-38.
- [12] Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, et al. C reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study [J]. *Diabetes*, 2002, **51** (5): 1596-600.
- [13] Rashid G, Korzets Z, Bemheim J. Advanced glycation end products stimulate tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta secretion by peritoneal macrophages in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis [J]. *Isr Med Assoc J*, 2006, **8** (1): 36-39.

(此文编辑 文玉珊)