

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.10.1293

• 短篇论著 •

糖尿病性心肌病血浆类胰蛋白酶与血糖相关性的分析

厉娜¹, 郑鑫洋², 岳温恒¹, 黄志刚^{1*}

1. 第二军医大学长征医院心内科, 上海 200003

2. 第二军医大学长征医院器官移植科, 上海 200003

[摘要] **目的** 观察肥大细胞特异性分泌的类胰蛋白酶在糖尿病性心肌病(DCM)患者中的表达及其与空腹血糖的关系。**方法** 选取2012年8月至2013年3月在第二军医大学长征医院心内科就诊的DCM患者26例(DCM组)、缺血性心肌病(ICM)患者32例(ICM组)、健康志愿者20例(健康对照组)。收集各组受试者的一般临床资料并检测其空腹血糖等生化指标。采用酶联免疫吸附法检测各组受试者的血浆类胰蛋白酶水平,分析类胰蛋白酶水平与空腹血糖的相关性。**结果** 3组受试者的一般临床资料和空腹血糖差异均无统计学意义。DCM组和ICM组患者的血浆类胰蛋白酶水平高于对照组 $[7.19 \pm 0.62] \mu\text{g/L}$ 、 $[6.81 \pm 0.94] \mu\text{g/L}$ vs $[2.37 \pm 0.56] \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$];DCM组患者的血浆类胰蛋白酶水平高于ICM组,但差异无统计学意义。Pearson相关性分析结果显示,血浆类胰蛋白酶水平与空腹血糖呈正相关($r = 0.637$, $P < 0.01$)。

结论 DCM患者体内的血浆类胰蛋白酶水平升高,且与空腹血糖呈正相关。

[关键词] 糖尿病并发症;心肌病;类胰蛋白酶类;肥大细胞;心脏重构

[中图分类号] R 587.23

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)10-1293-05

Correlation analysis of plasma trypsin and blood glucose in patients with diabetic cardiomyopathy

LI Na¹, ZHENG Xue-yang², YUE Wen-heng¹, HUANG Zhi-gang^{1*}

1. Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression of mast cell-secreted trypsin in patients with diabetic cardiomyopathy (DCM) and its relationship with fasting blood glucose. **Methods** Patients with DCM (DCM group, $n = 32$) or ischemic cardiomyopathy (ICM group, $n = 26$) and age-matched healthy volunteers (healthy control group, $n = 20$) were recruited from Changzheng Hospital of Second Military Medical University between August 2012 and March 2013. The clinical characteristics of the participants were collected and the biochemical indices including fasting blood-glucose were detected. ELISA detection reagent kit was used for detecting serum trypsin level in each group. Pearson analysis was used to analyze the correlation between plasma trypsin level and fasting glucose. **Results** The general clinical characteristics and the fasting blood glucose were not significantly different between the three groups. The plasma trypsin levels in DCM group and ICM group were significantly higher than that in the healthy control group ($[7.19 \pm 0.62] \mu\text{g/L}$, $[6.81 \pm 0.94] \mu\text{g/L}$ vs $[2.37 \pm 0.56] \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$). DCM group had higher serum trypsin level than ICM group, but with no significant difference. Pearson analysis showed that the plasma trypsin level was positively correlated with fasting blood glucose level ($r = 0.637$, $P < 0.01$).

Conclusion The plasma trypsin level is increased in patients with DCM, and it is positively correlated with the fasting blood glucose in all the participants of three groups.

[Key words] diabetes complications; cardiomyopathies; trypsin; mast cells; cardiac remodeling

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(10): 1293-1297]

随着社会经济的发展和人类生活水平的提高,糖尿病的发病率逐年升高。根据国际糖尿病联合会的报告,2014年全球糖尿病患者已超过3.87亿^[1],

其中65%左右的患者死于心血管并发症^[2]。糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是一种主要的糖尿病并发症,其导致的心力衰竭被认为是

[收稿日期] 2016-04-15 **[接受日期]** 2016-06-28

[基金项目] 国家自然科学基金(81303111)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81303111)。

[作者简介] 厉娜,主治医师。E-mail: f5562358@163.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885297, E-mail: 13816409727@126.com

造成糖尿病患者死亡的主要因素之一。越来越多的证据显示,肥大细胞脱颗粒释放的各种介质所介导的炎症反应在高血压、缺血性心肌病(ischemic cardiomyopathy, ICM)等导致的心肌纤维化、心脏重构过程中起到关键的作用^[3-4]。本研究通过分析循环中类胰蛋白酶水平与 DCM 的相关性,进一步研究肥大细胞激活与 DCM 的心脏重构的关系,为临床预防 DCM 提供可能的干预靶点。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选取 2012 年 8 月至 2013 年 3 月在第二军医大学长征医院心内科就诊的 DCM 患者 26 例作为 DCM 组, ICM 患者 32 例作为 ICM 组,同时选取健康志愿者 20 例作为健康对照组。本试验经第二军医大学长征医院医学伦理委员会审批通过。DCM 诊断标准:(1)糖尿病病程 5 年以上;(2)既往无心脏病史;(3)排除高血压、甲状腺功能亢进等;(4)冠状动脉造影或心脏 CTA 检查排除冠心病;(5)至少出现以下情况之一:心脏扩大、各类心律失常、慢性心功能不全。ICM 诊断标准:(1)有明确心脏病史,有 1 次或以上心肌梗死(有或无 Q 波心梗);(2)影像学结果显示心脏明显扩大;(3)存在心功能不全征象和(或)实验室依据;(4)排除冠心病并发症及某些机械性并发症,如室间隔穿孔、心室壁瘤和乳头肌功能不全导致的二尖瓣关闭不全等;(5)除外由其他原因引起的心脏扩大或心力衰竭。排除标准:(1)试验前 1 个月内出现感染;(2)合并严重慢性疾病;(3)肝、肾功能不良;(4)每天酒精摄入量超过 20 g;(5)拒绝参加该研究者。

1.2 数据收集 人口统计学特征(性别、年龄)和体检测量数据(身高、体质量、腰围、臀围、血压)均于受试者采血当天清晨安静状态下获得。其他详细资料以病史依据为准。

1.3 血标本收集和处理 所有受试者均禁食 8 h 以上,于清晨抽取肘静脉血 10 mL,由我院检验科测定血常规、肝肾功能、血糖、总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)。另抽取 2 mL 静脉血注入乙二胺四乙酸抗凝管,将采集的血标本置于离心机中,2~8 °C 1 000×g 离心 15 min;

取上层血浆,-80 °C 冰箱冷冻保存,待检测血浆中类胰蛋白酶水平。

1.4 类胰蛋白酶水平的测定 运用人胰蛋白酶酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA)试剂盒(古朵生物,中国)测定各受试者血浆中的类胰蛋白酶水平。采用 ELX800 酶标仪(BioTek,美国)测定 450 nm 波长下的光密度值。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA);计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 相关分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 各组受试者的一般资料 健康对照组、ICM 组和 DCM 组受试者的一般资料、体检所测参数及用药情况见表 1。3 组受试者在年龄、性别、吸烟人数占比、血压、体质量指数(body mass index, BMI)、腰围、臀围及腰臀比方面差异均无统计学意义。在用药情况方面,ICM 组和 DCM 组患者均常规使用他汀类降脂药、口服降压药及阿司匹林。DCM 组患者与 ICM 组相比,使用 β 受体阻滞剂的比例较少,使用血管紧张素酶抑制剂或血管紧张素 II 受体拮抗剂(ACEI/ARB)及钙拮抗剂(CCB)类降压药的比例相对较高;有 76.9%(20/26)的 DCM 患者同时使用胰岛素控制血糖。

2.2 各组受试者生化指标的比较 健康对照组、ICM 组和 DCM 组受试者的生化指标检测结果如表 2 所示。3 组受试者的空腹血糖、糖化血红蛋白、总胆固醇、HDL-C 和三酰甘油差异均无统计学意义,ICM 组及 DCM 组患者 LDL-C 水平均低于健康对照组($P < 0.05$)。此外,ICM 组及 DCM 组患者的肌酐水平均高于健康对照组,其中 DCM 组与健康对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组受试者血浆类胰蛋白酶水平的比较 健康对照组、ICM 组和 DCM 组受试者血浆类胰蛋白酶水平分别为(2.37 ± 0.56)、(6.81 ± 0.94)和(7.19 ± 0.62) $\mu\text{g/L}$ 。ICM 组和 DCM 组患者的血浆类胰蛋白酶水平均高于健康对照组($P < 0.01$);DCM 组患者的血浆类胰蛋白酶水平略高于 ICM 组,但差异无统计学意义。

表1 各组受试者一般资料的比较

指标	健康对照组 N=20	ICM组 N=32	DCM组 N=26
年龄(岁), $\bar{x}\pm s$	44.3±11.2	43.7±10.6	43.4±12.1
男/女 n/n	11/9	17/15	15/11
吸烟 n(%)	5(25.0)	9(28.1)	7(26.9)
收缩压 p/mmHg, $\bar{x}\pm s$	130.2±17.8	136.4±19.2	134.3±17.2
舒张压 p/mmHg, $\bar{x}\pm s$	75.4±9.5	79.2±8.9	78.5±9.1
BMI ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$), $\bar{x}\pm s$	23.52±3.39	24.41±2.99	24.29±3.88
腰围 l/cm, $\bar{x}\pm s$	82.79±2.53	83.33±2.57	83.22±2.63
臀围 l/cm, $\bar{x}\pm s$	93.07±3.66	93.25±3.84	92.53±3.70
腰臀比 $\bar{x}\pm s$	0.89±0.01	0.89±0.01	0.90±0.01
用药情况 n (%)			
他汀类降脂药		27(84.3)	22(84.6)
β 受体阻滞剂		22(68.8)	7(26.9)
利尿剂		21(65.6)	17(65.4)
ACEI/ARB类降压药		10(31.2)	14(53.8)
CCB类降压药		4(12.5)	7(26.9)
阿司匹林		29(90.6)	23(88.5)
氯吡格雷		13(40.6)	2(7.7)
胰岛素		0(0.0)	20(76.9)

1 mmHg=0.133 kPa. ICM: 缺血性心肌病; DCM: 糖尿病性心肌病; BMI: 体质量指数; ACEI/ARB: 血管紧张素酶抑制剂或血管紧张素II受体拮抗剂; CCB: 钙拮抗剂

表2 各组受试者生化指标检测结果的比较

指标	健康对照组 N=20	ICM组 N=32	DCM组 N=26	P 值
FG $c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	5.14±0.92	5.08±1.34	5.33±2.15	0.83
HbA _{1c} (%)	5.5±0.5	5.6±0.4	5.8±0.7	0.15
TC $c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	5.03±0.94	4.89±0.97	4.78±0.86	0.66
HDL-C $c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	1.33±0.42	1.16±0.35	1.18±0.38	0.26
LDL-C $c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	3.19±0.75	2.58±0.90*	2.63±0.80*	0.03
TG $c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	1.17±0.37	1.92±1.80	1.76±1.54	0.19
Cr $c_B/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	76.5±12.1	83.5±15.0	88.1±17.6*	0.04

ICM: 缺血性心肌病; DCM: 糖尿病性心肌病; FG: 空腹血糖; HbA_{1c}: 糖化血红蛋白; TC: 总胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; TG: 三酰甘油; Cr: 肌酐. * $P<0.05$ 与健康对照组比较

2.4 血浆类胰蛋白酶水平与空腹血糖的相关性分析

将所有受试者按空腹血糖水平不同进行分层,结果空腹血糖 ≤ 6.0 mmol/L、6.1~7.0 mmol/L、7.1~11.1 mmol/L、 >11.1 mmol/L组分别有59、8、9、2例,各组血浆类胰蛋白酶水平分别为(5.27±3.11)、(6.70±1.74)、(7.15±0.92)和7.23 $\mu\text{g/L}$,表明各受试者血浆类胰蛋白酶水平随空腹血糖水平升高而升高,但组间差异无统计学意义($P=0.09$)。Pearson相关性分析显示,血浆类胰蛋白酶水平与空腹血糖呈正相关($r=0.637, P<0.01$;图1)。

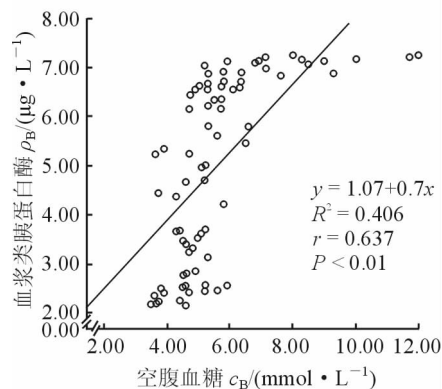


图1 血浆类胰蛋白酶水平与空腹血糖间的相关性

3 讨论

心肌纤维化是 DCM 心室重构的主要病理改变。高血糖状态引起代谢紊乱、胰岛素抵抗、微血管病变、肾素-血管紧张素系统变化及心脏自主功能障碍,导致心肌组织胶原沉积、心肌纤维化和心肌重构,最终进展至心力衰竭和死亡^[5-8]。对其机制的进一步研究有利于改善 DCM 患者的预后。而研究显示,肥大细胞在器官纤维化、动脉粥样硬化斑块形成、高血压或心肌缺血导致的心肌病、心脏重构中发挥关键作用,是调节心脏重构的关键细胞^[9-11]。已有研究在人类和动物的心肌病心肌纤维化中观察到肥大细胞密度以及脱颗粒的增加^[12-13]。被激活的肥大细胞脱颗粒释放多种细胞因子[白介素(IL)-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)等]、趋化因子(如 IL-8)、蛋白酶(半胱氨酸组织蛋白酶和基质金属蛋白酶)以及细胞特异性蛋白酶(糜酶和类胰蛋白酶)^[14-15]。动物实验表明,肥大细胞能直接参与肥胖和糖尿病等代谢性疾病的发病过程,并在其中发挥关键作用^[16-17]。DCM 心肌组织中肥大细胞的密度增加^[18],因此推测肥大细胞也参与了 DCM 心肌纤维化的过程。本课题组前期在链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠模型中证实,应用肥大细胞膜稳定剂奈多罗米可以改善糖尿病心肌纤维化^[19]。而对于糖尿病通过何种机制引起肥大细胞脱颗粒、导致心肌纤维化,目前尚无文献报道。

类胰蛋白酶是肥大细胞特异性蛋白酶,属丝氨酸蛋白酶家族。类胰蛋白酶一般预先合成并储存在肥大细胞颗粒内,经脱颗粒释放到细胞外,激活基质金属蛋白酶前体,降解趋化因子、脂蛋白及纤连蛋白^[20],刺激成纤维细胞增殖和胶原蛋白合成,是组织纤维化的重要参与蛋白^[21]。Moreno 等^[22]研究证实,存在动脉粥样硬化斑块患者的血循环中类胰蛋白酶水平升高。因此本研究选择 ICM 患者作为阳性对照,检测 DCM 组、ICM 组和健康对照组受试者血浆类胰蛋白酶的水平。结果显示 DCM 组、ICM 组患者的血浆类胰蛋白酶水平均高于健康对照组,DCM 组患者血浆类胰蛋白酶水平稍高于 ICM 组,表明在糖尿病患者中,肥大细胞对类胰蛋白酶的释放增加。Li 等^[23]在 SD 大鼠的主动脉缩窄模型中证实,类胰蛋白酶通过自分泌的方式激活肥大细胞、促

进糜酶的释放,参与心肌纤维化,这可能是类胰蛋白酶参与心肌纤维化的机制之一。本研究进一步对所有受试者进行汇总分析,结果显示类胰蛋白酶水平与空腹血糖之间存在正相关,这为探讨肥大细胞激活与糖尿病心肌纤维化的机制研究提供了方向。

糖尿病患者长期高血糖状态可导致机体中大量的终末糖基化产物(advanced glycation end products, AGEs)堆积。AGEs 的堆积可以导致慢性炎症反应,引起心肌纤维化和心肌重构。Sick 等^[24]报道 AGEs 可以刺激肥大细胞脱颗粒。因此,推测肥大细胞参与 DCM 的机制可能为糖尿病导致心肌组织中 AGEs 的堆积,刺激心脏肥大细胞脱颗粒,释放类胰蛋白酶,进而引起心肌胶原合成和组织纤维化增加。本研究首次在临床患者中证实了肥大细胞激活与 DCM 的相关性,为 DCM 的预防和治疗提供了方向。

[参考文献]

- [1] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas 2014 update [S/OL]. <http://www.idf.org/diabetesatlas>
- [2] GRUNDY S M, BENJAMIN I J, BURKE G L, CHAIT A, ECKEL R H, HOWARD R V, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 1999, 100: 1134-1146.
- [3] JANICKI J S, BROWER G L, LEVICK S P. The emerging prominence of the cardiac mast cell as a potent mediator of adverse myocardial remodeling[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1220: 121-139.
- [4] LI J, JUBAIR S, JANICKI J S. Estrogen inhibits mast cell chymase release to prevent pressure overload-induced adverse cardiac remodeling[J]. *Hypertension*, 2015, 65: 328-334.
- [5] BUGGER H, BODE C. The vulnerable myocardium. Diabetic cardiomyopathy[J]. *Hamostaseologie*, 2015, 35: 17-24.
- [6] ANEJA A, TANG W H, BANSILAL S, GARCIA M J, FARKOUH M E. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options[J]. *Am J Med*, 2008, 121: 748-757.
- [7] TRACHANAS K, SIDERIS S, AGGELI C,

- POULIDAKIS E, GATZOULIS K, TOUSOULIS D, et al. Diabetic cardiomyopathy: from pathophysiology to treatment[J]. *Hellenic J Cardiol*, 2014, 55: 411-421.
- [8] PAPPACHAN J M, VARUGHESE G I, SRIRAMAN R, ARUNAGIRINATHAN G. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology, diagnostic evaluation and management [J]. *World J Diabetes*, 2013, 4: 177-189.
- [9] ZHANG D, SPIELMANN A, WANG L, DING G, HUANG F, GU Q, et al. Mast-cell degranulation induced by physical stimuli involves the activation of transient-receptor-potential channel TRPV2 [J]. *Physiol Res*, 2012, 61: 113-124.
- [10] HÜGLE T. Beyond allergy: the role of mast cells in fibrosis[J]. *Swiss Med Wkly*, 2014, 144: w13999.
- [11] LEVICK S P, MELÉNDEZ G C, PLANTE E, MCLARTY J L, BROWER G L, JANICKI J S. Cardiac mast cells: the centerpiece in adverse myocardial remodeling[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89: 12-19.
- [12] LEVICK S P, MCLARTY J L, MURRAY D B, FREEMAN R M, CARVER W E, BROWER G L, et al. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart[J]. *Hypertension*, 2009, 53: 1041-1047.
- [13] LIU J, DIVOUX A, SUN J, ZHANG J, CLÉMENT K, GLICKMAN J N, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice[J]. *Nat Med*, 2009, 15: 940-945.
- [14] PEJLER G, ABRINK M, RINGVALL M, WERNERSSON S. Mast cell proteases [J]. *Adv Immunol*, 2007, 95: 167-255.
- [15] SATOMURA K, YIN M, SHIMIZU S, KATO Y, NAGANO T, KOMEICHI H, et al. Increased chymase in livers with autoimmune disease; colocalization with fibrosis[J]. *J Nippon Med Sch*, 2003, 70: 490-495.
- [16] ZHANG J, SHI G P. Mast cells and metabolic syndrome[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822: 14-20.
- [17] HE A, SHI G P. Mast cell chymase and tryptase as targets for cardiovascular and metabolic diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19: 1114-1125.
- [18] PATELLA V, DE CRESCENZO G, LAMPARTER-SCHUMMERT B, DE ROSA G, ADT M, MARONE G. Increased cardiac mast cell density and mediator release in patients with dilated cardiomyopathy[J]. *Inflamm Res*, 1997, 46 Suppl 1: S31-S32.
- [19] HUANG Z G, JIN Q, FAN M, CONG X L, HAN S F, GAO H, et al. Myocardial remodeling in diabetic cardiomyopathy associated with cardiac mast cell activation[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8: e60827. doi: 10.1371/journal.pone.0060827
- [20] XIANG M, SUN J, LIN Y, ZHANG J, CHEN H, YANG D, et al. Usefulness of serum tryptase level as an independent biomarker for coronary plaque instability in a Chinese population[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 215: 494-499.
- [21] ABE M, KUROSAWA M, ISHIKAWA O, MIYACHI Y, KIDO H. Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production[J]. *Clin Exp Allergy*, 1998, 28: 1509-1517.
- [22] MORENO M, PUIG J, SERRANO M, MORENO-NAVARRETE J M, ORTEGA F, RICART W, et al. Circulating tryptase as a marker for subclinical atherosclerosis in obese subjects[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9: e97014. doi: 10.1371/journal.pone.0097014
- [23] LI J, JUBAIR S, LEVICK S P, JANICKI J S. The autocrine role of tryptase in pressure overload-induced mast cell activation, chymase release and cardiac fibrosis[J]. *IJC Metab Endocr*, 2016, 10: 16-23.
- [24] SICK E, BREHIN S, ANDRÉ P, COUPIN G, LANDRY Y, TAKEDA K, et al. Advanced glycation end products (AGEs) activate mast cells[J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161: 442-455.