

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.012

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.012>

## 硫辛酸对糖尿病下肢周围动脉疾病患者内皮微粒和氧化应激的影响

丁胜, 王中京, 赵澍, 毛红

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院内分泌科, 武汉 430014)

**[摘要]** 目的: 评价硫辛酸对2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)并下肢周围动脉疾病(peripheral arterial disease, PAD)患者循环血中内皮微粒(endothelial microparticle, EMP)和氧化应激的影响。方法: 连续收集2017年4至10月于华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院住院的经药物治疗血糖不达标的T2DM并PAD患者48例, 随机分为糖尿病综合管理治疗组(管理组)与硫辛酸联合糖尿病综合管理治疗组(联合组), 每组各24例。管理组仅给予糖尿病综合管理降糖治疗, 联合组在糖尿病综合管理基础上联用硫辛酸治疗, 2组均干预12周, 治疗前后测定并比较患者血浆EMP水平、踝动脉-肱动脉血压比值(ankle-brachial index, ABI)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)及丙二醛(methane dicarboxylic aldehyde, MDA)。结果: 管理组治疗后EMP水平略有降低( $P>0.05$ ), 联合组治疗后EMP水平显著降低( $P<0.01$ ), 且明显低于管理组( $P<0.01$ ); 联合组治疗后ABI指数略有增加( $P>0.05$ ), 且略高于管理组( $P>0.05$ )。联合组治疗后ROS, MDA显著低于治疗前和管理组( $P<0.05$ )。结论: 在T2DM合并下肢PAD患者中, 硫辛酸联合糖尿病综合管理可明显降低循环血中EMP和氧化应激水平, 有助减轻糖尿病患者下肢PAD。

**[关键词]** 硫辛酸; 内皮微粒; 2型糖尿病; 周围动脉病

## Effect of lipoic acid treatment on endothelial microparticles and oxidative stress in patients with diabetic peripheral artery disease in lower limbs

DING Sheng, WANG Zhongjing, ZHAO Shi, MAO Hong

(Department of Endocrinology, Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China)

**Abstract** **Objective:** To evaluate the effect of lipoic acid on endothelial microparticle (EMP) and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients with peripheral artery disease (PAD) of the lower limbs. **Methods:** Forty-

收稿日期 (Date of reception): 2018-11-13

通信作者 (Corresponding author): 丁胜, Email: doctordingsheng@163.com

基金项目 (Foundation item): 2016 年度武汉市临床医学科研项目基金 (WX16C42); 湖北省卫生和计划生育委员会项目 (WJ2017W183)。

This work was supported by the Wuhan Clinical Medical Research Project Foundation in 2016 (WX16C42) and Hubei Provincial Health and Family Planning Commission Project (WJ2017W183), China.

eight T2DM patients with PAD of the lower limbs were randomly divided into two groups: a joint group and a management group (24 cases for each). Patients of management group only received multi-healthcare therapy for 12 weeks. Patients of joint group were treated with both lipoic acid treatment and multi-healthcare therapy at the same time for 12 weeks. The levels of EMP, ankle-brachial index (ABI), reactive oxygen species (ROS) and methane dicarboxylic aldehyde (MDA) in venous blood were estimated before and after treatment by flow cytometry. **Results:** Compared to the management group, EMP value showed a significant reduction in joint group ( $P<0.01$ ). The EMP value of joint group went down obviously as compared that before combined treatment ( $P<0.01$ ). Patients treated with lipoic acid treatment and multi-healthcare therapy seemed have higher levels of ABI than the management group ( $P>0.05$ ). The level of ROS and MDA in joint group was significantly lower than that in management group and treatment before ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Lipoic acid combined with multi-healthcare significantly decrease the level of EMP in T2DM patients with PAD of lower limbs. They are effective therapies for T2DM patients with PAD.

**Keywords** lipoic acid; endothelial microparticle; type 2 diabetes mellitus; peripheral arterial disease

据统计, 中国成人糖尿病患病率已高达10.4%<sup>[1]</sup>, 糖尿病防治面临“知晓率低、治疗率低、达标率低”的严峻现状。长期血糖控制不佳导致糖尿病并发症发生率增高, 约50%的糖尿病患者会在10年内出现下肢周围动脉疾病(peripheral artery disease, PAD)<sup>[2]</sup>。PAD通常指下肢动脉粥样硬化性病变, 糖尿病患者较非糖尿病患者发生下肢动脉粥样硬化性病变的危险性增加2倍<sup>[3]</sup>。血管内皮功能障碍、自由基增多及氧化应激是下肢动脉粥样硬化性病变的主要机制<sup>[4]</sup>。硫辛酸是临床上常用的抗氧化剂, 可清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)和自由基<sup>[5]</sup>。1990年Hamilton等<sup>[6]</sup>报道一种直径 $<1\ \mu\text{m}$ 的微粒, 命名为内皮微粒(endothelial microparticles, EMP), 其参与内皮损伤、血管炎症等过程, 导致内皮功能障碍<sup>[7-8]</sup>。本研究旨在探讨硫辛酸对2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)合并PAD病变的患者EMP和氧化应激的影响。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

连续收集2017年4至10月于华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院内分泌科住院的经药物治疗血糖不达标的T2DM患者48例, 其中男25例, 女23例, 年龄35~65(平均51.8)岁, 糖尿病史平均5.6年。纳入标准: 1)糖尿病的诊断标准符合1999年世界卫生组织(WHO)标准; 2)符合PAD诊断标准<sup>[8-9]</sup>, 踝/肱动脉血压比(ankle-brachial index, ABI) $\leq 0.9$ ; 3)糖化血红蛋白(HbA1c) $\geq 7.5\%$ ; 4)病程 $\geq 1$ 年。排除标准: 1)1型糖尿病; 2)伴有糖尿病急性并发症;

3)伴有糖尿病足或溃疡; 4)伴有严重感染及心血管疾病; 5)伴有肿瘤或严重肝肾功能不全。本研究经华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院医学伦理委员会审核批准, 患者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分组及干预

按随机数表法将48例患者随机分为糖尿病综合管理治疗组(管理组)与硫辛酸联合糖尿病综合管理治疗组(联合组), 每组各24例。2组患者均住院1周出院, 后续门诊随访治疗, 共观察12周。

管理组仅给予糖尿病综合管理, 指在药物治疗基础上联用糖尿病营养餐、运动治疗、教育管理。由营养师制定个体化营养治疗计划(日均摄入总热量1 525 kcal); 运动指导师制定个体化运动治疗计划(日均运动消耗热量264 kcal); 健康管理师给予健康教育(院内1次/d, 院外每周1次)及院内、外追踪指导管理, 出院后均自行监测指末梢血糖每周1~2 d, 7次/d(三餐前后及睡前); 于门诊每2周随访1次, 根据血糖监测值调整药物剂量。联合组在糖尿病综合管理治疗基础上联用硫辛酸治疗: 第1周在院内使用硫辛酸针剂(注射用硫辛酸, 烟台只楚药业有限公司)600 mg加入生理盐水250 mL, 静脉滴注, 1次/d; 后11周院外继续使用硫辛酸胶囊(硫辛酸胶囊, 江苏万禾制药有限公司)0.2 g, 口服, 3次/d。

#### 1.2.2 观察指标

##### 1.2.2.1 一般资料

收集入组时所有受试者的性别、年龄、糖尿病病程、HbA1c水平。采集治疗前和治疗12周后的静脉血, 采用流式细胞术测定患者血浆EMP水平

并检测ABI。

### 1.2.2.2 ABI 测定

采用多普勒超声(ACUSON X300, 德国西门子子公司)分别测定和记录上臂和踝部收缩压的最高值, 体位采用仰卧位,  $ABI = \text{足背或胫后动脉收缩压} / \text{上臂收缩压}$ , 实验重复3次, 取平均值。

### 1.2.2.3 血浆 EMP 测定

清晨空腹抽取静脉血3 mL, 离心10 min后取血浆。加入500  $\mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬, 加入特异性荧光标记抗体(anti-CD144-PE) 0.5  $\mu\text{g}$ (美国eBioscience公司), 在室温下孵育30 min后行流式细胞仪测定。以1  $\mu\text{m}$ 微球设门(美国Sigma-Aldrich公司), EMP定义为 $<1.0 \mu\text{m}$  CD144阳性的微粒。每支检测的样本流式管中加入已知绝对计数的3  $\mu\text{m}$ 微球0.5  $\mu\text{L}$ (美国Sigma-Aldrich公司)。当收集500 000个3  $\mu\text{m}$ 微球后停止计数, 依据绝对计数微球的浓度计算出EMP浓度。

### 1.2.2.4 ROS 测定

采取2组患者肝素抗凝血2 mL, 用活性氧检测试剂盒(S0033, 碧云天生物技术研究所), 按试剂使用说明书以流式细胞仪测定ROS, 以488 nm和525 nm分别为激发波长和发射波长, 测定2组患者平均荧光强度。

### 1.2.2.5 血清丙二醛测定

分别采取2组患者促凝血2 mL, 离心后取上层血清, 用紫外分光光度计, 按丙二醛(methane dicarboxylic aldehyde, MDA)试剂盒(德国Sigma公司)操作说明书, 在532 nm, 1 cm光径的条件下测定2组患者血清MDA含量, 以蒸馏水为阴性对照。

## 1.3 统计学处理

使用SPSS 17.0统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两样本均数比较采用 $t$ 检验, 配对 $t$ 检验用于治疗前后的比较, Fisher确切概率法用于计数资料的比较,  $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2组一般资料的比较

2组在性别、年龄、糖尿病病程、HbA1c水平、ABI水平上差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1)。

### 2.2 血浆 CD144+EMP 的计数测定

流式细胞术示: 计数 $5 \times 10^5$ 个直径3  $\mu\text{m}$ 微球的同时计数到直径小于1  $\mu\text{m}$ 微粒153 435个, 其中anti-CD144-PE<sup>+</sup>直径小于1  $\mu\text{m}$ 微粒89 237个, 计算得出该样本血浆CD144<sup>+</sup>EMP检测值为1 208.3个/ $\mu\text{L}$ (图1)。

### 2.3 2组 EMP 与 ABI 治疗前后的比较

2组治疗前EMP数值无统计学差异( $t = 0.335$ ,  $P > 0.05$ ), 管理组治疗后EMP水平略有降低( $t = 1.283$ ,  $P > 0.05$ ), 联合组治疗后EMP水平显著降低( $t = 7.712$ ,  $P < 0.01$ ), 且治疗后EMP水平明显低于管理组( $t = 7.132$ ,  $P < 0.01$ ); 联合组治疗后ABI指数较治疗前略有提升( $t = 1.821$ ,  $P > 0.05$ ), 且略高于管理组( $t = 1.092$ ,  $P > 0.05$ ; 表2)。

### 2.4 2组 ROS 和 MDA 含量治疗前后的比较

联合组治疗前ROS为(37.3 $\pm$ 6.2) U/mL, 治疗后为(23.7 $\pm$ 2.1) U/mL, 治疗后ROS显著低于治疗前, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 管理组治疗前ROS为(36.7 $\pm$ 8.1) U/mL, 治疗后为(35.2 $\pm$ 3.5) U/mL, 治疗前后差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。联合组治疗前MDA为(15.8 $\pm$ 2.3)  $\mu\text{mol/L}$ , 治疗后为(7.45 $\pm$ 0.9)  $\mu\text{mol/L}$ , 治疗后MDA显著低于治疗前, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 管理组治疗前MDA为(16.1 $\pm$ 1.9)  $\mu\text{mol/L}$ , 治疗后为(14.9 $\pm$ 2.1)  $\mu\text{mol/L}$ , 治疗前后差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表1 2组一般资料对比

Table 1 Comparison of general information between the 2 groups

组别	性别(男/女)	年龄/岁	病程/年	HbA1c/%	ABI
联合组	12/12	51.5 $\pm$ 7.8	5.7 $\pm$ 2.8	8.6 $\pm$ 0.9	0.70 $\pm$ 0.09
管理组	13/11	52.1 $\pm$ 8.2	5.4 $\pm$ 2.5	8.4 $\pm$ 0.8	0.71 $\pm$ 0.09
$\chi^2/t$	0.083*	0.260	0.392	0.814	0.385
$P$	$>0.05$	$>0.05$	$>0.05$	$>0.05$	$>0.05$

\*Fisher确切概率法。

\*Fisher exact probability.

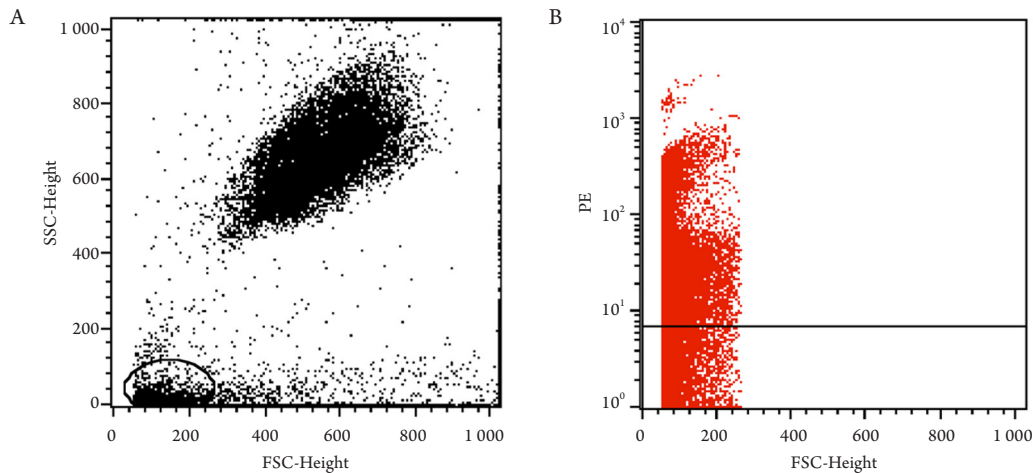


图1 血浆CD144+EMP测定

Figure 1 Measurement of CD144+EMP in plasma

(A)流式细胞仪检测EMP; (B)anti-CD144-PE+EMP计数。

(A) Flow cytometry showing the EMP; (B) Count number of anti-CD144-PE+EMP.

表2 2组血浆EMP及ABI治疗前后的比较( $n=24$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of EMP and ABI before and after treatment in plasma between the 2 groups ( $n=24$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

组别	EMP计数/(个· $\mu\text{L}^{-1}$ )		ABI	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
联合组	1 317.8 $\pm$ 124.5	1 057.1 $\pm$ 109.2* <sup>#</sup>	0.70 $\pm$ 0.09	0.75 $\pm$ 0.10
管理组	1 329.6 $\pm$ 119.7	1 286.4 $\pm$ 113.5	0.71 $\pm$ 0.09	0.72 $\pm$ 0.09

与治疗前相比, \* $P<0.05$ ; 与管理组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ 。

Compare with treatment before, \* $P<0.05$ ; Compare with management group, <sup>#</sup> $P<0.05$ .

### 3 讨论

内皮细胞在激活或凋亡过程中能释放EMP, EMP能反应内皮功能障碍的程度, 能独立预测内皮依赖性血管舒张功能的受损情况<sup>[8]</sup>。冠心病、高血压病、糖尿病等一系列疾病中都有外周血中EMP升高<sup>[8,10-11]</sup>。研究<sup>[7]</sup>显示: 糖尿病并PAD患者EMP值与ABI呈负相关。

本研究结果显示: 治疗后, 联合组EMP水平显著低于管理组, 其原因可能是T2DM患者广泛存在高胰岛素血症、胰岛素抵抗。Banting奖得主Corkey<sup>[12]</sup>指出: 高胰岛素血症导致体重增加、内皮功能障碍。动物研究<sup>[13-14]</sup>提示: 高胰岛素血症可导致NO合成的部分损伤, 还可通过PI3-K胰岛素依赖性信号通路协同耦合胰岛素抵抗和内皮功能障碍。国内外研究<sup>[15-16]</sup>均显示: 长期的高血糖状态

容易导致糖尿病并发症发生, 诸多心血管病危险因素, 如内皮功能障碍、氧化应激等与餐后高血糖相关。血糖控制不达标的患者因体内高血糖状态, 会导致高胰岛素血症进一步加重, 出现恶性循环, 更容易并发PAD。本研究显示: 糖尿病综合管理可帮助患者尽快解除高血糖状态, 有助于减轻氧化应激, 改善血管内皮功能障碍。

MDA及ROS是影响呼吸链复合物及线粒体内酶活性的重要物质, 也是细胞氧化应激的重要指标。PAD患者内皮损伤的机制之一是氧化应激, ROS产生过多并诱发氧化应激, 进而引起血管内皮功能障碍和神经微循环障碍<sup>[17]</sup>。作为常用的抗氧化应激药物, 硫辛酸可有效阻断这一过程, 促进微循环的改善, 并增加血流量, 进而保护血管内皮功能。另外, 硫辛酸可刺激胰岛素释放, 提高胰岛素的敏感性, 增强葡萄糖代谢能力, 有益



于控制血糖, 给T2DM患者带来益处<sup>[18]</sup>。在本研究中, 联合组治疗后ROS和MDA含量显著低于治疗前, 且显著低于管理组, 治疗后ABI指数较治疗前略有增加, 且略高于管理组, 提示硫辛酸可显著改善氧化应激, 提示硫辛酸通过阻断氧化应激, 保护血管内皮功能, 降低了EMP; 硫辛酸与糖尿病综合管理联合治疗血糖不达标的T2DM合并下肢PAD患者, 还通过协同作用增强了疗效。

本研究仅观察到联合组EMP水平降低, ABI指数升高尚无统计学意义, 原因可能为干预治疗时间仅12周, 对PAD改善效果有限。延长观察时间, 有望观察到联合组甚至管理组ABI进一步提升。

综上, 在血糖控制不达标的T2DM合并下肢PAD患者中, 硫辛酸联合糖尿病综合管理可明显降低患者循环血中EMP水平, 有利于防治糖尿病并下肢PAD。

### 参考文献

1. Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013[J]. JAMA, 2017, 317(24): 2515-2523.
2. Ephraim PL, Dillingham TR, Sector M, et al. Epidemiology of limb loss and congenital limb deficiency: a review of the literature[J]. Arch Phys Med Rehabil, 2003, 84(5): 747-761.
3. 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 10(1): 4-67. Diabetes Branch of Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and control of type 2 diabetes in China (2017 edition)[J]. Chinese Journal of Diabetes Mellitus, 2018, 10(1): 4-67.
4. 中国微循环学会糖尿病与微循环专业委员会. 糖尿病微循环障碍临床用药专家共识[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2017, 9(2): 34-41. Chinese Association of Diabetes and Microcirculation. Microcirculation dysfunction in diabetes: Chinese experts consensus statement[J]. Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science. Electronic Edition, 2017,9(2): 34-41.
5. 屈春梅, 陈书梅, 张又之, 等.  $\alpha$ -硫辛酸对糖尿病肾病患者氧化应激、血管内皮及肾功能的影响[J]. 海南医学院学报, 2018, 24(2): 165-168. QU Chunmei, CHEN Shumei, ZHANG Youzhi, et al. Effects of  $\alpha$ -lipoic acid on oxidative stress, vascular endothelium function and renal function in patients with diabetic nephropathy[J]. Journal of Hainan Medical University, 2018, 24(2): 165-168.
6. Al-Qaissi A, Papageorgiou M, Deshmukh H, et al. The effects of acute insulin-induced hypoglycaemia on endothelial microparticles in adults with and without type 2 diabetes[J]. Diabetes Obes Metab, 2018, Epub ahead of print.
7. 丁胜, 赵湜, 王中京, 等. 干细胞移植治疗2型糖尿病并下肢周围动脉病前后内皮微粒的变化及意义[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(6): 1034-1035. DING Sheng, ZHAO Shi, WANG Zhongjing, et al. Changes and significance of endothelial particles before and after stem cell transplantation for type 2 diabetes mellitus complicated with peripheral artery disease of lower extremities[J]. The Journal of Practical Medicine, 2015, 31(6): 1034-1035.
8. Bruyndonckx L, Hoymans VY, Frederix G, et al. Endothelial progenitor cells and endothelial microparticles are independent predictors of endothelial function[J]. J Pediatr, 2014, 165(2): 300-305.
9. 中华医学会外科学分会血管外科学组. 下肢动脉硬化闭塞症诊治指南[J]. 中国普通外科学文献(电子版), 2016, 10(1): 1-18. Vascular Surgery Group, Surgery Society, Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of lower extremity arteriosclerosis obliterans[J]. Chinese Archives of General Surgery. Electronic Edition, 2016, 10(1): 1-18.
10. Sansone R, Baaken M, Horn P, et al. Release of endothelial microparticles in patients with arterial hypertension, hypertensive emergencies and catheter-related injury[J]. Atherosclerosis, 2018, 273: 67-74.
11. Amabile N, Cheng S, Renard JM, et al. Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study[J]. Eur Heart J, 2014, 35(42): 2972-2979.
12. Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, et al. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex[J]. J Biol Chem, 1990, 265(7): 3809-3814.
13. Sarafidis PA, Ruilope LM. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and renal injury: mechanisms and implications[J]. Am J Nephrol, 2006, 26(3): 232-244.
14. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, et al. Cardiovascular actions of insulin[J]. Endocr Rev, 2007, 28(5): 463-491.
15. 陈名道, 潘长玉, 杨立勇, 等. 2型糖尿病血糖控制未达标患者现状调查报告[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(8): 625-630. CHEN Mingdao, PAN Changyu, YANG Liyong, et al. Investigation report on the current situation of type 2 diabetes mellitus patients with unqualified blood glucose control[J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2011, 27(8): 625-630.
16. Cavalot F, Pagliarino A, Valle M, et al. Postprandial blood glucose predicts cardiovascular events and all-cause mortality in type 2 diabetes in a 14-year follow-up: lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study[J]. Diabetes Care, 2011, 34(10): 2237-2243.

17. Ceriello A, Ihnat MA, Thorpe JE. Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications?[J]. J Clin Endocrinol Metabl, 2009, 94(2): 410-415.
18. 陈林, 奚泉, 金方.  $\alpha$ -硫辛酸的临床应用及其不同给药途径对疗

效的影响[J]. 世界临床药物, 2010, 31(12): 764-767.

CHEN Lin, XI Quan, JIN Fang. Clinical application of  $\alpha$ -lipoic acid and the influence on curative effect with different administration routes[J]. World Clinical Drags, 2010, 31(12): 764-767.

**本文引用:** 丁胜, 王中京, 赵湜, 毛红. 硫辛酸对糖尿病下肢周围动脉疾病患者内皮微粒和氧化应激的影响[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(1): 67-72. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.012

**Cite this article as:** DING Sheng, WANG Zhongjing, ZHAO Shi, MAO Hong. Effect of lipoic acid treatment on endothelial microparticles and oxidative stress in patients with diabetic peripheral artery disease in lower limbs[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(1): 67-72. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.012