

2 型糖尿病血瘀证患者血小板 CD_{62p}、CD₆₃测定意义探讨*

姜兆顺¹ 张胜兰¹ 寇天芹² 邢万佳¹ 姜 辉¹ 尹格平¹

内容提要 目的:研究 2 型糖尿病患者的血小板活化与血瘀证的关系及其影响因素。方法:用单克隆抗体作分子探针,经流式细胞术测定了 30 例 2 型糖尿病血瘀证患者、27 例 2 型糖尿病非血瘀证患者及 20 名健康者的血小板膜糖蛋白 CD_{62p}、CD₆₃ 表达。结果:2 型糖尿病血瘀证组 CD_{62p}、CD₆₃ 显著高于非血瘀证组及对照组($P < 0.001$),血瘀证组 CD_{62p} 与 CD₆₃ 呈正相关($r = 0.73, P < 0.01$)、CD_{62p} 与糖化血红蛋白(HbA_{1c})、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)呈正相关($r = 0.43, r = 0.45; P < 0.05$)。结论:2 型糖尿病血瘀证患者血小板活化水平升高,它是血瘀证的重要分子学基础。说明了对 2 型糖尿病患者进行血瘀辨证及活血化瘀治疗的重要性。

关键词 2 型糖尿病 血小板活化 血瘀证 流式细胞术

Significance of Platelet CD_{62p}, CD₆₃ Assessment in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Blood Stasis Jiang Zhaoshun, Zhang Shenglan, Kou Tianqin, et al General Hospital of Jinan Military Region, Jinan (250031)

Objective: To study the relationship between blood stasis and platelet activation and the influential factors on the latter in type 2 diabetes mellitus (DM) patients. **Methods:** Platelet CD_{62p}, CD₆₃ expressions were determined in 30 patients of type 2 DM with blood stasis, 27 patients of type 2 DM without blood stasis and 20 normal controls by flow cytometry. **Results:** CD_{62p}, CD₆₃ levels were significantly higher in type 2 DM with blood stasis group than that without blood stasis group and in normal controls. CD_{62p} was positively correlated with CD₆₃, while positive correlation existed between HbA_{1c}, LDL-C and CD_{62p} in DM patients with blood stasis. **Conclusion:** The increased level of platelet activation was the primary molecular basis in type 2 DM. It was important to perform the Syndrome Differentiation of blood stasis and treatment of activating blood circulation to remove blood stasis in type 2 DM.

Key words type 2 diabetes mellitus, platelet activation, blood stasis syndrome, flow cytometry

血瘀证是糖尿病常见的证型,为了揭示糖尿病血瘀证的现代医学基础,以往的研究多从患者的血液流变性变化、血小板血栓素合成机能亢进等方面来研究,尚未见报道糖尿病血瘀证与血小板活化状态的关系。本研究采用先进的流式细胞技术(flow cytometry, FCM)检测了 2 型糖尿病血瘀证患者血小板膜糖蛋白 CD_{62p}、CD₆₃,以探讨 2 型糖尿病血瘀证与 CD_{62p}、CD₆₃ 之间的关系以及对糖尿病进行血瘀辨证的重要性。

资料与方法

1 临床资料 健康对照组 20 名,男 12 名,女 8 名;年龄 32~68 岁,平均 51.1 岁,均为查体健康者。2 型糖尿病患者 57 例,诊断均符合 1985 年 WHO 标

准⁽¹⁾,并按卫生部新药临床研究指导原则⁽²⁾辨证分为血瘀证组与非血瘀证组。血瘀证组 30 例,男 13 例,女 17 例;年龄 35~72 岁,平均 54.3 岁;病程 3 个月~21 年,平均 7.34 年。非血瘀证组 27 例,男 13 例,女 14 例,年龄 35~70 岁,平均 51.3 岁;病程 2 个月~16 年,平均 4.34 年。所有受检对象于采血前 0.5 个月内均未用阿斯匹林、丹参等影响血小板功能的药物。

2 观察项目与检测方法

2.1 CD_{62p}、CD₆₃ 的检测 参考文献⁽³⁾略加改进如下:(1)标本采集及制备富含血小板血浆,取晨起空腹静脉血 2ml,放入 1:9 EDTA 抗凝管内,800r/min 离心 5min,取上清液,用 8% 多聚甲醛室温固定 15min,以磷酸盐缓冲液(PBS)2000r/min 离心漂洗,每次 5min,共 3 次,调整血小板浓度为 $300 \times 10^9/L$ 。(2)免疫荧光标记,加 20ml 荧光单抗与 100 μ l 富含血小板血浆混匀,室温置 15min, PBS 漂洗 2 次,2000r/min 离心

* 济南军区总医院重点资助课题(No. 9809)部分内容

1. 济南军区总医院(济南 250031);2. 济宁市中医医院

5min, 弃上清。(3)流式细胞仪检测 CD_{62p}、CD₆₃ [仪器系美国 BD 公司生产的 FACScan 型流式细胞仪;试剂:异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的单克隆抗体、鼠抗人 CD_{62p}-FITC McAb、鼠抗人 CD₆₃-FITC McAb 及阴性对照羊抗鼠 IgG FITC McAb, 均为美国贝克曼库尔特有限公司 IMMUNOTECH 产品]。

2.2 空腹血糖 (FBG)、血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高、低密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C、LDL-C) 的检测 采用日本产 AU1000 全自动生化分析仪测定。

2.3 HbA_{1c} 的检测 所有患者均由指尖取血 1μl, 经单克隆抗体技术测定 (仪器系德国拜尔公司产 DCA2000 型 HbA_{1c} 测定仪并供试剂盒)。

3 统计学处理 组间比较采用 *t* 检验, 指标间关系确定采用直线相关分析。

结 果

1 2 型糖尿病患者及健康人血小板活化水平比较 见表 1。血瘀证组 CD_{62p}、CD₆₃ 显著高于健康对照组及非血瘀证组, 非血瘀证组 CD₆₃ 较健康对照组显著升高, CD_{62p} 有所升高, 但无统计学差异。

表 1 2 型糖尿病患者及健康人 CD_{62p}、CD₆₃ 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD _{62p} (%)	CD ₆₃ (%)
血瘀证	30	5.61 ± 3.17	5.62 ± 2.90
非血瘀证	27	2.73 ± 2.17*	2.32 ± 1.10* [△]
健康对照	20	2.37 ± 1.16*	1.47 ± 0.71*

注:与血瘀证组比较, * *P* < 0.001;与健康对照组比较, [△] *P* < 0.01

2 2 型糖尿病血瘀证组患者 CD_{62p} 与 CD₆₃、FBG、LDL-C、HbA_{1c} 等指标的相关性 本组患者的 CD_{62p} 与 CD₆₃ 呈显著正相关 ($r = 0.73, P < 0.01$)、与 HbA_{1c} 呈正相关 ($r = 0.43, P < 0.05$)、与 LDL-C 呈正相关 ($r = 0.45; P < 0.05$); CD_{62p} 与 FBG、TC、TG、HDL-C 均无相关性。

讨 论

近来研究认为 CD_{62p} 及 CD₆₃ 均为活化血小板膜糖蛋白, 分别存在于静息血小板的 α 颗粒内及溶酶体膜, 当血小板被激活时, 血小板内颗粒与血小板膜整合, CD_{62p} 及 CD₆₃ 表达于血小板表面, 成为血小板活化的标志⁽³⁾。用抗血小板膜糖蛋白的单克隆抗体作分子探针, 经免疫荧光标记, 用 FCM 检测单个或血小板亚群膜糖蛋白, 是分析方法学上的重大发展, 具有灵敏度高、特异性强、快速准确的优点。

本研究结果表明 2 型糖尿病血瘀证组的 CD_{62p}、CD₆₃ 表达较健康对照组与非血瘀证组显著升高, 说明 2 型糖尿病患者的血小板处于高活化状态, 尤其在血瘀证患者中更为明显, 因此 CD_{62p}、CD₆₃ 表达增高是 2 型糖尿病发生血瘀证的重要分子学基础, 也是判断血瘀证较重的一项量化指标。对 2 型糖尿病血瘀证组 CD_{62p}、CD₆₃ 高表达的原因, 分析可能有以下几方面: (1) 高血糖致血管内皮损伤。长期高血糖可抑制内皮细胞 DNA 的合成, 使血管内皮屏障作用受损, 结果导致内皮下组织暴露, 使血小板与血管壁连接起来, 促使血小板活性增强⁽⁴⁾; 内皮细胞损伤后, 合成释放的血小板活化抑制因子前列环素与一氧化氮减少, 血小板易于活化。本研究发现 CD_{62p} 与 HbA_{1c} 呈正相关, 支持血小板的活化与长期高血糖状态有关。(2) 血小板活化后的自身放大作用。血小板活化后可释放二磷酸腺苷 (ADP), ADP 也是血小板活化剂⁽⁵⁾; 还可产生大量血栓素 A₂, 释放于血中引起血管收缩及血小板聚集, 易形成微血栓, 微血栓又可促使血小板大量活化⁽⁶⁾。这一点与中医对血瘀的认识有相似, 中医学认为瘀血是血瘀的病理产物, 血瘀是瘀血的进一步发展。(3) 脂代谢紊乱。糖尿病患者常并发脂代谢紊乱, 表现为 HDL-C 降低、TC、TG、LDL-C 升高, 本研究发现 CD_{62p} 与 LDL-C 呈正相关, 说明 2 型糖尿病血瘀证患者的血小板活化与高血脂有关。这一点又与中医的“痰瘀相关理论”相吻合。另外, 也可能存在由红细胞、白细胞变形能力下降等原因所致的血液流变性下降, 诱导了 2 型糖尿病患者的血小板活化, 这还需要将来的研究进一步探讨。

参 考 文 献

1. WHO Study Group on Diabetes Mellitus. 1985. Technical Report Series. WHO Geneva 1985:727—729.
2. 中华人民共和国卫生部. 新药临床研究指导原则. 1993:82—85.
3. Sedlmayr P, Grobaupt B, Muntean W. Flow cytometric detection of intracellular platelet antigens. Cytometry 1996;23:284—289.
4. 王殿彬, 陈汝贤, 李建勇, 等. 糖尿病患者微血管病与血小板功能. 江苏医药 1994;20:121—123.
5. Schafer AI. Antiplatelet therapy. Am J Med 1996;101:201—204.
6. 潘宜智, 吾柏铭, 洪小苏, 等. 血小板活化在不稳定性心绞痛中的意义. 中华心血管病杂志 1994;22(4):247—249.

(收稿:1999-01-23 修回:1999-05-20)