

◇ 药物与临床 ◇

阿托伐他汀对 2 型糖尿病患者 单核细胞 toll 样受体 4 表达和炎症因子的影响

任丽君¹, 张麦叶², 高彬³

(1. 咸阳市第一人民医院内分泌科, 陕西 咸阳 712000; 2. 空军军医大学

西京医院内分泌科, 陕西 西安 710032; 3. 西安交通大学生命科学与技术学院, 陕西 西安 710049)

摘要:目的 观察 2 型糖尿病患者单核细胞 toll 样受体 4 表达和炎症因子的变化情况, 以及阿托伐他汀对其表达的影响。方法 选取 2013 年 1 月至 2015 年 1 月期间收治的 60 例 2 型糖尿病患者作为观察组, 并选取同期在我院进行健康体检的 60 例正常人作为对照组。采用流式细胞仪检测单核细胞 toll 样受体 4 表达; 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 分别对血清相关因子水平进行测定。将观察组中的患者分为 A 组 ($n=30$) 和 B 组 ($n=30$), 其中 A 组患者予以常规的降糖治疗, B 组患者在常规治疗基础上予以阿托伐他汀药物进行治疗。分别对两组患者的单核细胞 toll 样受体 4 表达和炎症因子水平变化情况以及治疗前后的血糖水平进行客观的评定和比较, 同时比较两组患者治疗后临床疗效和血糖指标。结果 较对照组而言, 观察组的单个核细胞 TLR4 mRNA [(4.35 ± 0.66) 比 (1.95 ± 0.30)] 和蛋白表达 [(3.79 ± 0.52) 比 (1.80 ± 0.20)] 明显升高 ($P < 0.05$); 与治疗前后相比, A 组患者的单个核细胞 TLR4 mRNA 和蛋白表达以及血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 B 组患者治疗后的单个核细胞 TLR4 mRNA [(2.09 ± 0.40) 比 (4.76 ± 0.55)] 和蛋白表达 [(1.99 ± 0.33) 比 (4.60 ± 0.47)] 以及血浆 TNF- α 等水平 [(9.10 ± 0.76) 比 (18.66 ± 1.32)] 较治疗前明显降低, 且更低于 A 组患者 ($P < 0.05$); 两组治疗前后的空腹血糖、餐后 2 h 血糖和糖化血红蛋白情况差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 两组组间的比较也差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 阿托伐他汀可以降低血清炎症因子的水平, 且可以下调 2 型糖尿病患者的单核细胞 toll 样受体 4 表达, 其的抗炎和抑制 TLR4 效果显著, 可以发挥治疗作用。

关键词: 阿托伐他汀; 2 型糖尿病; 临床疗效; 炎症因子

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.08.038

Effect of atorvastatin on the expression of toll-like receptor-4 and inflammatory factors in monocytes of patients with type 2 diabetes mellitus

REN Huijun¹, ZHANG Maiye², GAO Bin³

(1. Department of Endocrinology, The First People's Hospital of Xianyang, Xianyang, Shaanxi 712000, China;

2. Department of Endocrinology Xiking Hospital, Xi'an, Shaanxi 710032, China;

3. College of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China)

Abstract: **Objective** To observe the expression of toll-like receptor-4 and inflammatory factors in monocytes of patients with type 2 diabetes mellitus and the effect of atorvastatin on its expression. **Methods** Sixty patients with type 2 diabetes mellitus admitted from January 2013 to January 2015 were selected as the observation group, and 60 healthy subjects were selected as the control group. The expression of toll-like receptor-4 in monocytes was detected by flow cytometry. The level of serum-associated factor was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Patients in the observation group were divided into group A ($n=30$) and group B ($n=30$). Patients in group A were treated with conventional hypoglycemic therapy and patients in group B were treated with atorvastatin based on conventional therapy treatment. The expression of toll-like receptor-4 and the change of inflammatory factors in monocytes were evaluated and compared. The clinical curative effect was compared between the two groups. **Results** Compared with the control group, the expression of TLR4 mRNA [(4.35 ± 0.66) vs. (1.95 ± 0.30)] and protein [(3.79 ± 0.52) vs. (1.80 ± 0.20)] in the mononuclear cells of the observation group were significantly increased ($P < 0.05$). However, the levels of TLR4 mRNA [(2.09 ± 0.40) vs. (4.76 ± 0.55)] and protein expression [(1.99 ± 0.33) vs. (4.60 ± 0.47)] and plasma TNF- α [(9.10 ± 0.76) vs. (18.66 ± 1.32)] in mononuclear cells after treatment in group B were significantly lower than those in group B ($P < 0.05$), and the levels of TLR4 mRNA and TNF- α were significantly lower ($P < 0.05$). The total effective rate of group A was lower than that of group

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2015JM8471)

通信作者: 张麦叶, 女, 副主任医师, 研究方向为老年糖尿病合并骨质疏松, E-mail: 912234978@qq.com

B ($P < 0.05$). The fasting blood glucose, postprandial 2 h blood glucose and glycosylated hemoglobin were significantly different between the two groups ($P < 0.05$), and there was significant difference between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Atorvastatin can decrease the levels of inflammatory cytokines and down-regulate the expression of toll-like receptor 4 in monocytes of type 2 diabetes mellitus patients. The anti-inflammatory and anti-TLR4 effects of atorvastatin are significant and the clinical curative effect is improved.

Key words: Atorvastatin; Type 2 diabetes mellitus; Clinical curative effect; Inflammatory factor

随着社会经济的不断发展,人们的生活水平得到了极大的提高,与此同时,人们的饮食结构发生了巨大的改变,因此 2 型糖尿病在人群中的发病率呈现出逐年上升的趋势,严重影响了患者的身体健康的生活质量,同时也造成了家庭和社会的重担^[1-2]。有关资料报道^[3],已确诊的糖尿病患者发生心血管疾病的危险是正常人的 3 倍左右,且预后差。研究表明炎症因子和糖尿病的发生发展密切相关。也有研究表明^[4], toll 样受体 4 与介导先天免疫参与了糖尿病的炎性反应。阿托伐他汀可以降低、炎症因子的浓度的效果,同时还可以提高细胞免疫力等作用。本研究通过对 2 型糖尿病患者予以阿托伐他汀药物治疗,比较此药物对 2 型糖尿病患者的单核细胞 toll 样受体 4 和炎症因子水平的影响,旨在分析阿托伐他汀对糖尿病患者的抗炎作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2015 年 1 月咸阳市第一人民医院收治的 60 例 2 型糖尿病患者为观察组,同期在进行健康体检的 60 例正常人作为对照组。对照组包括男 33 例,女性 27 例,年龄(62.40 ± 2.59)岁,年龄范围为 59 ~ 78 岁。患者的纳入标准为^[5]: (1)符合糖尿病的诊断标准及分类标准;且其他临床症状不典型,主要表现为高血糖; (2)患者生活自理,没有严重的并发症; (3)所有患者均自愿配合本次调查。排除标准: (1)有严重的糖尿病并发症,如酮症酸中毒、严重糖尿病肾病等; (2)合并有严重甲亢、肺结核恶性肿瘤患者; (3)存在有精神病阳性家族史或个人史、有严重的认知功能障碍等无法配合护理指导的情况,或者不愿意随访的患者。本研究获咸阳市第一人民医院伦理委员会批准。将观察组患者分为观察 I 组($n = 30$)和观察 II 组($n = 30$),其中观察 I 组患者中包括男性 18 例,女性 12 例,年龄(62.40 ± 2.59)岁,年龄范围为 59 ~ 78 岁,病程(5.90 ± 0.89)年,病程范围为 4 ~ 8 年,使用胰岛素剂量为(38.99 ± 2.34) U · d⁻¹,舒张压(79.99 ± 1.56) mmHg,收缩压(140.10 ± 2.44) mmHg,血肌酐(99.02 ± 2.52) μmol · L⁻¹;观察 II 组患者中包括男性 19 例,女性 11 例,年龄(61.72 ± 2.44)岁,年龄范围为 56 ~ 75 岁,病程

(5.21 ± 0.79)年,病程范围为 4 ~ 8 年,使用胰岛素剂量为(39.1 ± 2.50) U · d⁻¹,舒张压(78.41 ± 1.33) mmHg,收缩压(138.87 ± 2.12) mmHg,血肌酐(98.33 ± 2.65) μmol · L⁻¹。经比较,两组患者的基线资料(性别、年龄、病程、血肌酐等)差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法 观察 I 组患者予以常规的降糖治疗,包括健康的饮食指导、生活方式指导、口服降糖药(除二甲双胍和胰岛素增敏药)、皮下注射胰岛素等。观察 II 组患者在常规治疗基础上予以阿托伐他汀药物(北京嘉林药业股份有限公司,生产批号 141148) 20 mg,每天 1 次,晚间口服,连服 3 个月。

1.3 TLR4 的检测方法 静脉采血 1 mL 于 ED-TA 抗凝管。取 100 μL 抗凝血,再将 10 μL 加到 TLR4 抗体,混匀后避光孵育 30 min,再裂解红细胞,离心后细胞沉淀即加 0.5 mL PBS 重悬,采用流式细胞仪检测单核细胞 toll 样受体 4 表达;采用半定量逆转录-聚合酶链式反应法(RT-PCR)检测单核细胞 TLR4 mRNA 表达,采用 DNAMAN 软件设计引物,由日本 Takara 生物技术有限公司合成。引物序列(上海申友公司合成)。扩增产物取每个反应体系 10 μL 于非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电泳结果与 β-actin 的电泳结果相对照,得出 TLR4 表达的相对强度。TLR4:上游 CCATTTTCAGCTCTGCCTTCAC 下游 ACAACAATCACCTTTGGGCTTT。

1.4 血清因子的检测方法 采用 ELISA 法分别测定血清超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等水平。试剂盒购于武汉生物工程有限公司,严格按照说明书进行操作。

1.5 观察指标 采用流式细胞仪检测单核细胞 toll 样受体 4 表达;IL-6 使用 GC-911y 计数仪测定,TNF-α 与炎性反应密切相关,其浓度与病情的严重程度成正比,使用 GC-911y 计数仪测定,hs-CRP 为肝脏合成,释放到血液中,常于炎性反应期水平增高,其水平的高低直接影响疾病的发生,使用 C 反应蛋白测定试剂盒测定。同时,对患者的治疗前后的血糖进行比较。其中血糖达标标准为:空腹血糖 5 ~ 6 mmol · L⁻¹,餐后 2 h 血糖 6 ~ 8 mmol · L⁻¹,糖化血

红蛋白 6.5% ~7.0%。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 21.0 统计软件包进行数据处理,两组之间差异的比较使用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组和观察组患者的单个核细胞 **TRL4 mRNA** 和蛋白表达比较 较对照组而言,观察组的单个核细胞 **TRL4 mRNA** 和蛋白表达治疗后明显升高($P < 0.05$),见表 1。

表 1 对照组和观察组患者的 单个核细胞 TRL4 mRNA 和蛋白表达比较/ $\bar{x} \pm s$			
组别	例数	TRL4 mRNA 相对表达水平	TRL4 相对表达水平
对照组			
治疗前	60	5.01 ± 0.87	4.87 ± 0.66
治疗后	60	1.95 ± 0.30	1.80 ± 0.20
观察组			
治疗前	60	5.16 ± 0.84	4.92 ± 0.98
治疗后	60	4.35 ± 0.66 ^a	3.79 ± 0.52 ^a

注:与对照组治疗后比较

2.2 观察I组和观察II组治疗前后的 **TRL4 mRNA** 和蛋白表达比较 与治疗前相比,治疗后观察 I 组患者的单个核细胞 **TRL4 mRNA** 和蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),而观察 II 组患者治疗后的单个核细胞 **TRL4 mRNA** 和蛋白表达较治疗前明显降低,且更低于观察 I 组患者($P < 0.05$),见表 2。

表 2 A 组和 B 组治疗前后的 TRL4 mRNA 和蛋白表达比较/ $\bar{x} \pm s$			
组别	例数	TRL4 mRNA 相对表达水平	TRL4 相对表达水平
观察 I 组	30		
治疗前		4.69 ± 0.51	4.63 ± 0.49
治疗后		4.60 ± 0.44	4.57 ± 0.41
观察 II 组	30		
治疗前		4.76 ± 0.55	4.60 ± 0.47
治疗后		2.09 ± 0.40 ^a	1.99 ± 0.33 ^a

注:与观察 I 组组治疗后相比,^a $P < 0.05$

表 3 观察 I 组和观察 II 组治疗前后的炎症因子水平比较/ $\bar{x} \pm s$					
组别	例数	CRP	TNF-α	IL-6	LDL-C
观察 I 组	30				
治疗前		21.21 ± 2.75	19.44 ± 1.67	122.30 ± 6.28	3.67 ± 0.42
治疗后		19.60 ± 0.44	18.70 ± 1.44	113.46 ± 5.89	3.00 ± 0.31
观察 II 组	30				
治疗前		20.89 ± 2.54	18.66 ± 1.32	123.55 ± 6.76	3.58 ± 0.40
治疗后		6.10 ± 0.76 ^a	9.10 ± 0.76 ^a	47.11 ± 3.20 ^a	0.89 ± 0.10 ^a

注:与观察 I 组治疗后相比,^a $P < 0.05$

2.3 观察 I 组和观察 II 组治疗前后的炎症因子水平比较 与治疗前相比,治疗后观察 I 组患者的 **hs-CRP**、**TNF-α**、**IL-6**、**TC**、**LDL-C** 差异无统计学意义($P > 0.05$),而观察 II 组患者治疗后的 **hs-CRP**、**TNF-α**、**IL-6**、**TC**、**LDL-C** 较治疗前明显降低,且更低于观察 I 组患者($P < 0.05$),见表 3。

2.4 观察 I 组和观察 II 组治疗前后的血糖指标比较 两组治疗前后的空腹血糖、餐后 2 h 血糖和糖化血红蛋白情况差异有统计学意义($P < 0.05$),两组组间的比较也差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

表 4 观察 I 组和观察 II 组治疗前后的血糖指标比较/ $\bar{x} \pm s$				
组别	例数	空腹血糖 /mmol · L ⁻¹	餐后 2 h 血糖 /mmol · L ⁻¹	糖化血红蛋白 /%
观察 I 组	30			
治疗前		13.01 ± 2.44	18.66 ± 3.13	9.26 ± 1.28
治疗后		9.76 ± 1.22	13.74 ± 2.10	8.58 ± 0.94
观察 II 组	30			
治疗前		13.74 ± 2.22	19.07 ± 3.32	9.44 ± 1.31
治疗后		5.45 ± 1.85	8.00 ± 2.28	6.94 ± 0.77

2.5 糖尿病疾病组相对表达与血清因子的相关性 **TRL4** 与病情活动的指标相关,见表 5。

表 5 糖尿病疾病组相对表达与血清因子的相关性		
血清因子	r 值	P 值
hs-CRP	0.040	0.028
TNF-α	0.042	0.010
IL-6	0.047	0.034
TC	0.046	0.049
LDL-C	0.038	0.019

3 讨论

2 型糖尿病的发病分别有遗传、肥胖、年龄和现代生活方式等几大因素相关,该疾病的治疗主要以控制血糖为主^[6-7]。而目前,在临床中已有研究证明^[8],炎症亦在与 2 型糖尿病的发生和发展中起着重要的影响作用。其中,急性和慢性高血糖通过多种信号参与 2 型糖尿病患者机体的炎症反应^[9]。

所以,在对 2 型糖尿病患者进行有效的降糖治疗外,再进行抗炎亦是治疗此疾病的有效举措之一。

相关文献显示^[10],单核细胞 toll 样受体 4 信号通路和 2 型糖尿病的炎症反应具有相关性。因氧化应激,糖基化反应的存在,患者外周血中和外周血单核细胞中的 TLR4 配体增加,TLR4 与之结合后,诱导炎症因子的产生。炎症的激活与 TLR4 高表达相关^[11]。既往研究表明,2 型糖尿病患者 TLR4 表达增高,与血浆 TNF- α 呈正相关,Devaraj 等^[12]报道 1 型糖尿病大鼠,TLR4 表达上调与炎症因子增加密切相关。TLR4 缺陷的大鼠链脲佐菌素诱导发生糖尿病后,TLR 下游分子 MyD88,磷酸化 IRAK-1 蛋白,Trif,IRF3,和 NF- κ B 活性明显下降,血清炎症因子 IL-1 β ,IL-6, MCP-1) 和 TNF- α 降低。可见降低 TLR4 表达和抑制 TLR4 信号通路可能会减轻 2 型糖尿病的炎症反应。陈海英等^[13]的报道中显示,2 型糖尿病患者单细胞 TLR4 表达与血清炎症因子 CRP 和 TNF- α 等相关。罗成等^[14]的研究发现,糖尿病大鼠 TLR4 表达与炎症因子亦具有相关性,TLR4 缺陷的大鼠发生糖尿病后,其炎症因子亦随之降低。而在本研究发现,与健康的对照组相比,发生 2 型糖尿病患者的 TLR4 mRNA 和蛋白表达明显上调,与以上文献报道结果相似。由此说明了 TLR4 信号通路的激活和介导的炎症反应在 2 型糖尿病的机体中发挥了重要作用。

近年来,他汀类药物被临床中广为使用。他汀类药物降低糖尿病患者心血管风险不能单用血脂降低解释。他汀类药物具有调脂外的多向性作用,其临床获益可能与抗炎作用相关。有研究证明^[15],他汀类药物可以降低健康人群的 TLR4 表达和下游信号分子,但其在糖尿病患者中能否发挥抗炎的效果和是否与抑制 TLR4 通路相关尚未确定。而在本研究中的结果显示,通过阿托伐他汀进行治疗的 2 型糖尿病患者的 TLR4 mRNA 和蛋白表达、CRP、TNF- α 、IL-6、LDL-C 等因子明显降低,此外,本研究经相关性结果分析发现,TLR4 与 CRP、TNF- α 、IL-6、LDL-C 间具有相关性,这说明了阿托伐他汀在一定程度上降低糖尿病患者 TLR4 蛋白表达,进而降低 TLR4 通路激活介导的炎症介质产生,且可以起到有效的抗炎效果,同时,此发挥的作用和 TLR4 信号通路的抑制具有密切的关联。所以,我们认为可将 TLR4 信号通路和炎症因子作为评估 2 型糖尿病患者疾病情况和严重度以及疗效的有利指标。同时,本研究中发现,阿托伐他汀可以以辅助调节患者的糖代谢和控制血糖,由表 4 可以看出,B 组的血糖指标比 A 组和干预前的改善更为显著。

综上所述,阿托伐他汀的机制与 TLR4 及炎症因子的释放相关,这可能成为有效治疗 2 型糖尿病治疗作用的机制之一,且 TLR4 信号通路亦可能成为治疗 2 型糖尿病的潜在靶点。

参考文献

- [1] UDELL JA, BHATT DL, BRAUNWALD E, et al. Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Moderate or Severe Renal Impairment: Observations From the SAVOR-TIMI 53 Trial[J]. Diabetes Care, 2015, 38(4):696-705.
- [2] NORRIS SL, ZHANG X, AVENELL A, et al. Long-term non-pharmacological weight loss interventions for adults with type 2 diabetes mellitus[J]. Sao Paulo Medical Journal, 2016, 134(2):85-86.
- [3] 李曼丽,郑倩,沈清. 外周血单核细胞 Toll 样受体 2 及 Toll 样受体 4 表达与糖尿病慢性肾脏疾病发生关系的研究[J]. 中国糖尿病杂志,2013,21(10):871-873.
- [4] 贾文杰,刘素筠. 辛伐他汀对 I 型糖尿病大鼠的肾脏保护作用及对肾脏组织 Toll 样受体 4 和 MCP-1 表达的影响[J]. 中国医疗前沿,2012,7(2):23-24, 85.
- [5] 黄金,夏杰琼,周雯,等. 低血糖生成指数和低血糖生成负荷膳食对 2 型糖尿病患者人体测量学指标的影响[J]. 中华护理杂志,2014,49(4):418-423.
- [6] 冯晓桃,陈群,梁霄. 蒲黄总黄酮对 2 型糖尿病大鼠炎症因子和胰岛素敏感性的影响[J]. 广州中医药大学学报,2014,31(6):936-939, 943.
- [7] 刘春燕,陈云霞,苏俊平,等. 百令胶囊对糖尿病肾病患者单核细胞 Toll 样受体 4 表达及炎症因子的影响[J]. 河北医药,2015,37(24):3703-3706.
- [8] 黄敏,黄俊,段微,等. 罗苏伐他汀对 2 型糖尿病合并冠心病患者炎症因子水平、调控因子活性和胰岛素抵抗的影响[J]. 河北医药,2015(2):191-193.
- [9] 邓婷婷,周素娴. 2 型糖尿病合并高血压患者血脂、血糖代谢情况及其与高血压病程的关系[J]. 广东医学,2014,35(5):722-724.
- [10] 周倩,董萍,李晗,等. 糖尿病肾脏疾病患者外周血单核细胞 TLR4 基因表达及其与炎症因子的关系[J]. 山东医药,2015,55(20):83-84.
- [11] 胡伟. 厄贝沙坦与氨氯地平治疗 2 型糖尿病合并高血压的临床研究[J]. 医学综述,2014,20(22):4210-4212.
- [12] DEVARAJ S, TOBIAS P, JIALAL I, et al. Knockout of toll-like receptor-4 attenuates the pro-inflammatory state of diabetes[J]. Cytokine, 2011, 55(3):441-445.
- [13] 陈海英,曲鹏,丁彦春,等. 2 型糖尿病患者单核细胞 TLR4 表达及其与血浆 TNF- α 相关性研究[J]. 临床内科杂志,2009,26(4):261-263.
- [14] 罗成,张辉,曾蜜. 阿托伐他汀对 2 型糖尿病肾病患者炎症因子的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(11):1114-1115.
- [15] 赵立军,李勃,文军,等. 阿托伐他汀对 2 型糖尿病合并高脂血症患者炎症因子的影响[J]. 陕西医学杂志,2014,43(12):1601-1603.

(收稿日期:2017-02-23,修回日期:2017-05-09)