

粒细胞集落刺激因子动员2型糖尿病患者外周血CD34⁺细胞的变化**

窦立冬¹, 崔晓兰², 陈建河¹, 王立梅¹, 王意忠¹

Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes peripheral blood CD34⁺ cells in patients with type 2 diabetes mellitus

Dou Li-dong¹, Cui Xiao-lan², Chen Jian-he¹, Wang Li-mei¹, Wang Yi-zhong¹

Abstract

BACKGROUND: The number of mobilized peripheral blood CD34⁺ cells significantly decreases in type 2 diabetes mellitus patients compared with normal subjects.

OBJECTIVE: To investigate the changes of mobilized peripheral blood CD34⁺ cells in type 2 diabetes mellitus patients.

METHODS: A total of 234 patients with type 2 diabetes mellitus were divided into five categories according to disease duration, newly diagnosed type 2 diabetes (≤ 1 year) and diabetes duration (1-5, 5-10, 10-15, ≥ 15 years). CD34⁺ cells were mobilized with granulocyte colony-stimulating factor. Five days later, the number of peripheral blood CD34⁺ cells was detected with flow cytometry. Its relationship with disease duration, blood lipids and uric acid was analyzed by person-related analysis and multiple regression analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: The number of mobilized peripheral blood CD34⁺ cells was associated with the triacylglycerol ($r=-0.202, P=0.002$), the apoprotein-B ($r=-0.276, P=0.000$), and the uric acid ($r=-0.297, P=0.000$). Statistical analysis found that, the number of mobilized peripheral blood CD34⁺ cells decreased with development of diabetes mellitus.

Dou LD, Cui XL, Chen JH, Wang LM, Wang YZ. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes peripheral blood CD34⁺ cells in patients with type 2 diabetes mellitus. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(23):4295-4298. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 与正常人比较, 2型糖尿病患者外周血CD34⁺细胞含量已有明显下降。

目的: 分析2型糖尿病患者外周血动员后CD34⁺细胞比例的变化。

方法: 将234例2型糖尿病患者按病程分为5组(<1年, 1~5年, >5~<10年, 10~15年和 ≥ 15 年), 予以粒细胞集落刺激因子动员。动员5d后, 使用流式细胞仪检测外周血CD34⁺细胞的含量, 并利用Person简单相关及多元回归方法分析其与病程、血脂、尿酸的关系。

结果与结论: 糖尿病患者外周血动员后CD34⁺细胞水平与三酰甘油相关($r=-0.202, P=0.002$), 与载脂蛋白B相关($r=-0.276, P=0.000$), 与尿酸相关($r=-0.297, P=0.000$)。经统计分析发现, 糖尿病患者外周血动员后CD34⁺细胞数随糖尿病病程进展而逐渐下降。

关键词: 粒细胞集落刺激因子; 2型糖尿病; CD34⁺细胞; 动员; 病程; 相关性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.23.026

窦立冬, 崔晓兰, 陈建河, 王立梅, 王意忠. 粒细胞集落刺激因子动员2型糖尿病患者外周血CD34⁺细胞的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(23):4295-4298. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

抗原CD34通常被认为是造血干细胞特征性表面标志。正常情况下, 外周血CD34⁺细胞含量甚微, 可作为评价骨髓功能的重要指标之一。2型糖尿病患者由于存在严重代谢紊乱, 对各种组织、器官造成不同程度的损害^[1-2], 骨髓组织也不例外。Fadini等^[3-5]对2型糖尿病患者的研究发现, 与正常人比较, 2型糖尿病患者外周血CD34⁺细胞含量已有明显的下降, 而且与病程有一定的相关性。目前国内关于外周血CD34⁺细胞在糖尿病患者中的研究较少, 关于动员后外周血CD34⁺细胞在糖尿病患者中的研究尚无报道。本研究旨在比较新发及不同病程的2型糖尿病患者动员后外周血CD34⁺细胞的

差异, 并探讨各种代谢因素与动员后外周血CD34⁺细胞的关系。

1 材料和方法

设计: 病例分析。

时间及地点: 于2009-07/2010-04在北京大学航天临床医学院完成。

对象: 选择同期本院进行外周血干细胞治疗糖尿病的患者。

纳入标准: ①符合WHO(1999)糖尿病诊断标准2型糖尿病诊断标准。②患者对治疗知情同意。

排除标准: ①1型糖尿病和其他特殊类型糖尿病。②恶性肿瘤。③严重心脏病(急性心肌梗死, 失代偿性心力衰竭, 严重心律失常、不稳定型心绞痛等)。

¹Department of Hematology and Endocrinology, Aerospace Clinical Medical College of Peking University, Beijing 100049, China;

²Pharmacology Laboratory, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Dou Li-dong★, Studying for master's degree, Department of Hematology and Endocrinology, Aerospace Clinical Medical College of Peking University, Beijing 100049, China

Correspondence to: Wang Yi-zhong, Doctor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Hematology and Endocrinology, Aerospace Clinical Medical College of Peking University, Beijing 100049, China vipwyz@126.com

Supported by: Scientific Research Fund of China Aerospace Science and Industry Group, No. 2009-JKBZ-003*

Received: 2011-03-15 Accepted: 2011-04-25

¹ 北京大学航天临床医学院血液内分泌科, 北京市 100049; ² 中国中医科学院中药所药理室, 北京市 100700

窦立冬★, 男, 1984 年生, 河北省人, 北京大学在读硕士, 主要从事干细胞治疗糖尿病的临床研究。doulidong999@163.com

通讯作者: 王意忠, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 北京大学航天临床医学院血液内分泌科, 北京市 100049 vipwyz@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)23-04295-04

收稿日期: 2011-03-15
修回日期: 2011-04-25
(20110315007/W · Y)

共入选 234 例, 其中男 192 例, 女 42 例; 按糖尿病病程将 234 例糖尿病患者分为新发 (<1 年)、1~5 年、>5 年, <10 年、10~15 年及 ≥15 年 5 组。

方法: 皮下注射粒细胞集落刺激因子 4~6 μg/(kg·d) 动员 5 d, 第 5 天采用 Facscalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 检测外周血 CD34⁺ 细胞含量。

采用 Glamour 2000 全自动生化分析仪测定总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、载脂蛋白 A1 (Apo-A1)、载脂蛋白 B (Apo-B) 及尿酸。

主要观察指标: ① 外周血 CD34⁺ 细胞与糖

尿病病程的关系。② 动员后外周血 CD34⁺ 细胞与三酰甘油、载脂蛋白 B 及尿酸相关性分析。③ 影响动员后外周血 CD34⁺ 细胞的多因素逐步回归分析。

统计学分析: 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 相关分析采用 Person 简单相关, 多因素分析采用多元逐步回归分析, 所有统计均用 SPSS 13.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 糖尿病患者的详细资料 见表 1。

表 1 不同病程 2 型糖尿病患者的一般情况比较
Table 1 Basic information of type 2 diabetes mellitus patients

Item	Newly diagnosed type 2 diabetes (≤1 yr) (n=22)	Diabetes duration 1-5 yr (n=51)	Diabetes duration 5-10 yr (n=83)	Diabetes duration 10-15 yr (n=56)	Diabetes duration ≥15 yr (n=22)
Age (yr)	41±8	42±8	47±9 ^b	51±8 ^b	58±6 ^b
Sex (M/F)	20/2	39/12	68/15	45/11	20/2
BMI (kg/m ²)	25.3±3.5	25.8±3.0	25.7±3.0	25.8±2.8	26.2±2.5
HbA1c (%)	7.1±1.5	7.8±2.2	8.5±2.3 ^b	8.7±2.9 ^a	7.4±1.3
TC (mmol/L)	4.3±1.0	4.7±1.0	5.1±1.0 ^b	5.0±1.2 ^b	4.7±0.7
TG (mmol/L)	1.4±0.6	1.9±1.3	1.9±1.2	1.9±1.4	2.1±1.7
HDL (mmol/L)	0.9±0.2	0.9±0.2	0.9±0.2	1.0±0.5	1.0±0.3
LDL (mmol/L)	2.7±0.8	2.9±0.9	2.9±0.9	3.0±1.0	3.0±0.6
Apo-A1 (g/L)	1.1±0.2	1.1±0.1	1.2±0.2 ^a	1.2±0.2 ^a	1.1±0.1
Apo-B (g/L)	0.8±0.2	1.1±0.4 ^b	1.2±0.4 ^b	1.2±0.4 ^b	1.1±0.3 ^a
UA (μmol/L)	275.5±70.2	295.4±80.2	316.7±81.0 ^a	292.2±89.1	343.9±88.6 ^b
DN (n%)	2/9	6/12	14/17 ^a	14/25 ^b	7/32 ^b
DR (n%)	1/5	10/20 ^b	21/25 ^b	26/46 ^b	17/77 ^b
AS (n%)	13/59	38/76 ^b	58/70 ^b	50/89 ^b	20/91 ^b

BMI: Body mass index; A1c: glycosylated hemoglobin; TC: total cholesterol; TG: triacylglycerol; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; Apo-A1: apoprotein A1; Apo-B: apoprotein B; UA: uric acid; DN: diabetic nephropathy; DR: diabetic retinopathy; AS: atherosclerosis; ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, vs. newly diagnosed type 2 diabetes group

5 组间在性别、体质量指数 (BMI)、三酰甘油、高密度脂蛋白及低密度脂蛋白差异无显著性意义; 病程 > 5 年, < 10 年组及病程 10~15 年组的年龄、糖化血红蛋白 (HbA1c)、总胆固醇、载脂蛋白 A1 及载脂蛋白 B 明显高于新发糖尿病组。

2.2 各组患者动员后外周血 CD34⁺ 细胞水平 新发组 (0.15±0.4)%、1~5 年组 (0.14±0.6)%、>5 年, <10 年组 (0.11±0.6)%、10~15 年组 (0.10±0.5)%、≥15 年组 (0.09±0.5)%。后 3 组较前两组差异有显著性意义 (*P* < 0.01), 新发组及 1~5 年组之间比较差异无显著性意义, >5 年, <10 年组、10~15 年组及 ≥15 年组 3 组之间比较差异无显著性意义。见图 1。

2.3 动员后外周血 CD34⁺ 细胞与三酰甘油、载脂蛋白 B 及尿酸相关性分析 2 型糖尿病患者动员后外周血 CD34⁺ 细胞水平与三酰甘油、载脂

蛋白 B 及尿酸均存在线性相关关系, 其中与载脂蛋白 B 及尿酸相关系数较高。见图 2~4。

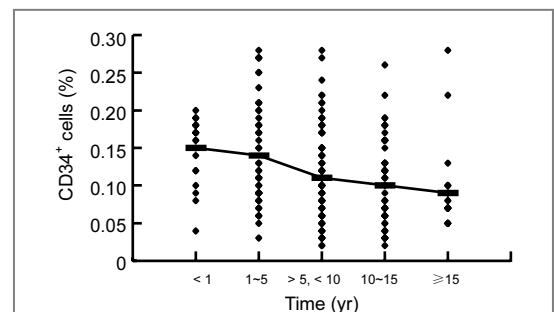
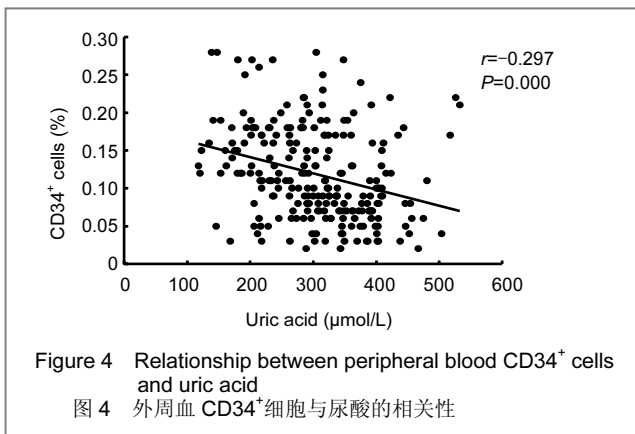
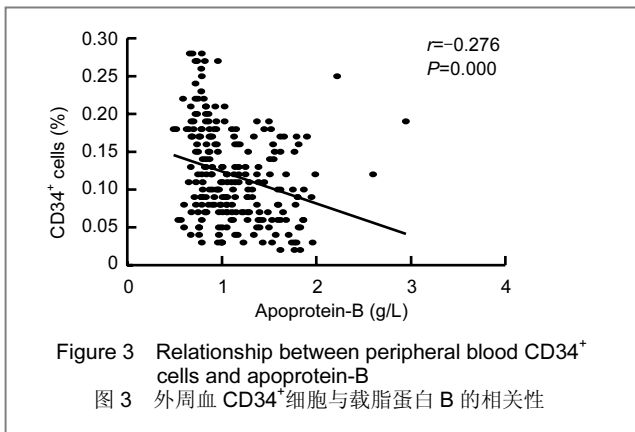
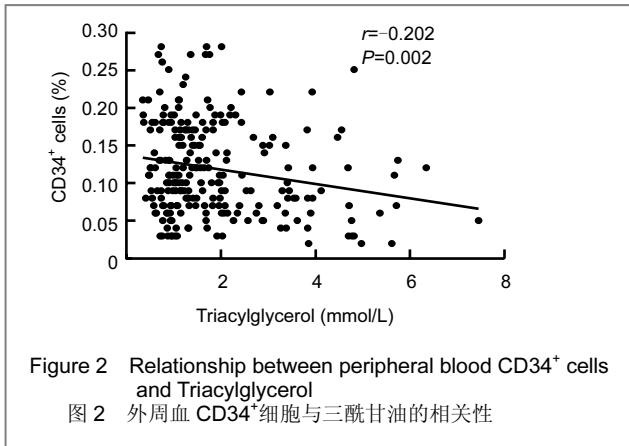


图 1 外周血 CD34⁺ 细胞与糖尿病病程的关系
Figure 1 Relationship between peripheral blood CD34⁺ cells and disease duration

2.4 影响动员后外周血 CD34⁺ 细胞的多因素逐步回归分析 动员后外周血 CD34⁺ 细胞为因变量, 以性别、年龄、病程、BMI、三酰甘油、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、载

脂蛋白A、载脂蛋白B及尿酸为自变量, 进行多元逐步回归分析显示病程是影响2型糖尿病动员后外周血CD34⁺细胞含量的主要因素, 其标准回归系数为-0.259($P < 0.001$)。



3 讨论

CD34抗原是高度糖基化的1型跨膜糖蛋白, 选择性表达于人类及其他哺乳动物的造血干/祖细胞表面, 并随细胞的成熟逐渐减弱至消失。因此, 可以通过检测外周血CD34⁺细胞数来评价外周血干细胞含量。未经动员的外周血CD34⁺细胞数量少, 尤其在糖尿病患者中, 流式

细胞仪检测出的结果范围狭窄。动员后外周血CD34⁺细胞明显增加, 检测结果范围及准确性都有一定提高。而且动员后外周血CD34⁺细胞数在一定程度上能直接的反应骨髓功能。

本组结果显示, 随着糖尿病的发展, 动员后外周血CD34⁺水平逐渐下降, 说明2型糖尿病患者随病程发展CD34⁺细胞增殖功能受损^[6-8]。另外, 这种现象在一定程度上验证糖尿病患者存在骨髓损害的说法, 而且随着糖尿病的发展骨髓损害逐渐加重。基质细胞衍生因子1 α (SDF-1 α)是一种介导造血干细胞归巢的趋化因子^[9-11], 有研究表明, 基质细胞衍生因子1 α 介导骨髓造血干细胞的活化, 在糖尿病骨髓中基质细胞衍生因子1 α 水平下降致使动员后外周血CD34⁺细胞含量下降^[12-13]。

本组结果显示, 依据病程分成的5组糖尿病患者, 随着病程的延长, 外周血CD34⁺逐渐下降, 其中, >5~<10年组出现一次较明显的下降。引起降低的机制目前尚不明确。结果显示外周血不成熟的骨髓来源细胞-CD34⁺细胞, 通过作为血管内皮祖细胞库和多种生长因子的重要来源来维持血管系统的平衡^[6, 14]。血管内皮细胞暴露于高血糖的环境中可引起内皮细胞中葡萄糖氧化, 活性氧大量生成, 从而导致糖尿病患者内皮细胞中的抗氧化贮备明显降低^[15-17], 当储备能力丧失时, 外周血CD34⁺细胞含量就会出现较明显的降低。另外, 随着血管内皮的损伤, 毛细血管阻塞, 局部组织缺血, 外周血CD34⁺细胞在血管修复及病理性新生血管形成上发生紊乱, 加重糖尿病微血管及大血管并发症^[18-19]。所以推测以上是引起CD34⁺细胞下降的因素。

动员后外周血CD34⁺细胞含量除了与病程有较明显的线性相关外, 还受多种因素的影响。相关分析提示, 动员后外周血CD34⁺细胞含量与三酰甘油、载脂蛋白B及尿酸均具有良好的负相关, 且与尿酸具有更好的相关性。而与总胆固醇及低密度脂蛋白无明显相关性。高三酰甘油及载脂蛋白B经常作为动脉粥样硬化与心血管病的主要危险因素, 因此, 外周血CD34⁺细胞含量下降可能是三酰甘油及载脂蛋白B升高诱发动脉粥样硬化及心血管病的原因之一。Liu等^[20]发现从高三酰甘油患者餐后血浆中分离残样微粒能诱导外周血CD34⁺细胞的衰老, 这可能是三酰甘油与外周血CD34⁺细胞呈负相关的重要原因。然而, 也有人发现两者的相关性在多元分析中丢失^[21], 这一发现则反映高三酰甘油不是一个独立的决定因子, 只是潜在生理过程的结果, 例如胰岛素抵抗。尿酸与外周血CD34⁺细胞含量明显负相关, 原因在于高尿酸引起血管内皮损伤及功能失调, 进而抑制外周血CD34⁺细胞^[22-24]。其可能机制: ①高尿酸血症促进低密度脂蛋白氧化和脂质过氧化。②高尿酸血症伴随氧自由基生成增加并参与炎症反应^[25]。

多项研究显示, 外周血CD34⁺细胞与心血管病及糖

尿病并发症呈明显相关性^[26-30]。本组结果发现外周血 CD34⁺细胞与多种代谢指标明显相关。因此, 外周血 CD34⁺细胞在预防和治疗糖尿病代谢紊乱及血管并发症中可能是一个潜在的治疗靶点。

4 参考文献

- [1] Marcovecchio M L, Lucantoni M, Chiarelli F, et al. Role of Chronic and Acute Hyperglycemia in the Development of Diabetes Complications. *Diabetes Technol Ther.* 2011;13(3):389-392.
- [2] Rosei E A, Rizzoni D. Small artery remodelling in diabetes. *J Cell Mol Med.* 2010;14(5):1030-1036.
- [3] GianPaolo Fadini, Elisa Boscaro, Stefanie Dimmeler, et al. Time Course and Mechanisms of Circulating Progenitor Cell Reduction in the Natural History of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2010; 33(5):1097-1102.
- [4] Fadini GP, Agostini C, Boscaro E, et al. Mechanisms and significance of progenitor cell reduction in the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord.* 2009;7(1):5-10.
- [5] Zou C, Liu JY. Jiangxi Yixueyuan Xuebao. 2009;49(7):62-64. 邹丛, 刘建英. 2型糖尿病患者外周血循环祖细胞的变化和临床意义 [J]. 江西医学院学报, 2009;49(7):62-64.
- [6] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999-1007.
- [7] Fadini GP, De Kreutzenberg SV, Coracina A, et al. Circulating CD34⁺ Cells, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk. *Eur Heart J.* 2006;27(18):2247-2255.
- [8] Orlandi A, Chavakis E, Seeger F, et al. Long-term diabetes impairs repopulation of hematopoietic progenitor cells and dysregulates the cytokine expression in the bone marrow microenvironment in mice. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(6):703-712.
- [9] Lau T, Wang D. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. 2011;11(2):189-197.
- [10] Ceradini D, J, Kulkarni A, R, Callaghan M J, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004;10(8):858-864.
- [11] Salvucci, O, Basik M, Yao L, et al. Evidence for the involvement of SDF-1 and CXCR4 in the disruption of endothelial cell-branching morphogenesis and angiogenesis by TNF-alpha and IFN-gamma. *J Leukoc Biol.* 2004;76(1):217-226.
- [12] Oren M, Tepper, Jacquelyn Carr, et al. Decreased Circulating Progenitor Cell Number and Failed Mechanisms of Stromal Cell-Derived Factor-1[alpha] Mediated Bone Marrow Mobilization Impair Diabetic Tissue Repair. *Diabetes.* 2010;59(8):1974-1983.
- [13] Zhang Q, Guo R, Schwarz EM, et al. TNF inhibits production of stromal cell-derived factor 1 by bone stromal cells and increases osteoclast precursor mobilization from bone marrow to peripheral blood. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):R37.
- [14] Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30(5):1305-1313.
- [15] Fadini G P, Miorin M, Facco M, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells Are Reduced in Peripheral Vascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(9):1449-1457.
- [16] Fadini GP, Sartore S, Albiero M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(9): 2140-2146.
- [17] Wong CY, Qiuwaxi J, Chen H, et al. Daily intake of thiamine correlates with the circulating level of endothelial progenitor cells and the endothelial function in patients with type II diabetes. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(12):1421-1427.
- [18] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004; 95: 343-353.
- [19] Kevin Tan a, Emma Lessieur, et al. Impaired function of circulating CD34⁺CD45⁻ cells in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Experimental Eye Research.* 2010;91(6):229-237.
- [20] Liu L, Wen T, Zheng XY, Yang DG, et al. Remnant-like particles accelerate endothelial progenitor cells senescence and induce cellular dysfunction via an oxidative mechanism. *Atherosclerosis.* 2009;202(2):372-377.
- [21] Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, et al. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia.* 2007;50(10):2156-2163.
- [22] Papezikova I, Pekarova M, Lojek A, et al. The effect of uric acid on homocysteine-induced endothelial dysfunction in bovine aortic endothelial cells. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009;30(1):112-115.
- [23] Bainbridge SA, Roberts JM, von Versen-Hoyneck F, et al. Uric acid attenuates trophoblast invasion and integration into endothelial cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(2):440-450.
- [24] Zharikov S, Krotova K, Hu H, et al. Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(5): 1183-1190.
- [25] Domanski L, Safranow K, Ostrowski M, et al. Oxypurine and purine nucleoside concentrations in renal vein of allograft are potential markers of energy status of renal tissue. *Arch Med Res.* 2007; 38(2):240-246.
- [26] Makino H, Okada S, Nagumo A, et al. Decreased circulating CD34⁺ cells are associated with proliferative of diabetic nephropathy. *Diabet. Med.* 2009;26(6):171-173.
- [27] Lee IG, Chae SL, Kim JC, et al. Involvement of circulating endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eye.* 2006;20(5):546-552.
- [28] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89(1):E1-7.
- [29] Liu X, Li Y, Liu Y, et al. Endothelial progenitor cells (EPCs) mobilized and activated by neurotrophic factors may contribute to pathologic neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol.* 2010;176(1):504-515.
- [30] Sivan-Loukianova, E Awad O A, Stepanovic V, et al. CD34⁺ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J Vasc Res.* 2003;40(4):368-377.
- [31] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01. 中华人民共和国国务院. 医疗机构管理条例. 1994-09-01.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 航天科工集团科研基金项目 (2009-JKBZ-003)。

作者贡献: 实验设计为第一作者和通讯作者, 实验实施为第一、三、四作者, 实验评估为第二作者, 资料收集及成文为第一作者。审校为通讯作者, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 根据国务院《医疗机构管理条例》规定^[31], 患者知情同意。

本文创新性: 干细胞治疗糖尿病已经成为实验室及临床研究热点问题, 2型糖尿病患者外周血 CD34⁺细胞含量较常人已有明显下降, 其下降的特点及影响因素国内外研究较少, 尤其动员后外周血 CD34⁺细胞含量是自体干细胞治疗糖尿病过程中干细胞提取及评估预后的重要指标, 就 2型糖尿病患者动员后外周血 CD34⁺细胞与多种致病因素的相关性进行探讨, 目前国内外尚无相关的研究。