

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.03.012

文章编号: 1005- 8982 (2017) 03- 0059- 05

2 型糖尿病患者血清 Trx、Txnip 与认知功能的相关性*

马一嘉¹, 房辉², 李玉凯², 王耕银², 张志月¹, 张红蕊¹, 张馨心², 邱明月²

(1. 华北理工大学 研究生学院, 河北 唐山 063009; 2. 河北省唐山市工人医院
内分泌二科, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 探讨 2 型糖尿病 (T2DM) 患者血清硫氧还蛋白 (Trx)、硫氧还蛋白互作蛋白 (Txnip) 水平及 Trx 活性与认知功能的相关性, 为 T2DM 患者认知功能障碍的防治提供新思路。**方法** 选取 2014~2015 年在河北省唐山市工人医院内分泌科住院的 T2DM 患者 100 例作为病例组, 同时选取正常健康人群 90 例作为对照组。收集以上所有研究对象的人口学资料 (年龄、性别、教育程度、体重指数、病程等) 及临床生化指标 [空腹血糖 (FPG)、糖化血红蛋白 (HbA1C)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL)], 并进行认知功能量表 RBANS (包括即时记忆、视觉广度、言语功能、注意力、延迟记忆) 评分。血清 Trx、Txnip 水平采用酶联免疫吸附法检测, Trx 活性采用胰岛素还原法检测。**结果** ① 与正常对照组比较, T2DM 患者 FPG、HbA1C、TG、Trx、Txnip 水平升高 ($P<0.05$), Trx 活性降低 ($P<0.05$); ② 与正常对照组比较, T2DM 患者 RBANS 量表即时记忆、延迟记忆、总分降低 ($P<0.05$); ③ 在 T2DM 患者患者中血清 Trx、Txnip 水平与空腹血糖、糖化血红蛋白呈正相关 ($P<0.05$), Trx 活性与 Txnip 水平呈负相关 ($P<0.05$); ④ 血清 Trx、Txnip 水平与 RBANS 量表延迟记忆、总分呈负相关 ($P<0.05$); Trx 活性与其呈正相关 ($P<0.05$)。**结论** 血清 Trx、Txnip 升高, 以及 Trx 活性降低可能是 T2DM 患者出现认知功能障碍的一个危险因素。

关键词: 2 型糖尿病; 认知功能; 硫氧还蛋白; 硫氧还蛋白互作蛋白; 氧化应激

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

Correlations of serum Trx, Txnip and Trx activity with cognitive function in patients with type 2 diabetes mellitus*

Yi-jia Ma¹, Hui Fang², Yu-kai Li², Geng-yin Wang², Zhi-yue Zhang¹,
Hong-ruai Zhang¹, Xin-xin Zhang², Ming-yue Qiu²

(1. Graduate School, North China University of Science and Technology, Tangshan,
Hebei 063009, China; 2. Department of Endocrinology, Tangshan
Gongren Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the cognitive function and serum thioredoxin (Trx) and thioredoxin-interacting protein (Txnip) levels, and Trx activity in type 2 diabetic patients, so as to provide new ideas for prevention and treatment of cognitive impairment in these patients. **Methods** A total of 100 patients with type 2 diabetes mellitus who were hospitalized into Department of Endocrinology, Tangshan Gongren Hospital from 2014 to 2015 were enrolled as case group, at the same time, 90 healthy people were selected as control group. Demographic data (age, gender, education level, BMI, duration of disease, etc.) and clinical biochemical indicators (FPG, HbA1c, TC, TG, HDL and LDL) of all the research objects were collected. The cognitive function scale (RBANS) (including immediate memory, vision span, speech function, attention and delayed memory) scores were evaluated. The serum Trx and Txnip levels were detected by ELISA, the activity of Trx was tested by insulin reduction assay. **Results** Compared with the control group,

收稿日期: 2016-01-14

* 基金项目: 河北省自然科学基金青年基金 No: H2015105083)

[通信作者] 房辉, E-mail: fanghui@medmail.com.cn; Tel: 0315-3722505

FPG, HbA1C, TG, Trx and Txnip levels increased in the case group ($P < 0.05$), but Trx activity decreased in the case group ($P < 0.05$). Compared with the control group, RBANS scores including immediate memory, delayed memory and total scores were lowered in the T2DM patients ($P < 0.05$). In the case group, the serum Trx and Txnip levels were positively associated with fasting blood glucose and glycosylated hemoglobin ($P < 0.05$), the activity of Trx was negatively correlated with the level of Txnip ($P < 0.05$). The serum Trx and Txnip levels were negatively correlated with and the activity of Trx was positively correlated with the total RBANS scale score and the delayed memory score ($P < 0.05$). **Conclusions** The increased serum Trx and Txnip and decreased Trx activity may be risk factors for cognitive dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; cognition; thioredoxin; thioredoxin-interacting protein; oxidative stress

近年来,随着对 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 研究的逐步增多,发现 T2DM 作为一种独立的危险因素,能够加速认知功能减退,甚至使老年痴呆的风险增加 (1.5~2.0 倍)^[1],但其发病机制目前尚未十分明确,氧化应激是其重要的发病机制之一。硫氧还蛋白 (Thioredoxin, Trx) 是一种高度保守且广泛表达的小分子蛋白,具有清除自由基、维持体内细胞内外氧化还原平衡的作用,可以直接抑制凋亡信号调节激酶 (apoptosis signal-regulating kinase, ASK-1), 还能通过调节转录因子参与细胞抗氧化应激、抗凋亡的细胞内信号传导^[2]。目前关于 Trx 与 2 型糖尿病认知障碍的研究较少,本研究对 T2DM 患者与正常健康人的血清 Trx、硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin interacting protein, Txnip) 及 Trx 活性等氧化应激指标进行对比分析,进一步探讨硫氧还蛋白系统在 T2DM 合并认知功能障碍中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 12 月 - 2015 年 5 月在河北省唐山市工人医院住院的 2 型糖尿病患者 100 例作为病例组。其中,男性 56 例,女性 44 例,均符合 1999 年世界卫生组织糖尿病诊断标准。同时从医院健康体检中心选取男性健康人群,90 例,男性 42 例,女性 48 例作为对照组。排除标准:① 糖尿病急、慢性并发症;② 急、慢性感染性疾病;③ 正在或者既往 3 个月内服用甾体类抗炎药,如:阿司匹林、对乙酰氨基酚等;④ 甲状腺及甲状腺旁腺疾病或者其它与内分泌相关的疾病;⑤ 癌症、肝病、肾病、视网膜病、冠状动脉粥样硬化性心脏病、严重的高血压、脑卒中、神经精神异常及其它中枢神经系统疾病;⑥ 酗酒。

1.2 方法

1.2.1 一般临床资料收集 记录患者的人口学资

料,包括年龄、教育情况、体重指数 (body mass index, BMI)、病程。收集其临床检验结果,包括空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG)、糖化血红蛋白 (hemoglobin A1c, HbA1c)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (Triglyceride, TG)、高密度脂蛋白 (high density lipoproteins, HDL)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)。

1.2.2 血清 Trx、Txnip 水平及 Trx 活性检测 患者于清晨 6:00~7:00 抽取空腹静脉血 5 ml,室温放置 30 min, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液放入 -80℃ 冰箱中待用,采用酶联免疫吸法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清中 Trx、Txnip。采用胰岛素还原法检测 Trx 活性,即将海马组织降解液与胰岛素、硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase-1, TrxR)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 孵育。酶标仪检测 412 nm 处光密度值,计算出 Trx 活性。

1.2.3 认知功能评定 采用重复性成套神经心理状态测验 (repeatable battery for the assessment of neuropsychological status, RBANS) 进行认知功能评定。其包括 5 个分测验,每个分测验下设 2 个子测验:即时记忆 (包括词汇学习和故事复述)、视觉广度 (包括图形临摹和线条定位)、言语功能 (包括图画命名和语义流畅)、注意力 (包括数字广度和编码任务) 及延迟记忆 (包括词汇回忆、故事回忆、图形回忆和词汇再识)。将以上 5 个分测验得分相加,经查表以后获得一个校正年龄影响的总分。RBANS 量表目前已经被翻译成中文,并且在汉族人群中试用的结果表明其具有良好的信度和效度^[3],是评价认知功能的敏感工具。

1.2.4 实验分组 将所有研究对象分为病例组和对照组,比较两组的一般资料及 RBANS 认知功能量

表评分。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,符合正态分布的计量资料用独立样本 t 检验,非正态分布的计量资料用非参数秩和检验;计数资料以率表示,用 χ^2 检验。单因素相关性分析用 Pearson 或 Spearman 相关分析,多因素相关分析用偏相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料及实验室指标比较

病例组与对照组 FPG、HbA1C、TG、Trx、Txnip 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组间年龄、受教育年限、BMI 及 TC、HDL、LDL 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组 RBANS 认知功能量表评分比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 Trx、Txnip、Trx 活性与一般资料的相关性

经多元逐步回归发现,分别以 Trx、Txnip、Trx 活性为变量,年龄、BMI、病程、TC、TG、HDL、LDL、FPG、HbA1C 作为自变量。血清 Trx 与 FPG 比较,差异有

统计学意义($\beta = -0.926, t = 2.368, P = 0.019$)、Trx 与 HbA1C 比较,差异有统计学意义($\beta = 0.837, t = 3.294, P = 0.026$);Txnip 与 FPG 比较,差异有统计学意义($\beta = 1.159, t = 3.324, P = 0.023$),Txnip 与 HbA1C 比较,差异有统计学意义($\beta = 0.603, t = 3.036, P = 0.035$),Txnip 与血脂比较,差异有统计学意义($\beta = 0.965, t = 2.694, P = 0.028$);Trx 活性与 Txnip 水平比较,差异有统计学意义($\beta = -0.635, t = -2.568, P = 0.016$)。见表 1。

2.3 Trx、Txnip、Trx 活性与 RBANS 认知功能量表评分相关性

经偏相关分析发现,在分别校正年龄、BMI、病程、TC、TG、HDL、LDL、FPG、HbA1C 时,血清 Trx 与延迟记忆比较,差异有统计学意义($r_{\text{偏}} = -0.308, P = 0.019$),Trx 与总分比较,差异有统计学意义($r_{\text{偏}} = -0.570, P = 0.016$)。Txnip 与延迟记忆比较,差异有统计学意义($r_{\text{偏}} = -0.562, P = 0.026$),Txnip 与总分比较,差异有统计学意义($r_{\text{偏}} = -0.459, P = 0.037$)。Trx 活性与延迟记忆比较,差异有统计学意义($r_{\text{偏}} = 0.638, P = 0.011$),Trx 活性与总分比较,差异有统计学意义($r_{\text{偏}} = 0.366, P = 0.027$)。见表 2。

表 1 一般资料比较

组别	年龄 / (岁, $\bar{x}\pm s$)	男/女 / 例	受教育年限 / (年, $\bar{x}\pm s$)	病程 / [年, M, Q ₂₅ , Q ₇₅]	BMI / (kg/m ² , $\bar{x}\pm s$)	FPG / (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	HbA1C / (%, $\bar{x}\pm s$)
病例组 n=100	58.74 \pm 8.76	56/44	9.56 \pm 2.53	8 [6.5, 12.3]	24.30 \pm 3.30	9.58 \pm 3.82	8.32 \pm 1.57
对照组 n=90	57.98 \pm 7.72	42/48	9.21 \pm 3.42	-	24.16 \pm 3.32	4.82 \pm 0.56	5.24 \pm 0.30
t/Z 值	0.732	1.563	0.625	-	0.548	3.687	3.363
P 值	0.483	0.135	0.576	-	0.611	0.000	0.000

组别	TC / (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	TG [mmol/L, M, Q ₂₅ , Q ₇₅]	HDL / (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	LDL / (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	Trx / (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)	Txnic / (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)	Trx 活性 / ($\bar{x}\pm s$)
病例组 n=100	4.90 \pm 1.11	2.17 [1.13, 3.43]	1.13 \pm 0.19	2.92 \pm 0.84	45.36 \pm 6.28	19.07 \pm 8.32	7.43 \pm 2.06
对照组 n=90	4.81 \pm 1.03	1.56 [0.99, 2.85]	1.10 \pm 0.22	2.68 \pm 0.79	39.86 \pm 3.06	16.92 \pm 1.93	4.26 \pm 0.45
t/Z 值	0.835	2.496	0.536	0.967	2.729	2.598	3.675
P 值	0.418	0.017	0.643	0.384	0.008	0.011	0.000

表 2 两组 RBANS 认知功能量表评分比较 (分, $\bar{x}\pm s$)

组别	即时记忆	视觉广度	言语功能	注意力	延迟记忆	总分
病例组 n=100	78.64 \pm 17.47	97.24 \pm 11.51	98.10 \pm 10.47	100.26 \pm 14.62	88.28 \pm 4.86	86.85 \pm 11.56
对照组 n=90	89.25 \pm 15.21	98.37 \pm 11.68	99.14 \pm 12.31	101.45 \pm 13.93	99.41 \pm 8.41	95.60 \pm 10.43
t 值	2.279	0.785	1.542	0.842	2.343	2.327
P 值	0.031	0.477	0.138	0.396	0.021	0.023

3 讨论

RBANS 量表是在简易精神状态量表的认知项目设置和评分标准基础上,根据临床经验改良并经过

临床试验及探索证实的用于快速筛查轻度认知功能损害的评定工具。本研究结果显示,与正常人相比, T2DM 患者 RBANS 量表即时记忆、延迟记忆评分及

总分均降低。而 ZHEN 等^[4]发现, T2DM 患者 RBANS 量表除注意力和视觉广度以外的评分降低,这可能与两者所选样本量大小、研究对象及使用的统计方法不同有关。在实验中,笔者对研究对象实行严格的排除标准,另外结果中也显示,两组的年龄、性别、受教育年限比较,差异无统计学意义,从而防止其他因素对结果的混淆和干扰。但总的来说,以上结果均表明, T2DM 患者存在认知功能受损的表现。

目前认为,糖尿病引起神经营养因子、血脑屏障及血管改变、胰岛素生物功能障碍、 β -淀粉样蛋白和 Tau 蛋白毒性、氧化应激等与糖尿病脑病 (diabetic encephalopathy, DE) 相关^[4]。DE 患者可并发不同程度认知功能障碍,从轻度认知功能受损到晚发型阿尔茨海默病 (alzheimer's disease, AD)。氧化应激指细胞和组织的抗氧化状态被暴露的氧化物改变,有研究表明,正常人体内氧化物质、抗氧化物质处在一个动态平衡^[9]。脑组织自身代谢旺盛,耗氧量多,极易产生大量的自由基,当高糖及其他外界有害刺激时,人体的抗氧化物质的抑制因子增多,大量的自由基产生,超出自身的清除能力造成脑组织的严重损害,且氧化应激可导致神经元细胞线粒体蛋白的表达或活性降低及氧化基因受损^[9],因此中枢神经系统更易受氧化应激产生的各种自由基损伤。海马作为学习、记忆的重要神经中枢,与认知功能密切相关。近年来越来越多的研究表明,氧化应激与 DE 的发生、发展关系密切,并被认为是糖尿病脑病发病机制之一^[7]。

TRX 系统作为体内重要的还原系统发挥着多种细胞内外功能,如 Trx 系统在氧化应激中起关键作用^[9],其直接的抗氧化作用是清除 H_2O_2 ,也是血浆型谷胱甘肽过氧化物酶的有效电子传递体,也可以直接清除活性氧集团;另外 Trx 可激活转录因子如核转录因子 κB 和 AP-1 促生长,以及与 ASK-1 作用抑制细胞凋亡等。孙茂民等^[9]在研究 Trx 对缺氧/复氧大鼠海马神经元 Caspase-3 活性的影响时发现,添加 Trx 的处理组细胞在复氧后 24~48 h 内细胞活性明显增加。LOVELL 等^[10]用 TrxR、Trx 和 β -AP 处理培养的海马区神经细胞,发现单独 β -AP 作用使培养的神经元在 12 h 内全部死亡,而 β -AP 加 TrxR 或 β -AP 加 Trx 可使培养的神经元存活率提高到 60%,首次证实 TrxR 和 Trx 对 β -AP 引起的神经毒具有保护作用。YANG 等^[11]发现,AD 患者额叶皮质和海马 CA1 区神经元内 Trx1 水平降低,因此,AD 脑组织 Trx1 水平降低是加重神经退行性病变的重要机制之一,增加

Trx1 的表达水平可以对抗 $A\beta$ 的毒性并延缓 AD 的进程。当存在氧化应激时,TRX 从细胞释放出来^[12],并且血清或血浆水平的 TRX 可以用 ELISA 法测量。ZHAO 等^[13]也证实,当存在氧化应激时,血清或血浆中 TRX 明显升高,是氧化应激的标志。本研究也得到相同结果,与正常对照组相比 T2DM 患者血清 Trx 水平升高,但其活性明显下降,且认知功能评分降低,并且血清 Trx 升高水平与认知功能受损呈正相关,与 FPG、HbA1C 水平呈正相关。

TXNIP 又称 TBP-2/VDUP-1。人们最初在用 1, 25-二羟维生素 D3 治疗的 HL-60 白血病细胞中发现 Txnip。Txnip 是一种生理性的内在的 Trx 调节蛋白, Txnip 能与 Trx 结合,抑制 Trx 的活性,还能促进活性氧的产生,从而加重氧化应激促进细胞凋亡^[14]。有研究表明,高糖环境下 Txnip 这一 Trx 的抑制因子增多,从而使机体的氧化应激水平升高^[15]。Txnip 与 Trx 结合导致 ASK-1 从 Trx 分离并激活,导致下游 Caspase-3 被激活,进而诱导细胞凋亡^[16]。本研究结果显示,与正常对照组相比 T2DM 患者血清 Txnip 升高,认知功能评分降低,且其升高水平与认知功能受损呈正相关,并与 FPG、HbA1C 水平呈正相关。这些均提示 TRX 系统参与糖尿病脑病的发生,同时也证实糖尿病认知功能障碍是血糖控制水平、血脂异常等多因素影响所致。

综上所述,糖尿病认知功能减退与硫氧还蛋白系统反应密切相关,可能互为因果关系。Trx、Txnip 的增高常常受多种疾病及应激状态的影响,虽然笔者在研究中对可能影响硫氧还蛋白系统各指标的因素进行严格的排查,但对于能否将 Trx、Txnip 血清水平作为判断糖尿病患者认知障碍的一项特异性指标,尚需进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] VERDILE G, KEANE K N, CRUZAT V F, et al. Inflammation and oxidative stress: the molecular connectivity between insulin resistance, obesity, and alzheimer's disease[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 11(2): 1155-1160.
- [2] 刘继红. 硫氧还蛋白及其相互作用蛋白与糖尿病胰岛功能[J]. *实用医院临床杂志*, 2013, 10(4): 208-210.
- [3] 张保华, 谭云龙, 张五芳, 等. 重复性成套神经心理状态测验的信度、效度分析[J]. *中国心理卫生杂志*, 2008, 22(12): 865-869.
- [4] ZHEN Y F, ZHANG J, LIU X Y, et al. Low BDNF is associated with cognitive deficits in patients with type 2 diabetes[J]. *Psychopharmacology*, 2013, 227(1): 93-100.

- [5] SHAH A, XIA L, MASSON E A, et al. Thioredoxin-inter acting protein deficiency protects against diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(12): 2963-2977.
- [6] ALAVIAN K N, DWORETZKY S I, BONANNI L, et al. The mitochondrial complex v-associated large-conductance inner membrane current is regulated by cyclosporine and dextranspinexole[J]. *Mol Pharmacol*, 2015, 87(1): 1-8.
- [7] ORTIZ-AVILA O, ESQUIVEL-MARTINEZ M, OLMOS-ORIZABA B E, et al. Arocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats[J]. *J Diabetic Res*, 2015, 9(6): 258-269.
- [8] RIE W, HAJIME N, HIROSHI M, et al. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2[J]. *Pharmacology Therapeutics*, 2010, 127(6): 261-270.
- [9] 孙茂民,夏春林,王宇卉. 硫氧还蛋白对缺氧/复氧大鼠神经元 caspase-3 活性的影响[J]. *苏州大学学报*, 2002, 22(6): 656-658.
- [10] LOVELL M A, XIE C, GABBITA S P, et al. Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in alzheimer's disease[J]. *Free Radic Bio Med*, 2000, 28(3): 418-427.
- [11] YANG X H, LIU H G, LIU X, et al. Thioredoxin and impaired spatial learning and memory in the rats exposed to intermittent hypoxia[J]. *Chin Med J (Eng)*, 2012, 125(17): 3074-80.
- [12] BHATT N M, AON M A, TOCCHETTI C G, et al. Restoring redox balance enhances contractility in heart trabeculae from type 2 diabetic rats exposed to high glucose[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(4): 291-302.
- [13] ZHAO Y, SUN Y, DING Y, et al. GL-V9, a new synthetic flavonoid derivative, ameliorates DSS-induced colitis against oxidative stress by up-regulating Trx-1 expression via activation of AMPK/FOXO3a pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 26291-26307.
- [14] ZHOU J, CHANG W J. Roles of thioredoxin binding protein (TXNIP) in oxidative stress, apoptosis and cancer[J]. *Mitochondrion*, 2012, 13(3): 163-169.
- [15] REN Y, SHI Y, WANG Y, et al. p38MAPK pathway is involved in high glucose-induced thioredoxin interacting protein induction in mouse mesangial cells[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(15): 3480-3485.
- [16] LU J, HOLMGREN A. Thioredoxin system in cell death progression[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(12): 1738-1747.

(童颖丹 编辑)