

血清 TLR-9、25-(OH)D3 水平与糖尿病足感染患者血糖指标及病情程度的相关性

张丹丹¹, 张娜娜², 毕菲菲³

(1. 唐山市中医医院门诊; 2. 唐山市妇幼保健院生殖遗传科; 3. 唐山市中医医院内分泌科, 河北 唐山 063000)

【摘要】目的: 分析血清 Toll 样受体 9 (TLR-9)、25 羟维生素 D3 (25-(OH)D3) 水平与糖尿病足感染 (DFI) 患者血糖指标及病情程度的相关性。**方法:** 120 例 DFI 患者作为 DFI 组, 同期 60 例未合并 DFI 的糖尿病 (DM) 患者作为 DM 组, 选取同期 100 名排除 DM 的体检者作为对照组。比较三组年龄、性别、体质指数 (BMI)、腰臀比 (WHR)、空腹血糖 (FBG)、糖化血红蛋白 (GHB)、空腹胰岛素 (FINS)、稳态模型评估胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 及血清 TLR-9、25-(OH)D3 水平, 并采用 Wagner 分级标准对 DFI 组患者进行病情评价。采用 Pearson 直线相关、Spearman 等级相关分析血清 TLR-9、25-(OH)D3 水平与血糖指标、Wagner 分级的相关性。**结果:** DFI 组和 DM 组患者的 BMI 和 FBG 水平均高于对照组 ($P < 0.05$)。GHB、FINS、HOMA-IR 水平及血清 TLR-9 水平: DFI 组 > DM 组 > 对照组 ($P < 0.05$)。血清 25-(OH)D3 水平: DFI 组 < DM 组 < 对照组 ($P < 0.05$)。DFI 组患者的 Wagner 分级与血清 TLR-9 呈正相关 ($P < 0.05$), 与 25-(OH)D3 水平呈负相关 ($P < 0.05$)。患者的 GHB、FINS、HOMA-IR 水平均与血清 TLR-9 呈正相关 ($P < 0.05$), 与 25-(OH)D3 水平呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论:** 血清 TLR-9 水平的升高、血清 25-(OH)D3 水平的降低与 DFI 的发生和进展及患者的糖代谢状态均具有相关性, 临床上可考虑将这两种标志物用于 DFI 的诊断和病情评价。

【关键词】 糖尿病足感染; 糖代谢; Toll 样受体 9; 25 羟维生素 D3; 病情; 相关性

【中图分类号】 R587.2 **【文献标志码】** A

Correlations between serum TLR-9, 25-(OH) D3 levels and blood glucose indexes and disease severity in patients with diabetic foot infection

ZHANG Dan-dan¹, ZHANG Na-na², BI Fei-fei³

(1. Department of Outpatient, Tangshan Hospital of Traditional Chinese Medicine; 2. Department of Reproductive Genetics, Tangshan Maternal and Child Health Hospital; 3. Department of Endocrinology, Tangshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tangshan 063000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To analyze the correlations between the levels of serum toll like receptor 9 (TLR-9), 25 hydroxyvitamin D3 (25-(OH) D3) and blood glucose indexes and disease severity in patients with diabetic foot infection (DFI). **Methods:** 120 cases of DFI were selected as DFI group, 60 cases of diabetes mellitus (DM) without DFI in the same period were selected as DM group, and 100 cases of physical examination excluding DM were selected as the control group. The age, the gender, the body mass index (BMI), the waist to hip ratio (WHR), the fasting blood glucose (FBG), the glycosylated hemoglobin (GHB), the fasting insulin (FINS) and the homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) and the serum TLR-9, 25-(OH) D3 levels among the subjects in the three groups were compared and analyzed. The disease severity of the patients in DFI group was evaluated by Wagner grading standard. Pearson linear correlation and Spearman rank correlation were used to analyze the correlations between serum TLR-9 and 25-(OH) D3 levels and blood glucose indexes, the correlations with Wagner grade. **Results:** BMI and FBG levels of the patients in DFI group or DM group were higher than those in control group ($P < 0.05$). The levels of GHB, FINS, HOMA-IR and the serum TLR-9 level of the patients in DFI group were higher than those in DM group, the above indexes of the patients in DM group were higher than those in control group ($P < 0.05$). The serum 25-(OH) D3 level of the patients in DFI group was lower than that in DM group, and the serum 25-(OH) D3 level of the patients in DM group was lower than that in control group ($P < 0.05$). Wagner grade of the patients in DFI group was positively correlated with the serum TLR-9 level ($P < 0.05$), and negatively correlated with 25-(OH) D3 level ($P < 0.05$). The levels of GHB, FINS and HOMA-IR were positively correlated with the serum TLR-9 level ($P < 0.05$), and negatively correlated with the serum 25-(OH) D3 level ($P < 0.05$). **Conclusion:** The increase of serum TLR-9 level and the decrease of serum 25-(OH) D3 level are

correlated with the occurrence and progress of DFI and the state of glucose metabolism of the patients. Clinicians can consider employing such two markers in the diagnosis and evaluation of DFI.

【Key words】 Diabetic foot infection; Glucose metabolism; Toll like receptor 9; 25 hydroxyvitamin D3; Disease severity; Correlation

全球的糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者已超过4.15亿,且患病率仍在增加,国内情况尤为严峻,约占全球发病率的22.22%(1/4.5)。糖尿病足(diabetic foot, DF)是最常见的DM慢性并发症之一,我国DF发病率高达15%。目前,糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)的治疗仍是一项临床难题,年龄、长病程、血糖控制不佳、营养不良、局部感染病变严重等因素可对DFU预后产生影响,而高血压、血脂代谢异常、神经病变、肾功能衰竭可能均与DFU的迁延不愈和患者死亡缺乏相关性^[1]。糖尿病足感染(diabetic foot infection, DFI)则是导致DFU难以愈合和不良预后的直接因素,因此DFI的早期诊断和有效评价具有重要的临床意义。DFU的进展与机体的炎症反应和细胞因子异常密切相关,其中血清生物学标志物尤为关键,譬如Toll样受体9(toll-like receptor 9, TLR9)和25羟维生素D3(25 hydroxy-vitamin D3, 25-(OH)D3)是近年来发现的两种与DM并发症具有相关性的标志物^[2-3],但是否与DFI病情程度具有相关性仍存在争议。故本研究拟探讨血清TLR-9、25-(OH)D3水平与DFI患者血糖指标及病情程度的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年1月至2020年1月唐山市中医医院内分泌科收治的60例DFI患者作为DFI组,同期60例未合并DFI的DM患者作为DM组,同期100名排除DM的体检者作为对照组。三组研究对象均签署知情同意书自愿参与本研究,本研究方案经院医学伦理委员会审核通过。纳入标准:(1)DM的诊断依据参照美国糖尿病学会制订的《糖尿病医学诊疗标准(2019年版)》^[4];(2)DFI的诊断依据国际糖尿病足工作组(international working group on the diabetic foot, IWG-DF)制订的《糖尿病足感染诊断和治疗指南(2019年更新)》^[5];(3)对照组均经临床检查排除DM;(4)临床资料完整;(5)年龄>18岁。排除标准:(1)妊娠期糖尿病及继发性糖尿病患者;(2)合并急性糖尿病并发症或其它慢性并发症终末期患者;(3)合并恶性肿瘤、重要器官功能不全、急慢性感染性疾病、自身免疫疾病或免疫缺陷病的患者;(4)妊娠期或哺乳期患者;(5)入组前已对DFI进行治疗的患者;(6)入组前1个月具有应用可能影响(25)-OH D3代谢药物史的患者。

1.2 方法

1.2.1 基线资料及血糖指标对比 对三组研究对象的年龄、性别构成、体质指数(BMI)、腰臀比(WHR)、空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(GHB)、空腹胰岛素(FINS)水平进行检测并计算稳态模型评估胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment for insulin resistance, HOMA-IR),其中,血糖指标为采集空腹静脉血进行检测,DFI组和DM组患者的采血时间为入院次日,对照组研究对象的采血时间为体检当日。FBG的检测采用COBAS C501型全自动血液生化分析仪(瑞士罗氏公司),GHB的检测采用离子交换层析法,FINS的检测采用放射免疫法,HOMA-IR的计算公式为 $FBG \times FINS / 22.5$ 。

1.2.2 血清TLR-9、25-(OH)D3水平检测 于上述采血时点另取真空管采集三组研究对象的静脉血样本3 mL,在室温下静置2 h凝固后以3 000 rpm的速度离心15 min,移取血清样本置于-18℃中保存待测。采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对血清TLR-9水平进行检测,人TLR-9 ELISA试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司,采用电化学发光法对血清25-(OH)D3水平进行检测,试剂盒购于瑞士罗氏公司,以上检测步骤均严格按照试剂盒使用说明书操作。

1.2.3 病情程度评价 采用Wagner分级标准^[6]对DFI组患者进行病情评价,DFI患者的Wagner分级为2~5级,分级标准为:(1)2级:出现较深的、穿透性溃疡病灶,感染类型为软组织感染,但排除骨髓炎或深部脓肿。(2)3级:溃疡病灶累及骨组织,感染类型为深部脓肿或骨髓炎。(3)4级:溃疡病灶出现局部或特殊部位坏疽,部分病灶无严重疼痛感,坏死组织表面有明显感染表现。(4)5级:坏疽病变蔓延至整个足部,可合并发生大动脉阻塞、神经病变。

1.3 统计学分析

应用SPSS 22.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用 t 检验;计数资料以 $[n(\%)]$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法;血清TLR-9、25-(OH)D3水平与血糖指标的相关性采用Pearson直线相关分析;血清TLR-9、25-(OH)D3水平与Wagner分级的相关性采用Spearman等级相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DFI组与DM组患者基线资料和血糖指标的

比较

DFI 组患者的 GHB、FINS、HOMA-IR 水平均高于 DM 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 DFI 组与 DM 组患者基线资料和血糖指标的比较
[$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

指标	DFI 组 ($n=120$)	DM 组 ($n=60$)	t 值/ χ^2 值	P 值
年龄(岁)	55.62 ± 8.64	54.89 ± 8.35	0.540	0.472
男/女(例)	76/44	40/20	0.194	0.660
BMI(kg/m^2)	24.47 ± 0.76	24.38 ± 0.82	0.729	0.275
WHR	0.78 ± 0.35	0.76 ± 0.48	0.318	0.689
FBG(mmol/L)	9.47 ± 1.64	9.43 ± 2.24	0.136	0.865
GHB(%)	9.26 ± 0.35	7.32 ± 0.45	31.784	<0.001
FINS(mIU/L)	13.72 ± 0.33	11.48 ± 1.98	12.094	<0.001
HOMA-IR	5.78 ± 0.31	4.79 ± 0.22	22.097	<0.001

2.2 三组血清 TLR-9、25-(OH)D3 水平的比较

对照组、DM 组、DFI 组的血清 TLR-9 水平依次升高,血清 25-(OH)D3 水平依次降低,以上各组间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 三组研究对象血清 TLR-9、25-(OH)D3 水平的比较

指标	DFI 组 ($n=60$)	DM 组 ($n=60$)	对照组 ($n=100$)	F 值	P 值
TLR-9($\mu\text{g}/\text{L}$)	43.39 ± 2.79 ^{#*}	36.03 ± 3.36	20.28 ± 3.64	14.450	<0.001
25-(OH)D3(ng/mL)	9.82 ± 2.56 ^{#*}	15.02 ± 3.39	28.16 ± 3.78	19.196	<0.001

* $P < 0.05$,与对照组比较;# $P < 0.05$,与 DM 组比较。

2.3 DFI 患者血清 TLR-9、25-(OH)D3 水平与血糖指标及病情程度的相关性

DFI 组患者的 Wagner 分级情况为:2 级 11 例 (18.33%)、3 级 20 例 (33.33%)、4 级 22 例 (36.67%)、5 级 7 例 (11.67%)。Spearman 等级相关分析结果显示,患者的 Wagner 分级与血清 TLR-9 呈正相关关系($P < 0.05$),与 25-(OH)D3 水平呈负相关关系($P < 0.05$)。Pearson 等级相关结果显示,患者的 GHB、FINS、HOMA-IR 水平均与血清 TLR-9 呈正相关关系($P < 0.05$),与 25-(OH)D3 水平呈负相关关系($P < 0.05$),而患者的 FBG 水平与上述两个指标无相关性($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 DFI 患者血清 TLR-9、25-(OH)D3 水平与血糖指标及病情程度的相关性

指标	TLR-9		25-(OH)D3	
	r 值	P 值	r 值	P 值
Wagner 分级	0.882	<0.001	-0.705	<0.001
FBG(mmol/L)	0.103	0.452	-0.069	0.786
GHB(%)	0.763	<0.001	-0.696	<0.001
FINS(mIU/L)	0.612	<0.001	-0.559	<0.001
HOMA-IR	0.732	<0.001	-0.702	<0.001

3 讨论

DFU 的临床治疗方案主要依据其病情程度,仅合并浅表 DFI 的患者多采用内科治疗辅以清创术、高压氧治疗、负压封闭引流等^[7],血管病变严重的患者可酌情采用介入治疗,但这些方法通常无法完全逆转 DFI 的进展和复发。当感染进展至骨髓炎阶段,治疗费用和难度会大幅度上升,且治疗效果和预后通常较差^[8]。Wagner 分级是评价 DFU 病情的公认可靠指标,其主要依据之一就是 DFI 的进展程度,一般来说,随着 Wagner 分级的升高,患者的截肢率风险也不断升高,不论是否截肢,严重 DFI 患者的死亡率均可达近 30%^[9]。本研究显示,DFI 患者的 Wagner 3 级以上患者 >80%,Wagner 4 级以上患者近 50%,感染病情相对较重,可能与入选研究对象均为住院病例有关。传统的学术观点认为,DFI 的病情程度主要与血液感染标志物、趾肱指数、ALB、HB 及血脂代谢指标有关,但进一步研究^[10]结果显示,这些传统实验室指标在 DM 患者中往往波动性较大,且与急性感染的发生关系更加密切,难以用于评价 DFI 等慢性感染病情,而血糖控制指标和免疫炎症因子水平可能对 DFI 的影响更大,从免疫炎症机制角度筛选适于 DFI 患者的新型预后标志物成为了学术界努力的方向。本研究选取了 TLR-9 和 25-(OH)D3 作为主要研究指标,研究结果支持了这两种标志物与 DFI 患者血糖指标和病情程度具有相关性的结论,为进一步的研究提供了有益的思路。

Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)属于模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR),在机体识别和抵御病原微生物的过程中扮演着重要的角色。病原微生物能够被 TLRs 等 PRR 所识别,从而激活下游信号通路、介导炎症因子的产生。相关研究^[11]已证实,TLR-2、TLR-4 等 TLRs 与 DF、糖尿病肾病等的发生密切相关,其血清表达水平与患者的糖代谢指标、炎症因子水平和糖基化终产物水平均具有相关性。而本研究结果提示了血清 TLR-9 水平与 DFI 病情程度具有相关性,其可能机制:(1) DFI 的病原体以细菌为主,而细菌基因组中广泛存在着以未甲基化的胞嘧啶-鸟嘌呤核苷酸为核心的基序,这一病原分子模式能够激活 B 淋巴细胞、类浆细胞等免疫细胞从而诱导产生 Th1 型优势免疫应答,在此过程中,TLR-9 能够识别病原分子模式激活信号通路,从而激活固有免疫系统、上调前炎症细胞因子,介导固有免疫应答和适应性免疫应答^[12],因此 DFI 患者的血清 TLR-9 水平能够敏感地反映机体针对细菌感染的免疫应答水平,从而有效指示

DFI 的病情程度。(2)在细菌或病毒感染性疾病的过程中,血清 TLR-9 表达上调与患者的外周血淋巴细胞亚群表达及其转录因子叉头蛋白状态紊乱有关^[13],故 DFI 患者的血清 TLR-9 水平能够提示糖代谢紊乱导致的免疫功能损害程度,从而间接反映机体的长期血糖控制效果和感染程度。

DM 患者中维生素 D 缺乏现象十分普遍,维生素 D 已被证实具有保护胰岛 β 细胞、减轻胰岛素抵抗、抑制炎症因子表达、抗氧化应激、抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性、延缓动脉粥样硬化、保护足细胞等作用,故维生素 D 缺乏可能与 DM 的发生和并发症的出现密切相关^[14-17]。本研究表明,DFI 患者的病情程度和糖代谢指标与维生素 D 缺乏程度有关,其可能机制:(1)维生素 D 缺乏可通过干扰 DFI 患者血糖血脂稳态、提升炎症反应程度和氧化应激水平、加重周围神经病变等机制影响 DFU 创面的愈合和组织生长^[18],从而导致了 DFI 病变的持续进展。(2)维生素 D 缺乏可通过上调炎症反应水平、促进氧化应激等机制进一步加剧 DFI 患者机体的免疫损害,从而使其多药耐药菌感染风险上升,特别是中度及重度维生素 D 缺乏患者在 DFU 愈合后更易出现复发^[19],而多药耐药菌感染和 DFU 复发导致了感染治疗效果不佳和病情进展。

综上所述,DM 患者血清 TLR-9 水平的升高、血清 25-(OH)D3 水平的降低,且 TLR-9、25-(OH)D3 与 DFI 的发生发展及机体糖代谢异常相关。

参考文献

[1] 蒋竹奕,谢颖,杨川.中国糖尿病足溃疡患者预后危险因素研究进展[J].中国糖尿病杂志,2020,28(7):550-554.

[2] D'Onofrio V, Monnier AA, Kremer C, et al. Lesion size is associated with genetic polymorphisms in TLR1, TLR6, and TIRAP genes in patients with major abscesses and diabetic foot infections[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2020, 39(2):353-360.

[3] Razzaghi R, Pourbagheri H, Momen-Heravi M, et al. The effects of vitamin D supplementation on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Journal of Diabetes and Its Complications, 2017, 31(4):766-772.

[4] American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2019 [J]. Diabetes

Care, 2019, 42(Suppl 1):S13-S28.

[5] Lipsky BA, Senneville \acute{e} , Abbas ZG, et al. Guidelines on the diagnosis and treatment of foot infection in persons with diabetes (IWGDF 2019 update) [J]. Diabetes Metabolism Research and Reviews, 2020, 36(Suppl 1):e3280.

[6] Calhoun JH, Cantrell J, Cobos J, et al. Treatment of diabetic foot infections; Wagner classification, therapy, and outcome [J]. Foot & Ankle, 1988, 9(3):101-106.

[7] Chastain CA, Klopfenstein N, Serezani CH, et al. A clinical review of diabetic foot infections [J]. Clinics in Podiatric Medicine and Surgery, 2019, 36(3):381-395.

[8] 周春豪,张红安,方佳,等.糖尿病足骨髓炎的骨科诊治进展[J].中华创伤骨科杂志,2019,21(7):636-640.

[9] Kurup R, Ansari AA, Singh J. A review on diabetic foot challenges in Guyanese perspective [J]. Diabetes & Metabolic Syndrome, 2019, 13(2):905-912.

[10] Gherman D, Dumitrescu CI, Ciocan A, et al. Histopathological changes in major amputations due to diabetic foot—a review [J]. Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2018, 59(3):699-702.

[11] 代晓茹,张茹,于玉兰,等.糖尿病足感染患者炎症因子和 Toll 样受体信号通路的表达及意义 [J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(2):198-202.

[12] Yang X, Cao Z, Wu P, et al. Effect and mechanism of the bruton tyrosine kinase (Btk) inhibitor ibrutinib on rat model of diabetic foot ulcers [J]. Medical Science Monitor, 2019, 25:7951-7957.

[13] 宣晓梅,陈立荣,林琳,等.尖锐湿疣患者外周血淋巴细胞 Foxp3 与树突状细胞 TLR9、IRF-7 水平变化特征 [J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(20):2012-2016.

[14] Shillo P, Selvarajah D, Greig M, et al. Reduced vitamin D levels in painful diabetic peripheral neuropathy [J]. Diabetic Medicine, 2019, 36(1):44-51.

[15] Hu X, Liu W, Yan Y, et al. Vitamin D protects against diabetic nephropathy: Evidence-based effectiveness and mechanism [J]. European Journal of Pharmacology, 2019, 845:91-98.

[16] Gupta S, Goyal P, Feinn RS, et al. Role of vitamin D and its analogues in diabetic nephropathy: A meta-analysis [J]. American Journal of the Medical Sciences, 2019, 357(3):223-229.

[17] 陈武,邹光美.检测血浆 25-羟基维生素 D 水平在糖尿病肾病中的应用价值 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17(13):1850-1853.

[18] 王少婷,吴佩佩,王振竞,等.补充维生素 D 对糖尿病足溃疡患者创面愈合、糖代谢、炎症及氧化应激的影响 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2020, 20(8):940-944.

[19] 陈丽华,杨婧,伍勇.糖尿病足患者足分泌物分离菌分布及多重耐药影响因素分析 [J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(10):1286-1290.

(收稿日期:2021-09-12

修回日期:2021-10-21)