

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.02.029

肺炎衣原体感染与青少年 I 型糖尿病的相关性研究

李 伟¹ 张 华^{2△} 李 伟³ 马朋朋⁴ 李双霞³

(1 河北省人民医院体检中心 河北 石家庄 050051; 2 河北省人民医院胸外科 河北 石家庄 050051;

3 中国人民解放军 251 医院 河北 张家口 075000; 4 河北北方学院附属第一医院 河北 张家口 075000)

摘要 目的:探讨肺炎衣原体感染与青少年 I 型糖尿病的相关性,为 I 型糖尿病的临床治疗提供参考依据。方法:选择 2010 年 12 月-2012 年 6 月间石家庄地区各医院收治的 49 例青少年 T1DM 患者为观察组,及同期 50 例健康人作为对照组,应用即时指尖血免疫测定仪分析受试者 HbA1c 水平;应用 RT-PCR 技术检测血液中 Cpn DNA;应用 ELISA 方法检测受试者血清中 Cpn 特异性抗体水平,对 Cpn DNA 的检出情况及 HbA1c 水平与 Cpn DNA 和特异性抗体水平的相关性进行统计学分析。结果:观察组 Cpn DNA 的检出率为 46.9%,显著高于对照组($P<0.05$);观察组 Cpn 抗体阳性率显著高于对照组($P<0.05$),且观察组再次感染或慢性感染 Cpn 的百分率显著高于对照组($P<0.05$);HbA1c 与 IgG/IgA 抗体水平显著相关,血糖控制较差(HbA1c $>9\%$)的糖尿病患者 Cpn IgG/IgA 抗体阳性率与血糖控制较好的患者(HbA1c $<7\%$)相比显著升高($P<0.05$)。结论:与健康对照相比,青少年 T1DM 患者更容易感染 Cpn,且更容易由急性感染状态进展为慢性感染形式,良好的血糖可能降低患者发生与代谢控制有关的慢性并发症。

关键词:肺炎衣原体;I 型糖尿病;青少年;实时定量 PCR;糖化血红蛋白

中图分类号:R587.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273(2014)02-309-04

Correlational Study on the Chlamydia Pneumonia Infection with Adolescent Type1 Diabetes Mellitus

LI Wei¹, ZHANG Hua^{2△}, LI Wei³, MA Peng-peng⁴, LI Shuang-xia³

(1 Health Examination Center, People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei, 050051, China; 2 Department of Thoracic Surgery, people's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei, 050051, China; 3 The 251 Hospital of PLA, Zhangjiakou, Hebei, 075000, China; 4 The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei, 075000, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the association between Chlamydia pneumoniae(Cpn) infection and adolescent Type1 Diabetes Mellitus (T1DM), and provide basis for the clinical treatment of T1DM. **Methods:** HbA1c was measured by the point-of-care immunoassay; Cpn DNA was detected by real time PCR; The serum Cpn specific antibody IgA, IgG, IgM were measured by ELISA. **Results:** Cpn DNA was performed in 46.9% of the patients with T1DM, this prevalence was higher than that in control group($P<0.05$); Cpn antibody and re-infection or chronic infection rate were higher in observation group than those in the control group ($P<0.05$); There was a significant positive correlation between the HbA1c and the IgG/IgA. Cpn IgG/IgA antibody positivity was significantly ($P<0.05$) more common in HbA1c $>9\%$ patients versus HbA1c $<7\%$ patients. **Conclusion:** Adolescents with T1DM were more likely to show signs of infection with Cpn, and have an increased risk from an acute Cpn infection to a chronic form. Good glycaemic control may reduce the chronic complications related to metabolic control.

Key words: Chlamydia pneumonia; Type 1 diabetes mellitus; Adolescent; Real time PCR; Glycosylated haemoglobin

Chinese Library Classification(CLC): R587.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)02-309-04

前言

感染可以引起或触发一些慢性非传染性疾病,也可能与糖尿病有关^[1]。1 型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus, T1DM)被公认为是一种慢性免疫反应介导的疾病,以选择性缺失分泌胰岛素的胰岛 β 细胞为特点^[2]。肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae, Cpn)是一种重要的人类病原体,参与免疫细胞的调节,为严格细胞内寄生菌,与上呼吸道感染、重复感染和慢性疾病等有

关^[3],可以长期感染巨噬细胞并改变其功能,参与调节宿主的免疫反应,进而影响一些自身免疫性疾病的发生,如胰岛素依赖型 T1DM^[4]。本研究旨在评估青少年 T1DM 患者 Cpn 感染和疾病长期进展中糖化血红蛋白(Glycosylated haemoglobin, HbA1c)的变化,并分析糖尿病病程长短与 Cpn 感染之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选择 2010 年 12 月~2012 年 6 月间石家庄地区各医院收治的 49 例青少年 T1DM 患者作为观察组,其中男 27 例,女 22 例,平均年龄为(14.5 ± 2.8)岁。收集所有患者详细的临床资料,只选择过去两年内糖化血红蛋白连续测量三次以上升高的患者,排除诊断为糖尿病不到 1 年,及患有心脏、肾脏或内分泌器

作者简介:李伟,女,主治医师,电话:18932732687,

E-mail: lwzh2687@163.com

△通讯作者:张华,男,主治医师,电话 13933868750,

E-mail: 1013937406@qq.com

(收稿日期:2013-02-28 接受日期:2013-03-25)

官疾病的患者。应用随机方法选取同期 50 例健康人作为对照组,入选者血糖水平正常,HbA1c 正常,其中男 26 例,女 24 例,平均年龄为(14.2± 3.1)岁。观察组与对照组性别组成及年龄无统计学差异,具有可比性,见表 1。

表 1 研究对象的临床资料
Table 1 Clinical characteristics of study population

	Observation group	Control group
No. of individuals	49	50
Age (years)	14.5± 2.8	14.2± 3.1
Male/female	27:22	26:24
Diabetes duration (years)	3.1-6.3	0
HbA1c≤ 5.9%	0	50
HbA1c 6-6.9%	8	0
HbA1c 7-7.9%	10	0
HbA1c 8-8.9%	17	0
HbA1c 9-10%	14	0

1.2 方法

1.2.1 血糖控制评价标准 用外周血 HbA1c 水平评价血糖控制情况,用即时指尖血免疫测定仪测定所有受试者 HbA1c 水平,根据测定结果分为 4-5.9%(正常)、6-6.9%、7-7.9%、8-8.9%、9-10%(控制差)五个范围,以评估受试者血糖控制情况与 Cpn 感染之间的相关性。

1.2.2 标本收集 观察组患者维持原来治疗不变。收集所有受试者晨起空腹静脉血标本并保存于 -20℃,待行血清学检测,同时收集受试者外周血单个核细胞并提取细胞中 DNA,也保存于 -20℃,待行 PCR 检测。

1.2.3 RT-PCR 检测 Cpn TaKaRa TaqTMPCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司。根据参考文献^[9],针对 Cpn 53kDa 蛋白质保守序列设计并合成一对特异性引物,同时针对引物之间的基因片段

利用 Primer Express(1.0, PE Applied Biosystem)设计 TaqMan 探针,探针的 5' 端标记 FAM,3' 端标记 TAMRA,引物序列为:Primer 1: 5'-AACACGCTAGCAACACAAATTAC-3'; Primer 2:5'-CCAGATTTGACAGCCGCTTT-3';探针:5'-CAGCTGTCAGACAAGCGATCACC-3'。扩增体系总体积为 20 μL,包括 2 μL 10× TaqMan Buffer,4 μL MgCl₂ (5 mmol/L),2 μL dNTP(2.5 mmol/L),上、下游引物各 0.5 μL,1 μL TaqMan 探针,1Ml DNA 溶液,1 μL Taq 聚合酶 (5U/μL),8 μL 灭菌三蒸水。按照说明书用 ABI Prism 7700 序列检测仪扩增和检测 PCR 产物。扩增程序简述为:94℃ 5 min;95℃ 15 s,60℃ 60 s,50 个循环。实验重复两次结果均为阳性的确定为 PCR 阳性,去除只有一次结果阳性的标本。

1.2.4 血清学检测 用 ELISA 检测试剂盒检测受试者血清标本中 Cpn 特异性 IgG、IgA 和 IgM 水平。操作方法严格按照说明书进行,ELISA 试剂盒购于北京万泰公司。近期首次感染 Cpn 的诊断标准为:RT-PCR 结果阳性且特异性 IgM≥ 20,IgA 和 IgM 同时阳性也定义为 Cpn 首次感染;Cpn 再次感染或慢性感染的诊断标准为:Cpn RT-PCR 结果阳性且特异性 IgG≥ 128,和/或 IgM 阴性,IgA≥ 64。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件对所得数据进行统计学分析,用费舍尔确切概率法比较不同组别 Cpn DNA 及 Cpn 特异性抗体差异性,率的比较采用 X² 检验,应用 Spearman 等级相关性检测 HbA1c 不同分级之间的关系,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Cpn DNA 的检出率比较

所有 99 例受试者中共有 28 例检出存在 Cpn DNA,检出率 28.3%,其中观察组 23 例,对照组 5 例,观察组 Cpn DNA 的检出率(46.9%)明显高于对照组(10.0%)(P<0.05),见表 2。

表 2 两组 Cpn DNA 的检出率和感染情况的比较

Table 2 Comparison of the detection rate of Cpn DNA and Infectious status of Cpn between two groups

		No. of individuals (%)				
		IgG≥ 128	IgA≥ 64	IgM≥ 20	DNA	IgG/IgA
Patients	49	29(59.2)*	25(51.0)*	8(16.3)*	23(46.9)*	25(51.0)*
Controls	50	6(12.0)	1(2.0)	0(0)	5(10.0)	1(2.0)

注:与对照组相比,*P<0.05。

Note: compared with control group, *P<0.05.

2.2 两组 Cpn 感染情况的比较

观察组 49 例患者中有 29 名已经感染过 Cpn,对照组为 6 名;观察组 25 例 IgA 阳性,对照组为 1 例;观察组 8 例 IgM 阳性,对照组未检出;观察组 25 例 IgG/IgA 同时阳性,对照组为 1 例。观察组再次感染或慢性感染率显著高于对照组(P<0.05)。

2.3 血糖控制与 Cpn 感染的关系

健康对照组(HbA1c≤ 5.9%)Cpn 的感染率为 10.0%;血糖控制较好的 T1DM 患者 (HbA1c 6-6.9%) 感染率为 12.5%;HbA1c 7-7.9% 为 30.0%;HbA1c 8-8.9% 为 58.8%;HbA1c>9% 为

64.3%。可见 HbA1c>7% 的患者 Cpn 的感染率与血糖控制较好的糖尿病患者及对照组相比均显著升高(P<0.05)。

HbA1c 与 IgG/IgA 抗体水平显著相关,HbA1c 8-8.9% 的患者 Cpn IgG/IgA 双阳性率为 64.7%(11 例),与控制较好的患者相比显著升高(P<0.05),与对照组相比显著升高(P<0.01);HbA1c 9-10% 的患者 Cpn IgG/IgA 双阳性率为 71.4%(10 例),与控制较好的患者相比显著升高(P<0.05),与对照组相比显著升高(P<0.01),见表 3。

表 3 血糖控制与 Cpn 特异性抗体的关系

Table 3 Relationship between the blood glucose control and IgG/IgA of Cpn

	No. of individuals	Cpn DNA Positive(%)	Cpn IgG/IgA Positive(%)
HbA1c≤ 5.9%	50	5(10.0)	1(2.0)
HbA1c 6-6.9%	8	1(12.5)	2(25.0)
HbA1c 7-7.9%	10	3(30.0)	3(30.0)
HbA1c 8-8.9%	17	10(58.8)* ##	11(64.7)* ##
HbA1c 9-10%	14	9 (64.3)** ##	10(71.4)** ##

注:与 HbA1c 6-6.9%相比, *P<0.05, **P<0.01; 与对照组相比, ##P<0.01。

Note: compared with HbA1c 6-6.9%, *P<0.05, **P<0.01; compared with control group, ##P<0.01.

3 讨论

Cpn 是一种细胞内寄生菌,与呼吸道疾病、重复感染及慢性非传染性疾病如心血管疾病、高血压和中风有关^[6,9]。高血糖被认为是多种病原体感染的风险因素, Cpn 可以感染巨噬细胞并逃逸其杀伤作用,在细胞中生长繁殖,而巨噬细胞又可能参与糖尿病肾病的发生发展。因此, Cpn 感染有可能促进这一过程^[10]。研究已经证实:与非糖尿病人相比,糖尿病患者中 Cpn 的检出率较高,表明 T1DM 和 T2DM 个体 Cpn 感染风险升高^[11,12]。已经有动物模型显示高糖可促进 Cpn 从肺部到外周血液系统的传播速度^[13]; Wang 等建立的 C57BL/6 小鼠 Cpn 感染模型显示 Cpn 可诱发显著的胰岛素抵抗,表明 Cpn 感染可能与糖尿病的发生有一定的关系^[14]。

糖尿病的发展可能引起免疫抑制而使宿主处于一个复杂的易感状态^[15]。宿主防御系统的缺失状态可能促进 Cpn 在肺或外周血细胞中长期存在,青少年糖尿病患者中 Cpn 的存在又可能继发起宿主防御系统及免疫细胞功能的二次损伤,从而促使由急性 Cpn 感染发展为慢性感染形式^[16]。糖尿病可能使 Cpn 控制更为困难,同时 Cpn 感染对炎症系统的慢性刺激可能影响糖尿病的转归,两者关系非常复杂^[17]。本研究应用 RT-PCR 方法评估 T1DM 患者中 Cpn 的感染情况,发现有 46.9%的青少年 T1DM 患者存在 Cpn DNA,与对照组相比明显升高,且其 Cpn 抗体阳性率亦明显高于对照组,提示糖尿病患者比健康人更容易感染 Cpn。

HbA1c 是高糖状态的一个重要评估指标,与空腹血糖相比更为稳定,反应血糖控制的长期水平^[18,19]。本研究以 HbA1c 水平为标志评价 Cpn 感染与血糖控制之间的联系,发现 HbA1c 与 IgG/IgA 抗体水平显著相关,血糖控制差(HbA1c>9%)的患者 Cpn 抗体阳性率明显高于血糖控制较好 (HbA1c<7%) 的患者,也表明血糖控制不佳与慢性感染机率升高有明显关系。

青少年 T1DM 患者更容易由 Cpn 急性感染发展为慢性感染形式,需要一种合理且标准化的筛选方法来监视患有糖尿病的青少年中 Cpn 的感染情况^[20]。虽然高血糖症本身是否有感染性疾病参与还不能完全肯定,但高血糖症的早期识别和适当的干预治疗对预防 Cpn 感染可能是有益的,尤其是当今糖尿病人的数量快速增长的情况下。良好控制的血糖水平可能降低患者发生与代谢控制有关的慢性并发症。

参考文献(References)

[1] Van den Biggelaar AH, Holt PG. 99th Dahlem conference on

infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: neonatal immune function and vaccine responses in children born in low-income versus high-income countries [J]. Clin Exp Immunol, 2010, 160(1): 42-47

- [2] Knip M, Veijola R, Virtanen SM, et al. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2005, 54(2): S125-136
- [3] Edvinsson M, Thelin S, Hjelm E, et al. Persistent Chlamydia pneumoniae infection in thoracic aortic aneurysm and aortic dissection?[J]. Ups J Med Sci, 2010, 115(3): 181-186
- [4] Sechi LA, Rosu V, Pacifico A, et al. Humoral immune responses of type 1 diabetes patients to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis lend support to the infectious trigger hypothesis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(2): 320-326
- [5] Miyashita, N., Obase, Y., Fukuda, M., et al. Evaluation of the diagnostic usefulness of real-time PCR for detection of Chlamydia pneumoniae in acute respiratory infections [J]. J Infect Chemother, 2007, 13: 183-187
- [6] Hahn DL, Schure A, Patel K, et al. Chlamydia pneumoniae-specific IgE is prevalent in asthma and is associated with disease severity[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35945
- [7] Erkkila L, Saario E, Laitinen K, et al. Intragastric primary infection sensitizes to lung reinfection in a Chlamydia pneumoniae mouse model[J]. Vaccine, 2008, 26(20): 2503-2509
- [8] Hasan ZN. Association of Chlamydia pneumoniae serology and ischemic stroke[J]. South Med J, 2011, 104(5): 319-321
- [9] Bandaru VC, Boddu DB, Laxmi V, et al. Seroprevalence of Chlamydia pneumoniae antibodies in stroke in young [J]. Can J Neurol Sci, 2009, 36(6): 725-730
- [10] Carratelli CR, Rizzo A, Paolillo R, et al. Effect of nitric oxide on the growth of Chlamydia pneumoniae [J]. Can J Microbiol, 2005, 51(11): 941-947
- [11] Roubalová K, Broz J, Hrubá D, et al. Prevalence of active infection with Chlamydia pneumoniae and human cytomegalovirus in patients with type II diabetes mellitus[J]. Folia Microbiol (Praha), 2007, 52(3): 287-290
- [12] Lutsey PL, Pankow JS, Bertoni AG, et al. Serological evidence of infections and Type 2 diabetes: the MultiEthnic Study of Atherosclerosis[J]. Diabet Med, 2009, 26(2): 149-152
- [13] Yamaguchi H, Oshio I, Osaki T, et al. Development of diabetes in non-obese diabetic mice promotes Chlamydia pneumoniae dissemination from lung to peripheral blood [J]. Int J Exp Pathol, 2006, 87(2): 121-129

- [14] Wang C, Gao D, Kaltenboeck B. Acute Chlamydia pneumoniae reinfection accelerates the development of insulin resistance and diabetes in obese C57BL/6 mice[J]. J Infect Dis, 2009, 200(2): 279-287
- [15] Pozzilli P, Guglielmi C, Maggi D, et al. Clinical update on the use of immuno modulators (antiCD3, GAD, Diapep277, anti-IL1) in type 1 diabetes[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(29): 3224-3228
- [16] Campbell LA, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae-an infectious risk factor for atherosclerosis?[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(1): 23-32
- [17] Guech-Ongey M, Brenner H, Twardella D, et al. Chlamydia pneumoniae, heat shock proteins 60 and risk of secondary cardiovascular events in patients with coronary heart disease under special consideration of diabetes: a prospective study [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2006, 6: 17
- [18] Herman WH, Engelgau MM, Zhang Y, et al. Use of GHb (HbA1c) to screen for undiagnosed diabetes in the U. S. population[J]. Diabetes Care, 2000, 23(8): 1207-1208
- [19] Farmer A. Use of HbA1c in the diagnosis of diabetes[J]. BMJ, 2012, 1(345): e7293
- [20] Rizzo A, Paolillo R, Iafusco D, et al. Chlamydia pneumoniae infection in adolescents with type 1 diabetes mellitus [J]. Journal of Medical Microbiology, 2012, 61(Pt11): 1584-1590

(上接第 301 页)

- [8] Cascinelli N, Clemente C, Bu falino R, et al. Perinodular injection of thymopentin (TP5) in cutaneous and subcutaneous metastases of melanoma[J]. Melanoma Res, 1993, 3(6): 471-476
- [9] 华鹏, 钟信刚, 陈鼎汉, 等. 胸腺五肽联合干扰素治疗尖锐湿疣临床疗效观察[J]. 皮肤病与性病, 2012, 34(1): 55-56
Hua Peng, Zhong Xin-gang, Chen Ding-han, et al. Clinical observation on the efficacy of thymopietin-5 and interferon in the treatment of condyloma acuminatum[J]. Journal of Dermatology and Venereology, 2012, 34(1): 55-56
- [10] Conant MA, Calabrese LH, Thomps on SE, et al. Maintenance of CD4⁺ cells by thymopentin in asymptomatic HIV2infected subjects results of a double-blind placebo2controlled study[J]. AIDS, 1992, 6: 1335-1339
- [11] 骆欢, 詹雨林, 瞿志军, 等. 胸腺肽对糖尿病合并肺结核患者 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 山西医药杂志, 2009, 38(1): 46-47
Luo Huan, Zhan Yu-lin, Qu Zhi-jun, et al. Therapeutic efficacy of thymic peptide for T-Lymphocyte Subsets in patients with diabetes and pulmonary tuberculosis[J]. Shanxi Medical Journal, 2009, 38(1): 46-4
- [12] Serrate SA, Schulof RS, Leoaderidis L, et al. Modulation of human NK cell cytotoxin activity, lymphokine production and IL-2 Rexpresion by thymic hormones[J]. J International, 1987, 139: 2338-2343
- [13] Wang J, Lu WL, Liang GW, et al. Phar macokinetics, toxicity of nasalcilia and immunomodulating effects in Sprague-Dawley rats followingnintranasal delivery of thymopentin with orwithout abs orp ti on enhancers[J]. Pep tides, 2006, 27(4): 826
- [14] Siemion I Z, Kluczyk A, CebratM. The pep tide molecular links between the central nervous and the immune systems [J]. Amino Acids, 2005, 29(3): 161
- [15] Mastion A, Favalli C, Grelli S, et al. Thymic hormones and cytokines. [J]. Immuopathol, 1992, 5: 77
- [16] 哈药集团生物工程有限公司注射用重组人干扰素 α -2b 使用说明书
Harbin Pharmaceutical Group Co., Ltd maunal of Recombinant human interferon α -2b for injection
- [17] 侯云清. 干扰素及临床应用: 第一版 [M]. 南京: 江苏科技出版社, 1981
Hou Yun-qing. Interferon and clinical application [M]. Nanjing: Jiangsu science and Technology Press, 1981
- [18] 余测香. 干扰素 a-2b 治疗小儿毛细支气管炎疗效观察[J]. 儿科药物治疗学, 2008, 14(3): 45-46
Yu Ce-xiang. Clinical observation of interferon a-2b in children with bronchiolitis[J]. Journal of Pediatric Pharmacy, 2008, 14(3): 45-46
- [19] 张应香. 干扰素 α -2b 治疗湿疹临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(6): 76
Zhang Ying-xiang. The observation of the efficacy for interferon a-2b in the treatment of chronic eczema [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2008, 2(6): 76
- [20] 邱亦明. 干扰素 a-2b 治疗复发性口腔溃疡的临床疗效及机制探讨[J]. 海峡药学, 2011, 23(4): 120-122
Qiu Yi-ming. Clinical observation and mechanism of interferon a-2b in recurrent oral ulcers[J]. St rait Pharmaceut ical Journa, 2011, 23(4): 120-122