

耐药性癫痫患者外周血 N-WASP 基因表达的研究^①

郭灿收,高策,蒋勇明,项琳,陈海燕,唐雄林,黄灵,袁胜山,黄建敏^②

(右江民族医学院附属医院,广西 百色 533000 E-mail:a831115@163.com)

摘要:目的 观察神经元威斯科特-奥德里奇综合征蛋白(Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein,N-WASP)基因在耐药性癫痫(drug resistant epilepsy,DRE)患者外周血中的表达变化,分析其作为外周血生物学指标预测 DRE 的临床价值。方法 抽取 32 例 DRE 患者(耐药组)、40 例抗癫痫药物控制良好者(良好组)及 32 例健康体检者(正常组)的外周血。采用 RT-PCR 检测 3 组人群外周血 N-WASP 基因相对表达量,分析比较不同用药方式、不同病程及用药前不同癫痫发作频率 N-WASP 基因相对表达量差异。结果 耐药组外周血 N-WASP 基因相对表达量显著高于良好组($P < 0.01$),良好组显著高于正常组($P < 0.01$)。2 种药物联合治疗无效组 N-WASP 基因相对表达量显著高于 2 种药物联合治疗有效组($P = 0.035$),2 种药物联合治疗有效组高于单药治疗有效组,差异无统计学意义($P = 0.789$)。耐药组和良好组中病程 ≥ 5 年组 N-WASP 基因相对表达量均显著高于病程 < 5 年组($P < 0.001$)。耐药组和良好组中用药前癫痫发作频率 ≥ 4 次/月亚组的 N-WASP 基因相对表达量均显著高于发作频率 < 4 次/月亚组($P = 0.016$, $P < 0.001$)。结论 N-WASP 基因表达量在 DRE 患者外周血中明显升高并且与药物疗效差、病程长和发作频率高密切相关,提示其可能参与了 DRE 的发生和发展,或可以作为预测 DRE 发生的外周血生物学指标之一。

关键词: 耐药性癫痫;N-WASP 基因;外周血

中图分类号: R741.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2018)04-0303-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.04.003

Study on the expression of peripheral blood N-WASP mRNA in patients with drug-resistant epilepsy

Guo Canshou,Gao Ce, Jiang Yongming, Xiang Lin,Chen Haiyan, Tang Xionglin,
Huang ling, Yuan Shengshan,Huang Jianmin

(Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China
E-mail:a831115@163.com)

Abstract: **Objective** To analyze the clinical value of Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) mRNA as a biomarker for forecasting drug resistant epilepsy (DRE) by observing the relative expression of peripheral blood N-WASP mRNA in patients with DRE. **Methods** Blood samples were drawn from 32 patients with DRE (DRE group), 40 patients well controlled with anti-epileptic drugs (AEDs) (AEDs well controlled group) and 32 healthy individuals (normal group). The relative expression of peripheral blood N-WASP mRNA was measured by RT-PCR for the three groups. Analysis and comparison of N-WASP mRNA relative expression were performed among different drug regimens, different course of disease and different seizure frequency before drug administration. **Results** The relative expression of N-WASP mRNA was significantly higher in the DRE group than that in the AEDs well controlled group ($P < 0.01$). The relative expression of N-WASP mRNA was significantly higher in the AEDs well controlled group than that in the normal group ($P < 0.01$). The relative expression of N-WASP mRNA was significantly higher in the ineffective group with two drugs combined therapy than that in the effective group with two drugs combined therapy ($P = 0.035$). The relative expression of N-WASP mRNA was higher in the effective group with two drugs combined therapy than that in the effective group with single drug therapy, there was no statistical difference ($P =$

① 基金项目:广西自然科学基金项目(2014jjAA40417)

② 通信作者,E-mail:bshuangjianmin@126.com

0.789)。The relative expression of N-WASP mRNA was significantly higher in the ≥ 5 -year disease course subgroup than that in the < 5 -year disease course subgroup in the DRE group and AEDs well controlled group ($P < 0.001$)。The relative expression of N-WASP mRNA was significantly higher in patients having more than 4 seizures times per month subgroup before treatment than those having less than 4 seizures times per month subgroup group in the DRE and AEDs well controlled groups ($P = 0.016, P < 0.001$)。 **Conclusion** The expression level of peripheral blood N-WASP mRNA is significantly increased in DRE patients and is closely related to poor drug efficacy, long disease course and high frequency of seizures, suggesting that it may be involved in the occurrence and development of DRE, and it may be one of peripheral blood biomarkers for predicting DRE occurrence.

Key words: drug-resistant epilepsy; N-WASP mRNA; peripheral blood

癫痫是由于脑部神经元高度异常同步化放电所致的慢性发作性疾病,WHO 报告目前全球约有 7000 万癫痫患者。癫痫治疗方法以药物治疗为主,药物种类繁多,近年来也研发出很多新药,但是经过抗癫痫治疗后仍然有约 30% 的患者无法达到满意的疗效,发展为耐药性癫痫(DRE) [1]。神经元威斯科特-奥德里奇综合征蛋白(N-WASP)是中枢神经系统 RhoGTPases 信号通路重要的细胞骨架调节蛋白,参与轴突、树突生长及物质转运,形成丝状和板状伪足,在病理情况下,使神经元、神经胶质细胞通过突触联系形成异常神经网络。神经网络异常重塑是 DRE 重要病理学特征,提示 N-WASP 可能与 DRE 的发病机制密切相关,但是目前国内外有关这方面的文献报道很少。本研究拟通过检测 DRE 患者外周血中 N-WASP 基因的表达,探讨 N-WASP 在 DRE 发病机制中的作用,并对比不同用药方式、不同病程及用药前癫痫发作频率对该指标的表达变化。

1 资料和方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 5 月—2018 年 6 月在右江民族医学院附属医院神经内科住院或门诊就诊的癫痫患者 72 例。纳入标准:①符合国际抗癫痫联盟(ILAE)2001 年制定的癫痫和癫痫综合征分类标准 [2];②患者依从性好,至少服用过一种或一种以上抗癫痫药物;③患者年龄满 18 周岁。排除标准:①患有恶性肿瘤、严重高血压、不稳定性心脏病、血液病、肝肾功能不全等严重器质性疾病的患者;②由进行性器质性脑病或其他中枢神经系统疾病等导致的症状性癫痫患者;③诊断错误、治疗不规范、依从性差的患者;④妊娠及哺乳期患者。DRE 诊断标准 [1]:根据癫痫发作类型,选择两种一线、作用机制不同、没有药物间相互作用、可耐受的抗癫痫药物,经足量、足疗程治疗(单药或联合用药)仍未能控制癫痫发作者。抗癫痫药物控制良好诊断标准 [1]:根据 2010 年 ILAE 定义的“无发作”标准:合理选用 1 种或 2 种一线抗癫痫药物治疗,达到长于 3 倍治疗前无发作间期或大于 1 年无癫痫发作。

根据 DRE 的诊断标准,将病例分为癫痫耐药组和药物控制良好组。其中耐药组:32 例,男 17 例,女 15 例,年龄 19~51 岁,平均年龄(35.00±9.73)岁,病程 ≥ 5 年 21 例,病程 < 5 年 11 例,抗癫痫治疗前发作频率 ≥ 4 次/月 23 例,发作频率 < 4 次/月 9 例;良好组 40 例,男 21 例,女 19 例,年龄 18~50 岁,平均年龄(31.98±11.04)岁,病程 ≥ 5 年 12 例,病程 < 5 年 28 例,抗癫痫治疗前发作频率 ≥ 4 次/月 8 例,发作频率 < 4 次/月 32 例。选取同期来院体检的 32 名健康人作为正常组,其中男 15 例,女 17 例,年龄 20~55 岁,平均年龄(35.44±10.35)岁。3 组性别、年龄之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),耐药组与良好组病程、用药前癫痫发作频率构成比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。研究对象或其监护人均签署知情同意书,本研究已通过本单位伦理委员会批准。

表 1 3 组一般资料比较

变量	耐药组 (n=32)	良好组 (n=40)	正常组 (n=32)	χ^2/F	P
性别				0.312	0.856
男	17	21	15		
女	15	19	17		
年龄(岁)	35.00±9.73	31.98±11.04	35.44±10.35	1.203 ^a	0.305
病程(年)				9.088	0.003
≥ 5	21	12			
< 5	11	28			
发作频率(次/月)				19.513	< 0.001
≥ 4	23	8			
< 4	9	32			

注:a 为 F 值,其余为 χ^2 值

1.2 仪器与试剂 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司),1-14R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),PTC-200 普通梯度仪。血液总 RNA 提取试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、逆转录试剂盒(立陶宛 Fermentas 公司)、荧光定量扩增试剂盒(瑞士 Roche 公司)。

1.3 荧光定量法检测外周血 N-WASP 基因相对表达

量 采集受检者空腹外周静脉血约 2 ml 于 EDTA 抗凝管中,置于 4 °C 冰箱保存,4 h 内提取 RNA。实验过程:①引物设计与合成:由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列:N-WASP:上游引物:5'-TGGAGATACTGTCAAGTTGCT-3';下游引物:5'-CTGTAGCCATGGGTAGATTAGG-3';扩增片段大小 152 bp。GAPDH 上游引物 5'-CAGGAGGCAT-TGCTGATGAT-3';下游引物:5'-GAAGGCT-GGGGCTCATTT-3';扩增片段大小:138 bp。②提取 RNA。取 1 ml 全血经 4 °C 3000×g (g 指重力加速度)离心 5 min 后弃上清,加入 750 μl Trizol 液,混均。室温静置 5 min 后加入 150 μl 氯仿,混均。室温静置 3 min 后 4 °C 12 000×g 离心 15 min 取上层水相置于新的 EP 管中,再次 4 °C 12 000×g 离心 15 min 去除上层水相中杂质,将上层水相转移至新的 EP 管中,余按照 Trizol 试剂盒说明书进行操作。所提取的总 RNA 经紫外分光光度仪检测其纯度和浓度,要求 A260/A280 在 1.7~2.2 之间。按逆转录试剂盒说明书操作,反应体系为 20 μl。③检测 N-WASP 基因表达:PCR 反应体系为 20 μl;其中 CYBERGreen qPCR SuperMix 10 μl,cDNA 模板 2 μl,上、下游引物各 0.6 μl,加 Rnase-free 水至 20 μl。使用荧光定量 PCR 仪进行扩增,重复 45 个循环;反应结束后,由软件自动得出荧光反应曲线、每个标本反应体系的扩增效率及 Ct 值。采用 2^{-ΔΔCt} 法进行数据相对定量分析,计算出 N-WASP 相对表达量。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 24.0 软件进行统计学处理,计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)或 Median(Q1~Q3)表示,多组间比较采用方差分析,两组间用 LSD-*t* 法或 Wilcoxon 秩和检验。计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 N-WASP mRNA 相对表达量比较 3 组 N-WASP mRNA 相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 52.672, P < 0.001$),经 LSD-*t* 法多重比较发现,耐药组显著高于良好组 ($P < 0.01$),而良好组又显著高于正常组 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 3 组 N-WASP mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	N-WASP 基因相对表达量
耐药组	32	6.10 ± 3.24
良好组	40	2.95 ± 1.23 ^a
正常组	32	1.11 ± 0.51 ^{ab}

注: $F = 52.672, P < 0.001$; a:与耐药组比较, $P < 0.01$; b:与良好组比较, $P < 0.01$

2.2 不同用药方式 N-WASP mRNA 相对表达量的比较 3 组不同用药方式之间 N-WASP mRNA 相对表达量 *u* 差异有统计学意义 ($P < 0.001$),见表 3。经 LSD-*t* 法多重比较发现,2 种药物联合治疗无效组显著高于 2 种药物联合治疗有效组 ($P = 0.038$),2 种药物联合治疗有效组高于单药治疗有效组,但差异无统计学意义 ($P = 0.789$),见表 4。

表 3 不同用药方式 N-WASP mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

用药方式	<i>n</i>	N-WASP mRNA 相对表达量
2 种药物联合治疗无效	32	5.52(3.82,7.36)
2 种药物联合治疗有效	11	4.28(1.39,4.76)
单药治疗有效	29	2.66(208,3.40)

注: $F = 20.366, P < 0.001$

表 4 3 种不同用药方式之间 N-WASP mRNA 相对表达量多重比较

分组	<i>Z</i>	<i>P</i>
单药治疗有效-2 种药物治疗有效	-8.296	0.789
单药治疗有效-2 种药物联合治疗无效	26.553	<0.001
2 种药物联合治疗有效-2 种药物联合治疗无效	-18.257	0.038

2.3 不同病程 N-WASP mRNA 相对表达量的比较 耐药组中病程 ≥ 5 年患者 N-WASP mRNA 相对表达量显著高于病程 < 5 年 ($P < 0.001$),同时良好组中病程 ≥ 5 年患者 N-WASP mRNA 相对表达量也显著高于病程 < 5 年 ($P < 0.001$),见表 5。

表 5 不同病程 N-WASP mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	N-WASP 基因相对表达量	<i>Z</i>	<i>P</i>
耐药组			-4.032	<0.001
病程 < 5 年	11	3.41(2.52,4.20)		
病程 ≥ 5 年	21	7.26(5.52,8.67)		
良好组			-3.838	<0.001
病程 < 5 年	28	2.31(1.65,3.15)		
病程 ≥ 5 年	12	4.36(2.96,4.73)		

2.4 用药前不同癫痫发作频率 N-WASP mRNA 相对表达量的比较 耐药组中用药前癫痫发作频率 ≥ 4 次/月患者的 N-WASP mRNA 相对表达量显著高于发作频率 < 4 次/月患者 ($P = 0.016$)。同时良好组中用药前癫痫发作频率 ≥ 4 次/月患者的 N-WASP mRNA 相对表达量显著高于发作频率 < 4 次/月患者 ($P < 0.001$),见表 6。

表6 用药前不同癫痫发作频率 N-WASP 基因相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	N-WASP 基因相对表达量	Z	P
耐药组			-2.413	0.016
发作频率 < 4 次/月	9	4.17(3.31, 4.90)		
发作频率 ≥ 4 次/月	23	7.27(4.00, 8.14)		
良好组			-3.72	<0.001
发作频率 < 4 次/月	32	2.48(1.76, 3.29)		
发作频率 ≥ 4 次/月	8	4.66(3.51, 5.10)		

3 讨论

由于耐药性癫痫的发病机制尚不完全清楚,导致约 30% 癫痫患者疗效差,即使经过规范抗癫痫药物治疗仍出现反复发作,给患者的心理、生理造成沉重的打击,严重影响患者生活质量。因此,进一步深入研究 DRE 的发病机制,寻找早期预测 DRE 的生物学指标,对有效防治 DRE 具有重大的临床价值。

N-WASP 作为中枢神经系统最重要的成核促进因子之一,最早于 1996 年从牛脑组织中被纯化,系 WASP 家族重要成员之一,与 WASP 结构具有约 50% 的同源性,因在哺乳动物脑组织中表达最多而得名。人类 N-WASP 基因位于 7q31.3 处,编码 505 个氨基酸,分子量为 65 kDa^[3]。N-WASP 是中枢神经系统 RhoGTPases 信号通路重要的细胞骨架调节蛋白,由上游的细胞分裂周期 42 GTP 结合蛋白 (cell division cycle 42 GTP-binding protein, Cdc42) 激活 N-WASP 后,与肌动蛋白相关蛋白 2/3 (actin-related protein 2/3, Arp2/3) 结合,促使肌动蛋白单体聚合形成肌动蛋白多聚体,刺激神经突起生长与分支^[4]。在神经系统中,正常生理条件下 N-WASP 参与了神经髓鞘的准确形成^[5]、正常生长锥的生长及正常神经突触形成^[6]。沈秀莲等^[7]通过结构域基因敲除及过表达研究发现,N-WASP 主要是通过 PolyPro、VCA 结构域调控中枢神经系统神经元迁移,促进神经突触的生长。Hebbrecht 等^[8]制作了一种针对 N-WASP 的 VCA 区域的纳米抗体,与神经细胞作用后发现侵袭性伪足减少、功能下降。有研究表明 N-WASP 过度表达促进神经纤维异常芽生,参与阿尔茨海默病发病^[9]。这些研究结果表明,N-WASP 维持正常神经网络结构与功能起重要的作用,但是在病理情况下可促进异常神经网络形成导致各种疾病发生。

由于条件及伦理限制,癫痫患者脑组织取材困难很难得到,而外周血取材具有操作便捷、可重复性强、易被患者接受的优势,本研究通过检测 DRE 患者外周血中 N-WASP 基因的表达,分析比较耐药组、药物控制良好组和健康对照组表达差异,并对比不同用药方式、不同病程及用药前癫痫发作频率该指标的表达变

化,结果发现,N-WASP 基因在 DRE 组患者外周血中的表达显著高于药物控制良好组,药物控制良好组又显著高于健康对照组。这研究表明 N-WASP 基因表达异常与 DRE 发病有关,具体机制可能是癫痫发作后促使 N-WASP 基因过度表达,生长锥的异常生长,错误地介导海马苔藓纤维芽生、海马齿状回神经元错误迁徙形成异常神经网络,导致耐药性癫痫发生。Xiao F 等^[6]通过对 52 例耐药性癫痫脑组织与 32 例脑外伤切除脑组织基因芯片扫描发现,N-WASP 基因在耐药性癫痫患者脑组织中的相对表达量显著高于正常对照组,提示 N-WASP 基因表达与 DRE 发病机制密切相关,与本研究结果类似。

既往在临床上对耐药性癫痫患者的危险因素分析,发现首次用药疗效差、单药治疗无效、病程长和发作频率高是 DRE 患者发生耐药的独立危险因素^[10-11]。本研究通过对比不同用药方式、不同病程及用药前不同癫痫发作频率 N-WASP 基因表达变化,发现对抗癫痫药疗效差即多药联合治疗才有效、病程长、用药前癫痫发作频率高的癫痫患者外周血中 N-WASP 基因的表达显著增加,这一结果更进一步显示 N-WASP 基因表达增加对 DRE 的发生具有较大的预警价值,可以作为早期预测 DRE 发生的外周血生物学指标之一。

总之,本研究发现 N-WASP 基因在 DRE 患者外周血中明显高表达,同时受到用药方式、病程及癫痫发作频率的影响,提示 N-WASP 基因的过度表达参与 DRE 的发生发展,可以作为早期预测 DRE 发生的外周生物学指标之一。

参考文献:

- [1] Kwan P, Arzimanoglou A, Berg A T, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies[J]. *Epilepsia*, 2010, 51(6): 1069-77.
- [2] Engel J Jr, International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(6): 796-803.
- [3] Miki H, Miura K, Takenawa T. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases[J]. *EMBO J*, 1996, 15(19): 5326-5335.
- [4] Luan Q, Zelter A, MacCoss MJ, et al. Identification of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) binding sites on the branched actin filament nucleator Arp2/3 complex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(7):

- E1409-E1418.
- [5] Novak N, Bar V, Sabanay H, et al. N-WASP is required for membrane wrapping and myelination by Schwann cells [J]. *J Cell Biol*, 2011, 192(2): 243-50.
- [6] Xiao F, Wang X, Li J, et al. Overexpression of N-WASP in the brain of human epilepsy [J]. *Brain Res*, 2008, 1233: 168-75.
- [7] 沈秀莲, 逯宜超, 甲芝莲, 等. N-WASP 通过 polyPro 和 VCA 结构域调控大脑皮层神经元迁移 [J]. *遗传*, 2018, 40(5): 390-401.
- [8] Hebbrecht T, Van Audenhove I, Zwaenepoel O, et al. VCA nanobodies target N-WASP to reduce invadopodium formation and functioning [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185076.
- [9] Kitamura Y, Tsuchiya D, Takata K, et al. Possible involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family in aberrant neuronal sprouting in Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2003, 346(3): 149-152.
- [10] 李乐超, 张燕芳. 耐药性部分性发作癫痫抗癫痫药物治疗观察及影响因素分析 [J]. *山东医药*, 2013, 53(23): 24-26.
- [11] 胡春霞, 郑维红, 刘肇绩, 等. 耐药性癫痫的相关危险因素分析 [J]. *医学综述*, 2015, 21(14): 2642-2644.
- 收稿日期: 2018-07-06; 修回日期: 2018-08-08

(上接第 302 页)

- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2010 版) [J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(1): 81-117.
- [6] Rooh-UI-Muqim, Ahmed M, Griffin S. Evaluation and management of diabetic foot according to Wagner's classification. A study of 100 cases [J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2003, 15(3): 39-42.
- [7] 孙燕, 陈波, 李婉媚. 2 型糖尿病患者踝脉搏波传导速度和踝臂指数与颈动脉粥样硬化的相关性研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2013, 21(2): 19-20.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版) [J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(8): 2-42.
- [9] 林铮, 谢燕玉, 吴晓鸿. 老年 2 型糖尿病患者外周动脉硬化与踝臂指数、趾臂指数的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(21): 5314-5315.
- [10] 丁亚琴, 吴坚, 邵筱宏, 等. 2 型糖尿病患者踝臂指数、趾臂指数的变化及其与糖尿病足的相关性 [J]. *疑难病杂志*, 2015, 14(11): 1133-1136.
- [11] Aboyans V, Ho E, Denenberg JO, et al. The association between elevated ankle systolic pressures and peripheral occlusive arterial disease in diabetic and nondiabetic subjects [J]. *J Vasc Surg*, 2008, 48(5): 1197-1203.
- [12] Fowkes FG. The measurement of atherosclerotic peripheral arterial disease and epidemiological surveys [J]. *Int J Epidemiol*, 1988, 17(2): 248-254.
- [13] 胡大一, 杨进刚. 下肢动脉疾病诊疗的专家共识 [J]. *中国实用内科杂志*, 2006, 26(21): 1678-1683.
- [14] 张庆梅, 周宇, 王薇. 踝臂指数与下肢动脉彩超对糖尿病下肢血管病变的诊断价值 [J]. *中国医学工程*, 2017, 25(2): 1-3.
- [15] 高静, 段畅, 李丽娟. 2 型糖尿病发病机制的研究进展 [J]. *医学综述*, 2015, 21(21): 3935-3938.
- [16] 向臣希, 欧瑜. 氧化应激在 2 型糖尿病发病过程中的作用 [J]. *药物生物技术*, 2015, 22(5): 457-460.
- [17] Tavares CA, Rassi CH, Fabel MG, et al. Relationship between glycemic control and coronary artery disease severity, prevalence and plaque characteristics by computed tomography coronary angiography in asymptomatic type 2 diabetic patients [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2016, 32(10): 1577-1585.
- [18] 张彬号, 王瑞琼. 吸烟对 2 型糖尿病患者动脉硬化的影响 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2016, 26(19): 142-143.
- [19] 曹永红, 戴武, 王长江, 等. 2 型糖尿病合并下肢血管病变有关危险因素分析 [J]. *安徽医学*, 2011, 32(11): 1855-1857.
- [20] Jin X, Ma JH, Shen Y, et al. An analysis of the relationship between ankle-brachial index and estimated glomerular filtration rate in type 2 diabetes [J]. *Angiology*, 2013, 64(3): 237-241.
- [22] 王飞. 2 型糖尿病住院患者踝臂指数及相关指标研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2016.
- [23] 侯小丽, 王鹏华, 孙幸幸, 等. 糖尿病足感染的诊断与治疗 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2014, 6(7): 443-446.
- [24] 黄红艳. 2 型糖尿病合并 DF 患者的危险因素分析 [J]. *山东医药*, 2007, 47(25): 68-69.
- 收稿日期: 2018-07-08; 修回日期: 2018-08-10