文章编号:1000-5404(2014)16-1729-05

论著

血浆血管细胞黏附分子-1与巨噬细胞游走抑制因子水平与糖尿病患者肾脏功能损害的关联性研究

冯晓明,田 晓 (063000 河北 唐山,河北联合大学附属医院肾内科)

[摘要] **目的** 探讨血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1,VCAM-1)和巨噬细胞游走抑制因子(macrophage migration inhibitory factor,MIF)对糖尿病患者的临床意义及其在糖尿病肾病诊断过程中的作用。**方法** 选取2型糖尿病患者126例和20例健康体检者(健康对照组),测量VCAM-1、MIF、尿肌酐、血清肌酐等指标,估算糖尿病患者的肾小球滤过率(eGFR)。比较不同研究对象的VCAM-1与MIF水平,采用Pearson相关分析探讨VCAM-1及MIF与尿白蛋白/肌酐、eGFR的关联。**结果** 糖尿病患者的VCAM-1、MIF水平明显高于健康对照组,尿白蛋白/肌酐越高,VCAM-1、MIF越高($P<0.05$);VCAM-1和MIF水平与eGFR均呈明显的负相关关系($r^2=0.240\ 5$, $r^2=0.516\ 2$, $P<0.05$);VCAM-1和MIF水平与尿白蛋白/肌酐值均呈正相关关系($r^2=0.069\ 5$, $r^2=0.059\ 5$, $P<0.05$);VCAM-1和MIF水平与eGFR变化均呈负相关($r^2=0.048\ 2$, $r^2=0.071\ 7$, $P<0.05$)。**结论** 糖尿病及糖尿病肾病患者血浆中VCAM-1及MIF水平升高,对糖尿病肾病诊断及病情判断具有一定的参考价值。

[关键词] 血管细胞黏附分子-1;巨噬细胞移动抑制因子;糖尿病肾病;诊断
[中图法分类号] R446.112;R587.2;R692.04 [文献标志码] A

Correlation of serum levels of VCAM-1 and MIF with early diabetic nephropathy: report of 126 cases

Feng Xiaoming, Tian Xiao (Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan, Hebei Province, 063000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the clinical significance of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in diabetic patients and determine their role in the diagnosis of diabetic nephropathy. **Methods** A total of 126 patients of type 2 diabetes in our department from January 2010 to January 2012 were recruited in this study, and 20 healthy subjects were subjected as normal control. Their serum levels of VCAM-1, MIF and creatinine, urine creatinine and estimated glomerular filtration rate (eGFR) in diabetic patients were measured and calculated. VCAM-1 and MIF levels from different groups were compared and the correlation of MIF and VCAM-1 with urinary albumin/creatinine and eGFR was analyzed by Pearson correlation analysis. **Results** Serum levels of VCAM-1 and MIF were significantly higher in diabetic patients than the healthy control ($P<0.05$), and the higher the urinary albumin/creatinine, the higher VCAM-1 and MIF levels were ($P<0.05$). Serum levels of VCAM-1 and MIF showed a significant negative correlation with eGFR ($r^2=0.240\ 5$, $r^2=0.516\ 2$, $P<0.05$), a positive correlation with urinary albumin/creatinine ($r^2=0.069\ 5$, $r^2=0.059\ 5$, $P<0.05$); The changes of VCAM-1 and MIF levels compared with the levels in 1 year later showed a negative correlation with changes in eGFR ($r^2=0.048\ 2$, $r^2=0.071\ 7$, $P<0.05$). **Conclusion** Serum levels of VCAM-1 and MIF are elevated in the patients with diabetes or diabetic nephropathy, and the levels provide a certain reference value for the diagnosis of diabetes and kidney disease.

[**Key words**] vascular cell adhesion molecule-1; macrophage migration inhibitory factor; diabetic nephropathy; diagnosis

Corresponding author: Feng Xiaoming, E-mail: fengxiaomingts@126.com

[通信作者] 冯晓明,E-mail:fengxiaomingts@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140625.0937.006.html(2014-06-25)

糖尿病肾病是肾功能衰竭的重要原因之一,尽管近年来,糖尿病肾病相关疾病的诊疗和管理技术取得了长足的发展,但仍有相当比例的患者将发展成为终末期糖尿病肾病。为了使目前临床上的治疗方案的疗效最优化,临床医师必须尽可能早地识别可能发展为终末期糖尿病肾病的患者[1]。而这一过程的关键,则是确定可靠而灵敏的分子生物学标志物。有越来越多的证据表明,血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1,VCAM-1)和巨噬细胞游走抑制因子(macrophage migration inhibitory factor,MIF)通过促进炎性反应和纤维化参与了糖尿病肾病的发病机制[1-2]。VCAM-1已被证明在具有肾纤维化的各种肾病中可以发挥重要的作用,主要参与慢性炎症过程,VCAM-1的表达增加,病变组织诱发新生血管增生,该过程与炎症反应可以发生相互影响。在糖尿病发展为糖尿病肾病的过程中,上述事件启动或介入了其病理过程。研究表明,在机体的炎症过程中,内毒素、外毒素以及TNF-α、IFN-γ等细胞因子,某些细胞将释放预先储备的MIF,并为合成新的MIF做准备。目前通过跨膜受体信号传导机制尚未明确建立,MIF主要参与非受体介导的细胞内吞过程[3]。MIF通过刺激细胞因子表达等作用促进炎性反应过程,因此,MIF也是感染、脓毒血症、糖尿病肾病发展过程中的重要介质。基于上述生物学作用,VCAM-1和MIF可能是糖尿病肾病发生机制链中的重要环节。然而,迄今为止,临床上尚未将VCAM-1和MIF水平作为糖尿病患者肾功能的非侵入性标记物,其与糖尿病肾病患者的预后关系亦不明确。本研究测定了糖尿病患者的血浆VCAM-1和MIF水平,并前瞻性地观察并分析了其在糖尿病肾病诊断中的作用,旨在探明其在糖尿病肾病发展中的作用,为临床诊断和治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2010年1月至2012年1月在我院治疗的糖尿病患者126例,依据2012年版我国糖尿病临床诊治指南进行明确诊断,排除心血管疾病、血液系统疾病、肿瘤及心、肝、肺、肾功能异常者。根据糖尿病组的尿白蛋白和尿肌酐比值分为3组:正常白蛋白尿T2DM组(A组)38例(尿白蛋白/肌酐值≤2.5 mg/mmol)、微量白蛋白尿T2DM组(B组)47例(尿白蛋白/肌酐值>2.5 mg/mmol且≤25 mg/mmol)、大量白蛋白尿T2DM组(C组)41例(尿白蛋白/肌酐值>25 mg/mmol)。另选取同期在我院体检中心体检的健康者20名为健康对照组。4组研究对象的基本情况比较见表1。研究经我院医学伦理委员会批准,患者及家属知情同意后,签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器及试剂 轮转切片机、全自动组织脱水机(徕卡公司,德国),包埋机(湖北泰康医疗设备有限公司),烤箱、孵箱(北京第二仪器厂,中国),光学显微镜(上海光学仪器厂),高清晰度病理图片采集系统(上海茸研仪器有限公司)。鼠抗人VCAM-1和MIF单克隆抗体(Invitrogen,美国),PBS缓冲液、抗原修复液、DAB显色液、过氧化氢由上海生工有限公司提供,苏木精、伊红、中性树胶、二甲苯等由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司提供。

1.2.2 免疫组化 采用免疫组织化学S-P法检测VCAM-1和MIF的表达。在切片机下,将经活检的肾脏组织切成5 μm厚的组织块,置于干净的载玻片上,放入烤箱,65 ℃烘烤2 h后,放入二甲苯中脱蜡,15 min/次,共2次。之后在酒精中水化,依次在100%、95%、80%、75%不同浓度中分别静置5 min。再将切片放入抗原修复液中煮沸3 min后在过氧化氢浸泡5 min。BSA孵育1 h,PBS冲洗3次。滴加VCAM-1和MIF一抗,4 ℃湿盒孵育过夜,倾去一抗,PBS缓冲液洗3次;分别滴加二抗,室温孵育30 min,PBS缓冲液冲洗3次,再滴加DAB显色剂,镜下控制显色时间,自来水冲洗。最后进行苏木精复染。行酒精梯度脱水,二甲苯透明后进行中性树胶封片。

1.2.3 免疫组化染色结果评定 参考Hoevel等[3]的方法,根据免疫强度评定免疫组化染色结果:无染色记为"0分",弱染色记为"1分",中等染色记为"2分",强染色记为"3分"。同时根据染色阳性细胞占细胞总数的百分比计分:0%~9%记为0分,10%~49%记为1分,50%~89%记为2分,≥90%记为3分。然后将每一标本的上述两个指标相乘再除以3求平均值,经四舍五入到最接近的整数即为免疫组化染色强弱的最终结果。

1.2.4 其他指标检测 另采集糖尿病患者的血样标本,经细菌学检测,不同糖尿病组患者的尿样标本菌落数均无统计学差异后方可使用。实验室测量包括血清白蛋白、血清肌酐、尿白蛋白/肌酐值和尿细菌学检查。血清肌酐和尿肌酐测定采用苦味酸动力学法(罗氏试剂),血清肌酐及尿微量白蛋白测定采用免疫比浊法(朗道公司试剂),尿微量蛋白测定采用联苯三酚红比色法(利德曼公司试剂),VCAM-1及MIF水平测定采用酶联免疫吸附法(ELISA,利德曼公司试剂),均严格按照试剂盒说明书进行操作。采用修订的MDRD方程估算肾小球滤过率(eGFR)[4]:男性 $eGFR = 186 \times (肌酐/88.4)^{-1.154} \times 年龄^{-0.203}$,女性 $eGFR = 186 \times (肌酐/88.4)^{-1.154} \times 年龄^{-0.203} \times 0.742$,肌酐单位:μmol/L。

1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 或构成比(率)进行统计描述;采用 χ^2 或方差分析进行统计推断,如有必要,采用LSD法进行两两比较;采用Pearson相关分析观察指标间的关联性。

2 结果

2.1 一般资料

4 组研究对象的性别、年龄、收缩压、舒张压均无统计学差异($P>0.05$);3 组糖尿病患者的疾病史及 4 组 eGFR、血清肌酐具有统计学差异($P<0.05$),三者均随研究对象的尿白蛋白含量升高而升高。

2.2 免疫组化观察

VCAM-1 和 MIF 阳性染色均主要定位于细胞质及细胞膜,以棕褐色染色为主。正常白蛋白尿组未见棕褐色颗粒表达,微量及大量白蛋白尿组患者的肾脏组织可见 VCAM-1 和 MIF 表达阳性的棕褐色颗粒,同时,大量白蛋白尿组患者的棕褐色颗粒多于微量白蛋白尿组,颜色更重(图 1),说明:正常蛋白尿组患者 VCAM-1 和 MIF 表达阴性,而大量白蛋白尿组患者的肾脏组织 VCAM-1 和 MIF 表达阳性明显强于微量白蛋白尿组。

2.3 4 组 VCAM-1 和 MIF 水平比较

4 组 VCAM-1 和 MIF 水平比较见图 2。经方差分析,4 组 VCAM-1 和 MIF 水平具有统计学差异($P<0.05$);经 LSD 两两比较,糖尿病患者的 VCAM-1 和 MIF 水平均明显高于健康对照组($P<0.05$),二者随着糖尿病患者尿白蛋白/尿肌酐值升高而升高($P<0.05$)。

2.4 VCAM-1 和 MIF 水平与 eGFR 的关系

采用 Pearson 相关性分析 VCAM-1 和 MIF 水平与 eGFR 的关系,结果显示:VCAM-1 和 MIF 水平与 eGFR 均呈明显的负相关,即 eGFR 随着 VCAM-1 和 MIF 水平升高而降低($P<0.05$,图 3)。

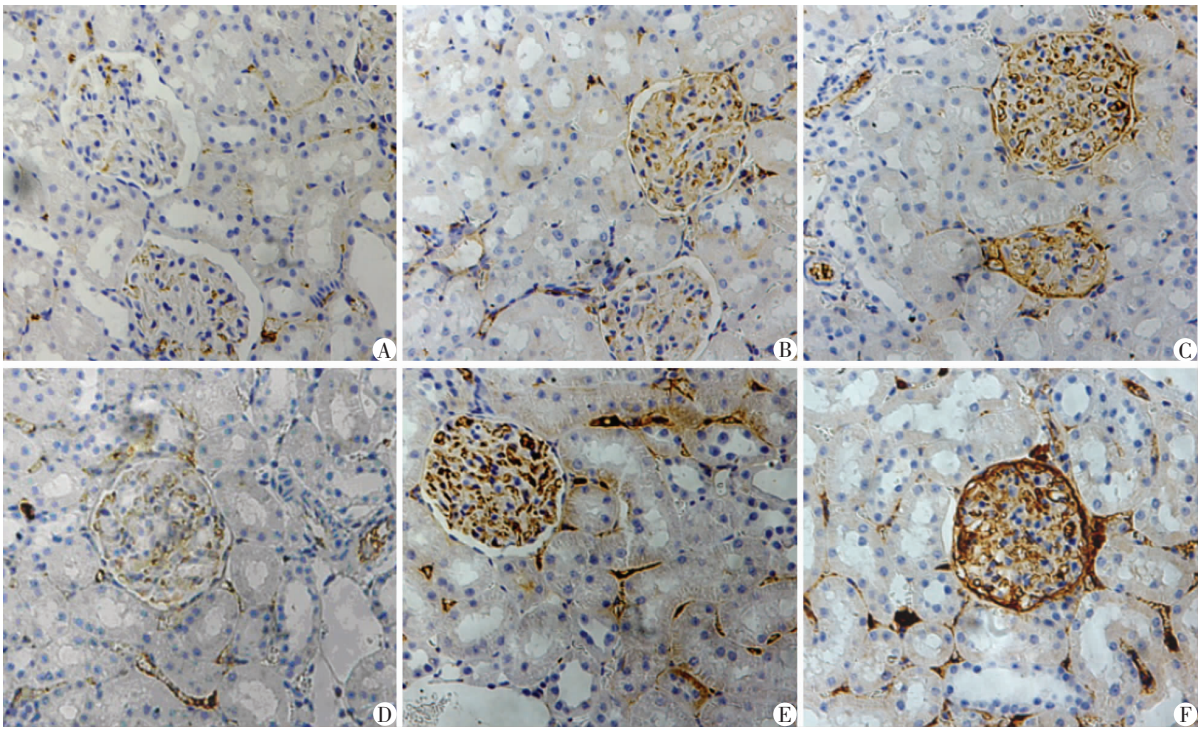
2.5 VCAM-1 和 MIF 水平与尿白蛋白/肌酐值变化的关系

A 组和 B 组的糖尿病患者进入本研究之后,均进行临床常规治疗,并对此两组患者进行了为期 1 年的随访。A 组失访 4 例,共成功随访 34 例;B 组失访 5 例,成功随访 42 例。VCAM-1 和 MIF 水平与尿白蛋白/肌酐值的 Pearson 关联性分析见图 4,VCAM-1 和 MIF 水平越高,尿白蛋白/肌酐值升高幅度越大,VCAM-1 和 MIF 水平与尿白蛋白/肌酐值呈正相关关系($P<0.05$)。

表 1 4 组研究对象的基本情况比较

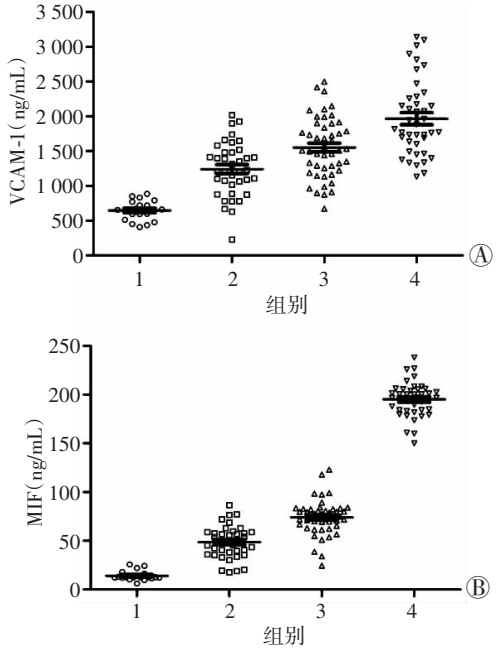
组别	例数	性别(男/女)	年龄(岁)	糖尿病史(年)[a]	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	eGFR [mL/(min·1.73m^2)][a]	血清肌酐(μmol/L)[a]
健康对照组	20	8/12	55.3±8.2	–	124.26±3.45	81.02±1.89	79.98±3.59	73.12±5.46
A 组	38	19/19	54.2±7.5	2.59±1.42	125.41±2.89	81.58±2.00	72.49±2.55	83.25±6.59
B 组	47	21/26	54.2±7.5	3.55±2.46	125.77±3.15	81.95±2.05	71.04±4.78	92.59±7.44
C 组	41	23/18	53.3±7.0	4.13±3.59	126.47±4.85	82.74±2.15	61.19±10.27	115.33±8.67
F/χ^2值		1.833	1.441	6.966	1.528	1.666	14.588	20.236
P值		0.608	0.378	0.020	0.362	0.341	<0.01	<0.01

a:$P<0.05$,经 LSD 法,任一两两比较



A:正常白蛋白尿组(VCAM-1 阴性);B:微量白蛋白尿 T2DM 组(VCAM-1 弱阳性);C:大量白蛋白尿 T2DM 组(VCAM-1 阳性);D:正常白蛋白尿组(MIF 阴性);E:微量白蛋白尿 T2DM 组(MIF 弱阳性);F:大量白蛋白尿 T2DM 组(MIF 阳性)

图 1 免疫组化观察不同白蛋白尿组 VCAM-1 和 MIF 表达 (S-P ×200)



1:健康对照组;2:正常白蛋白T2DM组;3:微量白蛋白尿T2DM组;4:大量白蛋白尿T2DM组

图2 4组研究对象VCAM-1(A)和MIF(B)水平比较

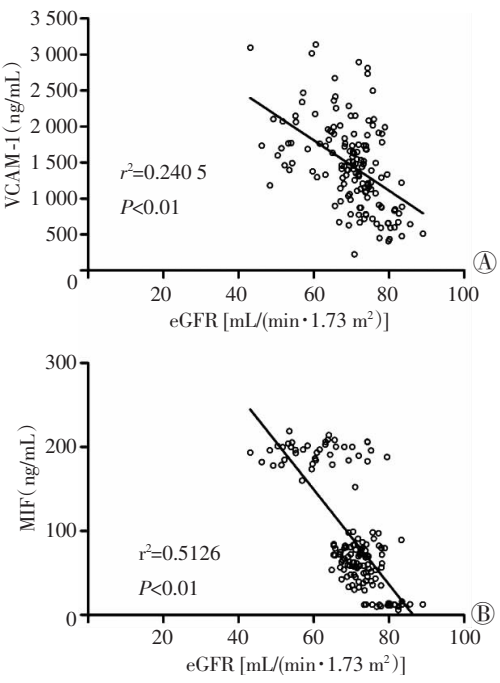


图3 VCAM-1(A)和MIF(B)水平与eGFR的相关性分析

2.6 VCAM-1和MIF水平与eGFR变化的关系

随访1年后,VCAM-1和MIF水平与eGFR变化间Pearson关联分析见图5,VCAM-1和MIF水平越高,GFR下降幅度越大,VCAM-1和MIF水平与eGFR变化呈负相关关系($P<0.05$)。

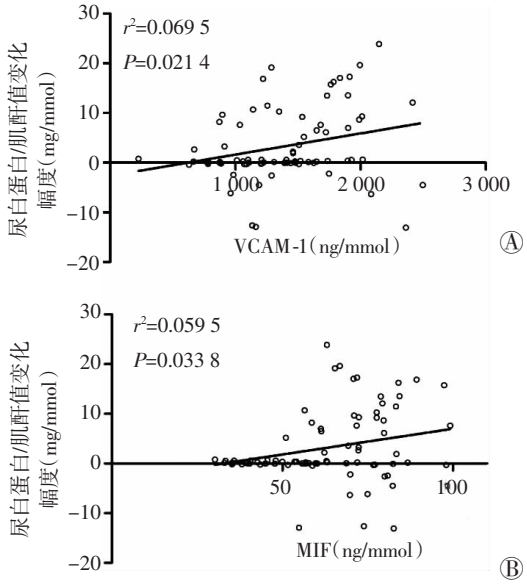


图4 VCAM-1(A)和MIF(B)水平与尿白蛋白/肌酐值变化的关系

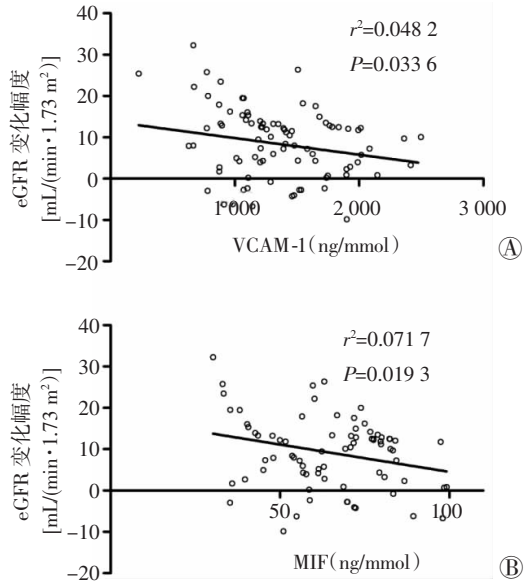


图5 VCAM-1(A)和MIF水平(B)与eGFR变化的关系

3 讨论

VCAM-1和MIF可存在于多类细胞,诸如血管内皮细胞、肾小球细胞、上皮细胞等。近年来其检测方法也得到了迅速发展,但其临床意义尚不十分清楚。我们采用前瞻性研究探讨了健康对照组及糖尿病患者血浆VCAM-1和MIF水平的检测对其进展为糖尿病肾病的诊断的临床意义。结果发现:糖尿病患者VCAM-1和MIF水平明显高于健康对照组,并与患者eGFR呈明显的负相关关系,由此可见,VCAM-1和MIF水平可以明显影响糖尿病患者尿白蛋白含量及eGFR。糖尿病患者尿白蛋白含量越高,临床上一般提示患者肾

功能减退越明显,可表现为 eGFR 越低,因而 VCAM-1 和 MIF 水平可在一定程度上反应糖尿病患者的肾功能,并可借此提示患者向糖尿病肾病进展情况。

近年研究表明:肾纤维化是包括糖尿病肾病在内的肾脏疾病进展至终末期肾病的共同通路。在肾纤维化过程中,结缔组织生长因子及促纤维化生长因子均是十分重要的标志物。另有研究表明,结缔组织生长因子 2、3(connective tissue growth factor 2、3, CCN2、CCN3)等众多的细胞因子可以通过促进 VCAM-1 和 MIF 相关基因的表达而加速肾纤维化的进程,MIF 还与糖尿病肾病肾组织的炎症及病理损害相关[5-6]。该假设与本研究的分析结果是一致的。本研究发现:VCAM-1 和 MIF 水平的升高是糖尿病肾病的标志物,并可以对糖尿病肾病患者的预后有一定的预测作用。临床上对糖尿病等慢性病的管理技术不断完善,诊治技术也不断发展,在很大程度上改善了糖尿病患者的生活质量,延缓了向糖尿病肾病的进展速度[7-8]。本研究对部分研究对象进行了为期 1 年的随访,分析结果发现,大部分完成随访的糖尿病患者的尿白蛋白/肌酐值仍增高,eGFR 下降;VCAM-1 和 MIF 水平与尿白蛋白/肌酐值的升高幅度成正比,与 eGFR 的增高呈反比,表明 VCAM-1 和 MIF 水平可以反映该类患者肾纤维化状况,定量反应糖尿病患者的肾功能变化。对于糖尿病患者 VCAM-1 和 MIF 水平升高的机制目前研究较多,但尚不明确。有研究发现:糖尿病肾病患者近端肾小管及肾小球上皮细胞表面 VCAM-1 表达高于痛风性肾病[9-10],因此,糖尿病肾病患者血清 VCAM-1 水平较正常人升高可能与肾脏分泌 VCAM-1 的能力提高,并进入血液循环或体液循环有关;还可能是由该类患者内皮功能紊乱导致[10]。肾组织 MIF 表达增加,可通过其受体 CD74 而导致细胞损伤[5,11-14]。上述机制可能是糖尿病肾病患者尿液 VCAM-1 及 MIF 水平可反映糖尿病肾病患者肾组织病变程度的主要机制。

综上所述,糖尿病患者尿液中 VCAM-1 及 MIF 水平明显高于健康对照组,VCAM-1 及 MIF 水平与患者的尿微量白蛋白/肌酐值、eGFR 等指标呈明显的相关关系,表明 VCAM-1 及 MIF 水平对糖尿病肾病诊断及病情判断具有一定的参考价值。

参考文献:

[1] Jerums G, Premaratne E, Panagiotopoulos S, *et al*. New and old markers of progression of diabetic nephropathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 82(Suppl 1): S30-S37.

[2] Colhoun H M, Betteridge D J, Durrington P N, *et al*. Effects of atorvastatin on kidney outcomes and cardiovascular disease in patients with diabetes: an analysis from the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS)[J]. Am J Kidney Dis, 2009, 54(5): 810-819.

[3] Hoevel T, Macek R, Swisshelm K, *et al*. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids[J]. Int J Cancer, 2004, 108(3): 374-383.

[4] 王建兵, 潘婉仪, 孙蕾, 等. 胱抑素 C 和估算的肾小球滤过率在糖尿病肾病早期诊断中的应用[J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(3): 354-357.

[5] Sanchez-Nino M D, Sanz A B, Ihalmo P, *et al*. The MIF receptor CD74 in diabetic podocyte injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(2): 353-362.

[6] Liang J H, Li Y N, Qi J S, *et al*. Peroxynitrite-induced protein nitration is responsible for renal mitochondrial damage in diabetic rat[J]. J Endocrinol Invest, 2010, 33(3): 140-146.

[7] King G L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications[J]. J Periodontol, 2008, 79(8 Suppl): 1527-1534.

[8] Elmarakby A A, Sullivan J C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy[J]. Cardiovasc Ther, 2012, 30(1): 49-59.

[9] Lopes A A. End-stage renal disease due to diabetes in racial/ethnic minorities and disadvantaged populations[J]. Ethn Dis, 2009, 19(1 Suppl 1): S1-47-S1-51.

[10] Romero-Aroca P, Mendez-Marin I, Baget-Bernaldiz M, *et al*. Review of the relationship between renal and retinal microangiopathy in diabetes mellitus patients[J]. Curr Diabetes Rev, 2010, 6(2): 88-101.

[11] Zhou G, Wang Y, He P, *et al*. Probucol inhibited Nox2 expression and attenuated podocyte injury in type 2 diabetic nephropathy of db/db mice[J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(12): 1883-1890.

[12] Pan Y, Huang Y, Wang Z, *et al*. Inhibition of MAPK-mediated ACE expression by compound C66 prevents STZ-induced diabetic nephropathy[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(2): 231-241.

[13] Li L, Zhao Y W, Zeng J S, *et al*. Rituximab regulates the expression of the Raf kinase inhibitor protein *via* NF-κB in renal tissue of rats with diabetic nephropathy[J]. Genet Mol Res, 2013, 12(3): 2973-2981.

[14] Sagar S K, Zhang C, Guo Q, *et al*. Role of expression of endothelin-1 and angiotensin-Ⅱ and hypoxia-inducible factor-1α in the kidney tissues of patients with diabetic nephropathy[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2013, 24(5): 959-964.

(**收稿**:2014-03-02;**修回**:2014-04-18)

(编辑 龙 亮)