

论著·临床研究

血管外基质蛋白 Fibulin-1 在早期糖尿病肾病中的表达及临床意义*

陈 志¹, 王启茹¹, 汪晓莺^{2△}

(1. 兴化市人民医院检验科, 江苏泰州 225700; 2. 南通大学医学院免疫学教研室, 江苏南通 226000)

摘要:目的 探究血管外基质蛋白 Fibulin-1 在早期糖尿病肾病(DN)中的表达情况及其临床意义。方法 选取兴化市人民医院 2017 年 2—6 月住院患者 90 例, 根据晨尿微量清蛋白水平, 将其分为糖尿病组 30 例(尿微量清蛋白 0~30 mg/L), 糖尿病微量清蛋白尿组 30 例(>30~300 mg/L), 糖尿病大量蛋白尿组 30 例(>300 mg/L); 另选体检健康者 30 例为健康对照组, 分析 4 组血清中胱抑素 C(Cys C)、空腹血糖(FBG)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和血清中 Fibulin-1 表达。结果 糖尿病大量蛋白尿组 Cys C 水平和健康对照组以及糖尿病组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。糖尿病大量蛋白尿组的 Fibulin-1 的水平与健康对照组、糖尿病组及糖尿病微量蛋白尿组之间差异有统计学意义($P<0.05$), 糖尿病微量蛋白尿组与健康对照组及糖尿病组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。采用 Spearman 相关分析发现, 血清 Fibulin-1 水平与血清 Cys C、FBG、TG、TC、LDL-C 均呈正相关(r 分别为 0.46、0.38、0.29、0.37、0.35, $P<0.05$)。结论 血清 Fibulin-1 水平与 DN 的发生及病情严重程度相关。检测血清 Fibulin-1 水平对 DN 的病情判断具有积极的临床意义。

关键词:糖尿病肾病; 血管外基质蛋白; Fibulin-1; 胱抑素 C

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.18.018

中图法分类号:R587.2;R446.6

文章编号:1673-4130(2018)18-2269-04

文献标识码:A

The expression and clinical significance of extracellular stromal protein
fibulin-1 in early diabetic nephropathy*

CHEN Zhi¹, WANG Qiru¹, WANG Xiaoying^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Xinghua People's Hospital, Taizhou, Jiangsu 225700, China; 2. Immunology Teaching and Research Office, School of Medicine, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of extracellular matrix protein Fibulin-1 in early diabetic nephropathy and its clinical significance. **Methods** A total of 90 cases of hospitalized patients in the hospital from February to June 2017 were divided into 30 cases of diabetic group (urine trace albumin content 0—30 mg/L), 30 cases of diabetes microalbuminuria group (>30—300 mg/L), 30 cases of diabetes albuminuria group (>300 mg/L), 30 healthy subjects were selected as the healthy control group. The serum levels of cystatin C (Cys C), fasting blood glucose (FBG), three acyl glycerol (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and serum Fibulin-1 expression in 4 groups were analyzed. **Results** There was a significant difference in the level of Cys C between the diabetes albuminuria group and the healthy control group and the diabetes group ($P<0.05$). The levels of Fibulin-1 in the diabetes albuminuria group were significantly different from those in the healthy control group, the diabetic group and the diabetic microalbuminuria group ($P<0.05$). There was significant difference between diabetic microalbuminuria group and healthy control group and diabetic group ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that serum Fibulin-1 level was positively correlated with serum Cys C, FBG, TG, TC and LDL-C ($r=0.46, 0.38, 0.29, 0.37, 0.35, P<0.05$, respectively). **Conclusion** Serum Fibulin-1 level is associated with the occurrence and severity of diabetic nephropathy. Detection of serum Fibulin-1 level has a positive clinical significance in the diagnosis of diabetic nephropathy.

Key words: diabetic nephropathy; extracellular matrix protein; Fibulin-1; cystatin C

* 基金项目:江苏大学医学临床科技发展基金(JLY20160163)。

作者简介:陈志,男,主管技师,主要从事免疫学研究。△ 通信作者, E-mail: wxy@ntu.edu.cn。

本文引用格式:陈志,王启茹,汪晓莺.血管外基质蛋白 Fibulin-1 在早期糖尿病肾病中的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2018,39

糖尿病肾病(DN)是导致终末期肾衰竭的重要原因,也是糖尿病的一种并发症,近年来发病率不断上升。多年来,国内外对 DN 已进行了大量研究。从本质上来说, DN 是一种因代谢异常而导致的微血管并发症,血管发生异常在 DN 的发生发展中起着重要作用^[1-4]。但由于其病因复杂,有关 DN 发病的分子机制依然不是很清楚,找寻 DN 新相关基因,研究其在 DN 发生发展过程中可能发挥的作用,对于认识 DN 分子机制,优化 DN 诊断防治方法均具有重要意义。血管外基质蛋白 Fibulin-1 属于分泌型糖蛋白 Fibulin 家族,主要参与细胞外基质的构成,该家族目前已知至少有 6 个基因型^[5-7]。Fibulin-1 蛋白已知与多种肿瘤如前列腺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌等的发生发展密切相关^[8]。Fibulin-1 与 DN 也有着密切的联系,但早期 DN 中 Fibulin-1 究竟起何种作用及其相关机制仍无研究进展,且国内作者未查询到类似研究。本研究旨在研究人类血清 Fibulin-1 与早期 DN 的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 2—6 月兴化市人民医院住院治疗的糖尿病患者 90 例作为研究对象,根据晨尿微量清蛋白将其分为糖尿病组(0~30 mg/L),糖尿病微量清蛋白尿组(>30~300 mg/L),糖尿病大量蛋白尿组(>300 mg/L),每组 30 例;另选同期在该院体检中心的体检健康者 30 例设为健康对照组,其体检结果均在正常范围且既往体检也均在正常范围;所有研究对象均排除严重肝肾功能损害、发热、感染等应激状态及妊娠糖尿病、1 型糖尿病。

1.2 仪器与试剂 酶标仪(Thermo MK3)移液器(Thermo)37 °C 恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司 GNP-9270) Fibulin-1 ELISA kit [CSB-EL008452HU]试剂盒以及用于 ELISA 的 96 孔板购自 CUSABIO 公司。

1.3 方法 测定所有研究对象空腹血糖(FBG)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)等常规指标,测定早期肾损伤标记物胱抑素 C(Cys C),所有检测对象早晨空腹静脉采血 5 mL,3 000 r/min 离心 10 min 后检测常规生化指标,继续 12 000 r/min 离心 10 min 后,取上层血清标本放置 -80 °C 冰箱保存。ELISA 法测定血清 Fibulin-1 水平。96 微孔板上设置标准孔和样本孔,每孔分别加入对照标准品或样本 100 μL,混匀,37 °C 孵育 2 h 后倾倒液体,吹干。每孔加入 100 μL 生物素标记的抗体,37 °C 孵育 2 h 后倾倒液体,吹干。每孔加入 200 μL 清洗液浸泡 3 min,弃去清洗液,吹干,重复 3 次。每孔加 100 μL HRP 标记亲和素,37 °C 孵育 1 h 后倾倒液体,吹干。每孔加入 200 μL 清洗液浸泡 3 min,弃去清洗液,吹干,重复 5 次。每孔依次加入 90 μL 底物,37 °C 避光显色 20 min。每孔依次加入 50 μL 终止液。在 450 nm 波长下,10 min 内用酶标仪测量各孔的吸光度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,Spearman 相关分析 Fibulin-1 与糖尿病各临床指标及 Cys C 的关系,多元线性逐步回归分析 Fibulin-1 水平的决定因素,进一步讨论其与糖尿病早期肾病的关系。Fibulin-1 与年龄、性别、Cys C、FBG、TG、TC、LDL-C、HDL-C 等指标分别进行 Spearman 相关分析和多元线性逐步回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料和生化结果比较 4 组人群年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),Cys C、Fibulin-1、FBG、TG、TC、LDL-C、HDL-C 与健康对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 一般资料和生化结果比较

项目	健康对照组 (n=30)	糖尿病组 (n=30)	糖尿病微量蛋白尿组 (n=30)	糖尿病大量蛋白尿组 (n=30)	P
性别(男/女,n/n)	60/40	60/40	60/40	50/50	1.000 0
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	51.20 ± 12.42	49.50 ± 13.24	48.20 ± 14.26	50.50 ± 11.84	0.820 0
Cys C(mg/L, $\bar{x} \pm s$)	0.64 ± 0.16	0.86 ± 0.29	1.05 ± 0.83	1.91 ± 1.02 ^{abc}	<0.000 1
Fibulin-1(mg/L, $\bar{x} \pm s$)	7.15 ± 3.12	8.78 ± 4.81	15.10 ± 9.56 ^{▲◆○}	22.93 ± 12.74 ^{* #△}	<0.000 1
FBG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	5.15 ± 0.38	10.05 ± 1.56 [○]	8.60 ± 1.53 [▲]	9.31 ± 1.62 ^a	<0.000 1
TG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.21 ± 0.38	2.79 ± 1.72 [○]	2.25 ± 1.33 [▲]	2.53 ± 1.42 ^{* #}	0.000 4
TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	4.12 ± 0.56	4.27 ± 0.62 [○]	5.13 ± 1.2 [▲]	5.36 ± 1.04 ^{* #△}	0.000 8
HDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.48 ± 0.35	1.04 ± 0.75	0.97 ± 0.98 [▲]	0.93 ± 1.25 ^{* #}	0.014 0
LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.56 ± 0.62	2.63 ± 0.73	2.86 ± 1.36 [▲]	2.95 ± 1.24 ^{* #}	0.025 0

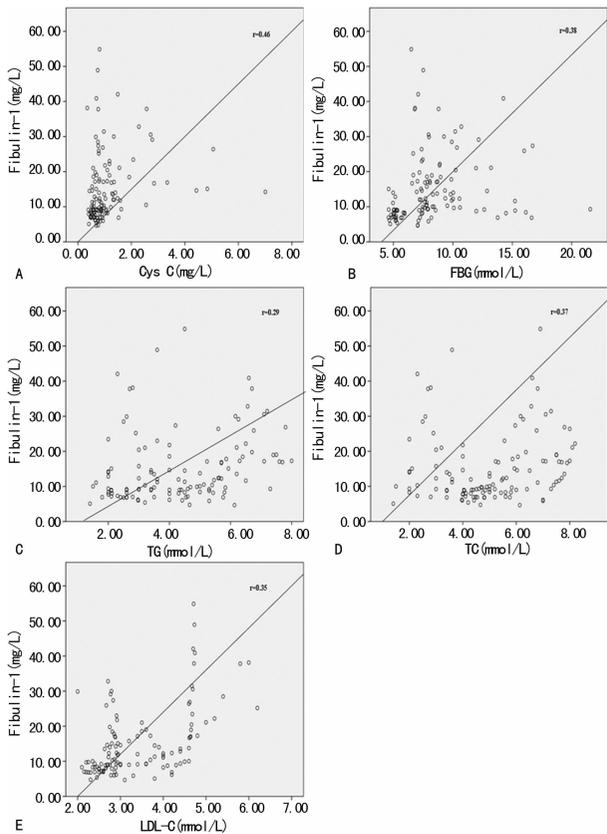
注:糖尿病大量蛋白尿组和健康对照组相比,* $P < 0.05$;糖尿病大量蛋白尿组和糖尿病组相比,# $P < 0.05$;糖尿病大量蛋白尿组和糖尿病微量蛋白尿组相比,△ $P < 0.05$;糖尿病微量蛋白尿组和健康对照组相比,▲ $P < 0.05$;糖尿病微量蛋白尿组和糖尿病组相比,◆ $P < 0.05$;糖尿病组和健康对照组相比,○ $P < 0.05$

2.2 Fibulin-1 与其他各项指标的相关性分析

Spearman 相关分析结果显示,血清 Fibulin-1 水平与 Cys C、FBG、TG、TC、LDL-C 均呈正相关(r 分别为 0.46、0.38、0.29、0.37、0.35, $P < 0.05$),见表 2。Fibulin-1 与其他各项指标的散点图分布见图 1。

表 2 Fibulin-1 与其他各项指标的相关性分析

项目	r	P
年龄(岁)	0.19	$< 0.000 1$
Cys C(mg/L)	0.46	$< 0.000 1$
FBG(mmol/L)	0.38	0.003 6
TG(mmol/L)	0.29	0.004 1
TC(mmol/L)	0.37	0.002 0
HDL-C(mmol/L)	-0.18	0.019 0
LDL-C(mmol/L)	0.35	0.018 0



注:A 表示 Cys C, B 表示 FBG, C 表示 TG, D 表示 TC, E 表示 LDL-C

图 1 Fibulin-1 与其他各项指标相关的散点图分布

3 讨 论

Fibulin-1 蛋白属于分泌型糖蛋白 Fibulin 家族,该家族目前已知至少有 6 个基因型,它们主要参与细胞外基质的构成,因此,也被认为是细胞外基质蛋白家族中的成员。Fibulin-1 基因位于人染色体 22 号 q13.3,包含 20 个外显子,基因编码的蛋白相对分子质量为 $(90 \sim 100) \times 10^3$ [9-10]。Fibulin-1 蛋白由多种细胞产生并分泌到细胞间质中,与多种蛋白质间存在相互作用,并参与细胞外基质的构成,特别是可以与层

粘连蛋白、细胞外基质中的纤维连接因子等通过桥接等方式来介导细胞信号转导,参与调控细胞形态、细胞的生长、黏附和迁移, Fibulin-1 蛋白已知与多种肿瘤如前列腺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌等肿瘤的发生、发展密切相关 [11-12]。

2011 年丹麦的 CANGEMI 等 [13] 发现糖尿病患者血清中 Fibulin-1 的水平明显高于非糖尿病患者,并且与糖尿病患者的糖化血红蛋白及血管硬化程度明显相关,进一步对 18 例糖尿病患者的乳房血管进行免疫组织化学研究,发现血管壁外层的 Fibulin-1 表达最高,推断出该因子和糖尿病动脉血管硬化及心血管事件的发生有密切关系,这是第一个关于 Fibulin-1 与糖尿病及血管并发症的研究。NEIMAN 等 [14] 随后发现 Fibulin-1 与肾损伤有关,并且预测血 Fibulin-1 水平有可能成为肾损伤程度的反应指标。之后, SCHOLZE 等 [15] 在对各种类型的慢性肾脏病患者血清 Fibulin-1 水平进行测定,发现其水平在 DN 明显高于其他类型的慢性肾脏病。

本研究表明,糖尿病大量蛋白尿组 Cys C 水平和健康对照组以及糖尿病组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。糖尿病大量蛋白尿组的 Fibulin-1 的水平与健康对照组、糖尿病组及糖尿病微量蛋白尿组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),糖尿病微量蛋白尿组与健康对照组及糖尿病组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。由此可见, Fibulin-1 水平和 Cys C 水平相比,在 DN 的进程中, Fibulin-1 指标更加敏感。采用 Spearman 相关分析发现,血清 Fibulin-1 水平与 Cys C、FBG、TG、TC、LDL-C 均呈正相关 (r 分别为 0.46、0.38、0.29、0.37、0.35, $P < 0.05$)。因此, Fibulin-1 水平可作为评价 DN 进程的一个重要指标,并且其灵敏度高于 Cys C 的水平。

4 结 论

血清 Fibulin-1 水平与 DN 的发生及病情严重程度相关。检测血清 Fibulin-1 水平对 DN 的病情判断具有积极的临床意义。同时,本研究仅对 90 例兴化市人民医院的研究对象入院时进行静态分析,结果可能存在一些偏差,此后还需进一步扩大样本量,并且增加长期动态观察随访。

参考文献

- [1] 林子桐,张超,沈雪梅. 糖尿病肾病发病机制研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(5): 765-773.
- [2] BHATTACHARJEE N, BARMA S, KONWAR N, et al. Mechanistic insight of diabetic nephropathy and its pharmacotherapeutic targets: an update [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791: 8-24.
- [3] CHEUNG C Y, MA M K M, CHAK W L, et al. Cancer risk in patients with diabetic nephropathy: a retrospective cohort study in Hong Kong [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(38): e8077.

- and viral infections in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Mod Rheumatol*, 2012, 22(5): 750-757.
- [4] VAN DER MEER W, PICKKERS P, SCOTT C S, et al. Hematological indices, inflammatory markers and neutrophil CD64 expression; comparative trends during experimental human endotoxemia [J]. *J Endotoxin Res*, 2007, 13(2): 94-100.
- [5] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1139-1265.
- [6] DU J, LI L, DOU Y, et al. Diagnostic utility of neutrophil CD64 as a marker for early-onset sepsis in preterm neonates [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102647.
- [7] HERRA C M, KEANE C T, WHELAN A. Increased expression of Fc gamma receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection [J]. *J Med Microbiol*, 1996, 44(2): 135-140.
- [8] SIMONIN-LE JEUNE K, LE JEUNE A, JOUNEAU S, et al. Impaired functions of macrophage from cystic fibrosis patients: CD11b, TLR-5 decrease and sCD14, inflammatory cytokines increase [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75667.
- [9] CHOO Y K, CHO H S, SEO I B, et al. Comparison of the accuracy of neutrophil CD64 and C-reactive protein as a single test for the early detection of neonatal sepsis [J]. *Korean J Pediatr*, 2012, 55(1): 11-17.
- [10] GROSELJ-GRENC M, IHAN A, PAVCNIK-ARNOL M, et al. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children [J]. *Intensive Care Med*, 2009, 35(11): 1950-1958.
- [11] 李月梅, 郝玲, 李艳芝. 中性粒细胞 CD64 在新生儿败血症诊断中的价值 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2006, 21(22): 1536-1537.
- [12] DANIKAS D D, KARAKANTZA M, THEODOROU G L, et al. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis; correlation to CD64 and CD14 antigen expression [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154(1): 87-97.
- [13] GILFILLAN M, BHANDARI V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: clinical practice guidelines [J]. *Early Hum Dev*, 2017, 105: 25-33.
- [14] AYDIN M, BARUT S, AKBULUT HH, et al. Application of Flow Cytometry in the Early Diagnosis of Neonatal Sepsis [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2017, 47(2): 184-190.
- [15] FANG D H, FAN C H, LI J, et al. Ratios of CD64 expressed on neutrophils, monocytes, and lymphocytes may be a novel method for diagnosis of neonatal sepsis [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2015, 9(2): 175-181.
- [16] 黄海辉, 张婴元, 黄绍光, 等. 上海地区社区获得性肺炎的病原学调查 [J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2003, 3(6): 321-324.
- [17] 庞保东, 董琰, 张慧玉, 等. 儿童社区获得性肺炎非典型病原体临床分析 [J]. *中国综合临床*, 2005, 26(9): 849-850.
- [18] PAUKSENS K, FJAERTOFT G, DOUHAN-HAKANSON L, et al. Neutrophil and monocyte receptor expression in uncomplicated and complicated influenza A infection with pneumonia [J]. *Scand J Infect Dis*, 2008, 40(4): 326-337.

(收稿日期: 2018-02-11 修回日期: 2018-04-28)

(上接第 2271 页)

- [4] Mise K, Yamaguchi Y, Hoshino J, et al. Paratubular basement membrane insudative lesions predict renal prognosis in patients with type 2 diabetes and biopsy-proven diabetic nephropathy [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0183190.
- [5] 张剑文, 刘炜, 傅斌生, 等. Fibulin-1 蛋白的真核表达与 ELISA 检测方法的建立 [J/CD]. *中华腔镜泌尿外科杂志 (电子版)*, 2013, 7(6): 56-59.
- [6] 杨欢, 付海龙, 毛佳慧, 等. 血清外体内 fibulin-1 检测在胃癌诊断中的应用 [J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(2): 107-109.
- [7] 王静, 赵亮. Fibulin-1 基因启动子区域甲基化与食管癌的关系研究 [J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(1): 133-136.
- [8] 董小英, 周贺, 张如意. 2 型糖尿病合并颈动脉病变患者血清 Fibulin-1 蛋白检测及与相关代谢指标的关系 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2017, 39(7): 764-767.
- [9] 周慧娟, 李怀芳. Fibulin-1 在女性压力性尿失禁患者盆底组织中的表达及意义 [J]. *同济大学学报 (医学版)*, 2012, 33(3): 42-46.
- [10] 王琪. Fibulin-1 在肾癌中的表达及相关功能的初步研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [11] 汤佳城. 血管生成素与 Fibulin 蛋白家族相互作用的验证与功能探索 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [12] 董会, 英晓霞. 舌鳞状细胞癌中 FBLN1 基因甲基化及肿瘤抑制作用研究 [J]. *慢性病学杂志*, 2014, 15(7): 501-504.
- [13] CANGEMI C, SKOV V, POULSEN M K, et al. Fibulin-1 is a marker for arterial extracellular matrix alterations in type 2 diabetes [J]. *Clin Chem*, 2011, 57(11): 1556-1565.
- [14] NEIMAN M, HEDBERG J J, DNNES P R, et al. Plasma profiling reveals human fibulin-1 as candidate marker for renal impairment [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(11): 4925-4934.
- [15] SCHOLZE A, BLADBJERG E M, SIDELMANN J J, et al. Plasma concentrations of extracellular matrix protein fibulin-1 are related to cardiovascular risk markers in chronic kidney disease and diabetes [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12(1): 6.

(收稿日期: 2018-01-14 修回日期: 2018-04-21)