

• 论 著 •

2 型糖尿病患者血浆中 PAI-1 及 sVCAM-1 水平与耳鸣的相关性研究^{*}

王 庆¹, 罗 茂²

(1. 乐山市市中区人民医院耳鼻喉科, 四川乐山 614000; 2. 西南医科大学药物研究中心, 四川泸州 646000)

摘 要:目的 探讨 2 型糖尿病(T2DM)患者血浆相关指标预测耳鸣发生情况的意义。方法 对 64 例 T2DM 并发耳鸣患者及 148 例单纯 T2DM 患者临床资料进行回顾性分析, 分别将其纳入观察组与对照组。比较两组患者血浆相关指标纤维酶原激活物抑制物-1(PAI-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1(sVCAM-1)、3-硝基酪氨酸(3-NT)、神经生长因子(NGF)水平, 以受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析上述指标单独或联合预测 T2DM 并发耳鸣的诊断效能, 借助 Pearson 相关系数模型, 探索观察组患者上述指标与耳鸣严重程度[耳鸣残疾度量表(THI)]的相关性。**结果** 观察组血浆 PAI-1、sVCAM-1、3-NT、NGF 水平均明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。血浆 PAI-1、sVCAM-1、3-NT、NGF 单独预测 T2DM 患者并发耳鸣 ROC 曲线下面积(AUC)均大于 0.5, Youden 指数对应 cut-off 值分别为 8.06 mmol/L、58.50 ng/mL、269.79 pg/mL、4.16 ng/mL; 4 个指标联合预测的 ROC 曲线 AUC 为 0.796, 均明显大于单独预测指标($P < 0.05$)。观察组患者血浆 PAI-1、sVCAM-1、3-NT、NGF 水平与 THI 评分均表现出显著正相关($r > 0, P < 0.05$)。**结论** 血浆 PAI-1、sVCAM-1 水平与 T2DM 患者并发耳鸣存在密切关系, 可通过联合 3-NT、NGF 等指标开展较为准确的早期预测诊断, 以期提高临床干预的目的性。

关键词: 2 型糖尿病; 纤维酶原激活物抑制物-1; 可溶性血管细胞黏附分子-1; 耳鸣; 相关性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.07.007

中图法分类号:R764.45

文章编号:1673-4130(2020)07-0795-04

文献标识码:A

Correlation between plasma PAI-1 and sVCAM-1 levels and tinnitus in patients with type 2 diabetes mellitus^{*}

WANG Qing¹, LUO Mao²

(1. Department of Otolaryngology, Leshan DOWNTOWN District People's Hospital, Leshan, Sichuan 614000, China; 2. Drug Discovery Research Center, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** To explore the significance of plasma-related indicators in predicting the occurrence of tinnitus of patients with type 2 diabetes mellitus(T2DM). **Methods** The clinical data of 64 patients with T2DM complicated with tinnitus and 148 patients with simple T2DM were retrospectively analyzed, and they were included in observation group and control group. Plasma-related indicators plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1), soluble vascular cell adhesion molecule-1(sVCAM-1), 3-nitrotyrosine(3-NT), nerve growth factor(NGF) were compared between the two groups, and the receiver operating characteristic curve(ROC curve) was used to analyze the diagnostic efficacy of single or combination of the above indexes in predicting T2DM complicated with tinnitus. Pearson correlation coefficient model was used to explore the correlation between above indicators and severity of tinnitus[tinnitus handicap inventory(THI)] in observation group. **Results** The levels of plasma PAI-1, sVCAM-1, 3-NT and NGF in observation group were significantly higher than those in control group, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The values of area under the ROC curve (AUC) of single plasma PAI-1, sVCAM-1, 3-NT and NGF in predicting patients with T2DM complicated with tinnitus were all more than 0.5, and the cut-off values of Youden index were 8.06 mmol/L, 58.50 ng/mL,

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81800434)。

作者简介: 王庆, 男, 主治医师, 主要从事耳科临床方面研究。

本文引用格式: 王庆, 罗茂. 2 型糖尿病患者血浆中 PAI-1 及 sVCAM-1 水平与耳鸣的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(7):

269.79 pg/mL and 4.16 ng/mL respectively. The AUC of ROC curve of the combined prediction of four indexes was 0.796, which was significantly greater than that of single prediction index ($P < 0.05$). The levels of plasma PAI-1, sVCAM-1, 3-NT and NGF were significantly positively correlated with THI score in observation group ($r > 0, P < 0.05$). **Conclusion** The levels of plasma PAI-1 and sVCAM-1 are closely related to tinnitus in T2DM patients. It is possible to carry out more accurate early prediction and diagnosis by combining 3-NT and NGF to improve the clinical intervention.

Key words: type 2 diabetes mellitus; plasminogen activator inhibitor-1; soluble vascular cell adhesion molecule-1; tinnitus; correlation

随着当代医学对 2 型糖尿病 (T2DM) 的深入研究, 人们认识到 T2DM 本身并不会对患者生命造成较大威胁, 而其引发的血管、肾脏、视网膜损害将严重影响患者生活质量^[1]。近年来, 听力损害作为 T2DM 的并发症, 正逐渐受到卫生领域重视, 相关调查显示, 糖尿病患者并发听力障碍风险为健康人群的 2 倍, 其特征常见双侧对称性、渐进性、不可逆性病变^[2], 且多以高频听力损害为主, 表现为耳鸣、耳聋等症状, 为患者日常生活带来诸多不便。由于 T2DM 患者主观感受、听觉感受并不能确切反映其实际的听力情况, 因而并发耳鸣症状在早期并不容易察觉, 即便通过纯音测听试验也不能做出有效诊断^[3]。然而全面的听力学检查项目较多, 且试验程序复杂, 对测试仪器与测试者经验要求较高, 早期筛查诊断仍较为困难。基于此, 本研究检测了 T2DM 产生的全身性病变相关标志物, 分析了这些标志物与并发耳鸣之间的潜在联系, 取得一定成果, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2017 年 4 月至 2019 年 3 月乐山市市中区人民医院收治的 64 例 T2DM 并发耳鸣患者 (观察组) 及 148 例单纯 T2DM 患者 (对照组) 临床资料进行回顾性分析。观察组男性 34 例, 女性 30 例; 年龄 60~88 岁, 平均 (76.33 ± 5.41) 岁; T2DM 病程为 7~20 年, 平均 (14.94 ± 3.26) 年; 空腹血糖 (FPG) 水平为 (9.47 ± 1.35) mmol/L, 糖化血红蛋白 (HbA1c) 水平为 $(8.82 \pm 0.73)\%$; 耳鸣残疾度量表 (THI) 评分为 (27.95 ± 6.89) 分。对照组男性 76 例, 女性 72 例; 年龄 48~81 岁, 平均 (65.12 ± 9.50) 岁; 病程为 3~18 年, 平均 (11.60 ± 4.18) 年; FPG 水平为 (8.60 ± 1.22) mmol/L, HbA1c 水平为 $(8.26 \pm 0.59)\%$ 。纳入标准: (1) 临床表现及口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 检测结果均符合 T2DM 相关诊断标准; (2) 年龄 40~90 岁; (3) 中耳及前庭功能正常。排除标准: (1) 诊断为外耳道栓塞、中耳炎、耳硬化症、内耳畸形、鼓膜穿孔、梅尼埃病等耳部疾病因素或病毒感染、噪声、爆震、外伤、中毒、颞颌关节疾病等直接因素引起的耳鸣; (2) 存在意识、精神障碍而无法对耳鸣状况进行如实描

述; (3) 临床资料不完整。

1.2 方法 患者空腹状态下常规采集肘静脉血 5 mL, 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 抗凝管保存, 30 min 内通过 3 000 r/min 转速离心机内处理 ≥ 20 min, 提取上清液保存于样品管, 在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存待测; 确保批量测试周期 ≤ 3 个月, 测试采用纤维酶原激活物抑制物-1 (PAI-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1 (sVCAM-1)、3-硝基酪氨酸 (3-NT)、神经生长因子 (NGF) 对应酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (购自伊莱瑞特生物科技有限公司), 测试前 24 h 将血浆样品转移至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱缓慢解冻, 测试前 30 min 将血浆样品与试剂盒转移至实验台上平衡至室温, 在此期间准备好稀释液、工作液、洗涤液、底物溶液、终止液等所需试剂, 取 96 孔板分别标记空白孔、样品孔及多个标准孔; 向空白孔、样品孔与首级标准孔中分别加入稀释液、血浆样品与标准品溶液, 逐级稀释标准品溶液并确保每孔液体体积均为 $100\text{ }\mu\text{L}$, 混匀后覆膜在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中温育 1 h; 倾去孔内液体后甩干, 加生物素化抗体工作液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 混匀后覆膜在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中温育 1 h; 倾去液体后每孔加入洗涤液 $350\text{ }\mu\text{L}$, 浸泡 2 min 后倾去, 重复洗涤 3 次后在吸水纸上尽量拍干, 每孔加酶结合物工作液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 混匀后覆膜在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中温育 30 min; 倾去液体后甩干, 以上述方法洗涤 5 次并拍干, 每孔加入底物溶液 $90\text{ }\mu\text{L}$, 混匀后覆膜、加盖避光在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中温育约 15 min, 终止时间以半数标准孔休闲肉眼可见显色即可, 以底物溶液相同顺序加入终止液 $50\text{ }\mu\text{L}$; 通过酶标仪在 450 nm 波长处测量每孔光密度 (A), 以空白孔数据校正背景, 将孔梯度浓度与 A 值绘制为标准曲线并拟合出回归方程, 计算对应样品孔血浆样品中对应物质的浓度水平。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS20.0 进行数据分析, 组别赋值 1 = “观察组”、0 = “对照组”, 计数资料以例数描述。计量资料则先通过方差齐性与正态性检验, 均已证实具备方差齐性且近似服从正态分布, 故以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 组间比较行独立样本 t 检验, 计量资料之间相关性分析采用 Pearson 相关系数分析模

型,选取双侧检验,受试者工作特征曲线(ROC 曲线)绘制,令状态变量值为 1,获取带对角参考线的图像并获取曲线下面积(AUC)、置信区间(95%CI)及坐标点,随后计算 Youden 指数=灵敏度+特异度-1,并获取其对应 cut-off 值。

2 结 果

2.1 两组各指标比较 观察组血浆 PAI-1、sVCAM-1、3-NT、NGF 水平均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组患者血浆 PAI-1、sVCAM-1、3-NT、NGF 水平比较($\bar{x}\pm s$)					
组别	<i>n</i>	PAI-1 (mmol/L)	sVCAM-1 (ng/mL)	3-NT (pg/mL)	NGF (ng/mL)
观察组	64	7.27±2.49	55.77±13.48	264.32±84.00	4.31±1.36
对照组	148	6.48±2.02	46.21±12.99	225.56±70.10	3.56±1.22
<i>t</i>		2.428	4.862	3.476	3.940
<i>P</i>		0.016	<0.001	0.001	<0.001

2.2 预测诊断效能分析 血浆 PAI-1、sVCAM-1、3-NT、NGF 单独预测 T2DM 患者并发耳鸣 ROC 曲线 AUC>0.5,Youden 指数对应 cut-off 值分别为 8.06 mmol/L、58.50 ng/mL、269.79 pg/mL、4.16 ng/mL;4 个指标联合预测的 ROC 曲线 AUC 为 0.796,均明显大于单独预测指标($P<0.05$)。见图 1、表 2。

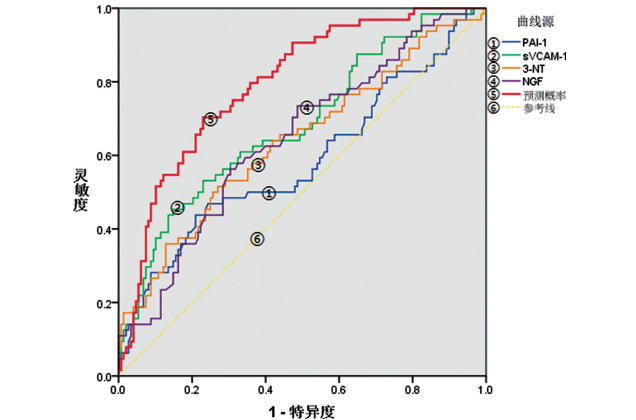


图 1 各指标单独及联合预测 T2DM 患者并发耳鸣的 ROC 曲线

表 2 ROC 曲线参数				
指标	AUC	95%CI	Youden 指数	cut-off 值
PAI-1	0.585 *	0.495~0.674	0.228	8.06 mmol/L
sVCAM-1	0.682 *	0.603~0.762	0.304	58.50 ng/mL
3-NT	0.639 *	0.555~0.723	0.245	269.79 pg/mL
NGF	0.645 *	0.565~0.725	0.258	4.16 ng/mL
联合预测	0.796	0.734~0.859	0.473	—

注:与联合预测比较,* $P<0.05$;—表示无数据。

2.3 相关性分析 观察组患者血浆 PAI-1、sVCAM-

1、3-NT、NGF 水平与 THI 评分均表现出显著正相关性($r>0,P<0.05$),见表 3。

表 3 各指标与观察组 THI 评分的 Pearson 相关性分析				
统计值	PAI-1	sVCAM-1	3-NT	NGF
<i>r</i>	0.376	0.496	0.437	0.464
<i>P</i>	0.011	0.006	0.011	<0.001

3 讨 论

PAI-1 属于纤溶系统的重要组成部分,其主要功能是通过抑制纤维酶原激活物(PA)活性,以调节整个纤溶系统平衡^[4]。T2DM 患者在血糖逐渐升高及糖耐量下降的同时,血管内皮细胞功能失调,PAI-1 过度释放,纤溶抑制可随之出现,引起血液高凝状态,能促进血栓形成,心、脑血管病变风险极大增加^[5],是独立于体质质量指数(BMI)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、糖尿病家族史等已知因素以外的危险因素。有关研究指出,血液流变学异常可增加微血管循环负担,不仅基底膜增厚,管状内皮细胞也将出现病理增生,与糖尿病视网膜病变机制相仿,可加重耳蜗毛细胞内脂肪沉积作用,形成典型的微循环障碍,进而导致听觉损害^[6]。本研究结果显示,观察组血浆 PAI-1 水平明显高于对照组,与 THI 评分有明显正相关性,ROC 曲线显示 PAI-1≥8.06 mmol/L 可高风险提示为耳鸣,这表明血浆 PAI-1 能一定程度预测 T2DM 并发耳鸣及其严重程度,临床检测可通过参考阈值进行早期筛查诊断。

sVCAM-1 是免疫球蛋白超家族成员之一,主要由活化的血管内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞及成纤维细胞表达,其配体为整合素家族的极迟抗原-4(VLA-4),二者结合能介导细胞间相互黏附作用^[7]。T2DM 导致的广泛炎症反应,将促使动脉粥样硬化病变进程加快,并触发血管内皮细胞受损,白细胞更易于向内皮下结构募集,刺激其过度表达 sVCAM-1^[8]。据相关研究报道,内耳血流供应主要依赖于小脑前下动脉分支,且由于其他代偿动脉较少,一旦血管发生病变导致内耳缺血,即便成功达成再灌注,也难以恢复耳蜗正常电位^[9]。本研究中,观察组血浆 sVCAM-1 水平明显高于对照组,与 THI 评分正相关性良好,sVCAM-1≥58.50 ng/mL 可提示存在较高耳鸣风险。

T2DM 由于存在葡萄糖自身氧化、蛋白质非酶促糖基化、多元醇通路过度激活等作用产生广泛的氧化应激,不仅可进一步损害胰岛 β 细胞,还将减少外周组织对胰岛素的敏感性^[10]。3-NT 作为蛋白质硝基化的主要产物,是 T2DM 患者体内一氧化氮被超氧阴离子氧化为过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)后造成蛋白质

氧化损伤的主要证据^[11]。有学者认为, ONOO⁻能对多种生物大分子产生过氧化与硝基化作用, 能导致 DNA 链断裂与多聚核苷酸二磷酸核糖基聚合酶 (PARP) 激活, 对神经病变与微血管病变均有较强促进作用^[12]。本研究发现, 观察组血浆 3-NT 水平明显高于对照组, 与 THI 评分有明显正相关性 ($r=0.473, P=0.011$), 其 cut-off 值为 269.79 pg/mL, 因此 T2DM 患者 3-NT 水平越高, 越容易并发更严重的耳鸣, 早期检测可一定程度反映患者微血管病变及神经病变的程度。

NGF 是最早发现的神经营养因子, 不仅能维持神经细胞生理活动, 还可促进新生血管形成等非神经组织生理活动。既往研究已证实随着糖尿病病程延长, 血管内皮细胞损害与非酶促糖基化反应加剧, NGF 表达与 HbA1c 生成量同时增高^[13]。针对糖尿病视网膜病变患者而言, 视网膜低氧状态可诱发视神经细胞过度表达 NGF 以产生代偿性保护作用, 由于能提高新生血管网增生效率, 将进一步损害视功能^[14]。赵振鹿等^[15]在研究中提出, T2DM 患者耳蜗小血管管壁增厚明显, 血管纹则有显著萎缩, 螺旋神经节细胞出现明显缺失, 神经纤维则明显减少, 第Ⅷ颅神经纤维束结构变得更为松散, 导致部分神经轴索分裂为碎片, 从而引起听力障碍。本研究也发现, 观察组血浆 NGF 水平明显高于对照组, 与 THI 评分正相关性良好, 其水平大于或等于 4.16 ng/mL 者更易于出现耳鸣, 且联合应用上述指标能提高对 T2DM 患者并发耳鸣的早期预测诊断效能, 可作为全面听力学功能测试前的迅速联合筛检项目应用于临床。

4 结 论

糖尿病并发耳鸣早期确诊相对困难, 有必要通过简便易行的检测方法提供诊断与评估信息。血浆 PAI-1、sVCAM-1、3-NT、NGF 水平作为生化指标, 均已证实与 T2DM 患者并发耳鸣严重程度存在确切正相关性。尽早通过实施联合检测, 可为临床干预提供指导, 具有较高预测价值。

参考文献

- [1] 张艾萍, 杨文. 2 型糖尿病及合并并发症患者主要生化指标分析[J]. 重庆医学, 2017, 46(21): 2943-2944.
- [2] 黄国威, 吕萍, 于宁. 糖尿病性听力损失的特点及发生机制[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2016, 24(6): 624-627.
- [3] 王铮, 田颖, 姜学钧. 客观听力学测试在纯音听阈正常双侧耳鸣患者中的应用价值[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(23): 1846-1849.
- [4] LIU Y, CHENG J, GUO X, et al. The roles of, PAI-1,

gene polymorphisms in atherosclerotic diseases: a systematic review and meta-analysis involving 149,908 subjects [J]. Gene, 2018, 673(10): 167-173.

- [5] WANG J, YUAN Y, CAI R, et al. Association between plasma levels of PAI-1, TPA/PAI-1 molar ratio, and mild cognitive impairment in chinese patients with type 2 diabetes mellitus [J]. J Alzheimers Dis, 2018, 63(2): 835-845.
- [6] AKINPELU O V, IBRAHIM F, WAISSBLUTH S, et al. Histopathologic changes in the cochlea associated with diabetes mellitus — a review [J]. Otol Neurotol, 2014, 35(5): 764-774.
- [7] 李颖, 黄伟. 糖尿病肾病患者血清细胞黏附分子、CD11b、CD62P、CD63 的表达及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(9): 1207-1209.
- [8] HOCAOGLU-EMRE F S, SARIBAL D, YENMIS G, et al. Vascular cell adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and cluster of differentiation 146 levels in patients with type 2 diabetes with complications [J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2017, 32(1): 99-105.
- [9] 原晶, 袁明霞, 杨宜林, 等. 2 型糖尿病患者听力损害特点及危险因素的分析[J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(1): 53-56.
- [10] REHMAN K, AKASH M S H. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked: Oxidative stress and diabetes mellitus [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(11): 3577-3585.
- [11] BALA C, RUSU A, CIOBANU D M, et al. The association study of high-sensitivity C-reactive protein, pentraxin 3, nitrotyrosine, and insulin dose in patients with insulin-treated type 2 diabetes mellitus [J]. Ther Clin Risk Manag, 2018, 14(5): 955-963.
- [12] ZAKARIA E M, EL-MARAGHY N N, AHMED A F, et al. PARP inhibition ameliorates nephropathy in an animal model of type 2 diabetes: focus on oxidative stress, inflammation, and fibrosis [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2017, 390(6): 621-631.
- [13] 高妍, 李立彬, 贾兴泽, 等. 糖尿病周围神经病变患者应用鼠神经生长因子联合胰岛素泵后血清 Cys-C 水平的变化 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 119-121.
- [14] 魏菁, 张明华. 血清 TGF-β1、CTGF 与增生性糖尿病视网膜病变的关系 [J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(7): 61-65.
- [15] 赵振鹿, 乔月华, 丛涛, 等. 耳蜗螺旋神经节细胞的损伤和再生 [J]. 中华耳科学杂志, 2016, 14(1): 43-48.