

• 论 著 •

糖尿病足患者外周血 TIM4 蛋白水平的变化及临床意义*

吴光秀,夏培金[△],孙建娟

(重庆市涪陵中心医院内分泌科,重庆 408000)

摘要:目的 探讨 TIM4 蛋白水平在糖尿病足患者外周血中的变化及临床意义。方法 以 2016 年 1 月至 2019 年 6 月于该院就诊的单纯糖尿病(对照组,160 例)和糖尿病合并糖尿病足(观察组,160 例)患者为研究对象。根据 Wagner 评分标准,将观察组患者按病情严重程度分为 0~1 级(50 例)、2~3 级(54 例)、4~5 级(56 例);依据是否合并感染分为糖尿病足感染组(65 例)和糖尿病足非感染组(95 例)。采用流式细胞仪检测各组外周血单核细胞 TIM4 蛋白阳性率;酶联免疫吸附试验法检测 TIM4 蛋白及降钙素原(PCT)水平,免疫散射法检测 C 反应蛋白(CRP)水平,分别比较各组外周血 TIM4 蛋白、PCT、CRP 的差异,受试者工作特征(ROC)曲线评价外周血 TIM4 蛋白对糖尿病足患者病情严重程度的预测价值。结果 与对照组比较,观察组外周血 TIM4 蛋白阳性率和 TIM4 蛋白水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.001$);不同 Wagner 分级组间外周血 TIM4 蛋白水平比较,差异有统计学意义($P < 0.001$)。其中 4~5 级患者外周血 TIM4 蛋白水平最高,2~3 级次之,0~1 级最低。糖尿病足感染组外周血 TIM4 蛋白、PCT 及 CRP 水平明显高于糖尿病足非感染组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。糖尿病足患者外周血 TIM4 蛋白水平与 Wagner 分级、PCT 及 CRP 水平呈显著正相关($r = 0.784, P = < 0.001; r = 0.601, P = 0.005; r = 0.568, P = 0.008$)。ROC 曲线分析显示,外周血 TIM4 蛋白的曲线下面积为 0.875(95%CI 为 0.814~0.936),其最佳工作点为 2.70 ng/mL,此时预测糖尿病足患者病情严重程度的灵敏度和特异度分别为 77.97%和 87.04%,均明显优于 PCT 和 CRP。结论 外周血 TIM4 蛋白水平与糖尿病足患者的发生、发展密切相关,对于糖尿病足患者病情严重程度的预测具有一定的应用价值。

关键词: TIM4 蛋白; 糖尿病足; 降钙素原; C 反应蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.22.013

中图法分类号: R446.1

文章编号: 1673-4130(2020)22-2740-04

文献标识码: A

The changes and clinical value of TIM4 protein in peripheral blood of patients with diabetic foot*

WU Guangxiu, XIA Peijin[△], SUN Jianjuan

(Department of Endocrinology, Fuling Central Hospital of Chongqing City, Chongqing 408000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the change and clinical value of TIM4 protein in peripheral blood in diabetic foot. **Methods** The patients with diabetes mellitus (control group, 160 cases) and diabetes mellitus with diabetic foot (observation group, 160 cases) were enrolled in Fuling Central Hospital of Chongqing City from January 2016 to June 2019. According to the Wagner score, the patients in observation group were divided into 0—1 grade (50 cases), 2—3 grade (54 cases), 4—5 grade (56 cases). According to whether complicated with infection, patients in observation group were divided into diabetic foot with infection group (65 cases) and diabetic foot without infection group (95 cases). The positive rate of TIM4 in peripheral blood was detected by flow cytometry. The levels of TIM4 and procalcitonin (PCT) in peripheral blood were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The level of C-reactive protein (CRP) was detected by immunoturbidimetry. The differences of TIM4, PCT and CRP level in peripheral blood of different groups were compared. The predictive value of TIM4 in peripheral blood for the severity of diabetic foot was evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Compared with those in control group, the positive rate and level of TIM4 protein in peripheral blood of patients in observation group significantly increased, with statistically significant difference ($P < 0.001$). TIM4 protein levels of peripheral blood in different Wagner classification

* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会中医药科技项目(ZY201802139);重庆市涪陵区科技计划项目(FLKJ2014ABB2108)。

作者简介:吴光秀,女,副主任医师,主要从事糖尿病相关并发症的临床诊治研究。 [△] 通信作者, E-mail: lhcq2006@126.com。

本文引用格式:吴光秀,夏培金,孙建娟.糖尿病足患者外周血 TIM4 蛋白水平的变化及临床意义[J].国际检验医学杂志,2020,41(22):

groups showed statistically significant differences ($P < 0.001$). Among them, the level of TIM4 in 4–5 grade group was the highest, followed by the 2–3 grade group, and which in the 0–1 grade group was the lowest. The levels of TIM4 protein, PCT and CRP in peripheral blood in diabetic foot with infection group were significantly higher than those in diabetic foot without infection group ($P < 0.001$). There were significant positive correlations between TIM4 protein level in peripheral blood and Wagner grade, PCT, CRP level in diabetic foot patients ($r = 0.784, P < 0.001, r = 0.601, P = 0.005, r = 0.568, P = 0.008$). The ROC curve analysis showed that the area under curve of the TIM4 level was 0.875 (95% CI: 0.814–0.936), and optimal operating point was 2.70 ng/mL, the sensitivity and specificity in predicting the severity of diabetic foot were 77.97% and 87.04%, which were significantly better than PCT and CRP. **Conclusion** The level of TIM4 in peripheral blood closely relates to the occurrence and development of patients with diabetic foot, and there is certain application value for predicting the severity of diabetic foot.

Key words: TIM4 protein; diabetic foot; procalcitonin; C-reactive protein

糖尿病足是临床常见的糖尿病并发症,是糖尿病患者致残及死亡的重要原因之一^[1]。明确糖尿病足发病机制,对病情进行准确评估与治疗是提高该病治疗效果的关键。近年来,已有研究表明,糖尿病足的发病与自身免疫功能紊乱、炎性反应的激活密切相关,其中 Th 细胞异常分化在糖尿病足的发生、发展过程中扮演了重要角色^[2]。TIM4 蛋白作为一个免疫调节因子,参与了机体 Th 细胞分化及功能的调节,与糖尿病、过敏性哮喘等疾病的发生、发展关系密切^[3-4]。已有研究证实,糖尿病患者体内 TIM4 蛋白水平明显升高,并且随着病情的进展而变化,在糖尿病的临床诊断及预后评估中发挥重要作用^[5]。然而, TIM4 蛋白水平与糖尿病足的关系如何目前尚未阐明。本研究通过观察糖尿病足患者外周血 TIM4 蛋白水平变化,评估其与疾病发生、发展的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2019 年 6 月于本院内分泌科就诊的糖尿病合并糖尿病足患者 160 例作为观察组,其中男 82 例,女 78 例;年龄 41~82 岁,中位年龄 58 岁。所有患者均符合糖尿病和糖尿病足诊断与治疗标准^[6]。排除标准:合并恶性肿瘤;非糖尿病引起的足部相关溃疡;合并其他部位感染;存在其他自身免疫性疾病和免疫缺陷;存在严重肝、肾功能不全。选取同期 160 例未合并糖尿病足的单纯 2 型糖尿病患者为对照组,其中男 80 例,女 80 例,年龄 39~81 岁,中位年龄 57 岁。依据 Wagner 分级法^[7],将糖尿病足患者按病情严重程度进行分级,分别为 0~1 级(50 例)、2~3 级(54 例)、4~5 级(56 例);依据是否合并感染,分为糖尿病足感染组(65 例)和糖尿病足非感染组(95 例)。观察组与对照组、观察组各亚组间在性别构成比、年龄等方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。所有研究对象自愿参与本研究,并签署知情同意书,本研究获得本院医学伦理委员会的批准后进行。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司,多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司。细胞裂解液购自美国 GE 公司, TIM4 蛋白、CD14 单克隆抗体购自美国 Invitrogen 公司;降钙素原(PCT)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 外周血单核细胞 TIM4 蛋白阳性率检测 抽取所有研究对象外周血标本 3 mL,经肝素抗凝后,提取单核细胞,振荡混匀后加入 CD14 单克隆抗体 10 μ L,室温避光孵育 30 min 后,加入 1 mL 破膜液,静置离心后($1\ 000 \times g, 5\ min$, 室温),吸去上清液,加入 TIM4 蛋白单克隆抗体 5 μ L,振荡混匀后,采用流式细胞仪进行检测,记录 TIM4 蛋白阳性率。

1.4 外周血 TIM4 蛋白及相关炎症因子水平的检测 抽取各组外周血标本 4 mL,离心后收集上清液,采用 ELISA 法检测 TIM4 蛋白水平,具体操作参照试剂盒说明书。炎症因子 PCT 和 C 反应蛋白(CRP)水平的检测分别采用 ELISA 法和免疫散射比浊法。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理与统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间中的两两比较采用 SNK- q 检验。采用 Spearman 相关法分析外周血 TIM4 蛋白水平与 Wagner 分级的相关性,采用 Pearson 相关法分析 TIM4 蛋白水平与 PCT 及 CRP 的相关性。采用 Graphpad 软件进行受试者工作特征(ROC)曲线分析,计算外周血 TIM4 蛋白水平的 ROC 曲线下面积(AUC)、最佳工作点(OOP)、灵敏度、特异度,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与观察组外周血 TIM4 蛋白比较 与对照组比较,观察组外周血 TIM4 蛋白阳性率、水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。

2.2 不同 Wagner 分级患者外周血 TIM4 蛋白及相

关炎症因子水平比较 不同 Wagner 分级患者外周血 TIM4 蛋白水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。其中 4~5 级患者外周血 TIM4 蛋白水平最高,2~3 级次之,0~1 级最低。4~5 级患者外周血 PCT 和 CRP 水平明显高于 2~3 级和 0~1 级患者,而 2~3 级与 0~1 级患者比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 1 对照组与观察组外周血 TIM4 蛋白比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	TIM4 蛋白阳性率(%)	TIM4 蛋白水平(ng/mL)
对照组	160	3.5±1.4	0.6±0.3
观察组	160	9.2±1.0	2.7±0.7
<i>t</i>		41.910	30.182
<i>P</i>		<0.001	<0.001

表 2 不同 Wagner 分级患者外周血 TIM4 蛋白及相关炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$)				
Wagner 分级	<i>n</i>	TIM4 蛋白(ng/mL)	PCT(ng/mL)	CRP(mg/L)
0~1 级	50	1.9±0.6	0.28±0.11	15.0±3.2
2~3 级	54	2.7±0.5*	0.33±0.15	16.1±4.1
4~5 级	56	3.3±0.7*#	1.21±0.20*#	34.1±4.0*#
<i>F</i>		70.440	587.200	432.700
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注:与 0~1 级患者比较,* $P<0.05$;与 2~3 级患者比较,# $P<0.05$ 。

2.3 糖尿病足感染组与糖尿病足非感染组间 TIM4 蛋白及相关炎症因子水平比较 糖尿病足感染组外周血 TIM4 蛋白、PCT 及 CRP 水平明显高于糖尿病足非感染组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3 糖尿病足感染组与糖尿病足非感染组外周血 TIM4 蛋白及相关炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	TIM4 蛋白(ng/mL)	PCT(ng/mL)	CRP(mg/L)
糖尿病足非感染组	95	2.4±0.5	0.30±0.18	16.4±4.5
糖尿病足感染组	65	3.0±0.4	0.88±0.31	27.2±6.0
<i>t</i>		8.070	14.940	13.000
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 相关分析 观察组患者外周血 TIM4 蛋白水平与 Wagner 分级、PCT 及 CRP 水平呈显著正相关($r=0.784,P<0.001;r=0.601,P=0.005;r=0.568,P=0.008$)。

2.5 ROC 曲线分析 外周血 TIM4 蛋白水平预测糖尿病足患者病情严重程度的 ROC 曲线结果显示,外周血 TIM4 蛋白水平的 AUC 为 0.875(95%CI:

0.814~0.936),其 OOP 为 2.70 ng/mL,提示按此 OOP 对糖尿病足患者病情严重程度进行预测,其灵敏度和特异度分别为 77.97%和 87.04%,均明显优于 PCT 和 CRP,见图 1 及表 4。

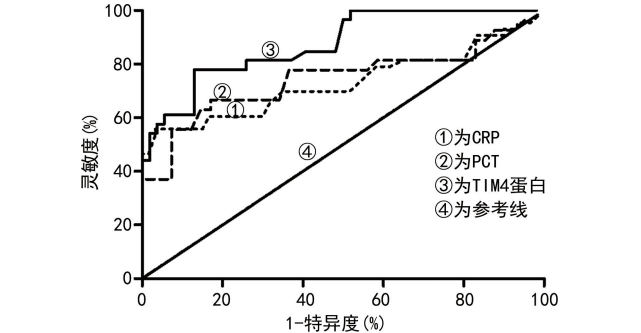


图 1 各指标预测糖尿病足患者病情严重程度的 ROC 曲线

表 4 各指标预测糖尿病足患者病情严重程度的性能					
指标	AUC(95%CI)	<i>P</i> *	OOP	灵敏度(%)	特异度(%)
TIM4 蛋白	0.875(0.814~0.936)	0.009	2.70 ng/mL	77.97	87.04
PCT	0.745 (0.610~0.880)	0.012	0.62 ng/mL	66.67	80.49
CRP	0.730(0.620~0.840)	0.016	23.84 mg/L	69.77	65.00

注:*与 AUC=0.5 比较。

3 讨论

随着人口老龄化进程的加快,糖尿病及其并发症的发生率正呈现逐年升高趋势^[8]。有研究显示,约 50%医院截肢手术与糖尿病有关,同时,有 25%的糖尿病患者会出现足部病变^[9]。早期评估糖尿病足病情严重程度,并针对靶点进行干预,对于降低患者致残率,提高患者生活质量具有重要的临床意义。目前,对于糖尿病足病情严重程度,临床常采用 Wagner 分级法进行评估,但该方法往往存在一定的滞后性,无法进行预测^[10]。传统的炎症反应指标,如 CRP、PCT 等,对于糖尿病足病情严重程度的评估有一定的参考价值,但特异度偏低^[11-12]。因此,寻找特异性指标准确预测糖尿病足患者病情严重程度是临床研究的重点。

已有研究表明,糖尿病是一种慢性炎症性疾病,机体免疫功能异常是其重要原因^[13]。在糖尿病患者及动物模型中,均可发现炎症反应指标如白细胞介素(IL)-1 β 、NLRP3 炎症小体、CRP 等升高,并且其水平与患者血糖控制情况密切相关^[14-15]。TIM4 蛋白作为磷脂酰丝氨酸受体,通过促进巨噬细胞活化、迁移,以及促进 Th 细胞分化,达到调节机体免疫功能的作用^[16]。在器官缺血再灌注损伤、过敏性哮喘及糖尿病等疾病中,机体 TIM4 蛋白水平可明显升高,参与疾病的发生、发展过程^[3,17-18]。外周血 TIM4 蛋白是否参与了糖尿病足的发病,同时与病情严重程度相关性如何,目前尚不清楚。本研究结果显示,与对照组比

较,观察组外周血 TIM4 蛋白阳性率和 TIM4 蛋白水平明显升高,表明糖尿病足的发生可能与 TIM4 蛋白水平增加关系密切。进一步根据糖尿病足患者病情严重程度进行分组,其结果显示,糖尿病足患者外周血 TIM4 蛋白水平随着病情严重程度的增加而明显升高。在糖尿病患者及动物模型中,单核细胞分泌的 IL-1 β 明显上调,可进一步促进下游炎症反应和氧化应激通路的激活,诱导胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞的凋亡,而 TIM4 蛋白是诱导上述单核细胞活化的重要因子^[19]。另外有研究显示,TIM4 蛋白可通过负反馈机制抑制单核巨噬细胞的进一步活化,参与调节免疫内环境的稳定^[20]。本研究进一步绘制 ROC 曲线,分析外周血 TIM4 蛋白对糖尿病足患者病情严重程度的预测价值,其结果显示,AUC 较大,预测价值较高。

4 结 论

外周血 TIM4 蛋白可能与糖尿病足患者的发病及病情严重程度密切相关,但有关 TIM4 蛋白在其中的免疫调节机制还有待进一步研究。检测外周血 TIM4 蛋白可能成为糖尿病足诊断及病情严重程度评估的有效指标。

参考文献

- [1] KHAN A, JUNAID N. Prevalence of diabetic foot syndrome amongst population with type 2 diabetes in Pakistan in primary care settings[J]. J Pak Med Assoc, 2017, 67(12):1818-1824.
- [2] 刘涛,戴黎明,李晓晶,等.糖尿病足患者外周血 T 细胞的分化[J]. 中国老年学杂志,2017,37(23):5839-5841.
- [3] VERGANI A, GATTI F, LEE K M, et al. TIM4 regulates the anti-islet Th2 alloimmune response[J]. Cell Transplant, 2015, 24(8):1599-1614.
- [4] 赵静,车治萍,金晶,等.外周血 TIM4 和 sIgE 联合检测预测儿童过敏性哮喘病情严重程度的价值研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(14):1740-1743.
- [5] 孙辉,孙洪珍,张耀辉,等.2 型糖尿病人外周血 TIM4 蛋白水平增高且与 IL-1 β 负相关[J]. 免疫学杂志,2017,33(7):619-622.
- [6] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(十三)——糖尿病足的诊治[J]. 中国社区医师,2012,28(7):7.
- [7] HUANG Y, XIE T, CAO Y, et al. Comparison of two classification systems in predicting the outcome of diabetic foot ulcers: the Wagner grade and the Saint Elian Wound score systems[J]. Wound Repair Regen, 2015, 23(3):379-385.
- [8] CARDENAS V, SEO K, SHETH S, et al. Prevalence of lower-extremity arterial calcification in patients with diabetes mellitus complicated by foot disease at an urban US

- Tertiary-Care Center[J]. J Am Podiatr Med Assoc, 2018, 108(4):267-271.
- [9] MAIYA A G, GUNDMI S, MATPADY P, et al. Prevalence of foot complications in people with type 2 diabetes mellitus: a community-based survey in rural udupi[J]. Int J Low Extrem Wounds, 2018, 17(3):169-175.
- [10] JEON B J, CHOI H J, KANG J S, et al. Comparison of five systems of classification of diabetic foot ulcers and predictive factors for amputation[J]. Int Wound J, 2017, 14(3):537-545.
- [11] 徐波,杨彩哲,李小红,等.糖尿病足严重程度评估指标的相关性分析[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(27):120-123.
- [12] 徐升强,陈峻,詹燊,等.降钙素原、超敏 C-反应蛋白和纤维蛋白原在糖尿病足感染患者中的变化[J]. 血栓与止血学,2018,24(1):23-25.
- [13] 郑绍同,付启云,杨士军,等.糖尿病患者炎症及免疫学指标水平与其肾脏病变的相关性研究[J]. 检验医学与临床,2018,15(1):44-46.
- [14] DOODY N E, DOWEJKO M M, AKAM E C, et al. The role of TLR4, TNF- α and IL-1 β in type 2 diabetes mellitus development within a North Indian population[J]. Ann Hum Genet, 2017, 81(4):141-146.
- [15] DAI J, ZHANG X, LI L, et al. Autophagy inhibition contributes to ROS-Producing NLRP3-dependent inflammasome activation and cytokine secretion in high glucose-induced macrophages[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(1):247-256.
- [16] YANG B, LI L J, XU L Z, et al. Histone acetyltransferase p300 modulates TIM4 expression in dendritic cells[J]. Sci Rep, 2016, 6:21336.
- [17] ZHANG Y, SHEN Q, LIU Y, et al. Hepatic ischemic preconditioning alleviates ischemia-reperfusion injury by decreasing TIM4 expression[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(10):1186-1195.
- [18] WAKUI H, FUSEYA S, SUZUKI R, et al. Incomplete clearance of apoptotic cells by core 1-derived O-glycan-deficient resident peritoneal macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(2):2017-2023.
- [19] LIU H, YIN J J, CAO M M, et al. Endoplasmic reticulum stress induced by lipopolysaccharide is involved in the association between inflammation and autophagy in INS-1 cells[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5):5787-5792.
- [20] HU T, FAN X, MA L, et al. TIM4-TIM1 interaction modulates Th2 pattern inflammation through enhancing SIRT1 expression[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(5):1504-1510.

(收稿日期:2019-12-07 修回日期:2020-06-18)