

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.10.011

2 型糖尿病肾病患者尿足细胞标志蛋白和血管内皮生长因子水平与氧化应激的相关性*

董闪闪¹, 张洁¹, 刘璠¹, 秘玉静², 李欣盼¹, 周慧敏¹
(河北医科大学第一医院:1. 内分泌科;2. 检验科, 石家庄 050031)

[摘要] **目的** 探讨 2 型糖尿病(T2DM)并发不同程度肾病患者尿足细胞标志蛋白(PCX)和血管内皮生长因子(VEGF)水平变化,及其与氧化应激的关系。**方法** 186 例 T2DM 患者按照 24 h 尿清蛋白排泄率(UAER)分为单纯 T2DM 组(SDM 组,62 例)、微量组(NA 组,60 例)、大量组(MA 组,64 例),另取 24 h UAER 正常者作对照(NC 组,60 例)。分别检测 PCX、VEGF、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)和丙二醛(MDA)水平。**结果** 与其他 3 组比较,MA 组 VEGF、PCX 及 MDA 水平最高($P<0.01$),SOD 和 GSH-px 水平最低($P<0.01$, $P<0.05$)。VEGF、UAER、HbA1c 是尿 PCX 的独立危险因素。**结论** 糖尿病肾病患者尿 PCX 及血 VEGF 与氧化应激相关,氧化应激与足细胞的损伤密切相关。

[关键词] 糖尿病肾病;尿足细胞标志蛋白;血管内皮生长因子;氧化性应激

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)10-1334-03

Association of urinary podocalyxin and vascular endothelial growth factor levels with oxidative stress in patients with type 2 diabetes nephropathy*

Dong Shanshan¹, Zhang Jie¹, Liu Fan¹, Mi Yujing², Li Xinpan¹, Zhou Huimin¹
(1. Department of Endocrinology; 2. Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the change of urinary podocalyxin (PCX) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels and its association with the oxidative stress in the patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) complicating different degrees of diabetic nephropathy. **Methods** Totally 186 patients with T2DM were divided into the pure T2DM (SDM, 62 cases), trace amount group (NA group, 60 cases) and massive amount group (MA group, 64 cases) according to the 24 h urinary albumin excretion rate (UAER). 60 cases of normal 24 h UAER were taken as the control group (NC group). The levels of PCX, VEGF, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-px) were determined. **Results** Compared with other three groups, the level of VEGF, PCX and MDA in the MA group were highest ($P<0.01$), while the levels of SOD and GSH-px were lowest ($P<0.01$, $P<0.05$). VEGF, UAER, HbA1c were the independent risk factors for urinary PCX. **Conclusion** In patients with diabetic nephropathy, urinary PCX and VEGF are correlated with the oxidative stress, while the oxidative stress is closely correlated with glomerular podocyte injury.

[Key words] diabetic nephropathy; podocytes; vascular endothelial growth factor; oxidative stress

糖尿病肾病(DN)是糖尿病的主要微血管并发症,目前已成为引起终末期肾病的主要原因。而其具体发病机制目前尚未明确。足细胞附着于肾小球基底膜外侧,参与构成肾小球滤过膜的最后一道屏障。足细胞的损伤和脱落与蛋白尿的发生密切相关,是肾小球硬化形成和发展的关键因素^[1-2]。最近人体活组织检查研究表明,DN 发病过程中足细胞功能及结构上的损伤早期已出现^[3]。足细胞标志蛋白(PCX)及血管内皮生长因子(VEGF)主要表达于足细胞,是足细胞损伤的主要标志物。肾脏对氧化损伤敏感,多项研究证实氧化应激在 DN 的发病中起着重要作用。DN 发生时活性氧(ROS)产生增加,ROS 可介导足细胞的凋亡,同时诱导 PCX 的脱落,促进 VEGF 的过度表达,是引起足细胞损伤的主要原因。体内主要的氧化应激标志物丙二醛(MDA)作为脂质过氧化产物,反映了细胞氧化损伤程度。抗氧化应激物质的减少是引起足细胞损伤的另一主要原因,超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)是体内的最重要的抗氧化酶^[4]。本研究旨在探讨

DN 患者尿 PCX 及血 VEGF 与氧化应激的相关性,并为 DN 患者足细胞损伤的机制提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 3 月至 2014 年 5 月本院 2 型糖尿病(T2DM)患者 186 例(T2DM 组),均符合 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准。根据 24 h 尿清蛋白排泄率(UAER)分为单纯糖尿病组(UAER $<20\text{ }\mu\text{g/min}$,SDM 组)62 例、微量组($20\text{ }\mu\text{g/min}\leq\text{UAER}<200\text{ }\mu\text{g/min}$,NA 组)60 例、大量组(UAER $\geq 200\text{ }\mu\text{g/min}$,MA 组)64 例,另选取 60 例健康体检者为对照组(NC 组)。纳入标准:(1)所有研究对象均符合人体试验伦理学标准,并取得伦理委员会的批准及签署知情同意书;(2)研究对象均排除糖尿病急性并发症、泌尿系感染、其他肾脏疾病、高血压、严重心脑血管肺疾病、严重肝病、精神心理疾病及其他内分泌等疾病;(3)1 年未服用过抗氧化应激药物;(4)无手术、外伤等应激情况。各组患者年龄、性别、BMI、收缩压(SBP)和舒张压(DBP)比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

* 基金项目:河北省卫生厅重点科技研究计划(20130260)。 作者简介:董闪闪(1982—),主治医师,硕士,主要从事糖尿病及糖尿病并发症研究。

表 1 各组临床一般资料比较(̄x±s)

组别	n	男/女 (n)	年龄 (岁)	BMI (kg/m ²)	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)
NC 组	60	32/28	51.9±8.7	23.5±4.3	117.77±14.83	74.67±8.79
SDM 组	62	30/32	53.0±8.3	24.1±2.3	119.25±9.64	76.69±7.13
NA 组	60	29/31	52.9±9.7	25.1±2.5	120.17±11.88	75.03±5.58
MA 组	64	34/30	55.7±9.1	25.3±2.6	121.66±11.14	75.28±7.25
F/χ ²		0.445	1.021	2.320	0.576	0.460
P		0.732	0.386	0.079	0.632	0.711

1.2 方法 测量身高、体质量、血压,计算 BMI。空腹 10 h 抽静脉血,采用美国贝克曼 DXC800 进行全血生化测定,采用 Vantage(德国,拜耳)测定糖化血红蛋白(HbA1c)。采用 ELISA 法测定血 VEGF(晶美生物工程有限公司)。采用比色法测定 SOD、GSH-px 和 MDA(南京建成生物工程研究所)。留取晨尿 10 mL 采用 ELISA 法测定 PCX(上海越研生物科技有限公司),同日留取 24 h 尿检测 UAER。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料以 ̄x±s 表示,4 组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,相关分析采用 Pearson 相关及多元逐步回归分析法。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组糖代谢指标的比较 与 NC 组比较,T2DM 组患者空腹血糖(FPG)及 HbA1c 高于 NC 组,差异有统计学意义(P<0.05)。T2DM 3 组间比较,NA 组及 MA 组 FPG 及 HbA1c 高于 SDM 组,差异有统计学意义(P<0.05),见表 2。

表 2 各组糖代谢指标比较(̄x±s)

组别	HbA1c(%)	FPG(mmol/L)
NC 组	4.99±0.47	5.02±0.42
SDM 组	7.50±0.83 ^a	7.69±1.05 ^a
NA 组	8.78±1.59 ^{ab}	8.80±1.93 ^{ab}
MA 组	9.07±1.37 ^{ab}	9.37±1.89 ^{ab}
F/χ ²	79.225	53.004
P	0.000	0.000

^a:P<0.01,与 NC 组比较;^b:P<0.01,与 SDM 组比较。

2.2 各组 VEGF、PCX 及 UAER 比较 与 NC 组比较,T2DM 组患者 VEGF、PCX 及 UAER 高于 NC 组,差异有统计学意义(P<0.05)。T2DM 3 组患者 VEGF、PCX 及 UAER 为 SDM 组<NA 组<MA 组,差异有统计学意义(P<0.05),见表 3。

2.3 各组氧化应激指标的比较 与 NC 组比较,T2DM 组患者 MDA 高于 NC 组,T2DM 组患者 GSH-px 及 SOD 低于 NC 组,差异有统计学意义(P<0.05)。T2DM 3 组患者 MDA 水平为 SDM 组<NA 组<MA 组,GSH-px 及 SOD 水平为 SDM 组>NA 组>MA 组,差异有统计学意义(P<0.05),见表 4。

2.4 Pearson 相关分析 尿 PCX 与 UAER、MDA、VEGF、FPG、HbA1c 呈正相关(r=0.823,0.823,0.870,0.639,0.700),与 SOD、GSH-px 呈负相关(r=-0.739,-0.474,均 P<0.05);血 VEGF 与 PCX、UAER、MDA、FPG、HbA1c 呈正相关(r=0.870,0.794,0.877,0.672,0.707),与 SOD、GSH-px 呈负相关(r=-0.771,-0.514,均 P<0.05)。

2.5 多元逐步回归分析 以 PCX 为因变量,UAER、SOD、GSH-px、MDA、VEGF、FPG、HbA1c、病程、BMI、SBP、DBP、血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)为自变量进行多元逐步回归分析,回归方程为 Y=-10.56+0.032(VEGF)+0.029(UAER)+1.043(HbA1c),P<0.01,说明 VEGF、UAER、HbA1c 是尿 PCX 的独立危险因素。

表 3 各组 VEGF、PCX 及 UAER 比较(̄x±s)

组别	VEGF(ng/L)	PCX(μg/L)	UAER(μg/min)
NC 组	247.35±55.71	3.14±1.14	12.73±1.89
SDM 组	352.57±34.24 ^a	7.12±2.23 ^a	14.47±2.33
NA 组	459.07±35.71 ^{ab}	16.63±3.55 ^{ab}	82.86±42.39 ^{ab}
MA 组	551.41±38.59 ^{abc}	26.05±4.87 ^{abc}	314.06±59.35 ^{abc}
F/χ ²	306.831	305.496	477.760
P	0.000	0.000	0.000

^a:P<0.01,与 NC 组比较;^b:P<0.01,与 SDM 组比较;^c:P<0.01,与 NA 组比较。

表 4 各组氧化应激指标的比较(̄x±s)

组别	GSH-px(ku/L)	MDA(nmol/L)	SOD(ku/L)
NC 组	125.48±10.11	2.43±0.76	98.90±9.70
SDM 组	119.09±7.15 ^a	4.83±1.01 ^a	84.88±7.55 ^a
NA 组	114.05±8.54 ^{ab}	6.66±0.75 ^{ac}	78.46±6.45 ^{ac}
MA 组	108.76±10.58 ^{acd}	8.26±1.10 ^{ace}	70.58±6.68 ^{ace}
F/χ ²	18.633	228.507	79.108
P	0.000	0.000	0.000

^a:P<0.01,与 NC 组比较;^b:P<0.05,^c:P<0.01,与 SDM 组比较;^d:P<0.05,^e:P<0.01,与 NA 组比较。

3 讨 论

肾小球的脏层上皮细胞又称为足细胞,是一种终末分化的多突状细胞,分化成熟后一般不能再生,是肾小球滤过膜的重要构成部分^[5]。PCX 是一种唾液酸黏蛋白分子,正常表达于足细胞,固定于足细胞顶膜构成肾小球分子屏障,同时因其带负电荷,故又参与构成肾小球的电荷屏障^[6]。Hara 等^[7]、Ye 等^[8]多项研究表明 PCX 是 T2DM 患者足细胞损伤的早期标志物,ELISA 法可准确检测尿中 PCX 的水平,本研究表明 T2DM 组尿 PCX 明显高于 NC 组,FPG 与尿 PCX 呈正相关,HbA1c 是 PCX 独立危险因素,说明高血糖可导致足细胞的损伤,进一步研究表明 UAER 是 PCX 独立危险因素,尿 PCX 排泄增多可反映出足细胞的损伤呈进行性加重,提示 PCX 与足细胞损伤程度相平行。随着尿 PCX 逐渐升高,UAER 亦逐渐升高,证实尿 PCX 的水平可反应肾脏损伤的严重程度。

VEGF 即血管通透因子,具有增加血管通透性作用。足细胞是表达 VEGF 最丰富的细胞,生理情况下足细胞分泌的 VEGF 通过自分泌方式调节自身钙离子平衡,降低细胞毒性,提高足细胞存活率,同时对维持肾小球基底膜的完整性及正常功能起着重要作用,而肾小球发生病理改变时足细胞表达 VEGF 也相应发生变化。本研究发现 VEGF 与 FPG、HbA1c 呈正相关,说明高血糖可通过蛋白激酶 C(PKC)、细胞外信号调节激酶(ERK)介导的 PKC-ERK 机制促进足细胞 VEGF mRNA 及蛋白的表达^[9]引起 VEGF 分泌增多,过高分泌的 VEGF 可引起足细胞Ⅳ型胶原分泌增多,从而引起基底膜结构

发生改变,形成更大的孔,使大分子蛋白更易通过,同时还可引起足细胞的损伤和凋亡,在蛋白尿的发生发展中起着重要的作用^[10]。本研究验证了上述观点,血 VEGF 与 UAER、PCX 呈显著正相关,随血 VEGF 分泌增多,UAER、PCX 随之升高,MA 组 VEGF、PCX 显著高于其他组。

最近研究证实^[4],氧化应激反应增强在 DN 发生发展中发挥了重要的作用。ROS 产生过多和/或抗氧化系统活性降低可导致体内氧化应激水平增加,本研究表明 T2DM 组代表氧化损伤水平的 MDA 显著高于 NC 组,代表抗氧化水平的 SOD、GSH-px 显著低于 NC 组,且随着 UAER 的升高,氧化-抗氧化系统的失衡逐渐加重,MA 组 MDA 最高,SOD、GSH-px 最低证实了上述观点。DN 发生时高血糖通过多元醇途径、晚期糖基化终末产物(AGEs)途径、PKC 途径和氨基己糖途径导致 ROS 产生增多^[4],进一步激活 p38MAPK 途径引起足细胞凋亡,同时通过 ERK1/2 的磷酸化导致足突形态发生改变^[11],引起 PCX 的脱落。本研究表明 PCX 与 MDA 呈正相关,与 SOD、GSH-px 呈负相关,且随着氧化应激反应的加重,尿 PCX 排泄增多,MA 组 PCX 最高,这与 Lin 等^[12]研究一致,抗氧化剂 α -硫辛酸通过减轻氧化应激可使尿 PCX 排泄减少。同时 Susztak 等^[13]研究表明 ROS 介导足细胞的凋亡,ROS 可直接攻击足细胞,并激活足细胞还原型尼克酰胺腺嘌呤核苷酸磷酸氧化酶产生过多的 ROS,从而形成恶性循环。ROS 产生增多可启动高迁移率蛋白 1,激活 c-jun 氨基末端激酶诱导 VEGF 的表达^[14],研究发现 VEGF 与 MDA 呈正相关,与 SOD、GSH-px 负相关,SDM 组中足细胞分泌的 VEGF 已显著增加,随着 UAER 升高,氧化应激反应进行性加重,VEGF 水平相应升高,Thallas-Bonke 等^[15]研究表明氧化应激的减轻可使 VEGF 分泌减少。此外 VEGF 与足细胞损伤密切相关^[16],VEGF 可介导单核吞噬细胞的趋化或活化,进而产生大量毒性的促生长物质,如蛋白水解酶、血小板活化因子及生长因子等从而引起足细胞损伤。本研究发现 VEGF 是尿 PCX 的独立危险因素,说明过高分泌的 VEGF 一方面可直接引起 PCX 的丢失,从而引起肾小球分子屏障及电荷屏障受损,另一方面可引起肾小球毛细血管通透性加大,促使大分子蛋白滤过,这些可能是蛋白尿形成的主要原因。

氧化应激反应的增强可以直接引起 PCX 的丢失,同时促使足细胞分泌过多的 VEGF,进而引起足细胞的损伤和凋亡,这可能是 DN 进行性恶化的主要原因,所以,尽早改善高血糖及氧化应激,可延缓 DN 的发生,并为治疗 DN 开辟了新的途径。

参考文献

- [1] Matsui K, Kamijo-Ikemori A, Hara M, et al. Clinical significance of tubular and podocyte biomarkers in acute kidney injury[J]. Clin Exp Nephrol, 2011, 15(2): 220-225.
- [2] Merscher S, Fornoni A. Podocyte pathology and nephropathy-sphingolipids in glomerular diseases[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014, 5(5): 127.
- [3] Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. Cell biology of diabetic nephropathy: Roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes[J]. J Diabetes Investig, 2015, 6(1): 3-15.

- [4] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications-A unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [5] Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus[J]. J Pathol, 2003, 200(4): 537-546.
- [6] Nielsen JS, McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(8): 1669-1676.
- [7] Hara M, Yamagata K, Tomino Y, et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin[J]. Diabetologia, 2012, 55(11): 2913-2919.
- [8] Ye H, Bai X, Gao H, et al. Urinary podocalyxin positive-element occurs in the early stage of diabetic nephropathy and is correlated with a clinical diagnosis of diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Complications, 2013, 28(1): 96-100.
- [9] Hoshi S, Nomoto K, Kuromitsu J, et al. High glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(1): 177-184.
- [10] Chen S, Kasama Y, Lee JS, et al. Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3(IV) collagen production by transforming growth factor-beta1 in mouse podocytes[J]. Diabetes, 2004, 53(11): 2939-2949.
- [11] Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(9): 2690-2701.
- [12] Lin H, Ye S, Xu J, et al. The alpha-lipoic acid decreases urinary podocalyxin excretion in type 2 diabetics by inhibiting oxidative stress in vivo[J]. J Diabetes Complications, 2014, 29(1): 64-67.
- [13] Susztak K, Raff AC, Schiffer M, et al. Glucose-induced reactive Oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2006, 55(1): 225-233.
- [14] Lee JJ, Hsiao CC, Yang IH, et al. High-mobility group box 1 protein is implicated in advanced glycation end products-induced vascular endothelial growth factor A production in the rat retinal ganglion cell line RGC-5[J]. Mol Vis, 2012, 18: 838-850.
- [15] Thallas-Bonke V, Jha JC, Gray SP, et al. Nox-4 deletion reduces oxidative stress and injury by PKC- α -associated mechanisms in diabetic nephropathy[J]. Physiol Rep, 2014, 2(11): e12192.
- [16] Brosius FC, Podocytes CR, Pathways S. And vascular factors in diabetic kidney disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2014, 21(3): 304-310.