

血清 Ang/Tie2、VEGF 在糖尿病肾病病情评估中的应用价值

霍亚杰¹, 温玉洁², 刘陶文², 夏含笑²

摘要 目的 观察血清中血管生成素-1 (Ang-1)、血管生成素-2 (Ang-2) 及其受体 Tie2 与血管内皮生长因子 (VEGF) 在糖尿病肾病 (DN) 病情进展中的水平变化规律, 探讨平衡其比率在 DN 中的重要性。方法 选取 2 型糖尿病患者 60 例, 依据尿白蛋白排泄率 (UAER) 分为 3 组: 正常白蛋白尿患者 20 例 (DM1 组)、微量白蛋白尿患者 22 例 (DM2 组)、大量白蛋白尿患者 18 例 (DM3 组), 另设健康对照患者 22 例 (NC 组)。采用 ELISA 法检测受试者血清 Ang-1、Ang-2、Tie2、VEGF 水平, 同时检测相关生化指标。结果 ① DM1 组血清 VEGF、Ang-2 水平高于 NC 组, DM2 组、DM3 组进一步升高, 4 组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。② DM1 组血清 Ang-1 水平高于 NC 组, DM2 组、DM3 组逐渐下降, 4 组间差异无统计学意义。③ Tie2 水平差异无统计学意义。④ UAER 与 Ang-2、VEGF 呈正相关性 ($r = 0.470, 0.404, P < 0.01$), 与 Ang-1 呈负相关性 ($r = -0.310, P < 0.05$); Ang-2 与 VEGF、Tie2 呈正相关性 ($r = 0.450, 0.725, P < 0.01$); Ang-1 与 Tie2 呈正相关性 ($r = 0.571, P < 0.01$), 与 Ang-2、VEGF 呈负相关性 ($r = -0.497, -0.396, P < 0.01, P < 0.05$)。⑤ 以 UAER 为应变量行多元线性逐步回归分析显示: Ang-1、Ang-2、VEGF、肌酐进入回归方程, 是影响 UAER 的独立相关因子。结论 血清中 Ang-1、Ang-2、Tie2、VEGF 水平与 DN 密切相关, 可能参与了 DN 的发生发展, 并影响 DN 病情的进程。检测血清 Ang/Tie2 及 VEGF 可作为评估 DN 病情的重要指标。

关键词 糖尿病肾病; 血管生成素; 血管内皮生长因子; Tie2; 尿白蛋白排泄率

中图分类号 R 587.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)04-0508-04

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是导致终末期肾病的一个首要原因, 累积发病率为 25% ~ 40%^[1], 由于糖尿病患病率增加及生存期的延长, DN 人数逐年上升。随着病情进展, 患者最终要靠血液透析或肾移植来维持生命。目前临床上常采用尿白蛋白排泄率 (urinary albumin excretion rate,

UAER) 来诊断评估 DN, 通过控制血糖、血压, 改善血脂及肾脏血流动力学延缓 DN 的进程。事实上在微量白蛋白尿出现之前 DN 就存在血流动力学异常和代谢紊乱, 故需寻找一种新的、特异的 DN 早期诊断标志物, 以便进行早期干预治疗。研究^[2]表明, 血清中血管生成素-1 (angiopoietin-1, Ang-1)、血管生成素-2 (angiopoietin-2, Ang-2) 及其受体 Tie2、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在 DN 进展中调节血管新生方面起重要作用, 但联合检测 4 者及评估其在防治 DN 中的潜在作用尚无明确报道。该研究通过测定血清中 Ang-1、Ang-2、Tie2 及 VEGF 在 DN 患者不同阶段的水平变化规律, 探讨平衡的比率对 DN 病情评估的重要性, 从而为早期 DN 的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2013 年 8 月 ~ 2014 年 3 月在广西壮族自治区南溪山医院住院的 2 型糖尿病患者 60 例和来我院体检中心体检的健康成年者 22 例。受试者均符合 2010 年 ADA 糖尿病诊断标准, 年龄 33 ~ 79 (56.94 ± 11.14) 岁, 病程 1 ~ 15 年。根据 UAER 分为 3 组: 正常白蛋白尿患者 20 例作为 DM1 组: UAER $< 20 \mu\text{g}/\text{min}$, 男 11 例, 女 9 例, 年龄 39 ~ 73 (54.35 ± 8.85) 岁; 微量白蛋白尿患者 22 例作为 DM2 组: UAER 为 20 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{min}$, 男 12 例, 女 10 例, 年龄 44 ~ 79 (62.45 ± 9.54) 岁; 大量白蛋白尿患者 18 例作为 DM3 组: UAER $> 200 \mu\text{g}/\text{min}$, 男 10 例, 女 8 例, 年龄 38 ~ 78 (63.00 ± 12.06) 岁; 健康对照者 22 例作为 NC 组: 男 11 例, 女 11 例, 年龄 33 ~ 62 (57.80 ± 7.31) 岁。受试者排除标准: 1 型糖尿病, 高血糖高渗状态, 乳酸性酸中毒, 高血压, 心、肝、肾功能不全者, 感染性疾病, 恶性肿瘤, 自身免疫性疾病, 极度衰弱者及近期使用影响肾功能的药物等。实验得到伦理委员会的批准, 所有受试者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血清收集 受试者均隔夜禁食 8 ~ 12 h, 于清晨空腹采取肘静脉血约 5 ml, 离心 ($2\ 000 \text{ r}/\text{min}$, 10 min) 后分离血清, 取 1 ml 血清至 1.5 ml EP 管中,

2014-12-13 接收

基金项目: 广西自然科学基金资助项目 (编号: 2011GXNSFA018238)

作者单位: ¹ 桂林医学院研究生学院, 桂林 541001

² 广西壮族自治区南溪山医院内分泌科, 桂林 541002

作者简介: 霍亚杰, 女, 硕士研究生;

温玉洁, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wenyujie888@qq.com

置于 -70 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 相关指标检测 血清中 Ang-1、Ang-2、Tie2 及 VEGF 水平均采用 ELISA 法测定(试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司)。按说明书操作,测吸光度,根据标准曲线计算血清中 Ang-1、Ang-2、Tie2 及 VEGF 浓度。空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、肌酐(creatinine, Cr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)均采用自动血生化分析仪检测。糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1C)采用离子交换高效液相色谱法测定,24 h 尿微量白蛋白定量采用比浊法测定。体重指数(body mass index, BMI) = 体重/身高²。UAER = 24 h 尿微量白蛋白浓度 × 24 h 尿量/(24 × 60)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析,两变量间关系采用 Pearson 直线相关分析,影响 UAER 的多因素分析采用多元线性逐步回归分析。

2 结果

2.1 DM1 组、DM2 组、DM3 组及 NC 组观察指标比较 所有观察指标经正态检验,符合正态分布。4 组受试者 BMI、HbA1C、TC、TG、HDL-C、LDL-C、Tie2 水平比较,差异均无统计学意义。4 组受试者 BUN、Cr、血清尿酸(serum uric acid, sUA)、UAER、Ang-2、

VEGF 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其中,DM1 组血清 VEGF、Ang-2、UAER 的水平高于 NC 组,DM2 组、DM3 组进一步升高,4 组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。DM1 组血清 Ang-1 水平高于 NC 组($P < 0.05$),DM2 组、DM3 组逐渐下降,差异无统计学意义。Tie2 受体水平差异无统计学意义。见表 1。

2.2 各指标间的相关性分析 UAER 与 Cr、sUA、Ang-2、VEGF 呈正相关性($r = 0.587、0.361、0.470、0.404, P < 0.01$),与 BUN 呈正相关性,但相关性较弱($r = 0.280, P < 0.05$),与 Ang-1 呈负相关性($r = -0.310, P < 0.05$)。Ang-2 与 Cr、VEGF、Tie2 呈正相关性($r = 0.478、0.450、0.725, P < 0.01$)。Ang-1 与 Tie2 呈正相关性($r = 0.571, P < 0.01$),与 Ang-2、VEGF 呈负相关性($r = -0.497、-0.396, P < 0.01, P < 0.05$)。

2.3 UAER 与相关指标的多元线性逐步回归分析 为排除外混杂因素影响,以 UAER 为应变量,BMI、BUN、Cr、HbA1C、TC、TG、HDL-C、LDL-C、Ang-1、Ang-2、Tie2、VEGF 为自变量,行多元线性逐步回归分析显示 Cr、Ang-1、Ang-2、VEGF 进入回归方程,是影响 UAER 的独立相关因子。见表 2。

3 讨论

DN 作为糖尿病微血管并发症之一,突出特点为血管通透性和血管生成增加,Ang-1、Ang-2、Tie2 及 VEGF 在 DN 的血管新生和重塑方面发挥重要作用^[3-4]。

在 DN 中,VEGF 随着蛋白尿的程度及血管内皮

表 1 各组观察指标比较($\bar{x} \pm s$)

项目	NC 组($n = 22$)	DM1 组($n = 20$)	DM2 组($n = 22$)	DM3 组($n = 18$)	F 值	P 值
BMI(kg/m ²)	24.65 ± 2.80	24.25 ± 3.40	24.57 ± 2.98	23.70 ± 2.32	1.198	0.316
BUN(mmL/L)	4.87 ± 1.24	5.38 ± 1.71*	6.36 ± 2.00* [△]	8.68 ± 4.30* ^{△#}	8.230	<0.001
Cr(μmol/L)	69.74 ± 18.06	73.00 ± 19.06*	77.73 ± 20.11* [△]	137.28 ± 69.12* ^{△#}	13.880	<0.001
sUA(μmol/L)	308.45 ± 89.83	300.35 ± 64.62*	310.55 ± 77.86* [△]	388.05 ± 88.05* ^{△#}	4.831	0.004
HbA1C(%)	4.36 ± 1.78	9.16 ± 2.79	9.98 ± 2.04	8.98 ± 1.86	1.150	0.324
UAER(μg/min)	—	8.88 ± 5.54*	98.37 ± 48.28* [△]	517.22 ± 313.47* ^{△#}	62.020	<0.001
TC(mmol/L)	5.17 ± 1.06	5.12 ± 1.18	5.00 ± 0.87	5.37 ± 0.98	0.463	0.709
TG(mmol/L)	1.89 ± 1.07	2.40 ± 0.92	2.47 ± 2.25	3.02 ± 1.34	2.007	0.120
HDL-C(mmol/L)	1.43 ± 0.52	1.18 ± 0.32	1.28 ± 0.32	1.11 ± 0.216	3.160	0.130
LDL-C(mmol/L)	3.44 ± 0.86	3.39 ± 0.80	3.20 ± 0.70	3.57 ± 0.88	0.758	0.521
Ang-1(ng/L)	16.88 ± 14.74	22.90 ± 16.76*	20.46 ± 15.21	10.56 ± 5.65	2.640	0.060
Ang-2(ng/L)	2.03 ± 1.56	2.77 ± 2.17*	2.99 ± 1.80* [△]	3.35 ± 2.60* ^{△#}	1.245	<0.001
Tie2(ng/L)	1.49 ± 0.89	1.59 ± 1.13	6.92 ± 1.08	2.04 ± 0.85	2.830	0.094
VEGF(ng/L)	31.08 ± 24.32	66.36 ± 31.22*	73.56 ± 53.71* [△]	89.08 ± 69.67* ^{△#}	7.066	0.020

与 NC 组比较:* $P < 0.05$; 与 DM1 组比较:[△] $P < 0.05$; 与 DM2 组比较:[#] $P < 0.05$

表2 UAER水平与相关指标的多元线性逐步回归分析

UAER	偏回归系数	偏回归系数的95%置信区间	回归系数标准误	标准化偏回归系数	t值	P值
Cr	-0.649	-1.280 ~ -0.234	0.180	-0.424	3.611	<0.001
VEGF	0.452	0.249 ~ 0.962	0.120	0.280	3.757	0.001
Ang-1	19.013	12.432 ~ 21.424	5.467	0.256	3.478	0.002
Ang-2	7.840	4.580 ~ 9.490	11.350	1.230	2.370	0.001

功能的失常而增加^[1]。Cha et al^[5]研究显示 VEGF 在 DN 早期上调,可作为疾病初期病情进展的标志,后期 VEGF 表达下降。本研究对不同阶段 DN 患者血清中 VEGF 水平进行比较,表明 VEGF 随蛋白尿程度增加而升高;其中 DM1 组高于 NC 组,DM3 组虽有下降趋势,但仍高于 DM2 和 DM1 组,与相关文献^[4,6]报道一致。这种随 DN 进展逐渐增高的趋势,可能与糖代谢紊乱所致血管内皮损伤后机体自我修复相关^[7]。提示局部 VEGF 水平升高或降低均可导致蛋白尿的产生。既往有研究^[8]显示 DN 患者血清中 VEGF 及 Ang-2 水平与 HbA1c 相关,随 UAER 增加而升高,本研究表明 HbA1c 在 DM3 组中是降低的,可能与患者长期使用控制血糖药物有关。相关分析显示 DN 患者 UAER 与 VEGF 呈显著正相关性,多元线性逐步回归分析显示 VEGF 升高与 UAER 变化一致,为影响 DN 的独立危险因素之一。提示血清中 VEGF 可能成为 DN 的预测因素和潜在危险因子。

Ang-1、Ang-2 参与了 DN 血管生成和重塑过程, Tie-2 为其共同受体^[9]。研究^[10]表明 Ang-1 在第 4、8 周糖尿病大鼠肾组织中表达显著上调,从第 12 周开始下降,第 24 周显著下降,表明 Ang-1 水平在高血糖情况下有所消耗。Rizkalla et al^[11]发现在糖尿病大鼠早期阶段,Ang-1、Tie2 水平上调,随病情进展,表达逐渐下调。本研究表明 DM1 组血清 Ang-1、Tie2 水平高于 NC 组,DM2 组、DM3 组逐渐下降,且 UAER 与血清 Ang-1 呈负相关性,多元线性逐步回归分析显示 Ang-1 与 DN 病情进展相关。研究^[12]表明 Ang-1 可减少蛋白尿,降低肾小球系膜的扩张、基底膜厚度,抑制炎症因子在肾脏中的表达。推测 Ang-1 具有保护 DN 微血管内皮细胞,延缓和逆转 DN 微血管病变作用。

研究^[13]显示在早期肾小球疾病中 Ang-2 水平增加。Kümpers et al^[14]在肾血管内皮损伤的患者中发现 Ang-2 水平比健康者高 6 倍,在病情有所缓解的情况下 Ang-2 水平差异无统计学意义,推测 Ang-2 可能来源于损伤的肾血管内皮。本研究结果示

DM1 组血清 Ang-2 的水平高于 NC 组,DM2 组、DM3 组进一步升高,随着蛋白尿程度增加而升高;UAER 与 Ang-2 呈显著正相关性,多元线性逐步回归分析显示 Ang-2 升高与 Tie2、UAER 变化一致,为影响 DN 的独立危险因素之一;与研究^[15]结果一致。Ang-2 参与了 DN 的形成发展,可作为 DN 早期诊断的一项重要指标,持续表达预示着肾脏病变存在进行性发展的潜在危险^[16]。

本研究表明血清中 Ang-1、Ang-2、Tie2 与 VEGF 4 者相互作用,共同参与了 DN 的发生发展。多元线性回归分析表明血清中 VEGF、Ang-2 和 Ang-1 与 UAER 密切相关,是 DN 病情进展的独立相关因子,可在一定程度上反应 DN 的严重程度,影响 DN 的进程。DM3 组血清 Ang-1、Tie2 水平下降,而 Ang-2、VEGF 水平升高,提示 Ang/Tie2、VEGF 比值在 DN 患者中表达失衡。相关研究^[13]表明上调 VEGF 与 Ang-2 可增加血管通透性,促不稳定血管出芽,Ang-1 可拮抗此现象使血管成熟、维持血管内皮结构稳定。推测降低 DN 患者 Ang-2 与 VEGF 水平,将减少不良血管生成,使血管渗透脆性降低,提升 Ang-1 促使血管成熟稳定,由此平衡血清 Ang/Tie2、VEGF 的表达水平,使其在 DN 中发挥最大程度的保护肾脏作用。

综上所述,血清 Ang/Tie2、VEGF 在 DN 发病机制及病情评估中发挥重要作用,平衡它们之间的关系,可作为未来的治疗方法。

参考文献

- [1] New J P, Middleton R J, Klebe B, et al. Assessing the prevalence, monitoring and management of chronic kidney disease in patients with diabetes compared with those without diabetes in general practice [J]. Diabet Med, 2007, 24(4): 364-9.
- [2] Martynov S A, Shestakova M V, Kutyrina I M, et al. Role of circulating angiogenic factors in diabetic kidney disease [J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2013(2): 35-42.
- [3] You Q Y, Zhuge F Y, Zhu Q Q, et al. Effects of laser photocoagulation on serum angiotensinogen-converting enzyme, angiotensinogen, angiotensin II, angiotensinogen-converting enzyme 2, angiotensinogen-converting enzyme 2 ratio, and soluble angiotensinogen receptor Tie-2 levels in type 2 diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. Int J Ophthalmol, 2014, 7(4): 648-53.
- [4] 张丰姣,康志强,王继萍,等. 糖尿病肾病患者血清血管内皮生长因子和血管生成素-2 的测定及临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(5): 1260-1.
- [5] Cha D R, Kim N H, Yoon J W, et al. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy [J]. Kidney Int Suppl, 2000, 58(77): S104-12.
- [6] 许永志,陈彬,刘惠娜,等. 血清 CysC、PEDF、VEGF 检测在糖

- 尿病肾病诊断及治疗中的意义 [J]. 临床检验医学杂志, 2014, 35(2): 148–51.
- [7] Tammali R, Reddy A B, Srivastava S K, et al. Inhibition of aldose reductase prevents angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [J]. Angiogenesis, 2011, 14(2): 209–21.
- [8] 杨亦彬, 陈泽君, 柳飞, 等. Angiopoietin-1 在糖尿病鼠肾脏中的表达及意义 [J]. 四川大学学报(医学版), 2007, 38(1): 93–6.
- [9] Rizkalla B, Forbes J M, Cao Z, et al. Temporal renal expression of angiogenic growth factors and their receptors in experimental diabetes: role of the renin-angiotensin system [J]. J Hypertens, 2005, 23(1): 153–64.
- [10] Lee S, Kim W, Moon S O, et al. Renoprotective effect of COMP-angiopoietin-1 in db/db mice with type 2 diabetes [J]. Nephrol Dial Transplant, 2007, 22(2): 396–408.
- [11] David S, John S G, Jefferies H J, et al. Angiopoietin-2 levels predict mortality in CKD patients [J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27(5): 1867–72.
- [12] Kumpers P, Hellpap J, David S, et al. Circulating angiopoietin-2 is a marker and potential mediator of endothelial cell detachment in ANCA-associated vasculitis with renal involvement [J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(6): 1845–50.
- [13] Lee S G, Kim J L, Lee H K, et al. Simvastatin suppresses expression of angiogenic factors in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2011, 249(3): 389–97.

Application value of serum Ang/Tie2, VEGF in the assessment of diabetic nephropathy

Huo Yajie¹, Wen Yujie², Liu Taowen², et al

(¹Graduate College, Guilin Medical University, Guilin 541001; ²Dept of Endocrinology, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002)

Abstract Objective To observe the regular levels change of serum angiopoietin-1 (Ang-1), angiopoietin-2 (Ang-2) and receptor Tie2 as well as vascular endothelia growth factor (VEGF) in the progerSSION of diabetic nephropathy (DN), and investigate the importance of ratio of balance among them in DN. **Methods** Sixty Chinese patients with type 2 diabetes were enrolled. According to their UAER diabetic patients were divided into three groups randomly: 20 patients with normoalbuminuric diabetic (DM1 group), 22 with microalbuminuric diabetic (DM2 group) and 18 proteinuric diabetic (DM3 group). A total of 22 health controls were selected (NC group). Serum Ang-1, Ang-2, Tie2, VEGF levels were detected by ELISA. At the same time, related biochemical indicators were tested. **Results** ① The level of serum Ang-2, VEGF increased in DM1 compared with NC, and serum Ang-2, VEGF levels in DM2 and DM3 were much higher. There was statistical difference among four groups ($P < 0.05$). ② The level of serum Ang-1 increased in DM1 compared with NC, but serum Ang-1 levels in DM2 and DM3 were much lower. ③ There was no statistical significance in difference among the four groups. There was no statistical significance in differences of Tie2. ④ UAER had positive correlation with serum Ang-2, VEGF ($r = 0.470, 0.404, P < 0.01$). UAER had negative correlation with serum Ang-1 ($r = -0.310, P < 0.05$). Ang-2 had positive correlation with serum VEGF, Tie2 ($r = 0.450, 0.725, P < 0.01$). Ang-1 had positive correlation with serum Tie2 ($r = 0.571, P < 0.01$). Ang-1 had negative correlation with serum Ang-2, VEGF ($r = -0.497, -0.396, P < 0.01, P < 0.05$). ⑤ Line to UAER level as the dependent variable, multiple stepwise regression analysis showed that: Ang-1, Ang-2, VEGF, creatinine entered regression equation. They were independent correlation factors for UAER. **Conclusion** Serum Ang-1, Ang-2, Tie2 and VEGF levels are closely related with DN. They may participate in the development of DN and affect the process of DN. Detection of serum Ang/Tie2 and VEGF levels can be used as a reference index for the condition of DN.

Key words diabetic nephropathy; angiopoietin; VEGF; Tie2; urinary albumin excretion rate