

## 终末期肾脏病患者血清 ucMGP 及 PIVKA-II 与桡动脉钙化的相关性

王 科 任 伟 汪 鹏 王 珣 倪力军

**摘要** 目的 探讨血清非活性基质 Gla 蛋白(ucMGP)及凝血酶原前体蛋白(PIVKA-II)与终末期肾脏病(ESRD)患者桡动脉钙化的关系。方法 选取45例ESRD住院患者作为病例组,行动静脉内瘘手术时取桡动脉标本,桡动脉标本均行 von kossa 染色,判断有无钙化,并计算钙化积分。选取同期健康体检人群30例作为对照组。所有研究对象均检测血清 ucMGP、PIVKA-II、血红蛋白(Hb)、钙(Ca)、磷(P)、白蛋白(ALB)、全段甲状旁腺素(iPTH)、C反应蛋白(CRP)指标。结果 病例组血清 ucMGP 低于对照组( $P < 0.01$ ), PIVKA-II 高于对照组( $P < 0.01$ )。在病例组中桡动脉钙化与高血 P

相关,与低 ucMGP 相关。血清 PIVKA-II 与 ucMGP 水平及桡动脉钙化无相关性。结论 ESRD 患者血清 ucMGP 低于正常人群,且与桡动脉钙化相关。ESRD 患者血清 PIVKA-II 高于正常人群。

**关键词** 肾功能衰竭;慢性;动脉硬化;维生素 K 缺乏病;ucMGP; PIVKA-II

**中图分类号** R 692.5; R 543.5

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2014)04-0505-04

终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)患者血管钙化是心血管疾病的独立危险因素<sup>[1]</sup>。血清基质 Gla 蛋白(matrix Gla protein, MGP)是一种具有抑制血管钙化作用的维生素 K 依赖性蛋白。维生素 K 缺乏可导致 MGP 以非活性基质 Gla 蛋白(uncarboxylated matrix Gla protein, ucMGP)形式沉积于血管钙化部位。凝血酶原前体蛋白(protein in-

2013-10-10 接收

基金项目:安徽省卫生厅立项课题(编号:2010C040)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院肾脏内科,合肥 230001

作者简介:王 科,男,硕士研究生;

任 伟,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: renweishan@163.com

## Expression of matrix metalloproteinase-13 in synovium of early osteonecrosis of femoral head

Wang Sisheng<sup>1</sup>, Gui Binjie<sup>1</sup>, Zhou Jian<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Joint Surgery, <sup>2</sup>Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To analyze the expression of matrix metalloproteinase-13 in synovium of early osteonecrosis of femoral head(ONFH) patients, and to study its effect on progress of ONFH. **Methods** Selected 30 ONFH patients (osteonecrosis group), 30 Hip osteoarthritis (OA) patients (OA group), 30 transcervical fracture patients (fracture group). Synovium dissected in operations. Investigate expressing of MMP-13 protein and morphological change of synovium by immunohistochemical technology. Investigate expressing of MMP-13 mRNA of synovium by RT-PCR technology. **Results** Immunohistochemistry results showed statistically significant difference in expression of MMP-13 protein in osteonecrosis group and OA group between fracture group ( $P < 0.05$ ). No statistically significant difference between osteonecrosis group and OA group ( $P > 0.05$ ). RT-PCR results showed statistical significantly difference in expression of MMP-13 mRNA in osteonecrosis group between OA group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** High expression of MMP-13 protein in osteonecrosis group and OA group show they may have the same synovial pathological mechanism. Higher expression of MMP-13 mRNA in osteonecrosis group than OA group show the severity of abnormality synovium is different.

**Key words** osteonecrosis of the femoral head; synovium; matrix metalloproteinases-13; immunohistochemistry; real time-polymerase chain reaction

duced by vitamine K absence or antagonist-Ⅱ, PIVKA-Ⅱ) 作为维生素 K 缺乏或拮抗剂诱导的蛋白质( protein induced by vitamine K absence or antagonist, PIVKA) 之一, 是反映机体维生素 K 营养状况的敏感指标。该研究观察 ESRD 患者血清 ucMGP 水平及其与桡动脉血管钙化的关系, 并通过对血清 PIVKA-Ⅱ的观察, 了解 ESRD 患者维生素 K 缺乏状况及其与血清 ucMGP 及血管钙化之间的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 病例组: 选取 2012 年 6 月~2013 年 5 月我院肾脏内科住院患者 45 例。入选标准如下: ① 年龄 $\geq 18$  岁; ② 符合美国肾脏病基金会( National Kidney Foundation, NKF) 慢性肾脏病( chronic kidney disease, CKD) 5 期标准, 尚未开始血液透析治疗或开始血液透析治疗时间 $< 2$  周; ③ 原发疾病为慢性肾小球肾炎, 无继发性肾脏疾病证据。所有患者均在我科行前臂自体动静脉内瘘成形术。对照组: 选择同期我院健康体检人群 30 例, 年龄、性别与病例组匹配, 无高血压病、糖尿病、痛风、结缔组织病、慢性肾脏病史, 体检肝、肾功能正常, 尿常规正常。所有研究对象 1 年内无应用华法林、维生素 K 史, 无肝癌及慢性肝脏病史, 肝脏 B 超检查正常, 对本研究知情同意并签署知情同意书。

**1.2 血标本检查** 所有研究对象均抽取空腹血标本检查如下: 应用血细胞分析仪测定血红蛋白( Hb) 水平, 应用全自动生化分析仪测定血钙( Ca)、血磷( P)、白蛋白( ALB), 应用电化学发光法测定血清全段甲状旁腺素( iPTH)、C 反应蛋白( CRP)。采用 ELISA 法测定血清 ucMGP 及 PIVKA-Ⅱ水平( 均为美国 Cusabio 公司试剂盒)。

**1.3 病例组血管处理** 前臂自体动静脉内瘘术中取得桡动脉标本 0.5 cm 长, 在生理盐水中充分漂洗后放入 4% 甲醛固定 48 h, 然后进行石蜡包埋切片。von kossa 染色: 二甲苯脱蜡, 逐级乙醇水化, 10% 硝酸银避光浸染 30 min, 紫外线照射 30 min, 蒸馏水冲洗 2 min, 0.1% 伊红复染 2 min。蒸馏水冲洗 5~10 s, 常规脱水、透明、中性树脂封固。

**1.4 病理结果判定** 读片标准: 切片钙盐沉积为黑色, 背景为红色。根据血管上钙盐沉积程度分为: 0 分, 无钙盐沉积; 1 分, 点状钙盐沉积; 2 分, 单个片状钙盐沉积; 3 分, 多个片状钙盐沉积; 4 分, 弥漫性围绕管腔环形沉积。0 分定义为无钙化; 1~2 分定义为轻度钙化; 3~4 分定义为重度钙化。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。均数比较采用两样本比较  $t$  检验及单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 血管钙化程度与各血清指标之间的关系采用 Spearman 相关分析, ucMGP 与各指标之间的相关性采用 Pearson 相关分析。

## 2 结果

**2.1 两组的血清学比较** 病例组血 Hb、Ca、ALB、ucMGP 低于对照组(  $P < 0.01$  ), P、iPTH、CRP、PIVKA-Ⅱ高于对照组(  $P < 0.01$  ), 见表 1。

表 1 两组各项指标的比较(  $\bar{x} \pm s$  )

项目	病例组( $n=45$ )	对照组( $n=30$ )	$t$ 值	$P$ 值
男/女( $n$ )	28/17	17/13	0.475	0.636
年龄( 岁 )	49.49 $\pm$ 14.6	46.57 $\pm$ 14.50	0.849	0.399
Hb( g/L )	77.02 $\pm$ 19.06	133.20 $\pm$ 17.20	12.993	0.000
Ca( mmol/L )	2.02 $\pm$ 0.24	2.23 $\pm$ 0.17	4.006	0.000
P( mmol/L )	1.99 $\pm$ 0.80	1.39 $\pm$ 0.27	4.651	0.000
ALB( g/L )	34.08 $\pm$ 6.63	44.03 $\pm$ 5.16	6.933	0.000
iPTH( ng/L )	826.98 $\pm$ 617.66	86.49 $\pm$ 32.88	8.025	0.000
CRP( mg/L )	13.75 $\pm$ 12.16	3.87 $\pm$ 2.84	5.237	0.000
ucMGP( nmol/L )	198.96 $\pm$ 93.96	468.17 $\pm$ 191.90	7.135	0.000
PIVKA-Ⅱ( $\mu$ g/L )	4.79 $\pm$ 4.05	1.92 $\pm$ 1.59	4.279	0.000

**2.2 病例组血管钙化情况** 45 例 ESRD 患者桡动脉标本中, 无钙化的 28 例( 62.2% ), 轻度钙化的 12 例( 26.7% ), 重度钙化的 5 例( 11.1% )。钙化均发生在血管中膜, 见图 1。

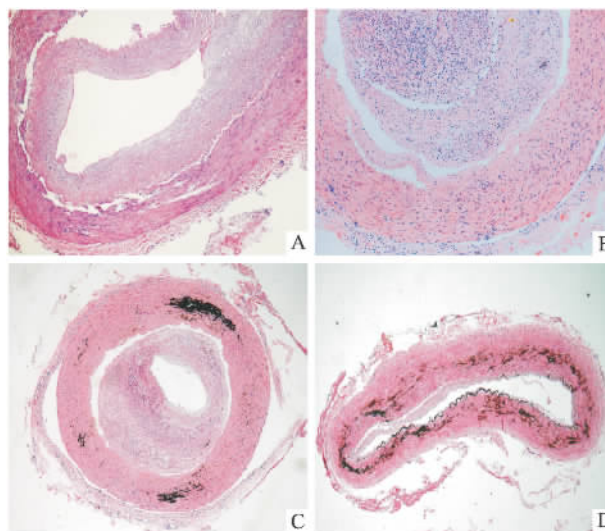


图 1 ESRD 患者桡动脉中膜钙化 von kossa 染色

A: 无钙盐沉积  $\times 100$ ; B: 点状钙盐沉积  $\times 100$ ; C: 多个片状钙盐沉积  $\times 40$ ; D: 弥漫性围绕管腔环形钙盐沉积  $\times 40$

在无钙化组、轻度钙化组及重度钙化组 3 组间比较血 P、ucMGP 水平差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。LSD 法组间比较提示重度钙化组 PIVKA-II 与轻度钙化组 PIVKA-II 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见表 2。

表 2 不同桡动脉钙化积分组的血清学指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	无钙化组 ( $n=28$ )	轻度钙化组 ( $n=12$ )	重度钙化组 ( $n=5$ )	F 值	P 值
年龄(岁)	49.46 ± 14.59	48.08 ± 16.26	53.00 ± 13.47	0.191	0.827
Hb(g/L)	79.18 ± 17.8	76.75 ± 21.18	65.60 ± 20.67	1.083	0.348
Ca(mmol/L)	2.04 ± 0.25	1.96 ± 0.23	2.06 ± 0.23	0.522	0.597
P(nmol/L)	1.71 ± 0.50	2.11 ± 0.67	3.26 ± 1.20 <sup>#</sup>	12.473	0.000
ALB(g/L)	32.39 ± 6.17	36.00 ± 5.21	38.86 ± 9.65 <sup>*</sup>	2.940	0.064
iPTH(ng/L)	689.17 ± 634.59	964.63 ± 478.89	1268.36 ± 43.74	2.418	0.101
CRP(mg/L)	11.66 ± 13.24	18.77 ± 9.41	13.37 ± 9.65	1.470	0.241
ucMGP(nmol/L)	241.14 ± 86.86	141.83 ± 57.74 <sup>*</sup>	99.80 ± 49.87 <sup>*</sup>	11.590	0.000
PIVKA-II(μg/L)	4.67 ± 3.96	6.26 ± 4.48	1.91 ± 1.43 <sup>#</sup>	2.177	0.126

与无钙化组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与轻度钙化组比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$

**2.3 相关性分析** Spearman 相关分析提示血管钙化程度与 ucMGP 呈负相关 ( $r_s = -0.64$ ,  $P < 0.05$ )，与血清 P、iPTH、CRP 呈正相关。Pearson 相关分析提示 ucMGP 与血清 P 呈负相关 ( $r_s = -0.31$ ,  $P < 0.05$ )，血清 ucMGP 与 PIVKA-II 无相关性，见表 3。

表 3 桡动脉钙化积分及血清 ucMGP 与其他血清学指标的相关性分析 ( $r$ )

项目	年龄	Hb	Ca	P	ALB	iPTH	CRP	ucMGP	PIVKA-II
桡动脉钙化积分( $r_s$ )	-0.42	-0.20	-0.10	0.47 <sup>*</sup>	0.26	0.37 <sup>*</sup>	0.36 <sup>*</sup>	-0.64 <sup>*</sup>	-0.07
血清 ucMGP( $r_s$ )	-0.05	-0.05	0.04	-0.31 <sup>*</sup>	-0.02	-0.19	-0.20	1.00	-0.02

\*  $P < 0.05$

### 3 讨论

MGP 是由血管平滑肌细胞及软骨细胞合成的一种低分子蛋白，它作用于局部血管壁发挥抑制血管钙化作用。MGP 最初合成时为 ucMGP 几乎不具有生物学活性，经维生素 K 依赖性羧化酶将其中的  $\gamma$ -赖氨酸羧化成谷氨酸残基后成为 cMGP，具有抑制动脉钙化的活性。ucMGP 及 cMGP 在体内均有少量为磷酸化状态，分别称为 dp-ucMGP 和 dp-cMGP<sup>[2]</sup>，这种磷酸化的作用目前尚不清楚<sup>[3]</sup>。MGP 可以直接与胎球蛋白及钙磷离子结合成复合物，抑制钙盐在血管壁的沉积，并可与骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 结合形成 BMP-2/MGP 结合体抑制 BMP-2 对骨化的诱导，其中 MGP 与 BMP-2 的结合需要通过维生素 K 依赖的  $\gamma$  羧基

谷氨酸残基<sup>[4]</sup>。但 MGP 抑制血管钙化的具体机制尚不十分清楚。

本研究发现 ESRD 患者血清 ucMGP 较对照组明显降低，与国外研究<sup>[5]</sup>结果一致。进一步研究提示：ESRD 患者中桡动脉钙化组较无钙化组血清 ucMGP 更低。有研究<sup>[6]</sup>显示，维持性血液透析患者血清 ucMGP 低于正常人群，且 ucMGP 水平与血清 P 及主动脉增强指数呈负相关。另外有研究<sup>[7-8]</sup>对维持性血液透析患者及健康妇女血清 ucMGP 与 CT 扫描冠状动脉钙化积分进行相关性研究，显示在维持性血液透析患者及健康妇女中血清 ucMGP 水平与冠状动脉钙化程度均呈负相关。目前推测这种现象发生的原因：ESRD 患者亚临床维生素 K 缺乏，导致血管平滑肌细胞产生的 ucMGP 直接沉积在血管壁，不再释放入血液循环，导致循环中 ucMGP 减少<sup>[6]</sup>。

有研究<sup>[9]</sup>显示维持性血液透析患者普遍摄入维生素 K 不足，且处于维生素 K 缺乏状态。当人体处于维生素 K 缺乏或使用维生素 K 拮抗剂时，血清中可以检测到一组蛋白质，称之为 PIVKA，其中 PIVKA-II 变化最为明显，是生化水平反映机体维生素 K 营养状况最敏感的指标<sup>[10]</sup>。为评估 ESRD 患者是否存在亚临床维生素 K 缺乏，本研究对 ESRD 患者和健康人进行血清 PIVKA-II 测定，结果提示 ESRD 患者体内 PIVKA-II 水平明显升高，与国外报道<sup>[9]</sup>一致，证实了 ESRD 患者存在亚临床维生素 K 缺乏。这种亚临床维生素 K 缺乏可能与 ESRD 患者低钠、低钾、低磷饮食有关，患者在低钠、低钾、低磷饮食同时一些富含维生素 K 的食物如新鲜绿叶蔬菜、肉类的摄取减少<sup>[9]</sup>。另外部分 ESRD 患者胃肠道吸收功能不良、使用头孢菌素导致肠道菌群失调也是维生素 K 缺乏的可能原因。

本研究显示尽管 ESRD 患者体内 PIVKA-II 水平明显升高，但在不同血管钙化组的 PIVKA-II 水平比较中差异无统计学意义。笔者认为血管钙化涉及一系列复杂的生化机制，影响因素很多，维生素 K 缺乏只是其中一个间接因素，对血管钙化的影响有限，在小样本的研究中很难发现显著差异。本研究对 PIVKA-II 水平与 ucMGP 水平进行相关性分析，未发现它们之间有相关性，据此推测，血清维生素 K 的水平对血清 ucMGP 可能没有影响。国外一项关于健康人群的研究<sup>[11]</sup>也显示补充维生素 K 对 ucMGP 没有影响：该研究采用双盲随机对照，给健康人群口服维生素 K2-7 (menaquinone-7, MK-7) 12 周，

观察血清 MGP 水平变化, 研究结果提示口服维生素 K2-7 后血清 ucMGP 水平无变化, 但 dp-ucMGP 水平显著下降。有研究<sup>[3,12]</sup>显示虽然 ESRD 患者血清 ucMGP 与 PIVKA-II 不相关, 但 dp-ucMGP 是正常人群的 6.5 倍, 且与血清 PIVKA-II 呈正相关, 补充维生素 K 可以降低 dp-ucMGP。还有研究<sup>[13]</sup>显示在 CKD 患者中血清 dp-ucMGP 随肾小球滤过率下降而升高, 且与主动脉钙化积分呈正相关。

### 参考文献

- [1] London G M, Guérin A P, Marchais S J, et al. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality [J]. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18(9): 1731-40.
- [2] Schurgers L J, Cranenburg E C, Vermeer C. Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K [J]. *Thromb Haemost* 2008, 100(4): 593-603.
- [3] Schlieper G, Westenfeld R, Krüger T, et al. Circulating nonphosphorylated carboxylated matrix Gla protein predicts survival in ESRD [J]. *J Am Soc Nephrol* 2011, 22(2): 387-95.
- [4] Sweatt A, Sane D C, Hutson S M, et al. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats [J]. *J Thromb Haemost* 2003, 1(1): 178-85.
- [5] Cranenburg E C, Vermeer C, Koos R, et al. The circulating inactive form of matrix Gla Protein (ucMGP) as a biomarker for cardiovascular calcification [J]. *J Vasc Res* 2008, 45(5): 427-36.
- [6] Hermans M M, Vermeer C, Kooman J P, et al. Undercarboxylated matrix Gla protein levels are decreased in dialysis patients and related to parameters of calcium-phosphate metabolism and aortic augmentation index [J]. *Blood Purif* 2007, 25(5-6): 395-401.
- [7] Cranenburg E C, Brandenburg V M, Vermeer C, et al. Uncarboxylated matrix Gla protein (ucMGP) is associated with coronary artery calcification in haemodialysis patients [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 101(2): 359-66.
- [8] Dalmeijer G W, van der Schouw Y T, Vermeer C, et al. Circulating matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification and vitamin K status in healthy women [J]. *J Nutr Biochem* 2013, 24(4): 624-8.
- [9] Cranenburg E C, Schurgers L J, Uiterwijk H H, et al. Vitamin K intake and status are low in hemodialysis patients [J]. *Kidney Int*, 2012, 82(5): 605-10.
- [10] 张会丰, 王丽芳, 范士英, 等. 检测凝血酶原前体蛋白判断维生素 K 营养状况 [J]. *世界华人消化杂志* 2000, 8(3): 348.
- [11] Dalmeijer G W, van der Schouw Y T, Magdeleyns E, et al. The effect of menaquinone-7 supplementation on circulating species of matrix Gla protein [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2): 397-402.
- [12] Westenfeld R, Krueger T, Schlieper G, et al. Effect of vitamin K2 supplementation on functional vitamin K deficiency in hemodialysis patients: a randomized trial [J]. *Am J Kidney Dis* 2012, 59(2): 186-95.
- [13] Schurgers L J, Barreto D V, Barreto F C, et al. The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: a preliminary report [J]. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010, 5(4): 568-75.

## Correlation between serum concentrations of ucMGP and PIVKA-II and calcification of radial artery in patients with ESRD

Wang Ke, Ren Wei, Wang Peng et al

(Dept of Nephrology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To determine the correlation between serum concentrations of uncarboxylated matrix Gla protein (ucMGP) and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) and calcification of radial artery in patients with end stage renal disease (ESRD). **Methods** 45 patients with ESRD (experimental group) were recruited in nephrology department, while 30 people in good health (control group) were included as control. Radial arteries were partially excised from patients in experimental group through arteriovenous fistula operation, and von kossa-staining was used to judge the degree of calcification. The serum concentrations of ucMGP, PIVKA-II, Hb, Ca, P, ALB, PTH and CRP were all included as items of inspection. **Results** The concentration of ucMGP in experimental group was lower than that in control one, on the contrary, the concentration of PIVKA-II was higher in experimental group. In experimental group, the calcification of radial artery was associated with hyperphosphatemia and the lower concentration of ucMGP. There was no significant association between serum concentration of PIVKA-II and radial calcification as well as the concentration of ucMGP. **Conclusion** The serum concentration of ucMGP in patients with ESRD is lower than that in healthy people, and is associated with radial calcification. The serum concentration of PIVKA-II in patients with ESRD is higher than that in healthy people.

**Key words** kidney failure, chronic; arteriosclerosis; vitamin K deficiency; ucMGP; PIVKA-II