

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.03.011

## 血浆激肽释放酶水平与成人隐匿性自身免疫性糖尿病的关系\*

秦雯<sup>1</sup>,覃保瑜<sup>2</sup>,夏宁<sup>3△</sup>

(广西医科大学第一附属医院:1.病理科 2.老年内分泌科;3.内分泌代谢病科,南宁 530021)

**摘要:**目的 研究血浆激肽释放酶(KLKKB1)在成人隐匿性自身免疫性糖尿病(LADA)、经典 1 型糖尿病(T1DM)、2 型糖尿病(T2DM)和健康成人中的水平,并结合其他指标分析其与 LADA 的关系。方法 分别检测 LADA 组、T1DM 组、T2DM 组、健康对照组(NC 组)血浆样本中 KLKKB1、糖化血红蛋白(HbA1c)、空腹血糖(FPG)、餐后 2 h 血糖(2 h PG)、空腹 C 肽(FCP)、餐后 2 h C 肽(2 h CP)、谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)等指标,并对检测结果进行统计学分析。结果 LADA 组与其他各组在 FPG(T2DM 组除外)、2 h PG、HbA1c、FCP、2 h CP 指标方面差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。LADA 组与其他各组(T1DM 组除外)GADA 的差异有统计学意义( $P < 0.05$ );KLKKB1 在 LADA 组血浆中的含量明显高于 T2DM 组和 NC 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );KLKKB1 与 FCP、HbA1c、FPG、2 h PG 相关( $P < 0.05$ ),而与年龄、病程、2 h CP 无关( $P > 0.05$ )。ROC 曲线进一步分析显示,单独应用 KLKKB1 对 LADA 进行诊断或鉴别诊断具有一定的局限性。结论 KLKKB1 对判断 LADA 发病风险和早期诊断 LADA 有一定意义,可在 LADA 高危人群中结合其他指标进行 LADA 的筛选和监控。

**关键词:**血浆激肽释放酶;自身免疫性疾病;糖尿病;成人隐匿性自身免疫性糖尿病;早期诊断

中图分类号:R58

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)03-0321-03

## The level of plasma prekallikrein and its correlation with latent autoimmune diabetes in adults\*

Qin Wen<sup>1</sup>, Qin Baoyu<sup>2</sup>, Xia Ning<sup>3△</sup>

(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Geriatric Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Department of Endocrinology and Metabolism, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**Abstract:** Objective To investigate the plasma expression of plasma prekallikrein(KLKKB1) in latent autoimmune diabetes in adults (LADA), type 1 diabetes(T1DM), type 2 diabetes(T2DM) and healthy people, and its relationship with LADA in combination with other indicators. Methods Among the four groups, KLKKB1, glycosylated hemoglobin(HbA1c), fasting blood glucose(FPG), 2 h postprandial plasma glucose(2 h PG), Fasting c-peptide(FCP), 2 h postprandial C peptide(2 h CP), and glutamic acid decarboxylase antibody(GADA) were detected respectively. And the detection results were analyzed by statistics. Results By comparison, there were statistically significant difference between LADA group and other groups on FPG(except for T2DM group), 2 h PG, HbA1c, FCP and 2 h CP( $P < 0.05$ ). And except for T1DM group, there was statistically significant difference between LADA group and other groups on GADA, too( $P < 0.05$ ). The plasma expression of KLKKB1 in LADA was significantly higher than those in T2DM group and NC group( $P < 0.05$ ). The levels of KLKKB1 was related with FCP, HbA1c, FPG, 2 h PG( $P < 0.05$ ), and it was not related with age, course, and 2 h CP( $P > 0.05$ ). Receiver operating characteristic (ROC) showed that only using KLKKB1 to diagnose LADA had its limitation. Conclusion KLKKB1 could be used as a clinical indicator to predict the onset of LADA to a certain degree. We could screen for LADA by using KLKKB1 and other indicators in people at high risk.

**Key words:** plasma prekallikrein; autoimmune diseases; diabetes mellitus; latent autoimmune diabetes in adults; early diagnosis

世界卫生组织将糖尿病视为一种常见的流行病。初步估计至 2015 年,在超过 30 岁的成年人中糖尿病的发病率将增加 60%,且高发年龄将为 45~64 岁<sup>[1]</sup>,其中既包括 2 型糖尿病(T2DM),也包括成人隐匿性自身免疫性糖尿病(latent autoimmune diabetes in the adult, LADA),此二者在发病初期难以鉴别。对糖尿病进行正确分类才能做到早期、适当治疗,降低发生微血管并发症的概率<sup>[2-3]</sup>。尤其对于 LADA 患者,由于其可能会迅速进入胰岛 β 细胞衰竭和胰岛素缺乏期,早期及时诊断并给予胰岛素治疗可有效控制血糖,保存剩余 β 细胞功能,延缓并发症的发生。目前,在临床检验中常通过一些胰腺自身抗体来初步鉴别自身免疫性糖尿病。然而这些自身抗体不仅种类繁多,而且无论是阳性率还是敏感性在 LADA 患者

中均相对较低<sup>[4]</sup>。因此,探索有别于自身抗体的指标,更早地预测 LADA 是本研究的目的所在。不少研究报道都揭示了炎症反应在经典 1 型糖尿病(T1DM)和 LADA 发病过程中所起的作用<sup>[5-8]</sup>。有研究证实在链脲佐菌素制造的 T1DM 鼠模型中,致炎因子血浆激肽释放酶(KLKKB1)在循环血中的水平是升高的<sup>[9]</sup>;而 LADA 与 T1DM 同为自身免疫性糖尿病,其血浆中 KLKKB1 水平的变化尚无相关报道。本研究旨在探讨 KLKKB1 在早期 LADA 患者血浆中的变化及与早期预测 LADA 的关系。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 各疾病组均选自 2011 年 8 月至 2011 年 12 月在本院就诊的新诊断糖尿病患者,病程均小于 1 年,收集标

\* 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81060070)。  
△ 通讯作者, Tel: (0771)3277215; E-mail: xianing12@sina.com。

作者简介:秦雯(1980-),主治医师,博士,主要从事内分泌病理方向研究。

表 1 各组一般临床资料及生化指标比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	性别 (男/女)	年龄 (岁)	病程 (月)	HbA1c (%)	FPG (mmol/L)	2 h PG (mmol/L)	FCP[M(P25,P75), ng/mL]	2 h CP (ng/mL)	GADA [n(%)]
LADA 组	58	32/26	37.2±5.1	4.8±1.1	8.2±0.8	9.2±1.7	15.8±1.5	0.71(0.63,0.76)	1.3±0.2	58(100)
T1DM 组	52	28/24	12.2±3.8 <sup>a</sup>	4.5±1.2	8.6±0.8 <sup>a</sup>	10.0±1.6 <sup>a</sup>	17.0±1.9 <sup>a</sup>	0.53(0.43,0.65) <sup>a</sup>	1.0±0.2 <sup>a</sup>	52(100)
T2DM 组	65	37/28	38.2±4.7	4.7±1.2	7.8±0.7 <sup>a</sup>	9.0±1.2	13.8±0.8 <sup>a</sup>	1.87(1.65,2.16) <sup>a</sup>	6.0±1.5 <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>
NC 组	83	48/35	36.8±4.7	—	5.1±0.4 <sup>a</sup>	5.1±0.7 <sup>a</sup>	6.1±1.1 <sup>a</sup>	1.48(1.25,1.79) <sup>a</sup>	5.6±1.9 <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>

—:无数据;<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与 LADA 组比较。

本前患者均未接受其他治疗且知情同意。糖尿病诊断采用 2003 年美国糖尿病协会(ADA)诊断标准;而 LADA 的诊断目前尚无统一标准,本研究采用 Fourlanos 等<sup>[10]</sup>和周智广等<sup>[11]</sup>提出的标准。LADA 组 58 例,其中男 32 例,女 26 例,平均年龄(37.22±5.08)岁,平均病程(4.81±1.12)个月。T1DM 组 52 例,其中男 28 例,女 24 例,平均年龄(12.19±3.80)岁,平均病程(4.52±1.23)个月。T2DM 组 65 例,其中男 37 例,女 28 例,平均年龄(38.23±4.73)岁,平均病程(4.68±1.23)个月。各组受检者的年龄、性别构成及病程间有均衡性。另选同期健康自愿者 83 例为健康对照组(NC 组),其中男 48 例,女 35 例,平均年龄(36.84±4.66)岁。

**1.2 方法** 晨起抽空腹血查空腹血糖(FPG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、空腹 C 肽水平(FCP),进食 100 g 馒头后 2 h 抽查餐后 2 h 血糖(2 h PG)、餐后 2 h C 肽(2 h CP)。FPG、2 h PG 采用西门子公司 ADVIA2400 全自动生化仪葡萄糖氧化酶法测定。FCP、2 h CP 的检测使用美国 DPC 公司全自动化学发光免疫分析仪(IMMULATE-1000),采用化学发光法。HbA1c 采用 Bio-Rad 公司全自动糖化血红蛋白仪高效液相法检测。另留 2 份血样,分离血浆,−80 °C 保存,1 份用于谷氨酸脱羧酶抗体(glutamic acid decarboxylase,GADA)的测定(ELISA 法,北京北方生物技术研究所),1 份用于 KLKB1 的测定(ELISA 法,武汉优尔生科技股份有限公司)。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料予以正态性检验,对符合正态分布变量表示为  $\bar{x}\pm s$ ,LADA 组与其他各组 KLKB1 值组间比较采用单因素方差分析;对非正态分布变量用百分位数表示,采用非参数检验方法;计数资料采用  $\chi^2$  检验;血浆 KLKB1 和其他指标相关性分析采用 Spearman 相关分析,多因素分析采用多元线性回归法(逐步法);使用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析血浆 KLKB1 对 LADA 临床早期诊断的意义,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组一般临床资料及实验室指标比较** LADA 组与其他各组在性别构成、病程(NC 组除外)方面差异无统计学意义( $P>0.05$ )。LADA 组与其他各组(T1DM 组除外)在年龄方面差异无统计学意义( $P>0.05$ )。LADA 组与其他各组的 FPG(T2DM 组除外)、2 h PG、HbA1c、FCP、2 h CP 指标方面差异有统计学意义( $P<0.05$ )。LADA 组与其他各组(T1DM 组除外)GADA 的差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

**2.2 血浆 KLKB1 水平在各组中的比较** 血浆 KLKB1 在 LADA 组中的值为(29.44±7.22) $\mu\text{g/mL}$ ,明显高于 T2DM 组的(24.76±6.88) $\mu\text{g/mL}$ 和 NC 组的(25.61±6.86) $\mu\text{g/mL}$ ,差异有统计学意义( $P<0.05$ );同时也高于 T1DM 组的(28.27±7.86) $\mu\text{g/mL}$ ,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.3 LADA 组患者血浆 KLKB1 水平相关因素分析** 经

Spearman 相关分析,LADA 组血浆 KLKB1 含量与年龄、病程、2 h CP 无明显相关性( $P>0.05$ ),与 FCP 呈负相关( $P<0.05$ ),与 HbA1c、FPG、2 h PG 呈正相关( $P<0.05$ ),见表 2。进一步以 KLKB1 为因变量,以年龄、病程、FPG、2 h PG、HbA1c、FCP、2 h CP 各项指标为自变量,进行多元线性回归分析,仅有病程、FCP 进入回归方程( $P<0.05$ )。见表 3。

表 2 KLKB1 与其他观察指标的 Spearman 相关分析结果

	年龄	病程	HbA1c	FPG	2 h PG	FCP	2 h CP
r	−0.16	0.12	0.61	0.75	0.46	−0.92	0.13
P	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

表 3 以 KLKB1 为因变量的多元线性回归分析

自变量	$\beta$	$\beta'$	SE	t	P
病程	−1.059	−0.164	0.484	−2.191	<0.05
FCP	−55.778	−0.885	4.707	−11.849	<0.05

**2.4 血浆 KLKB1 值早期预测 LADA 的灵敏性、特异性及临界值探讨** 为证实血浆 KLKB1 值在鉴别 LADA 和 T2DM 中的价值,绘制 ROC 曲线。同时,计算出其预测 LADA 的灵敏度、特异度和临界值。经计算,血浆 KLKB1 预测 LADA 的临界值为 20.60  $\mu\text{g/mL}$ ,灵敏度为 0.88,特异度为 0.38,见图 1。

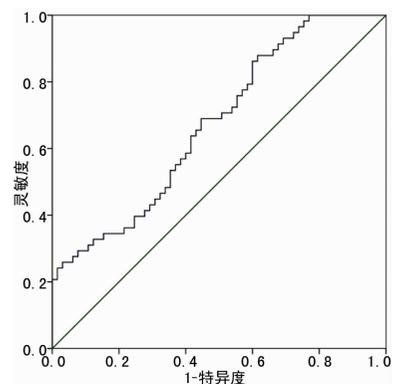


图 1 KLKB1 预测 LADA 的 ROC 曲线

## 3 讨论

目前诊断 LADA 的直接证据是检测到血液中之与之相关的多种自身免疫抗体,如胰岛细胞质抗体、胰岛细胞表面抗体、胰岛素自身抗体、GADA 等<sup>[12]</sup>。间接证据有标志胰岛  $\beta$  细胞功能的胰岛素及 C-肽水平的降低。然而有研究显示,即使是 T2DM 患者,其胰岛自身免疫抗体也有 17.21% 的阳性率<sup>[13]</sup>。胰岛素因在肝肾内分解且半衰期短而影响测量结果的准确性,不少患者在 LADA 的发病初期 C 肽值无明显变化,这些都导致了 LADA 的误诊或漏诊。

KLKB1 是一种由激肽释放酶原产生的丝氨酸蛋白酶,也

是由 *KLKB1* 基因表达的一种丰富的循环酶原。它本质上是一种水解酶,作用于肽键,也就是丝氨酸肽链内切酶。它所参与的补体及凝集通路是血浆中一连串蛋白水解的串联通路,是针对病原体的非特异性防御机制。补体的激活有 3 条路径:经典路径、外源凝集素路径和替代路径,所有路径产生决定性的酶活性,并依次产生补体效应分子。补体激活的主要结果是产生了调理素,补充炎症细胞和免疫活性细胞。*KLKB1* 所参与的生物过程除了经典的血液凝固过程、纤溶过程、止血过程外,还有炎症反应过程。因此,它在许多疾病中都有致炎因子的作用,而这一方面通常被研究者们忽略。所以有学者认为有必要评估 *KLKB1* 在胰岛炎及在最终发展成 T1DM 过程中的作用<sup>[14-15]</sup>。

最近对 *KLKB1* 的基因学、分子学和药理学研究使人们对其生理和病理角色有了更深入的理解。基因分析发现 *KLKB1* 的变构体与血液中的代谢物水平、高血压和凝集作用有关。以 *KLKB1* 基因缺陷为特征的动物模型和 *KLKB1* 抑制物都已证实了其在炎症、血管功能、血压调节、血栓形成、糖尿病和代谢等方面的作用<sup>[16-17]</sup>。

本研究通过对 LADA 组与 T1DM 组、T2DM 组、NC 组的水浆 *KLKB1* 水平对比分析发现,*KLKB1* 在 LADA 组与 T1DM 组中的绝对定量值非常相近,经统计学分析发现两者的差异无统计学意义。而水浆 *KLKB1* 水平在 LADA 组与 T2DM 组、NC 组中的差异有统计学意义,在 LADA 组中呈明显上调的趋势。有很多自身免疫性疾病发病的早期常有炎症反应的表现,如链球菌感染后的急性肾小球肾炎发病早期,在能检测出自身抗体前其补体水平就已明显下降。对于 T1DM 和 LADA 的发病机制,目前已知它们都属于自身免疫性疾病,而这些自身抗体产生的真正原因并未阐明,是否有炎症因素参与到疾病的始动环节尚无定论。本研究中水浆 *KLKB1* 水平在早期 LADA 和 T1DM 患者中上调提示,炎症因素很可能在疾病的早期已经开始发挥作用。通过对 LADA 组水浆 *KLKB1* 水平的相关因素分析和多元线性回归分析发现,FCP 是 LADA 组水浆 *KLKB1* 水平的主要影响因素,而 FCP 又是反映患者糖代谢及胰岛  $\beta$  细胞功能的重要指标,这就从一个侧面证实 *KLKB1* 极有可能参与了 LADA 的病理生理过程。据此推测,纠正 *KLKB1* 过高的状态有可能使 LADA 患者获益,但该设想尚需进一步深入研究证实。由于 *KLKB1* 在 LADA 发病的初期就已经升高了,本研究采用 ROC 曲线进一步分析 *KLKB1* 是否能作为早期预测 LADA 的指标,结果显示 *KLKB1* 蛋白对 LADA 的早期诊断预测性一般,故单独应用 *KLKB1* 对 LADA 进行诊断或鉴别诊断具有较大局限性。

综上所述,*KLKB1* 对判断 LADA 发病风险和早期诊断 LADA 有一定意义,可在 LADA 高危人群中结合其他指标进行筛选、监控。如果在 *KLKB1* 升高的同时发现胰岛素、FCP 等指标异常,应及早干预治疗,尽量保护残留的胰岛  $\beta$  细胞,阻止或延缓 LADA 的发生。此外,由于本研究样本含量有限,尚需从分子水平进一步探明 *KLKB1* 在 LADA 发生、发展中的作用机制。

#### 参考文献:

[1] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes; estimates for the year 2000 and projections for 2030 [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(5): 1047-1053.

- [2] Gross JL, De Azevedo MJ, Silveiro SP, et al. Diabetic nephropathy; diagnosis, prevention, and treatment [J]. *Diabetes Care*, 2005, 28(1): 164-176.
- [3] Shahbazian H, Rezaii I. Diabetic kidney disease; review of the current knowledge [J]. *J Renal Inj Prev*, 2013, 2(2): 73-80.
- [4] Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW. Diabetes antibody standardization program; first assay proficiency evaluation [J]. *Diabetes*, 2003, 52(5): 1128-1136.
- [5] Devaraj S, Glaser N, Griffen S, et al. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2006, 55(3): 774-779.
- [6] Jialal I, Devaraj S. Circulating versus cellular biomarkers of inflammation in type 1 diabetes; the superiority of C-reactive protein [J]. *Cytokine*, 2012, 60(1): 318-320.
- [7] Ahmadi Z, Arababadi MK, Hassanshahi G. CXCL10 activities, biological structure, and source along with its significant role played in pathophysiology of type I diabetes mellitus [J]. *Inflammation*, 2013, 36(2): 364-371.
- [8] Guglielmi C, Palermo A, Pozzilli P. Latent autoimmune diabetes in the adults (LADA) in Asia; from pathogenesis and epidemiology to therapy [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012, 28 Suppl 2: 40-46.
- [9] Rothschild AM, Melo VL, Reis ML, et al. Kininogen and prekallikrein increases in the blood of streptozotocin-diabetic rats are normalized by insulin in vivo and in vitro [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1999, 360(2): 217-220.
- [10] Fournalos S, Dotta F, Greenbaum CJ, et al. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(11): 2206-2212.
- [11] 周智广, 杨琳. LADA 的诊断要点与治疗方式 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2006, 22(1): 插 1-插 4.
- [12] Bingley PJ. Clinical applications of diabetes antibody testing [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(1): 25-33.
- [13] 江志兰, 邓爱红, 黄泽棋, 等. 老年 2 型糖尿病患者胰岛自身免疫抗体与超敏-CRP 和肾功能指标变化的临床分析 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(24): 2861-2863.
- [14] Zuccollo A, Frontera M, Cueva F, et al. Effects of aprotinin on the kallikrein-kinin system in type I diabetes (insulinitis) [J]. *Immunopharmacology*, 1997, 37(2): 251-256.
- [15] Zucollo A, Dziubecki D, Villareal I, et al. The development of insulinitis and the kallikrein-kinin system [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(13/14): 1941-1947.
- [16] Feener EP, Zhou Q, Fickweiler W. Role of plasma kallikrein in diabetes and metabolism [J]. *Thromb Haemost*, 2013, 110(3): 434-441.
- [17] Xu S, Lind L, Zhao L, et al. Plasma prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) is increased in obesity and diabetes mellitus and related to cardiovascular dysfunction [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(7): 1110-1115.