

DN 不同中医证型 NF- κ B 信号通路相关细胞因子的检测及意义*薛雄燕,朱嫦琳,潘练华,黄少珍,李炜焯[△]

(广东省佛山市第一人民医院检验科 528000)

[摘要] **目的** 探讨糖尿病肾病(DN)不同中医证型核因子- κ B(NF- κ B)通路相关细胞因子的表达差异及其临床意义。**方法** 选取该院 146 例 DN 患者,按中医辨证进行分型,检测血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素(IL)-1、IL-6、IL-8 水平,并与 62 例健康体检者(对照组)比较。**结果** 不同中医证型 DN 各组的 TNF- α 、IL-1、IL-6 及 IL-8 水平比较,均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。各个证型 DN 患者中 TNF- α 、IL-1、IL-6 及 IL-8 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。随着 DN 病程进展,各细胞因子水平均呈逐步升高的趋势,且 DN 不同证型升高的幅度与时间不一致。**结论** NF- κ B 通路相关细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 及 IL-8 与 DN 不同中医证型具有相关性,可能在 DN 不同证型的发生、发展中起一定的作用。

[关键词] 糖尿病肾病;NF- κ B;细胞信号通路;细胞因子类;中医证型

[中图分类号] R446.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)07-0898-03

Detection and significance of cytokines related to NF- κ B signaling pathway in patients with different TCM syndrome types of diabetic nephropathy*

Xue Xiongyan, Zhu Changlin, Pan Lianhua, Huang Shaozhen, Li Weixuan[△]

(Department of Clinical Laboratory, Foshan Municipal First People's Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression difference of cytokines related to nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway among different traditional Chinese medicine (TCM) syndromes in the patients with diabetic nephropathy (DN). **Methods** Serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in 146 patients with DN and 62 individuals undergoing healthy physical examination in the control group were measured. **Results** The levels of serum TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-8 in various DN groups were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of serum TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-8 were significantly different among groups of different TCM syndromes ($P<0.05$). With the progression of DN, all cytokines levels showed a gradually increasing trend, moreover the increased extents and time were different in different TCM syndrome types of DN. **Conclusion** The levels of serum TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-8 related to NF- κ B signaling pathway are correlated with different TCM syndromes types and may play a role in the occurrence and progression of different TCM syndrome types of DN.

[Key words] diabetic nephropathy; NF-kappa B; cell signaling pathway; cytokines; traditional Chinese Medicine syndrome

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是终末期肾病最常见的致病原因和糖尿病致死的主要原因之一^[1]。研究发现, DN 患者的外周血单个核细胞的核因子- κ B(NF- κ B)与无并发症的糖尿病患者及健康人之间有明显差异^[2],提示 NF- κ B 在 DN 的发生、发展中有重要作用。由于直接检测 NF- κ B 不易在临床中开展,本研究通过检测不同中医证型 DN 患者 NF- κ B 信号通路相关细胞因子的水平及其在不同病程的变化,进一步阐明 NF- κ B 在 DN 发生、发展中的作用,为 DN 证型实质的研究提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 3 月至 2015 年 3 月在本院就诊并确诊为 DN III~V 期的患者共 146 例(观察组),其中男 83 例,女 63 例;年龄 42~73 岁,平均(56.13±8.74)岁;糖尿病病程 10~24 年,平均(13.47±6.88)年;DN 病程 0.25~8.00 年,平均(2.18±0.95)年;纳入病例均符合《肾脏病学》诊断标准^[3],其中 III 期 82 例,IV 期 43 例,V 期 21 例。排除合并原发性肾脏疾病、严重心血管疾病、严重肝脏疾病、孕妇及哺乳期妇女和肿瘤患者。选择同期本院健康体检者 62 例作为对照组,其中男 36 例,女 26 例;年龄 44~71 岁,平均(55.87±7.96)

岁。两组对象性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 中医辨证分型标准 参照中华中医药学会肾病分会 2007 年的试行方案^[4],综合各种证型及临床表现, DN 最常见类型可归纳为气阴两虚血瘀型(48/146, 32.88%)、阴阳两虚血瘀型(52/146, 35.62%)、脾肾阳虚湿浊瘀阻型(18/146, 12.33%)及其他证型(28/146, 19.18%)4 型。

1.2.2 检测方法 采集两组对象静脉血 3 mL, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离上层血清, 置于-80℃保存待测。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6 和 IL-8 的测定采用德国西门子的全自动免疫分析仪(型号: Immune 1000)及配套试剂; IL-1 的测定采用的酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 试剂盒购自美国 Abcam 公司(型号: AB2202); 酶标仪购自美国 BioTek 公司(型号: ELX-800)。以上检测均严格按照说明书操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA), 计数资料用率表示, 以 $P<0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结 果

2.1 DN 患者的病程分期情况 146 例 DN 患者的病程分期情况,见表 1。

2.2 不同中医证型 DN 中 NF-κB 通路相关细胞因子的表达比较 DN 不同证型的 TNF-α、IL-1、IL-6 及 IL-8 水平均高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。阴阳两虚血瘀型的各个细胞因子水平明显高于其他 3 种证型(P<0.05);气阴两虚血瘀型的 TNF-α、IL-6 和 IL-8 明显高于脾肾阳虚湿浊瘀阻型

和其他证型(P<0.05),见表 2。

表 1 DN 患者的病程分期情况[n(%)]

中医证型	n	Ⅲ期	Ⅳ期	Ⅴ期
气阴两虚血瘀型	48	31(64.58)	13(27.08)	4(8.33)
阴阳两虚血瘀型	52	25(48.08)	17(32.69)	10(19.23)
脾肾阳虚湿浊瘀阻型	18	12(66.67)	4(22.22)	2(11.11)
其他证型	28	14(50.00)	9(32.14)	5(17.86)
合计	146	82(56.16)	43(29.45)	21(14.38)

表 2 不同中医证型 DN 中 NF-κB 通路相关细胞因子的表达比较(̄x±s)

组别	n	TNF-α(ng/mL)	IL-1(ng/L)	IL-6(pg/mL)	IL-8(ng/mL)
气阴两虚血瘀型	48	39.34±6.59 ^{ab}	1279.26±47.67 ^{ab}	6.85±1.11 ^{ab}	44.77±13.91 ^{ab}
阴阳两虚血瘀型	52	56.95±11.33 ^a	1533.12±53.25 ^a	6.93±1.20 ^a	62.13±15.20 ^a
脾肾阳虚湿浊瘀阻型	18	28.28±5.74 ^{abc}	1287.63±48.39 ^{ab}	4.31±1.08 ^{abc}	32.51±11.43 ^{abc}
其他证型	28	29.33±5.88 ^{abc}	1301.03±44.02 ^{ab}	4.45±0.99 ^{abc}	35.96±11.29 ^{abc}
对照组	62	1.26±0.58	505.84±32.93	2.33±0.84	21.24±9.59

^a:P<0.05,与对照组比较;^b:P<0.05,与阴阳两虚血瘀型比较;^c:P<0.05,与气阴两虚血瘀型比较。

2.3 NF-κB 通路相关细胞因子在 DN 不同阶段的水平 随着 DN 病程进展,各细胞因子水平均呈逐步升高的趋势。DN Ⅲ期时,阴阳两虚血瘀型 TNF-α 及 IL-1 水平显著高于其他各组;至 DN Ⅴ期时,气阴两虚血瘀型 TNF-α 水平快速升高,与阴阳两虚血瘀型基本一致,其余两型升高不明显。而各型 IL-1

及 IL-6 均稳步上升。IL-8 水平在 DN Ⅲ期时各证型比较,差异无统计学意义(P>0.05);至 Ⅴ期时,阴阳两虚血瘀型升高最明显,其次为气阴两虚血瘀型,其余两型升高不明显,见图 1。

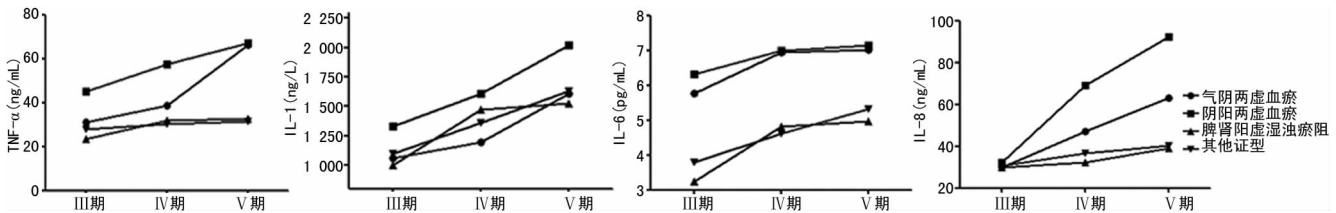


图 1 NF-κB 通路相关细胞因子在 DN 不同阶段的变化

3 讨 论

DN 是终末期肾病最常见的致病原因,也是糖尿病致死的主要原因之一,在我国,约有 30% 的糖尿病患者最终进展为 DN^[5]。由于 DN 可造成患者慢性肾衰竭,需要进行血液透析与肾移植,给患者家庭带来巨大的经济和心理负担。DN 在中医学中属下消、肾消范畴,目前现代医学尚未发现满意的治疗方法,中医是 DN 诊治良好的补充手段。从长期的临床工作中发现,DN 最常见类型可归纳为气阴两虚血瘀、阴阳两虚血瘀、脾肾阳虚湿浊瘀阻及其他证型,而气阴两虚血瘀型最为常见。有研究指出,DN 的病理分子机制与 NF-κB 信号通路密切相关,NF-κB 及其相关基因作为一种转录因子调节众多基因表达,参与 DN 的发生、发展^[6]。Wang 等^[7]研究发现,临床期 DN 患者、无并发症的糖尿病患者和健康人之间 NF-κB 通路相关细胞因子 TGF-β 水平有显著差异,提示 NF-κB 活性异常在 DN 发生、发展中可能起着重要作用。此外,临床相关分析表明,NF-κB 活性与糖化血红蛋白水平及血浆脂质的超氧化物标志物呈正相关^[8],提示 NF-κB 与 DN 的严重程度密切相关,因此,本研究选取 NF-κB 通路相关细胞因子进行测定,进一步明确 NF-κB 在 DN 发生、发展中的作用。

NF-κB 通路相关细胞因子包括 TNF-α、IL-1、IL-6 及 IL-8 等。NF-κB 活化可增强 TNF-α 和 IL-1 的基因转录,使二者升

生和释放增多,此外,NF-κB 活化后还可使 IL-6 和 IL-8 产生和释放增多,导致炎症信号进一步放大^[9],因此,TNF-α、IL-1、IL-6 及 IL-8 水平的变化可反映 NF-κB 信号通路的激活情况。本研究结果显示,所有证型的 DN 患者血清中 TNF-α、IL-1、IL-6 及 IL-8 水平均明显高于对照组,提示 DN 患者体内 NF-κB 通路被激活,导致通路相关细胞因子分泌增加。其中,阴阳两虚血瘀型的患者 TNF-α、IL-1 及 IL-8 水平均明显高于其他 3 种证型,IL-6 水平与气阴两虚血瘀型患者相当,明显高于脾肾阳虚湿浊瘀阻型和其他证型,提示 NF-κB 与 DN 的发生及 DN 中医证型具有一定的相关性。

Dabhi 等^[10]研究显示,TNF-α 可刺激肾小球系膜细胞产生氧自由基,可激活 IL-1、IL-6 等细胞因子,促进肾小球细胞释放胶原酶,促进 DN 发病。本研究也发现随着 DN 病程进展,各细胞因子水平均呈逐步升高的趋势,与文献^[11-12]报道一致,DN 不同病程分期中,阴阳两虚血瘀型 TNF-α 水平升高最为明显,各组 IL-1 及 IL-6 均稳步上升,其发生机制可能与 TNF-α 和 IL-6 可通过促进系膜细胞和血管内皮细胞增生而导致肾小球硬化有关。IL-1 是重要的炎症因子之一,也是热原质成分,具有致热和介导炎症的作用,可受各种刺激因子诱导,与 DN 的病理过程密切相关^[13]。IL-6 是一种炎症反应启动因子,同时具有促炎和抗炎的作用,在 DN 各个证型患者血清中水平

显著升高。但与气阴两虚血瘀型患者 TNF- α 水平至 DN V 期时才快速升高的变化不一致的是, IL-6 在气阴两虚血瘀型 DN 中升高程度与阴阳两虚血瘀型基本一致, 不可作为鉴别这两种证型的指标, 同时也提示 IL-6 升高可能比 TNF- α 发生更早。IL-8 主要由单核巨噬细胞产生, 具有中性粒细胞趋化、脱粒、释放溶酶、加强炎症防护等作用。有研究表明, IL-8 在 DN 早期开始增高, 并随着 DN 的发展逐渐升高^[12]。本研究结果发现, IL-8 在 DN 各个证型中均明显升高, 在 DN III 期时各型无明显差异, 至 V 期时, 阴阳两虚血瘀型升高最明显, 其次为气阴两虚血瘀型, 其余两型升高不明显, 与 TNF- α 变化规律基本一致, 可作为 DN 不同中医证型的鉴别指标, 用于指导治疗。

综上所述, NF- κ B 通路相关细胞因子与 DN 不同中医证型具有相关性, 在 DN 不同证型的发生、发展起一定作用, 可作为 DN 不同中医证型的鉴别指标。然而, 由于 DN 的中医辨证分型缺乏统一性, 本研究中中医分型参考 DN 患者虚证与实证情况并结合长期的临床工作经验, 将纳入研究的 DN 病例进行分型, 未包括 DN 所有中医证型, 因此, 仍需加大样本量进行研究, 进一步探讨 NF- κ B 在 DN 发生、发展过程中的确切机制。

参考文献

- [1] Macisaac RJ, Premaratne E, Jerums G. Estimating glomerular filtration rate in diabetes using serum cystatin C [J]. *Clin Biochem Rev*, 2011, 32(2): 61-67.
- [2] Mezzano S, Aros C, Droguett A, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(10): 2505-2512.
- [3] 王海燕. 肾脏病学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 949-967.
- [4] 中华中医药学会肾病分会. 糖尿病肾病诊断、辨证分型及疗效评定标准(试行方案)[J]. *上海中医药杂志*, 2007, 41(7): 7-8.
- [5] 李琳, 李英. 糖尿病肾病进展风险及预后评估的研究进展

[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2015, 16(2): 169-171.

- [6] Xie X, Peng J, Chang XT, et al. Activation of RhoA/ROCK regulates NF-kappa B signaling pathway in experimental diabetic nephropathy[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 369(1/2): 86-97.
- [7] Wang T, Chen SS, Chen R, et al. Reduced beta 2 glycoprotein I improve diabetic nephropathy via inhibiting TGF-beta 1-p38 MAPK pathway[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(5): 6852-6865.
- [8] 廖新学, 孙胜楠, 郭瑞鲜, 等. JAK-STAT 通路调制 NF- κ B 介导 H₂O₂ 预处理的细胞保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(7): 1422-1427.
- [9] Brasier AR. The NF-kappa B regulatory network[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2006, 6(2): 111-130.
- [10] Dabhi B, Mistry KN. Oxidative stress and its association with TNF- α -308 G/C and IL-1 α -889 C/T gene polymorphisms in patients with diabetes and diabetic nephropathy [J]. *Gene*, 2015, 562(2): 197-202.
- [11] 叶赏和, 潘兴成, 胡国华, 等. 益气化痰汤对早期糖尿病肾病细胞因子水平干预的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(6): 1236-1238.
- [12] Perlman AS, Chevalier JM, Wilkinson P, et al. Serum inflammatory and immune mediators are elevated in early stage diabetic nephropathy[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2015, 45(3): 256-263.
- [13] Stefanidis I, Kreuer K, Dardiotis E, et al. Association between the interleukin-1 beta gene (IL-1 β) C511T polymorphism and the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes candidate gene association study[J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(7): 463-468.

(收稿日期: 2016-07-19 修回日期: 2016-11-17)

(上接第 897 页)

- [4] Mahmoodi BK, Kate MK, Wanders F, et al. High absolute risks and predictors of venous and arterial thromboembolic events in patients with nephritic syndrome results from a large retrospective cohort study[J]. *Circulation*, 2008, 117(2): 224-230.
- [5] 白杨, 沈凯. 肾病综合征时血栓形成的病理生理机制及临床诊治[J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(16): 2308-2310.
- [6] Kerlin B, Haworth K, Smoyer WE. Venous thromboembolism in pediatric nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2014, 29(26): 989-997.
- [7] Chaudesaygues E, Grasse M, Marchand L, et al. Nephrotic syndrome revealed by pulmonary embolism about four cases[J]. *Ann Cardiol Angeiol*, 2014, 63(5): 385-388.
- [8] Lee JK, Baek MS, Mok YM, et al. successfully treated femoral artery thrombosis in a patient with minimal change nephrotic syndrome[J]. *Chonnam Med J*, 2013, 49(1): 50-53.
- [9] 任保艳. 胱抑素 C 用于评估肾功能损害的临床价值[J].

临床合理用药, 2016, 9(6A): 143-144.

- [10] 王玉莲. 血清胱抑素 C 在慢性肾脏病中的临床意义[J]. *中国社区医师*, 2016, 32(18): 144-146.
- [11] 徐晓红. 肾病综合症患者检测凝血指标的临床意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(12): 1739-1740.
- [12] 王森, 张毅刚. 血清胱抑素 C 在心血管疾病中的研究进展[J]. *安徽医药*, 2016, 20(6): 1030-1033.
- [13] 朱红, 马丽娜, 杨伟, 等. 血清 NGAL 和 Cys-C 对老年冠心病患者早期肾损害的诊断价值[J]. *心血管康复医学杂志*, 2014, 23(2): 170-175.
- [14] 齐宏, 黄珊, 马祥生, 等. 同型半胱氨酸、高敏 C 反应蛋白及胱抑素 C 和脂蛋白相关磷脂酶 A2 与冠心病的相关性[J]. *广东医学*, 2014, 35(14): 2253-2256.
- [15] 李妍, 李芳, 肖婷, 等. 冠心病患者血清胱抑素 C 与髓过氧化物酶、Fractalkine 水平的变化及相关性[J]. *广东医学*, 2016, 37(9): 1311-1314.

(收稿日期: 2016-07-27 修回日期: 2016-11-25)