

• 论 著 •

ADAMTS13 和 TSP-1 在糖尿病视网膜病变的意义

吴志美¹, 喻海忠¹, 袁建芬¹, 王伟鹏²

(江苏省南通市中医院:1. 检验科;2. 眼科 226001)

摘要:目的 研究血管性血友病因子裂解蛋白酶(ADAMTS13)及凝血酶敏感蛋白-1(TSP-1)与糖尿病眼底视网膜病变(DR)的关系。**方法** 选取 114 例糖尿病患者分为单纯糖尿病(DM)组 38 例和糖尿病视网膜病变(DR)组 76 例,同时选取 30 例健康体检者作为对照组。用残余胶原结合试验法检测 ADAMTS13 活性;同时用酶联免疫吸附试验法检测血浆中 TSP-1 及血管性血友病因子(vWF)抗原水平。**结果** DM 组患者血浆中 ADAMTS13 活性低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),vWF 抗原和 TSP-1 水平均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);DR 组 ADAMTS13 活性明显低于 DM 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),vWF 抗原和 TSP-1 水平均高于 DM 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** ADAMTS13 活性降低及 TSP-1 水平升高可能导致糖尿病眼底视网膜病变的发生和发展。

关键词:糖尿病伴眼底视网膜病变; 血管性血友病因子裂解酶; 凝血酶敏感蛋白-1

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.19.024 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)19-2880-03

Significance of ADAMTS13 and TSP-1 in diabetic patients

WU Zhimei¹, YU Haizhong¹, YUAN Jianfen¹, WANG Weipeng²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Ophthalmology, Nantong Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 (ADAMTS13) and thrombospondin-1 (TSP-1) with diabetic retinopathy (DR). **Methods** One hundred and fourteen patients with diabetes were divided into the simple diabetes mellitus group (DM group, $n=38$) and DR group (DR group, $n=76$), while 30 healthy physical were selected as control group. The activity level of ADAMTS13 was measured by the residual collagen binding assay, meanwhile the plasma TSP-1 and von Willebrand factor (vWF) antigen levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The plasma ADAMTS13 activity level in the DM group was lower than that in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The levels of vWF antigen and TSP-1 were higher than those in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$); the ADAMTS13 activity level in the DR group was significantly lower than that in the DM group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), while the vWF antigen and TSP-1 levels were higher than those in the DM group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The decrease of ADAMTS13 activity and the increase of TSP-1 level may be involved in the occurrence and development of DR.

Key words: diabetic retinopathy; ADAMTS13; thrombospondin-1

糖尿病眼底视网膜病变(DR)是糖尿病患者最为常见的并发症,也是导致失明的主要原因。由于糖尿病患者血液血管性血友病因子(vWF)水平的增高而使血小板聚集能力增强,导致血栓,使眼底小血管和毛细血管发生闭塞,而体内调节 vWF 主要的酶有血管性血友病因子裂解蛋白酶(ADAMTS13)和凝血酶敏感蛋白-1(TSP-1)。ADAMTS13 是一种金属蛋白酶,其调节 vWF 的机制为通过裂解 vWF 将大分子量的 vWF 多聚体裂解成小分子的片段,而 vWF 多聚体增高是体内易形成血栓的原因之一^[1]。TSP-1 是一种黏附蛋白,是 vWF 的还原酶,通过与 ADAMTS13 竞争结合,抑制 ADAMTS13 对 vWF 的降解^[2]。本研究通过检测糖尿病患者体内 ADAMTS13 的活性及 TSP1 的水平,探讨其与 DR 的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 12 月至 2016 年 11 月本院收治的 114 例 2 型糖尿病患者纳入研究对象。所有患者均符合 2010 年世界卫生组织(WHO)制定的糖尿病诊断标准^[3],同时

根据国际 DR 分型标准^[4]将 114 例糖尿病患者分为伴发眼底视网膜病变(DR)组 76 例,未伴发眼底视网膜病变的单纯糖尿病(DM)组 38 例。其中 DR 组中男 40 例,女 36 例,DM 组男 18 例,女 20 例。所有患者年龄 35~82 岁,平均(63.6 ± 16.5)岁;选取健康体检者 30 例为对照组,男 14 例,女 16 例,年龄 45~72 岁,平均(61.23 ± 14.12)岁。排除全身感染、肿瘤、心功能衰竭、酮症酸中毒、近期应用肾毒性药物者。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 用 3.8%枸橼酸钠抗凝真空采血管获取 2 mL 抗凝管(2 管)血充分混匀。1 管用于检测 ADAMTS13 活性,1 管用于检测 vWF 抗原水平和 TSP-1 水平。以 3 000 r/min 速度离心 10 min,收集血浆置于-30 ℃冰箱保存。

1.2.2 应用残余胶原结合实验(R-CBA)测定血浆中 ADAMTS13 活性 (1)用Ⅲ型胶原(5 μg/mL)包被反应板,每孔 200 μL,4 ℃过夜;用 2.5%牛血清蛋白封闭。(2)分别取 2 份 50 μL 血浆,其中 1 份放入透析管,在 pH8.3 尿素 1.5 mol/L、

Tris-HCL 0.005 mol/L、Tween20 0.1% 的缓冲液中,37℃ 孵育 3 h;另 1 份血浆待用(室温保存)。(3)按 1:20 的比例将 2 份血浆稀释,取 100 μL 加入包被好的反应板中,37℃ 孵育 1 h;洗板,然后加入兔抗人 vWF 多抗,孵育 1 h,在加入的辣根过氧化物酶标记抗兔-IgG,孵育 1 h,洗板。(4)透析前后以波长 490 nm 比色,以透析前后的比值作为该份待测血样的 R-CBA,以 100% 减去 R-CBA 作为该份血样的 ADAMTS13 活性。

1.2.3 酶联免疫吸附试验(ELISA) 检测三组血浆中 vWF 抗原水平和 TSP-1 水平。依次向酶标板孔内加入标准品及待测样品、酶标记物,37℃ 水浴 30 min。洗板后加底物及显色剂,10 min 后加终止液;在酶标仪上以 450 nm 读取 A 值,根据标准曲线得到患者标本中 vWF 抗原水平和 TSP-1 水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件对所得数据进行统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验,相关性采用 Pearson 相关分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 三组结果比较 DR 组 vWF 抗原水平明显高于 DM 组,DM 组 vWF 抗原水平明显高于对照组;DR 组 ADAMTS13 活性明显低于 DM 组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),DM 组 ADAMTS13 活性抗原水平明显低于对照组;DR 组 TSP-1 水平明显高于 DM 组和对照组,DM 组 TSP-1 明显高于对照组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 三组 vWF 抗原、ADAMTS13、TSP1 结果比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	vWF 抗原(mg/L)	ADAMTS13(%)	TSP-1(mg/L)
对照组	30	5.32±1.26	98.75±9.74	20.65±6.74
DM 组	38	12.55±2.89	60.28±6.92	26.63±8.33
DR 组	76	19.74±6.51	42.87±6.58	31.61±10.79

2.2 Pearson 相关分析 对糖尿病视网膜病变患者血浆中 ADAMTS13 的活性与 TSP-1 水平进行相关性分析:ADAMTS13 活性水平与 TSP-1 水平呈负相关(*r* = -0.724),差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 1。

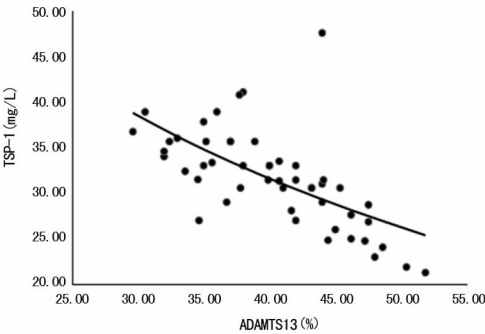


图 1 ADAMTS13 与 TSP-1 的相关性分析

3 讨 论

微血管病变是糖尿病患者的特征性病变,主要累及肾脏、眼和心内微血管。眼底微血管结构和功能的变化是导致眼底视网膜病变的病理基础,其中多因素导致的血管内皮细胞损伤是糖尿病患者发生血管病变的主要原因。而患者止血功能的改变及微血栓形成与眼底视网膜病变发生、发展密切相关[3]。

vWF 是血浆中的一种具有黏附功能的糖蛋白,在内皮细胞受刺激或损伤时,血浆 vWF 水平升高,介导血小板在血管损伤部位的黏附,增加了微血栓形成。

ADAMTS13 属于锌金属蛋白酶,2001 年通过 Northern 印迹法首次在肝脏中检出[4],健康人群血浆中 ADAMTS13 的活性为 50%~78%[5]。国外对 ADAMTS13 在血栓性血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮及脑梗死患者中的研究较多,显示 ADAMTS13 在患者体内分泌明显减少,与其发病有明显的相关性[6-8],但在 DR 患者中的报道较少。本试验通过研究 DR 患者血浆中 ADAMTS13 活性的结果显示,DR 患者血浆中的 ADAMTS13 活性低于 DM 组及对照组,而 vWF 抗原水平明显高于 DM 组及对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。ADAMTS13 对眼底微血管的作用是通过裂解 vWF 而起间接作用。ADAMTS13 末端为含有金属蛋白酶的结构域,一个去整合素的结构域,富含半胱氨酸,通过蛋白水解裂解 vWF 氨基酸之间的肽键,大分子 vWF 被裂解为小分子肽段。而体内 ADAMTS13 活性降低可导致血浆中超大结构的 UL-vWF 不能被及时降解,超大的 vWF 多聚体在体内水平增高,介导血小板黏附于内皮下胶原的能力明显增强,使得血小板易于黏附到血管壁的受损处或在微血管中聚集处,从而更易形成微血栓,使眼部小血管和毛细血管发生闭塞,血流停滞,组织缺氧,发生视网膜病变。因此,ADAMTS13 活性降低是间接导致 DR 的原因之一。

TSP-1 是一种重要的细胞外基质糖蛋白,能影响及调控内皮细胞的功能。本研究结果显示,DR 患者血浆中的 TSP-1 水平明显高于 DM 组及对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),与连连[9]研究结果相一致。本研究同时分析了患者血浆中 ADAMTS13 活性与 TSP-1 的相关性,显示血浆中 ADAMTS13 活性与 TSP-1 的水平呈负相关。TSP-1 参与 DR 的发展过程,可能有以下两方面的作用:(1)通过与 ADAMTS13 竞争性地与 vWF 结合,从而抑制 ADAMTS13 的活性[10],使 ADAMTS13 不能有效地裂解大分子 vWF,从而更易形成微血栓。(2)TSP-1 是目前较为重要的血管抑制因子,TSP-1 在视网膜周细胞的增殖扩散和迁移中起了重要作用并影响视网膜血管的发育和动态平衡;视网膜损伤后,TSP1 表达起着至关重要的作用,对眼部血管稳态调节细胞功能有显著的影响[11]。

综上所述,血浆 ADAMTS13 活性及 TSP1 水平与 DR 发生、发展密切相关,在国内外已引起越来越多的关注,重组 ADAMTS13 及研发针对 TSP-1 的药物可能成为新的一类抗血栓药物,在糖尿病引起的微血管病变的治疗中有一定的临床意义。

参考文献

[1] 李雪美,江森,赵益明. 血管性血友病因子的研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2013,21(3):801-805.

[2] Wang A, Liu F, Ruan C, et al. Thrombospondin-1 and ADAMTS13 competitively bind to vWF A2 and A3 domains in vitro[J]. Thromb Res,2010,126(4):260-265.

[3] 宾蓉,刘露. 背景期、增殖期糖尿病视网膜病变凝血功能异常变化的临床研究[J]. 血栓与止血,2016,22(4):428-430.

(下转第 2884 页)

本研究表明,CRP 水平逐步上升,变化幅度差异无统计学意义($P>0.05$)。其水平的变化是由于本身炎症反应引起,因此能够在采取外科手术干预后下降。本研究结果中,AL 组由于静脉营养的支持,血清 ALB 水平呈上升趋势,非 AL 组 ALB 继续保持低水平状态,说明机体处于高代谢水平,外源营养物能够促进代谢,未转化为合成代谢^[12-13]。

健康者体内的 PCT 水平很低,当发生脓毒症或者感染时 PCT 水平上升,术后无并发症感染的患者 PCT 水平可快速下降,若产生并发症,则会出现差异。其他研究结果表明,肺部感染性疾病及脓毒血症的发生都可以利用 PCT 进行早期诊断。之前研究也表明,AL 组患者的 PCT 水平明显升高,尽管存在争议,PCT 依然被认为是细菌感染的早期诊断的特异性指标^[11]。PCT 的灵敏度存在局限性,但变化幅度可以作为预测吻合口瘘的因素之一。若患者 PCT 水平在术后快速上升,则极有可能与术后吻合口瘘具有相关性。

本研究显示,术后血清 PCT 水平升高、CRP 维持高水平、ALB 维持低水平与吻合口瘘行成有关,提示医生需要对患者进行严密的观察,防止恶化。血清 PCT、CRP 与 ALB 检测可对食管癌术后早期吻合口瘘进行诊断,帮助患者加快恢复健康。

参考文献

[1] 郭春霞,高社干. 血清和糖皮质激素调节蛋白激酶在食管癌组织中的表达及临床意义[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(9):786-788.

[2] 尤静,朱广迎. 食管癌放化疗相关进展[J]. 中国癌症防治杂志, 2014, 6(4):327-331.

[3] 郭伟,龚太乾,蒋耀光,等. 366 例电视胸腔镜食管癌切除术中及术后并发症分析[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2014, 30(3):145-148.

[4] 袁静,卢航青,郑康,等. 右美托咪定对食管癌患者围术期免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(1): 59-61.

[5] 张胜,孔敏,崔可,等. 降钙素原对食管癌根治术后吻合口瘘早期诊断的意义[J]. 中华全科医学, 2015, 13(4):526-528.

[6] 王琪,吴明,沈钢,等. 快速康复外科在微创食管癌切除术中的应用[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2013, 29(6): 349-353.

[7] 郝曙光,刘平侯,夏宝,等. 血清降钙素原、C 反应蛋白联合白蛋白预测食管癌术后早期吻合口瘘的应用价值[J]. 2016, 33(3):791-793.

[8] 高会清. 护理干预在老年食管癌患者手术治疗中的应用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(94):411-422.

[9] 林艺兰,钟原. 厦门市居民 2005—2014 年食管癌死亡的流行病学研究[J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(8):709-712.

[10] Wu N, Chen G, Hu H, et al. Low pretherapeutic serum albumin as a risk factor for poor outcome in esophageal squamous cell carcinomas[J]. Nutr Cancer, 2015, 67(3): 481-485.

[11] Meyer ZC, Schreinemakers JM, Mulder PG, et al. Procalcitonin in the recognition of complications in critically ill surgical patients[J]. J Surg Res, 2014, 187(2):553-558.

[12] 彭宗玉,李淑平,温红. 中段食管癌术后预防性放疗临床研究[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(15):2331-2332.

[13] 李璞璞,陈新峰,平玉,等. 食管癌患者外周血 MAGE-C2 抗原特异性 CD8⁺T 细胞的功能及临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(4):476-480.

(收稿日期:2017-03-03 修回日期:2017-05-12)

(上接第 2880 页)

[4] Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor cleaving protease(ADAM TS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. J Biol Chem, 2001, 276(44):41059-41163.

[5] Eyraudier A, Obert B, Houllier A, et al. Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases[J]. Blood, 2001, 98(6):1765-1772.

[6] Rurali E, Banterla F, Donadelli R, et al. ADAMTS13 Secretion and Residual Activity among Patients with Congenital Thrombotic Thrombocytopenic Purpura with and without Renal Impairment[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2015, 10(11):2002-2012.

[7] Martin-Rodriguez S, Reverter JC, Tàssies D, et al. Reduced ADAMTS13 activity is associated with thrombotic risk in systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2015, 24(11):1143-1149.

[8] Qu L, Jiang M, Qiu W, et al. Assessment of the diagnostic value of plasma level, activity, ratios between von willebrand factor and ADAMTS13 in patients with cerebral infarction[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2016, 22(3):252-259.

[9] 连连. 2 型糖尿病视网膜病变患者血清血小板反应蛋白-1 和高敏 C 反应蛋白的变化及临床意义[J]. 临床医药实践, 2016, 25(7):513-515.

[10] Novelli EM, Kato GJ, Hildesheim ME, et al. Thrombospondin-1 inhibits ADAMTS13 activity in sickle cell disease[J]. Haematologica, 2013, 98(11):132-134.

[11] Farnoodian M, Kinter JB, Yadranji AS, et al. Expression of pigment epithelium-derived factor and thrombospondin-1 regulate proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells[J]. Physiol Rep, 2015, 3(1):256-267.

(收稿日期:2017-01-21 修回日期:2017-03-26)