·论　　著·

抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎患者中 MIF 及 MCP-1 的检测及临床意义*

张铭明，张　锐，杨小珂，帅宗文△

（安徽医科大学第一附属医院风湿免疫科，安徽合肥 230022）

摘　要：目的　探讨抗中性粒细胞胞浆抗体（ANCA）相关性血管炎（AASV）患者中巨噬细胞迁移抑制因子（MIF）及单核细胞趋化蛋白（MCP）-1 的检测及临床意义。**方法**　采用酶联免疫吸附试验（ELISA）法检测 84 例 AASV 患者（疾病组）和 60 例体检健康者（健康对照组）血清中 MIF 及 MCP-1 水平，同时测定疾病组特异性自身抗体及一般实验室指标：肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-6、尿素氮（BUN）、肌酐（Cr）、补体 C3、C4、红细胞沉降率（ESR）、超敏 C-反应蛋白（hs-CRP）进行相关性分析。**结果**　疾病组血清中 MIF 及 MCP-1 水平明显高于健康对照组；高滴度 ANCA 患者 MIF 及 MCP-1 水平高于阴性及低滴度 ANCA 患者，差异有统计学意义（$P<0.05$）；高滴度 ANCA 患者中 TNF-α、IL-6、Cr、hs-CRP、髓过氧化物酶（MPO）水平高于阴性及低滴度 ANCA 患者，差异有统计学意义（$P<0.05$）；疾病组血清中 MIF 及 MCP-1 水平均与 BUN、Cr、MPO、hs-CRP、TNF-α、IL-6 水平呈正相关（$r=0.241\sim0.556$，$P<0.05$），且疾病组血清中 MIF 与 MCP-1 水平之间呈正相关（$r=0.312$，$P=0.004$）。**结论**　AASV 患者血清中 MIF 及 MCP-1 水平明显升高，尤其对于高滴度 ANCA 及肾脏受累严重的患者，MIF 及 MCP-1 水平升高更明显，提示血清中 MIF 及 MCP-1 水平在 AASV 发病机制中有重要作用，可作为 AASV 病情活动的监测指标。

关键词：抗中性粒细胞胞浆抗体；　血管炎；　趋化蛋白；　自身抗体

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2020.13.011　　**中图法分类号：**R593.27；R446.6

文章编号：1673-4130(2020)13-1581-04　　**文献标识码：**A

The study of MIF and MCP-1 in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis*

ZHANG Mingming, ZHANG Rui, YANG Xiaoke, SHUAI Zongwen△

(*Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui* 230022, *China*)

Abstract: Objective　To investigate the clinical significance of macrophage migration suppressor factor (MIF) and monocyte chemotactic protein (MCP)-1 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) associated systemic vasculitis (AASV) patients. **Methods**　The serum levels of MIF and MCP-1 in 84 AASV patients (disease group) and 60 healthy persons (healthy control group) were measured by ELISA methods. At the same time, the specific autoantibodies and general laboratory indexes, namely tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-6, urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), complement C3, C4, erythrocyte sedimentation rate (ESR), high sensitive C-reactive protein (hs-CRP) of disease group were determined. **Results**　The serum levels of MIF and MCP-1 in the disease group were significantly higher than those in healthy controls. The levels of MIF and MCP-1 in high titer ANCA patients were higher than those in negative and low titer ANCA patients, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of TNF-α, IL-6, Cr, hs-CRP and myeloperoxidase (MPO) in patients with high titer ANCA were higher than those in patients with negative and low titer ANCA, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of MIF and MCP-1 were positively correlated with the levels of BUN, Cr, MPO, hs-CRP, TNF-α and IL-6 in disease group ($r=0.241-0.556$, $P<0.05$), and the level of MIF was positively correlated with the level of MCP-1 ($r=0.312$, $P=0.004$). **Conclusion**　The serum level of MIF and MCP-1 were increased significantly in AASV patients.

*　**基金项目：**上海上药中西制药有限公司科研专项基金项目（ZXF2017003）。

作者简介：张铭明，男，副主任技师，主要从事自身免疫方面的研究。　△　**通信作者**，E-mail：amushuaizw@163.com。

本文引用格式：张铭明，张锐，杨小珂，等. 抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎患者中 MIF 及 MCP-1 的检测及临床意义[J]. 国际检验医学杂志，2020，41(13)：1581-1584.

Especially for the patients with high titer ANCA and with severe renal involvement, the level of MIF and MCP-1 increased more obviously. It is suggested that the serum levels of MIF and MCP-1 play an important role in the pathogenesis of AASV, and can be used as AASV monitoring indicator of disease activity.

Key words: anti-neutrophil cytoplasmic antibody;　vasculitis;　chemotactic protein;　autoantibodies

抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关性血管炎(AASV)是一组由不同病因引起的血管炎症性疾病，发病机制复杂，可能与免疫复合物介导的血管炎症损伤及免疫调节机制有关，遗传、感染及环境也是血管炎的致病因素。AASV 可累及全身任何部位的大小血管及动静脉血管，尤其对肾脏和肺受累最为常见，临床表现复杂，变化多端，可呈隐匿性或急性发作，引起器官组织损伤。AASV 最为明显的特征是出现 ANCA，这些特异性自身抗体的表达对 AASV 患者的某些临床特点及相关脏器损伤具有一定的指示意义。巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)作为一种多功能免疫调节细胞，可以通过促进单核细胞趋化蛋白(MCP)-1 的表达，在促炎、趋化、内皮细胞黏附等方面发挥重要作用[1-2]。为进一步探讨这些细胞因子在 AASV 发病机制中所起的作用，笔者对其进行检测并进行相关性分析，旨在帮助病情评估及预后判断，为 AASV 患者的临床监测治疗提供新的思路。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集安徽医科大学第一附属医院 2017 年 1 月至 2019 年 5 月风湿免疫科 AASV 住院患者 84 例为疾病组，其中男 33 例，女 51 例，年龄 22～84 岁，平均(67.64±12.23)岁。纳入标准：(1)符合 2012 年美国查珀尔希尔共识会议(CHCC)系统性血管炎的分类诊断标准[3]者；(2)临床资料真实详细完整者；(3)既往无高血压糖尿病者。排除标准：(1)不符合 AASV 的诊断标准者；(2)表现为 ANCA 阳性的急慢性感染、肿瘤、炎症性肠病等患者；(3)临床资料不完整者。健康对照组为体检中心提供的 60 例体检健康者，其中男 19 例，女 41 例，年龄 16～68 岁，患者均排除急慢性感染、风湿免疫性疾病及家族史，研究程序符合医学伦理委员会制订的伦理学标准并获得批准，健康对照组与疾病组在年龄及性别构成上差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2　仪器与试剂　MIF、MCP-1 试剂盒由美国 R&D Systems 公司提供，肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6 试剂盒购自美国 Biolegend 公司，检测均采用酶联免疫吸附试验(ELISA)；ANCA 间接免疫荧光法和特异性自身抗体谱分析(化学发光法)检测试剂盒分别由北京欧蒙公司和西班牙 WerFen 公司提供。全自动荧光分析仪型号为德国欧蒙公司 Sptingter XL；全自身化学发光仪为西班牙 WerFen Bioflash；荧光显微镜型号为日本 Olympus BX51。

1.3　标本的采集与检测　采集所有研究对象外周血，1 000 r/min 离心 10 min 以分离血清，－80 ℃保存标本，TNF-α、IL-6、MIF 及 MCP-1 按照说明书进行，待测标本及标准品经加样、酶标抗体、底物工作液、终止液、450 nm 酶标仪检测等 ELISA 步骤完成；ANCA 荧光以 1∶10 为起始稀释度，按照说明书进行间接免疫荧光法检测，将待测标本及质控品经加样、荧光素标记抗体、封片、荧光显微镜半定量判读，1∶10 及以上判为阳性，阳性标本梯度稀释继续检测。ANCA 根据间接免疫荧光法荧光染色形态的不同分为核周型(p-ANCA)和胞浆型(c-ANCA)。ANCA 特异性靶抗原髓过氧化物酶(MPO)和蛋白酶 3(PR3)由化学发光法上机检测；补体 C3、C4、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)指标数据由医院检验科生化室提供，红细胞沉降率(ESR)数据由临检室提供。

1.4　统计学处理　所有数据采用 SPSS19.0 统计软件进行分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，实验组间两两比较采用双侧 t 检验进行分析，相关性分析采用 Pearson 相关分析，以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　两组血清中 MIF 及 MCP-1 水平比较　疾病组血清中 MIF 及 MCP-1 水平明显高于健康对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)，见表 1。

表 1　两组血清中 MIF 及 MCP-1 水平比较($\bar{x}\pm s$，pg/mL)

组别	n	MIF	MCP-1
疾病组	84	89.23±25.98[a]	293.37±47.50[a]
健康对照组	60	31.29±8.15	161.05±24.68
t		16.69	15.66
P		0.000	0.000

注：与健康对照组比较，[a]$P<0.05$。

2.2　AASV 高滴度 ANCA 患者与阴性及低滴度 ANCA 患者之间实验室指标比较　高滴度 ANCA 患者与阴性及低滴度 ANCA 患者之间，MIF、MCP-1、TNF-α、IL-6、Cr、hs-CRP 和 MPO 水平差异有统计学意义($P<0.01$)，其他指标差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.3　AASV 患者血清中 MIF 及 MCP-1 水平与临床指标的相关性分析　AASV 患者血清中 MIF 及 MCP-1 水平均与 BUN、Cr、MPO、CRP、TNF-α、IL-6 水平呈正相关($r=0.241\sim0.556$，$P<0.05$)，而与血清中 C3、C4、ESR、PR3 不相关($P>0.05$)。见表 3。

2.4　AASV 患者血清中 MIF 与 MCP-1 水平的相关性分析　AASV 患者血清中 MIF 与 MCP-1 水平呈正相关（$r=0.312$，$P=0.004$）。见图 1。

表 2　AASV 高滴度 ANCA 患者与阴性及低滴度 ANCA 患者之间实验室指标比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	MIF(pg/mL)	MCP-1(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	BUN(mmol/L)	Cr(μmol/L)
高滴度 ANCA	54	96.04±27.44[a]	302.19±51.33[a]	201.48±36.40[a]	84.94±18.40[a]	5.30±1.53	69.79±20.45[a]
阴性及低滴度 ANCA	30	76.97±17.7	277.49±35.17	177.84±23.26	68.24±14.60	4.85±1.16	59.87±15.89
组别	n	C3(g/L)	C4(g/L)	hs-CRP(mg/L)	ESR(mm/h)	MPO	PR3
高滴度 ANCA	54	0.95±0.22	0.22±0.06	8.42±5.92[a]	32.80±16.46	51.38±20.19[a]	14.52±6.58
阴性及低滴度 ANCA	30	0.89±0.25	0.21±0.07	5.94±2.18	30.93±14.14	32.23±14.24	6.58±2.17

注：与阴性及低滴度 ANCA 比较，[a]$P<0.05$。

表 3　ANCA 患者血清中 MIF 及 MCP-1 水平与临床指标的相关性分析

指标	MIF		MCP-1	
	r	P	r	P
TNF-α(pg/mL)	0.311	0.004	0.295	0.007
IL-6(pg/mL)	0.422	0.000	0.316	0.003
BUN(mmol/L)	0.241	0.028	0.451	0.000
Cr(umol/L)	0.356	0.001	0.327	0.002
C3(g/L)	0.039	0.723	−0.051	0.648
C4(g/L)	−0.131	0.236	−0.078	0.483
hs-CRP(mg/L)	0.323	0.003	0.436	0.000
ESR(mm/h)	−0.073	0.508	0.079	0.473
MPO	0.302	0.005	0.556	0.000
PR3	0.004	0.969	0.031	0.776

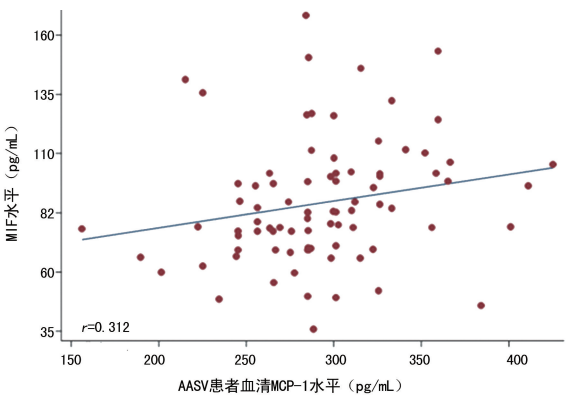


图 1　AASV 患者血清中 MIF 与 MCP-1 水平相关性散点图

3　讨　论

MIF 是由多种细胞合成具有多效炎性介质功能的细胞调节因子，它既可以作为信号分子介导免疫调节功能，又可以通过自分泌和旁分泌方式进行自体和微循环调节。MIF 在炎性疾病及代谢性疾病中发挥着重要作用，其通过与趋化因子（CXC）家族及 CD74 受体结合，以受体复合物（CXCR2/CD74、CXCR4/74）的形式，进行信号传递介导[4-6]。MCP-1 是由多种细胞产生，趋化和激活各种免疫细胞，发挥促炎、趋化、内皮细胞黏附作用的可溶性碱性蛋白质趋化因子，MCP-1 与 CC 类趋化因子受体 2 和 4（CCR2、CCR4）结合形成受体复合物，诱导黏附分子 VCMA-1 和 ICAM-1 的表达，释放多种炎性细胞因子（TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 等），在炎症性疾病及血管炎症损伤修复中发挥重要的生物学作用[7-8]。因此，本研究旨在通过检测 AASV 患者血清中 MIF 及 MCP-1 水平，分析其与临床指标、疾病活动的关系及它们之间的关联性来探讨其在 AASV 疾病发展中的作用。

AASV 是一种由不同病因引起的血管炎性疾病，在疾病的不同阶段有炎性因子浸润和抗原、免疫球蛋白及补体的沉积，侵犯机体的不同器官，尤其对肾、肺等器官造成致命性损伤。本研究发现，AASV 患者血清中 MIF 及 MCP-1 水平较健康对照组明显升高，而且在高滴度 ANCA 患者中尤其明显。ANCA 滴度与疾病活动及疾病复发存在明显相关性，AASV 患者经过积极对症治疗后 ANCA 滴度水平可下降，进一步说明 MIF 及 MCP-1 水平与疾病活动性相关。MIF 主要由血管内皮细胞、T 细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞等分泌，在炎性反应发生之前 MIF 就可以聚集在这些细胞中，诱导炎性反应产生后，MIF 即被释放出来[9]，与此同时，MIF 的相关受体细胞 CD74、补体 CR2 和补体 CR4 等也被分泌出来，形成受体复合物，进行信号传导，诱导一系列炎症因子（TNF-α、IL-1、IL-1β、IL-6、IL-8 等）的产生[5]。

AASV 肾损伤通常表现为急进性肾炎，伴肾功能不全[10-11]。本研究发现高滴度 ANCA 患者与阴性及低滴度 ANCA 患者之间，Cr 水平差异有统计学意义，表明高滴度 ANCA 患者肾受累严重，引起急进性肾炎，虽然肾活检有助于明确 AASV 的鉴别诊断、病理特点、预后评判，但不是所有 AASV 患者都有肾活检的适应证，因此，高滴度的 ANCA 及高特异性的 MPO 抗体水平对诊断 AASV 更有判断价值。

本研究发现，MIF 及 MCP-1 水平与 AASV 患者

BUN、Cr、CRP、MPO、TNF-α、IL-6 水平呈正相关，说明 MIF 及 MCP-1 水平升高可能诱导一系列炎症因子的产生，参与 AASV 发病，促进疾病发展，导致肾功能的进一步损伤，说明 MIF 及 MCP-1 在加剧炎症组织促炎细胞因子和趋化因子的表达中起到十分重要的作用，可作为炎症活动的重要指标[7,12]。MIF 和 MCP-1 不仅在炎症发生、发展中起重要作用，还在内皮细胞激活修复、促进血管新生中起重要作用，在血管炎症发生部位，能够提高血管内皮细胞生长因子水平，促进血管内皮的活化[13-14]。本研究还发现 MIF 与 MCP-1 水平在 AASV 患者血清中呈正相关，笔者推测 MIF 一方面可能通过促进炎症因子和趋化因子的表达，从而在炎症微环境中发挥促炎作用；另一方面，一些炎症介质和趋化因子受体复合物，如 TNF-α、IL-6、MCP-1-CCR2/4 等，通过核因子 κB（NF-κB）激活蛋白系统反过来刺激单核巨噬细胞、T 细胞、上皮细胞，促进 MIF 的表达[5]。这时，MIF 作为这些炎症介质的下游效应分子，形成正反馈效应，促进和放大局部的炎性反应，募集更多的炎症细胞和趋化因子及复合物向炎症部位浸润，加速炎性反应的进展过程，如慢性肾脏血管炎症性疾病的产生。

MIF 有促炎细胞作用，相反，抗 MIF 抗体则有拮抗炎性细胞的作用，应用抗 MIF 抗体作用于炎性部位，会导致炎性因子（TNF-a、IL-1、IL-1β、IL-6 等）水平的降低[15-16]。因此，为了深入探讨 MIF、MCP-1 介导的 AASV 发病机制及其生物学功能，可溶性 MIF、MCP-1 蛋白的制备及抗 MIF、MCP-1 抗体拮抗剂的制备成为治疗 AASV 新的发展方向。

4　结　　论

MIF 及 MCP-1 水平与 AASV 病情活动密切相关，推测这两种蛋白水平的过度表达可能参与病情的发生、发展，MIF 和 MCP-1 可能是监测疾病活动和调节自身免疫性炎症疾病新的标志物。因此，关于如何抑制这两种蛋白水平的表达，并将其抗体及受体拮抗剂应用于炎症及免疫相关疾病治疗的研究具有重要价值。

参考文献

[1] ASSIS D N, TAKAHASHI H, LENG L, et al. A macrophage migration in hibitory factor polymorphism is associated with autoimmunehepa-titis severity in US and Japanese patients[J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(12): 3506-3512.

[2] LEE Y H, SONG G G. Urinary MCP-1 as a biomarker for lupus nephritis: a meta analysis[J]. Z Rheumatol, 2017, 76(4): 357-363.

[3] JENNETTE J C, FALK R J, BACON P A, et al. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides[J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(1): 1-11.

[4] CHAN P C, WU T N, CHEN Y C, et al. Targetted inhibition of CD74 attenuates adipose COX-2-MIF-mediated M1 macrophage polarization and retards obesity-related adipose tissue inflammation and insulin resistance[J]. Clin Sci, 2018, 132(14): 1581-1596.

[5] SU Y, WANG Y J, ZHOU Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor activates inflammatory responses of astrocytes through interaction with CD74 receptor[J]. Oncotarget, 2017, 8(2): 2719-2730.

[6] BERNHAGEN J, KROHN R, LUE H, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment[J]. Nat Med, 2007, 13(5): 587-596.

[7] HJORT G M, LARSEN O, STEEN A, et al. Differential CCR7 targeting in dendritic cells by three naturally occurring CC-Chemokines[J]. Front Immunol, 2016, 9(7): 568-582.

[8] LIM S Y, YUZHALIN A E, GORDON-WEEKS A N, et al. Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis[J]. Oncotarget, 2016, 7(19): 28697-28710.

[9] SIMONS D, GRIEB G, HRISTOV M, et al. Hypoxia induced endothelial secretion of macrophage migration in hibitory factor and role in endothelial progenitor cell recruitment[J]. J Cell Mol Med, 2011, 15(3): 668-678.

[10] 季中菊，王梅红，李静，等. 抗中性粒细胞胞质抗体相关小血管炎患者抗体滴度与其临床特点及预后的相关性研究[J]. 中国全科医学，2016，19(14)：1642-1646.

[11] 廖蕴华，王成玉，薛超，等. ANCA 相关性系统性小血管炎并肾损害患者肾组织血管内皮生长因子的表达[J]. 临床与实验病理学杂志，2010，26(5)：548-551.

[12] TOGNARELLI S, GAYET J, LAMBERT M, et al. Tissue specific micro vascular endothelial cells show distinct capacity to activate NK cells: implications for the pathophysiology of granulomatosis with polyangiitis[J]. J Immunol, 2014, 192(7): 33399-33408.

[13] 骆翠玲，南江草. MCP-1、MIF 在过敏性紫癜小儿肾功能异常预测中的价值[J]. 临床医学研究与实践，2018，3(34)：114-115.

[14] 张真如. 尿蛋白四项与 IGF-1、MCP-1 水平在过敏性紫癜患儿中的变化及与肾损伤的关系研究[J]. 国际检验医学杂志，2018，39(16)：2008-2010.

[15] GRIEB G, MERK M, BERNHAGEN J, et al. Macrophage migration in hibitory factor (MIF): a promising biomaker[J]. Drug News Perspect, 2010, 23(4): 257-264.

[16] 张启芳，王柏涛，郑奕，等. 抗巨噬细胞移动抑制因子单抗对溃疡性结肠炎小鼠治疗效果及炎症因子水平的影响[J]. 广西医学，2016，38(5)：615-618.

（收稿日期：2019-12-10　修回日期：2020-02-22）