

• 论 著 •

糖尿病肾病患者血清肌肉生长抑制素水平与血管钙化的相关性分析

马 懿, 曾蜀春

四川绵阳四〇四医院肾脏内科, 四川绵阳 621053

摘要:目的 探讨糖尿病肾病(DN)患者血清肌肉生长抑制素(myostatin)水平及其与血管钙化的关系。方法 选取 2019 年 5 月至 2021 年 5 月该院收治的 120 例 DN 患者作为病例组, 根据 Mogenson 分期标准及相关检查进一步分为病例 A 组(DN I / II 期)、病例 B 组(DN III 期)、病例 C 组(DN IV 期)、病例 D 组(DN V 期), 另选取同期于该院体检的健康者 30 例作为对照组。采用彩超检查颈部血管钙化情况, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 myostatin 水平。绘制受试者工作特征(ROC)曲线评估血清 myostatin 水平对 DN 患者出现血管钙化的预测价值。结果 病例 A 组与对照组血清 myostatin 水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 而病例 B、C、D 组血清 myostatin 水平低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。病例 A、B、C、D 组颈总动脉钙化率高于对照组, 病例 D 组颈总动脉钙化率高于病例 A、B 组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。DN 血管钙化患者钙磷乘积、CRP 水平高于非血管钙化患者, 而 myostatin 水平低于非血管钙化患者, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。相关性分析显示, myostatin 与钙磷乘积、CRP 呈负相关($r = -0.293, -0.361, P = 0.015, 0.019$)。血清 myostatin、CRP、钙磷乘积预测 DN 患者出现血管钙化的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.734、0.683、0.698。多因素 Logistic 回归分析显示, 高水平 myostatin 是 DN 患者发生血管钙化保护因素, 高 CRP、高钙磷乘积是 DN 患者发生血管钙化危险因素($P < 0.05$)。结论 DN 患者血清 myostatin 水平升高, 且合并血管钙化的 DN 患者血清 myostatin 水平更高, 血清 myostatin 对 DN 患者血管钙化具有一定的预测价值, 有望作为 DN 患者血管钙化早期生物标志物。

关键词:糖尿病肾病; myostatin; 血管钙化; 相关性; 生物标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.16.022

中图法分类号:R587.2;R692.9

文章编号:1673-4130(2022)16-2020-04

文献标志码:A

**Correlation between serum myostatin level and vascular calcification
in patients with diabetic nephropathy**

MA Yi, ZENG Shuchun

Department of Nephrology, Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang, Sichuan 621053, China

Abstract: **Objective** To explore the correlation between serum myostatin level and vascular calcification in patients with diabetic nephropathy (DN). **Methods** A total of 120 patients with DN treated in this hospital from May 2019 to May 2021 were selected as case group. According to Mogenson staging criteria and related examinations, the case group was further divided into case A group (stage I / II), case B group (stage III), case C group (stage IV), and case D group (stage V). Another 30 people who underwent physical examination in this hospital during the same period were selected as control group. Cervical vascular calcification was examined by color Doppler ultrasound, and serum myostatin level was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Receiver operating characteristic (ROC) curves were drawn to evaluate the predictive value of serum myostatin for vascular calcification in DN patients. **Results** There was no significant difference in serum myostatin between case A group and control group ($P > 0.05$), while the serum myostatin of case B, C, and D groups was lower compared with the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The carotid artery calcification rate of case A, B, C, and D groups was higher than that of the control group, and the carotid artery calcification rate of the case D group was higher than that of the case A and B groups, with statistical significance ($P < 0.05$). The $\text{Ca}^{2+} \times \text{P}^{3-}$ and CRP level in DN patients with vascular calcification were higher than those in non-vascular calcification, while the myostatin level was lower than that in non-vascular calcification ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that myostatin negatively correlated with $\text{Ca}^{2+} \times \text{P}^{3-}$ and CRP level ($r = -0.293, -0.361, P = 0.015, 0.019$). The area under the ROC curve (AUC) of serum myostatin, CRP level and $\text{Ca}^{2+} \times \text{P}^{3-}$ predicting the vascular calcification in DN were 0.734, 0.683 and 0.698. Multivariate Logistic regression analysis showed that high level of myostatin was a protective factor for

作者简介:马懿,女,副主任医师,主要从事肾脏病及血液净化方向研究。

vascular calcification in DN patients, while high CRP and high calcium-phosphorus product were risk factors for vascular calcification in DN patients ($P < 0.05$). **Conclusion** Serum myostatin level is elevated in patients with DN, and the serum myostatin level in DN patients with vascular calcification is higher. Serum myostatin has a certain predictive value for vascular calcification in patients with DN, and is expected to be a biomarker for early vascular calcification in patients with DN.

Key words: diabetic nephropathy; myostatin; vascular calcification; correlation; biomarker

糖尿病是常见的慢性病之一。我国糖尿病患者数量居全球第一位。在糖尿病导致的死亡原因中,心血管并发症占首位,而糖尿病肾病(DN)是糖尿病常见的微血管并发症,发生率为 35% 左右^[1]。血管钙化则是 DN 患者心血管并发症的主要表现之一^[2]。DN 患者在糖尿病与肾病双重促血管钙化因素的作用下,血管钙化的发生率及重症率明显高于其他糖尿病患者。有研究表明,微炎症反应参与了 DN 的发病过程,这种炎症反应是以细胞因子驱动为特征的慢性亚临床炎症过程^[3]。肌肉生长抑制素(myostatin)也称为生长分化因子-8(GDF-8),属于转化生长因子- β 超家族成员,参与调节骨骼的合成和肌肉蛋白降解^[4]。myostatin 主要产生于肌肉组织,能抑制骨骼肌的生长,其表达水平降低会导致肌肉肥大发生,而较高的 myostatin 水平与腹膜透析患者较高的肌肉质量有关。有研究显示,myostatin 水平升高与血管炎症和动脉粥样硬化紧密相关^[5],但关于血管钙化相关的临床数据很少。本研究拟探讨 DN 患者血清 myostatin 水平与血管钙化的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 5 月至 2021 年 5 月在本院住院治疗的 120 例 DN 患者作为病例组,其中男 68 例、女 52 例,平均年龄(47.3 ± 6.5)岁。纳入标准:(1)年龄 19~69 岁;(2)诊断符合 WHO 糖尿病诊断和分型标准^[6];(3)血 GAD-Ab、IAA、ICA 均阴性。排除标准:(1)糖尿病乳酸酸中毒、高糖高渗状态、酮症酸中毒等急性并发症患者;(2)恶性肿瘤、感染性疾病、风湿免疫性疾病、甲状腺功能亢进(甲亢)、急性血管炎患者;(3)妊娠、哺乳期女性;(4)依从性差,不能配合相应治疗者;(5)尿路感染所引起尿清蛋白阳性和肾脏实质性病变者;(6)近期内使用过肾毒性药物及服用免疫抑制剂及糖皮质激素者。另选取同期本院健康体检者 30 例作为对照组,男 17 例、女 13 例,平均年龄(47.0 ± 6.2)岁。参照 Mogenson 分期标准^[7],并根据 24 h 尿微量清蛋白定量、肾功能及眼底检查,将病例组进一步分为病例 A 组(DN I 期/II 期,32 例)、病例 B 组(DN III 期,34 例)、病例 C 组(DN IV 期,28 例)及病例 D 组(DN V 期,26 例)。4 组年龄、性别、体质量指数比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。所有研究对象及其家属签署知情同意书;本研究经本院伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 于患者入院后次日早晨空腹抽取

静脉血 5 mL 于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,室温静置 10 min,以 4 000 r/min 离心 10 min,分离吸取上层血清放入冻存管,置于 -80°C 冰箱保存待测。

1.2.2 检测方法 采用全自动生化分析仪(奥林巴斯 AU5440)检测常规项目包括血钙(Ca^{2+})、血磷(P^{3-})、C 反应蛋白(CRP)、肾功能指标等,采用美国 Bio-Tek ELX800 多功能酶标仪检测血清 myostatin 水平(外送金域检验)。由专业人员严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 颈部 B 超检查 患者取平卧头仰位,肩背部垫一薄枕,充分暴露颈部,头略偏向对侧,由同一医师进行彩超(武汉迈瑞医疗技术研究院有限公司,型号 R7)检查。分别依次检查两侧颈总动脉(CCA)主干、分叉部及颈内动脉(ICA)起始部,测量内膜面到中膜与外膜交界面之间的垂直距离即为内膜中层厚度(IMT),并探查是否有较强回声或伴有声影的斑块。颈总动脉斑块阳性定义:位于血管内膜中层厚度超过 1 mm 且与邻近血管壁对比增厚至少 100%。血管钙化分组^[8]:血管钙化组,颈动脉 IMT 局部增厚 > 115 mm,且有强回声或伴有声影的斑块者;血管非钙化组,颈动脉 IMT 局部增厚 < 115 mm,或颈动脉 IMT 局部增厚 > 115 mm 但无强回声或伴有声影的斑块。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析,计量资料先进行正态性检验及方差齐性检验,符合正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,采用两独立样本 t 检验或单因素方差分析进行比较,方差分析后的多重比较采用 SNK- q 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 myostatin 对 DN 患者血管钙化的预测价值,采用多因素 Logistic 回归分析 DN 患者出现血管钙化的相关因素。检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 myostatin 水平及血管钙化情况比较 病例 A 组血清 myostatin 与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而病例 B、C、D 组血清 myostatin 明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。病例 A、B、C、D 组颈总动脉钙化率明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。病例 D 组颈总动脉钙化率高于病例 A 组、病例 B 组,而其余各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 血管钙化组与血管非钙化组临床指标比较 血管钙化组钙磷乘积、CRP 水平明显高于血管非钙化组,而 myostatin 水平明显低于血管非钙化组,差异均

有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 各组血清 myostatin 水平及血管钙化情况比较

组别	n	myostatin($\bar{x} \pm s$, ng/mL)	血管钙化[n(%)]
对照组	30	7.3 ± 2.2	1(3.33) ^a
病例 A 组	32	6.4 ± 2.8	9(28.13) ^a
病例 B 组	34	5.3 ± 2.5 ^a	13(38.23) ^a
病例 C 组	28	4.2 ± 1.8 ^{ab}	13(46.43) ^a
病例 D 组	26	3.3 ± 1.2 ^{abc}	16(61.54) ^{abc}
F/ χ^2		15.025	41.451
P		<0.001	<0.001

注:与病例 A 组比较,^a $P < 0.05$;与病例 B 组比较,^b $P < 0.05$;与病例 C 组比较,^c $P < 0.05$ 。

表 2 血管钙化组与血管非钙化组临床指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	myostatin (ng/mL)	钙磷乘积 (mg ² /dL ²)	CRP(mg/L)
血管非钙化组	69	6.4 ± 2.9	42.7 ± 8.5	22.4 ± 12.5
血管钙化组	51	4.2 ± 1.7	54.5 ± 6.9	31.3 ± 23.1
t		5.751	9.378	2.875
P		<0.001	<0.001	0.005

2.3 myostatin 水平与各临床指标的相关性 Pearson 相关性分析显示,myostatin 与钙磷乘积、CRP 呈负相关($r = -0.293, -0.361, P = 0.015, 0.019$)。

2.4 血清 myostatin、CRP、钙磷乘积对 DN 患者发生血管钙化预测价值 ROC 曲线分析显示,血清 myostatin、CRP、钙磷乘积用于预测 DN 患者发生血管钙化的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.734、0.683、0.698。myostatin 预测血管钙化发生的 AUC 最大,对应灵敏度为 78.4%,特异度为 78.3%。见表 3 和图 1。

表 3 血清 myostatin、CRP、钙磷乘积对 DN 患者发生血管钙化的预测价值

指标	AUC(95%CI)	截断值	灵敏度 (%)	特异度 (%)
myostatin	0.734(0.617~0.854)	5.25 ng/mL	78.4	78.3
CRP	0.683(0.603~0.762)	25.3 mg/L	74.5	65.2
钙磷乘积	0.698(0.642~0.783)	4.2 mg ² /dL ²	76.5	66.7

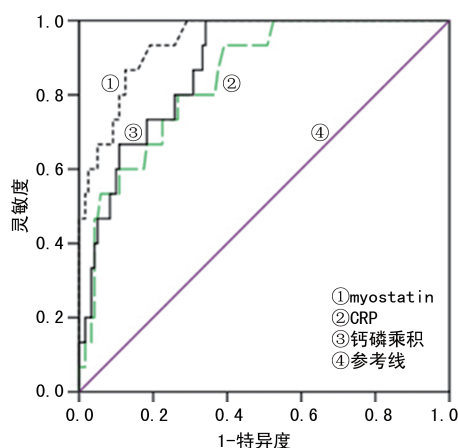


图 1 血清 myostatin、CRP、钙磷乘积预测 DN 患者血管钙化的 ROC 曲线

2.5 DN 患者发生血管钙化的多因素 Logistic 回归分析 以患者是否出现血管钙化为因变量(1=是, 0=否),以 myostatin、CRP、钙磷乘积为自变量,多因素 Logistic 回归分析结果显示,高水平 myostatin 是 DN 患者发生血管钙化保护因素,高 CRP、高钙磷乘积是 DN 患者发生血管钙化独立危险因素($P < 0.05$),其 OR 及 95% CI 分别为 0.334(0.155~0.581)、1.532(1.051~2.551)、2.134(1.325~3.803)。见表 4。

表 4 DN 患者出现血管钙化的多因素 Logistic 回归分析

自变量	β	SE	Wald	P	OR(95%CI)
myostatin	-1.413	0.217	9.427	0.002	0.334(0.155~0.581)
CRP	0.466	0.235	7.318	0.005	1.532(1.051~2.551)
钙磷乘积	0.852	0.155	6.254	0.013	2.134(1.325~3.803)

3 讨论

血管钙化是 DN 患者终末期主要并发症,也是 DN 患者心血管死亡的主要危险因素。有研究发现,一些标志物如 OPG、RANKL、Fetuin A 和 FGF-23 可以作为血管钙化的抑制剂或诱导剂,但 myostatin 作为血管钙化抑制剂或诱导剂的作用前景尚不清楚^[9-11]。有研究表明,血管钙化的形成过程是一个主动的、高度可调控的生物学过程,有可能是因为在钙化促进因素作用下血管平滑肌细胞向成骨细胞转化,最后成为中膜钙化细胞^[12]。血管钙化是一个活性抑制因子与诱导因子相互作用的过程。脂蛋白代谢紊乱、高磷血症、高钙血症、骨调节蛋白表达异常、氧化应激、炎症、细胞凋亡等都参与血管钙化的发生、发展^[13]。有研究表明,myostatin 水平与腰椎侧位片的腹主动脉钙化评分呈负相关,myostatin 对透析患者的血管钙化有潜在的有利影响^[14]。一般而言,myostatin 的表达与血管损伤严重程度的发生率呈正相关。动物实验提示,缺乏 myostatin 的小鼠间充质干细胞通过调节成骨因子,肌肉量和脂肪量的增加与较高的血管钙化患病率相关^[15]。当肌肉质量减少时,血管钙化可能经常发生,骨骼肌质量对透析患者血管钙化发生率或进展与 myostatin 水平存在一定关联。

本研究结果显示,与对照组比较,DN 患者Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ期血清 myostatin 水平明显降低,且随 DN 患者病情的进展而下降,而Ⅰ、Ⅱ期的 myostatin 水平差异无统计学意义,提示 DN 患者 myostatin 水平与病情严重程度有关。当透析患者病情加重时,myostatin 产生会减少,而 myostatin 与病情的确切作用机制尚不清楚,需要进一步的前瞻性研究来验证,有必要监测患者透析前及长期透析期间的 myostatin 水平。有研究显示,myostatin 是体内强大的异位钙化抑制物,在血清钙磷动态平衡中发挥重要作用^[16]。在血液循环中与基质 G1a 蛋白(MGP)和钙、磷形成复合体,抑制磷灰石前体矿物质的形成和沉积,使血清钙磷乘积下

降 50%。本研究结果显示, myostatin 与钙磷乘积、CRP 呈负相关, 提示 DN 患者血管钙化可能与营养状况及微炎症状态有关。炎症和营养不良发生率在 DN 患者中较为常见, 且其与动脉粥样硬化密切相关。研究表明, DN 患者常长期伴随慢性炎症, 后者是人群心血管事件的重要危险因素, 可加速动脉粥样硬化和营养不良的发展, 形成营养不良—炎症—动脉粥样硬化综合征, 三者互相影响导致 DN 高病死率^[17]。CRP 是一种非特异性炎症标志物, 是判断慢性感染常用的指标^[18]。本研究结果显示, 血管钙化组 DN 患者 myostatin 水平明显低于血管非钙化组, 且与 CRP、钙磷乘积呈负相关, 表明除高血钙、血磷外, 低 myostatin 水平和炎症亦可能是引起血管钙化的重要原因。

据报道, 终末期肾病患者一半以上会死于心血管疾病, 且与血管钙化密切相关^[19-20]。本研究结果发现, DN 患者血清 myostatin 水平低于健康人群, 伴有血管钙化的患者血清 myostatin 水平降低更加明显, 提示血清 myostatin 可能早期预测透析患者发生血管钙化。ROC 曲线显示, myostatin 预测血管钙化的截断值为 5.25 ng/mL, 此时灵敏度为 78.4%, 特异度为 78.3%, 均高于 CRP、钙磷乘积对血管钙化预测的灵敏度和特异度, 多因素 Logistic 回归模型中调整了年龄和性别数据后发现, myostatin 水平是 DN 患者发生血管钙化的重要危险因素, 提示 myostatin 对 DN 患者发生血管钙化的预测价值更高。

综上所述, DN III 期以上患者血清 myostatin 水平下降, 后者可作为 DN 的诊断参考指标之一。血清 myostatin 在 DN 合并血管钙化发生过程中发挥一定作用。同时, 本研究有一定局限性, 一是参与对象相对较少, 二是本研究为横断面研究, 尚不能佐证前后的因果关联。

参考文献

- [1] 李小豪, 张丽, 孙婷婷. 视网膜微血管变化预测糖尿病肾病的研究进展[J]. 中华糖尿病杂志, 2020, 12(11): 942-944.
- [2] DUDINK E, FLORIJS B, WEIJS B, et al. Vascular calcification and not arrhythmia in idiopathic atrial fibrillation associates with sex differences in diabetic microvascular injury miRNA profiles[J]. MicroRNA, 2019, 8(2): 127-134.
- [3] GONG C, LI L, QIN C, et al. The involvement of Notch1-RBP-Jk/Msx2 signaling pathway in aortic calcification of diabetic nephropathy rats[J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 8968523.
- [4] FERNÁNDEZ-NOCELO S, GALLEGOS R, COSTOYA J A, et al. Expression of myostatin in human hematopoietic cells unveils novel autocrine/paracrine actions for the hormone[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7236-7246.
- [5] ESPOSITO P, VERZOLA D, PORTA E, et al. Myostatin in the arterial wall of patients with end-stage renal disease[J]. J Atheroscler Thromb, 2020, 27(10): 1039-1052.
- [6] 郭海健, 胡浩, 刘宇翔, 等. 指尖血联合中国糖尿病风险评分表法筛查糖尿病及糖尿病前期的效率分析[J]. 中华糖尿病杂志, 2020, 12(2): 76-80.
- [7] 赵耕. 2 型糖尿病患者血清网膜素-1 水平与肾损伤程度关系的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1): 115-117.
- [8] 董宝镜. 血管超声检查在预防 2 型糖尿病患者下肢坏疽中的意义[J]. 中国医药指南, 2021, 19(4): 27-28.
- [9] HARPER E, FORDE H, DAVENPORT C, et al. Vascular calcification in type-2 diabetes and cardiovascular disease: integrative roles for OPG, RANKL and TRAIL[J]. Vasc Pharmacol, 2016, 82: 30-40.
- [10] 张曼, 张京慧, 温小军. 老年血液透析患者血清 hs-CRP、Fetuin-A 水平与心脏瓣膜钙化和血管钙化的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(3): 296-299.
- [11] JIMÉNEZ V M, GARCÍA G G, GARCÍA F P, et al. Fractional excretion of phosphorus and vascular calcification in stage 3 chronic kidney disease[J]. J Investig Med, 2019, 67(3): 674-680.
- [12] LEE D O, KIM J H, KANG H W, et al. Calcifying characteristics of peripheral vascular smooth muscle cells of chronic kidney disease patients with critical limb ischemia[J]. Vasc Med, 2021, 26(2): 139-146.
- [13] 曾蓉, 李安琪, 刘江华. 血管平滑肌细胞内质网应激与血管钙化的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(11): 949-954.
- [14] 杜玮, 夏俊, 刘明军, 等. 绵羊 Myostatin 前肽对成肌细胞的分化作用[J]. 新疆农业科学, 2021, 58(3): 581-588.
- [15] 刘秀娟, 张念云, 王斌, 等. 脂肪间充质干细胞注射对离心运动大鼠肌肉修复中肌肉抑制素信号通路的影响机制[J]. 中国康复医学杂志, 2021, 36(1): 16-22.
- [16] 王东. Myostatin 基因敲除对牛糖代谢的影响研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2017.
- [17] XIONG Y, ZHOU L. The signaling of cellular senescence in diabetic nephropathy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 7495629.
- [18] 李朝晖, 李复红, 韩蓓, 等. 慢性阻塞性肺部疾病合并肺部感染患者 CRP、PCT、TLR4 的表达及其临床意义[J]. 海南医学, 2020, 31(13): 1655-1658.
- [19] AL-HAJJI A A, ALSUBAIE H A, ALBAQSHI H T, et al. Cardiovascular disease-related mortality risk in end stage renal disease and type 2 diabetes: a systematic review[J]. J Family Med Prim Care, 2020, 9(7): 3195-3199.
- [20] WHEELER D C, STEFANSSON B V, BATIUSHIN M, et al. The dapagliflozin and prevention of adverse outcomes in chronic kidney disease (DAPA-CKD) trial: baseline characteristics [J]. Nephrol Dial Transplant, 2020, 35(10): 1700-1711.

(收稿日期: 2021-09-19 修回日期: 2022-06-17)