

老年糖尿病肾病患者血清 SP-D 水平表达及其基因多态性与并发肺部感染的相关性研究

闫海燕¹, 杨云秀², 杨云华³, 宋晓伟¹, 缙 剑¹

(1. 咸阳市第一人民医院呼吸与危重症医学科 陕西咸阳 712000; 2. 陕西唐华四棉医院呼吸科, 西安 710038;
3. 西安北车医院内科, 西安 710085)

摘要: 目的 研究老年糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)患者血清表面活性蛋白D(surfactant protein D, SP-D)水平表达及其基因多态性与并发肺部感染的相关性。方法 收集2018年4月~2020年10月咸阳市第一人民医院108例老年DN患者作为研究对象,根据是否伴有肺部感染,将患者分为感染组($n=26$)和对照组($n=82$)。比较两组患者血清SP-D水平,检测SP-D基因多态性分布。参照肺炎严重指数(pneumonia severity index, PSI),记录26例肺部感染患者严重程度。分析血清SP-D及其基因多态性与肺炎严重程度的关系。结果 ELISA结果显示,与对照组血清SP-D(20.02 ± 4.54 ng/L)比较,感染组血清SP-D(24.18 ± 5.39 ng/L)显著升高($t=3.888, P<0.05$)。感染组患者SP-D基因型频率分布(TT型4例、CT型7例和CC型15例),与对照组(TT型22例、CT型45例和CC型15例)比较,差异有统计学意义($\chi^2=15.310, P<0.05$)。26例肺部感染中轻度14例、中度8例和重度4例。轻度组、中度组及重度组三组血清SP-D(17.24 ± 3.77 ng/L, 23.17 ± 3.82 ng/L及 25.29 ± 2.18 ng/L)水平比较,差异有统计学意义($F=11.325, P<0.05$)。轻度组(TT型3例、CT型5例和CC型6例)、中度组(TT型1例、CT型2例和CC型5例)及重度组(TT型0例、CT型0例和CC型4例)基因型分布比较,差异有统计学意义($\chi^2=4.288, P<0.05$)。ROC分析显示血清SP-D判断DN并发肺部感染的AUC为0.779($SE=0.056, 95\%CI=0.669 \sim 0.890, P=0.000$),敏感度和特异度分别为0.769和0.598。结论 血清SP-D有助于判断DN并发肺部感染风险,CC基因型患者较其他患者更易发生肺部感染。

关键词: 血清SP-D; 基因多态性; 糖尿病肾病; 肺部感染

中图分类号: R587.2; R392.11 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2021)04-021-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.04.005

Research on the Relationship between Serum SP-D Level, Gene Polymorphism and Pulmonary Infection in Elderly Patients with Diabetic Nephropathy

YAN Hai-yan¹, YANG Yun-xiu², YANG Yun-hua³, SONG Xiao-wei¹, GOU Jian¹

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First People's Hospital of Xianyang City, Shaanxi Xianyang 712000, China; 2. Department of Respiration, Shaanxi Tanghua Simian Hospital, Xi'an 710038, China;
3. Department of Internal Medicine, Xi'an Beiche Hospital, Xi'an 710085, China)

Abstract: Objective To study the relationship between serum surfactant protein D (SP-D) level, gene polymorphism and pulmonary infection in elderly patients with diabetic nephropathy (DN). **Methods** The 108 cases elderly patients with DN from April 2018 to October 2020 in the First People's Hospital of Xianyang City were collected as the research objects. The patients were divided into infection group ($n=26$) and control group ($n=82$), which accorded to the presence or absence of pulmonary infection. The two groups of patients with serum SP-D level was compared, the distribution of SP-D gene polymorphism was detected. The severity of 26 patients with pulmonary infection was recorded, which accorded to the pneumonia severity index (PSI). The relationship between serum SP-D and its gene polymorphism and the severity of pneumonia were analyzed. **Results** The results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed that the serum SP-D of infection group (24.18 ± 5.39 ng/L) were significantly increased, which compared with the control group (20.02 ± 4.54 ng/L) ($t=3.888, P<0.05$). The frequency distribution of SP-D genotype in infection group (4 cases of TT type, 7 cases of CT type and 15 cases of CC type) was significantly different from that of control group (22 cases of TT type, 45 cases of CT type and 15 cases of CC type) ($\chi^2=15.310, P<0.05$). There were 14 cases of mild, 8 cases of moderate and 4 cases of severe in the 26 cases of pulmonary infection. There

作者简介: 闫海燕(1983-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 呼吸重症, 肺心病, 肺部感染, E-mail: xianyanyanhai@163.com。

通讯作者: 宋晓伟(1987-), 男, 本科, 研究方向: 气道肿瘤, E-mail: 415510359@qq.com。

were significant differences in serum SP-D levels among mild group, moderate group and severe group (17.24 ± 3.77 ng/L, 23.17 ± 3.82 ng/L and 25.29 ± 2.18 ng/L) ($F=11.325$, $P<0.05$). There were significant differences in genotype distribution between mild group (TT type 3 cases, CT type 5 cases, CC type 6 cases), moderate group (TT type 1 case, CT type 2 cases, CC type 5 cases) and severe group (TT type 0 cases, CT type 0 cases, CC type 4 cases) genotype distribution difference was statistically significant ($\chi^2=4.288$, $P<0.05$). The receiver operator characteristic (ROC) analysis showed that the AUC of serum SP-D to judge the DN complicated with pulmonary infection, the sensitivity and specificity were 0.779 (SE=0.056, 95%CI=0.669~0.890, $P=0.000$), 0.769 and 0.598, respectively. **Conclusion** The serum SP-D is helpful to judge the risk of DN complicated with pulmonary infection, and the CC genotype patients are more likely to have pulmonary infection than other patients.

Keywords: serum SP-D; gene polymorphism; diabetic nephropathy; pulmonary infection

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是因糖尿病进展累及肾脏微血管引起的肾小球硬化症, DN 也成为终末期肾病的主要原因^[1]。目前认为, 肺部感染是 DN 常见并发症。糖脂代谢紊乱是 DN 的重要机制, DN 患者长期处于高血糖状态, 自身免疫防御能力降低, 尤其是老年患者, 全身机体功能衰退, 更易发生肺部感染^[2-3]。而肺部感染可进一步加重肾损伤。因而, 长期以来, 肺部感染一直是老年 DN 患者防治重点。表面活性蛋白 D (surfactant protein D, SP-D) 是由 II 型肺泡细胞和呼吸性细支气管 clara 细胞分泌的蛋白, 既往研究证实 SP-D 与慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 发病和病理进展密切相关, SP-D 与肺功能水平具有显著相关性^[4-5]。但有关 SP-D 与 DN 患者并发肺部感染的关系, 国内却少有报道。本研究纳入 108 例老年 DN 患者作为研究对象, 探讨 SP-D 在 DN 并发肺部感染中的作用和临床应用价值。报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2018 年 4 月 ~ 2020 年 10 月咸阳市第一人民医院 108 例老年 DN 患者作为研究对象, 纳入标准: ① DN 诊断参照中华医学会内分泌学会推荐共识标准^[6]; ②患者临床病例资料完整。排除标准: ①并发原发性肾小球肾炎、肾盂肾炎及肾病综合征患者; ②并发有恶性肿瘤者; ③并发有肺结核、支气管炎及肺间质性疾病者。根据是否并发肺部感染, 将 108 例 DN 患者分为感染组 ($n=26$, 并发肺部感染) 和对照组 ($n=82$, 未并发肺部感染)。感染组 26 例患者中男性 17 例, 女性 9 例; 年龄 70.21 ± 4.75 岁; 体重指数 20.29 ± 1.81 kg/m²; 病程 3.58 ± 1.09 年。对照组 82 例患者中男性 64 例, 女性 18 例; 年龄 69.53 ± 4.47 岁; 体重指数 20.34 ± 2.01 kg/m²; 病程 3.60 ± 0.84 年。两组患者基本资料比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。根据肺炎严重指数 (pneumonia severity index, PSI) 评分^[7], 将感染患者分为轻度组 (PSI 评分 <91 分), 中度组 ($91 \leq$ PSI 评分 ≤ 130 分) 及重度组 (PSI 评分 >130 分)。

1.2 仪器和试剂 博科 BIOBASE TGL-18M 型离心机, ELISA 试剂盒 (上海赛默科技生物发展有限公

司), 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) (上海纯优生物科技有限公司), 细胞裂解液 (南京信帆生物技术有限公司), 蛋白酶 K (洛阳惠尔纳米科技有限公司), 酚氯仿异戊醇、醋酸钠 (北京普博欣生物科技有限责任公司)。

1.3 方法 血清 SP-D 检测: 在 DN 确诊后 3 天内取 108 例患者清晨空腹肘静脉血 5ml, 3 000r/min 离心 10min 后取上清液, 采用 ELISA 法检测血清 SP-D 水平。

DNA 提取: 取确诊后 3 天内空腹肘静脉血 3ml 作为检测标本, 将静脉血置于含有 EDTA 的抗凝管中, 冷冻备用。提取 DNA 步骤: ①先将标本解冻, 以等量 PBS 与之混匀, 3 000r/min 离心 10min, 弃上清液, 加入细胞裂解液 300 μ l, 混匀后 37℃ 下水浴 60min, 再依次加入 20g/dl 的 SDS 液 25 μ l 和蛋白酶 K 20 μ l, 水浴过夜。②取水浴后的细胞液, 按 3:1 比例与酚氯仿异戊醇混匀, 离心后取上清液, 再次重复上述操作 1 次。③取上清液 400 μ l, 再加入无水乙醇和醋酸钠 800 μ l 和 15 μ l, 沉淀 DNA, 再以 8 000r/min 离心, 弃上清液。④以 70ml/dl 乙醇洗涤沉淀, 再加入 Tris-EDTA 液 20 μ l, 溶解后冷冻保存。

PCR-RFLP 检测: 采用 PCR-RFLP 法检测 SP-D 基因多态性, 记录 SP-D 基因 Met11 Thr (rs721917 T/C) 位点频率分布情况, PCR 扩增条件: PCR 扩增引物: 上游: 5' -TCACCTCTCAGGCCATGCTGCTCTT CCTCC-3', 下游: 5' -GAGCTACACATGACCAG GGTGCAAGCACTG-3'。反应体系: 15 μ l 2 \times PCR PLUS MIX, 1.5 μ l DNA 模板, 上下游引物各 0.5 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l。反应条件: 95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 0.5min, 58℃ 退火 1min, 72℃ 延迟 0.5min, 40 个循环。72℃ 延迟 5min。

1.4 统计学分析 选用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间行 t 检验, 计数资料以 $n(\%)$ 表示, 组间行 χ^2 检验, 预测价值采用受试者工作曲线 (receiver operator characteristic, ROC) 分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 SP-D 和基因位点分布 感染组血清 SP-D

水平为 $24.18 \pm 5.39 \text{ ng/L}$, 对照组血清 SP-D 水平为 $20.02 \pm 4.54 \text{ ng/L}$, 两组间差异有统计学意义 ($t=3.888$, $P<0.001$)。SP-D 基因型位点率分布差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组基因位点分布 [n(%)]

基因型	感染组 (n=26)	对照组 (n=82)	χ^2 值	P 值
TT	4 (15.38)	22 (26.83)	15.310	<0.001
CT	7 (26.92)	45 (54.88)		
CC	15 (57.69)	15 (18.29)		

2.2 不同肺炎程度患者 SP-D 水平比较 26 例肺部感染患者中轻度 14 例, 中度 8 例, 重度 4 例。轻度组患者血清 SP-D 为 $17.24 \pm 3.77 \text{ ng/L}$, 中度组 $23.17 \pm 3.82 \text{ ng/L}$, 重度组 $25.29 \pm 2.18 \text{ ng/L}$ 。三组患者血清 SP-D 水平比较, 差异有统计学意义 ($F=11.325$, $P<0.001$)。

2.3 不同肺炎程度患者 SP-D 基因多态性分布 见表 2。不同程度肺部感染患者 SP-D 基因型频率分布比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.288$, $P<0.001$)。

表 2 不同肺炎程度患者 SP-D 基因多态性分布

基因型	轻度 (n=14)	中度 (n=8)	重度 (n=4)
TT	3 (21.43)	1 (12.50)	0 (0.00)
CT	5 (35.71)	2 (25.00)	0 (0.00)
CC	6 (42.86)	5 (62.50)	4 (100.00)

2.4 SP-D 判断 DN 伴发肺部感染的价值分析 见图 1。ROC 分析显示血清 SP-D 判断 DN 并发肺部感染的 AUC 为 0.779 (SE=0.056, 95%CI=0.669~0.890, $P=0.000$), 敏感度为 0.769, 特异度为 0.598。

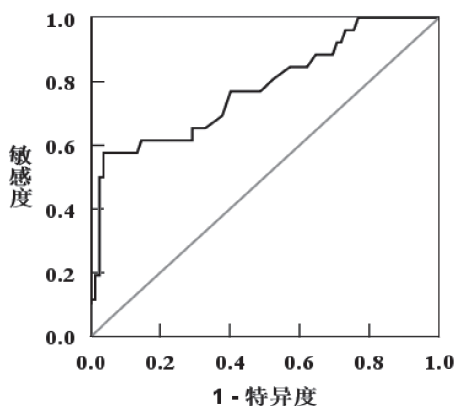


图 1 SP-D 判断 DN 伴发肺部感染的 ROC 分析

3 讨论

DN 伴发肺部感染的病理机制较为复杂。长期的高血糖不仅可形成酸性环境, 直接破坏机体抵抗力, 还可导致和加重肺组织缺氧, 增加肺部感染的易感性^[8]。另外, 随着 DN 患者体液免疫失调, 白细胞粘附作用减弱, 为致病菌的滋生繁殖创造了条件^[9]。

SP-D 是具有维持肺泡表面活性物质稳定和保持肺组织局部免疫功能的亲水性蛋白, 基础实验显示 SP-D 对中性粒细胞、单核-巨噬细胞具有趋化作用, 还可通过抑制炎症因子合成, 缓解肺部炎症, 而对于肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌等肺部常见病原菌, 则具有与 IgG 相近的作用, 增强吞噬细胞活性, 促进病原菌的吞噬^[10-12]。本研究对比 DN 并发肺部感染与未感染者血清 SP-D 水平, 也发现两组间血清 SP-D 差异有统计学意义, 提示监测 SP-D 有助于判断肺部感染风险。而 ROC 分析显示血清 SP-D 判断 DN 并发肺部感染的 AUC 为 0.779, 这进一步证实 SP-D 水平对预测肺部感染具有一定应用价值, 但血清 SP-D 敏感度和特异度均有限。这可能与 SP-D 基因多态性有关。

SP-D 基因多态性与肺疾病的关系已被临床报道。SP-D Met11 Thr (rs721917 T/C) 的多态性是目前临床关注较多的 SP-D 基因, 徐丽等^[13]认为 rs721917 等位基因与间质性肺炎相关, 而 ISHII 等^[14]的一项研究发现 rs721917C 可能增加 COPD 易感性。rs721917 位点不同基因型表达可影响其正常结构和功能^[15], 本研究发现感染组与对照组 rs721917 位点基因型分布差异有统计学意义, 提示 SP-D 基因 rs721917 位点多态性与 DN 患者并发肺部感染的易感性有关。对于血清 SP-D 升高的 CC 基因型 DN 患者, 并发肺部感染的机率更高。另外, 本研究还发现不同肺炎程度患者血清 SP-D 及其基因型表达也存在显著性差异, 提示 SP-D 可能参与肺部感染的病理进展。随着肺部感染的发生发展, 肺泡毛细血管屏障功能受损, 使 SP-D 进入血液循环, 进而使血清 SP-D 水平升高^[16]。因而, 血清 SP-D 可作为判断肺部感染严重程度的判断依据。而对于 rs721917 位点 CC 基因型患者, 较其他位点, 肺功能损伤程度更重^[17]。本研究也显示 CC 基因型肺部感染病情更为严重, 与上述报道结果一致。

综上, 血清 SP-D 水平有助于判断 DN 并发肺部感染风险, CC 基因型患者较其他基因型患者更易发生肺部感染, 且病情较重。

参考文献:

- [1] 苏洋, 梅秋雁. 血浆 NGAL, Cys C 和尿 NAG/Crea 联合检测对早期糖尿病肾病诊断价值的研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1): 99-101, 105.
- [2] SU Yang, MEI Qiuyan. Study on combined determination plasma NGAL, Cys C and Urinary NAG/Crea for the diagnosis of early diabetic nephropathy [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(1): 99-101, 105.
- [3] 杨宏秀, 刘丽, 张会芬, 等. 血清抗中性粒细胞胞浆抗体及相关炎症因子检测对糖尿病肾病的诊断价值 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(5): 95-97, 101.

- YANG Hongxiu, LIU Li, ZHANG Huifen, et al. Diagnostic value of detection anti-cardiolipin antibodies and related inflammatory factors in diabetic nephropathy[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(5): 95-97, 101.
- [3] 于菲菲, 庞白冰, 杨华, 等. 单纯性2型糖尿病与糖尿病肾病患者尿液中 α 1-微球蛋白和激肽原1的表达分析[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(5): 94-96, 99.
- YU Feifei, PANG Baibing, YANG Hua, et al. Expression analysis of α 1-microglobulin, kininogen in urine of simple type 2 diabetes and diabetic nephropathy patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(5): 94-96, 99.
- [4] ZIEN ALAABDEN A, MOHAMMAD Y, FAHOUM S. The role of serum surfactant protein D as a biomarker of exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Qatar Medical Journal, 2015, 2015(2): 18.
- [5] 郭海燕, 林淑芳, 梁彩霞, 等. 血清SP-D, PARC/CCL18水平与慢性阻塞性肺疾病严重程度关系[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(6): 936-938.
- GUO Haiyan, LIN Shufang, LIANG Caixia, et al. The relationship between serum SP-D, PARC/CCL18 levels and the severity of chronic obstructive pulmonary disease[J]. The Journal of Practical Medicine, 2016, 32(6): 936-938.
- [6] 中华医学会内分泌学会. 中国成人糖尿病肾脏病临床诊断的专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2015, 31(5): 379-385.
- Chinese Medical Association Endocrinology Society. Expert consensus on clinical diagnosis of diabetic nephropathy in Chinese adults[J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2015, 31(5): 379-385.
- [7] SANZ F, MORALES-SUÁREZ-VARELA M, FERNÁNDEZ E, et al. A composite of functional status and pneumonia severity index improves the prediction of pneumonia mortality in older patients[J]. Journal of General Internal Medicine, 2018, 33(4): 437-444.
- [8] 李晓燕, 李晓华, 王养维. 幽门螺杆菌感染与2型糖尿病发病机制的相关性探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 1-4.
- LI Xiaoyan, LI Xiaohua, WANG Yangwei. *Helicobacter pylori* infection and the pathogenesis of type 2 diabetes[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 1-4.
- [9] 岳芳芳, 倪文娟, 冷小敏, 等. 人白介素10荧光定量PCR检测方法的建立及其在糖尿病肾病中的表达研究[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(4): 11-14.
- YUE Fangfang, NI Wenjuan, LENG Xiaomin, et al. Establishment of real-time quantitative PCR assay for human IL-10 and its expression in diabetic nephropathy[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(4): 11-14.
- [10] 肖传宇, 王宁, 王小艳, 等. 血清胰岛素与慢性肾脏病的相关研究及其应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 109-112.
- XIAO Chuanyu, WANG Ning, WANG Xiaoyan, et al. Correlation of serum insulin and chronic kidney disease and its application value[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 109-112.
- [11] REINHARDT A, WEHLE M, GEISSNER A, et al. Structure binding relationship of human surfactant protein D and various lipopolysaccharide inner core structures[J]. Journal of Structural Biology, 2016, 195(3): 387-395.
- [12] SAKA R, YANAGIHARA I, SASAKI T, et al. Immunolocalization of surfactant protein D in the liver from infants with cholestatic liver disease[J]. Journal of Pediatric Surgery, 2015, 50(2): 297-300.
- [13] 徐丽, 谭榜宪, 李华. 表面活性蛋白D基因多态性与肺部疾病易感性的研究进展[J]. 现代预防医学, 2018, 45(11): 2043-2046.
- XU Li, TAN Bangxian, LI Hua. Association between gene polymorphism of surfactant protein D and susceptibility to lung disease[J]. Modern Preventive Medicine, 2018, 45(11): 2043-2046.
- [14] ISHII T, HAGIWARA K, IKEDA S, et al. Association between genetic variations in surfactant protein D and emphysema, interstitial pneumonia, and lung cancer in a Japanese population[J]. COPD, 2012, 9(4): 409-416.
- [15] 吴北霞, 韩伟, 李永春. SP-D基因rs721917多态性与COPD的相关性研究[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(1): 77-80.
- WU Beixia, HAN Wei, LI Yongchun. Relationship between gene polymorphism of surfactant protein D (rs721917) and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2015, 20(1): 77-80.
- [16] 徐素玲, 李政, 张成. 肺炎支原体肺炎患儿血清和支气管肺泡灌洗液中肺表面活性蛋白A、肺表面活性蛋白D和Toll样受体2水平变化及临床意义[J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(7): 605-607, 611.
- XU Suling, LI Zheng, ZHANG Cheng. Clinical significance of the changes in pulmonary surfactant protein A, surfactant protein D and Toll-like receptor 2 in serum and bronchoalveolar lavage fluid in children with Mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. Journal of Xinxiang Medical University, 2018, 35(7): 605-607, 611.
- [17] LI Xiufang, YAO Xiaoguang, HEIZHATI M, et al. A7441 genetic polymorphism of surfactant protein D rs721917 may associated with severe obstructive sleep apnea hypopnea syndrome[J]. Journal of Hypertension, 2018, 36(4): e49.

收稿日期: 2020-11-04

修回日期: 2020-12-04