

胱抑素 C 水平与下肢静脉性溃疡发生的相关性研究

陆 黎, 邹君杰, 章希炜*

(南京医科大学第一附属医院血管外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(cystatin C, Cys C)与下肢静脉性溃疡(venous leg ulceration, VLU)发生的相关性。方法:采用酶联免疫吸附法(ELISA 法)对下肢慢性静脉功能不全(chronic venous insufficiency, CVI)无溃疡患者、VLU 患者和正常人的血浆肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-2 受体(IL-2 receptor, IL-2R)、Cys C 水平及静脉组织 Cys C 水平进行检测。结果:①VLU 组血浆 TNF- α 、IL-1 β 水平分别为(185.46 \pm 20.90)pmol/L 和(100.60 \pm 17.43) pmol/L,明显高于对照组的(32.28 \pm 7.76) pmol/L 和(58.72 \pm 16.20) pmol/L($P < 0.05$),CVI 无溃疡组的 TNF- α 和 IL-1 β 分别为(41.68 \pm 7.35)pmol/L 和(65.36 \pm 25.51)pmol/L,与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);VLU 组和 CVI 无溃疡组血浆 IL-2R 水平分别为(138.56 \pm 78.75) pmol/L 和(94.45 \pm 35.26) pmol/L,与对照组的(93.67 \pm 12.28) pmol/L 相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);②VLU 患者组织 Cys C 表达较单纯 CVI 无溃疡患者和正常人明显降低($P < 0.05$);手术前 VLU 患者血浆 Cys C 的表达显著低于正常人($P < 0.05$),手术后 4 d VLU 患者血浆 Cys C 的表达显著高于手术前($P < 0.05$)。③相关分析显示 Cys C 表达与 TNF- α 和 IL-1 β 表达呈显著负相关, r 值分别为-0.878 和-0.990($P < 0.05$)。④术后 Cys C 表达较低的患者溃疡复发率高于 Cys C 高表达患者。结论:Cys C 的表达与 VLU 的发病有密切关系,Cys C 的低表达可能是导致 VLU 的发病和复发的重要因素。

[关键词] 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C;静脉功能不全;静脉性溃疡

[中图分类号] R543.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)07-960-05

Association of cystatin C (Cys C) and lower extremity venous ulcers

LU Li, ZOU Jun-jie, ZHANG Xi-wei*

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between serum levels of cystatin C (Cys C) and venous leg ulceration (VLU). **Methods:** Subjects were divided into three groups, chronic venous insufficiency (CVI) patients without ulcers, patients with VLU and normal subjects. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for detection of plasma TNF- α , IL-1 β , IL-2R, Cys C levels and Cys C level of venous tissue. **Results:** ① The plasma levels of TNF- α and IL-1 β in the VLU patients with venous ulcers were(185.46 \pm 20.90) pmol/L and(100.60 \pm 17.43) pmol/L respectively, and was significantly higher than those in the control group [(32.28 \pm 7.76) pmol/L of TNF- α and (58.72 \pm 16.20) pmol/L of IL-1 β]($P < 0.05$). The plasma levels of TNF- α and IL-1 β in the CVI without ulcers group were(41.68 \pm 7.35) pmol/L and(65.36 \pm 25.51) pmol/L, and had no significant difference compared to the control group ($P > 0.05$);The plasma IL-2R levels in the VLU group and CVI without ulcers group were (138.56 \pm 78.75) pmol/L and(94.45 \pm 35.26) pmol/L, and both of them had no significant difference compared to the control group[(93.67 \pm 12.28) pmol/L] ($P > 0.05$); ②Cys C expression in venous tissue was significantly lower in VLU patients than in the CVI without ulcers and control group($P < 0.05$);The plasma Cys C level of VLU group was significantly lower than that of control before surgery ($P < 0.05$), and the plasma Cys C level of VLU group four days after surgery was significantly higher than that before surgery ($P < 0.05$). ③ The correlation analysis showed that Cys C expression was significantly negatively correlated with expressions of TNF- α and IL-1 β ($r = -0.878$ and $-0.990, P < 0.05$). ④After surgery, ulcer recurrence rate in patients with low expression of Cys C were higher than that with the high Cys C expression. **Conclusion:** Cys C expression is closely related to the incidence of VLU. Low expression of the Cys C may be an important factor of the incidence and recurrence of VLU.

[Key words] cystatin C; venous insufficiency; venous ulcer

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 960-964]

[基金项目] 江苏省人才高峰项目(303070470IB09)

*通讯作者, E-mail: xiwei1092@yahoo.com.cn

下肢静脉溃疡(venous leg ulceration, VLU)是下肢慢性静脉功能不全(chronic venous insufficiency, CVI)最严重的并发症,临床较常见,往往经久不愈或反复发作,严重影响患者生活质量。1988年,Coleridge等^[1]提出白细胞捕获学说,并认为 CVI 是一种系统性炎症反应的结果,血细胞、血液成分和血流特征参与了 CVI 的发病机制^[2]。静脉溃疡的发生是多种因素综合作用的结果,其中微血管内白细胞聚积、激活理论的解释较为合理,而炎症因子水平在其中起到了关键作用。半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin C, Cys C)是人体内广泛存在的一种低分子量蛋白,有研究显示 Cys C 及其片段可能影响了粒细胞的吞噬与趋化功能,参与炎症过程^[3-4]。因此 Cys C 水平可能与静脉功能不全、静脉性溃疡发生存在密切关系,此方面相关研究未见报道。本研究着重探讨 Cys C 与下肢静脉性溃疡发生的相关性,以期临床皮肤溃疡形成的预测、疗效及预后的判断提供帮助。本研究采用酶联免疫吸附法(ELISA)对下肢 CVI 无溃疡患者、VLU 患者和正常人的血浆肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-2 受体(IL-2 receptor, IL-2R)、Cys C 水平及组织 Cys C 水平进行检测,观察 Cys C 在静脉性溃疡形成、发展和愈合过程中变

化,探讨其在静脉性溃疡致病过程中的作用。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 对象

病例选自 2010 年 10 月~2011 年 5 月在南京医科大学第一附属医院血管外科治疗的下肢 CVI 患者,根据临床症状、体征及彩超确诊;共 40 例,其中男 23 例,女 17 例,年龄 32~67 岁,中位年龄 51 岁,病史 1~36 年,平均(22.7 \pm 5.8)年,其中活动性溃疡(CEAP 临床分级 C6)20 例(男 12 例,女 8 例),患肢共 22 条,溃疡病史 8 个月~35 年,作为 VLU 组;CVI 无溃疡组(CEAP 临床分级 C1~5 级)20 例(男 11 例,女 9 例),2 组间一般情况比较差异无统计学意义(表 1)。对照组为健康志愿者,共 10 例,男 6 例,女 4 例,年龄 23~53 岁,中位年龄 30 岁。3 组间年龄、性别比较无显著性差异,均排除糖尿病、原发肾小球疾病、肝硬化、恶性肿瘤、自身免疫性疾病及严重肝肾功能不全、1 周前有细菌和病毒感染等情况。所有 VLU 组患者均实施了腔镜深筋膜下交通支静脉结扎术,VLU 组及 CVI 无溃疡组均实施大隐静脉高位结扎及剥脱术^[5]。病例组、对照组均签署知情同意书,未出现并发症。

表 1 不同病情静脉曲张患者临床资料比较

Table 1 Comparison of the clinical data among CVI patients with or without VLU

组别	n	性别(例)		年龄(岁)	患肢数(条)	患肢疼痛(条)	静脉曲张(条)	小腿肿胀(条)
		男	女					
VLU 组	20	12	8	52 \pm 16	22	22	22	18
CVI 无溃疡组	20	11	9	50 \pm 17	24	16	24	15

1.1.2 试剂

人 IL-1 β 、IL-2R、TNF- α 定量检测 ELISA 试剂盒由海南华美生物医学公司进口分装,人 Cys C ELISA 检测试剂盒购自上海 RD 公司。

1.2 方法

1.2.1 标本收集

①手术取得曲张静脉组织及正常静脉组织,静脉组织标本获取后即置入液氮保存。②静脉血标本:采外周静脉血 5 ml,分别置入血清管 2 ml,抗凝瓶 3 ml,无菌分离血浆,细胞涂片,-30 $^{\circ}$ C 冷冻保存,待检测。

1.2.2 血浆 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-2R 测定

采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。用抗人 TNF- α 单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 TNF- α 与单抗结合,加入生物素化的抗人 TNF- α ,形成免疫复

合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入酶底物 TMB,硫酸终止,在 450 nm 处测吸光度值^[6-7]。

1.2.3 Cys C 的测定

静脉组织加入一定量的 PBS(pH7.4),将标本匀浆。离心 20 min,3 000 r/min。仔细收集上清,分装后检测。血浆标本及组织匀浆后的上清液均按照人 Cys C ELISA 检测试剂盒说明,根据标准品的浓度及对应的吸光度值,计算出标准曲线的直线回归方程,再根据样本的吸光度值计算,最终浓度为实际测定浓度乘以稀释倍数^[8]。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS15.0 软件,结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较应用方差分析,两两比较采用 q 检验,相关性分析用直线回归分析,溃疡

复发率采用 Kaplan-Meier 法统计及 Log-rank 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血浆 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-2R 水平变化与 CVI 临床分级的关系

VLU 组血浆 TNF- α 和 IL-1 β 水平均显著高于 CVI 无溃疡组和对照组 (P 均 < 0.05 , 表 2); CVI 无溃疡组血浆 TNF- α 和 IL-1 β 水平与对照组比较无

明显差异 ($P > 0.05$); VLU 组和 CVI 无溃疡组者血浆 IL-2R 与对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 Cys C 与 CVI 临床分级的关系

VLU 患者组织 Cys 水平较 CVI 无溃疡患者和正常人明显降低 ($P < 0.05$, 表 3); 手术前 VLU 患者血浆 Cys C 的表达显著低于正常人 ($P < 0.05$), 手术后 4 d VLU 患者的血浆 Cys C 的表达显著高于手术前 ($P < 0.05$, 表 3)。

表 2 3 组血浆 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-2R 水平测定结果

Table 2 Results of plasma TNF- α , IL-1 β and IL-2R levels among the three groups (pmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α	IL-1 β	IL-2R
对照组	10	32.28 \pm 7.76	58.72 \pm 16.20	93.67 \pm 12.28
CVI 无溃疡组	20	41.68 \pm 7.35	65.36 \pm 25.51	94.45 \pm 35.26
VLU 组	20	185.46 \pm 20.90 ^{*Δ}	100.60 \pm 17.43 ^{*Δ}	138.56 \pm 78.75

与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 CVI 无溃疡组比较, ^{Δ} $P < 0.05$ 。

表 3 各组中组织和血浆中 Cys C 的表达

Table 3 The Cys C level in tissue and plasma among each group (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	组织 Cys C	血浆 Cys C	
			术前	术后
对照组	10	1.806 \pm 0.294	1.401 \pm 0.362	1.389 \pm 0.337
CVI 无溃疡组	20	1.584 \pm 0.278	0.916 \pm 0.258	1.278 \pm 0.395
VLU 组	20	1.071 \pm 0.365 ^{*Δ}	0.596 \pm 0.143 [*]	1.158 \pm 0.334 [#]

与对照组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 CVI 无溃疡组比较, ^{Δ} $P < 0.05$; 与同组术前比较, [#] $P < 0.05$ 。

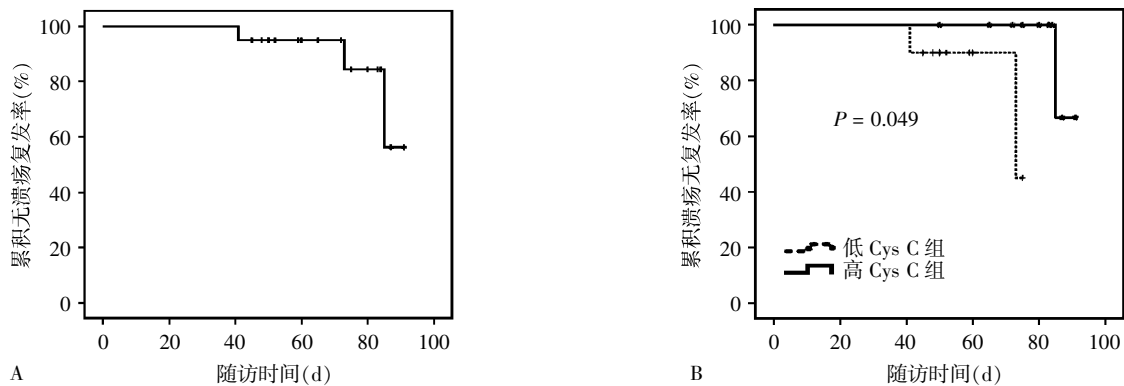
2.3 血浆 Cys C 与 TNF- α 和 IL-1 β 的相关分析

血浆 Cys C 表达与 TNF- α 和 IL-1 β 表达呈负相关, 分别为 $r = -0.878, P < 0.01$ 和 $r = -0.990, P < 0.01$ 。

2.4 Cys C 与溃疡复发的关系

以 Cys C $< 1.163 5$ mg/L (中位数) 为低水平组, 余者为高水平组, 以出院时间 (手术后 4 d) 为

起点, 临床结局 (溃疡是否复发) 为终点, 并观察随访 90 d。估计 30 d 累积无复发率为 100%、60 d 无复发率为 (95.0 \pm 4.9)%、90 d 为 (56.3 \pm 2.4)% (图 1A)。低 Cys C 组 30 d 无复发率 100%、60 d (90.0 \pm 9.5)%、90 d 为 (66 \pm 27)%。高 Cys C 组 30 d、60 d 无复发率均为 100%, 90 d 为 (66 \pm 27)% (图 1B)。



A: 所有患者的累积无溃疡复发率; B: 低 Cys C 组与高 Cys C 组累积无溃疡复发率的比较。经 Log-rank 检验, $\chi^2 = 3.861, P = 0.049$ 。

图 1 患者累积无溃疡复发率的观察结果

Figure 1 Observation of cumulative ulcer non-recurrence rate in patients

3 讨论

皮肤营养障碍和溃疡占了下肢 CVI 的 2%~5%,但其确切机制尚不清楚,早在 1917 年,John Homans 就提出了淤血性溃疡的概念,Homans 理论认为淤血和缺氧导致溃疡。事实上,溃疡的发病机制比 Homans 理论更为复杂,这也是治疗效果较差的原因。目前淤血性溃疡的概念已被废弃,公认静脉性溃疡这一名词更为恰当,但深静脉和交通支瓣膜功能不全导致的静脉高压形成溃疡的确切病理机制,目前尚不明确。近年来,CVI 皮肤微循环中白细胞聚集现象受到重视^[9]。细胞因子是一类能在细胞间传递信息、具有免疫调节和效应功能的蛋白质或小分子多肽,可由白细胞和内皮细胞等多种细胞释放,炎症细胞因子是指参与炎症反应的各种细胞因子,在众多炎症细胞因子中,起主要作用的是 TNF- α 、IL-1 β 等^[10]。本研究显示,VLU 组患者血 TNF- α 水平显著高于 CVI 无溃疡组和对照组,IL-1 β 在 VLU 明显高于对照组。表明 CVI 皮肤营养障碍时,患肢静脉曲张,TNF- α 和 IL-1 β 浓度明显增高。其原因可能是下肢静脉瓣膜功能不全时,静脉回流加快,大量血液淤积于小腿,从而造成下肢静脉系统瘀血和高压,激活单核细胞分泌释放 TNF- α 和 IL-1 β 。而 IL-2R 在 CVI 无溃疡组、VLU 组和对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明淋巴细胞可能不是导致皮肤溃疡形成的主要细胞类型。Claudy 等^[11]报道,VLU 中 TNF- α 免疫活性主要存在于毛细血管内的单核细胞,参与介导一些严重的病理生理过程而对机体造成损害。白细胞的趋化、激活和局部组织的浸润是静脉性溃疡形成的原因,或是溃疡而引起的表现^[12,13],Powell 等^[14]曾对 24 名下肢 CVI 患者(其中 10 名合并静脉性溃疡),15 名健康者对照,抽取血液,测量单核细胞 CD11b 的表达,结果下肢 CVI 患者组高于对照组,而下肢 CVI 组内(合并溃疡组与无溃疡组)无差异,说明单核细胞的激活并非静脉性溃疡的结果。陈流华等^[15]的研究也表明,白细胞的浸润是导致静脉性溃疡的重要因素。

本研究显示:与对照组比较,VLU 组 Cys C 表达显著降低;而针对静脉性溃疡的手术治疗以后,愈合中或愈合后患者的 Cys C 表达明显升高,说明血浆 Cys C 的表达与静脉性溃疡的发病密切相关;相关分析表明:血浆 Cys C 的表达与 TNF- α 和 IL-1 β 表达呈显著负相关。张媛媛等^[16]也发现,与正常大

隐静脉比较,曲张大隐静脉管壁中膜及内膜平滑肌细胞中组织蛋白酶 L 表达增强,Cys C 表达降低。因此推测,皮肤局部组织 Cys C 的低表达,趋化大量的白细胞向局部组织浸润,释放出细胞因子,很可能是导致静脉性溃疡的重要原因之一。手术后的检测结果显示,Cys C 的表达明显升高,术后 Cys C 表达较低的患者溃疡复发率高于 Cys C 高表达患者,提示 Cys C 表达较低的患者预后不佳。究其原因,针对静脉性溃疡的腔镜深筋膜下交通支静脉结扎技术、大隐静脉高位结扎和抽剥、以及局部曲张静脉的缝扎、刨吸等手术,使局部组织的静脉血流动力学明显改善,静脉淤血减少,白细胞及血小板等在局部血液淤积的情况得到部分改善,使内皮细胞分泌 Cys C 增多;白细胞黏附、捕获的减少,使其来源的一些炎症细胞因子相应的减少,同时减少了对局部组织的刺激,使组织及血浆 Cys C 的表达升高,反过来抑制了白细胞的趋化作用,这样就产生了一个良性循环,逐渐促使静脉溃疡的愈合。

因此,研究 Cys C 和检测白细胞激活标志物,可以为临床皮肤溃疡治疗的疗效及预后的判断提供帮助,也可望用药物干预,下调细胞因子的表达,预防和治疗 CVI。

[参考文献]

- [1] Coleridge Smith PD, Thomas P, Scurr JH, et al. Causes of venous ulceration: a new hypothesis [J]. Br Med J (Clin Res Ed), 1988, 296(6638): 1726-1727
- [2] van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases [J]. J Leukoc Biol, 2009, 85(2): 195-204
- [3] 孙磊, 杨志健, 贾恩志. 胱抑素 C 与冠心病的相关性研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(5): 702-706
- [4] Cheng XW, Huang Z, Kuzuya M, et al. Cysteine protease cathepsins in atherosclerosis-based vascular disease and its complications [J]. Hypertension, 2011, 58(6): 978-986
- [5] 李朝晖, 景在平, 陈泉, 等. 腔镜深筋膜下交通支结扎+溃疡周围环缝术治疗慢性下肢静脉性溃疡 23 例 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2008, 15(6): 416-417
- [6] 刘大钺, 王深明, 钱结胜, 等. 肿瘤坏死因子 α 与下肢静脉性溃疡发病的相关性研究 [J]. 中华普通外科杂志, 2007, 22(3): 215-217
- [7] 朱岚, 申卫红. 重度烧伤患者细胞因子水平的变化及其临床意义 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30(12): 1778-1780
- [8] 单桂芬, 林伟. ELISA 测定血清半胱氨酸蛋白酶抑制

剂 C[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(1): 105-106

[9] 叶开创, 陆信武. 血液成分改变在下肢慢性静脉功能不全中的作用[J]. 上海医学, 2009, 32(8): 669-671

[10] 瞿卫, 立彦, 陈永铭. 低剂量琥珀酸氢化可的松治疗感染性休克患者细胞因子的变化[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30(8): 1187-1189

[11] Claudy AL, Mirshahi M, Soria C, et al. Detection of undegraded fibrin and tumor necrosis factor-alpha in venous leg ulcers[J]. J Am Acad Dermatol, 1991, 25(4): 623

[12] 文雪刚, 何延政, 刘勇. 白细胞激活及炎症反应在慢性静脉功能不全中的作用[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2008, 15(3): 227-230

[13] Barath P, Fishhein MC, Cao J, et al. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma[J]. Am J Cardiol, 1990, 65(5): 297

[14] Powell CC, Rohrer MJ, Barnard MR, et al. Chronic venous insufficiency is associated with increased platelet and monocyte activation and aggregation [J]. J Vasc Surg, 1999, 30(5): 844-851

[15] 陈流华, 刘大钺, 熊江, 等. 细胞趋化因子 RANTES 在下肢静脉性溃疡发病中的作用 [J]. 中华医学杂志, 2009, 89(21): 1460-1463

[16] 张媛媛, 韩卉, 黄大可. 组织蛋白酶 L 及其抑制剂 Cystatin C 在曲张大隐静脉平滑肌细胞中的表达[J]. 解剖学杂志, 2007, 30(4): 427-430

[收稿日期] 2012-03-22

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容, 要符合编制题录、索引和检索的有关原则, 并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字, 必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号, 尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名, 这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序, 写法为: 姓前名后, 姓全部大写, 名的首字母大写, 其余字母小写, 名间加连字符, 如 ZHOU Ping, SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位, 如“南京医科大学第一附属医院心内科”, “南京医科大学公共卫生学院流行病学与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”, 并在论文首页下补充基金的名称、编号, 以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑: 接雅俐)