

# Luminex 液相芯片技术检测与胰岛素抵抗相关的脂肪细胞因子水平在妊娠期糖耐量受损孕妇中的相关性研究

钱源<sup>1</sup> 宗迪<sup>2</sup> 马润玫<sup>1</sup> 褚嘉佑<sup>2</sup> 孙浩<sup>2\*</sup>

(1. 昆明医科大学第一附属医院 妇产科, 云南 昆明 650032;

2. 中国医学科学院医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

**【摘要】** 目的 研究汉族妇女血清中的与胰岛素抵抗相关脂肪细胞因子水平, 并且比较在妊娠期正常血糖水平组和糖耐量受损组中的水平差异。方法 采用 Luminex 液相芯片技术对 IL-6、TNF- $\alpha$ 、瘦素、MCP-1 等脂肪细胞因子在共 80 例孕妇血清中的表达水平进行检测, 并进行差异性检测。结果 瘦素水平在 2 组中具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 其他各细胞因子则无明显区别 ( $P > 0.05$ )。结论 血清瘦素水平与妊娠期糖耐量受损 (GIGT) 密切相关, 如果改善血清瘦素水平, 提高胰岛素敏感性, 将对 GIGT 的防治有重要的临床意义。而 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 等细胞因子水平与 GIGT 则无关, 其与 GIGT 的关系需要进一步的研究。

**【关键词】** 液相芯片; 瘦素; 胰岛素抵抗; 糖耐量受损

**【中图分类号】** R714.256 **【文献标志码】** A

**【Abstract】 Objective** To investigate the level of cytokines associated with insulin resistance in serum of Chinese Han pregnancy women and to compare the discrepancy of the cytokine level between the control group and GIGT group. **Method** 40 samples in each of the impaired glucose tolerance group and the control group were selected, using Luminex multiplex analysis for the detection of cytokines level. The discrepancy between the two groups was detected using  $\chi^2$  analysis. **Results** The results showed that the serum Leptin level has significant difference between GIGT group and control group ( $P < 0.05$ ), and interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocyte chemo attractant protein 1 (MCP-1) have no obvious difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The result support that the level of Leptin was closely associated with the pathogenesis of the GIGT, which makes Leptin as a potential marker for gestational impaired glucose tolerance. The high level of expression of Leptin causes insulin resistance, while the latter is one of the major reason for abnormal glucose tolerance. There was no association between the level of IL-6, TNF- $\alpha$  and MCP-1 and pathogenesis of the GIGT. Futher studies are needed to detect the relationship between them.

**【Key words】** Luminex multiplex analysis; leptin, insulin resistance; impaired glucose tolerance

妊娠期糖耐量受损 (gestational impaired glucose tolerance, GIGT) 为早期的血糖稳态改变,

是介于正常妊娠状态和妊娠期糖尿病的一种中间状态, 并有可能进一步转化为妊娠期糖 (GDM) 尿病。已有研究支持在糖耐量受损的妊娠中, 大于胎龄儿、新生儿转入 ICU 及剖宫产、胎儿高胰岛素血症和胎

基金项目: 昆明医科大学第一附属医院院内资助项目“引起胰岛素抵抗的脂肪细胞分泌因子与妊娠期糖尿病易感性的研究”

\* 通讯作者: 孙浩, E-mail: sunhaox@hotmail.com

盘成熟不良的发生率增高<sup>[1-3]</sup>。HOPA的新研究结果也支持“随着母体孕期糖耐量受损程度的加重,胎儿受累的危险性变化是连续的”这一结论。GIGT和GDM在发病机制上是相同的,只是病变程度有所不同,两者对妊娠结局的影响也是极其相似的,这个已经得到大量资料的证明。但临床上常因GIGT引起的糖代谢紊乱相对较轻而被忽视,结果导致有些情况下GIGT的妊娠结局比GDM更严重,GIGT巨大儿发生率甚至高于GDM<sup>[4,5]</sup>。GIGT的研究在产科发展中占据重要地位。在重视GDM的同时,也不可忽视对GIGT的研究。

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是糖代谢异常及糖尿病的关键因素之一。胰岛素生理作用的反应性降低或敏感性降低,其实质为细胞对胰岛素介导的糖代谢能力的减低。胰岛素抵抗与全身炎症反应有关,脂肪细胞因子参与着妊娠期胰岛素抵抗的发生发展过程,与妊娠期糖耐量异常密切相关<sup>[6,7]</sup>。本研究亦采用了液相芯片技术对与胰岛素抵抗相关的脂肪细胞因子水平进行检测,以寻找脂肪细胞因子表达水平变化与GIGT之间的关系。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 根据知情同意的原则,选择2008年11月至2009年11月在昆明医科大学第一附属医院就诊的汉族孕妇共80例,根据28周OGTT检测糖耐量情况分为2组,其中妊娠期糖耐量受损(GIGT)组共40例,平均年龄(30.7±2.7)岁,平均孕龄(28.1±1.2)周;对照组为糖耐量正常孕妇,共40例,平均年龄(29.8±3.1)岁,平均孕龄(28.4±1.1)周。2组年龄、孕周均无统计学差异( $P>0.05$ )。

实验对象经静脉采血5 ml,其中2 ml静脉血EDTA盐抗凝,另外3 ml血静置,离心,提取血清。所有样本均置于-80℃冰箱保存。

1.2 诊断标准 2组孕妇于孕26~30周进行75 g糖筛查,GIGT诊断采用1999年世界卫生组织(WHO)的标准:空腹血糖<7.0 mmol/L且75 g口服葡萄糖耐量实验(OGTT)2小时血糖在7.8~11.1 mmol/L之间即可诊断为GIGT。

1.3 仪器 液相芯片系统Luminex 200™(美国

Luminex公司)。

1.4 统计学处理 各细胞因子表达水平通过Luminex 100 IS V2.3计算,统计分析应用SPSS 17.0统计软件进行,所有数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,样本比较采用 $t$ 检验,变量之间互相关系用相关分析,非正态分布变量经对数变换后分析。

## 2 结果

2.1 比较结果 40例糖耐量正常孕妇的空腹血糖水平分布在3.0~4.1之间。餐后2小时血糖水平分布在4.4~5.23之间。该组平均身高为(160±4.4) cm,孕前平均体重(49.5±4.0) kg,OGTT平均体重为(59.9±5.6) kg。孕前BMI(19.4±1.5),孕中BMI(23.4±2.0)。

相似地,40例糖耐量受损的孕妇空腹血糖分布于3.1~6.1之间,餐后2小时血糖水平分布在8.43~15.02之间。该组平均身高为(159±4.2) cm,孕前体重(54.6±8.3) kg,OGTT平均体重为(65.4±9.3) kg,孕前BMI(21.5±3.0),孕中BMI(25.8±3.4)。

糖耐量正常孕妇组与糖耐量受损组之间,身高不具有显著性差异,但孕前体重以及孕中体重具有显著性差异( $P<0.01$ )。糖耐量受损组的孕前体重显著高于正常对照组,至孕中期前者增加的体重数目小于后者。

2.2 血清脂肪细胞因子的水平 采用Luminex液相芯片技术对脂肪细胞因子IL-6、TNF- $\alpha$ 、瘦素、MCP-1水平进行了检测,具体结果如表1所示。结果表明,在GIGT组和正常对照组之间,血清瘦素水平具有显著性差异( $P<0.01$ )。其他脂肪细胞因子在两组之间则无明显区别( $P>0.05$ )。

表1 孕妇血清IL-6、TNF- $\alpha$ 、Leptin、MCP-1表达水平的检测结果( $\bar{x}\pm s$ )

组别	IL-6 (ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	Leptin ( $\mu$ g/L)	MCP-1 (ng/L)
对照组	3.35±2.50	5.91±2.95	17.8±7.69	131±52
GIGT组	4.06±3.44	6.02±3.46	24.2±12.9	147±59

## 3 讨论

3.1 妊娠期糖耐量受损组及对照组之间脂肪细胞

因子表达水平的差异 瘦素(Leptin)是肥胖基因(obese gene, Ob)编码的167个氨基酸的蛋白产物,最初是由洛克菲勒大学杰克逊实验室通过定位克隆于ob/ob肥胖小鼠身上发现<sup>[8]</sup>,这些小鼠携带有瘦素缺陷型基因的纯合子,结果导致瘦素的完全缺乏,表现为贪食、极度肥胖、糖尿病、神经内分泌异常、不孕等症状。瘦素主要由脂肪组织分泌,并且表达水平与身体脂肪含量密切相关<sup>[9]</sup>

本研究中发现瘦素在GIGT患者中的表达水平显著高于正常对照组,这在其他相关的研究中也得到了证实<sup>[10-12]</sup>,结果支持可能瘦素水平将成为妊娠期糖耐量异常的一个潜在标志物。目前笔者所知,怀孕是一个生理胰岛素抵抗的状态,如果胰岛素分泌不能维持血糖平衡,孕妇将发展成为妊娠期糖耐量异常,而高瘦素血症则会造成胰岛素抵抗或者加剧胰岛素抵抗,从而成为妊娠期糖耐量异常发生过程中的一个重要因素。瘦素的高表达量引发胰岛素抵抗主要有以下几个原因:①高浓度的瘦素可以通过葡萄糖-6-磷酸酶抑制肝糖原分解,而游离的葡萄糖又可以通过糖异生转变成糖原,从而导致血糖水平降低,这种情况下,胰岛素只有增加分泌来维持血糖平衡,引发胰岛素抵抗<sup>[13]</sup>;②瘦素对脂肪的影响主要为抑制脂肪合成,促进脂肪分解,胰岛素则具有相反的作用,从而高浓度的瘦素引发胰岛素抵抗<sup>[14]</sup>;③瘦素对胰岛素分泌起到抑制作用,而胰岛素则刺激瘦素分泌,两者之间达到某种平衡。在病理状态下,瘦素受体对瘦素不敏感,即瘦素敏感性下降,瘦素不能发挥作用,造成高瘦素血症,瘦素不能有效抑制胰岛 $\beta$ 细胞分泌胰岛素,两者之间的平衡被打破,胰岛素分泌增加,则导致胰岛素抵抗<sup>[15]</sup>。

同时本研究也发现IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1血清水平与GIGT无明显的关联,而这些细胞因子又被报道与胰岛素抵抗相关,笔者推测其原因可能是GIGT为糖耐量异常的早期状态,在这个过程中血清中相关的炎症因子还未产生或者较少量产生,其存在的胰岛素抵抗程度尚未非常严重,推测可能由单一瘦素所引发的胰岛素抵抗造成了糖耐量受损。多个细胞因子引起的胰岛素抵抗将具有累积效应,可能在更为后期更严重的妊娠期糖耐量异常即

GDM中才能发现。

综上所述,血清瘦素水平与GIGT密切相关,如果改善血清瘦素水平,提高胰岛素敏感性,将对GIGT的防治有重要的临床意义。而IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1等细胞因子水平与GIGT则无关,其与GIGT的关系需要我们进一步的研究才能加以确定。

3.2 液相芯片技术在细胞因子检测中的应用 随着生命科学的不断发展,少数几个指标的检测已经不能完全反映研究对象的生理状态,而高通量的多指标检测技术平台成为临床科学研究及临床应用的迫切需要。

Luminex液相芯片系统就是结合了流式细胞仪技术和微球技术的高通量检测平台,它可以对同一样品同时进行多达100种不同的检测项目,样本量却仅仅需要25微升。

Luminex液相分析系统的核心技术包括了荧光微球技术、流式检测技术和信号处理技术等几部分,其中微球技术是Luminex的特色所在。Luminex公司在其早期的研究基础上发现,最初采用根据微球大小来区分出的微球类型数目受到很大限制,因此Luminex系统采用2种不同荧光染料对同一大小的微球进行染色,每种染料分别有10种不同的浓度梯度,而这2个浓度梯度进行自由组合后就可以得到100种可区分的不同颜色的微球,这样不同的荧光微球上包被不同的检测分子,就可以在一个反应体系里同时检测100种不同的分子。Luminex的检测系统通过2束不同波长的激光进行检测,635 nm的红色激光照射微球后,微球能发射658 nm和712 nm的荧光,根据探测到的荧光微球的荧光强度来判断是哪种微球,从而对探针分子定性;另一束532 nm的绿色激光用来激发探针分子上的PE染料,通过对PE发出的橙色荧光强度的测量,来对待检生物分子进行定量。通过这个反应体系,我们就能够快速地对同一个样本中的不同指标参数进行定性定量检测,由于其处理样本类似计算机芯片密度高、速度快,且在溶液中进行,故称之为液相芯片技术。

在Luminex系统中,荧光微球是通过化学反应

与特定的分子(抗原抗体、核苷酸探针、受体与底物等)结合。在这一过程中,预先经化学修饰的荧光微球提供活性化学基团,此基团与特定分子的特定化学基团形成共价结合,从而各种探针分子得以稳定地与微球结合,而且结合的效果可以方便地通过控制反应中的条件来稳定。这种化学偶联荧光微球与各种探针的方式对于 Luminex 液相分析系统检测结果的稳定性是非常重要的。

3.3 孕前体重水平确实是发生 GIGT 的独立危险因素 糖耐量正常孕妇组与糖耐量受损组之间,身高不具有显著性差异,但孕前体重以及孕中体重具有显著性差异( $P < 0.01$ )。糖耐量受损组的孕前体重显著高于正常对照组,至孕中前者增加的体重数目小于后者。Young 等<sup>[16]</sup>报道妊娠期 OGTT 异常者中,孕前肥胖者发生 GDM 的危险性是正常者的 22.4 倍。Berkowitz 等<sup>[17]</sup>报道,孕前高 BMI 者患 GDM 的危险性大大增加,经多因素 logistic 回归分析后,孕前高 BMI 是独立的危险因素。由此可见大量研究支持孕前肥胖是 GDM 和 GIGT 发生的重要因素。因此,控制孕前肥胖是预防 GDM 和 GIGT 发生的重要方面,对孕前肥胖的孕妇应加强监测,尽早识别和诊断 GDM 和 GIGT,降低母婴并发症的发生。

#### 参 考 文 献

- [1] 周丽萍,王智红,周维,等. 妊娠期糖耐量异常对妊娠结局的影响[J]. 中国妇幼保健,2006,21(23):3227-3229.
- [2] 时春艳,杨慧霞,谢翠英,等. 妊娠期糖代谢异常对巨大儿发生率及其他相关问题的影响[J]. 中华围产医学杂志,2005,8(1):9-12.
- [3] 韩轲,陈维清,黄杏端,等. 妊娠期糖代谢异常对妊娠的不良影响[J]. 中国糖尿病杂志,2008,16(3):134-136.
- [4] 冯小静,周卫卫. 妊娠期糖耐量受损 80 例临床分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2003(No. 5):295-296.
- [5] 刘津予,康林泉,孟凡丽. 妊娠期糖耐量受损对母儿的影响[J]. 中国妇幼保健,2008,23(9):1232-1233.
- [6] Grimble R F. Inflammatory status and insulin resistance[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care,2002,5(5):551-559.
- [7] 李秀钧. 代谢综合征胰岛素抵抗综合征[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,2007:133.
- [8] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994,372(6505):425-432.
- [9] Considine R V, Sinha M K, Heiman M L, et al. Serum immunoreactive-Leptin concentrations in normal-weight and obese humans[J]. N Engl J Med,1996,334(5):292-295.
- [10] Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, et al. Increased plasma Leptin in gestational diabetes [J]. Diabetologia,2001,44(2):164-172.
- [11] Silva N Y, Tennekoon K H, Senanayake L, et al. Cord blood Leptin levels in normal pregnancies, pregnancy induced hypertension and gestational diabetes mellitus [J]. Ceylon Med J,2008,53(3):79-82.
- [12] Stock S M, Bremme K A. Elevation of plasma Leptin levels during pregnancy in normal and diabetic women [J]. Metabolism,1998,47(7):840-843.
- [13] Barzilay N, Wang J, Massillon D, et al. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action [J]. J Clin Invest,1997,100(12):3105-3110.
- [14] Akther A, Khan K H, Begum M, et al. Leptin: a mysterious hormone; its physiology and pathophysiology [J]. Mymensingh Med J,2009,18(1 Suppl):S140-S144.
- [15] Girard J. Is Leptin the link between obesity and insulin resistance? [J]. Diabetes Metab,1997,23 Suppl 3:16-24.
- [16] Young C, Kuehl TJ, Sulak PJ, et al. Gestational diabetes screening in subsequent pregnancies of previously healthy patients [J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 182(5): 1024-1026.
- [17] Berkowitz GS, Lapinski RH, Wein R, et al. Race/ethnicity and other risk factors for gestational diabetes [J]. Am J Epidemiol, 1992, 135(9): 965-973.

编辑:宋文颖

(收稿日期:2012-11-28)