

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.27.015

新型肾损伤标志物联合检测在 2 型糖尿病肾损伤早期诊断中的价值*

马永能,彭秀娟,杨自力,刘国雄,刘 珊,任皓月
(四川省绵阳市第三人民医院检验科 621000)

[摘要] **目的** 探讨肾损伤标志物肾损伤分子 1(Kim-1)、热休克蛋白 72(Hsp72)、人纤溶酶原激活物抑制因子 1(PAI-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)联合检测在 2 型糖尿病肾损伤早期诊断中的价值。**方法** 将 187 例临床确诊为 2 型糖尿病的患者根据尿蛋白 4 项,即尿微量清蛋白(MA)、尿转铁蛋白(TRU)、尿免疫球蛋白(IGU)、尿 α 1-微球蛋白(A1M)结果分成尿蛋白阴性组(A 组)48 例和尿蛋白阳性组(B 组,至少有一项尿蛋白阳性)139 例;50 例尿蛋白阴性的健康体检者为健康对照组(NC 组),对各组分别测定其晨尿中 Kim-1、Hsp72、PAI-1、NGAL 的水平。MA、TRU、IGU、A1M 采用速率散射比浊法;Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 采用 ELISA 法。**结果** A 组患者尿中 Kim-1、Hsp72 和 PAI-1 水平与 NC 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),NGAL 的水平变化差异无统计学意义($P > 0.5$);B 组 Kim-1、Hsp72、PAI-1、NGAL 各指标的水平均明显高于 NC 组($P < 0.01$),并且 B 组与 A 组相比,各项指标升高更明显($P < 0.01$)。Kim-1、Hsp72、PAI-1、NGAL 4 项指标联合检测阳性率高于单项检测($P < 0.01$),在 A 组的阳性率为 66.70%。**结论** 2 型糖尿病患者尿中 Kim-1、Hsp72、PAI-1、NGAL 在尿蛋白出现前就已出现明显异常,且这种异常变化随肾损伤程度的加重而明显;Kim-1、Hsp72、PAI-1、NGAL 可作为 2 型糖尿病肾损伤早期的标志物,联合检测阳性率明显高于单项检测,极大地提高了阳性检出率。

[关键词] 糖尿病,2 型;肾损伤分子 1;热休克蛋白 72;人纤溶酶原激活物抑制因子 1**[中图分类号]** R587.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)27-3791-03

The early renal injury diagnostic value of new markers joint detection for type 2 diabetic kidney injury*

Ma Yongneng, Peng Xiujian, Yang Zili, Liu Guoxiong, Liu Shan, Ren Haoyue

(Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Mianyang, Mianyang, Sichuan 621000, China.)

[Abstract] **Objective** To explore the diagnosis value of urinary molecular markers of Kidney injury molecule 1(Kim-1), heat shock protein 72(Hsp72), plasminogen activator inhibitor 1(PAI-1), neutrophil gelatinase associated lipocalin(NGAL) joint detection in the diagnosis of early type 2 diabetes renal damage. **Methods** Totally 187 cases of type 2 diabetes mellitus patients were separate into two groups based on combination of four urine proteins[Microalbumin(MA), urinary transferrin(TRU), urine immunoglobulin(IGU), urine alpha 1 microglobulin(A1M)]. Group A had 48 cases, and the urine protein of patients were negative. Group B had 139 cases, and the urine protein of patients were positive. The normal control group(NC group) selected 50 cases of urinary protein negative healthy people. MA, TRU, IGU, A1M were detected by rate scattering turbidimetric method, and Kim-1, Hsp72, PAI-1 and NGAL were detected by enzyme-linked immunosorbent. **Results** Compared with NC group, the levels of urine Kim-1, Hsp72 and PAI-1 had significant increase in group A($P < 0.01$), but the variation in content of NGAL had no statistical significance ($P > 0.5$). The levels of Kim-1, Hsp72, PAI-1 and NGAL significantly increased in group B($P < 0.01$), and the increase value was more significantly in group B($P < 0.01$). The positive rates of Kim-1, Hsp72, PAI-1 and NGAL joint detection reached 66.70% in group A, which was significantly higher than single detection($P < 0.01$). **Conclusion** The levels of Hsp72, PAI-1, Kim-1 NGAL protein have been a significant exception before urinary protein in type 2 diabetes mellitus patients, and the abnormal is obvious with the increase of renal damage degree. Kim-1, Hsp72, PAI-1, NGAL can be used as early biomarkers of kidney injury in type 2 diabetes, the joint detection will greatly increase the positive detection rate.

[Key words] diabetes mellitus, type 2; kidney injury molecule 1; heat shock protein 72; plasminogen activator inhibitor 1

糖尿病作为危害人类健康的重要疾病之一,其患病率呈逐年上升趋势,据 WHO 报道,到 2030 年全球糖尿病患者预计将从 2010 年的 2.85 亿上升至 4.39 亿^[1]。随着医疗技术的不断进步,虽然糖尿病患者的血糖控制情况得到了改善,一定程度上延长了患者的寿命^[2]。但是,由于患者常常不能遵照医嘱等原因,即便是有效的治疗也并不能保证血糖的完全控制,即便是得到一定治疗的患者也有可能发生慢性的大血管和微血管方面的疾病,而糖尿病肾病是最常见的并发症^[3-5]。而且,由于 25.0%~40.0% 的糖尿病患者最终将发展成为糖尿病肾病,进

而发展成为终末期慢性肾病,患者需要透析或者肾移植才能生存,因此,糖尿病及其并发的糖尿病肾损伤成了最受关注的公共健康问题^[6-7]。

由于糖尿病所致的肾损伤大多起病隐匿,呈渐进性肾功能损害,早期常缺乏明显的临床表现,当患者出现临床症状或者影像学检查有明显损伤时大多已达到病程后期,出现严重的肾功能衰竭,治疗难度大、花费贵、预后差。鉴于此,临床医生迫切需要一些能早期诊断和检测糖尿病肾病的生物标志物,使糖尿病所致的肾损伤能早发现、早治疗,从而阻止其发展成肾脏

* 基金项目:绵阳市卫生局立项课题支持项目(201232);绵阳市应用技术与开发(14S-ZC-06)。 作者简介:马永能(1971—),本科,副主任检验技师,主要从事临床检验工作。

纤维化甚至肾衰竭,降低病死率^[8]。所以寻找一组灵敏度高、特异度强的诊断早期肾损伤的生物学标志物成为研究热点。

本研究拟利用近年来研究者在急性肾损伤的早期诊断中提出的有意义的几个主要的生物标志物,即肾损伤标志物肾损伤分子 1(Kim-1)、热休克蛋白 72(Hsp72)、人纤溶酶原激活物抑制因子 1(PAI-1)、人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)来检测其在 2 型糖尿病患者中的表达,旨在评价其联合检测在 2 型糖尿病肾损害早期诊断中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择被本院内分泌科确诊为 2 型糖尿病的患者 187 例为研究对象,患者年龄 40~70 岁,男女不限。受试者需排除酮症酸中毒、非糖尿病肾病、泌尿系感染、肿瘤、肝脏疾病及血管病变患者。根据尿微量蛋白 4 项,即尿微量清蛋白(MA)、尿转铁蛋白(TRU)、尿免疫球蛋白(IGU)、尿 α 1-微球蛋白(A1M)定量结果将受试者分为两组,尿蛋白全阴性为 A 组($n=48$);至少有一项尿蛋白阳性的为 B 组($n=139$);健康对照组(NC 组)选择 50 例健康体检者,且尿蛋白 4 项阴性,血糖、肝功能和血脂正常,年龄 40~65 岁。

1.2 标本采集与保存 尿液标本留取收集清晨第 1 次晨尿(中段尿)10 mL,留取的尿液由护工及时送达实验室。尿标本 2 000×g 离心 15 min 后,用上清液立即测定尿蛋白 4 项 TRF、TRU、MA、A1M;另取离心后的尿液 1 mL 于 EP 管内,−80 °C 保存备 Kim-1、Hsp72、PAI-1、NGAL 的测定。

1.3 方法 尿蛋白 4 项 TRF、TRU、MA、A1M 在 IMMAGE-800 上采用速率散射比浊法检测,IMMAGE-800 全自动特定蛋白分析仪和配套试剂均由贝克曼公司提供;Kim-1、Hsp72、L-FABP、Netrin-1 采用 ELISA 法,试剂由上海基免生物技术有限公司和武汉新启迪生物科技有限公司提供,试剂盒均按相应的说明书进行操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据统计与分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组尿蛋白 4 项 MA、TRF、IGU、A1M 水平 A、B 组的各项指标变化与 NC 组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$),B 组较 A 组各项指标升高更明显($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 3 组尿蛋白 MA、TRF、IGU、A1M 水平($\bar{x} \pm s$,mg/L)

组别	<i>n</i>	MA	TRF	IGU	A1M
NC 组	50	2.45±1.2	0.83±0.07	3.21±0.30	5.76±0.81
A 组	48	5.56±5.3	1.17±0.49	5.39±1.27	7.54±3.11
B 组	139	42.44±73.1	3.43±3.72	10.80±12.52	43.30±22.20

2.2 3 组 Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 水平 A 组中 Kim-1、Hsp72 和 PAI-1 的水平与 NC 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),NGAL 的水平变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。B 组 Kim-1、Hsp72、PAI-1、NGAL 各指标的水平均明显高于 NC 组及 A 组($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 B 组与 NC 组 Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 水平 将 B 组的 139 例 2 型糖尿病患者根据尿蛋白的情况进行分组,尿蛋白 4 项 TRF、TRU、MA、A1M 中有 1 项阳性的为 B1 组($n=37$);有 2 项阳性的为 B2 组($n=44$);3 项或 4 项均阳性的为 B3

组($n=57$)。方差分析结果显示, Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 的水平在 B1、B2、B3 组均明显高于 NC 组($P < 0.01$),且 B3 组高于 B2 组和 B1 组($P < 0.01$),B2 组高于 B1 组($P < 0.01$)。随着肾损伤的加重, Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 的水平越高。见表 3。

表 2 3 组 Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 水平($\bar{x} \pm s$, μ g/L)

组别	<i>n</i>	Kim-1	Hsp72	PAI-1	NGAL
NC 组	50	6.89±2.81	38.86±13.77	66.50±17.49	0.92±0.26
A 组	48	14.12±12.48	70.53±40.20	125.±91.19	1.24±0.60
B 组	139	32.41±21.22	124.7±60.38	192.±92.78	1.99±1.06

表 3 B 组与 NC 组 Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 水平($\bar{x} \pm s$, μ g/L)

组别	<i>n</i>	Kim-1	Hsp72	PAI-1	NGAL
NC 组	50	6.89±2.81	38.86±13.77	66.5±17.49	0.92±0.26
B1 组	37	9.44±3.27	60.44±10.11	111.38±20.12	1.46±0.74
B2 组	44	26.36±11.01	103.29±30.17	175.20±50.13	1.89±1.20
B3 组	57	52.63±9.76	181.61±18.56	261.07±44.47	2.43±1.03

2.4 A 组 Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 联合检测情况 将 Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 在 NC 组中的测定值进行靶值(\bar{x})和标准差(s)计算,为了避免假阳性的产生,将 $+2s$ 定为正常上限,大于 $+2s$ 即为阳性。分析 48 例尿蛋白阴性的 A 组 2 型糖尿病患者中早期标志物的阳性情况和阳性率,发现 NGAL 的阳性人数是 13 例,阳性率最低(27.1%);PAI-1 的阳性人数 26 例,阳性率最高(54.2%);4 项指标联合检出阳性人数为 32 例,总阳性率最高(66.7%),明显高于单指标检测($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 A 组 Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 联合检测情况

组别	阳性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
Kim-1	17	35.4
Hsp72	21	43.7
PAI-1	26	54.2
NGAL	13	27.1
4 项联合检测	32	66.7

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病患者常见的并发症,也是死亡的主要原因之一,随着病程的延长,糖尿病肾病的发病率不断增加。糖尿病大于 20 年以上的患者,糖尿病肾病发病率几乎是 100%,早期积极治疗,可降低糖尿病肾病的发病率和病死率。目前对已确诊的糖尿病患者监测其肾损伤的常用办法是进行尿微量蛋白测定、尿常规排查。因受尿路感染等多因素影响,使得检测结果不能满足临床早期诊断糖尿病肾病的需要。

根据临床早期、有效诊断糖尿病肾病需要,早期糖尿病肾病诊断的理想生物学标志物应该是:早于尿素氮和肌酐的改变;能同时反映肾小球和肾小管的损伤;还应具备在血液或体液中易检测的、稳定的、特异表达的生物分子。

NGAL、Hsp72、KIM-1、PAI-1 是新近发现的具有应用前景的早期诊断急性肾损伤的生物标志物。KIM-1 是肾小管上皮细胞一种跨膜糖蛋白,属于免疫球蛋白基因超家族^[9]。KIM-1 在正常肾中微量表达,而在受损后再生的肾小管上皮细胞中表达显著增强,并可从尿中排出。实验动物模型研究表明,KIM-1 在药物注射肾损伤的第 1 天明显升高,而常规的检查指标如血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿蛋白和尿 N-乙酰-β-葡萄糖苷(NAG),并没有在这个时间点发生变化。因此检测尿中的 KIM-1 水平可作为肾损伤早期监测的生物指标之一^[10]。NGAL 又名脂质运载蛋白-2,是脂钙蛋白家族的成员之一^[11],1993 年在中性粒细胞中发现,后来研究表明当肾受损伤时其可积聚于肾小管皮质区,并在血液和尿液中高度表达,故可作为肾损伤的早期标志物。而 Hsp72 在多种因素导致的肾小管损伤中均有明显的表达,成为早期灵敏地反映急性肾小管不同程度损伤的重要分子^[12]。研究发现 PAI-1 通过参与调节肾脏血管紧张素转换酶抑制剂和参与微血管损伤等在 2 型糖尿病肾病中发挥重要作用^[13-14]。由于肾损伤后各指标表达的差异和达峰时间的不同,单一检查一个指标有局限性,若能将它们联合检测,将发挥更高的临床应用价值。

本研究通过对 2 型糖尿病患者尿液中微量尿蛋白 4 项 TRF、TRU、MA、A1M 进行检测,实验结果显示,A 组 Kim-1、Hsp72 和 PAI-1 的水平与 NC 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),NGAL 的水平变化差异无统计学意义($P > 0.5$),提示 Kim-1、Hsp72 和 PAI-1 在尿蛋白异常前就已出现明显的变化;B 组 Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 各指标的水平均明显高于 NC 组($P < 0.01$),且 B 组较 A 组各项指标均明显升高($P < 0.01$)。根据患者尿蛋白高低的情况,分了 B1、B2、B3 3 个组,从表 3 可以看出,Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 是依次递增的,说明肾损伤程度加重后这些测定值升高更加明显。从表 4 可以看出,即便是在尿蛋白阴性的 A 组患者,尿 Kim-1、Hsp72、PAI-1 和 NGAL 的变化差异也是有统计学意义。并且联合检测的阳性率可高达 66.70%,明显高于单指标检测。

综上所述,Kim-1、Hsp72、PAI-1、NGAL 可作为 2 型糖尿病肾损伤早期的标志物,联合检测将极大地提高阳性检出率,对早期预防、早期治疗糖尿病肾病及监测病情进展有较大的临床应用价值。

参考文献

[1] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(1): 4-14.

[2] Penforinis A, Personeni E, Borot S. Evolution of devices in diabetes management[J]. *Diabetes Technol Ther*, 2011, 13(Suppl 1): S93-102.

[3] Stolar M. Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus[J]. *Am J Med*, 2010, 123(3 Suppl): S3-11.

[4] Maric C, Hall JE. Obesity, metabolic syndrome and diabetic nephropathy[J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 170: 28-35.

[5] Blázquez-Medela AM, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C. Mechanisms involved in the Genesis of diabetic nephropathy[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2010, 6(2): 68-87.

[6] Reutens AT, Atkins RC. Epidemiology of diabetic nephropathy[J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 170: 1-7.

[7] McCrary EB. The road to renal failure: an overview of diabetic nephropathy[J]. *Adv Nurse Pract*, 2008, 16(7): 61-63.

[8] Tgel FE, Westenfelder C. Mesenchymal stem cells: a new therapeutic tool for AKI[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6(3): 179-183.

[9] Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1(KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury[J]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2008, 241: 78-83.

[10] Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, et al. Urinary kidney injury molecule-1 [J], a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(2): F517-529.

[11] Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(10): 2534-2543.

[12] Barrera-Chimal J, Perez-Villalva R, Cortes-Gonzalez C, et al. Hsp72 is an early and sensitive biomarker to detect acute kidney injury[J]. *EMBO Mol Med*, 2011, 3(1): 5-20.

[13] Kenichi M, Masanobu M, Takehiko K, et al. Renal synthesis of urokinase type-plasminogen activator, its receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 in diabetic nephropathy in rats: modulation by angiotensin-converting-enzyme inhibitor[J]. *J Lab Clin Med*, 2004, 144(2): 69-77.

[14] Adly AA, Elbarbary NS, Ismail EA, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: relation to diabetic microvascular complications and carotid intima media thickness [J]. *J Diabetes Complications*, 2014, 28(3): 340-347.

(收稿日期:2015-03-07 修回日期:2015-06-29)

2015 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者,本刊一律接受网上投稿,不再接受纸质和电子邮箱投稿!请您直接登陆网站 <http://cqyx.journalserv.com/> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话:023-63604477。

来稿须将审稿费 100 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部,编辑部若未收到审稿费,稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!