

[5] Ngan GJ, Ng LM, Jureen R, et al. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23SrRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria [J]. Lett Appl Microbiol, 2011, 52(5): 546-554.

[6] 王峰, 朱玉梅, 桂静, 等. PCR 测序和基因芯片快速鉴定分枝杆菌菌种的应用研究[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(11): 713-717.

[7] 梁建琴, 吴雪琼, 王巍, 等. 应用寡核苷酸探针阵列法快速鉴定临床分离株中的分枝杆菌[J]. 军医进修学院学报, 2007, 28(1): 29-31.

[8] 梁建琴, 高华方, 李洪敏, 等. PCR-荧光探针法快速检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌[J]. 中华医学会结核病学分会 2011 年学术会议论文汇编, 2011, 20(1): 20-23.

[9] 康丽军, 洪峰, 冯建兵, 等. 结核/非结核分枝杆菌核酸快速检测方法临床应用价值[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(5): 263-266.

[10] Taghi Naserpour Farivar, Pouran Johari, Abbas Ali Moien, Assessment of Prevalence of Non-tuberculous Mycobacteria in Archival Acid-fast Bacilli Positive Smear Slides by TaqMan Real-time PCR Assay[J]. NORTH American Journal of Medical Sciences, 2012, 4(5): 231-234.

[11] Young Jin Choi, Hwi Jun Kim, Hee Bong Shin, et al. Evaluation of Peptide Nucleic Acid Probe-based Real-time PCR for Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Specimens [J]. Ann Lab Med, 2012, 32(4): 257-263.

[12] Jeong-Uk Kim, Choong-Hwan Cha, Hae-Kyong An. Multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis for identifying mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 483-487.

[13] Taghi Naserpour Farivar, Pouran Johari, Abbas Ali Moien, et al. Assessment of Prevalence of Non-tuberculous Mycobacteria in Archival Acid-fast Bacilli Positive Smear Slides by TaqMan Real-time PCR Assay [J]. N Am J Med Sci, 2012, 4(5): 231-234.

[14] Chia-Sui Ong, Yun-Fong Ngeow. Evaluation of PCR-RFLP analy-

sis targeting hsp65 and rpoB genes for the typing of mycobacterial isolates in Malaysia [J]. J Med Microbiol, 2010, 59 (Pt11): 1311-1316.

[15] Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, et al. Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country [J]. Jpn J Infect Dis, 2011, 64(4): 265-271.

[16] 万彦彬. 用 PCR-限制性长度多态性鉴定结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌 [J]. 实用预防医学, 2010, 17(5): 879-882.

[17] Orita M, Iwahana H. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1989, 86(8): 2766-2770.

[18] 石玉玲, 陈建芸, 李林海, 等. 应用基因芯片快速检测分枝杆菌 [J]. 生物技术通讯, 2011, 3(22): 419-423.

[19] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.

[20] 邵军军, 周广青. 环介导等温技术及其在分子诊断中的应用 [J]. 实验诊断与治疗杂志, 2007, 21(6): 451-459.

[21] Anna M, Checkley DH, Wyllie TJ, et al. Identification of Antigens Specific to Non-Tuberculous Mycobacteria: The Mce Family of Proteins as a Target of T Cell Immune Responses [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26434.

[22] 林飞燕, 陆春, 叶庭路, 等. 变性高效液相色谱法在微生物检测的应用进展 [J]. 现代科学仪器, 2009, 25(5): 116-118.

[23] Aurelie Lotz, Agnès Ferroni. Rapid Identification of Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 4481-4486.

[24] Joseph Jeong, Sung-Ryul Kim, Seon Ho Lee, et al. The Use of High Performance Liquid Chromatography to Speciate and Characterize the Epidemiology of Mycobacteria [J]. Lab Medicine, 2011, 42(10): 612-617.

(收稿日期: 2013-01-23)

• 综 述 •

急性肾损伤的检测指标 NGAL 的研究进展

马玉国, 赵红丽, 任秀华, 赵俊月 综述, 马玉国 审校
(武警河北总队医院检验科, 河北石家庄 050081)

关键词: 肾功能衰竭; 载体蛋白质类; 综述
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 14. 029

文献标识码: A **文章编号:** 1673-4130(2013)14-1842-03

急性肾损伤 (AKI) 原称急性肾功能衰竭 (ARF)。它是由各种原因引起的肾功能在短时间 (几小时至几天) 内突然下降而出现的临床综合征。2005 年 9 月, 在阿姆斯特丹召开的合作研讨会上, 将肾功能衰竭更名为急性肾损伤^[1]。AKI 由于其病死率高, 急性肾损伤的早期诊断和分期直接决定其治疗措施, 进而影响预后, 因此努力提高其早期诊断率, 对急性肾损伤进行早期防治, 有着积极的临床意义。

在常规评价肾功能降低的指标中, 多采用肌酐、尿素氮以及尿量等指标, 但是这些指标缺乏较高的敏感性, 特异性较差, 临床检验中极易受到各种因素的干扰。可靠的检测指标的缺乏, 是 AKI 致死率居高不下的重要原因之一^[2]。近几年, 国内外学者对于急性肾损伤的研究主要集中在其早期诊断方面, 大量临床研究表明, 通过对 AKI 早期诊断和干预, 可以有效降低

患者病死率。中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 作为脂质运载蛋白家族的成员之一, 其结构与功能在急性肾损伤的报道成为目前研究的热点。

1 AKI 的定义及诊断标准

AKI 的定义: AKI 是指不超过 3 个月的肾脏功能或结构方面的异常, 包括血、尿、组织检测或影像学方面的肾损伤标志物的异常。AKI 的临床检验诊断标准为: 肾功能在 48 h 内突然减退, 具体为血清肌酐 (SCr) 升高绝对值大于 26.5 $\mu\text{mol/L}$; 或血肌酐较前升高大于 50%; 或尿量减少 (尿量小于 0.5 mL/(kg · h), 时间超过 6 h^[3]。

2 NGAL 的基因结构及功能

2.1 NGAL 的生物学特性 NGAL 蛋白的分子量为 25×10^3 , 它是 lipocalin 家族的新成员, Kjeldsen 在 1993 年在人

性粒细胞中发现^[4],是脂质运载蛋白 lipocalin 超家族中 2 号成员,又名脂质运载蛋白 2、铁转运蛋白、24p3。大量研究表明,NGAL 与明胶酶 B,即 MMP-9 的功能密切相关。据研究,机体在外界有害条件(如:X-ray 或 H₂O₂)的刺激下,NGAL 的表达会远高于正常值,表明 NGAL 的表达是由活性氧化剂直接诱导产生的,因此,NGAL 也被作为一种鉴别机体内氧化强度的一种生物指标^[5-6]。人类 NGAL 基因定位于第 9 号染色体长臂(9q34),全长 5 869 bp,其基因结构包含 5'端非转录区、3'端非转录区、以及由 7 个外显子和 6 个内含子构成的原初转录区(primary transcribed region)^[7]。NGAL 的可以结合多种配体包括血小板活化因子(PAF),白三烯-B4(LT-B4)和 N-甲基-甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸(N-formyl-Met-Leu-Phe)等^[8]。

2.2 NGAL 在人体组织中的分布与功能 NGAL 最初在人类中性粒细胞中被发现的,并共价结合于中性粒细胞的明胶酶。因此在人体的正常生理状态下,NGAL 除了在中性粒细胞表达外,NGAL 还在肾脏、肝脏、胃、结肠、胰腺、前列腺及胸腺等组织中以极低水平表达,其中包括胃壁细胞、肝胆管细胞、肾近曲小管细胞、小肠潘氏细胞、脂肪细胞以及巨噬细胞等。而在脑及以及周围和心脏等组织中,则不表达^[9]。当发生炎症(如全身炎性反应综合征、严重脓毒症及脓毒症休)或上皮细胞受到损伤性、以及外界有害条件(如:X-ray)刺激,NGAL 才大量表达。

2.3 NGAL 的功能 大量研究表明 NGAL 参与多样的生化反应过程,涉及胚胎发育、细胞凋亡、脂质代谢、细胞分化、炎症免疫应答、肿瘤的发生、发展等^[10]。肾脏的发育受输尿管芽分泌因子的调控,而 NGAL 是诱导上皮细胞形成输尿管芽分泌因子的重要因素之一。Burne 研究发现,NGAL 具有类似于转铁蛋白的铁转运功能,其过程涉及到:NGAL 被早期的原始肾上皮细胞摄取,通过介导铁转运从而促进原始肾上皮细胞的成熟^[11]。同时研究还发现:NGAL 可以通过抑制铁离子以干扰细菌能量代谢,从而抑制其生长发育。这种结合力是以氢键和范德华力维系的,形成具有高度亲和力且牢固的 NGAL·Fe·Ent 三元复合物^[12]。所以 NGAL 还是参与干扰细菌生长代谢的一个抗菌蛋白^[13]。

3 NGAL 与急性肾损伤的相关性

NGAL 是一种小分子蛋白,可以直接检测尿液,样本的获取比较简便。在有关急性肾损伤的动物模型中,Devarajan^[14]和 Michael 等^[15]研究证明:小鼠在被诱导肾脏受损后一个小时后,检测排出的尿液 NGAL 浓度水平,发现受诱导的小鼠的 NGAL 的浓度显著高于正常小时,而且即使是轻微的“亚临床”型肾缺血,NGAL 也可检测到其浓度的变化。

目前在临床上通常根据血肌酐及尿量的测定来诊断 AKI(见表 1),但是以上两个指标在检测 AKI 方面有不足之处,血清肌酐敏感性较低,通常情况下,肾功能下降 50%以上时,血肌酐浓度才会有所改变。

表 1 AKI 的分期标准		
分期	Scr 标准	尿量标准
1	Scr 升高>26 μmol/L 或较其线值增<0.5 mL/kg/h 连续 6 h 以高 1.5~2 倍	上
2	Scr 基线值增高 2~3 倍	<0.5 mL/kg/h 连续 12 h 以上
3	Scr 较基线值增高>3 倍;或 Scr≥354<0.3 mL/kg/br 连续 24 h μmol/L;或接受肾脏替代治疗	以上,或无尿 12 h

除上述两项指标外,国外很多研究学者的研究还表明

NGAL、肾损伤分子-1(KIM-1)、胱抑素-C、白介素-18 等其他与 AKI 关系密切^[16]。但是 Jaya Mishra^[17]和 Michael^[18]研究发现肾脏受损因子(KIM-1)两种指标在患者处于稳定的缺血性肾损害时改变却并不明显。

NGAL 不仅存在于尿液中,也存在于血浆中。血浆中 NGAL 浓度的测定 AKI 的早期诊断将更加有利,因为它能避免因少尿带来的麻烦,也能减轻因治疗而使用利尿药等带来的干扰。急性肾功能损伤过程中 NGAL 水平偏高,预后将发展成为急性肾功能衰竭,急性肾功能衰竭(ARF)是心脏手术、肾毒性、肾移植常见的并发症。NGAL 在以下情况下可作为早期监测 AKI 的指标:儿童和成人心肺搭桥手术,冠心病介入治疗(PCI),在急诊科或加护病房的重症患者(心脏衰竭,败血症,多器官功能衰竭),肾移植,慢性肾病患者。NGAL 在造影剂对肾损伤方面的检测也得到研究者的证实,在小儿心导管插入手术后,部分患者 2 h 后就能在血液和尿液中检测到有 NGAL 升高,与之后 2~3 d 血肌酐的升高密切相关。在成人患者中,造影后 4 h 可以在患者尿液中检测到有 NGAL 异常升高,而在血液中 2 h 就可发现 NGAL 异常升高。

4 小 结

对于急性肾损伤,NGAL 是一种新型的,敏感的生物指标。因此检测 NGAL 水平对于今后正确的判断肾脏的早期损害以及提高急性肾损伤的治疗效果具有非常重要的临床意义。

参考文献

[1] 王海燕.急性肾损伤临床研究的思考与建议[J].中华肾脏病杂志,2006,22(11):649-650.

[2] Mehta RL,Kellum JA,Shah SV,et al. Acute renal failure-definition,outcome measures,animal models,fluid therapy and information technology needs;the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group[J]. Crit Care Med,2007,35(8):1837-1843.

[3] Devarajan P. Emerging biomarkers of acute kidney injury[J]. Contrib Nephrol,2007,156(2):203-212.

[4] Kjeldsen L,Johnsen AH,Sengelov,et al. Isolation and primary stucture of NGAL,a novel protein associated with neutrophil gelatinase[J]. Biol Chem,1993,268(14):10425-10432.

[5] Mehryar Habibi,Yoshikazu Taisuke B,et al. Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression;addressing its expression under the harmful conditions[J]. J Radiat Res,2007,8(1):39-44.

[6] Cowland B,Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans[J]. Genimics,1997,45(1):17-23.

[7] Kjeldsen L,Johnsen AH,Sengelov,et al. Isolation and primary stucture of NGAL,a novel protein associated with neutrophil gelatinase[J]. Biol Chem,1993,268(14):10425-10432.

[8] Goetz DH,Willie ST,Armen RS,et al. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin [J]. Biochemistry,2000,39(8):1935-1941.

[9] Molitoris BA. Transitioning to therapy in ischemic acuterenal failure[J]. Am Soc Nephrol,2003,14(2):265-267.

[10] Yan L,Borregaard N,Kjeldsen L,et al. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase(MMP)activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)Modulation of MMP-9 activity by NGAL[J]. J Biochem Biophys,2001,276(40):37258-37265.

[11] Burne NJ,Rabb H. Pathophysiological contributions of fucosyl-transferases in renal ischemia reperfusion injury[J]. Immunol,2002,24(169):2648-2652.

[12] Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues, cell type-specific pattern of expression[J]. Histochem J, 1999, 31(7): 433-441.

[13] 王彩文. 急性肾损伤早期的分子标志物-NGAL[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 7(10): 125-128.

[14] Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease[J]. Clin Lab Invest Suppl, 2008, 241(1): 89-94.

[15] Michael Z, Kimberly K, Ayse A, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study[J]. Critical Care, 2007, 11(4): 84-94.

• 综 述 •

Care, 2007, 11(4): 84-94.

[16] Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1482(1/2): 298-307

[17] Jaya Mishra, Catherine Dent, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery[J]. Lancet, 2005, 18(365): 1231-1238.

[18] Michael Z, Kimberly K, Ayse A, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study[J]. Critical Care, 2007, 11(4): 84-94.

(收稿日期: 2013-01-01)

单核细胞趋化蛋白-1 与动脉粥样硬化形成机制研究进展

梁洁玲¹综述, 王洋洋¹, 卢玉贞², 李海珠¹, 陈立强¹ 审校

(1. 广东省肇庆市第一人民医院检验科, 广东肇庆 526021; 2. 广东医学院, 广东东莞 523808)

关键词: 冠状动脉疾病; 趋化因子类; 单核细胞; 斑块形成
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 14. 030 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)14-1844-03

动脉粥样硬化(AS)是一组动脉硬化血管病中常见的、最重要的一种^[1],其特点是受累动脉病变从内膜开始,一般先有脂质和复合糖类积聚、出血及血栓形成,纤维组织增生及钙质沉着,并有动脉中层的逐渐蜕变和钙化等^[2],近年来随着人们生活水平的提高患病率有明显增加的趋势^[3]。研究证明 MCP-1 具有趋化作用,在特殊的环境下内皮细胞、成纤维细胞、白细胞和平滑肌细胞都能表达,引起单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞在血管内膜堆积,从而导致动脉粥样硬化的发生^[4]。现主要对 MCP-1 与动脉粥样硬化(AS)形成的分子机制的最新研究进展作一综述。

1 MCP-1 的结构与生理功能

趋化因子家族是由多肽类组成的小分子肝素结合蛋白,与相关细胞因子共同辅助和调节细胞的趋化运动。趋化因子家族根据结构分子半胱氨酸残基在氨基末端的数量和位置不同分成四个亚科,命名为 CXC, CC, CX3C, 和 C。MCP-1 是第一个被发现属于 C-C 家族炎症趋化因子,其编码基因位于第 17 号染色体上,由 76 个氨基酸组成,大小为 13×10^3 。趋化因子的分泌信号是对促炎症因子的应答所产生的,在趋化单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞向炎症组织移动过程中发挥着重要的作用^[5]。MCP-1 可由许多不同类型的细胞分泌,包括内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞、滑膜肌细胞、肾小球系膜细胞、星形细胞、单核细胞和小神经胶质细胞等,而 MCP-1 主要由单核细胞和巨噬细胞分泌,MCP-1 及其受体(单核细胞趋化蛋白受体(CCR2))在许多疾病的发生与发展中发挥着重要作用。血液中的单核细胞受到趋化因子的趋化作用而迁移并穿过血管内皮细胞到达炎症组织是机体防御的需要,也是对机体炎症反应的关键步骤^[5]。MCP-1 的具体生理功能如下:(1) MCP-1 具有趋化和介导单核细胞向管壁内皮细胞的迁移与粘连功能;(2) MCP-1 具有诱导平滑肌增生的能力;(3) MCP-1 具有促血管生成的作用^[6-11];(4) MCP-1 还具有促进血栓形成的作用,MCP-1 通过介导基质金属蛋白酶(MMP)的表达与释放在动脉粥样硬化斑块的形成的进程中也起一定的作用;(5) 实验表明 MCP-1 通过促进组织因子的合成增强机体的凝血功能^[12-13]。

2 MCP-1 在单核细胞趋向运动中的作用

在许多体内的动脉粥样硬化动物模型研究中,当血管壁内皮发生损伤时,血液中的脂质容易进入内皮下,在固有的巨噬细胞的作用下氧化成氧化型低密度脂蛋白(oxLDLs),氧化后的低密度脂蛋白(LDLs)进一步促进其他脂质的氧化。随后,oxLDLs 被巨噬细胞吞噬,吞噬后的巨噬细胞逐步演变成泡沫细胞^[14-17],泡沫细胞分泌相关的细胞因子刺激内皮细胞合成 MCP-1、选择素等细胞因子,与此同时,由受损部位释放的炎症因子刺激血液中单核细胞,使单核细胞膜上表达 Ly-6C+,即 Ly-6C+ 的单核细胞(在小鼠,单核细胞亚型分为 Ly-6C+ 与 Ly-6C-, Ly-6C+ 单核细胞称作炎症型细胞,而 Ly-6C- 为固有型细胞^[18-19])。随着炎症因子的刺激, Ly-6C+ 的单核细胞逐渐增多,且单核细胞膜上的 Ly-6C+ 会促进 CCR2 的合成。CCR2 是 MCP-1 的特异性受体,能与 MCP-1 特异性结合。受损的内皮细胞上的 MCP-1 吸引单核细胞上的 CCR2,使单核细胞被募集到受损的内皮部位。单核细胞通过 MCP-1 与 CCR2 的特异性结合,同时在选择素(如 P-选择素)与结合素(如 $\alpha 4 \beta 1$ 整合素)的共同作用下与内皮细胞紧密连接^[20];之后,在 MCP-1 的作用下,单核细胞通过内皮间隙浸入内皮下;进入内皮下的单核细胞在 oxLDLs 的刺激下转化成巨噬细胞,巨噬细胞进一步吞噬 oxLDLs 形成泡沫细胞,泡沫细胞的不断聚集是动脉粥样硬化形成的基础条件,对此过程的深入研究有利于了解动脉粥样硬化的形成机制,对日后临床治疗动脉粥样硬化提供有力依据。

3 MCP-1 在动脉粥样硬化斑块形成中的作用

研究表明 MCP-1 在动脉粥样硬化斑块中大量表达并且诱导巨噬细胞在动脉粥样硬化损伤组织聚集。动脉粥样硬化的早期病理表现是由泡沫细胞(充满脂质的巨噬细胞)组成。脂质的氧化作用导致泡沫细胞的形成,从而对动脉粥样硬化的形成起关键作用。最低浓度 ox-LDLs 可以引起 MCP-1 在动脉壁内皮和平滑肌细胞的表达,而未氧化的 LDLs 则不可以。MCP-1 连接在内皮细胞表面的糖蛋白上,与单核细胞上的 CCR2 受体相互结合,然后单核细胞通过 MCP-1 作用浸入到