

(3):233-245.

[22] Saadoun D, Bieche I, Maisonnobe T, et al. Involvement of chemokines and type 1 cytokines in the pathogenesis of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis neuropathy[J]. Arthritis Rheum, 2008, 55(9):2917-2925.

[23] Heydtmann M, Lalor PF, Eksteen JA, et al. CXC chemokine ligand and 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver[J]. J Immunol, 2008, 177(2):1055-1062.

[24] Shimaoka T, Seino K, Kume N, et al. Critical role for CXC chemokine ligand 16 (SR-PSOX) in Th1 response mediated by NKT cells[J]. J Immunol, 2007, 179(70):8172-8179.

[25] Northfield JW, Kasproicz V, Lucas M, et al. CD161 expression on hepatitis C virus-specific CD4+ T cells suggests a distinct pathway of T cell differentiation[J]. Hepatology, 2008, 47(2):396-406.

(收稿日期:2013-08-28)

• 综 述 •

# 狼疮性肾炎的尿液生物标志物研究现状

李海英, 左 灿 综述, 卿之驹<sup>△</sup> 审校

(中南大学湘雅二医院检验科, 湖南长沙 410011)

**关键词:** 狼疮肾炎; 生物标志物; 疾病活动度

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 01. 028

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)01-0067-03

狼疮性肾炎(LN)是系统性红斑狼疮(SLE)病变累及到肾脏而引发的一种免疫复合物性肾炎,是SLE最普遍、也是最严重的脏器损害之一<sup>[1-2]</sup>,并且肾脏的受累情况直接影响了SLE患者的预后。因此,早期诊断出狼疮患者是否有肾脏病变,尤其是了解LN是否处于活动期及其活动程度,对于指导治疗和判断预后具有重要意义<sup>[3]</sup>。目前,肾穿刺活检术仍是LN的病理诊断及分型的金标准。但LN的病程是一个活动与缓解反复交替的临床过程,而肾活检作为一个有创性检测手段,重复多次操作具有一定风险,所以难以通过肾活检对病情进行连续监测。因此,如何从临床表现及临床检测指标的细微变化来及时了解肾组织的急性改变,已成为了LN研究的热点。所以,很多学者开始采取血液、尿液标本作为研究对象来探寻无创且有效的LN生物标志物。现临床上常用抗ds-DNA、ANA、补体C3、C4等血清学指标来判断SLE的活动度,但这些指标更倾向于反映全身性活动情况,而无法及时敏感地反映出肾脏的局部病变。尿液标本直接来自肾脏,留取比较方便且能够反复留取标本进行检测,这样就可通过检测尿液指标来及时动态的监测肾脏的活动性病变。所以尿液指标在判断LN活动性方面具有相当重要的临床应用价值。近年来,除了尿蛋白、尿沉渣等传统检测指标,许多研究者还致力于寻找新的尿液标志物来评估LN肾脏病变的活动性。本文主要综述了最近研究得较多的LN尿液生物标志物,如单核细胞趋化因子(MCP-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、肿瘤坏死因子样凋亡的微弱诱导剂(TWEAK)、Fractalkine(FKN)等的研究现状。

## 1 传统的尿液检测指标

目前临床上用来判断LN患者肾功能的尿液指标主要有尿沉渣(管型、红细胞、白细胞等)和尿蛋白。其中尿沉渣的主观性较强,不同实验室不同医生辨认细胞、管型的能力不同,而且不同实验室的工作环境也相差比较大,这些都导致尿沉渣的结果在各实验室间不具可比性。尿蛋白的检测可用于初步判断肾脏的功能、协助诊断其他系统多种疾病、进行疾病的动态观察及疗效评判等。尿蛋白的检测又分为定性和定量两种方法。定性方法主要由尿液分析仪完成,这种方法从留取标本到

检测都很方便,患者容易接受。因此,在各医院常将它用于LN的筛查,但它对微量蛋白尿的灵敏度不高,并且只能用1+~3+来描述尿蛋白的多少,无法显示尿蛋白的具体含量。而定量方法则可以具体量化尿蛋白的多少,对临床判断疗效更有帮助。目前用得最多的定量检测方法是测24h尿蛋白,但24h尿的收集比较麻烦,并且难以保证收集准确,临床上容易发生收取时间超过或不足24h的尿量。除此之外,尿沉渣和尿蛋白一般只对有明显肾脏损害的患者敏感,而对早期患者不太灵敏,从而使得相当一部分患者延误了最佳治疗时机。而对于严重的LN患者,只有在未经治疗的情况下,尿沉渣和尿蛋白才会出现明显的异常,经过治疗的LN患者的尿沉渣和尿蛋白结果可能只有细微的异常,甚至没有异常,因此尿检正常并不意味着SLE患者一定没有肾脏损害<sup>[4]</sup>。鉴于这些传统的尿液检测指标在灵敏度和特异度方面都不是十分理想,所以不少国内学者正努力寻找新的LN尿液生物学标志物。

## 2 新型尿液生物标志物

**2.1 单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)** MCP-1又名单核细胞趋化及激活因子(MCAF/CCL2),属趋化因子CC亚家族。可由炎症介质刺激的单核/巨噬细胞、肾固有细胞如肾小球系膜细胞、成纤维细胞等合成和分泌,是在肾脏表达最广泛的趋化因子,与肾脏疾病的发生发展密切相关。在动物实验中,有研究证实将LN小鼠的MCP-1基因敲除或将其生物学作用阻断,可以改善肾小球及间质中炎症细胞的浸润,明显减轻肾功能的受损程度<sup>[5]</sup>,说明MCP-1参与LN的炎症发病过程。LN患者肾组织中的MCP-1基本集中分布于肾小管表皮细胞的间质血管壁及基底侧,MCP-1的表达与肾小管炎症细胞的浸润及肾间质的纤维化有关<sup>[6]</sup>。目前,国内外有多篇研究报道指出,与非活动期LN患者、无肾脏病变的SLE患者以及健康者的尿MCP-1(uMCP-1)水平相比,活动期LN患者的uMCP-1水平明显升高<sup>[7-8]</sup>,而且在LN活动前的2~4个月,uMCP-1的水平就会出现持续的升高,给予治疗以后几个月内又能下降<sup>[9]</sup>。因此,uMCP-1水平的早期增高可能预示着SLE患者将发生或已经发生肾脏病变。另外还有研究表明,uMCP-1水平与SLE-DAI积分成正相关,与补体水平成负相关<sup>[10]</sup>,而血清MCP-1

则未能体现这一特性。由此可见, LN 患者尿中增高的 MCP-1 并非单纯经肾脏滤过而来, 而是由肾脏自身生成的<sup>[11]</sup>。另外, 还有研究认为 uMCP-1 与 LN 的严重程度明显相关<sup>[12]</sup>, 并且还认为 uMCP-1 在Ⅳ型 LN 中升高很明显<sup>[11]</sup>。但目前国内外针对 uMCP-1 在 LN 患者病理分型及治疗预后中的价值的文献讨论还少有报道, 其具体价值有待进一步研究。总之, 综合各种研究可以发现 uMCP-1 可能是 LN 的一个特异且敏感的活动性指标, 连续监测 SLE 患者 uMCP-1 的变化, 对 LN 的发生、发展有重要价值。

**2.2 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)** NGAL 是 Kjeldsen 等在 1993 年研究中性粒细胞明胶酶时所发现的一种相对分子质量为  $25 \times 10^3$  的小分子量蛋白质, 属于人脂质运载蛋白家族中的一个新成员。通常 NGAL 在中性粒细胞、肾小管上皮细胞、肺泡巨噬细胞、支气管上皮黏液细胞等中低表达, 但在受损的上皮细胞中表达显著上升。肾小管细胞表达的 NGAL, 通过与铁转运体结合而参与铁代谢, 调节肾上皮细胞的增殖、分化及凋亡<sup>[13]</sup>。研究表明, NGAL 对肾脏具有保护作用, 可作为监测早期肾损伤及急性肾衰竭治疗一个生物指标。另外, 在防止肾间质纤维化方面 NGAL 也有重要的作用<sup>[14]</sup>。可是目前, NGAL 却作为一种新的 SLE 肾损伤标志物而倍受关注。

有研究报导, 在经过抗 ds-DNA 抗体处理后的 LN 动物模型中, 肾系膜细胞能表达出高水平的 NGAL<sup>[15]</sup>。Rubinstein 等<sup>[16]</sup>发现, LN 患者的尿中 NGAL(uNGAL)的水平比非 LN 患者明显增高, 而且, 在肾活检证实的 LN 中, uNGAL 比抗 ds-DNA 抗体能更灵敏、更特异地预测肾脏病变的活动性。Suzuki 等<sup>[17]</sup>研究青少年特发性关节炎患者的血清 NGAL(pNGAL)及 uNGAL 含量时, 发现只有 uNGAL 水平与肾脏病变的活动度明显相关, 而 pNGAL 则与疾病的活动性无明显的相关性, 该结果表明 uNGAL 可能是由受损肾脏局部分泌的。此外, 还有研究<sup>[18-20]</sup>也显示, uNGAL 是 LN 一个很好的生物标志物, 与肾脏病变的严重程度有关, 并且能特异地预测疾病的活动性。除此之外, NGAL 还具有蛋白酶不易水解, 检测方法相对简单等优点。以上都表明 uNGAL 是一个较理想的诊断 LN 指标, 为研究 LN 新的诊断方法提供了新方向。但作为诊断指标, 还需进一步了解 NGAL 在肾组织中的作用机制等。

**2.3 肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂(TWEAK)** TWEAK 属于肿瘤坏死因子超家族的多功能细胞因子, 是一种结构高度保守的分泌性蛋白质, 主要以可溶性三聚体形式介导其大部分生物学活性。研究普遍认为 Fn14 可能是 TWEAK 诱导肾脏炎症和细胞凋亡的唯一受体<sup>[21]</sup>。TWEAK 通过与其受体 Fn14 结合而发挥相应的生物学作用, 如促进细胞增殖、迁移、黏附<sup>[22]</sup>, 调节细胞生长和凋亡<sup>[23]</sup>。目前, 越来越多的研究者开始关注 TWEAK 在评估肾脏病变中的价值。有研究表明, 急性肾损伤时 TWEAK 和 Fn14 的表达会增加。最近的研究发现, TWEAK 在 LN 的肾脏组织中也高表达。TWEAK 与受体 Fn14 结合后, 能促进肾小球系膜细胞释放 CCL2/MCP-1、CCL5/RANTES/CXCL10/IP-10 等炎症趋化因子<sup>[24]</sup>, 引起炎症细胞浸润, 最终导致 LN 发生。

近年来, 国内外学者为明确 TWEAK 在 LN 和其他炎症性肾病发病机制中是否起作用, 以及如何起作用的, 做了大量的研究。Gao 等<sup>[6]</sup>对人肾脏系膜细胞、足细胞和肾小管上皮细胞进行研究, 发现 TWEAK 可诱导肾细胞表达多种炎症介质, 如 RANTES、MCP-1、IP-10、ICAM-1 和血管细胞黏附分子

(VCAM-1)等。还有学者在动物模型实验中发现<sup>[25]</sup>, Fn14 缺陷的 SLE 小鼠很少发展为严重的肾脏病变; 而且 LN 小鼠经抗 TWEAK 抗体治疗后, IL-6、MCP-1、IL-10 等在肾脏中的表达明显下调。他们的研究提示 TWEAK 可能在 LN 的进展中起到重要的致病作用。一项多中心研究显示<sup>[26]</sup>, 与抗 dsDNA 抗体和补体 C3、C4 相比, 尿 TWEAK 能更好地鉴别 LN 与非 LN 的 SLE 患者。另外也有研究发现, 尿 TWEAK 水平在 LN 患者中显著升高, 且尿 TWEAK 水平的高低与 LN 活动度高度相关<sup>[27]</sup>。因此, 尿 TWEAK 可以作为 LN 的活动性指标。以上研究支持了 TWEAK 在 LN 中的作用, 并为 TWEAK 可能作为 LN 的临床生物学标志物提供有力证据。以上研究表明, 尿 TWEAK 对 LN 具有特异性, 与 LN 活动性密切相关, 可能作为 LN 的生物学标记物。但因为缺乏早期预测肾脏病变发作的敏感性, 故尚不能取代肾活检。

**2.4 Fractalkine(Fkn)** Fkn 是新发现的一种 CX3C 家族趋化因子, 只能与一个受体 CX3CR1 结合发挥其生理活性。该受体主要在单核/巨噬细胞、NK 细胞以及部分 T 淋巴细胞表面表达。正常生理状态下, Fkn 在肾脏组织中一般检测不到, 但如果表达 CX3CR1 的免疫细胞进入了肾组织, 肾脏局部会产生前炎性介质, 继而这些炎性介质能刺激肾小管上皮细胞、系膜细胞和内皮细胞产生 Fkn。另外, 白细胞介素(IL)- $1\beta$  等炎症因子也可以诱导内皮细胞上膜结合型 Fkn 的表达<sup>[28]</sup>。

研究发现<sup>[29-30]</sup>, 在人类新月体肾炎、同种异体肾移植急性排斥反应中, Fkn 在肾组织中表达增高, 可能参与介导新月体性肾炎的发生。除此之外, 同样也有一些与狼疮性肾炎相关的研究。Inoue 等<sup>[31]</sup>研究显示, 给予 MRL/lpr 小鼠 Fractalkine 类似物作为拮抗剂, 能够有效延缓 LN 的发生和发展, 说明 Fkn 与狼疮性肾炎有关。Yoshimoto 等<sup>[32]</sup>用免疫组化的方法对 LN 患者的肾穿刺活检标本进行检测后, 发现在Ⅳ型 LN 患者肾组织中 Fkn 的表达要明显高于其他类型。也有研究<sup>[33-34]</sup>发现, 在Ⅲ型和Ⅳ型 LN 的肾脏组织中 Fkn 的表达显著升高, 而且 Fkn 的表达还与 LN 病情的进展, 以及肾脏损伤的严重程度有关。因此, 有学者认为 Fkn 可能在狼疮性肾炎的发病机制中起一定的作用, 但尚需进一步实验来证实。而且, 有关 LN 患者尿液中 Fkn 与疾病活动性及病情进展之间的关系还未见报道。

### 3 结 语

综上所述, 近年来, 国内外在 LN 生物标志物研究方面取得了一定的进展。以上这些生物标志物有望成为 LN 的早期诊断、活动性监测以及预后评估的可靠指标。这些指标对将来研究 SLE 和 LN 的发病机制并制订有效的临床治疗方案具有很大的帮助。可是, 因为 LN 的病程相对较复杂, 以上各种生物标志物在 LN 中具体的作用机制尚不是很清楚, 目前国内外的研究大多数只是横断面调查的结果, 仅局限于实验研究阶段, 尚不能替代传统的检查指标。它们明确的临床应用价值仍需要进一步用大规模、多中心、随机对照临床实验来明确和论证。另外, 生物标志物与 LN 病理分型之间的关系将会继续成为研究的热点, 而联合检测新型 LN 生物标志物和常规指标也可能成为今后的临床诊断和监测 LN 趋势。

### 参考文献

- [1] Mok CC, Tang SS, To CH, et al. Incidence and risk factors of thromboembolism in systemic lupus erythematosus: a comparison of three ethnic groups[J]. Arthritis Rheum, 2008, 55(15): 2774-

- 2782.
- [2] Brugos B, Zehner M. Biomarkers in lupus nephritis[J]. *Orv Hetil*, 2010, 151(9): 1171-1176.
- [3] Esdaile JM, Joseph L, Mackenzie T, et al. The benefit of early treatment with immunosuppressive agents in lupus nephritis[J]. *J Rheumatol*, 2008, 25(11): 2046-2051.
- [4] Das L, Brunner HI. Biomarkers for renal disease in childhood[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2009, 11(3): 218-225.
- [5] Rovin BH, Birmingham DJ, Nagaraja H N, et al. Biomarker discovery in human SLE nephritis[J]. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2007, 65(3): 187-193.
- [6] Gao HX, Campbell SR, Burkly LC, et al. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells[J]. *Cytokine*, 2009, 46(1): 24-35.
- [7] Rosa RF, Takei K, Araujo NC, et al. Monocyte chemoattractant-1 as a urinary biomarker for the diagnosis of activity of lupus nephritis in Brazilian patients[J]. *J Rheumatol*, 2012, 39(10): 1948-1954.
- [8] Alzawawy A, Zohary M, Ablordiny M, et al. Estimation of monocyte-chemoattractant protein-1 (Mcp-1) level in patients with lupus nephritis[J]. *Int J Rheum Dis*, 2009, 12(4): 311-318.
- [9] Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, et al. Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(2): 467-473.
- [10] Barbado J, Vega L, Gonzalez-Gallego R, et al. MCP-1 in urine as biomarker of renal lupus in absence of cytokines, interferon-gamma and growth factors[J]. *Reumatol Clin*, 2010, 6(3): 296-298.
- [11] Torabinejad S, Mardani R, Habibagahi Z, et al. Urinary monocyte chemotactic protein-1 and transforming growth factor-beta in systemic lupus erythematosus[J]. *Indian J Nephrol*, 2012, 22(1): 5-12.
- [12] Singh RG, Usha, Rathore SS, et al. Urinary MCP-1 as diagnostic and prognostic marker in patients with lupus nephritis flare[J]. *Lupus*, 2012, 21(11): 1214-1218.
- [13] Rubinstein T, Pitashny M, Putterman C. The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/Lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis[J]. *Autoimmun Rev*, 2008, 7(3): 229-234.
- [14] Gwira JA, Wei F, Ishibe S, et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(9): 875-882.
- [15] Qing X, Zavadil J, Crosby MB, et al. Nephritogenic anti-DNA antibodies regulate gene expression in MRL/lpr mouse glomerular mesangial cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(15): 2198-2210.
- [16] Rubinstein T, Pitashny M, Levine B, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel biomarker for disease activity in lupus nephritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, 49(5): 960-971.
- [17] Suzuki M, Wiers KM, Klein-Gitelman MS, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of disease activity in pediatric lupus nephritis[J]. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23(3): 403-412.
- [18] Pawar RD, Pitashny M, Gindea S, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is instrumental in the pathogenesis of antibody-mediated nephritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 20(2): 325-326.
- [19] Allison SJ. Lupus nephritis; Urinary NGAL predicts renal flares in lupus nephritis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6(5): 250.
- [20] Hammad A, Mosaad Y, Elhanbly S, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of severe lupus nephritis in children[J]. *Lupus*, 2013, 22(5): 486-491.
- [21] Nakayama M, Ishidoh K, Kojima Y, et al. Fibroblast growth factor-inducible 14 mediates multiple pathways of TWEAK-induced cell death[J]. *J Immunol*, 2008, 175(2): 341-348.
- [22] Harada N, Nakayama M, Nakano H, et al. Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 305(3): 488-493.
- [23] Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19(3/4): 241-249.
- [24] Campbell S, Burkly LC, Gao HX, et al. Proinflammatory effects of TWEAK/Fn14 interactions in glomerular mesangial cells[J]. *J Immunol*, 2006, 176(16): 1889-1898.
- [25] Zhao Z, Burkly LC, Campbell S, et al. TWEAK/Fn14 interactions are instrumental in the pathogenesis of nephritis in the chronic graft-versus-host model of systemic lupus erythematosus[J]. *J Immunol*, 2007, 179(11): 7949-7958.
- [26] Schwartz N, Rubinstein T, Burkly LC, et al. Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(5): R143.
- [27] Xuejing Z, Jiazhen T, Jun L, et al. Urinary TWEAK level as a marker of lupus nephritis activity in 46 cases[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 359647.
- [28] Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif[J]. *Nature*, 2008, 69(6): 640-644.
- [29] Segerer S, Hughes E, Hudkins KL, et al. Expression of the fractalkine receptor (CX3CR1) in human kidney diseases[J]. *Kidney Int*, 2008, 68(2): 488-495.
- [30] Peng W, Chen J, Jiang Y, et al. Urinary fractalkine is a marker of acute rejection[J]. *Kidney Int*, 2008, 74(11): 1454-1460.
- [31] Inoue A, Hasegawa H, Kohno M, et al. Antagonist of fractalkine (CX3CL1) delays the initiation and ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 55(10): 1522-1533.
- [32] Yoshimoto S, Nakatani K, Iwano M, et al. Elevated levels of fractalkine expression and accumulation of CD16+ monocytes in glomeruli of active lupus nephritis[J]. *Am J Kidney Dis*, 2007, 50(1): 47-58.
- [33] Nakatani K, Yoshimoto S, Iwano M, et al. Fractalkine expression and CD16+ monocyte accumulation in glomerular lesions; association with their severity and diversity in lupus models[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299(2): F207-F216.
- [34] You Y, Liao P, Qin Y, et al. Blood and renal fractalkine expression in patients with lupus nephritis and its significance[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2013, 33(4): 520-523.

(收稿日期: 2013-08-27)