

• 临床检验研究论著 •

# 血清中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白在健康成年人中的参考值范围调查

刘梦婕, 蒋洪敏

(中南大学湘雅二医院检验科, 湖南长沙 410011)

**摘要:**目的 评估中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白(NGAL)在健康成年人中的参考值范围。方法 采用丹麦 Bioporto 公司试剂盒, 用胶乳增强免疫比浊法在日立全自动生化分析仪上测定 252 例健康成年体检者血清 NGAL 浓度并进行统计学分析, 建立 NGAL 参考值范围。同时分别测量同型半胱氨酸(Hcy)、半胱氨酸抑制酶 C(CysC)、 $\beta_2$  微球蛋白( $\beta_2$ -MG)水平, 分析年龄、性别及所测肾功能各项参数与 NGAL 的相关性。结果 NGAL 在健康人群中呈近似正态分布。17~<50 岁的 NGAL 水平与 50~<90 岁比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。NGAL 与年龄的相关性最为密切( $r=0.268, P<0.01$ ), 其次是  $\beta_2$ -MG ( $r=0.180, P<0.01$ )。此外, CysC 也与 NGAL 有一定的相关性( $r=0.137, P<0.05$ )。以 50 岁为分界年龄, 以 97.5% 为参考值上限, 健康成年人不同年龄的 NGAL 参考值范围是: 17~<50 岁 NGAL <73.94 ng/mL, 50~<90 岁 NGAL <87.85 ng/mL。结论 年龄及其他生理指标可以影响健康者 NGAL 分布, 仪器、试剂及所检测标本的不同也会使所测 NGAL 范围不一致, 因此各实验室需建立自己的 NGAL 参考值范围。

**关键词:** 癌基因蛋白类; 明胶酶类; 参考值

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.015

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)06-0689-03

## Investigation on reference range of serum NGAL in normal adults

Liu Mengjie, Jiang Hongmin

(Department of Clinical Laboratory, Xiangya Second Hospital, Changsha, Hunan 410011, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the reference range of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in normal adults. **Methods** By adopting the reagent kit produced by Denmark Bioparto Company, the concentration of serum NGAL in 252 healthy adults were determined by the latex enhanced turbidimetric immunoassay on the Hitachi fully automatic biochemical analyzer and the statistical analysis was performed for establishing the reference range of serum NGAL. At the same time the levels of homocysteine (Hcy), cysteine inhibit enzyme C (CysC) and  $\beta_2$  microglobulin ( $\beta_2$ -MG) were detected and the correlation between age, sex and detected renal function parameters with NGAL was analyzed. **Results** Serum NGAL presented the approximate normal distribution in the healthy population. The NGAL level had statistical difference between the age group of 17~<50 years old and the age group of 50~<90 years old ( $P<0.05$ ). NGAL was closely correlated with the age ( $r=0.268, P<0.01$ ), followed by  $\beta_2$ -MG ( $r=0.180, P<0.01$ ). In addition, CysC had some correlation with NGAL ( $r=0.137, P<0.05$ ). With 50 years old as the boundary age and 97.5% as the upper limit of reference values, the NGAL reference value range in different ages of normal adults were: NGAL <73.94 ng/mL for 17~<50 years old and NGAL <87.85 ng/mL for 50~<90 years old. **Conclusion** Age and other physiological indexes may influence the distribution of NGAL in healthy adults, the different instruments, reagents and samples also make the detected range of NGAL to be inconsistent. Therefore, each laboratory needs to establish the NGAL reference value range for adults.

**Key words:** oncogene proteins; gelatinases; reference values

中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白(NGAL)是一种相对分子质量仅为  $25 \times 10^3$  的分泌蛋白,最初是由被猴痘病毒 40(SV-40)感染的小鼠肾脏细胞中纯化而来<sup>[1]</sup>,属于脂质运载蛋白超家族<sup>[2]</sup>。1993 年科学家在活化的中性粒细胞中发现并证实这种分泌蛋白可作为急性肾损伤的早期灵敏标志物<sup>[3-5]</sup>。心肌损伤时 NGAL 也有一定程度升高,但是当存在潜在的肾脏损伤时,这种升高缺乏疾病预测价值<sup>[6]</sup>。国内外对 NGAL 参考范围的研究很少<sup>[7-8]</sup>,本试验对 252 例健康体检者的血清 NGAL 检测结果进行了年龄和性别的相关分析,以评估血清 NGAL 在健康成年人中的参考值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 随机选择本院体检健康者 252 例,年龄 17~<90 岁,其中男 137 例,女 115 例。将研究对象按年龄不

同分为 17~<30 岁、30~<40 岁、40~<50 岁、50~<60 岁、60~<70 岁、70~<90 岁。研究对象排除肝肾疾病、代谢性疾病、心血管疾病、肿瘤、急慢性感染者。

**1.2 仪器与试剂** 采用日立全自动生化分析仪,乳胶颗粒增强免疫比浊法试剂盒由丹麦 Bioparto 公司提供。

**1.3 方法** 受试者清晨空腹采集肘静脉血 3 mL 于有促凝剂及分离胶的真空采血管中,2 h 内离心 3 000 r/min,5 min,分离血清于 -70 ℃ 保存,2 个月内平衡至室温测定。

**1.4 统计学处理** 运用 SPSS19.0 统计学软件对数据进行分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,相关性分析采用 Spearman 相关分析,两组间用独立样本  $t$  检验,多组样本均数之间的两两比较用单因素方差分析,以 2.5%~97.5% 的可信区间作为健康人群血清 NGAL 的参考值范围( $\bar{x} \pm 1.96s$ ),以  $P<0.05$  为差异

有统计学意义。

2 结 果

2.1 NGAL 总体分布规律 252 例研究对象 NGAL 呈近似正态分布见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。最小值 6.1 ng/mL,最大值 102 ng/mL。

2.2 血清 NGAL 水平与性别、年龄关系 男、女健康者 NGAL 浓度分别为(47.62±17.82) ng/mL 和(44.55±18.85) ng/mL,两者比较差异无统计学意义( $t=1.325, P>0.05$ )。不同年龄 NGAL 分布特征见表 1。17~<50 岁的 NGAL 水平与 50~<90 岁比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。随着年龄增长血清 NGAL 水平基本呈上升趋势。

表 1 不同年龄 NGAL 分布特征

年龄(岁)	n	$\bar{x}\pm s$ (ng/mL)	最低值(ng/mL)	最高值(ng/mL)
17~<30	36	36.44±19.13*	6.1	67.3
30~<40	42	42.80±12.60*	16.5	68.2
40~<50	45	44.82±16.70*	6.2	85.6
50~<60	54	49.43±17.78	24.3	101.9
60~<70	43	49.09±20.19	11.6	90.0
70~<90	32	54.35±19.69	21.5	102.0
合计	252	46.22±18.32	6.1	102.0

\*:  $P<0.05$ ,与 50~<90 岁比较。

2.3 各年龄段的参考范围 不同年龄段的血清 NGAL 水平的参考范围按 2.5%~97.5%的可信区间( $\bar{x}\pm 1.96s$ )计算。结合本试验 NGAL 结果的年龄性别分布特点,以 50 岁为年龄分界,性别不予考虑,见表 2。

表 2 成年男女血清 NGAL 的参考范围(ng/mL)

年龄(岁)	n	$\bar{x}\pm s$	NGAL 参考范围( $\bar{x}\pm 1.96s$ )
17~<50	123	41.72±16.44	<73.94
50~<90	129	50.51±19.05	<87.85

2.4 各项生理指标对 NGAL 的影响 为广泛研究其他肾功能指标对 NGAL 的影响,将受试者性别、年龄、同型半胱氨酸(Hcy)、半胱氨酸抑制酶 C(CysC)及  $\beta_2$  微球蛋白( $\beta_2$ -MG)与 NGAL 作相关性分析。年龄与 NGAL 的相关性最为显著( $r=0.268, P<0.01$ ),其次  $\beta_2$ -MG 与 NGAL 关系也很密切( $r=0.180, P<0.01$ )。CysC 也与 NGAL 有一定的相关性( $r=0.137, P<0.05$ )。NGAL 与 Hcy 不相关。

3 讨 论

NGAL 是一种功能强大的小分子蛋白质,科学家认为 NGAL 可通过多种途径发挥作用。NGAL 在中性粒细胞、呼吸器官、肠道及前列腺上皮均有表达<sup>[9]</sup>,在免疫及各种肿瘤发生发展中发挥不同作用;NGAL 可以与铁形成螯合物,通过内吞作用阻止细菌生长,诱导中性粒细胞凋亡,发挥抑菌作用;NGAL 是一种生长和分化因子;NGAL 大量表达于肾脏近曲小管上皮,能够灵敏反映肾组织的损伤。近十年来,大量的临床研究反映尿液和/或血液 NGAL 浓度与急慢性肾损伤之间有一定的相关性<sup>[10]</sup>。全血、血浆、血清及尿液均可作为检测 NGAL 的标本来源<sup>[11]</sup>。各种标本来源的 NGAL 在健康者中的参考范围均不相同。本试验采集体检正常的人群血清进行 NGAL 检测,通过禁食一定时间基本可以控制抽血前影响因

素,方便可行。

本结果显示健康成年人 NGAL 呈近似正态分布,与年龄相关,随着年龄增大 NGAL 水平升高。这可能与老年人肾功能生理性降低有关。这种生理性的变化是因为血液动力学和结构上的变化引起<sup>[12]</sup>。男女 NGAL 水平基本一致,男性稍微高于女性,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。但 Pennemans 等<sup>[13]</sup>对 338 例年龄跨度 0~95 岁,无嗜烟等不良爱好的健康者研究发现,当单独检测 NGAL 浓度时,性别与尿液 NGAL 浓度线性相关( $P<0.05$ );仅校准尿肌酐时,年龄及性别均影响尿液 NGAL 分布( $P<0.05$ );仅校准尿比重时,仅年龄对尿液 NGAL 的影响差异有统计学意义( $P<0.05$ )。尿液 NGAL 与年龄线性相关,年龄增大 NGAL 浓度升高。本试验结果与 Pennemans 等<sup>[13]</sup>的试验结果稍有偏差,究其原因可能是标本选择的不同。尿液 NGAL 和血清 NGAL 分布有可能确实存在不同。试验方法的不同。Pennemans 等<sup>[13]</sup>采用的是酶联免疫吸附测定法,而本试验采用胶乳增强免疫比浊法检测 NGAL,由于方法学的不同引起灵敏度的差异因而导致测量结果的不一致。NGAL 分布有可能有种族及地域差异。

在明确了年龄和性别对 NGAL 的影响之后,建立了以 97.5%位数为参考值上限,以年龄为分类基础的健康成年人血清 NGAL 参考值范围:17~<50 岁 NGAL <73.94 ng/mL,50~<90 岁 NGAL <87.85 ng/mL。国外对于血清 NGAL 的正常参考值范围的研究并不广泛,未能找到国外血清 NGAL 参考值范围。但尿液 NGAL 参考值范围已有学者进行研究。推测血清 NGAL 与尿液 NGAL 在健康人群分布及疾病预测方面具有相似性,需进一步调查研究。

NGAL 自发现以来一直被认为是检测肾功能的极其敏感的指标,Peacock 等<sup>[14]</sup>研究血清 NGAL 及 CysC 与急性肾脏损伤之间的关系时发现,NGAL 与 CysC 具有良好相关性,两者都可先于血清肌酐预测肾损伤的发生。国内在预测糖尿病肾病方面也有类似研究<sup>[15]</sup>。本试验希望通过做 NGAL 与各项肾功能指标的相关性分析,以确定健康成年人 NGAL 与其他肾功能指标之间的关系。试验发现在健康成年人中 NGAL 也与 CysC 及  $\beta_2$ -MG 有良好相关性,但与 Hcy 不具相关性。制订中国人 NGAL 正常参考值范围是一项长期而细致的工作,需纳入更多试验对象并更精准控制其他影响因素,得到更加准确的参考值范围。

参考文献

[1] Chakraborty S, Kaur S, Guha S, et al. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin(NGAL) in inflammation and cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1826(1): 129-169.

[2] Lippi G, Plebani M. False myths and legends in laboratory diagnostics[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(11): 2087-2097.

[3] Rahimzadeh N, Otukesh H, Hoseini R, et al. Are serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin predictive of renal graft function in short term? [J]. Pediatr Transplant, 2012, 16(7): 796-802.

[4] Kim SS, Song SH, Kim IJ, et al. Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 97(2): 251-257.

[5] Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury[J]. Biomark Med, 2010, 4(2): 265-280.

计学意义( $P<0.05$ ),阳性结果均采用 Western blot 法进行确认。

**2.2 P62、PCNA 在不同组织标本中的表达情况** 结肠癌组织的 P62 阳性率和 PCNA 标记指数均高于结肠腺瘤组织,见表 1。

表 1 P62 和 PCNA 在不同结肠组织中的表达情况			
组织标本类型	<i>n</i>	P62 阳性[ <i>n</i> (%)]	PCNA 标记指数( $\bar{x}\pm s$ )
结肠癌	64	48(75.0)*	74.8±19.6*
结肠腺瘤	42	6(14.3)	29.9±11.5

\*: $P<0.05$ ,与结肠腺瘤比较。

**2.3 ANA 检测结果** 结肠癌血清组 ANA 的阳性率为 82.8%(53/64),滴度普遍较高,与结肠腺瘤患者比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 3 讨 论

肿瘤自身抗体可以作为细胞癌变过程中的报告分子,对于监控肿瘤的发展有着重要作用<sup>[2-4]</sup>。以往的研究表明,常见的恶性肿瘤患者血清中存在抗 P62 自身抗体<sup>[5-6]</sup>。本研究通过 ELISA 法检测到结肠癌患者血清 P62 抗体的阳性率明显高于结肠腺瘤患者,同时笔者还采用免疫组化方法研究 P62 在结肠癌组织中的表达,发现结肠癌组织标本的 P62 阳性表达率高于结肠腺瘤组织。P62 可能和肿瘤细胞的恶性转化相关,它在结肠癌的检测中有望成为潜在的肿瘤标记物。肿瘤细胞的增殖活性是决定肿瘤生物学行为的一个重要指标<sup>[7-8]</sup>。PCNA 的表达水平反映了肿瘤细胞的增殖活性。

在风湿性自身免疫病中,自身抗体对于某种疾病具有较高的特异性,而大多数的肿瘤自身抗体则不具备这种严格的特异性。研究表明肿瘤细胞能直接诱导机体产生 ANA,其没有种属、构象和序列特异性,癌症患者有较高的自身抗体检出率,某些由肝炎、肝硬化发展成肝癌的患者会出现 ANA 由阴性到阳性变化的现象。这种自身抗体是由于细胞癌变过程出现的蛋白刺激机体产生的,在某种情况下,检测到自身抗体也可为肿瘤的诊断提供依据<sup>[9]</sup>。本研究表明,结肠癌患者血清 ANA 阳性率和滴度较结肠腺瘤患者增加。虽然一定比例健康者血清中也存在着生理性的 ANA,但结肠癌患者的血清抗体谱更宽,荧光核型更加丰富,且胞浆和核仁阳性率显著高于结肠腺瘤患者。核糖体蛋白是与细胞生长增值过程密切相关的蛋白,

提示结肠癌患者体内的自身抗体相应的靶抗原可能与细胞恶转和异常增值有关,因此 ANA 的检测可为结肠癌的早期发现提供帮助。检测到的 ANA 是由哪种具体的肿瘤相关抗原引起的还有待进一步的探讨。

综上所述,P62、PCNA 在结肠癌组织中的表达明显上调,PCNA 与细胞的增殖密切相关,结肠癌患者血清 ANA 阳性率和滴度明显增加,因此将三者结合起来对结肠癌的早期诊断、肿瘤的恶变及预后监测及分子靶向治疗有着重要意义。

### 参考文献

[1] Zhang JY,Chan EK,Peng XX,et al. A novel cytoplasmic protein with RNA-binding motifs is an autoantigen in human hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Med,1999,189(7):1101-1110.

[2] Tan EM. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis[J]. J Clin Invest,2001,108(10):1411-145.

[3] Houghton AN. Cancer antigens;immune recognition of self and altered self[J]. J Exp Med,1994,180(1):1-4.

[4] Old LJ,Chen YT. New paths in human cancer serology[J]. J Exp Med,1998,187(8):1163-1167.

[5] Liu W,Wang P,Li Z,et al. Evaluation of tumour-associated antigen (TAA) miniarray in immunodiagnosis of colon cancer[J]. Scand J Immunol,2009,69(1):57-63.

[6] Liu W,Peng B,Lu Y,et al. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in cancer immunodiagnosis[J]. Autoimmun Rev,2011,10(6):331-335.

[7] Zuber M,Tan EM,Ryoji M. Involvement of proliferating cell nuclear antigen(cyclin) in DNA replication in living cells[J]. Moll Cell Biol,1989,9(1):57-66.

[8] Shpitz B,Bomstein Y,Mekori Y,et al. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci,hyperplastic polyps,adenomas,and adenocarcinomas of the human colon [J]. Am J Surg,1997,174(4):425-430.

[9] Zhang JY,Tan EM. Autoantibodies to tumor-associated antigen as diagnostic biomarkers in hepatocellular carcinoma and other solid tumors[J]. Exper Rev Mol Diagn,2010,10(3):321-328.

(收稿日期:2013-12-13)

(上接第 690 页)

[6] Shrestha K,Borowski AG,Troughton RW,et al. Renal dysfunction is a stronger determinant of systemic neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels than myocardial dysfunction in systolic heart failure[J]. J Card Fail,2011,17(6):472-478.

[7] Cullen MR,Murray PT,Fitzgibbon MC. Establishment of a reference interval for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin [J]. Ann Clin Biochem,2012,49(Pt 2):190-193.

[8] Cangemi G,Storti S,Cantinotti M,et al. Reference values for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) in pediatric age measured with a fully automated chemiluminescent platform[J]. Clin Chem Lab Med,2013,51(5):1101-1105.

[9] Virzi GM,Clementi A,de Cal M,et al. Genomics and biological activity of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in several clinical settings[J]. Blood Purif,2013,35(1/3):139-143.

[10] Lalanne A,Beaudeau JL,Bernard MA. NGAL;a biomarker of acute and chronic renal dysfunction[J]. Ann Biol Clin(Paris),2011,69(6):629-636.

[11] Cai L,Rubin J,Han W,et al. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2010,5(12):2229-2235.

[12] Weinstein JR,Anderson S. The aging kidney;physiological changes[J]. Adv Chronic Kidney Dis,2010,17(4):302-307.

[13] Pennemans V,Rigo JM,Faes C,et al. Establishment of reference values for novel urinary biomarkers for renal damage in the healthy population;are age and gender an issue? [J]. Clin Chem Lab Med,2013,51(9):1795-1802.

[14] Peacock WF,Maisel A,Kim J,et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin in acute kidney injury[J]. Postgrad Med,2013,125(6):82-93.

[15] 童俊容,何凤,罗正茂,等. 血清 NGAL 和 Cystatin C 对糖尿病肾病早期诊断的意义研究[J]. 中国全科医学,2010,13(8):810-812.

(收稿日期:2013-10-18)