

• 综述 •

NGAL 临床应用及实验室检测最新进展

刘琴 综述, 蒋洪敏 审校

(中南大学湘雅二医院检验科, 湖南长沙 410011)

关键词: 肾疾病; 肿瘤; 早期诊断; 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; 生物学特性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.030

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)10-1302-03

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)属于脂质运载蛋白家族成员。NGAL cDNA 及其全基因序列分别于 1994、1997 年被克隆鉴定^[1]。近年来, NGAL 基因的功能及其在人体正常和肿瘤组织中的表达特征受到关注, 并且在肾脏疾病、肿瘤等发病机制的相关研究中取得了一些有意义的进展, 现就其生物学特性、临床应用及实验室检测进行综述。

1 生物学特性

1.1 结构特点 NGAL 基因是单拷贝, 定位于染色体 9q34 上, 全长 5 869 bp^[1], 包括 1 695 bp 的 5'端非转录区, 178 bp 的 3'端非转录区及由 7 个外显子和 6 个内含子构成的 3 696 bp 的初级转录区, 该基因属于人类脂质运载蛋白家族成员, 其 cDNA 全序列由 63 bp 的 5'端非翻译区和 591 bp 的编码区组成, 编码含 197 个氨基酸残基的肽链, 此肽链包括 178 个氨基酸残基的成熟肽段和 19 个氨基酸的前导序列。NGAL 蛋白由一条多肽链构成, 相对分子质量为 25 000, 含 178 个氨基酸残基。由 N 端 310-螺旋、C 端 α 融合及中间 8 段反平行式 β 折叠构成了一个多肽链 β 折叠桶结构。中间 8 段反平行式 β 折叠链间的连接环, 除第 1 环外(Ω 环), 其余均为典型的 β 发夹结构。该 β 折叠桶结构一端是开放的, 为其与配体结合提供了进口, 其底部内侧的疏水核可结合并转运亲脂性配体, 主要配体为铁载体, 包括小的铁结合蛋白分子^[2]。而另一端则被短的 N 端 310-螺旋所封闭。在 β 折叠桶结构的底部内侧排列着疏水芳香族和脂肪族氨基酸残基, 形成一个疏水核或疏水内部, 为结合亲脂性配体提供了位点, 这些结构特征符合典型脂质运载蛋白家族的结构特点。

1.2 合成与分布 NGAL 是从中性粒细胞次级颗粒中分离出来的一种新型蛋白质^[3], 以共价键结合于中性粒细胞明胶酶。外周血成熟中性粒细胞缺乏 NGAL mRNA 的表达, NGAL 蛋白是在早期髓细胞次级颗粒形成阶段合成, NGAL mRNA 在成人各种组织中低水平表达, NGAL 基因启动子区域包含了一些结合位点的转录因子, 包括核因子 kappa B(nuclear factor-kappa B, NF-κB), ErbB2 在乳腺癌患者的组织中过表达, 并通过影响 NF-κB 活力而使 NGAL 表达上调, 而后者可能导致肿瘤相关性贫血, 因此, ErbB2、NF-κB、NGAL 途径可作为肿瘤相关性贫血的潜在治疗靶点。

1.3 生理功能

1.3.1 NGAL 是对抗细菌感染固有免疫的重要组分, 细菌合成铁载体清除周围环境中多余的铁质, 并通过特殊的转运体恢复铁载体-铁复合物, 以保证细胞的铁供应, NGAL 通过与铁载体形成螯合物而达到抑菌目的^[4-6], 通过基因修饰去除 NGAL 基因的小鼠更易受革兰阴性细菌感染并死于脓毒血症^[6]。

1.3.2 NGAL 在淋巴结部分滤泡中心细胞中表达, 提示它可能还与 B 细胞的发育有关。

1.3.3 NGAL 在人类一系列肿瘤中过度表达, NGAL 基因被大量促肿瘤物质所诱导, 包括猴空泡病毒 40(simian vacuolating virus 40, SV40)、多瘤病毒、神经转化因子、肝细胞生长因子、视黄酸、糖皮质激素和 NF-κB。过度表达的 NGAL 结合到基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)而阻止其降解, 而已知 MMP-9 可通过降解基底膜和细胞外基质, 释放血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 促进血管生成、癌细胞侵袭及转移, 从而促进肿瘤的进展。

1.3.4 肾脏疾病发展过程中, NGAL 促进间充质祖细胞的上皮样分化, 形成肾小球、近端小管、Henle 髓袢及远端小管^[7-8]。在受损肾脏、结肠、肝脏和肺上皮组织中, NGAL 的表达显著上调, 可能是通过 NF-κB 介导, 后者在控制细胞的增殖与分化上起决定作用^[8]。在肾脏损伤组织中, NGAL 抑制凋亡, 促进增殖, 这种保护机制依赖于其与有毒铁质的螯合及其对铁载体和铁的调节。

2 临床应用

2.1 NGAL 与肾脏疾病 血浆 NGAL 可自由通过肾小球, 大部分经巨蛋白依赖的内吞作用在近端小管被重吸收^[5], 对动物模型进行全身 NGAL 标记, 最后 NGAL 在近端小管大量存在, 而尿液中却未检出^[9]。因此, 尿液中出现 NGAL 可能是由于近端肾小管受损阻碍了 NGAL 的重吸收或 NGAL 合成增加。而基因表达研究表明, 急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)时, 远端肾单位, 尤其是在髓袢升支和集合管中的 NGAL mRNA 表达迅速上调^[5], 远端肾单位合成分泌 NGAL, 构成尿液 NGAL 的大部分, 支持这一结论的临床依据是 AKI 患者 NGAL 的高排泄分数。然而, 肾脏本身并非血浆 NGAL 的主要来源, 远端器官, 尤其是肝脏 NGAL mRNA 的大量表达, 使大量进入循环的 NGAL 构成“循环池”。NGAL 是一种可由中性粒细胞、巨噬细胞和其他免疫细胞释放的急性反应时相蛋白, 这支持 AKI 时“循环池”这一假设。AKI 时, 肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)下降, NGAL 的清除率也下降, “循环池”中 NGAL 大量蓄积, 这一机制是否导致了 AKI 后血浆 NGAL 的升高仍有待考究。

2.1.1 NGAL 与 AKI 临床前转录谱研究表明, NGAL 基因在动物 AKI 模型起病早期上调最明显^[9-11], 蛋白组学分析也表明 NGAL 是动物模型发生缺血性和毒性 AKI 时产生最快、最多的蛋白质^[12-13]。有研究表明, 动物发生 AKI 后, 尿液中很快能检出 NGAL, 提示 NGAL 可能作为诊断早期 AKI 的无创性指标。Mishra 等^[14]发现顺铂诱导的肾脏急性损伤后 3 h 就能在尿中检出 NGAL, 而尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAG)和血肌酐的检出在 96 h 后; 同样在肾脏急性缺血-再灌注损伤后 3 h 也能检测到 NGAL。Haase 等^[15]通过对世界范围的 19 项大型临床研究(共 2 538

例患者)的 Meta 分析发现,NGAL 对肾移植、肾缺血和肾毒性引起的 AKI 早期诊断具有重要意义,其灵敏度高且检测范围广,特别是对儿童心脏术后发生的早期 AKI 诊断更具意义(分析其原因可能是儿童患者其他基础病和并发症少),结果显示 NGAL 越高,AKI 的严重程度越高。手术患者术后发生 AKI 是影响患者术后恢复的重要因素,Cai 等^[16]报道 59 例心脏手术患者中约一半在 2 h 后尿液人中性粒细胞载脂蛋白(human neutrophil lipocalin, HNL)/NGAL 升高 10~100 倍,72 h 后全部患者该指标升高,尿 HNL/NGAL 在评估肾功能上与胱抑素 C 和肌酐呈正相关性。Przybylowski 等^[17]评估 164 例心脏移植术患者术后血清 NGAL、肌酐、GFR、胱抑素 C 时发现该类患者肾功能损伤发生概率显著高于健康志愿者,且单因素分析血清 NGAL 与肌酐、24 h 肌酐清除率及胱抑素 C 有显著相关性,提示血清 NGAL 可作为肾功能损伤的预测指标,尤其对于肾损伤高危患者,如高血压、糖尿病及其他心脏病患者。综上所述,NGAL 在各型 AKI 发生早期即明显升高,具有保护肾脏的作用,可作为 AKI 强有力的早期诊断标志物。

2.1.2 NGAL 与肾移植 Mishra 等^[18]发现,NGAL 在肾移植中也可作为诊断标志物,肾移植时因缺血-再灌注所致 AKI 使移植肾功能延迟,导致移植术后 1 周内患者需接受透析治疗,移植肾活检显示 NGAL 染色强度与移植后肾功能的延迟正相关。Malyszko 等^[19]报道肾移植患者和慢性肾损伤患者血清 NGAL、肌酐显著升高,GFR 估计值(estimated GFR,eGFR)显著降低。NGAL 逐渐升高,在慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)4 期时显著升高,单因素分析发现 CKD 和肾移植患者血清 NGAL 与血清肌酐、血红蛋白、红细胞比容、白细胞、清蛋白、eGFR 相关;多元线性回归发现肌酐、钙调神经磷酸酶和超敏 C 反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)可作为血清 NGAL 的预测因子,健康人血清 NGAL 与年龄、血清肌酐、eGFR、白细胞相关。Lebkowska 等^[20]研究 NGAL、胱抑素 C 对肾移植患者预后的预测时发现,NGAL 在肾移植前、后各时间点与肌酐、胱抑素 C 均具有正相关性,而与尿量呈负相关,移植肾功能延迟患者的 NGAL、胱抑素 C 水平未见下降,提示 NGAL 可能作为预测移植肾功能延迟的早期预测指标,尤其对指导肾移植患者早期透析和抗排斥治疗具有重要价值。综上所述,对肾移植术后患者监测 NGAL 水平可早期发现移植肾功能延迟,及时进行对症处理,如血透、移植肾切除等。

2.1.3 NGAL 与慢性肾损伤 NGAL 作为 AKI 标志物已被广泛报道,Woo 等^[21]研究了 31 例 CKD 患者,其尿 NGAL 水平显著高于 36 例健康者,患者 GFR 水平显著低于健康者,且尿 NGAL 与 GFR 具负相关。他们对尿 NGAL、尿蛋白、尿微量清蛋白、GFR 两两之间的相关性分析显示尿 NGAL 可作为 CKD 诊断的可靠指标。

2.1.4 NGAL 与狼疮性肾炎 Rubinstein 等^[22]认为尿 NGAL 是预测狼疮性肾炎的敏感、特异指标,其预测狼疮性肾炎的敏感性和特异性高于 ds-DNA。Yang 等^[23]对 34 例累及肾脏的系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者、8 例未累及肾脏的 SLE 患者以及 12 例健康志愿者进行 24 h 尿液 NGAL 和转化生长因子 β、白细胞介素 10、肿瘤坏死因子 α 检测,发现 2 组 SLE 患者上述 3 种细胞因子的差异无统计学意义,而 NGAL 分泌量与血清肌酐和肌酐清除率正相关,但与 SLE 活动度评分指数无相关性。多元线性回归分析发现尿 NGAL 判断 SLE 患者肾脏损伤的特异性和敏感性高于 ds-DNA。

2.2 NGAL 与其他疾病

2.2.1 NGAL 与肿瘤 NGAL 是一种分泌型急性反应时相蛋白,在乳腺癌、肺癌、胰腺癌等组织中上调表达。Tong 等^[24]通过观察胰腺癌组织 NGAL 的表达,研究其在胰腺癌中的生物学特征,指出分化好的胰腺癌细胞高表达 NGAL,而分化相对差的癌细胞极少表达 NGAL。使人胰腺癌 PANC-1、MIA-PaCa-2 细胞稳定过表达 NGAL 可显著阻断体外胰腺癌细胞的黏附与侵袭,MIA-PaCa-2 细胞过表达 NGAL 还可减小肿瘤体积,降低肿瘤的远、近转移,进一步研究发现过表达 NGAL 还可减低 VEGF 的产生,使肿瘤组织血管生成减少,但 NGAL 的过表达不影响肿瘤细胞的生存、发育及其对化疗药物的反应。Zhang 等^[25]报道 100 例直肠癌患者中,69 例 NGAL mRNA 上调,而 NGAL mRNA 上调与 MMP-9 呈正相关。直肠癌组织 NGAL mRNA 过表达与肿瘤细胞浸润深度、淋巴结转移、静脉受累及肿瘤 TNM(tumor-node-metastasis)分期相关。总之,NGAL 在抑制肿瘤细胞黏附、转移、血管生成等方面具有应用价值。

2.2.2 NGAL 与冠心病 Kafkas 等^[26]报道 SA、UA、NSTE-MI、STEMI 患者血清 NGAL 水平与 hs-CRP、白细胞数显著正相关,提示血清 NGAL 可反映冠状动脉综合征患者的炎症水平,其血清 NGAL 具有较高的阴性预测值,并通过对炎症水平的反映而预测疾病的严重程度。

3 检测方法、影响因素及参考值界定

目前 NGAL 检测多采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),该法采用双抗体夹心法,敏感性高、线性范围宽、特异性及重复均较好,但耗时较长,难于自动化。测定中多采用血清或尿液,尤其尿液对保存条件要求高,容易受细菌干扰。多种病理情况下,NGAL 浓度会升高。建立健康人群血浆 NGAL 正常值可为相关疾病的诊断、治疗提供参考标准。性别、年龄、体质质量指数和肾功能等均可以影响 NGAL 水平。Cullen 等^[27]对 174 例志愿者(年龄 19~88 岁)进行尿 NGAL 分析,发现 95% 百分位浓度为 107 μg/L,女性 NGAL 水平显著高于男性,在年龄的分层上,<40 岁、40~<60 岁、60~88 岁组间 NGAL 水平具有显著性差异。

4 展望

NGAL 对急、慢性肾损伤的早期诊断具有一定的临床价值,是肾脏、心脏等疾病的新型标志物,但临床推广尚未普及,有以下几方面原因:(1)目前的报道均为小样本、小范围的临床试验,未经大规模流行病学调查,并建立健康人群参考范围;(2)对于建立新的生物学指标必须计算方法的特异性、敏感性,并作受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线,确定最大曲线下面积(area under the curve, AUC);(3)在出现 NGAL 阳性、肌酐阴性时,如何分析结果尚缺乏共识;(4)尚未建立统一、有效的适合临床推广的实验方法,临床与检验医师对 NGAL 的认识目前仍处于初期阶段。在今后的研究中,对 NGAL 鉴定 AKI 分型、病原学、临床结果的预测、危险分层等方面需要进一步探讨,相信随着研究的深入,NGAL 的临床应用会更加广阔。

参考文献

- [1] Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans[J]. Genomics, 1997, 45(1): 17-23.
- [2] Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, et al. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated Iron acquisition [J]. Mol Cell, 2002, 10 (5):

1033-1043.

- [3] Xu SY, Carlson M, Engström A, et al. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils[J]. Scand J Clin Lab Invest, 1994, 54(5):365-376.
- [4] Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(2):407-413.
- [5] Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering Iron[J]. Nature, 2004, 432(719):917-921.
- [6] Berger T, Togawa A, Duncan GS, et al. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(6):1834-1839.
- [7] Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An Iron delivery pathway mediated by a lipocalin[J]. Mol Cell, 2002, 10(5):1045-1056.
- [8] Yang J, Blum A, Novak T, et al. An epithelial precursor is regulated by the ureteric bud and by the renal stroma[J]. Dev Biol, 2002, 246(2):296-310.
- [9] Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, et al. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion[J]. Kidney Int, 2003, 63(5):1714-1724.
- [10] Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, et al. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics[J]. Mol Genet Metab, 2003, 80(4):365-376.
- [11] Yuen PS, Jo SK, Holly MK, et al. Ischemic and nephrotoxic acute renal failure are distinguished by their broad transcriptomic responses[J]. Physiol Genomics, 2006, 25(3):375-386.
- [12] 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.
- [13] Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity[J]. Am J Nephrol, 2004, 24(3):307-315.
- [14] Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery[J]. Lancet, 2005, 365(9466):1231-1238.
- [15] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis[J]. Am J Kidney Dis, 2009, 54(6):1012-1024.
- [16] Cai LJ, Borowiec J, Xu SY, et al. Assays of urine levels of HNL/NGAL in patients undergoing cardiac surgery and the impact of antibody configuration on their clinical performances[J]. Clin Chim Acta, 2009, 403(1/2):121-125.
- [17] Przybylowski P, Malyszko J, Malyszko JS. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin correlates with kidney function in heart allograft recipients[J]. Transplant Proc, 2010, 42(5):1797-1802.
- [18] Mishra J, Ma Q, Kelly C, et al. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation[J]. Pediatr Nephrol, 2006, 21(6):856-863.
- [19] Malyszko J, Malyszko JS, Bachorzewska-Gajewska H, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a new and sensitive marker of kidney function in chronic kidney disease patients and renal allograft recipients[J]. Transplant Proc, 2009, 41(1):158-161.
- [20] Lebkowska U, Malyszko J, Lebkowska A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C could predict renal outcome in patients undergoing kidney allograft transplantation: a prospective study[J]. Transplant Proc, 2009, 41(1):154-157.
- [21] Woo KS, Choi JL, Kim BR, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in comparison with glomerular filtration rate for evaluation of renal function in patients with diabetic chronic kidney disease[J]. Diabetes Metab J, 2012, 36(4):307-313.
- [22] 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.
- [23] Yang CC, Hsieh SC, Li KJ, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a potential biomarker for renal damage in patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012:759313.
- [24] Tong Z, Kunnumakkara AB, Wang H, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic Cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(15):6100-6108.
- [25] Zhang XF, Zhang Y, Zhang XH, et al. Clinical significance of Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression in primary rectal cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9:134.
- [26] Kafkas N, Demponeras C, Zoubouloglou F, et al. Serum levels of gelatinase associated lipocalin as indicator of the inflammatory status in coronary artery disease[J]. Int J Inflam, 2012, 2012:189797.
- [27] 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.

(收稿日期:2013-12-06)

(上接第 1298 页)

- 量监测指标分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(18):2216-2217.
- [2] Gillon J, Hussey AJ, Howe SP, et al. Post-transfusion non-A, non-B hepatitis: significance of raised ALT and anti-HBc in blood donors[J]. Vox Sang, 1988, 54(3):148-153.
- [3] Shiota G, Oyama K, Udagawa A, et al. Occult hepatitis B virus infection in HBs antigen-negative hepatocellular carcinoma in a Japanese population: involvement of HBx and p53[J]. J Med Virol, 2000, 62(2):151-158.
- [4] 王惺惺. 中国输血传染 HIV、HCV 和 HBV 的残余风险评估[J].

中国输血杂志, 2012, 25(10):924-925.

- [5] 陆祝选, 覃永庆. 南宁市 2005~2009 年无偿献血人群梅毒感染情况调查[J]. 临床输血与检验, 2011, 2(13):151-152.
- [6] 戴孟阳, 徐韬, 马宁, 等. 沈阳市 1997~2007 年梅毒流行病学特征分析[J]. 现代预防医学, 2009, 36(4):604-605.
- [7] 赵树铭, 李兵, 胡建, 等. 重庆地区无偿献血人群丙型肝炎病毒流行病学调查[J]. 重庆医学, 2006, 35(11):964-966, 968.
- [8] 雷永良, 纪勇平, 吴丽雅. 抗-HCV ELISA 检测阴性献血者 HCV-RNA 流行率调查[J]. 中国输血杂志, 2002, 15(4):264-265.

(收稿日期:2014-02-28)