

• 临床检验研究论著 •

糖尿病肾病患者尿液 NGAL 蛋白的定性及定量检测比较

何小洁¹, 陈慎仁², 杨毅华², 古东海³

(1. 广东省茂名市人民医院科教科, 广东茂名 525000; 2. 汕头大学医学院第二附属医院内分泌科, 广东汕头 515041; 3. 广东省茂名市人民医院内分泌科, 广东茂名 525000)

摘要:目的 明确尿液中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的定性及定量检测在糖尿病肾病早期诊断中的意义。方法 将 74 例糖尿病患者按其 24 h 尿微量清蛋白排泄率(UAER)分为正常蛋白尿组 26 例(DN₁组, UAER<30 mg/24 h), 微量蛋白尿组 24 例(DN₂组, UAER 介于 30~300 mg/24 h)及大量蛋白尿组 24 例(DN₃组, UAER>300 mg/24 h), 同时建立对照组 25 例。同时测定各组尿 NGAL 蛋白的活性及水平并比较两种检测结果。结果 各组患者尿 NGAL 活性条带均较对照组明显清晰($P=0.000$), 大量蛋白尿组 NGAL 活性较正常蛋白尿组高($P<0.05$), 微量蛋白尿组与正常蛋白尿组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 定量检测则提示大量蛋白尿组 NGAL 水平与其他 3 组存在区别, 大量蛋白尿组 NGAL 排出量高于微量蛋白尿组、正常蛋白尿组及对照组($P=0.000$), 对照组与正常蛋白尿组、微量蛋白尿组三者间两两两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 对糖尿病肾病患者而言, 尿 NGAL 蛋白活性检测比尿微量蛋白排泄率检测及 NGAL 定量检测敏感, 有可能成为糖尿病肾病早期诊断的新型指标。

关键词:中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; 糖尿病肾病; 尿微量清蛋白排泄率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)16-2163-03

Comparison of qualitative and quantitative detections of urine NGAL in patients with diabetic nephropathy

He Xiaojie¹, Chen Shenren², Yang Yihua², Gu Donghai³

(1. Department of Science and Teaching, Maoming Municipal People's Hospital, Maoming, Guangdong 525000, China;

2. Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital, Medical College, Shantou

University, Shantou, Guangdong 515041, China; 3. Department of Endocrinology,

Maoming Municipal People's Hospital, Maoming, Guangdong 525000, China)

Abstract: Objective To ascertain the significance of qualitative and quantitative detections of urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) in the early diagnosis of diabetic nephropathy. **Methods** 74 patients with diabetes mellitus were divided into the normoalbuminuria group[(DN₁, n=26, urinary albumin excretion rate(UAER)<30 mg/24 h], the microalbuminuria group(DN₂, n=24, UAER 30-300 mg/24 h) and the macroalbuminuria group(DN₃, n=24, UAER>300 mg/24 h) according to the 24 h UAER, and at the same time the control group(n=25) was set up. Both the activity and levels of urine NGAL in the above groups were examined and compared. **Results** The activity band of urine NGAL in each group were more distinct than that of the control group($P=0.000$). The NGAL activity in the macroalbuminuria group was higher than that in the normoalbuminuria group($P<0.05$). No difference in the NGAL activity was found between the micro-and normal-albuminuria groups($P>0.05$); the quantitative detection demonstrated that differences of the NGAL content existing between the macroalbuminuria group and the other three groups had statistical significance($P=0.000$), the urinary NGAL excretion in the macroalbuminuria group was higher than that in the microalbuminuria group, normoalbuminuria group and the control group($P=0.000$); No differences were found between the control group and the normoalbuminuria group and between the control group and the microalbuminuria group($P>0.05$). **Conclusion** For the patients with diabetic nephropathy, the activity detection of urine NGAL is more sensitive than UAER and the NGAL quantitative detection and could become a new type index in the early diagnosis of diabetic nephropathy.

Key words: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; diabetic nephropathy; urinary albumin excreting rate

糖尿病肾病(DN)是导致糖尿病患者死亡的主要原因之一。随着糖尿病发病率的逐年上升,糖尿病肾病的规模也不断扩大。目前,糖尿病肾病已是西方国家终末期肾衰的首位病因。对糖尿病肾病早期诊断及治疗的研究,目前众说纷纭,仍未得到较完善的解释。大多数研究认为,糖尿病肾病早期的肾脏病理改变是可逆的,如能早期诊断该病并及时采取干预措施,可阻止病情向不可逆蛋白尿阶段发展,这对提高患者后期

的生活质量和减轻社会医疗经济负担均有重大意义。当前对糖尿病肾病的早期诊断,最常用的指标是尿微量清蛋白,它是肾小球损伤的标志,也是临床上对糖尿病肾病进行分期的主要依据。但近期有研究认为,糖尿病肾病时肾小管的损伤可能要比肾小球的损伤早^[1],这提示研究者可以积极追寻某种能反映肾小管损伤的灵敏指标,从而更好地服务于临床。目前研究发现,中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)与肾小管的

分化及功能密切相关。它不仅是促进肾脏祖细胞转化为肾小管上皮细胞的重要因素^[2],而且在肾脏受损时还能诱导肾小管上皮细胞再生,促进肾功能的恢复^[3]。另外现有文献^[4]报道,NGAL 与肥胖、高血糖等代谢紊乱症状关联紧密。据此推测 NGAL 有可能参与糖尿病肾病的早期进展。本实验通过检测糖尿病患者及健康者尿液中 NGAL 蛋白的活性及浓度,从而了解 NGAL 在糖尿病肾病进展中的意义,并同时了解不同检测方法在糖尿病肾病早期筛查中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 1 月 1 日至 12 月 31 日 25 例本院健康体检者作为对照组。糖尿病组 74 例,均符合 1999 年世界卫生组织(WHO)糖尿病专家委员会制定的诊断标准。排除指标:合并其他种急慢性肾脏疾病(急慢性肾小球肾炎、急慢性肾盂肾炎、尿路感染)者;近期有适用肾毒性药物者;合并糖尿病急性并发症、全身感染、心衰、恶性肿瘤等疾病者。根据尿微量清蛋白排泄率(UARE)将该组患者分 3 小组,分别为正常蛋白尿组 26 例(DN₁组,UAER<30 mg/24 h);微量蛋白尿组 24 例(DN₂组,UAER 介于 30~300 mg/24 h)及大量蛋白尿组(DN₃组,UAER>300 mg/24 h)24 例。

1.2 检测方法

1.2.1 尿微量清蛋白排泄率检测 使用放射免疫法,试剂盒购自北京原子能研究所。步骤如下:非特异管加入温育液 300 μL,空白管加入温育液 100 μL,标准管分别加入 100 μL 对应的标准液(浓度依次为 1、2、5、10、20、50 μg/mL),质控管分别加入 100 μL 对应的质控液(浓度依次为 4.58、13.35、32.1 μg/mL),样品管加入 100 μL 相应患者的尿液。上述各管均加入¹²⁵I-清蛋白 100 μL,充分摇匀,并在各管(非特异管除外)加入清蛋白抗体 200 μL,摇匀后置入 37℃ 水浴箱中温育 30 min,然后在各管分别加入分离试剂 500 μL,再次充分摇匀,并于室温下静置 15 min,最后以 3 500 r/min 的速度离心 20 min。将离心后的溶液上清吸弃,沉淀物放入 γ 放射免疫检测仪中计数(每管 1 min),得出终浓度,结合尿量及可计算出 24 h 排泄率。

1.2.2 NGAL 蛋白定性检测 使用明胶酶底物电泳法。尿样离心后,收集上清 40 μL 并加入上样缓冲液(5×SDS)10 μL,充分混匀,取 20 μL 上样于含 1%明胶的底物胶中。室温下选择 40 V 恒压电泳,观察溴酚蓝进入分离胶后(约 0.5 h),选择 60 V 恒压电泳,进行至溴酚蓝刚刚逸出分离胶为止(约 5 h)。剥胶于 2.5%的 Triton X-100 中洗涤 1 h(期间换液 1 次)以去除胶中的 SDS,然后将凝胶置入含 NaCl 及 CaCl₂ 的孵育液中温育 24 h 以恢复明胶酶的活性(37℃,期间换液 1 次)。最后进行染色(0.1%考马斯亮蓝色)、脱色,使基质金属蛋白酶 9(MMP9)/NGAL 复合物在胶上形成明显的负染色带,照相得出结果。

1.2.3 NGAL 蛋白定量检测 使用双抗体夹心酶联免疫吸附法。NGAL 抗体购自丹麦 Antibodyshop 公司,NGAL 标准品由汕头大学医学院分子生物学实验室制备,辣根过氧化物酶标记链亲和素购自美国 VECTOR LABORATORIES 公司,ELISA 试剂盒购自美国 BETHYL LAB ELISA Starter Accessory PACKAGE 公司。步骤简介如下:用鼠抗人 NGAL 蛋白单克隆抗体包被 ELISA 微孔板以形成固相抗体,将包被板置

于 4℃ 下孵育过夜,用含 1%小牛血清清蛋白的封闭液终止反应。随后加入原核 NGAL 标准蛋白(浓度 0~250 μg/L)及待测样品各 100 μL。孵育后加入 100 μL 生物素化单克隆小鼠抗人 NGAL 抗体,继而加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记链亲和素,以底物四甲基联苯胺 100 μL 显色(15 min)并以 2 mol/L 的硫酸 100 μL 终止显色,最后在 450 nm 波长下读取吸光值,绘制标准曲线,得出 NGAL 蛋白浓度(μg/L)。

1.3 统计学处理 运用 SPSS10.0 软件包。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数表示。正态、方差齐性的计量资料多组间比较使用方差分析;偏态计量资料、计数资料多组间比较用 Kruskal-Wallis H 检验法,独立样本两两比较采用 Mann-Whitney U 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者一般资料比较 见表 1。各组年龄、性别比较差异无统计学意义(P>0.05),具有可比性。大量蛋白尿组患者病程较正常蛋白尿组长(P<0.05)。3 组患者收缩压水平比较差异有统计学意义(P<0.05),血压随病程加重而升高(P=0.000);其中,正常蛋白尿组与微量蛋白尿组差异有统计学意义(P<0.01),正常蛋白尿组与大量蛋白尿组比较差异有统计学意义(P=0.000),微量蛋白尿组与大量蛋白尿组比较差异无统计学意义(P>0.05),各组舒张压比较差异无统计学意义(P>0.05),对照组血压均为正常值。

表 1 各组患者一般情况比较表

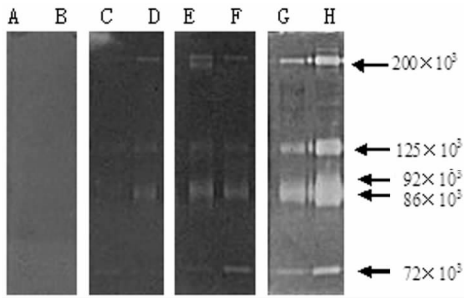
项目	对照组	DN ₁ 组	DN ₂ 组	DN ₃ 组
病例数(n)	25	26	24	24
男性百分比(%)	60	46.2	41.7	54.2
年龄(岁)	58.56±8.68	60.12±12.56	59.96±10.67	64.50±10.62
病程(年)	0	8.96±6.21	11.10±6.80	11.92±5.88*
收缩压(mm Hg)	—	126.04±16.24	145.50±25.83*	157.63±23.69*
舒张压(mm Hg)	—	76.58±11.52	78.92±12.38	83.17±14.32

*: P<0.05,与 DN₁ 组比较。—:无数据。

2.2 NGAL 蛋白定性检测结果 见表 2。不同强弱程度的 NGAL/MMP9 条带在各受试组中所占的比例,图 1 则为 NGAL 活性条带的示意图。健康人尿液未见 NGAL/MMP9 活性条带出现。图 1 中 200×10³ 提示为基质金属蛋白酶 9(MMP9)的二聚体条带;125×10³ 处为 MMP9/NGAL 复合物条带(即 NGAL 活性条带);92×10³ 处为 MMP9 前体条带;86×10³ 处为 MMP9 激活体条带;72×10³ 处为 MMP2 条带。由图 1 可见,对照组未出现任何活性条带,糖尿病正常蛋白尿组可见较弱的 NGAL 活性条带,微量蛋白尿组 NGAL 活性条带已较清晰,大量蛋白尿组中 NGAL 活性条带明显可见。

表 2 各组 NGAL 蛋白定性检测结果比较[n(%)]

组别	n	阴性	弱阳性	阳性	明显阳性	强阳性
对照组	25	25(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
DN ₁ 组	26	12(46)	7(27)	3(12)	2(8)	2(8)
DN ₂ 组	24	9(38)	3(13)	5(21)	6(21)	1(5)
DN ₃ 组	24	6(25)	7(29)	1(5)	1(5)	9(38)



A, B: 对照组尿液样品; C, D: DN₁ 组尿液样品; E, F: DN₂ 组尿液样品; G, H: DN₃ 组尿液样品。

图 1 各组 NGAL 蛋白活性比较示意图

2.3 NGAL 蛋白定量检测结果 见表 3 及图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 3 各组尿 NGAL 蛋白比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	n	NGAL 蛋白
对照组	25	1.36 ± 1.42 *
DN ₁ 组	26	1.56 ± 1.89 *
DN ₂ 组	24	2.65 ± 2.94 *
DN ₃ 组	24	7.22 ± 5.94

*: $P < 0.05$, 与 DN₃ 组比较。

3 讨论

NGAL 是载脂蛋白家族的一种比较新的脂质运载蛋白, 在人体内分布广泛, 主要存在于中性粒细胞的过氧化物酶阴性颗粒中, 同时还低水平表达于肾脏、支气管、胃、小肠、胰腺、前列腺及胸腺等处^[5]。人类 NGAL 蛋白是在研究 MMP9 时被发现, 后者是一类基质蛋白水解酶, 能分解 IV、V 型胶原及 I、V 型明胶。由于 NGAL 与 MMP9 形成的二聚体(NGAL/MMP9)是此二者在人体内常见的存在形式之一, 检测尿液中 MMP9/NGAL 的活性就可间接地反映 NGAL 的活性。

本研究发现, 在检测 UAER 尚未能发现异常的正常蛋白尿组患者, 尿液即可检出较为明显的 NGAL 蛋白活性条带与健康人有差别。这提示 NGAL 蛋白的定性检测有可能比尿微量清蛋白敏感, 在糖尿病未出现明显肾脏损害的阶段即可检出。而 NGAL 蛋白的定量检测则相对迟钝, 仅在大量蛋白尿组显示差别。因此, 尿液 NGAL 蛋白的定性检测可用于糖尿病肾病的早期筛查。另外, NGAL 活性及浓度均在大量蛋白尿组显示出高水平, 说明尿液大量 NGAL 蛋白的出现可在一定程度上提示疾病的严重性。

目前的研究发现, NGAL 与肾脏有着十分紧密的关系。在胚胎发育阶段, NGAL 可通过肠菌素与 Fe²⁺ 离子形成复合物: NGAL/肠菌素/Fe²⁺, 该复合物可通过介导铁离子向细胞内转运, 诱导肾脏祖细胞向早期肾小管上皮细胞分化, 促进胚胎发育成熟。肾脏受到损伤后, NGAL 所介导的铁转运又可提供足够的 Fe²⁺ 以修复肾小管上皮细胞^[6-7]。最新的研究还发现, NGAL 是肾小管损伤的标志物, 是糖尿病肾病患者肾小

球滤过率下降的一种预测指标^[8-11]。NGAL 在糖尿病肾病早期阶段升高的原因, 推测也与肾小管受损, 机体反馈性地分泌较多的 NGAL 蛋白来促进再生修复有关。而当糖尿病肾病发展至中晚期阶段, 随着肾小球肾小管破损的加重, 尿蛋白漏出的增多, NGAL 蛋白必然随之明显上升, 因此, 大量蛋白尿阶段 NGAL 蛋白的浓度及活性均达高值。

通过检测尿液 NGAL 蛋白活性来筛查糖尿病肾病患者, 取材方便, 检测方法简单, 且无需特殊仪器, 价格低廉, 同时对患者无创伤性, 是一项很有临床应用价值的方法。但因为判断条带强弱由操作者进行, 明显受限于操作者的个体差异, 经验及周围环境等, 而且尿液标本久置容易出现酶活性失活等, 大大限制了该方法的推广。但无论如何, 对筛查出有明显阳性条带的患者进行追踪随访, 有着十分重要的临床意义。

参考文献

- [1] Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: More than an aftermath of glomerular injury [J]. *Kidney Int*, 1999, 56(5): 1627-1637.
- [2] Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(1): 1045-1056.
- [3] Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 610-621.
- [4] Wang Y, Lam KS, Kraegen EW, et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(1): 34-41.
- [5] 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.
- [6] Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(1): 1045-1056.
- [7] Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 610-621.
- [8] Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2009, 32(2): 91-98.
- [9] 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.
- [10] Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin reflects the severity of renal impairment in subjects affected by chronic kidney disease [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2008, 31(4): 255-258.
- [11] Chou KM, Lee CC, Chen CH, et al. Clinical value of NGAL, L-FABP and albuminuria in predicting GFR decline in type 2 diabetes mellitus patients [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54863.

(收稿日期: 2014-02-22)