

· 论 著 ·

血浆 NGAL 和血清 CysC 在糖尿病肾病早期诊断中的临床价值*

孙 丽, 牛国平[△]

(徐州市中心医院检验科, 江苏徐州 221009)

摘要:目的 探讨 2 型糖尿病(T2DM)患者血浆中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)和血清胱抑素 C(CysC)的改变及其对糖尿病肾病(DN)的诊断价值。**方法** 选择 T2DM 患者 58 例,根据尿微量清蛋白/尿肌酐比值(ACR)分为正常清蛋白尿组(ACR<30 mg/mmol)和高清蛋白尿组(ACR≥30 mg/mmol);另选择 40 例健康体检者作为对照,测定其血浆 NGAL、血清 CysC、肾功能、血糖及血脂等水平。**结果** 血浆 NGAL 和血清 CysC 水平在对照组、正常清蛋白尿组和高清蛋白尿组中呈逐步增高趋势,差异有统计学意义($P<0.05$);Pearson 相关分析,血浆 NGAL 与血清 CysC、肌酐(CREA)呈正相关(相关系数分别为 0.58、0.43、0.66, $P<0.05$);血清 CysC 与 CREA、BUN 亦呈正相关(相关系数分别为 0.73、0.58, $P<0.05$)。**结论** DN 患者血浆 NGAL 与血清 CysC 水平显著升高,二者呈明显正相关,均与肾损伤程度有关,二者可以作为 DN 早期无创性诊断指标。

关键词: 血浆中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; 血清胱抑素 C; 糖尿病肾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1182-03

Clinical value of plasma NGAL and serum CysC in early diagnosis of diabetic nephropathy*

Sun Li, Niu Guoping[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xuzhou Municipal Central Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221009, China)

Abstract: **Objective** To explore the changes and diagnostic value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and serum cystatin C (CysC) in diabetic nephropathy (DN). **Methods** 58 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) were divided into 2 groups according to urinary microalbumin to creatinine ratio (ACR): normal albumin urine group (ACR<30 mg / mmol) and high albumin urine group (ACR≥30 mg/mmol). At the same time, 40 individuals undergoing healthy physical examination were selected as the control group. The levels of plasma NGAL, serum CysC, renal function and glucose were detected. The results were statistically processed. **Results** Plasma NGAL and serum CysC levels in the control group, normal albumin urine group and high albumin urine group showed the gradually increasing trend, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The Pearson correlation analysis: plasma NGAL level was positively correlated with serum CysC, creatinine (CREA), and blood urea nitrogen (BUN) (correlation coefficients 0.58, 0.43, 0.66 respectively, $P<0.05$); serum CysC was also positively correlated with serum CREA and BUN (correlation coefficients 0.73, 0.58 respectively, $P<0.05$). **Conclusion** Plasma NGAL and serum CysC levels in DN patients are significantly increased, both show a significantly positive correlation and are related with renal injury degree. Their combined detection could serve as a noninvasive diagnostic indicator for early diagnosis of DN.

Key words: plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin; serum cystatin C; diabetic nephropathy

糖尿病肾病(DN)是由 2 型糖尿病(T2DM)引发的肾脏损伤,是糖尿病最主要的并发症之一,因此,寻找有效的 DN 早期诊断指标及干预措施成为当前临床研究的热点。

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)是脂质运载蛋白家族的新成员^[1],最早在激活的中性粒细胞中被发现。它是一种相对分子质量很小的分泌性蛋白,可快速排泄并在尿液中检测到。近期研究表明,NGAL 是目前报道的可以灵敏地反映早期肾脏损伤的新型标志物之一^[2-3],和其他评估肾脏损伤的生物标志物相比,其更敏感、能更为早期地发现肾脏损伤^[4]。胱抑素 C(CysC)也是近年来报道可以反映早期肾脏功能改变的内源性标志物之一。肾脏是清除血循环中 CysC 的唯一器官。血液中的 CysC 水平稳定,不受年龄、性别、饮食和肌肉等因素的影响^[5],是一种比较理想的内源性指标。本研究通过检测 DN 患者的血浆 NGAL 和血清 CysC 水平,分析两者

与尿微量清蛋白/尿肌酐比值(ACR)之间的关系^[6],探讨二者与 DN 发生、发展的关系,评价其作为无创性肾脏早期损伤标志物的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按 1999 年世界卫生组织(WHO)的糖尿病诊断和分型标准^[7],选择 2014 年 1~7 月在徐州市中心医院治疗的 T2DM 患者 58 例。根据 ACR 分为正常清蛋白尿组(NA 组)29 例:ACR<30 mg/mmol,其中男 14 例,女 15 例,平均年龄(59.43±2.46)岁;高清蛋白尿组(含大量和微量清蛋白尿患者,CN+MA 组)29 例:ACR≥30 mg/mmol,其中男 17 例,女 12 例,平均年龄(55.72±2.71)岁;选取 2014 年 1~7 月本院体检中心健康体检者 40 例作为对照组,其中男 22 例,女 18 例,平均年龄(54.23±3.54)岁,无肾小球肾炎、良性肾动脉硬化、糖尿病、系统性疾病肾脏损害等。所有研究对象无严重心

* 基金项目:江苏省徐州市科技项目(XZZD1348)。作者简介:孙丽,女,副主任技师,主要从事临床生物化学研究。△ 通讯作者, E-mail:18952170707@189.cn。

脏功能不全、冠心病、胶原性疾病、肝病、脑梗死及肺部疾病。

1.2 仪器与试剂 Afinion™ AS100 分析仪由挪威 Axis Shield 公司提供,血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、CysC、肌酐(CREA)、血尿素氮(BUN)、尿酸(UA)、空腹血糖(FBG)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)项目均在日立 7600 全自动生化分析仪上测定,严格按照标准操作规程操作,同期室内质控均在可控范围内。

1.3 方法 所有受试者均于前 1 d 禁饮、禁食 10 h,次日早晨抽取空腹静脉血 3 mL,室温下静置 30 min 后,以 3 000 r/min 离心 10 min,立即检测 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C、BUN、CREA、UA、FBG 和 ALT 等。同时抽取静脉血 5 mL 置于乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)抗凝的试管中,3 000 r/min 离心 10 min,取 1.5 mL 血浆置于无菌 EP 管中;收集清洁中段晨尿 5 mL,置于无菌试管中,2 000 r/min 离心 5 min,取 1.5 mL 上清液置于 EP 管中,在 EP 管上做好标记后置于-80 °C 低温冰箱内保存。集中检测血浆 NGAL 水平和 ACR,避免反复冻融。采用干式免疫标记散射定量法测定 ACR,采用胶乳增强免疫比浊法测定血浆 NGAL 和血清 CysC 水平,同时分别采用胆固醇氧化酶法、甘油磷酸氧化酶法、直接法、紫外-谷氨酸脱氢酶法、肌氨酸氧化酶法、氧化酶法、己糖激酶法和速率法检测 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C、BUN、CREA、UA、FBG 和 ALT。

1.4 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS19.0 软件包对数据进行统计学分析。比较组间差异应用 *t* 检验,采用 Pearson 作血浆 NGAL 与血清 CysC、CREA 的相关性分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与 T2DM 各组一般资料及各项检测指标值的比较 对照组 40 例,NA 组患者 29 例,CN+MA 组患者 29 例。各组间患者年龄及男女比例差异均无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1。

表 1 三组受检者一般资料及各项检测数据的比较

指标	CN+MA 组	NA 组	对照组
<i>n</i>	29	29	40
年龄(岁)	55.72±2.71	59.43±2.46	54.23±3.54
性别(男/女)	17/12	14/15	22/18
NGAL(μg/L)	237.80±30.60*	158.10±13.24*	101.40±7.70
CysC (mmol/L)	1.69±0.18*△	0.84±0.05*	0.65±0.02
FBG(mmol/L)	8.13±1.0*	7.21±0.54*	5.03±0.08
TC(mmol/L)	5.44±0.37	4.99±0.34	4.31±0.14
TG(mmol/L)	2.34±0.44*	2.02±0.25*	1.06±0.08
HDL-C(mmol/L)	1.02±0.06*	1.05±0.06*	1.41±0.04
LDL-C(mmol/L)	3.57±0.29*	3.27±0.29*	2.60±0.10
BUN(mmol/L)	10.95±1.15*	5.52±0.42	4.81±0.20
CREA(μmol/L)	126.00±17.55*	61.25±5.77	57.67±1.90
UA(μmol/L)	346.50±17.54	268.70±17.34	281.40±10.77
ALT(U/L)	21.17±2.32	20.94±2.49	18.35±1.41

△: *P* < 0.05, 与 NA 组比较; *: *P* < 0.05, 与对照组比较。

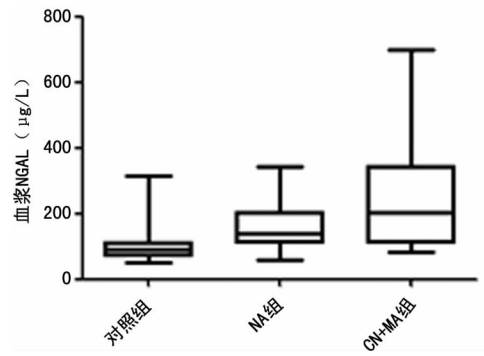


图 1 各组血浆 NGAL 水平比较

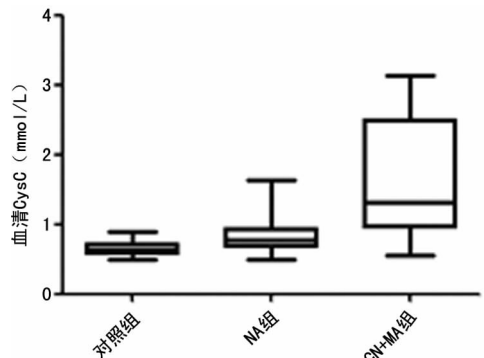


图 2 各组血清 CysC 水平比较

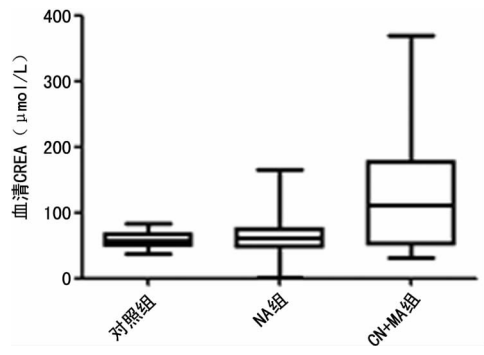


图 3 各组血清 CREA 水平比较

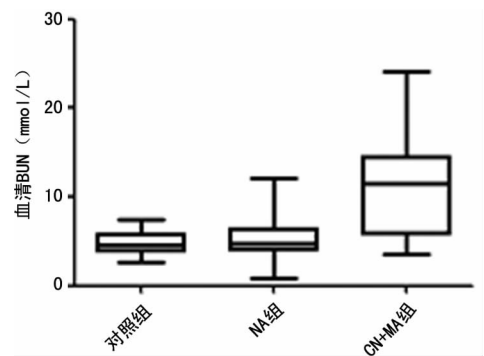


图 4 各组血清 BUN 水平比较

2.2 各组血浆 NGAL、血清 CysC、CREA、BUN 水平比较 T2DM 组(CN+MA 组和 NA 组)血糖、TG 和 LDL-C 水平均较对照组升高(*P* < 0.05),HDL-C 水平较对照组降低(*P* < 0.05)。血浆 NGAL 水平在对照组、NA 组和 CN+MA 组中呈逐步增高趋势(*P* < 0.05),见图 1。对照组、NA 组和 CN+MA 组的血清 CysC 水平亦呈逐步增高趋势(*P* < 0.05),见图 2。NA 组和 CN+MA 组的血清 CREA、BUN 水平明显高于对照

组 ($P < 0.05$), 见图 3、4。

2.3 血浆 NGAL、血清 CysC、CERA 的相关性 采用 Pearson 相关性分析显示, 血浆 NGAL 与血清 CysC 之间存在较好相关性 (相关系数 $r = 0.58, P < 0.05$), 见图 5。血浆 NGAL、血清 CysC 与 CERA 之间均呈正相关性 (r 分别为 0.58、0.43, $P < 0.05$)。见图 6~7。

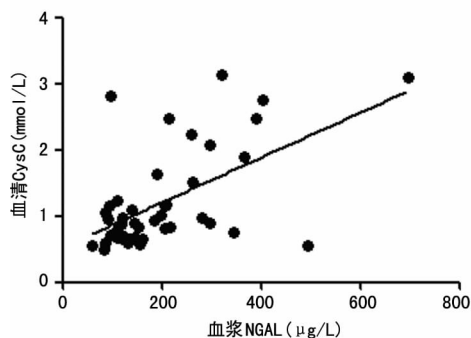


图 5 血浆 NGAL 的水平与血清 CysC 相关性分析

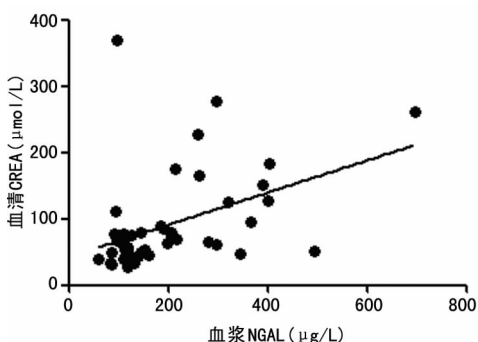


图 6 血浆 NGAL 的水平与血清 CREA 相关性分析

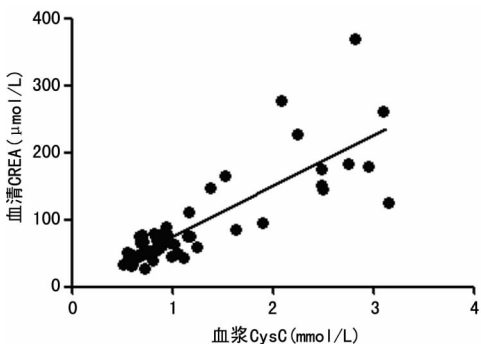


图 7 血清 CysC 的水平与血清 CREA 相关性分析

3 讨论

DN 是 T2DM 最常见和最严重的微血管并发症之一, 又可以称为糖尿病肾小球硬化症, 其发病率逐年升高, 严重危害人类的健康和生命^[8]。目前认为在 DN 早期, 肾脏的病理改变大多可逆, 如果能进行早期诊断并及时治疗, 可延缓蛋白尿的出现, 阻止病情向不可逆的阶段发展。早期诊断、及时治疗可将肾脏并发症的发生推迟长达 24 年, 减少透析、肾移植率达 60%, 延长预期寿命约 14 年^[9]。目前 DN 最可靠的鉴别诊断方法是进行肾脏活组织病理检查 (简称肾活检), 但是肾活检取材不便, 具有创伤性, 并且费用高昂, 在 DN 发生的早期阶段, 肾活检更难开展。因此, DN 的早期诊断和预后评估对患者的及时诊疗至关重要, 对于早期评价糖尿病肾脏损伤的生物学标

志物的研究逐渐受到重视^[10]。

NGAL 最初是在人类中性粒细胞中被发现的, 共价结合于中性粒细胞中的明胶酶, 是脂质运载蛋白超家族成员之一。正常情况下, NGAL 在人类许多组织, 如胃、肾脏、肝脏和结肠等中以极低水平表达。当肾脏缺血或毒素引起的肾小管急性损伤时, 受损的肾小管上皮细胞中的 NGAL 会显著高表达, 从而诱导肾小管-间质中浸润的中性粒细胞凋亡, 以保护肾脏组织免受攻击; 另一方面高水平的 NGAL 可以促进肾小管上皮细胞再生修复, 从而使肾脏功能得以恢复。通过转录水平筛选早期肾脏缺血时相关基因的表达状况, 发现 NGAL 基因表达是对照组的 10 倍, 同时在急性肾损伤的患者肾皮质小管、尿液和血液中均发现大量的 NGAL 堆积^[11]。Fassett 等^[12]研究发现, 在炎症刺激下, 慢性肾损伤患者体内肾小管上皮细胞活化, 肾单位受到破坏, 肾小球滤过率下降, 血 CREA 随之增高, 同时血液 NGAL 水平增高。因此, 血液中的 NGAL 可预测慢性肾损伤过程中的急性损伤, 其水平与急性损伤程度呈正相关。本研究发现 DN 患者血浆 NGAL 水平较对照组明显升高, 血浆 NGAL 水平与 ACR 水平成比例, 与肾损害的严重程度相一致, 是出现于 DN 早期的生物学指标。

血清 CysC 是半胱氨酸蛋白酶抑制物超家族的成员之一, 其不受性别、年龄、炎症、血脂、肝脏疾病等因素的干扰, 相对分子质量很低, 可以自由通过肾小球滤过膜, 被近曲小管重吸收和降解, 经肾脏排出, 不再重新回到血液中。肾小管不分泌 CysC, 肾脏是清除循环中 CysC 的唯一器官, 因此可作为反映肾脏滤过功能较理想的内源性指标。有研究显示, 当肾脏出现轻微损伤时, 血清 CysC 水平即可升高, 并随着病情的加重而逐渐增高^[13]。本研究结果表明 T2DM 患者中 CN+MA 组血清 CysC 水平明显高于 NA 组, NA 组明显高于对照组, 且随着 CREA 水平的增高而逐渐升高。由于血清 CREA 水平在 NA 组和对照组之间无明显差异, 表明血清 CysC 比血清 CREA 在诊断 DN 具有更高的灵敏度和特异性。

本研究还发现, T2DM 患者血浆 NGAL 与 CysC 之间存在较好的相关性, 均与血清 CREA 呈正相关, 这一结果表明血浆 NGAL 与血清 CysC 水平均可反应糖尿病肾脏受损伤程度。因此, 检测血浆 NGAL 与血清 CysC 水平有望成为诊断 DN 早期肾小管功能更敏感、更可靠的生物学指标。考虑由于本实验患者样本量较少, 值得临床进一步研究。

参考文献

- [1] Hanai J, Mammoto T, Seth P, et al. Lipocalin 2 diminishes invasiveness and metastasis of Ras-transformed cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14):13641-13647.
- [2] Srisawat N, Murugan R, Lee M, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts recovery from acute kidney injury following community-acquired pneumonia [J]. Kidney Int, 2011, 80(5):545-552.
- [3] Paragas N, Qiu A, Zhang Q, et al. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time[J]. Nat Med, 2011, 17(2):216-222.
- [4] Nishida M, Kawakatsu H, Okumura Y, et al. Serum and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels(下转第 1187 页)

标本进行 EGFR 突变检测是可行的, 可以作为临床应用靶向药物治疗肺癌的依据。但由于外周血肿瘤细胞的数量较肿瘤组织少, 可能存在假阴性的可能, 在本研究中就发现了 3 份肿瘤组织中检测到 EGFR 突变但外周血游离 DNA 中未检测到。

对于晚期 NSCLC 患者无法获得肿瘤组织时, 可以使用外周血替代肿瘤组织进行突变检测, 采用外周血标本进行 EGFR 突变检测, 具有无创性、实时性和动态性的特点, 患者易于接受。可作为临床分子靶向治疗个体化预测的有效选择之一。

参考文献

[1] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947-957.

[2] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung Cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): U38-958.

[3] Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung Cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(12): 1545-1552.

[4] Morita S, Okamoto I, Kobayashi K, et al. Combined survival analysis of prospective clinical trials of gefitinib for non-small cell lung Cancer with EGFR mutations[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(13): 4493-4498.

[5] 乔建兵, 陈文萍. 比较吉非替尼与化疗一线治疗晚期非小细胞肺癌的 Meta 分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(5): 426-430.

[6] Kim DW, Lee SH, Lee JS, et al. A multicenter phase II study to evaluate the efficacy and safety of gefitinib as first-line treatment for Korean patients with advanced pulmonary adenocarcinoma harboring EGFR mutations[J]. Lung Cancer, 2011, 71(1): 65-69.

[7] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung Cancer with mutated EGFR[J]. N

Engl J Med, 2010, 362(25): 2380-2388.

[8] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung Cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJ-TOG3405): an open label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2): 121-128.

[9] Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung Cancer in Asia (IPASS)[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(21): 2866-2874.

[10] Chintala L, Kurzrock R. Epidermal growth factor receptor mutation and diverse tumors: case report and concise literature review [J]. Mol Oncol, 2010, 4(4): 306-308.

[11] Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of Cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1659-1665.

[12] Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for Cancer biomarkers[J]. Curr Mol Med, 2010, 10(2): 142-165.

[13] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung Cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676): 1497-1500.

[14] Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, et al. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA) [J]. Br J Cancer, 2007, 97(6): 778-784.

[15] 黄进肃, 董强刚, 许凯黎, 等. 血清循环 DNA 的 EGFR 基因突变与肺癌选择性靶向治疗研究[J]. 肿瘤, 2007, 27(12): 968-972.

(收稿日期: 2015-01-02)

(上接第 1184 页)

in children with chronic renal diseases[J]. Pediatr Int, 2010, 52(4): 563-568.

[5] Randers E, Erlandsen EJ. Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function—a review[J]. Clin Chem Lab Med, 1999, 37(4): 389-395.

[6] 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.

[7] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation[J]. Diabet Med, 1998, 15(7): 539-553.

[8] Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint[J]. Kidney Int, 2008, 74(1): 22-36.

[9] Kanauchi M, Nishioka H, Hashimoto T, et al. Diagnostic signifi-

cance of urinary transferrin in diabetic nephropathy [J]. Nihon Jinzo Gakkai Shi, 1995, 37(11): 649-654.

[10] 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.

[11] Abassi Z, Sagi O, Armaly Z, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NAGL): a novel biomarker for acute kidney injury[J]. Harefuah, 2011, 150(2): 111-116.

[12] Fassett RG, Robertson IK, Ball MJ, et al. Effects of atorvastatin on NGAL and cystatin C in chronic kidney disease: a post hoc analysis of the Lord trial[J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27(1): 182-189.

[13] 李培敏, 陶庆枢. 血清胱抑素 C 与超敏 C 反应蛋白联检诊断早期糖尿病肾损伤的价值[J]. 现代医院, 2007, 7(4): 19.

(收稿日期: 2015-01-11)