

· 临床研究 ·

原发性肾病综合征患者中性粒细胞明胶酶
相关脂质运载蛋白的变化及意义

张颖 唐敏 施婧 杨晶 李胜开 尹忠诚

【摘要】 **目的** 探讨原发性肾病综合征(PNS)患者中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的变化以及与病理类型、肾小管间质损伤程度、临床指标的关系。 **方法** 40例PNS患者按有无急性肾小管坏死(ATN)分急性肾损伤(AKI)组及非AKI组,按病理类型分微小病变型肾病(MCD)组、系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)组、局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)组、膜增生性肾小球肾炎(MPGN)组、膜性肾病(MN)组;20例健康体检者及20例因肾肿瘤做肾切除术但远离肿瘤部位的正常肾组织作正常对照。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清、尿液NGAL水平,免疫组织化学染色法观察肾组织NGAL表达。 **结果** (1)AKI组患者血、尿NGAL水平及肾组织NGAL表达显著高于非AKI组及对照组($P < 0.05$)。(2)MPGN组及FSGS组患者血、尿NGAL水平及肾组织NGAL表达显著高于其他病理类型组($P < 0.05$)。(3)在肾小管间质发展至重度病变之前,随着肾小管间质损伤程度的加重,血、尿NGAL水平及肾组织NGAL表达逐渐升高;在肾小管间质发展至重度病变时,血NGAL水平及肾组织NGAL表达下降($P < 0.05$)。(4)血、尿NGAL水平及肾组织NGAL表达与血肌酐呈正相关(r 值分别为0.198、0.352、0.146, P 值分别为0.048、0.000、0.028),与尿素氮呈正相关(r 值分别为0.199、0.278、0.325, P 值分别为0.043、0.000、0.019),与血白蛋白呈负相关(r 值分别为-0.384、-0.318、-0.259, P 值分别为0.028、0.024、0.020),与尿渗透浓度呈负相关(r 值分别为-0.250、-0.256、-0.277, P 值分别为0.012、0.027、0.002)。 **结论** NGAL可作为预测PNS患者AKI的敏感指标,在一定程度下可用于评价肾小管间质病变程度及肾功能。

【关键词】 肾病综合征; 急性肾损伤; 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白
ZHANG Ying, TANG Min, SHI Jing, YANG Jing, LI Sheng-kai, YIN Zhong-cheng. Department of Nephrology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China

Corresponding author: YIN Zhong-cheng, Email: yzxyfy@126.com

【Abstract】 **Objective** To discuss the changes of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in patients with primary nephrotic syndrome (PNS) and the correlation with renal pathological type, renal tubulointerstitial lesions and the clinical indicators. **Methods** Forty patients with PNS were divided into acute kidney injury (AKI) group and non-AKI group according to whether renal tubular necrosis (ATN) occurred in renal pathology. Moreover, on the basis of pathological type they were divided into minimal change disease (MCD) group, mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN) group, focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) group, membrane proliferative glomerulonephritis (MPGN) group and membranous nephropathy (MN) group. Twenty healthy subjects and normal kidney tissues which came from 20 patients with renal tumor nephrectomy and were distant from the tumor sites were the control groups. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1001-7097.2013.07.003

作者单位: 221000 徐州医学院附属医院肾内科

通信作者: 尹忠诚, Email: yzxyfy@126.com

to detect the serum and urine level of NGAL, and immunohistochemical staining was used to observe the expression of NGAL in the renal tissue. **Results** (1)The serum and urine level of NGAL and the expression of NGAL in the renal tissue in the PNS complicated with AKI group were significantly higher than that in the PNS without AKI group and in the control group($P < 0.05$). (2)The serum and urine level of NGAL and the expression of NGAL in the renal tissue were enhanced in MPGN group and FSGS group than that in the other three groups($P < 0.05$). (3) Before developing to severe tubulointerstitial lesions, with the aggravation of tubulointerstitial damage, the serum and urine level of NGAL and the expression of NGAL in the renal tissue were increased. But when renal tubular interstitial lesions developed to severe disease, serum level of NGAL and the expression of NGAL in the renal tissue were decreased($P < 0.05$). (4)The serum and urine level of NGAL and the expression of NGAL in the renal tissue were positively correlated with serum creatinine(r values were 0.198, 0.352, 0.146 respectively, P values were 0.048, 0.000, 0.028 respectively), were positively correlated with blood urea nitrogen(r values were 0.199, 0.278, 0.325 respectively, P values were 0.043, 0.000, 0.019 respectively), were negatively correlated with serum albumin(r values were -0.384, -0.318, -0.259 respectively, P values were 0.028, 0.024, 0.020 respectively) and were negatively correlated with urine osmotic pressure(r values were -0.250, -0.256, -0.277 respectively, P values were 0.012, 0.027, 0.002 respectively). **Conclusion** NGAL is a sensitive biological parameter for predicting AKI in the patients with PNS, and it can be used to evaluate the degree of tubulointerstitial lesions and renal function to a certain extent.

【Key words】 Nephrotic syndrome; Acute kidney injury; Neutrophil gelatinase - associated lipocalin

原发性肾病综合征(PNS)是肾内科常见病,其中急性肾损伤(AKI)是严重的并发症之一,病理上常表现为急性肾小管坏死(ATN)及肾小管间质病变,若不及时诊治,可转化为慢性肾衰竭,需肾脏替代治疗。目前临床诊断AKI主要是通过检测血肌酐、尿素氮的变化,但在肾功能急性改变期间血肌酐并不能作为一个敏感的生物标志物判断肾脏组织学损伤程度。而NGAL在血肌酐改变前就可特异地表达于肾脏尤其是肾脏受损部位(如肾小管),能够动态监测,便于观察患者病情变化^[1]。本研究通过检测PNS患者血清、尿液NGAL水平变化,观察肾组织中NGAL表达强度,分析其与病理类型、肾小管间质损伤程度及临床指标的关系,进一步探讨NGAL在PNS中的作用及意义。

对象与方法

1. 研究对象:选取2012年1月至9月于本院肾内科首诊的PNS(24 h尿蛋白量 > 3.5 g,血浆白蛋白 < 30 g/L)患者40例作为肾病组,男21例,女19例,年龄 $18 \sim 63$ (35.2 ± 17.8)岁。排除标准:(1)继发性肾病综合征患者;(2)感染性疾病患者;

(3)肾穿前曾使用过糖皮质激素或(和)免疫抑制剂或(和)抗凝剂或(和)降脂药或(和)抗氧化剂或(和)抗利尿剂等药物的患者。按肾病理中有无ATN分为AKI组11例及非AKI组29例;按病理类型分为微小病变型肾病(MCD)组6例,系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)组13例,局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)组10例,膜增生性肾小球肾炎(MPGN)组3例,膜性肾病(MN)组8例。选取20例正常的健康体检者及20例肾肿瘤行肾切除但远离肿瘤部位的肾组织(均经光镜证实为正常肾组织)作为对照组。本研究经本院伦理委员会批准,且受试对象均知情同意并签署知情同意书。

2. 实验材料:人lipocalin2(NGAL)ELISA试剂盒(上海西唐);兔抗人NGAL单克隆抗体(美国Epitomics);PV-9001免疫组化染色试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉金桥)。

3. 临床一般指标及血、尿NGAL的检测:检测肾穿当天临床指标,其中血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、血白蛋白(ALB)、尿蛋白量(UTP)、尿 α_1 微球蛋白(α_1 -MG)均由本院检验科独立完成,尿渗透浓度由肾内科实验室检测。采用双抗体夹心ABC-ELISA法检测受试对象的血、尿NGAL水

平,实验步骤严格按照试剂盒说明书操作。

4. 肾小管间质病变半定量评分标准^[2]:石蜡切片常规染色观察肾小管间质病理损害程度。肾小管间质病变包括间质炎性细胞浸润、肾小管萎缩、间质纤维化。按照病变范围评 0~4 分。无病变为 0 分;病变范围在 0%~5% 为 1 分;6%~25% 为 2 分;26%~50% 为 3 分;>50% 为 4 分。每张切片至少计数 5 个高倍视野,取平均值。根据病理损害评分分为 1 分组、2 分组、3 分组、4 分组,共 4 组。

5. 免疫组化染色:按照兔超敏二步法免疫组化染色步骤进行操作,用正常肾组织病理切片作阴性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为自身对照。在高倍镜($\times 400$)下,每张切片随机观察 3 个不重叠视野,每个视野选取 2 个近曲小管,观察 NGAL 阳性细胞染色的部位,应用 IPP6.0 图像分析软件,测定 5 种病理类型及正常对照组近曲小管上皮细胞剔除细胞核后的面积(M)和染色的吸光度(A)值,最后计算近曲小管上皮细胞染色的相对 A,计算公式:相对 A 值=A/面积(M)。

6. 统计学分析:实验数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均值比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较方差齐时采用单因素方差分析,方差不齐时采用非参数秩和检验;相关性分析用 Spearman 相关分析方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。

结 果

1. 肾病组及对照组一般资料比较:肾病组与对照组在例数、性别、年龄、收缩压、舒张压、BUN、尿渗透浓度上差异无统计学意义($P > 0.05$);肾病组 Scr、尿 α_1 -MG、UTP 水平高于对照组($P < 0.05$),血 ALB 水平低于对照组($P < 0.05$);肾病组中 AKI 组与非 AKI 组间一般资料差异无统计学意义,见表 1。

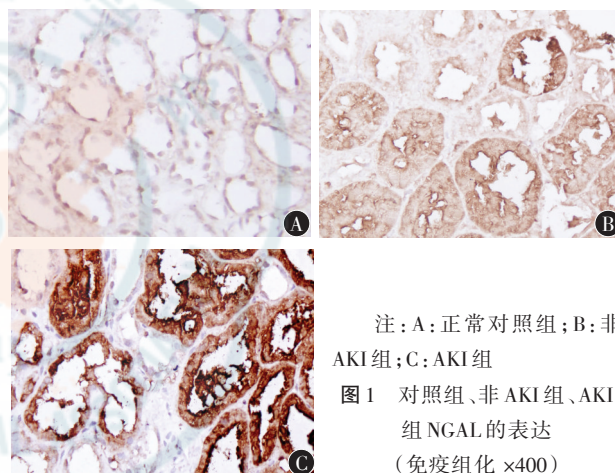
2. AKI 组、非 AKI 组及对照组血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达的比较:AKI 组及非 AKI 组血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达均高于对照组($P < 0.05$);且 AKI 组高于非 AKI 组($P < 0.05$),见图 1,表 2。

3. 不同病理类型组血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达的比较:MPGN 组及 FSGS 组血、尿

表 1 肾病组与对照组一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	肾病组	
		非 AKI 组	AKI 组
例数(男/女)	20(10/10)	29(15/14)	11(6/5)
年龄(岁)	39.20 \pm 19.80	34.07 \pm 18.57	38.20 \pm 15.30
收缩压(mm Hg)	120.38 \pm 10.39	120.35 \pm 10.24	123.65 \pm 11.37
舒张压(mm Hg)	76.00 \pm 9.46	78.13 \pm 9.79	80.23 \pm 7.37
SCr(μ mol/L)	68.00 \pm 11.33	91.17 \pm 65.31 ^a	100.52 \pm 64.26 ^a
BUN(mmol/L)	4.11 \pm 1.30	7.67 \pm 7.13	7.70 \pm 7.12
血 ALB(g/L)	44.33 \pm 3.45	20.98 \pm 6.34 ^a	19.38 \pm 5.16 ^a
尿 α_1 -MG(mg/L)	9.95 \pm 2.82	71.78 \pm 51.74 ^a	74.39 \pm 53.44 ^a
UTP(g/d)	0.12 \pm 0.02	8.14 \pm 3.69 ^a	8.25 \pm 3.54 ^a
尿渗透浓度(mmol/L)	602.56 \pm 114.64	553.86 \pm 192.24	546.33 \pm 199.52

注:与肾病组比较,^a $P < 0.05$



注:A:正常对照组;B:非AKI组;C:AKI组
图1 对照组、非AKI组、AKI组 NGAL 的表达(免疫组化 $\times 400$)

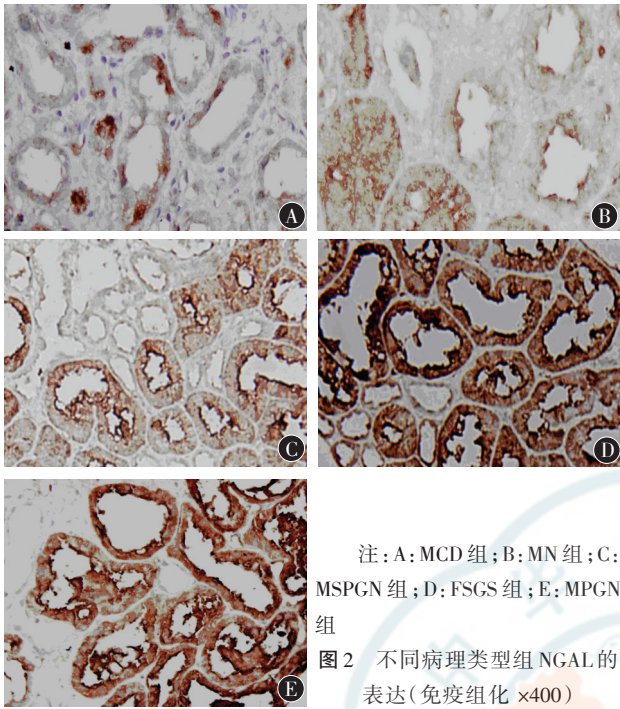
表 2 AKI 组、非 AKI 组和对照组血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血 NGAL(μ g/L)	尿 NGAL(μ g/L)	肾组织 NGAL A 值
对照组	20	0.56 \pm 0.07	0.99 \pm 0.07	0.0339 \pm 0.0030
非 AKI 组	29	1.23 \pm 0.50 ^a	1.46 \pm 0.23 ^a	0.0481 \pm 0.0089 ^a
AKI 组	11	1.76 \pm 0.53 ^{ab}	2.18 \pm 0.41 ^{ab}	0.0558 \pm 0.0078 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与非 AKI 组比较,^b $P < 0.05$

NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达高于其他各组($P < 0.05$),MPGN 组与 FSGS 组间及其余 3 组间比较差异均无统计学意义,见图 2,表 3。

4. 肾小管间质损害程度与血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达的关系:在肾小管间质发展至重度病变之前(1~3 分组),随着肾小管间质损伤程度的加重,血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达逐渐升高;在肾小管间质发展至重度病变时(4 分组),血 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达下降,见图 3,表 4。



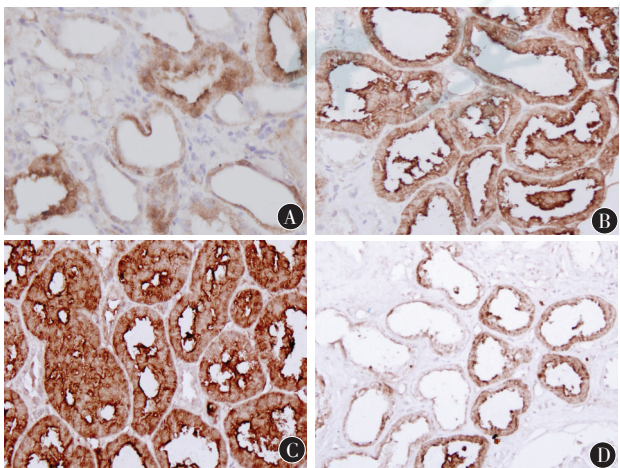
注: A: MCD 组; B: MN 组; C: MsPGN 组; D: FSGS 组; E: MPGN 组

图 2 不同病理类型组 NGAL 的表达(免疫组化 ×400)

表 3 各病理类型组 PNS 患者血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血 NGAL($\mu\text{g/L}$)	尿 NGAL($\mu\text{g/L}$)	肾组织 NGAL A 值
MCD 组	6	1.21±0.52	1.60±0.46	0.0473±0.0064
MN 组	8	1.34±0.51	1.43±0.35	0.0496±0.0145
MsPGN 组	13	1.37±0.47	1.68±0.31	0.0509±0.0077
FSGS 组	10	1.86±0.11 ^{abc}	2.17±0.22 ^{abc}	0.0582±0.0065 ^{abc}
MPGN 组	3	1.98±0.98 ^{abc}	2.24±0.40 ^{abc}	0.0579±0.0079 ^{abc}

注: 与 MCD 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 MN 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 MsPGN 组比较, ^c $P < 0.05$



注: A: 肾小管间质病变评分 1 分组; B: 2 分组; C: 3 分组; D: 4 分组

图 3 不同程度肾小管间质损害组 NGAL 的表达(免疫组化 ×400)

表 4 不同程度肾小管间质病理损害 PNS 患者血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血 NGAL($\mu\text{g/L}$)	尿 NGAL($\mu\text{g/L}$)	肾组织 NGAL A 值
1 分组	8	0.71±0.13	1.44±0.32	0.0465±0.0054
2 分组	13	1.29±0.14 ^a	1.90±0.33 ^a	0.0565±0.0060 ^a
3 分组	10	1.82±0.12 ^{ab}	2.29±0.42 ^{ab}	0.0576±0.0127 ^a
4 分组	9	1.13±0.12 ^{ac}	2.12±0.38 ^a	0.0443±0.0038 ^{bc}

注: 与 1 分组比较, ^a $P < 0.05$; 与 2 分组比较, ^b $P < 0.05$; 与 3 分组比较, ^c $P < 0.05$

5. 血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达与临床指标的相关性: PNS 患者血、尿 NGAL 水平与 Scr、BUN、UTP 呈正相关, 与血 ALB、尿渗透浓度呈负相关, 与尿 α_1 -MG 无相关性; 肾组织 NGAL 表达与 Scr、BUN 呈正相关, 与血 ALB、尿渗透浓度呈负相关, 与 UTP、尿 α_1 -MG 无相关性, 见表 5。

表 5 PNS 患者血、尿 NGAL 水平、肾组织 NGAL 表达与临床指标的相关性分析结果

项目	血 NGAL		尿 NGAL		肾组织 NGAL A 值	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
Scr	0.198	0.048	0.352	0.000	0.146	0.028
BUN	0.199	0.043	0.278	0.000	0.325	0.019
血 ALB	-0.384	0.028	-0.318	0.024	-0.259	0.020
UTP	0.226	0.033	0.421	0.000	0.032	0.754
尿 α_1 -MG	0.083	0.414	0.254	0.054	-0.027	0.056
尿渗透浓度	-0.250	0.012	-0.256	0.027	-0.277	0.002

讨 论

近年来许多新型生物标志物被提出作为诊断 AKI 的早期、敏感指标, 如胱抑素 C (Cys-C)、NGAL、白细胞介素 18 (IL-18)、肾损伤因子 1 (KIM-1) 等^[3]。NGAL 是由肾小管细胞、肝细胞和免疫细胞分泌的蛋白质。研究表明, NGAL 较 Scr 和 BUN 在 AKI 的诊断价值方面具有更高的敏感性, 可作为 AKI 的新的生物学标志物^[1]。Sean 等^[4]发现, 血、尿 NGAL 水平在 AKI 患者均出现升高, 指出 NGAL 与疾病的诊断、临床相关性和病理生理机制有关。

本研究结果显示, 血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达在 PNS 患者 AKI 组高于非 AKI 组及对照组。同时调查还发现, 在 AKI 组, 11 例 (100%) 患者血清及尿液 NGAL 水平升高, 但仅 6 例 (54.5%) 患者出现 Scr 升高, 表明在 Scr 尚未发生

异常时,血、尿 NGAL 水平已有升高,即血、尿 NGAL 的升高可早于 Scr 的改变,血、尿 NGAL 比 Scr 更敏感、可靠地预测 AKI 的发生。

本研究还发现,血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达在肾小管病理损害重的 MPGN 组及 FSGS 组患者远高于病理损害轻的 MCD 组、MN 组、MsPGN 组患者,与乔晞等^[5]研究结果基本一致,其中 MsPGN 组患者肾小管间质损害较轻的原因可能与我们选择的大部分病例处于病变早期,肾小管损伤受累较少有关。张建国等^[6]研究结果证实,在正常肾组织中,近端肾小管上皮细胞弱表达 NGAL,急慢性药物相关性间质性肾炎的肾小管上皮细胞表达 NGAL 较正常肾组织增高、增强,且随着小管间质损害的加重,其表达量下降。李璐等^[7]研究亦发现,在慢性肾间质性肾炎中,肾组织表达 NGAL 亦随着肾小管间质损害的加重而下降。本研究发现,在肾小管间质发展至重度病变之前(1~3 分组),随着肾小管间质损伤程度的加重,血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达逐渐升高;在肾小管间质发展至重度病变时(4 分组),血 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达下降,即随着肾间质纤维化的进展,肾小管萎缩程度的加重,炎性细胞浸润的逐渐增加,NGAL 表达呈现一个先升高后下降的动态过程,提示 NGAL 与 PNS 患者病情的进展有关。有研究报道在当肾缺血或毒素致急性肾小管损伤时,受损的肾小管上皮细胞能高表达 NGAL,从而诱导肾小管间质中浸润的中性粒细胞发生凋亡,以保护肾组织免受攻击;另一方面高水平的 NGAL 能促进肾小管上皮细胞再生修复,使肾脏功能得以恢复^[8]。在本研究中,NGAL 在 PNS 患者发生 ATN 时出现高表达,在肾小管间质发展至重度病变之前,随着肾小管损伤程度的加重,NGAL 亦出现高表达,推测 NGAL 可能作为一种保护因子,与 PNS 患者肾脏保护作用机制有关,可能会延缓肾小管间质病变的进展,但 NGAL 在 PNS 肾小管间质中的作用及其机制以及能否作为判断病情严重程度的新指标,还需进一步大样本量及临床试验研究加以证实。

本研究相关分析结果显示,血、尿 NGAL 水平及肾组织 NGAL 表达与尿渗透浓度、血 ALB 呈负

相关,与 Scr、BUN 呈正相关,表明 NGAL 不仅可作为反映肾小管功能的指标,还与肾小球功能密切相关。分别对尿 NGAL 与血 NGAL 及肾组织 NGAL 进行相关分析,结果显示尿 NGAL 与血 NGAL 呈正相关($r = 0.246, P = 0.048$),与肾组织 NGAL 亦呈正相关($r = 0.300, P = 0.002$),提示尿 NGAL 有望成为一种方便、有效的肾功能检测指标。

综上所述,NGAL 可作为反映 PNS 患者 AKI 的敏感指标,在一定程度下可用于评价肾小管间质病变程度及肾功能。

志谢 感谢徐州医学院病理实验室及附属医院病理科、肾内科实验室在本研究中给予的帮助

参 考 文 献

- [1] Prabhu A, Sujatha DL, Ninan B, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Ann Vasc Surg*, 2010, 24: 525-531.
- [2] Ikezumi Y, Suzuki T, Hayafuji S, et al. The sialoadhesion (CD169) expressing a macrophage subset in human proliferative glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20: 2704-2713.
- [3] 王坤元. 急性肾损伤早期标志物诊断价值评价. *国际泌尿系统杂志*, 2012, 32: 119-124.
- [4] Sean MB, Michael B, Michael H, et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Intensive Care Med*, 2010, 36: 452-461.
- [5] 乔晞, 李荣山, 吴丽然, 等. 原发性肾病综合征肾小管功能异常与肾小管间质病理损害的相关性分析. *临床医药实践*, 2009, 18: 188-191.
- [6] 张建国, 丁涵露, 任姜汶, 等. NGAL 在急性药物相关性间质性肾炎中的表达及其意义. *第三军医大学学报*, 2005, 27: 2083-2085.
- [7] 李璐, 邓迟君. NGAL 在慢性间质性肾炎中的表达及其作用. *健康天地*, 2010, 4: 138-139.
- [8] 童俊容, 何凤, 张虹, 等. 糖尿病肾病患者尿液中性粒细胞膜胶酶相关载脂蛋白及肾损伤分子分子-1 水平变化及意义. *中国全科医学*, 2012, 15: 2785-2787.

(收稿日期: 2013-03-11)

(本文编辑: 杨克魁)