

论著·临床研究

检测原发性肾病综合征患儿尿足细胞标志蛋白的临床意义

刘涛¹ 张碧丽² 李莉²

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津市儿童医院肾内科, 天津 300074)

[摘要] **目的** 探讨检测尿液中足细胞标志蛋白 podocalyxin (PCX) 在儿童原发性肾病综合征 (PNS) 的临床诊断及病情评估中的作用。**方法** 采用透射比浊法对 175 例儿童晨尿 PCX 的表达水平进行检测, 其中包括未经治疗的 PNS 患儿 (活动期组) 53 例 (单纯型肾病 36 例、肾炎型肾病 17 例)、PNS 完全缓解期患儿 (缓解组) 56 例 (复发者 42 例, 非复发者 14 例)、健康儿童 66 例 (对照组)。测定 53 例 PNS 活动期患儿同期 24 h 尿蛋白的水平; 绘制 ROC 曲线, 确定尿 PCX 诊断 PNS 活动期及鉴别肾炎型肾病的最佳临界点。**结果** 活动期组与缓解组及对照组比较, 尿 PCX 水平明显升高 ($P < 0.01$)。活动期组尿 PCX 水平与 24 h 尿蛋白水平呈正相关 ($r = 0.39, P < 0.01$)。活动期组患儿中, 肾炎型肾病患儿较单纯型肾病患儿尿 PCX 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。缓解组中, 复发者尿 PCX 水平较非复发者高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。尿 PCX 诊断 PNS 活动期及肾炎型肾病的 ROC 曲线下面积分别为 0.915、0.784; 诊断临界点分别为 7.97 ng/mL、10.28 ng/mL, 灵敏度分别为 81.1%、94.1%, 特异度分别为 93.4%、52.8%。**结论** 利用 PCX 定量检测可动态观察尿足细胞的变化, 对判断肾小球的损伤程度及疾病的活动情况、临床鉴别单纯型肾病与肾炎型肾病有一定的意义。 [中国当代儿科杂志, 2012, 14(5): 332-335]

[关键词] 足细胞标志蛋白; 原发性肾病综合征; 儿童

[中图分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)05-0332-04

Clinical significance of determining urinary podocalyxin level in children with primary nephrotic syndrome

LIU Tao, ZHANG Bi-Li, LI Li. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China (Zhang B-L, Email: zhangbili218@163.com)

Abstract: Objective To study the clinical significance of urinary podocyte marker protein podocalyxin (PCX) in the diagnosis of primary nephrotic syndrome (PNS) in children and the evaluation of disease severity. **Methods** PCX levels in the first morning urine were measured by turbidimetric immunoassay (TIA) in 175 children, including 53 children with acute PNS [36 cases of simple nephrotic syndrome (NS) and 17 cases of nephritic NS], 56 children with PNS in the remission stage (relapsed: 42 cases) and 66 healthy children (control group). Twenty-four hour urinary protein was measured in the 53 children with acute PNS. The optimal operating points for the diagnosis of acute PNS and nephritic NS were determined using the receiver-operating characteristic curve (ROC curve). **Results** Significant increased levels of urinary PCX were found in children with acute PNS compared with those in the remission stage and the control group ($P < 0.01$). A positive correlation was found between urinary PCX and 24 hour urinary protein in children with acute PNS ($r = 0.39, P < 0.01$). In children with acute PNS, urinary PCX levels were significantly higher in the nephritic NS group than in the simple NS group ($P < 0.05$). In children in the remission stage, a significant increase in levels of urinary PCX was found in children who had relapsed compared with those who had not ($P < 0.05$). The area under the ROC curve for the diagnosis of acute PNS and nephritic NS was 0.915 and 0.784 respectively. The optimal operating point for the diagnosis of acute PNS and nephritic NS was 7.97 and 10.28 ng/mL respectively, with a sensitivity and specificity of 81.1% and 93.4% respectively for acute PNS and of 94.1% and 52.8% respectively for nephritic NS. **Conclusions** The quantitative detection of urinary PCX is useful in the evaluation of podocyte dynamic changes. It is helpful in the diagnosis of acute PNS and in the differentiation of nephritic NS and simple NS. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(5): 332-335]

Key words: Podocalyxin; Primary nephrotic syndrome; Child

[收稿日期] 2011-11-08; [修回日期] 2012-01-06

[作者简介] 刘涛, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 张碧丽, 主任医师。

肾小球滤过屏障结构由内向外依次为毛细血管内皮细胞、基底膜 (glomerular basement memberane, GBM) 以及位于外侧的足细胞与足突之间的裂孔隔膜。足细胞结构和功能的改变是导致肾小球滤过膜通透性增高和蛋白尿产生的重要原因。在疾病状态下, 由于细胞凋亡、与 GBM 自动分离以及增殖能力下降等原因, 足细胞及其碎片会从肾小球 GBM 脱落进入尿液, 形成足细胞尿^[1]。作为足细胞主要标志蛋白的 podocalyxin (PCX) 位于足细胞顶膜区, 是带负电荷的 CD34 相关性唾液粘蛋白分子, 分子量为 165 ~ 170 kD, 其与足细胞骨架肌动蛋白等结构相连, 是肾小球滤过膜负电荷屏障的主要组成成分。Hara 等^[2]研究发现, 几乎所有的肾小球疾病患者尿液中均能检测到 PCX。朱颖等^[3]研究报道尿 PCX 水平可以反映肾小球损伤的严重程度。本研究采用透射比浊法定量检测尿液中 PCX 的水平, 观察足细胞及其碎片的排泄情况, 通过绘制 ROC 曲线, 评估尿液 PCX 是否可以作为诊断原发性肾病综合征 (PNS) 病情活动及鉴别肾炎型肾病的一项临床指标, 探讨其对儿童 PNS 临床治疗的指导意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

(1) PNS 活动期组: 2009 年 5 月至 2010 年 5 月天津市儿童医院肾脏科未经治疗的 PNS 患儿 53 例 (单纯型肾病患儿 36 例, 肾炎型肾病患儿 17 例), 尿蛋白 $\geq (3+)$, 24 h 尿蛋白定量 $\geq 50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 血清白蛋白 (ALB) $< 25 \text{ g/L}$ 。其中男 41 例, 女 12 例; 年龄 4.7 (2.0 ~ 9.0) 岁。(2) PNS 缓解组: PNS 完全缓解期患儿 56 例 (复发者 14 例, 非复发者 42 例), 血生化及尿检完全正常。其中男 42 例, 女 14 例; 年龄 4.5 (2.0 ~ 7.0) 岁。(3) 对照组 66 例, 取自同期天津市儿童医院体检中心体检健康儿童, 尿常规检查均正常。其中男 48 例, 女 18 例; 年龄 5.0 (3.0 ~ 7.0) 岁。

PNS、PNS 缓解期、单纯型肾病、肾炎型肾病及复发的诊断均符合 2009 年中华医学会儿科学分会肾脏病学组制定的《儿童常见肾脏疾病诊治循证指南 (一)》^[4], 并排除继发于全身性疾病的肾病综合征, 即乙型肝炎病毒相关性肾炎、狼疮性肾炎及紫癜性肾炎等。本研究经医院伦理委员会批准, 受试者家属均知情同意。

1.2 尿液 PCX 的检测

收集各组清洁中段晨尿 1.5 mL, 将其加入离心

管内, 4000 r/min 离心 10 min, 去上清, 在沉渣中加入生理盐水 1.5 mL, 充分混匀, 再次 4000 r/min 离心 10 min, 去上清, 在沉渣中加入生理盐水 150 μL 溶解, -20°C 保存, 使用奥地利 TECAN-Sunrise 酶标仪以透射比浊定量法 (试剂盒由广东虹叶抗体科技有限公司提供) 检测尿液中肾小球足细胞特异性标记蛋白 PCX 的浓度。

1.3 24 h 尿蛋白的检测

收集 PNS 活动期组患儿 24 h 尿液, 将尿液混匀, 并记录尿量, 采用 TBA-30FR 全自动生化分析仪测定 24 h 尿蛋白含量。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析, 对于尿 PCX 等非正态分布资料, 计量资料以中位数 (M, 四分位间距) 表示, 两个独立样本间的比较采用 Mann-Whitney *U* 检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验, 组间两两比较采用 Nemenyi 秩和检验; 计数资料采用 χ^2 检验。相关分析采用 Spearman 秩相关系数法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用非参数法, 以 (1 - 特异度) 为横坐标, 灵敏度为纵坐标绘制 ROC 曲线, 曲线下面积 $A_z < 0.7$ 时, 诊断价值较低; A_z 在 0.7 ~ 0.9 之间时, 诊断价值为中等; $A_z > 0.9$ 时, 诊断价值较高。对 ROC 曲线下面积进行假设检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。选择 ROC 曲线上最靠左上方的点, 根据统计结果中各可能的灵敏度和特异度, 计算 Youden 指数, 并以 Youden 指数最大的切点作为诊断的临界点。

2 结果

2.1 3 组尿 PCX 水平测定结果的比较

活动期组儿童尿 PCX 水平为 14.14 (8.67 ~ 18.98) ng/mL, 缓解组为 1.36 (0 ~ 6.86) ng/mL, 对照组为 0.67 (0 ~ 3.05) ng/mL。与缓解组比较, 活动期组尿 PCX 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 47.67, P < 0.001$); 与对照组比较, 活动期组尿 PCX 水平亦明显升高, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 71.54, P < 0.001$); 缓解组与对照组比较, 尿 PCX 水平差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.7, P = 0.43$)。

2.2 活动期组中单纯型肾病与肾炎型肾病患儿尿 PCX 测定结果的比较

在活动期组患儿中, 肾炎型肾病患儿尿 PCX 水平为 21.00 (14.27 ~ 43.08) ng/mL, 单纯型肾病患儿尿 PCX 水平为 10.03 (7.34 ~ 16.82) ng/mL。二者比较, 肾炎型肾病患儿尿 PCX 水平较单纯型肾病患

儿增高,差异具有统计学意义($U = 132, P < 0.01$)。

2.3 活动期组尿 PCX 与同期尿蛋白水平的相关关系

活动期组尿 PCX 水平与同期尿蛋白水平呈正相关($r = 0.39, P = 0.004$),见图 1。

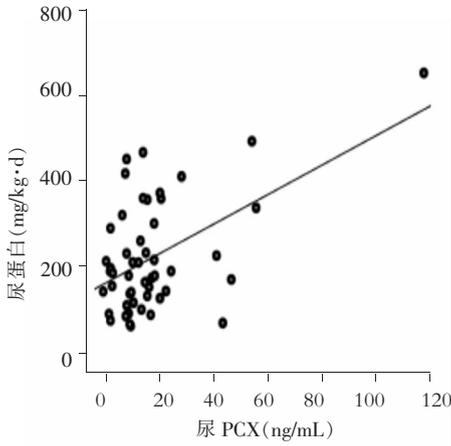


图1 活动期组尿 PCX 与同期尿蛋白水平的相关关系

2.4 缓解组中复发患儿与非复发患儿尿 PCX 水平的比较

缓解组中包括复发者 14 例,尿 PCX 水平为 $6.21(0.59 \sim 11.80)$ ng/mL;非复发者 42 例,尿 PCX 水平为 $0.55(0 \sim 3.89)$ ng/mL。二者比较,复发者在缓解期尿 PCX 水平升高,差异具有统计学意义($U = 177, P = 0.02$)。

2.5 尿 PCX 诊断 PNS 活动期的 ROC 曲线及临界值的确定

以 3 组作为分析人群,将所有可能的切点作为阈值进行灵敏度和特异度计算后,以(1 - 特异度)为横坐标,灵敏度为纵坐标作出 ROC 曲线(图 2)。ROC 曲线下面积 $A_z = 0.915 (P < 0.001)$ 。选择 ROC 曲线上最靠左上方的点(图 2 中 A 点所示),确定尿 PCX 水平 ≥ 7.97 ng/mL 时,Youden 指数最大为 0.745,对应的灵敏度为 81.1%,特异度为 93.4%。

2.6 尿 PCX 鉴别单纯型肾病与肾炎型肾病的 ROC 曲线及临界值的确定

以单纯型肾病和肾炎型肾病患儿作为分析人群,按 2.5 中的方法绘制 ROC 曲线(图 3)。ROC 曲线下面积 $A_z = 0.784 (P = 0.01)$ 。选择 ROC 曲线上最靠左上方的点(图 3 中 B 点所示),确定尿 PCX 水平 ≥ 10.28 ng/mL 时,Youden 指数最大为 0.469,对应的灵敏度为 94.1%,特异度为 52.8%。

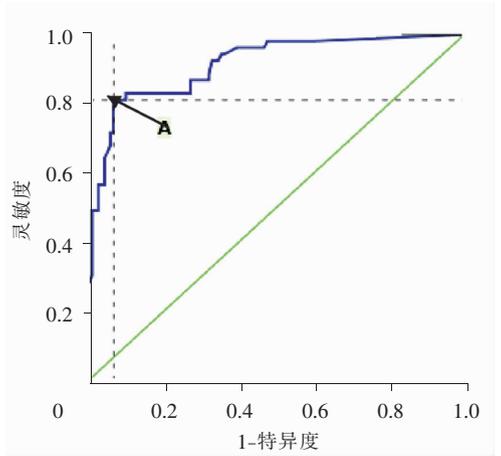


图2 尿液 PCX 水平诊断 PNS 活动期的 ROC 曲线

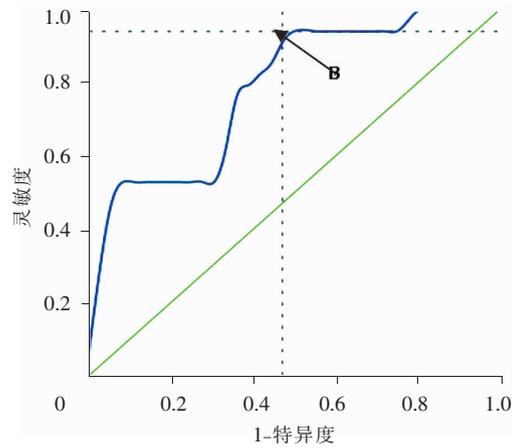


图3 尿液 PCX 水平鉴别肾炎型肾病的 ROC 曲线

3 讨论

足细胞起源于间叶组织,是肾小囊的脏层上皮细胞,它不仅可以作为静态分子筛阻止蛋白质分子从 GBM 滤过,还可以以负电荷屏障的方式阻止带负电荷的蛋白质分子通过 GBM。足细胞损伤已被认为是参与 PNS 尿蛋白产生及病情进展的关键细胞^[5]。足细胞可以表达多种特异性蛋白分子,包括 PCX、Nephrin 及 CD2AP 等,其中带负电的 PCX 位于足细胞的顶膜区,与其他蛋白分子一起维持正常足细胞的形态和功能。肾小球发生病变时,PCX 可以从受损的足细胞顶膜区脱落或随受损的足细胞及足细胞碎片一起脱落到尿液中并可以被检测到^[2]。PCX 常作为寻找尿液足细胞的标志物,用于检测肾小球足细胞的损伤及疾病的活动情况。

本研究检测结果显示,活动期组与缓解组及对照组比较,尿 PCX 水平明显升高,相关性分析显示

活动期组患儿尿 PCX 水平与尿蛋白水平呈正相关。在 PNS 活动期,足细胞所在的微环境会发生变化,如炎症细胞和促炎性细胞因子等的增加,可能启动足细胞的细胞凋亡程序,使得足细胞从 GBM 脱落,从而使肾小球滤过膜失去了足细胞的分子及电荷屏障,导致蛋白尿的产生增加,表明 PNS 活动期患儿尿 PCX 排泄水平与 PNS 的严重程度呈正相关,其水平的高低可以作为反映 PNS 患儿病情活动与否的指标之一。本研究采用 ROC 曲线分析得出,尿 PCX 对 PNS 活动期的诊断价值较高,诊断截点为 7.97 ng/mL,当尿 PCX \geq 7.97 ng/mL 时,应注意 PNS 病情活动的可能。Vogelmann 等^[6]发现,局灶节段性肾小球硬化(FSGS)的活动期组与缓解期及健康对照组相比,尿液中 PCX 阳性细胞的数量均有显著性差异,认为尿液中足细胞的排泄数目与疾病的活动密切相关,本研究检测结果与此相类似。另外,本研究分析结果显示,缓解组中复发患儿的尿 PCX 水平较非复发患儿高。Yu 等^[7]研究发现,尿足细胞较尿蛋白在反映肾小球损伤程度上更为敏感。PNS 缓解期的诊断虽有明确的标准,即血生化及尿液检查完全正常^[4],但是当 PNS 临床诊断为缓解期时,尿 PCX 水平可能并没有恢复到诊断截点以下(即尿 PCX < 7.97 ng/mL),在此情况下应注意患儿是否存在 PNS 复发的诱发因素(如潜在的感染灶、血液高凝状态等),激素减量或停药时要慎重,争取降低儿童 PNS 复发的风险。基于上述两点,动态监测尿 PCX 水平,对儿童 PNS 的病情活动情况有一定诊断价值,并可以指导 PNS 的临床治疗。

此外,本研究发现尿 PCX 水平也可作为鉴别单纯型肾病和肾炎型肾病的一项临床指标。单纯型肾病的病理类型以微小病变(MCD)为主,主要表现为肾小球足细胞的损伤;而肾炎型肾病的病理类型多样,包括系膜增生性肾小球肾炎、膜增生性肾小球肾炎、FSGS 等,可以伴有足细胞损伤,也可以不以足细胞的损伤为主。但本研究结果显示肾炎型肾病患儿尿 PCX 水平高于单纯型肾病患儿尿 PCX 水平,并且通过 ROC 曲线得出,当尿 PCX \geq 10.28 ng/mL 时应警惕肾炎型肾病的可能。本结果的得出可能与以下几方面有关:①肾炎型肾病与单纯型肾病的临床主要鉴别点之一是 2 周内 3 次以上离心尿检查红细胞 \geq 10 个/高倍视野,并证实为肾小球源性血尿。前期研究表明,尿 PCX 水平可以作为区分肾小球源性血尿和非肾小球源性血尿的指标之一^[8]。结合本研究检测结果,推测尿 PCX 的排泄水平增加可能是肾炎型肾病患儿血尿产生的原因之一。②虽然

单纯型肾病(MCD 为主)以足细胞的损伤为主,但其病理类型及足细胞的损伤程度可以没有肾炎型肾病(非 MCD 为主)严重。有研究发现,FSGS 患者尿液中足细胞的数目明显高于 MCD 患者,膜性肾病患者尿中足细胞的数目与 MCD 患者没有差别^[9]。③一项关于肾小球再生机制的研究结果显示,只要足细胞丢失不超过一定的数量,仍然可以重建或修复,而达到 20% ~ 40% 的足细胞丢失就会导致瘢痕反应,超过 60% 的足细胞丢失则会导致球形硬化^[10]。单纯型肾病病理损伤比较轻微,因此足细胞的丢失相对较少,而肾炎型肾病的病理损伤较单纯型肾病严重,足细胞的丢失可能相对较多。因此,本研究推测尿 PCX 水平可以作为临床区分肾炎型肾病和单纯型肾病的检测指标之一,但本结果尚待大样本临床资料证实。

综上所述,足细胞损伤在儿童 PNS 的发生发展中起重要作用,尿 PCX 可作为判断儿童 PNS 病情活动与否及区分肾炎型肾病和单纯型肾病的临床指标之一。通过动态监测尿 PCX 水平的变化,对儿童 PNS 的临床治疗具有一定的指导意义。

[参 考 文 献]

- [1] Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(12): 3005-3015.
- [2] Hara M, Yanagihara T, Kihara I, Higashi K, Fujimoto K, Kajita T. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(2): 408-416.
- [3] 朱颖, 鹿玲. 尿足细胞标志蛋白检测对肾脏疾病的诊断价值 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24(5): 361-363.
- [4] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 儿童常见肾脏病诊治循证指南(一): 激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治循证指南(试行) [J]. *中华儿科杂志*, 2009, 47(3): 167-170.
- [5] Kavoura E, Gakiopoulou H, Paraskevaku H, Marinaki S, Agrogiannis G, Stofas A, et al. Immunohistochemical evaluation of podocalyxin expression in glomerulopathies associated with nephrotic syndrome [J]. *Hum Pathol*, 2011, 42(2): 227-235.
- [6] Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 285(1): F40-F48.
- [7] Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(6): 1733-1741.
- [8] 李莉, 张碧丽. 尿 Podocalyxin 鉴别儿童血尿来源的价值 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2011, 26(5): 357-359.
- [9] Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis [J]. *Nephron*, 2001, 89(3): 342-347.
- [10] Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases [J]. *Kidney Int*, 2007, 71(12): 1205-1214.

(本文编辑: 邓芳明)