

中性粒细胞明胶酶相关脂质转运蛋白在儿童原发性肾病综合征尿液中的表达及意义

夏华 何庆南 李晓燕 帅兰军 陈海霞 易著文

(中南大学湘雅二医院儿童医学中心,湖南 长沙 410011)

[摘要] **目的** 研究中性粒细胞明胶酶相关脂质转运蛋白(NGAL)在原发性肾病综合征患儿尿中的水平及其意义。**方法** 原发性肾病综合征初治患儿34例,经口服泼尼松足量治疗4周尿蛋白未转阴患者归入糖皮质激素耐药型肾病综合征(SRNS)组,尿蛋白转阴患者归入糖皮质激素敏感型肾病综合征(SSNS)组。所有病例在口服泼尼松治疗前、治疗1周、2周、3周、4周时分别收集晨起中段尿,采取ELISA法检测尿液NGAL浓度,同时测得尿中肌酐(Cr)值,采用尿Cr排出量来校正单次尿NGAL水平,比较两组间尿NGAL与Cr比值的表达差异。**结果** 与SRNS组比较,SSNS组病例尿标本中NGAL/Cr比值在泼尼松治疗3、4周时明显下降($P < 0.05$);与SRNS组比较,SSNS组病例尿标本中 β_2 -MG/Cr比值在泼尼松治疗4周时才开始明显下降。SSNS与SRNS两组病例尿NGAL/Cr与尿蛋白/Cr比值呈正相关($r = 0.510, P < 0.01$)。ROC曲线下分析结果显示,用药3周后尿NGAL/Cr诊断截点为0.043时,敏感度和特异度分别为100%和79.2%。**结论** SRNS患儿尿液中NGAL/Cr比值持续维持于高水平,而SSNS患儿尿液中NGAL/Cr比值在泼尼松治疗后逐渐下降,且其下降时间早于 β_2 -MG/Cr比值,提示动态监测尿液中NGAL/Cr比值,有助于早期判断原发性肾病综合征的泼尼松治疗效应。 [中国当代儿科杂志,2013,15(7):541-545]

[关键词] 中性粒细胞明胶酶相关脂质转运蛋白;原发性肾病综合征;激素敏感型肾病综合征;激素耐药型肾病综合征;儿童

Expression of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and its clinical significance in children with idiopathic nephrotic syndrome

XIA Hua, HE Qing-Nan, LI Xiao-Yan, SHUAI Lan-Jun, CHEN Hai-Xia, YI Zhu-Wen. Children's Medical Center, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China (He Q-N, Email: heqn@163.com)

Abstract: Objective To investigate the urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) concentration in children with idiopathic nephrotic syndrome (INS) and its clinical significance. **Methods** Thirty-four children newly diagnosed with INS received oral prednisone for 4 weeks. Patients whose urinary protein did not become negative were classified as steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) group, while those whose urinary protein did become negative were classified as steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) group. Morning midstream urine specimens were collected from all patients before use of prednisone and after 1, 2, 3, and 4 weeks of treatment with prednisone. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the urinary NGAL concentration. Meanwhile, urinary creatinine (Cr) concentration was measured, and urinary NGAL concentration in a single urine collection was adjusted according to the urinary Cr excretion. The two groups were compared in terms of urinary NGAL/Cr ratio. **Results** Compared with the SRNS group, the SSNS group had significantly decreased urinary NGAL/Cr ratios after 3 and 4 weeks of prednisone treatment ($P < 0.05$). Compared with the SRNS group, the SSNS group had a significantly decreased urinary β_2 -MG/Cr ratio after 4 weeks of prednisone treatment ($P < 0.05$). In both groups, urinary NGAL/Cr ratio was positively correlated with urinary protein/Cr ratio ($r = 0.510, P < 0.01$). The results of ROC curve analysis showed when diagnostic cut-off point of urinary NGAL/Cr was 0.043 by 3 weeks after treatment, sensitivity and specificity achieved 100% and 79.2% respectively. **Conclusions** Urinary NGAL/Cr ratio remains high in children with SRNS, while this ratio decreases gradually during prednisone treatment in children with SSNS, and it falls ahead of urinary β_2 -MG/Cr ratio. These results suggest that dynamic monitoring of urinary NGAL/Cr ratio is useful for early judgment of response to prednisone in patients with INS. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(7):541-545]

Key words: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; Idiopathic nephrotic syndrome; Steroid-sensitive nephrotic syndrome; Steroid-resistant nephrotic syndrome; Child

[收稿日期]2012-11-01; [修回日期]2012-12-11

[作者简介]夏华,女,硕士研究生。现工作单位:首都儿科研究所附属儿童医院,邮编100020。

[通信作者]何庆南,教授。

原发性肾病综合征 (idiopathic nephrotic syndrome, INS) 是儿童时期最常见的肾小球疾病, 儿童患病率为 10 万分之 16^[1], 80% ~ 90% 的原发性肾病综合征患儿初始激素治疗可获完全缓解, 但仍有部分患儿复发, 其中有 45% ~ 50% 的病人为频复发或激素依赖^[2]。成人肾活检往往是判断预后的重要指标, 而对于肾脏病患儿, 其对激素治疗的反应较肾活检结果更为重要^[3]。因此临床医生如何使用简便无创的检查尽早识别患儿对泼尼松的治疗反应, 有针对性的、个体化的合理治疗, 是临床研究的重点。有回顾性研究发现中性粒细胞明胶酶相关脂质转运蛋白 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) 可能与肾病综合征的转归及预后相关, 激素耐药型肾病综合征 (steroid-resistant nephrotic syndrome, SRNS) 较激素敏感型肾病综合征 (steroid-sensitive nephrotic syndrome, SSNS) 尿中 NGAL 明显升高^[4]。本研究选择初发、初治的 INS 患儿, 前瞻性观察尿液中 NGAL 及 β_2 微球蛋白 (β_2 microglobulin, β_2 -MG) 与尿肌酐 (creatinine, Cr) 的变化, 评价 NGAL/Cr 在具有激素不同治疗反应的 INS 患儿中的水平及其在临床治疗中的意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2011 年 10 月至 2012 年 3 月在中南大学湘雅二医院儿科住院确诊的 INS 初治患儿 34 例, 临床诊断符合 2009 年中华医学会儿科学分会肾脏病学组制订的《儿童常见肾脏疾病诊治循证指南》标准^[5]。其中男 28 例, 女 6 例, 年龄 2 ~ 11 岁, 平均年龄 5.8 ± 3.2 岁。所有 INS 病例初始阶段均给予足量泼尼松口服治疗, 即泼尼松每日 60 mg/m^2 或 2 mg/kg , 最大剂量不超过 80 mg , 晨起顿服, 维持 6 周。4 周后根据患者对口服泼尼松治疗的反应进行分组, 尿蛋白仍阳性者为 SRNS 组, 尿蛋白转阴者为 SSNS 组。34 例患儿中 10 例为 SRNS 病例 (其中 2 例为肾炎型肾病综合征), 24 例为 SSNS 病例 (均为单纯型肾病综合征), 两组间年龄及性别比较差异无统计学意

义 ($P > 0.05$)。正常对照组 20 例, 均为中南大学湘雅二医院门诊 2011 年 11 月至 2012 年 3 月期间健康体检者。其中男 10 例, 女 10 例, 年龄 2 ~ 14 岁, 平均年龄 7.3 ± 2.5 岁。研究对象均排除继发性、先天性肾病综合征和遗传性肾病综合征, 排除移植后肾脏损害和已使用泼尼松和其他免疫抑制剂治疗者。所有患者病情相对平稳, 排除合并症如高血压、糖尿病、感染、心、肺慢性疾病及肿瘤性疾病。留取尿标本前均取得家长及医院伦理委员会同意。

1.2 标本收集与检测

所有患者均留取泼尼松使用前、使用后 1 周、2 周、3 周、4 周时晨起中段尿液, 以 3000 rpm 离心 20 min 后取上清液, 放置在 -80°C 超低温冰箱中备用, 检测患者尿 NGAL、尿蛋白、尿 Cr、尿 β_2 -MG 含量。收集研究对象相关临床资料, 包括基本资料和临床检验数据。ELISA 法检测患者尿液中 NGAL 浓度; 尿液中 Cr、 β_2 -MG 测定利用湘雅二医院检验科全自动生化分析仪完成; 尿蛋白定量采用考马斯亮蓝法测定。人 NGAL 酶联免疫分析试剂盒 (编号 LOT:201202) 由美国 R&D 公司生产; 全自动生化分析仪为美国 BECKMAN 自动分析仪。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较先行方差齐性检验 (F 检验), 多组方差齐性样本均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA 检验); 组内比较采用两个独立样本 t 检验; 计数资料比较采用行 \times 列表卡方检验; 相关关系则采用 Pearsons 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 初治 INS 病例一般资料

34 例初治 INS 病例中 10 例为 SRNS 型, 24 例为 SSNS 型。两组患儿在尿蛋白量、血胆固醇、Cr、白蛋白、肾小球滤过率 (GFR) 及病程之间的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 初治原发性肾病综合征患者的临床资料 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	病程 (d)	血胆固醇 (mmol/L)	血肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	白蛋白 (g/L)	尿蛋白 ($\times 10^3$, g/L)	GFR (mL/min $\cdot 1.73 \text{ m}^2$)
SSNS 组	24	10 ± 8	10 ± 4	37 ± 10	16 ± 4	6.7 ± 0.8	154 ± 29
SRNS 组	10	11 ± 3	13 ± 5	37 ± 13	14 ± 5	6.1 ± 4.8	167 ± 38
t 值		1.839	1.762	2.172	1.496	1.453	1.807
P 值		> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

注: GFR 为肾小球滤过率。

2.2 SSNS 与 SRNS 病例尿 NGAL/Cr 比值比较

SSNS 与 SRNS 两组泼尼松用药前尿 NGAL/Cr 比值均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$), 而两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SSNS 组病例用药 1 周、2 周时, 尿 NGAL/Cr 比值与用药前比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 用药 3 周时, 尿 NGAL/Cr 比值较用药前显著下降 ($P < 0.05$), 但仍高于正常对照组 ($P < 0.05$)。用药 4 周时, 尿 NGAL/Cr 比值降至正常水平, 与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SRNS 组病例用药 1 周、2 周、3 周、4 周时, 尿 NGAL/Cr 比值均维持于较高水平, 与用药前比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2, 图 1。

2.3 SSNS 与 SRNS 病例尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值比较

SSNS 与 SRNS 两组泼尼松用药前尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$), 而两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SSNS 组病例用药

1 周、2 周、3 周时, 尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值较用药前差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 用药 4 周时, 尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值较治疗前明显下降 ($P < 0.05$), 与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SRNS 组病例用药 1 周、2 周、3 周、4 周时, 尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值与用药前比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3、图 2。

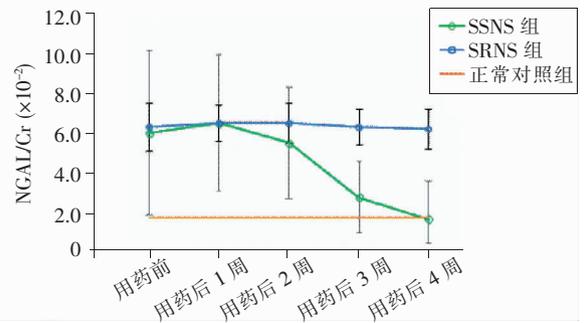


图 1 SSNS 和 SRNS 两组病例尿 NGAL/Cr 比值变化情况

表 2 SSNS 和 SRNS 病例激素治疗前后尿 NGAL/Cr 比值情况 ($\bar{x} \pm s; \times 10^{-2}$)

组别	例数	用药前	用药后 1 周	用药后 2 周	用药后 3 周	用药后 4 周
正常对照组	20	1.8 ± 1.3	1.8 ± 1.3	1.8 ± 1.3	1.8 ± 1.3	1.8 ± 1.3
SSNS 组	24	6.0 ± 4.1 ^b	6.5 ± 3.4 ^b	5.5 ± 2.8 ^b	2.8 ± 1.8 ^{a,b}	1.7 ± 1.9 ^a
SRNS 组	10	6.3 ± 1.2 ^b	6.5 ± 0.9 ^b	6.5 ± 1.0 ^b	6.3 ± 0.9 ^{b,c}	6.2 ± 1.0 ^{b,c}
F 值		18.435	12.468	6.107	45.714	47.331
P 值		0.011	<0.001	<0.001	0.049	0.638

a: 与用药前相比, $P < 0.05$; b: 与正常对照组相比, $P < 0.05$; c: 与 SSNS 组相比, $P < 0.05$

表 3 SSNS 和 SRNS 病例激素治疗前后尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值情况 ($\bar{x} \pm s; \times 10^{-2}$)

组别	例数	用药前	用药后 1 周	用药后 2 周	用药后 3 周	用药后 4 周
正常对照组	20	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2
SSNS 组	24	3.0 ± 1.8 ^b	2.9 ± 1.7 ^b	2.8 ± 1.32 ^b	2.6 ± 1.3 ^b	1.4 ± 0.2 ^a
SRNS 组	10	3.0 ± 0.6 ^b	2.9 ± 0.6 ^b	2.9 ± 0.7 ^b	2.9 ± 0.7 ^b	2.7 ± 0.7 ^{b,c}
F 值		20.790	21.606	32.948	30.319	85.967
P 值		0.012	<0.001	<0.001	<0.001	0.062

a 与用药前相比, $P < 0.05$; b 与正常对照组相比, $P < 0.05$; c 与 SSNS 组相比, $P < 0.05$

2.4 SSNS 组病例尿 NGAL/Cr 与尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值变化趋势比较

因两组变量存在单位及自身变异的影响, 因此采用 z-score 将变量标准化后比较。SSNS 组病例尿 NGAL/Cr 和尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值在治疗前比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 尿 NGAL/Cr 比值在使用泼尼松后 1 周前趋势较平稳, 2 周时明显下降, 较 $\beta 2$ -MG/Cr 比值下降早; 尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值的变化趋势与尿 NGAL/Cr 一样, 但其在使用泼尼松后 4 周才明显下降, 泼尼松治疗后尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值下降落后于尿 NGAL/Cr 比值。见图 3。

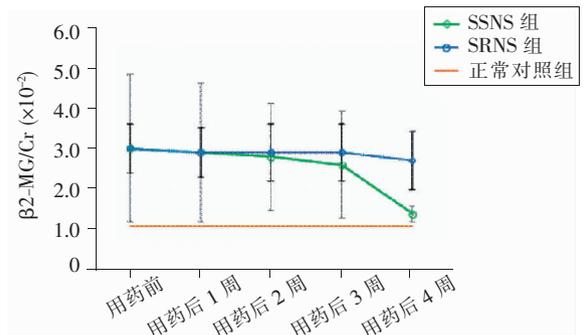


图 2 SSNS 和 SRNS 两组病例尿 $\beta 2$ -MG/Cr 比值变化情况

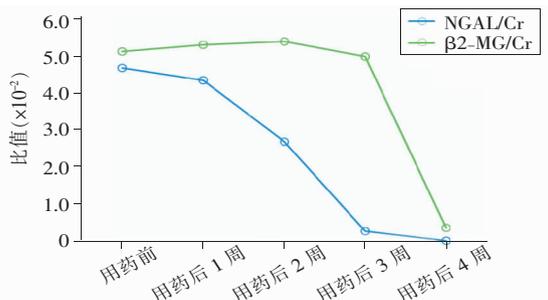


图3 SSNS组病例尿NGAL/Cr、beta2-MG/Cr比值变化趋势比较

2.5 SSNS和SRNS两组病例尿NGAL/Cr、尿蛋白/Cr比值的相关性分析

相关分析结果显示,SSNS与SRNS两组病例尿NGAL/Cr与尿蛋白/Cr呈正相关($r=0.510, P<0.01$)。

2.6 用药后3周尿NGAL/Cr与尿beta2-MG/Cr比值在肾病综合征诊断中的敏感性和特异性

ROC曲线分析显示,尿NGAL/Cr曲线下面积(AUC)为0.946(图4),当用药后3周尿NGAL/Cr检测截断点为0.043时,敏感度和特异度分别为100%和79.2%。尿beta2-MG/Cr AUC为0.669(图5),当用药后3周尿beta2-MG/Cr检测截断点为0.022时,敏感度和特异度分别为80%和54.2%。

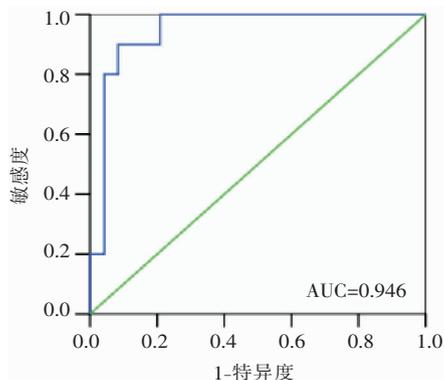


图4 NGAL/Cr在用药后3周肾病综合征诊断的ROC曲线

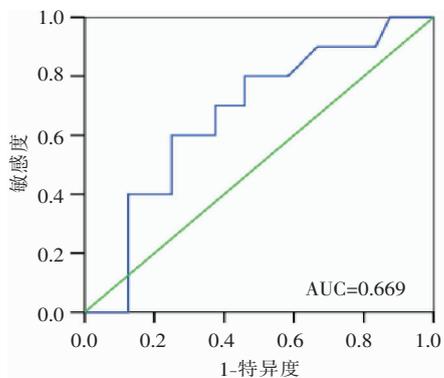


图5 beta2-MG/Cr在用药后3周肾病综合征诊断的ROC曲线

3 讨论

INS的泼尼松耐药是临床研究的热点,其机制复杂,涉及范围较广,目前仍无唯一的理论可解释患者对激素耐药的机制。曾有学者发现肾小管间质损害是表现为SRNS的原因之一^[6]。评价肾小管损伤的常用指标有视黄醇结合蛋白(retinol binding protein, RBP)、beta2-MG和N-乙酰-beta-D-葡萄糖胺酶(N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase, NAG)、肾损伤分子-1(kidney injury molecule, KIM-1)和白介素-18(interleukin-18, IL-18)等。

NGAL是近年来研究较多的小分子载脂蛋白,在急性肾损伤及慢性肾脏疾病研究中均提示NGAL与肾小管功能损伤有关^[7-9],但NGAL的水平与INS患者对泼尼松治疗的反应性有无相关,尚不明确。因单次尿NGAL排泄量受到肾功能、尿量和尿液浓缩情况等多种因素影响,本研究采用尿Cr排出量来校正单次尿NGAL水平,并比较了SSNS和SRNS两组间尿NGAL/Cr比值的差异。本研究发现SSNS和SRNS患者用药前尿NGAL/Cr比值增高程度相似,但泼尼松治疗后3、4周时,SSNS组尿NGAL/Cr逐渐下降至正常水平,而SRNS组尿NGAL/Cr仍维持在较高水平。结果提示动态观察INS病例尿NGAL/Cr比值变化,有助于判断INS患者对泼尼松用药的敏感情况。

beta2-MG是体内有核细胞包括淋巴细胞、血小板、多形核白细胞产生的一种小分子球蛋白,尿液中beta2-MG升高是提示(近端)肾小管受损的非常灵敏和特异性指标^[10]。Vallés等^[6]研究发现尿中beta2-MG在SRNS同时伴有大量蛋白尿患者较SSNS及激素依赖型肾病综合征缓解期患者明显升高。本研究发现SSNS和SRNS患者用药前尿beta2-MG/Cr比值增高程度相似,泼尼松治疗后4周,SSNS组尿beta2-MG/Cr比值逐渐下降至正常水平,而SRNS组比值仍维持在较高水平。通过比较INS患儿使用泼尼松治疗后尿NGAL/Cr比值和尿beta2-MG/Cr比值的变化趋势,结果发现:尿NGAL/Cr比值在使用泼尼松后1周前趋势较平稳,2周时明显下降,较beta2-MG/Cr比值下降早;尿beta2-MG/Cr比值的变化趋势与尿NGAL/Cr一样,但其在使用泼尼松后4周才明显下降,泼尼松治疗后尿beta2-MG/Cr比值下降落后于尿NGAL/Cr比值。通过ROC曲线分析,尿NGAL/Cr比值AUC较尿beta2-MG/Cr比值大,提示动态检测尿NGAL/Cr比值将更加有助于早期判断INS患者对

泼尼松治疗的反应性,尿 NGAL 水平测定有早期预测 INS 转归、早期诊断的作用。

综上所述,INS 病例尿 NGAL 水平持续维持在高水平对 INS 病例的泼尼松耐药有一定的提示作用,且与尿 β 2-MG 水平比较,有早期判断价值。有利于 INS 病例的早期诊断及治疗。

[参 考 文 献]

[1] MacHardy N, Miles PV, Massengill SF, Smoyer WE, Mahan JD, Greenbaum L, et al. Management patterns of childhood-onset nephrotic syndrome [J]. *Pediatrics Nephrology*, 2009, 24(11): 747-757.

[2] Tarshish P, Tobin JN, Bernstein J, Edelmann CM Jr. Prognostic significance of the early course of minimal change nephrotic syndrome; report of the International Study of Kidney Disease in Children [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8(5): 769-776.

[3] Rennke HG. How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? [J]. *Kidney Int Suppl*, 1994, 45: S58-S63.

[4] Bennett MR, Piyaphanee N, Czech K, Mitsnefes M, Devarajan P. NGAL distinguishes steroid sensitivity in idiopathic nephrotic syndrome [J]. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27(5): 807-812.

[5] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 儿童常见肾脏疾病诊治循证指南(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.

[6] Vallés P, Peralta M, Carrizo L, Martín L, Principi I, Gonzalez A, et al. Follow-up of steroid-resistant nephrotic syndrome: tubular proteinuria and enzymuria [J]. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15(3-4): 252-258.

[7] Buelow MW, Dall A, Regner K, Weinberg C, Bartz PJ, Sowinski J, et al. Urinary interleukin-18 and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin predict acute kidney injury following pulmonary valve replacement prior to serum creatinine [J]. *Congenit Heart Dis*, 2012, 7(5): 441-447.

[8] Peters HP, Waanders F, Meijer E, van den Brand J, Steenbergen EJ, van Goor H, et al. High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(11): 3581-3588.

[9] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A; NGAL Meta-analysis Investigator Group. 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.

[10] Hong CY, Chia KS. Markers of diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Complications*, 1998, 12(1): 43-60.

(本文编辑:钟乐)