

论著 · 临床研究

新生儿肾功能损害早期单个核细胞 载脂蛋白 H 基因表达与尿 NAG RBP 结果比较

吴志军¹, 黄上明¹, 陈睿¹, 胡彬², 陈幽¹, 朱远鹏¹, 卢光进¹, 韩玉昆³

(1. 深圳市宝安区妇幼保健院新生儿科, 广东 深圳 518133; 2. 广州达安基因股份有限公司, 广东 广州 510120;
3. 中国医科大学附属盛京医院, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 探讨尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、视黄醇结合蛋白(RBP)及血载脂蛋白 H (apoH)基因表达在新生儿肾功能损害早期诊断中的价值。**方法** 对 60 例可能伴肾功能损害的新生儿在入院 48 h 内分别检测外周血单个核细胞 apoH 基因表达、肌酐和尿素氮与尿 NAG 酶活性、RBP 及尿常规两次, 两次间隔 12~24 h。**结果** 60 例新生儿中第 1 次尿 NAG 异常率 83.3%, RBP 异常率 76.7%, apoH 阳性率为 73.3%; 第 2 次尿 NAG、RBP 及 apoH 异常率分别为 66.7%、76.7%、70.0%。以上 3 个指标第 1 次及第 2 次异常率比较, 差异均无显著性意义($P>0.05$)。但 3 个指标同血尿素氮和肌酐异常率比较, 除第 2 次尿 NAG 与血尿素氮异常率比较差异无显著性意义外, 其他均显著或极显著高于血尿素氮和肌酐异常发生率。**结论** 新生儿肾功能损害早期尿 RBP 和血 apoH 基因表达与 NAG 酶的诊断价值相同。血 apoH 基因表达和尿 NAG 及 RBP 较血肌酐和尿素氮在肾小管损害早期更敏感。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(8): 649-652]

[关键词] 载脂蛋白 H 基因表达; 视黄醇结合蛋白; NAG; 肾功能损害; 新生儿

[中图分类号] R722 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)08-0649-04

Value of blood apoH gene expression and urinary NAG and RBP in early diagnosis of renal function damage in neonates

WU Zhi-Jun, HUANG Shang-Ming, CHEN Rui, HU Bin, CHEN You, ZHU Yuan-Peng, LU Guang-Jin, HAN Yu-Kun.
Department of Neonatology, Bao'an District Maternal and Child Health Care Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518133, China (Email: zhijunwu@sina.com)

Abstract: Objective To study the value of apolipoprotein H (apoH) gene expression in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and urinary N-Acetyl-beta-D-Glucosaminidase (NAG) and retinal-binding protein (RBP) in the early diagnosis of renal function damage in neonates. **Methods** Sixty sick neonates who renal function damage probably occurred were enrolled. The blood and urinary samples were collected twice within 48 hrs following admission, with an interval of 12-24 hrs. Expression of apoH gene in PBMC was determined with RT-PCR. The levels of blood urea nitrogen (BUN) and creatinine, and urinary activities of NAG and RBP were measured with enzymatic reaction. **Results** The abnormal rates of blood apoH and urinary NAG and RBP were 73.3%, 83.3% and 76.7%, respectively in the first detection. The second detection for blood apoH and urinary NAG and RBP showed abnormal rates of 70.0%, 66.7% and 76.7%, respectively. There were no significant differences in the abnormal rates between the three markers either in the first or the second detection ($P>0.05$). Beside there were no significant significances in the abnormal rates between urinary NAG and blood BUN in the second detection, the abnormal rates of blood apoH and urinary NAG and RBP in both detections were significantly higher than those of BUN or creatinine ($P<0.01$ or 0.05). **Conclusions** There are identical values of blood apoH gene expression and urinary NAG and RBP in the early diagnosis of renal function damage in neonates. The above three markers are more sensitive to early renal function damage than blood BUN and creatinine.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(8): 649-652]

Key words: ApoH gene expression; RBP; NAG; Renal function damage; Neonate

急性肾功能衰竭是新生儿死亡最重要原因之一。当肾小球滤过率有所减少、内生肌酐清除率降至正常的 70% 时, 尿素氮 (BUN) 仍可在正常范围, 只有当肾小球滤过率或内生肌酐清除率下降到正常

[收稿日期] 2009-12-24; [修回日期] 2009-02-20
[基金项目] 深圳市科技局基金资助项目 (No: JH200507131058A)。
[作者简介] 吴志军, 男, 硕士研究生, 副主任医师。主攻方向: 新生儿急救。

的50%以下时,BUN才渐升高。体内肌酐生成比较稳定,血肌酐(Cr)浓度升高反映肾肌酐清除率下降,故可做为判断肾功能的指标,但只有当肾小球滤过率下降到正常的1/3时,血Cr才明显升高^[1]。各种危重疾病或药物造成的肾功能损害在早期往往由于临床表现或肾功能改变不明显,容易被忽视而漏诊,实验室检查是判断肾功能损害重要指标。载脂蛋白H(apoH)基因表达可反映儿童肾小管功能的损害,有助于临床早期诊断肾小管疾病^[2]。apoH基因表达是否能反映新生儿肾小管损害尚未见报道。新生儿尿N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-beta-D-Glucosaminidase, NAG)活性及尿视黄醇结合蛋白(RBP)均可作为评价急性肾小管功能损害早期的一项灵敏指标^[3],因此,我们通过检测apoH, NAG和RBP 3项指标对照研究评价其在新生儿肾功能损害早期的诊断价值。

1 对象与方法

1.1 对象

2006年4月至2007年2月住院新生儿中随机选取可能发生肾功能损害的患病新生儿60例,并排除先天性肾脏疾病。其中,新生儿窒息58例(轻度40例、重度18例)、重度贫血1例、感染性休克1例。男43例、女17例,胎龄<37周11例、37~42周42例、过期产儿7例。生后24 h内入院58例、1~5 d入院2例。合并代谢性酸中毒51例、电解质紊乱39例、肾功能衰竭8例。治愈47例、好转5例、放弃治疗4例、死亡4例。

1.2 方法

1.2.1 尿液的收集及测定 于入院48 h内用一次性SNQ-28型婴儿尿液收集器间隔12~24 h两次收集新生儿尿液标本10 mL,离心后部分置冰箱内(4℃)保存,并于1周内检测尿NAG及RBP,部分尿液送尿常规检验。同时抽取两次血液标本,部分送医院检验科行血Cr和BUN测定,部分立即分离外周血单个核细胞冻存后集中送达安基因有限公司检测apoH基因表达。

1.2.2 尿NAG测定方法 NAG试剂为日本协合试剂公司出产的速率法产品,尿肌酐试剂为上海DENUO公司出产的酶法产品。利用日本OLYMPUS AU400生化分析仪速率法测定尿样中NAG活性。判断标准:200例健康新生儿尿NAG活性指数结果P10和P90为正常参考值。>P90的结果均判为异常^[4]。

1.2.3 尿RBP检测及分析 用ELISA两步定量

法测定尿液RBP。同期留取我院产科生后48 h内健康新生儿100份尿液标本行RBP测定,其结果作为正常参考值(695 μg/mmol·Cr),高于该值可判定结果异常^[5]。

1.2.4 尿常规、血Cr、BUN分析 尿蛋白阳性和/或尿潜血阳性判为尿常规异常,血BUN>5.2 mmol/L为升高,血Cr>88 μmol/L为异常。

1.2.5 血apoH基因表达检测分析 分离外周血单个核细胞:抽取肝素抗凝静脉血2 mL,用淋巴细胞分离液分离提取外周血单个核细胞,用Eppendorf试管置-70℃冻存。

DNA提取:取0.5 mL的EPP管,加入样品50 μL和达安基因DNA提取液50 μL,水浴锅煮沸10 min,12 000 r/min离心5 min,取上清液待用。

定性PCR实验:反应体系:5×定性PCR buffer 10 μL,上游引物F 1 μL,下游引物R 1 μL,dNTPs 1 μL,Taq酶 1 μL,DNA模板(上清液)5 μL,ddH₂O 31 μL,总体积50 μL;反应条件:93℃预变性5 min,循环条件为93℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,40个循环后72℃延伸10 min。

琼脂糖凝胶电泳:在300 bp处见清晰条带出现时判为阳性。

1.2.6 统计学处理 采用χ²检验,P<0.05为差异具有显著性。

2 结果

2.1 apoH PCR扩增产物

标本行琼脂糖凝胶电泳时在300 bp处见清晰条带出现时判为阳性,即为异常,无条带出现即为阴性。

结果显示:两次结果均为阳性患儿35例、阴性转阳性7例、阳性转阴性8例、两次结果均阴性9例。

2.2 尿NAG及尿RBP结果

二次检测过程中尿NAG呈下降趋势,而尿RBP呈上升趋势(表1)。

2.3 血apoH及尿NAG结果

60例患儿无论是第1次还是第2次检验结果,还是两次结果混合统计,血apoH与尿NAG异常率比较差异无显著意义(表2)。二者对肾功能损害均有较高的敏感性,分别达到83.3%和90%。

2.4 血apoH及尿RBP结果

60例患儿在第1次和第2次检验结果中,血apoH与尿RBP比较差异无显著性(表3)。

表 1 患儿尿 NAG 和 RBP 结果

项目名称	标本次数	平均值	结果范围	参考范围	异常率(%)	平均超正常值倍数
尿 NAG (U/g·Cr)	第 1 次	62.42	3.16 ~ 360.38	<11.9	50/60(83.3)	6
	第 2 次	33.14	2.66 ~ 244.8		40/60(66.7)	4
尿 RBP (μg/mmol·Cr)	第 1 次	13184.52	31.14 ~ 169615.38	<695	46/60(76.7)	25
	第 2 次	14158.57	62.21 ~ 344212.65		46/60(76.7)	28

表 2 患儿血 apoH 和尿 NAG 结果

	例数	血 apoH 异常		尿 NAG 异常	
		例数	%	例数	%
第 1 次	60	44 (34)	73.3	50(34)	83.3
第 2 次	60	42 (29)	70.0	40(29)	66.7
两次均异常	60	32 (20)	53.3	36(20)	60.0
两次总计异常	60	50	83.3	54	90.0

注:括号内为血 apoH 和尿 NAG 结果均异常的病例数

表 3 患儿 apoH 和 RBP 结果

	例数	apoH 异常		尿 RBP 异常	
		例数	%	例数	%
第 1 次	60	44 (38)	73.3	46 (38)	76.7
第 2 次	60	42 (36)	70.0	46 (36)	76.7
两次均异常	60	32 (28)	53.3	39 (28)	65.0
两次总计异常	60	50	83.3	54	90.0

注:括号内为血 apoH 和尿 RBP 结果均异常的病例数

2.5 尿 NAG 和 RBP 结果

在两次检测结果中两指标结果比较差异无显著性意义,均 $P>0.05$ (表 4)。

表 4 患儿尿 NAG 和 RBP 结果

	例数	尿 NAG 异常		尿 RBP 异常	
		例数	%	例数	%
第 1 次	60	50(41)	83.3	46(41)	76.7
第 2 次	60	40(31)	66.7	46(31)	76.7
两次均异常	60	36(28)	60.0	39(28)	65.0
两次总计异常	60	54	90.0	54	90.0

注:括号内为尿 NAG 和 RBP 结果同时异常的病例数

2.6 血 apoH、尿 NAG 和 RBP 同血 Cr 和 BUN 结果比较

血 apoH、尿 NAG 和 RBP 同血 Cr 和 BUN 异常率比较,除尿 NAG 第 2 次与血 BUN 异常率比较差异无显著性意义外,其他两次检测均显著或极显著高于血 BUN 和 Cr 异常率(表 5)。

表 5 患儿血 apoH、尿 NAG 和 RBP 同血 BUN 和 Cr 结果比较

	检查项目	例数	例(%)
			异常
第 1 次	BUN	60	26 (43.3)
	Cr	60	8 (13.3)
	apoH	60	44 (73.3) ^{a,c}
	NAG	60	50 (83.3) ^{a,c}
	RBP	60	46 (76.7) ^{a,c}
第 2 次	BUN	60	30 (50.0)
	Cr	60	15 (25.0)
	ApoH	60	42 (70.0) ^{b,c}
	NAG	60	40 (66.7) ^c
	RBP	60	46 (76.7) ^{a,c}

a:与 BUN 比较, $P<0.01$, b: $P<0.05$; c:与 Cr 比较, $P<0.01$

3 讨论

apoH 是一种相对分子量为 50 000 的糖蛋白,它参与脂质代谢和凝血,并与自身免疫性疾病有关。肝胆管和近端肾小管上皮细胞是合成 apoH 的主要场所^[6]。在肾小管功能损害早期,尿中 apoH 排泄量增加,血液中 apoH 基因表达也增加^[7]。因此,apoH 基因表达作为早期诊断肾小管功能异常的指标。

尿 NAG 酶活性是判定新生儿早期肾小管功能异常的灵敏指标。有作者认为其敏感度远低于 apoH^[7]。但本实验结果表明,新生儿早期肾小管功能损害时,尿 NAG 与血 apoH 异常率比较差异无显著性。因此,在患儿留取尿液困难,或存在影响尿 NAG 活性因素存在时,apoH 基因表达可作为一项重要敏感指标进行临床应用。

RBP 是肝脏分泌的一种低分子量蛋白(21 000 kD),主要功能是将视黄醇从肝细胞转运到上皮细胞,血浆中的 RBP 约有 90% 与甲状腺素结合前蛋白结合,形成高分子蛋白复合物,故而不被肾小球滤过膜滤过。当视黄醇被转运到靶细胞后,RBP 便游离到血浆中,迅速被肾小球滤过,几乎全部被肾近曲小管重吸收而分解。正常情况下,在尿中稳定性强,不易分解,不受 pH 和血压干扰,RBP 排出量甚微(100 μg/d)。但在肾近曲小管损伤时,其尿排量明显增加,故 RBP 排量增加可作为肾近曲小管损伤的

标志物^[8]。本实验结果表明,在肾功能损害早期尿RBP与血 apoH 异常率比较差异无显著性。

尿量减少或无尿及氮质血症仍作为急性肾功能不全的重要诊断指标,本资料结果表明,60 例患儿在入院后 48 h 内有 3 例尿量每小时 >0.5 mL/kg,4 例每小时小于 1 mL/kg,仅 1 例诊断为急性肾功能衰竭。而血 BUN 发生异常时,患儿肾功能下降大于 50%^[9],延误治疗和抢救时间。本研究表明 apoH 基因表达、尿 NAG 及 RBP 在肾功能损害早期敏感度明显高于血 Cr 和 BUN。

因此,血 apoH 基因表达、尿 NAG 和 RBP 均可作为肾功能损害早期指标^[10,11],有助于临床及早诊断新生儿肾功能异常,为临床及时调整治疗方案提供指导。

[参 考 文 献]

[1] 陈大庆. 新生儿急性肾功能衰竭的早期诊断[J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(1):60-61.
[2] 夏正坤,刘光陵,高远斌,伏洁,付元凤,樊忠民,等. 肾小管损伤中载脂蛋白 H 基因表达的研究[J]. 山西医科大学学报,

2002, 33(5):411-412.
[3] 吴志军,陈幽,黄上明. 住院新生儿尿 NAG 筛查临床意义[J]. 中国儿童保健杂志, 2006, 14(1):31-33.
[4] 陈睿. 深圳地区正常新生儿尿 NAG 参考值范围调查[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(5):54.
[5] 陈睿,刘和录. 深圳地区早期正常新生儿尿视黄醇结合蛋白水平测定[J]. 中国儿童保健杂志, 2007, 15(6):674-675.
[6] Ragusa MA, Costa S, Cefalù AB, Noto D, Fayer F, Travali S, et al. RT-PCR and in situ hybridization analysis of apolipoprotein H expression in rat normal tissues[J]. Int J Mol Med, 2006, 18(3):499-455.
[7] Lapsley M, Sanson PA, Marlow CT, Flynn FV, Norden AG. Beta-2-glycoprotein-1 (apolipoprotein H) excretion in chronic renal tubular disorders: comparison with other protein markers of tubular malfunction[J]. J Clin Pathol, 1991, 44(10):812-816.
[8] 罗小平,刘皖君. 围产期窒息对新生儿肾功能的影响[J]. 同济医大学报, 1992, 21(3):159.
[9] 胡晓,董文斌,冉隆瑞,唐章华,王胜会,陈书琴,等. 窒息新生儿 NAG 改变及临床意义[J]. 泸州医学院学报, 2001, 24(3):4-5.
[10] 陆勤,卢长东,任建华,王健,王立金,倪宁,等. 窒息新生儿肾功能损害尿 NAG 和 RBP 的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(3):218-220.
[11] 蔡勇,谢宗德,陈平洋,丁依玲. 窒息宫内窘迫对早期新生儿肾功能的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(3):184-186.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

婴幼儿行为发展与贝利量表评定方法讲习班招生通知

中南大学湘雅二医院精神卫生研究所将于 2009 年 10 月 29 日至 11 月 5 日举办国家级继续医学教育项目《婴幼儿行为发展与贝利量表评定方法讲习班》,系统介绍婴幼儿行为发展的基本知识,培训婴幼儿心理评估方法及心理发育障碍的早期诊断、干预。培训结束,学员授 I 类学分 10 分。为保证教学质量,学员人数限 20 名,详情登录 www.childmh2009.com, 联系电话:0731-85292124(罗学荣)或 0731-85531781(黄菲);E-mail:luoxr@vip.sina.com