

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.03.005

论著·临床研究

原发性肾病综合征患儿检测结合珠蛋白和 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶对预测激素治疗反应的探讨

杨娟¹ 张碧丽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** 探讨原发性肾病综合征(PNS)患儿血清及尿液中结合珠蛋白(HP)和 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶(AAT)的水平对预测激素治疗儿童PNS疗效的价值。**方法** 将84例PNS患儿分为激素敏感型肾病综合征(SSNS)组($n=58$)和激素耐药型肾病综合征(SRNS)组($n=26$);随机抽取40例健康儿童作为对照组。ELISA法检测各组血、尿样本中HP及AAT水平。受试者工作特征曲线(ROC曲线)评价HP和AAT对激素治疗PNS疗效的预测效能。**结果** SSNS组与SRNS组治疗前血清HP浓度及尿AAT/Cr比值均显著高于对照组($P<0.05$);与SSNS组比较,SRNS组血清HP浓度及尿AAT/Cr比值在治疗前、治疗1周及4周时均显著升高($P<0.05$)。当血清HP浓度为37.935 mg/mL时,其预测激素治疗儿童PNS疗效的效能最高,敏感度为92.3%,特异度为86.2%;当尿AAT/Cr比值为0.0696时,其预测效能最高,敏感度为100%,特异度为79.3%;血清HP联合尿AAT/Cr比值作ROC曲线分析,敏感度为92.3%,特异度为96.6%,具有更好的预测效能。**结论** 血清HP或尿AAT/Cr比值升高在PNS患儿发病初期提示可能为激素耐药;如能两者联合检测对SRNS预测效能更佳。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(3): 227-231]

[关键词] 结合珠蛋白; $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶;原发性肾病综合征;儿童

Value of determination of haptoglobin and $\alpha 1$ -antitrypsin in predicting response to glucocorticoid therapy in children with primary nephrotic syndrome

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

Abstract: Objective To study the value of the determination of serum and urine haptoglobin (HP) and alpha 1-antitrypsin (AAT) in predicting the response to glucocorticoid therapy in children with primary nephrotic syndrome (PNS). **Methods** A total of 84 children with PNS were classified to steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) ($n=58$) and steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) groups ($n=26$). Forty healthy children were randomly selected for the control group. HP and AAT levels in blood and urinary samples were determined using ELISA. The efficiency of HP and AAT in predicting the response to glucocorticoid treatment of PNS was evaluated by the receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Compared with the control group, both the SSNS and SRNS groups had significantly higher serum HP concentrations and urine AAT/Cr ratio before treatment ($P<0.05$); compared with the SSNS group, the SRNS group had significantly higher serum HP concentrations and urine AAT/Cr ratio before treatment and after one week and four weeks of treatment ($P<0.05$). Serum HP had the highest efficiency in predicting the response to glucocorticoid treatment of PNS at the concentration of 37.935 mg/mL, with the sensitivity and specificity being 92.3% and 86.2% respectively. Urine AAT/Cr ratio had the highest prediction efficiency at 0.0696, with the sensitivity and specificity being 100% and 79.3% respectively. ROC curve analysis of serum HP combined with urine AAT/Cr ratio showed a better prediction efficiency, with the sensitivity and specificity being 92.3% and 96.6% respectively. **Conclusions** The increase in serum HP level or urine AAT/Cr ratio may indicate glucocorticoid resistance in the early stage of PNS. A combination of the two can achieve better efficiency in the prediction of SRNS. [Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(3): 227-231]

Key words: Haptoglobin; Alpha 1-antitrypsin; Primary nephrotic syndrome; Child

[收稿日期] 2014-08-29; [接受日期] 2014-10-18

[基金项目] 天津市卫生局科技基金(12KG117)。

[作者简介] 杨娟,女,硕士,医师。

[通信作者] 张碧丽,女,教授。

原发性肾病综合征(PNS)是儿童时期最常见的肾小球疾病,其在儿童中的患病率约为10万分之16^[1]。肾上腺糖皮质激素是目前公认治疗PNS的主要药物,根据正规足量激素治疗4周反应,将PNS分为激素敏感型肾病综合征(SSNS)和激素耐药型肾病综合征(SRNS)^[2]。大部分患儿对激素治疗表现为敏感,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^[3];约20%的患儿表现为激素耐药,其中约60%SRNS患儿发展为局灶性节段性肾小球硬化(FSGS),而FSGS患儿会逐渐演变为终末期肾病^[4]。SRNS和SSNS在激素治疗前有相似的临床表现,没有特异的实验室或者临床指标可以用来区分这两种分型,肾活检虽对了解肾脏病理改变、预测激素反应性及评估预后具有重要意义,但因其有创性,难以在儿科临床工作中普及。近年来,国内外蛋白质组学研究鉴定出多种SRNS与SSNS的差异化表达蛋白质,如 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶(AAT)、转铁蛋白、结合珠蛋白(HP)、细胞角蛋白9等,提示这些差异表达的蛋白质可能为预测SRNS的生物标志物^[5]。HP和AAT都属于急性期反应蛋白,在PNS患儿的病理生理过程中,HP和AAT可能会出现反应性增高,本研究拟选取HP和AAT为研究指标,通过检测血、尿中的HP、AAT水平预测PNS患儿对激素治疗的反应。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2012年9月至2014年1月于本院诊断并治疗的84例PNS患儿为研究对象,所有患儿均为初发的PNS患儿或停用糖皮质激素6个月以上的复发PNS患儿,且临床诊断均符合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^[6];排除观察期间出现严重感染、不能坚持正规激素治疗、使用过免疫抑制剂及出现肾功能下降的患儿。经足量激素治疗4周后根据激素治疗反应将84例PNS患儿分为SRNS组(尿蛋白仍阳性)和SSNS组(尿蛋白转阴)。SSNS组58例,其中男43例,女15例,年龄0.4~14岁,平均年龄 5 ± 3 岁;SRNS组26例,

其中男18例,女8例,年龄1~13岁,平均年龄 6 ± 4 岁。另选取同期于本院体检中心体检的健康儿童40例为对照组,其中男29例,女11例,年龄0.2~13岁,平均年龄 5 ± 4 岁。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 标本收集与检测

所有患儿均于应用激素治疗前、治疗1周及4周分别留取血、尿标本。采集PNS患儿空腹静脉血2 mL,静置60 min,3000 rpm离心5 min分离血清;在取血的同一日,留取新鲜晨起清洁中段尿20 mL,4℃下以3000 rpm离心20 min,收集上清液,血清及尿液均放置在-80℃超低温冰箱中备用。因单次尿排泄量受到肾功能、尿量和尿液浓缩情况等多种因素影响,故本研究采用尿肌酐(Cr)排出量来校正单次尿HP、AAT水平。收集所有患儿的年龄、性别、体重、入院时病程等临床指标;以及激素使用前的血胆固醇、血肌酐、白蛋白、24 h尿蛋白定量等生化指标。采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)测定血清、尿液中HP和AAT的浓度,ELISA试剂盒由上海恒远生物科技有限公司提供。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件包对数据进行统计学分析,正态分布计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;非正态分布计量资料使用中位数(四分位间距)[P_{50} (P_{25} , P_{75})]表示,两组间比较采用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。计数资料采用例数表示,两组间比较采用 χ^2 检验。采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC曲线)评价HP和AAT对激素治疗PNS疗效的预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PNS患儿治疗前临床及生化指标分析

SSNS、SRNS组患儿年龄、性别、体重以及在入院时病程、血胆固醇、血肌酐、血白蛋白、尿蛋白量之间比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表1。

表1 SSNS与SRNS患儿治疗前临床及生化指标比较 [例或($\bar{x} \pm s$)]

组别	例数	性别 (男/女)	年龄 (岁)	体重 (kg)	病程 (d)	血肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	血胆固醇 (mmol/L)	血白蛋白 (g/L)	尿蛋白 (mg/kg)
SSNS组	58	43/15	5 $\pm$ 3	22 $\pm$ 11	8 $\pm$ 8	46 $\pm$ 11	9.4 $\pm$ 2.9	19 $\pm$ 8	112 $\pm$ 56
SRNS组	26	18/8	6 $\pm$ 4	29 $\pm$ 14	14 $\pm$ 11	50 $\pm$ 12	9.3 $\pm$ 2.7	17 $\pm$ 5	136 $\pm$ 57
$\chi^2(t)$ 值		0.217	(1.720)	(2.000)	(2.625)	(1.550)	(0.150)	(1.202)	(1.770)
P 值		0.792	0.093	0.051	0.100	0.126	0.881	0.233	0.081

2.2 各组不同时间血清HP浓度比较

SSNS组与SRNS组治疗前血清HP水平均显著高于对照组($P<0.05$)；SRNS组血清HP水平在治疗前、治疗1周及治疗4周时均较SSNS组显著升高，差异有统计学意义($P<0.05$)；但治疗前、治疗1周及治疗4周时血清HP水平分别在SSNS及SRNS组内比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.3 各组不同时间尿HP/Cr比值比较

SSNS组及SRNS组治疗前尿HP/Cr比值均高于对照组($P<0.05$)；但在治疗前、治疗1周及治疗4周时尿HP/Cr比值在SSNS及SRNS组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)；且治疗前、治疗1周及治疗4周时尿HP/Cr比值分别在SSNS及SRNS组内比较差异亦均无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 各组不同时间血清HP水平及尿HP/Cr比值的比较 [P_{50} (P_{25} , P_{75})]

组别	例数	血清HP(mg/mL)					尿HP/Cr比值($\times 10^{-3}$)				
		治疗前	治疗1周	治疗4周	H 值	P 值	治疗前	治疗1周	治疗4周	H 值	P 值
对照组	40	12(2~24)	—	—	—	—	1.3(0.5~4.4)	—	—	—	—
SSNS组	58	30(26~34) ^a	32(26~35)	32(26~35)	1.088	0.580	6.6(3.4~11.6) ^a	8.3(5.1~17.7)	8.3(4.7~21.2)	4.316	0.116
SRNS组	26	49(40~54) ^{a,b}	53(42~63)	50(44~53)	0.853	0.653	5.6(3.2~14.0) ^a	5.2(3.1~10.0)	6.6(5.1~10.4)	1.521	0.467
$H(U)$ 值		58.499	(-5.428)	(-6.289)			40.621	(-1.838)	(-0.851)		
P 值		<0.001	<0.001	<0.001			<0.001	0.066	0.395		

注：a示与对照组比较， $P<0.05$ ；b示与SSNS组比较， $P<0.05$ 。

2.4 各组不同时间血清AAT浓度比较

治疗前血清AAT水平在对照组、SRNS组和SSNS组比较差异无统计学意义($P>0.05$)；在治疗前、治疗1周及治疗4周时血清AAT水平分别在SRNS和SSNS组间及组内比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

2.5 各组不同时间尿AAT/Cr比值比较

SSNS组与SRNS组治疗前尿AAT/Cr比值均显著高于对照组($P<0.05$)；SRNS组尿AAT/Cr比值在治疗前、治疗1周及治疗4周时均较SSNS组显著升高($P<0.05$)；但治疗前、治疗1周及治疗4周时尿AAT/Cr比值分别在SSNS及SRNS组内比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表3 各组不同时间血清AAT水平及尿AAT/Cr比值的比较 [P_{50} (P_{25} , P_{75})]

组别	例数	血清AAT(ng/mL)					尿AAT/Cr比值($\times 10^{-3}$)				
		治疗前	治疗1周	治疗4周	H 值	P 值	治疗前	治疗1周	治疗4周	H 值	P 值
对照组	40	269(216~337)	—	—	—	—	1.0(4.5~20.2)	—	—	—	—
SSNS组	58	297(243~324)	294(227~317)	291(221~334)	0.601	0.740	3.9(2.3~6.5) ^a	4.0(2.6~7.7)	4.0(2.8~7.4)	1.715	0.424
SRNS组	26	255(239~291)	261(190~296)	258(208~316)	0.172	0.918	9.6(8.2~18.8) ^{a,b}	10.8(8.2~17.6)	16.2(9.4~23.9)	3.926	0.140
$H(U)$ 值		4.125	(-1.829)	(-0.987)			76.024	(-5.138)	(-6.038)		
P 值		0.127	0.067	0.324			<0.001	<0.001	<0.001		

注：a示与对照组比较， $P<0.05$ ；b示与SSNS组比较， $P<0.05$ 。

2.6 血清 HP 及尿 AAT/Cr 比值的诊断价值

以 SSNS 及 SRNS 组血清 HP 浓度做 ROC 曲线分析,结果显示曲线下面积(AUC)为 0.904,当血清 HP 截点值为 37.935 mg/mL 时,预测激素治疗儿童 PNS 疗效的效能最高,其敏感度为 92.3%,特异度为 86.2%,Youden 指数为 78.5% (图 1);以两组尿 AAT/Cr 比值做 ROC 曲线分析,结果显示 AUC 为 0.899,当尿 AAT/Cr 截点值为 0.0696 时,预测效能最高,其敏感度为 100%,特异度为 79.3%,Youden 指数 79.3% (图 1)。以血清 HP 浓度联合尿 AAT/Cr 比值作 ROC 曲线分析,结果显示 AUC 为 0.971,敏感度为 92.3%,特异度为 96.6%,Youden 指数 88.9%,具有更好的预测效能 (图 2)。

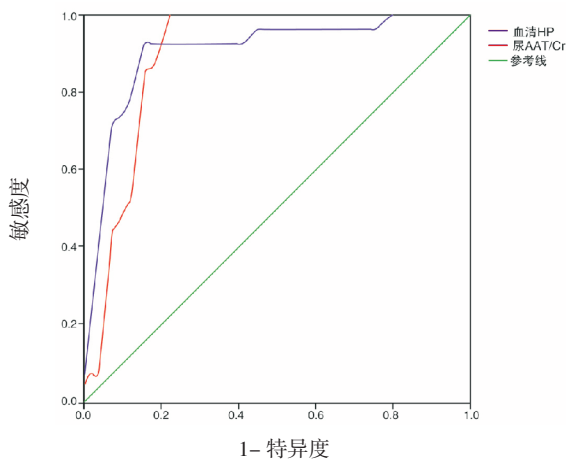


图1 血清 HP 水平及尿 AAT/Cr 比值预测激素治疗效果的 ROC 曲线分析

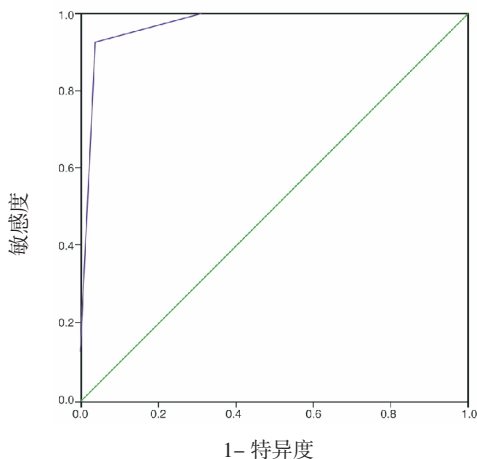


图2 血清 HP 水平联合尿 AAT/Cr 比值预测激素治疗效果的 ROC 曲线分析

3 讨论

SRNS 患儿持续存在的尿蛋白,不仅使体内蛋白质丢失;同时大量蛋白尿还作为一种独立的致病因素,能诱导肾小管间质纤维化,加重肾脏病变。迄今,尚缺乏早期诊断 SRNS 的特异性生物标志物。近年来,国内外蛋白质组学研究鉴定出多种 SRNS 与 SSNS 的差异性表达的蛋白质,如 AAT、转铁蛋白、HP、细胞角蛋白 9 等^[5]。本研究选取 HP 和 AAT 为研究对象,探讨其能否成为早期诊断 SRNS 的生物标志物。本研究标本分别是取自于激素治疗前以及激素治疗 1 周、4 周,这样既可以避免药物治疗干扰,又可以动态监测生物标志物与激素治疗反应的关系。本研究提示血清 HP 浓度和尿 AAT/Cr 比值在 SRNS 组明显升高,同时应用 ROC 曲线分析来评价其诊断 SRNS 的效能。

HP 又称触珠蛋白,在炎症刺激如感染、自身免疫反应等时,血清中 HP 水平会升高^[7]。HP 主要由肝脏合成,在脂肪组织、皮肤、肺、肾脏也有低度表达。HP 在参与宿主抗感染及损伤组织的修复中起着重要的作用,还对淋巴细胞功能有抑制作用,能调节 Th1/Th2 平衡^[8]。HP 表达的改变很可能是局部炎症后急性相蛋白的反应性变化以及免疫作用。免疫失衡,比如 T 细胞功能紊乱,2 型细胞因子上调,都可以导致微小病变型肾病综合征和局灶节段性肾小球硬化,而免疫失衡就可以引起血清 HP 升高。据报道,在肾小球疾病如肾小球肾炎、膜性肾病、IgA 肾病中,血清 HP 水平明显升高^[9]。推测免疫因素导致 SRNS 和 SSNS 不同的病理生理过程,SRNS 较 SSNS 患儿血清 HP 明显升高。在本研究中 PNS 患者尿 HP 水平比对照组明显升高,但是在 SRNS 和 SSNS 之间没有发现差异,有研究表明糖尿病肾病患者早期肾功能下降时尿中 HP 增加,考虑与肾小球通透性增加,使血清中的 HP 漏入尿液以及肾小管损伤有关^[10],本研究所有研究对象肾功能均正常,考虑在肾功能正常时 SSNS 和 SRNS 具有相似的尿 HP 排泄^[9],因此,仅血清 HP 升高提示 PNS 患儿激素耐药可能,而尿 HP 不适用于做预测 SRNS 的生物标志物,且当血清 HP 高于 37.935 mg/mL 时,提示可能激素耐药 (AUC 为 0.904,敏感度为 92.3%,特异度为 86.2%)。

AAT亦是一种急性时相炎症反应蛋白,是人类血浆中最丰富的蛋白酶抑制剂,主要由肝细胞分泌,肝外组织如肠、肾、脾等也能产生少量的AAT^[11]。Hidvegi等^[12]发现在细胞内反应途径中, α_1 变异的AAT能够活化NF- κ B,NF- κ B广泛存在于人体各种组织细胞中,包括免疫细胞、肾小球系膜细胞及肾小管上皮细胞等,许多诱导剂能使培养的肾细胞中NF- κ B激活,调节多种促炎因子的转录。本研究中发现肾病综合征患者尿AAT/Cr比值明显升高,SRNS患者升高尤为显著,目前原因尚不明确。文献报道血清和尿的蛋白组学分析表明蛋白水解活性增加,发现大量的白蛋白和AAT片段,考虑在对于非特异性刺激物应答过程中,由血多形性有核白细胞引起的氧化应激,并激发足细胞结构改变^[13]。也有研究表明AAT通过发挥其抑制中性粒细胞抗炎、抗凋亡作用,在肾小管损伤后,肾小管上皮细胞反应性的表达AAT^[14],Carlson等^[15]和Liew^[16]均报道用免疫组化方法在肾小管上皮细胞检测到AAT。国内的研究从蛋白质和mRNA水平证实了肾小管上皮细胞可表达AAT,肾小管上皮细胞表达AAT的意义是否与肾病综合征激素耐药相关仍为研究热点问题^[17]。本研究提示尿AAT/Cr比值可能成为预测SRNS的生物标志物,当尿AAT/Cr比值大于0.0696时,提示可能激素耐药(AUC为0.899,敏感度为100%,特异度为79.3%),本研究血清AAT的浓度在三组之间没有差异,推测大量蛋白尿等损伤因素引起足细胞改变以及肾小管损伤,氧化应激反应主要发生在肾小管及肾小球,而不是血液系统,故血清中AAT无明显升高。

总之,血清HP浓度及尿AAT/Cr比值升高在PNS患儿发病初期提示可能激素耐药,其可用来预测激素的疗效。推测血清HP浓度及尿AAT/Cr比值升高与免疫因素及肾小球、肾小管损伤有关。SRNS血清和尿液中的生物标志物,可能为SRNS患儿耐药机制在蛋白质水平的反应产物,联合检测上述两种生物标志物预测效能更佳(AUC为0.971,敏感度为92.3%,特异度为96.6%),但上述研究成果有待进行大规模、多中心队列研究,从分子机制进一步证明血清HP和尿AAT/Cr比值作为激素耐药的生物学标志物的可行性。

[参考文献]

- [1] MacHardy N, Miles PV, Massengill SF, et al. Management patterns of childhood-onset nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2009, 24(11): 2193-2201.
- [2] 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(试行)(三): 激素耐药型肾病综合征诊治指南[J]. *中华儿科杂志*, 2010, 48(1): 72-75.
- [3] 夏华, 何庆南, 李晓燕, 等. 中性粒细胞膜脂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[J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(7): 541-545.
- [4] Cochat P, Fargue S, Mestrallet G, et al. Disease recurrence in paediatric renal transplantation[J]. *Pediatr Nephrol*, 2009, 24(11): 2097-2108.
- [5] 王荧荧. 预测儿童原发性肾病综合征激素疗效的尿液标志物研究[D]. 南京医科大学学位论文, 2012.
- [6] 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.
- [7] Strandhave C, Krarup H, Christensen JH, et al. Haptoglobin genotype and risk markers of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease[J]. *Int J Nephrol*, 2013, 2013: 650847.
- [8] 郑能韬, 吴卫平. 多发性硬化的血清蛋白质组学研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2011, 37(1): 46-48.
- [9] Wen Q, Huang LT, Luo N, et al. Proteomic profiling identifies haptoglobin as a potential serum biomarker for steroid-resistant nephrotic syndrome[J]. *Am J Nephrol*, 2012, 36(2): 105-113.
- [10] Bhensdadia NM, Hunt KJ, Lopes-Virella MF, et al. Urine haptoglobin levels predict early renal functional decline in patients with type 2 diabetes[J]. *Kidney Int*, 2013, 83(6): 1136-1143.
- [11] Magistroni R, Ligabue G, Lupo V, et al. Proteomic analysis of urine from proteinuric patients shows a proteolytic activity directed against albumin[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(5): 1672-1681.
- [12] Hidvegi T, Schmidt BZ, Hale P, et al. Accumulation of mutant α_1 -antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum activates caspases-4 and -12, NF κ B, and BAP31 but not the unfolded protein response[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(47): 39002-39015.
- [13] Candiano G, Musante L, Petretto A, et al. Proteomics of plasma and urine in primary nephrotic syndrome in children[J]. *Contrib Nephrol*, 2008, 160: 17-28.
- [14] Graterol F, Navarro-Muñoz M, Ibernón M, et al. Poor histological lesions in IgA nephropathy may be reflected in blood and urine peptide profiling[J]. *BMC Nephrol*, 2013, 14(1): 82.
- [15] Carlson JA, Rogers BB, Sifers RN, et al. Multiple tissues express α_1 -antitrypsin in transgenic mice and man[J]. *J Clin Invest*, 1988, 82(1): 26.
- [16] Liew CT. α_1 -Antitrypsin in the renal tubular epithelium in patients with or without α_1 -antitrypsin deficiency[J]. *Changcheng Yi Xue Za Zhi*, 1990, 13(1): 1-9.
- [17] 唐功耀, 谌贻璞, 张嫩, 等. 人肾脏近曲小管上皮细胞表达 α_1 抗胰蛋白酶的研究[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(22): 1540-1544.

(本文编辑: 万静)