

2 型糖尿病肾病患者血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平的表达及临床意义

沈丽莎, 彭文芳, 夏莉莉, 汤瑜斌, 黄珊

上海交通大学医学院附属同仁医院, 上海 200336

摘要: **目的** 探讨 2 型糖尿病肾病患者血清肾损伤分子-1(human kidney injury molecule 1, Kim-1)、尿 N-乙酰- β -D-葡萄糖苷酶(N-acetyl-beta-D-glucosamidase, NAG)、血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)水平的表达及临床意义。 **方法**

选取 2014 年 4 月-2015 年 4 月期间同仁医院收治的 90 例 2 型糖尿病肾病患者作为研究对象,依据尿白蛋白排泄率将其分为早期糖尿病肾病组(early diabetic nephropathy, EDN 组)及临床糖尿病肾病组(diabetic nephropathy, DN 组)各 45 例,并选取 45 例健康体检者作为正常对照组(normal control, NC 组)。采用酶联免疫吸附法检测三组受试者血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平,分析其与 2 型糖尿病肾病的关系。 **结果** EDN 组及 DN 组血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平明显高于 NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),DN 组高于 EDN 组($P < 0.05$)。Kim-1、NAG、AGT 检测对 2 型糖尿病肾病的预测/诊断灵敏度分别为 0.702、0.615、0.718;特异度分别为 0.616、0.577、0.597,但联合检测灵敏度为 0.896,特异度为 0.853;Kim-1、NAG、AGT 水平异常是 2 型糖尿病肾病发生的危险影响因素($P < 0.05$)。 **结论** 2 型糖尿病肾病患者血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平呈高表达,Kim-1、NAG、AGT 联合检测对于 2 型糖尿病肾病具有较高的预测/诊断价值,其水平的异常增加也是 2 型糖尿病肾病的危险影响因素。

关键词: 2 型糖尿病; 肾病; 肾损伤分子-1; N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶; 血管紧张素原

中图分类号:R587.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1006-3110(2018)10-1252-04 **DOI:**10.3969/j.issn.1006-3110.2018.10.030

糖尿病为临床中常见的内分泌疾病,以血糖水平升高为主要临床特点。随着我国经济的发展,糖尿病发病人群数量不断增加,已成为严重的世界性问题。糖尿病肾病是糖尿病的慢性并发症之一,研究统计发现^[1],我国糖尿病人群中伴发肾脏病变的患病率为 33.6%,其中 2 型糖尿病伴肾病的发病率约为 34.7%。有研究证实^[2],早期糖尿病患者发生肾病,可出现轻至中度的肾功能不全,尤其是对于老年人,可增加死于心血管病的可能性,并且增加尿毒症的发生风险,可见糖尿病肾病严重影响患者的生存质量与生存率。糖尿病肾病的具体发生机制尚不明确,且发病机理较为复杂,目前认为细胞因子的合成与肾病的发生发展密切相关^[3]。美国糖尿病协会建议 1 型糖尿病患者在发病后 5 年、2 型糖尿病患者在诊断的初始应进行糖尿病肾病的筛查,早诊断、早治疗对于 2 型糖尿病患者具有重要的临床意义^[4]。有学者认为血清肾损伤分子-1(human kidney injury molecule 1, Kim-1)、尿 N-乙酰- β -D-葡萄糖苷酶(N-acetyl-beta-D-glucosamidase, NAG)、血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)与 2 型糖

尿病肾病的发生发展密切相关^[5-6]。因此,本文将探讨 2 型糖尿病肾病患者血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平变化及其临床意义,旨在为 2 型糖尿病肾病患者的早期诊断提供依据,现将结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2014 年 4 月-2015 年 4 月期间上海交通大学医学院附属同仁医院收治的 90 例 2 型糖尿病肾病患者作为研究对象。纳入标准:(1)患者符合 1999 年世界卫生组织(WHO)制定的 2 型糖尿病诊断标准^[7];(2)患者经尿白蛋白排泄率及相关辅助检查确诊为肾病;(3)患者无其它内分泌疾病。排除标准:(1)患者伴有肿瘤、结核、肝损害、糖尿病足等;(2)患者伴有肾损伤、糖尿病急性代谢性并发症;(3)近期服用肾毒性药物者或慢性感染者。依据尿白蛋白排泄率将患者分为早期糖尿病肾病组(early diabetic nephropathy, EDN 组)及临床糖尿病肾病组(diabetic nephropathy, DN 组)各 45 例,并选取 45 例健康体检者作为正常对照组(normal control, NC 组)。三组受试者性别、年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、血压等一般情况比较差异无统计学意义($P > 0.05$),可以进行对比分析,见表 1。本研究获得医院道德伦理委员会的审核批准,患者及家属知情同意,并签订知情同意书。

基金项目:2014 年度上海市同仁医院院级科研基金(TR201410)

作者简介:沈丽莎(1982-),女,硕士,主治医师,主要从事糖尿病及并发症诊疗方面的研究工作。

通信作者:黄珊。

表 1 三组受试者临床资料比较

组别	例数	男/女(例)	年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)	BMI(kg/m^2 , $\bar{x}\pm s$)	收缩压(mmHg, $\bar{x}\pm s$)	舒张压(mmHg, $\bar{x}\pm s$)
NC 组	45	25/20	45.32 \pm 5.81	24.32 \pm 3.17	130.31 \pm 6.79	74.58 \pm 9.47
EDN 组	45	22/23	44.93 \pm 5.55	24.37 \pm 3.40	127.83 \pm 9.26	72.49 \pm 10.51
DN 组	45	22/23	45.12 \pm 5.39	23.24 \pm 3.16	128.69 \pm 7.81	73.38 \pm 8.47
F/χ^2 值		0.534	0.115	1.747	1.246	0.585
P 值		0.766	0.891	0.178	0.291	0.559

1.2 方法

1.2.1 2 型糖尿病诊断标准^[7] (1)患者伴有典型症状,空腹血糖高于 7.0 mmol/L 或者餐后血糖高于 11.1 mmol/L;(2)患者无典型症状,出现两次或两次以上空腹血糖高于 7.0 mmol/L 或者餐后血糖高于 11.1 mmol/L;(3)患者无典型症状,口服葡萄糖耐量试验 2 h 血糖水平高于 11.1 mmol/L 者。满足以上 3 点任何一点,均可确诊为糖尿病。

1.2.2 糖尿病肾病诊断标准^[8] (1)患者具有糖尿病病史;(2)患者出现肾体积增大、肾小球滤过率(GFR)增高、尿白蛋白排泄率增高;早期糖尿病肾病诊断标准:伴有上述症状,且尿白蛋白排泄率加重,GFR 高于正常值(>120 ml/min);临床糖尿病肾病诊断标准:患者出现持续性蛋白尿,尿白蛋白排泄率高于 200 $\mu\text{g}/\text{min}$,伴有高血压或大量蛋白尿(每日大于 3.5 g)。

1.2.3 血 Kim-1 水平检测 采用酶联免疫吸附法(试剂盒由美国 R&D 公司提供)检测 Kim-1 水平,具体步骤:(1)采集受试者空腹静脉血 5 ml,室温自然凝固 10~20 min,离心(3 000 r/min,20 min)获得血清;(2)在酶标包被板上设标准品孔,在第一、第二孔中分别加入血清 100 μl ,并加入标准稀释液 50 μl ,混匀;从第一、第二孔取 100 μl 加入第三、第四孔,再向第三、第四孔加入标准稀释液 50 μl ,混匀;依次类推,加到第九、第十孔中,再向第九、第十孔中加入 50 μl 标准稀释液,混匀后分别弃 50 μl 液体;(3)分别设置空白孔、待测样品孔,向待测样品孔中先加样品稀释液 40 μl ,再加入待测样品 10 μl ;(4)在经过温育、配液、洗涤、加酶、再温育、洗涤、显色、终止步骤,在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度,在加入终止液后 15 min 内进行测定。

1.2.4 尿 NAG、AGT 水平检测 采用酶联免疫吸附法检测尿 NAG、AGT 水平,收集受试者清晨尿液 10 ml,离心(3 000 r/min,20 min)获得上清;ELISA 操作步骤同 Kim-1 检测。

1.3 统计学方法 本研究所得数据采用 SPSS 22.0 软

件进行处理。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,两组比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析采用 LSD- t 检验。计数资料以率(%)表示,比较采用 χ^2 检验。此外,采用 ROC 分析法对早期/临床 2 型糖尿病肾病的预测/诊断价值进行分析。采用 logistic 回归法对 2 型糖尿病肾病的危险影响因素进行分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组受试者血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平比较

三组血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平整体比较差异均有统计学意义($P<0.05$),EDN 组及 DN 组血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平明显高于 NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$),且 DN 组高于 EDN 组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 三组受试者血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	Kim-1(ng/ml)	NAG($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AGT($\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{Cr}$)
NC 组	45	4.63 \pm 0.73	396.79 \pm 42.58	20.99 \pm 11.04
EDN 组	45	7.73 \pm 1.22 ^a	752.15 \pm 58.37 ^a	101.75 \pm 20.34 ^a
DN 组	45	12.63 \pm 1.30 ^{ab}	1 106.79 \pm 81.75 ^{ab}	253.05 \pm 32.06 ^{ab}
F 值		596.003	1 426.092	1 196.497
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与 NC 组相比,a $P<0.05$;与 EDN 组相比,b $P<0.05$ 。

2.2 血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 对早期 2 型糖尿病肾病预测/诊断价值分析 以本研究 2 组资料(EDN,NC)为样本,分别以血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 等三指标做早期 2 型糖尿病肾病的预测分析(ROC 分析),再以 3 指标做联合预测的 ROC 分析。研究结果显示:血清 Kim-1 指标:预测阈值为 6(≥ 6 ng/ml),在此阈值点,预测的灵敏度 Se = 0.684,特异度 Sp = 0.604;尿 NAG 指标:预测阈值为 600(≥ 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$),在此阈值点,预测的灵敏度 Se = 0.713,特异度 Sp = 0.556;尿 AGT 指标:预测阈值为 60(≥ 60 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{Cr}$),在此阈值点,预测的灵敏度 Se = 0.706,特异度 Sp = 0.522。再以混合并

联方式建立早期 2 型糖尿病肾病联合预测法:以血清 Kim-1 达到阈值点 (≥ 6 ng/ml), 并且尿 NAG 或尿 AGT 至少有一个达到其阈值点 (尿 NAG ≥ 600 pg/ml 或尿 AGT ≥ 60 $\mu\text{g/g} \cdot \text{Cr}$) (否则进行再次诊断, 再次诊断后若不达阳性即判为阴) 作为联合预测的阈值, 联合预测法的 ROC 分析结果显示: 预测的灵敏度 $\text{Se} = 0.902$, 特异度 $\text{Sp} = 0.789$, ROC 曲线 $\text{AUC} = 0.892$, 见图 1。

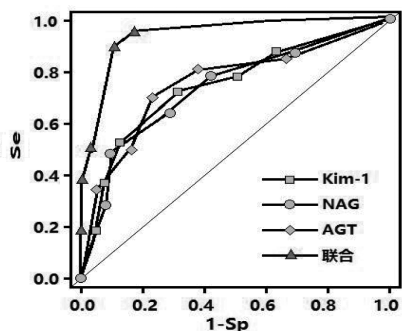


图 1 血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 对早期 2 型糖尿病肾病预测价值的 ROC 曲线

2.3 血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 对临床 2 型糖尿病肾病预测/诊断价值分析 以本研究 2 组资料 (EDN、DN) 为样本, 分别以上述单独或联用进行临床 2 型糖尿病肾病的诊断 ROC 分析。结果显示: 血清 Kim-1 指标: 诊断阈值为 10 ng/ml, 在此阈值点, 诊断的灵敏度 $\text{Se} = 0.702$, 特异度 $\text{Sp} = 0.616$ 。尿 NAG 指标: 诊断阈值为 900 pg/ml, 在此阈值点, 诊断的灵敏度 $\text{Se} = 0.615$, 特异度 $\text{Sp} = 0.577$ 。尿 AGT 指标: 诊断阈值为 160 $\mu\text{g/g} \cdot \text{Cr}$, 在此阈值点, 诊断的灵敏度 $\text{Se} = 0.718$, 特异度 $\text{Sp} = 0.597$ 。再以混合并联方式建立联合诊断法: 以血清 Kim-1 达到阈值点 (≥ 10 ng/ml), 并且尿 NAG 或尿 AGT 至少有一个达到其阈值点 (否则进行再次诊断, 再次诊断后若不达阳性即判为阴) 作为联合诊断的阈值, 联合诊断法的 ROC 分析结果显示: 临床 2 型糖尿病肾病诊断的灵敏度 $\text{Se} = 0.896$, 特异度 $\text{Sp} = 0.853$, ROC 曲线 $\text{AUC} = 0.907$, 见图 2。

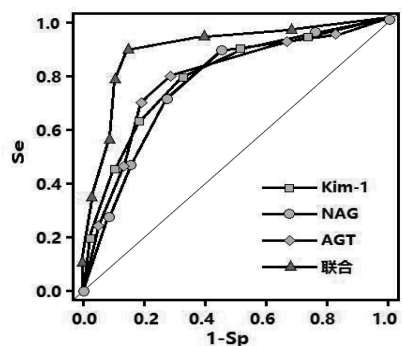


图 2 血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 对临床 2 型糖尿病肾病诊断价值的 ROC 曲线

2.4 Kim-1、NAG、AGT 水平对 2 型糖尿病肾病的影响

分析 以本研究全部资料 (NC、EDN、DN) 为样本, 以是否 2 型糖尿病肾病为应变变量 (赋值 1=是, 0=否), 建立非条件 Logistic 回归模型。自变量即取 Kim-1、NAG、AGT 等 3 个指标, 并进行适当的两分类转化 (计算各指标全部样本的均值, 然后对各样本进行转化赋值: 1 \geq 均值, 0 $<$ 均值)。Kim-1、NAG、AGT 等 3 个指标水平的异常增加均是影响 2 型糖尿病肾病发生风险的危险因素 ($P < 0.05$), OR 值均在 1.5 以上, 见表 3。

表 3 Kim-1、NAG、AGT 与 2 型糖尿病肾病关系的 logistic 分析

因素	回归系数	标准误差	Wald χ^2 值	P 值	OR 值	OR95%CI
Kim-1	0.605	0.246	6.038	0.014	1.832	1.130~2.969
NAG	0.407	0.207	3.875	0.049	1.503	1.002~2.255
AGT	0.701	0.276	6.465	0.011	2.016	1.174~3.461

3 讨论

糖尿病肾病为糖尿病常见的并发症之一, 呈慢性进行性进展, 导致终末期肾功能衰竭, 也是造成糖尿病患者死亡的重要原因之一^[9]。糖尿病肾病为慢性病程, 可由早期出现微量白蛋白进展为大量白蛋白尿, 当出现大量蛋白尿时, 肾小球功能将呈不可逆性损伤。国外一项研究表明^[10], 糖尿病肾病患者在 6 年、10 年内终末期肾衰发生率分别为 25%、50%, 且伴有蛋白尿患者的平均生存期大约为 10 年左右。目前临床发现^[11], 糖尿病肾病经超声波或静脉肾盂造影等检查发现肾脏体积增大, 约比正常人大 30% 左右; 而经功能性检查发现肾小球的滤过率增高, 且肾血浆流量计滤过分数均增高, 可比正常人群高 30% 左右; 病理结果显示肾小球伴有结节性硬化, 出现肾小球塌陷, 电镜下可出现系膜区伴有基膜样物质沉积。糖尿病肾病机制尚未完全清楚, 但是积极探索其机制, 做好早期预防, 不仅可减少患者痛苦及其家庭经济负担, 还可提高患者生活质量^[12]。目前, 临床中主要测量尿微量白蛋白, 评定患者是否伴有肾功能损害, 但是尿微量白蛋白易受个人体位、运动、血压、饮食等因素影响其检测水平, 因此, 寻找更为准确的相关因子具有重要的意义。

Kim-1 为一种跨膜糖蛋白, 其主要表达于人类的肾脏组织, 定位于肾损伤后再生的去分化近端小管上皮细胞的腔面和纤维化及炎症区域^[13]。Kim-1 在正常组织不表达或极低表达, 但在肾脏局部缺血或肾毒性损害时, 在金属基质蛋白酶的作用下, 其可在跨膜区域裂解为可溶性片段释放入血, 因而逐渐作为肾损伤的生物标志^[14]。本次研究结果显示, EDN 组及 DN 组 Kim-1 水平明显高于 NC 组 ($P < 0.05$); 而 DN 组 Kim-

1 水平明显高于 EDN 组 ($P<0.05$)。结果说明 Kim-1 在肾损伤后可出现升高,可能与其参与肾小管上皮细胞的去分化及增殖有关,能够促进肾小管上皮的修复。

NAG 为一种高分子糖蛋白酸性水解酶,可大量存在于肾小管上皮细胞溶酶体中。血浆中 NAG 不能通过肾小球,因而尿 NAG 主要来源于肾小管上皮细胞内溶酶体的释放,因而其可作为反映肾小管损伤的指标之一。研究发现^[15],尿 NAG 检测可提示有肾功能损害,并且较为敏感,且其不易受其他因素影响,主要与肾小管、肾间质损伤密切相关。高血糖不仅可造成肾损伤,同时可造成肾小管损伤。本次研究结果显示,EDN 组及 DN 组 NAG 水平明显高于 NC 组 ($P<0.05$),而 DN 组患者 NAG 水平明显高于 EDN 组 ($P<0.05$)。说明当患者伴有肾脏损害时,可出现 NAG 水平升高,因而 NAG 可成为预测是否伴有肾损害的一项指标。

AGT 为目前 RAS 系统中发现的唯一作用底物,血液循环中 AGT 多由肝脏产生,少部分由脑、肾、心等组织分泌。研究发现^[16],AGT 不能通过肾小球滤过屏障,因此尿中 AGT 由肾脏分泌,可经肾素及血管紧张素转换酶作用生成血管紧张素,而过多的可经尿排出。本次研究结果显示,EDN 组及 DN 组 AGT 水平明显高于 NC 组 ($P<0.05$),而 DN 组患者 AGT 水平明显高于 EDN 组 ($P<0.05$)。结果说明,AGT 水平随着肾脏损伤程度升高而升高,可能与高血糖协同促进 AGT 表达有关,高血糖可促进系膜细胞血管紧张素的分泌,正反馈调节 AGT 的表达,进而使得尿 AGT 水平升高。

本次研究结果显示,Kim-1、NAG、AGT 检测对 2 型糖尿病肾病(或早期 2 型糖尿病肾病)的预测价值 AUC 处于 0.50~0.70 附近,但联合检测 Kim-1、NAG、AGT 水平,可明显提高对 2 型糖尿病肾病的诊断价值,AUC 为 0.80~0.90 附近;Kim-1、NAG、AGT 水平异常可增加 2 型糖尿病肾病发生的风险 ($P<0.05$),说明 Kim-1、NAG、AGT 等 3 指标,可较好地评估糖尿病患者是否伴有肾脏损害,定期检测 Kim-1、NAG、AGT 水平,有助于早期发现肾脏疾病,及早进行干预治疗,改善患者预后。

综上所述,2 型糖尿病肾病患者血清 Kim-1、尿 NAG、AGT 水平呈高表达,由于其收集较方便、快速等优点,因此 Kim-1、NAG、AGT 可能成为预测糖尿病肾病发生的理想指标,对于提高临床诊断具有积极的

意义。

参考文献

- [1] 李艳丽,廖勇敢,李晓雯,等. 糖尿病肾病发病的危险因素分析[J]. 实用预防医学,2017,24(2):133-136.
- [2] 王洁,何媛,于珮,等. 糖尿病肾病的相关危险因素分析[J]. 国际内分泌代谢杂志,2015,35(3):153-157.
- [3] Shaheer AK,Tharayil JK,Krishna PW. A Comparative study of high sensitivity C-reactive protein and metabolic variables in type 2 diabetes mellitus with and without nephropathy[J]. J Clin Diagn Res,2017,11(9):BC01-BC04.
- [4] 赵昔良,叶益聪,张抒扬,等. 美国糖尿病学会新版糖尿病诊断标准对择期冠状动脉造影患者糖代谢异常的筛查意义[J]. 中华内科杂志,2015,54(4):302-306.
- [5] 黄炎,章爽,黄伟,等. 肾损伤分子-1 在糖尿病肾脏早期损伤中的诊断价值研究[J]. 中国实验诊断学,2017,21(8):1299-1302.
- [6] 袁国忠,吴建军,黄勇坚,等. 尿微量清蛋白和尿 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶对糖尿病肾病的诊断意义[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(10):1410-1411.
- [7] 罗娅,郑国波,杨雪峰,等. 2 型糖尿病患者血清中壬基酚负荷的检测及分析[J]. 实用医学杂志,2016,32(13):2227-2230.
- [8] 热孜万古力·阿帕尔,吴红. 2 型糖尿病肾病患者检测血清基质金属蛋白酶-10 的意义[J]. 现代检验医学杂志,2016,31(3):111-113.
- [9] 周娟,胡文杰,李培芳,等. 糖尿病肾病肾功能衰竭患者血清胆红素与左室舒张功能的关系[J]. 广东医学,2017,38(1):115-117.
- [10] Lee YH,Kim KP,Kim YG,et al. Clinicopathological features of diabetic and nondiabetic renal diseases in type 2 diabetic patients with nephrotic-range proteinuria[J]. Medicine (Baltimore),2017,96(36):e8047.
- [11] Joly D,Choukroun G,Combe C,et al. Glycemic control according to glomerular filtration rate in patients with type 2 diabetes and overt nephropathy: a prospective observational study [J]. Diabetes Res Clin Pract,2015,108(1):120-127.
- [12] 马海建,巫冠中. 糖尿病肾病发病分子机制[J]. 现代生物医学进展,2014,14(16):3184-3187.
- [13] Miao J,Friedman E,Wu AHB,et al. Clinical utility of single molecule counting technology for quantification of KIM-1 in patients with heart failure and chronic kidney disease [J]. Clin Biochem,2017,50(16-17):889-895.
- [14] 林永梅,陈映,陈姮熹,等. Kim-1、PAI-1 及 Hsp72 联合检测对糖尿病早期肾损害的诊断价值[J]. 西南国防医药,2017,27(3):247-250.
- [15] 刘培培,马飞,李兴翠,等. 尿 N 乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶、β2 微球蛋白对 2 至 4 期慢性肾病患者的临床意义[J]. 标记免疫分析与临床,2015,22(4):262-264.
- [16] 刘品力,陈燕玲. ACE 及 AGT 基因多态性与糖尿病肾病发病风险的关系[J]. 中国老年学杂志,2015,27(15):4177-4179.

收稿日期:2018-04-29