

视黄醇结合蛋白4检测在营养性疾病及肝肾损害检测中的临床应用*

孟俊^a, 顾志冬^a, 陈呢喃^b, 张冬青^b

(上海交通大学医学院 a. 附属瑞金医院检验科; b. 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

摘要:视黄醇结合蛋白(retinol binding protein, RBP)是一种分泌型视黄醇结合蛋白,主要合成于肝脏,广泛分布于人体血液、尿液等体液中的视黄醇(VitA)运载蛋白,在协助 VitA 发挥生理功能中起到关键作用^[1]。最新研究表明:RBP4 是一种新的脂肪细胞因子,参与胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的发生,与糖尿病肾病、营养性疾病等的发展存在着一定的相关性。这一发现使得 RBP4 更加受到人们的重视。该文就 RBP4 的生理功能,在肝肾疾病、糖尿病等各类疾病方面的应用以及新型临床检测方法作一综述。

关键词:视黄醇结合蛋白4;营养性疾病;肝肾损害

中图分类号:R531.3;R381 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2015)01-001-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.001

Assessment of Retinol Binding Protein 4 in Nutritional Diseases and Liver or Kidney Diseases

MENG Jun^a, GU Zhi-dong^a, CHEN Ninan^b, ZHANG Dong-qing^b

(a. Department of Clinical Laboratory, Ruijin Hospital; b. Shanghai Institute of Immunology, Medical School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: Retinol binding protein 4 (RBP4) was a class of secreting protein, mainly synthesized by the liver, widely distributed in the human body blood, urine and other body fluids. It plays an important role in assisting the physiological function of vitamin A^[1]. Recent research shows that RBP4 was a new kind of adipocytokine, participated in insulin resistance and occurrence of type 2 diabetes, and had a closed relationship with diabetic nephropathy, nutritional disease. This article describes the function of RBP4, review the relationship between RBP4 and nutritional or other type of diseases, and new clinical detection method with RBP4.

Keywords: retinol binding protein 4; nutritional diseases; liver and kidney damage

视黄醇结合蛋白 (retinol binding protein, RBP)是一种小分子蛋白质,是体内将视黄醇(VitA)由肝脏运转至各个靶组织中,协助视黄醇储存、代谢及发挥生理功能的特异性运载蛋白。检测血和尿中 RBP 水平,对肾脏、肝脏及营养状况等疾病的诊断和治疗有着重要意义。2005 年美国哈佛大学医学院 Yang 等^[2]首先发现 RBP4,随后 RBP4 在临床的各个领域均取得显著的研究成果。RBP4 作为一种新的循环性脂肪细胞因子,能够抑制肌肉组织中的胰岛素信号通路,促进糖异生,增加肝糖输出,从而导致胰岛素抵抗的发生,增加 2 型糖尿病(T2DM)的发病风险。更有研究表明 RBP4 是反映肾脏、肝脏及营养性疾病发展及转归的敏感指标。

1 RBP4 的理化特性 RBP4 属于 Lipocalin 超家

族成员,是一种单一肽链的蛋白质,包括 181 个氨基酸残基;分子量约为 21 KD,等电点 pH4.4~4.8,沉降系数 3S,半衰期 3~12 h,合成率为 5 mg/kg/天^[3]。根据序列同源性将视黄醇类蛋白分成五类:血浆视黄醇结合蛋白(RBP),光受体视黄醇类结合蛋白(IRBP),胞内视黄醇结合蛋白(CRBP),胞内视黄酸结合蛋白(CRABP)和胞内视黄醛结合蛋白(CRALBP)。RBP4 主要来源于肝细胞,其次为脂肪组织,广泛分布于人体血清、尿液及其他体液中,属于分泌型视黄醇类蛋白。RBP4 合成后,受到全反式视黄醇刺激分泌出来,再在血液与甲状腺素运载蛋白(transthyretin, TTR)以 1:1 的比例结合形成大分子复合物,联合转运视黄醇,不易被肾脏滤过;当视黄醇转运到靶细胞后,复合物解体,游离的 RBP4 被肾小球滤出,其中绝

* 基金项目:本课题系国家自然科学基金面上项目(31270963);上海市科委重点连续资助项目(10JC1408500);上海市科委生物医药领域科技支撑项目 2014 年度“科技创新行动计划”项目(14431903700);上海交通大学医学院附属瑞金医院优秀项目(8003)。

作者简介:孟俊(1982-),男,在读硕士,主管技师,研究方向:免疫学相关检测, E-mail: mjun2004@126.com。

通讯作者:张冬青, E-mail: dqzhang1333@163.com。

大部分在肾小管又被重吸收并分解,供组织利用,仅有少量从尿中排出^[4]。RBP4 功能障碍会导致视黄醇运输及代谢异常,从而引发各种疾病,影响上皮和骨组织的生长、分化、繁殖与胚胎发育。

2 RBP4 的临床应用

2.1 RBP4 与肾脏 血 RBP4 的排出量可作为反映肾小球滤过功能受损的敏感指标。在尿液中 RBP 稳定性较高,优于 β 2-微球蛋白(β 2-MG)^[5]。在原发性肾小管疾病、肾病综合征、糖尿病肾病及狼疮性肾炎等的早期诊断及疗效判断均有重要意义。而尿 RBP4 可反映肾小管的早期损伤,且灵敏度比 Cr, BUN, NAG 高。成海恩等^[6]发现,血清 RBP4 与 Urea, Cr 和 Cys-C 均呈明显正相关,表明在肾功能受损患者中, RBP4 同 Urea, Cr 和 Cys-C 等指标一样,能较好地反映肾功能受损情况。当肾小球发生损伤,滤过率下降时,血中 RBP4 的含量将上升;而肾小管损伤,重吸收能力受损时,尿中 RBP4 增高,且均与疾病严重程度相关。故同时检测血、尿 RBP4 含量有助于对肾损伤部位及严重程度的判断。

2.2 RBP4 与肝脏 肝功能损害会引起体内 RBP4, PA 含量降低, RBP4 和 PA 的降低程度与肝功能损害呈负相关性。而肝病恢复期,血清 RBP4 水平有所上升。故检测血清 RBP4 水平可了解肝功能损害及恢复情况,对肝病的诊断,损伤程度的评估,以及预后有参考价值^[7]。Alkhoury 等^[8]研究发现,在非酒精性脂肪肝中,血 RBP4 的降低与身体质量指数(BMI)或胰岛素抵抗并不相关,而是主要与肝细胞的损伤相关。此外,对于肥胖儿童, RBP4 可能是反映其肝内脂质含量的一个良好血清学指标^[9]。

2.3 RBP4 与 2 型糖尿病(DM2) 2 型糖尿病与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)有关,而 Graham 等^[10]发现,脂肪组织特异性葡萄糖转运子 4 (lucose transporter 4, Glut4)基因敲除小鼠可产生继发性的肌肉及肝脏的胰岛素抵抗,并且其血清 RBP4 水平明显升高。众多研究表明 RBP4 参与了 DM2 的发病, RBP4 血中含量的升高很可能是引起胰岛素抵抗的原因。Esteve 等^[11]认为脂肪细胞产生分泌病脂肪细胞因子,如 RBP4 与胰岛素抵抗、2 型糖尿病以及心血管疾病有关,其水平上升会增加患病的风险。然而,另外一些学者^[12,13]通过研究,认为 2 型糖尿病患者血中 RBP4 的上升,是由于糖尿病过程中并发了肾损伤,或是与糖耐量的受损相关^[14],而并非 RBP4 直接导致了胰岛素抵抗。Shim 等^[15]和 Ribell-Madsen 等^[16]的研究也都认为 RBP4 与胰岛素抵抗不具有显著的相关性。

2.4 RBP4 与营养状况评估 葛青玮^[17]通过对 108 例新生儿血清中 RBP4, PA 的检测,发现两者在营养不良早期就明显降低,可以检出早期营养不良和亚临床营养不良,且其水平先于体重、皮下脂肪等人体测量指标变化而变化,故可作为判断营养的敏感指标。检测血清 RBP4 能够及早发现营养不良,及时补充适当营养,提高新生儿生存质量,保证生长发育。此外,由于 RBP4 半衰期短,当营养不良纠正后短时间内就可回升,较为敏感,能迅速反映治疗效果。郑雪莲等^[18]的研究认为, PA, TRF 和 RBP 测定可敏感地反映危重病人应用肠外营养支持的效果。

2.5 RBP4 与其他相关疾病 Rhie 等^[19]的研究指出,对于儿童和青少年群体,其血清中 RBP4 的含量与机体脂质含量及青春期发育有相关性,而与胰岛素抵抗的关系并不显著。血 RBP4 水平和个体发育程度、BMI 及三酰甘油有关,较胖者及发育较成熟者血 RBP4 较高。Park 等^[20]发现血 RBP4 与代谢综合征之间有相关性,尤其是在患者合并有高血压的情况下,病人体内 RBP4 的水平较高。

3 RBP4 的检测方法 测定血、尿中 RBP4 的方法较多,传统的方法包含酶联免疫法(ELISA)、放射免疫分析法、免疫比浊法以及电泳等。这些方法均存在着耗时长,操作不方便等缺点。张桂生等建立的双抗体夹心酶免疫测定法,灵敏度 0.4 ng/ml;批内变异系数(Coefficient of Variation, CV) 6.3%,批间 CV 14.1%;工作范围 0.4~50 ng/ml。该方法灵敏度高,尿液在测定前不需浓缩,且工作范围较宽。范列英等改进的 I¹²⁵ 标记法,使其放化纯度为 95.4%,标记率 81.4%,标准曲线范围 0~320 mg/L,批内 CV 4.64% ($n=20$);批间 CV 5.74% ($n=8$),平均回收率 98.62%,该方法可同时用于血、尿样品的测定。蔡晔芬等^[21]对免疫透射比浊法测定 RBP 进行技术性能评价:正常值和高值的批内 CV 为 2.3% 和 1.7%,批间 CV 为 3.9% 和 3.1%,日间 CV 为 4.5% 和 3.8%,总 CV 为 5.5% 和 4.5%;线性上限可达 120 mg/L;胆红素浓度低于 442 μ mol/L、血红蛋白浓度低于 5 g/L 时对测定无显著干扰($P>0.05$);平均回收率为 99.2%。该方法符合临床检验的要求,且自动化程度高,操作简便,检测速度快,值得临床推广。而随着技术发展,新型的检测方法如免疫传感器和胶体金免疫层析法等也在快速发展。

4 小结与展望 综上所述, RBP4 作为一种分泌蛋白,在人体营养代谢、胰岛素抵抗、高血压、炎症等过程中,尤其是在肾脏疾病的诊断、治疗中具有不可替代的关键性作用。我实验室分别收集肾脏

疾病、营养不良、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化以及儿科病人进行血清与尿液 RBP4 的检测,发现其敏感度和特异度都优于常规检测项目。在肝脏疾病中,RBP4 的下降能够反映肝脏的损伤,且下降程度与损伤的程度相关。血中 RBP4 水平还能反映机体营养状况,营养不良时,RBP4 将下降。且由于 RBP4 半衰期短,介入治疗后能迅速回升,所以能够灵敏反映治疗效果。而 RBP4 与糖尿病、胰岛素抵抗之间的关系,各方观点不一:有认为 RBP4 诱发了胰岛素抵抗,从而导致糖尿病;也有认为其血中含量的上升是由于糖尿病的过程中并发的肾脏疾病。但都认可 2 型糖尿病患者体内 RBP4 含量上升这一客观表现。RBP4 与糖尿病、代谢综合征、肥胖以及心血管疾病之间是否存在联系,存在怎样的联系,有待进一步的证实。要完善 RBP4 在临床诊断中的应用,或使 RBP4 成为新的治疗靶位,还需要更多深入的研究。

参考文献:

- [1] 郭晓红,储明星,周忠孝. 视黄醇结合蛋白及其基因的分子生物学[J]. 遗传,2004,26(2):257-262.
Guo XH,Chu MX,Zhou ZX. Progress retinol-binding protein and their gene[J]. Hereditary,2004,26(2):257-262.
- [2] Yang Q,Graham TE,Mody N,et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes [J]. Nature,2005,436(7049):356-362.
- [3] 彭彦梦,孟家和,周度金,等. 视黄醇结合蛋白的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(8):736-737,740.
Peng YM,Meng JH,Zhou DJ,et al. Research Progress of retinol-binding protein[J]. International Journal of Laboratory Medicine,2007,28(8):736-737,740.
- [4] 贾伟平. 视黄醇结合蛋白 4 与糖尿病[J]. 临床内科杂志,2008,25(3):155-157.
Jia WP. Retinol-binding protein 4 and diabetes[J]. Journal of Clinical Internal Medicine,2008,25(3):155-157.
- [5] Blumsohn A,Morris BM,Griffiths H,et al. Stability of β 2-microglobulin and retinol-binding protein at different values of pH and temperature in normal and pathological urine [J]. Clin Chim Acta,1990,195(3):133-137.
- [6] 成海恩,高嵩,吴先国,等. 血清视黄醇结合蛋白与尿素、肌酐及半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的相关性探讨[J]. 检验医学,2010,25(7):567-568.
Cheng HE,Gao S,Wu XG,et al. Correlation of Serum Retinol-Binding Protein,Urea,Creatinine and Cystatin C[J]. Lab Med,2010,25(7):567-568.
- [7] Kawaguchi R,Yu JM,Wiita P,et al. An essential ligand-binding domain in the membrane receptor for retinol-binding protein revealed by large-scale mutagenesis and a human polymorphism[J]. Journal of Biological Chemistry,2008,283(22):15160-15168.
- [8] Alkhouiri N,Lopez R,Berk M,et al. Serum retinol-binding protein 4(RBP4) levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Clin Gastroenterol,2009,43(10):985-989.
- [9] Romanowska A,Lebensztejn DM,Skiba E,et al. Retinol binding protein-4 as a serum biomarker of intrahepatic lipid content in obese children-preliminary report [J]. Acta Biochim Pol,2011,58(1):35-38.
- [10] Graham TE,Yang Q,Blüher M,et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean,obese, and diabetic subjects[J]. N Engl J Med,2006,354(24):2552-6253.
- [11] Esteve E,Ricart W,Fernández-Real JM. Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin [J]. Diabetes Care,2009,32(Suppl 2):S362-367.
- [12] Henze A,Frey SK,Raila J,et al. Evidence that kidney function but not type 2 diabetes determines retinol-binding protein 4 serum levels [J]. Diabetes,2008,57(12):3323-3326.
- [13] Murata M,Saito T,Otani T,et al. An increase in serum retinol-binding protein 4 in the type 2 diabetic subjects with nephropathy [J]. Endocr J. 2009,56(2):287-294.
- [14] Chavez AO,Coletta DK,Kamath S,et al. Retinol-binding protein 4 is associated with impaired glucose tolerance but not with whole body or hepatic insulin resistance in Mexican Americans [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2009,296(4):758-764.
- [15] Shim CY,Park S,Kim JS,et al. Association of plasma retinol-binding protein 4, adiponectin, and high molecular weight adiponectin with insulin resistance in non-diabetic hypertensive patients [J]. Yonsei Med J,2010,51(3):375-384.
- [16] Ribel-Madsen R,Friedrichsen M,Vaag A,et al. Regulatory mechanisms and impact of circulating and tissue expression levels on insulin secretion and action [J]. Diabetes,2009,58(1):54-60.
- [17] 葛青玮. 视黄醇结合蛋白、前白蛋白在新生儿营养评价中的意义. 检验医学[J]. 2007,22(2):198-199.

- [6] Cantarelli V, Cavalcante B, Pilger DA, et al. Rapid detection of Van genes in rectal swabs by real time PCR in Southern Brazil[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2011, 44(5):631-632.
- [7] Fang H, Ohlsson AK, Jiang GX, et al. Screening for vancomycin-resistant *Enterococci*: an efficient and economical laboratory-developed test[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(3):261-265.
- [8] 冯作化. 医学分子生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001:162-213.
- Feng ZH. Medical Molecular Biology[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2001:162-213.
- [9] J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 429-455, 487-509, 981-1073.
- Sambrook J, Russell DM. Molecular Cloning A Laboratory Manual[M]. 3th Ed. Huang BT, Translated. Beijing: Science Press, 2002: 429-455, 487-509, 981-1073.
- [10] Lim SK, Tanimoto K, Tomita H, et al. Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(10):6544-6553.
- [11] Liu Y, Cao B, Gu L, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococci* in a Chinese hospital between 2003 and 2009[J]. Microb Drug Resist, 2011, 17(3):449-455.
- [12] Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, et al. Improved pulsed-field gel Electrophoresis for typing vancomycin-resistant *Enterococci*[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(11):4242-4245.
- [13] Zhang YS, Yakus MA, Graviss EA, et al. Pulsed-field gel Electrophoresis study of *Mycobacterium abscessus* isolates previously affected by DNA degradation[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12):5582-5587.
- [14] Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6):1963-1971.
- [15] Nyren P. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity[J]. Anal Biochem, 1987, 167(2):235-238.
- [16] Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate[J]. Science, 1998, 281(5375):363, 365.
- [17] 马永平, 易发平, 宋方洲, 等. 焦磷酸测序技术及其在分子生物学领域的应用[J]. 国外医学(分子生物学分册), 2003, 25(2):115-118.
- Ma YP, Yi FP, Song FZ, et al. Pyrosequencing and its application in molecular biology[J]. Foreign Medical Science(Molecular Biology Section), 2003, 25(2):115-118.
- [18] Schnitzler P, Schulz K, Lampson C, et al. Molecular analysis of linezolid resistance in clinical *Enterococcus faecium* isolates by polymerase chain reaction and pyrosequencing[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(1):121-125.
- [19] Frye JG, Lindsey RL, Rondeau G, et al. Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information database[J]. Microb Drug Resist, 2010, 16(1):9-19.
- [20] Cassone M, del Grosso M, Pantosti A, et al. Detection of genetic elements carrying glycopeptide resistance clusters in *Enterococcus* by DNA microarrays[J]. Mol Cell Probes, 2008, 22(3):162-167.

收稿日期:2014-07-10

修回日期:2014-11-08

(上接3页)

- Ge QW. The significance of retinol binding protein and prealbumin in the neonatal nutritional evaluation[J]. Lab Med, 2007, 22(2):198-199.
- [18] 郑雪莲, 李玉珍, 朱刚, 等. 血清前白蛋白、转铁蛋白及视黄醇结合蛋白在危重病人应用肠外营养支持中的意义[J]. 海南医学, 2009, 20(5):278-279.
- Zheng XL, Li YZ, Zhu G, et al. Significance of serum prealbumin, transferrin, and retinol binding protein in the critical patients with parenteral nutrition support[J]. Hainan Medical Journal, 2009, 20(5):278-279.
- [19] Rhie YJ, Choi BM, Eun SH, et al. Association of serum retinol binding protein 4 with adiposity and pubertal development in Korean children and adolescents[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(6):797-802.
- [20] Park CS, Ihm SH, Park HJ, et al. Relationship between plasma adiponectin, retinol-binding protein 4 and uric acid in hypertensive patients with metabolic syndrome[J]. Korean Circ J, 2011, 41(4):198-202.
- [21] 蔡晔芬, 黄清松. 免疫透射比浊法测定视黄醇结合蛋白的技术性能评价[J]. 宜春学院学报, 2011, 33(4):74-75.
- Cai YF, Huang QS. Performance evaluation of immune transmission turbidity for retinol binding protein[J]. Journal of Yichun College, 2011, 33(4):74-75.

收稿日期:2014-02-28

修回日期:2015-01-01