

联合检测视黄醇结合蛋白和膜联蛋白 A2 水平 对糖尿病肾病早期诊断的意义*

阿地拉·阿布里孜¹, 王霞², 屈晓威³ (1. 新疆维吾尔自治区人民医院肾病科, 乌鲁木齐 830001;
2. 新疆喀什地区第一人民医院第二门诊部, 新疆喀什 844000;
3. 延安大学附属医院东关分院, 陕西延安 716000)

摘要:目的 探讨检测视黄醇结合蛋白和膜联蛋白 A2 水平对糖尿病患者早期肾损伤诊断的意义。方法 选取 80 例糖尿病肾病患者, 以 24-UAER 含量为标准由低到高将患者分为 A 组(25 例)、B 组(26 例)和 C 组(29 例), 另选体检者 25 例作为对照组(NC), 测定所有研究对象糖化血红蛋白(HbA1c)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、尿酸(UA)和视黄醇结合蛋白(RBP)水平。实时荧光定量 PCR 检测膜联蛋白 A2(AnnexinA2)表达水平。结果 ①病例组(A+B+C)的 HbA1c, Scr, BUN, UA 和 RBP 水平均高于对照组($t=4.64\sim13.65$, 均 $P<0.05$); A 组和 B 组 HbA1c, Scr, BUN 和 UA 水平比较差异无统计学意义($t=0.31\sim1.25$, 均 $P>0.05$), 而 RBP 水平差异有统计学意义($t=15.26$, $P<0.05$)。A 组和 C 组 Scr, BUN, UA 和 RBP 水平比较差异有统计学意义($t=5.26\sim25.33$, 均 $P<0.05$)。B 组和 C 组 Scr, BUN, UA 和 RBP 水平比较差异也有统计学意义($t=4.02\sim18.33$, 均 $P<0.05$); ②病例组(A+B+C) AnnexinA2 表达水平 1.58 ± 0.05 ng/ml, 对照组为 0.13 ± 0.01 ng/ml, 两组比较差异有统计学意义($t=18.45$, $P<0.05$)。病例组 A 组 0.12 ± 0.01 ng/ml, B 组 1.35 ± 0.06 ng/ml, C 组 1.88 ± 0.07 ng/ml, 两两比较差异有统计学意义($t=13.45\sim24.25$, 均 $P<0.05$)。③糖尿病肾病组(A+B+C)患者 RBP 水平与 AnnexinA2 表达程度之间存在正相关($r=0.95$, $P<0.01$)。结论 联合检测血清视黄醇结合蛋白和膜联蛋白 A2 是反映糖尿病患者早期肾病微血管病变的敏感指标。

关键词:糖尿病肾病; 视黄醇结合蛋白; 膜联蛋白 A2

中图分类号: R587.2; R392.11 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)05-118-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.033

Significance of Combined Detection of Serum Retinol-Binding Protein and AnnexinA2 in Diabetic Nephropathy

ADILA·Abulizi¹, WANG Xia², QU Xiao-wei³ (1. Department of Nephropathy, the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China; 2. the Second Section for Outpatients of People's Hospital, Xinjiang Kashi 844000, China; 3. Dongguan Branch of the Affiliated Hospital of Yan'an University, Shaanxi Yan'an 716000, China)

Abstract: **Objective** To explore the significance of detection serum Retinol-Binding Protein and AnnexinA2 in diabetic nephropathy. **Methods** According to 24-UAER level, 80 diabetic patients with suspected DN were divided into three groups, that was A (25 cases), B (26 cases) and C (29 cases) group, and control group (NC) was 25 cases. HbA1c, BUN, Scr, UA and RBP levels were detected by the standard method. The expression level of Annexin A2 were detected by real-time PCR. **Results** There were obvious differences of HbA1c, BUN, Scr, UA and RBP levels among three groups and NC group ($t=4.64\sim13.65$, $P<0.05$). To HbA1c, BUN, Scr and UA, no differences between A group and B groups ($t=0.31\sim1.25$, $P>0.05$), there were differences of RBP ($t=15.26$, $P<0.05$). To HbA1c, BUN, Scr UA and RBP, there were differences between A groups and C groups ($t=5.26\sim25.33$, $P<0.05$), there were the same results between B groups and C groups ($t=4.02\sim18.33$, $P<0.05$). To expression level of AnnexinA2 there were differences among three group and NC group ($t=13.45\sim24.25$, $P<0.05$). There exist positive correlation between the expression of AnnexinA2 and RBP level ($r=0.95$, $P<0.01$). **Conclusion** Combined detection of serum RBP and expression level of AnnexinA2 may be a sensitive and early phase indicator for impairment of renal function for diagnosis of diabetic nephropathy.

Keywords: diabetic nephropathy(DN); retinol-binding protein; annexinA2

糖尿病肾病(DN)是糖尿病微血管并发症之一, 如果不及时发现和纠正肾小球过滤和肾小管重吸收功能的改变, 患者病情将随病程的延长而加重, 最终将近一半的患者死于终末期肾病^[1]。以往

实验室评价肾功能的指标敏感性较差, 近年来发现视黄醇结合蛋白(RBP)水平与早期肾小管损伤有直接联系。另外膜联蛋白 A2(AnnexinA2)基因作为促进毛细血管形成的重要因子, 在糖尿病微血

* 作者简介: 阿地拉·阿布里孜(1974-), 女, 维族, 硕士学位, 副主任医师, 主要从事血液透析患者诊疗。

通讯作者: 屈晓威(1970-), 男, 大学本科, 学士学位, 副主任检验师, E-mail: 27806505@qq.com。

管病变和新生微血管形成中的作用越来越被学术界认可。故本研究选取不同程度糖尿病(DN)病人及健康对照者共105例,联合检测视黄醇结合蛋白(RBP)和 AnnexinA2 基因水平,以探讨两指标作为 DN 患者早期肾损伤的诊断价值。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2015年下半年门诊及住院治疗的DN患者80例,均符合WHO糖尿病1999年的诊断和分型标准。根据清蛋白排泄率将糖尿病患者分为单纯糖尿病A组(24-UAER<30mg/24h)25例,其中男性13例,女性12例,年龄50~82岁,平均年龄 69.5 ± 5.2 ,病程11~25年;早期肾损伤B组($300\text{mg}/24\text{h} > 24\text{-UAER} > 30\text{mg}/24\text{h}$)26例,其中男性12例,女性14例,年龄45~85岁,平均年龄 67.5 ± 10.1 岁,病程5~18年;中晚期肾损伤C组($24\text{-UAER} \geq 300\text{mg}/24\text{h}$)29例,其中男性15例,女性14例,年龄55~83岁,平均年龄 68.1 ± 9.2 岁,病程0~10年。同期选取健康体检者25例作为正常对照(NC组),其中男性15例,女性10例,年龄45~78岁,平均年龄 66.5 ± 8.2 岁。上述研究对象均无心脑血管、自身免疫等病史。

1.2 主要仪器和试剂 全自动生化分析仪7600(日本东芝),Trizol(美国Invitrogen公司),MMLV(Promega公司),DEPC(BBI公司),ExTaq™ R-PCR Version 2.1(大连宝生物公司),视黄醇结合蛋白(上海北加生化试剂有限公司),24-UAER检测试剂盒(Orion Diagnostica Oy),HbA1c(日本东曹生物科技有限公司)。

1.3 标本采集及测定

1.3.1 视黄醇结合蛋白(RBP)检测:所有受检者空腹采血3ml,置于真空采血管中,3500r/min离心5min后,取上层血清置于-80℃冰冻保存待测。RBP检测采用免疫比浊法。

1.3.2 实时荧光定量PCR检测 AnnexinA2 基因:①Trizol法提取血液样本中总RNA。②cDNA的合成管1:随机引物2μl,RNA4μl,DEPC H₂O 9μl 70℃,5min,4℃;管2:5×Buffer 8μl,MMLV 1μl,Rnasin 0.5μl,dNTP 1.25μl,加H₂O 14.25μl;将管2加入管1中,37℃1h,95℃5min。③荧光定量PCR 5×buffer 5μl,Mg²⁺ 0.25μl,dNTP 0.75μl,TaqMen 0.25μl,Primer1 0.5μl,Primer2 0.5μl,Probe 0.3μl,dH₂O 15.45μl,ample 2μl 95℃5min,95℃15s,60℃60s,50个循环4℃,AnnexinA2的上游引物5'-CTGTTCACGAAATCCTGTGC-3',下游引物5'-CACCTTTGTCTTGATGGCT-3'。④结果判定与分析以GAPDH作为内参照,根据标准曲线得出待测基因mRNA的表达量。

1.4 统计学分析 应用SPSS 19.0软件对数据统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组与对照组 RBP 及其它生化指标比较

见表1。病例组(A+B+C)的HbA1c,Scr,BUN,UA和RBP水平均高于健康对照组(NC)($t = 4.64 \sim 13.65$,均 $P < 0.05$)。而病例组A组Scr,BUN,UA和RBP水平与NC组比较差异无统计学意义($t = 0.26 \sim 1.37$,均 $P > 0.05$)。B组和C组分别与NC组比较差异有统计学意义($t = 5.31 \sim 15.31$, $t = 6.64 \sim 21.65$,均 $P < 0.05$)。A组和B组HbA1c,Scr,BUN和UA水平比较差异无统计学意义($t = 0.31 \sim 1.25$,均 $P > 0.05$),而RBP水平比较差异有统计学意义($t = 15.26$, $P < 0.05$)。A组和C组Scr,BUN,UA和RBP水平比较差异有统计学意义($t = 5.26 \sim 25.33$,均 $P < 0.05$)。B组和C组Scr,BUN,UA和RBP水平比较差异也有统计学意义($t = 4.02 \sim 18.33$,均 $P < 0.05$)。

表1 病例组与对照组 RBP 及其它生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HbA1c(%)	Scr(μmol/L)	BUN(mmol/L)	UA(mmol/L)	RBP(mg/L)
NC	25	4.8 ± 0.53	63.42 ± 4.12	5.43 ± 0.87	155.92 ± 8.09	38.12 ± 2.21
A+B+C	80	7.69 ± 0.73	102.31 ± 9.61	7.45 ± 0.98	303.58 ± 27.61	155.32 ± 20.61
A	25	7.62 ± 0.61	97.12 ± 10.52	6.39 ± 1.02	185.07 ± 19.12	40.12 ± 7.05
B	26	7.71 ± 0.71	102.19 ± 8.45	7.29 ± 1.05	225.32 ± 28.31	88.15 ± 24.21
C	29	7.75 ± 0.75	188.85 ± 9.57	9.92 ± 0.95	485.95 ± 35.65	162.31 ± 33.12

2.2 病例组与对照组 AnnexinA2 基因表达水平

病例组(A+B+C组)AnnexinA2基因表达水平 1.58 ± 0.05 ng/ml,对照组 AnnexinA2 基因表达水平 0.13 ± 0.01 ng/ml,两组比较差异有统计学

意义($t = 18.45$, $P < 0.05$)。病例组A组 0.12 ± 0.01 ng/ml,B组 1.35 ± 0.06 ng/ml,C组 1.88 ± 0.07 ng/ml,可见A组与对照组差异无统计学意义($t = 0.11$, $P > 0.05$), (下转122页)

HCV病毒载量的升高而增高,与HCV-RNA病毒载量呈正相关($P < 0.05$);而HCV-Ab阳性检出率无明显的变化,与HCV-RNA的浓度无关($P > 0.05$)。

HCV-cAg检测方法与基于RT-PCR的HCV-RNA检测方法一致性较好,而HCV-cAg在方法学上与HCV-RNA相比,具有方法简便、快速、价廉,所需设备简单,易于普及应用等优点,因此HCV-cAg检测可作为筛查HCV“窗口期”感染、严重低免疫状态人群感染的简便、廉价方法,在不具备HCV-RNA检测条件的基层医疗单位作为HCV感染检测的直接证据具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 许方,李晓兰,祝琳.丙肝病毒核心抗原检测对于丙型肝炎诊断的价值[J].中国实验诊断学,2010,14(5):713-715.
Xu, Li XL, Zhu L. Diagnostic value of HCV core antigen in the hepatitis C[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnostics, 2010, 14(5): 713-715.
- [2] 张瑞,李金明.丙型肝炎病毒感染临床检测程序的建立及结果报告与解释[J].中华检验医学杂志,

2010,33(10):990-992.

Zhang R, Li JM. Laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2010, 33(10): 990-992.

- [3] 李蓉.丙肝抗HCV检测与荧光定量PCR HCV-RNA检测结果对比分析[J].临床医学杂志,2015,35(5):110-111.
Li R. Anti HCV HCV detection with fluorescence quantitative PCR, comparative analysis of the results of HCV-RNA[J]. Journal of Clinical Medicine, 2015, 35(5): 110-111.
- [4] 曹军皓,黄前川.丙肝病毒核心总抗原定量检测的临床应用[J].现代检验医学杂志,2014,29(2):108-109,114.
Cao JH, Huang QC. Clinical application and evaluation of hepatitis C virus core antigen quantitative assays[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(2): 108-109, 114.
- [5] Bostan N, Mahmood T. An overview about hepatitis C: A devastating virus[J]. Crit Rev Microbiol, 2010, 36(2): 91-133.
- [6] Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(2): 107-115.

收稿日期:2016-05-11

修回日期:2016-06-26

(上接119页)而B组和C组分别与对照组比较差异均有统计学意义($t = 15.25 \sim 22.78$, 均 $P < 0.05$)。病例组(A+B+C组)间两两比较差异有统计学意义($t = 13.45 \sim 24.25$, 均 $P < 0.05$)。

2.3 病例组(A+B+C)血清RBP水平和AnnexinA2基因表达的相关性分析 所有DN(A+B+C)患者RBP水平与AnnexinA2基因表达程度之间存在正相关($r = 0.95$, $P < 0.01$)。

3 讨论 糖尿病肾病患者初期临床症状很不典型,常规的肾功能检测不能反映患者肾脏的受累程度,一旦患者尿微量清蛋白出现并急剧升高,预示肾脏损害程度加重,故尽早发现糖尿病微血管病变是治疗此类疾患的关键。在急性肾小球损伤和慢性肾衰竭患者中,RBP水平早于肌酐在血液中浓集。本研究结果充分显示,在糖尿病无肾损伤组(A组)和早期糖尿病肾损伤组(B组)肾功能(BUN,Scr和UA)水平无差别,而B组RBP水平已明显比A组升高,预示患者肾脏早期受累正逐渐加重,此时临床医生应对患者加以针对性治疗,这将极大延缓患者肾脏代谢负荷加重,并可早期诊治DN。

AnnexinA2基因是近年来发现的与膜转运和细胞骨架重塑相关的因子,其在代谢性疾病发生中的作用机制是研究的焦点^[2]。有报道其对内皮细胞流动性改变最大的是糖尿病视网膜眼底微血管病变和新生微血管的形成^[3]。本研究发现DN(A

+B+C)组随着肾脏损伤程度加重AnnexinA2基因表达水平逐渐升高,即C组>B组>A组,预示患者肾脏微血管损害逐渐加重。另外在糖尿病肾损伤组AnnexinA2基因表达与RBP水平有很好的相关性,这些也印证AnnexinA2基因和RBP是糖尿病早期肾病微血管病变的敏感指标。

总之,通过检测患者血清中AnnexinA2基因表达和RBP水平变化,可提早发现糖尿病患者的肾脏损伤程度,且其水平随糖尿病肾病早期病情的严重程度加大而逐渐升高,应引起临床医生和实验室操作人员的高度重视。

参考文献:

- [1] 马建伟,张蕾,孟凡荣,等.糖尿病肾病患者血清中Ang-1,Ang-2,AnnexinA2基因表达水平及意义[J].中国中西医结合肾病杂志,2015,16(12):1075-1078.
Ma JW, Zhang L, Meng FR, et al. Study on the expression level of Ang-1, Ang-2, annexinA2 gene in the diabetic nephropathy[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2015, 16(12): 1075-1078.
- [2] Ferguson MA, Waikar SS. Established and emerging markers of kidney function[J]. Clin Chem, 2012, 58(4): 680-689.
- [3] Mortimer JC, Laohavisit A, Macpherson N, et al. Annexins: multifunctional components of growth and adaptation[J]. J Exp Bot, 2008, 59(3): 533-544.

收稿日期:2016-05-02

修回日期:2016-08-07