

• 肾脏疾病专栏 •

糖尿病肾病诊断标志物研究进展

陈堃 刘超 陈国芳 王昆

【摘要】 糖尿病肾病(DN)是造成终末期肾病的最常见原因,也是糖尿病患者发病率和死亡率显著增加的主要因素。早期诊断对 DN 的管理非常重要。尿微量白蛋白被认为是诊断早期 DN 的金标准,但具有一定的局限性。近年来发现了一些尿液中反映肾脏受损的新的标志物,包括肾小球损伤标志物(肾病蛋白、足细胞标记蛋白、肾母细胞瘤 1 基因),肾小管损伤标志物(中性粒细胞明胶酶相关脂质蛋白、肾脏损伤分子 1)和炎症因子(肿瘤坏死因子受体)等。同时一些较新的方法如尿非编码 RNA(微小 RNA)及尿蛋白组学检测为诊断 DN 提供了新策略。

【关键词】 糖尿病肾病;标志物;肾小球损伤;肾小管损伤;微小 RNA

Urinary biomarkers for diabetic nephropathy Chen Kun, Liu Chao, Chen Guofang, Wang Kun.
Endocrine and Diabetes Center, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
Corresponding author: Liu Chao, Email: liuchao@nfmcn.com

【Abstract】 Diabetic nephropathy (DN) is the most common cause of end-stage kidney disease and accounts for a significant increase in morbidity and mortality in patients with diabetes. Early detection is critical in improving clinical management. Although microalbuminuria is regarded as the gold standard for diagnosing the onset of DN, its predictive power is limited. Recently, a number of novel urinary biomarkers have been identified and used to reflect kidney injury, such as biomarkers of glomerular damage (nephrin, podocalyxin, Wilms Tumor-1), biomarkers of tubular damage (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, kidney injury molecule-1) and inflammatory factors (tumor necrosis factor receptor). In the mean time, new approaches including urinary microRNAs (noncoding mRNAs) and urine proteomics provide new direction to identify potential novel biomarkers for detecting diabetic nephropathy.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Biomarkers; Glomerular damage; Tubular damage; MicroRNAs

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35: 176-179)

糖尿病肾病(DN)是进展为终末期肾病最常见的因素,也是糖尿病患者的主要死亡原因之一。临床上如何诊断、治疗,阻断病情的发展,延缓慢性肾功能衰竭的进程是亟待解决的问题。

微量白蛋白尿是诊断早期 DN 的金标准,并属于进展期 DN 的标志物。然而,晚近研究提示,在 1 型和 2 型糖尿病患者中,微量白蛋白尿的预测能力具有较大局限性。一些糖尿病患者没有微量白蛋白尿却出现进展期肾病的病理学表现,另一些在某一时段白蛋白尿阳性,但病情发展过程中却未能测出^[1]。此外,在有些暂未出现肾脏改变的糖尿病患者和部分具有慢性肾脏疾病的非糖尿病患者中也可出现阳性结果,所以,微量白蛋白尿并不是最理想的 DN

诊断标志物^[2]。因此,寻找一些更具敏感性和特异性的早期及进展期 DN 标志物非常必要。

1 肾小球损伤标志物

1.1 足细胞损伤 足细胞损伤被认为是 DN 的早期特征,肾小球足细胞数目和密度的下降会导致尿蛋白的出现和肾脏疾病的进展^[3]。研究表明,在正常蛋白尿患者中即可发现足细胞的异常,提示足细胞的受损早于蛋白尿的出现^[4]。目前,已发现一些具有早期及进展期 DN 标志物作用的足细胞特异性蛋白。

1.1.1 肾病蛋白(nephrin) 肾病蛋白是一种跨膜蛋白,是滤过裂隙的一个结构部件,当肾小球滤过屏障受损时其表达升高。Jim 等^[5]发现,2 型糖尿病伴有白蛋白尿的患者 100%存在肾病蛋白表达。而 54%未出现白蛋白尿的 2 型糖尿病患者也出现肾病蛋白表达^[6]。另一项研究发现,30%未出现白蛋白尿的 1 型糖尿病患者会出现尿肾病蛋白表达,28%的患者首次检查未发现白蛋白尿,但在随后的检查中

发现存在微量白蛋白尿,与此同时,正常人群尿液中则未出现肾病蛋白^[7]。对于糖尿病患者,尿肾病蛋白出现的时间比微量白蛋白早,尽管需要进一步研究,现有的试验已经说明尿液中的肾病蛋白可以作为早期 DN 的生物标志物之一。

1.1.2 足细胞标记蛋白(podocalyxin) 足细胞标记蛋白作为足突顶端质膜的主要构成部分,是足突顶膜区主要的带负电荷的唾液酸蛋白,参与维持足细胞的正常结构和滤过屏障。DN 早期以肾脏肥大和肾小球高滤过为特征。在肾小球足细胞的检测中,足细胞蛋白作为最常用的标记蛋白之一,对监测肾小球疾病的发生和发展起到极其重要的作用。Hara 等^[6]用 ELISA 试剂盒检测到 2 型糖尿病患者尿液中含有足细胞标记蛋白。另在 53.8% 无白蛋白尿的患者中也可检测到足细胞标记蛋白,说明足细胞标记蛋白可能出现在 DN 早期的患者中,具有作为生物标志物的潜力^[6]。此外,尿 mRNA 检测发现了足细胞标记蛋白相关的 mRNA,还有一些与之相关的分子,如突触极蛋白、 α -actinin-4、膜蛋白等,可能作为早期足细胞损伤的标志,还可以评估 DN 的进展^[8-9]。不过,尿液中的 mRNA 有可能被降解因而影响检测,而且,由于足细胞标记蛋白还可以在内皮细胞/壁层上皮细胞及各种非肾脏细胞中存在,因此,这种检测还存在特异性的问题^[10]。

1.1.3 肾母细胞瘤 1(WT1)基因 WT1 基因是在足细胞成熟中起重要作用的一个锌指转录因子^[4]。在成熟的肾小球中,WT1 基因的表达仅限于足细胞。Kubo 等^[11]最先报道在包括 DN 的肾病患者的尿液中可以检测到内源性 WT1 基因的 mRNA。近期,Kalani 等^[4]在 1 型糖尿病患者的尿液中分离出 WT1 基因的外泌体蛋白,其表达水平与尿白蛋白与肌酐比值和血清肌酐水平正相关,与肾小球滤过率负相关。50% 的糖尿病患者即使没有蛋白尿也会出现尿 WT1 蛋白表达,而非糖尿病受试者的尿液中几乎检测不到 WT1 基因。这些结果表明,尿 WT1 蛋白水平可作为一个足细胞特异的生物标志物,用于 DN 的早期诊断和结局的预测。

1.2 肾小球内皮细胞损伤 肾脏内皮细胞可通过自分泌与旁分泌产生系列的体液因子,如一氧化氮、内皮素、前列环素、血栓素等来维持和调节肾小球局部血流动力学的功能。内皮功能破坏是导致肾小球瘢痕硬化的重要因素^[12]。血管内皮细胞损伤会扰乱正常的微血管通透性,并与糖尿病患者微量白蛋白尿的产生具有相关性^[12]。内皮功能障碍是 DN 及

微血管并发症的主要机制之一^[13]。血管内皮的糖胺聚糖在血管内皮损伤时升高,研究表明,糖尿病患者糖胺聚糖水平显著高于对照组^[14]。此外,微量白蛋白尿或蛋白尿患者的尿液中同时检测到糖胺聚糖,且糖胺聚糖水平的增加与 DN 的患病时间正相关^[15]。因此,尿糖胺聚糖水平的评估可能是 DN 的一个极有潜力的指标。尤其是它可以用于确定 DN 的早期阶段,并评估疾病的进展。需要指出的是,虽然一些研究报道糖胺聚糖水平在糖尿病患者(包括尿白蛋白水平正常的患者)尿液中升高,但还有学者表示,尿糖胺聚糖水平在糖尿病及正常人群中无差别,甚至有试验报道其表达水平是降低的^[16]。还应指出的是,糖胺聚糖是包括肾小管基底膜在内的各种基底膜的主要组分,已有研究发现,糖胺聚糖分泌与肾小管损伤的尿液标志物如塔姆-霍斯福尔蛋白(Tamm-Horsfall 蛋白)有相关性^[16]。这些结果都说明糖胺聚糖的分泌可能反映糖尿病患者肾小管功能障碍。

1.3 肾小球基底膜蛋白 IV 型胶原蛋白是肾小球和肾小管基底膜及系膜外基质的重要组成部分,通常不被肾小球滤过。已有研究发现,尿 IV 型胶原蛋白在 2 型糖尿病患者中显著升高,和尿蛋白水平正相关。Cawood 等^[17]证实,在正常蛋白尿糖尿病患者中尿 IV 型胶原蛋白升高先于微量白蛋白尿的出现。此外,近年报道,在无明显蛋白尿的 1 型和 2 型糖尿病患者中高尿 IV 型胶原蛋白排泄和肾小球滤过率下降相关^[18-19]。因此,相比白蛋白,尿 IV 型胶原蛋白排泄水平可以作为一个更有用的早期 DN 标志物。但目前还不清楚其是否为一个进展期 DN 可信的标志物。

2 肾小管损伤标志物

中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(NGAL)是 lipocalin 家族成员之一,是一种来源于中性粒细胞和明胶酶共价相关的蛋白。NGAL 产生于近端肾单位,在肾脏损伤时反应性升高^[20]。位于近曲小管细胞顶侧膜的一种 1 型跨膜蛋白肾脏损伤分子-1(KIM-1)在肾脏受损时同样升高。研究发现,1 型糖尿病患者无论有无蛋白尿,尿 NGAL 及 KIM-1 水平均升高,提示肾小管的早期损害^[21]。而在 2 型糖尿病患者中高尿 NGAL 及 KIM-1 水平可预测病程中快速的肾小球滤过率下降^[22]。最新一项调查 2 型糖尿病早期阶段(<5 年)肾小管损伤发生率的横断面研究证实,糖尿病组尿 NGAL 及 KIM-1 水平比正常组显著增加。另外,尿 NGAL 水平和尿白蛋白排泄

率明显正相关,和肾小球滤过率无关,而尿 KIM-1 在正常白蛋白尿组、微量白蛋白尿组和大量白蛋白尿组中无明显差异,且和尿白蛋白排泄率及肾小球滤过率均不相关^[23]。这些发现表明,肾小管损伤在 2 型糖尿病早期相对常见,尿 NGAL 可能为一个较有前景的早期预测和监测 2 型糖尿病肾功能损伤的标志物。

3 肿瘤坏死因子受体(TNFR)

TNFR1 和 TNFR2 属于肿瘤坏死因子- α (TNF- α)受体超家族,是一组 I 型单跨膜糖蛋白。近年来,其介导的特别途径而非通常认为的炎症反应在糖尿病患者早、晚期肾功能受损的发展中受到关注。日本一项研究提示,无明显蛋白尿的 2 型糖尿病患者循环中高 TNFR1 和 TNFR2 水平和明显的肾小球滤过率下降相关^[24]。另外,Niewczas 等^[25]对 410 例 2 型糖尿病患者 8~12 年随访发现,发生终末期肾病事件和循环 TNFR1、TNFR2 水平显著正相关,而并非游离或总的 TNF- α 。同样,Gohda 等^[26]对 628 例 1 型糖尿病患者 5~12 年随访观察到发生慢性肾脏疾病 ≥ 3 期事件和血清 TNFR1、TNFR2 浓度显著相关,但和游离或总的 TNF- α 及其他临床协变量无关。相对于 TNF- α 可提高白蛋白的渗透性,TNFR 缺乏在 DN 动物模型中的研究证据及作用机制尚不明确。

4 转化生长因子- β (TGF- β)

TGF- β 是一种潜在的细胞外基质蛋白诱导物,是 DN 发病机制的重要中介物。TGF- β 诱导蛋白 h3(β ig-h3)被用来评估肾脏中 TGF- β 的生物活性。研究发现,尿 β ig-h3/肌酐比值在 2 型糖尿病患者中明显升高^[27]。另一研究同样证实,和对照组相比,即使正常白蛋白尿阶段糖尿病患者尿 β ig-h3 水平也明显升高,进展期 DN 更为显著^[28]。由此提示纵向监测尿 β ig-h3 水平可以预测早期 DN 及肾脏疾病的进展。

5 尿 miRNA

MiRNA 是一种非编码单链 RNA,通过结合至靶基因 mRNA 上,可促进 mRNA 的降解或抑制 mRNA 的翻译,从而抑制其靶基因的表达,实现对靶基因的转录后调控。研究表明,许多 miRNA 通过调控 TGF- β 而参与 DN 的发生^[29]。Szeto 等^[30]观察到糖尿病肾小球硬化症患者尿 miRNA-15 明显降低。另外,无论哪种类型肾病,尿 miRNA-21 和 miRNA-216a 的表达与肾功能下降及进展为终末期肾病均相关。Kato 等^[31]也发现,在 DN 小鼠模型系膜细胞中,miRNA-192 表达升高,通过抑制锌指 E 盒结合蛋白 1

及锌指 E 盒结合蛋白 2 表达,激活 TGF- β 信号通路,导致肾组织纤维化。尽管目前研究证据有限,但 miRNA 在基因中的调控作用可能成为 DN 一个新的诊断标志及治疗靶点。

6 尿蛋白组学

蛋白组学是一种可以同步检测多种形式尿液及血清蛋白的大规模蛋白研究技术。其通过毛细管电泳结合质谱分析法,具有高分辨蛋白能力。近年运用此技术识别 DN 标志物在 1 型糖尿病中敏感性和特异性均为 97%,在 2 型糖尿病中敏感性为 93.8%,特异性为 91.4%^[32-33]。然而,这种技术确诊 DN 需在临床上出现大量蛋白尿的基础上,不具备组织学的认证能力。一项前瞻性的病例对照研究通过检测 273 种尿多肽值,作出以尿液蛋白组学为基础的危险评分及分级,预测 2 型糖尿病患者微量白蛋白尿的进展情况,结果发现,尿蛋白组学是糖尿病患者发展为微量蛋白尿和大量蛋白尿的独立相关因素^[34]。

7 总结

近年寻找新的早期及进展期 DN 标志物成为研究热点,并发现了一些新的靶点。但是,大部分临床研究样本量较少,调查方法多是横断面研究及短期的前瞻性研究,标志物检测多为 ELISA 法,检测手段单一,且缺乏有说服力的动物研究证据,相关机制尚不明确。因此,发现新的 DN 标志物及证实其是否具有代表性,还需做更多的工作。

参 考 文 献

- [1] Zachwieja J, Soltysiak J, Fichna P, et al. Normal-range albuminuria does not exclude nephropathy in diabetic children [J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25(8): 1445-1451.
- [2] Glassock RJ. Is the presence of microalbuminuria a relevant marker of kidney disease? [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2010, 12(5): 364-368.
- [3] Su J, Li SJ, Chen ZH, et al. Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilm's tumor-1 protein used as a podocyte marker [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87(2): 167-175.
- [4] Kalani A, Mohan A, Godbole MM, et al. Wilm's tumor-1 protein levels in urinary exosomes from diabetic patients with or without proteinuria [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60177.
- [5] Jim B, Ghanta M, Qipo A, et al. Dysregulated nephrin in diabetic nephropathy of type 2 diabetes: a cross sectional study [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36041.
- [6] Hara M, Yamagata K, Tomino Y, et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(11): 2913-2919.
- [7] Pätärilä A, Forsblom C, Havanna M, et al. Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2003, 52(12): 2969-2974.

- [8] Zheng M, Lv LL, Ni J, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20431.
- [9] Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases[J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(12): 2081-2095.
- [10] Nielsen JS, McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(8): 1669-1676.
- [11] Kubo K, Miyagawa K, Yamamoto R, et al. Detection of WT1 mRNA in urine from patients with kidney diseases[J]. Eur J Clin Invest, 1999, 29(10): 824-826.
- [12] Singh A, Fridén V, Dasgupta I, et al. High glucose causes dysfunction of the human glomerular endothelial glycocalyx[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 300(1): F40-F48.
- [13] Karalliedde J, Gnudi L. Endothelial factors and diabetic nephropathy[J]. Diabetes Care, 2011, 34(Suppl 2): S291-S296.
- [14] Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, et al. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2006, 55(4): 1127-1132.
- [15] Popławska-Kita A, Mierzejewska-Iwanowska B, Szelachowska M, et al. Glycosaminoglycans urinary excretion as a marker of the early stages of diabetic nephropathy and the disease progression[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2008, 24(4): 310-317.
- [16] Torffvit O. Urinary sulphated glycosaminoglycans and Tamm-Horsfall protein in type 1 diabetic patients[J]. Scand J Urol Nephrol, 1999, 33(5): 328-332.
- [17] Cawood TJ, Bashir M, Brady J, et al. Urinary collagen IV and π GST: potential biomarkers for detecting localized kidney injury in diabetes a pilot study[J]. Am J Nephrol, 2010, 32(3): 219-225.
- [18] Morita M, Uchigata Y, Hanai K, et al. Association of urinary type IV collagen with GFR decline in young patients with type 1 diabetes[J]. Am J Kidney Dis, 2011, 58(6): 915-920.
- [19] Araki S, Haneda M, Koya D, et al. Association between urinary type IV collagen level and deterioration of renal function in type 2 diabetic patients without overt proteinuria[J]. Diabetes Care, 2010, 33(8): 1805-1810.
- [20] Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery[J]. Lancet, 2005, 365(9466): 1231-1238.
- [21] Nielsen SE, Schjoedt KJ, Astrup AS, et al. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) and Kidney Injury Molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross sectional study and the effects of lisinopril[J]. Diabet Med, 2010, 27(10): 1144-1150.
- [22] Nielsen SE, Reinhard H, Zdunek D, et al. Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 97(1): 71-76.
- [23] Fu WJ, Xiong SL, Fang YG, et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study[J]. Endocrine, 2012, 41(1): 82-88.
- [24] Miyazawa I, Araki S, Obata T, et al. Association between serum soluble TNF α receptors and renal dysfunction in type 2 diabetic patients without proteinuria[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011, 92(2): 174-180.
- [25] Niewczas MA, Gohda T, Skupien J, et al. Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(3): 507-515.
- [26] Gohda T, Niewczas MA, Ficociello LH, et al. Circulating TNF receptors 1 and 2 predict stage 3 CKD in type 1 diabetes[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(3): 516-524.
- [27] Ha SW, Kim HJ, Bae JS, et al. Elevation of urinary β ig-h3, transforming growth factor- β -induced protein in patients with type 2 diabetes and nephropathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2004, 65(2): 167-173.
- [28] Cha DR, Kim IS, Kang YS, et al. Urinary concentration of transforming growth factor- β -inducible gene-h3 (β ig-h3) in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Diabet Med, 2005, 22(1): 14-20.
- [29] McClelland A, Hagiwara S, Kantharidis P. Where are we in diabetic nephropathy: microRNAs and biomarkers? [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014, 23(1): 80-86.
- [30] Szeto CC, Ching-Ha KB, Ka-Bik L, et al. Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases [J]. Dis Markers, 2012, 33(3): 137-144.
- [31] Kato M, Arce L, Wang M, et al. A microRNA circuit mediates transforming growth factor- β 1 autoregulation in renal glomerular mesangial cells[J]. Kidney Int, 2011, 80(4): 358-368.
- [32] Rossing K, Mischak H, Dakna M, et al. Urinary proteomics in diabetes and CKD[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(7): 1283-1290.
- [33] Alkhalaf A, Zürlbig P, Bakker SJ, et al. Multicentric validation of proteomic biomarkers in urine specific for diabetic nephropathy [J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13421.
- [34] Roscioni SS, de Zeeuw D, Hellemons ME, et al. A urinary peptide biomarker set predicts worsening of albuminuria in type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetologia, 2013, 56(2): 259-267.

(收稿日期: 2015-01-28)

• 消息 •

2015 年第 4 期部分文题介绍

1. OGTT 0.5 小时血糖切点值在诊断糖尿病及糖尿病前期中的临床意义 2. 严格随访干预对 2 型糖尿病早期糖尿病肾病转归的影响及相关因素分析 3. 妊娠糖尿病与甲状腺自身免疫相关性研究 4. 人源性 TRAb Fab 段抗体库的构建 5. 一种新的脂肪因子——Cartonectin 6. FGF21 和胰岛素抵抗的关系 7. 口服胰岛素纳米粒的吸收机制 8. 长链非编码 RNA 与糖尿病 9. 自然疗法治疗 2 型糖尿病的研究进展 10. Vasohibin-1 在糖尿病肾病中的研究进展 11. Visfatin 在胰岛素抵抗及糖尿病肾病发病机制中的研究进展 12. 肠促胰素类降糖药物的低血糖风险 13. 胰高血糖素样肽 1 药物与胰腺炎和胰腺癌 14. 亚临床甲状腺功能异常与骨质疏松症的相关性 15. 二甲双胍在甲状腺疾病治疗中的作用 16. 男性垂体促性腺激素腺瘤 5 例报道并文献复习