

· 论 著 ·

糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶检测及其病理意义分析

郑敬民, 尹 广, 恽时锋, 刘志红

〔摘要〕 目的 了解肥大细胞糜蛋白酶在糖尿病肾病患者尿液中的表达及其与糖尿病肾病临床指标的相关性,探讨糜蛋白酶和肥大细胞在糖尿病肾病肾组织损伤中的作用。方法 收集糖尿病肾病 103 例(包括糖尿病肾病早期 10 例、中期 31 例和晚期 62 例)和 20 例正常对照者的尿液;利用 ELISA 法检测尿中糜蛋白酶水平;比较分析尿液糜蛋白酶在正常对照组、糖尿病肾病早期组、中期组和晚期组中的变化情况及其与患者各临床指标的相关性。结果 与正常对照组相比,糖尿病肾病患者尿液中糜蛋白酶的水平显著升高,表现为随糖尿病肾病的发展而逐渐增加的趋势。糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平与血肌酐[相关系数(r) = 0.446, $P < 0.01$]、血胱蛋白酶抑制剂 C(r = 0.398, $P < 0.01$)、血尿素氮(r = 0.365, $P < 0.01$)、24 h 尿蛋白(r = 0.512, $P < 0.01$)、尿 C3(r = 0.321, $P < 0.01$)、尿视黄醇结合蛋白(r = 0.432, $P < 0.01$)、尿溶菌酶(r = 0.482, $P < 0.01$)、尿 N-乙酰- β -葡萄糖苷酶(r = 0.582, $P < 0.01$)水平具有显著相关性。结论 上述结果支持关于肥大细胞参与糖尿病肾病肾组织损伤的观点,提示肾组织肥大细胞及其分泌的糜蛋白酶很可能在糖尿病肾病肾组织损伤中具有重要作用并可能是糖尿病肾病防治的新靶标。

〔关键词〕 糜蛋白酶;肥大细胞;糖尿病肾病;病理意义

〔中图分类号〕 R587.2;R692.9 〔文献标志码〕 A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.03.003

A study of urinary chymase expression in patients with diabetic nephropathy

ZHENG Jing-min, YIN Guang, YUN Shi-feng, LIU Zhi-hong. National Clinical Research Center of Kidney Diseases, Jinling Hospital, Nanjing University School of Medicine, Nanjing 210002, China

〔Abstract〕 Objective To observe the expression of chymase in the urine of patients with diabetic nephropathy and its correlation with clinical indices. Methods Urine samples from 20 normal controls and 103 patients with diabetic nephropathy were collected. Among these patients, 10 were identified to be at the early stage (microalbuminuria stage), 31 were identified to be at the middle stage (proteinuria stage) and 62 were identified to be at the late stage (renal insufficiency stage). The level of chymase in each urine sample was measured by an ELISA kit. Its correlation with clinical indices was carried out. Results The urinary chymase level was found increased with the development of diabetic nephropathy. The urinary chymase level was found correlated significantly with serum creatinine, serum cystatin C, serum urea nitrogen, 24 hour urine protein, urine C3, urine retinol-binding protein, urine lysozyme, urine N-acetyl- β -glucosaminidase level. Conclusion This study has provided another evidence for the involvement of mast cells in renal injury under the condition of diabetic nephropathy. Mast cells and chymase may have important roles in the development of diabetic nephropathy and might be a novel target for treatment of the disease.

〔Key words〕 chymase; mast cells; diabetic nephropathy; pathological significance

糖尿病肾病是糖尿病的一种常见并发症,也是导致终末期肾衰的一个重要原因。有关糖尿病肾病的病理机制目前仍不完全清楚。现有治疗措施仅能部分延缓糖尿病肾病的进展,而不能从根本上阻断疾病的发生和发展^[1]。近年来,有关肥大细胞在肾脏疾病中的可能作用引起了一些研究者的注意。多种肾脏疾病患者肾组织中均发现存在肥大细胞增多的现象^[2-4],而以糖尿病肾病患者肾组织肥大细胞增加最为显著^[5-6]。但目前对于肾组织肥大细胞的确

切病理意义和分子机制仍不是很清楚。

肥大细胞的最大特点是其可合成多种生物活性物质,并将其贮存于胞内的囊泡中。一旦被激活,肥大细胞可将其贮存的各种生物活性物质释放出来,发挥各种生物学功能。糜蛋白酶是一种由肥大细胞特异性合成和分泌的多功能丝氨酸蛋白酶。一些研究认为糜蛋白酶参与了肾组织损伤过程^[6],但仍缺少足够的证据。从笔者查阅的文献来看,尚未见对糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平的分析研究。本文利用 ELISA 法对糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平进行定量检测,对其与糖尿病肾病发生发展的关系进行了分析研究。

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2012779)

作者单位:210002 江苏南京,南京军区南京总医院国家肾脏疾病临床医学研究中心、全军肾脏病研究所

通讯作者:尹 广, E-mail:yingguan@medmail.com

1 材料与方法

1.1 病例选择及相关病理资料的获取 选择 2012 年 1 月-2013 年 6 月来南京军区南京总医院解放军肾脏病研究所就诊,并经临床和病理诊断为 2 型糖尿病肾病的病例共 103 例。所有病例临床符合 1997 年 WHO 糖尿病诊断标准,肾活检病理符合糖尿病肾病病变并排除其他可能合并的原发/继发性肾脏疾病。根据临床及肾活检组织病理特点将患者分为糖尿病肾病早期组(即微量蛋白尿期, $n=10$)、糖尿病肾病中期组(即显性蛋白尿期, $n=31$)和糖尿病肾病晚期组(即肾功能不全期, $n=62$)。其中糖尿病肾病早期组主要表现为微量白蛋白尿(24 h 尿白蛋白 <0.3 g,24 h 尿蛋白 <0.5 g),肾活检组织病理主要表现为肾小球体积增大,系膜区轻度增宽,此外无其他显著病变;糖尿病肾病中期组有明显的蛋白尿(24 h 尿白蛋白 >0.3 g,24 h 尿蛋白 ≥ 0.5 g),但肾功能正常[根据 MDRD 公式计算的肾小球滤过率($eGFR$) ≥ 60 ml/min/ 1.73 m^2];糖尿病肾病晚期组则表现有肾功能明显受损($eGFR < 60$ ml/min/ 1.73 m^2)。同时选取 20 例正常对照者尿液标本作为对照组。所有临床相关资料(包括生化检测结果等)从有关病历资料库中获取。

1.2 尿液标本的留取和保存 留取每例患者和正常对照者的尿液 10 ml,5000 g 离心 5 min,取上清分

装置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3 尿液糜蛋白酶水平检测 采用伊艾博公司的人肥大细胞糜蛋白酶检测试剂盒(ELISA)测定尿液糜蛋白酶水平,以尿肌酐进行校正。具体操作按试剂盒说明进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。检测数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,由于数据的正态性不佳,采用 Kruskal-Wallis 检验进行组间比较;Mann-whitney 检验进行两两比较,同时采用 Bonferroni 法进行校正;相关性分析采用 pearson 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常对照组和糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶检测结果 20 份正常对照者尿液样品中,只有 6 份样品的糜蛋白酶水平相对较高($>1.0\text{ ng/mg}$ 肌酐),其余尿液标本中糜蛋白酶的水平极低($<1.0\text{ ng/mg}$ 肌酐)。与此相比,糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平明显要高得多,且表现出一种随着糖尿病肾病的进展而增高的趋势(图 1)。表 1 所示为糖尿病肾病患者各分组的一些临床病理指标,显示糖尿病肾病患者血肌酐、血胱蛋白酶抑制剂 C、血尿素氮、24 h 尿蛋白、尿 C3、尿视黄醇结合蛋白、尿溶菌酶、尿 N-乙酰- β -葡萄糖苷酶水平等的水平均随病情加重而升高(P 均 <0.05)。

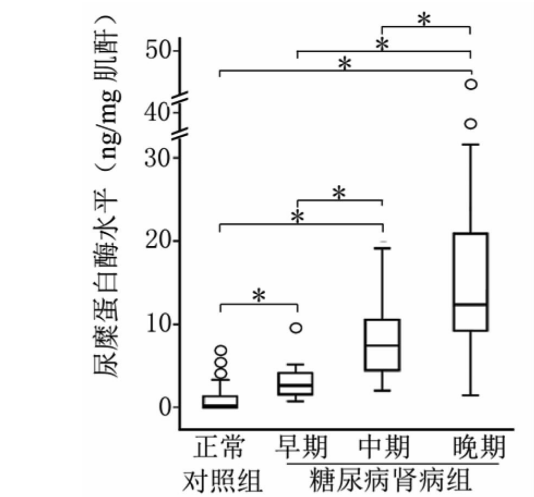
表 1 糖尿病肾病各分组临床病理指标

项目	糖尿病肾病早期组 ($n=10$)	糖尿病肾病中期组 ($n=31$)	糖尿病肾病晚期组 ($n=62$)
年龄(岁)	47.7 \pm 4.4	48.6 \pm 8.5	51.5 \pm 8.1
性别(男/女)	8/2	24/7	51/11
血肌酐($\mu\text{mol/L}$)	70.0 \pm 20.9	75.5 \pm 19.2*	185.5 \pm 74.2*
血胱蛋白酶抑制剂 C (mg/L)	1.0 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	2.3 \pm 0.7*
尿 C3 (mg/L)	3.1 \pm 3.1	3.5 \pm 4.0*	5.4 \pm 4.9*
尿溶菌酶 (mg/l)	0.4 \pm 0.4	0.7 \pm 1.0*	3.7 \pm 6.0*
尿视黄醇结合蛋白 (mg/L)	0.6 \pm 0.7	0.9 \pm 2.2*	12.4 \pm 15.4*
尿 N-乙酰- β -葡萄糖苷酶 (u/g. cr)	9.1 \pm 3.1	20.7 \pm 22.2*	43.2 \pm 37.1*
24 h 尿蛋白 (g/24 h)	0.3 \pm 0.1	1.6 \pm 1.4*	4.3 \pm 2.9*
血尿素氮 (mmol/L)	15.4 \pm 2.5	16.7 \pm 4.6*	30.3 \pm 11.7*
空腹血糖 (mmol/L)	7.4 \pm 2.3	7.9 \pm 2.3	8.0 \pm 3.0
餐后血糖 (mmol/L)	13.4 \pm 3.9	11.5 \pm 3.3	12.1 \pm 5.0
糖化血红蛋白 (%)	7.7 \pm 1.5	7.5 \pm 1.6	7.2 \pm 1.3
血三酰甘油浓度 (mmol/L)	2.0 \pm 1.1	2.3 \pm 1.3	2.1 \pm 1.5
高密度脂蛋白 (mmol/L)	0.9 \pm 0.4	0.9 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2
低密度脂蛋白 (mmol/L)	3.3 \pm 0.8	3.0 \pm 0.7	3.2 \pm 1.2

注:与糖尿病肾病早期组比较,* $P<0.05$

表 2 糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平与一些临床病理指标的相关性

临床指标	与尿糜蛋白酶的相关性	临床指标	与尿糜蛋白酶的相关性
血肌酐 ($n = 103$)	$r = 0.446, P < 0.01$	尿视黄醇结合蛋白 ($n = 101$)	$r = 0.432, P < 0.01$
血胱蛋白酶抑制剂 C ($n = 76$)	$r = 0.398, P < 0.01$	尿溶菌酶 ($n = 96$)	$r = 0.482, P < 0.01$
血尿素氮 ($n = 103$)	$r = 0.365, P < 0.01$	尿 N-乙酰- β -葡萄糖苷酶 ($n = 100$)	$r = 0.582, P < 0.01$
24 h 尿蛋白 ($n = 102$)	$r = 0.512, P < 0.01$	尿 C3 ($n = 78$)	$r = 0.327, P < 0.01$



与正常对照组及不同分期组比较, * $P < 0.01$

图 1 正常对照组和糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平统计分析结果

2.2 糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平与各种临床病理指标的相关性分析 双因素 pearson 相关性分析显示,糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平与血肌酐、血胱蛋白酶抑制剂 C、血尿素氮、24 h 尿蛋白、尿 C3、尿视黄醇结合蛋白、尿溶菌酶、尿 N-乙酰- β -葡萄糖苷酶水平具有显著相关性(表 2);而与年龄、性别、空腹血糖、餐后血糖、糖化血红蛋白水平、血三酰甘油浓度、高密度脂蛋白和低浓度脂蛋白浓度等则无明显相关性。

3 讨论

肥大细胞来源于骨髓造血祖细胞,通过各级血管迁移入组织,同时完成其成熟过程。肥大细胞最初是因其参与过敏反应而引起人们的广泛关注。作为变态反应的主要效应细胞,肥大细胞几乎成了变态反应的代名词。长期以来,有关肥大细胞的研究主要集中于呼吸道、消化道和皮肤这些器官,对其病理意义的探讨也大都集中在哮喘等变态反应性疾病方面,但肥大细胞的分布并不限于呼吸道、消化道和皮肤。事实上,包括脑、心脏、肾脏和脊椎等在内的许多器官中均发现有肥大细胞的存在。近年来的体内、体外研究表明,肥大细胞是一类多功能细胞,其

生理功能远非“变态反应效应细胞”这么简单,除了参与过敏反应和蠕虫免疫外,肥大细胞还与包括免疫调节^[7-8]、组织重构^[9]、损伤修复和组织纤维化等^[10-11]在内的多种生理病理过程密切相关。但目前对于肥大细胞在特定器官和特定病理过程中的确切病理意义的了解仍非常有限。虽然早在 1960 年, Pavone-Macaluso^[12]就报道,肾脏病患者肾组织中存在肥大细胞增多的现象,但长期以来,肥大细胞却并没有引起肾脏病学家的太多关注。直到 1996 年, Lajoie 等^[13]建立了以类胰蛋白酶为肥大细胞特异性标记物的免疫组化分析方法,肾组织肥大细胞才逐渐引起了越来越多研究者的关注。至今,除微小病变等极少数肾脏疾病外,其他肾脏病患者肾组织中均已发现存在肥大细胞增多的现象。但目前对于肾组织肥大细胞的确切病理意义仍不清楚,对于肥大细胞究竟是起肾脏保护作用还是起损伤作用也仍存在争论^[14-17]。在前面的研究中,笔者利用本研究所肾活检资源的优势,集中对包括糖尿病肾病在内的各种主要肾脏病患者肾组织肥大细胞的情况进行分析。结果显示:虽然不同肾脏病患者肾组织中均存在肥大细胞增多的现象,但以糖尿病肾病患者肾组织肥大细胞增加最为显著。进一步的相关性分析显示,肾组织肥大细胞与糖尿病肾病的病理过程密切相关,提示肥大细胞在糖尿病肾病中有重要作用^[18]。为了进一步验证本研究结果,本文首次对糖尿病肾病患者尿液中糜蛋白酶水平进行了初步的定量分析,并将其与正常对照者进行了比较。作为一种主要由肥大细胞特异性合成和分泌的丝氨酸蛋白酶,糜蛋白酶水平能更直接地反映当时肾组织活化肥大细胞的数量和活化水平。从本文的检测结果来看,绝大多数正常对照者尿液中糜蛋白酶的水平很低,这与笔者先前发现的正常肾组织中极少有肥大细胞,且肥大细胞的脱颗粒水平也较低一致^[18]。与正常对照不同,糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶的水平显著升高,且呈现出一种随糖尿病肾病的进展而逐渐增加的趋势,这种情况也与笔者先前的对糖尿病肾病患者肾组织肥大细胞数量和脱颗粒水平的分析结果相一致^[18],再次印证了肥大细胞参与糖尿病

肾病肾组织损伤的可能性。这种情况也为下列结果所证实:糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平与 24 h 尿蛋白、尿 C3、血肌酐、血胱蛋白酶抑制剂 C、血尿素氮、尿视黄醇结合蛋白、尿溶菌酶和尿 N-乙酰- β -葡萄糖苷酶水平具有显著相关性。正常情况下,像补体 C3 这样的分子量较大的蛋白质分子不能透过肾小球滤过膜,而能透过肾小球滤过膜的小分子蛋白质也会被肾小管重吸收,因此尿 C3 水平的增加提示肾小球滤过膜受损,而 24 h 尿蛋白排泄的增加更是肾脏病变的最常用指征,同时,近年来的研究还表明,尿蛋白还是导致肾组织损伤,特别是小管间质损伤的一个重要致病因素;血肌酐和血尿素氮水平是反映肾功能损伤程度的传统指标,而血胱蛋白酶抑制剂 C 则是近年来发现的反映肾功能损伤程度更为灵敏的新指标;尿视黄醇结合蛋白和尿溶菌酶是反映肾小管损伤程度的常用指标;N-乙酰- β -葡萄糖苷酶是一种细胞内溶酶体酶,高表达于肾脏近曲肾小管,尿 N-乙酰- β -葡萄糖苷酶的升高提示存在肾小管急性损伤。因此,上述结果表明,尿液糜蛋白酶水平与糖尿病肾病患者肾组织损伤相关,肾组织肥大细胞和(或)其分泌的糜蛋白酶参与了糖尿病肾病肾组织损伤过程。值得指出的是,与其他病理指标相比,糖尿病肾病患者尿液糜蛋白酶水平与反映肾小管急性损伤的指标包括尿 N-乙酰- β -葡萄糖苷酶等具有较高的相关性($r=0.582, P<0.01$),提示肾组织肥大细胞和(或)其分泌的糜蛋白酶很可能在糖尿病肾病肾小管急性损伤中有重要作用。

总之,本文的研究结果不仅再次印证了肥大细胞与糖尿病肾病肾组织损伤的相关性,而且提示肥大细胞分泌的糜蛋白酶可能是造成糖尿病肾病肾组织损伤的一个重要原因,肥大细胞和肥大细胞分泌的糜蛋白酶很可能是糖尿病肾病防治的有效新靶标。但要证明肥大细胞和肥大细胞分泌的糜蛋白酶在糖尿病肾病中的确切病理意义,仍有待于进一步的研究。

【参考文献】

[1] Balakumar P, Arora MK, Ganti SS, et al. Recent advances in pharmacotherapy for diabetic nephropathy: current perspectives and future directions[J]. *Pharmacol Res*, 2009, 60(1): 24-32.

- [2] Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Ramos E, et al. Mast cell quantitation in renal transplant biopsy specimens as a potential marker for the cumulative burden of tissue injury[J]. *Transplant Proc*, 2013, 45(4): 1469-1471.
- [3] Watanabe S, Miyata Y, Matsuo T, et al. High density of tryptase-positive mast cells in patients with renal cell carcinoma on hemodialysis: correlation with expression of stem cell factor and protease activated receptor-2[J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(6): 888-897.
- [4] Welker P, Krämer S, Groneberg DA, et al. Increased mast cell number in human hypertensive nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295(4): F1103-F1109.
- [5] Ehara T, Shigematsu H. Mast cells in the kidney[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2003, 8(3): 130-138.
- [6] Balakumar P, Reddy J, Singh M. Do resident renal mast cells play a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 330(1-2): 187-192.
- [7] Gan PY, Summers SA, Ooi JD, et al. Mast cells contribute to peripheral tolerance and attenuate autoimmune vasculitis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(12): 1955-1966.
- [8] Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, et al. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances[J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 749-786.
- [9] Kawakami T. A crucial door to the mast cell mystery knocked in[J]. *J Immunol*, 2009, 183: 6863-6881.
- [10] Gilfillan AM, Austin SJ, Metcalfe DD. Mast cell biology: introduction and overview[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 716: 2-712.
- [11] Piliponsky AM, Chen CC, Rios EJ, et al. The chymase mouse mast cell protease 4 degrades TNF, limits inflammation, and promotes survival in a model of sepsis[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(3): 875-886.
- [12] Pavone-Macaluso M. Tissue mast cells in renal diseases[J]. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1960, 50: 337-346.
- [13] Lajoie G, Nadasdy T, Laszik Z, et al. Mast cells in acute cellular rejection of human renal allografts[J]. *Mod Pathol*, 1996, 9(12): 1118-1125.
- [14] Beghdadi W, Madjene LC, Claver J, et al. Mast cell chymase protects against renal fibrosis in murine unilateral ureteral obstruction[J]. *Kidney Int*, 2013, 84(2): 317-326.
- [15] Silver RB. Role of mast cells in renal fibrosis[J]. *Kidney Int*, 2013, 84(1): 214-224.
- [16] Summers SA, Gan PY, Dewage L, et al. Mast cell activation and degranulation promotes renal fibrosis in experimental unilateral ureteric obstruction[J]. *Kidney Int*, 2012, 82(6): 676-685.
- [17] Kim DH, Moon SO, Jung YJ, et al. Mast cells decrease renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(10): 1031-1038.
- [18] 郑敬民, 尹广, 姚根宏, 等. 肥大细胞在糖尿病肾病肾组织中的分布及相关性研究[J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(6): 622-627.

(收稿日期: 2013-12-24; 修回日期: 2014-01-21)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)