



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2021.05.015

http://www.lcnkz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.05.015

· 论著 ·

# 尿液结合珠蛋白水平及其基因型对早期糖尿病肾病的诊断价值

宋欣 张永 张庆红 孟忠吉 胡雪梅

**【摘要】 目的** 探讨尿液结合珠蛋白(uHp)水平及其基因型与早期糖尿病肾病(DKD)的关系。**方法** 纳入单纯 2 型糖尿病(T2DM)患者(UAER < 30 mg/24 h)29 例(单纯 T2DM 组),随机选取同期就诊的 DKD 患者,并按照尿白蛋白排泄率(UAER)将其分为早期 DKD 组(30 mg/24 h ≤ UAER < 300 mg/24 h,33 例)和临床 DKD 组(UAER ≥ 300 mg/24 h,28 例)。再随机选取同期体检的 30 例健康体检者为健康对照组。比较 4 组受试者的一般资料(性别、年龄、体重、吸烟史、病程、收缩压)、实验室检查结果[血尿素(Urea)、血肌酐(SCr)、糖化血红蛋白(HbA1c)、尿 β<sub>2</sub> 微球蛋白(β<sub>2</sub>-MG)、UAER、肾小球滤过率(GFR)]及 Hp 基因型。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 uHp、UAER、尿液 β<sub>2</sub>-MG 水平对早期 DKD 的诊断价值。**结果** 健康对照组、单纯糖尿病组、DKD 组及临床 DKD 组患者 uHp 水平依次升高,各组间比较差异均有统计学意义(P < 0.05)。共检测出 Hp1-1、Hp1-2、Hp2-23 种基因型,3 种基因型在 4 组受试者中的频率分布比较差异无统计学意义(P = 0.525)。ROC 曲线分析结果显示,uHp 的 ROC 曲线下面积(AUC)明显大于 UAER 及尿液 β<sub>2</sub>-MG(P < 0.001)。**结论** uHp 水平随 DKD 病情进展而升高,对 T2DM 患者肾功能进展的预测价值高于尿液 UAER,但未发现 Hp 基因型与 DKD 之间存在显著关联。

**【关键词】** 糖尿病肾病; 尿液结合珠蛋白; 基因型; 早期诊断

**【中图分类号】** R587.1 **【文献标识码】** A

2 型糖尿病(T2DM)患者中约 34.7% 发生糖尿病肾病(DKD)<sup>[1]</sup>,据统计,40% ~ 50% 的终末期肾病(ESRD)是由 DKD 引起,DKD 是糖尿病患者重要的死亡原因之一。目前 DKD 的诊断主要依靠临床诊断和病理诊断,肾活检的开展受到地区、经济、患者差异等情况的限制。尿白蛋白排泄率(UAER)或尿白蛋白/肌酐(UACR)是目前被广泛应用的 DKD 早期诊断指标,但白蛋白尿作为 DKD 诊断标志物的效能受到许多因素的限制<sup>[2]</sup>。相关研究表明,40% 的 1 型糖尿病(T1DM)患者和 30% 的 T2DM 患者可出现尿蛋白的自发性消退,20% 尿蛋白正常的 T2DM 患者表现出早期肾小球滤过率(GFR)进行性下降<sup>[3]</sup>,特别是在药物干预的情况下,这种情况更为常见<sup>[4]</sup>。近年来,通过对 DKD 新型诊断标志物的探索发现,结合珠蛋白(Hp)水平及其基因型与 DKD 的发生发展相关<sup>[5-6]</sup>。本研究

旨在探讨尿液 Hp(uHp)对 DKD 的诊断价值及 Hp 基因多态性与 DKD 易感性之间的关系。

## 对象与方法

1. 对象:2018 年 9 月 ~ 2019 年 9 月于十堰市太和医院就诊的 T2DM 患者(UAER < 30 mg/24 h)29 例(单纯 T2DM 组),年龄 15 ~ 75 岁。T2DM 的诊断标准参考《中国糖尿病肾病防治指南(2019 年版)》中 T2DM 的诊断标准。纳入同期于我院就诊的 DKD 患者 61 例,按照 UAER 水平将其分为早期 DKD 组(30 mg/24 h ≤ UAER < 300 mg/24 h,33 例)和临床 DKD 组(UAER ≥ 300 mg/24 h,28 例)。排除标准:T1DM、急慢性感染、严重心脑血管疾病、其他系统性或活动性疾病(如血液系统疾病、自身免疫性疾病、结缔组织病或恶性肿瘤等)、妊娠、精神异常、DKD 以外的肾脏疾病患者。随机选取同期于我院体检的 30 例健康者为健康对照组。本研究通过十堰市太和医院伦理委员会审核批准(2020KS016),所有患者均知情同意。

## 2. 方法

(1)一般资料收集:收集所有受试者的一般资料,

项目基金:湖北省自然科学基金资助项目(2019CFB309);十堰市太和医院院级基金资助项目(2019JXXM072)

作者单位:442000 湖北十堰,锦州医科大学十堰市太和医院肾病内科研究生培养基地 湖北医药学院附属医院(宋欣);十堰市太和医院发展策划部(张永),肾病内科(张庆红、胡雪梅),生物医学研究所(孟忠吉)

包括性别、年龄、体重、吸烟史、收缩压及病例组患者的病程。

(2)实验室指标检测:所有受试者于清晨空腹取静脉血 5 ml,分离血浆和血细胞,于 -80 °C 冰箱冻存;取晨尿 10 ml,于 -80 °C 冰箱冻存。采用全自动生化分析仪检测所有受试者血尿素(Urea)、血肌酐(SCr)、糖化血红蛋白(HbA1c)、尿 β<sub>2</sub> 微球蛋白(β<sub>2</sub>-MG)、24 小时尿蛋白排泄率(UAER),计算 GFR。采用武汉云克隆公司的人结合珠蛋白试剂盒(SEA817Hu)检测 uHp 水平。

(3)Hp 基因型测定:采用天根公司人血液基因组 DNA 提取试剂盒(DP318-02)提取血液基因组 DNA,采用聚合酶链反应(PCR)检测 Hp 基因型。参考 Koch 等<sup>[7]</sup>的试验方法设计引物,用上游引物 A(5'-GAGGGGAGCTTGCCTTCCATTG-3'),下游引物 B(5'-GAGATTTTTGAGCCCTGGCTGGT-3')扩增 1 757 bp 的 Hp1 片段和 3 481 bp 的 Hp2 片段,用上游引物 C(5'-CCTGCCTCGTATTAAGTGCACCAT-3')和下游引物 D(5'-CCGAGTGCTCCACATAGCCATGT-3')扩增 349 bp 的 Hp2 片段。PCR 反应体系为模板 DNA 2 μl,dNTP,上下游引物各 0.5 μl,加入 ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μl。反应条件为 95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 1 min,62 °C 退火和延伸 3 min,共 35 个循环;72 °C 终末延伸 7 min。产物采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,经 125 V 电泳 20 min,在紫外光下观察。

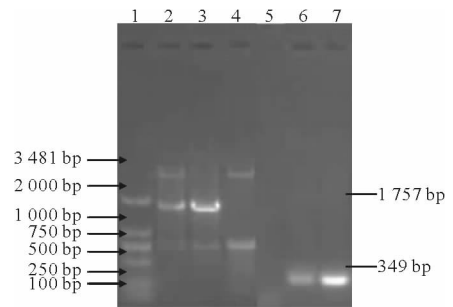
3. 统计学处理:应用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验;不符合正态分布的计量资料以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,多组间比较采用 *Kruskal-Wallis H* 检验,两组间比较采用 *Mann-Whitney U* 检验;计数资料以例数和百分比表示,组间比较采用 *fisher* 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 uHp、

UAER、尿液 β<sub>2</sub>-MG 水平对早期 DKD 的诊断价值。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1.4 组受试者一般资料和实验室检查结果比较:4 组受试者性别、年龄、吸烟史、Urea 比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。单纯糖尿病组、早期 DKD 组及临床 DKD 组患者的收缩压、HbA1c、尿液 β<sub>2</sub>-MG、UAER、uHp 水平均高于健康对照组,GFR 水平低于健康对照组( $P < 0.05$ )。健康对照组、单纯 T2DM 组、早期 DKD 组及临床 DKD 组患者 uHp 水平依次升高,各组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

2. 各组 HP 基因型比较:共检测出 Hp1-1、Hp1-2、Hp2-2 3 种基因型(图 1)。图 1 中条带 1 为 DNA Marker 2 000 bp 的电泳条带,条带 2、3、4 和条带 5、6、7 代表的样本呈一一对应关系。条带 2、3、4 为引物 A 和引物 B 扩增产物,其中 1 757 bp 的片段为含 Hp1 等位基因;条带 5、6、7 为引物 A 和引物 B 扩增产物,其中 349bp 的片段为含 Hp2 等位基因。条带 2、5 对应患者的基因型为 Hp1-1,条带 3、6 和条带 4、7 分别对应患者的基因型为 Hp1-2、Hp2-2。另外,还扩增出含 750bp



注:条带 2、5 为 Hp1-1 基因型,3、6 为 Hp1-2 基因型,4、7 为 Hp2-2 基因型,1 为 DNA Marker 2000bp

图 1 Hp 基因型电泳结果

表 1 4 组受试者一般资料和实验室检查结果比较 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ]

组别	例数	性别(男/女)	年龄(岁)	体重(kg)	吸烟史[例,(%)]	病程(年)	收缩压(mmHg, $\bar{x} \pm s$ )
健康对照组	30	19/11	55.50(45.75,63.00)	62.50(57.75,68.00)	13(43.3%)	-	128.07 ± 13.82
单纯 T2DM 组	29	19/10	52.00(44.75,62.75)	72.00(62.75,76.00)	8(27.6%)	4.50(1.00,10.00)	132.27 ± 18.62 <sup>a</sup>
早期 DKD 组	33	21/12	54.00(48.00,61.75)	68.50(59.50,80.25)	10(30.3%)	4.00(1.00,10.75)	132.30 ± 17.47 <sup>a</sup>
临床 DKD 组	28	15/13	58.00(54.00,67.00)	70.50(64.00,76.00)	11(39.3%)	10.00(6.75,15.25)	142.00 ± 20.24 <sup>a</sup>
<i>P</i> 值		0.872	0.162	0.044	0.592	<0.001	0.004
组别	例数	HbA1c(%)	Urea(mmol/L)	GFR(ml/min)	尿液 β <sub>2</sub> -MG(mg/L)	UAER(mg/24 h)	uHp(ng/ml)
健康对照组	30	5.70(5.40,5.90)	4.78(4.13,5.89)	85.88(74.87,99.39)	0.11(0.08,0.14)	6.58(0.8,8.1)	8.16(6.89,9.95)
单纯 T2DM 组	29	9.80(7.70,11.90) <sup>a</sup>	5.55(4.56,6.04)	85.21(70.72,90.56) <sup>a</sup>	0.50(0.14,0.93) <sup>a</sup>	11.59(8.02,16.63) <sup>a</sup>	14.70(12.09,21.28) <sup>a</sup>
早期 DKD 组	33	9.05(6.48,10.58) <sup>a</sup>	5.15(4.22,5.59)	71.24(62.85,80.95) <sup>a</sup>	0.93(0.76,1.25) <sup>a</sup>	102.60(66.00,147.00) <sup>a</sup>	37.23(17.27,52.80) <sup>ab</sup>
临床 DKD 组	28	8.75(8.02,9.95) <sup>a</sup>	5.60(4.46,7.43)	65.04(54.02,75.22) <sup>a</sup>	0.60(0.37,0.91) <sup>a</sup>	566.40(330.00,1081.35) <sup>a</sup>	51.56(35.22,84.50) <sup>abc</sup>
<i>P</i> 值		<0.001	0.136	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与健康对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与单纯 T2DM 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与早期 DKD 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 3 uHp、UAER、尿液 β<sub>2</sub>-MG 对 DKD 的诊断价值

指标	AUC(95% CI)	最佳诊断界值	敏感度(%)	特异度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)
uHp	0.816(0.714~0.917)	36.68 ng/ml	86.7	64.9	31.58	94.44
UAER	0.759(0.638~0.881)	233.40 mg/24 h	66.7	76.6	35.70	92.20
尿液 β <sub>2</sub> -MG	0.645(0.500~0.789)	1.17 mg/L	46.7	80.5	31.80	88.60

的片段,经查证为引物 B 单独扩增序列<sup>[8]</sup>。3 种 Hp 基因型在各组频率见表 2。3 种基因型在 4 组受试者中的频率分布为 Hp1-1 基因型最少, Hp2-2 基因型频率最高。Hp2-2 基因型频率在对照组最低, 在临床 DKD 组最高, 但组间比较差异无统计学意义 ( $P = 0.525$ )。Hp1-1 及 Hp1-2 基因型频率在在 4 组受试者中的分布无明显规律, 组间比较差异无统计学意义 ( $P = 0.525$ )。

表 2 3 种 Hp 基因型在 4 组患者中出现的频率[例, (%) ]

基因	例数	健康对照组	单纯 T2DM 组	早期 DKD 组	临床 DKD 组
Hp1-1	10	3(30.0)	2(20.0)	3(30.0)	2(20.0)
Hp1-2	40	13(32.5)	12(30.0)	10(25.0)	5(12.5)
Hp2-2	70	16(20.0)	15(21.4)	20(28.6)	21(30.0)

3. uHp、UAER、尿液 β<sub>2</sub>-MG 水平对早期 DKD 的诊断价值:以 GFR 为标准绘制 uHp、UAER、尿液 β<sub>2</sub>-MG 对 DKD 诊断的 ROC 曲线, 结果发现, uHp 的 ROC 曲线下面积(AUC)明显大于 UAER 及尿液 β<sub>2</sub>-MG 的 AUC ( $P < 0.001$ )。见图 2、表 3。

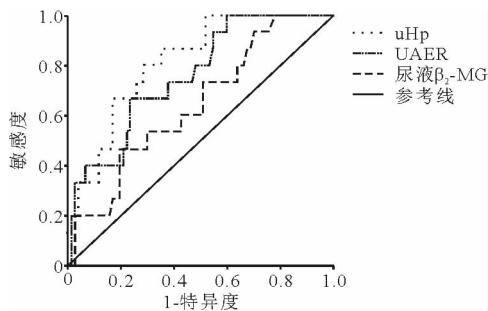


图 2 uHp、UAER、尿液 β<sub>2</sub>-MG 对 DKD 透析的 ROC 曲线

### 讨 论

DKD 属于 T2DM 严重并发症之一, 是导致糖尿病患者不良预后的重要因素。由最初的肾小球高滤过到出现大量蛋白尿的过程中, 肾功能的进展逐渐加速。在 DKD 早期阶段, 肾小球结构的完整性大多得到保留, 晚期时肾小球结构被破坏、滤过屏障受损、肾小管损伤、间质纤维化, 病情难以逆转, 因此早期预测并进行干预尤其重要<sup>[9-10]</sup>。

本研究首先比较了健康人群及不同阶段 DKD 患者的 uHp 水平, 结果发现随着病情进展, uHp 浓度逐渐升高, 表明 uHp 与 DKD 的发生发展相关。为了解 uHp

对 DKD 的预测价值进一步绘制了 ROC 曲线, 结果发现 uHp 的 AUC 明显大于 UAER 和尿液 β<sub>2</sub>-MG, 表明 uHp 对 DKD 的诊断效能优于 UAER 及尿液 β<sub>2</sub>-MG。约登指数取最大值时, 得到 uHp 的最佳诊断界值为 36.68 ng/ml, 即当 uHp > 36.68 ng/ml 时诊断 DKD 具有较高的诊断价值, 此时诊断的敏感度和特异度分别为 86.7%、64.9%。

Hp 主要合成场所在肝脏, 但在皮肤、脂肪组织、肺及肾脏也有表达<sup>[11]</sup>, 在人体内发挥清除血红蛋白、促进血管生成、抗炎、抗氧化应激等作用。T2DM 患者的红细胞脆性增加, 游离 Hb 增多<sup>[12-13]</sup>; DKD 早期, 肾小球呈高滤过状态, 血液中 Hp 经肾小球滤过增多; 另一方面, 在 DKD 早期, Hp 在肾脏的表达反应性增多; 此外, DKD 患者肾间质受累, 肾小管上皮细胞损伤凋亡增加, Hp 从脱落的近端小管上皮细胞进入管腔, 最终出现 DKD 患者尿液中 Hp 浓度升高。

研究表明, Hp 基因型决定了 Hp 在患者体内表达的差异, 另外, 不同基因型的 Hp 产物在功能上可能存在差异, 主要表现在结合游离 Hb 的差异及其与巨噬细胞表面 CD163 亲和力的差异<sup>[14]</sup>。因此, 不同 Hp 基因型与疾病的易感性也有所不同, Hp 基因型可能同样对 DKD 有潜在预测价值<sup>[14]</sup>。我们进一步分析了 Hp 基因型频率在各组的差异, 但并未发现 Hp 与 DKD 进展间存在显著关联。基于以上结果, 我们分析可能原因如下: 一方面, 本研究样本量较小, 可能不能很好代替总体; 另一方面, 虽然本试验尽量避免了试验操作因素造成的误差, 但仍不排除试验过程中人为因素的干扰; 第三, 由于 Hp 基因型频率受年龄、种族、地域等影响<sup>[15]</sup>, 我们的研究仅基于十堰及周边地区的 T2DM 患者, 结果是否普遍适用还需进一步大规模探索。

综上, 本文就 uHp 水平在 DKD 早期诊断中的价值进行了探讨, 发现 uHp 水平随 DKD 病情进展逐步升高, 其对 DKD 的诊断效能优于 UAER 和尿液 β<sub>2</sub>-MG, 对 DKD 早期诊断有很大价值, 作为一种无创、简便的检查手段, 在临床上可以弥补单独使用尿白蛋白进行诊断的不足。另外, 尽管 Hp 基因型影响 Hp 在人体的表达, 但我们的实验中未发现 DKD 的进展与 Hp 基因型之间显著相关, 其中的机制还有待进一步研究发现。

### 参 考 文 献

[1] 杨文英. 中国糖尿病的流行特点及变化趋势[J]. 中国科学: 生命科

学, 2018, 48(8):812-819.

[2] 刘晓宁, 高萍. CKD273 在糖尿病肾病患者早期诊断中的临床价值[J]. 临床内科杂志, 2019, 36(4):283-285.

[3] Krolewski AS, Skupien J, Rossing P, et al. Fast renal decline to end-stage renal disease; an unrecognized feature of nephropathy in diabetes[J]. *Kidney Int*, 2017, 91(6):1300-1311.

[4] Pugliese G, Penno G, Natali A, et al. Diabetic kidney disease: New clinical and therapeutic issues. Joint position statement of the Italian Diabetes Society and the Italian Society of Nephrology on "The natural history of diabetic kidney disease and treatment of hyperglycemia in patients with type 2 diabetes and impaired renal function" [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2019, 29(11):1127-1150.

[5] Gurung RL, Dorajoo R, Liu S, et al. Genetic markers for urine haptoglobin is associated with decline in renal function in type 2 diabetes in East Asians[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):5109.

[6] Dalan R, Lihuh LG. The protean role of haptoglobin and haptoglobin genotypes on vascular complications in diabetes mellitus[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2018, 25(14):1502-1519.

[7] Koch W, Latz W, Eichinger M, et al. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR [J]. *Clin Chem*, 2002, 48(9):1377-1382.

[8] 曲艳, 王云英, 刘格, 等. 早发冠心病患者结合珠蛋白的基因多态性[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(5):1016-1018.

[9] 王宓, 左力. 糖尿病肾病诊治专家共识解读[J]. *临床内科杂志*, 2020, 37(9):675-678.

[10] 张洁, 汪蛟, 江妍霞, 等. 间充质干细胞治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2019, 39(6):394-398.

[11] Andersen C, Stodkilde K, Saederup KL, et al. Haptoglobin[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(14):814-831.

[12] Zhao LL, Makinde EA, Shah MA, et al. Rhinacanthins-rich extract and rhinacanthin C ameliorate oxidative stress and inflammation in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy[J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(4):e12812.

[13] Akhtar M, Taha NM, Nauman A, et al. Diabetic Kidney Disease: Past and Present[J]. *Adv Anat Pathol*, 2020, 27(2):87-97.

[14] Asleh R, Briasoulis A, Berinstein EM, et al. Meta-analysis of the association of the haptoglobin genotype with cardiovascular outcomes and the pharmacogenomic interactions with vitamin E supplementation [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2018, 11:71-82.

[15] Di Vincenzo A, Tana C, El Hadi H, et al. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Metabolic Properties of Tocopherols and Tocotrienols: Clinical Implications for Vitamin E Supplementation in Diabetic Kidney Disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20):5101.

(收稿日期:2020-10-09)

(本文编辑:余晓曼)



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2021.05.016

http://www.lcnkz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.05.016

• 论著摘要 •

## 长寿地区 90 岁及以上人群认知功能、营养状况与日常生活活动自理的关系研究

董昱 王桦 叶光明 尹倩 彭姣

[关键词] 长寿老人; 活动自理; 认知; 营养; 小腿围

[中图分类号] R592 [文献标识码] A

我国人口老龄化发展迅速,其中长寿人口( $\geq 90$ 岁)在第五次与第六次人口普查的十年间数量翻倍。人类期望寿命在不断增加,长寿的可能性呈现持续上升趋势<sup>[1]</sup>,如何“不仅活得久而且活得更好”更显其重要性。能自行进行日常生活活动有助于提升长寿老人的幸福感,并减少他们对家庭和社区的依赖,进而减轻经济负担。小腿围可在一定程度上代表四肢骨骼肌肌肉量<sup>[2]</sup>,受身体活动量和营养的影响,并能预测活动能力<sup>[3,4]</sup>。因此,我们走访调查湖北省钟祥市这一“世界长寿之乡”的 90 岁及以上老人,以评估该地区长寿老人日常生活活动自理情况,探讨疾病、认知功能、营养状况、人体测量指标和生活自理之间的关联及小腿围的中介作用,从而为促进长寿老人活动自理提供思路。

### 对象与方法

1. 对象:2013 年 1 月~2019 年 3 月共调查钟祥地区长寿老人 330 例,排除资料不完整者,最终 300 例纳入分析。根据其活

动力分为活动自理组(128 例)和活动依赖组(172 例)。本研究已获得我院伦理委员会批准。

2. 方法:由经过统一培训的人员对长寿老人(和照料者)进行面对面问卷调查和体格检查。①问卷调查长寿老人基本情况,包括年龄、性别、曾受教育情况、吸烟史、饮酒史、骨折史、近 3 个月有无急性疾病或心理应激、每日服药种类、每日吃饭顿数、每日水果蔬菜摄入量(份)、每日饮水量(杯,1 杯约 200 ml)、近 3 个月进食减少程度;②检查长寿老人视力状况和听力状况;③检测长寿老人上臂围及小腿围:用软尺测量上臂围和小腿围,上臂围为肩峰与尺骨鹰嘴连线中点位置的水平围长,小腿围为腿肚最粗位置的水平围长,单位均为 cm;④长寿老人活动能力、认知功能和营养状况评估:日常生活活动量表总分为 100 分,根据《中国健康老年人标准(2013)》<sup>[5]</sup>,分数 $\geq 95$ 分为活动自理,分数 $< 95$ 为活动依赖;简易智能量表总分为 30 分,得分越高,说明认知功能越好;简易营养评估量表总分为 30 分,得分越高,说明营养状况越好。

3. 统计学处理:应用 SAS 9.4 和 Mplus 8.3 软件进行统计分析。符合正态分布的定量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验;不符合正态分布的定量数据以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,组间比较

基金项目:湖北省老龄办重点项目研究基金(HBLLB2017004)

作者单位:430071 武汉,武汉大学中南医院老年科(董昱、王桦、尹倩、彭姣),检验科(叶光明)

通信作者:王桦, E-mail: hosphw@sina.com