

尿肾损伤分子-1对脓毒症大鼠急性肾损伤的诊断价值

张红燕 尚跃丰 李家瑞 张继翱 王文欣 乔佑杰

【摘要】 目的 观察脓毒症大鼠干预与否两种情况下尿肾损伤分子-1 (uKIM-1) 浓度变化特点, 并评价其对脓毒症早期急性肾损伤 (AKI) 的诊断价值。方法 按照随机数字表法将 56 只 SD 大鼠分为假手术组 (8 只)、脓毒症模型组 (16 只)、血必净干预组 (16 只)、黄芪注射液和柴胡注射液联合干预组 (16 只) 4 组。采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症模型; 假手术组仅开腹、暴露盲肠后关腹。假手术组和模型组于术后经尾静脉注射生理盐水 4 mL/kg、12 h 1 次, 同时腹腔注射生理盐水 13 mL/kg、每日 1 次; 血必净组经尾静脉注射血必净注射液 4 mL/kg、12 h 1 次, 同时腹腔注射生理盐水 13 mL/kg、每日 1 次; 黄芪柴胡组经尾静脉注射生理盐水 4 mL/kg、12 h 1 次, 同时腹腔注射黄芪注射液 8 mL/kg 和柴胡注射液 5 mL/kg、每日 1 次。各组均于术前及术后 6、12、18、24、36、48 和 72 h 取眼眶血和尿液, 检测血清肌酐 (SCr)、血清钠 (SNa)、尿肌酐 (uCr)、尿钠 (uNa) 和 uKIM-1 或经 uCr 校正的 uKIM-1 (cuKIM-1)。绘制受试者工作特征曲线 (ROC), 评价各指标对 24 h 内发生 AKI 的预测价值。结果 假手术组各时间点 uKIM-1、cuKIM-1 均无较大波动。模型组、血必净组和黄芪柴胡组 uKIM-1、cuKIM-1 均于术后 6 h 较术前迅速升高 [uKIM-1 (ng/L): 288.05 ± 163.59 比 68.70 ± 0.20 , 210.06 ± 53.90 比 70.47 ± 3.32 , 206.37 ± 110.04 比 69.95 ± 2.92 ; cuKIM-1 (ng/mg): 6.92 ± 0.03 比 1.82 ± 0.48 , 5.22 ± 0.91 比 1.67 ± 0.35 , 5.40 ± 1.83 比 1.57 ± 0.31 , 均 $P < 0.01$], 且明显高于假手术组 [uKIM-1 为 (69.80 ± 25.38) ng/L, cuKIM-1 为 (1.68 ± 1.70) ng/mg, 均 $P < 0.01$]; 6 h 后 3 组 uKIM-1、cuKIM-1 变化差异无统计学意义; 两个干预组仅 cuKIM-1 于 12 h 和 18 h 时明显低于模型组。将 3 个脓毒症大鼠各自按照 24 h 内是否发生 AKI 分层, 其中模型组和血必净组中发生 AKI 与未发生 AKI 大鼠各时间点 uKIM-1、cuKIM-1 差异均无统计学意义; 黄芪柴胡组中发生 AKI 的大鼠自 12 h 起 uKIM-1、cuKIM-1 均明显高于未发生 AKI 的大鼠。ROC 曲线分析显示, 6 h 时 uKIM-1、cuKIM-1 对 24 h 内发生 AKI 均有预测价值 [uKIM-1: ROC 曲线下面积 (AUC) = 0.717, 切线值为 198.10 ng/L 时, 敏感度为 72.7%, 特异度为 73.1%, $P = 0.010$; cuKIM-1: AUC = 0.706, 切线值为 5.76 ng/mg 时, 敏感度为 66.7%, 特异度为 80.0%, $P = 0.018$], 而 6 h 时尿量、SNa、uNa、uCr 和尿微量白蛋白 (umALB) 则没有诊断价值。结论 实验采用的干预因素可能会影响脓毒症大鼠 uKIM-1 浓度; 早期 uKIM-1、cuKIM-1 浓度可作为发生 AKI 的诊断因子。

【关键词】 肾损伤分子-1; 急性肾损伤; 脓毒症

急性肾损伤 (AKI) 可发生于多种严重疾病, 脓毒症是导致 AKI 的重要危险因素, 是重症加强治疗病房 (ICU) 中 AKI 发生的最主要原因^[1-4]。由于 AKI 缺乏早期诊断手段, 导致 AKI 发生率和病死率较高^[5-7]。尿肾损伤分子-1 (uKIM-1) 是早期诊断 AKI 的理想标志物^[8], 但在脓毒症时 uKIM-1 的变化特点和早期诊断 AKI 的能力尚未见报道。本研究通过在动物实验模拟脓毒症诱发 AKI 过程中干预与未干预两种情况下, 观察大鼠 uKIM-1 浓度的变化特点及对 AKI 的早期诊断价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 健康清洁级雄性 SD 大鼠 56 只, 体质量 200 ~ 250 g, 购自北京大学医学部实验动物中心, 动物许可证号: SCXK (京) 2011-0012。按随机数字表法将大鼠

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.05.016

基金项目: 天津市医药卫生重点学科攻关项目 (10KG118)

作者单位: 300211 天津市天津医院血液净化中心 (张红燕), 急诊科 (尚跃丰、李家瑞、张继翱、王文欣); 300121 天津市人民医院 ICU (乔佑杰)

通讯作者: 李家瑞, Email: 13821359282@163.com

分为假手术组 (8 只)、脓毒症模型组 (16 只)、血必净干预组 (16 只)、黄芪注射液和柴胡注射液联合干预组 (16 只)。

1.2 模型制备及处理方法: 采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症模型^[9], 假手术组暴露盲肠后立即逐层缝合腹壁切口。模型组和假手术组均于术后经尾静脉注射生理盐水 4 mL/kg、12 h 1 次, 同时腹腔注射生理盐水 13 mL/kg、每日 1 次; 血必净组经尾静脉注射血必净注射液 4 mL/kg、12 h 1 次, 同时腹腔注射生理盐水 13 mL/kg、每日 1 次; 黄芪柴胡组经尾静脉注射生理盐水 4 mL/kg、12 h 1 次, 同时腹腔注射黄芪注射液 8 mL/kg 和柴胡注射液 5 mL/kg、每日 1 次。所有大鼠静脉和腹腔注射方案均持续至大鼠死亡或实验结束。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 标本采集: 于术前及术后 6、12、18、24、36、48、72 h 取大鼠眶静脉血 0.5 mL, 离心取上清液, 置于 -20 °C 冰箱待测。每 6 h 用 2 mL 注射器穿刺大鼠膀胱反复抽取尿液至无尿液抽出, 加上代谢笼中收集的尿液作为大鼠 6 h 尿量并记录数值; 离心尿液取上清液, 存于 -20 °C 冰箱待测。

1.4 检测指标及方法: 血清或尿液标本室温融化后, 用全

自动生化仪检测血清肌酐 (SCr)、血清钠 (SNa)、尿肌酐 (uCr)、尿钠 (uNa) 浓度。uKIM-1 检测按酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒操作步骤进行。AKI 的诊断采用改善全球肾脏病预后组织 (KDIGO) 制定的标准,以某时间点 SCr 与术前 SCr 比值 ≥ 1.5 视为 AKI^[10-12]。以 uKIM-1 与同时点 uCr 比值获得经 uCr 校正的 cuKIM-1 (cuKIM-1)。

1.5 统计学方法:数据处理采用 SPSS 20.0 软件。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用重复测量方差分析;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验。绘制受试者工作特征曲线 (ROC),分析 6 h 时 uKIM-1 或 cuKIM-1 以及血、尿生化指标对 24 h 内发生 AKI 的早期预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症模型大鼠 AKI 发生情况 (表 1):模型组于术后 12 h 即有大鼠发生 AKI,24 h 时 AKI 发生率最高为 62.5%,36 h 后大鼠全部死亡。24 h 内 3 组均有大鼠发生 AKI,且黄芪柴胡组 AKI 发生率较模型组和血必净组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而模型组和血必净组间 AKI 发生率无显著差异。

表 1 各组大鼠不同时间点急性肾损伤 (AKI) 发生率比较

组别	动物数 (只)	AKI 发生率 [% (只)]					
		12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h
模型组	16	12.5 (2)	56.2 (9)	62.5 (10)	62.5 (10)		
血必净组	16	6.2 (1)	18.8 (3)	43.8 (7)	68.8 (11)	81.2 (13)	100.0 (16)
黄芪柴胡组	16	0 (0)	0 (0) ^a	6.2 (1) ^{ab}	37.5 (6)	68.8 (11)	93.8 (15)

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$;与血必净组比较,^b $P < 0.05$;空白为动物全部死亡

2.2 uKIM-1 浓度随时间变化特点

2.2.1 各组 uKIM-1 和 cuKIM-1 变化趋势 (表 2):假手术组各时间点 uKIM-1 和 cuKIM-1 水平平缓,无较大波动。模型组、血必净组和黄芪柴胡组术后 6 h uKIM-1 和 cuKIM-1 水平均迅速升高,且明显高于假手术组 (均 $P < 0.01$);6 h 后,模型组、血必净组、黄芪柴胡组 uKIM-1 和 cuKIM-1 无明显变化,均维持在较高水平。血必净组与黄芪柴胡组 cuKIM-1

表 2 脓毒症急性肾损伤各组大鼠不同时间点 uKIM-1 和 cuKIM-1 水平变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	uKIM-1 (ng/L)					
		术前	术后 6 h	术后 12 h	术后 18 h	术后 24 h	术后 36 h
假手术组	8	71.11 \pm 3.08	69.80 \pm 25.38	76.92 \pm 31.47	74.64 \pm 35.10	61.65 \pm 22.64	60.14 \pm 22.04
模型组	16	68.70 \pm 0.20	288.05 \pm 163.59 ^{ab}	283.03 \pm 142.15 ^{ab}	279.42 \pm 136.96 ^{ab}	248.27 \pm 117.45 ^{ab}	259.93 \pm 103.87 ^{ab}
血必净组	16	70.47 \pm 3.32	210.06 \pm 53.90 ^{ab}	222.69 \pm 47.72 ^{ab}	251.28 \pm 58.20 ^{ab}	250.85 \pm 47.97 ^{ab}	234.89 \pm 33.89 ^{ab}
黄芪柴胡组	16	69.95 \pm 2.92	206.37 \pm 110.04 ^{ab}	196.66 \pm 80.88 ^{ab}	193.85 \pm 79.36 ^{ab}	207.76 \pm 73.73 ^{ab}	217.33 \pm 89.24 ^{ab}

组别	动物数 (只)	cuKIM-1 (ng/mg)					
		术前	术后 6 h	术后 12 h	术后 18 h	术后 24 h	术后 36 h
假手术组	8	1.79 \pm 0.64	1.68 \pm 0.70	1.87 \pm 0.76	1.80 \pm 0.60	1.70 \pm 0.84	1.58 \pm 0.63
模型组	16	1.82 \pm 0.48	6.92 \pm 0.03 ^{ab}	7.80 \pm 0.40 ^{ab}	8.57 \pm 0.41 ^{ab}	8.23 \pm 1.34 ^{ab}	8.51 \pm 2.30 ^{ab}
血必净组	16	1.67 \pm 0.35	5.22 \pm 0.91 ^{ab}	5.53 \pm 1.24 ^{abc}	6.53 \pm 2.03 ^{ab}	6.90 \pm 1.27 ^{ab}	6.49 \pm 1.42 ^{ab}
黄芪柴胡组	16	1.57 \pm 0.31	5.40 \pm 1.83 ^{ab}	5.55 \pm 1.37 ^{abc}	5.73 \pm 1.75 ^{abc}	6.46 \pm 1.88 ^{abc}	6.79 \pm 1.92 ^{ab}

注:uKIM-1 为尿肾损伤分子 -1, cuKIM-1 为经尿肌酐校正的尿肾损伤分子 -1;与本组术前比较,^a $P < 0.01$;与假手术组比较,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$

于 12 h 和 18 h 时明显低于模型组 (均 $P < 0.05$)。

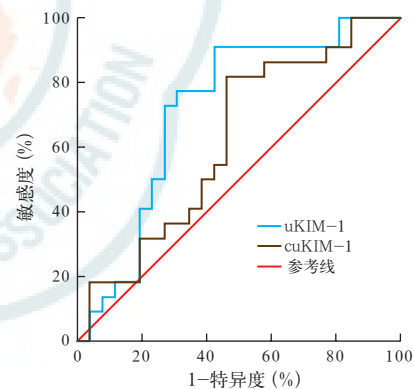
将 3 个脓毒症大鼠各自按照 24 h 内是否发生 AKI 分层,其中模型组和血必净组中发生 AKI 与未发生 AKI 大鼠各时间点 uKIM-1、cuKIM-1 差异均无统计学意义;黄芪柴胡组中发生 AKI 的大鼠自 12 h 起 uKIM-1、cuKIM-1 均明显高于未发生 AKI 的大鼠。

2.3 uKIM-1 对 AKI 的预测能力 (表 3;图 1):将所有脓毒症大鼠混合,评价 6 h 时 uKIM-1 或 cuKIM-1 预测 24 h 内发生 AKI 的能力。结果显示,6 h 时 uKIM-1 或 cuKIM-1 对 24 h 内发生 AKI 均有预测能力 (均 $P < 0.05$);而 6 h 时尿量、SNa、uNa、uCr 和尿微量白蛋白 (umALB) 则没有诊断价值。

表 3 脓毒症大鼠 6 h 时 uKIM-1 和 cuKIM-1 预测 24 h 内发生 AKI 的 ROC 分析结果

分析指标	AUC	切线值	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值
6 h uKIM-1	0.717	198.10	72.7	73.1	0.010
6 h cuKIM-1	0.706	5.76	66.7	80.0	0.018

注:uKIM-1 为尿肾损伤分子 -1, cuKIM-1 为经尿肌酐校正的尿肾损伤分子 -1, AKI 为急性肾损伤, AUC 为受试者工作特征曲线 (ROC) 下面积



注:uKIM-1 为尿肾损伤分子 -1, cuKIM-1 为经尿肌酐校正的尿肾损伤分子 -1, AKI 为急性肾损伤, ROC 为受试者工作特征曲线

图 1 脓毒症大鼠 6 h 时 uKIM-1 和 cuKIM-1 预测 24 h 内发生 AKI 的 ROC 曲线

3 讨论

目前监测 AKI 仍依赖 SCr 和肾小球滤过率 (GFR)^[13-14], 而 SCr 和 GFR 不能反映肾脏功能失常和结构损伤^[15-16], 还不能及时对 AKI 作出诊断, 从而影响了 AKI 的及时治疗, 导致 AKI 发生率和病死率仍较高^[17-18]。有研究表明, 肾损伤分子-1 (KIM-1) 在正常组织中不表达, 但在缺血和肾脏毒性损伤后的肾组织中表达显著增强^[19]。KIM-1 主要在近端肾小管上皮受到损伤后表达, 尿中 KIM-1 水平上升提示近端肾小管损伤^[20]。因此, uKIM-1 可能是诊断 AKI 的理想标志物^[8]。

对 SD 大鼠左侧孤立肾模型的肾缺血/再灌注 (I/R) 损伤和肾缺血后处理保护作用的研究显示, I/R 后 6 h 时 uKIM-1 水平明显升高, 24 h 达到峰值, 为基础值的 120 倍; 缺血后处理大鼠 uKIM-1 的变化趋势与 I/R 大鼠相似, 但各时间点 uKIM-1 水平较 I/R 大鼠明显降低^[21]。双侧肾 I/R 损伤大鼠 uKIM-1 在第 1 天即显著高于基线水平, 且随着损伤程度加深, uKIM-1 表达逐渐增加, 一直持续到损伤恢复^[22]。临床研究显示, 脓毒症患者进入 ICU 后 6 h, uKIM-1 水平即较入 ICU 前明显增高, 24 h 后仍升高, 直至某一最高水平后轻微下降, 但仍维持在较高水平^[23]。本研究中, 脓毒症大鼠制模后 6 h uKIM-1、cuKIM-1 均迅速升高, 而后升高幅度明显减小。出现这种情况的可能原因是, 无论是缺血损伤还是肾毒性损伤导致的 AKI, 研究者采用的均为一次性损伤, 而脓毒症损伤是一个完整、连续的过程, 并且较严重, 因此脓毒症肾损伤导致的 KIM-1 主要由肾小管上皮细胞分泌^[20], 表现为 KIM-1 先大量分泌, 而后分泌量轻度增加; 当损伤达到一定程度后, 肾小管细胞 KIM-1 耗竭, 而细胞来不及补充失去的 KIM-1, 即表现为分泌量有所降低。还有研究显示, 入 ICU 后 6 h 内完成复苏的脓毒症患者 uKIM-1 水平随时间延长呈下降趋势, 而 6 h 内未完成复苏的脓毒症患者 uKIM-1 水平随时间延长逐渐升高; 并且存活者 uKIM-1 水平于复苏后缓慢降低, 而死亡患者 uKIM-1 水平则随时间逐渐升高^[24]。本研究 3 个脓毒症组中, 两个干预组大鼠 uKIM-1、cuKIM-1 在 6 h 后的大多数时间点均低于模型组, 与前述研究结果相似。提示对脓毒症及时有效的治疗可降低尿中 KIM-1 的分泌量, 间接反映了治疗因素在脓毒症情况下对肾脏的保护作用。

临床实际工作中, 有相当一部分脓毒症患者未能接受及时治疗, 这部分患者 uKIM-1 的变化仍无研究报告。本研究采用大鼠脓毒症模型来观察按照 AKI 发生和干预分层后 uKIM-1 浓度随时间变化的规律。结果显示, 脓毒症大鼠 uKIM-1 无论是否发生 AKI 或是否接受干预治疗, uKIM-1 随时间变化趋势相似, 均于术后 6 h 明显升高; 并且发生 AKI 大鼠的 uKIM-1 有高于未发生 AKI 大鼠的趋势。提示脓毒症情况下, 治疗可能会影响 uKIM-1 和 cuKIM-1 的水平, 并且早期 uKIM-1 和 cuKIM-1 对脓毒症诱发的 AKI 均有诊断价值。

综上所述, 本研究结果显示, 脓毒症时无论是否接受干

预措施, 是否发生 AKI, uKIM-1 和 cuKIM-1 随时间变化曲线均相近, 其浓度水平会受施加的干预措施影响; uKIM-1 和 cuKIM-1 均对脓毒症发生 AKI 有诊断价值。

参考文献

- [1] Zarjou A, Agarwal A. Sepsis and acute kidney injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22 (6): 999-1006.
- [2] 李家瑞. 重症监护病房的急性肾损伤[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (3): 238-240.
- [3] 廖晓辉, 张玲, 钟玲, 等. 住院患者急性肾损伤的病因及预后分析[J]. 重庆医学, 2010, 39 (10): 1250-1253.
- [4] 方艺, 丁小强, 钟一红, 等. 住院患者急性肾损伤的发病情况调查[J]. 中华肾脏病杂志, 2007, 23 (7): 417-421.
- [5] Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury [J]. Curr Opin Pediatr, 2011, 23 (2): 194-200.
- [6] 赵娜, 田焕焕, 李志, 等. 脓毒症并发急性肾损伤的危险因素分析与早期诊断[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (9): 542-545.
- [7] 李立斌, 严静. 急性肾损伤的早期诊治: 路在何方? [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (4): 209-211.
- [8] McCullough PA. Radiocontrast-induced acute kidney injury [J]. Nephron Physiol, 2008, 109 (4): p61-72.
- [9] Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. Surgery, 1979, 85 (2): 205-211.
- [10] KDIGO AKI Work Group. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury [J]. Kid Int Suppl, 2012, 2 (1): 1-138.
- [11] 汤晓静, 梅长林. KDIGO 指南解读: 急性肾损伤的诊治[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32 (12): 914-917.
- [12] 周景霞, 尤不聪, 刘春涛, 等. 探讨急性肾损伤分期的 KDIGO 标准在选择连续性血液净化治疗介入时机中的指导意义[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (7): 420-423.
- [13] Khan E, Batuman V, Lertora JJ. Emergence of biomarkers in nephrology [J]. Biomark Med, 2010, 4 (6): 805-814.
- [14] 黄海樱, 陈波, 周强, 等. 肾功能早期损伤诊断指标联合应用的价值[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (4): 298-302.
- [15] 赵宇, 费晓, 王鸣, 等. 急性肾损伤患者尿液 IL-18、NGAL 的变化[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14 (4): 334-335.
- [16] Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin—an emerging troponin for kidney injury [J]. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23 (12): 3737-3743.
- [17] Siew ED, Ware LB, Ikizler TA. Biological markers of acute kidney injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22 (5): 810-820.
- [18] 赵平, 郑瑞强. 连续性肾脏替代治疗严重感染所致急性肾损伤的研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (2): 118-120.
- [19] Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans [J]. Clin Transl Sci, 2008, 1 (3): 200-208.
- [20] Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, et al. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 290 (2): F517-529.
- [21] 纪翔, 马露林, 卢剑, 等. 肾缺血后处理对大鼠 Kim-1 表达的影响及对缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 北京大学学报(医学版), 2012, 44 (4): 511-517.
- [22] Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, et al. Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure [J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18 (3): 904-912.
- [23] Tu Y, Wang H, Sun R, et al. Urinary netrin-1 and KIM-1 as early biomarkers for septic acute kidney injury [J]. Ren Fail, 2014, 36 (10): 1559-1563.
- [24] 高琳琳, 李国福, 赵阳, 等. 肾损伤分子-1 在脓毒症患者治疗中的临床研究[J]. 中华危重病急救医学, 2012, 24 (11): 647-650.

(收稿日期: 2015-03-12)

(本文编辑: 保健媛)