

## I 型心肾综合征模型早期肾损伤生物标记物的评价

赵月秋<sup>1</sup>, 张晓红<sup>2</sup>, 管 静<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup> 江苏联合职业技术学院南京卫生分院护理教研室, 江苏 南京 210038; <sup>2</sup> 南京医科大学附属脑科医院神经外科, 江苏 南京 210029; <sup>3</sup> 南京医科大学附属妇幼保健院药剂科, 江苏 南京 210004)

**[摘要]** 目的:拟通过建立肾脏缺血/再灌注模型探讨 CRS 的肾保护措施从而指导心肾等重要靶器官的临床保护。方法:52 只急性心肌梗死(AMI)再灌注存活的猪入组,根据后续处理的不同随机分为以下 4 组:即室温复苏组、室温复苏同时灌注 500 mL 常温生理盐水组、室温复苏同时灌注 500 mL 4℃生理盐水组和假手术组。各组同时观察了发生室性心律失常后 1、3、5 和 10 min 开放血流再灌注复苏后急性肾损伤(AKI)的相关指标的变化。收集血液及随机尿液标本进行相关的测定。结果:猪 AMI 缺血再灌注模型出现肾小管损伤标记物中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL),L 型脂肪酸结合蛋白(L-FABP),白介素 18(IL-18)的升高,提示了亚临床 AKI 的发生,且肾损伤在血流动力学不稳定后迅速发生,而不同于以往文献中报道血流动力学不稳定后数小时出现 AKI。在不同的干预措施下提示肾损伤的升高的生物学标志物有不同程度的下降,但其对远期预后的影响有待进一步研究探讨。结论:提示反映肾小管损伤标志物的升高可先于肾小球功能的改变,为 I 型 CRS 进行及时有效肾脏保护措施比如低温再灌注复苏争取宝贵的时机。

**[关键词]** 心肾综合征;缺血-再灌注;急性肾损伤;NGAL;IL-18;L-FABP

**[中图分类号]** R541.6

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2016)12-1446-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20161209

2010 年改善全球肾脏病预后(KDIGO)和急性透析质量指导组(ADQI)明确的提出了心肾综合征(cardiorenal syndrome, CRS)这一概念,CRS 是急性失代偿心衰治疗中重要的并发症,根据心功能不全的发病急慢又可进一步将 CRS 分为 I 型(急性)和 II 型(慢性)。一项回顾性研究表明,在 438 例诊断为 CRS 的患者中, I 型患者占 48.2%, II 型患者占 21.9%<sup>[1-2]</sup>。

目前缺乏进行 CRS 肾损伤机制研究的动物模型。传统的肾动脉钳夹模型构建的肾脏缺血再灌注模型并不能解释 CRS 肾损伤的具体病理生理机制,且对 CRS 患者的临床研究并没有解决具体观察点和观察时间问题。现有的肾损伤诊断方法如血清肌酐、尿量等对于判断急性肾损伤(AKI)不够早期、准确、可靠<sup>[3-4]</sup>,以致及时早期的肾脏保护措施无法干预。综上所述,CRS 肾脏损伤的机制复杂,采用何种治疗方案为最佳以及何时早期干预仍有待探讨。

近年来,一些新的血清生物标记物的发现推动了急性肾损伤的早期诊断,目前常用的生物标记物

包括中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL), L 型脂肪酸结合蛋白(L-type fatty acid-binding protein, L-FABP),白介素 18(Interleukin-18, IL-18)等<sup>[5-7]</sup>。这些生物标记物在肾脏受损早期即表达异常,是反映急性肾损伤的早期敏感指标。本研究构建了 I 型 CRS 的动物模型,并利用这些新型标记物观察肾脏损伤的情况,为进一步明确肾脏损伤机制和合理干预、早期保护提供一条新的思路。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

猪急性心肌梗塞(AMI)缺血/再灌注模型的方法按本组以往发表的方法进行<sup>[8]</sup>。冠状动脉左前降支阻塞 90 min 后开放血流,心电图和左室造影证实 AMI 的发生。本实验总共有 62 只猪入组,实验动物诱发心室颤动 30 min 后进行再灌注干预,10 只猪接受再灌注治疗后由于持续心室颤动未能纠正而死亡。52 只存活的猪分为 4 组分别接受 4 种不同模式的复苏干预:A 组:室温复苏组;B 组:室温复苏同时灌注 500 mL 常温生理盐水组;C 组:室温复苏同时灌注 500 mL 4℃生理盐水组;D 组:假手术组。各

**[基金项目]** 江苏省卫生计生委基金(J201515)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fd5821@126.com

组同时观察了发生室性心律失常后 1、3、5 和 10 min 开放血流再灌注复苏后 AKI 的相关指标的变化, 1 d 后外科处死。实验动物操作均按照江苏省动物实验规范执行。

## 1.2 方法

### 1.2.1 血液及尿液标本的收集

收集血液和随机尿液标本, 4℃离心 10 min, 分别取血浆及尿液上清用自动生化分析仪(OLYMPUS AU5400)进行肾脏功能的检测。

### 1.2.2 血浆及尿 NGAL、L-FABP、IL-18 的检测

血浆及尿液 NGAL 的检测采用猪 ELISA 试剂盒(KIT 044, Bio-Porto Diagnostics 公司, 丹麦), 血浆及尿液 L-FABP 的检测采用猪 ELISA 试剂盒(KIT ab156517, Abcam 公司, 英国), 血浆及尿液 IL-18 的检测采用猪 ELISA 试剂盒(KIT BMS672/BMS672TEN, eBioscience 公司, 美国), 具体检测方法按照试剂盒说明书。NGAL、L-FABP、IL-18 试剂盒的检测范围分别为 10~400 ng/mL、0~10 ng/mL、39.1~2 500.0 pg/mL。

### 1.3 统计学方法

采用 SAS6.12 统计分析软件对实验数据进行分析处理, 计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 不同测量时间点采用重复测量的 ANOVA 方差分析,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 再灌注导致的亚临床急性肾损伤

各种复苏组血肌酐和尿素氮水平均低于假手术组, 不同复苏组的肾脏损伤指标 NGAL、L-FABP、IL-18 均较假手术组显著升高。尿白蛋白肌酐比值(A/C)、血清胱抑素 C 水平也呈类似变化。

### 2.2 不同复苏干预模式对临床肾脏损伤指标的影响

随着开始复苏时间的延长, 尿 A/C 显著升高, 5、10 min 复苏较 1、3 min 复苏升高更为显著, 给予

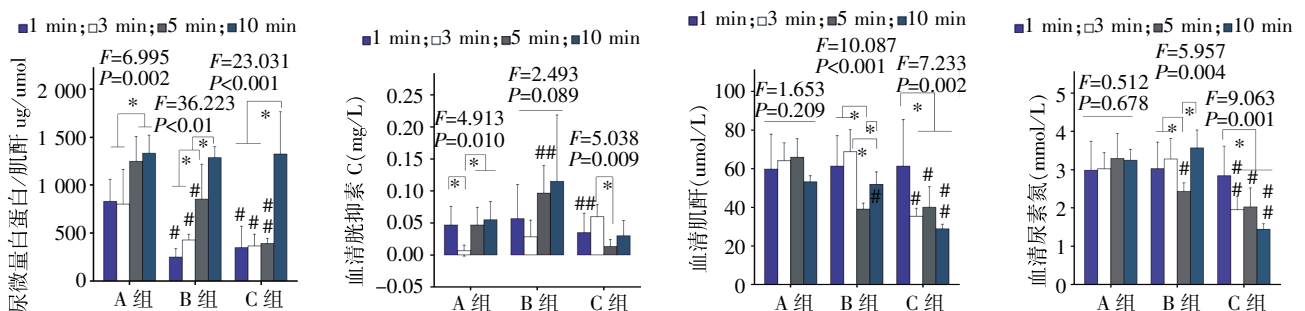
生理盐水复苏的两组, 除了 10 min 干预点, 均较非生理盐水复苏组显著下降; 胱抑素 C 水平的变化在复苏 3 min 干预时最为明显; 血肌酐和尿素氮变化的水平类似。(图 1)

### 2.3 不同复苏干预模式对生物学标志物变化的影响

图 2 显示了不同生物学标志物 NGAL、L-FABP 和 IL-18 在不同复苏干预模式下的变化。常温条件下, 不同时间点复苏血 NGAL 并无时间变化性趋势, 而血 L-FABP 在 10 min 复苏时显著增加, 而血 IL-18 水平则在 5 min 复苏时显著降低(图 2)。尿液 NGAL 在 5、10 min 复苏显著升高, 而尿 L-FABP 则在 3、10 min 复苏时较 1 min 复苏显著升高, 而尿 IL-18 并未表现这种趋势(图 2)。以上 3 种血标志物在生理盐水复苏情况下表现出类似的变化趋势。尿液 IL-18 和 L-FABP 在低温生理盐水复苏条件下变化一致, 即 1 min 复苏最低, 19 min 复苏最高; 而 NGAL 则在 5 min 复苏时为最低。进一步比较同一时间点 3 种复苏模式的结果发现, 血 NGAL 和 IL-18 并无明显变化, 而低温复苏 L-FABP 出现显著性改变。而在 1 min 复苏不同条件下, 3 种尿液生物学标志物即出现了显著性变化。10 min 复苏 3 种条件均可以发现 3 种标志物的显著性升高, 尤其是低温复苏组尤为明显。

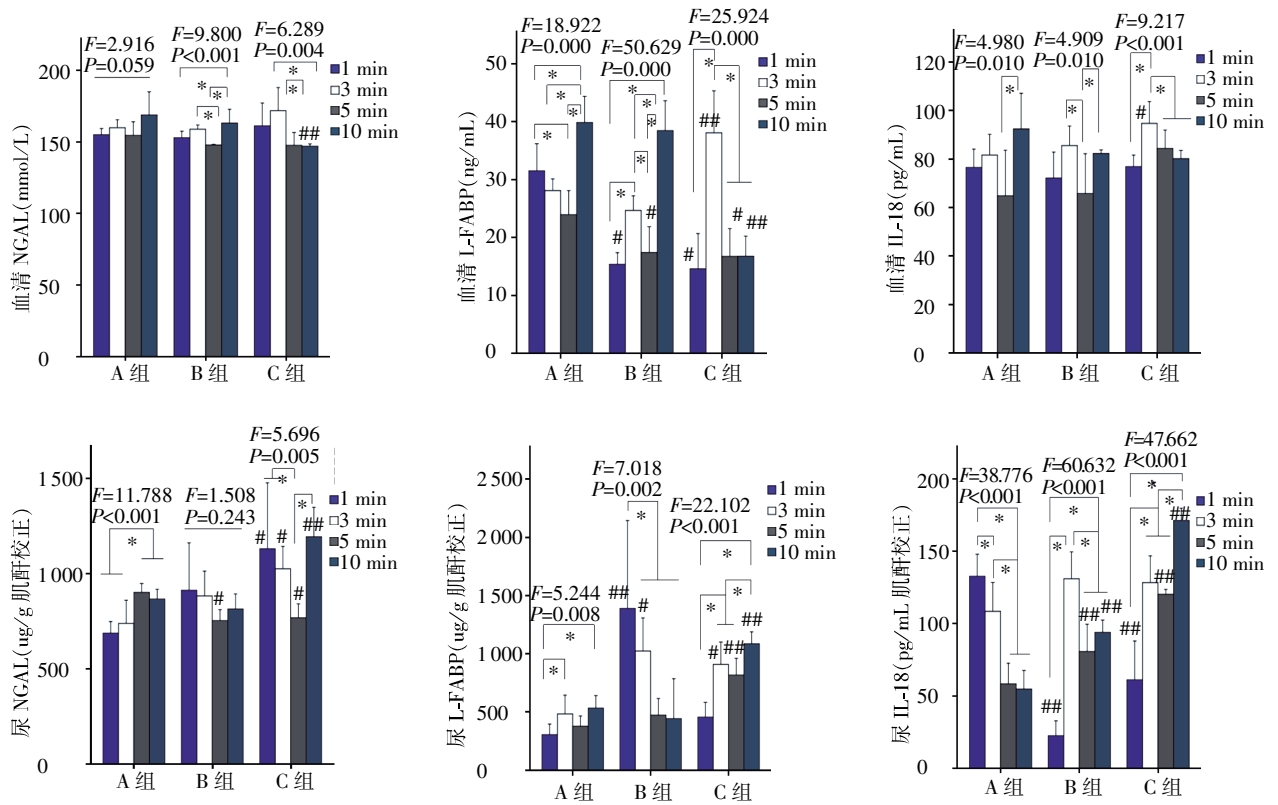
## 3 讨论

本实验发现: 首先, AMI 后再灌注可以诱导亚临床急性肾损伤的发生, 尿液 A/C 值、血清胱抑素 C 以及尿液 NGAL、L-FABP、IL-18 的升高证实了 I 型心肾综合征模型的建立; 其次, 对 I 型心肾综合征的干预时间和干预方法做了初步的探讨; 第三, 在 I 型心肾综合征早期血肌酐、尿素氮并不是反映早期肾脏损伤的敏感指标。与此同时, 本实验建立的猪 AMI 缺血再灌注模型诱导的亚临床 AKI 更接近人体病理生理情况, 是今后研究心-肾对话一个重要平台。



组内不同时间点比较, \* $P < 0.05$ ; 同一时间点与 A 组比较, # $P < 0.05$ ; 同一时间点与其他 2 组比较, ## $P < 0.05$ 。

图 1 不同干预时间及不同干预模式下血液及尿液生物标志物的变化



组内不同时间点比较, \* $P < 0.05$ ; 同一时间点与 A 组比较, \* $P < 0.05$ ; 同一时间点与其他 2 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 不同干预时间及不同干预模式下血液及尿液生物标志物的变化

心肾综合征是急性失代偿性心衰过程中的重要并发症,目前采用 Ronco 分型标准<sup>[5-8]</sup>,将 CRS 分为 5 型,其中 I 型 CRS 指急性心功能障碍(包括急性非代偿性心衰、急性冠脉综合征、心脏手术后低心排综合征)引起的急性肾损伤,其发病率占急性非代偿性心衰住院患者的 27%~45%,及急性冠脉综合征患者的 9%~54%<sup>[9]</sup>。

在本实验中,猪心肌梗死及再灌注模型仅仅引起亚临床急性肾损伤,其诊断主要依靠肾小管损伤标记物 NGAL、IL-18、L-FABP 水平的升高。亚临床 AKI 的诊断也是来源于近年来生物标志物的不断发现。已经有证据表明 15%~20% 的患者在未出现符合目前 AKI 诊断标准的情况下就已经出现了急性肾小管损伤,而且和患者的预后密切相关<sup>[10]</sup>。因此,AKI 的诊断不仅仅依靠血肌酐/尿量,更应该评估这些肾小管损伤标记物。对这些患者进行早期监测、早期诊断显得尤为重要。

基因组学、转录水平以及蛋白质组学已经证实 NGAL 是 AKI 的早期标志物。本组研究进一步证实,和对照组相比,血液和尿液 NGAL 水平显著升高。这也和其它研究者大鼠 AMI 模型的结果类似,提示对于 AMI 患者检测血液和尿液 NGAL 的重要性<sup>[10]</sup>。

IL-18 是许多器官缺血及炎症损伤的重要介质,在缺血性损伤环境下肾小管产生并分泌至尿液中<sup>[11]</sup>。本实验中,AMI 缺血再灌注猪模型血、尿均显著升高,也和既往的研究相吻合,提示其可作为亚临床 AKI 的检测指标。L-FABP 主要在近曲小管表达,在再灌注过程中是脂质过氧化的重要靶位点。日本学者<sup>[12]</sup>的研究发现在急性缺血再灌注损伤过程中,尿 L-FABP 显著增加。本研究再次证实了血、尿 L-FABP 表达增加在诊断亚临床 AKI 中的价值。

进一步比较本组实验结果,发现血、尿生物学标志物的趋势并不完全一致,本文推测在缺血环境下,肾脏局部血流分布发生了改变,即使皮质血流恢复灌注而髓质的低灌注仍可能持续存在。本结果表明,低温复苏和常温复苏相比,10 min 组血浆 NGAL 和 L-FABP 显著下降,提示即使在 10 min 进行低温复苏仍有价值。肾小管损伤标记物中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL),L 型脂肪酸结合蛋白(L-FABP),白介素 18(IL-18)等在急性肾损伤中的应用,已有大量文献报道,目前认为用单一指标评估肾损伤的程度有一定的局限性,几种联合更有价值,但在急性心梗后的肾损伤中尚未有报道,且 AKI 动物模型基本集中在鼠类等啮齿类动

物,与人类疾病模型尚有差别<sup>[13]</sup>,且目前,尚缺乏 I 型 CRS 的动物模型,本研究 and 既往临床观察的 I 型 CRS 患者不同,观察了更接近人类疾病模型的猪动物模型早期而非数小时或数天的变化,可能更能在组织学改变早期提供功能学相关的指标变化趋势。

本研究对临床判断和治疗决策的选择提供了新的依据。首先,在功能学改变出现之前检测反映肾小管功能的血、尿生物学指标有助于提高临床医师对肾损伤的警惕性;第二,尿量仍是反映患者液体平衡的良好指标,也是连续性肾脏替代治疗开始及终止判断的重要指标,而肾小球滤过功能指标如血肌酐、胱抑素 C 等临床反应滞后,推动基于生物学标志物的临床诊断可能会对患者的预后产生重大影响;第三,低温液体复苏有助于在 I 型 CRS 肾损伤早期保护肾功能改善预后。

[参考文献]

[1] Ronco C, Cruz DN, Ronco F. Cardiorenal syndromes [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2009, 15(5): 384-391

[2] Lane BR, Demirjian S, Weight CJ, et al. Performance of the chronic kidney disease epidemiology study equations for estimating glomerular filtration rate before and after nephrectomy [J]. *J Urol*, 2010, 183(3): 896-901

[3] Prosek J, Agarwal A, Parikh SV. Cardiorenal syndrome and the role of ultrafiltration in heart failure [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2013, 10(1): 81-88

[4] Haase M, Kellum JA, Ronco C. Subclinical AKI-an emerging syndrome with important consequences [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2012, 8(12): 735-739

[5] Ronco C, Stacul F, McCullough PA. Subclinical acute kidney injury (AKI) due to iodine-based contrast media [J].

*Eur Radiol*, 2013, 23(2): 319-323

[6] Ronco C, Kellum JA, Haase M. Subclinical AKI is still AKI [J]. *Crit Care*, 2013, 16(3): 313

[7] Latchamsetty R, Fang J, Kline-Rogers E, et al. Prognostic value of transient and sustained increase in in-hospital creatinine on outcomes of patients admitted with acute coronary syndrome [J]. *Am J Cardiol*, 2007, 99(7): 939-942

[8] Chen Y, Shao DB, Zhang FX, et al. Establishment and evaluation of a swine model of acute myocardial infarction and reperfusion-ventricular fibrillation-cardiac arrest using the interventional technique [J]. *J Chin Med Assoc*, 2013, 76(9): 491-496

[9] Marenzi G, Assanelli E, Campodonico J, et al. Acute kidney injury in ST-segment elevation acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock at admission [J]. *Crit Care Med*, 2010, 38(2): 438-444

[10] Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(2): 480-485

[11] Melnikov VY, Faubel SG, Siegmund B, et al. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(8): 1083-1091

[12] Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, et al. Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(11): 2894-2902

[13] Cho E, Kim M, Ko YS, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of cardiorenal syndrome in a rat myocardial infarction model [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(11): 2766-2778

[收稿日期] 2016-06-13

欢迎投稿 欢迎订阅