

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00867

## 免疫胶体金快速试纸条法检测尿视黄醇结合蛋白4对肾移植患者肾功能不良状态的评估价值

张芳, 沈兵\*, 范昱, 秦燕, 邱建新

上海交通大学附属第一人民医院泌尿中心肾移植科, 上海 200080

**[摘要]** **目的** 研究免疫胶体金快速试纸条法检测尿视黄醇结合蛋白4(RBP4)对肾移植患者肾功能不良状态的评估价值。**方法** 选取本中心随访的141例肾移植术后患者为研究对象,分别以酶联免疫吸附(ELISA)法和免疫胶体金快速试纸条法测定尿中RBP4含量,采用kappa检验评价两种方法的一致性。根据免疫胶体金快速试纸条法检测结果呈现深红、浅红和无显色分别代表RBP4高、中、低浓度,将患者分为3组,分析患者临床检测指标与RBP4结果间的关系。**结果** 以ELISA方法和免疫胶体金快速试纸条法在检测肾移植患者尿RBP4方面高度一致( $\kappa=0.813, 95\%CI:0.763\sim0.933$ )。根据免疫胶体金快速试纸条法结果,不同浓度RBP4组间在空腹血糖( $P=0.028$ )、血肌酐( $P=0.021$ )、血尿素氮( $P=0.012$ )、血白蛋白( $P=0.014$ )、血红蛋白( $P=0.026$ )、尿蛋白( $P=0.015$ )等方面差异有统计学意义。**结论** 以免疫胶体金快速试纸条法检测尿RBP4浓度,可根据试纸条反应颜色达到半定量检测的目的,其结果可靠、灵敏、操作快捷,便于移植术后患者随访过程中早期发现肾小管损害。

**[关键词]** 肾移植;肾功能不全;视黄醇结合蛋白4;免疫胶体金法

**[中图分类号]** R 692.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)08-0867-05

### Value of urine retinol-binding protein 4 detected by colloidal gold immunochromatography assay in evaluating renal dysfunction in kidney transplant patients

ZHANG Fang, SHEN Bing\*, FAN Yu, QIN Yan, QIU Jian-xin

Department of Renal Transplantation, Urology Center, The First People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the value of urine retinol-binding protein 4 (RBP4) detected by colloidal gold immunochromatography assay in evaluating the renal dysfunction state in kidney transplant patients. **Methods** A total of 141 kidney transplant patients followed-up by our urology center were included in this study. The RBP4 levels in the urine of the participants were measured by both enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and colloidal gold immunochromatography assay. The consistency of the two methods was evaluated by kappa test. The patients were divided into three groups according to the results of colloidal gold immunochromatography assay, in which dark red, light red and colorless representing the low, medium and high levels of RBP4, respectively. The relationship between patient clinical manifestations and RBP4 results was analyzed. **Results** The two methods of ELISA and colloidal gold immunochromatography assay showed high consistency in detecting RBP4 concentration in the urine of kidney transplant patients ( $\kappa=0.813, 95\%CI: 0.763-0.933$ ). According to the results of colloidal gold immunochromatography assay, the low, medium and high levels RBP4 groups had significantly different fasting glucose ( $P=0.028$ ), serum creatinine ( $P=0.021$ ), blood urea nitrogen ( $P=0.012$ ), albumin ( $P=0.014$ ), hemoglobin ( $P=0.026$ ) and proteinuria ( $P=0.015$ ). **Conclusion** Colloidal gold immunochromatography assay detecting urine retinol binding protein 4 can achieve semi-quantitative results via reaction color of the strip. It is reliable, sensitive and easy to perform, making it easy for the early diagnosis of renal tubular injury after kidney transplantation during follow-up.

**[Key words]** kidney transplantation; renal insufficiency; retinol-binding protein 4; colloidal gold immunochromatography assay

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(8): 867-871]

**[收稿日期]** 2015-07-08 **[接受日期]** 2015-07-29

**[基金项目]** 上海市自然科学基金(14ZR1433200). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (14ZR1433200).

**[作者简介]** 张芳, 博士, 主治医师. E-mail: zhangfangRBP4@126.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-63240090-3161, E-mail: shenbingyishi@163.com

肾移植是改善终末期肾病患者生活质量的一种优越的肾脏替代治疗方法<sup>[1]</sup>。然而,术后各种原因(例如急、慢性排斥反应和免疫抑制药物不良反应等)均可导致移植肾的损伤<sup>[2]</sup>。临床上主要依据临床表现、肾功能检查和移植肾穿刺活检等来诊断肾移植术后肾功能不良状态,但临床表现和肾功能检查缺乏敏感性,而作为金标准的移植肾穿刺活检却又具有有创性、标本片面性和动态持续监测的困难性等不足<sup>[3-4]</sup>。随着各种新型、高敏的分子生物学技术手段的应用,将新型生物标记用于肾移植术后肾损伤的检测,日益受到临床一线工作者重视。

视黄醇结合蛋白4(retinol-binding protein 4, RBP4)是一种相对分子质量为21 200的低分子量蛋白,经肾小球滤出后,在近端小管几乎完全被重吸收。RBP4生成量相对恒定,且具有较好的稳定性,故其在尿中的排泄量可作为肾小管功能受损的灵敏指标<sup>[5-8]</sup>,与移植肾的病理改变有密切关系<sup>[9-11]</sup>。目前,临床上应用较多的检测RBP4的方法主要是酶联免疫吸附(ELISA)法和免疫比浊法。胶体金免疫层析方法是一种将胶体金标记、免疫检测和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记免疫检测技术,具有灵敏、便捷、安全、低成本等特点。我们尝试采用胶体金免疫层析技术建立了一种快速试纸条检测尿RBP4的方法,前期研究初步证实其敏感、可靠、快速、便捷<sup>[12-13]</sup>。本研究在前期研究的基础上进一步探讨免疫胶体金快速试纸条法对肾移植患者术后可能出现的肾功能不良状态的评估价值。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 招募141例在上海交通大学附属第一人民医院泌尿中心进行随访的肾移植成人受者,均为首次移植,移植时间为术后第1天至术后215个月,透析时间0~178个月,热缺血时间为(5.14±2.00)min,冷缺血时间为(8.77±4.18)h。术后均服用泼尼松(Pred)、吗替麦考酚酯(MMF)、钙调磷酸酶抑制剂(CNI)三联免疫抑制剂,后者包括环孢素A(CsA)和他克莫司(FK506)。本研究方案得到本院伦理委员会批准,所有受者均签署知情同意书。

1.2 RBP4的测定 实验过程采用盲法。取收集好的尿液样本,将每个样本分装成两管备用。分别

以ELISA法和免疫胶体金快速试纸检测全部患者尿液中RBP水平。RBP ELISA检测试剂为上海太阳生物技术有限公司产品,批号60143,线性范围0.78~50 ng/mL,可报告范围40~2 550 ng/mL,方法溯源至西门子诊断公司内部参考标准,产品注册证号:沪食药监械(准)字2009第2400805号。RBP胶体金免疫层析法检测试剂为上海柏纳生物技术有限公司产品,批号20110401,灵敏度300 ng/mL,产品注册证号:沪食药监械(准)字2012第2400077号。胶体金试剂盒使用方法:将尿液标本以含2% Tween-20的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液按1:300比例稀释,浸入免疫胶体金试纸中3 min,进行检测对比。试纸上检测线(T线)显示为“红色”时代表检测结果为阳性,浓度越高,颜色越深;T线不显色代表检测结果为阴性。质控线为C线,所有试纸的C线均显色,表明质控良好。Bernard等<sup>[14]</sup>发现正常人尿液中RBP4的浓度上限为308 μg/L,而我们经研究发现免疫胶体金快速试纸条法最小检测浓度可达1 ng/mL,且RBP4含量小于300 ng/mL时结合临床指标仍有肾小管损伤可能出现,故本研究采用100 ng/mL标准作为临界水平,将尿液标本在制备过程中以含2% Tween-20的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液按1:100比例稀释。

1.3 统计学处理 采用SAS 8.1软件对结果进行统计分析,组间比较采用多个独立样本的非参数检验(Kruskal-Wallis *H* 检验)。尿液中RBP4含量与患者尿蛋白水平的相关性分析采用等级资料的非参数检验方法(Median 检验)。检验水准( $\alpha$ )为0.05。采用kappa一致性检验评估免疫胶体金快速试纸条法和ELISA检测结果的一致性。以ELISA法为金标准,根据公式计算免疫胶体金快速试纸条法的灵敏度和特异度:灵敏度=[真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)]×100%,特异度=[真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数)]×100%。

## 2 结果

2.1 基本资料 本研究共招募了本中心141例肾移植受者,其中男性90例,女性51例;年龄32~69岁,平均年龄(48±10)岁;移植术后时间0~215个月,中位数42个月。

2.2 免疫胶体金快速试纸条法与 ELISA 检测结果的一致性 免疫胶体金快速试纸条法与 ELISA 法检测判断结果如表 1 所示。对结果进行 kappa 一致性检验,计算得到  $\kappa=0.813$ ,95%CI:0.763~0.933。由于 kappa 系数 $>0.8$ ,可以认为两种方法在检测肾移植患者尿 RBP4 方面高度一致。通过计算,免疫胶体金快速试纸条法检测尿 RBP4 的灵敏度为 100%,特异度为 84.3%。

表 1 两种 RBP4 检测方法一致性分析

Tab 1 Consistency analysis of the two methods in detecting urine RBP4 levels

Colloidal gold immunochromatography	ELISA		Total
	+	-	
+	58	13	71
-	0	70	70
Total	58	83	141

RBP4: Retinol-binding protein 4

2.3 尿 RBP4 含量与临床特征的关系 ELISA 试剂盒测定患者尿液中 RBP4 含量为 6.8~80 936 ng/mL,与患者血肌酐及尿蛋白水平均存在明显相关性(血肌酐:相关系数  $r=0.655$ , $P<0.001$ ;尿蛋白:相关系数  $r=0.608$ , $P<0.001$ )。尿 RBP4 阳性率( $>300$  ng/mL)为 41.1%(58/141),高于尿常规尿蛋白阳性率 34.0%(48/141)。

采用免疫胶体金快速试纸条法检测所有患者的尿 RBP4 含量,并将检测结果分为 A、B、C 3 组。A 组患者 T 线呈深红色,其 RBP4 浓度基本大于 1 000 ng/mL,入组 58 例病例;C 组患者 T 线无显色,其 RBP4 浓度基本小于 100 ng/mL,为 70 例;B 组患者 T 线呈浅红色,RBP4 浓度介于 100 ng/mL 与 1 000 ng/mL 之间,为 13 例患者。比较 3 组患者的生化指标,发现 3 组间在空腹血糖( $P=0.028$ )、血肌酐( $P=0.021$ )、血尿素氮( $P=0.012$ )、血白蛋白( $P=0.014$ )、血红蛋白( $P=0.026$ )、尿蛋白( $P=0.015$ )等方面差异有统计学意义(表 2)。

表 2 根据免疫胶体金快速试纸条法检测的尿 RBP4 水平分组后各组实验室指标的比较

Tab 2 Comparison of laboratory findings among 3 groups according to RBP4 levels detected by colloidal gold immunochromatography assay in urine

Index	Total (N=141)	Group A (N=58)	Group B (N=13)	Group C (N=70)	P value
SCr <sub>CB</sub> /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), median(min-max)	92(52-752)	163(73-752)	92(52-149)	79(62-166)	0.021
BUN <sub>CB</sub> /( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\bar{x} \pm s$ or median(min-max)	9.3 $\pm$ 5.8	9.7(6.6-30)	7.6 $\pm$ 2.2	6.7 $\pm$ 2.0	0.012
UA <sub>CB</sub> /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\bar{x} \pm s$	336 $\pm$ 94	369 $\pm$ 112	325 $\pm$ 90	314 $\pm$ 78	0.402
HBG <sub>CB</sub> /( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\bar{x} \pm s$	119 $\pm$ 21	106 $\pm$ 18	118 $\pm$ 27	127 $\pm$ 14	0.026
TG <sub>CB</sub> /( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\bar{x} \pm s$	2.2 $\pm$ 1.1	2.1 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 1.5	0.589
TC <sub>CB</sub> /( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\bar{x} \pm s$	5.5 $\pm$ 1.4	5.2 $\pm$ 1.8	5.3 $\pm$ 1.1	5.7 $\pm$ 1.4	0.591
BG <sub>CB</sub> /( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\bar{x} \pm s$	6.1 $\pm$ 2.3	7.2 $\pm$ 3.6	5.9 $\pm$ 2.1	5.4 $\pm$ 0.5	0.028
ALT <sub>CB</sub> /( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\bar{x} \pm s$ or median(min-max)	13.2 $\pm$ 12.0	12(2-65)	10(4-35)	9.1 $\pm$ 3.3	0.555
Alb <sub>CB</sub> /( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\bar{x} \pm s$	45 $\pm$ 5	42 $\pm$ 5	43 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3	0.014
K <sub>CB</sub> /( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), $\bar{x} \pm s$	4.1 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.2	0.576
Proteinuria <i>n</i>					0.015
0	93	15	8	70	
±	29	26	3	0	
+	10	9	1	0	
++	4	3	1	0	
+++	3	3	0	0	
++++	2	2	0	0	

The patients were divided into group A, B, and C according to the result of colloidal gold immunochromatography assay, which representing the low, medium and high levels of RBP4 concentrations. RBP4: Retinol-binding protein 4; SCr: Serum creatinine; BUN: Blood urea nitrogen; UA: Uric acid; HBG: Hemoglobin; TG: Triglyceride; TC: Total cholesterol; BG: Blood glucose; ALT: Alanine aminotransferase; Alb: Albumin; K: Potassium

2.4 13例“假阳性”患者病因分析 13例患者胶体金免疫层析法检测结果阳性而ELISA法检测结果阴性,经临床分析,该13例患者移植时间为120~200个月,ELISA检测结果提示RBP4浓度为200~300 ng/mL。5例患者曾在随访过程中出现CNI药物浓度一过性增高( $CsA > 200$  ng/mL或 $FK506 > 15$  ng/mL),另外8例出现移植肾功能延迟恢复,其中2例患者行移植肾穿刺,1例提示急性排斥反应,另1例提示CNI药物中毒,该2例移植肾病理均见小管间质损伤。药物性肾小管损伤及移植肾排斥反应均为肾移植术后肾小管间质损伤的常见病因,尽管本组患者尿蛋白目前呈阴性,ELISA检测 $RBP4 < 300$  ng/mL,但临床有小管损伤诱因存在,部分经病理证实,因此可认为灵敏度调整至100 ng/mL后能更灵敏地反映出肾小管损伤。

### 3 讨论

RBP4由肝细胞合成,并且与视黄醇、甲状腺运载蛋白相结合,从而有助于维生素A的代谢与储存<sup>[6,10]</sup>。在血浆中,约90%的RBP4能与甲状腺素结合前蛋白结合,形成高分子蛋白复合物。此高分子蛋白复合物难以被肾小球滤过膜滤过。然而,当视黄醇被转运到靶细胞后,RBP4便会游离到血浆中,进而迅速被肾小球滤过。而这些被肾小球滤过的RBP4,绝大部分会在肾近曲小管被重吸收<sup>[14-15]</sup>。因此,正常尿液中RBP4的排量甚微。但是,当肾近曲小管损伤时,患者的尿排量明显增加,故其RBP4排量也会相应增加。另外,正常情况下,RBP4在尿中稳定性较强,不易分解,也不受pH和血压干扰。Koch等<sup>[16]</sup>认为,尿RBP4排泄增加先于微白蛋白尿的出现。因此,尿RBP4可作为一项敏感性较强的肾近曲小管损伤的早期诊断指标<sup>[17-20]</sup>。

肾移植患者由于长期服用免疫抑制剂,以及各种急慢性排斥、低免疫状态易造成感染等因素存在,极易出现肾小管损伤。尿RBP4与移植肾病理中的肾小管损伤程度有密切关系,而且对于合并糖尿病及高血压的患者更能早期提示肾脏轻微损害<sup>[19]</sup>。我们通过ELISA方法与免疫胶体金快速试纸条法检测肾移植术后患者尿中RBP4中含量,发现两种方法检测结果一致性高,免疫胶体金快速试纸条法更加便于临床检测,且其最小检测浓度达到1 ng/

mL,可根据试纸条反应颜色达到半定量检测的目的,满足临床需要<sup>[21-23]</sup>。

根据免疫胶体金试纸条法检测结果进行分组,各组间在空腹血糖( $P = 0.028$ )、血肌酐( $P = 0.021$ )、血尿素氮( $P = 0.012$ )、血白蛋白( $P = 0.014$ )、血红蛋白( $P = 0.026$ )、尿蛋白( $P = 0.015$ )等方面差异有统计学意义。这表明免疫胶体金快速试纸条法的测定结果能够一定程度上反映肾小管的损伤程度。结合临床和病理资料,我们认为将检测的灵敏度提高到100 ng/mL后可以更早期发现肾小管损伤,方便移植术后患者随访过程中早期发现肾小管损害,有利于早期治疗,改善患者预后。但由于本研究样本量相对较小,且受者主要来自于中国东南沿海,故而仍需要多中心、大样本的前瞻性研究进一步验证。

### [参考文献]

- [1] Browne O T, Allgar V, Bhandari S. Analysis of factors predicting mortality of new patients commencing renal replacement therapy 10 years of follow-up[J]. BMC Nephrol, 2014, 15: 20.
- [2] Niu S F, Li I. Quality of life of patients having renal replacement therapy[J]. J Adv Nurs, 2005, 51: 15-21.
- [3] Swedko P J, Clark H D, Paramsothy K, Akbari A. Serum creatinine is an inadequate screening test for renal failure in elderly patients[J]. Arch Intern Med, 2003, 163: 356-360.
- [4] Glasscock R J. Con: Kidney biopsy: an irreplaceable tool for patient management in nephrology[J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, 30: 528-531.
- [5] 薛邦禄,李妍,徐维家. 血胱抑素C、视黄醇结合蛋白与尿微量清蛋白/肌酐联合检测在早期肾损伤中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34: 425-426.
- [6] Pallet N, Chauvet S, Chassé J F, Vincent M, Avillach P, Levi C, et al. Urinary retinol binding protein is a marker of the extent of interstitial kidney fibrosis[J]. PLoS One, 2014, 9: e84708.
- [7] Barazzoni R, Zanetti M, Semolic A, Pirulli A, Cattin M R, Biolo G, et al. High plasma retinol binding protein 4 (RBP4) is associated with systemic inflammation independently of low RBP4 adipose expression and is normalized by transplantation in

- nonobese, nondiabetic patients with chronic kidney disease[J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2011, 75: 56-63.
- [8] 金莉,徐宽,牛凯莉,沈鹤柏. 视黄醇结合蛋白4对肾脏疾病早期诊断的评估[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14: 2976-2979.
- [9] Frey S K, Henze A, Nagl B, Raila J, Scholze A, Tepel M, et al. Effect of renal replacement therapy on retinol-binding protein 4 isoforms[J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 401(1-2): 46-50.
- [10] Frey S K, Nagl B, Henze A, Raila J, Schlosser B, Berg T, et al. Isoforms of retinol binding protein 4 (RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver[J]. *Lipids Health Dis*, 2008, 7: 29.
- [11] Henze A, Raila J, Kempf C, Reinke P, Sefrin A, Querfeld U, et al. Vitamin A metabolism is changed in donors after living-kidney transplantation: an observational study[J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 231.
- [12] 邢国杰. 基于胶体金免疫层析技术的视黄醇结合蛋白检测试剂的制备和临床验证[D]. 上海:上海师范大学,2012.
- [13] 邢国杰,张芳,王锋,孙轶卓,沈鹤柏. 胶体金免疫层析法视黄醇结合蛋白检测试剂对肾小管功能损伤的诊断价值评价[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12: 7030-7033.
- [14] Bernard A M, Vyskocil A A, Mahieu P, Lauwerys R R. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury[J]. *Clin Chem*, 1987, 33: 775-779.
- [15] Masaki T, Anan F, Tsubone T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, et al. Retinol binding protein 4 concentrations are influenced by renal function in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Metabolism*, 2008, 57: 1340-1344.
- [16] Koch A, Weiskirchen R, Sanson E, Zimmermann H W, Voigt S, Dückers H, et al. Circulating retinol binding protein 4 in critically ill patients before specific treatment: prognostic impact and correlation with organ function, metabolism and inflammation[J]. *Crit Care*, 2010, 14: R179.
- [17] Awad H, el-Safty I, el-Barbary M, Imam S. Evaluation of renal glomerular and tubular functional and structural integrity in neonates[J]. *Am J Med Sci*, 2002, 324: 261-266.
- [18] Henze A, Frey S K, Raila J, Tepel M, Scholze A, Pfeiffer A F, et al. Evidence that kidney function but not type 2 diabetes determines retinol-binding protein 4 serum levels[J]. *Diabetes*, 2008, 57: 3323-3326.
- [19] Codoñer-Franch P, Mora-Herranz A, Simó-Jordá R, Pérez-Rambla C, Boix-García L, Faus-Pérez A. Retinol-binding protein 4 levels are associated with measures of liver and renal function and oxidant/antioxidant status in obese children[J]. *J Pediatr*, 2013, 163: 593-595.
- [20] Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lossner U, Kratzsch J, Blüher M, et al. Serum levels of adipokine retinol-binding protein-4 in relation to renal function[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30: 2588-2592.
- [21] Junker R, Schlebusch H, Luppá P B. Point-of-care testing in hospitals and primary care[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2010, 107: 561-567.
- [22] Sautter R, Lipford E H. Point-of-Care testing: guidelines and challenges[J]. *N C Med J*, 2007, 68: 132-135.
- [23] Bian C, Zhang F, Wang F, Ling Z, Luo M, Wu H, et al. Development of retinol-binding protein 4 immunocolloidal gold fast test strip using high-sensitivity monoclonal antibodies generated by DNA immunization [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42: 847-853.