

糖尿病肾病患者血清抗 AT1 和 $\alpha 1$ 受体抗体与肾小球滤过率的关系

赵林双, 向光大, 乐 岭, 孙慧玲, 翟振艳, 朱广平, 刘 晔

【摘要】 目的 探讨糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)患者血清抗血管紧张素 II 1 型受体自身抗体(angiotensin II type 1 receptor activating antibody, AT1-AA)和抗 $\alpha 1$ 肾上腺素能受体($\alpha 1$ -R)自身抗体与肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)降低的相关性。**方法** ①以合成的 AT1 受体和 $\alpha 1$ 受体多肽片段为抗原,应用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)技术,检测 371 例 DN 患者(A 组)、107 例 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者(B 组)、47 例正常对照(C 组)自身抗体。②肾动态显像,采用同位素 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记法测定 GFR。③ELISA 技术测定尿蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)。**结果** ①A 组 AT1 和 $\alpha 1$ 受体抗体阳性率分别为 51.5% 和 47.7%, 明显高于 B 组(19.5% 和 15.9%)及 C 组(10.6% 和 8.5%), $P < 0.05$ 。②A 组中, GFR 异常者 AT1 和 $\alpha 1$ 受体抗体阳性率分别为 59.5% 和 63.1%, 明显高于 GFR 正常者的 30.5% 和 35.1% ($P < 0.01$)。③A 组中, GFR 异常组中 AT1 和 $\alpha 1$ 受体抗体均阳性者 130 例, 阳性率为 59.9%, 显著高于 GFR 正常组(17.5%, 27/154, $P < 0.01$)。**结论** DN 患者 GFR 降低, 血清抗 AT1 和 $\alpha 1$ 受体抗体阳性率明显升高, 糖尿病肾功能不全与抗 AT1 和 $\alpha 1$ 受体自身抗体有关。

【关键词】 糖尿病肾病; 血管紧张素 II 1 型受体; $\alpha 1$ 受体; 自身抗体; 肾小球滤过率

【中图分类号】 R 587.1

【文献标识码】 A

Relation between Autoantibodies against AT1 Receptor and $\alpha 1$ -adrenergic and Glomerular Filtration Rate in Patients with Diabetic Nephropathy

ZHAO Lin-shuang, XIANG Guang-da, YUE Ling, SUN Hui-ling, ZHAI Zhen-yan, ZHU Guang-ping, LIU Ye. Department of Endocrinology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan Hubei 430070, China

Corresponding author: ZHAO Lin-shuang, E-mail: zls7111@yahoo.com.cn, Tel: 13397191371

【Abstract】 Objective To observe the relation between the autoantibodies against $\alpha 1$ -adrenergic receptor and AT1 receptor and the glomerular filtering coefficient (GFR) in the patients with diabetic nephropathy (DN). **Methods** The epitopes of the second extracellular loop of $\alpha 1$ receptor (192-218) and AT1 receptor (165-191) were synthesized and used respectively to screen sera autoantibodies of 371 DN patients (group A), 107 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) but no renal failure (group B) and 47 healthy controls (group C) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). GFRs and urinary albumin excretion rate (UAER) were assayed by isotope $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -lablble method and ELISA respectively. **Results** The positive rate of the autoantibodies against AT1 receptor and $\alpha 1$ receptors was 51.5% and 47.7% respectively in group A, which was significantly higher than that in group B (19.5% and 15.9%) and group C (10.6% and 8.5%, $P < 0.05$). These positive rates in DN patients in group A with abnormal GFR was 59.5% and 63.1% respectively, which was significantly higher than that in DN patients in group A with normal GFR (30.5% and 35.1%, $P < 0.01$). In DN patients in group A with abnormal GFR, the positive rate of the both autoantibodies was 59.9% (130/217), which was significantly higher than that with normal GFR (17.5%, 27/154, $P < 0.01$). **Conclusion** DN patients have decreased GFR and increased positive rates of the autoantibodies against AT1 receptor and $\alpha 1$ receptors. Renal dysfunction of DM patients are related with these autoantibodies.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Angiotensin II type 1 receptor activating antibody; $\alpha 1$ receptors; Autoantibodies; Glomerular filtration rate

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病

患者最常见的肾脏微血管病变, 早期无临床指征且进展缓慢, 易被忽视, 一旦进入临床蛋白尿期, 则病情重、预后差。因此, 深入研究 DN 发病机制, 探讨合理有效的防治方法, 避免 DN 肾功能不全恶化, 是当前内分泌领域研究的重点课题^[1-2]。本课题组的前期研究发现,

【基金项目】 湖北省自然科学基金项目(2002AB116)

【作者单位】 430070 湖北武汉, 广州军区武汉总医院内分泌科(赵林双、向光大、乐 岭、孙慧玲、翟振艳、朱广平、刘 晔)

【通讯作者】 赵林双, E-mail: zls7111@yahoo.com.cn; Tel: 13397191371

在难治性高血压患者血清中,检出抗 AT1 受体和 $\alpha 1$ 受体自身抗体,这些患者合并肾损害频率明显增高^[3]; DN 患者 $\beta 1$ 和 AT1 受体抗体阳性率明显升高^[4-6]。肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)是反映肾脏血流动力学的敏感指标。GFR 降低,与 2 型糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者早期肾功能损害有关,可作为 DN 最早期诊断指标。但肾功能不全、GFR 降低的 DN 患者血清抗 AT1 受体和 $\alpha 1$ 受体自身抗体是否升高,目前尚未见报道。本研究大样本检测 DN 患者血清中 $\alpha 1$ 和 AT1 受体抗体,并进行 GFR 测定,深入观察 GFR 降低的 DN 患者血清抗 AT1 受体和 $\alpha 1$ 受体自身抗体阳性率,为免疫机制参与 DN 发病过程提供依据。

1 对象与方法

1.1 对象

2001-11/2007-01 月收治的 371 例 DN 患者(A 组),107 例 2 型糖尿病患者(B 组)。47 例正常对照(C 组)来自作者医院健康体检中心。记录临床情况及实验室检查资料,采集受检查者清晨空腹静脉血 5 ml,离心取血浆后 -40℃ 贮存备用。

1.2 方法

1.2.1 多肽合成 采用 pssm-8 型多肽自动合成仪(Shimadzu 公司,日本)用固相多肽合成法合成 $\alpha 1$ 和 AT1 受体^[3-4],参考文献[5]分别合成相当于人 $\alpha 1$ 与 AT1 受体细胞外第二环氨基酸序列的肽段。 $\alpha 1$ -受体 192-218 位氨基酸残基片段(氨基酸残基序列为 G-W-K-E-P-V-P-P-D-E-R-F-C-G-I-T-E-E-A-G-Q-A-V-F-S-S-V);AT1 受体 165-191 位氨基酸残基片段(AT1 受体段氨基酸 H-T-I-H-A-A-V-P-P-L-G-A-L-T-V-Y-A-P-H-T-G-S-G-A-S-T-L),用高压液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析合成肽的纯度 >95%。

1.2.2 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测自身抗体^[3,5] 实验中设置空白对照和阳性、阴性对照,测光密度(optical density, OD)值时以空白对照调零,以保证检测结果可靠性。以健康人群为参考血清,取 OD 值超出对照健康人群两倍标准差的患者血清标本作为阳性对照血清。研究标本血清与阴性血清的吸光度之比[(标本 OD 值-空白对照 OD 值)/(阴性对照 OD 值-空白对照 OD 值)]超过 2.1 倍者判为抗体检测阳性。

1.2.3 血清受体抗体的检出频率^[3,5] 抗 AT1 受体

抗体:用已知 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 稀释度, AT1 受体及抗体阳性和阴性血清作为参考血清,患者血清在稀释度 1:20 和 1:40 阳性率较为稳定,选择 1:40 作为常规稀释度。抗 $\alpha 1$ 受体抗体:用 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 稀释度。患者血清在稀释度 1:100 和 1:200 阳性率较为稳定,选择 1:200 作为常规稀释度。 $\alpha 1$ 受体抗体:批内变异系数(coefficient of variation, CV) 7.26%, 批间 CV 10.1%。AT1 受体自身抗体:批内 CV 6.6%, 批间 CV 9.7%。

1.2.4 GFR 测定方法 肾动态显像,采用同位素^{99m}Tc^m-DTPA 标记法测定 GFR,显像仪器为德国西门子公司 ECAM 型,放化纯度 >90%,放射性活度为 111~185 MBq,连续采集 20 min。记录患者身高、体质量及注射前后计数器计数。仪器条件:单光子发射体层摄影(single photon emission computed tomography, SPECT), γ 照相机带自动处理系统计算机,配以通用低能平行孔准直器。患者准备:正常进食饮水,显像前 20 min 再饮水 300 ml,显像前排尿,测身高、体质量。操作:①输入患者姓名、性别、年龄、身高、体质量。② γ 照相机探头朝上,将装有^{99m}Tc^m-DTPA 的注射器放在距离探头中心 30 cm 处,由 γ 照相机测得放射性强度 111~185 MBq 为注射前计数。③探头置于检查床下,患者仰卧于检查床上,使双肾、输尿管、膀胱全暴露于视野内。④肘静脉内“弹丸”式注入^{99m}Tc^m-DTPA,当肺底显影时立刻启动计算机采集图像,1 帧/3 s,共 20 帧为肾血流图像,接着 1 帧/30 s,共 38 帧为肾功能图像,共需 20 min。⑤采集结束后,按照方法②计算注射后计数。⑥采用感兴趣区域(region of interest, ROI)编码技术,根据仪器中的处理程序(Gates 法)计算 GFR。

1.2.5 尿中白蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)测定 尿蛋白异常即微量白蛋白尿(microalbuminuria, MAU),尿中白蛋白含量超出健康人参考范围。于取血前 1 日清晨 7:00,开始收集 24 h 尿,加甲苯酸防腐,混匀后记录总量,检测采用 ELISA 测定技术,上海波佳生物技术有限公司提供药盒。UAER 诊断按照国际标准^[7]。

1.3 统计学处理

用 SPSS 13.0 统计软件处理,实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组计量资料均数比较用 t 检验,多组计量资料的比较用方差分析,计数资料用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床资料及血清抗 AT1 和 $\alpha 1$ 受体抗体的

检出频率比较

DN 组收缩压、舒张压、尿素氮、肌酐 AT1 受体和 $\alpha 1$ 受体抗体阳性率,明显高于 DM 组和正常对照组,具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。DM 组收缩压、舒张压、舒张压、UAER、AT1 受体和 $\alpha 1$ 受体抗体阳性率明显高于正常对照组,具有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 临床资料及实验室检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Clinical data and laboratory test results of the subjects ($\bar{x} \pm s$)

项目	DN 组 (<i>n</i> = 371)	DM 组 (<i>n</i> = 107)	对照组 (<i>n</i> = 47)
男性 [<i>n</i> (%)]	221(59.6)	57(53.3)	24(51.1)
女性 [<i>n</i> (%)]	150(40.4)	50(46.7)	23(48.9)
年龄(岁)	61±7	59±6	53±5
病程(年)	11±3	9±3	
入院时心率(次/min)	91±7	77±4	71±4
收缩压(mmHg)	147±9*##	131±7#	117±7
舒张压(mmHg)	91±6##	87±5#	77±3
尿素氮(mmol/L)	6.9±0.7*#	5.9±0.3	5.1±0.3
肌酐(μ mol/L)	97.7±6.7*##	71.2±5.7	53.7±3.1
尿中白蛋白排泄率(mg/24 h)	371.0±17.0**##	15.7±3.0#	9.4±2.0
肾小球滤过率(ml/min)	77±9**	121±11	
AT1 受体自身抗体阳性率 [<i>n</i> (%)]	191(51.5)**##	21(19.5)#	5(10.6)
$\alpha 1$ 受体自身抗体阳性率 [<i>n</i> (%)]	177(47.7)**##	17(15.9)#	4(8.5)

注:与 2 型糖尿病组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与对照组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

2.2 DN 患者中不同 GFR 水平亚组受体抗体阳性率比较

DN 患者中,GFR 水平异常亚组 $\alpha 1$ 受体抗体阳性率、A1 受体抗体阳性率、两种受体抗体同时阳性率均明显高于 GFR 水平正常亚组,有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

表 2 DN 患者中 GFR 正常者与异常者受体抗体阳性率比较 [*n*(%)]

Table 2 Comparison of positive rates of auto-antibodies against $\alpha 1$ -receptor and AT₁-receptor among DN patients with normal or abnormal GFR [*n*(%)]

组别	$\alpha 1$ 受体阳性	A1 受体阳性	2 种受体身 抗体同时阳性
GFR 正常组(<i>n</i> = 154)	47(30.5)	54(35.1)	27(17.5)
GFR 异常组(<i>n</i> = 217)	130(59.9)**	137(63.1)**	130(59.9)**
χ^2 值	21.41	17.37	27.23

注:组间比较,** $P<0.01$

3 讨论

G 蛋白偶联受体(G-protein-coupled-receptor,

GPCR),包括 AT1 受体、 $\beta 1$ 肾上腺素能受体($\beta 1$ 受体)、 $\alpha 1$ 受体等,是信号转导的细胞膜受体中最大的家族,它们介导的信号不仅涉及视觉调控,而且参与肾脏功能和调节免疫应答^[8-9]。

DN 患者肾脏动力学的改变出现在 UAER 增多之前。核素肾功能动态显像可观察其肾脏损害程度,准确测定 GFR,较早地判断肾小球滤过功能的异常变化。研究提示, DN 发生、发展过程中伴随着肾脏血流动力学的变化,而 GFR 是反映这一变化的敏感指标之一,其下降幅度直接反映肾小球受损程度^[10-12]。临床多以血肌酐上升作为肾功能减退的标志。血肌酐敏感性较差,尤其是老年 DN 患者,由于肌肉萎缩,内源性肌酐产生下降,是在肾功能减退的早期,虽然 GFR 已经开始下降,而血肌酐水平并未相应升高。因此,仅从肌酐水平分析判断肾功能往往延误治疗的最佳时机^[12]。而 GFR 不仅是评价肾功能减退早期肾小球滤过功能的敏感指标,而且有助于发现 DM 患者早期肾功能损害。本研究证实 DN 患者肾损害,GFR 降低者, $\alpha 1$ 和 AT1 受体抗体明显升高,表明 $\alpha 1$ 和 AT1 受体抗体与 DN 有关。

本研究结果发现:①在 371 例 DN 中 $\alpha 1$ 和 AT1 受体自身抗体阳性率分别达 47.7%和 51.5%,明显高于 DM 组和正常对照组,表明 $\alpha 1$ 和 AT1 受体抗体可能与 DN 有关。②DN 患者中,GFR 异常组 $\alpha 1$ 和 AT1 受体抗体阳性率明显高于 GFR 正常组($P<0.01$),表明 GFR 降低与肾损害有关, $\alpha 1$ 和 AT1 受体抗体阳性率升高与 GFR 与有关,自身免疫反应是参与肾损害发病的主要因素之一。③DN 患者中,GFR 异常亚组的 2 种受体抗体同时阳性率高达 59.9%(130/217),而 GFR 正常亚组中仅为 17.5%(27/154),两组比较具有统计学意义($P<0.01$),提示 DN 肾损害可能与两种抗体同时参与有关,其协同致病作用可能是导致 DN 发病的主要原因之一,但尚需大样本进一步研究。

受体抗体产生机制:AT1 和 $\alpha 1$ 受体属于 G 蛋白偶联受体超家族,AT1 其肽链结构七次穿越胞膜并形成胞外 3 个环肽和胞内 3 个环肽的空间结构,其中细胞膜外的 3 个环肽及一个链肽结构是信号接受部位。G 蛋白偶联受体的活化途径之一,是在受到刺激后通过内化机制进入胞浆,内化的受体在溶酶体内发生降解、融合,转移到细胞表面,进而递呈给相应的免疫细胞。反复的受体刺激是促进其内化、降解进而诱发自身免疫的重要机制^[13-14]。DN 肾局部高浓度

Ang2,可引起巨噬细胞浸润、细胞外间质增生以及趋化因子等增加,肾小球内压增高,内皮细胞损伤,抗原暴露,在 DN 易感人群产生受体自身抗体,是自身抗体产生的主要途径之一^[15],可能的机制是:AT1 和 $\alpha 1$ 抗体可与该受体特异性结合,产生受体激动样活性,导致肾组织细胞钙超负荷,引起肾组织损伤。自身抗体通过相应受体引起病理效应,是导致 DM 肾损害的主要原因之一。受体受到反复刺激后,通过内化机制产生自身抗体,受体自身抗体具有病理激动剂样活性,通过相应受体引起病理效应,导致自身免疫反应,引起相应组织损伤。

GPCR 结构的相对规律性及某一配体对其受体结合高专一性特点,是构成特异靶点治疗药物的基础^[9,16-17]。本研究将在深入研究 DN 早期诊断的基础上,重点研究 DN 的早期靶向治疗,以期有效防治 DN 肾功能不全的恶化进展。

参 考 文 献

- [1] Gouwy M, Struyf S, Verbeke H, *et al.* CC chemokine ligand-2 synergizes with the nonchemokine G protein-coupled receptor ligand fMLP in monocyte chemotaxis, and it cooperates with the TLR ligand LPS via induction of CXCL8[J]. J Leukoc Biol, 2009, 86(3):671-680
- [2] Almeida JC, Zelmanovitz T, Vaz JS, *et al.* Sources of protein and polyunsaturated fatty acids of the diet and microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus[J]. J Am Coll Nutr, 2008, 27(5):528-537
- [3] Liao YH, Wei YM, Wang M, *et al.* Autoantibodies against AT₁-receptor and alpha1-adrenergic receptor in patients with hypertension[J]. Hypertens Res, 2002, 25(4):641-646
- [4] 赵林双,廖玉华,向光大,等. 2 型糖尿病合并难治性高血压患者血清抗 β_1 与 M₂ 受体自身抗体的临床初步研究[J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(5): 407-410
- [5] 赵林双,廖玉华,王 敏,等. 糖尿病肾病患者血清抗 AT₁、 α_1 、 β_1

和 M₂ 受体自身抗体的分析[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 21(5):454-455

- [6] Larsson A, Malm J, Grubb A, *et al.* Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg /L [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2004, 64(1): 25-30
- [7] 周子华,廖玉华,李留东,等. 抗 α_1 -肾上腺素受体抗体介导大鼠心室重塑的免疫机制[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(9):625-629
- [8] Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta analysis[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 40(2):221-226
- [9] Leitão CB, Canani LH, Polson PB, *et al.* Urinary albumin excretion rate is associated with increased ambulatory blood pressure in normoalbuminuric type 2 diabetic patients [J]. Diabetes Care, 2005, 28(7):1724-1729
- [10] Bansal G, Divietro JA, Kuehn HS, *et al.* RGS13 controls GPCR-evoked responses of human mast cell[J]. J Immunol, 2008, 181(11):7882-7890
- [11] Felix SB, Staudt A, Landsberger M, *et al.* Removal of cardiopressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(4):646-652
- [12] 唐 伟. 糖尿病患者测定肾小球滤过率 139 例临床分析[J]. 实用医院临床杂志, 2006, 3(1):37-39
- [13] 姚 建,陈名道,糖尿病肾病及其早期防治[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2002, 18(4):330-331
- [14] Thomaseth K, Pacini G, Morelli P, *et al.* Importance of glycemic control on the course of glomerular filtration rate in type 2 diabetes with hypertension and microalbuminuria under tight blood pressure control[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2008, 18(9): 632-638
- [15] Fu ML, Herlitz H, Schulze W, *et al.* Autoantibodies against the angiotensin receptor (AT₁) in patients with hypertension[J]. J Hypertens, 2000, 18(7):945-953
- [16] Wallukat G, Müller J, Hetzer R. Specific removal of β_1 -adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. N Engl J Med, 2002, 347(22):1806
- [17] Gross JL, deAzevedo MJ, Silveiro SP, *et al.* Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment [J]. Diabetes Care, 2005, 28(1):164-176

(2012-05-31 收稿 2012-06-16 修回)

(上接第 447 页)

- [3] 王 丽,李乐之. 住院期间压疮高危人群的营养筛查和评估[J]. 护理研究, 2009, 23(11A):2832-2833
- [4] 陈春明. 中国成人体质指数分类的推荐意见简介[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(5):349-350
- [5] 王 艳,蒋德川,袁 芳,等. 临床常用营养指标与卧床老年患者体质指数的相关性研究[J]. 护理学杂志, 2010, 25(21):24-26
- [6] 王 艳,陈惠敏,袁 芳. 3 种评估表对消化科老年患者压疮预测效果的比较[J]. 护理学杂志, 2010, 25(19):12-15
- [7] 陈 伟,蒋朱明,张永梅. 欧洲营养不良风险调查方法在中国住院患者的临床可行性研究[J]. 中国临床营养杂志, 2005, 13(3):137-141
- [8] 王 艳,郑国荣,高金华,等. 老年患者院内难免压疮与院外带入压疮的危险营养因素分析[J]. 华南国防医学杂志, 2011, 25(6):487-489

- [9] 蒋朱明,陈 伟,张澍田,等. 中国 11 个城市大医院 6 个临床专科 5303 例住院患者营养不良风险筛查(期中小结摘要)[J]. 中国临床营养杂志, 2006, 14(4):263
- [10] 赵海英,吴咏冬. NRS-2002 在消化科住院患者整体营养状况筛查中的应用[J]. 首都医科大学学报, 2010, 31(3):424-426
- [11] Clark M, Schols JM, Benati G, *et al.* Pressure ulcers and nutrition: a new European guideline[J]. J Wound Care, 2004, 13(7):267-272
- [12] 邓少娟. 70 岁以上老年病人预防压疮的效果分析[J]. 现代临床护理, 2004, 3(1):37-39
- [13] 江 华,蒋朱明. 营养风险筛查与肠外营养支持的合理应用[J]. 中国临床营养杂志, 2006, 14(4):244-246
- [14] Finucne TE. Rhetoric of research: promoting nutrition products for pressure ulcers[J]. J Am Geriatr Soc, 2006, 54(5):859-860

(2012-03-16 收稿)