

MBL 途径补体激活与糖尿病肾病进展的相关性研究*

武晓慧¹, 唐蕊¹, 黄颂敏², 宁晓霞¹

(1. 西安医学院临床医学院, 陕西 西安 710021; 2. 四川大学华西医院肾内科, 四川 成都 610041)

【摘要】 目的 观察 II 型糖尿病患者血清甘露聚糖结合凝集素(MBL)和尿膜攻击复合物(MAC)的表达及与糖尿病肾病发生和进展的相关性。方法 选择 60 例 II 型糖尿病患者, 按照尿白蛋白排泄率(UAER)分为正常白蛋白尿组(NA, UAER<30mg/24h, n=20), 微量白蛋白尿组(MA, UAER 30~300mg/24h, n=20)和临床蛋白尿组(CA, UAER>300mg/24h, n=20)。采用双抗体夹心酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清 MBL、尿 MAC 水平, 并检测各组患者的血清肌酐(SCr)等指标。结果 CA 组血清 MBL 和尿 MAC 明显高于 MA 组($P<0.05$), MA 组也高于 NA 组($P<0.05$); 所有患者的血清 MBL 与尿 MAC 呈高度正相关关系($P<0.05$); 血清 MBL 及尿 MAC 与患者的 UAER 及血清肌酐均存在正相关关系($P<0.05$)。结论 MBL 途径补体激活可能与糖尿病肾病的发生及进展密切相关。

【关键词】 II 型糖尿病; 糖尿病肾病; 尿白蛋白排泄率; 甘露聚糖结合凝集素; 膜攻击复合物

【中图分类号】 R 587.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2012.07.012

Correlation research about MBL complement pathway activation and progression of diabetic nephropathy

WU Xiao-hui¹, Tang Rui¹, HUANG Song-min², et al

(1. Department of Clinical Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021;

2. Department of Nephrology, West China Hospital, of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of serum mannose-binding lectin (MBL) and urinary membrane attack complex (MAC) in type 2 diabetics and their correlation with onset and progression of diabetic nephropathy. **Methods** 60 patients with T2DM were divided into three groups according to their urinary albumin excretion rate (UAER): normal albuminuria group (NA, UAER<30mg/24h, n=20), micro-albuminuria group (MA, UAER 30~300mg/24h, n=20) and clinical proteinuria group (CA, UAER>300mg/24h, n=20). Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum MBL and urine MAC, serum creatinine (SCr) and other test index were also detected in each group of patients. **Results** Serum MBL and urine MAC were significantly higher in CA group than in MA group ($P<0.05$). They were also higher in MA group than in NA group ($P<0.05$); In all patients, serum MBL was positively correlated with urinary MAC ($P<0.05$); both serum MBL and urine MAC were positively correlated with UAER and serum creatinine ($P<0.05$). **Conclusion** MBL complement pathway activation may be closely correlated with the onset and progression of diabetic nephropathy.

【Key words】 Diabetes Mellitus, Type II; Diabetic Nephropathy; Urinary Albumin Excretion Rate; Mannose-Binding Lectin; Complement Membrane Attack Complex

糖尿病(DN)肾病是糖尿病最常见的微血管并发症,其发病机制目前仍不完全清楚。近年来的研究发现,糖尿病患者体内存在甘露聚糖结合凝集素(Mannose-Binding Lectin, MBL)水平的明显升高,且与患者的死亡率呈正相关^[1,2], DN 发病可能与甘露聚糖结合凝集素途径补体激活有关。但上述研究均并未明确检测 MBL 途径补体激活的产物——膜攻击复合物

(Membrane Attack Complex, MAC), 且均为白人患者的研究结果,在我国尚无相关研究。本实验将检测不同蛋白尿水平的 II 型糖尿病患者血清 MBL 及尿 MAC 的浓度,并统计这两个指标之间及二者与所有患者的尿白蛋白排泄率(Urinary Albumin Excretion Rate, UAER)、血清肌酐(SCr)的相关性,以探索 MBL 途径补体激活对我国糖尿病患者肾脏损害的发生和进展的影响。

1 对象和方法

基金项目:西安医学院基金项目(No:11FZ21)

1.1 一般资料 研究对象选自第一、二附属医院内分泌肾病科 2010 年 11 月~2012 年 2 月住院及门诊治疗患者,共 60 例,按照尿白蛋白排泄率(UAER)分为正常白蛋白尿组(NA, UAER<30mg/24h, n=20),微量白蛋白尿组(MA, UAER 30~300mg/24h, n=20)和临床蛋白尿组(CA, UAER>300mg/24h, n=20)。入组患者全部符合 1999 年 WHO 亚太地区糖尿病诊断标准;均按临床标准排除感染、原发性肾脏疾病、肾血管疾病、原发性高血压及恶性高血压、肾结石、肾肿瘤、心脑血管等大血管病变、肝功能异常、服用糖皮质激素药物的患者。三组患者的性别、年龄、病程为:NA 组 男:女例数=16:14,平均年龄(58.5±3.8)岁,病程(5.1±2.5)年;MA 组 男:女例数=17:13,平均年龄(59.5±5.7)岁,病程(7.7±5.4)年;CA 组 男:女例数=16:14,平均年龄(61.5±7.9)岁,病程(10.0±5.9)年。各组年龄、性别等一般资料差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法 ①标本收集及一般性指标的检测:所有入组患者测量血压,过夜禁食 12h 后次晨空腹肘静脉采血,测定血清肌酐、糖化血红蛋白、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白 C(LDL-C)、高密度脂

蛋白 C(HDL-C)。②尿白蛋白测定:留尿当天清晨排空膀胱,弃去尿液,收集至次日晨 24h 尿,测定尿总量,混匀后留取部分尿液测定尿蛋白,计算出 UAER,全部对象均不连续测定 2 次,取平均值。③所有入组患者清晨空腹肘静脉采血,按试剂盒要求分离血清,保存于一70°冰箱。收集晨尿标本。用酶联免疫吸附法测定血清 MBL 和尿 MAC。试剂盒购自上海恒远生物科技有限公司,操作严格按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法 计量资料以均数±标准差表示。方差齐时多组间均数的比较采用 q 检验,方差不齐时做秩和检验。利用 Pearson 相关系数判断两个变量的相关关系,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。

2 结果

2.1 各组研究对象的检测指标 结果显示:血压、血脂、HbA1c 三组间差异无统计学意义($P>0.05$),CA 组 SCr、UAER 均明显高于 NA 组和 MA 组($P<0.05$),MA 组 SCr、UAER 高于 NA 组($P<0.05$)。CA 组的血清 MBL 浓度以及尿 MAC 浓度明显高于 MA 组($P<0.05$),MA 组也高于 NA 组($P<0.05$),见表 1。

表 1 研究对象的指标检测结果 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Test results of patients

组别	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)
NA 组	128±16	78±9	1.01±0.92	4.88±0.99	1.26±0.34
MA 组	133±15 ^①	80±10 ^①	1.03±1.02 ^①	4.96±0.91 ^①	1.21±0.32 ^①
CA 组	138±19 ^①	82±12 ^①	1.07±1.09 ^①	5.04±1.01 ^①	1.23±0.36 ^①

组别	LDL-C(mmol/L)	HbA1c(×10 ⁻²)	Scr(mmol/L)	UAER(mg/24h)	MBL(μg/L)	MAC(pg/L)
NA 组	3.09±1.03	8.2±1.4	86.63±14.57	18.22±5.85	666±258	35±45
MA 组	2.95±0.89 ^①	8.6±1.6 ^①	93.64±14.62 ^②	104.61±68.04 ^②	965±394 ^②	99±64 ^②
CA 组	2.99±0.99 ^①	9.0±2.1 ^①	159.65±58.53 ^②	1099.37±232.25 ^②	1275±574 ^②	175±54 ^②

注:与 NA 组比较^① $P>0.05$,^② $P<0.05$

2.2 各指标间的相关性分析 所有患者的血清 MBL 与尿 MAC 呈高度正相关性($r=0.787$, $P<0.05$)。血清 MBL 及尿 MAC 的表达均与患者的尿蛋白排泄率呈正相关性($r=0.701$, $r=0.638$; $P<0.05$);血清 MBL 及尿 MAC 与患者的血清肌酐呈正相关性($r=0.599$, $r=0.638$; $P<0.05$)。

3 讨论

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的重要微血管并发症,调查显示亚洲人群 II 型糖尿病患者中糖尿病肾病发生率高,尽管目前加强了血糖控制,但仍有 58.6% 的糖尿病患者逐渐进展为临床蛋白尿并出现肾功能受损^[3],使得 DN 的发病机制成为国内外的研究热点。除了高血糖、蛋白非酶糖基化、炎

症机制以及血流动力学改变等发病机制外,近年来的研究发现 DN 发病还可能与甘露聚糖结合凝集素(Mannose Binding Lectin, MBL)有关。MBL 是补体激活凝集素途径的始动因子,为主要由肝细胞分泌的一种血清糖蛋白,是天然免疫防御系统的重要组成部分。MBL 在结合病原微生物表面的 N 氨基半乳糖或甘露糖等糖基配体后^[4]按照级联酶促反应依次裂解补体,最终形成膜攻击复合物(Membrane Attack Complex, MAC),完成补体激活过程。研究发现在 1 型糖尿病患者中,MBL 的基因表达及平均血清浓度明显高于正常蛋白尿组,甚至同卵双生患者中, DN 组的平均血清 MBL 浓度也高于正常蛋白尿组^[5]。动物实验也发现 MBL 可以明显影响糖尿病小鼠的肾脏重

量、尿白蛋白排泄量和胶原 IV α 1 mRNA 的表达^[6];糖尿病肾病大鼠肾脏中存在 MBL-A 的沉积增加^[7]。高糖培养的人肾小球内皮细胞表面也检测到 MBL、MAC 的沉积^[8]。推测升高的 MBL 通过激活补体途径导致肾脏损伤,但国内外尚缺乏以糖尿病肾病患者为研究对象的 MBL 途径补体激活的直接证据——补体激活产物 MAC 表达增加的研究。

本实验结果显示,CA 组血清 MBL 及尿 MAC 水平明显高于 MA 组和 NA 组,MA 组也高于 NA 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),两种指标呈明显正相关关系,证实在我国 II 型糖尿病患者体内存在血清 MBL 浓度升高,经肾脏排出的 MAC 也明显增加,患者体内发生了 MBL 途径补体激活。将所有患者的血清 MBL 及尿 MAC 与 UAER、SCr 做相关分析,发现血清 MBL 和尿 MAC 与 UAER、SCr 均呈正相关关系($P < 0.05$),表明随着血清 MBL 和尿 MAC 水平的升高,患者尿蛋白逐渐增加,肾脏功能逐渐恶化,MBL 浓度与患者肾脏病变的发生和进展密切相关。本研究入选各组患者的血压、血脂和 HbA1c 均差异不大,排除了这些因素对患者肾病进展的影响,显示了 MBL 独立于其他因素之外的致病作用。

本实验首次检测了糖尿病患者尿液中 MBL 途径补体激活产物——膜攻击复合物(MAC)的水平,发现该指标与患者的蛋白尿和肾功恶化有正相关关系。MAC 有全溶解型(lytic)和亚溶解型(sublytic)两类,前者可以在细胞膜上“打孔”,造成细胞溶解凋亡;后者则可激活一系列信号转导过程^[9],上调各种炎症因子的表达。已有研究在体外培养的人肾小球内皮细胞中检测到 MAC 引发的炎症因子 IL-6, TNF- α 等的过表达^[10],也有许多文献报道 DN 患者中存在这些炎症因子的表达上调^[11],因此我们推测 MAC 可能通过加重 DN 炎症和血管损伤来影响患者肾小球的结构和功能,MBL 补体激活与 DN 的炎症机制之间可能构成级联反应网络。

4 结论

我国 II 型糖尿病患者体内可能存在血清 MBL 升高,通过激活凝集素补体途径导致糖尿病肾病发生和进展,高血清 MBL 可以作为糖尿病肾脏损害的预报因子。虽然需要进行更大样本量的研究,但本实验仍将为 DN 发病的免疫学机制研究以及防治提供崭新的

思路。

【参考文献】

- [1] TK Hansen, Forsblom C, Saraheimo M, *et al.* Association between mannose-binding lectin, high-sensitivity C-reactive protein and the progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2010, 53(7): 1517-1524.
- [2] TK Hansen, Gall MA, Tarnow L, *et al.* Mannose-binding lectin and mortality in type 2 diabetes [J]. *Archives of internal medicine*, 2006, 166(18): 2007.
- [3] AYT Wu, Kong NCT, De Leon F, *et al.* An alarmingly high prevalence of diabetic nephropathy in Asian type 2 diabetic patients: the MicroAlbuminuria Prevalence (MAP) Study [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(1): 17-26.
- [4] M Mikaelian, Poghosyan G, Stepanyan I, *et al.* Effect of lysozyme on plasma membranes of liver and heart cells: Lectin binding assay [J]. *Cell Biology International*, 2007, 31(7): 699-702.
- [5] TK Hansen, Tarnow L, Thiel S, *et al.* Association between mannose-binding lectin and vascular complications in Type 1 diabetes [J]. *Scandinavian Journal Of Immunology*, 2004, 59(6): 613.
- [6] J Østergaard, Thiel S, Gadjeva M, *et al.* Mannose-binding lectin deficiency attenuates renal changes in a streptozotocin-induced model of type 1 diabetes in mice [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(7): 1541-1549.
- [7] 颜晓勇, 黄颂敏, 吴蔚桦, 等. 甘露聚糖结合凝集素在早期糖尿病大鼠肾脏中的表达及意义 [J]. *广东医学*, 2011, 32(12): 1515-1518.
- [8] WX Fan, Huang SM, Liu F. Activation of the lectin complement pathway on human renal glomerular endothelial cells triggered by high glucose and mannose-binding lectin [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(80): 18539-18549.
- [9] TP Zwaka, Manolov D, Ozdemir C, *et al.* Complement and dilated cardiomyopathy: A role of sublytic terminal complement complex-induced tumor necrosis factor- α synthesis in cardiac myocytes [J]. *The American journal of pathology*, 2002, 161(2): 449.
- [10] 武晓慧, 黄颂敏, 樊文星, 等. 高糖和 MBL 途径的补体激活对人肾小球内皮细胞表达 IL-6、TNF- α 的影响 [J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2011, 42(1): 90-94.
- [11] M Dalla Vestra, Mussap M, Gallina P, *et al.* Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2005, 16(3): 78-82.

(收稿日期: 2012-03-29; 编辑: 陈舟贵)