

尿白蛋白片段与心脑血管损伤的关系

陈仁涉¹, 高芳¹, 吴伟¹, 鲍利民¹, 李明洲², 张玉梅³

(1. 卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730; 2. 卫生部北京医院心内科; 3. 北京市崇文区中医医院)

[关键词] 尿白蛋白, 片段; 高血压; 心血管疾病; 免疫印迹

[摘要] 为探讨尿白蛋白片段与心脑血管损伤的关系, 用改进的免疫印迹法分析心血管损伤疾病患者尿白蛋白片段, 尿样来自 112 例无并发症原发性高血压患者, 另有 46 例并发冠心病和 36 例并发脑血管病的原发性高血压患者以及 108 例健康人。有心脑血管损伤性疾病的患者尿中可见异常尿白蛋白片段(45 kDa、30 kDa 和 22 kDa)。原发性高血压、并发冠心病和并发脑血管病患者尿白蛋白片段的阳性率分别为 32.3%、60.8% 和 66.7%。这些患者的尿白蛋白片段阳性率明显高于健康人(4.60%, $P < 0.01$), 且合并心脑血管病的原发性高血压患者尿白蛋白片段的阳性率也明显高于单纯原发性高血压患者。尿白蛋白片段与微量白蛋白尿、甘油三酯和总胆固醇等指标呈正相关。提示尿白蛋白片段与心脑血管疾病明显相关, 可作为一种新的非创伤性检查心脑血管损伤的参考指标。

[中图分类号] R446. 6

[文献标识码] A

Correlation between Urinary Albumin Fragments and Cardiovascular Diseases

CHEN Ren- She, GAO Fang- Kun, WU Wei, BAO Li- Min, LI Ming- Zhou, and ZHANG Yu- Mei

(Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Public Health, Beijing 100730, China)

MeSH Urinary Albumin, Fragments; Hypertension; Cardiovascular Diseases; Western Blot

ABSTRACT **Aim** To explore the relationship between the urinary albumin fragments(uAF) and cardiovascular damage. **Methods** The improved western blot was employed for analysis of uAF in urine of the patients with cardiovascular damaged disorders. Sample from 112 patients with non- diabetic primary hypertension, 46 coronary artery disease and 36 cerebrovascular disease as well as 108 healthy volunteers were examined. **Results** The anomalous fragments (45 kDa, 30 kDa, 22 kDa) are detected in the urine of patients with cardiovascular damaged disorders, the prevalences of uAF in hypertension, coronary artery disease, cerebrovascular disease and healthy volunteers were 32.33%, 60.87%, 66.67% and 5.00% respectively, the incidence of detection of uAF in these patients is significantly higher than that in healthy volunteers ($P < 0.01$). uAF is related to MAU, TG and TC. **Conclusions** uAF and cardiovascular damage are significantly related, uAF can be used as a new reference indicator of non- injury for determining cardiovascular damage.

人白蛋白基因(albumin gene)位于4号染色体的长臂上,接近于q11~12着丝点,其mRNA含有2 250个核苷酸,但它的3'端和5'端约有400个核苷酸不能翻译成蛋白质,因此从人血浆中分离纯化的天然白蛋白分子由585个氨基酸组成,分子量为69 kDa,其结构类似心形,有三个亚区,9个肽环,环间有17对二硫键和氢键相连。人血浆中的蛋白水解酶能把天然的白蛋白裂解为许多切口,这种蛋白称为修饰型白蛋白。由于二硫键和氢键的连接,使其在血浆中仍处于全分子状态,但立体结构与天然白蛋白不同。Wiggins等^[1]发现人血浆和尿液中存在着尿白

蛋白片段(urinary albumin fragments, uAF),但并未意识到它与各种疾病的关系。Yagame等^[2]认为尿白蛋白片段与糖尿病性肾病有关。但他们使用的方法较复杂,本研究用自己改进的免疫印迹法(Western blot)测定尿白蛋白片段,并探讨尿白蛋白片段与心脑血管损伤的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

白蛋白为Sigma公司产品,抗血清及酶标白蛋白为本室自己制备。

1.2 观察对象

健康人为北京医院门诊体检正常人108例,无并发症的非糖尿病原发性高血压患者112例,原发

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(38970857)

[作者简介] 陈仁涉,男,广东丰顺人,1938年出生,硕士生导师,现为卫生部北京老年医学研究所研究员,从事胶原蛋白与衰老、免疫与衰老的研究。

性高血压并发冠心病患者 46 例,原发性高血压并发脑血管病患者 36 例。收集各组人群静脉血,留取血清和晨尿或计时尿测定相关指标。

1.3 方法

本室将 Western blot 方法给予改进,先把样品通过 SDS-PAGE 电泳分离出白蛋白片段,暴露出各自抗原位点,然后转印至硝基纤维膜上,经 5% 猪血清 (V/V) 封闭 30 min 后,在原封闭液中同时加入白蛋白抗体和酶标记白蛋白抗原,37℃ 1 h,置于 4℃ 冰箱过夜,冲洗 5 次后加入底物显色,出现 45 kDa、30 kDa 和 22 kDa 者为异常片段。

尿微量白蛋白 (microalbuminuria, MAU) 测定也采用本室自建的酶标记抗原一步竞争法^[3]。以晨尿 ≥ 18 mg/L 或计时尿 ≥ 20 μ g/min 为阳性。

总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglycerides, TG) 由北京医院检验科生化室测定。以 TG ≥ 1.5 g/L 和 TC ≥ 2.3 g/L 为异常。

2 结果

2.1 尿白蛋白片段与心血管损伤性疾病的相关性

结果见表 1 (Table 1), 结果表明各组患者的尿白蛋白片段阳性率均高于健康人 ($P < 0.01$), 合并心脑血管疾病患者阳性率明显高于单纯性原发性高血压组 ($P < 0.01$)。

表 1 尿白蛋白片段与高血压和心血管疾病的关系

Table 1 Correlation between urinary albumin fragments and hypertension, cardiovascular diseases

Groups	n	Positive	Percentage(%)
Control	108	5	4.6
Hypertension	112	36	32.3 ^a
CHD	46	28	60.8 ^{a,b}
CD	36	24	66.6 ^{a,b}

CD: cerebrovascular diseases. a: $P < 0.01$, compared with control group, b: $P < 0.01$, compared with hypertension without complication group

2.2 各个片段与疾病的关系

表 2 (Table 2) 表明,无并发症的高血压者、冠心病患者和脑血管病患者的 4 个尿白蛋白片段均与健康人有明显差异 ($P < 0.01$), 其中 69 kDa 和 45 kDa 尿白蛋白片段阳性率最高,其次是 30 kDa 尿白蛋白片段,二者有显著差异 ($P < 0.05$), 22 kDa 尿白蛋白片段的阳性率在单纯性高血压与对照组相比无差异 ($P > 0.05$), 但在有心脑血管并发症组与对照组间有显著差异 ($P < 0.05$), 表明 22 kDa 的尿白蛋白片

段可能标志着心脑血管损伤程度较严重。健康人中 4 种尿白蛋白片段的阳性率均与年龄无关(数据未列入表内)。

表 2 单纯性原发性高血压及高血压并发症患者与不同尿白蛋白片段的关系

Table 2 Relationship between the different albumin fragments and hypertension without complication, Hypertension with complication

Groups	n	69 kDa (%)	45 kDa (%)	30 kDa (%)	22 kDa (%)
Control	60	3(5)	3(5)	3(5)	0(0.0)
Hypertension	33	19(57.5)	19(57.5)	11(33.3) ^a	3(9.0) ^b
CHD	38	24(63.1)	24(63.1)	17(44.4) ^a	5(13.1) ^c
CD	21	12(57.1)	12(57.1)	7(33.3) ^a	5(23.8) ^c

CD: cerebrovascular diseases. a: $P < 0.05$, compared with 69 kDa, 45 kDa groups, b: $P > 0.05$, c: $P < 0.05$, compared with control group

2.3 尿白蛋白片段与其它指标的相关性

表 3 (Table 3) 表明尿白蛋白片段与尿微量白蛋白、总胆固醇和甘油三酯三种指标呈正相关,且阳性率高于后者,这也间接证实尿白蛋白片段和心血管损伤有关。

表 3 尿白蛋白片段与血管损伤生化指标的相关性

Table 3 Correlation between the albumin fragments and other biochemical indicator of relative vascular damage

Groups	n	uAF(%)	MAU(%)	TC(%)	TG(%)
Control	60	3(5)	2(3.3)	2(3.3)	2(3.3)
Hypertension	33	19(57.5)	11(33.3)	4(12.1)	2(6.0)
CHD	38	24(63.1)	18(47.3)	2(5.2)	2(5.2)
CD	21	12(57.1)	7(33.3)	3(14.7)	12(57.1)

CD: cerebrovascular diseases. Positive: MAU ≥ 20 μ g/min, TC ≥ 2.3 g/L, TG ≥ 1.5 g/L

3 讨论

为探讨尿白蛋白片段与血管损伤的关系,我们比较了有血管损伤疾病患者和健康人尿白蛋白片段的差异,并观察尿白蛋白片段与心血管损伤有关指标的相关性。这些试验均说明尿白蛋白片段与血管损伤密切相关,是一项非创伤性检查血管功能的良好指标。

尿白蛋白各片段的意义有待进一步探讨,从我们的结果看,患者常见的是 69 kDa、45 kDa、30 kDa 和 22 kDa 4 个片段,不同的片段与病情的严重程度

有一定的关系。22 kDa 片段代表有较严重的心血管损伤。除了原发高血压及并发症外, 某个片段是否和其它疾病有特殊相关有待做更多的病例给予证实。

为探讨尿白蛋白片段出现的机理, 我们进行了白蛋白通过基底膜时与分子构型有关的试验。上述结果得知尿白蛋白浓度升高主要是修饰型人血清白蛋白增加, 这种蛋白增加时, 出现 45 kDa、30 kDa 和 22 kDa 片段, 但不能确定修饰型人血清白蛋白(human serum albumin, HA) 是以全分子状态通过基膜或是在体内先分解成片段后再通过基膜。为此, 取有异常蛋白带的样品, 不经巯基乙醇处理直接做 SDS-PAGE 电泳和聚焦电泳, 发现电泳后均只出现一条蛋白带, 表明修饰型白蛋白是以全分子状态通过基膜。电泳后出现的小分子片段是电泳前处理样品时巯基乙醇把修饰型人血清白蛋白肽环间二硫键切断所致, 二巯基乙醇也能把天然形人血清白蛋白肽环间二硫键切断, 但它在体内肽段未经蛋白水解酶预先分解, 所以电泳后不能出现小分子片段, 只能显出 69 kDa 的全分子蛋白带。修饰型与天然型人血清白蛋白二者分子构型不同, 说明分子通过基膜与分子形态有关。这些结果与 Myers^[6]所做实验类似, 他发现不同分子量(28~ 60 kDa) 的右旋糖酐通过基底膜时, 以半径大于 40 Å 者居多。据此认为尿白蛋白

片段的出现可能与基底膜的屏障形态选择障碍有关, 允许修饰型人血清白蛋白优先通过。因而, 存在心脑血管损伤性疾病时, 尿中可能出现大量 45 kDa、30 kDa 和 22 kDa 的白蛋白片段。

尿白蛋白片段的出现是血管内皮渗透性增加所致, 渗透性增加时低密度脂蛋白也沉积在血管壁的胶原蛋白上, 这是造成动脉粥样硬化的病理基础。

参考文献

- [1] Wiggins RC, Kshisaagar B, Kelsch RC, et al. Fragmentation and polymeric complexes of albumin in human urine [J]. *Clin Chim Acta*, 1985, **149**: 155- 163
- [2] Yagame M, Sazuki D, Jinde K, et al. Urinary album fragments as a new clinical parameter for the early detection of diabetic nephropathy [J]. *Intern Med*, 1995, **34**: 463- 468
- [3] 陈仁涉, 吴伟, 鲍利民, 等. 简易酶联免疫试验测定尿微量白蛋白 [J]. *中华流行病学杂志*, 1997, **18**(3- 4): 85- 87
- [4] Dechert T, Feldt- Rasmussen B, Borch- Johnsen K, et al. Albuminuria reflects widespread vascular damage [J]. *Diabetologia*, 1989, **32**: 219- 226
- [5] Stehouwer GDA, Nauta JJP, Zeldenrust GC, et al. Urinary albumin excretion, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin- dependents mellitus [J]. *Lancet*, 1992, **340**: 319- 323
- [6] Myers BD. Pathophysiology of proteinuria in diabetic glomerular disease [J]. *J Hypertension*, 1990, **8**(supple 1): S41

(此文 2000- 08- 02 收到, 2000- 11- 10 修回)

(此文编辑 朱雯霞)