

## 论著·临床研究

不同肾功能进展 IgA 肾病患者血清 IgA1 对人肾小球系膜细胞增殖及 TGF- $\beta$ 1 表达的影响

孔凌云, 蒋更如

上海交通大学 医学院附属新华医院肾内科, 上海 200092

**【摘要】目的**·探讨肾功能快速进展为终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD) 的 IgA 肾病患者与肾功能长期稳定的 IgA 肾病患者血清 IgA1 对体外培养的正常人肾小球系膜细胞 (human mesangial cells, HMCs) 增殖的刺激作用及对转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 表达水平的影响。**方法**·9 例经肾活检确诊为原发性 IgA 肾病的患者, 根据病情进展情况分为肾功能快速进展组 ( $n=6$ ) 和肾功能长期稳定组 ( $n=3$ )。采用亲和层析及分子筛提取血清 IgA1, 用不同质量浓度 (10、50、250、1 000  $\mu\text{g/mL}$ ) 的 IgA1 分别干预 HMC 12、24 h。CCK8 法测定细胞增殖率; real-time PCR 测定 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达; ELISA 法测定 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达。**结果**·肾功能快速进展组及肾功能长期稳定组患者血清 IgA1 对 HMC 有明显的促增殖作用, 且表现为时间依赖性和浓度依赖性, 作用高峰质量浓度分别为 250  $\mu\text{g/mL}$  和 1 000  $\mu\text{g/mL}$ 。2 组患者血清 IgA1 均能显著上调 TGF- $\beta$ 1 的 mRNA 和蛋白的表达。在肾功能快速进展组, IgA1 质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  时 TGF- $\beta$ 1 的 mRNA 及蛋白水平达到高峰, 其后随刺激浓度升高而递减; 在肾功能长期稳定组, TGF- $\beta$ 1 水平则与血清 IgA1 呈现平行的浓度依赖性。**结论**·肾功能快速进展及长期稳定的患者血清 IgA1 在一定浓度和时间范围内均具有刺激 HMC 增殖的作用。在较低质量浓度 (10 ~ 50  $\mu\text{g/mL}$ ) 范围内, 促增殖作用没有明显差异, 但肾功能快速进展的患者血清 IgA1 上调 TGF- $\beta$ 1 表达的作用更强, 提示血清 IgA1 具有一定的预后评估作用。

**【关键词】** IgA 肾病; 肾功能; 系膜细胞; 转化生长因子  $\beta$ 1

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.06.011 **【中图分类号】** R692.6 **【文献标志码】** A

Effect of serum IgA1 on human mesangial cells and expression of TGF- $\beta$ 1 in patients of IgA nephropathy with different renal function progress

KONG Ling-yun, JIANG Geng-ru

Department of Nephrology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

**【Abstract】Objective**·To extract serum IgA1 from patients with IgA nephropathy (IgAN) (end stage renal disease vs long-term stable renal function) to explore the effect on proliferation rate of human mesangial cells (HMCs) and the level of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). **Methods**·Nine patients with primary IgAN were divided into rapidly progressive group ( $n=6$ ) and long-term stable group ( $n=3$ ). Jacalin affinity chromatography and sephacryl S-200HR molecular sieves were used to extract serum IgA1. HMCs were cultured and co-cultivated with different IgA1 concentration (10, 50, 250 and 1 000  $\mu\text{g/mL}$ ) at point of 12 h and 24 h respectively. The proliferation rate was measured by cell counting kit-8 (CCK8). The expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA was measured via quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect TGF- $\beta$ 1 protein. **Results**·Serum IgA1 from IgAN patients with different renal functions (end stage renal disease vs long-term stable renal function) activated proliferation of HMC significantly, presenting with time-dependence and concentration-dependence. The highest value showed at 250  $\mu\text{g/mL}$  and 1 000  $\mu\text{g/mL}$  respectively. Serum IgA1 in two groups of patients statistically increased the expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA and protein. In group with end stage renal disease, the summit stood at 10  $\mu\text{g/mL}$  and started to decrease by degrees afterwards; while in group with long-term stable renal function, the level of TGF- $\beta$ 1 increased in a parallel manner with the serum IgA1. **Conclusion**·Serum IgA1 from IgAN patients with different renal functions (end stage renal disease vs long-term stable renal function) can both promote the proliferation of HMC. There is no dramatical difference observed with in 10–50  $\mu\text{g/mL}$ , but the IgA1 from group with end stage renal disease reveals a stronger effect on TGF- $\beta$ 1, in accordance with the pathological type of the patients (IgA sclerosis), suggesting the prognostic value of serum IgA.

**【Key words】** IgA nephropathy; renal function; human mesangial cell; transforming growth factor- $\beta$ 1

IgA 肾病 (IgA nephropathy, IgAN) 是世界最常见的原发性肾小球疾病, 也是导致终末期肾功能衰竭的重要原因。在中国, 约 45% 的原发性肾小球肾炎患者表现为

IgAN。该病理表现为 IgA 单独沉积或与 IgG、IgM 共同存在于肾小球系膜区<sup>[1]</sup>。IgAN 的发病有一定种族倾向。在美国, 根据所居住的州, 由于 IgAN 导致的终末期肾病

**【基金项目】** 上海市科学技术委员会基金 (12140903002); 上海市卫生和计划生育委员会科研课题 (20144Y0145) (Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, 12140903002; Projects of Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission, 20144Y0145)。

**【作者简介】** 孔凌云 (1992—), 女, 硕士生; 电子信箱: 18800204302@163.com。

**【通信作者】** 蒋更如, 电子信箱: jianggeng-ru@hotmail.com。

(end stage renal disease, ESRD) 的发病率从 18/1 000 000 上升至 264/1 000 000<sup>[2]</sup>。北美洲的非裔美国人比欧洲血统的白人患 IgAN 风险高, 东亚人种患病率更高。同时, 也有研究<sup>[3]</sup>发现, 家庭成员中常有异常的糖基化 IgA1 铰链区缺陷遗传, 遗传概率为 40% ~ 50%。IgA 分为 IgA1 和 IgA2 两种亚型, 系膜区的 IgA 主要为糖基化缺陷的 IgA1 型, IgA1 或其复合物沉积在系膜区, 促进人肾小球系膜细胞 (human mesangial cell, HMC) 增生、节段性肾小球硬化和小管间质纤维化, 具有一定的预后价值。IgAN 患者的临床进程差别较大, 有 30% ~ 40% 的 IgAN 患者在初诊 IgAN 后 20 年左右进展为 ESRD。尽管如此, 临床观察到部分患者可长期保持肾功能正常。转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 是促细胞外基质增殖的重要因子, 广泛存在于人体中, 肾小球、肾小管及间质中均可见, 主要通过不同通路调节细胞凋亡或生长分化作用<sup>[4]</sup>。本研究拟通过观察 ESRD 的 IgAN 患者和肾功能长期稳定的 IgAN 患者不同浓度的血清 IgA1 对 HMC 增殖的刺激作用以及对 TGF- $\beta 1$  表达的影响, 探讨相互作用的异同, 为进一步研究 IgA 在肾功能进展方面的作用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

HMC 购自上海嘉彼生物科技有限公司, Jacalin 琼脂糖凝胶购自 Pierce 公司, Sephacryl S-200HR 层析柱购自 Amersham (GE) 公司, 蜜二糖、磷酸氢二钠十二水、磷酸二氢钠二水、TGF- $\beta 1$  及内参引物均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司, IgA 抗体购自 Santa Cruz 公司, 胎牛血清 (FBS)、RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)、HRP 标记 - 山羊抗小鼠 IgG (H+L) 抗体均购自碧云天公司, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus)、PrimeScript<sup>™</sup> RT Master Mix 均购自 Takara 公司, TGF- $\beta 1$  ELISA 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 9 例经肾活检确诊为原发性 IgAN 的患者纳入研究, 根据患者病情进展情况分为肾功能快速进展组和肾功能长期稳定组。肾功能快速进展组 6 例, 患者来自上海交通大学医学院附属新华医院血液透析中心, 在发

病后 10 年内进展为 ESRD; 男性 2 例, 女性 4 例; 年龄 40 ~ 65 岁, 平均  $(46.17 \pm 5.64)$  岁; 患者 24 h 蛋白尿质量浓度为 0.546 ~ 3.756 g/L; 肝功能正常, 血清肌酐值为 289 ~ 584  $\mu\text{mol/L}$ ; 肾活检病理结果证实 5 例为 IgA 肾病 (弥漫增生伴肾小球局灶节段硬化), 1 例为 IgA 肾病 (硬化性)。肾功能长期稳定组 3 例, 为 IgA 肾病门诊随访患者, 发病后 10 年病情平稳, 未进展为 ESRD; 男性 1 例, 女性 2 例; 年龄 37 ~ 52 岁, 平均  $(46.33 \pm 6.65)$  岁; 患者 24 h 蛋白尿浓度为 0.346 ~ 1.510 g/L; 肝功能正常, 血清肌酐值为 71 ~ 214  $\mu\text{mol/L}$ ; 肾活检病理结果证实 2 例为 IgA 肾病 (弥漫增生伴肾小球局灶节段硬化), 1 例为 IgA 肾病 (局灶节段增生)。抽取 2 组患者清晨空腹静脉血 5 mL (肾功能快速进展组患者在上机前取血), 分离血清备用。所有患者均知情同意, 研究经医院伦理办公室审批通过。

**1.2.2 IgAN 患者血清 IgA 的提取** 采用 Jacalin 亲和层析联合凝胶过滤。5 mL 静脉血室温下静置 30 min, 以  $4\,000 \times g$  离心 15 min, 分离血清, 于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。实验前将血清  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴解冻, 用 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore 滤器过滤除菌<sup>[5]</sup>, 用 PBS (pH 值 7.0) 以 1:1 稀释血清; 用 5 倍体积的 PBS (pH 值 7.0) 以 1 mL/min 的速度平衡柱子, 将稀释后的血清样品在室温下以 0.5 mL/min 的流速缓慢加入离心柱, 用 10 倍柱体积的 PBS (pH 值 7.0) 以 1 mL/min 的速度洗柱, 直到吸光度  $[D(280\text{ nm})] < 0.1$ , 血清中的 IgA1 将吸附于离心柱, 不与柱子结合的蛋白质随缓冲液流出柱外; 用 0.1 mol/L 蜜二糖 / PBS (pH 值 7.0) 缓冲液以 0.5 mL/min 的速度彻底洗脱, 以 2 mL 收集管收集, 直至  $D(280\text{ nm})$  恢复至 0.1, 得到 Jacalin 结合的蛋白即为单体 IgA (monomeric IgA, mIgA)<sup>[6]</sup>; 超滤浓缩为 1 mL, 将 Jacalin 结合的蛋白 1 mL 以 0.5 mL/min 速度经 AKTA-purifier 系统上样 Sephacryl S-200HR 分子筛柱, 用 1.5 倍体积的 PBS 以 1 mL/min 的速度进行洗脱; 在  $D(280\text{ nm})$  处可见 3 个峰, 分别是多聚体 IgA (polymeric IgA1, pIgA1)、mIgA 和其他非 IgA 蛋白<sup>[7]</sup>。本实验主要采用 mIgA, 对第 2 个峰用鼠抗人 IgA1 及 HRP 标记 - 山羊抗小鼠 IgG (H+L) 抗体进行 Western blotting, 证实为 IgA1。将所得 IgA1 用 0.2  $\mu\text{m}$  Corning 注射器式过滤器过滤。

**1.2.3 HMC 培养** 复苏 HMC 后, 用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基于 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  饱和湿度条件下培养。当细胞生长至 70% ~ 80% 融合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代继续培养, 细胞传代培养至第 3 ~ 8 代用于实验。

**1.2.4 IgA1 干预 HMC 后细胞增殖的测定** 采用 CCK-8 试剂盒检测 HMC 的增殖。取对数期 HMC, 调整浓度为

$3 \times 10^4$  个/mL, 200  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板内, 细胞完全贴壁 (12 ~ 24 h) 后弃去培养基, PBS 冲洗 3 次, 加入 0.5% FBS 同步化 24 h<sup>[8]</sup>; 加入不同质量浓度 (10、50、250、1 000  $\mu$ g/mL) 的 IgA1, 每孔 100  $\mu$ L, 分别干预 12、24 h, 37  $^{\circ}$ C 下避光培养箱孵育。在干预结束前 2 h 加入 100  $\mu$ L 的 RPMI 1640 及 10  $\mu$ L 的 CCK-8 溶液, 振荡 10 ~ 15 min, 酶标仪检测各孔吸光度 [ $D(450\text{ nm})$ ]。每组设 2 个复孔, 设置空白对照组为只含 0.5% FBS 培养基且无细胞的孔, 不含刺激物而只含 0.5% FBS 培养基的孔为阴性对照组。实验重复 3 次以上, 计算增殖率 (proliferation rate, PR)。PR=[实验组  $D(450\text{ nm})$  - 空白对照组  $D(450\text{ nm})$ ] / [阴性对照组  $D(450\text{ nm})$  - 空白对照组  $D(450\text{ nm})$ ]  $\times 100\%$ 。

1.2.5 Real-time PCR 法检测 TGF-β1 mRNA 表达

(1) 组织总 RNA 提取 采用 TRIzol-氯仿-异丙醇-乙醇法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,  $D(260\text{ nm}) / D(280\text{ nm})$  均在 1.8 ~ 2.0。用前调整总 RNA 质量浓度至 1 g/L。

(2) 反转录 反应体系为 20  $\mu$ L, 加入所提取总 RNA 2  $\mu$ L、dNTP (mix) 4  $\mu$ L、无菌 DEPC 水 14  $\mu$ L, 振荡混匀, 37  $^{\circ}$ C 15 min, 85  $^{\circ}$ C 5 s, 4  $^{\circ}$ C 1 min。

(3) PCR 赛博绿实时聚合酶链反应混合液 (Synergy Brands, SYBR) 10  $\mu$ L, 上下游引物各 0.4  $\mu$ L, 样本模板 (cDNA) 2  $\mu$ L, DEPC 无菌水 6.8  $\mu$ L, ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ L, 总反应体积为 20  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 34 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 40 次后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。

表 1 引物序列及其扩增产物的长度  
Tab 1 PCR primers for transgenic sequences and length of products

目标或内参	引物序列 (5'→3')	扩增产物的长度
TGF-β1		
上游	GCCAGAGTGGTTATCTTTTGATG	120 bp
下游	AGTGTGTTATCCCTGCTGTCAC	
GAPDH		
上游	GGCACCGTCAAGGCTGAGAAC	286bp
下游	TGCAGGAGGCATTGCTGATGATC	

1.2.6 ELISA 法测定 IgA1 干预 HMC 后上清液中 TGF-β1 的水平 细胞铺板步骤同 1.2.3, 在干预 12、24 h 后, 小心吸取上清液, 并装于 1.5 mL 的冻存管中, -70  $^{\circ}$ C 保存备用, 用以检测 TGF-β1。操作严格按试剂盒说明进行。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差

分析法分析组间差异, 并进行两两比较。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 IgA1 的提取

采用 Jacalin 亲和层析的方法 (图 1), 单峰即为蜜二糖洗脱峰 (IgA1)。

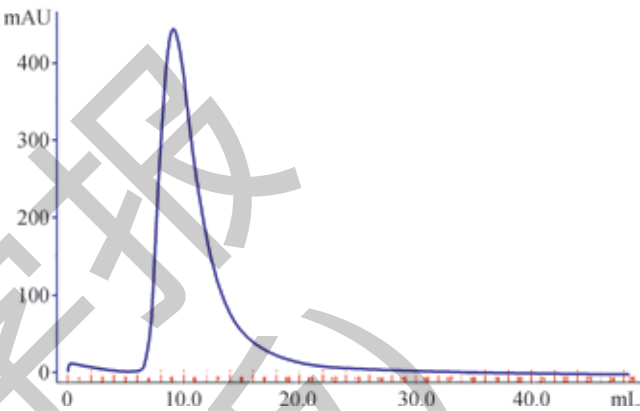


图 1 Jacalin 蜜二糖亲和层析  
Fig 1 Jacalin affinity chromatography

2.2 IgA1 对 HMC 增殖的影响

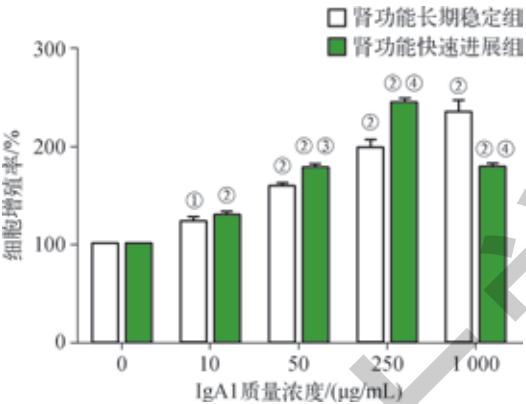
由表 2、3, 图 2、3 可见, 与空白对照组比较, 不同质量浓度 IgA1 (10、50、250、1 000  $\mu$ g/mL) 刺激组  $D(450\text{ nm})$  均显著上升。肾功能长期稳定组 HMC 增殖率表现为随血清 IgA1 质量浓度升高而逐渐上升, 在 IgA1 质量浓度为 1 000  $\mu$ g/mL 时达到顶峰; 肾功能快速进展组患者血清 IgA1 在 250  $\mu$ g/mL 时促 HMC 增殖作用达到高峰, 而在质量浓度继续升高至 1 000  $\mu$ g/mL 时, 则表现为细胞增殖率下降。

表 2 不同浓度血清 IgA1 作用 12 h 对 HMC 增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab 2 Effect of different concentrations of serum IgA1 on proliferation of HMC after stimulation for 12 h ( $\bar{x} \pm s$ )

IgA1 质量浓度 / ( $\mu$ g/mL)	肾功能长期稳定组 $D(450\text{ nm})$ ( $n=3$ )	肾功能快速进展组 $D(450\text{ nm})$ ( $n=6$ )
0 (空白对照组)	$0.133 \pm 0.001$	$0.133 \pm 0.001$
0 (阴性对照组)	$0.401 \pm 0.017$	$0.401 \pm 0.017$
10	$1.225 \pm 0.047$	$1.294 \pm 0.025$
50	$1.590 \pm 0.032$	$1.780 \pm 0.033$
250	$2.056 \pm 0.205$	$2.442 \pm 0.042$
1 000	$2.340 \pm 0.131$	$1.786 \pm 0.040$

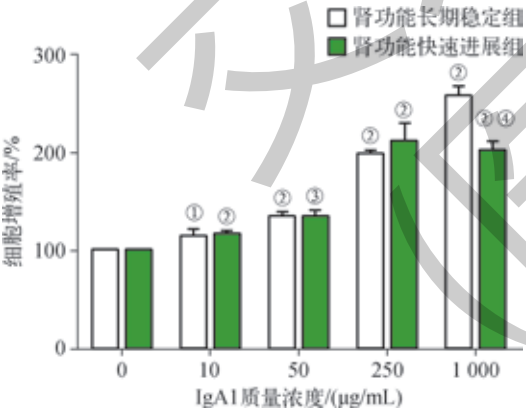
表 3 不同浓度血清 IgA1 作用 24 h 对 HMC 增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab 3 Effect of different concentrations of serum IgA1 on proliferation of HMC after stimulation for 24 h ( $\bar{x} \pm s$ )

IgA1 质量浓度 / ( $\mu\text{g/mL}$ )	肾功能长期稳定组 $D(450\text{ nm}) (n=3)$	肾功能快速进展组 $D(450\text{ nm}) (n=6)$
0 (空白对照组)	$0.137 \pm 0.002$	$0.137 \pm 0.002$
0 (阴性对照组)	$0.412 \pm 0.015$	$0.412 \pm 0.015$
10	$1.148 \pm 0.074$	$1.175 \pm 0.024$
50	$1.347 \pm 0.045$	$1.348 \pm 0.064$
250	$1.973 \pm 0.042$	$2.124 \pm 0.182$
1 000	$2.581 \pm 0.095$	$2.019 \pm 0.104$



注: <sup>①</sup> $P=0.002$ , <sup>②</sup> $P=0.000$ , 与阴性对照组比较; <sup>③</sup> $P=0.001$ , <sup>④</sup> $P=0.005$ , 与肾功能长期稳定组比较。

图 2 CCK-8 法检测 IgA1 刺激 12 h 后 HMC 增殖率  
Fig 2 Proliferation rate of HMC after IgA1 stimulation for 12 h by CCK-8 method

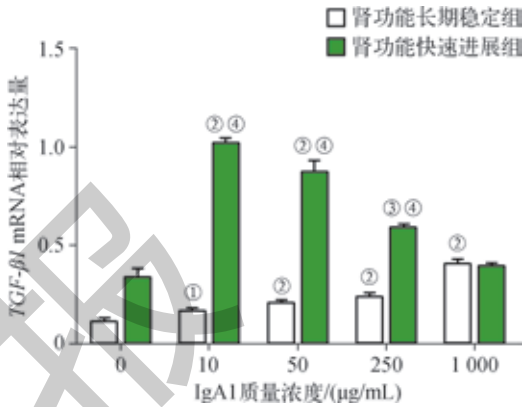


注: <sup>①</sup> $P=0.047$ , <sup>②</sup> $P=0.000$ , <sup>③</sup> $P=0.001$ , 与阴性对照组比较; <sup>④</sup> $P=0.004$ , 与肾功能长期稳定组比较。

图 3 CCK-8 法检测 IgA1 刺激 24 h 后 HMC 增殖率  
Fig 3 Proliferation rate of HMC after IgA1 stimulation for 24 h by CCK-8 method

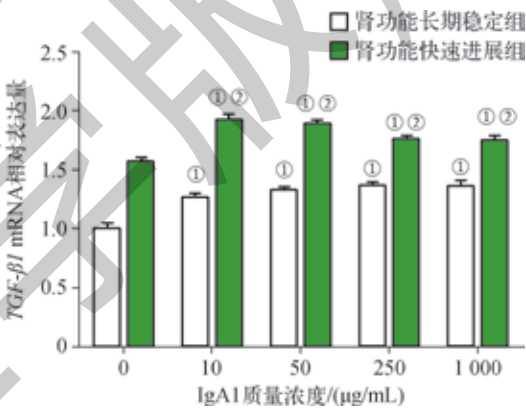
**2.3 IgA1 刺激不同时间对  $TGF-\beta 1$  mRNA 表达水平的影响**  
血清 IgA1 刺激 HMC 12 h 后, 肾功能快速进展组  $TGF-\beta 1$  mRNA 表达水平在 IgA1 质量浓度为  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$  时最高 ( $1.023 \pm 0.027$ ), 其后随 IgA1 质量浓度升高逐渐降低 (图 4); 肾功能长期稳定组  $TGF-\beta 1$  mRNA 水平逐

渐升高, 在 IgA1 质量浓度为  $1\text{ }000\text{ }\mu\text{g/mL}$  时达到高峰 ( $0.406 \pm 0.021$ )。在作用 24 h 时, 肾功能快速进展组在不同质量浓度血清 IgA1 刺激下, HMC 的  $TGF-\beta 1$  mRNA 表达水平均高于肾功能长期稳定组, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (图 5)。



注: <sup>①</sup> $P=0.014$ , <sup>②</sup> $P=0.000$ , <sup>③</sup> $P=0.004$ , 与阴性对照组比较; <sup>④</sup> $P=0.000$ , 与肾功能长期稳定组比较。

图 4 IgA1 刺激 HMC 12 h 后  $TGF-\beta 1$  mRNA 表达  
Fig 4 Level of  $TGF-\beta 1$  mRNA in HMC after IgA1 stimulation for 12h



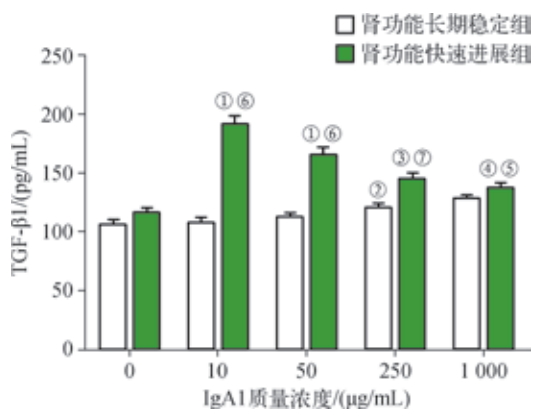
注: <sup>①</sup> $P=0.002$ , 与阴性对照组比较; <sup>②</sup> $P=0.000$ , 与肾功能长期稳定组比较。

图 5 IgA1 刺激 HMC 24 h 后  $TGF-\beta 1$  mRNA 表达  
Fig 5 Level of  $TGF-\beta 1$  mRNA in HMC after IgA1 stimulation for 24 h

2.4 IgA1 刺激不同时间对  $TGF-\beta 1$  蛋白表达水平的影响

血清 IgA1 分别作用 12、24 h, ELISA 法检测 2 组  $TGF-\beta 1$  蛋白表达水平 (图 6、7)。结果显示: 在 12 h, 肾功能快速进展组  $TGF-\beta 1$  蛋白表达水平在 IgA1 质量浓度为  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$  时最高 ( $191.21 \pm 7.35$ ), 其后随 IgA1 质量浓度升高逐渐降低; 肾功能长期稳定组  $TGF-\beta 1$  蛋白表达水平呈现浓度依赖性, 在 IgA1 质量浓度为  $1\text{ }000\text{ }\mu\text{g/mL}$  时达到高峰 ( $128.38 \pm 2.10$ ); 24 h 时, 肾功能快速进展组在不同质量浓度血清 IgA1 刺激下,  $TGF-\beta 1$  蛋白表达水平均高于肾功能长期稳定组, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

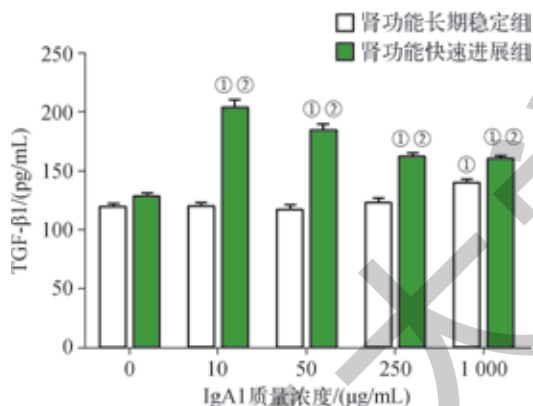




注: <sup>①</sup> $P=0.000$ , <sup>②</sup> $P=0.018$ , <sup>③</sup> $P=0.004$ , <sup>④</sup> $P=0.002$ , <sup>⑤</sup> $P=0.007$ , 与阴性对照组比较; <sup>⑥</sup> $P=0.000$ , <sup>⑦</sup> $P=0.007$ , 与肾功能长期稳定组比较。

图 6 IgA1 刺激 HMC 12 h 后 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达

Fig 6 Level of TGF- $\beta$ 1 protein after IgA1 stimulation for 12 h



注: <sup>①</sup> $P=0.000$ , 与阴性对照组比较; <sup>②</sup> $P=0.000$ , 与肾功能长期稳定组比较。

图 7 IgA1 刺激 HMC 24 h 后 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达

Fig 7 Level of TGF- $\beta$ 1 protein after IgA1 stimulation for 24 h

### 3 讨论

IgAN 的主要病理表现为肾小球系膜区的 IgA 免疫复合物沉积。Al-Eisa 等<sup>[9]</sup>发现初乳中的分泌型 IgA 在 5  $\mu$ g/mL 时即对 HMC 表现出较明显的促进增殖的作用, 且与胰岛素样生长因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) 共同作用 HMC 后, 可通过 IGF-1 受体 (IGF-1 receptor, IGF-1R) 提高 IGF-1 有丝分裂的水平。另外, 邓会等<sup>[10]</sup>通过质谱法进一步分析 HMC 上清蛋白, 发现 HMC 可合成和分泌 IgA。本研究重点观察血清 IgA1 体外刺激系膜区增殖及细胞外因子的预后作用, 通过提取 2 组肾功能进展不同的患者血清 IgA1, 分析其对系膜区细胞的增殖及细胞外因子的作用, 结果发现两者均表现出一定的时间依赖性和浓度依赖性。与肾功能长期稳定患者相比, 肾功能快速进展患者血清 IgA1 在 250  $\mu$ g/mL 时促增殖作用达到高峰, 而在浓度 1 000  $\mu$ g/mL 时, 作用达到饱和, 细胞增殖率下降; 肾功能长期稳定患者血清 IgA1 对系膜区的增

殖作用则随着时间、浓度递增, 在浓度达到 1 000  $\mu$ g/mL 时作用最强。这一差别可能与 IgA1 分子的糖基化差异有关, 并为将来研究针对肾组织沉积的 IgA1 药物的靶向浓度提供参考。

TGF- $\beta$ 1 是具有多种功能的细胞因子。Smad 蛋白家族为参与 TGF- $\beta$  信号通路的重要分子, 通过特异性激活细胞内 R-Smads, 与 Co-Smad 进一步作用, 提高 Smad3 水平, 正向调控细胞纤维化<sup>[4]</sup>。在 IgAN 患者的尿液和肾组织中, 均发现 TGF- $\beta$ 1 水平升高, 其通过诱导 HMC 和足细胞凋亡而影响 IgAN 肾病进展<sup>[11]</sup>。研究<sup>[12]</sup>发现, 通过结合 IgA 的 Fc 端, 一种  $\beta$ -1,4 半乳糖基转移酶受体的亚型在 IgA 与 HMC 结合中起到关键作用。有研究表明, 在肝癌细胞中, 在经过反义 TGF- $\beta$ 1 转染后的 SMMC-7721 (AST/7721) 细胞,  $\beta$ -1,4 半乳糖基转移酶的 mRNA 与蛋白含量均明显降低, 提示 TGF- $\beta$ 1 与  $\beta$ -1,4 半乳糖基转移酶具有协同性。Chun 等<sup>[13]</sup>利用 TGF- $\beta$  模拟慢性肾小管上皮细胞损伤与纤维化的体外模型, 发现在作用的前 7 d, 原代肾小管上皮细胞可呈现明显的成纤维细胞形态, 同时在前 3 d 内, 发现 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 的 mRNA 和蛋白均达到峰值, 而在 3 d 后出现 NLRP3 水平的降低和纤维细胞表型丢失, 提示上皮表型损失与降低的 NLRP3 蛋白和 mRNA 水平有关。而且, 有研究<sup>[14]</sup>表明, NLRP3 水平较高者预后相对良好。因此, TGF- $\beta$ 1 对预测 IgAN 进展有一定价值。本实验中, 在不同观察时间点, 2 组细胞增殖率随血清 IgA1 浓度升高而增大。但 TGF- $\beta$ 1 在较低的 IgA1 浓度作用下水平较高, 其后却逐渐降低, 推测可能与 Smad 蛋白作用有关。IgA1 不仅可以介导 TGF- $\beta$ 1 信号的下游通路, 同时也能调节 TGF- $\beta$ 1 表达, 其中内源性 Smad7 可与 TGF- $\beta$ 1 的 I 型受体结合, 阻止 R-Smad 的磷酸化。研究<sup>[15]</sup>也证实, Smad7 可以负反馈调节 TGF- $\beta$ 1/Smad 通路, 从而阻止纤维化进程。

IgAN 患者的病程、预后具有异质性, 难以预测。临床上, 部分患者肾功能稳定, 部分患者则快速进展到 ESRD。目前, 临床判断预后的指标包括低肾小球滤过率 (eGFR)、高血压、蛋白尿、HMC 增生、节段硬化或粘连、肾小管萎缩和间质纤维化。有研究表明, 毛细血管内皮细胞增生是影响肾脏病结局的独立危险因素<sup>[16]</sup>, 但由于临床数据有限, 结论尚需验证。本实验为判断患者临床预后提供新的方向, 重点关注血清 IgA1 在肾小球系膜区的沉积与增殖作用。国外研究提示, 血清 IgA1 或糖基化缺陷 IgA1-IgG 抗体复合物与肾功能进展相关<sup>[17]</sup>; IgAN 患者平均血清总蛋白水平、自身抗体 IgG 和 IgA 抗体与对照组

相比显著升高,并且与患者预后相关。目前,没有明确证据表明药物可以影响 IgA1 的结构,并且在家族性和散发性 IgAN 患者患病亲属中,常常发现高水平的糖基化缺陷 IgA1,提示血清中 IgA1 与基因水平有关。结合血清 IgA1 的更全面的治疗方案可能为 IgAN 患者带来益处。因此,本实验选取血清 IgA1,其理化性质受影响较小,相较于蛋白尿、血压等临床指标更稳定,便于临床诊疗。

本实验仍有许多不足。在人血清中,约 85% 为 IgA1 单体,仅有 15% 左右为多聚 IgA (polymeric immunoglobulin A, pIgA)<sup>[18]</sup>。Valentijn 等<sup>[19]</sup>在研究中利用双色免疫荧光法发现,在 13 例肾组织标本中,肾小球系膜区沉积物主要是以 IgA1 为主的 pIgA。研究<sup>[20]</sup>证实,主要激活系膜区 MAPK-ERK 的因素为含有 IgA 的相对分子质量较大

(800 000 ~ 900 000) 免疫复合物。国内有报道<sup>[21]</sup>, IgAN 患者血清的 IgA1,尤其是聚合 IgA1,对 IgAN 进展发挥显著作用。众多研究表明,血清中 IgA 升高并不一定能致病,说明 IgA 分子的异常理化性质如分子大小、电荷以及糖基化均对系膜区病变有一定影响,关于这方面的问题仍值得探索。另外, IgA 分子糖基化程度的不同,也可能是系膜区增殖的关键因素。曾有研究<sup>[22]</sup>发现,不同糖基化程度的 IgA1 可表现出与脐静脉内皮细胞不同的结合量,推测不同肾病进展的 IgAN 患者,血清 IgA1 分子不同的结构及功能异常,可能影响其与 HMC 的结合,从而影响肾脏系膜区增殖及细胞外因子的表达,影响病情进展。另外,本实验中样本数量较少,需继续开展对于 IgAN 患者血清 IgA1 分子结构及功能的大样本研究。

## 参·考·文·献

- [1] SotoodianB, Robert J, Mahmood MN, et al. IgA cutaneous purpura post-renal transplantation in a patient with long-standing IgA nephropathy: case report and literature review[J]. J Cutan Med Surg, 2015, 19(5): 498-503.
- [2] Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, et al. Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis[J]. PLoS Genetics, 2012, 8: e1002765.
- [3] Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, et al. Aberrant glycosylation of IgA1 is inherited in both pediatric IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis[J]. Kidney, 2011, 80(1): 79-87.
- [4] MengXM, Chung AC, Lan HY, et al. Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases[J]. Clin Sci (Lond), 2013, 124(4): 243-254.
- [5] 吴琳. 过敏性紫癜血清 IgA1 刺激脐静脉内皮细胞分泌炎症介质的实验研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [6] Grywalska E, Smarz-Widelska I, Krasowska-Zajac E, et al. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in primary glomerulonephritides[J]. Arch Immun Ther Exp, 2018, 66(2): 133-143.
- [7] Wang C, Peng H, Tang H, et al. Serum IgA1 from IgA nephropathy patients induces apoptosis in podocytes through direct and indirect pathways[J]. Clin Invest Med, 2007, 30(6): E240-E249.
- [8] 王悦, 赵明辉, 章友康, 等. IgA 肾病患者血清 IgA-1 活化细胞外信号调节激酶并诱发肾小球系膜细胞增殖的作用[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(20): 1406-1409.
- [9] Al-Eisa A, Dhaunsi GS. IgA enhances IGF-1 mitogenic activity via receptor modulation in glomerular mesangial cells: implications for IgA-induced nephropathy[J]. Kidney Blood Press Res, 2017, 42(3): 391-397.
- [10] 邓会, 马骏凡, 景子洋, 等. 免疫球蛋白 A 在人肾小球系膜细胞中的合成与分泌[J]. 北京大学学报 (医学版), 2017, 49(6): 948-953.
- [11] Chihara Y, Ono H, Ishimitsu T, et al. Roles of TGF-β1 and apoptosis in the progression of glomerulosclerosis in human IgA nephropathy[J]. Clin Nephrol, 2006, 65(6): 385-392.
- [12] Molyneux K, Wimbury D, Pawluczyk I. β1, 4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells[J]. Kidney Int, 2017, 92(6): 1458-1468.
- [13] Chun J, Chung H, Wang X, et al. NLRP3 localizes to the tubular epithelium in human kidney and correlates with outcome in IgA nephropathy[J]. Sci Rep, 2016, 6: 24667.
- [14] Coppo R, Troyanov S, Bellur S, et al. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments[J]. Kidney Int, 2014, 86(4): 828-836.
- [15] Wu SP, Yang Z, Li FR, et al. Smad7-overexpressing rat BMSCs inhibit the fibrosis of hepatic stellate cells by regulating the TGF-β1/Smad signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(3): 2568-2576.
- [16] Fabiano RCG, Araújo SA, Bambirra EA, et al. The Oxford Classification predictors of chronic kidney disease in pediatric patients with IgA nephropathy[J]. J Pediatr (Rio J), 2017, 93(4): 389-397.
- [17] Berthou F, Suzuki H, Thibaudin L, et al. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23 (9): 1579-1587.
- [18] Lai KN, Tang SC, Schena FP, et al. IgA nephropathy[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16001.
- [19] Valentijn RM, Radl J, Haaijman JJ, et al. Circulating and mesangial secretory component-binding IgA-1 in primary IgA nephropathy[J]. Kidney Int, 1984, 26: 760-766.
- [20] Tamouza H, Chemouny JM, Raskova Kafkova L, et al. The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy[J]. Kidney Int, 2012, 82(12): 1284-1296.
- [21] 张巧玲, 蒋小云, 吴伟, 等. IgA1 对人肾小球系膜细胞 TGF-β1、Smad7 和纤连蛋白表达的影响[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(7): 1513-1516.
- [22] 张建军, 于峰, 徐丽霞, 等. 糖基化缺陷的血清 IgA1 与人脐静脉内皮细胞结合量的研究[J]. 北京大学学报 (医学版), 2005, 37(2): 139-142.

[收稿日期] 2018-01-16

[本文编辑] 吴 洋