

## IgA肾病患者血清IgA1对足细胞凋亡的影响

王成, 刘迅, 彭晖, 叶增纯, 唐骅, 娄探奇\*

(中山大学附属第三医院肾内科, 广东广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨IgA肾病患者血清IgA1对足细胞凋亡的影响。【方法】Jacalin亲和层析和Sephacryl S-200分子筛用来纯化蛋白,单体IgA1(mIgA1)热聚合为聚合体IgA1(aIgA1),同步化的足细胞与患者和健康对照来源的aIgA1共培养,流式细胞仪评价细胞凋亡情况,Real time PCR检测Bcl-2, Bax, Fas and Fas-L mRNA表达情况。【结果】IgAN患者的aIgA1可诱导足细胞的凋亡,其凋亡率显著高于对照组[(30.5 ± 5.4)% vs (20.6 ± 4.5)%,  $P < 0.05$ ];而健康对照的aIgA1可诱导足细胞的凋亡,凋亡率也显著高于对照[(31.4 ± 5.3)% vs (20.6 ± 4.5)%,  $P < 0.05$ ];IgAN患者的aIgA1诱导足细胞的凋亡呈现时间和浓度依赖。与对照相比,IgAN患者和健康对照来源的aIgA1诱导足细胞Fas mRNA升高2.4倍( $P < 0.05$ ),而Bcl-2 mRNA和Bax mRNA无显著性变化( $P > 0.05$ )。【结论】IgA肾病患者血清IgA1可诱导足细胞的凋亡,其可能参与IgAN的进展。

**关键词:** 肾小球肾炎 IgA; IgA1; 足细胞; 凋亡

**中图分类号:** R692 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)05-0517-05

### Effect of Apoptosis in Podocyte by IgA1 Isolated from IgA Nephropathy

WANG Cheng, LIU Xun, PENG Hui, YE Zeng-chun, TANG Hua, LOU Tan-qi\*

(Department of Nephrology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】 To explore the apoptosis in podocyte by aIgA1 isolated from IgAN patients and normal control. 【Methods】 Jacalin affinity chromatography and Sephacryl S-200 molecular sieve chromatography were used to isolate IgA1. Apoptosis rate in podocyte was assessed by flow cytometry, monomeric IgA1(mIgA1) was transformed to aggregated IgA1(aIgA1) by heating. Different aIgA1 was exposed to the medium with RPMI 1640 containing 0.5% FBS cultured with growth arrested podocyte. Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of Bcl-2, Bax, Fas and Fas-L. 【Results】 Apoptosis rate of podocyte by medium from aIgA1 from IgAN cultured with podocyte cell was higher than control [(30.5 ± 5.4)% vs (20.6 ± 4.5)%  $P < 0.05$ ], and the rate of podocyte by aIgA1 from healthy control was higher than control [(31.4 ± 5.3)% vs (20.6 ± 4.5)%  $P < 0.05$ ]. The apoptosis rate of podocyte by aIgA1 from IgAN was time and concentration-dependent. Fas mRNA of podocyte exposed with aIgA1 from IgAN patients and healthy control was 2.4-fold higher than control ( $P < 0.05$ ), while Bcl-2 and Bax in this two groups were not different from control ( $P > 0.05$ ). 【Conclusion】 Our findings implicate that aIgA1 from IgA nephropathy can induces apoptosis of podocyte, which might accelerate the progression of IgAN by inducing apoptosis of podocyte.

**Key words:** nephritis IgA; IgA1; podocyte; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(5): 517-521]

IgA肾病(IgAN)是一种常见的原发性肾小球疾病,在我国占原发性肾炎患者的25%~33%,是引起终末期肾功能衰竭最常见的原因之一<sup>[1]</sup>。既往认为该病预后良好,无需特殊干预,但研究表明该病是一组进展性疾病,在诊断后5~25年内,约

有15%~40%患者进入终末期肾衰竭而不得不接受肾脏替代治疗<sup>[2]</sup>。尽管其机制未明,但越来越多的研究提示异常的IgA1在其发病及进展中起着重要作用<sup>[3]</sup>。足细胞是一种终末分化的细胞,增殖能力有限,损伤后难以修复。足细胞损伤在肾小球

收稿日期: 2009-01-07

基金项目: 广东省医学研究基金(B2007060)

作者简介: 王成,主治医师,医学博士, E-mail: wczg@medmail.com.cn; \*通信作者: 娄探奇,教授,博士生导师, E-mail: loutq@163.com

硬化、间质纤维化中起重要作用,与肾小球疾病的进展有密切关系<sup>[4]</sup>。凋亡是导致足细胞数目下降的重要原因之一<sup>[5]</sup>。那么异常的 IgA1 能否诱导足细胞的凋亡呢?本研究通过体外细胞培养来观察 IgA1 对足细胞凋亡的影响及其可能的机制,现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 对象

收集中山大学附属第三医院的 22 例无黏膜感染、3 月内无服用激素及免疫抑制剂的肾穿刺诊断的原发性 IgAN 患者和 10 例健康对照者入组。IgAN 患者男性 12 例、女性 10 例,年龄 14 ~ 65 (30 ± 15) 岁;肾活检病理表现为系膜增生为 12 例、局灶硬化 3 例、系膜增生伴硬化 7 例;其血清 IgAN 浓度为 (4.52 ± 3.58) mg/mL。健康对照者男性 6 例、女性 4 例,年龄 18 ~ 49 (29 ± 13) 岁。上述每例取血 20 mL, 3 000 r/min ( $r = 35$  cm) 离心 15 min, 取上清于 -20 °C 冻存备用,入组患者和健康对照均签署知情同意书。

### 1.2 IgA1 的分离和鉴定

上述上清首先和 PBS(phosphate-buffered saline, pH = 7.4) 1:1 稀释, 0.2 μm 针头过滤器过滤,而后上样平衡好的 jacalin agarose 亲和层析柱, 175 mmol/L Tris-HCL (pH 7.4) 冲洗,而后 0.1 mol/L D-(+)-蜜二糖 洗涤,得到洗脱峰,收集洗脱液浓缩后上样 Sephacryl S-200 分子筛,得到 3 个峰:多聚 IgA1 (polymeric IgA1, pIgA1), 单体 IgA1 (monomeric IgA1, mIgA1) 和其它非 IgA1 蛋白<sup>[6-7]</sup>, 分别收集超滤浓缩, 0.2 μm 针头过滤器过滤, SDS-PAGE 检测其纯度, Western blot 鉴定,而后置于 -70 °C 保存备用。因 pIgA1 量太少,无法满足实验需要,我们采用热聚合方法得到聚合 IgA1 (aggregated IgA1, aIgA1)<sup>[6-7]</sup>。

### 1.3 细胞培养

小鼠足细胞 MPC5 由中山大学附属第一医院余学清教授惠赠,实验采用的细胞为 10 ~ 18 代。MPC5 使用含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养,细胞首先在 50 U/mL 的 IFN-存在下, 33 °C, 5% 体积分数 CO<sub>2</sub> 培养,而后转入 37 °C, 5% 体积分数 CO<sub>2</sub> 培养 12 d, 细胞以 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL 转入放有载玻片的

六孔板中待用,上述细胞使用前均使用含 5 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基同步化 18 ~ 24 h。

### 1.4 实验分组

100 μg/mL 的 IgAN 患者 (pIgA 组) 和健康对照 (NIgA) 的 aIgA1 分别与同步化的足细胞共培养 24 h, 检测相关指标;不同浓度 (0、50、100、200、400、800、1 600 μg/mL) IgAN 患者来源 aIgA1 分别与同步化的足细胞共培养 24 h; 100 μg/mL 的 IgAN 患者的 aIgA1 分别与同步化的足细胞共培养 6、12、24、48 h; 100 μg/mL 的不同病理类型 (系膜增生型、硬化型) IgAN 患者 aIgA1 分别与同步化的足细胞共培养 24 h, 100 μg/mL 的 IgAN 患者的 mIgA1 和 aIgA1 分别与同步化的足细胞共培养 24 h, 分别检测细胞凋亡情况和相关基因表达情况。每组设 3 个平行样品, 实验重复 3 次。

### 1.5 凋亡检测

采用流式细胞仪评价凋亡 (annexin-fitc apoptosis detection kit I, BD Biosciences), 操作按说明书进行: 首先用冷 PBS 冲洗 2 次, 胰酶消化, 1 × 结合缓冲液重悬细胞, 调整细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 取 100 μL 加入反应管, 分别加入 5 μL Annexin V-FITC 和 PI, 轻轻震荡, 室温避光保存 15 min, 而后加入 400 μL 1 × 结合缓冲液, 上机分析, Annexin<sup>-</sup> PI<sup>-</sup> 活细胞, Annexin<sup>+</sup> PI<sup>-</sup> 早期凋亡细胞, Annexin<sup>+</sup> PI<sup>+</sup> 晚期凋亡细胞, Annexin<sup>-</sup> PI<sup>+</sup> 坏死细胞, 凋亡率为早期凋亡 + 晚期凋亡<sup>[8]</sup>。

### 1.6 Real time PCR

上述足细胞的总 RNA 提取使用 Trizol (Invitrogen), 逆转录反应使用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect Real time, TaKaRa) 试剂盒进行, 条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。引物见表 1, PCR 使用 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) 和 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> Perfect Real time (TaKaRa) 进行, 每孔为 20 μL, 包括 10 μL SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>, 0.4 μL 引物, 0.4 μL ROX Reference Dye, 2 μL cDNA 和 6.8 μL dH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件: 预变性 95 °C 10 s, 而后 PCR 反应: 40 循环, 变性 95 °C 5 s, 退火/延伸 60 °C 31 s, 每个样品重复 3 次, 阴性对照无扩增, 反应孔可见单峰溶解曲线, 数据处理采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 相对 CT 值方法进行, 对照组各项指标设定为 1。

### 1.7 统计学处理

所有数据均用均数 ± 标准差表示, 计量资料

表 1 引物序列  
Table 1 Sequence of primers

Name		Sequence (5'→3')	Length (bp)
Bcl-2	Sense	GTGTTCCATGCACCAAGTCCA	127
	Antisense	AGGTACAGGCATTGCCGCATA	
Bax	Sense	CAGGATGCGTCCACCAAGAA	165
	Antisense	GTTGAAGTTGCCATCAGCAAACA	
Fas	Sense	GAAGATGCACACTCTGCGATGAA	103
	Antisense	TCCGACTAGAACTCTGTTTGCAC	
Fas-l	Sense	CAGCTTCAGATGCAAGTGAGTGG	141
	Antisense	CAAGGACAGAACTCTGACGCTGAC	
GAPDH	Sense	TGTGTCCTCGTGGATCTGA	150
	Antisense	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	

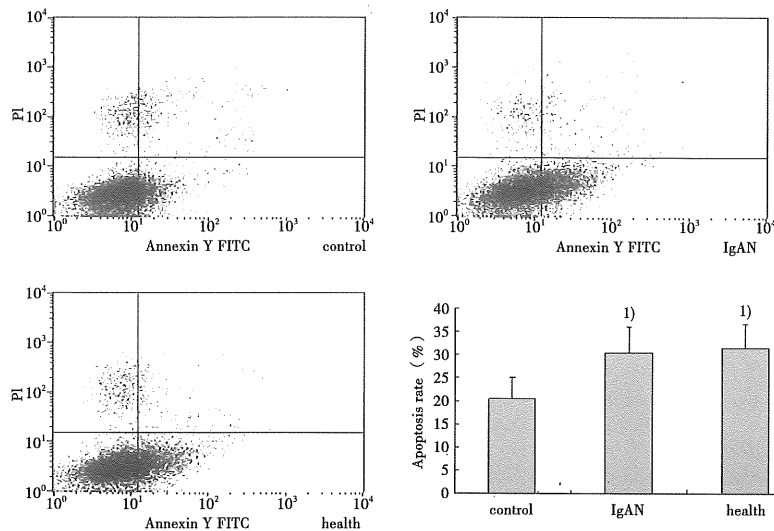


图 1 不同组足细胞的凋亡率的比较

Fig.1 Comparison of apoptosis rate of podocyte in different group ( $n = 6$ )

Control: podocytes incubated with RPMI 1640 containing 5 mL/L FBS; IgAN: podocytes incubated with RPMI 1640 containing 5 mL/L FBS and aIgA1(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from IgAN patients; health: podocytes incubated with RPMI 1640 containing 5 mL/L FBS and aIgA1 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from healthy control, 1)  $P < 0.05$  compared with control group

## 2.2 IgAN 患者的 aIgA1 诱导足细胞凋亡率不同时间的比较

各个时间点 IgAN 患者来源的 aIgA1(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )均可诱导足细胞的凋亡,其中 12 h 凋亡率高于 6 h ( $P < 0.05$ ), 24 h 凋亡率高于 12 h ( $P < 0.05$ ), 48 h 凋亡率高于 24 h( $P < 0.05$ ,图 2)。

## 2.3 不同浓度的 IgAN 患者的 aIgA1 诱导足细胞凋亡率的比较

50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IgAN 患者的 aIgA1 诱导足细胞凋亡率(24 h)与对照相比无显著性差异( $P > 0.05$ ),而浓度大于 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IgAN 患者的 aIgA1 诱导足细胞凋亡率要显著高于对照( $P < 0.05$ ,图 3)。

比较使用单因素方差分析,计数资料组间比较使用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  被认为有统计学意义,使用统计学处理软件 SPSS 11.0 进行。

## 2 结果

### 2.1 不同来源的 aIgA1 诱导足细胞凋亡的比较

IgA 肾病患者来源的 aIgA1(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )与足细胞共培养 24 h 后,可诱导其凋亡,其凋亡率显著高于对照组的凋亡率[(30.5  $\pm$  5.4)% vs (20.6  $\pm$  4.5)%  $P < 0.05$ ];而健康对照的 aIgA1 亦可诱导足细胞的凋亡,其凋亡率显著高于对照组的凋亡率[(31.4  $\pm$  5.3)% vs (20.6  $\pm$  4.5)%,  $P < 0.05$ ,图 1]。

### 2.4 不同来源的 mIgA1 和 aIgA1 诱导足细胞凋亡率的比较

不同来源的 mIgA1 和 aIgA1 均可诱导足细胞凋亡,其凋亡率高于对照组( $P < 0.05$ ),但 aIgA1 和 mIgA1 诱导足细胞凋亡率无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 2)。

### 2.5 Bcl-2, Bax, Fas and Fas-L mRNA 的表达

IgAN 患者和健康对照来源的 aIgA1 可使足细胞的 Fas/GAPDH mRNA 较对照增加 2.4 倍( $P < 0.05$ ),而 Fas-L/GAPDH mRNA 与对照相比下降 75%( $P < 0.05$ );而两组的 Bcl-2 和 Bax mRNA 与对照相比差异无显著性( $P > 0.05$ ,图 4)。

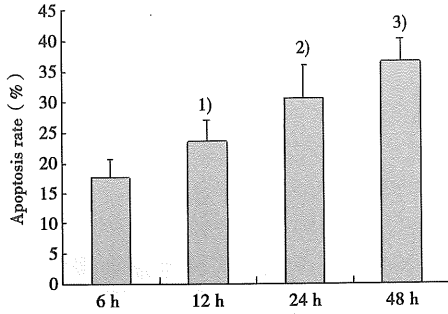


图 2 IgAN 患者的 aIgA1 诱导足细胞不同时间的凋亡率比较

Fig.2 Comparison of apoptosis rate of podocyte incubated aIgA1 from IgAN patients at different time

1)  $P < 0.05$  compared with 6 h; 2)  $P < 0.05$  compared with 12 h; 3)  $P < 0.05$  compared with 24 h;  $n = 6$

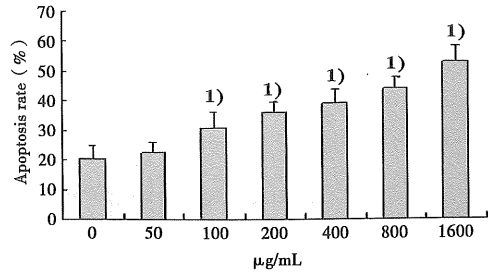


图 3 不同浓度 IgAN 患者来源的 aIgA1 诱导足细胞的凋亡率比较

Fig.3 Comparison of apoptosis rate of podocyte incubated different aIgA1 from IgAN patients (24 h)

1)  $P < 0.05$  compared with 0 µg/mL;  $n = 6$

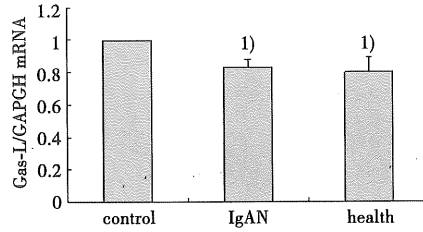
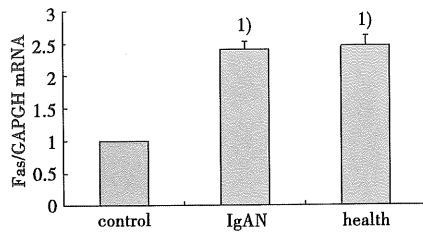
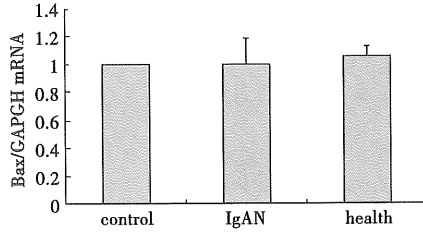
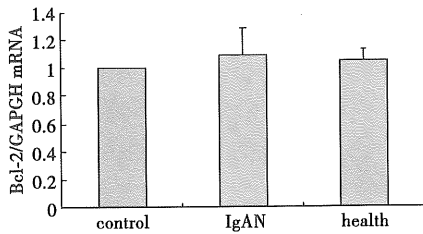


图 4 不同组别凋亡相关基因的 mRNA 的比较

Fig.4 Comparison of apoptosis related genes of podocytes in different group

Control: podocytes incubated with RPMI 1640 containing 5 mL/L FBS, IgAN: podocytes incubated with RPMI 1640 containing 5 mL/L FBS and aIgA1(100 µg/mL) from IgAN patients, health: podocytes incubated with RPMI 1640 containing 5 mL/L FBS and aIgA1(100 µg/mL) from healthy control, 1)  $P < 0.05$  compared with control group;  $n = 6$

### 3 讨论

以肾脏系膜区 IgA 沉积为特点的肾小球疾病,系膜细胞一直是人们关注的热点。但近些年研究表明,足细胞损伤与肾小球硬化、间质纤维化等肾脏进展病理改变密切相关,足细胞数目下降直接导致蛋白尿和肾小球硬化的发生。Kim 等<sup>[9]</sup>通过反复注射 PAN 引起足细胞的损伤,导致单位肾小球足细胞数量和密度的下降,发现随着减少的足细胞减少,肾小球硬化逐步出现,在足细胞损伤

10% ~ 20%时,肾小球硬化才开始,提示足细胞丢失与小球硬化进展密切相关。Ichikawa 等<sup>[4]</sup>发现无论在胚胎还是成体后足细胞损伤均可导致肾小球硬化,其损伤发展速度越快。在 MWF 大鼠模型研究中发现,足细胞数量与蛋白尿发生、肾小球硬化有密切的关系<sup>[10]</sup>。Lemley 等<sup>[11]</sup>发现足细胞减少的程度与肾小球硬化的程度和肾小球滤过率的下降密切相关,足细胞减少是疾病活动性的重要标志。而足细胞中具有阻断细胞死亡的 Bcl-2 的表达与蛋白尿、肾脏硬化程度等指标密切相关,提示在 IgA 肾病中存在显著的足细胞损伤,而其损伤与肾脏进展有密切关系<sup>[12]</sup>。

导致足细胞凋亡的因素有什么呢? TGF- $\beta$  及其受体可诱导足细胞的凋亡;Singhall 等<sup>[13]</sup>证实血管紧张素 II 通过血管紧张素受体直接诱导足细胞的凋亡;而向 SD 大鼠体内输注血管紧张素 II 可以诱导足细胞的凋亡<sup>[14]</sup>。而足细胞本身因素参与足细胞凋亡的发生,研究表明裂孔膜蛋白调控足细胞的生存;Schiffer<sup>[15]</sup>发现 CD2P 敲除的小鼠足细胞的凋亡率要显著高于野生型小鼠,同样 nephrin 亦参与足细胞凋亡的调控<sup>[16]</sup>。

那么 IgAN 患者的 IgA 能否引起足细胞凋亡呢? 为此我们设计此体外实验,比较不同来源的 aIgA1 对足细胞凋亡的影响,我们发现患者和健康对照的 aIgA1 可显著诱导足细胞的凋亡,提示 IgA1 诱导足细胞的凋亡与 IgA1 本身的糖基化程度无相关性,只要 IgA1 能够与足细胞接触就可以与其发挥作用而引起生物学性质的改变,而异常的糖基化的 IgA1 分子更容易沉积于肾脏,而更可能在体内诱导足细胞的凋亡。

通常,引起凋亡的途径可分为两种:死亡受体途径和线粒体途径。通常死亡受体如 Fas 与其受体 Fas-L 结合,激活下游分子如 FADD 而启动凋亡发生;而线粒体途径往往与 Bcl-2 家族蛋白有关,这两种途径均参与上皮细胞的凋亡。我们结合以往报道和预实验结果,选择两种途径有代表性的相关基因进行检测,发现:这种 IgAN 患者的 aIgA1 与系膜细胞共培养得到的上清可以诱导足细胞的凋亡可能 Fas 的上调有关,表明死亡受体途径均可能参与到此凋亡的发生,至于其受体的轻度下调,可能是细胞的一种自我保护调控机制,其具体机制需要进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 王悦,赵明辉,章友康. IgA 肾病分子病因学的研究 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2002, 11(3): 273-276.
- [2] Li LS, Liu ZH. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in china: analysis based 13,159 renal biopsies [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(3): 920-923.
- [3] Xu LX, Zhao MH. Aberrantly glycosylated IgA1 are closely associated with pathologic phenotype of IgA nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(1): 167-172.
- [4] Ichikawa I, Ma J, Motojima M. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005, 14(1): 205-210.
- [5] Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF- $\beta$  and Smad7 [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(2): 807-816.
- [6] Wang Y, Zhao MH, Zhang YK, et al. Binding capacity and pathophysiological effects of IgA1 from patients with IgA nephropathy on human glomerular mesangial cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 136(1): 168-175.
- [7] Wang Y, Zhao MH, Zhang Y, et al. Serum IgA (1) from patients with IgA nephropathy induces phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and proliferation of human mesangial cells [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2002, 82(20): 1406-1409.
- [8] Keane WF. Proteinuria: Its clinical importance and role in progressive renal disease [J]. *Am J Kidney*, 2000, 35(4s1): 97-105.
- [9] Kim Y-H, Goyal M, Kurnit D, et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(2): 957-968.
- [10] Daniela M, Maria B, Ariela B, et al. Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury [J]. *Am J Pathol* 2006, 168(1): 42-45.
- [11] Lemley KV, Lafayette RA, Safai M, et al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2002, 61(4): 475-485.
- [12] Lian QQ, Raja S, Stephen IH. Downregulation of Bcl-2 by podocytes is associated with progressive glomerular injury and clinical indices of poor renal prognosis in human iga nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1): 79-90.
- [13] Ding G, Reddy K, Kappsi AA, et al. Angiotensin II podocytes induced apoptosis in rat glomerular epithelial cell [J]. *Am J Renal Physiol*, 2002, 283(1): 173-180.
- [14] Jia J, Ding G, Zhu J, et al. Angiotensin II infusion induces nephrin expression changes and podocyte apoptosis [J]. *Am J Nephrol*, 2008, 28(3): 500-507.
- [15] Schiffer M, Mundel P, Shaw AS, et al. A novel role for the adaptor molecule CD2P in TGF- $\beta$  induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(35): 37004-37012.
- [16] Foster RR, Saleem MA, Mathieson PW, et al. Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocyte [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288(1): F48-57.