

A

陈越¹, 彭莉²

(1.自贡市第一人民医院肾内科, 四川 自贡 643000;

2.成都市第七人民医院肾内科, 四川 成都 610000)

摘要:目的 研究黄芪对细胞毒素相关蛋白 A(cagA)诱导大鼠的系膜细胞外基质分泌的影响。方法 将大鼠系膜细胞进行体外培养,并随机分为四组,分别为空白对照组、IL-1 β 阳性对照组(10 ng/ml IL-1 β)和 CagA 实验组(4 μ g/ml CagA)及 CagA+黄芪干预组(1 mg/ml 的黄芪注射液+4 μ g/ml CagA),各组予以对应处理后刺激培养 72 h,检测细胞培养上清液 I 型胶原(Collagen I)、III 型胶原(Collagen III)蛋白水平及其 mRNA 表达。结果 IL-1 β 阳性对照组、CagA 实验组 Collagen I、Collagen III 蛋白浓度及 mRNA 表达水平高于空白对照组,CagA+黄芪干预组 Collagen I、Collagen III 蛋白浓度及 mRNA 表达水平低于 CagA 实验组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 黄芪或通过减少 I、III 型胶原蛋白的分泌,抑制 CagA 诱导的大鼠系膜细胞外基质的异常分泌,可为 IgA 肾病的治疗提供思路。

关键词: IgA 肾病;黄芪;系膜细胞;细胞毒素相关蛋白 A

中图分类号:R692

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.15.023

文章编号:1006-1959(2022)15-0104-04

Effect of Astragalus Membranaceus on CagA-induced Extracellular Matrix Secretion of Rat Mesangial Cells

CHEN Yue¹, PENG Li²

(1.Department of Nephrology,Zigong First People's Hospital,Zigong 643000,Sichuan,China;

2.Department of Nephrology,Chengdu Seventh People's Hospital,Chengdu 610000,Sichuan,China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Astragalus Membranaceus on CagA-induced extracellular matrix secretion of rat mesangial cells. **Methods** Rat mesangial cells were cultured in vitro and randomly divided into four groups: blank control group, IL-1 β positive control group (10 ng/ml IL-1 β), CagA experimental group (4 μ g/ml CagA) and CagA+Astragalus Membranaceus intervention group (1 mg/ml Astragalus Membranaceus injection+4 μ g/ml CagA). Each group was stimulated for 72 h after corresponding treatment. The protein level and mRNA expression of type I collagen (Collagen I) and type III collagen (Collagen III) in cell culture supernatant were detected. **Results** The protein concentration and mRNA expression of Collagen I and Collagen III in IL-1 β positive control group and CagA experimental group were higher than those in blank control group, and the protein concentration and mRNA expression of Collagen I and Collagen III in CagA+Astragalus Membranaceus intervention group were lower than those in CagA experimental group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Astragalus Membranaceus can inhibit CagA-induced abnormal secretion of extracellular matrix in rat mesangial cells by reducing the secretion of type I and type III collagen, which can provide ideas for the treatment of IgA nephropathy.

Key words: IgA nephropathy; Astragalus Membranaceus; Mesangial cells; Cytotoxin-associated protein A

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)是一组临床上以反复发作性的肉眼血尿或镜下血尿为主要表现、病理上表现为肾小球系膜区 IgA 沉积或以 IgA 沉积为主要特征的原发性肾小球疾病^[1],并以肾小球系膜增生及细胞外基质分泌增加为其基本组织学改变,占我国终末期肾病病因的第 1 位,占 40%~47.2%^[2]。在我国,IgAN 已成为导致慢性肾功能衰竭最主要的肾小球疾病^[3]。过度增生与凋亡减少的肾小球系膜细胞均可引起细胞外基质的过度表达和聚积,从而导致肾小球系膜区增宽和基质增生,最终导致肾小球硬化^[4,5]。研究表明^[6],细胞毒素相关蛋白 A(cytotoxin-associated protein A, CagA)具有促进大鼠肾小球系膜细胞增殖与细胞外基质分泌的作用。在

肾病综合征的中药治疗中,黄芪(Astragalus Membranaceus)因具有活血化淤、益气补血的作用,而被广泛应用于多种肾脏疾病的治疗中,但其具体分子机制尚未完全阐明^[7]。基于此,本研究通过观察黄芪对 CagA 诱导的大鼠系膜细胞外基质分泌的影响,探讨其抑制系膜细胞外基质分泌的作用机制,以期 IgA 肾病的防治研究提供思路,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料 HBZY-1 细胞株(大鼠系膜细胞):西南医科大学中心实验室惠赠;IL-1 β (R&D 公司,美国);幽门螺杆菌 CagA 蛋白(上海合星生物科技有限公司);1640 培养基(Gibco 公司,美国);黄芪注射液(每安瓿 2 ml,2 g/ml,批号 0306052);购自成都地奥九鸿制药厂;PCR 仪(定量定性分析类,Continuous fluorescence detector:CFD-3220,MJ,美国);多功能酶标仪(Infinite M200,TECAN,瑞士);TRIzol(Invitrogen TRIzol,赛默飞,美国)。

作者简介:陈越(1986.5-),女,四川自贡人,硕士,主治医师,主要从事肾内科临床工作

1.2 方法

1.2.1 大鼠系膜细胞培养 复苏系膜细胞基于 5% 二氧化碳、37 ℃ 孵箱环境进行培养, 细胞培养基为加入灭活 FBS(56 ℃ 灭活) 的 1640 培养基, 并加入终浓度为 0.1 mg/ml 的链霉素和 100 U/ml 的青霉素, 采倒置相差显微镜观察细胞生长。

1.2.2 细胞分组 培养的大鼠系膜细胞经充分洗涤后, 依据不同干预方法分为 4 组: 空白对照组、IL-1 β 阳性对照组 (IL-1 β 浓度 10 ng/ml)、CagA 实验组 (CagA 浓度 4 μ g/ml)、CagA+黄芪干预组 (加入 4 μ g/ml 的 CagA 和 1 mg/ml 的黄芪注射液)。

1.2.3 样本收集与保存 细胞刺激培养完成后, 细胞悬液以 1000 rpm 离心 5 min, 收集上清液, PBS 液洗涤 2 次, 采用 Trizol 法重复离心收集细胞, 并采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测提取的 mRNA。收集的上清液再次以 2500 rpm 离心 20 min, 上清液置于 4 ℃ 冰箱用于当日酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测, 未完成检测标本上清液及逆转录 cDNA 置于 -70 ℃ 长期保存。

1.2.4 检测方法 ① 采用 ELISA 法检测收集细胞上清液的 I、III 型胶原蛋白浓度, 采用多功能酶标仪检测 OD 值, 利用 Curve Expert 软件绘制标准曲线; 再根据标准曲线计算样品的 I、III 型胶原浓度; ② 采用

RT-PCR 法检测 I、III 型胶原蛋白的 mRNA 表达, Trizol 法提取细胞 RNA, 采用 RNA 琼脂糖电泳验证提取 RNA 的完整性, 使用超微量分光光度计检测 RNA 浓度、纯度, 合成引物序列: 内参照 GAPDH (上游: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; 下游: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'); Col III (上游: 5'-TAAAGGCTGAACGGGGCAGT-3'; 5'-ACGTTCCC-CATTATGGCCAC-3'); RT-PCR 反应条件: 95 ℃ 预变性 2 min, 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; PCR 产物进行琼脂糖电泳, 采用 Image J 软件分析凝胶电泳条带。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠系膜细胞外基质分泌水平比较 四组 Collagen I、Collagen III 蛋白浓度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 IL-1 β 阳性对照组、CagA 实验组系膜细胞外基质浓度高于空白对照组, CagA+黄芪干预组细胞外基质浓度低于 CagA 实验组, 见表 1。

表 1 各组大鼠系膜细胞外基质分泌水平比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$)

组别	<i>n</i>	Collagen I 蛋白浓度	Collagen III 蛋白浓度
空白对照组	4	39.882 \pm 1.127	52.191 \pm 1.630
IL-1 β 阳性对照组	4	101.905 \pm 0.842	161.802 \pm 1.917
CagA 实验组	4	88.344 \pm 1.114	127.914 \pm 2.193
CagA+黄芪干预组	4	68.900 \pm 0.975	98.178 \pm 3.122

2.2 各组大鼠系膜细胞外基质 mRNA 表达水平比较 四组 Collagen I、Collagen III mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 IL-1 β 阳性对照组、CagA 实验组系膜细胞外基质 mRNA 表达水平高于空白对照组, CagA+黄芪干预组系膜细胞外基质 mRNA 表达水平低于 CagA 实验组, 见图 1、表 2。

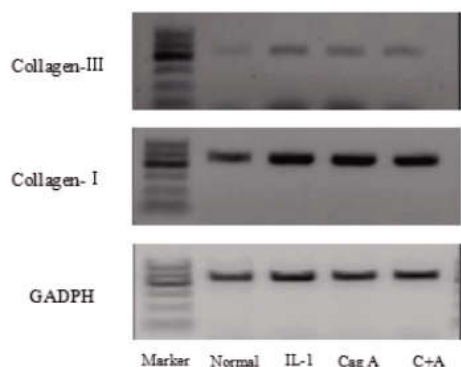


图 1 各组 I、III 型胶原蛋白的 mRNA 表达比较

表 2 各组大鼠系膜细胞外基质 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Collagen I	Collagen III
空白对照组	4	0.708 \pm 0.010	0.818 \pm 0.012
IL-1 β 阳性对照组	4	1.086 \pm 0.007	1.267 \pm 0.006
CagA 实验组	4	1.229 \pm 0.012	1.061 \pm 0.004
CagA+黄芪干预组	4	0.922 \pm 0.006	0.841 \pm 0.056

3 讨论

IgAN 作为全球范围内发病率最高的原发性肾小球疾病, 同时也是导致终末期肾脏病的主要原因之一^[8-11], 其病理学机制主要是以二聚体或多聚体的 IgA 为主的免疫复合物在肾小球系膜区沉积^[12]。正常情况下, IgA 主要由粘膜组织产生, 而在 IgAN 中, 肾外黏膜组织受抗原刺激后, 会产生异常 IgA 分子并在肾小球系膜区沉积, 从而引起和促进了 IgA 肾病的发生与发展。黏膜组织的免疫功能紊乱, 尤其是扁桃体, 目前被较多研究者作为 IgA 肾病发病机制研究的重点方向^[13]。黏膜免疫功能异常引起

如 β -1,3半乳糖基转移酶等糖基化相关酶类及其相关的伴侣蛋白表达降低,以及黏膜淋巴B细胞产生O-糖链糖基化异常的IgA分子,该异常的IgA分子沉积在肾小球系膜区,进而导致IgA肾病的发生与发展^[14]。在临床治疗中可以观察到,扁桃体切除术后,部分IgAN患者的生活质量、尿检异常、肾功能恶化的进展均有所改善,这些研究结果均提示扁桃体等黏膜组织可能为IgA肾病的致病抗原产生场所^[15,16]。肾间质纤维化是所有肾脏疾病慢性化的病理表现,也是影响慢性肾脏病预后和导致肾功能损害的主要因素之一。

本研究结果发现,IL-1 β 阳性对照组、CagA实验组系膜细胞外基质浓度及mRNA表达水平高于空白对照组($P<0.05$),提示CagA可以在体外诱导大鼠系膜细胞外基质异常分泌,在蛋白与mRNA层面均提高了Collagen I、Collagen III的表达,同IL-1 β 阳性对照具有相似作用。CagA作为幽门螺杆菌(Hp)主要的毒力蛋白之一,在消化性溃疡等胃肠道疾病以及Hp感染方面发挥关键作用,其主要机制为CagA可以导致胃上皮细胞的破坏、黏膜损伤、组织炎症甚至肿瘤发生。在Hp感染与IgAN的相关研究中,IgAN患者的肾小球系膜区可见Hp以及相关的免疫复合物沉积^[17]。肾小球系膜细胞增殖及细胞外基质分泌的增加是IgAN的基本组织学改变。CagA具有促进肾小球系膜细胞增殖及细胞外基质分泌的作用^[18]。因此,当肾小球受到炎症或如同CagA等因素作用时,可刺激系膜细胞增殖,分泌I、III型胶原,致ECM大量堆积,并分泌多种细胞因子、层粘蛋白等,更进一步介导肾脏免疫、炎症反应,加重肾脏损伤。

黄芪具有益气补肾、活血化淤的功效,在临床治疗中有提高血浆白蛋白、减轻肾损害的作用,且药理学研究表明^[19],黄芪及其黄芪皂苷可以通过各种机制参与对肾脏的保护,但其作用机制尚未完全阐明。黄芪苷IV可以减少单侧输尿管梗阻(UUO)小鼠模型的细胞外基质分泌以及炎症细胞浸润,并通过TLR4/NF- κ B调控改善肾间质纤维化^[20]。黄芪甲苷通过miR-98-5p抑制小儿IgAN中半乳糖缺乏的IgA1分泌,参与对IgAN的保护作用^[21]。在糖尿病肾病中,黄芪可以显著抑制肾皮质NLRP3、Caspase-1和IL-1 β 的表达水平,降低血清肿瘤坏死因子- α 和单核细胞趋化蛋白-1的水平。在高糖诱导的足细胞中,黄芪显着提高NLRP3、Pro-Caspase-1和Caspase-1的表达水平,表明黄芪可以通过抗NLRP3炎症小体介导的炎症改善了db/db小鼠的肾功能和足细胞损伤,并延迟了糖尿病肾病的发展^[22]。本研究结

果发现,CagA+黄芪干预组细胞外基质浓度及mRNA表达水平低于CagA实验组($P<0.05$),提示黄芪干预可抑制CagA诱导的大鼠系膜细胞外基质的异常分泌,无论从Collagen I、Collagen III蛋白或者mRNA表达水平都起到了抑制作用。

综上所述,黄芪或通过降低I、III型胶原蛋白的表达水平,抑制CagA诱导异常分泌的大鼠系膜细胞外基质,从而可为临床上IgAN的治疗提供新思路。本研究尚存在较多不足,黄芪可能通过抑制肾小球系膜细胞外基质增多而减缓IgA肾病进程,然而,在人体内是否有类似作用还需要进一步通过临床实验加以验证。此外,参与调控黄芪对系膜细胞细胞外基质异常分泌的抑制信号通路需进一步研究。

参考文献:

- [1]Rodrigues JC,Haas M,Reich HN.IgA Nephropathy [J].Clin J Am Soc Nephrol,2017,12(4):677-686.
- [2]何邦友,程晓霞.程晓霞主任医师诊治IgA肾病经验[J].中国中西医结合肾病杂志,2014(6):537-538.
- [3]Chen T,Li X,Li Y,et al.Prediction and Risk Stratification of Kidney Outcomes in IgA Nephropathy [J].Am J Kidney Dis,2019,74(3):300-309.
- [4]赵静,张丽英,康红霞.基于自噬途径探讨黄芪甲苷抑制糖尿病肾病系膜细胞NLRP3炎症小体活化通路及机制[J].中医药导报,2021,27(9):41-46.
- [5]姜楠,陈钰,王卓娜,等.miR-148a-3p对LPS诱导的肾小球系膜细胞增殖、凋亡及炎症因子的影响[J].西部医学,2021,33(2):217-222.
- [6]Wang L,Tan RZ,Chen Y,et al.CagA promotes proliferation and secretion of extracellular matrix by inhibiting signaling pathway of apoptosis in rat glomerular mesangial cells [J].Ren Fail,2016,38(3):458-464.
- [7]Guo MF,Dai YJ,Gao JR,et al.Uncovering the Mechanism of Astragalus membranaceus in the Treatment of Diabetic Nephropathy Based on Network Pharmacology [J].J Diabetes Res,2020,2020:5947304.
- [8]Lai KN,Tang SC,Schena FP,et al.IgA nephropathy [J].Nat Rev Dis Primers,2016,2:16001.
- [9]庞爽,赵栓,徐夏莲,等.基于网络药理学和体外细胞实验分析黄芪治疗IgA肾病的作用机制 [J].中国实验方剂学杂志,2021,27(15):139-147.
- [10]Suzuki H,Novak J.IgA glycosylation and immune complex formation in IgAN[J].Semin Immunopathol,2021,43(5):669-678.
- [11]Liu LJ,Yang YZ,Shi SF,et al.Effects of Hydroxychloroquine on Proteinuria in IgA Nephropathy: A Randomized Controlled Trial[J].Am J Kidney Dis,2019,74(1):15-22.
- [12]Tortajada A,Gutierrez E,Pickering MC,et al.The role of complement in IgA nephropathy [J].Mol Immunol,2019,114:123-132.

(下转第124页)

(上接第 106 页)

- [13] Gesualdo L, Di Leo V, Coppo R. The mucosal immune system and IgA nephropathy [J]. *Semin Immunopathol*, 2021, 43(5): 657–668.
- [14] Yamada K, Kobayashi N, Ikeda T, et al. Down-regulation of core 1 beta1,3-galactosyltransferase and Cosmc by Th2 cytokine alters O-glycosylation of IgA1 [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(12): 3890–3897.
- [15] Harabuchi Y, Takahara M. Recent advances in the immunological understanding of association between tonsil and immunoglobulin A nephropathy as a tonsil-induced autoimmune/inflammatory syndrome [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2019, 7(2): 86–93.
- [16] Mariotti A, Agrawal RA. The role of tonsillectomy in pediatric IgA nephropathy [J]. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 2009, 135(1): 85–87.
- [17] Zhu TT, Wang L, Wang HL, et al. *Helicobacter pylori* participates in the pathogenesis of IgA nephropathy [J]. *Ren Fail*, 2016, 38(9): 1398–1404.
- [18] 陈越. 细胞毒素相关抗原 A 对大鼠肾小球系膜细胞的作用 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2014.
- [19] 王雅宁. 黄芪甲苷抑制糖尿病肾病肾间质纤维化的作用和机制 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [20] Zhou X, Sun X, Gong X, et al. Astragaloside IV from *Astragalus membranaceus* ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting inflammation via TLR4/NF- κ B in vivo and in vitro [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 42: 18–24.
- [21] Liu C, Li X, Shuai L, et al. Astragaloside IV Inhibits Galactose-Deficient IgA1 Secretion via miR-98-5p in Pediatric IgA Nephropathy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 658236.
- [22] Feng H, Zhu X, Tang Y, et al. Astragaloside IV ameliorates diabetic nephropathy in db/db mice by inhibiting NLRP3 inflammasome mediated inflammation [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(2): 164.

收稿日期: 2021-09-16; 修回日期: 2021-10-12

编辑/杜帆