

基于C1GALT1/C1GALT1C1通路探讨加味升降散对 IgA肾病大鼠Gd-IgA1的影响

张圆圆¹, 靳培培¹, 靳贺超¹, 顾悦¹, 郭登洲^{2*}

(1. 河北中医学院 研究生学院, 石家庄 050200;

2. 河北中医学院 第一附属医院, 河北省中医院, 石家庄 050011)

[摘要] 目的:通过观察加味升降散对免疫球蛋白(Ig)A肾病大鼠血清及肾组织中微小RNA-148b(miRNA-148b)、白细胞介素-6(IL-6)、核心 β 1,3-半乳糖基转移酶(C1GALT1)、分子伴侣Cosmc(core β 3-Gal-T特异性分子伴侣,C1GALT1C1)、半乳糖缺乏IgA1(Gd-IgA1)表达的影响探讨其可能作用机制,为临床运用加味升降散治疗IgA肾病提供科学依据。方法:将42只SPF级雄性SD大鼠按照随机数字表法分为正常组8只、造模组34只,将大鼠适应性饲养1周后采用联合牛血清白蛋白(BSA)灌胃+尾静脉注射脂多糖(LPS)+皮下注射四氯化碳(CCl_4)、蓖麻油的免疫复合的方法建立实验性IgA肾病大鼠模型。造模完成后随机选取2只大鼠取材,检测造模是否成功。造模成功后,将造模组大鼠按照随机数字表法分成模型组、中药低剂量(加味升降散, $6.27 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、中药高剂量(加味升降散, $12.54 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、贝那普利($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组各8只,进行药物灌胃,1次/d,治疗4周。于实验第1周末、第9周末、第13周末检测24 h尿蛋白定量(24 h-UTP),第14周各组大鼠麻醉后取材,股动脉取血后离心取上清检测白蛋白(ALB)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN);酶联免疫吸附测定法(ELISA)检IL-6、Gd-IgA1表达水平变化;苏木素-伊红(HE)/马松(Masson)/碘酸六胺银(PASM)法观察肾组织病理改变;透射电镜观察肾小球超微结构变化;免疫组化法观察IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1表达情况;免疫荧光观察肾小球系膜区;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)观察miRNA-148b、IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1 mRNA表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1蛋白水平变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠24 h-UTP、SCr、ALT、IL-6、Gd-IgA1含量水平明显升高($P<0.05$),ALB含量水平明显降低($P<0.05$);肾小球系膜细胞增生、系膜区增厚、足细胞足突融合,大量颗粒状IgA免疫复合物沉积于肾小球系膜区;IL-6在系膜区、足细胞表达增强,C1GALT1、C1GALT1C1在系膜区、足细胞表达减弱;IL-6 mRNA、miRNA-148b表达增强($P<0.01$),C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA表达减弱($P<0.01$);IL-6蛋白表达显著增强($P<0.01$),C1GALT1、C1GALT1C1蛋白表达显著减弱,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,加味升降散干预后,24 h-UTP、SCr、ALT、IL-6、Gd-IgA1含量水平显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),ALB含量水平升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);病理损害减轻;基底膜IgA免疫复合物沉积明显减少;IL-6在大鼠肾小球系膜区、足细胞的表达减弱,C1GALT1、C1GALT1C1在系膜区、足细胞表达增强;IL-6 mRNA、miRNA-148b表达减少($P<0.01$),C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA表达增加($P<0.01$);IL-6蛋白表达明显减弱($P<0.05$, $P<0.01$),C1GALT1、C1GALT1C1蛋白表达增强,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);中药组表现出明显的量效趋势。结论:加味升降散可能通过降低IgA肾病大鼠血清及肾组织中miRNA-148b、IL-6表达,使C1GALT1、C1GALT1C1表达恢复,减少Gd-IgA1的生成,从而减轻肾脏病理损害,减少蛋白尿,发挥保护肾脏的作用,达到延缓疾病进展的目的,并且随剂量增加效果增强。

[关键词] 免疫球蛋白(Ig)A肾病; 加味升降散; 微小RNA-148b; 白细胞介素-6; 核心 β 1,3-半乳糖基转移酶; 核心 β 3-Gal-T特异性分子伴侣; 半乳糖缺乏IgA1

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R256.5;R692 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)14-0070-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221493

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220311.1451.011.html>

[网络出版日期] 2022-03-14 9:05

[收稿日期] 2021-11-17

[基金项目] 河北省科技支撑计划项目(16277765D);河北中医学院科技能力提升项目(KTZ2019025)

[第一作者] 张圆圆,在读博士,从事中医药治疗肾脏病研究,E-mail:514183801@qq.com

[通信作者] *郭登洲,主任医师,教授,博士生导师,从事中医药治疗肾脏病研究,E-mail:guodeangzhou@sohu.com

Effect of Modified Shengjiangsans on Gd-IgA1 in IgA Nephropathy Rats: Based on C1GALT1/C1GALT1C1 Signaling Pathway

ZHANG Yuanyuan¹, JIN Peipei¹, JIN Hechao¹, GU Yue¹, GUO Dengzhou^{2*}

(1. Graduate School, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** The effect of modified Shengjiangsans on immunoglobulin A (IgA) nephropathy was observed. The microRNA-148b (miRNA-148b), interleukin 6 (IL-6), core 1 beta 1,3-galactosyltransferase (C1GALT1), molecular chaperone Cosmc (core1 β -Gal-T-specific molecular chaperone C1GALT1C1), and galactose-deficient IgA1 (Gd-IGA1) in serum and kidney tissues of IgA nephropathy rats were detected to explore the underlying mechanism. The result is expected to lay a scientific basis for clinical application of modified Shengjiangsans in the treatment of IgA nephropathy. **Method:** A total of 42 SPF male SD rats were randomized into the normal group (8rats) and modeling group (34 rats) with the random number table method. After one week of adaptive feeding, rats for modeling were given bovine serum albumin (BSA, gavage), lipopolysaccharide (LPS, injection into tail vein), carbon tetrachloride (CCl₄, subcutaneous injection), and castor oil to induce IgA nephropathy. After modeling, two rats were randomly selected to test the modeling outcome. Then the model rats were classified into the model group, low-dose Chinese medicine group (modified Shengjiangsans, 6.27 g·kg⁻¹), high-dose Chinese medicine group (modified Shengjiangsans, 12.54 g·kg⁻¹), and benazepril group (10 mg·kg⁻¹) with the random number table method, 8 in each group. The administration (gavage, once a day) lasted 4 weeks. The 24-h urinary total protein (24 h-UTP) was detected at the end of the 1st, 9th, and 13th week of the experiment. At the 14th week, after anesthesia, femoral artery blood was collected and centrifugated. The supernatant was collected to detect albumin (ALB), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), serum creatinine (SCr), and blood urea nitrogen (BUN). The expression levels of IL-6 and Gd-IGA1 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Based on hematoxylin-eosin (HE)/Masson/periodic Schiff-methenamine silver (PASM) staining, the pathological changes of renal tissues were observed. Ultrastructural changes of glomeruli were observed by transmission electron microscopy. The expression of miRNA-148b, IL-6, C1GALT1, and C1GALT1C1 was detected by immunohistochemistry. The mesangial area of the glomeruli was observed by immunofluorescence. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was employed to determine the mRNA levels of mirNA-148b, IL-6, C1GALT1, and C1GALT1C1, and Western blot was used to detect the protein levels of IL-6, C1GALT1, and C1GALT1C1. **Result:** Compared with normal group, the model group showed increase in the content of 24 h-UTP, SCr, ALT, IL-6, and GD-IGA1 ($P<0.05$), decrease in ALB content ($P<0.05$). Moreover, rats in the model group demonstrated hyperplasia of glomerular mesangial cells, thickening of mesangial area, podocyte foot process effacement, and a large number of granular IgA immune complex in the mesangial area. In addition, the model group showed increase in the expression of IL-6 in mesangial area and podocytes, decrease in the expression of C1GALT1 and C1GALT1C1 in mesangial area and podocytes, enhanced expression of IL-6 mRNA and miRNA-148b ($P<0.01$), weakened expression of C1GALT1 mRNA and C1GALT1C1 mRNA ($P<0.01$), rise of IL-6 protein expression ($P<0.01$), and reduction in the protein expression of C1GALT1 and C1GALT1C1 ($P<0.01$). Compared with the model group, modified Shengjiangsans decreased the content of 24 h-UTP, SCr, ALT, IL-6, and Gd-IGA1 ($P<0.05$) and increased the content of ALB ($P<0.05$, $P<0.01$). Moreover, with the

treatment of this Chinese medicine, the pathological damage was significantly alleviated and the deposition of IgA immune complex in basement membrane was reduced. The expression of IL-6 in the mesangial area and podocytes of rats was decreased, and the expression of C1GALT1 and C1GALT1C1 in the mesangial area and podocytes of rats was increased. Moreover, the expression of IL-6 mRNA and miRNA-148b was decreased ($P < 0.01$), and the expression of C1GALT1 mRNA and C1GALT1C1 mRNA was increased ($P < 0.01$). The protein expression of IL-6 was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the protein expression of C1GALT1 and C1GALT1C1 was enhanced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The Chinese medicine group showed obvious dose-effect trend. **Conclusion:** Modified Shengjiangsan may reduce the expression of miRNA-148b and IL-6 in serum and kidney tissue of IgA nephropathy rats, restore the expression of C1GALT1 and C1GALT1C1, and decrease the generation of Gd-IgA1, so as to reduce renal pathological damage and proteinuria, protect the kidney protection, and finally delay the disease progression. Moreover, the effect is enhanced with the rise of dose.

[Keywords] immunoglobulin A (IgA) nephropathy; modified Shengjiangsan; miRNA-148b; interleukin-6; core 1 beta 1, 3-galactosyltransferase; core 1 beta3-galactosyltransferasespecific molecular chaperone; galactose-deficient IgA1

免疫球蛋白(Ig)A肾病是一种常见的原发性肾小球疾病,临床表现主要以肉眼血尿和或镜下血尿为主,可伴有不同程度蛋白尿、高血压和肾脏功能受损,肾组织活检病理显示在肾小球系膜区以IgA为主的免疫复合物沉积,以肾小球系膜细胞增生、系膜基质增多为基本组织学改变^[1]。IgA肾病发病机制复杂,而免疫致病机制为本病的重要致病机制,而且越来越多的证据表明半乳糖缺乏 IgA1 (Gd-IgA1)在IgA肾病发病机制中起关键作用^[2-3]。IgA1分子正常的情况下有独特的铰链区结构,在铰链区中有多个苏氨酸、丝氨酸残基,此为O糖基化的连接位,IgA1分子O糖基化过程中,N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)在N-乙酰半乳糖胺转移酶的作用下与丝氨酸、苏氨酸连接形成O糖基化的基本结构,半乳糖(Gal)在核心1 β 1,3-半乳糖基转移酶(C1GALT1)和分子伴侣Cosmc(core1 β 3-Gal-T特异性分子伴侣,C1GALT1C1)的催化作用下与GalNAc连接,N-乙酰神经氨酸在 α -2,6唾液酸转移酶(ST6GALNAC2)或 α -2,3唾液酸转移酶(ST3GAL)的作用下与GalNAc或Gal连接形成糖链^[4]。若IgA1分子铰链区O-糖基化程度降低,缺乏半乳糖的GalNAc上直接连接唾液酸,此时形成的多聚糖无法被修饰则产生了Gd-IgA1^[5]。Gd-IgA1暴露的GalNAc与唾液酸结合或与唾液酸结合位点被相应的抗体所覆盖,不能被肝细胞识别,也不能通过肝内皮细胞窗孔,导致清除减少^[6]。IgG分子有其独特特征,使其适于识别Gd-IgA1分子,二者结合可形成循环免疫复合物^[7]。Gd-IgA1形成的免疫复合物沉积于肾小球系膜区,继而引起系膜细胞增生、活

化,释放大量的细胞因子及趋化因子,引起肾脏结构的损伤^[8-12]。因此通过恢复C1GALT1及其分子伴侣C1GALT1C1的表达,减少Gd-IgA1的生成,可以有效抑制IgA肾病的进展。

升降散方出自《万病回春·瘟疫门》,由僵蚕、蝉蜕、姜黄、大黄组成。国医大师薛伯寿认为,升降散中气分药为僵蚕、蝉蜕,可升阳中之清阳;血分药为姜黄、大黄,可降阴中之浊阴,一升一降,宣通三焦,调和气血,共收宣透解郁、泄热降火之效^[13]。前期研究证实升降散具有抗炎和抑制非特异性免疫、体液免疫及细胞免疫的作用^[14-16]。药理学研究表明,升降散是通过干预多种炎症因子及其信号传导通路实现对全身炎症反应综合征免疫失衡的调控平衡^[17]。目前对加味升降散治疗IgA肾病的机制尚未完全清楚,本次实验通过观察加味升降散对IgA肾病大鼠血清及肾组织中miRNA-148b、IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1、Gd-IgA1表达的影响探讨其可能作用机制,为临床运用加味升降散治疗IgA肾病提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 北京维通利华实验动物技术有限公司购进42只雄性SD大鼠,SPF级,7周龄,体质量(200 \pm 20)g,动物合格证编号110011200106395172,许可证号SCXK(京)2016-0006。饲养于河北中医学院实验动物中心标准化动物房(相对湿度50%~70%,温度23~25℃,昼夜各半),普通饲料(河南环宇禾康生物科技有限公司,批号202090812),自由饮水。本实验由河北中医学院伦理委员会批准,动物实验伦理编号DWLL2018046。

1.2 药物 加味升降散免煎颗粒(僵蚕 12 g、蝉蜕 12 g、桔梗 8 g、茯苓 10 g、姜黄 10 g、大黄 6 g、积雪草 10 g)以上药物由广东一方制药厂提供(批号分别为 9112903、9115203、0061423、0062763、0042053、0040293、0077393)。盐酸贝那普利片由深圳信立泰药业股份有限公司生产(国药准字 H20054771,批号 C200152,5 mg/片)。

1.3 试剂 牛血清白蛋白(BSA)、脂多糖(LPS)(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为 A8010、L8880),四氯化碳(CCl_4 ,天津傲然精细化工研究所,批号 2020-09-17),蓖麻油(天津市光复精细化工研究所,批号 2020-09-02),白细胞介素-6(IL-6)抗体、C1GALT1 抗体、C1GALT1C1 抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)内参(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-0782R、bs-9685R、bs-13801R、bs-0061R),山羊抗兔二抗(北京中杉金桥,批号 ZB2301),血肌酐(CCr)试剂盒、尿素氮(BUN)试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(美国 Beckman Coulter 公司,批号分别为 AUZ3562、AUZ3611、AUZ3689、AUZ3645),白蛋白(ALB)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号 A028-1-1),鼠 IL-6 试剂盒、Gd-IgA1 试剂盒(上海森雄科技事业有限公司,批号分别为 SXR032、SXR201),苏木素-伊红(HE)染液套装、马松(Masson)染液套装、碘酸六胺银(PASM)染液套装(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为 G1003、G1006、G1059),山羊抗大鼠 IgA(英国 Abcam 公司,货号 ab97184),DEPC(美国 Sigma 公司,货号 D5758),Eastep Super Total RNA Extraction Kit、GoScript Reverse Transcription System、GoTaq 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix(美国 Promega 公司,货号分别为 LS1040、A5001、A6002),Primers[生工生物工程(上海)股份有限公司,货号 260064816],MicroAmp Optical 8-Cap Strip、MicroAmp Fast Reaction Tubes(美国 Life technologies 公司,货号分别为 REF4323032、REF4358293),RNAiso for Small RNA kit、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit、Mir-X miRNA RT-qPCR TB Green Kit(日本 Takara 公司,货号分别为 9753A、638315、638314),RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,货号 P0013E),发光试剂盒(美国 Millipore 公司,货号 WBKLS0500),NC 膜(美国 Pall Corporation 公司,货号 T22740)。

1.4 仪器 Clinitek50 型尿液分析仪(美国拜耳公司),CFX96 型 Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),HEMIX-180 型全自动生化分析仪(日本 Sysmex 公司),SHA-B 型恒温振荡器(常州国华电器有限公司),DL-CJ-1N 型高性能无菌实验台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),YXQ-LS-50A 型高压灭菌器(上海博迅实业有限公司),2720 型基因扩增仪(美国 AB 公司),HM-200 型电子天平(日本三丰 Mitutoyo 公司),1-15K 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司),MDF-382E 型超低温保存箱(日本三洋公司),756MC 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),600 型电热恒温水箱(天津泰斯特公司),NW10VF 型超纯水机(上海力康 HealForce 公司),S25 型电动玻璃匀浆机(德国 IKA 公司),UV-254 型紫外透射仪(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司),DYY 型电泳槽及电泳仪(北京六一仪器厂),MK3 型酶联免疫检测仪(芬兰雷勃),8×12 型全自动洗板机(美国 Etl Listed 公司),600 型电热恒温水箱(天津泰斯特仪器有限公司),TDL-5-A 型离心机(上海安亭电子仪器厂),SHB-D 型循环水真空泵(郑州长城仪器有限公司),IX-70 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),HT7800 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司),Quantity One 分析软件(美国 Bio-Rad Technical Service Department)。

2 方法

2.1 动物分组、模型制备、给药与取样 将 SPF 级雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为正常组 8 只、造模组 34 只。于实验室饲养笼内适应性饲养 1 周,未见不良反应,在第 1 周末将大鼠放进代谢笼收集 24 h 尿液,检测 42 只大鼠尿蛋白、尿潜血均为阴性。参照陆慧瑜等^[18]造模方案 BSA+LPS+ CCl_4 +蓖麻油复合造模的方法,制备 IgA 肾病实验大鼠模型。具体操作为造模组大鼠采用联合 BSA 灌胃+尾静脉 LPS+皮下注射 CCl_4 、蓖麻油的免疫复合方法建立实验 IgA 肾病大鼠模型,方案为口服免疫原 BSA 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 隔天灌胃,持续 8 周;皮下注射蓖麻油 0.3 mL+ CCl_4 0.1 mL,每周 1 次,持续 9 周,并于第 6 周联合运用 LPS 0.05 mg 尾静脉注射。正常组予等量蒸馏水隔天灌胃,持续 8 周;皮下注射 0.9% 氯化钠溶液 0.4 mL,每周 1 次,持续 9 周;并于第 6 周尾静脉注射 0.9% 氯化钠溶液 0.2 mL。第 9 周末于代谢笼中留取大鼠 24 h 尿液,并检测 24 h 尿蛋白定量(24 h-UTP)。造模组大鼠出现肉眼血尿、蛋白尿,随机选取造模组大鼠 2 只,行光镜、电镜、免疫荧

光检测以确定造模是否成功。模型大鼠肾组织光镜下主要表现为中到重度系膜细胞和基质增生;电镜下出现不同程度足突融合及肾小球系膜细胞增生;免疫荧光可见肾小球系膜区有团块状或颗粒状绿色 IgA 荧光沉积,荧光强度为卅~卅卅, IgA 肾病大鼠模型制备成功。模型制备成功后,将造模组 32 只大鼠按照随机数字表法分成模型组、中药低剂量组、中药高剂量组、贝那普利组各 8 只。中药低剂量组、中药高剂量组予加味升降散灌胃,给药剂量按照徐叔云等^[19]《药理实验方法学》的剂量换算公式计算(按照人的体质量 70 kg 换算),中药低剂量组大鼠按照 $6.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量灌胃,中药高剂量组按照 $12.54 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,每日 1 次,共持续 4 周;贝那普利组按照 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌服盐酸贝那普利片,1 次/d,共持续 4 周;正常组和模型组均予相同体积蒸馏水灌胃,每日 1 次,共持续 4 周。实验大鼠每周检测体质量。于实验第 13 周末运用代谢笼分别留取每只大鼠的 24 h 尿液,留取尿液期间禁食不限水。于实验第 14 周,实验大鼠留完最后 1 次尿液标本后,所有实验大鼠取材前禁食 12 h,禁水 4 h,并进行称质量,3% 浓度的戊巴比妥钠按照 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量对大鼠进行腹腔注射麻醉,麻醉成功后,股动脉取血,离心机($2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,室温离心 10 min,离心半径 10 cm)分离上清用于生化指标检测;完成股动脉取血后,立即从肾门处游离出两侧肾脏并进行剥离,先切取部分右侧肾脏组织,放入冻存管中后快速放置于液氮罐内,后转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备检,再将剩余的右肾组织用 4% 的多聚甲醛液进行固定,用于 HE、Masson、PASM 病理染色及免疫组织化学法(IHC)检测;在冰袋上切取大小为 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的左肾皮质置于 4% 的戊二醛固定液中固定,用以进行透射电镜样本制备,将其放置于 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存;剩余的左侧肾脏皮质迅速制成冰冻切片,用于进行免疫荧光检测。

2.2 检测指标

2.2.1 肝、肾功能 应用尿液分析仪检测 24 h-UTP,应用全自动生化分析仪测定肝功能、肾功能指标。

2.2.2 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清 IL-6、Gd-IgA1 水平 各组大鼠血液上清采用 ELISA 法检测 IL-6、Gd-IgA1 水平,实验步骤按照试剂盒方法进行。

2.2.3 HE、Masson、PASM 染色及透射电镜观察大鼠肾组织病理学改变 肾组织于 4% 多聚甲醛固定 48 h 后石蜡包埋、切片($4 \mu\text{m}$),石蜡切片脱蜡至水,

分别进行 HE、Masson、PASM 染色处理,脱水封片,显微镜下观察肾组织病理学变化;肾脏组织于 2.5% 戊二醛固定后,磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗、固定、脱水、丙酮树脂包埋、切片,使用透射电子显微镜观察肾小球系膜区超微结构的改变。

2.2.4 免疫荧光观察肾小球系膜区 IgA 沉积 切片($3\sim 5 \mu\text{m}$)、PBS 洗涤、加入兔抗鼠 FITC 标记的 IgA 抗体溶液、PBS 冲洗、甘油封片、用荧光显微镜观察各组大鼠肾组织中 IgA 的沉积部位和强度,拍片,结果以亮绿色为阳性,采用国内外通用的免疫荧光强度 5 级法半定量标准。

2.2.5 IHC 检测大鼠肾组织 IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1 表达水平 肾组织进行常规脱蜡及水化、抗原修复、室温孵育、血清封闭、滴加 PBS 稀释好的 IL-6(1:100)、C1GALT1(1:100)、C1GALT1C1(1:100)孵育、加入生物素标记的二抗、室温孵育、自来水冲洗、苏木素复染、盐酸酒精分化、梯度酒精脱水、二甲苯透明,中性树脂封片;显微镜下仔细对比观察阳性表达,并选 5 个不重叠的视野,采图拍摄保存。

2.2.6 Real-time PCR 法检测大鼠肾组织 IL-6 mRNA、C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA、miRNA-148b 的表达 称取肾组织 20 mg 经液氮研磨,提取总 RNA,取总 RNA $2 \mu\text{g}$,先在含 Oligo dT Primer、Random Primers 的混合液中 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min 使模板 RNA 变性后,冰上迅速冷却。再加入反转录反应液(含 Reaction Buffer, MgCl_2 , PCR Nucleotide Mix, Ribonuclease Inhibitor, Reverse Transcriptase 等),并用 Nuclease-Free Water 补足到 $20 \mu\text{L}$ 反应液体积,缓慢混匀后短暂离心,于 PCR 仪 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 5 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 min, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 失活 15 min,冰上冷却。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。应用两步法反应程序, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,然后 44 个循环反应: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s。扩增完毕后,得到各样本各目的基因及内参基因的 C_t 值,目的基因 C_t 值-内参基因的 C_t 值 = $\Delta\Delta C_t$,按照公式 $Q = 2^{-\Delta\Delta C_t}$,得到 IL-6 mRNA、miRNA-148b、C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA 相对定量值(RQ 值),将 RQ 值用于统计分析,每个实验组重复 3 次。引物为自行设计,由生工上海总部合成部合成。见表 1。

2.2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1 蛋白表达 按照试剂盒说明提取大鼠肾脏组织蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,每管上清液中分别加入 $5 \times$ Loading Buffer $50 \mu\text{L}$,

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 GCAGGAGTACGATGAGTCCG	74
	下游 ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	
IL-6	上游 AGCGATGATGCACTGTCAGA	127
	下游 GGAAGTCCAGAAGACCAGAGC	
C1GALT1	上游 CTTGTCTGGAGCCGGTTGA	110
	下游 TTCAGCCAAGATTTAGAGGCCA	
C1GALT1C1	上游 TGAGAGGAAAGCGGCGTAAG	70
	下游 TGAAAGCATGTTCCGCATCT	
内参 U6	上游 CGCTTCGGCAGCACATATAC	
	下游 TTCACGAATTTGCGTGTCATC	
miRNA-148b	上游 TCAGTGCATCACAGAACTTTGT	

100 °C煮沸 15 min,以蛋白变性。按照十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳说明书进行电泳,PVDF转膜 90 min。在封闭液中室温静止 12 h,加入稀释好的一抗 IL-6(1:800),C1GALT1(1:800),C1GALT1C1(1:800), β -actin(1:5000),室温摇动 1~3 h,Tween-PBS洗 3 遍一抗,每次 10 min,加入二抗(1:6500),在室温条件下摇动 1~2 h,Tween-PBS洗 3 遍二抗,每次 10 min,显色、洗膜、读片。使用 Quantity One 软件进行分析,测定各条带的吸光度 A,将待测蛋白质表达量与内参照 β -actin 表达量进行对比,用以表示蛋白质的相对表达水平,每个实验组重复 3 次。

2.3 统计学方法 相关数据统计采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析,计量资料符合正态分布且方差齐,用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较应用单因素方差分析,组间两两比较用 *t* 检验法,方差不齐应用秩和检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般情况的影响 正常组大鼠毛色光亮,精神、摄食、饮水均正常,体质量逐渐增加、大小便正常。造模组大鼠在造模阶段出现毛色光泽度降低,杂乱,精神不振,进食减少,体质量增加缓慢,而药物干预治疗后,中药低、高剂量组、贝那普利组大鼠上述症状有所恢复。中药高剂量组大鼠大便量明显增加,大便成形。

3.2 对大鼠 24 h-UTP 的影响 实验第 1 周末,各组实验大鼠尿蛋白均为阴性,各组间差异无统计学意义。实验第 9 周末,与正常组比较,造模组实验大鼠 24 h-UTP 明显增高,差异具有统计学意义

($P<0.05$)。第 13 周末,与模型组比较,中药低、高剂量组、贝那普利组实验大鼠 24 h-UTP 明显降低,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);而中药低、高剂量组、贝那普利组实验大鼠间 24 h-UTP 组间比较差异无统计学意义,中药组随剂量增加,24 h-UTP 有下降趋势。见表 2。

表2 加味升降散对大鼠 24 h-UTP 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of modified Shengjiangsan on 24 hours urinary total protein in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	9周末	13周末
正常组		0.907 2±0.537 6	0.856 1±0.453 9
模型组		3.426 2±0.390 9 ¹⁾	3.924 0±0.435 5 ²⁾
中药低剂量组	6.27	3.439 6±0.361 8	2.771 4±0.375 3 ³⁾
中药高剂量组	12.54	3.437 6±0.315 5	2.530 4±0.387 9 ⁴⁾
贝那普利组	0.01	3.411 8±0.377 6	2.571 6±0.439 6 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表 3-表 6 同)

3.3 对大鼠肝肾功能血清指标的影响 正常组、模型组、中药低、高剂量组、贝那普利组实验大鼠血清中 BUN、AST 的含量差异无统计学意义。与正常组比较,模型组实验大鼠血清中 ALB 含量降低,ALT、SCr 的含量升高,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,中药低、高剂量组、贝那普利组实验大鼠血清中 SCr 的含量降低($P<0.05, P<0.01$);中药高剂量组、贝那普利组大鼠血清中 ALB 的含量升高($P<0.05$);中药高剂量组大鼠血清中 ALT 的含量降低($P<0.05$)。中药低、高剂量组、贝那普利组大鼠各组间血清中 ALB、ALT、SCr 的含量差异无统计学意义;中药组随剂量增加,效果有增强趋势。见表 3。

3.4 对大鼠血清 IL-6、Gd-IgA1 的影响 研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠血清中 IL-6、Gd-IgA1 含量均明显升高($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,中药低、高剂量组、贝那普利组大鼠血清中 IL-6 含量显著下降($P<0.01$);中药高剂量组、贝那普利组大鼠血清中 Gd-IgA1 含量明显下降($P<0.05, P<0.01$);中药低、高剂量组、贝那普利组大鼠各组间血清中 IL-6、Gd-IgA1 差异无统计学意义;中药组随剂量增加,血清中 IL-6、Gd-IgA1 含量有下降趋势。见表 4。

3.5 对大鼠肾组织病理形态的影响 HE 染色显示,与正常比较,模型组大鼠肾小球呈代偿扩张和萎缩病变,系膜细胞和内皮细胞呈中-重度增生,系膜基质弥漫性增宽增厚,肾小管间质炎性细胞浸

表3 加味升降散对大鼠血清ALT、AST、ALB、SCr和BUN的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of modified Shengjiangsans on ALT, AST, ALB, SCr and BUN in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

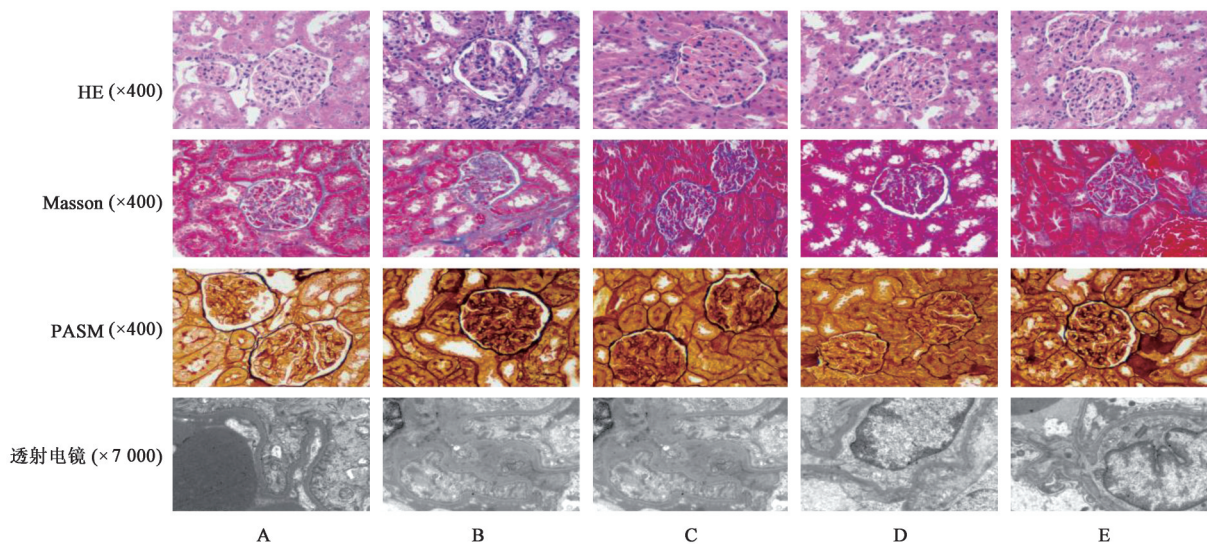
组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	SCr/mmol·L ⁻¹	BUN/μmol·L ⁻¹
正常组		28.70±3.15	70.17±6.87	19.03±1.26	87.87±8.05	4.08±0.73
模型组		46.07±6.93 ²⁾	76.21±9.89	17.19±1.14 ¹⁾	129.50±16.07 ²⁾	4.35±0.56
中药低剂量组	6.27	41.33±10.09	75.81±10.48	18.43±1.42	110.15±14.09 ³⁾	4.28±0.62
中药高剂量组	12.54	36.46±7.10 ³⁾	67.47±12.17	18.71±1.59 ³⁾	100.52±16.78 ⁴⁾	3.89±0.56
贝那普利组	0.01	38.41±13.14	85.07±20.69	18.74±0.97 ³⁾	95.29±15.41 ⁴⁾	4.06±0.74

表4 加味升降散对大鼠间血清IL-6、Gd-IgA1的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of modified Shengjiangsans on IL-6 and Gd-IgA1 in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	Gd-IgA1/kU·mL ⁻¹
正常组		15.40±1.73	0.957±0.099
模型组		22.33±3.09 ²⁾	1.265±0.204 ¹⁾
中药低剂量组	6.27	18.44±2.07 ⁴⁾	1.218±0.249
中药高剂量组	12.54	18.17±2.99 ⁴⁾	1.024±0.210 ³⁾
贝那普利组	0.01	17.16±1.98 ⁴⁾	0.817±0.303 ⁴⁾

润,毛细血管祥阻塞;Masson染色显示,与正常组比较,模型组间质纤维化明显增多;PASM染色显示,与正常组比较,模型组基底膜明显增厚;透射电镜下观察肾小球系膜区超微结构,与正常组比较,模型组大鼠系膜细胞增生,基质增多,足细胞可见足突节段性融合、绒毛变性;中药低、高剂量组、贝那普利组大鼠光镜和电镜下肾组织病理改变与模型组相似,但较模型组病理损伤减轻。中药高剂量组肾组织病理改变轻于中药低剂量组。见图1。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 中药剂量组;D. 中药高剂量组;E. 贝那普利组(图2-图4同)

图1 加味升降散对IgA肾病大鼠肾组织病理形态的影响

Fig. 1 Effect of modified Shengjiangsans on renal morphology in IgA nephropathy rats

3.6 对大鼠肾脏IgA免疫荧光的影响 正常组实验大鼠无免疫复合物沉积于肾小球系膜区,荧光强度为(-);模型组实验大鼠有颗粒状免疫复合物沉积于肾小球系膜区,荧光强度为(+++);中药低、高剂量组、贝那普利组实验大鼠有不同程度的免疫复合物沉积于肾小球系膜区,但沉积量及强度较模型组少,荧光强度为(+~++);中药高剂量组免疫复合物沉积量少于中药低剂量组。见图2。

3.7 对IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1免疫组化结果的影响 与正常组比较,模型组大鼠IL-6在系膜

区、足细胞表达增强(++),C1GALT1、C1GALT1C1在系膜区、足细胞表达减弱。与模型组比较,中药低剂量组、中药高剂量组、贝那普利组IL-6在系膜区、足细胞表达减弱(+),C1GALT1、C1GALT1C1在系膜区、足细胞表达增强;中药低剂量组、中药高剂量组、贝那普利组大鼠各組间比较,IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1在系膜区、在足细胞表达强度差异无统计学意义。见图3。

3.8 对IL-6 mRNA、miRNA-148b、C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA表达的影响 与正常

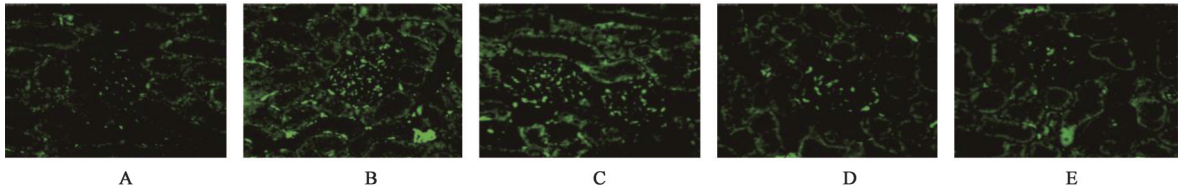


图2 加味升降散对大鼠肾脏IgA免疫荧光的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 2 Effect of modified Shengjiangsans on rat kidney IgA immunofluorescence (immunofluorescence, ×400)

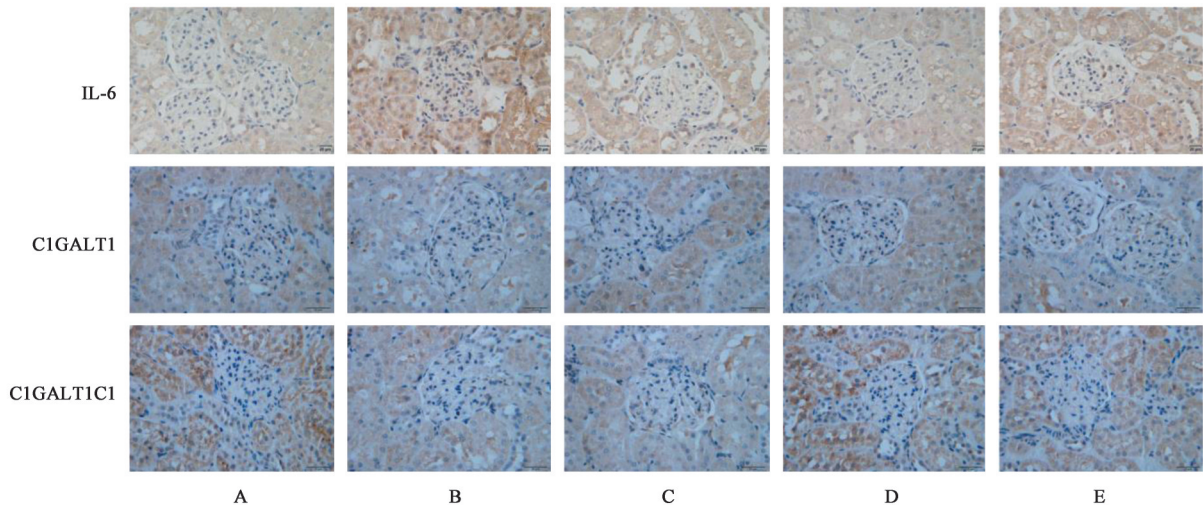


图3 加味升降散对IL-6、C1GALT1C1、GALT1C1在各组大鼠肾组织表达的影响(IHC,×400)

Fig. 3 Effect of modified Shengjiangsans on expression of IL-6, C1GALT1C1, GALT1C1 in renal tissue of rats (IHC, ×400)

组比较,模型组大鼠IL-6 mRNA、miRNA-148b表达显著增强($P<0.01$),C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA表达显著减弱($P<0.01$)。与模型组比较,中药高剂量组、贝那普利组大鼠IL-6 mRNA、miRNA-148b表达下降($P<0.01$),C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA表达升高($P<0.01$);中药高剂

量组、贝那普利组大鼠IL-6 mRNA、miRNA-148b、C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA表达水平差异无统计学意义;中药组随剂量增加,IL-6 mRNA、miRNA-148b表达水平有下降趋势,C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA表达水平有升高趋势。见表5。

表5 加味升降散对各组大鼠肾组织中IL-6、miRNA-148b、C1GALT1和C1GALT1C1 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of modified Shengjiangsans on expression of IL-6, miRNA-148b, C1GALT1 and C1GALT1C1 mRNA in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	miRNA-148b	C1GALT1	C1GALT1C1
正常组		0.879±0.141	0.742±0.092	1.246±0.578	1.355±0.986
模型组		1.309±0.343 ²⁾	1.391±0.275 ²⁾	0.713±0.598 ²⁾	0.727±0.364 ²⁾
中药低剂量组	6.27	1.095±0.195	1.130±0.066 ³⁾	0.928±0.364 ³⁾	0.910±0.116 ³⁾
中药高剂量组	12.54	0.937±0.117 ⁴⁾	0.863±0.079 ⁴⁾	1.097±0.130 ⁴⁾	1.025±0.732 ⁴⁾
贝那普利组	0.01	0.906±0.165 ⁴⁾	0.872±0.272 ⁴⁾	1.091±0.155 ⁴⁾	1.239±0.544 ⁴⁾

3.9 对IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠IL-6蛋白表达显著上调,C1GALT1、C1GALT1C1蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,中药低、高剂量组、贝那普利组大鼠IL-6蛋白表达减少,C1GALT1、C1GALT1C1蛋白表达增加,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);中药低、高剂量组、贝那普利组大鼠

各组间比较,IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1蛋白表达水平无统计学意义;中药组随剂量增加,IL-6蛋白表达水平有下降趋势,C1GALT1、C1GALT1C1蛋白表达水平有升高趋势。见图4,表6。

4 讨论

IgA肾病在世界范围内是最常见的原发性肾小球肾炎,25%~50%的患者会发展终末期肾病

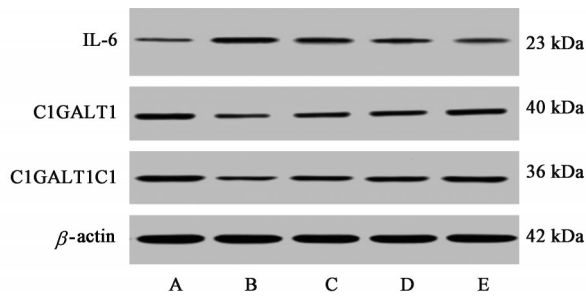


图4 各组大鼠肾组织 IL-6、C1GALT1、C1GALT1C1 蛋白电泳
Fig. 4 Electrophoresis of IL-6, C1GALT1, C1GALT1C1 protein in each group

(ESRD)^[20]。IgA 肾病进展的危险因素主要有肾小球硬化^[21]、肾间质纤维化、高血压、大量蛋白尿和肾功能减退^[22]。目前,西医多以血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂控制血压、减少尿蛋白,应用糖皮质激素、免疫抑制剂等治疗为主^[23-25],由于 IgA 肾病确切的发病机制尚不清楚,因此也缺乏特异性治疗^[26]。传统中医虽对 IgA 肾病没有明确的记载,但现代中医学研究根据 IgA 肾病的临床表现将其归于“水肿”“血尿”“尿浊”“肾风”“虚劳”等疾病范畴,中医以其独特的理论作指导来辨证论治本病。

根据陈香美等^[27]做的大样本 IgA 肾病患者中医证候的流行病学调查显示 IgA 肾病患者主要以“湿热”“血瘀”2种证候为主(31.6%、28.9%)。课题组前期临床观察也证实湿热为本病的重要病因^[28-29],而“血瘀”贯穿于 IgA 肾病的发生、发展整个过程中。加味升降散由僵蚕、蝉蜕、桔梗、茯苓、姜黄、大黄、积雪草组成。其中僵蚕辛苦咸平,清热解郁,散风除湿,化痰散结,既能宣郁,又能透风湿于火热之外。蝉蜕辛咸凉,宣肺开窍以清郁热。姜黄辛苦温,行气散结,破瘀逐血,消肿止痛。大黄苦寒,泻下攻积,清热泻火,凉血解毒,逐瘀通经。桔梗味苦、辛,性微温,入肺经,能祛痰止咳,并有宣肺、排脓作用,可载诸药上行直达病所,引邪外透。茯苓性味甘淡平,入心、肺、脾经,具有渗湿利水,健脾和

胃,宁心安神的功效。积雪草性寒,味苦、辛,归肝经、脾经、肾经,可清湿热、解毒消肿、活血利尿。方中大黄、积雪草荡积行瘀、清邪热,清利下焦湿热为君药,僵蚕、蝉蜕祛风解痉、散风热、宣肺气清利上焦湿热,茯苓健脾渗湿以清利中焦湿热共为臣药;佐以姜黄活血化瘀;桔梗为使药,载药上行,清宣上焦湿热;诸药合用升清降浊,寒温并用,可使阳升阴降,内外通达,气血调畅,三焦湿热之邪得清,瘀血得除。现代药理研究发现,蝉蜕提取物可抑制非特异性免疫;僵蚕有抑菌等作用;桔梗总皂苷及桔梗皂苷 D 能够有效调节磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路及其介导的核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路抑制炎症反应和细胞凋亡;茯苓多糖能明显改善 db/db 小鼠肾脏损伤;姜黄素类似物 J7 可能通过抑制氧化应激、抗细胞凋亡、抑制转化生长因子- β (TGF- β)/Smad 通路及纤维化作用实现对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠肾脏的保护;大黄酚能够改善 LPS 诱导的小鼠炎症模型中的炎症反应;复方积雪草对 IgA 肾病大鼠有肾保护作用^[30-36]。本实验中,模型组大鼠尿蛋白升高,肾小球呈代偿扩张和萎缩病变,系膜细胞和内皮细胞呈中-重度增生,系膜基质弥漫性增宽增厚,肾小管间质炎性细胞浸润,毛细血管祥阻塞,间质纤维化明显增多,基底膜明显增厚,系膜细胞增生,基质增多,足细胞可见足突节段性融合、绒毛变性;经加味升降散干预后,蛋白尿、肝肾功能及肾组织病理明显改善,提示加味升降散对 IgA 肾病大鼠具有降低蛋白尿,改善肝肾功能及减轻肾脏病理变化进而延缓疾病进展的作用,并且随剂量增加效果增强。

IgA 肾病发病机制复杂,涉及免疫、遗传、环境或营养等多种因素。而最广为接受的就是“四重打击”学说:①循环中糖基化异常 IgA1 的合成增加;②产生抗 Gd-IgA1 的自身抗体;③形成含有致病性 O-半乳糖化 IgA1 的免疫复合物;④这些免疫复合物在肾小球中沉积,激活肾小球细胞,进而损害肾小

表6 加味升降散对 IL-6、C1GALT1 和 C1GALT1C1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of modified Shengjiangsan on expression of protein of IL-6, C1GALT1 and C1GALT1C1 in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6/ β -actin	C1GALT1/ β -actin	C1GALT1C1/ β -actin
正常组		0.218±0.045	0.635±0.516	0.669±0.089
模型组		0.580±0.091 ²⁾	0.312±0.046 ²⁾	0.237±0.011 ²⁾
中药低剂量组	6.27	0.455±0.074 ³⁾	0.548±0.057 ³⁾	0.449±0.060 ³⁾
中药高剂量组	12.54	0.371±0.070 ⁴⁾	0.567±0.049 ³⁾	0.598±0.081 ³⁾
贝那普利组	0.01	0.281±0.047 ⁴⁾	0.589±0.045 ³⁾	0.601±0.069 ³⁾

球^[2]。现代研究证实,IgA肾病患者血清中IgA1分子铰链区O聚糖存在半乳糖缺失,这种异常糖基化的IgA1(Gd-IgA1)与IgA肾病的发生相关^[37]。ROBERT等^[38]得出结论如果可以使糖基化的酶受到影响,就可以使IgA1糖基化受到影响,即可以使C1GALT1活性降低或者(并且)使ST6GALNAC2活性增强就可以出现IgA1异常糖基化。在IgA肾病患者的血清中IL-6含量升高,可以降低C1GALT1和Cosmc的表达,从而对IgA1的糖基化产生影响^[39]。IL-6是一种多功能的炎性细胞因子,是炎症介质网络的关键成分,在炎症反应中极其重要作用,参与细胞介导的免疫反应,并导致发生炎症的局部及全身的IL-6水平升高。除此之外,IL-6还可以使ST6GALNAC2的表达增加^[40]。SERINO等^[41]观察到IgA肾病患者C1GALT1表达与miRNA-148b表达呈负相关,miRNA-148b的上调可能靶向C1GALT1;此外miRNA-148b的上调与Gd-IgA1的水平直接相关。本实验中,模型组大鼠血清中IL-6、Gd-IgA1含量水平明显升高;免疫组化结果显示IL-6在模型组大鼠系膜区、足细胞高表达,C1GALT1、C1GALT1C1在模型组大鼠系膜区、足细胞表达减弱;在模型组大鼠肾组织中IL-6 mRNA、miRNA-148b表达增强,C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA表达减弱;在模型组大鼠肾组织中IL-6蛋白表达明显上调,C1GALT1、C1GALT1C1蛋白表达明显降低;加味升降散干预后血清中IL-6、Gd-IgA1含量水平降低,IL-6在系膜区、足细胞表达降低,C1GALT1、C1GALT1C1在系膜区、足细胞表达增强;大鼠肾组织中IL-6 mRNA、miRNA-148b表达减弱,C1GALT1 mRNA、C1GALT1C1 mRNA表达增强;IL-6蛋白表达明显降低,C1GALT1、C1GALT1C1蛋白表达明显升高;且中药组表现出明显的剂量趋势。提示加味升降散可能通过降低miRNA-148b、IL-6表达使C1GALT1、C1GALT1C1的表达恢复进而减少Gd-IgA1的生成,从而达到延缓疾病进展的作用,并且随剂量增加效果增强。

综上所述,加味升降散可能通过降低IgA肾病大鼠血清及肾组织中miRNA-148b、IL-6表达,恢复C1GALT1、C1GALT1C1表达,减少Gd-IgA1的生成,从而减轻肾脏病理损害,减少蛋白尿,发挥保护肾脏的作用,达到延缓疾病进展的目的,并且随剂量增加效果增强。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 侯婉音,蔡青青,师素芳,等. IgA肾病的血管病变[J]. 中华肾脏病杂志, 2019, 35(7):553-557.
- [2] SUZUKI H, KIRYLUK K, NOVAK J, et al. The pathophysiology of IgA nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(10):1795-803.
- [3] GLASSOCK R J. The pathogenesis of IgA nephropathy [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2011, 20(2): 153-160.
- [4] TOMANA M, MATOUSOVIC K, JULIAN B A, et al. Galactose deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG [J]. Kidney Int, 1997, 52:509-516.
- [5] ZHAO N, HOU P, LV J, et al. The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression [J]. Kidney Int, 2012, 82(7):790-796.
- [6] TSANG M, WEATHERBEE J. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA₁ with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies [J]. J Clin Invest, 1999, 104(1):73-78.
- [7] SUZUKI H, FAN R, ZHANG Z, et al. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1668-1677.
- [8] HADDAD E, MOURA I C, ARCOSFAJARDO M, et al. Enhanced expression of the CD71 mesangial IgA1 receptor in Berger disease and Henoch Schonlein nephritis: Association between CD71 expression and IgA deposits [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(2): 327-337.
- [9] LAI K N, TANG S C, GUH J Y, et al. Polymeric IgA1 from patients with IgA nephropathy upregulates transforming growth factor-beta synthesis and signal transduction in human mesangial cells via the renin-angiotensin system [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(12):3127-3137.
- [10] NOVAK J, TOMANA M, BROWN R, et al. IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells [J]. Kidney Int, 2005, 67(2):504-513.
- [11] LAI K N, LEUNG J C K, CHAN L Y Y, et al. Activation of podocytes by mesangial derived TNF- α : glomerulo podocytic communication in IgA nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(4):F945-F955.
- [12] WANG C, LIU X, YE Z, et al. Mesangial medium

- with IgA1 from IgA nephropathy inhibits nephrin expression in mouse podocytes[J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39(7):561-567.
- [13] 李冬华, 薛燕星. 国医大师薛伯寿运用升降散经验[J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(1):130-132.
- [14] 贺红安, 王晓, 陈雅桐, 宋哲, 张葆青. 基于网络药理学和分子对接探讨升降散治疗儿童慢性扁桃腺炎的作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(4):877-884.
- [15] 马世平, 瞿融, 燕茹, 等. 升降散对免疫功能及 I、IV 型变态反应的影响[J]. *中成药*, 1998, 20(6):29.
- [16] 朱亮, 奚耀, 赵雷, 等. 升降散对 ICU 脓毒症患者炎症细胞因子的干预作用[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2018, 25(4):351-354.
- [17] 周刚, 张朝晖, 龚勋, 等. 升降散治疗重症患者全身炎症反应综合征临床研究[J]. *中国中医急症*, 2012, 21(4):537, 569.
- [18] 陆慧瑜, 张巧玲, 蒋小云, 等. IgA 肾病大鼠模型的建立[J]. *中国误诊学杂志*, 2011, 11(6):1264-1267.
- [19] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 《药理实验方法学》第二版出版发行[J]. *中国药理学通报*, 1992(1):19.
- [20] LI L S, LIU Z H. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in China: Analysis based on 13 519 renal biopsies[J]. *Kidney Int*, 2004, 66(3):920-923.
- [21] 陈振杰, 李超, 李航, 等. 局灶节段性肾小球硬化形成机制及其在 IgA 肾病中的作用[J]. *中国医学科学院学报*, 2018, 40(4):549-555.
- [22] 徐钢. 肾脏病诊疗指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2013:6.
- [23] 于小勇. IgA 肾病预后与治疗[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2019, 20(2):169.
- [24] 杨宏宇, 吕继成. IgA 肾病的治疗进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2020, 40(7):551-554.
- [25] 谢院生. 对 IgA 肾病治疗的新认识[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2020, 9(3):144.
- [26] 刘键, 段姝伟, 陈香美. IgA 肾病预后评估方法研究进展[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2017, 6(5):233-238.
- [27] 陈香美, 谢院生. 重视延缓 IgA 肾病进展的基础和临床研究[J]. *中华肾脏病杂志*, 2004, 20(4):235-237.
- [28] 石蒙, 张倩, 边东, 等. 从湿热论治难治性肾病综合征[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(10):929-931.
- [29] 郭登洲, 边东, 王月华, 等. 肾炎宁治疗非肾病综合征 IgA 肾病的疗效观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(8):841-844.
- [30] 李俊义. 蝉蜕的临床应用和药理作用[J]. *内蒙古中医药*, 2011, 30(12):89.
- [31] 陈文文, 胡美变, 彭伟, 等. 僵蚕中有效成分白僵菌素的研究进展[J]. *中国药房*, 2019, 30(24):3452-3456.
- [32] 冷晶. 基于 NF- κ B 和 PI3K/Akt 信号通路阐释桔梗皂苷对顺铂致肾毒性的保护作用[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [33] 李佳丹, 周迪夷. 茯苓多糖对 db/db 小鼠肾脏保护作用及其对 p38 MAPK/PPAR- γ 信号通路的影响[J]. *中国中医药科技*, 2019, 26(3):346-350.
- [34] 姬秀焕, 章琼莹, 池琛, 等. 姜黄素类似物 J7 对 2 型糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. *浙江医学*, 2019, 41(13):1342-1347, 1457.
- [35] 朱培, 闫东梅, 郑伟. 大黄酚通过抑制巨噬细胞的 TNF- α 从而改善 LPS 诱导的小鼠炎症反应[J]. *中国实验诊断学*, 2021, 25(1):98-101.
- [36] 包自阳, 朱彩凤, 孙玥, 等. 复方积雪草对 IgA 肾病大鼠肿瘤坏死因子- α 及巨噬细胞移动抑制因子表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8):3731-3735.
- [37] ZHAO N, HOU P, LV J, et al. The level of galactose deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression [J]. *Kidney Inter*, 2012, 82(7):790.
- [38] ROBERT T, BERTHELOT L, CAMBIER A, et al. Molecular insights into the pathogenesis of IgA nephropathy [J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(12):762-775.
- [39] NOVAK J, RASKOVA K L, SUZUKI H, et al. IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured human mesangial cells [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(11):3451-3457.
- [40] SUZUKI H, RASKA M, YAMADA K, et al. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc- II enzymes [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289:5330-5339.
- [41] SERINO G, SALLUSTIO F, COX S N, et al. Abnormal miRNA-148b expression promotes aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(5):814-824.

[责任编辑 王鑫]