

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.24.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 24-0001-05

基础研究 · 论著

IgA 肾病大鼠尿维生素 D 结合蛋白 与肾脏纤维化关系的研究 *

何国华¹, 容丽萍², 姜梦婕², 蒋小云²

(1. 广东省佛山市妇幼保健院 儿科, 广东 佛山 528000;
2. 中山大学附属第一医院 儿科, 广东 广州 510089)

摘要: **目的** 测定 IgA 肾病大鼠尿维生素 D 结合蛋白 (VDBP) 及肾组织胶原纤维的含量, 探讨尿 VDBP 与 IgA 肾病肾脏纤维化的关系。 **方法** 选取 20 只 SD 大鼠随机分为对照组和模型组。模型组复制 IgA 肾病模型, 以正常 SD 大鼠为对照组。在实验第 10 周末, 应用全自动生化分析仪测定各组大鼠尿红细胞、24 h 尿蛋白、肝肾功能指标, 酶联免疫吸附法测定 24 h 尿 VDBP, 半定量分析法计算胶原纤维所占肾组织面积百分比, 以观察肾脏纤维化程度, 检测肾组织中转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 蛋白表达水平, 分析该指标之间的关系。 **结果** 模型组大鼠 24 h 尿蛋白 (23.44 ± 2.72) mg/24 h、尿 VDBP (0.65 ± 0.27) μ g/24 h、肾纤维化程度 (13.80 ± 6.18) %、TGF- β_1 蛋白表达水平 (1.03 ± 0.14) 均高于对照组大鼠的尿蛋白 (5.44 ± 1.50) mg/24 h、尿 VDBP (0.19 ± 0.09) μ g/24 h、肾纤维化 (1.23 ± 1.07) %、TGF- β_1 蛋白表达水平 (0.61 ± 0.14), 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。所有实验动物 24 h 尿 VDBP 定量与肾组织纤维化程度、TGF- β_1 蛋白表达水平、尿蛋白呈正相关 ($r = 0.859, 0.908$ 和 0.567)。 **结论** 24 h 尿 VDBP 可作为监测 IgA 肾病大鼠肾纤维化的一个无创生物学指标。

关键词: 维生素 D 结合蛋白; IgA 肾病; 纤维化; 尿蛋白

中图分类号: R692.3

文献标识码: A

Association between urinary vitamin D binding protein and renal fibrosis in rat model of IgA nephropathy*

Guo-hua He¹, Li-ping Rong², Meng-jie Jiang², Xiao-yun Jiang²

(1. Department of Pediatrics, Foshan Women and Children Hospital, Foshan, 528000, China;
2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou, 510089, China)

Abstract: Objective To investigate association between urinary vitamin D binding protein (VDBP) and renal fibrosis in rat model of IgA nephropathy (IgA) rats. **Methods** A total of 20 Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group and IgA group. Rats in IgA group were received with bovine serum albumin (BSA), lipopolysaccharide (LPS) and carbon tetrachloride (CCl₄). Control group received nothing. At the end of the 10th week, levels of 24-hour urinary protein, 24-hour urinary VDBP, renal function profiles, renal histopathology and TGF- β_1 expression in renal tissue were measured. The relationship between these indexes were analyzed. **Results** In IgA group, Rats experienced significantly increased levels of 24 hour urinary protein, 24 hour urinary VDBP, renal fibrosis and TGF- β_1 in IgAN group when compared with control group [(23.44 ± 2.72) vs (5.44 ± 1.50) mg, (0.65 ± 0.27) vs (0.19 ± 0.09) μ g/24 h, (13.80 ± 6.18) % vs (1.23 ± 1.07) %, (1.03 ± 0.14) vs (0.61 ± 0.14), $P < 0.05$,

收稿日期: 2018-03-30

* 基金项目: 佛山市卫生和计划生育局医学科研课题 (No: 20160050); 广东省科技计划项目 (No: 2014A020212140)

[通信作者] 蒋小云, E-mail: xyjiang-3208@163.com; 020-87755766-8821

respectively]. The 24-hour urinary VDBP was positively related to 24-hour urinary protein, renal fibrosis and TGF- β_1 expression ($r = 0.859, 0.908$ and $0.567, P < 0.05$). **Conclusion** VDBP is potentially a biomarker of renal fibrosis in IgA rats.

Keywords: vitamin D binding protein; IgA nephropathy; renal fibrosis; urinary protein

IgA 肾病是全球最常见的原发性肾小球疾病之一^[1]。在成人患者, 每 10 年约有 20% 的患者进展至终末期肾病 (end stage renal disease, ESRD)^[2]。IgA 肾病进展至 ESRD 的危险因素包括蛋白尿、高血压、肾功能不全、新月体形成、肾小球系膜细胞重度增生、肾小球硬化、肾小管纤维化等^[1]。对 IgA 肾病小管间质纤维化, 目前缺乏早期的、有效的、无创的指标。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) /Smads 信号通路是包括肾脏在内的多种组织纤维化的最主要通路之一, 在 IgA 肾病患者肾组织中, TGF- β_1 表达与肾小管损伤及间质纤维化程度呈正相关^[3]。

维生素 D 结合蛋白 (vitamin D binding protein, VDBP) 分子量为 5.8 kD, 是血浆中维生素 D 及其代谢产物的主要转运蛋白^[4]。VDBP 在肝脏合成, 在肾小球被滤过, 在近曲小管由受体介导重吸收^[5]。当肾小管受损伤时, VDBP 重吸收功能降低, 在庆大霉素造成的肾炎大鼠模型中的研究发现, 尿 VDBP 能够作为肾小管间质损伤的一个生物学标记, 并且独立于蛋白尿的存在^[6], 该发现提示尿 VDBP 可以作为一个无创性的尿液标志, 用于监测小管间质纤维化。

本研究运用改良的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) + 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) + 四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 方法复制实验性 IgA 肾病大鼠模型^[3], 研究尿 VDBP 在 IgA 肾病肾小管间质纤维化中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型的复制及分组

健康清洁级 5 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠采购自广东省医学实验动物中心, 共 20 只, 体重 120 ~ 140 g, 随机分为对照组, 模型组, 每组 10 只。其中模型组运用改良的 BSA+LPS+CCl₄ 方法复制实验性 IgA 肾病大鼠模型^[3]。具体方案: 将免疫原 BSA 以蒸馏水配成 10% 浓度, 隔天灌胃 400 mg/kg, 持续 8 周; 皮下注射蓖麻油 0.3 ml+CCl₄ 0.1 ml, 每周 1 次, 持续 9 周; LPS 以生理盐水配成 0.025% 浓度, 于实验第 6

周尾静脉注射 0.05 mg。同时对对照组大鼠给予蒸馏水灌胃, 生理盐水皮下注射及尾静脉注射。所有大鼠在实验期间均予标准饮食。在实验第 10 周末收集尿标本后处死大鼠收集血标本、肾组织标本进行下述测量。

1.2 尿蛋白、尿红细胞及尿 VDBP 的测量

在实验第 10 周末使用代谢笼留取大鼠 24 h 尿, 进行尿红细胞镜检, 并分别记录尿量, 测定 24 h 尿蛋白。通过酶联免疫吸附法 (维生素 D 结合蛋白 ELISA 试剂盒, 美国 Alpcos 公司) 测定尿 VDBP 含量。

1.3 血生化检测

在实验第 10 周末, 处死大鼠, 予 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉, 心脏取血, 用全自动生化分析仪测定血中生化指标, 包括: 尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (Alb)。

1.4 肾脏病理检查

大鼠处死后取约 0.2 cm 厚度矢状面切片, 置于 10% 甲醛固定, 48 h 内行石蜡包埋, 用于光镜检查及免疫荧光 IgA 检查。IgA 免疫荧光强度判定, 根据目前国内外通用标准, 参照 5 级半定量法分为 - ~ ++++ 5 个等级。① -: 低倍镜下不能显示, 高倍镜下似乎可见; ② +: 低倍镜下似乎可见, 高倍镜下可见; ③ ++: 低倍镜下可见, 高倍镜下清晰可见; ④ +++: 低倍镜下清晰可见, 高倍镜下耀眼; ⑤ ++++: 高倍镜下刺眼。使用 Masson 三色染色评估肾脏组织纤维化程度^[7], 胶原纤维呈蓝色, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析, 以胶原纤维在肾组织含量的百分比表示肾脏组织的纤维化程度。

1.5 TGF- β_1 蛋白表达的检测

采用 Western blot 法检测。将样品组织研成粉末, 加入裂解液提取总蛋白, BCA 法测定计算蛋白质浓度。取相同质量的蛋白质变性, 上样, SDS-PAGE 电泳、转膜。封闭液封闭 120 min, 后置于一抗孵育, 反应时间 90 min, 洗膜, 二抗孵育 60 min, 洗膜, 用化学发光置于暗夹内曝光、依次显影、定影。将胶片进行扫描, 应用 Quantity One 图像分析软件对凝胶图像条带进行分析, 计算目标条带的净光密度值。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验, 相关性分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾脏病理结果

对照组大鼠肾小球无明显 IgA 沉积, 荧光强度 - ~ ± (见图 1A、B), 模型组肾小球系膜区均可见团块状或颗粒状绿色 IgA 荧光, 荧光强度 ++ ~ +++ (见图 1C、D), 提示 IgA 肾病大鼠模型复制成功。

2.2 血生化检测结果

两组 BUN、Scr、TP、ALB 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 各组 24 h 尿蛋白、尿红细胞、尿 VDBP 的变化

模型组 24 h 尿蛋白、尿红细胞、24 h 尿 VDBP 高于对照组, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。见表 2。

2.4 各组肾纤维化及 TGF-β₁ 蛋白表达水平的变化

在 Masson 染色病理改变上, 对照组肾小球、肾小管及间质组织病理形态无异常, 系膜区基质及细胞未见增加, 肾小管、肾间质、血管无明显病变, 肾组织鲜有蓝色胶原纤维着色区域 (见图 2A)。模型组 Masson 染色见系膜区中到重度不同程度细胞及基质增生, 部分肾小球基底膜、系膜区见蓝色线条状区域, 在肾间质小管处可见斑块条状蓝色区域散在分布, 血管胶原纤维也呈蓝色着色 (见图 2B)。

模型组胶原纤维含量 [(13.80 ± 6.18) %] 高于对照组 [(1.23 ± 1.07) %] 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

模型组肾组织 TGF-β₁ 蛋白表达水平 (1.03 ± 0.14), 高于对照组 (0.61 ± 0.14), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 相关性分析

所有大鼠 24 h 尿 VDBP 与尿蛋白呈正相关 ($r = 0.859, P = 0.000$), 与肾纤维化呈正相关 ($r = 0.908, P =$

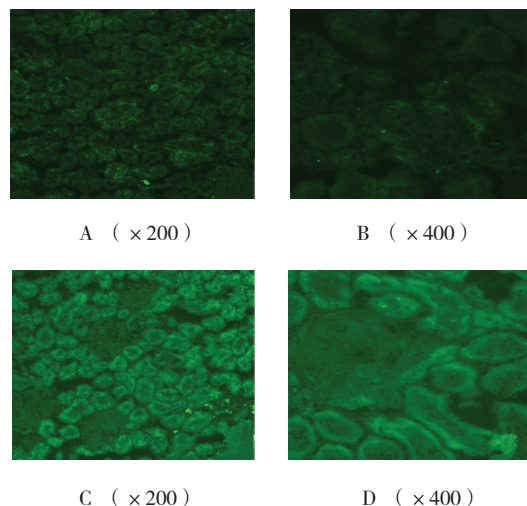


图 1 两组大鼠肾脏病理学改变 (免疫荧光)
A、B: 对照组大鼠肾小球无明显 IgA 沉积, 荧光强度 - ~ ±;
C、D: 模型组肾小球系膜区均可见团块状或颗粒状绿色 IgA 荧光, 荧光强度 ++ ~ +++

表 1 两组血生化检测结果 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	BUN/ ($\mu\text{mol/L}$)	Scr/ (mmol/L)	TP/ (g/L)	ALB/ (g/L)
对照组	8.07 ± 0.76	39.28 ± 4.33	60.53 ± 3.20	25.97 ± 1.83
模型组	7.41 ± 1.03	39.46 ± 5.36	59.47 ± 3.18	26.36 ± 1.08
<i>t</i> 值	1.625	-0.083	0.743	-0.580
<i>P</i> 值	0.122	0.935	0.467	0.570

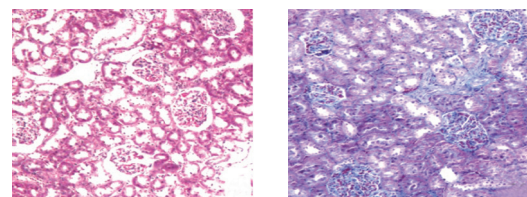
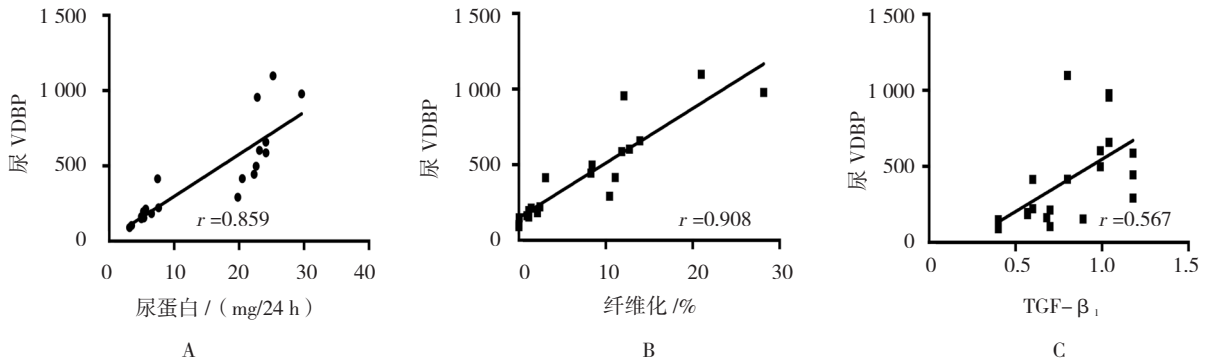


图 2 两组大鼠肾脏染色结果 (Masson × 100)
A 对照组 B 模型组

表 2 两组尿蛋白、尿红细胞、尿 VDBP、胶原纤维、肾组织 TGF-β₁ 蛋白表达水平的比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	尿蛋白 / ($\text{mg}/24\text{h}$)	尿 RBC / (个 /Hp)	尿 VDBP / ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	胶原纤维 / %	TGF-β ₁
对照组	5.40 ± 1.50	4.50 ± 2.64	0.19 ± 0.09	1.23 ± 1.07	0.61 ± 0.14
模型组	23.44 ± 2.72	158.20 ± 86.38	0.65 ± 0.27	13.80 ± 6.18	1.03 ± 0.14
<i>t</i> 值	-18.360	-5.624	-5.154	-6.330	-6.500
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

0.000), 与 TGF- β_1 蛋白表达呈正相关 ($r=0.859$, $P=0.009$)。见表 3 和图 3。



A: 尿 VDBP 与尿蛋白呈正相关; B: 尿 VDBP 与肾纤维化呈正相关; C: 尿 VDBP 与 TGF- β_1 蛋白表达呈正相关

图 3 尿蛋白、尿 VDBP 与肾脏纤维化的相关性

表 3 尿 VDBP 分别与尿蛋白、肾纤维化、TGF- β_1 蛋白表达的相关分析

统计量	尿 VDBP & 尿蛋白	尿 VDBP & 肾纤维化	尿 VDBP & TGF- β_1
r 值	0.859	0.908	0.567
P 值	0.000	0.000	0.009

3 讨论

IgA 肾病的临床表现多样, 轻重程度不一, 从无症状的尿检异常到急性肾衰竭均可出现。IgA 肾病病理改变多种多样, 但时常有不同程度的肾间质病变, 研究发现, 小管间质受累程度影响到肾小球病变的转归^[8-9]。在 IgA 肾病患者中, 部分肾小球病变严重, 但间质病变轻微的患者长期预后较好, 而间质损害严重, 小球病变轻微的病例长期随访预后不佳, 提示肾脏间质纤维化是预测 IgA 肾病病情预后的重要指标^[10]。

VDBP 为簇特异性蛋白 (group-specific component, Gc) 分子量为 5.8 kD, 在体内有多重作用, 包括转运维生素 D, 调控体内炎症反应以及免疫调节等作用^[11]。VDBP 在肝脏合成, 经过肾小球滤过, 在近曲小管重吸收^[5], 因此, 尿中的 VDBP 水平很大程度取决于肾小管的重吸收功能。当肾小管间质出现纤维化改变时, 可以导致尿 VDBP 重吸收减少, 从而使尿中 VDBP 升高^[6, 12], 上述研究为检测尿 VDBP 水平反应小管间质损伤提供理论依据。

本研究结果显示, IgA 肾病模型组尿 VDBP 高于对照组。既往其他动物模型及肾病患者研究中, 亦发现肾损伤时尿 VDBP 水平升高: 在阿霉素大鼠模型中, 尿 VDBP 在肾损伤早期即出现升高, 与小管间质纤维

化的指标密切相关^[6], 并且独立于白蛋白尿^[6]。在大鼠尿毒症模型中, 发现从尿中丢失 VDBP 增多^[13]。而在糖尿病肾病患者的研究中发现, 尿 VDBP 排出量增加^[14]。本研究也发现, 模型组尿 VDBP 定量高于对照组, 说明在 IgA 肾病在肾损伤时会出现尿 VDBP 定量升高。

TGF- β_1 /Smad3 信号通路在肾小球硬化、肾小管损伤和肾间质纤维化过程起其重要的作用。TGF- β_1 与具有丝氨酸-苏氨酸活性的细胞的表面受体过特异性结合, 并激活该受体, 启动免疫应答, 作用于相应的靶基因, 如纤连蛋白 (fibronectin, FN), 调节其转录、表达。FN 表达水平上调意味着细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 积聚, 最终会出现肾小球硬化和肾间质纤维化^[15]。在 IgA 肾病患者肾组织中, TGF- β_1 表达与 FN 表达呈正相关, 并且与肾小管损伤及间质纤维化呈正相关^[15]。本研究进一步发现, 24 h 尿 VDBP 水平与肾脏纤维化程度以及 TGF- β_1 蛋白的表达呈正相关, 提示尿 VDBP 可以反映肾脏纤维化程度, 并随着肾损伤的严重程度而增加。尿 VDBP 水平与肾小管细胞巨噬细胞浸润程度以及胶原纤维表达呈正相关, 并与多种小管损伤因子呈正相关^[6]。CKD 患者中研究发现, 尿 VDBP 随疾病的严重程度而增加^[16-17]。提示尿 VDBP 可能涉及肾脏纤维化过程中多种系统免疫调控, 但尚有待进一步研究证实。

本研究发现, 在 IgA 肾病模型中, 24 h 尿 VDBP 与 24 h 尿蛋白呈正相关。在阿霉素大鼠模型研究中, 尿 VDBP 在肾损伤早期升高, 并且独立于白蛋白尿, 提示尿 VDBP 在尿蛋白出现改变之前即可发生改变, 反应肾损伤的程度^[6]。本实验研究结果显示, 模型组大鼠的尿蛋白及尿 VDBP 水平高于对照组, 尿 VDBP

组间的差异与肾脏纤维化程度及在肾组织纤维化的程度改变一致, 提示与尿蛋白相似, 尿 VDBP 能反应肾组织纤维化的程度。在 CKD 患者的一项研究中发现, 尿 VDBP 在 CKD 患者中升高, 并且与蛋白尿水平呈正相关^[18], 其研究结果与本实验研究发现一致。推测其原因, 无论是阿霉素肾病大鼠、IgA 肾病大鼠、CKD 患者, 其蛋白尿成分主要为白蛋白, 白蛋白分子量为 6.85 kD, 分子量比 VDBP 大。白蛋白主要经过肾小球滤过, 在肾小球滤过屏障损伤时, 尿中白蛋白升高, 是尿蛋白的主来源。尿蛋白水平是公认的反应肾小球滤过屏障损伤的指标, 而前述研究中提到, 尿 VDBP 是在肾小管被重吸收, 尿中 VDBP 水平反应肾小管损伤及间质纤维化程度的指标。故从反映肾纤维化角度出发, 尿 VDBP 可能是比尿蛋白更敏感、准确的指标。提示尿 VDBP 可以作为一个无创性的尿液标志, 用于早期监测小管间质炎症和纤维化。在不同的肾脏疾病中, 尿 VDBP 水平与尿蛋白水平是否存在相关性该问题, 值得进一步探讨。

本研究发现, IgA 肾病大鼠尿 VDBP 升高, 尿 VDBP 与肾纤维化、尿蛋白呈正相关, 尿 VDBP 可作为监测 IgA 肾病大鼠肾纤维化的一个无创的生物学指标。

参 考 文 献:

- [1] WYATT R J, JULIAN B A. IgA nephropathy[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(25): 2402-2414.
- [2] CHEUNG C, BASHIR S, BARRATT J. IgA nephropathy[J]. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2014, 75(Suppl 11): C173-176.
- [3] WU W, JIANG X Y, ZHANG Q L, et al. Expression and significance of TGF-beta1/Smad signaling pathway in children with IgA nephropathy[J]. *World J Pediatr*, 2009, 5(3): 211-215.
- [4] 冯娟, 夏维波. 维生素 D 结合蛋白研究进展[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2016, 36(3): 209-213.
- [5] NYKJAER A, DRAGUN D, WALTHER D, et al. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃[J]. *Cell*, 1999, 96(4): 507-515.
- [6] MIRKOVIC K, DOORENBOS C R, DAM W A, et al. Urinary vitamin D binding protein: a potential novel marker of renal interstitial inflammation and fibrosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55887.
- [7] 何辉, 赵明. 肾间质纤维化诊断与评估方法的研究进展[J]. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29(11): 862-865.
- [8] 张国珍, 吴小川, 彭晓杰, 等. 黄芪对实验性 IgA 肾病大鼠肾小管间质损害及 NF- κ B MCP-1 表达的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(2): 173-178.
- [9] 李艳红, 汪清. 肾小管间质损害在儿童 IgA 肾病中的临床意义[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2013, 39(1): 33-36.
- [10] BOGENSCHUTZ O, BOHLE A, BATZ C, et al. IgA nephritis: on the importance of morphological and clinical parameters in the long-term prognosis of 239 patients[J]. *Am J Nephrol*, 1990, 10(2): 137-147.
- [11] CHUN R F. New perspectives on the vitamin D binding protein[J]. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(6): 445-456.
- [12] ZENG J, WEN Q, RONG R, et al. Vitamin D-binding protein is a potential urinary biomarker of irbesartan treatment response in patients with IgA nephropathy[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(11): 666-673.
- [13] MALARD V, GAILLARD J C, BERENQUER F, et al. Urine proteomic profiling of uranium nephrotoxicity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794(6): 882-891.
- [14] THRAILKILL K M, JO C H, COCKRELL G E, et al. Enhanced excretion of vitamin D binding protein in type 1 diabetes: a role in vitamin D deficiency[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(1): 142-149.
- [15] YANG Q, XIE R J, YANG T, et al. Transforming growth factor-beta1 and Smad4 signaling pathway down-regulates renal extracellular matrix degradation in diabetic rats[J]. *Chin Med Sci J*, 2007, 22(4): 243-249.
- [16] DOORENBOS C R, de CUBA M M, VOGT L, et al. Antiproteinuric treatment reduces urinary loss of vitamin D-binding protein but does not affect vitamin D status in patients with chronic kidney disease[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 128(1/2): 56-61.
- [17] KALANTARI S, RUTISHAUSER D, SAMAVAT S, et al. Urinary prognostic biomarkers and classification of IgA nephropathy by high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80830.
- [18] KALOUSOVA M, DUSILOVA-SULKOVA S, ZAKIYANOV O, et al. Vitamin D binding protein is not involved in vitamin D deficiency in patients with chronic kidney disease[J]. *Biomed Res Int*, 2015(2015): 492365.

(王荣兵 编辑)