大黄酸对免疫球蛋白A肾病的改善作用及机制研究Δ

陈杉杉[1*]，彭胜男[1#]，洪　婷[2]（1.江西中医药大学中医学院，南昌　330004；2.江西中医药大学临床医学院，南昌　330004）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）07-0819-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.07.10

摘　要　目的　基于信号转导与转录激活因子3（STAT3）信号通路，研究大黄酸改善免疫球蛋白A肾病（IgAN）模型大鼠的作用及机制。**方法**　将大鼠随机分为正常对照组、IgAN模型组和大黄酸治疗组（100 mg/kg），每组10只。IgAN模型组和大黄酸治疗组采用牛血清白蛋白+脂多糖+四氯化碳联合法复制IgAN模型。造模第7周开始，大黄酸治疗组大鼠灌胃相应药物，正常对照组和模型组大鼠灌胃等量生理盐水，连续4周。末次给药后，检测大鼠尿红细胞数、24 h尿蛋白（24 h-UTP）以及血清中免疫球蛋白A（IgA）、小肠黏液中分泌型IgA（sIgA）的水平；观察大鼠肾皮质和小肠黏膜Peyer结的病理形态学变化以及肾皮质中IgA沉积情况；检测大鼠小肠黏膜Peyer结中白细胞介素17（IL-17）、IL-6和转化生长因子β（TGF-β）的表达水平；检测Peyer结中STAT3和维甲酸受体相关孤儿受体γt（RORγt）mRNA的表达水平；检测Peyer结中磷酸化STAT3（p-STAT3）和RORγt蛋白的表达水平。**结果**　与正常对照组比较，IgAN模型组大鼠尿红细胞数、24 h-UTP以及血清中IgA、小肠黏液中sIgA水平均显著升高（$P<0.01$）；肾皮质中肾小体增大，肾小囊扩张，球内系膜增生、纤维化明显；小肠黏膜Peyer结体积和生发中心增大；肾皮质中IgA沉积明显；小肠黏膜Peyer结中IL-17、IL-6、TGF-β、STAT3 mRNA、RORγt mRNA以及p-STAT3、RORγt蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.01$）。与IgAN模型组比较，大黄酸治疗组大鼠上述指标水平均显著降低（$P<0.01$），肾皮质病理损伤有所改善，小肠黏膜Peyer结体积和生发中心减小，肾皮质中IgA沉积减弱。**结论**　大黄酸对IgAN模型大鼠具有较好的改善作用，其作用机制可能与抑制STAT3信号通路活性、调控小肠黏膜Peyer结内的免疫功能有关。

关键词　大黄酸；免疫球蛋白A肾病；肠黏膜；Peyer结；信号转导与转录激活因子3信号通路

Study on improvement effects and mechanism of rhein on immunoglobulin A nephropathy

CHEN Shanshan[1], PENG Shengnan[1], HONG Ting[2] (1. School of Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. School of Clinical Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the improvement effects and mechanism of rhein on immunoglobulin A nephropathy (IgAN) model rat based on signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway. **METHODS** Rats were randomly divided into normal control group, IgAN model group and rhein treatment group, with 10 rats in each group. IgAN model group and rhein treatment group were given combination of bovine serum albumin+lipopolysaccharide+carbon tetrachloride to induce IgAN model. Since the 7th week, rhein treatment group rats were intragastrically given relevant medicine, and normal control group and model group rats were given equal amount of normal saline intragastrically, for consecutive 4 weeks. After the last administration, the count of urine sediment erythrocyte, 24 h-urine total protein (UTP), the levels of immunoglobulin A (IgA) in serum and secretory immunoglobulin A (sIgA) in intestinal mucosa were detected. The pathological changes of Peyer's patch in renal cortex and intestinal mucosa and IgA deposition in renal cortex were observed. The expressions of interleukin-17 (IL-17), IL-6 and transforming growth factor β (TGF-β) in Peyer's patch of intestinal mucosa in rats were detected. The expressions of STAT3 and related orphan receptor γt (RORγt) mRNA in Peyer's patch were detected. The expressions of p-STAT3 and RORγt proteins in Peyer's patch were detected. **RESULTS** Compared with normal control group, the count of urine sediment erythrocyte, 24 h-UTP, the levels of IgA in serum and sIgA in intestinal mucosa were increased significantly in IgAN model group ($P<0.01$); enlarged renal corpuscles, dilated renal sacs, obvious intratubular mesangial hyperplasia and fibrosis were observed in renal cortex; the volume and germinal center of Peyer's patch in intestinal mucosa increased; IgA deposition of renal cortex was obvious; the expressions of IL-17, IL-6 and TGF-β in Peyer's patch, mRNA expressions of STAT3 and RORγt, protein expressions of p-STAT3 and RORγt were increased significantly ($P<0.01$). Compared with IgAN model group,

Δ**基金项目**　江西省自然科学基金项目（No.20202BABL206028）；江西省教育厅科学技术研究项目（No.GJJ190630，No.191641）；江西中医药大学中西医结合一级学科（江西省双一流学科）项目（No.zxyylxk20220103）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：自身免疫性疾病的治疗和发病机制。E-mail：1025376860@qq.com

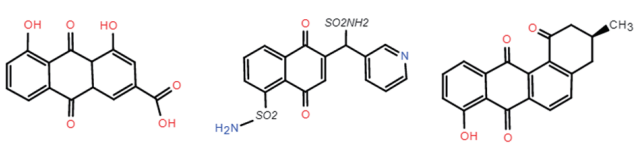
＃**通信作者**　副教授，硕士生导师，博士。研究方向：自身免疫性疾病的治疗和发病机制。E-mail：3603405@qq.com

above indexes were decreased significantly in rhein treatment group ($P<0.01$), pathological damage of renal cortex was improved, the volume of Peyer's patch and germinal center of intestinal mucosa were reduced, and IgA deposition in renal cortex was weakened. **CONCLUSIONS** Rhein can improve IgAN model rats, the mechanism of which may be associated with inhibiting STAT3 signaling pathway and regulating immune function of Peyer's patch in intestinal mucosa.

KEYWORDS rhein; immunoglobulin A nephropathy; intestinal mucosa; Peyer's patch; signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway

免疫球蛋白A肾病(immunoglobulin A nephropathy, IgAN)是自身免疫性疾病,主要临床表现为反复发作的血尿,其确诊标准为在肾小球系膜区检出以免疫球蛋白A(immunoglobulin A, IgA)为主的免疫沉积[1]。目前,关于IgAN的病因和病机存在多种学说,如机体免疫失衡、肠道菌群失调、多重打击学说等[2-3]。相关研究发现,IgAN患者存在肠道屏障功能受损的情况,其病情加重通常会伴随小肠黏膜的感染[4-5];另外,一些肠道疾病也会合并IgAN,如克罗恩病、溃疡性结肠炎、乳糜泻等[6-7]。

本课题组前期研究发现,大黄酸可调节IgAN模型大鼠小肠黏膜内免疫指标CD4/CD8的平衡,从而减轻IgAN[8-9],但具体机制尚不清楚。目前,已有学者证实信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路可通过调节免疫细胞来平衡自身免疫反应[10]。相关研究基于大黄酸与STAT3分子模拟对接结果发现,大黄酸与STAT3抑制剂LY5、STA-21的结构(分子结构式见图1)相似[11]。故笔者提出设想:大黄酸是否可通过抑制STAT3信号通路活性,抑制小肠黏膜免疫的过度激活,从而减轻IgAN。Peyer结是小肠黏膜内的一组淋巴滤泡,为小肠黏膜免疫系统的重要组成部分[12]。基于此,本研究建立IgAN模型大鼠,并基于STAT3信号通路探讨大黄酸调节小肠黏膜Peyer结内免疫功能从而改善IgAN的作用机制。



A. 大黄酸　　B. LY5　　C. STA-21

图1　大黄酸与STAT3抑制剂的分子结构式

1　材料

1.1　主要仪器

本研究所用主要仪器包括AB104-N型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司),RT-6100型酶标仪(美国Rayto公司),BV-2型垂直电泳仪、BT-2型转印电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司),CFX型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司),L535R型多功能台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),BX43型光学显微镜(日本Olympus公司),6300型化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司)等。

1.2　主要药品与试剂

大黄酸原料药(纯度98%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(批号I2104421);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA,规格25 g)、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS,纯度99%)、苏木素-伊红(hematoxylineosin staining, HE)染色试剂盒(批号分别为128P0516、1124K021、20220409)均购自北京索莱宝科技有限公司;四氯化碳(CCl_4)购自上海麦克林生化科技有限公司(批号C12886285);蓖麻油购自上海易恩化学技术有限公司(批号RH255359);FITC标记的山羊抗大鼠IgA抗体、兔抗磷酸化STAT3(p-STAT3)抗体均购自美国Abcam公司(批号分别为GR3412514-2、GR246894-41);兔抗维甲酸受体相关孤儿受体γt(related orphan receptor γt, RORγt)抗体购自南京巴傲得生物科技有限公司(批号CN89330);兔抗白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、兔抗白细胞介素17(IL-17)、鼠抗转化生长因子β(transforming growth factor β, TGF-β)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体和免疫组化试剂盒套装(抗兔)、免疫组化试剂盒套装(抗鼠)均购自北京博奥森生物技术有限公司(批号分别为BJ12146794、BA11232558、BA10143035、BA07022760、BB05099092、BB04146979);尿蛋白(urine total protein, UTP)定量测试盒购自南京建成生物工程研究所(批号20211220);大鼠IgA酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、大鼠分泌型IgA(secretory immunoglobulin A, sIgA)ELISA试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司(批号分别为220104065R、220104078R);逆转录试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司(批号MPC2112069);ECL发光试剂购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司(批号013Z0102)。

1.3　实验动物

本研究所用大鼠为SPF级雄性SD大鼠,30只,体质量为(200±20) g,由江西中医药大学实验动物中心提供,动物生产许可证号为SCXK(赣)2018-0003。动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准,批准号为20220307006。

2　方法

2.1　分组与给药

将大鼠随机分为正常对照组、IgAN模型组和大黄酸治疗组,每组10只。采用BSA+LPS+CCl_4联合法造

模[13]，具体方法如下：IgAN模型组和大黄酸治疗组大鼠隔日灌胃BSA（400 mg/kg），连续6周，第6周和第8周尾静脉注射LPS各1次（0.05 mg/次），另皮下注射CCl_4（0.1 mL/次）、蓖麻油（0.5 mL/次），每周1次，连续9周；正常对照组大鼠用等量生理盐水代替造模药物。从第7周开始，大黄酸治疗组大鼠每天灌胃大黄酸（100 mg/kg，剂量参考文献[9]设置），连续4周；正常对照组和IgAN模型组大鼠灌胃等量生理盐水，其余操作不变。第10周末取材。

2.2 大鼠尿红细胞数、24 h-UTP的检测

第10周末用揉腹法采集大鼠新鲜尿液，并于显微镜下使用血球计数板进行尿红细胞计数；然后将各组大鼠放至代谢笼中，采集其24 h尿液，应用酶标仪和相应试剂盒测定24 h-UTP。

2.3 大鼠血清中IgA和小肠黏液中sIgA水平的检测

上述实验结束后，腹腔注射1%戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉大鼠，然后在解剖板上进行腹主动脉取血。将血样室温静置20 min左右，以3 000 r/min离心10 min，收集上清液，备用。另处死大鼠，剖取肾皮质，部分放入4%多聚甲醛溶液中固定，部分放入液氮中保存备用；剖取小肠黏膜Peyer结，部分放入4%多聚甲醛溶液中固定，部分置于－80 ℃冰箱中保存备用，部分用盖玻片刮取肠黏液保存备用。根据ELISA试剂盒说明书方法测定大鼠血清中IgA和小肠黏液中sIgA水平。

2.4 大鼠肾皮质和小肠黏膜Peyer结的病理形态学观察

取各组大鼠固定于4%多聚甲醛溶液中的肾皮质和小肠黏膜Peyer结适量，经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后，进行HE染色。每张切片取任意5个高倍镜视野（×400），通过Katafuchi评分对肾皮质切片中肾小体增大、肾小囊扩张、肾小管肿胀阻塞、球内系膜增生和纤维化情况进行半定量分析[14]。

2.5 大鼠肾皮质中IgA沉积情况观察

采用免疫荧光法进行观察。取大鼠肾皮质制备冰冻切片，室温晾干后，固定在4%多聚甲醛溶液中10 min，晾干，置于湿盒；以磷酸盐缓冲液（PBS）浸泡3次，以10%正常山羊血清常温封闭20 min，再于4 ℃条件下以FITC标记的山羊抗大鼠IgA抗体（稀释度为1∶100）孵育过夜；次日以PBS浸泡3次，晾干封片，置于荧光显微镜下观察，并参考文献[15]进行荧光半定量分级。

2.6 大鼠小肠黏膜Peyer结中IL-17、IL-6和TGF-β表达水平的检测

采用免疫组化法进行检测。取大鼠小肠黏膜Peyer结适量进行石蜡包埋、切片、脱蜡水化、抗原修复；以PBS浸泡3次，3%H_2O_2室温避光灭活内源性过氧化物25 min，再以PBS浸泡3次，10%正常山羊血清室温封闭非特异性抗体30 min；加入IL-17、IL-6、TGF-β抗体（稀释度均为1∶200），4 ℃孵育过夜；次日以PBS浸泡3次，加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h；以PBS浸泡3次，DAB显色液显色，当在光学显微镜下看到棕黄色沉淀时，将切片放在纯水中终止显色；以苏木素复染3 min，流水洗1 min，分化液分化数秒，自来水蓝化1 min，再脱水、透明、封片。采用光学显微镜随机选取6个视野拍照，并用图像分析系统分析每个视野的积分光密度值。当切片中出现棕黄色或棕褐色颗粒时则为相应蛋白的阳性表达。

2.7 大鼠小肠黏膜Peyer结中STAT3、RORγt mRNA表达水平的检测

采用RT-PCR法进行检测。每组随机选取6只大鼠的小肠黏膜Peyer结于研磨钵中磨粉，采用Trizol法提出总RNA并测定其含量。取总RNA 2 μg按逆转录试剂盒说明书方法操作获得cDNA。以cDNA为模板进行PCR，具体反应条件为95 ℃预变性30 s；95 ℃变性15 s，60 ℃退火延伸30 s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目的基因的表达水平。本研究所用引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成，具体信息见表1。

表1 PCR引物序列与扩增产物长度

基因	序列（5′→3′）	扩增产物长度/bp
GAPDH	上游：CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游：GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
STAT3	上游：TTAACATTCTGGGCACGAACA	147
	下游：TGACAATCAAGGAGGCATCAC	
RORγt	上游：CAAGAAAAGAGGAGAGTGGAGCA	169
	下游：GGAGGTGCTGGAAGTCCTGTAG	

2.8 大鼠小肠黏膜Peyer结中p-STAT3和RORγt蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。每组随机选取6只大鼠的小肠黏膜Peyer结提取总蛋白，并测定其浓度。取50 μg总蛋白，100 ℃变性5 min，冷却至室温，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜；5%BSA封闭2 h，加入p-STAT3一抗（稀释度为1∶1 000）、RORγt一抗（稀释度为1∶500）、β-actin一抗（稀释度为1∶2 000）于4 ℃孵育过夜；次日洗膜后加入二抗（稀释度为1∶5 000），37 ℃孵育1 h；采用ECL法显色，并用Image J软件分析各条带的灰度值，以目的蛋白与内参β-actin的灰度值比值表示其蛋白表达水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 23.0软件分析数据，数据用$\bar{x} \pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验，等级分组资料采用Kruskal-Wallis秩和检验。检验水准$\alpha=0.01$。

3 结果

3.1 大黄酸对IgAN模型大鼠尿红细胞数和24 h-UTP的影响

与正常对照组比较，IgAN模型组大鼠尿红细胞数和24 h-UTP均显著升高（$P<0.01$）；与IgAN模型组比较，大黄酸治疗组大鼠尿红细胞数和24 h-UTP均显著降低（$P<0.01$）。结果见表2。

表2 各组大鼠尿红细胞数和24 h-UTP的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	尿红细胞数/个	24 h-UTP/(mg/L)
正常对照组	0	451.90±63.58
IgAN模型组	7.40±1.89[a]	737.80±106.30[a]
大黄酸治疗组	2.60±1.57[b]	553.10±99.36[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与IgAN模型组比较，$P<0.01$

3.2 大黄酸对IgAN模型大鼠血清中IgA和小肠黏液中sIgA水平的影响

与正常对照组比较，IgAN模型组大鼠血清中IgA和小肠黏液中sIgA水平均显著升高（$P<0.01$）；与IgAN模型组比较，大黄酸治疗组大鼠血清中IgA和小肠黏液中sIgA水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表3。

表3 各组大鼠血清中IgA和小肠黏液中sIgA水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，μg/mL）

组别	IgA	sIgA
正常对照组	177.70±22.40	7.93±2.25
IgAN模型组	288.00±8.55[a]	20.76±2.11[a]
大黄酸治疗组	247.90±7.93[b]	15.33±1.61[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与IgAN模型组比较，$P<0.01$

3.3 大黄酸对IgAN模型大鼠肾皮质病理形态学的影响

正常对照组、IgAN模型组和大黄酸治疗组的Katafuchi评分分别为（1.10±0.32）、（3.80±0.42）、（2.30±0.48）分。与正常对照组比较，IgAN模型组大鼠肾皮质中肾小体增大，肾小囊扩张，球内系膜增生、纤维化明显，肾小管肿胀阻塞；与IgAN模型组比较，大黄酸治疗组以上情况均有所改善。结果见图2。

3.4 大黄酸对IgAN模型大鼠小肠黏膜Peyer结病理形态学的影响

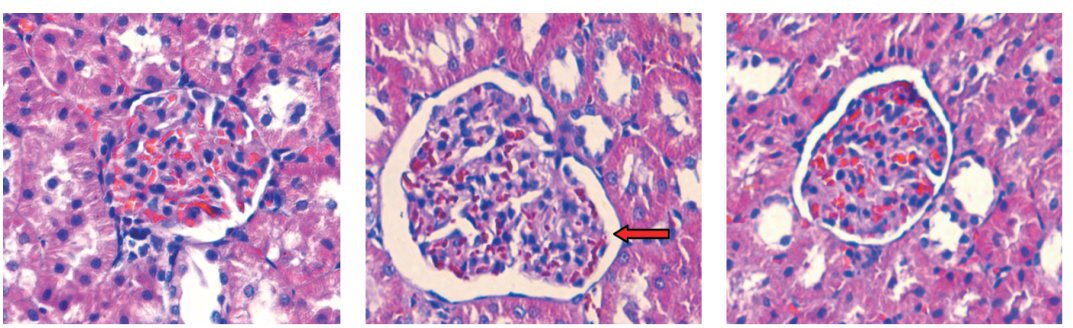
与正常对照组比较，IgAN模型组大鼠小肠黏膜Peyer结体积和生发中心均增大；与IgAN模型组比较，大黄酸治疗组大鼠小肠黏膜Peyer结体积和生发中心均减小。结果见图3。

3.5 大黄酸对IgAN模型大鼠肾皮质中IgA沉积的影响

正常对照组大鼠肾皮质中IgA荧光不明显。与正常对照组比较，IgAN模型组大鼠肾皮质中IgA沉积明显（$P<0.01$）；与IgAN模型组比较，大黄酸治疗组大鼠肾皮质中IgA沉积减弱（$P<0.01$）。结果见图4、表4。

3.6 大黄酸对IgAN模型大鼠小肠黏膜Peyer结中IL-17、IL-6、TGF-β表达水平的影响

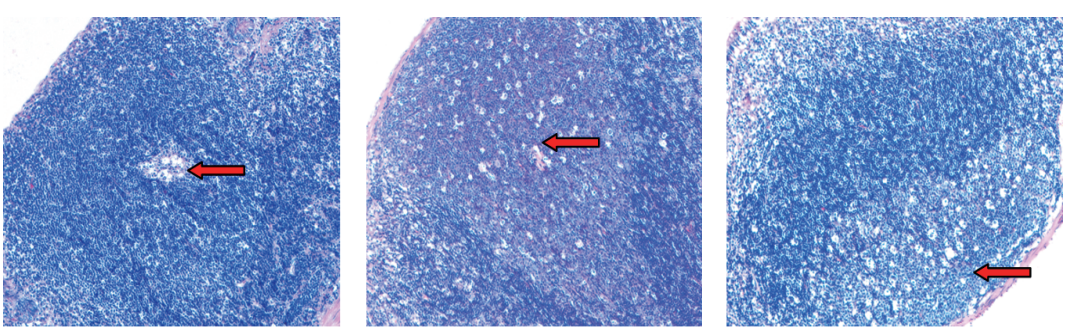
与正常对照组比较，IgAN模型组大鼠小肠黏膜Peyer结中IL-17、IL-6、TGF-β表达水平均显著升高（$P<0.01$）；与IgAN模型组比较，大黄酸治疗组大鼠小肠黏膜Peyer结中IL-17、IL-6、TGF-β表达水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表5、图5。



A. 正常对照组　B. IgAN模型组　C. 大黄酸治疗组

注：箭头所指为病变处

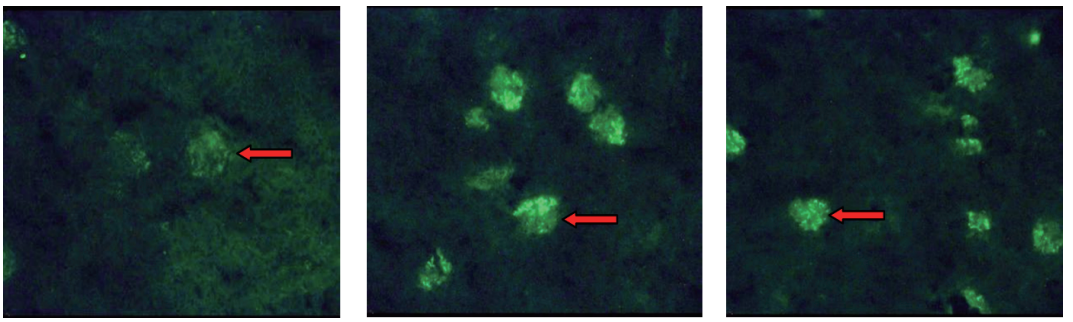
图2 各组大鼠肾皮质病理形态学的观察结果（HE染色，×400）



A. 正常对照组　B. IgAN模型组　C. 大黄酸治疗组

注：箭头所指为生发中心

图3 各组大鼠小肠黏膜Peyer结的病理形态学观察结果（HE染色，×100）



A. 正常对照组　　B. IgAN模型组　　C. 大黄酸治疗组

注：箭头所指为IgA荧光

图4　各组大鼠肾皮质中IgA沉积的观察结果（免疫荧光法，×100）

表4　各组大鼠肾皮质中IgA沉积分级情况（$n=10$）

组别	±	+	++	+++	++++
正常对照组	10	0	0	0	0
IgAN模型组	0	0	4	6	0
大黄酸治疗组	0	8	2	0	0

±：低倍镜下未见（亮绿色颗粒状IgA沉积），高倍镜下隐约可见；+：低倍镜下隐约可见，高倍镜下可见；++：低倍镜下可见，高倍镜下清晰可见；+++：低倍镜下清晰可见，高倍镜下耀眼；++++：高倍镜下刺眼

表5　各组大鼠小肠黏膜Peyer结中IL-17、IL-6、TGF-β蛋白积分光密度值的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	IL-17	IL-6	TGF-β
正常对照组	0.15±0.03	0.19±0.02	0.13±0.03
IgAN模型组	0.26±0.05[a]	0.28±0.03[a]	0.26±0.02[a]
大黄酸治疗组	0.19±0.03[b]	0.23±0.03[b]	0.17±0.02[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与IgAN模型组比较，$P<0.01$

3.7　大黄酸对IgAN模型大鼠小肠黏膜Peyer结中STAT3、RORγt mRNA表达的影响

与正常对照组比较，IgAN模型组大鼠小肠黏膜Peyer结中STAT3、RORγt mRNA表达水平均显著升高（$P<0.01$）；与IgAN模型组比较，大黄酸治疗组大鼠小肠黏膜Peyer结中STAT3、RORγt mRNA表达水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表6。

3.8　大黄酸对IgAN模型大鼠小肠黏膜Peyer结中p-STAT3、RORγt蛋白表达的影响

与正常对照组比较，IgAN模型组大鼠小肠黏膜Peyer结中p-STAT3、RORγt蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）；与IgAN模型组比较，大黄酸治疗组大鼠小肠黏膜Peyer结中p-STAT3、RORγt蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表7、图6。

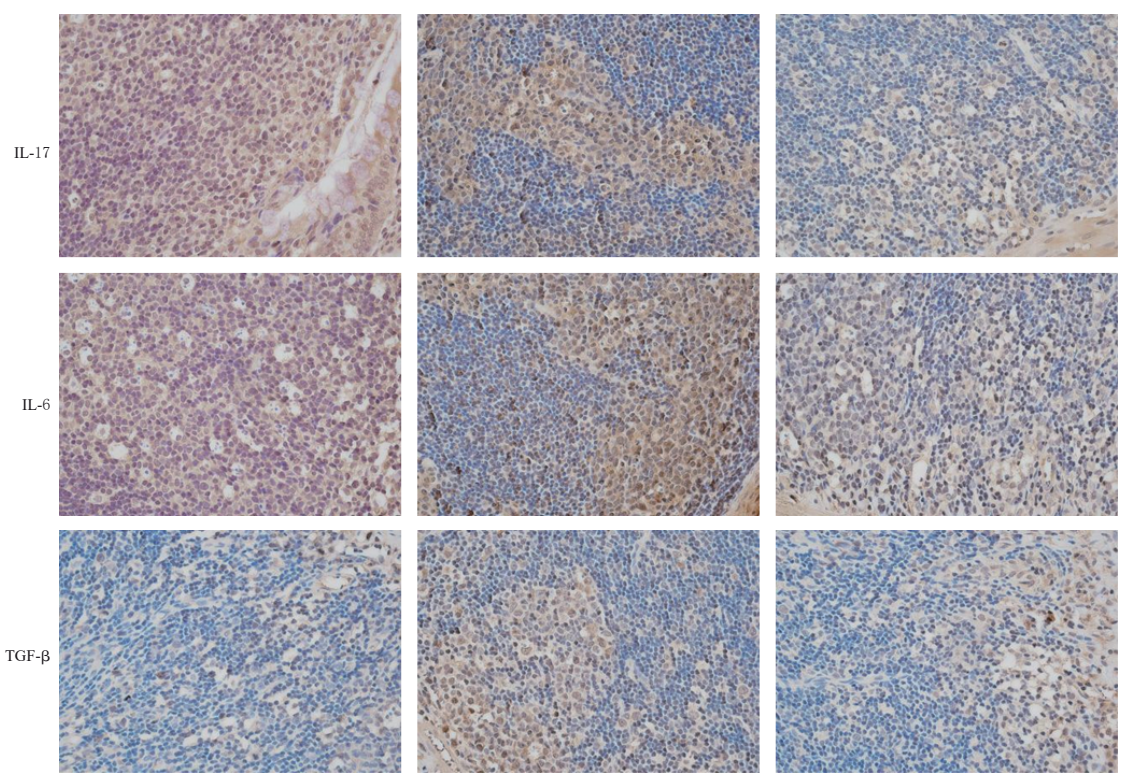


图5　各组大鼠小肠黏膜Peyer结中IL-17、IL-6、TGF-β蛋白表达的免疫组化图（×400）

表6　各组大鼠小肠黏膜Peyer结中STAT3、RORγt mRNA表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	STAT3 mRNA	RORγt mRNA
正常对照组	0.34±0.22	0.41±0.28
IgAN模型组	0.84±0.17[a]	1.66±0.34[a]
大黄酸治疗组	0.38±0.14[b]	0.90±0.40[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与IgAN模型组比较，$P<0.01$

表7　各组大鼠小肠黏膜Peyer结中p-STAT3、RORγt蛋白表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	p-STAT3/β-actin	RORγt/β-actin
正常对照组	0.34±0.05	0.17±0.01
IgAN模型组	0.68±0.04[a]	0.61±0.04[a]
大黄酸治疗组	0.53±0.02[b]	0.50±0.07[b]

a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与IgAN模型组比较，$P<0.01$

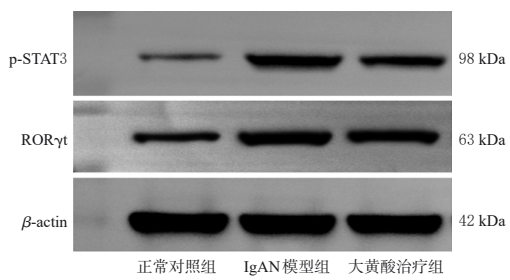


图6　各组大鼠小肠黏膜Peyer结中p-STAT3、RORγt蛋白表达的电泳图

4　讨论

IgAN可视为中医理论的“肾风”“血尿”“虚劳”等，正虚邪实为其证候，急性发作期患者有小便量少、频数多且深黄灼热的情况，更有甚者会出现血尿、大便稀薄或腥臭等症状[16]。《神农本草经》中大黄可去除血液中的热结，破除聚积的寒热，涤荡胃肠，对胃肠道具有一定的保护作用。大黄酸是大黄的主要提取物，有学者指出大黄酸具有利尿、抗炎、调节免疫、增强肾小球滤过功能和缓解肾纤维化等作用[17－19]。基于此，本研究主要探讨大黄酸改善IgAN的作用及机制。

IgAN发病过程中，血尿、24 h-UTP、血清中IgA均异常升高，并可在肾小球系膜区检出IgA沉积[1,20]。本研究结果显示，经大黄酸干预后，模型大鼠的尿红细胞数、24 h-UTP、血清中IgA水平均显著降低，且IgA沉积有所改善，这提示大黄酸对IgAN有较好的改善作用。

IgAN患者肾脏中沉积的IgA为多聚体，主要产自黏膜浆细胞，而肠道中的这些浆细胞主要产自Peyer结[21]；sIgA扮演黏膜免疫实施的角色，其结构与异常糖基化IgA1相似，能激发炎症反应，引起肾脏损害[22]。Peyer结作为肠道黏膜免疫系统里主要的淋巴小结，是小肠黏膜分泌IgA的主要组织，炎症作用后出现细胞分裂相，形成生发中心，而生发中心的增大或缩小可以反映淋巴细胞的增殖或抑制[12]。本研究结果显示，经大黄酸干预后，大鼠小肠黏液中sIgA水平降低、Peyer结体积减小、生发中心缩小，这提示大黄酸可抑制小肠黏膜的免疫激活，从而改善IgAN。

Tang等[23]研究发现，IgAN患者肾小管细胞中的过表达基因主要富集在IL-17信号通路。段先佳等[24]证明了在IgAN治疗中降低IL-17、IL-6、TGF-β_1的表达可延缓病程的发展。本研究结果显示，经大黄酸干预后，大鼠小肠黏膜Peyer结中IL-17、IL-6、TGF-β蛋白的表达水平均显著降低，这提示大黄酸可通过减少小肠黏膜Peyer结内炎症细胞因子的产生来抑制小肠黏膜的免疫过度应答。

STAT3是维持细胞增殖和存活的重要因子，可被多种细胞因子激活进而介导免疫和炎症反应以应对损伤。有文献报道，在IgAN模型中，STAT3的表达明显上调[25]。在IL-6、TGF-β_1并存的状态下，经过STAT3信号通路活化的下游转录因子RORγt可促进$CD4^+$往辅助性T细胞17（Th17）分化，从而产生炎症反应[26]。本研究结果显示，经大黄酸干预后，大鼠小肠黏膜Peyer结中STAT3、RORγt mRNA表达水平和p-STAT3、RORγt蛋白表达水平均显著降低，这提示大黄酸可通过下调STAT3信号通路相关蛋白表达来调节Peyer结内的免疫应答，从而改善IgAN。

综上所述，大黄酸对IgAN模型大鼠具有较好的改善作用，其作用机制可能与抑制STAT3信号通路活性、调控小肠黏膜Peyer结内的免疫功能有关。

参考文献

[1] 王新慧，梁莹，余仁欢，等. 益气养阴利咽方联合咽部啄治法治疗IgA肾病伴咽部炎症临床研究[J]. 中国中西医结合杂志，2019，39（1）：52-56.

[2] 唐余燕，贺海东，徐旭东. 肠道菌群失调在IgA肾病发病机制中的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志，2020，40（5）：951-954.

[3] RAUEN T，FLOEGE J. Inflammation in IgA nephropathy [J]. Pediatr Nephrol，2017，32（12）：2215-2224.

[4] COPPO R. The gut-kidney axis in IgA nephropathy：role of microbiota and diet on genetic predisposition[J]. Pediatr Nephrol，2018，33（1）：53-61.

[5] COPPO R. The gut-renal connection in IgA nephropathy [J]. Semin Nephrol，2018，38（5）：504-512.

[6] WELANDER A，SUNDELIN B，FORED M，et al. Increased risk of IgA nephropathy among individuals with celiac disease[J]. J Clin Gastroenterol，2013，47（8）：678-683.

[7] KU E，ANANTHAPANYASUT W，CAMPESE V M. IgA nephropathy in a patient with ulcerative colitis，Graves’ disease and positive myeloperoxidase ANCA[J]. Clin Nephrol，2012，77（2）：146-150.

（下转第848页）