

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.006

IgA 肾病与低相对分子质量尿蛋白的关系*

钱白音¹,鲁红云¹,李双¹,张桦¹,李中和¹,邹和群^{2△}

(1. 中山大学附属第五医院肾内科,广东珠海 519000;2. 南方医科大学第三附属医院肾内科,广州 510630)

摘要:目的 观察 IgA 肾病患者尿蛋白相对分子质量与肾小管间质损害及临床指标之间的关系,探讨低相对分子质量尿蛋白在 IgA 肾病发病机制中的作用。方法 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法检测 34 例同步行肾活检诊断明确的 IgA 肾病尿蛋白相对分子质量。结果 据 SDS-PAGE 法,尿蛋白可分为 4 组类型:小球性尿蛋白组,生理性尿蛋白组,混合性尿蛋白 23×10^3 组,混合性尿蛋白 10×10^3 组。IgA 肾病患者肾小管间质损害评分、24 小时尿蛋白定量及血清肌酐(Scr)水平比较,混合性尿蛋白 10×10^3 组均较 23×10^3 组升高($P < 0.05$)。结论 SDS-PAGE 分型 10×10^3 组尿蛋白对判断 IgA 肾病肾小管间质损害程度有临床意义,其作为无创性检测手段,可以作为判断 IgA 肾病肾小管间质损害程度的指标。

关键词:免疫球蛋白 I;肾小球肾炎;蛋白尿分型;低相对分子质量蛋白尿

中图分类号:R692.4

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)32-4291-03

The relationship between IgA nephropathy and low molecular weight urinary protein*

Qian Baiyin¹, Lu Hongyun¹, Li Shuang¹, Zhang Hua¹, Li Zhonghe¹, Zou Hequn^{2△}

(1. Department of Nephrology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhongshan University, Zhuhai, Guangdong 519000, China; 2. Department of Nephrology, the Third Affiliated Hospital of South Medical University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship among urinary protein molecular weight of IgA nephropathy, renal tubulointerstitium damage and clinical index, and discuss the role of low molecular weight urinary protein in the mechanism of IgA progression. Methods A total of 34 patients with biopsy proven IgAN were studied. We detect the molecular weight of urinary protein by SDS-PAGE. Data were processed with the classes of tubulointerstitial lesions and laboratory tests such as 24h urinary protein quantitation and serum creatinine(Scr). Results The urinary protein were divided into four types according the SDS-PAGE: the ball urinary protein group, physiologic urinary protein group, 23×10^3 proteinuria group and 10×10^3 proteinuria group. Scores of tubulointerstitial lesions, twenty four hour urine protein quantitation and Scr level were all significantly higher in 10×10^3 proteinuria group than 23×10^3 proteinuria group ($P < 0.05$). Conclusion 10×10^3 proteinuria may have close relationship with the progression of IgAN, and it may be a useful index for the degree of tubulointerstitial lesions of IgAN.

Key words: immunoglobulin A; glomerulonephritis; proteinuria; low molecular weight proteins

IgA 肾病是全球范围内最常见的肾小球疾病,也是导致终末期肾衰竭的一个主要原因^[1]。因此,寻求有效的方法阻止/延缓 IgA 肾病的进展意义重大。尿蛋白水平是影响 IgA 肾病病情进展的指标,除了尿蛋白的量与持续时间,尿蛋白成分也与 IgA 肾病的预后有关^[2]。有研究表明,低相对分子质量尿蛋白是 IgA 肾病预后不良的指标^[3]。低相对分子质量尿蛋白与 IgA 肾病之间的关系正越来越受到人们的重视。故本文选用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法检测 34 例同步行肾活检诊断明确 IgA 肾病患者尿液中尿蛋白相对分子质量,以了解低相对分子质量尿蛋白在 IgA 肾病患者发病机制中的作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择近期收治的中山大学附属第五医院及南方医科大学第三附属医院肾内科,经临床、肾活检首次诊断明确,尚未接受过任何治疗,并除外继发性肾病等的 IgA 肾病患者 34 例,男 13 例,女 21 例,年龄 13~42 岁,平均 29.6 岁。排除标准:(1)年龄小于 13 岁或大于 65 岁的患者;(2)紫癜性肾

炎、狼疮性肾炎、乙型肝炎相关性肾炎等继发性肾病,其他肾脏疾病及(或)高血压、糖尿病等其他疾病患者。

1.2 仪器与试剂 垂直式平板电泳槽购自北京崇文东方仪器厂,低相对分子质量 Marker 购自 Bio-Rad 公司,肌酐(Scr)试剂盒(肌氨酸氧化酶法)购自上海科华生物股份有限公司,尿总蛋白检测(邻苯三酚红法)试剂盒购自广州标佳科技有限公司。所有试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 肾组织病理标准 肾小管间质病理参数半定量积分采用 Katafuchi 等的标准:肾小管间质积分 0~9 分,包括间质炎性细胞浸润(0~3 分)、间质纤维化(0~3 分)和肾小管萎缩(0~3 分)。

1.3.2 SDS-PAGE 检测 (1)凝胶的配制。分别配制 10%分离胶和 4%的浓缩胶,将分离胶和浓缩胶依次加入 0.75 mm 的垂直电泳板中。(2)电泳方法。尿标本先进行蛋白定性,根据蛋白定性的结果决定样本电泳所需的上样量(表 1)。加样后在 200 V 电压下电泳 1~2 h。以溴酚蓝作为电泳指示剂。(3)考马斯亮蓝染色及脱色。电泳结束后,凝胶用考马斯亮蓝 R-

250 进行染色,并脱色。

表 1 尿蛋白定性与上样量的关系

尿蛋白定性	上样量(μL)
-或±	20
+	10
++	5
+++	2
++++	1

1.3.3 相对分子质量的测定 电泳、染色结束后,测量蛋白质及示踪染料的迁移距离,计算相对迁移率(relative mobility, R_f)值: $R_f = \text{蛋白质的迁移距离} / \text{示踪染料的迁移距离}$;以已知蛋白质低相对分子质量 Marker 绘坐标图,通过测定未知蛋白质的 R_f 值便可在标准曲线上读出它的相对分子质量。

1.3.4 尿蛋白 SDS-PAGE 分型 依尿蛋白相对分子质量分为:小球性尿蛋白组(相对分子质量大于或等于 70×10^3 ,包括高、中相对分子质量尿蛋白),生理性尿蛋白组(相对分子质量为 70×10^3 ,仅为中相对分子质量尿蛋白),混合性尿蛋白 23×10^3 组(包括高、中、低相对分子质量尿蛋白,最低相对分子质量为 23×10^3),混合性尿蛋白 10×10^3 组(包括高、中、低相对分子质量尿蛋白,最低相对分子质量为 10×10^3)^[4]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SDS-PAGE 尿蛋白分型结果 根据 SDS-PAGE 法,IgA 肾病患者尿蛋白可依相对分子质量分为 4 组类型:小球性尿蛋白组 5 例,生理性尿蛋白组 4 例,混合性尿蛋白 23×10^3 组 10 例,混合性尿蛋白 10×10^3 组 15 例。

2.2 两组肾小管间质病理损害比较 混合性蛋白尿 10×10^3 组较 23×10^3 组肾小管间质损害严重,间质炎性细胞浸润、间质纤维化及肾小管萎缩均明显增加。

较,24 h 尿蛋白定量明显增加($P < 0.05$)。

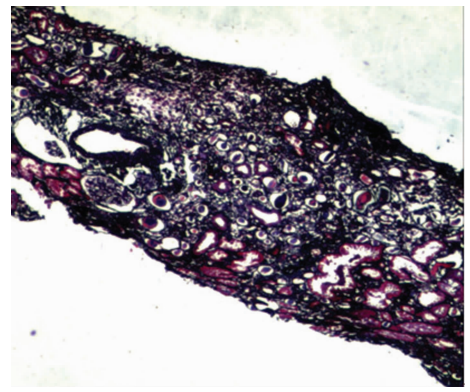


图 2 混合性蛋白尿 10×10^3 组肾小管间质损害较严重 [过碘酸六胺银染色(PASM)-胶原纤维染色(Masson), $\times 100$]

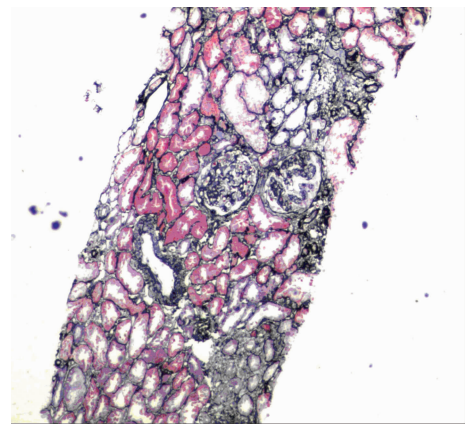


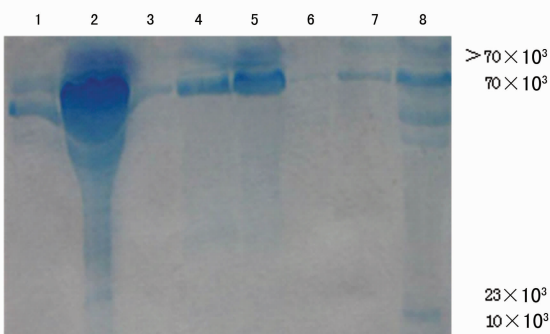
图 3 混合性蛋白尿 23×10^3 组肾小管间质损害较轻 (PASM-Masson, $\times 100$)

2.5 两组血清 Scr 水平比较 IgA 肾病混合性尿蛋白 10×10^3 组患者与混合性尿蛋白 23×10^3 组患者 Scr 水平分别为 $(165.8 \pm 121.83) \mu\text{mol/L}$ 与 $(80.00 \pm 35.51) \mu\text{mol/L}$,前者与后者比较,Scr 水平明显升高($P < 0.05$)。

3 讨 论

IgA 肾病是一种进展性疾病,多达 40% 的患者最终发展为终末期肾病^[5],是慢性肾衰竭的最常见病因。其发展和预后不仅与肾小球本身的损害有关,更与肾小管间质病变的严重程度密切相关^[6-7]。虽然学者们进行了大量研究,但 IgA 肾病发病机制至今尚未完全明确,且缺乏有效的治疗方法,仍是目前困扰着肾脏病学者的一个重要难题^[8]。

有研究表明,IgA 肾病尿蛋白水平与肾功能损害进展程度呈正相关^[9],其既是反映肾功能损害的指标,也是加速肾功能恶化的重要因素^[10-11]。不少尿蛋白对肾脏均有毒性作用,可能参与了肾小管及间质的损伤^[12-13]。由于异常尿蛋白的含量有时不高,所以必须依靠高灵敏度蛋白尿组成成分的检测方法。尿蛋白电泳作为一种高灵敏度无创性诊断工具,能够比较全面地观察患者尿液中蛋白组分含量及变化^[14]。SDS-PAGE 是根据蛋白质所带电荷及其相对分子质量大小和形状差异,在电场作用下产生不同的移动速率而被分离的方法,将尿蛋白按其相对分子质量的大小顺序彼此分离,来判断患者的尿蛋白谱(尿蛋白的性质与构成)。故本文选用 SDS-PAGE 垂直式平板电泳法,分析尿标本中蛋白质的组分,探讨其在 IgA 肾病中的临床意义及可能的病理生理作用。研究发现,低相对分子质量



1,4,5,7:小球性尿蛋白组;2: 23×10^3 尿蛋白组;3,6:生理性尿蛋白组;8: 10×10^3 尿蛋白组。

图 1 根据 SDS-PAGE 分型的 4 种尿蛋白类型

2.3 两组肾小管间质损害评分比较 IgA 肾病混合性尿蛋白 10×10^3 组患者与混合性尿蛋白 23×10^3 组患者肾小管间质损害评分分别为 (5.13 ± 2.85) 分与 (2.30 ± 2.41) 分,前者与后者比较,肾小管间质损害评分明显升高($P < 0.05$)。

2.4 两组 24 h 尿蛋白定量比较 IgA 肾病混合性尿蛋白 10×10^3 组患者与混合性尿蛋白 23×10^3 组患者 24 h 尿蛋白定量分别为 $(5.14 \pm 3.15) \text{g}$ 与 $(3.12 \pm 1.55) \text{g}$,前者与后者比

尿蛋白与 IgA 肾病患者的进展和预后关系紧密,低相对分子质量尿蛋白在 IgA 肾病中的重要性日益受到关注^[15-16]。有研究表明,肾小管间质损害在 IgA 肾病进展中起重要作用,可加速肾功能恶化,对于 IgA 肾病预后具有重要影响^[17-19]。学者们指出,低相对分子质量尿蛋白生理情况下可不受限制地从肾小球滤过膜滤出,并被肾小管上皮细胞全部重吸收^[20-21]。随疾病的发展,肾小球滤过膜选择性受损,中、高相对分子质量尿蛋白从肾小球漏出至肾小管腔,他们之间及与低相对分子质量尿蛋白之间存在肾小管重吸收的竞争,当重吸收机制出现饱和时,生理情况下可重吸收的低相对分子质量尿蛋白便在这种病理情况下逃脱肾小管的重吸收而出现在尿液中。而肾近曲小管上皮细胞也在持续的滤出蛋白超负荷下受到损害,发生结构破坏,并激活细胞因子及生长因子瀑布效应,引起肾间质细胞浸润及纤维化,从而导致肾小管上皮细胞的重吸收机制进一步受损,导致低相对分子质量尿蛋白逃脱肾小管重吸收现象加重。因此,尿液中的低相对分子质量蛋白与小管细胞损害程度及整体小管间质损害紧密相关,理论上能较可靠地反映 IgA 肾病患者小管间质损害的严重程度。因此,本研究重点比较了混合性蛋白尿 23×10^3 组和混合性蛋白尿 10×10^3 组两种类型尿蛋白患者的肾脏病理损害及临床指标。本研究发现,肾小管间质损害评分、24 h 尿蛋白定量及 Scr 水平, 10×10^3 组均较 23×10^3 组升高,说明相比较于 23×10^3 组尿蛋白, 10×10^3 组尿蛋白与肾小管间质损害、肾功能损害更密切相关。已有学者发现^[15],相对分子质量为 11.8×10^3 的 β_2 微球蛋白与 IgA 肾病患者尿蛋白及 Scr 水平紧密相关,可指导 IgA 肾病患者的预后,与本研究结果一致。因为肾活检是一种侵袭性检测手段,并只能反映很少一部分肾组织的状况。因此,SDS-PAGE 作为一种无创性检测手段, 10×10^3 组尿蛋白对判断 IgA 肾病患者肾小管间质损害的程度具有重要的诊断意义,可以作为判断 IgA 肾病患者肾小管间质损害程度的指标。但本研究因病例数较少, IgA 肾病与低相对分子质量尿蛋白的关系尚需进一步的研究。

综上所述,SDS-PAGE 分型 10×10^3 组尿蛋白对判断 IgA 肾病患者肾小管间质损害程度有临床意义,其作为一种非有创性检测手段,可以作为判断 IgA 肾病患者肾小管间质损害程度的指标。

参考文献:

- [1] 程媛,樊均明. IgA1 异常糖基化在 IgA 肾病发病机制中的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(10): 921-923.
- [2] 谢院生,陈香美. IgA 肾病病情评估及预后判断的无创生物标志物[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(5): 377-380.
- [3] Woo KT, Lau YK, Yap HK, et al. 3rd College of Physicians' lecture-translational research; From bench to bedside and from bedside to bench; incorporating a clinical research journey in IgA nephritis (1976 to 2006) [J]. Ann Acad Med Singapore, 2006, 35(10): 735-741.
- [4] Bazzi C, Petrini C, Rizza V, et al. A modern approach to selectivity of proteinuria and tubulointerstitial damage in nephrotic syndrome [J]. Kidney Int, 2000, 58(4): 1732-1741.
- [5] Walsh M, Sar A, Lee D, et al. Histopathologic features aid in predicting risk for progression of IgA nephropathy [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2010, 5(3): 425-430.
- [6] 刘小荣,沈颖,伏利兵. 肾小管间质损害与儿童 IgA 肾病进展的关系[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(19): 1497-1499.
- [7] 孙梅,许菲菲,刘毅,等. 来氟米特联合激素治疗伴肾小管间质损害的 IgA 肾病临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 12(7): 630-631.
- [8] Maeng YI, Kim MK, Park JB, et al. Glomerular and tubular C4d depositions in IgA nephropathy: relations with histopathology and with albuminuria [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(5): 904-910.
- [9] Jafar TH, Stark PC, Schmid CH, et al. Proteinuria as a modifiable risk factor for the progression of non-diabetic renal disease [J]. Kidney Int, 2001, 60(3): 1131-1140.
- [10] 李卫国,陈洪宇. CKD 方联合氯沙坦钾治疗慢性肾脏病蛋白尿的临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(9): 819-820.
- [11] 朱伟钟,钟贤,黄芪治疗慢性肾小球疾病概况[J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(1): 132-133.
- [12] Erkan E. Proteinuria and progression of glomerular diseases [J]. Pediatr Nephrol, 2013, 28(7): 1049-1058.
- [13] 芦怡舟. 肾小球疾病与肾间质损伤[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2009, 18(3): 260-265.
- [14] 赵惠临. 尿蛋白电泳对肾损伤诊断的价值[J]. 山西医药杂志, 2013, 42(8): 951-952.
- [15] Shin JR, Kim SM, Yoo JS, et al. Urinary excretion of β_2 -microglobulin as a prognostic marker in immunoglobulin A nephropathy [J]. Korean J Intern Med, 2014, 29(3): 334-340.
- [16] D'Amico G, Bazzi C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, 12(6): 639-643.
- [17] 杨军,刘云,郭明好,等. 肾小管间质损害在 IgA 肾病中的临床价值[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(1): 56-58.
- [18] Cattran DC, Coppo R, Cook HT, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification [J]. Kidney Int, 2009, 76(5): 534-545.
- [19] Peters HP, van den Brand JA, Wetzels JF. Urinary excretion of low-molecular-weight proteins as prognostic markers in IgA nephropathy [J]. Neth J Med, 2009, 67(2): 54-61.
- [20] D'Amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria [J]. Kidney Int, 2003, 63(3): 809-825.
- [21] Bazzi C. Composition of proteinuria in primary glomerulonephritides: association with tubulo-interstitial damage, outcome and response to therapy [J]. G Ital Nefrol, 2003, 20(4): 346-355.