

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.28.006

白细胞介素 17 在 IgA 肾病中引起 IgA1 糖基化异常的作用研究

林佳如^{1,2}, 樊均明^{1,2}

(1. 成都中医药大学中西医结合临床学院 610075; 2. 西南医科大学附属第一医院肾病内科, 四川泸州 646000)

[摘要] 目的 对 Th17 细胞的主要细胞因子白细胞介素 17(IL-17)参与介导 IgA 肾病(IgAN)中 B 淋巴细胞增殖及 IgA-1 异常糖基化的过程进行初步研究。方法 以体外培养的 DAKIKI 细胞为研究对象,在剂量效应分析中,以 5~320 ng/mL 的 IL-17 作用 48 h,在时间效应分析中以 160 ng/mL IL-17 刺激 24,48,72 h,细胞计数法和 CCK-8 法检测细胞增殖状况,酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 DAKIKI 细胞培养上清液中 IgA1 的水平,HAA 凝集素检测 IgA1 糖基化异常程度。结果 CCK-8 和细胞计数法显示,5~320 ng/mL 浓度范围的 IL-17 均可明显刺激 B 淋巴细胞增殖($P<0.05$);ELISA 及 HAA 检测结果显示,与对照组相比,IL-17 可引起 DAKIKI 细胞培养上清液中 IgA1 水平及异常糖基化的明显增加($P<0.05$)。结论 IL-17 呈时间和剂量依赖性刺激 B 淋巴细胞的增殖和 B 淋巴细胞分泌 IgA1,并且 IL-17 刺激 B 淋巴细胞增生的同时,诱导 IgA1 的低糖基化异常。

[关键词] 白细胞介素 17;肾小球肾炎,IGA;B 淋巴细胞;糖基化**[中图分类号]** R692.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)28-3907-03**Effects of IL-17 in IgA nephropathy induced underglycosylation of IgA1**Lin Jiaru^{1,2}, Fan Junming^{1,2}

(1. Clinical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610075, China;

2. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Southwest Medical University, LuZhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of IL-17 on the production and underglycosylation of IgA1 in a B cell line in IgA nephropathy. **Methods** DAKIKI cells, which was isolated from B lymphocytes and had the function of secretory IgA, was cultured and treated with different concentrations of IL-17(5, 10, 20, 40, 160, 320 ng/mL) for 48 h, 160 ng/mL IL-17 for different times (24, 48, 72 h). Then the cell proliferation was examined by cell counting and CCK-8. The production and glycosylation of IgA1 in supernatants were determined by ELISA and helix aspersa(HAA) lectin binding assay, respectively. **Results** The cell counting and CCK-8 results suggested that the 5—320 ng/mL concentration range of IL-17 could significantly stimulate B lymphocyte proliferation($P<0.05$). ELISA and HAA test results showed that compared with the control group, IL-17 could cause DAKIKI cell culture supernatant IgA1 content and abnormal glycosylation significantly increased($P<0.05$). **Conclusion** IL-17 can stimulate the B lymphocyte proliferation and secretion of IgA1 in time and dose dependent and accompanied by increased IgA1 production in vitro, while it also induced underglycosylation of IgA1.

[Key words] interleukin-17; glomerular nephritis, IGA; B lymphocytes; glycosylation

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)是全球范围内最常见的肾小球疾病,其临床表现多种多样,主要表现为血尿,几乎所有患者均表现有血尿。大约 25%~50% 的患者在疾病诊断后 25 年内发展到终末期肾衰竭(ESRD);患者即使接受肾移植,仍有超过 50% 的患者在肾移植术后 2 年内 IgAN 复发。IgAN 在欧美国家发病率约为 10%,在日本等东南亚地区和澳大利亚其构成比最高为 30%~40%^[1]。在我国 IgAN 占原发性肾小球疾病的 45.26%,约 26.69% 的 ESRD 患者为 IgAN 所致。IgAN 最早被认为是 IgA-IgG 免疫复合物沉积于肾脏导致的疾病,但是随着研究的深入,人们逐渐认识到糖基化异常的 IgA1 是引起 IgAN 的惟一抗体,从而最终形成免疫复合物沉积在肾小球系膜区,引起肾功能损伤^[2]。然而,以肾小球系膜区 IgA 沉积为特点的 IGA 肾病的发生机制尚未完全了解。近年研究发现,IgA1 分子糖基化异常在 IgAN 的发病机制中发挥着关键作用。

Th17 细胞是新近发现的一类不同于 Th1 和 Th2 细胞的第三类辅助性 T 细胞亚群,Th17 细胞可产生大量的白细胞介素 17(IL-17),Th17 细胞介导的绝大多数生物学效应都是通过 IL-17 起作用。在多发硬化患者中,IL-17 水平增加与病情

恶化相关;而在小鼠模型中诱导 Th17 细胞反应,可促进自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的发生。在银屑病中,IL-17 mRNA 水平与疾病活动性相关;在类风湿性关节炎中,滑膜中 IL-17 水平与关节损伤严重程度相关^[3]。总之,目前已有大量研究结果均提示 Th17 细胞可能参与自身免疫性疾病的发生、发展。

同样作为自身免疫性疾病的 IgAN,Th17 细胞是否也在其自身免疫发病机制中发挥作用,目前尚无相关研究报道。但早在 2005 年发现 Th17 细胞以前,Matsumoto 等^[4-5]、Harrington 等^[6]报道在表现为肾病综合征的 IgAN 患者尿液中 IL-17 水平明显增加;而由 IgAN 患者体内分离出的外周血单核细胞(PBMC)给予 IL-17 刺激后,促炎症性细胞因子释放明显增多^[4-6]。上述研究结果提示 IL-17 可能参与 IgAN 的发病。Lin 等^[7]研究发现,在 IgAN 患者的血清中,IL-17 的表达逐步增多,且 IgAN 患者血清中 IL-17 的表达水平与 24 h 蛋白尿呈正相关^[7]。以上结果提示 IL-17 可能是 IgAN 免疫发病机制及进展的重要因素之一。本研究进一步探讨 Th17 细胞及其主要效应因子 IL-17 参与介导 IgAN 的分子机制,特别是与 IgA1 分子糖基化异常相关的生物学机制,从而为 IgAN 自身免疫发病机制及防治研究提供新的实验证据和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 DAKIKI 细胞株(ATCC 公司,美国);重组人 IL-17(R&D Systems,公司,美国);5-Azacytidine(公司,美国);脂多糖(LPS)、HAA 凝集素、辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗 ExtrAvidin(Sigma,美国);胎牛血清(SH30070, Hyclone 公司,美国);RPMI-1640 培养基(Gibco 公司,美国);羊抗人 IgA 抗体、HRP 标记羊抗人 IgA 抗体(Southern Biotechnology Associates 公司,美国);神经氨酸酶(Roche,德国);CCK-8 试剂盒(KGA317,凯基生物科技发展有限公司,中国);多功能酶标仪(Infinite M200,TE-can 公司,瑞士);紫外分光光度计(Nano Drop ND1000,Thermo Fisher,美国)。

1.2 方法 探讨 IL-17 对 DAKIKI 细胞的增殖,以及刺激 IgA1 分泌及糖基化异常的机制,并进行剂量[IL-17 组(观察组):5、10、20、40、80、160、320 ng/mL]、时间(测定 3 个时间点,分别为 24、48、72 h)]依赖分析。

1.2.1 CCK-8 法检测细胞增殖 根据实验要求,待刺激结束后,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ L;将培养板置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后,酶标仪上 450 nm 波长处检测光密度(OD)值。

1.2.2 酶联吸附免疫法(ELISA)检测 IgA1 浓度 通过包被一抗、封闭、加样(每孔加入 50 μ L,设置 3 个重复孔)、孵育二抗、显色后在 10 min 内用酶标仪在 450 nm 波长处读取 OD 值。所有的 OD 值减去空白孔的 OD 值再进行计算,以标准品的浓度为横坐标及所测得的 OD 值为纵坐标,利用 Curve Expert 软件绘制标准曲线;再根据标准曲线计算样品的 IgA1 浓度。

1.2.3 HAA 凝集素结合试验检测 IgA1 低糖基化程度 通过包被一抗、封闭、加样(每孔加入 50 μ L,设置 3 个重复孔)、神经氨酸酶处理、孵育二抗、显色后在 10 min 内用酶标仪在 450 nm 波长处读取 OD 值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行数据统计,计量资料

采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IL-17 对 B 淋巴细胞的增殖作用

2.1.1 细胞计数检测 IL-17 对 B 淋巴细胞增殖影响 在剂量依赖实验中,用 5~320 ng/mL 的 IL-17 刺激培养 B 淋巴细胞 48 h,细胞计数结果显示:与对照组(未添加 IL-17 刺激)比较,不同浓度的 IL-17 均可促进 B 淋巴细胞的增殖,但 320 ng/mL 较 160 ng/mL 组效果好,见表 1。在时间依赖实验中,采用 160 ng/mL 的 IL-17 分别刺激培养 B 淋巴细胞 24、48、72 h,细胞计数结果显示,与各对应时间点的对照组相比,IL-17 组均出现细胞数量明显增多,见表 1。

2.1.2 CCK-8 检测 IL-17 对 B 淋巴细胞增殖的影响 用 5~320 ng/mL 的 IL-17 刺激培养 B 淋巴细胞 48 h,CCK-8 法检测细胞增殖状况,OD 值越高表示增殖细胞越多。检测结果显示,与对照组相比,不同浓度范围的 IL-17 均可明显刺激 B 淋巴细胞增殖,见表 2。

2.2 IL-17 对 B 淋巴细胞分泌 IgA1 浓度的影响 在剂量依赖实验中,将 5~320 ng/mL 的 IL-17 刺激 B 淋巴细胞培养 48 h,采用 ELISA 的方法检测细胞上清液中 IgA1 的。ELISA 结果用 OD 值表示,值越高代表上清液中的 IgA1 浓度越高。由结果可见,B 淋巴细胞在 5~320 ng/mL 的 IL-17 刺激作用下,IgA1 的分泌量出现明显增高,并随 IL-17 浓度的增加呈现明显的剂量-效应关系,见表 1。在时间依赖实验中,采用 160 ng/mL 的 IL-17 刺激 B 淋巴细胞培养 24、48、72 h,分别与同一时间点的对照组细胞进行比较。ELISA 结果显示,细胞培养上清液中 IgA1 的浓度在 24 h 时无明显变化($P > 0.05$),随着时间的延长,在 48 h 和 72 h 时出现明显增高($P < 0.05$),见表 2。

表 1 时间依赖实验中 160 ng/mL、IL-17 不同作用时间对 B 淋巴细胞增殖作用、分泌 IgA1 能力及 IgA1 异常糖基化作用的影响($\bar{x} \pm s$)

时间	组别	细胞直接计数(1×10^5 /孔)	上清液 IgA1 水平(OD 值)	IgA1 HAA 凝集素结合能力(OD 值)
24 h	对照组	2.563 \pm 0.155	0.586 \pm 0.01	0.623 \pm 0.006
	160 ng/mL 组	6.360 \pm 0.246 ^b	0.593 \pm 0.005	0.775 \pm 0.003 ^b
48 h	对照组	4.703 \pm 0.185	0.742 \pm 0.035	0.685 \pm 0.004
	160 ng/mL 组	11.367 \pm 0.295 ^b	0.860 \pm 0.030 ^a	0.789 \pm 0.005 ^a
72 h	对照组	6.853 \pm 0.107	1.039 \pm 0.028	0.820 \pm 0.017
	160 ng/mL 组	12.307 \pm 0.255 ^b	1.118 \pm 0.017 ^a	0.827 \pm 0.007

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,与对照组比较。

表 2 剂量依赖实验中不同剂量 IL-17 对 B 淋巴细胞增殖作用、分泌 IgA1 能力及 IgA1 异常糖基化作用的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞直接计数(1×10^5 /孔)	CCK-8 检测结果(OD 值)	上清液 IgA1 水平(OD 值)	IgA1 HAA 凝集素结合能力(OD 值)
对照组	4.543 \pm 0.206	0.515 \pm 0.013	0.722 \pm 0.007	0.529 \pm 0.002
观察组				
5 ng/mL 组	7.312 \pm 0.228 ^b	0.543 \pm 0.007 ^b	0.830 \pm 0.018 ^b	0.545 \pm 0.002
10 ng/mL 组	7.737 \pm 0.269 ^b	0.591 \pm 0.002 ^b	0.837 \pm 0.039 ^b	0.558 \pm 0.019 ^a
20 ng/mL 组	8.300 \pm 0.282 ^b	0.594 \pm 0.002 ^b	0.839 \pm 0.025 ^b	0.571 \pm 0.015 ^b
40 ng/mL 组	10.430 \pm 0.101 ^b	0.584 \pm 0.007 ^b	0.849 \pm 0.016 ^b	0.562 \pm 0.015 ^b
80 ng/mL 组	10.717 \pm 0.140 ^b	0.546 \pm 0.012 ^b	0.841 \pm 0.035 ^b	0.561 \pm 0.013 ^a
160 ng/mL 组	11.603 \pm 0.323 ^b	0.559 \pm 0.015 ^b	0.845 \pm 0.015 ^b	0.602 \pm 0.018 ^b
320 ng/mL 组	5.307 \pm 0.289 ^b	0.545 \pm 0.004 ^b	0.864 \pm 0.033 ^b	0.564 \pm 0.007 ^b

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,与对照组比较。

2.3 IL-17 对 B 淋巴细胞分泌的 IgA1 糖基化的影响 在剂量依赖实验中,采用 HAA 凝集素结合实验检测细胞上清液中 IgA1 的丰乳糖基转移酶(GalNAc)结合凝集素的能力,OD 值越高表示 IgA1 分子的低糖基化程度越高。结果显示,与对照组比较,5 ng/mL 的 IL-17 对 IgA1 分子的糖基化异常影响差异无统计学意义($P>0.05$),10~320 ng/mL 的 IL-17 均可明显促进 IgA1 的低糖基化($P<0.05$),在 160 ng/mL 时达到了峰值,随后进一步提高 IL-17 浓度,IgA1 的低糖基化反而出现一定程度的下调,见表 1。在时间依赖实验中,作者采用 160 ng/mL 的 IL-17 刺激 B 淋巴细胞培养 24、48、72 h,每组与同一时间点的对照组比较,HAA 凝集素结合实验结果显示,在 24、48 h 组上清液中 IgA1 的浓度均较同一时间点的对照组高($P<0.01$),但在 72 h 组上清液中 IgA1 的浓度与差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

3 讨 论

IgAN 是世界范围内尤其是亚洲地区最常见的导致慢性肾衰竭的原发肾小球疾病之一。其发病涉及遗传、免疫等多种复杂因素,机制尚未完全明了。IgAN 病理是以系膜区 IgA 沉积为特征的系膜增生性肾小球肾炎,IgAN 的始发因素是系膜区 IgA 的沉积,其主要为多聚 IgA1 (pIgA1) 沉积,伴或不伴 IgG、IgC3 沉积。众多研究已证明 IgAN 患者血清、肾小球系膜区及尿液的循环免疫复合物中均存在异常糖基化 IgA 分子^[8-10]。

而引起低糖基化 IgA1 分子形成的原因主要是由于糖基化酶异常可产生 N-乙酰半乳糖胺末端半乳糖基化通过细胞内半乳糖基转移酶[主要是 β -1,3 半乳糖基转移酶(C1GALT1)]催化,且需其伴侣蛋白 Cosmc 的辅助,最终由唾液酸酶催化半乳糖唾液酸化形成糖链。研究发现在 IgAN 患者的 PBMC、扁桃体组织及扁桃体 B 淋巴细胞中 C1GALT1 及其伴侣蛋白 Cosmc 的蛋白表达水平及基因表达水平都是降低的^[11-13]。同时,扁桃体 B 淋巴细胞的 C1GALT1 基因表达水平和 IgAN 患者的临床表现[如肾小球滤过率(GFR)、蛋白尿及组织损伤评分等]是显著相关的^[11]。在作者的早期研究中也发现 IgAN 患者外周血中 B 淋巴细胞 Cosmc mRNA 表达水平显著低于对照组,且与蛋白尿成负相关,提出 IgAN 患者 IgA1 O-糖基化异常可能是外周血 B 淋巴细胞 Cosmc mRNA 表达下降所致,外周血 B 淋巴细胞 Cosmc mRNA 表达下降可能是 IgAN 发病机制之一^[14]。

IL-17 是一种强大的前炎性细胞因子,也是炎性反应的微调因子,可促进中性粒细胞和单核细胞的募集,引起炎症细胞浸润和组织损伤,参与肾脏炎性反应的发生和发展^[15]。笔者将 IL-17 刺激 B 淋巴细胞后发现,IL-17 可促进 B 淋巴细胞的增殖且呈时间和剂量依赖性,并且在促进 B 淋巴细胞增生的同时还引起低糖基化异常的 IgA1 分泌增多。因此在 IgAN 患者的体内,产生糖基化异常的 IgA1 分泌增多的原因可能是由于外源性抗原如各种病毒、幽门螺旋杆菌引起 Th17 细胞的分泌增多,导致 IL-17 分泌增加,从而引起 B 淋巴细胞增生及低糖基化异常的 IgA1 分泌增多,沉积到肾脏引起疾病的发生。

综上所述,IL-17 可诱导 B 淋巴细胞增殖,且作用随浓度梯度而增加,大剂量有一定细胞抑制作用。IL-17 能诱导 B 淋巴细胞分泌 IgA1。IL-17 呈时间和剂量依赖性诱导 B 淋巴细胞分泌低糖基化的 IgA1。

参考文献

[1] Li LS, Liu ZH. 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.

- [2] Novak J, Renfrow MB, Gharavi AG, et al. Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013, 22(3): 287-294.
- [3] Hemdan NY, Birkenmeier G, Wichmann G, et al. Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity [J]. *Autoimmun Rev*, 2010, 9(11): 785-792.
- [4] Matsumoto K, Kanmatsuse K. Interleukin-17 stimulates the release of pro-inflammatory cytokines by blood monocytes in patients with IgA nephropathy[J]. *Scand J Urol Nephrol*, 2003, 37(2): 164-171.
- [5] Matsumoto K, Kanmatsuse K. Increased urinary excretion of interleukin-17 in nephrotic patients[J]. *Nephron*, 2002, 91: 243-249.
- [6] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11): 1123-1132.
- [7] Lin FJ, Jiang GR, Shan JP, et al. Imbalance of regulatory T cells to Th17 cells in IgA nephropathy[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2012, 72(3): 221-229.
- [8] Shimoza TS, Hiki Y, Odani H, et al. Serum udergalactosylated IgA1 is increased in Japanese patients with IgA nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(6): 1931-1939.
- [9] Hiki Y, Odani H, Tajahashi M, et al. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2001, 59(3): 1077-1085.
- [10] Timana M, Novak J, Julian BA, et al. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactosede? Cient hinge region and antiglycan antibodies [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(1): 73-81.
- [11] Inoue T, Sugiyama H, Hiki Y, et al. Differential expression of glycogenes in tonsillar B lymphocytes in association with proteinuria and renal dysfunction in IgA nephropathy[J]. *Clin Immunol*, 2010, 136(3): 447-455.
- [12] Serino G, Sallustio F, Cox SN, et al. Abnormal miR-148b expression promotes aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(5): 814-824.
- [13] He L, Peng Y, Liu H, et al. Activation of the interleukin-4/signal transducer and activator of transcription 6 signaling pathway and homeodomain-interacting protein kinase 2 production by tonsillar mononuclear cells in IgA nephropathy[J]. *Am J Nephrol*, 2013, 38(4): 321-332.
- [14] Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins [J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 635-700.
- [15] Shuai KX, Fu R. IL-17 and kidney diseases [J]. *Int J Pediatr*, 2010, 37(6): 645-647.

(收稿日期:2016-06-18 修回日期:2016-07-06)