

C3aR 过度活化与糖尿病肾病肾组织损伤的关系*

郑敬民^{1)**} 陈德君²⁾ 尹广¹⁾ 赵文紧¹⁾ 李丽娟¹⁾ 王建平¹⁾

¹⁾ 南京军区南京总医院 国家肾脏疾病临床医学研究中心, 全军肾脏病研究所, 南京 210002;

²⁾ 恩泽医疗中心, 浙江省台州医院, 临海 317000)

摘要 C3aR 是补体 C3 裂解产物 C3a 的受体。最近的一些研究提示 C3aR 通路可能参与了糖尿病肾病(DN)的病理过程, 但有关 C3aR 通路在 DN 中的确切病理作用及有关机制远未清楚。需要特别指出的是, 现有的有关 C3aR 参与 DN 肾组织损伤的证据主要来自一些动物模型的研究, 临床上尚缺乏较为系统全面的对 DN 患者肾组织 C3aR 通路及肾组织损伤关系的观察分析。为此, 本文首次以较大的样本量分析了不同病理时期 DN 患者肾组织 C3aR 和 C3a 的表达变化情况及其与 DN 患者肾组织损伤的相关性。在此基础上, 进而利用体外细胞模型, 对高糖环境下 C3aR 活化致肾小球足细胞损伤的作用及机制进行了探讨。结果显示: a. 与正常对照组相比, DN 患者肾组织 C3a 和 C3aR 的表达水平随 DN 的进展而升高, C3aR 在 DN 患者肾组织中的表达上调主要见于肾小管上皮细胞和肾小球足细胞; b. DN 患者肾组织 C3aR 和 C3a 水平与患者肾组织损伤程度, 特别是小管和小管间质损伤程度、肾小球足细胞损伤程度具有显著相关性; c. 外加 C3a 激活 C3aR 可使高糖环境中的足细胞的细胞骨架发生明显改变、足细胞标记分子表达下调、足细胞通透性增加。这些结果说明: a. DN 患者肾组织中确实存在 C3a/C3aR 轴过度活化的现象; b. C3a/C3aR 轴的过度活化很可能在 DN 患者肾组织损伤, 特别是小管和小管间质损伤、肾小球足细胞损伤中具有重要作用; c. 可能通过破坏成熟足细胞特有的细胞骨架, 改变足细胞标记分子表达, 增加足细胞的通透性, C3a/C3aR 轴过度活化参与 DN 足细胞损伤过程。本文不仅为 C3a/C3aR 通路参与 DN 病理过程提供了新的必不可少的临床证据, 也增加了对 C3a/C3aR 通路过度活化致 DN 患者肾组织损伤机制, 特别是肾小球足细胞损伤机制的了解, 这对于拓展对 DN 病理机制的认识, 发展 DN 防治新思路, 无疑都是有益的。

关键词 C3a, C3aR, 糖尿病肾病, 足细胞, 表达, 病理意义

学科分类号 Q5, R36, R58

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0217

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最严重的并发症和死亡原因之一^[1-2]。虽然经过多年的研究, 对 DN 的认识和诊断治疗水平均已有了很大的提高, 但有关 DN 的病理机制仍不完全清楚, 现有治疗措施仅能部分延缓 DN 进程, 而不能从根本上治愈 DN。进一步开展 DN 病理机制研究, 寻找 DN 防治新靶标, 对于提高 DN 诊疗水平非常必要。

近年来, 在 DN 观念上有了一个突破性进展: DN 是一种慢性炎症性疾病。而补体系统在 DN 中的作用也正引起越来越多研究者的关注^[3-5]。但目前对于 DN 炎症机制和补体系统参与 DN 的机制仍不是很清楚。

C3aR 是补体 C3 裂解产物 C3a 的受体。有关 C3aR 在免疫相关性疾病中的作用已有不少报道^[6-7]。

但近年来的研究表明, C3aR 也表达于一些非免疫细胞, 且在不同的生理、病理情景中表现出了多种多样的功能^[8-12]。最近 Li 等^[13-14]报道 C3aR 拮抗剂可减轻 DN 模型大鼠肾损伤, 提示 C3aR 通路可能参与了 DN 的病理过程。但从我们查阅的文献来看, 有关 C3aR 通路参与 DN 的临床观察资料却很少: 现有临床资料主要对 DN 患者血、尿标本中补体成分水平与 DN 的关系进行了分析^[4-5], 尚未见较为系统全面的有关 DN 患者肾组织 C3a 和 C3aR 表达变化情况及其与 DN 发生、发展关系的分析报道。为

* 国家自然科学基金(81370828)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 025-80863792, E-mail: zzjmm7713@sina.com

收稿日期: 2017-12-11, 接受日期: 2018-05-21

了探讨 C3aR 通路在 DN 中的作用, 了解其在 DN 发生、发展过程中的病理意义, 本文分析了不同病理时期 DN 患者肾组织中 C3aR 和 C3a 的表达情况, 并结合有关文献和体外细胞模型研究, 对 C3a/C3aR 通路活化在 DN 中的病理意义进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 病例选择及分组

本研究共包括 2009~2014 年在南京军区南京总医院肾脏病科住院并经肾活检证实为 2 型 DN 的病例共 70 例。所有病例符合世界卫生组织关于 2 型糖尿病的标准, 且肾活检符合 DN 的诊断标准, 并排除并发其他肾脏疾病。根据患者的临床及病理特点分为微量白蛋白尿期组(microalbuminuria stage group, MG)、显性蛋白尿期组(proteinuria stage group, PG)和肾功能不全期组(renal insufficiency stage group, RIG)。其中 MG 患者在临床上仅表现

为微量白蛋白尿($30\text{ mg} < 24\text{ h}$ 尿白蛋白排泄 $< 300\text{ mg}$), 肾组织病理主要表现为轻到中度的系膜扩张和肾小球基底膜增厚, 小管及小管间质损伤轻度(间质纤维化和小管萎缩评分不大于 2 分); PG 患者 24 h 尿白蛋白排泄 $\geq 300\text{ mg}$, 同时根据 MDRD 公式估算的肾小球滤过率 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) $\geq 60\text{ ml}/(\text{min} \cdot 1.73\text{ m}^2)$; 而 RIG 患者除满足其他所有 DN 条件外, 表现为肾功能不全 (eGFR $< 60\text{ ml}/(\text{min} \cdot 1.73\text{ m}^2)$)。13 例 (7 男 6 女, 平均年龄为 (51 ± 13) 岁) 因患肾癌而进行肾脏切除患者的癌旁正常肾组织作为正常肾组织对照。所有涉及人体组织标本的实验符合有关人体实验的标准和 Helsinki 宣言标准 (declaration of Helsinki), 并经南京军区南京总医院伦理委员会批准 (伦理批准号 2013GJJ-100)。所有参与者知情同意。表 1 所示的是各组 DN 患者的临床病理指标情况。

Table 1 Clinical and pathological variables of participating patients

Parameters	Microalbuminuria stage group	Proteinuria stage group	Renal insufficiency stage group
N	19	19	32
Age/years	53(45~58)	52(45~62)	54(49~62)
Duration of diabetes mellitus/months	60(36~80)	96(36~180)	132(84~189)**
Male/female	9/10	8/11	17/15
Body mass index	24.4±3.5	25.5±2.9	25.7±2.9
Fasting blood glucose/(mmol·L ⁻¹)	7.0(6.4~7.6)	7.1(5.6~7.9)	6.9(5.5~8.4)
Postprandial blood glucose/(mmol·L ⁻¹)	10.3(9.5~13.0)	10.5(9.1~12.4)	11.9(10.7~13.5)
Glycated hemoglobin/%	7.7±1.3	7.6±1.2	7.4±1.3
Glycated hemoglobin (mmol/mol)	60.3±14.0	59.9±13.5	57.3±14.6
Serum creatinine/(μmol·L ⁻¹)	58.3(53.9~76.9)	69.0(65.4~91.1)	143.7(122.7~203.3)**###
Serum albumin/(g·L ⁻¹)	44.4(42.9~47.1)	37.2(30.2~39.9)**	34.0(28.7~38.6)**
Serum urea nitrogen/(mg·L ⁻¹)	136(115~166)	156(126~202)	271(229~379)**##
Hemoglobin/(g·L ⁻¹)	134.2±19.8	120.4±16.6*	108.8±14.6**#
Serum cholesterol/(mmol·L ⁻¹)	4.1(3.8~5.3)	5.3(3.9~6.8)	5.9(4.4~6.4)**
Serum triglyceride/(mmol·L ⁻¹)	1.5(1.0~1.9)	2.1(1.2~3.2)	1.9(1.2~3.2)
Urine RBP/(mg·L ⁻¹)	0.3(0.1~0.5)	0.6(0.2~2.8)*	4.2(1.6~15.3)**##
Urine NAG (U·g ⁻¹)	14.9(8.5~24.3)	36.4(19.1~48.8)**	34.7(21.4~49.6)**
Proteinuria (g·24 ⁻¹ h ⁻¹)	0.3(0.2~0.4)	1.3(0.8~4.5)**	2.9(2.3~5.0)**
e-GFR (ml/min ⁻¹ ·1.73 ⁻¹ m ⁻²)	107(100~118)	85(74~107)	38(29~48)**##
systolic blood pressure/mm Hg	130(110~141)	138(130~150)	140(130~156)
diastolic blood pressure/mm Hg	80(70~85)	80(76~90)	84(79~90)
Hypertension N/(%)	8(42.1%)	17 (89.5%)	30 (93.8%)
Glomerular lesions			
Class II a N/(%)	13 (68.4 %)	2(10.5%)	0 (0%)
Class II b N/(%)	4(21.1 %)	5 (26.3%)	9 (28.1%)
Class III N/(%)	2 (10.5%)	11 (57.9%)	18 (56.3%)
Class IV N/(%)	0 (0%)	1 (5.3%)	5 (15.6%)

Continued

Parameters	Microalbuminuria stage group	Proteinuria stage group	Renal insufficiency stage group
Interstitial lesions(score)			
fibrosis and tubular atrophy			
Score=1 N(%)	15(78.9%)	6(31.6%)	3(9.3%)
Score=2 N(%)	4(21.1%)	13(68.4%)	16(50.0%)
Score=3 N(%)	0(0.0%)	0(0.0%)	13(40.6%)
interstitial inflammation			
Score=0 N(%)	3(15.8%)	0(0.0%)	0(0.0%)
Score=1 N(%)	15(78.9%)	16(84.2%)	13(40.6%)
Score=2 N(%)	1(5.3%)	3(15.8%)	19(59.4%)
Vascular lesions (score)			
arteriolar hyalinosis			
Score=0 N(%)	2(10.5%)	0(0%)	0(0%)
Score=1 N(%)	9(47.4%)	6(31.6%)	5(15.6%)
Score=2 N(%)	8(42.1%)	13(68.4%)	27(84.4%)
arterioscleroti			
Score=0 N(%)	3(15.8%)	1(5.3%)	0(0.0%)
Score=1 N(%)	14(73.7%)	8(42.1%)	10(31.3%)
Score=2 N(%)	2(10.5%)	10(52.6%)	22(68.7%)

Data are presented as mean $\pm$ SD for continuous variables with normal distribution, median (interquartile range) for continuous variables without normal distribution and absolute value and percentage for frequency of categorical variables. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs microalbuminuria stage group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs proteinuria stage group.

1.2 肾组织病理分析方法

参照 Tervaert 等^[15]介绍的方法对每位患者的肾小球和小管及间质损伤情况进行评分, 分别表示为肾小球损伤评分(glomerular injury score, GIS)、间质纤维化和小管萎缩评分(interstitial fibrosis and tubular atrophy score, IFTAS)。根据 HE 染色时炎症细胞的形态学特点对小管间质炎症细胞进行计数, 每一切片随机选取皮质区的 10 个区域, 计数炎症细胞数并测量相应区域内的小管及间质区面积, 计算炎症细胞密度。根据足细胞所处的位置和 PAS 染色特点辨别并计数每个小球的足细胞。每张切片随机选取 10 个近似正切的小球, 计数每小球平均足细胞数。小管间质相对体积(relative tubular interstitial volume, RIV)的测量参照 Okon 等^[16]介绍的方法进行。每张切片随机测量 10 个皮质区区域的 RIV, 计算平均值。小管及小管间质面积的测量采用 NIS Element BR3.4 software (购自 Nikon 公司)进行。

1.3 肾组织 C3aR 免疫组化染色方法

肾组织 C3aR 免疫组化染色按常规方法进行^[17]。所用的兔抗人 C3aR 抗体购自 Santa Cruz 公司, 使用时作 1:200 稀释。

1.4 肾组织 C3a 免疫荧光染色及半定量分析方法

按常规方法进行。简单过程如下: 肾组织冰冻切片经 10%新生牛血清封闭 1 h 后, 与小鼠抗人 C3a/C3a des Arg 抗体(购自 Abcam 公司, 使用时作 1:50 稀释)室温孵育 4 h。PBS 洗 3 次后, 与 FITC 标记的兔抗小鼠 IgG 抗体孵育 45 min。PBS 洗 3 次后, 以 DAPI 对切片细胞核进行染色。PBS 充分洗涤后, 封片置激光共聚焦显微镜下观察。根据 C3a 免疫荧光染色强度, 对 C3a 在肾小球和小管及间质中的水平进行半定量评分: 0 分, 无明显阳性着色。1 分, 有轻度阳性着色。2 分, 有中度阳性着色。3 分, 有较强的阳性着色。

1.5 对同一切片的 WT1 免疫荧光和 C3aR 免疫组化染色及观察方法

多聚甲醛固定的石蜡切片经常规脱蜡、复水、以高压锅高压的方法进行抗原修复、以 10%小牛血清进行封闭后, 与兔抗人 C3aR 抗体(来源同上, 使用时作 1:100 稀释)孵育 4 h。PBS 洗 3 次后, 与 HRP 标记的二抗(购自 Quanhui 公司)孵育 45 min。经 PBS 洗涤后, 与小鼠抗人 WT1 抗体(购自 LSBio 公司, 使用时作 1:10 稀释)孵育 2 h。切片经 PBS 洗 3 次后, 与 FITC 标记的兔抗小鼠 IgG 抗体孵育

45 min. PBS 洗涤后, 以甘油溶液封片, 于荧光显微镜下观察并摄影. 完成摄影后, 以 PBS 洗去甘油溶液, 以二氨基联苯胺(diaminobenzidine)进行显色, 最后对切片进行苏木素复染, 封片后置光镜下观察和摄影.

1.6 肾组织 C3aR 表达水平的免疫组化半定量分析方法

采用 Image-pro Plus 6.0 软件(Media Cybernetics 公司产品)进行. 小管 C3aR 水平以单位面积积分光密度(integral optical density, IOD)表示, 小球 C3aR 水平以免疫组化染色强度表示. 每切片随机选取皮质区 10 个高倍视野和 10 个近似正切的肾小

球分别测量小管和小球 C3aR 水平.

1.7 人足细胞系来源及培养方法

人足细胞系 HPC 系 Saleem 教授所赠, 具体培养方法完全参照文献[18]进行.

1.8 RNA 提取及 RT-PCR

利用 Ambion 公司的 Trizol 试剂提取细胞总 RNA. 利用 Takata 公司的 PrimeScript™ RT Master Mix kit 试剂盒逆转录合成 cDNA. 利用康为公司的 UltraSYBR Mixture 试剂盒进行荧光定量 PCR 分析. 以 18S RNA 作为内参. 所用的引物如表 2 所示.

Table 2 The sequence of primers used in RT-PCR

Gene	Primer sequence (5'→3')	Size/bp
18S	Forward: 5' ttctcgattccgtgggtgg 3'	95
	Reverse: 5' agcatgccagagtctcttc 3'	
C3aR	Forward: 5' tgaagccttcagctactgtctcag 3'	348
	Reverse: 5' ggacaatgatggagggatgag 3'	
Synaptopodin	Forward: 5' cttacggcggtgacatctc 3'	114
	Reverse: 5' acacctgagcctcgatcc 3'	
PCNA	Forward: 5' actaaaatgcccgcaa 3'	98
	Reverse: 5' cttctctggtttgtgcttc 3'	
ILK	Forward: 5' gcagcccgagtcgagagata 3'	95
	Reverse: 5' gcgccgagtcgagagata 3'	
α -SMA	Forward: 5' gacaatggctctgggctctgtaa 3'	194
	Reverse: 5' atgccatgttctatcggtacttca 3'	

1.9 细胞总蛋白质提取和蛋白质印迹分析

利用碧云天生物技术研究生产的蛋白质抽提试剂盒进行细胞总蛋白质提取, 其中的蛋白酶抑制剂来自罗氏公司. 对 C3aR、synaptopodin 和 α -SMA 的蛋白质印迹分析按常规方法进行, 基本过程如下: 细胞总蛋白质经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 以电转移的方法转印至尼龙膜(Merck Millipore 公司产品)上; 转印膜经 5%脱脂奶粉封闭 2 h 后与一抗(包括兔抗人 C3aR 抗体(使用时作 1:1 000 稀释), 山羊抗人 synaptopodin 抗体(使用时作 1:1 000 稀释), 兔抗人 α -SMA 抗体(使用时作 1:500 稀释), 小鼠抗人 GAPDH 抗体(使用时作 1:10 000 稀释))于 4℃下孵育过夜, 充分洗涤后与辣根过氧化物酶标记的二抗于室温孵育 1 h; 充分洗涤后, 利用化学发光的方法进行检测.

1.10 细胞骨架染色和分析方法

利用购自 Sigma-Aldrich 公司的罗丹明标记的

鬼笔环肽进行细胞骨架(F-actin)染色. 具体过程如下: 生长于盖玻片上的 HPC 细胞经 4%多聚甲醛于 4℃固定 30 min 后, 与罗丹明标记的鬼笔环肽室温孵育 40 min; PBS 洗涤后, 细胞经 DAPI 染核、洗涤, 最后以甘油溶液封片并置激光共聚焦显微镜下观察.

1.11 足细胞单层通透性分析

足细胞单层通透性分析采用购自 Fisher Scientific 公司的 24 孔 Transwell 系统进行. 基本过程如下: 生长于 Transwell 半透膜上的 HPC 细胞单层经各种条件处理后, 移去培养液, 并以含 1 mmol/L CaCl_2 和 1 mmol/L MgCl_2 的 PBS 洗涤细胞 2 次, 然后在 Transwell 的上室中加入 300 μl 无血清培养基, 而在下室加入 1 ml 含 1 g/L FITC-BSA (购自 Sigma-Aldrich)的培养基. 37℃孵育 1 h 后, 从上室中吸取 200 μl 培养液转移至 96 孔板中, 于 490 nm 波长处测量荧光强度, 进而计算上室中

FITC-BSA 浓度。

1.12 细胞免疫荧光分析方法

按常规方法进行。具体过程如下：生长于盖玻片上的 HPC 细胞经 4%多聚甲醛 4℃固定 30 min 后，以 0.5% Triton X-100 处理 15 min，以 10%小牛血清封闭 1 h，而后分别与兔抗人 C3aR 抗体 (1:100)、山羊抗人 synaptopodin 抗体 (1:100) 和兔抗人 α -SMA 抗体 (1:50) 孵育 2 h。经 PBS 洗涤后，细胞分别与 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG (一抗为兔源性的) 和驴抗山羊 IgG (一抗为山羊源性的) 孵育 30 min。经 PBS 洗涤和 DAPI 对细胞核进行染色后，封片并置激光共聚焦显微镜下观察。

1.13 统计学分析方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。正态分布的连续数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示；组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验。非正态分布的数据以中位数(四分间距)表示；组间比较采用非参数分析和 Mann-Whitney 检验。双变量相关采用 Spearman 相关分析；多因素分析采用多元线性回归模型，其结果表示为相关系数(95%可信区间)。所有统计学检验均采用双侧检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 C3aR 在不同病理时期 DN 患者肾组织中的表达变化及其与肾组织损伤的相关性

如图 1a, b 所示，在正常对照肾组织，C3aR 主要表达于肾小管上皮细胞，其中在远端小管中的表达水平较其他节段的表达水平相对要高。与此形成对照的是，C3aR 在正常肾小球中的表达水平极低，在我们的免疫组化染色中仅在部分肾小球的足细胞和壁层上皮细胞中观察到有很弱的免疫染色。

与正常对照组相比，C3aR 在 DN 患者肾组织中的表达明显增加(图 1c~e)。C3aR 的表达增加不仅见于小管，也见于小球。此外，我们也观察到 C3aR 在浸润细胞中的表达。总体来看，C3aR 在小管和小球中的表达呈现出一种随 DN 的进展而逐渐增加的趋势(即从 MG (图 1c)到 PG(图 1d)，再到 RIG(图 1e)逐渐增加)。其中 C3aR 在小管中的表达呈现出一种随小管损伤程度增加而增加的趋势：在 MG 患者，C3aR 的表达增加主要见于局灶的萎缩小管；而随着 DN 的进展(在 PG 和 RIG)，更多的小管出现损伤和萎缩，与此同时，C3aR 在更高比

例的小管中高表达。在 DN 患者小球，C3aR 阳性染色主要见于足细胞和壁层上皮细胞的位置。对同一肾组织切片的 C3aR 免疫组化和 WT1 免疫荧光染色显示，DN 患者小球中的 C3aR 主要由 WT1 阳性细胞(即足细胞)所表达(图 1g, h)。早在 MG 患者，就可观察到一些足细胞高表达 C3aR，而随着 DN 的进展(在 PG 和 RIG)，更高比例的足细胞高表达 C3aR。小管和小球中 C3aR 水平随 DN 进展而增加的现象也为免疫组化半定量分析结果所证实(图 1i, j)。

基于双变量相关分析的结果显示：DN 患者小管 C3aR 水平与反映小管损伤程度的指标，包括 RIV($r=0.611$, $P < 0.01$)、IFTAS($r=0.604$, $P < 0.01$)以及小管间质炎症浸润细胞数量($r=0.461$, $P < 0.01$)具有显著相关性，也与反映肾功能损伤程度的指标，包括 eGFR ($r=-0.498$, $P < 0.01$)和血肌酐水平($r=0.521$, $P < 0.01$)显著相关。小管 C3aR 水平与 RIV、IFTAS、eGFR 和血肌酐水平的相关性在排除包括年龄、性别、空腹血糖、餐后血糖、体重指数、糖化血红蛋白、血甘油三酯和血胆固醇在内的这些可能混杂因素后仍然具有显著性，其相关系数(95%可信区间)和 P 值分别是：0.11(0.07~0.16), $P < 0.01$; 0.629 (0.41~0.85), $P < 0.01$; 47.91 (20.84~74.98), $P < 0.01$; -20.47(-31.41~-9.54), $P < 0.01$ 和 40.42(18.57~62.26), $P < 0.01$ 。

DN 患者小球 C3aR 水平与反映小球损伤程度的指标，包括 GIS($r=0.456$, $P < 0.01$)和每个小球的平均足细胞数($r=-0.485$, $P < 0.01$)显著相关，也与 eGFR ($r=-0.285$, $P < 0.05$)和血肌酐水平($r=0.271$, $P < 0.05$)显著相关。小球 C3aR 水平与 GIS、小球平均足细胞数、eGFR 和血肌酐水平的相关性在排除包括年龄、性别、空腹血糖、餐后血糖、体重指数、糖化血红蛋白水平、血甘油三酯和血胆固醇在内的可能混杂因素后仍然具有显著性，其相关系数(95%可信区间)和 P 值分别是：0.29(0.14~0.44), $P < 0.01$; -1.93(-2.78~-1.08), $P < 0.01$; -6.16 (-11.68~-0.64), $P < 0.05$; 16.23(5.58~26.89), $P < 0.01$ 。

2.2 C3a 在 DN 患者肾组织中的表达变化及其与肾组织损伤的相关性

由于所用的 C3a 抗体不能用于石蜡切片的免疫组化染色，我们利用免疫荧光方法对 C3a 在 19 例 DN 患者 (其中 4 例属于 MG, 5 例属于 PG, 10 例属于 RIG) 和 8 例对照肾组织中的表达情况进行

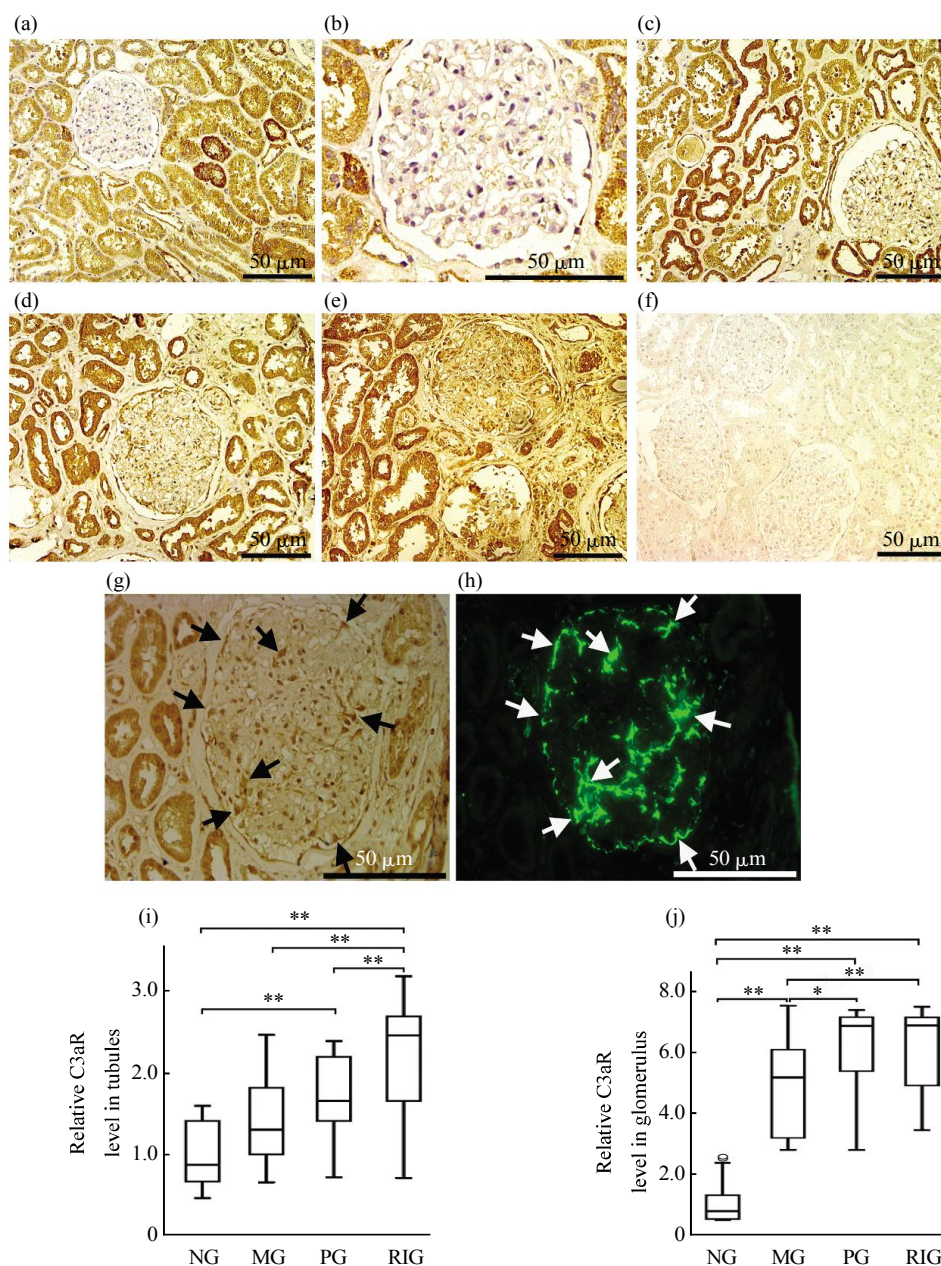


Fig. 1 Results of immunohistochemistry showing that renal expression of C3aR increased with the development of diabetic nephropathy

Sections of renal biopsies from 70 patients with diabetic nephropathy (including microalbuminuria stage group (MG, $n=19$), proteinuria stage group (PG, $n=19$) and renal insufficiency stage group (RIG, $n=32$)) and 13 normal control participants (normal control group, NG) were used in the assay. (a, b) Representative picture from the normal controls. (b) is the partial enlarged view of (a). (c) Representative picture from diabetic nephropathy patients at microalbuminuria stage. (d) Representative picture from diabetic nephropathy patients at proteinuria stage. (e) Representative picture from diabetic nephropathy patients at renal insufficiency stage. (f) Negative control. (g, h) Results of immunohistochemical staining for C3aR (g) and immunofluorescence staining for WT1 (h) on the same renal section showed that C3aR was mainly expressed by WT1 positive cells (namely podocytes) in the glomerulus of DN patients. (i, j) Results of statistical analysis. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$.

了分析。在 8 例对照肾组织中，我们没有观察到针对 C3a 的阳性染色。与此形成对照的是，19 例 DN 患者中的 16 例存在明显的 C3a 阳性染色 (图 2)。C3a 阳性率在 MG、PG 和 RIG 分别为 50%、80%

和 100%。C3a 主要分布于 DN 患者的小球系膜区、小球基底膜、包曼氏囊壁、小管间质、小管基底膜，以及小管上皮细胞中。C3a 在 DN 患者肾组织中的水平呈现出一种随肾组织损伤程度的增加而增

加的趋势. 相关性分析显示: C3a 在小球中的免疫

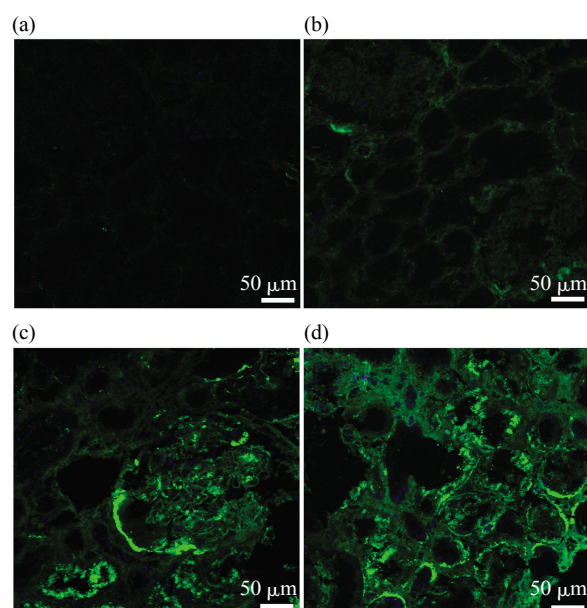


Fig. 2 Immunostaining for C3a increased in the renal tissue of patients with diabetic nephropathy

(a) Negative control. (b) Normal controls. (c, d) Representative pictures of patients with diabetic nephropathy.

荧光染色强度(以免疫荧光强度评分表示)和小球损伤评分显著相关($r=0.679$, $P < 0.01$); 小管及小管间质 C3a 免疫荧光评分与小管间质损伤指标, 包括 RIV($r=0.800$, $P < 0.01$)和 IFTAS($r=0.644$, $P < 0.01$))显著相关.

2.3 C3aR 活化对高糖环境中足细胞的影响

C3aR 和 C3a 在 DN 患者肾组织中的表达上调及其与肾组织损伤的相关性强烈提示: C3a/C3aR 通路可能参与了 DN 患者肾组织损伤, 特别是小管和小管间质以及小球足细胞的损伤过程. 从我们查阅的文献来看, 已有不少研究报道了 C3aR 通路在特定病理情景下参与肾小管损伤的情况, 并对其可能机制进行了探讨^[19-21], 但有关 C3aR 通路在足细胞中作用的资料却极为稀少. 为了探讨 DN 下 C3aR 活化在足细胞损伤中的可能作用, 我们进一步对高糖环境下 C3aR 活化对体外培养人足细胞 (HPC)的影响情况进行了分析.

在证实所用的 HPC 细胞确实表达 C3aR 后 (图 3a), 我们分析了外加 C3a 激活 C3aR 对 HPC 细胞骨架、足细胞标记分子 synaptopodin 和间充质

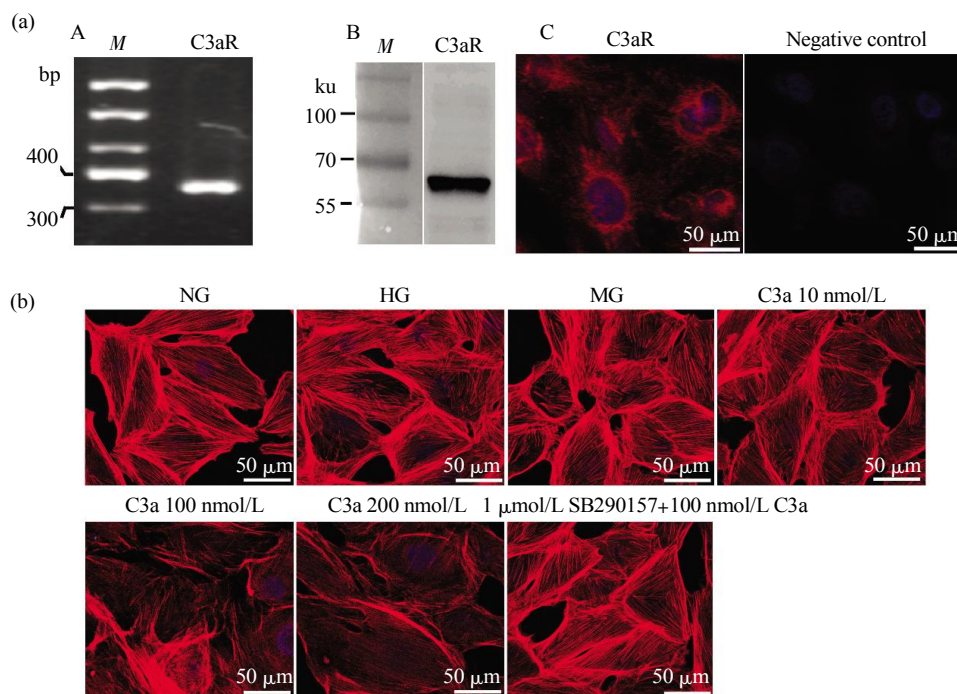


Fig. 3 C3aR was expressed by HPC cells and activation of C3aR induced reorganization of actin cytoskeleton in HPC cells cultured in high glucose condition

(a) Result of RT-PCR (A), Western blotting (B) and immunofluorescence (C) showed that C3aR was expressed by HPC cells. (b) Representative pictures showing that compared with the normal control group (NG), treatment of HPC cells with high glucose (30 mm glucose; HG) or normal glucose plus 25 mm mannitol condition (MG) for 24 h have no obvious influence in the cytoskeleton of HPC cells. Addition of C3a at a concentration of 100 nmol/L or 200 nmol/L for 30 min induced marked reorganization of the cytoskeleton in HPC cells cultured in high glucose condition and pre-treatment of the cells with 1 μ mol/L SB290157 (SB290157 was added for 30 min before the addition of C3a) prevent the C3a induced reorganization of cytoskeleton in the cells.

细胞标记分子 α -SMA 表达的影响情况、以及对足细胞单层的通透性的影响情况。30 mmol/L 的高糖处理 24 h 对足细胞的细胞骨架并没有明显的影响, 而当外加 C3a 的浓度达到 100 nmol/L 浓度以上时则可在较短的时间内引起高糖环境中足细胞的细胞骨架发生明显改变: 其 F-actin 微丝变得纤细并发生结构紊乱(图 3b)。与此同时, 外加 C3a 可使

HPC 细胞的足细胞标记分子 synaptopodin 的表达下降(图 4a), 足细胞单层对荧光素标记的牛血清白蛋白的通透性增加(图 5), 但外加 C3a 对 HPC 细胞 α -SMA 的表达却没有明显影响(图 4b)。而如在外加 C3a 前, 先以 C3aR 特异性抑制剂 SB290157 处理足细胞则可阻断 C3a 对 HPC 细胞骨架、synaptopodin 和足细胞单层通透性的影响(图 3~5)。

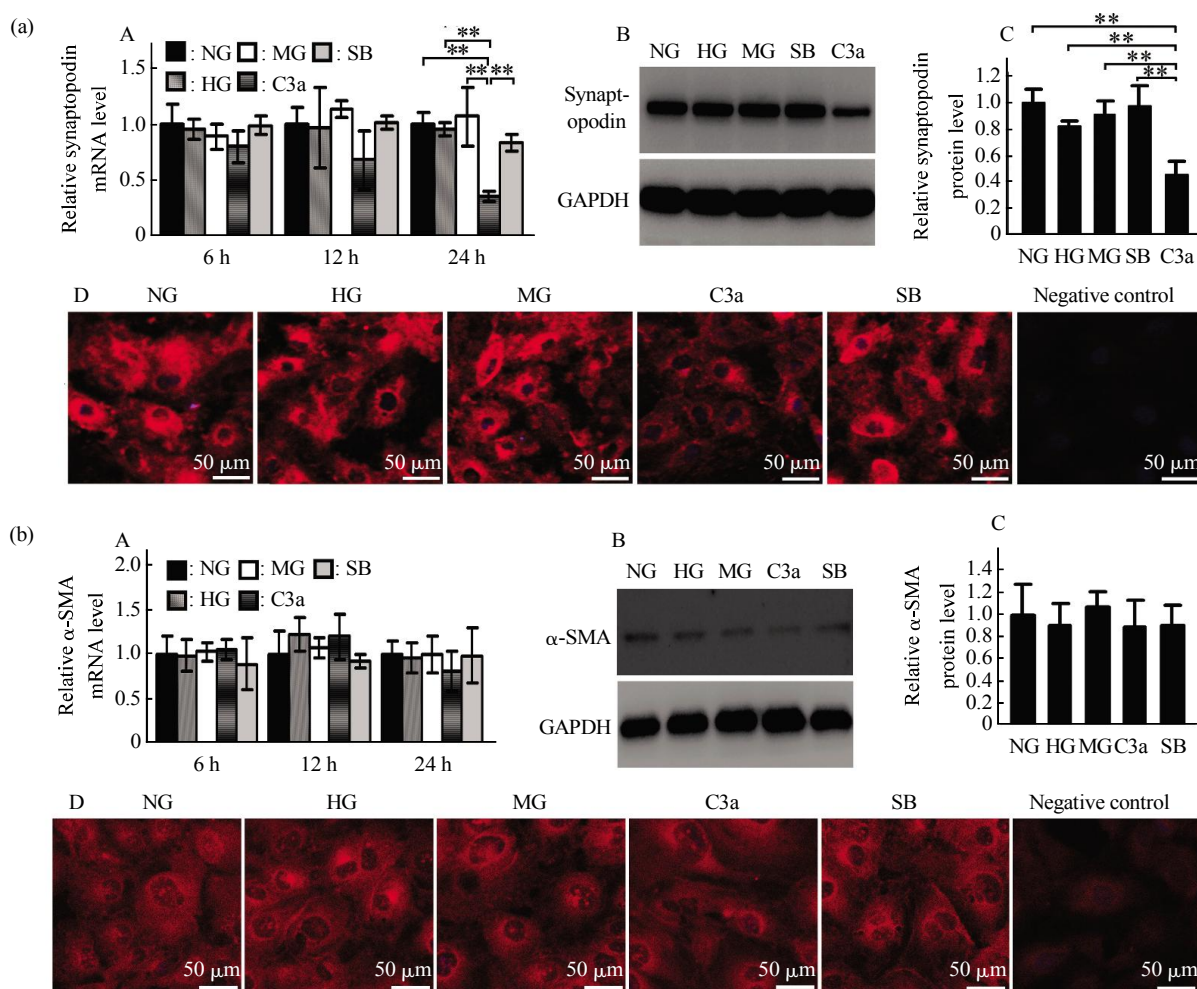


Fig. 4 Effects of activation of C3aR on the expression of synaptopodin and α -SMA in HPC cells cultured in high glucose condition

Differentiated HPC cells were cultured in medium containing normal glucose (NG), high glucose (30 mm glucose, HG), normal glucose plus 25 mm mannitol (MG) or high glucose plus 100 nmol/L C3a (C3a group). In the SB group, the cells were pretreated with 1 μ mol/L SB290157 for 30 min and then treated with high glucose plus 100 nmol/L C3a. Six, twelve and twenty-four hours later, total RNA was extracted from the cells and the mRNA levels of synaptopodin and α -SMA were evaluated by quantitative RT-PCR. The protein levels of synaptopodin and α -SMA were determined by Western blotting and immunofluorescence when the cells were treated as above for 24 h. (a) Results of RT-PCR (A), Western blotting (B-C) and immunofluorescence (D) showed that activation of C3aR induced down-regulation of synaptopodin in HPC cells cultured in high glucose condition. (b) Results of RT-PCR (A), Western blotting (B-C) and immunofluorescence (D) showed that activation of C3aR did not influence the expression of α -SMA in the cells. * P < 0.05; ** P < 0.01.

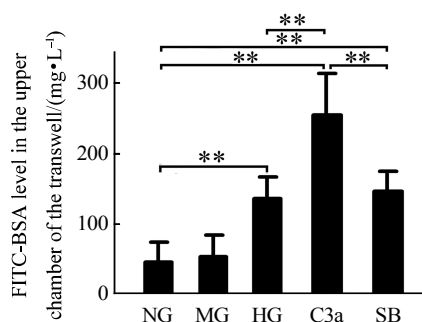


Fig. 5 Activation of C3aR increased the permeability of the HPC monolayer to FITC-BSA in high glucose condition

Differentiated HPC cell monolayer cultured in a Transwell system was treated with medium containing normal glucose (normal control group, NG), high glucose (30 mm glucose; high glucose group, HG), normal glucose plus 25 mm mannitol (mannitol control group, MG), or high glucose plus 100 nmol/L C3a (C3a group, C3a). In the SB group, the cells were pretreated with 1 μ mol/L SB290157 for 30 min and then treated with high glucose plus 100 nmol/L C3a. Twenty-four hours later, the permeability of HPC monolayer to FITC-BSA was analyzed and the permeability level was represented by the level of FITC-BSA in the upper chamber. $^{**}P < 0.01$.

3 讨 论

本文首次对 C3a 和 C3aR 在不同病理时期 DN 患者肾组织中的表达情况及其病理意义进行了比较全面的分析。我们观察到，在正常肾组织，C3aR 主要表达于小管上皮细胞，肾小球中 C3aR 的表达水平很低，仅在壁层上皮细胞和足细胞中有微弱的表达，这一结果与 Braun 等^[12]和 Bao 等^[22]所报道的结果完全相符。与正常对照组相比，DN 患者肾组织 C3aR 的表达显著增加。C3aR 的表达上调除了见于小管外，主要见于肾小球足细胞。C3aR 在 DN 患者肾组织中的表达水平呈现出一种随 DN 的进展而逐渐增加的趋势。与此同时，观察到 DN 患者肾组织 C3a 的水平也随着 DN 的进展而增加。据此，我们认为 DN 患者肾组织中确实存在 C3aR 过度活化的现象。

在本文中，观察到 DN 患者肾组织 C3a 和 C3aR 水平与反映肾组织损伤程度，包括小管损伤程度和小球及小球足细胞损伤程度的病理指标具有显著相关性。既往研究表明^[19-21]，激活 C3aR 可诱使小管细胞分泌炎症因子，促进小管细胞发生上皮间充质细胞转分化(EMT)。而慢性炎症和 EMT 是

DN 肾组织损伤的两个重要机制。据此，不难理解：通过诱导小管细胞分泌炎症因子(包括促炎的趋化因子)，提高肾组织炎症水平，以及诱导小管细胞发生 EMT，C3aR 通路在小管细胞的过度活化无疑会加重 DN 患者小管和小管间质损伤。但从查阅的文献来看，有关 C3aR 通路在小球足细胞中可能作用的资料极少，尚未见任何有关 C3aR 信号通路与 DN 足细胞损伤关系的报道。为了探讨 C3aR 活化在 DN 足细胞损伤中的可能作用及机制，我们利用体外足细胞模型，分析了 C3aR 活化对高糖环境中足细胞的影响情况。观察到，外加 C3a 激活 C3aR 可诱使高糖环境中的足细胞骨架发生明显变化、足细胞标记分子 synaptopodin 表达降低、足细胞通透性显著增加。作为肾小球滤过膜的最重要组成部分，足细胞在维持小球的正常结构和功能中起着极为重要的作用。足细胞损伤是导致包括 DN 在内的多种肾脏疾病发生和发展的重要因素^[23-24]。而足细胞骨架的完整性是维持足细胞正常结构和功能的重要前提条件^[25-26]。已有的研究表明，足细胞骨架的破坏是导致足细胞损伤、足突融合、足细胞脱落和蛋白尿的重要原因^[25-27]。作为足细胞中 Rho GTP 酶的一个重要调节者，synaptopodin 在维持足细胞的结构和功能，防止足细胞的细胞骨架发生重构方面也起着极为重要的作用^[28]。而足细胞通透性的增加，将会直接导致小球滤过膜通透性的改变，甚至直接导致蛋白尿的产生。

综合我们的上述研究结果，认为：a. DN 患者肾组织中确实存在一种 C3a/C3aR 轴过度活化的现象；b. C3a/C3aR 轴的过度活化很可能在 DN 患者肾组织损伤，特别是小管和小管间质损伤、肾小球足细胞损伤中具有重要作用；c. 可能通过破坏成熟足细胞特有的细胞骨架，改变足细胞标记分子表达，增加足细胞的通透性，C3a/C3aR 轴过度活化参与 DN 足细胞损伤过程。本文不仅为 C3a/C3aR 通路参与 DN 病理过程提供了新的必不可少的临床证据，也增加了对 C3a/C3aR 通路过活化致 DN 患者肾组织损伤机制，特别是肾小球足细胞损伤机制的了解，这对于拓展对 DN 病理机制的认识，发展 DN 防治新思路，无疑都是有益的。从我们查阅的文献来看，国内外均未见与本文相似的报道。

需要指出的是，本文的上述观点主要基于临床观察和体外细胞实验的分析结果。有关 C3aR 通路在 DN 中的具体病理作用及确切机制仍需包括动物

实验在内的多种研究手段进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Van Buren P N, Toto R. Current update in the management of diabetic nephropathy. *Curr Diabetes Rev*, 2013, **9**(1): 62-77
- [2] Maezawa Y, Takemoto M, Yokote K. Cell biology of diabetic nephropathy: roles of endothelial cells, tubulointerstitial cells and podocytes. *J Diabetes Investi*, 2015, **6**(1): 3-15
- [3] Forbes J M, Cooper M E. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*, 2013, **93**(1): 137-188
- [4] Guan L Z, Tong Q, Xu J. Elevated serum levels of mannose-binding lectin and diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Plos One*, 2015, **10**(3): e0119699
- [5] Jenny L, Ajjan R, King R, *et al.* Plasma levels of mannan-binding lectin-associated serine proteases MASP-1 and MASP-2 are elevated in type 1 diabetes and correlate with glycaemic control. *Clin Exp Immunol*, 2015, **180**(2): 227-232
- [6] Kwan W H, van der Touw W, Paz-Artal E, *et al.* Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells. *J Exp Med* 2013, **210**(2): 257-268
- [7] Sacks S H. Complement fragments C3a and C5a: the salt and pepper of the immune response. *Eur J Immunol*, 2010, **40**(3): 668-670
- [8] Bé nard M, Raoult E, Vaudry D, *et al.* Role of complement anaphylatoxin receptors (C3aR, C5aR) in the development of the rat cerebellum. *Mol Immunol*, 2008, **45**(14): 3767-3774
- [9] Xu X H, Peng H S, Sun M Q, *et al.* C-terminal peptide of anaphylatoxin C3a enhances hepatic function after steatotic liver transplantation: a study in a rat model. *Transplant Proc*, 2010, **42**(3): 737-740
- [10] Yu M, Zou W, Peachey N S, *et al.* A novel role of complement in retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, **53** (12): 7684-7692
- [11] Lim J, Iyer A, Suen J Y, *et al.* C5aR and C3aR antagonists each inhibit diet-induced obesity, metabolic dysfunction, and adipocyte and macrophage signaling. *FASEB J*, 2013, **27**(2): 822-831
- [12] Braun M C, Reins R Y, Li T B, *et al.* Renal expression of the C3a receptor and functional responses of primary human proximal tubular epithelial cells. *J Immunol*, 2004, **173**(6): 4190-4196
- [13] Li L, Yin Q, Tang X, *et al.* C3a receptor antagonist ameliorates inflammatory and fibrotic signals in type 2 diabetic nephropathy by suppressing the activation of TGF- β /smad3 and IKB α pathway. *Plos One*, 2014, **9**(11): e113639
- [14] Li L, Chen L, Zang J, *et al.* C3a and C5a receptor antagonists ameliorate endothelial-myofibroblast transition *via* the Wnt/ β -catenin signaling pathway in diabetic kidney disease. *Metabolism*, 2015, **64**(5): 597-610
- [15] Tervaert T W, Mooyaart A L, Amann K, *et al.* Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2010, **21**(4): 556-563
- [16] Okon K, Szumera A, Kuzniewski M. Are CD34+ cells found in renal interstitial fibrosis? *Am J Nephrol*, 2003, **23**(6): 409-414
- [17] Zheng J M, Yao G H, Cheng Z, *et al.* Pathogenic role of mast cells in the development of diabetic nephropathy: a study of patients at different stages of the disease. *Diabetologia*, 2012, **55**(3): 801-811
- [18] Saleem M A, O'Hare M J, Reiser J, *et al.* A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol*, 2002, **13**(3): 630-638
- [19] Peng Q, Li K, Smyth L A, *et al.* C3a and C5a promote renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 2012, **23** (9): 1474-1485
- [20] Tang Z, Lu B, Hatch E, *et al.* C3a mediates epithelial-to-mesenchymal transition in proteinuric nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(3): 593-603
- [21] Liu F, Gou R, Huang J, *et al.* Effect of anaphylatoxin C3a, C5a on the tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro*. *Chin Med J (Engl)*, 2001, **124**(23): 4039-4045
- [22] Bao L, Osawe I, Haas M, *et al.* Signaling through up-regulated C3a receptor is key to the development of experimental lupus nephritis. *J Immunol*, 2005, **175**(3): 1947-1955
- [23] Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int*, 2016, **89**(6): 1221-1230
- [24] Kerjaschki D. 2015 Homer W. Smith award: the podocyte from periphery to center stage. *J Am Soc Nephrol*, 2016, **27** (11): 3266-3270
- [25] Perico L, Conti S, Benigni A, *et al.* Podocyte-actin dynamics in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016, **12**(11): 692-710
- [26] Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol*, 2012, **74**: 299-323
- [27] Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, *et al.* Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, 2007, **17**(9): 428-437
- [28] Yanagida-Asanuma E, Asanuma K, Kim K, *et al.* Synaptopodin protects against proteinuria by disrupting Cdc42:IRSp53:Mena signaling complexes in kidney podocytes. *Am J Pathol*, 2007, **171**(2): 415-427

Roles of Excessive C3aR Signaling in The Kidney Damage of Patients With Diabetic Nephropathy*

ZHENG Jing-Min^{1)**}, CHEN De-Jun²⁾, YIN Guang¹⁾, ZHAO Wen-Jin¹⁾, LI Li-Juan¹⁾, WANG Jian-Ping¹⁾

¹⁾ National Clinical Research Center of Kidney Diseases, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China;

²⁾ Nephrology Department, Zhejiang Taizhou Hospital, Enze Medical Center, Linhai 317000, China)

Abstract C3aR is the receptor for C3a. Emerging evidence suggested that C3aR signaling might be involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy (DN), but the exact significance and the underlying mechanisms are unclear. In particular, most of the data thus far have been derived from experimental studies; no study has reported the association of renal C3aR activation with the development of DN in DN patients. By using renal biopsy specimen from patients at different pathological stages, the present study investigated the expression of C3a and C3aR in the renal tissue of DN patients and associated them with the development of the disease. To determine the effect of C3aR activation in podocytes in DN condition, podocytes cultured in medium with high glucose were treated with C3a and the influences of C3aR activation in podocyte cytoskeleton, the expression of synaptopodin and alpha smooth muscle actin, and the permeability of podocyte monolayer were examined. Compared with the normal controls, renal expression of C3aR and C3a increased with the development of DN. C3aR was distributed mainly in tubular epithelial cells and glomerular podocytes. C3aR level in tubules and glomerulus was closely associated with the degree of tubular and glomerular damage, respectively. Activation of C3aR in podocytes induced re-organization of the cytoskeleton, down-regulation of synaptopodin, and increased permeability of the podocyte monolayer. The results indicated that a situation of excessive signaling through C3aR is present in the kidney of DN patients, which might contribute to the progression of DN. In particular, probably through destroying the podocyte characteristic cytoskeleton structure, decreasing the expression of podocyte specific molecules, and increasing the permeability of podocyte, excessive C3aR signaling contributes to the damage of glomerular podocytes.

Key words C3a, C3aR, diabetic nephropathy, podocyte, expression, pathological significance

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0217

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81370828).

**Corresponding author.

Tel: 86-25-80863792, E-mail: zzjjmm7713@sina.com

Received: December 11, 2017 Accepted: May 21, 2018