

临床研究

IgA 肾病患者血清 6 种常见过敏食物特异性抗体的检测

周朝敏¹, 刘志刚², 睦维国³, 谷东风¹, 李永强¹, 邹和群¹¹南方医科大学第三附属医院肾内科、泌尿疾病研究所, 广东 广州 510630; ²深圳大学医学院过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518060; ³中国人民解放军第 181 中心医院全军肾移植与透析治疗中心, 广西 桂林 541002

摘要:目的 初步探讨 6 种常见过敏食物的主要过敏蛋白与 IgA 肾病发病的关系。方法 采用 ELISA 双抗体夹心法检测并比较 31 例 IgA 肾病患者及 80 例健康体检者血清中 6 种常见过敏食物的主要过敏蛋白特异性的 IgA1、IgG 及 IgE 水平, 并对所有病人进行食物过敏情况问卷调查, 观察多种食物抗体水平明显升高的患者的临床特征。结果 IgA 肾病组患者血清中 6 种常见过敏食物的主要过敏蛋白特异性的 IgA1 及 IgG 水平均显著高于健康对照组 ($P < 0.05$)。两组中均未检测到食物特异性的 IgE。所有病人均无明确的食物过敏史。多种食物 (大于 4 种) 特异性 IgG 抗体水平明显升高的患者均有蛋白尿。结论 某些食物尤其是高致敏性食物在 IgA 肾病的发病及进程中可能伴有重要角色。

关键词: IgA 肾病; 食物抗原; 过敏原; ELISA

Detection of serum food specific antibodies of 6 common foods in patients with IgA nephropathy

ZHOU Chaomin¹, LIU Zhigang², SUI Weiguo³, GU Dongfeng¹, LI Yongqiang¹, ZOU Hequn¹¹Institute of Nephrology and Urology, Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, China; ²Shenzhen Key Laboratory of Allergy and Immunology, Shenzhen University School of Medicine, Shenzhen 518060, China; ³Kidney Transplantation and Dialysis Center of PLA, 181 Central Hospital of PLA, Guilin 541002, China

Abstract: Objective To explore the relationship between the major allergens of 6 common allergic foods and IgA nephropathy. **Methods** A sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum levels of food-specific IgA1, IgG and IgE in 31 patients with IgA nephropathy and 80 healthy volunteers. All the patients were examined for a history of food allergy using a questionnaire. **Results** Serum levels of IgA1 and IgG against the major allergens of the 6 common allergic foods were significantly higher in patients with IgA nephropathy than in healthy volunteers ($P < 0.05$). There was no detectable food-specific IgE antibodies in the two groups. No patients had a clear history of food allergy. All the patients with increased IgG levels specific to 4 or more foods simultaneously had proteinuria. **Conclusion** Some foods especially the highly allergic ones may participate in the pathogenesis and progression of IgA nephropathy.

Key words: IgA nephropathy; food antigen; allergens; ELISA

IgA 肾病(IgAN)是以 IgA 或 IgA 为主的免疫复合物在肾小球系膜区沉积为主要特征的免疫复合物肾小球肾炎,也是世界范围类最常见的原发性肾小球肾炎^[1]。其病因及发病机制尚不明确。早在 1980 年末就有研究提出食物可能参与 IgAN 的发病^[2-3]。近年 Kloster Smerud 等^[4-5]提出食物过敏可能与 IgAN 有关。我国是 IgAN 的高发地区,而我国的饮食结构和习惯不同于西方国家。食物与 IgAN 发病关系的研究在国内尚未见报道。本研究旨在初步探讨 6 种常见过敏食物的主要过

敏蛋白与 IgA 肾病发病的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2011 年 9 月~2012 年 9 月于南方医科大学第三附属医院及桂林 181 医院明确诊断的 IgA 肾病患者 31 例(病例组),男 21 例,女 10 例,平均年龄 32.71 ± 9.09 岁。选取 80 例健康体检者(对照组),男 45 例,女 35 例,平均年龄 33.89 ± 8.61 岁。所有 IgA 肾病病例经过肾活检确诊,并除外过敏性紫癜、乙肝相关性肾炎、系统性红斑狼疮等继发性 IgAN。过敏性紫癜性肾炎的诊断依据:皮肤紫癜基础上出现血尿、蛋白尿等肾病表现,或不伴关节痛及腹痛,除肾脏受累外常有全身系统受损。健康对照组均为健康体检者,无肾病病史,尿常规检查、肾功能测定均正常。

收稿日期:2013-10-08

基金项目:深圳市重点实验室组建项目(SW201110010);深圳市科技计划基础研究重点项目(JC201005250073A)

作者简介:周朝敏,在读硕士研究生, E-mail: 723729549@qq.com

通信作者:邹和群,博士生导师,教授,电话:020-62684403, E-mail: hequnzou@hotmail.com

1.2 标本采集

收取肾活检当日清晨空腹静脉血,所有标本均采血 5 ml,置于促凝剂试管中,离心机离心 15 min,转速为 4000 r/min,分离血清,冻存于-80 ℃冰箱待检。

1.3 研究方法

采用ELISA双抗体夹心法检测并比较病例组和对照组血清中6种常见过敏食物(花生、牛奶、鸡蛋、大豆、虾、鱼)的主要过敏蛋白特异性IgA1、IgG及IgE并观察多种食物(大于4种)抗体水平均明显升高的患者的临床特征。对所有IgAN患者进行食物过敏情况问卷调查。

1.4 ELISA试剂、仪器

PBS, PBST。底物A液和B液,终止液2 mol/L H₂SO₄。6种主要过敏食物的主要过敏原:花生Ara h1、鸡蛋卵清白蛋白、虾原肌球蛋白、大豆Gly m Bd 30K蛋白、鱼小清蛋白由深圳大学医学院变态反应与免疫实验室自行研制^[6-8]。牛奶β-乳球蛋白购至美国Sigma。HRP标记抗IgA1、抗IgG及抗IgE抗体,购于美国SouthernBiotech。聚苯乙烯反应板、洗板机、酶标仪、37 ℃恒温培养箱。

1.5 双抗体夹心ELISA法

以6种食物的主要过敏蛋白为包被抗原,CBS稀释至1 μg/ml,取100 μl,置4 ℃过夜,拍干,3%BSA(PBS

稀释)封闭。拍干,加入1:40稀释的血清,置37 ℃恒温箱中1 h。PBST洗板3次。加入1:400稀释(PBST)的IgA1、IgE,1:6000稀释(PBST)的IgG,置37 ℃恒温箱中1 h。PBST洗板6次。加底物A液、B各50 μl,置37 ℃恒温箱中10 min后加入终止液。立即置于酶标仪检测。TWB吸收波长为450 nm,读值。

1.6 统计学方法

采用SPSS 13.0统计分析软件处理数据。血清食物特异性的IgA1及IgG因不符合正态分布,采用非参数Mann-Whitney U检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清6种常见过敏食物的主要过敏蛋白特异性IgA1检测

IgA肾病组血清6种常见过敏食物的主要过敏蛋白(花生Ara h1、卵清白蛋白、虾原肌球蛋白、大豆Gly m Bd 30K蛋白、鱼小清蛋白、β-乳球蛋白)特异性的IgA1水平均显著高于健康对照组,两组间差异有统计学意义($P<0.05$,图1)。实验组6种食物特异性IgA1水平从高到低分别为:牛奶、鱼、虾、鸡蛋、大豆、花生。对应的OD值中位数依次为2.53(1.47)、2.32(0.49)、1.96(1.04)、1.68(1.46)、1.20(0.54)、1.16(0.48)。

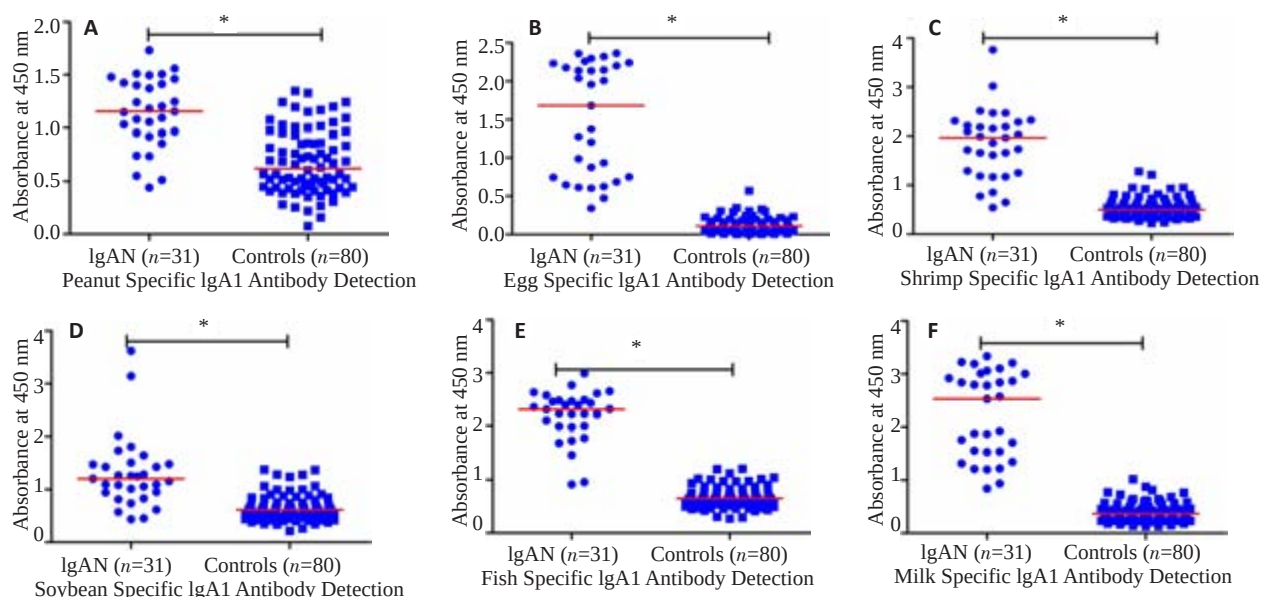


图1 血清6种常见过敏食物的主要过敏蛋白特异性IgA1检测

Fig.1 Detection of serum IgG levels specific to the major allergenic proteins from 6 common allergic foods. A: Peanut Ara h1; B: Ovalbumin; C: Shrimp tropomyosin; D: Soy Gly m Bd 30K protein; E: Fish parvalbumin; F: β-lactoglobulin. * $P<0.05$.

2.2 血清6种常见过敏食物的主要过敏蛋白特异性IgG检测

IgA肾病组血清6种常见过敏食物的主要过敏蛋白特异性的IgG水平均显著高于健康对照组($P<0.05$,图

2)。实验组6种食物特异性IgG水平从高到低分别为:虾、鱼、鸡蛋、牛奶、花生、大豆,对应的OD值中位数依次为3.86(0.37)、3.54(1.08)、3.01(0.71)、2.92(0.9)、2.84(0.76)、2.53(0.45)。

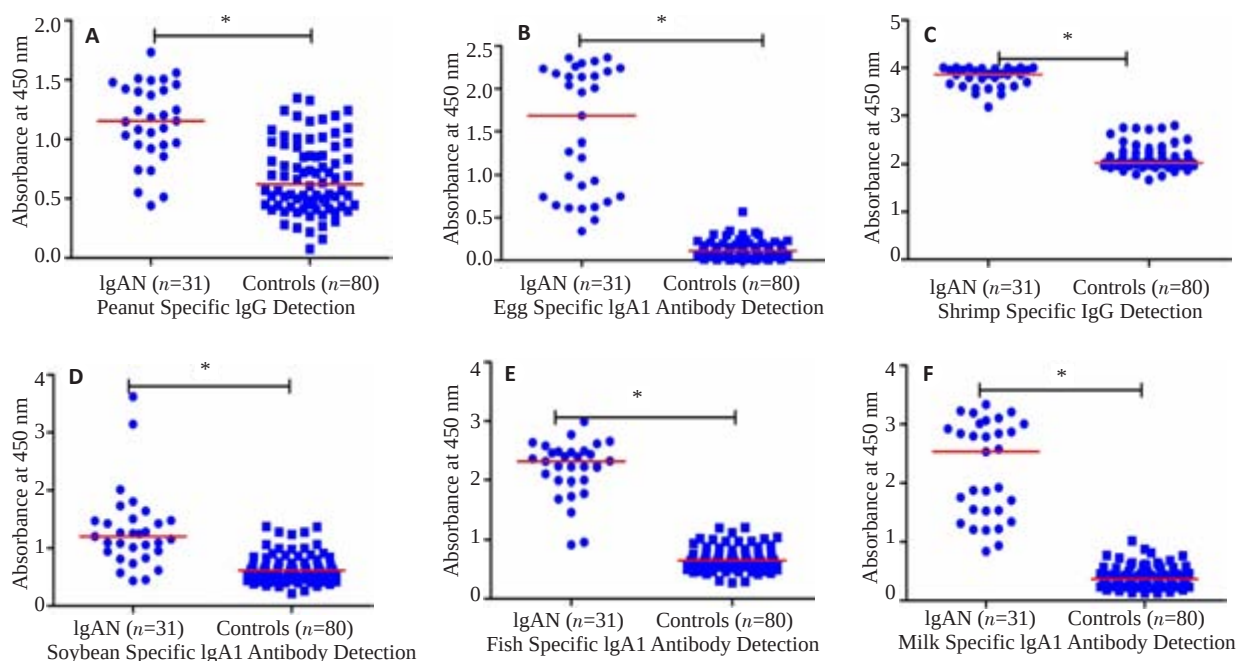


图2 血清6种常见过敏食物的主要过敏蛋白特异性IgG检测

Fig.2 Detection of serum IgG levels specific to the major allergenic proteins from 6 common allergic foods. A: Peanut Ara h1; B: Ovalbumin; C: Shrimp tropomyosin; D: Soy Gly m Bd 30K protein; E: Fish parvalbumin; F: β -lactoglobulin. * P <0.05.

2.3 血清6种常见过敏食物的主要过敏蛋白特异性IgE检测

IgA 肾病组及健康对照组血清中均未检测到食物特异性的IgE。

2.4 食物过敏情况问卷调查

参与本研究的所有IgAN患者均无明确的食物过敏史。

2.5 临床指标观察

我们观察了多种(大于4种)食物IgG抗体水平明显升高(高于中位数)的9例IgAN患者的临床资料,发现这9例患者临床表现均有蛋白尿,其中8人尿蛋白大于1 g/24 h,4人同时伴有高血压。这9例患者鸡蛋、牛奶、鱼、虾特异性的IgG水平均明显升高。而6种食物特异性IgG抗体水平均较低(低于中位数)的5例患者仅有血尿。所有有蛋白尿的患者至少有1种食物特异性IgG抗体水平升高,食物抗原种类可为6种食物中的任意1种,但就整体而言,虾、牛奶、鸡蛋、花生特异性IgG水平升高的患者较常见。分别为19例、15例、15例、15例。

3 讨论

在本实验中,我们首次在中国IgAN患者血清中同时检测了常见6种过敏食物特异性的IgA1、IgG及IgE。IgAN组6种常见过敏食物的主要过敏蛋白特异性的IgA1、IgG均显著高于健康对照组(P <0.05),在多种食物特异性IgG抗体水平均明显升高的患者中,临床表现均有蛋白尿,而食物特异性IgG抗体水平均较低

(低于中位数)的患者均无蛋白尿,而蛋白尿是影响IgAN预后的主要因素,提示食物蛋白在IgAN的发病或进程中可能伴有重要角色。1980年末就有研究^[9-10]提出食物抗原可能参与了IgAN的发病。Coppo等^[10]人的研究表明IgA肾病患者血清中卵清白蛋白特异性的IgA、IgG较健康对照组明显升高,这与我们的结果一致,而异常糖基化的IgA1是IgAN发病的基础^[11],在本研究中我们检测食物特异性的IgA1,较前者检测的指标更有代表性。Michael等^[11]的研究中IgAN组患者血清10种常见食物特异性的IgA与健康对照组差异无统计学意义,这可能与他们采用的放射免疫法敏感性较差有关。我们使用来源于目的基因片段克隆、表达及纯化的食物抗原来检测同一批病人血清中的多种食物蛋白特异性的抗体,较之前期学者的研究^[10-11],我们检测的食物种类更多、特异性更强。

近年研究表明含异常糖基化的IgA1免疫复合物的形成是导致IgAN的关键。这种免疫复合物由异常糖基化的IgA1及特异性识别异常糖基化的IgA1的自身抗体IgG或IgA1组成^[12]。但并非所有IgAN患者都有IgG的沉积^[13]且正常人血清中也可检测到异常糖基化的IgA1^[14]。体外实验表明,只有相对分子质量大小为800 000~900 000的免疫复合物才能刺激系膜细胞增殖^[15]。这些事实表明,致肾炎的IgA1-免疫复合物可能还有其他的组成。在本研究中IgAN组血清食物特异性的IgA1明显升高,提示食物抗原可能与IgA1形成了致肾炎的IgA1-免疫复合物。(1)无抗原饮食后,IgAN患者血清

IgA-免疫复合物明显减少,蛋白尿减少且肾脏病理损伤也较前减轻^[16]; (2) IgAN患者肾组织中多种食物蛋白^[17]的检测支持这一推论。

在本研究中, IgAN组多种食物特异性IgG、IgA1抗体水平均显著高于健康对照组, 这可能与IgAN患者肠道通透性增加有关。有研究表明部分IgAN患者的肠道通透性明显增加^[18]。肠道通透性增加可促进肠道内多种食物抗原进入血循环而诱发全身免疫反应, 长期大量的食物抗原刺激可导致含食物抗原的IgA1在肾小球的沉积, 从而激活补体导致或加重IgAN。未纳入研究的食物特异性抗体可能也是升高的。

纳入研究的食物蛋白具有较强的致敏性或抗原性。本研究也旨在探索食物过敏是否参与了IgAN的发病。我们在健康对照组及IgAN组血清中均未检测到食物特异性的IgE, 所有病人均无明确的食物过敏史。IgE介导速发型超敏反应, 症状突出且与过敏食物摄入有关。非IgE介导的食物过敏一般并不出现典型症状, IgG参与了此类过敏反应。在本实验中IgAN组食物特异性的IgG较健康对照组显著升高, IgG可与食物抗原结合成大分子免疫复合物从而导致或加重肾损伤。本研究中4种以上食物特异性IgG均升高的患者均有蛋白尿, 且食物抗原种类以虾、牛奶、鸡蛋多见, 这与成人常见不耐受食物种类一致^[19]。而食物特异性IgG抗体水平较低的患者仅表现为血尿, 提示IgG介导的食物不耐受在IgA肾病的发病及进程中可能伴有重要角色。

值得一提的是, 食物中含有大量凝集素, 烹饪和消化酶一般不能完全破坏凝集素活性。研究表明食物凝集素可导致食物过敏及肠道通透性增加, 体外实验证实食物凝集素还可结合并激活肾小球系膜细胞^[20], 纳入研究的花生和大豆均富含凝集素, 他们可能同时发挥上诉作用而诱发了IgAN。

本研究仅从血清学水平研究食物抗原与IgAN发病的关系, 尚需更多的实验方法及数据证实食物抗原与IgAN发病的相关性。但避免食用某些高致敏性或富含食物凝集素的食物可能对部分IgAN患者, 尤其是血清多种食物特异性抗体滴度较高的患者有一定疗效。

参考文献:

- [1] D'amico G. The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy[J]. Q J Med, 1987, 64(245): 709-27.
- [2] Russell MW, Mestecky J, Julian BA, et al. IgA-associated renal diseases: antibodies to environmental antigens in sera and

deposition of immunoglobulins and antigens in glomeruli[J]. J Clin Immunol, 1986, 6(1): 74-86.

- [3] Coppo R, Basolo B, Rollino C, et al. Dietary gluten and primary IgA nephropathy[J]. N Engl J Med, 1986, 315(18): 1167-8.
- [4] Smerud HK, Fellström B, Hällgren R, et al. Gluten sensitivity in patients with IgA nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(8): 2476-81.
- [5] Kloster Smerud H, Fellström B, Hällgren R, et al. Gastrointestinal sensitivity to soy and milk proteins in patients with IgA nephropathy[J]. Clin Nephrol, 2010, 74(5): 364-71.
- [6] 李建杰, 陈大玮, 闫浩, 等. 牛奶主要过敏原 β -乳球蛋白的一基因片段的克隆、表达、纯化及抗原性鉴定[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(2): 109-13.
- [7] 易海涛, 刘志刚, 闫浩, 等. 花生过敏原Ara h2.02的克隆、表达及免疫学鉴定[J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2010, 34(5): 531-5.
- [8] 练玉银, 刘志刚, 温岸玲. 鲤鱼主要变应原的分离、鉴定与纯化[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(8): 947-9.
- [9] Nagy J, Scott H, Brandtzaeg P. Antibodies to dietary antigens in IgA nephropathy[J]. Clin Nephrol, 1988, 29(6): 275-9.
- [10] Coppo R, Amore A, Roccatello D, et al. IgA antibodies to dietary antigens and lectin-binding IgA in sera from Italian, Australian, and Japanese IgA nephropathy patients[J]. Am J Kidney Dis, 1991, 17(4): 480-7.
- [11] Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, et al. The pathophysiology of IgA nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(10): 1795-803.
- [12] Glassock RJ. Analyzing antibody activity in IgA nephropathy[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1450-2.
- [13] Glassock RJ. Analyzing antibody activity in IgA nephropathy[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1450-2.
- [14] Gharavi AG, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, et al. Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(5): 1008-14.
- [15] Novak J, Tomana M, Matoušovic K, et al. IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells[J]. Kidney Int, 2005, 67(2): 504-13.
- [16] Ferri C, Puccini R, Longombardo G, et al. Low-antigen-content diet in the treatment of patients with IgA nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant, 1993, 8(11): 1193-8.
- [17] Sato M, Kojima H, Takayama K, et al. Glomerular deposition of food antigens in IgA nephropathy[J]. Clin Exp Immunol, 1988, 73(2): 295-9.
- [18] Kovacs T, Kun L, Schmelcz M, et al. Do intestinal hyperpermeability and the related food antigens play a role in the progression of IgA nephropathy [J]? Am J Nephrol, 1996, 16(6): 500-5.
- [19] 张建江, 史佩佩, 张利果, 等. 食物不耐受与儿童过敏性紫癜的相关性[J]. 中华肾脏病杂志, 2011, 27(5): 337-40.
- [20] Hamid R, Masood A. Dietary lectins as disease causing toxicants[J]. Pakistan Journal of Nutrition, 2009, 8(3): 293-303.

(编辑:孙昌朋)