

阿霉素肾病大鼠肾组织中 nephrin 和 CD2AP 的表达及意义

彭亚琴¹, 莫 樱^{2*}, 蒋小云², 张巧玲¹, 陈述枚²

(中山大学附属第一医院 1. 黄埔院区儿科, 广东 广州 510700; 2. 儿科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】动态观察 nephrin、CD2 相关蛋白(CD2AP)在阿霉素肾病大鼠肾小球中的表达变化,探讨其在蛋白尿发生发展过程中的作用。【方法】72 只大鼠分为 2 组,模型组 36 只和对照组 36 只,模型组大鼠尾静脉一次性注射盐酸阿霉素,对照组大鼠尾静脉一次性注射等容积生理盐水,分别于注射后 3、5、7、14、28、42 d 各杀检 6 只大鼠。采用实时荧光定量 PCR、免疫组织化学检测大鼠肾小球中 nephrin、CD2AP 的表达和分布变化。【结果】①模型组大鼠 7 d 时 nephrin mRNA 表达增加,14 d 时其蛋白表达(9.44 ± 0.49)亦显著增加;CD2AP 表达增加时间较晚,28 d 时其 mRNA 和蛋白表达(7.88 ± 1.01)才显著增加。②与对照组相比,模型组 nephrin、CD2AP 出现分布异常,从沿着毛细血管袢线样分布逐渐转变为不连续性颗粒样或斑片状分布。③肾小球 nephrin mRNA、CD2AP mRNA 表达量与 24 h 尿蛋白量均呈正相关关系($r = 0.878, P < 0.01$; $r = 0.945, P < 0.01$)。【结论】①nephrin 早期出现表达增加及分布异常,可能是导致蛋白尿的原因及判断肾小球足细胞损伤的一个早期重要指标。②CD2AP 在后期出现表达增加,可能是足细胞抵抗损伤的一种代偿反应。

关键词: nephrin; CD2AP; 阿霉素; 蛋白尿

中图分类号: R692

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)01-0015-06

Expression and Significance of Nephrin and CD2AP in Adriamycin-induced Nephrotic Rats

PENG Ya-qin¹, MO Ying^{2*}, JIANG Xiao-yun², ZHANG Qiao-ling¹, CHEN Shu-mei²

(1. Department of Pediatrics, Huangpu Section, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510700, China;

2. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objectives】 To dynamically observe the role of nephrin and CD2-associated protein (CD2AP) in adriamycin-induced nephrotic rats, and to explore the possible effects on the occurrence and development of proteinuria. 【Methods】 Seventy-two rats were divided into two groups: model group ($n = 36$) and control group ($n = 36$). The rats in model group were injected with adriamycin (6 mg/kg) via tail-vein for one time, while the rats in control group were injected with saline. At day 3, 5, 7, 14, 28, and 42, the kidney tissues of six rats were studied after adriamycin injection using electronic microscope, real time PCR, and immunohistochemistry. 【Results】 ① Nephrin mRNA expression at day 7, nephrin protein expression at day 14, and CD2AP (mRNA and protein) expression at day 28 increased in the rats in model group, respectively. ② Compared with the control group, the distribution of nephrin and CD2AP shifted from a linear-like pattern along the capillary loops of glomerulus to a discontinuous coarse granular or sheet-like distribution. ③ The mRNA expression of nephrin and CD2AP were positively correlated with the amount of 24 h urinary protein ($r = 0.878, P < 0.01$; $r = 0.945, P < 0.01$). 【Conclusions】 ① Nephrin presents early over-expression and abnormal distribution, suggesting possibly a cause of proteinuria occurrence and an important early indicator for acute podocyte injury. ② CD2AP exhibits lately over-expression, suggesting possibly a compensatory response against podocyte injury.

Key words: nephrin; CD2-associated protein; adriamycin; proteinuria

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(1): 15-20; 25]

收稿日期: 2008-08-05

基金项目: 广东省科技厅科技计划项目(2008B030301070); 广东省医学科研基金(B2008027)

作者简介: 彭亚琴, 硕士, 医师; * 通讯作者: 莫樱, 副教授, 硕士生导师, E-mail: moviolet@163.com

蛋白尿是肾小球滤过屏障受损的标志,近年来发现裂孔隔膜(slit diaphragm,SD)及其相关蛋白分子,如nephrin、CD2-associated protein (CD2AP)、podocin 和 NPHS1 等对于维持肾小球滤过屏障结构极为关键。在一些先天性/遗传性肾病综合征和肾病动物模型中,nephrin、CD2AP 基因突变或敲除后即会出现大量蛋白尿、足突及 SD 的改变或消失^[1-3],提示 nephrin、CD2AP 在蛋白尿发生发展中具有重要作用,但两者的作用和变化究竟如何呢?国内外文献报道较少,且结果不一致^[4-8]。本研究采用经典的微小病变肾病模型-阿霉素肾病大鼠,检测 nephrin、CD2AP 在该模型中不同时间点的表达变化,探讨其在蛋白尿发生发展中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠(中山大学医学院动物实验中心提供)72只,体质量180~200g,随机分为两组:①模型组36只,实验初一次性尾静脉注射盐酸阿霉素(深圳万乐药业有限公司,生理盐水配制,1mg/mL),剂量6mg/kg;②对照组36只,实验初一次性尾静脉注射等容积生理盐水。在整个实验过程中,各组大鼠饲养于代谢笼中,自由食用我院动物实验中心提供的饲料和自来水,于注射后3、5、7、14、28、42d各杀检6只大鼠。实验初及各时间点大鼠处死前代谢笼收集24h尿液,-20℃保存待测;留取肾脏标本,分离肾皮质,分别置液氮中速冻后-70℃保存备做分子生物学检测用、以20mL/L戊二醛固定后送电镜检查及40g/L甲醛固定以备病理学和免疫组织化学检查。

1.2 24h尿蛋白测定

采用考马斯亮兰法测定24h尿蛋白(mg/24h)。

1.3 实时荧光定量PCR

1.3.1 总RNA的提取 用Trizol按美国Invitrogen公司标准程序提取肾皮质总RNA。

1.3.2 逆转录反应 每个样本取5μg RNA,用随机引物M-MLV逆转录酶(德国QIAGEN公司)在20μL体系内进行逆转录,用PE9600PCR仪按37℃,60min;95℃,3min反应条件循环一次得到cDNA。

1.3.3 荧光定量PCR反应 取5μL逆转录物加入总体积50μL的PCR反应体系中[5×SYBR Green 1 buffer 10μL,10mmol/L dNTPs(华美生物工程公司)1μL,25μmol/L上、下游引物各1μL,5U/μL TaqDNA聚合酶(德国QIAGEN公司)μL],用PE5700自动荧光PCR仪进行实时荧光定量PCR反应。

1.4 免疫组织化学检测

兔抗nephrin抗体、CD2AP抗体购自美国Santa Cruz公司;SP超敏试剂盒、DAB显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。3μm厚肾组织石蜡切片,常规脱腊水化,0.01mol/L柠檬酸盐抗原修复液微波抗原修复,30mL/L过氧化氢室温孵育20min,正常山羊血清封闭10min,依次加入1:200稀释的兔抗nephrin抗体或CD2AP抗体(4℃,过夜)、生物素标记的山羊抗兔IgG(室温,10min),链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液(室温,10min),DAB显色3min。实验中以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。肾组织观察有棕黄色为阳性信号,采用全自动图像分析系统对免疫组化结果进行半定量分析。每只大鼠切片标本至少观察10个肾小球的剖面,在10×物镜下应用图像分析系统对其进行扫描分析,计算出免疫组化阳性信号的总强度(阳性单位,PU),即反应抗原(nephrin、CD2AP)的数量。

1.5 统计学方法

采用SPSS10.0统计软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各时间点模型组与对照组比较采用 t 检验,相关分析用Spearman法。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间点24h尿蛋白量

实验初、注射阿霉素后3d及5d两组大鼠尿蛋白排泄量无明显差别。7d时模型组大鼠开始出现尿蛋白,较对照组有显著增加($P < 0.01$),且尿蛋白排泄渐加重直至42d(表1)。

2.2 透射电镜结果

模型组7d开始足细胞足突稍有变形;14d时变形明显、部分融合;28d时足突扁平、融合加重;42d时足突弥漫性融合,部分断裂及消失,有微绒毛形成,基底膜部分增厚,内皮细胞窗孔消失(图1)。

表 1 两组大鼠各时间点 24 h 尿蛋白量

Table 1 Urinary protein (mg/24 h) in the rats of model and control groups at the different time ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Cases	0 d	3 d	5 d	7 d	14 d	28 d	42 d
Control	6	5.1 ± 1.0	5.2 ± 1.0	5.4 ± 2.0	5.4 ± 2.5	5.6 ± 1.6	6.9 ± 2.3	7.0 ± 4.1
Model	6	6.0 ± 1.0	6.0 ± 1.5	7.2 ± 2.2	14.0 ± 2.6 ¹⁾	64.0 ± 29.6 ¹⁾	159.5 ± 23.3 ^{1),2)}	337.7 ± 38.1 ^{1),3)}
<i>t</i>		1.687	1.690	1.649	5.793	7.242	15.953	21.135

After adriamycin injection, 24 h urinary protein in rats in model group progressively increased with time.

1) compared with control group, $P < 0.01$; 2) compared with model group 14 d, $P < 0.01$; 3) compared with model group 28 d, $P < 0.01$

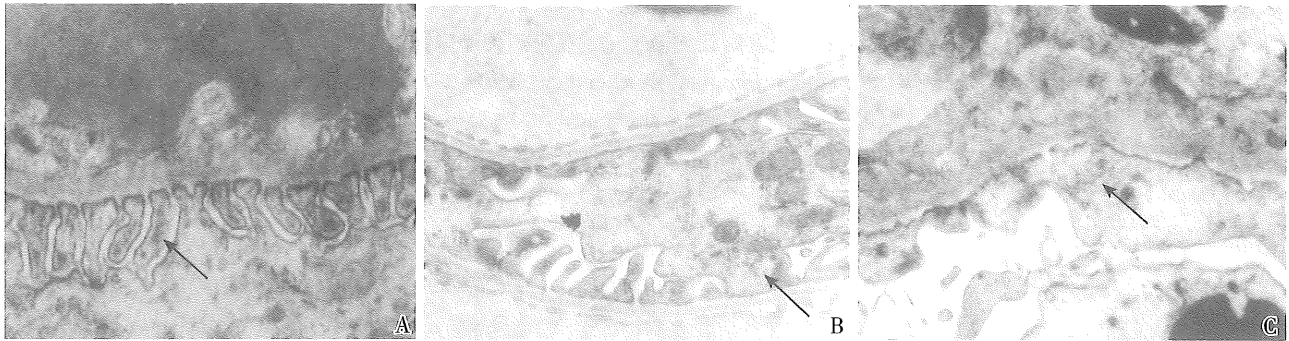


图 1 大鼠肾组织透射电镜照片

Fig. 1 Electron micrographs of kidney tissue from rats

A: Control group 14 d, foot-processes were normal; B: Model group 14 d, foot-processes were distorted and partly effaced; C: Model group 42 d, foot-processes were completely effaced; $\times 10\ 000$

2.3 nephrin 和 CD2AP mRNA 表达变化

2.3.1 nephrin mRNA 表达 模型组 nephrin mRNA 表达 7 d 时始增加($P < 0.01$),随时间进展逐渐增加至 42 d(图 2)。

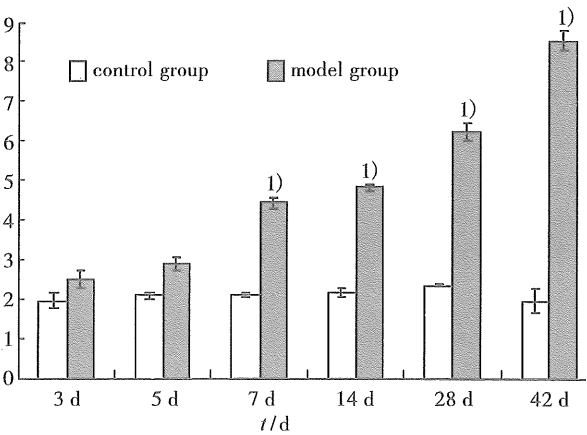


图 2 各时间点肾组织 nephrin mRNA 相对表达量
Fig.2 Relative quantity of nephrin mRNA expression in kidney tissues at the different time ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

From day 7 to 42 nephrin mRNA expression in model rats increased. Compared with control group, 1) $P < 0.01$.

2.3.2 CD2AP mRNA 表达 模型组 CD2AP mRNA 表达 14 d 前与对照组比较无明显差异,28 d、42 d 时均显著高于对照组($P < 0.01$,图 3)。

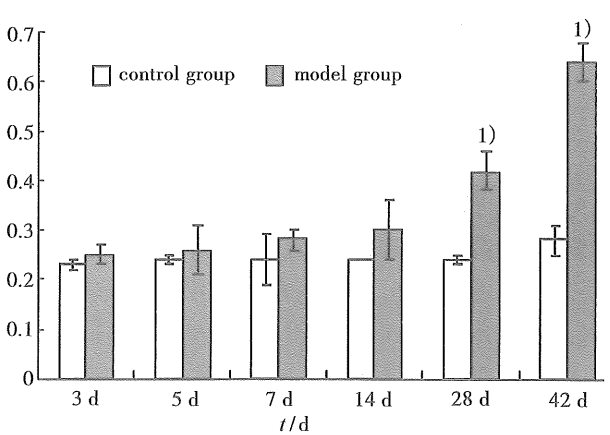


图 3 各时间点肾组织 CD2AP mRNA 相对表达量
Fig.3 Relative quantity of CD2AP mRNA expression in kidney tissues at the different time ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

From day 28 CD2AP mRNA expression in model rats increased. Compared with control group, 1) $P < 0.01$.

2.4 免疫组织化学

2.4.1 nephrin 蛋白表达 对照组肾小球 nephrin 沿着毛细血管祥呈连续性线样分布,模型组肾小球 nephrin 染色增强,从沿着毛细血管祥线样分布逐渐转变为不连续性颗粒样或节段性斑片状分布(图 4)。免疫组化染色半定量分析示:模型组 nephrin 表达从 14 d 时开始增加,呈进行性增加,到 42 d 时显著高于对照组($P < 0.05$,表 2)。

2.4.2 CD2AP 蛋白表达 对照组 CD2AP 沿着毛细血管祥呈线样分布,模型组 CD2AP 随时间进展染色区域扩大,染色程度增强,从沿着毛细血管祥线样分布逐渐转变为不连续性颗粒样或斑片状分布,(图 5)。免疫组化染色半定量分析示:CD2AP 表达 14 d 前与对照组无明显差异,28 d 时较对照组显著增加($P < 0.05$),逐渐增加至 42 d (表 3)。

表 2 两组大鼠各时间点 nephrin 免疫组化半定量分析

Table 2 Half-quantitative analysis of nephrin immunohistochemistry of the rats in model and control groups at the different time ($\bar{x} \pm s$)

Group	Case	Nephrin(PU)					
		3 d	5 d	7 d	14 d	28 d	42 d
Control	6	8.1 ± 0.3	8.1 ± 0.6	8.1 ± 0.7	8.1 ± 0.8	8.5 ± 0.6	9.0 ± 1.7
Model	6	8.3 ± 0.4	8.4 ± 0.5	8.6 ± 0.4	9.4 ± 0.59 ¹⁾	10.2 ± 1.2 ^{1), 2)}	12.6 ± 1.1 ^{1), 3)}
<i>t</i>		1.270	1.040	1.921	3.800	3.600	4.750

From day 14, nephrin expression in kidney tissues of model rats gradually increased.

1) compared with control group, $P < 0.05$; 2) compared with model group 14 d, $P < 0.01$; 3) compared with model group 28 d, $P < 0.01$

表 3 两组大鼠各时间点 CD2AP 免疫组化半定量分析

Table 3 Half-quantitative analysis of CD2AP immunohistochemistry of the rats in model and control groups at the different time ($\bar{x} \pm s$)

Group	Case	CD2AP expression (PU)					
		3 d	5 d	7 d	14 d	28 d	42 d
Control	6	6.2 ± 0.6	6.2 ± 0.7	6.2 ± 0.6	6.2 ± 0.8	6.6 ± 0.6	7.0 ± 0.6
Model	6	6.7 ± 0.4	6.8 ± 0.5	7.0 ± 0.6	7.0 ± 0.4	7.9 ± 1.0 ¹⁾	10.1 ± 2.1 ^{1), 2)}
<i>t</i>		1.930	2.100	2.360	2.331	3.762	4.234

From day 28, CD2AP expression in kidney tissues from model rats gradually increased

1) compared with control group, $P < 0.01$; 2) compared with model group 28 d, $P < 0.05$

2.5 相关分析

2.5.1 nephrin mRNA 表达与 24 h 尿蛋白量的相关分析 相关分析结果显示,模型组大鼠不同时间点的肾小球 nephrin mRNA 表达量与 24 h 尿蛋白量之间存在着显著的正相关关系($r = 0.878$, $P < 0.01$;图 6A)。

2.5.2 CD2AP mRNA 表达与 24 h 尿蛋白量的相关分析 相关分析结果显示,模型组大鼠不同时间点肾小球 CD2AP mRNA 表达量与 24 h 尿蛋白量之间存在着显著的正相关关系($r = 0.945$, $P < 0.01$;图 6B)。

3 讨论

足细胞足突间的 SD 是肾小球滤过屏障最重要的组成部分^[9],早在 1974 年 Rodewald 和 Karnovsky 已在透射电镜下观察到 SD 类似拉链样结构,桥接相邻的足突,但直到近年与此结构有关的蛋白才逐渐被阐明,如 nephrin、CD2AP、podocin、mFAT1 等。肾脏 nephrin 由足细胞合成,特异性表达于 SD,为一跨膜蛋白,由位于染色体 19q13.1 上的 NPHS1 基因编码,相邻足细胞足突 nephrin 的 N

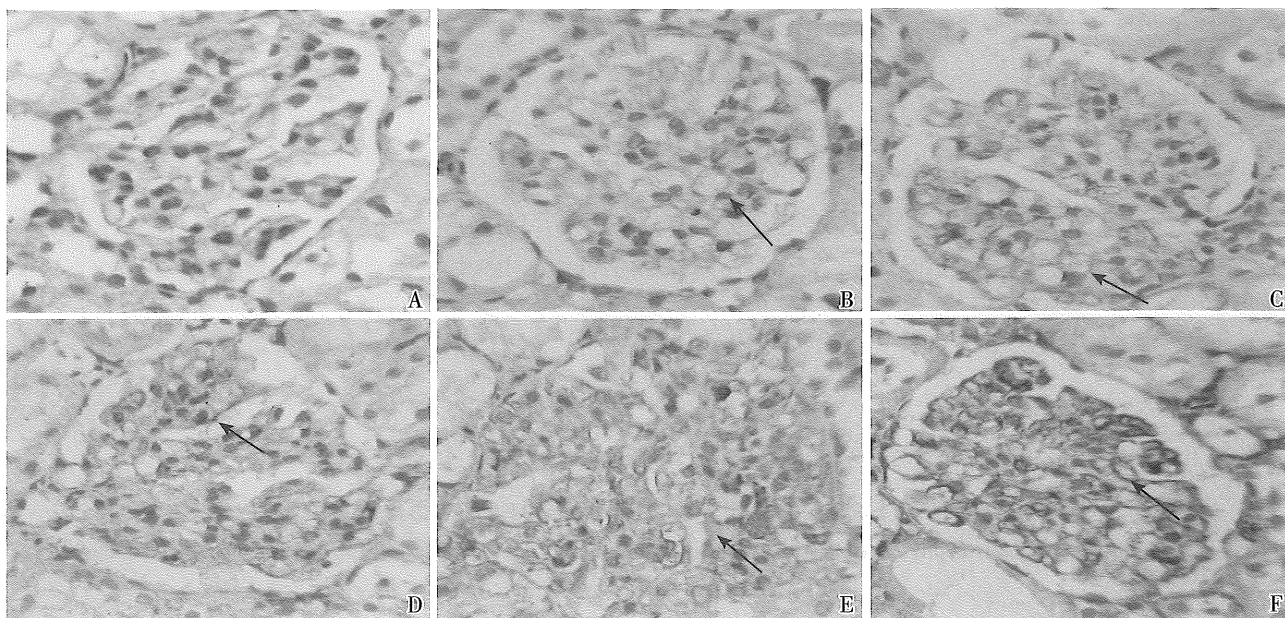


图4 肾小球 nephrin 免疫组织化学结果

Fig.4 Immunohistochemical staining for nephrin in glomerulus from the model rats the and control rats

A: negative control; B: control group; C: model group 7 d; D: model group 14 d; E: model group 28 d; F: model group 42 d

From day 14 after adriamycin injection, the distribution of nephrin shifted from a linear-like pattern along the capillary loops of glomerulus to a coarse granular. $\times 200$

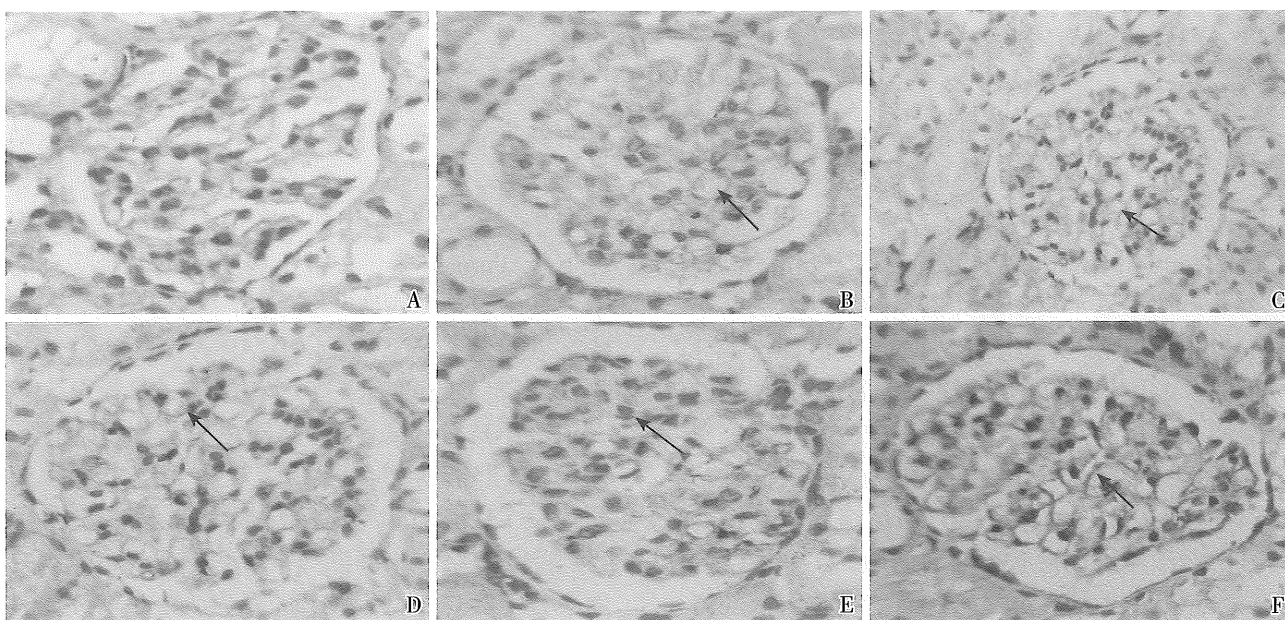


图5 肾小球 CD2AP 免疫组织化学结果

Fig.5 Immunohistochemical staining for CD2AP in glomerulus from the model rats and the control rats

A: negative control; B: control group; C: model group 7 d; D: model group 14 d; E: model group 28 d; F: model group 42 d

From day 28 after adriamycin injection, the distribution of CD2AP in model rats shifted from a linear-like pattern along the capillary loops of glomerulus to a discontinuous coarse granular or sheet-like distribution. $\times 200$

端的 6 个 Ig 分子在裂孔间通过嗜同作用以头对头的方式相互作用, 形成一个拉链样等孔结构^[10]。

CD2AP 是一种胞浆蛋白, 在肾脏中主要表达于足突细胞, 含有 639 个氨基酸残基, 氨基末端有 3 个

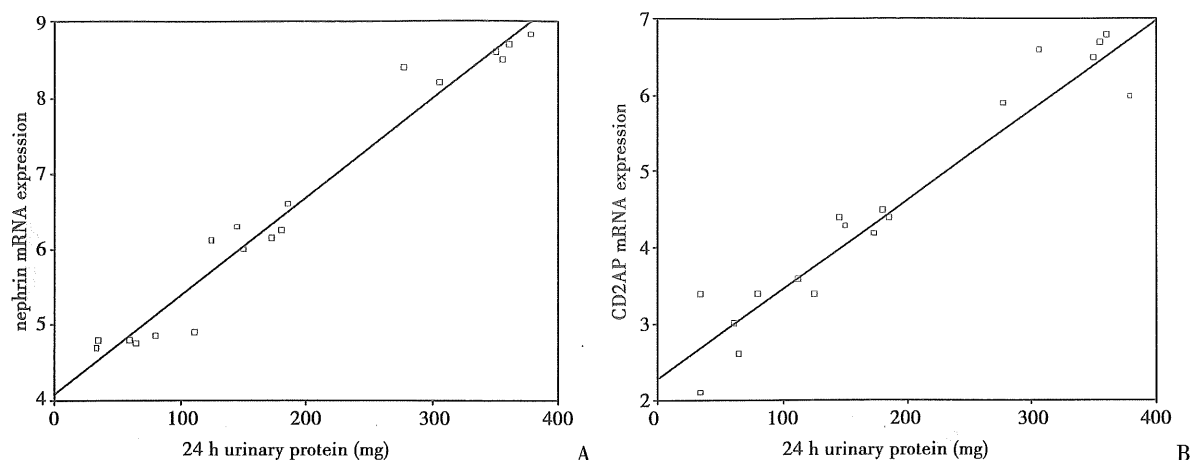


图 6 nephrin mRNA、CD2AP mRNA 表达量与 24 h 尿蛋白量的相关关系

Fig.6 Relationship between nephrin mRNA and 24 h urinary protein (left); relationship between CD2AP mRNA and 24 h urinary protein (right)

The mRNA expressions of nephrin and CD2AP were positively correlated with the amount of 24 h urinary protein ($r = 0.878$, $P < 0.01$; $r = 0.945$, $P < 0.01$).

连续的 SH3 结构域,羧基末端有 1 个螺旋结构域,这些结构与介导蛋白间相互作用及信号转导功能有关^[11]。文献报道,CD2AP 具有衔接子的功能^[12],其羧基端能够连接 nephrin 的羧基末端,从而将肾小球足突细胞 SD 与足突内细胞骨架蛋白连接起来,起到稳定 SD 的作用。

本实验中,注射阿霉素后 nephrin、CD2AP 表达均增加,7 d 时 nephrin mRNA 表达增加,14 d 时其蛋白表达亦显著增加;CD2AP 表达增加时间较晚,28 d 时其 mRNA 和蛋白表达才显著增加;相关分析结果显示模型组大鼠不同时间点的肾小球 nephrin mRNA 及 CD2AP mRNA 表达量与 24 h 尿蛋白量成正相关。由此可见,nephin、CD2AP 的表达增加与阿霉素肾病大鼠蛋白尿的发生发展密切相关。足细胞是分化成熟的细胞,具有高度分化、增生能力有限的特点^[13]。当足细胞受到损伤时,由于细胞周期素激酶抑制剂如 P21 和 P27 的蛋白表达和活性增加,足细胞只能通过有限的增生能力来代偿缺失的足细胞。当损伤进一步加重时,足细胞失去代偿能力,导致肾小球滤过膜的完整性遭到破坏,产生大量蛋白尿。据此推测,阿霉素肾病大鼠 nephrin、CD2AP 的表达增加不是足细胞增生所致,而可能是足细胞内这些蛋白合成增加的结果,这提示足细胞在抵抗损伤时启动了一种保护机制,即通过增加合成 SD 相关蛋白分子来维持足细胞的生物学功能。但免疫组化结果显示

nephin、CD2AP 的分布从沿着毛细血管袢样分布逐渐转变为不连续性颗粒样或节段性斑片状分布,即分布是异常的,没有正确定位于 SD,也就打乱了其与足细胞细胞骨架及相互之间的正常连接,故没有起到代偿作用。

既往在较多动物实验性肾病和人类获得性肾病综合征的研究中,nephin、CD2AP 的表达结果不一致,如 Luimula 等^[4]在嘌呤霉素肾病大鼠和 Heyman 肾炎模型中均观察到 nephrin mRNA 表达下降,Furness 等^[5]在微小病变和膜性肾病患者中发现 nephrin mRNA 也表达下降,赵非等^[6]在嘌呤霉素肾病大鼠观察到 CD2AP 表达随蛋白尿加重而下降;而 Schaefer 等^[7]在抗 Thy1.1 肾炎大鼠发现肾小球 nephrin 的表达随蛋白尿加重而进行性增加,邢燕等^[8]在阿霉素肾病大鼠中也发现 nephrin、CD2AP mRNA 和蛋白表达较对照组增高。我们的研究结果与邢燕等报道的相似,可见裂孔隔膜分子 nephin、CD2AP 的表达无论是增高或是降低,都可能与蛋白尿的发生发展密切相关,表达不一致可能与所用的肾病模型、检测方法不同有关。

综上所述,均提示阿霉素肾病大鼠肾小球 nephin、CD2AP 的表达变化在蛋白尿的发生机制中有着重要作用,然而,nephin - CD2AP 的相互作用如何尚有待进一步阐明。

(下转第 25 页 to page 25)