

[文章编号] 1000-4718(2009)01-0156-04

## 巢蛋白对维持足细胞形态作用的探讨\*

苏蔚<sup>1,2</sup>, 房成<sup>2</sup>, 杨海春<sup>1</sup>, 陈靖<sup>1</sup>, 顾勇<sup>1</sup>, 郝传明<sup>1△</sup>

(<sup>1</sup> 复旦大学附属华山医院肾脏科, 上海 200040; <sup>2</sup> 新乡医学院病理教研室, 河南 新乡 453003)

**[摘要]** 目的: 观察细胞骨架蛋白巢蛋白(nestin)在体外培养的小鼠足细胞中的表达及在维持足细胞形态方面的作用。方法: 应用免疫荧光技术检测 nestin 在条件性永生的足细胞中的表达;应用 RNA 干扰技术抑制巢蛋白 nestin 在足细胞中的表达,观察足细胞形态的变化并计算 nestin siRNA 组和无关序列 siRNA 组中有足突的足细胞数量。结果: 体外培养的足细胞中巢蛋白呈丝状分布于胞浆;转染 nestin siRNA 质粒的足细胞,足突变短或消失,而转染无关对照序列 siRNA 质粒的足细胞形态未见改变;无关对照组有足突的足细胞数为 77.0% ± 6.3%,转染 nestin siRNA 序列质粒组有足突的细胞数为 16.0% ± 4.6%,两组差异显著( $n=3, P<0.01$ )。结论: 巢蛋白 nestin 对于维持足细胞正常形态具有重要作用。

**[关键词]** 足细胞;巢蛋白;RNA 干扰;免疫荧光

**[中图分类号]** R3 **[文献标识码]** A

### Role of nestin in the maintenance of the structure of podocytes

SU Wei<sup>1,2</sup>, FANG Cheng<sup>2</sup>, YANG Hai-chun<sup>1</sup>, CHEN Jing<sup>1</sup>, GU Yong<sup>1</sup>, HAO Chuan-ming<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Division of Nephrology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; <sup>2</sup>Department of Pathology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China. E-mail: hnswei@yahoo.com.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the expression of nestin, a kind of cytoskeletal protein in cultured murine podocytes and the role of nestin in the maintenance of the podocyte structure. **METHODS:** The immortalized murine podocytes were cultured. The expression of nestin was determined by immunofluorescence. In differentiated podocytes, the expression of nestin was knock-down by RNAi. The effect of nestin knock-down was examined by Western blotting and immunofluorescence. The projections longer than maximal length of the cell body in which the cells transfected with siRNA and control vector that contained nonhomologous oligo were counted, respectively. **RESULTS:** Nestin siRNA markedly reduced or abolished nestin expression. In cells transfected with nestin siRNA, the percentage of cells with processes was significantly lower than that in cells transfected with control vector (77.0% ± 6.3% vs 16.0% ± 4.6%,  $n=3, P<0.01$ ). **CONCLUSION:** Nestin may play an important role in maintaining normal function of podocytes.

**[KEY WORDS]** Podocytes; Nestin; RNA interference; Immunofluorescence

Nestin (巢蛋白)是迄今为止发现的第Ⅵ类中间丝蛋白,被称为中枢神经系统多能干细胞的标志性蛋白。Nestin 在啮齿类动物肾脏发育过程中,可表达于来源于后肾间充质的肾小管上皮细胞及小球内皮细胞,而在肾脏发育成熟后, nestin 只表达于分化成熟的足细胞中<sup>[1]</sup>。足细胞是肾小球滤过膜的重要组成部分,是一种巨大胞体的上皮细胞,依靠其指状足突附着在毛细血管基底膜表面,足突之间形成曲折的滤过裂隙,足细胞的功能是血液选择性滤过的保障,足细胞功能障碍将导致蛋白尿形成及慢性肾脏病变的小球硬化性损伤。作为细胞骨架蛋白, nestin 在维持足细胞形态和功能方面是否具有特殊作用,

本实验应用 RNA 干扰技术沉默巢蛋白 nestin 在足细胞中的表达,以观察 nestin 对于维持足细胞形态方面的作用。

### 材 料 和 方 法

#### 1 材料

条件性永生的小鼠足细胞由 Peter Mundel 教授 (Mount Sinai School of Medicine) 馈赠。该细胞含有 1 个温度敏感的 SV40-T 抗原基因,该基因可由 IFN-γ 诱导的 H-2Kb 启动子控制,因此,当细胞培养在 33 ℃,有 IFN-γ 存在,细胞将处于未分化状态,以保持其永生性。当细胞置于 37 ℃,并去除 IFN-γ

[收稿日期] 2007-10-18 [修回日期] 2008-04-15

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30570861)

△ 通讯作者 E-mail: hnswei@yahoo.com.cn

后,细胞将开始分化。培养条件如文献所述<sup>[2]</sup>。小鼠抗人 nestin 抗体 (BD Pharmingen), Cy3 标记的荧光 II 抗 (DAKO), MOM 试剂盒 (Vector Laboratories), RPMI - 1640 培养液、胎牛血清 (Gibco), Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen); 无血清培养液 Opti - MEM (Gibco); 质粒中抽试剂盒 (Qiagen)。

## 2 方法

**2.1 免疫荧光染色** 小鼠足细胞接种于盖玻片上,待细胞完全贴壁后,取出贴有细胞的盖玻片,1 × PBS 洗 2 次,每次 5 min;冷丙酮 -20 °C 固定 3 min, MOM 试剂盒中 mouse antigen blocker 封闭,室温 1 h, nestin I 抗 1:50, 4 °C 过夜,对照组只加稀释液。Cy3 驴抗小鼠 IgG (1:400) 室温孵育 1 h, 荧光显微镜下观察结果,拍照

**2.2 Nestin RNA 干扰质粒的构建及扩增** 根据 NCBI 基因数据库检索出小鼠 Nestin mRNA 基因全长,基因序列号为 af110498,将其编码区用 RNA 干扰设计软件设计出短 RNA 链,构建特异的携带有 nestin 基因沉默 pRNAT - U6.1/Neo 质粒 A,靶基因 DNA 序列为 GGAAGTGACTAGTGAGACA,位于 nestin 基因序列 299 - 318 碱基位,携带有同样长度与人和鼠无同源性的无关序列 pRNAT - U6.1/Neo 质粒为对照质粒 B,靶基因 DNA 序列为 TTCTCCGAACGTGT-CACGT。目标 dsRNA 正义链和反义链中间以 9 个脱氧核苷酸的 Loop 结构相连,后面接有 RNA PolyIII 聚合酶转录中止位点,将它们分别连接在含有 U6 启动子的表达载体 pRNAT - U6.1/Neo 中,该载体同时具有 CMV 控制的绿色荧光蛋白 (GFP)。同时,模板链两端分别设计 BamH I、Hind III 酶切位点。Nestin siRNA 及无关对照序列质粒均由上海康成生物科技有限公司设计合成。

**2.3 质粒中抽** 将连接在载体 pRNAT - U6.1/Neo 的 nestin siRNA 及无关对照序列质粒转染大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 225 r/min 摇床,37 °C 过夜,收集菌液,按照 Qiagen 公司质粒中抽试剂盒操作说明进行质粒中抽,酶切鉴定后备用。

**2.4 实验分组** 实验分为 3 组,即未转染组 (对照组)、转染无关对照序列 siRNA 组、转染 nestin siRNA 组。

**2.5 质粒转染** 取 1 mL 含处于分化状态的足细胞的培养液加入离心管,离心半径 16 cm, 800 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 900  $\mu$ L 不含抗生素的培养基,机械吹打分散细胞。将 50 pmol siRNA 用 50  $\mu$ L Opti - MEM 稀释,混匀;另将 1  $\mu$ L Lipofectamine 2000 加入 50  $\mu$ L Opti - MEM 稀释,混匀,室温孵育 15 min;两液体轻柔混合,室温孵育 15 min。将混合物加入足细胞悬液中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿

度的培养箱中孵育,于 72 h 后荧光显微镜下观察细胞的转染情况,并对转染后细胞进行 nestin 免疫荧光染色及 Western blotting 检测。

**2.6 Western blotting 检测** 收集 3 组细胞,在细胞裂解液 [0.05 mol/L Tris - HCl (pH 8.0), 0.15 mol/L NaCl, 2 × 10<sup>-3</sup> mol/L EDTA, 0.1% SDS, 1% NP - 40, 0.5 × 10<sup>-3</sup> mol/L PMSF] 100  $\mu$ L 中裂解 15 min 后,12 000 × g 离心 20 min,收集上清蛋白质样本,考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。沸水浴变性 5 - 10 min。取 50 - 100  $\mu$ g 蛋白在 10% 的十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺 (SDS - PAGE) 胶中电泳,之后将蛋白质在电转移电泳槽 (40 mA, 15 h) 中转至硝酸纤维素膜。取出膜后用正常山羊血清室温下封闭 3 h,然后置于杂交袋中,加入 I 抗 (nestin 1:100; GAPDH 1:5 000), 4 °C 孵育过夜,II 抗 (1:10 000), 37 °C 孵育 60 - 120 min,结果转膜后丽春红染色进行校正。照相记录结果。

## 3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。

## 结 果

### 1 免疫荧光染色

将细胞培养于 37 °C,待其呈分化状态后,细胞形成树枝状结构。巢蛋白抗体染色显示,巢蛋白免疫反应蛋白沿细胞纵轴呈束状排列,无横向排列,并由胞浆延伸至一级足突和二级足突,呈纤维细丝状整齐排列。在核周形成长卷曲状纤维,呈笼状结构围绕细胞核,见图 1。

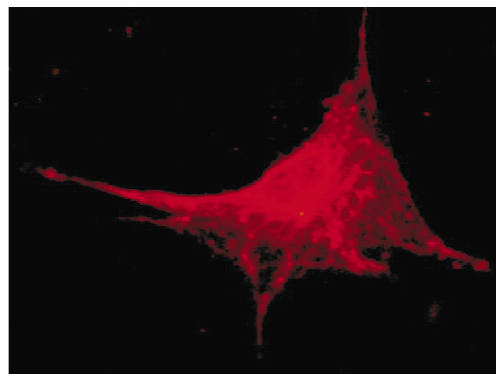


Fig 1 Nestin expression in the differentiated podocytes by immunofluorescence.

图 1 免疫荧光显示 nestin 在小鼠足细胞中的表达

### 2 RNA 干扰引起 nestin 基因表达沉默

**2.1 免疫荧光染色检测结果** Nestin siRNA 序列质粒转染 37 °C 分化状态足细胞,72 h 后,用抗鼠 nestin 抗体标记 nestin 蛋白,由于所用表达型载体带有 GFP,因此,凡是有绿色荧光的细胞, nestin 的表达被

抑制,即这些细胞中红色荧光较弱,而胞浆中无绿色荧光的细胞, nestin 不被抑制,红色荧光不减弱,见图 1。对照组和转染无关序列 siRNA 组 nestin 红色荧光显著。

**2.2 Western blotting 检测结果** 对照组即未转染组和无关序列 siRNA 转染后 72 h 的足细胞 nestin 均显著表达,经 nestin siRNA 转染后 72 h 的足细胞 nestin 表达显著降低,见图 2。

**3 转染 nestin siRNA 序列质粒后足细胞形态的变化**

凡是胞浆中有绿色荧光的细胞,足突变短或消失,而胞浆中无绿色荧光的细胞及对照组和转染无关序列 siRNA 质粒组,足细胞形态未见改变。

**4 转染无关序列 siRNA 质粒和 nestin siRNA 质粒后拥有足突的细胞数比较**

以足突的长度与足细胞胞体比较,凡足突出胞体长度,定为有足突细胞,而足突不足胞体长度,

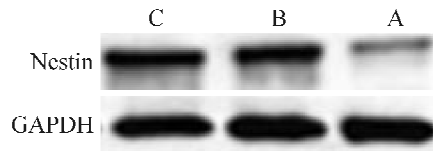


Fig 2 The nestin expression was knocked down after transfection of siRNA for 72 h (immunoblot of nestin in cultured murine podocytes). A: the podocytes transfected with nestin siRNA; B: control vector containing nonhomologous oligo; C: untreated podocytes. GAPDH was used as loading control.

图 2 siRNA 转染足细胞 72 h 后 nestin 基因表达沉默

则定为无足突细胞,计数每高倍视野中两组有足突的细胞数,每次实验随机选 10 个高倍视野,实验重复 3 次,结果显示:转染无关序列 siRNA 质粒组有足突的细胞数为 77.0% ± 6.3%,而转染 nestin siRNA 序列质粒组有足突的细胞数为 16.0% ± 4.6%,图 3,两者比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。

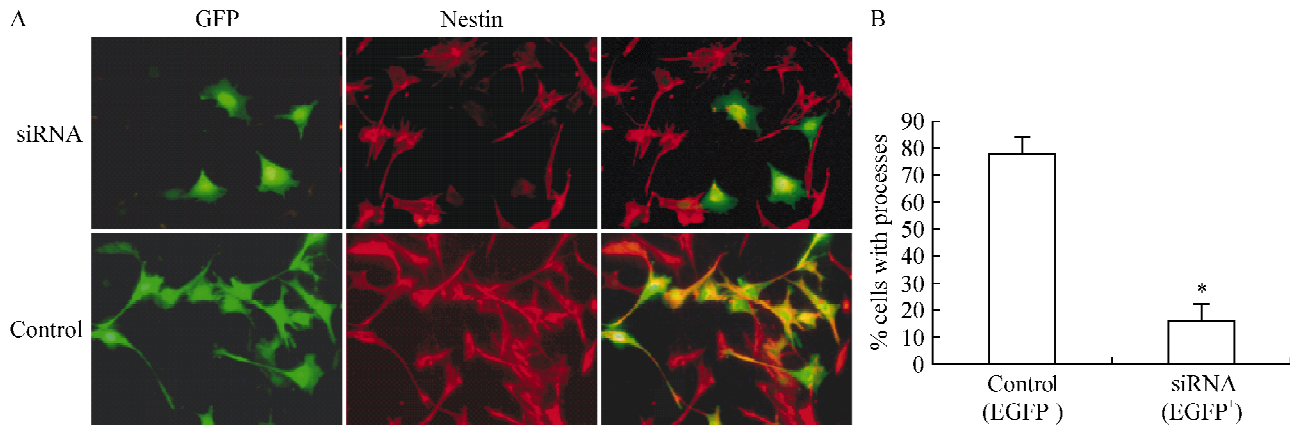


Fig 3 Effect of nestin silencing on process formation on cultured murine podocytes. Immortalized murine podocytes were cultured. Nestin siRNA or control vectors (both vectors also contain cytomegalovirus - driven enhanced green fluorescent protein [EGFP]) were transfected into cultured podocytes. A: nestin expression determined by immunofluorescence (red). Cells that are transfected with nestin siRNA or control vector can be identified by EGFP (green). B: percentage of cells with processes (from three independent experiments).  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.01$  vs control.

图 3 Nestin RNA 干扰对体外培养小鼠足细胞足突的影响

**讨 论**

分化状态足细胞区别于增殖状态足细胞的主要特征是细胞呈树枝状,由胞体伸出长长的足突, nestin 在足细胞中纵向排列,由胞体延伸至足突,本研究发现,应用 RNA 干扰技术将足细胞中的 nestin 蛋白表达下调后,足细胞形态发生明显改变,足突变短或消失,而转染无关对照序列组质粒的足细胞足突未见改变。因此推测, nestin 在维持足细胞形态和功能方面具有一定意义。

众所周知, nestin 是中枢神经胚胎干细胞的标志性蛋白,在组织发育成熟后表达下调,被组织特异的中间丝蛋白所替代。虽然 nestin 在成熟组织中表达已有很多报道,但仅局限于组织损伤后增生的具有

快速分裂能力的细胞中,因此又被称为增生和迁移细胞的标志<sup>[4]</sup>。在几乎所有的分化成熟的细胞类型中, nestin 表达均下调,只有组织损伤后会有瞬时表达<sup>[5,6]</sup>。本实验前期研究发现<sup>[1]</sup>, nestin 在分化成熟的足细胞中有表达,而在胚胎期足细胞的前体细胞中未见表达, nestin 在足细胞中与其它细胞完全相反的表达方式说明, nestin 作为唯一的一种第六类中间丝蛋白在足细胞中具有特殊的意义。

自 1990 年 Lendahl 等<sup>[7]</sup>发现 nestin 表达于 CNS 干细胞中以来,越来越多的功能在异源细胞中被发现,诸如在细胞骨架蛋白中的连接作用<sup>[8]</sup>;磷酸化调节其它中间丝蛋白的聚合和解聚,参与有丝分裂过程中细胞骨架蛋白的重排;参与细胞形态的重塑等;参与细胞膜表面的信号传递<sup>[9]</sup>。但是 nestin 在终末

分化状态组织中的表达及作用还未有报道。本实验结果首次显示 nestin 并不是干细胞和快速分裂细胞的专有蛋白,还可表达于高度分化的足细胞中,而且提示 nestin 与足细胞正常形态和功能的维持有关。

足细胞是一种具有复杂细胞骨架系统的高度分化的上皮细胞,它最主要的形态学特点是其呈指状连接的足突<sup>[10]</sup>,这些足突由裂孔膜连接,是肾小球滤过膜的最后一道屏障,决定了肾小球选择性滤过的蛋白分子的大小<sup>[11]</sup>,任何原因引起的足突的损伤都可引起蛋白尿,影响肾脏功能<sup>[12]</sup>。由于足细胞的形态和所处位置的独特性,保持足细胞完整结构包括在足细胞之间以及足细胞与基底膜之间建立稳定的联结,因此,完整而正常的细胞骨架系统是维持足突形态和功能的重要保证。足细胞骨架系统最基本的作用是维持裂孔膜复合物与基底膜之间的紧密连接,保证肾小球滤过功能的正常完成。其次,细胞骨架系统为足细胞提供抵抗机械和非机械压力的能力,使之具有一定弹性,抵御来自心脏跳动的血液冲击力及血管内流体静压,防止血管壁的扩张和膨胀<sup>[13]</sup>。

在足细胞的胞体和初级足突,主要分布的细胞骨架蛋白是微管和中间丝,如 vimentin、desmin,微丝形成致密的网络结构延伸至二级足突<sup>[11,14]</sup>。当然,细胞内的骨架蛋白并不是孤立存在的,而是形成复杂强大的网络系统,在维持细胞形态和功能方面协调发挥作用。和其它中间丝蛋白一样,nestin 在其蛋白结构上也具有典型的含有重复的 7 个疏水氨基酸序列,和其它中间丝蛋白不同的是 nestin 有 1 个较短的 N 末端,和 1 个较长的 C 末端<sup>[8-10]</sup>,由于 N 末端较短,因此 nestin 不能独立自行形成同二聚体,只能和其它中间丝蛋白分子形成异二聚体;由于 C 末端较长,使得 nestin 能够和微管、微丝结合。这些特征使 nestin 成为连接细胞骨架蛋白的桥梁<sup>[15,16]</sup>。由于还没有找到 nestin 的抑制因子以及 nestin 缺失的动物模型,使得体内研究 nestin 功能受到限制,因此,我们应用 RNA 干扰技术,沉默 nestin 在足细胞中的表达,以研究 nestin 在足细胞中的功能,发现足细胞足突变短或消失,这一结果支持 nestin 在维持足细胞正常结构方面的重要作用,而其作用机制还有待于进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Chen J, Boyle S, Zhao M, et al. Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes[J]. *Am Soc Nephrol*, 2006, 17(5):1283-1291.
- [2] Mundel P, Reiser J, Borja AZ, et al. Rearrangement of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell line[J]. *Exp Cell Res*, 1997, 236(1):248-258.
- [3] 苏蔚,陈靖,杨海春,等.足细胞中巢蛋白的表达及其相互作用的分子的研究[J].*中华肾脏病杂志*, 2006, 22(7):406-410.
- [4] Wiese C, Rolletschek A, Kania G, et al. Nestin expression - a property of multi-lineage progenitor cells? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(19-20):2510-2522.
- [5] Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, et al. Independent regulatory elements in the nestin gene direct trans gene expression to neural stem cells or muscle precursors [J]. *Neuron*, 1994, 12(1): 11-24.
- [6] Lothian C, Lendahl U. An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells[J]. *Eur J Neurosci*, 1997, 9(3): 452-462.
- [7] Lendahl U, Lyle B, Zimmerman, et al. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. *Cell*, 1990, 60(4):585-595.
- [8] Marvin M, Dahlstrand J, Lendahl U, et al. A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice[J]. *Cell Sci*, 1998, 111(Pt14): 1951-1961.
- [9] Chou YH, Bischoff J, Beach D, et al. Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin[J]. *Cell*, 1990, 62(6):1063-1071.
- [10] Kobayashi N, Reiser J, Schwarz K, et al. Process formation of podocytes: morphogenetic activity of microtubules and regulation by protein serine/threonine phosphatase PP2A[J]. *Histochem Cell Biol*, 2001, 115(3):255-266.
- [11] Holzman LB, St John PL, Kovari IA, et al. Nephron localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(4):1481-1491.
- [12] 卢远航,邓安国,杨晓,等.大鼠足细胞损害后肾小球血管生成素的异常表达及其意义[J].*中国病理生理杂志*, 2007, 23(1):109-115.
- [13] Quaggin SE. Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation[J]. *Microsc Res Tech*, 2002, 57(4):208-211.
- [14] Drenckhahn D, Franke RP. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man[J]. *Lab Invest*, 1988, 59(5):673-682.
- [15] Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease[J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63:345-382.
- [16] Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(1):79-90.