

## · 基础研究 ·

# 马兜铃酸损伤大鼠肾小球足细胞的研究

程虹 湛贻璞 董鸿瑞 王艳艳 芮宏亮

**【摘要】目的** 探讨马兜铃酸是否能损害肾小球足细胞。**方法** 用关木通浸膏水溶液间断灌胃制作马兜铃酸肾损害大鼠模型, 分别于第 1、4 周末检测早期马兜铃酸肾损害大鼠 24 h 尿蛋白量, 并以十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳观察尿蛋白成分。随后处死大鼠取肾组织, 用激光显微切割捕获技术分离肾小球; 用实时荧光定量 PCR 检测肾小球中 nephrin、podocin、CD2AP、podocalyxin、podoplanin 的 mRNA 表达; 电镜下测量肾小球足突的平均宽度。**结果** 模型大鼠 4 周末尿蛋白量较对照组显著增多 ( $P < 0.01$ ), 其中白蛋白含量明显增加。电镜结果显示肾小球足突平均宽度较对照组显著增宽 ( $P < 0.01$ )。肾小球中 nephrin、podocin、CD2AP、podocalyxin、podoplanin 的 mRNA 表达均较对照组显著减少, 分别下调 34%、62%、56%、50% ( $P < 0.01$ ) 及 27% ( $P < 0.05$ )。**结论** 马兜铃酸能损伤肾小球足细胞, 导致足细胞相关蛋白 mRNA 表达下调, 足突节段增宽, 并出现白蛋白尿。

**【关键词】** 马兜铃酸; 足细胞; 损伤

**Study of glomerular podocyte injury induced by aristolochic acid** CHENG Hong, CHEN Yi-pu, DONG Hong-rui, WANG Yan-yan, RUI Hong-liang. Division of Nephrology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China  
Corresponding author: CHEN Yi-pu, Email: chen\_yipu@medmail.com.cn

**【Abstract】Objective** To explore whether the glomerular podocytes can be damaged by aristolochic acid. **Methods** Thirty-two male SD rats were equally divided into the following 2 groups: model group in which the rats received the extract of *Aristolochia manshuriensis* Kom (AmK) by gavage; control group only received tap water by gavage. 24 h urinary protein excretion was measured at the end of the 1st and 4th week, and SDS-PAGE gel electrophoresis was performed to detect the protein in urine. At the end of the 4th week, all the rats were sacrificed and the glomeruli were isolated by laser capture microdissection technique. The mRNA expression of nephrin, podocin, CDA2P, podocalyxin and podoplanin in isolated glomeruli was determined by RT-PCR, and the average width of glomerular foot process was measured by electron microscopy and image analysis. **Results** At the end of the 4th week, 24 h urinary protein excretion in the model group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ) and the urinary albumin content in model group was also obviously increased. The average width of glomerular foot process in the model group was significantly larger than that in control group ( $P < 0.01$ ). The mRNA expressions of nephrin, podocin, CDA2P, podocalyxin and podoplanin in glomeruli were significantly down-regulated in the model group compared with the control group, which decreased by 34%, 62%, 56%, 50% ( $P < 0.01$ ) and 27% ( $P < 0.05$ ), respectively. **Conclusions** Aristolochic acid can damage the glomerular podocytes, resulting in the down-regulation of nephrin, podocin, CD2AP, podoplanin and podocalyxin mRNA expression, the segmental widening of foot process, and increased urinary protein excretion.

**【Key words】** Aristolochic acid; Podocyte; Injury

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.03.013

作者单位: 100029 北京, 首都医科大学附属安贞医院肾内科

通信作者: 湛贻璞, Email: chen\_yipu@medmail.com.cn

急性马兜铃酸肾病的主要病理改变是急性肾小管坏死,然而,我们既往的研究发现,部分患者尿蛋白量较多,甚至出现大量蛋白尿及低蛋白血症;电镜可见肾小球足突节段性融合<sup>[1-2]</sup>。因此,我们推测,马兜铃酸除主要损伤肾小管外,也可能损伤肾小球<sup>[2]</sup>。本研究用激光显微切割技术,分离早期马兜铃酸肾病模型大鼠的肾小球,进行足细胞形态及其相关蛋白变化的研究,以对上述假说作验证。

## 材料与方 法

### 一、主要材料

雄性 SD 大鼠,清洁级,体质量(200±10)g(北京维通利华)。马兜铃酸制剂按文献[3]制作。

### 二、方法

1. 动物分组及模型制作: 32 只雄性 SD 大鼠按数字随机法分为对照组(C 组)及马兜铃酸肾损害模型组(M 组),每组 16 只。模型组给予木通浸膏水溶液间断灌胃,初始剂量相当于马兜铃酸 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,连续 5 d,停药 9 d;此后剂量减至相当于马兜铃酸 15 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,连续 7 d,休息 7 d,直至第 4 周末。对照组给予等量蒸馏水灌胃。给药前 1 d、给药后第 1 周和 4 周末,用代谢笼留取大鼠 24 h 尿液做相关化验。于造模后第 1 周及 4 周末,随机处死两组大鼠各 8 只。

2. 肾脏标本获取及保存: 处死大鼠后留取两侧肾脏。一侧肾脏横切两半,分别予 OTC 胶迅速包埋,置于干冰中速冻后,放置于-80℃冰箱中保存用于激光显微切割;另一侧肾脏的大部分肾组织置于 10%中性甲醛缓冲溶液中固定,进行免疫组织化学检查,小部分置于 2.5%戊二醛溶液中固定,用于电镜检查。

3. 尿蛋白定量: 用 Bradford 试剂盒(江苏碧云天)测定尿蛋白浓度,然后乘以全日尿量,算出 24 h 尿蛋白量。

4. 尿蛋白十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳: 第 4 周末测定尿蛋白浓度后,留取含 60 μg 蛋白的尿液。将同组 8 只大鼠留取尿液混匀,冷冻干燥,测定前溶解到 100 μl SDS 样本缓冲液中,取 10 μl 上样,于 SDS-PAGE 凝胶上以 100 V 恒压电泳 90 min,再以考马斯亮蓝 R250 染色 1 h,甲醇-冰醋酸脱色 1 h,扫描,分析实验结果。

5. 激光显微切割捕获肾组织: 取出置于-80℃保存的肾脏组织,在-20℃冷室切片机中制作 8 μm 厚的冰冻切片,粘贴在去 RNA 酶的专用薄膜玻片上。置组织切片于 75%的乙醇中(保存于-20℃冷室切片机中)3 min,取出切片,加入配好的 Kresyljiolett 染液(甲酚紫醋酸盐染液)100 μl 速染 50 s。迅速置于 100%的乙醇中上下洗片 5 次,再依次放入 80%及 75%的乙醇中各 30 s,最后取出待稍干后迅速放入-20℃冰箱中,密闭保存至进行显微切割。激光显微镜(×200)定位,95~100 束激光切割捕获肾小球。每例标本切割捕获肾小球 80~100 个。

6. RT-PCR: 从微切肾小球组织提取 mRNA,反转录成 cDNA,然后进行 RT-PCR。大鼠 nephrin、podocin、CDA2P、podocalyxin、podoplanin 和内参照 18S 的引物全部由上海生工公司合成,见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

引物	序列	产物(bp)
nephrin	正链 5'-GGGGACCCCTCTATGATGAA-3'	171
	负链 5'-GTGAAGCGTCTCACACCAGA-3'	
podocin	正链 5'-TCTTGTCTCTCCTCCCTGA-3'	195
	负链 5'-AATTTTGGCTGTTGGAGGTG-3'	
CDA2P	正链 5'-CTCCAAAACCTGACCCGTTA-3'	233
	负链 5'-CAACTGCTTTGGAAGGACTCGC-3'	
podocalyxin	正链 5'-GTTCATTTGTCTCCATCCCC-3'	231
	负链 5'-ATCCTGCTAAGCAAAGGCAA-3'	
podoplanin	正链 5'-GATGGAGACCTCATCCCAGA-3'	236
	负链 5'-TCCATCCACCACCTAGAAGC-3'	
18S	正链 5'-GACGATCAGATACCGTCTACTTC-3'	138
	负链 5'-GTTTCAGCTTTGCAACCATACTCC-3'	

7. 肾小球足突宽度测量: 常规制作电镜切片,醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,透射电镜检查(×20 000)。于每张铜网上随机选取 4~5 个视场,取外周非系膜区足突摄片,每例共摄片 10~12 张。图像以 jpg 文件格式存入计算机中,进行图像分析。用德国 Leica Qwin Pro 2.6 分析软件,测量照片中肾小球基底膜的长度(μm)及相应基底膜上足突裂孔数。将每个标本的测量值汇总后带入公式  $WFP = \pi/4 \cdot (\sum GBM \text{ length} / \sum \text{slits})$ ,计算出该例标本肾小球足突的平均宽度<sup>[4]</sup>。

8. 统计学处理: 计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组

间差异比较用 *t* 检验。全部统计学处理用 SPSS 12.0 软件进行。

### 结 果

#### 一、尿蛋白

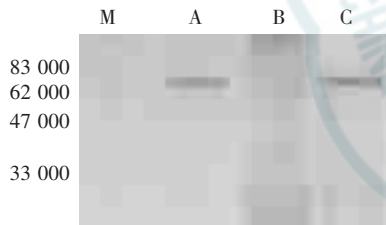
1.尿蛋白量:实验前及给药后 1 周时,2 组尿蛋白量差异无统计学意义;给药后 4 周时,模型组大鼠的尿蛋白量显著增加,与对照组差异有统计学意义,见表 2。

表 2 两组大鼠尿蛋白量(mg/d,  $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	0 周	1 周	4 周
对照组	3.12±1.42	7.13±1.81	10.39±1.83
模型组	3.80±1.58	8.38±3.31	13.81±2.44 <sup>a</sup>

注:与对照组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01

2. 尿 SDS-PAGE 凝胶电泳:与对照组比较,第 4 周模型组大鼠尿中白蛋白含量增加,见图 1。



注:M:分子量标记;A:白蛋白标准品;B:对照组;C:模型组

图 1 第 4 周 2 组大鼠尿 SDS-PAGE 电泳

#### 二、肾小球足突宽度

模型组大鼠 1 周时肾小球足突未见明显增宽;4 周时足突出现节段融合、宽度增加,显著高于对照组,见表 3,图 2。

#### 三、肾小球微切组织各指标 mRNA 表达

第 1 周时 2 组大鼠肾小球各指标 mRNA 表达差异无统计学意义;第 4 周时模型组肾小球

表 3 2 组大鼠肾小球足突平均宽度( $\mu\text{m}/\text{个}, \bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	1 周	4 周
对照组	0.238±0.032	0.259±0.020
模型组	0.235±0.014	0.359±0.058 <sup>a</sup>

注:与对照组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01

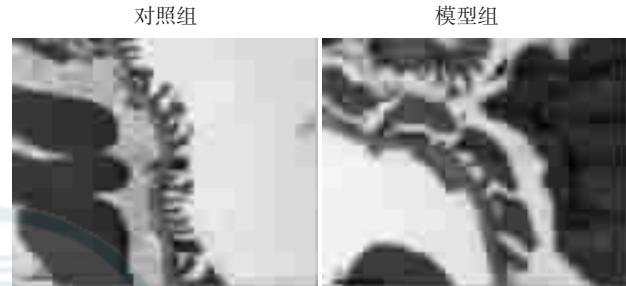


图 2 第 4 周 2 组大鼠肾小球足突宽度( $\times 20\ 000$ )

nephrin、podocin、CD2AP、podocalyxin 及 podoplanin 的 mRNA 表达较对照组均显著下调,分别减少了 34%、62%、56%、50%(均 *P* < 0.01) 及 27%(*P* < 0.05),见表 4。

### 讨 论

马兜铃酸为硝基菲类化合物,具有细胞毒性作用<sup>[1-2]</sup>。由于马兜铃酸进入体内后在肾组织中持续存在的时间最长、浓度最高<sup>[5]</sup>,因此肾损害最突出。我们的早期研究已明确马兜铃酸在肾组织中作用的主要靶细胞是近端肾小管上皮细胞及肾间质成纤维细胞<sup>[2,6]</sup>;近年发现马兜铃酸也能损害血管内皮细胞<sup>[7]</sup>。本研究则探讨肾小球足细胞损害的问题。

足细胞又被称作肾小囊脏层上皮细胞,它由三段细胞结构组成,即细胞体、主突起及指状足突(主突起可以直接分出足突或分支后再分出足突)。足细胞的细胞体和主突起并不直接与肾小球基底膜相连,而是漂浮在肾小囊内滤液中,只

表 4 第 1、4 周时 2 组肾小球各指标的 mRNA 相对表达量( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	时间	nephrin	podocin	CD2AP	podocalyxin	podoplanin
对照组	1 周	1	1	1	1	1
	4 周	1	1	1	1	1
模型组	1 周	0.814±0.291	1.081±0.539	1.085±0.329	1.387±0.612	0.964±0.639
	4 周	0.641±0.170 <sup>b</sup>	0.384±0.140 <sup>b</sup>	0.443±0.134 <sup>b</sup>	0.504±0.230 <sup>b</sup>	0.726±0.325 <sup>a</sup>

注:与对照组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01



有足突直接附着于肾小球基底膜,相邻足细胞的足突相嵌形成指状交错(形似拉链),足突之间间隙即为滤过裂孔,由裂孔隔膜桥接(bridging)<sup>[8-9]</sup>。

随着对足细胞的深入研究,现知足突可分成 3 个主要功能区:(1)足突基底区(basal aspect):此区具有几个重要的连接蛋白包括 podoplanin,  $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 5$  及  $\beta 4$  整合素,和  $\alpha$ - $\beta$ -dystroglycan,它们使足突牢固地粘附于肾小球基底膜上。(2)足突底外侧区(basolateral region):相邻的足突是以裂孔隔膜桥接,底外侧区即为裂孔隔膜插入足突的部位。现知在裂孔隔膜上存在 nephrin、Neph-1、Neph-2、Filtrin、FAT1 及 P-钙黏素等跨膜蛋白,而在裂孔隔膜插入位点的足突中又存在 podocin、CD2AP、ZO-1 及 densin 等蛋白,它们将裂孔隔膜的跨膜蛋白连接到足突的肌动蛋白细胞骨架上,发挥功能作用。(3)足突顶区(apical part):足突顶区有唾液蛋白 podocalyxin 等,它们在维持足细胞膜阴电荷上具有重要作用<sup>[4,8-11]</sup>。上述各种足细胞相关蛋白在维持足细胞正常形态及肾小球滤过功能上均具有重要作用。

研究发现,在获得性肾小球疾病患者及动物模型的肾小球中,上述 5 种足细胞相关蛋白,除 CD2AP 外,均表达下调<sup>[4,12]</sup>。在微小病变病、局灶节段性肾小球硬化症(FSGS)、膜性肾病、糖尿病肾病及狼疮肾炎(LN)等患者中,以及在嘌呤霉素肾病、Heymann 膜性肾病及链脲菌素糖尿病肾病动物模型中均发现 nephrin 蛋白表达下调<sup>[4,12]</sup>;在 FSGS、LN 及某些肾炎综合征患者中,以及在嘌呤霉素肾病动物模型中 podocin 蛋白表达下调<sup>[4,12]</sup>;在 FSGS 患者,以及嘌呤霉素肾病和 db/db 小鼠糖尿病肾病模型中 podocalyxin 蛋白表达下调<sup>[4,12-13]</sup>。另外,在嘌呤霉素肾病动物模型中 podoplanin 蛋白表达下调<sup>[12,14]</sup>。结果说明在上述获得性肾小球疾病中都存在足细胞损伤,在上述足细胞相关蛋白表达下调的同时,还常伴随出现足突融合的病理形态改变。

本研究中,第 1 周末,马兜铃酸肾损害大鼠模型尿蛋白尚未增多,足细胞形态尚无明显改变,肾小球足细胞上 nephrin、podocin、CD2AP、podoplanin 及 podocalyxin 的 mRNA 表达与对照组差异均无统计学意义;第 4 周末,与对照组比较,模型组大鼠尿蛋白量显著增加,白蛋白排泄也增

多,足细胞足突出现节段性增宽及融合,同时 nephrin、podocin、CD2AP、podoplanin 及 podocalyxin 的 mRNA 表达全部显著下调。结果显示马兜铃酸对肾小球足细胞也有毒性作用,能导致足细胞病变。经检索,迄今尚无类似研究结果报道。

## 参 考 文 献

- [1] 陈文, 谌贻璞, 李安, 等. 马兜铃酸肾病的临床与病理表现. 中华医学杂志, 2001, 81: 1101-1105.
- [2] 谌贻璞. 马兜铃酸肾病. // 谌贻璞, 主编. 全国高等学校医学研究生规划教材《肾内科学》. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 132-149.
- [3] 高艳丽, 谌贻璞, 董鸿瑞, 等. 慢性马兜铃酸肾病动物模型及牛磺酸的早期保护作用. 中国中西医结合杂志, 2003, 23 增刊: 109-112.
- [4] Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. J Am Soc Nephrol, 2003, 14: 2063-2071.
- [5] 苏涛, 屈磊, 张春丽, 等. 马兜铃酸 I 在大鼠体内的代谢特征研究. 中国中药杂志, 2004, 29: 676-681.
- [6] 唐功耀, 田雪飞, 谌贻璞. 马兜铃酸对人肾细胞作用的实验研究. 中华肾脏病杂志, 2002, 18: 266-269.
- [7] 王艳艳, 谌贻璞, 唐功耀, 等. 马兜铃酸对人脐静脉内皮细胞的作用. 中华肾脏病杂志, 2007, 23: 652-656.
- [8] Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Takagi M, et al. The role of podocytes in proteinuria. Nephrology (Carlton), 2007, 12 Suppl 3: S15-S20.
- [9] Cheng H, Harris RC. The glomerulus—a view from the outside—the podocyte. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42: 1380-1387.
- [10] Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. Nat Clin Pract Nephrol, 2006, 2: 271-282.
- [11] Mathieson PW. Update on the podocyte. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009, 18: 206-211.
- [12] Moreno JA, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, et al. A slit in podocyte death. Curr Med Chem, 2008, 15: 1645-1654.
- [13] 祁佳, 肖跃飞, 张冬娟, 等. 高糖引起小鼠肾小球足细胞 podocalyxin 蛋白的表达下调. 北京大学学报(医学版), 2007, 39: 167-170.
- [14] Luimula P, Sandstrom N, Novikov D, et al. Podocyte-associated molecules in puromycin aminonucleoside nephrosis of the rat. Lab Invest, 2002, 82: 713-718.

(收稿日期: 2011-08-15)

(本文编辑: 李耀荣)