

## 短篇论著

文章编号:1000-5404(2014)17-1858-04

# 大鼠嘌呤霉素氨基核苷肾病中肾小球“小管化”现象的观察

李 塘<sup>1</sup>, 陈燕铭<sup>1,2</sup> (510630 广州, 中山大学附属第三医院: 特诊医疗中心<sup>1</sup>, 内分泌与代谢疾病科<sup>2</sup>)

**[摘要]** **目的** 观察大鼠嘌呤霉素氨基核苷肾病(puromycin aminonucleoside nephrosis, PAN)模型中肾小球“小管化”的现象。**方法** 将30只雄性SD大鼠按随机数字表法分为6组,溶媒对照组(一次性腹腔注射生理盐水2 mL)及注射嘌呤霉素氨基核苷(puromycin aminonucleoside, PA)后2、5、10、15、20 d组(均一次性腹腔注射溶于生理盐水的嘌呤霉素氨基核苷15 mg/100 g),每组5只。采用一次性腹腔注射嘌呤霉素氨基核苷15 mg/100 g的方法制作PAN模型。用HE染色、免疫荧光检测和透射电镜观察的方法确定各组大鼠肾小囊壁层上皮细胞的类型,测定各组24 h尿蛋白定量。采用SPSS 13.0统计软件分析各组该现象的发生率和严重度差异。**结果** 大鼠PAN模型肾小囊壁层的立方状上皮细胞的形态学特征和免疫学表型均与近端小管上皮细胞表型一致,即肾小球发生了“小管化”。模型初期,肾小球“小管化”的发生率和严重度随模型进展逐渐加重,10、15 d组较正常组均明显升高( $P < 0.05$ ),20 d组虽然“小管化”仍较正常组明显升高( $P < 0.05$ ),但已出现下降的趋势。肾小球“小管化”的发生率( $r = 0.55, P < 0.05$ )和严重度( $r = 0.56, P < 0.05$ )与24 h尿蛋白定量正相关。**结论** 大鼠PAN模型发生了肾小球“小管化”,并且在模型中呈现动态变化。这一现象有可能为研究足细胞和肾小囊壁层上皮细胞损伤的机制提供新思路。

**[关键词]** 嘌呤霉素氨基核苷肾病;肾小囊壁层上皮细胞;肾近端小管上皮细胞;肾小球小管化

**[中图分类号]** R-332; R329.24; R692.6

**[文献标志码]** A

嘌呤霉素氨基核苷肾病(puromycin aminonucleoside nephrosis, PAN)模型是研究微小病变型肾病综合征(minimal change nephropathy syndrome, MCNS)和局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)的理想动物模型。该模型以足细胞损伤和肾病范围的蛋白尿为特点,足细胞是嘌呤霉素氨基核苷(puromycin aminonucleoside, PA)诱导损伤的主要靶点<sup>[1]</sup>。既往研究较少关注该模型中足细胞以外的其他肾脏固有细胞的变化。正常肾脏中,肾小囊壁层上皮细胞呈单层扁平状,有少量的短的微绒毛和1根中心纤毛,近端小管上皮细胞呈单层立方状,并且有显著的刷状缘,这两种细胞在肾小体与肾小管衔接处(即肾小管的起始部位)突然移行<sup>[2]</sup>。肾小球“小管化”(glomerular tubularization)是指近端肾小管上皮细胞沿着肾小囊壁层内表面逆行延伸进入肾小囊的现象<sup>[3-4]</sup>,目前报道极少,多见于缺血/再灌注所致急性肾损伤模型<sup>[3-6]</sup>。我们在制作大鼠PAN模型时发现,模型组一些肾小囊壁层出现立方状的上皮细胞,并且与近端小管上皮细胞相延续。为了明确这一现象是否为肾小球“小管化”,本研究用光镜、电镜和免疫荧光

染色的方法鉴定这种立方状上皮细胞的类型,并动态观察其在模型进程中的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠30只,体质量110~140 g(购于中山大学动物实验中心),按随机数字表法<sup>[7]</sup>分为6组:溶媒对照组(一次性腹腔注射生理盐水2 mL)及注射PA后2、5、10、15、20 d组[均一次性腹腔注射溶于生理盐水的PA(美国Sigma公司)15 mg/100 g],每组5只。实验时间为20 d,在注射PA后2、5、10、15、20 d脱颈处死各组大鼠,取左肾上极肾皮质,留作病理检测、免疫荧光检测和电镜观察。电镜标本送中山医学院电镜室观察。

### 1.2 24 h尿蛋白定量的测定

在注射PA后2、5、10、15、20 d分别收集各鼠24 h尿,用全自动生化分析仪分析24 h尿蛋白定量。

### 1.3 肾小球“小管化”的鉴定

**1.3.1 病理制片观察** 光镜观察:标本置于4%中性甲醛固定24 h,脱水、石蜡包埋、连续切片,常规HE染色,镜下观察并摄片。电镜观察:对标本进行固定、脱水、包埋、切片、捞片,用醋酸铀与柠檬酸铅双染法染色,透射电镜下阅片摄片。

**1.3.2 免疫荧光检测** 主要试剂:一抗:兔抗Aquaporin-1多克隆抗体(购于Millipore公司,美国)。Aquaporin-1大量表达在近端小管,它定位在近端小管上皮细胞的顶膜和基侧膜

**[通信作者]** 陈燕铭, E-mail: yanmingch@qq.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140711.1708.003.html> (2014-07-11)

上,是近端小管上皮细胞的标志<sup>[8]</sup>。二抗:Fluorescent phalloxin 标记羊抗兔 IgG(购于 Invitrogen 公司,美国)。

1.3.3 染色方法 6 μm 肾组织石蜡切片,常规脱蜡至水、抗原修复、封闭液封闭。加一抗 50 μL(阴性对照切片以封闭液代替)4 ℃ 孵育过夜。滴加二抗 50 μL 37 ℃ 避光孵育 45 min。避光条件下予 DAPI 染核,封片、晾干,于激光共聚焦显微镜下观察。以上各步骤间有 PBS 洗涤。

### 1.4 肾小球“小管化”的评估

1.4.1 肾小球“小管化”的发生率 计数切片上全部肾小球的总数,以及同一切片内发生“小管化”的肾小球数量。每切片“小管化”的发生率 = “小管化”的肾小球数/该切片肾小球的总数,每只大鼠计数 3 个切片,求平均数。

1.4.2 肾小球“小管化”的严重度 严重“小管化”:近端小管样上皮细胞覆盖程度占肾小囊壁层圆周长 1/4 及以上的肾小球。计数切片上发生严重“小管化”的肾小球数量,以及同一切片内发生“小管化”的肾小球数量。每切片“小管化”严重度 = 严重“小管化”的肾小球数/“小管化”的肾小球数,每只大鼠计数 3 个切片,求平均数。

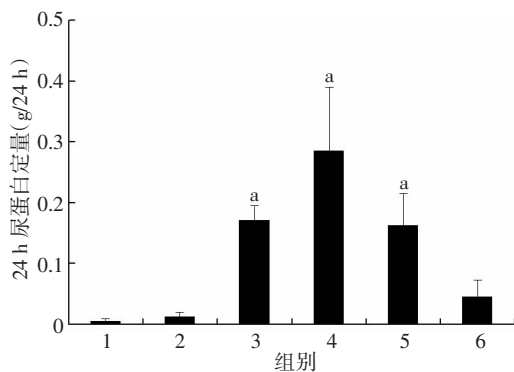
### 1.5 统计学方法

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,资料服从正态分布且方差齐性时,使用单因素方差分析,并用 Bonferroni 法进行两两比较。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠 24 h 尿蛋白测定

与对照组相比,各模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量均增加,5、10、15 d 组与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 1)。建模初期,随着模型的进展,大鼠 24 h 尿蛋白量逐渐增加,10 d 时达到顶峰,15 d 时 24 h 尿蛋白定量高峰逐渐回落,20 d 时 24 h 尿蛋白定量继续减少,与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



1: 对照组; 2: 2 d 组; 3: 5 d 组; 4: 10 d 组; 5: 15 d 组; 6: 20 d 组; a:  $P < 0.05$ ,与对照组比较

图 1 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量分析

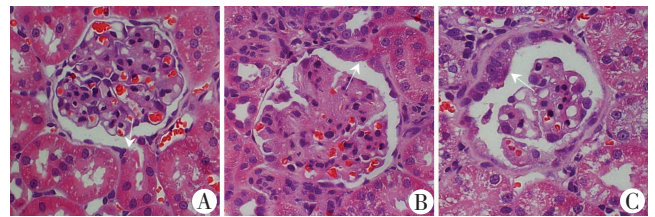
### 2.2 各组大鼠足细胞损伤情况

透射电镜检查各组大鼠肾标本,对照组的足细胞足突呈清

晰的栅栏状,2 d 组和 5 d 组标本均已出现足突融合;10 d 组大鼠肾小球内足突广泛融合,其后 15、20 d 组足突损伤逐渐恢复。

### 2.3 肾小球“小管化”的鉴定

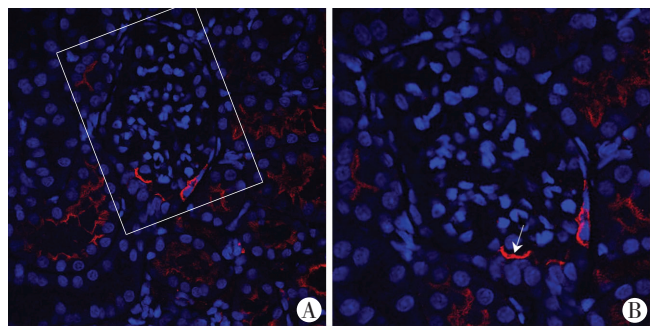
2.3.1 光镜观察细胞的组织学特征 对照组大鼠的肾小囊壁层上皮细胞呈单层扁平状,近端小管上皮细胞单层立方状,细胞体大,细胞质嗜酸性,可见刷状缘。在肾小囊壁层与近端小管结合处,肾小囊壁层上皮细胞与近端小管上皮细胞突然移行(图 2A)。在模型组大鼠的部分肾小体中,肾小囊壁层并不完全被扁平的上皮细胞覆盖,而是不同程度地被立方状的上皮细胞所覆盖。这些立方状细胞与近端小管上皮细胞相延续,并具有近端小管上皮细胞的特征,比如,细胞为立方状,细胞质嗜酸性,细胞核大呈球形(图 2B、C)。



A: 对照组,扁平的肾小囊壁层上皮细胞与立方状近端小管上皮细胞突然移行(↑);B:15 d 组,肾小囊壁层上皮被立方状近端小管样上皮细胞覆盖,并且该立方状上皮细胞与近端小管上皮细胞相延续(↑);C:15 d 组,肾小囊壁层上皮较高程度地被立方状近端小管样上皮细胞覆盖(↑)

图 2 HE 染色观察各组大鼠肾小囊壁层上皮 (×400)

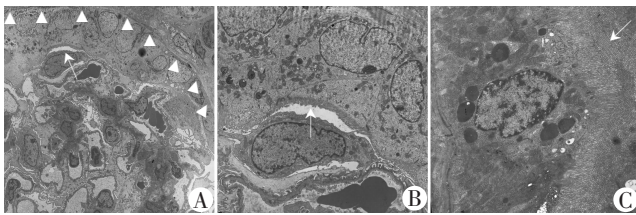
2.3.2 免疫荧光染色鉴定细胞的免疫表型 肾小囊壁层的立方状上皮细胞 Aquaporin-1 染色阳性(图 3)。



A: Aquaporin-1 在近端小管上皮细胞和肾小囊壁层上皮的部分细胞中显示阳性染色,方框处为肾小球;B: 肾小囊壁层上皮的部分细胞被 Aquaporin-1 染色(↑);红色为 Aquaporin-1,蓝色为 DAPI 染核

图 3 15 d 组大鼠肾组织 Aquaporin-1 免疫荧光染色 (×400)

2.3.3 电镜观察细胞的超微结构 低倍透射电镜下观察 10 d 组大鼠,可见部分肾小囊被高的立方状上皮覆盖(图 4A)。高倍镜下观察,该层立方状细胞的顶面可见刷状缘,细胞质中含有丰富的近似垂直方向的线粒体,细胞核大呈球状(图 4B)。正常组大鼠近端小管上皮细胞顶面具有明显的刷状缘,细胞质内可见纵行整齐排列的线粒体(图 4C)。



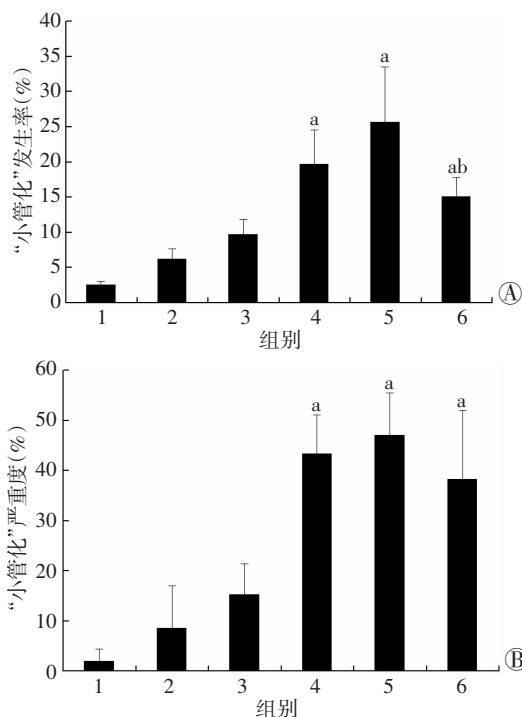
A: 肾小囊壁层有立方状上皮细胞沿肾小囊基底膜(▲)排列,这些细胞显示了近端小管上皮细胞的特征,细胞顶面可见刷状缘(↑, ×2 000);B: 超微结构分析,该层立方状上皮细胞细胞核大而圆,细胞质内可见大量线粒体,细胞顶面可见刷状缘(↑, ×10 000);C: 对照组大鼠近端小管上皮细胞超微结构,细胞质内可见纵行排列的线粒体,细胞顶面可见排列整齐的刷状缘(↑, ×10 000)

图4 透射电镜观察10 d组大鼠肾小囊壁层覆盖的立方状上皮细胞

## 2.4 肾小球“小管化”的评估

2.4.1 “小管化”的发生率 建模初期,随着模型的进展,各组“小管化”的发生率逐渐升高(图5A)。与对照组相比,10、15、20 d组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),15 d组最高,20 d组“小管化”发生率较15 d组显著下降( $P < 0.05$ )。

2.4.2 “小管化”的严重度 建模初期,随着模型的进展,各组“小管化”的严重度逐渐升高(图5B)。与对照组相比,10、15、20 d组“小管化”严重度明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),20 d组呈现下降趋势。



1: 对照组;2: 2 d组;3: 5 d组;4: 10 d组;5: 15 d组;6: 20 d组;  
a:  $P < 0.05$ ,与对照组比较; b:  $P < 0.05$ ,与15 d组比较

图5 各组大鼠“小管化”发生率(A)和“小管化”严重度(B)

## 2.5 肾小球“小管化”发生率及严重度与24 h尿蛋白定量的相关关系

“小管化”发生率与24 h尿蛋白定量正相关( $r = 0.55, P < 0.01$ );“小管化”严重度与24 h尿蛋白定量呈正相关( $r =$

$0.56, P < 0.01$ )。

## 3 讨论

本研究用一次性腹腔注射 PA 15 mg/100 g 的方式制作 SD 大鼠 PAN 模型,在模型中观察到部分肾小囊的壁层被立方状上皮细胞所覆盖,而且这种细胞与近端小管上皮细胞相延续。本研究用光镜、电镜观察,用特异性标志进行免疫荧光染色分析了这种细胞的类别。在光镜下,这些细胞呈立方状,细胞质嗜酸性,细胞核大球形,与近端小管上皮细胞组织学特征相同并为之延续。免疫荧光结果显示,这些细胞可被近端小管上皮细胞标志 Aquaporin-1 染色,提示这些细胞具有与近端小管上皮细胞相同的免疫表型。电镜超微结构显示,细胞顶面有大量排列整齐的微绒毛,细胞质中含有丰富的线粒体,与正常近端小管上皮细胞的超微结构一致。而正常肾小囊壁层上皮细胞呈单层扁平状,有少量的、短的微绒毛和1根中心纤毛<sup>[2]</sup>,与本实验中观察到的细胞形态不同。我们认为,肾小囊壁层的立方状上皮细胞具有与近端小管上皮细胞一致的形态学特征和相同的免疫学表型,从而证明 SD 大鼠 PAN 模型肾组织中发生了肾小球“小管化”。进一步观察发现,随着模型的进展和恢复,肾小球“小管化”的发生率及其严重度均呈现先升高、后下降的趋势,在15 d时达峰值,20 d组的“小管化”发生率呈现下降趋势。肾小球“小管化”的发生率及其严重度与24 h尿蛋白定量呈现显著的正相关关系。

既往仅有少量研究关注 PAN 模型中近端小管上皮细胞的形态学变化。Pulver 等<sup>[9]</sup>用串联扫描共聚焦显微镜观察 PAN 大鼠肾小管,发现近端小管管腔扩大,小管上皮细胞刷状缘微绒毛丢失,管腔中有细胞碎屑,局部发生肾小管坏死。本研究在 SD 大鼠 PAN 模型中观察到肾小球“小管化”的现象,是对 PAN 模型病理变化的重要补充。同时发现这一现象随模型的进展和恢复呈现动态变化,提示这一现象可能在 PAN 模型的发展和恢复过程中发挥一定作用。进而可以推测,这一现象有可能成为 PAN 模型所模拟的人类肾脏疾病的诊治的潜在靶点,但仍需进一步实验证实。

既往仅有少量研究报道了肾小球“小管化”的现象。这些研究中的疾病或疾病模型中多存在缺血/再灌注损伤,如 FVB 小鼠缺血性急性肾损伤模型<sup>[4]</sup>,猪大动脉闭塞所致缺血/再灌注肾损伤模型<sup>[5]</sup>。研究<sup>[4-6]</sup>发现,在缺血/再灌注模型中,肾小球“小管化”的发生率和严重程度与肾小管损伤的严重程度正相关,因而认为肾小球“小管化”是早期肾损伤的标志。还有研究<sup>[3]</sup>报道在小管上皮细胞改变轻微的急性小管损伤中,肾小球“小管化”可能是其唯一标志。PAN 模型以足细胞损伤为特点,无明显缺血/再灌注损伤。

本研究首次在SD大鼠PAN模型中发现了肾小球“小管化”这一现象,提示肾小球“小管化”在肾脏疾病中可能有着更为广泛的潜在意义。

本研究首次在PAN模型中观察到了肾小球“小管化”的现象,并且发现该现象随着模型的进展和恢复呈现动态变化,这是对PAN模型肾损伤表现的丰富与完善。这一现象有可能为研究足细胞和肾小囊壁上皮细胞损伤的机制提供新思路,可能有助于对两种细胞均有损害的肾小球病以及其他肾脏疾病发病机制的研究。

### 参考文献:

[1] Pippin J W, Brinkkoetter P T, Cormack-Aboud F C, *et al.* Inducible rodent models of acquired podocyte diseases[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(2): F213 - F229.  
[2] Lee S J, Sparke J, Howie A J. The mammalian glomerulotubular junction studied by scanning and transmission electron microscopy[J]. *J Anat*, 1993, 182(Pt 2): 177 - 185.  
[3] Jennette J C, Olson J L, Schwartz M M, *et al.* *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,

2007: 1149 - 1150.  
[4] Isaac J, Togel F E, Westenfelder C. Extent of glomerular tubularization is an indicator of the severity of experimental acute kidney injury in mice[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2007, 105(1): e33 - e40.  
[5] Simon F, Scheuerle A, Groger M, *et al.* Effects of intravenous sulfide during porcine aortic occlusion-induced kidney ischemia/reperfusion injury[J]. *Shock*, 2011, 35(2): 156 - 163.  
[6] Moya-Olano L, Milne H M, Robinson J M, *et al.* Trientine and renin-angiotensin system blockade ameliorate progression of glomerular morphology in hypertensive experimental diabetic nephropathy[J]. *Pathol Int*, 2011, 61(11): 652 - 661.  
[7] 陈青山, 钟佩红, 林佩贤, 等. 在Excel中完成实验对象的随机化分组[J]. *中国卫生统计*, 2009, 26(3): 298 - 299.  
[8] Nielsen S, Smith B L, Christensen E I, *et al.* CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron[J]. *J Cell Biol*, 1993, 120(2): 371 - 383.  
[9] Pulver M, Petroll W M, Andrews P M. Noninvasive microscopic evaluation of the intact living nephrotic kidney[J]. *Lab Invest*, 1993, 68(5): 592 - 596.

(收稿:2014-03-02;修回:2014-03-14)

(编辑 龙亮)

## 我刊网站主页和远程稿件处理系统改版、升级

近期,我刊网站主页和远程稿件处理系统改版、升级工作正在进行。新主页增加了用QQ、微博账号登录系统,二维码扫描分享微信朋友圈,推送本刊单篇论文相似文献,分享论文到微博、微信、博客等功能,新增论文引用、分享排名,视频、音频,优先数字出版,专题重点号,科学快报(报道生命科学前沿信息)和编读往来等板块,并将在近期增加HTML格式全文浏览功能。远程稿件处理系统全面升级,新系统将呈现给用户更友好的界面和更多的功能。

网站主页和远程稿件处理系统的改版、升级,是我刊数字化出版工作的重要举措,旨在为用户提供更为方便快捷的信息服务和更丰富的数字化信息资源。改版、升级工作中难免出现各种问题,请读者、作者和审稿专家们积极向编辑部反馈,以便我们及时改进,为大家提供更优质的服务。联系人:黄超,联系电话:(023)68752187。

