

高血压大鼠足细胞的超微病变和 podocalyxin 的表达及其作用研究

刘以鹏 刘淑华 李 婷 朱刚艳 黄红春

摘 要 **目的** 观察高血压大鼠足细胞的超微结构病变,探讨足细胞蛋白 podocalyxin(PCX)在高血压大鼠肾组织中的表达及作用。**方法** 随机将 30 只雄性 SD 大鼠以改进的“两肾一夹”方法建立高血压大鼠模型,分为高血压组 and 对照组。分别于造模前和造模后 1、5、10 周检测两组大鼠的尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)、血尿素氮(BUN)及血肌酐(Scr)水平;免疫荧光方法观察 PCX 在肾组织的表达,并用 Image-pro plus 6.0 软件,以面积密度值进行分析;光镜、电镜观察肾小球及足细胞超微结构改变。**结果** (1)术后 2 周起高血压组收缩压(SBP)较对照组显著升高(137.2 ± 9.4 mmHg vs 92.3 ± 10.3 mmHg, $P < 0.01$),并且逐渐升高至术后 4 周趋于平稳。(2)术后 5 周起高血压组尿 β_2 -MG 显著高于对照组[(110.28 ± 11.25) ng/L vs (56.68 ± 9.51) ng/L, $P < 0.01$],并且有继续增高的趋势。两组 BUN、Scr 在整个实验过程中没有显著性差异。(3)光镜、电镜观察均可见高血压组肾脏发生病理改变;足细胞超微结构发生病变。(4)免疫荧光可见高血压组 PCX 表达明显减少,其面积密度值显著低于对照组(0.204 ± 0.042 vs 0.296 ± 0.039 , $P < 0.01$),且 PCX 表达与尿 β_2 -MG 呈显著负相关($r = -0.927$, $P < 0.01$)。**结论** PCX 蛋白表达降低可能是参与高血压肾损害的机制之一,其可能是导致肾小球电荷屏障受损、尿蛋白排泄增加、肾功能受损、肾脏病理及足细胞超微结构发生病变的基础之一。

关键词 高血压肾损害 足细胞 超微病变 Podocalyxin

Ultrastructure Pathological Changes of Podocyte and the Expression of Podocalyxin in the Kidney of Hypertensive Rats. Liu Yipeng, Liu Shuhua, Li Ting, Zhu Gangyan, Huang Hongchun. Department of Geriatrics, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To observe the ultrastructure pathological changes of podocyte and to investigate the expression and roles of the podocyte-associated molecule podocalyxin(PCX) in the kidney of 2-kidney-1-clip hypertensive rats. **Methods** Thirty male SD rats were randomly assigned into two groups: experimental group($n=20$) and control group($n=10$). Improved 2-kidney-1-clip hypertensive rats were used in the experiment. The urinary β_2 -microglobulin(β_2 -MG), blood urea nitrogen(BUN) and serum creatinine(Scr) were monitored at different stages. The expression of podocalyxin in the kidney was detected by using immunofluorescence, and analyzed by Image-pro plus 6.0 software. The pathological changes of the kidney and podocyte were observed under optical and electron microscope respectively. **Results** The systolic blood pressure 2 weeks after operation in experimental group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$). The urinary β_2 -MG 5 weeks after operation in experimental group was significantly higher than in that control group ($P < 0.01$), but the BUN and Scr levels in experimental group had no significant difference compared with control group in the whole process. We could see pathological changes of the kidney under optical and electron microscope. The expression of PCX in experimental group was significantly lower than in control group ($P < 0.01$), and it was negatively correlated with the urinary β_2 -MG ($r = -0.927$, $P < 0.01$). **Conclusion** The reduction of the expression of the podocyte-associated molecule podocalyxin may be one of the pathogenesises of hypertensive kidney lesion. It may lead to injury of charge barrier in glomerulus, the increase of the excretion of urinary β_2 -MG, and impairment of renal function.

Key words Hypertensive renal disease; Podocyte; Ultrastructure pathological changes; Podocalyxin

高血压可引起肾损害,且是导致慢性肾脏病的主要病因之一。足细胞是有着独特结构和功能的细胞,免疫因素、高血糖、高血脂、高血压等各种因素均可导

致足细胞损伤,损伤后会导致足细胞数量的减少和结构的病变。近年来研究不断认识到足细胞损伤是多种肾脏疾病发生和发展的关键因素。位于足细胞顶端膜部的 PCX 蛋白不仅是肾小球电荷屏障的关键组成部分,且可以通过其抗黏附作用形成并维持足细胞独特的形态结构^[1]。其分布及表达异常是多种肾小球疾病的发病机制之一,缺乏 PCX 蛋白使肾小球滤

基金项目:湖北省卫生厅科研课题(JX4C22)

作者单位:430060 武汉大学人民医院老年病科

通讯作者:刘淑华,主任医师,副教授,硕士生导师,电子信箱:LI-

USHUHUA200866@163.com

过屏障受损参与蛋白尿发生,并促进了肾小球的纤维化和硬化过程^[2-4]。有关足细胞损伤及其相关蛋白在肾脏的表达与肾脏疾病关系的研究多限于糖尿病肾病、IgA 肾病等,而在高血压肾损害的研究甚少。本研究旨在观察足细胞超微结构的病变,检测足细胞蛋白 PCX 在高血压大鼠肾脏的表达,分析其与尿 β_2 -MG 的关系,探讨其在高血压肾损害发生发展中的可能机制。

材料与方法

1. 实验动物及分组:SPF 级健康雄性 SD 大鼠 30 只,体重 180~220g(武汉大学动物实验中心提供)。将大鼠随机分为实验组(20 只)、对照组(10 只)。参照文献方法建立“两肾一夹”高血压大鼠模型^[5],实验组经常规麻醉、皮肤消毒后沿腹正中中线打开腹腔,钝性分离出左肾动脉,穿入无菌丝线,把直径为 0.25mm 的针灸针与肾动脉血管长轴紧贴平行放置,用无菌丝线扎紧肾动脉与针灸针然后抽出针灸针,以此制备“两肾一夹”高血压模型,此组设为高血压组;对照组除不放置针灸针和不用丝线紧扎外,其余操作方法相同。实验过程中高血压组死亡 2 只,3 只大鼠造模失败,余均造模成功,全部纳入研究。实验动物由武汉大学动物实验中心集中给予普通饲料喂养。

2. 大鼠尾动脉收缩压(SBP)检测:采用 BP-98A 型大鼠血压计(北京软隆生物技术有限公司)测量大鼠清醒状态下的尾动脉 SBP。取 3 次测量值均值。造模前测量 1 次,造模后每隔 1 周测 1 次,直至实验结束。

3. 尿 β_2 -MG 及生化指标检测:分别于实验前及实验后第 1、5、10 周代谢笼收集大鼠 24h 尿量,尿 β_2 -MG 放免试剂盒(上海麦莎生物科技有限公司)检测尿 β_2 -MG。同期每次于第 2 天晚禁食,第 3 天清晨尾静脉采血,低温高速离心取上清液,HITACHI17150A 自动生化分析仪(日本日立)检测 BUN、Scr。

4. 组织标本的收集:于实验第 10 周末以戊巴比妥钠腹腔麻醉动物,腹正中切口取肾脏,为避免手术本身所造成的局部血流动力学变化对实验的影响,只收集右肾,去包膜,留取肾皮质,部分肾皮质 2.5% 戊二醛固定,做电镜(日立 H-600 型透射电镜,日本日立公司)检查;部分肾皮质 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,行 PAS 染色和免疫荧光检测。

5. 免疫荧光测 PCX 蛋白表达:肾组织石蜡切片经常规脱蜡、PBS 冲洗后,柠檬酸盐缓冲液修复抗原,3% 双氧水灭活内源性过氧化物酶,PBS 冲洗,3% 牛血清封闭,滴加兔抗大鼠 podocalyxin 多克隆抗体(美国 SANTA CRUZ 公司)(1:50) 37℃ 孵育 1hour;滴加 FITC 标记山羊抗兔 IgG(美国 SANTA CRUZ 公司)(1:200) 37℃ 避光孵育 1h,封片。DMLACW4000 荧光显微镜(Leica 公司)观察阳性染色发绿色荧光。每组随机摄取 50 个肾小球视野,用 Image-pro plus 6.0 软件分析,以面积密度值(PCX 阳性染色面积占肾小球面积的百分比)表

示阳性物质的相对含量,并分析其与尿 β_2 -MG 的相关性。

6. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 for Windows 统计软件进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用 t 检验,相关性采用 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 两组大鼠在不同时期 SBP、尿 β_2 -MG 及肾功能的变化:术后 2 周起高血压组 SBP 始高于对照组(137.2 ± 9.4 mmHg vs 92.3 ± 10.3 mmHg, $P < 0.01$),并且逐渐升高,至 4 周时形成稳定的高血压大鼠模型 162.9 ± 12.5 mmHg,见图 1。术后 5 周起高血压组尿 β_2 -MG 显著高于对照组(110.28 ± 11.25 ng/L vs 56.68 ± 9.51 ng/L, $P < 0.01$),并且随着高血压病情的延续而进行性的增加,见图 2。但是两组 BUN、Scr 在整个实验过程中没有统计学差异($P > 0.05$)(表 1)。

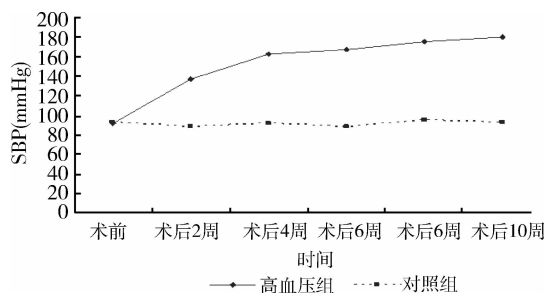


图 1 两组大鼠 SBP 变化

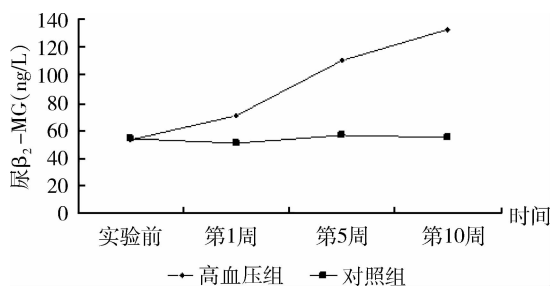


图 2 两组大鼠尿 β_2 -MG 变化

表 1 两组大鼠 BUN、Scr 变化 ($\bar{x} \pm s$)

时间	BUN (mmol/L)		Scr (μ mol/L)	
	高血压组	对照组	高血压组	对照组
实验前	5.47 $\pm$ 0.59	5.65 $\pm$ 0.93	49.28 $\pm$ 16.47	45.95 $\pm$ 15.89
第 1 周	6.10 $\pm$ 0.95	5.75 $\pm$ 0.89	53.37 $\pm$ 5.16	49.29 $\pm$ 6.01
第 5 周	5.48 $\pm$ 0.59	6.01 $\pm$ 0.37	56.95 $\pm$ 9.46	50.90 $\pm$ 10.38
第 10 周	5.93 $\pm$ 0.35	6.01 $\pm$ 0.26	60.95 $\pm$ 10.03	53.56 $\pm$ 9.87

BUN、Scr 不同时间点两组比较, $P > 0.05$

2. 肾脏病理学变化:(1)两组大鼠的肾脏病理表现:光镜下,对照组肾小球、肾小管及间质无病理改

变。高血压组肾小球体积缩小,可见局灶性硬化,入球小动脉管壁增厚,管腔狭窄或梗阻,系膜细胞、系膜基质增生,肾间质充血、炎性细胞浸润,细胞外基质沉积(图3)。(2)两组大鼠的足细胞超微结构表现:透射电镜下可见高血压组肾小球体积缩小,可见局灶性硬化病变,足细胞肿胀、脱落、细胞数明显减少,足突增宽、回缩、部分或弥漫性融合甚至消失,部分区域可见足突与基膜剥离,基膜增厚,系膜轻度增生。对照组肾小球基膜结构良好,足突形态正常,排列整齐清晰,内皮孔清晰可见(图4)。

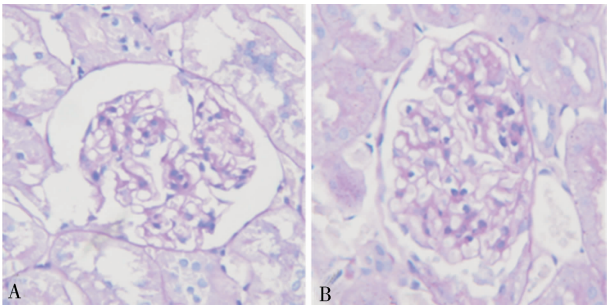


图3 两组大鼠肾组织病理结果(PAS×400)
A. 高血压组; B. 对照组

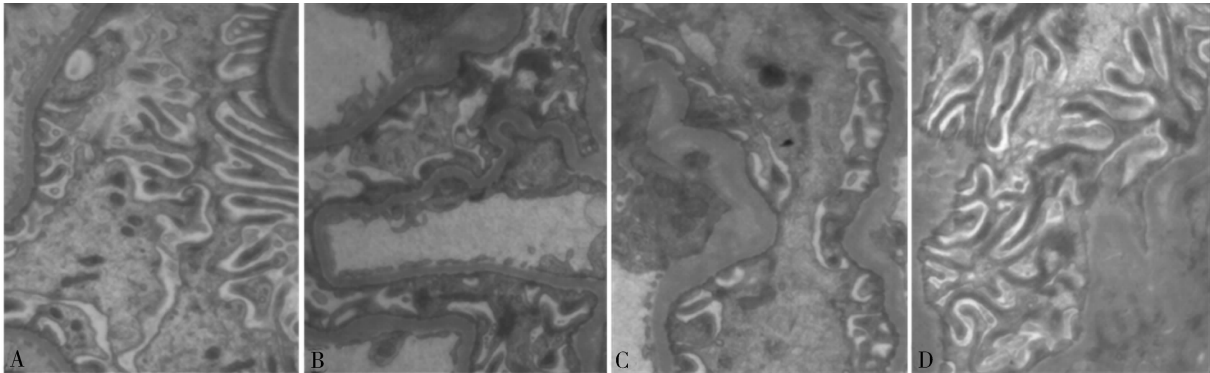


图4 两组大鼠肾小球足细胞电镜观察结果(×10000)
A、B、C. 高血压组; D. 对照组

3. PCX 在两组大鼠肾脏的表达:荧光显微镜下可见,高血压组肾小球毛细血管区域阳性荧光信号表达较对照组明显减弱,分布不均匀,部分区域未见荧光显示;对照组阳性荧光信号沿肾小球毛细血管壁走行分布均匀、连续(图5)。面积密度值统计结果显示,高血压组显著低于对照组(0.204 ± 0.042 vs 0.296 ± 0.039 , $P < 0.01$),详见图6。高血压组 PCX 表达量与尿 β_2 -MG 呈显著负相关($r = -0.927$, $P < 0.01$),详见图7。

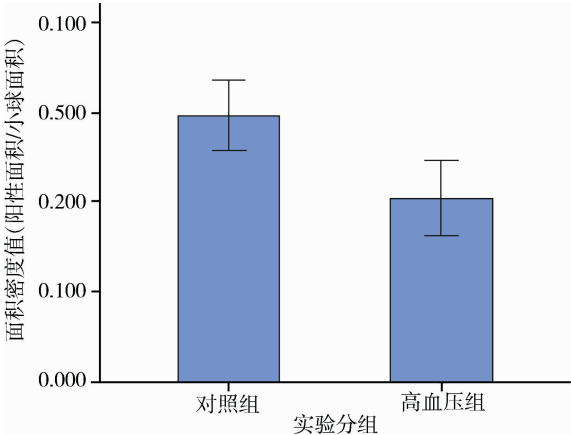


图6 免疫荧光测定 PCX 蛋白表达结果
高血压组 PCX 蛋白表达明显好于对照组($P < 0.01$)

讨 论

肾脏不仅在正常血压的维持中起着重要的作用,同时也是高血压损害的主要靶器官之一。高血压肾损害所致的晚期肾衰竭成为威胁患者生命的主要相关疾病之一^[6]。本研究通过建立“两肾一夹”高血压大鼠模型,2周始 SBP 明显增高,在4周时已形成稳定的高血压,且在高血压组出现蛋白尿及肾脏的病理

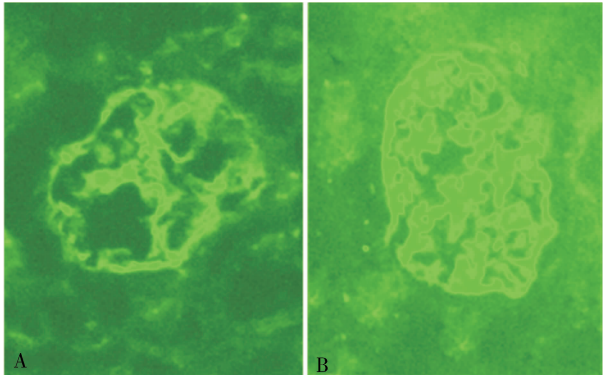


图5 两组大鼠肾组织 PCX 免疫荧光染色结果(×200)
A. 高血压组; B. 对照组

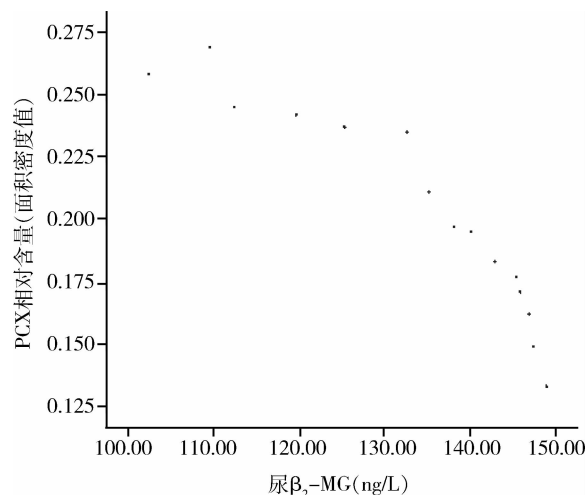


图7 高血压组大鼠尿 β_2 -MG 与 PCX 表达量的相关性
 $r = 0.927, P < 0.01$

变化,表明本研究成功地建立了高血压大鼠模型符合文献报道^[5]。

足细胞即肾小球脏层上皮细胞,是一种终末分化细胞,覆盖于肾小球基膜(glomerular basement membrane, GBM)最外层,连同 GBM 和毛细血管内皮细胞一起,构成肾小球血液滤过屏障,因而成为阻止蛋白丢失的最后屏障。PCX 蛋白是一种 CD34 相关的唾液酸黏蛋白,主要由足细胞和内皮细胞合成,是足细胞顶端膜部特异的带负电荷的主要标志蛋白,且是其参与肾小球电荷屏障的分子基础,PCX 可以发挥抗黏附作用维持裂隙膜的功能,防止相邻细胞间的粘连及维持足细胞的结构^[4,7,8]。PCX 除了作为静态分子筛阻止蛋白尿外,也可以电荷屏障的方式阻止带负电荷的蛋白通过。足细胞负电荷水平下降或丢失会导致足细胞损伤与蛋白尿。梁伟等^[9]研究发现,在糖尿病高血压大鼠肾组织中,PCX 蛋白的表达显著降低,足细胞损伤并蛋白尿增加,应用 ARB 类药物和舒洛地特干预后,可增加 PCX 蛋白的表达,减轻蛋白尿和病理损伤。本研究结果显示高血压组 5 周起尿 β_2 -MG 已显著增高,并且随着高血压病情的延续而进行性的增高。有研究认为肾小球囊内高压、低灌注引起的肾小管间质缺血;肾小管毒性物质漏入管腔等因素使得近端肾小管较肾小球更易发生损伤,故尿 β_2 -MG 具有更好的敏感性。本研究发现两组 BUN、Scr 在整个实验过程中没有显著性差异,可能由于实验尚处于肾损害的早期阶段。本研究显示,高血压组 PCX 荧光信号表达明显减少,面积密度值显著降低;且 PCX 表达与尿 β_2 -MG 呈显著负相关,说明 PCX

表达下降可能参与尿 β_2 -MG 的生成,参与肾损害的病理过程,且反应较为灵敏,早期便可出现明显降低。

血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是肾素-血管紧张素系统(rennin-angiotensin system, RAS)中的重要效应分子,在高血压的发病中起重要作用。有研究发现,足细胞表面表达血管紧张素 I 型受体(AT I R)和 AT II R,且足细胞上有丰富的 AT I R,其介导的 Ang II 作用可使足细胞相关蛋白表达减低^[10]。本实验通过建立“两肾一夹”这种 RAS 激活的高血压大鼠模型,并且发现肾脏发生了一系列的病理改变,分析其可能是 RAS 激活,Ang II 通过 AT I R 介导使得 PCX 蛋白表达降低,足细胞发生超微病变,导致电荷屏障受损,引起蛋白尿产生,从而进一步损伤肾功能,促进高血压肾脏的病理损害。但足细胞 PCX 分子与肾脏疾病的关系复杂,其分子机制有待进一步研究。

参考文献

- Kritz W, Mundel P, Elger M. The contractile apparatus of podocytes is arranged to counteract GBM expansion[J]. *Contrib Nephrol*, 1994, 107:1-9
- Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, *et al.* Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(8):2063-2071
- 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[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2007, 39(2):167-170
- Takeda T, Go WY, Orlando RA, *et al.* Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(9):3219-3232
- 戴勇,彭武建,徐卓佳. “两肾一夹”肾性高血压大鼠模型的改进[J]. *实验动物科学与管理*, 2006, 23(2):60-66
- Ruilope LM. The kidney as a sensor of cardiovascular risk in essential hypertension[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(3):165-168
- Kerjaschki D, Poczewski H, Dekan G, *et al.* Identification of a major sialoprotein in the glycocalyx of human visceral glomerular epithelial cells[J]. *J Clin Invest*, 1986, 78(5):1142-1149
- Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin; the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell[J]. *J Cell Biol*, 1984, 98(4):1591-1596
- 梁伟,余碧影,丁国华,等. 舒洛地特对糖尿病高血压大鼠肾脏保护作用 and 足细胞 Podocalyxin 表达的影响[J]. *中华肾脏病杂志* 2009, 25(7):497-502
- Suzuki K, Han GD, Miyauchi N, *et al.* Angiotensin II type1 and type 2 receptors play opposite roles in regulating the barrier function of kidney glomerular capillary wall[J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(6):1841-1853

(收稿:2011-03-28)

(修回:2011-03-30)