

· 基础研究 ·

糖尿病大鼠肾组织足细胞数和整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达的变化盛佳曦, 金秀平[△]

(华北煤炭医学院附属医院内分泌科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 观察糖尿病大鼠肾小球足细胞数和整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达的变化, 探讨肾小球足细胞数及整合素 $\alpha v\beta 3$ 与糖尿病肾病(DN)的关系。方法 链脲佐菌素(STZ)制备糖尿病大鼠模型, 分为对照组($n=10$)和实验组($n=14$)。造模 6 周后, 透射电镜下观察肾脏超微结构变化。采用免疫组化法检测肾脏上皮细胞整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达。结果 与对照组比较, 实验组大鼠足细胞数减少。实验组大鼠 24 h 尿蛋白量明显增多($P<0.05$)。肾脏上皮细胞整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达明显增强($P<0.01$)。尿清蛋白与足细胞数呈负相关, 与整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达呈正相关。结论 糖尿病大鼠肾组织整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达增强和足细胞数减少是 DN 发生的重要环节。

关键词:糖尿病肾病; 足细胞; 整合素 $\alpha v\beta 3$; 尿微量清蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)07-0678-02

Change of podocytes and $\alpha v\beta 3$ integrin expression in kidney of diabetic ratsSheng Jiayi, Jin Xiuping[△]

(Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To observe the changes of podocyte and $\alpha v\beta 3$ integrin expression in kidney of type 1 diabetic rats and to inquire into the correlation between podocyte and $\alpha v\beta 3$ integrin with diabetic nephropathy(DN). **Methods** The animal model of DN was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin. The rats were randomized into diabetic model group with rats without STZ injection as the normal control group. After 6 weeks, the rats were sacrificed and renal tissue pathology was observed under light microscope. In addition, the ultrastructure of glomeruli was observed by electron microscope. Integrin $\alpha v\beta 3$ expression localized to epithelial cells was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, podocytes of the diabetic model group significantly decreased, the 24 h urine microalbumin increased significantly. The expression of $\alpha v\beta 3$ integrin expression localized to epithelial was increased. Urine microalbumin was negatively correlated with podocytes and positively correlated with $\alpha v\beta 3$ integrin expression. **Conclusion** The upregulation of $\alpha v\beta 3$ integrin and decreased expression of podocyte in kidney of type 1 diabetic rats play a key role in DN.

Key words: diabetic nephropathies; podocytes; integrin $\alpha v\beta 3$; urine microalbumin

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是终末期肾病的主要病因之一, 主要的病理变化为肾小球基底膜增厚及肾小球细胞外基质积聚增加, 导致肾小球硬化及系膜膨胀等改变。本研究观察糖尿病大鼠肾小球足细胞数和肾小球整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达的变化, 探讨足细胞数及整合素 $\alpha v\beta 3$ 与 DN 的关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 清洁级近交雄性 Wistar 大鼠, 由北京维通利华实验动物中心提供[许可证号: SCXK(京)2002-0003]。饲养条件: 华北煤炭医学院实验动物中心屏障环境(使用证编号: MY06DXK07), 体质量 180~220 g, 室温控制在 18~29 °C, 相对湿度 65%~70%, 饮用水为专用消毒水, 正常昼夜交替, 适应性喂养 7 d 后进入实验。所需标准大鼠饲料由华北煤炭医学院动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂 兔抗大鼠 $\alpha v\beta 3$ 多克隆抗体由北京博奥森生物技术有限公司生产(编号: bs-1310R), DAB 试剂盒(二管装)由北京中山金桥生物技术有限公司生产(编号: ZLI-9017), 超敏即用型二步法(非生物素)检测试剂盒北京中杉生物技术

有限公司生产(编号: PV-9001)。

1.2 方 法

1.2.1 实验动物造模 健康雄性 Wistar 大鼠 24 只, 适应性喂养 7 d 后造模, 造模前全部剪尾测血糖 1 次, 血糖正常(<8 mmol/L)大鼠作为入选动物。随机分为对照组($n=10$)和实验组($n=14$), 造模前禁饮食 12 h。将链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)按 65 mg/kg 剂量一次性经左侧腹腔注射, 对照组以等剂量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液进行左侧腹腔注射。观察 2 h, 恢复饲料供应。72 h 后用血糖仪测尾血血糖, 第 5 天时重复检测, 如血糖均高于 16.7 mmol/L 者为糖尿病大鼠模型。共造模成功 13 只。

1.2.2 标本采集 于实验开始及造模后 1、3、6 周(处死前)用代谢笼收集各组大鼠 24 h 尿标本, 记录尿量后取 3 mL, 2 000 r/min 离心 10 min, 去除沉渣, 分装于 2 个 Eppendorf 管中, 并于 -20 °C 冰箱中保存待测。6 周后 10% 水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 在鼠板上固定大鼠, 沿腹正中线剪开腹部皮肤, 打开腹腔, 迅速取出双肾, 游离肾包膜, 生理盐水洗去血迹后称质量, 左肾纵向切开, 取一小块置于 3% 戊二醛

磷酸盐缓冲液中固定,切成 1 mm³ 组织块,制成超薄切片置透射电镜下观察,余下用 4% 多聚甲醛固定 48 h,常规制备石蜡切片。连续切片厚 3~4 μm,常规 HE、PAS 染色,以及免疫组化染色,光镜下观察。

1.2.3 观察指标 (1)24 h 尿清蛋白排泄量(放射免疫分析法)。(2)采用 HPIAS-1000 计算机图像分析系统:置于光镜下观察肾脏组织形态学改变,每张切片于低倍镜下随机选取 10 个肾小球,测量高倍视野(×400 倍)下每个肾小球每 1 000 μm² 面积内肾小球足细胞数,取其平均值代表肾小球足细胞数目;免疫组化切片:每例在光学显微镜下随机选择 5 个高倍镜视野(×400 倍),测量阳性细胞的平均光密度值。肾脏指数:肾脏指数=左肾质量/体质量×10³。(3)免疫组化测定整合素 αvβ3 在肾组织的表达。(4)肾组织超微结构观察取左肾组织置于 3% 戊二醛磷酸盐缓冲液中固定 12 h,送至华北煤炭医学院电子显微镜室,完成其余步骤。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计学软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异性比较采用单因素方差分析,相关分析采用直线相关,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

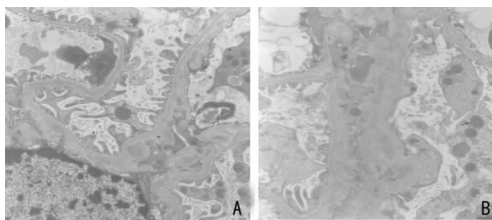
2.1 24 h 尿清蛋白排泄量 与对照组比较,实验组大鼠 1 周时尿清蛋白排泄量明显增多($P < 0.01$),尿清蛋白排泄量随病程增加而增加,6 周时尿清蛋白排泄量明显高于 1 周时排泄量($P < 0.05$)见表 1。

表 1 不同时间各组 24 h 尿清蛋白的比较(μg)

组别	n	造模后 1 周	造模后 3 周	造模后 6 周
对照组	10	1.76±0.72	2.13±0.74	2.03±0.64
实验组	13	21.42±1.21 ^a	24.39±1.89 ^a	25.67±1.45 ^{ac}

^a: $P < 0.01$,与对照组比较;^c: $P < 0.05$,与同组造模后 1 周时比较。

2.2 肾组织电镜下观察 对照组大鼠肾皮质中肾小球内足细胞结构清晰,可见明显的次级突起以及形成的栅栏状结构,基膜结构清晰、无肿胀。实验组足突变形、融合增宽、融合足细胞覆盖的基底膜(GBM)面积增大、GBM 增厚,见图 1。



A:对照组;B:实验组。

图 1 肾小球足细胞表达变化(×6000)

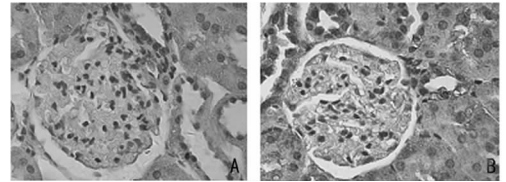
表 2 肾脏指标及免疫组化指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	肾脏指数	肾小球面积	足细胞数	整合素 αvβ3 平均光密度
对照组	2.85±0.23	55.33±1.91	12.58±0.45	0.25±0.04
实验组	8.56±0.76 ^a	87.23±1.76 ^a	8.38±0.26 ^a	0.31±0.05 ^a

^a: $P < 0.01$,与对照组比较。

2.3 整合素 αvβ3 免疫组化结果 整合素 αvβ3 表达于肾小球内皮细胞,肾小球、肾小管上皮细胞内阳性染色为深棕黄色颗

粒,实验组染色强度较对照组显著增加,半定量分析显示:与对照组比较,实验组整合素 αvβ3 平均光密度值明显增高($P < 0.01$)。见图 2、表 2。



A:对照组;B:实验组。

图 2 肾小球整合素 αvβ3 表达变化(×400)

2.4 尿清蛋白排泄量与足细胞数及整合素 αvβ3 表达的关系 尿清蛋白量与足细胞数成负相关,与整合素 αvβ3 表达成正相关($r = -0.74, r = 0.69$,均 $P < 0.05$)

3 讨 论

足细胞是构成肾小球滤过屏障外层的主要成分,为高度分化和特异化的细胞。目前已知足细胞的功能主要有构成肾小球的滤过屏障、对抗毛细血管腔内的流体静水压、在肾小球内静水压下降时维持毛细血管腔的开放等。本研究发现糖尿病鼠 1 周时,24 h 尿清蛋白排泄量较对照组明显增高,提示肾脏损害已经存在,6 周时尿清蛋白排泄量明显高于 1 周时,说明糖尿病肾损害随病程增加逐渐加重。电镜下观察糖尿病组大鼠肾小球足细胞数明显减少、足突融合,表明足细胞的缺失与尿清蛋白产生有关。足细胞胞体伸出许多足突覆盖于肾小球基底膜,足突间的裂孔隔膜以大小选择性的方式来限制血浆蛋白进入尿路,构成阻止血浆蛋白丧失的最后屏障^[1]。足细胞数减少 10%~20%时,肾小球硬化即开始发生^[2-3]。当足细胞从 GBM 上剥脱的速度超过足细胞再生能力时,数目严重不足的足细胞不能再完全覆盖 GBM,从而引起 GBM 裸露,滤过膜完整性遭到破坏,导致蛋白漏出,出现蛋白尿^[4-6]。足细胞肥大、足突融合、脱落、肾小球 GBM 裸露等一系列病变,导致 DM 肾小球硬化的发生^[7]。本实验显示糖尿病鼠尿清蛋白排泄量与足细胞数成负相关,足细胞脱落与蛋白尿产生和加重有关。

整合素是一类细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM),它是由 α(150~210 ku)和 β(90~110 ku)两条链以非共价键形式连接组成的异二聚体。α、β 链均为跨膜糖蛋白^[8-9]。研究发现健康人肾小球上皮细胞表达 α1、α3、α5β1、αvβ3 及 αvβ5 整合素^[10]。整合素 αvβ3 可与多种细胞外基质(ECM)成分结合(如 Fn,玻连蛋白)。体外实验发现整合素与基质间相互作用的紊乱,可以导致足细胞结构的破坏,其在体内的相应表现为足突的回缩和 GBM 的裸露,因此整合素的正常表达对维持正常的足突结构起着重要作用^[11]。推测整合素 αvβ3 可能参与足细胞与 GBM 的黏附。据有关研究发现高糖环境下造成内皮细胞受损,导致 αvβ3 表达增高从而促进毛细血管内皮细胞的增生修复^[12-13],本实验显示糖尿病鼠肾小球内皮细胞及肾小球、肾小管上皮细胞上的整合素 αvβ3 表达均显著增加,尿清蛋白排泄量与整合素 αvβ3 表达成正相关。提示整合素 αvβ3 表达增加参与 DN 发生,整合素 αvβ3 表达量可以反映肾组织损害程度。因此,本研究提示糖尿病时肾组织整合素 αvβ3 表达增加和足细胞数减少是 DN 发生的重要环节。

参考文献:

[1] Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology (下转第 685 页)

总之,为了使本地区及中国广大中小城镇 CHD 患儿得到及时诊断及合理治疗,降低并发症发生率及病死率,提高患儿的生活质量和生存时间,需通过多种渠道普及和加深专业人士及父母们对该病的认识,以及建立良好的医疗网络及医疗保障制度。

参考文献:

- [1] Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(12): 1890-1900.
- [2] Yang XY, Li XF, Lu XD, et al. Incidence of congenital heart disease in Beijing[J]. Chin Med J, 2009, 122(10): 1128-1132.
- [3] 谢利剑, 黄敏. 先天性心脏病遗传学病因的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2009, 36(3): 244-245.
- [4] 宋治远. 先天性心脏病介入治疗进展[J]. 重庆医学, 2006, 35(3): 193.
- [5] 张璘. 先天性心脏病发病机制[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(3): 1-4.
- [6] 陈英耀, 张洁, 李军, 等. 先天性心脏病的疾病经济负担研究[J]. 中华医院管理杂志, 2007, 23(11): 740-744.
- [7] Liu CX, Shen AD, Li XF, et al. Association of TBX5 gene polymorphism with ventricular septal defect in the Chinese Han population[J]. Chin Med J, 2009, 122(1): 30.

- [8] Chen P, Xie LJ, Huang GY, et al. Mutations of connexin43 in fetuses with congenital heart malformations[J]. Chin Med J, 2005, 118(12): 971-976.
- [9] 钟秋安. 先天性心脏病病因研究进展[J]. 中国儿童保健杂志, 2003, 11(4): 259-261.
- [10] 王凤明, 程彩虹, 王晓东, 等. 5 927 名 0~2 岁儿童先天性心脏病患病调查分析[J]. 疾病监测, 2008, 23(8): 508.
- [11] Jacobs EG, Leung MP, Kariberg J. Distribution of symptomatic congenital heart disease in Hong Kong[J]. Pediatr Cardiol, 2000, 21(2): 148-157.
- [12] 杨军. 超声心动图在新生儿先天性心脏病诊断中的应用[J]. 中国实用儿科杂志, 2009, 24(9): 667.
- [13] 吕斌. 超声在产前筛查胎儿先天性心脏病中的应用[J]. 重庆医学, 2008, 37(18): 2055-2056.
- [14] 贾国良, 张玉顺. 积极开展先天性心脏病的介入治疗[J]. 心脏杂志, 2001, 13(3): 219-220.
- [15] 张林潮, 韦金儒. 我国先天性心脏病的介入治疗进展[J]. 微创医学, 2008, 3(3): 232.
- [16] Hijazi ZM, Awad SM. Pediatric Cardiac Interventions[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2008, 1(6): 603-611.

(收稿日期: 2010-04-09 修回日期: 2010-09-22)

(上接第 679 页)

- and response to injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(12): 30051-30015.
- [2] Kim YH, Goyal M, Kurnit D, et al. Podocytedepletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat[J]. Kidney Int, 2001, 60(3): 957-968.
- [3] Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis[J]. Kidney Int, 2006, 69(12): 2131-2147.
- [4] Steffes MW, Schmidt D, McCreary R, et al. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients[J]. Kidney Int, 2001, 59(6): 2104-2113.
- [5] Hoshi S, Shu Y, Yoshida F, et al. Podocyte injury promotes progressive nephropathy in zucker diabetic fatty rats[J]. Lab Invest, 2002, 82(1): 25-35.
- [6] Janssen U, Riley SG, Vassiliadou A, et al. Hypertension superimposed on type II diabetes in Goto Kakizaki rats induces progressive nephropathy[J]. Kidney Int, 2003, 63(6): 2162-2170.
- [7] Steffes W, Schmidt D, McCreary YR, et al. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients[J]. Kidney Int, 2001, 59(6): 2104-2113.

- [8] Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors[J]. Cell, 1987, 48(4): 549-554.
- [9] Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis[J]. Lab Invest, 1993, 68(1): 4-17.
- [10] Adler S. Integrin receptors in the glomerulus: potential role in glomerular injury[J]. Am J Physiol, 1992, 262(5 Pt 2): F697-704.
- [11] 陈娣, 肖婧, 张林娟, 等. $\alpha 3 \beta 1$ 整合素在糖尿病大鼠肾脏的表达及其与足细胞减少的关系[J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(4): 293-298.
- [12] Ogawara K, Kuldo JM, Osterhuis K, et al. Functional inhibition of NF-kappa B signal transduction in alphavbeta3 integrin expressing endothelial cells by using RGD-PEG-modified adenovirus with a mutant Ikappa B gene[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(1): 32-35.
- [13] Lian J, Dai X, Li X, et al. Identification of an active site on the laminin alpha4 chain globular domain that binds to alphavbeta3 integrin and promotes angiogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347(1): 248-253.

(收稿日期: 2010-05-10 修回日期: 2010-09-16)

《重庆医学》——中国科技论文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!