

## 小鼠肾脏中 CD133 表达的研究

刘 伟, 马云胜, 穆长征<sup>△</sup>, 田 鹤

(辽宁医学院组织学与胚胎学教研室, 辽宁锦州 121000)

**摘要:**目的 观察成熟小鼠肾脏中 CD133 的表达定位, 分析其分布规律, 为肾脏的修复再生研究提供依据。方法 心脏灌注固定取成熟小鼠肾脏, 制成 5 μm 厚石蜡切片。然后行 CD133 的免疫组织化学检测。结果 CD133 表达于髓质肾乳头区, 少量表达于外髓外带远端小管和集合管以及皮质肾单位远端小管。结论 肾脏乳头区可能是肾脏干细胞密集以及再生能力较强的区域。

**关键词:**小鼠; 肾; 干细胞; CD133

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.028

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)05-0587-02

## The expression research of CD133 in mouse kidney

Liu Wei, Ma Yunsheng, Mu Changzheng<sup>△</sup>, Tian He

(Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

**Abstract:** Objective To observe the expression of CD133 in mouse kidney, analysis the distribution pattern, and provide basis for the kidney regeneration research. Methods The mice kidney was took by the heart perfusion fixation, and then made into 5 μm thick slice. Immunohistochemistry test was used to detect the CD133 expression. Results CD133 was mostly expressed in renal papillae zone, and also could be seen at the distal tubule in outer zone of medulla external and the distal tubule in the superficial nephron. Conclusion The renal papillae zone might have mass renal stem cells and regeneration capacity.

**Key words:** mice; kidney; stem cells; CD133

肾脏损伤后可以再生, 原因是由于在肾脏组织中存在一部分再生能力较强, 具有一定自我更新能力的干细胞样细胞成分。从目前的研究结果看, 由于肾脏中细胞成分复杂, 肾脏中有可能存在几种干/祖细胞, 因此其标志物亦可能根据不同的阶段而不同。Bussolati 等<sup>[1]</sup>发现从人肾脏中分离培养的 CD133 细胞具有较强的增殖能力, 也可以分化为上皮或内皮细胞, 修复小管损伤, 因此这群细胞具有干细胞特性。本研究在小鼠肾脏原位检测 CD133 细胞的表达与分布, 从空间定位角度分析该细胞的位置及数量, 为该细胞组织修复提供数据支持, 现报道如下。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料与试剂** 选取昆明小鼠 12 只(辽宁医学院实验动物中心提供, 清洁级, 雌雄不限, 35~30 g, 3 月龄); 兔抗 CD133 (北京博奥森公司), DAB(武汉博士德公司); HRP 标记的羊抗兔 IgG(北京中杉金桥公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 肾脏组织的采集** 取成熟健康昆明小鼠, 左心室灌注固定后, 取双侧肾脏, 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 梯度乙醇脱水, 入二甲苯透明, 60℃ 浸蜡 3 h, 包埋制成石蜡块。

**1.2.2 切片制备与 CD133 免疫组织化学检测** 用 Leca3215 切片机将肾脏组织切成 5 μm 厚度切片, 黏附于涂有多聚赖氨酸的防脱片上, 60℃ 烤片 2 h 后, 切片二甲苯脱蜡 2 h, 梯度乙醇下行入水。3% 过氧化氢清除内源性过氧化物酶 5 min, 枸橼酸盐缓冲液高压锅法进行抗原修复。自然冷却后, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次, 每次 5 min, 组画笔画圈, 5% BSA 封闭 10 min 室温下滴加兔抗 CD133(1:200)抗体。湿盒内 4℃ 冰箱过夜。

次日取出去除一抗, PBS 洗 3 次, 滴加 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, DAB 显色并观察, 适时终止显示, 清水冲洗, 苏木精复染细胞核, 梯度乙醇脱水, 树脂封片。

**1.2.3 免疫蛋白印迹法(Western blot)检测 CD133 表达** 取整个肾脏, 眼科剪剪碎, 加 1 mL 蛋白裂解液, 超声波使细胞充分裂解, 然后分别转移到 1.5 mL 的离心管中, 置于冰中 30 min, 然后 4℃ 下 12 000 r/min 离心 40 min, 取总蛋白每孔 30 μg, 100℃ 煮沸 10 min, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离总蛋白, 然后将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PDVF)膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗(兔抗 CD133, 1:500)4℃ 孵育过夜, 次日加二抗(1:1 500)孵育 2 h, ECL 显色。

**1.3 统计学处理** Western blot 结果采用系统自带软件对目的条带进行光密度值的分析。采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 采用单因素方差分析比较样本均数, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 免疫组织化学结果** CD133 阳性细胞分布于肾脏的皮质和髓质(图 1)。在皮质区域, CD133 表达于一小部分远端小管上皮细胞的顶端(图 1a), 散在分布, 注意 CD133 都表达在靠近肾小体血管极的远端小管曲部上。偶尔在细胞质里也可见到阳性表达(图 1b)。甚至有少量 CD133 细胞表达在小管上皮细胞的侧面和整个小管的周围。在髓质和肾乳头区域 CD133 表达于分支粗段, 细段和集合管(图 1c)。在内髓 CD133 分布的较外髓内带要广泛, 并且以一小群细胞或单个细胞表达形式存在(图 1d~f)。

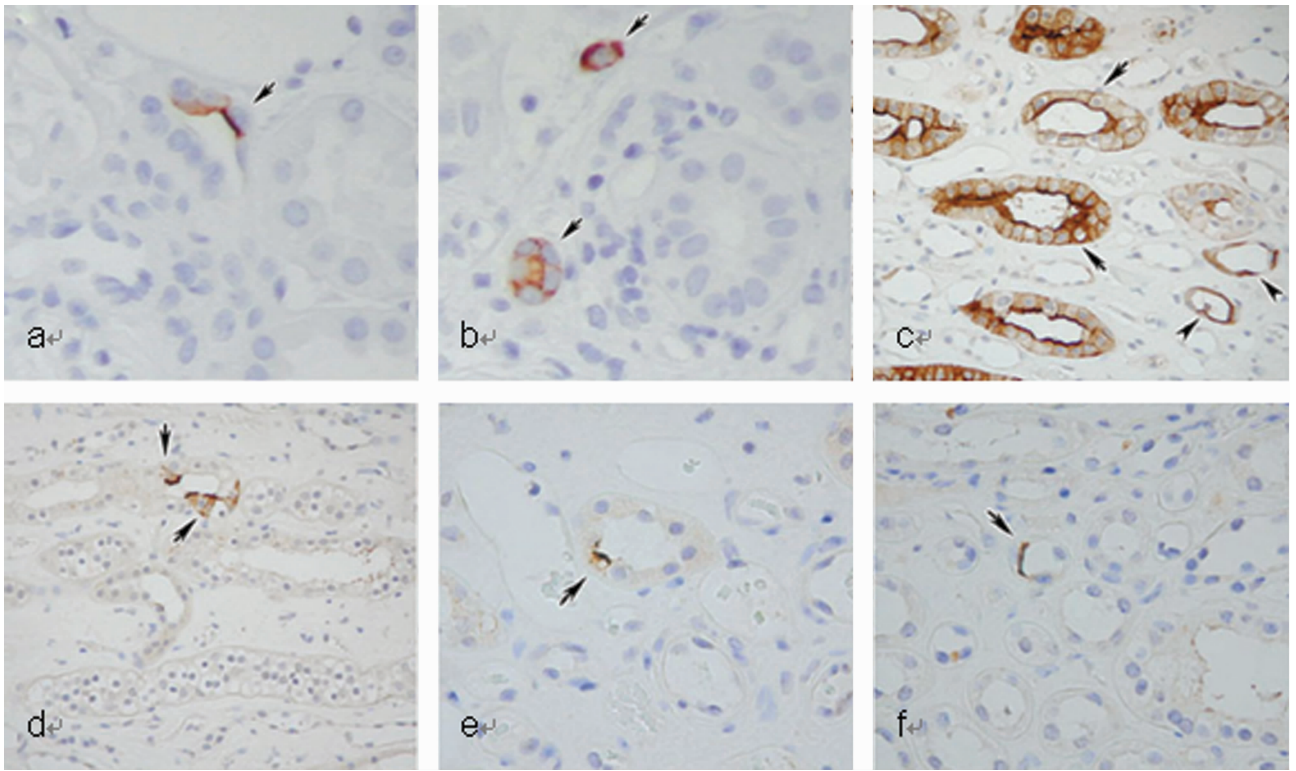


图 1 小鼠肾脏中 CD133 的免疫组织化学结果

**2.2 Western blot 检测结果** Western blot 检测提示小鼠肾脏组织中均检测到 CD133 表达,在  $120 \times 10^3$  左右出现特异性结合条带,见图 2。

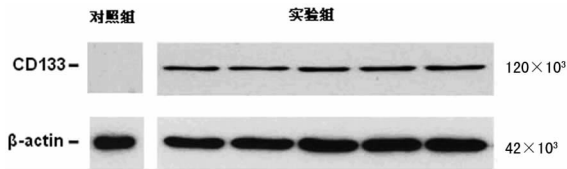


图 2 小鼠肾脏组织 CD133 Western blot 结果

### 3 讨 论

肾脏中组织成分复杂,其损失后修复的机制可能有多种。肾小管上皮细胞具有一定的更新能力,这说明肾小管上皮必然存在具有干细胞属性的细胞成分。而在很多疾病导致的肾脏小管上皮细胞坏死等都依赖于肾小管上皮细胞的修复和再生,以重新恢复其营养重新吸收及水代谢功能。CD133 被认为是肿瘤细胞标志物,在某些肿瘤如肾透明细胞癌中呈大量阳性表达。CD133 也可以被认为是一群干/祖细胞标志物,CD133 抗原早期用于从造血组织和神经组织中分离干细胞,在造血组织中 CD133 只表达于 CD34 阳性干细胞和祖细胞上<sup>[2]</sup>。此外,在骨骼肌和神经组织中也存在一部分 CD133 阳性细胞<sup>[3]</sup>。Osafune 等<sup>[4]</sup>从肾脏细胞中分离的 CD133 细胞不表达 CD34 和 CD45,这说明在不同的组织中表达 CD133 细胞是不同的。Bruno 等<sup>[5]</sup>在体外研究发现该细胞具有自我更新和复制的能力。此外从形态上看 CD133 细胞具有明显的极性,这说明他们具有分化细胞的特征。体外研究表明,CD133 细胞具有较强的扩增能力,标记后的 CD133 细胞静脉注射到 SCID 小鼠后,该细胞在肾小管并修复了肾小管损伤,从而修复肾脏损伤<sup>[6-7]</sup>。

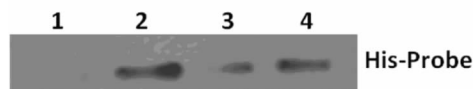
本研究发现,在成年小鼠的肾脏髓质,肾乳头区集合管,细段,广泛分布着 CD133 阳性细胞。而在皮质和外髓区 CD133

阳性细胞的数量较少,仅限于髓放线集合管和肾单位区髓袢升支细段和远曲小管,皮质集合管则没有分布。Lazzeri 等<sup>[8]</sup>应用 Brud 标记法发现肾乳头区细胞增殖能力强,表现为大量的标记细胞出现,并认为该区为肾脏干细胞的定居点<sup>[8]</sup>,本研究发现,CD133 分布在内髓肾乳头区较多,少量分布于外髓的集合管和肾单位远端小管。作者的发现进一步印证了 O'Neill 等<sup>[9]</sup>的观点,该观察可以为对于肾脏损伤修复的细胞分布的空间位置关系提供形态学依据,同时本研究也可能解释远端小管修复机制,下一步实验应该研究在肾脏损伤疾病模型上 CD133 的表达情况,进一步揭示肾脏损伤及修复的机制。总之,肾脏中干细胞表达 CD133,本实验从原位寻找 CD133 表达位置,为肾脏干细胞提供空间表达数据。

### 参考文献:

- [1] Bussolati B, Bruno S, Grange C, et al. Isolation of Renal Progenitor Cells from Adult Human Kidney[J]. Am J Pathol, 2005, 166(2): 545-555.
- [2] Dekel B, Zangi L, Shezen E, et al. Isolation and characterization of nontubular sca-1 + Lin<sup>-</sup> multipotent stem progenitor cells from adult mouse kidney [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(12): 3300-3314.
- [3] Yousof G, Masoud S, Zeinali S, et al. Isolation of stem cells from adult rat kidneys[J]. Biocell, 2009, 33(1): 33-38.
- [4] Osafune K, Takasato M, Kispert A, et al. Identification of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay[J]. Development, 2005, 133(1): 151-161.
- [5] Bruno S, Bussolati B, Grange C, et al. Isolation and characterization of resident mesenchymal stem(下转第 591 页)

(+)-FimH<sub>1-156</sub> 对照菌株;纯化后重组蛋白 FimH<sub>1-156</sub> 和超声后上清液及沉淀,进行 Western blot 鉴定,抗体为抗 6×His 单克隆抗体(图 5),表明 FimH 融合基因 pET28a(+)-FimH<sub>1-156</sub> 在 E. coli BL21(DE3)中正确表达,形式为包涵体表达。



1:未诱导 E. coli BL21(DE3)/pET28a(+)-FimH 对照菌株;2:超声后的上清液;3:纯化后重组蛋白 FimH;4:包涵体。

图 5 FimH<sub>1-156</sub> 融合蛋白的 Western blot 分析

### 3 讨论

抗中性粒细胞胞浆抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)相关性血管炎(ANCA-associated systemic vasculitis, AASV)是一种典型的自身免疫性疾病,已证实传统的 ANCA 相关的靶抗原中有中性粒细胞髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)及蛋白酶 3(protease 3, PR3)。van Putten 等<sup>[5]</sup>研究韦格纳肉芽肿与金黄色葡萄球菌感染的关系中,明确了感染与自身抗体的间接证据,但一直未能找到感染与 MPO 或 PR3 相关的直接证据。抗 LAMP-2 抗体是最近才发现的 ANCA 新亚型,Kain 等<sup>[6]</sup>关于 FNGN 发病机制的研究提示,UP-EC 入侵人体后,宿主通过 FimH 启动针对 LAMP-2 的自身免疫是 LAMP-2-ANCA 相关性 FNGN 发病机制的关键,这提供了分子模拟的直接证据。目前,抗 LAMP-2 抗体被认为是 AASV 更为特异而有效的标志,存在于几乎所有的 FNGN 患者中,与病变的相关性是传统抗 MPO 及 PR3-ANCA 的 2 倍<sup>[6]</sup>;然而,有关抗 LAMP-2 抗体的临床实际价值仍存在较大的争议,有报道就对抗 LAMP-2 抗体与疾病的相关性提出质疑,更多标准化的实验有待进一步研究<sup>[7-8]</sup>。

Kain 等<sup>[2]</sup>的研究证实了人 FNGN 的 LAMP-2 靶抗原的致病性的表位,即 P<sub>41-49</sub>(HGTVTYNGS)和 P<sub>331-341</sub>(QGKYS-TAQDCS),并成功构建了 WKY 大鼠 FNGN 动物模型。明确致病性表位后,特异性诱导针对 LAMP-2 靶抗原的免疫耐受,这有望成为个性化治疗 FNGN 的有力手段,也为基于 LAMP-2 靶抗原的多肽疫苗开发提供了可能。作者利用 LAMP-2 靶抗原的致病性的表位 P<sub>11-49</sub>多肽联合完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA),乳化后皮下注射 WKY 大鼠建立 FNGN 模型实验已经完成,3 只实验组大鼠 24 h 尿蛋白定量明显增多,但肾病理检查未见明显新月体及小球坏死,这可能与人工合成多肽免疫原性低有关。本研究成功构建了表达质粒 pET28a(+)-FimH<sub>1-156</sub>,采用大肠杆菌表达,获得免疫原性更高的 UPEC I 型菌毛 FimH<sub>1-156</sub> 表达蛋白,通过 Ni-NTA 纯

化后,利用标签抗体进一步间接鉴定了该表达蛋白,与文献报道结果类似<sup>[9]</sup>,该蛋白的表达形式也为包涵体,这可能与表达蛋白自身特性有关。随后,作者采用反复冻融、超声、离心和反复洗涤的方法,经 SDS-PAGE 分析,切胶纯化出较高纯度的 FimH<sub>1-156</sub> 融合蛋白,为进一步采用 FimH<sub>1-156</sub> 融合蛋白诱导 WKY 大鼠建立 FNGN 模型奠定基础。

### 参考文献:

- [1] Rashid T, Ebringer A. Autoimmunity in rheumatic diseases is induced by microbial infections via crossreactivity or molecular mimicry [J]. *Autoimmune Dis*, 2012, 2012: 539282.
- [2] Kain R, Exner M, Brandes R, et al. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis [J]. *Nat Med*, 2008, 14(10): 1088-1096.
- [3] Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. Covert operations of uropathogenic Escherichia coli within the urinary tract [J]. *Traffic*, 2005, 6(1): 18-31.
- [4] Connell I, Agace W, Klemm P, et al. Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(18): 9827-9832.
- [5] van Putten JW, van Haren EH, Lammers JW. Association between Wegener's granulomatosis and Staphylococcus aureus infection [J]. *Eur Respir J*, 1996, 9(9): 1955-1957.
- [6] Kain R, Tadema H, McKinney EF, et al. High prevalence of autoantibodies to hLAMP-2 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(3): 556-566.
- [7] Roth AJ, Brown MC, Smith RN, et al. Anti-LAMP-2 antibodies are not prevalent in patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody glomerulonephritis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(3): 545-555.
- [8] Fervenza FC, Specks U. Vasculitis: Will LAMP enlighten us about ANCA-associated vasculitis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2012, 8(6): 318-320.
- [9] 尹晓琳, 石新丽, 魏林, 等. 尿路致病性大肠杆菌 I 型菌毛 fimH 和 fimC 基因原核表达质粒的构建及表达 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(11): 1131-1134.

(收稿日期:2013-09-25 修回日期:2013-11-14)

(上接第 588 页)

cells in human glomeruli [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(6): 867-880.

- [6] Ohnishi S, Maehara O, Nakagawa K, et al. Hypoxia-inducible factors activate CD133 promoter through ETS family transcription factors [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66255.
- [7] Wen J, Cheng QL, Ma Q, et al. Effects of kidney stem cells on injure-recovery of human renal tubular epithelial cells [J]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2013, 45(4): 619-624.

- [8] Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, et al. Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(12): 3128-3138.
- [9] O'Neill AC, Ricardo SD. Human kidney cell reprogramming: applications for disease modeling and personalized medicine [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(9): 1347-1356.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-09-26)