

# 糖尿病肾病 MKR 小鼠蛋白尿与尿中 nephrin、PCX 含量相关性分析\*

曾婧<sup>1</sup>, 张翔<sup>1</sup>, 喻嵘<sup>2△</sup>, 唐元<sup>1</sup>, 罗文娟<sup>1</sup>, 陈聪<sup>1</sup>, 吴勇军<sup>2</sup>

1. 湖南中医药大学 研究生院(长沙 410007); 2. 湖南中医药大学(长沙 410208)

**【摘要】** 目的 通过检测糖尿病肾病(DN)MKR 小鼠足细胞结构蛋白 nephrin 与足细胞标记蛋白(PCX)在肾组织中的表达量及尿中的含量,分析尿微量白蛋白(UmAlb)与尿中 nephrin、PCX 蛋白含量的相关性。方法 取 30 只 8 周龄 MKR 小鼠随机分为 2 组(空白组和 DN 组),空白组以普通饲料喂养,将 DN 组小鼠单肾切除并加以高脂喂养 2 个月复制 DN 模型;另取 15 只同龄 C57 野生鼠为正常对照组,以普通饲料喂养。造模前 1 d、喂养 4 周及 8 周后,采用电化学法检测各组小鼠空腹血糖(FBG);喂养 8 周后,取各组小鼠肾脏组织,用电镜观察肾组织足细胞形态结构;Western blot 检测肾组织中 nephrin、PCX 蛋白表达含量;ELISA 法测定尿中 UmAlb 含量及 nephrin、PCX 蛋白表达含量。结果 电镜结果显示:喂养 8 周后,与 C57 组比较, DN 组小鼠肾小球足细胞结构损伤明显, DN 组 FBG 升高( $P < 0.01$ ),且肾组织中 nephrin、PCX 蛋白表达下调,而尿中 nephrin、PCX 蛋白含量及 UmAlb 含量均升高( $P < 0.01$ )。相关分析显示,尿 UmAlb 与尿中 nephrin 和 PCX 蛋白含量呈正相关(相关系数  $r = 0.920$ , 决定系数  $R^2 = 0.829$ ,  $P < 0.05$ )。结论 尿中 nephrin、PCX 蛋白含量与 UmAlb 含量呈正相关,足细胞结构蛋白丢失可能是导致糖尿病肾病蛋白尿的机制之一。

**【关键词】** 尿微量白蛋白 MKR 小鼠 糖尿病肾病 足细胞 Nephrin PCX

**Research on the Combined Detection of Urine UmAlb and Urinary Nephrin, Podocalyxin in Podocyte of MKR Mice with Diabetic Nephropathy** ZENG Jing<sup>1</sup>, ZHANG Xiang<sup>1</sup>, YU Rong<sup>2△</sup>, TANG Yuan<sup>1</sup>, LUO Wen-juan<sup>1</sup>, CHEN Cong<sup>1</sup>, WU Yong-jun<sup>2</sup>. 1. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

△ Corresponding author, E-mail: 1208466238@qq.com

**【Abstract】 Objective** To explore the combined detection of urine UmAlb and urinary nephrin (Unephrin), podocalyxin (UPCX) in podocyte of MKR mice with diabetic nephropathy. **Methods** Thirty 8 weeks old MKR mice were randomly divided into two groups as follows: negative control group, DN model group, and another 15 wild C57 mice were used as normal control. Mice in DN model group were received unilateral nephrectomy and high-fat diet feed for 2 months. The morphological structure changes of the podocytes were observed by transmission electron microscopes. The levels of FBG were detected by electrochemical detection method, The nephrin and PCX protein expression were measured by western blotting. The levels of UmAlb, Unephrin and UPCX were detected by ELISA. **Results** The podocyte damage in the mice of DN model group increased significantly when compared with normal control. As compared with normal control, FBG in the model group increased significantly ( $P < 0.01$ ), the expression level of nephrin and PCX in Renal Tissue and Unephrin, UPCX, and urine UmAlb were also increased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The level of Unephrin and UPCX were positive correlated with the level of urine UmAlb, the loss of podocyte structure protein might be one of the mechanism in leading proteinuria in diabetic nephropathy.

**【Key words】** Urine UmAlb MKR mice Diabetic nephropathy Podocyte Nephrin PCX

蛋白尿是糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的主要临床症状,是肾脏进展性病变的重要危险因素。近年来有研究发现足细胞损伤与丢失是蛋白尿发生发展的关键,而蛋白尿发生的同时也伴有足细胞骨架异常及重要结构蛋白丢失,并发现足细

胞相关结构蛋白 nephrin、足细胞标记蛋白(PCX)等对于 DN 及蛋白尿相关疾病中肾功能评估意义重大<sup>[1]</sup>。本实验通过分析 DN 小鼠 nephrin、PCX 蛋白与其蛋白尿的相关性,为 DN 的临床诊治提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

由美国国立卫生研究院糖尿病研究中心 Dr. D.

\* 国家自然科学基金(No. 81273753)、湖南省自然科学基金(No. 12JJ9031)和湖南省高校创新平台开放基金(No. 14K069)资助

△ 通讯作者, E-mail: yurong8072@qq.com

LeRoith 提供的 MKR 小鼠(骨骼肌特异性 IGF-1 受体缺失转基因 2 型糖尿病小鼠),饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心,许可证号:SYXK(湘)2009-0001,经自然交配繁殖。C57 野生鼠(湖南中医药大学刘伯炎老师惠赠),许可证号:SYXK(湘)2013-0005。

## 1.2 高脂饲料

由普通饲料加 15% 猪油、1% 胆固醇组成,由湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心加工制成。

## 1.3 主要仪器与试剂

Thermo 高速冷冻离心机;BioTek 酶标仪;Boxun 37 °C 恒温培养箱;日产 HT7700 型透射电镜;Eppendorf 核酸蛋白分析仪;Thermo -80 °C 冰箱;鼠尿微量白蛋白(UmAlb) ELISA 试剂盒、鼠尿 nephrin ELISA 试剂盒、鼠尿 PCX ELISA 试剂盒(上海晶天生物科技有限公司,lot:20140110);超敏 ECL 化学发光试剂盒(ShangHai Novland, NL128)。

## 1.4 实验方法

取 30 只 8 周龄 MKR 小鼠,随机分为 2 组(空白组、DN 组),每组 15 只。同时取 15 只同龄 C57 野生小鼠作为正常对照组。C57 组、空白组以普通饲料喂养;DN 组切除右侧单肾后以高脂饲料喂养两个月造模(以 UmAlb > 20 μg/L 为造模成功的标准),分别于造模前 1 d、喂养 4 周、喂养 8 周后,将各组小鼠禁食不禁水 5 h,尾静脉采血,采用电化学法血糖仪检测空腹血糖(FBG);喂养 8 周后,各组小鼠禁食不禁水,于代谢笼中留取随机尿,采用 ELISA 法检测 UmAlb 及尿中 nephrin、PCX 蛋白含量;实验结束,各组小鼠心脏采血处死,无菌取肾。取肾下极 1 mm<sup>3</sup> 左右组织置于电镜液中固定,采用透射电镜观察足细胞超微结构。其余肾组织用于免疫蛋白印迹法(Western blot)检测肾组织中 nephrin、PCX 蛋白含量,主要步骤:取 50 mg 各样本组织,分别加入蛋白提取液,于冰上碾碎,提取总蛋白;BCA 法测定蛋白含量;取 50 μg 各蛋白样品进行聚丙烯酰胺垂直电泳,40 g/L 浓缩胶,80 V;100 g/L 分离胶,120 V;转膜,100 V,2 h;5% 脱脂奶粉封闭,4 °C 过夜;一抗孵育 3~4 h;二抗孵育 2 h,采用 Bio-Rad 化学发光凝胶成像仪分析,取目的蛋白与内参 GAPDH 的光密度值之比进行统计分析。

## 1.5 统计学方法

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表达,满足正态性和方差齐性的数据资料采用单因素方差分析,组间比较采用

LSD 法;不满足正态性则采用非参数检验;相关性分析采用多元线性回归分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠空腹血糖比较

与 C57 组比较,空白组、DN 组小鼠造模前后血糖水平均较高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );DN 组小鼠造模后血糖水平呈上升趋势;与空白组比较, DN 组血糖水平升高明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组小鼠造模前后 FBG 水平( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Level of mice FBG before and after the model setting up ( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

Group	FBG (mmol/L)		
	Before 1 d	After 4 weeks	After 8 weeks
C57	4.17 ± 0.64	4.25 ± 0.67	4.19 ± 0.53
Blank	7.62 ± 0.68 <sup>△</sup>	8.50 ± 0.97 <sup>△</sup>	10.21 ± 1.27 <sup>△</sup>
DN	7.75 ± 0.69 <sup>△</sup>	10.26 ± 1.18 <sup>△·■</sup>	12.56 ± 1.35 <sup>△·■</sup>

△  $P < 0.01$ , vs. C57 group; ■  $P < 0.05$ , vs. blank group

### 2.2 各组小鼠不同时期 UmAlb 变化

DN 组造模后 UmAlb 呈上升趋势,与同期 C57、空白组相比, DN 组喂养 4 周、8 周后 UmAlb 均升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),符合尿微量白蛋白 > 20 μg/L 的造模成功标准。见表 2。

表 2 各组小鼠造模前后 UmAlb 水平( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Levels of mice UmAlb before and after the model setting up ( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

Group	UmAlb(μg/L)		
	Before 1 d	After 4 weeks	After 8 weeks
C57	8.19 ± 3.65	7.87 ± 3.16	9.69 ± 4.34
Blank	15.83 ± 5.72	28.71 ± 6.19 <sup>△</sup>	72.02 ± 10.75 <sup>△</sup>
DN	16.04 ± 5.84	120.65 ± 13.20 <sup>△·▲</sup>	246.76 ± 19.81 <sup>△·▲</sup>

△  $P < 0.01$ , vs. C57 group; ▲  $P < 0.01$ , vs. blank group

### 2.3 各组小鼠尿中 nephrin、PCX 蛋白含量

喂养 8 周后, C57 组尿中检测不到 nephrin 蛋白,但 DN 组、空白组尿中足细胞结构蛋白 nephrin、PCX 蛋白含量均明显升高( $P < 0.01$ ),两组间比较差异也有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 喂养 8 周后各组小鼠尿中 Nephtrin、PCX 水平( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Levels of nephrin and PCX in mice urine after feeding 8 weeks ( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

Group	Nephrin (ng/mL)	PCX (ng/mL)
C57	—	3.35 ± 0.82
Blank	29.32 ± 4.14 <sup>△</sup>	31.25 ± 4.41 <sup>△</sup>
DN	38.06 ± 5.57 <sup>△·■</sup>	47.76 ± 4.71 <sup>△·■</sup>

△  $P < 0.01$ , vs. C57 group; ■  $P < 0.05$ , vs. blank group

## 2.4 各组小鼠肾皮质病理变化

电镜下可见(图1)喂养8周后C57组小鼠足细胞饱满,足突排列紧密、整齐;与C57组相比,DN组小鼠系膜增厚明显,足细胞萎缩,足突广泛融合,裂孔膜增宽,可达1 000~2 000 nm;空白组基底轻度增生,足突轻度融合,裂孔膜宽约70~110 nm,足细

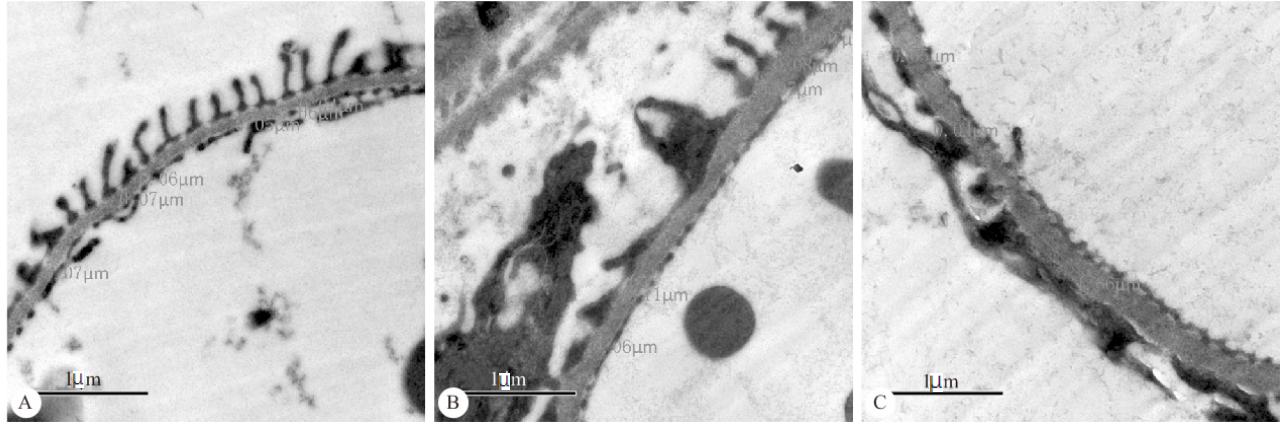


图1 电镜下小鼠肾皮质病理变化。 $\times 20\ 000$

Fig 1 Pathological changes in mice renal cortical by transmission electron microscope.  $\times 20\ 000$

A: C57 group; B: Blank group; C: DN group

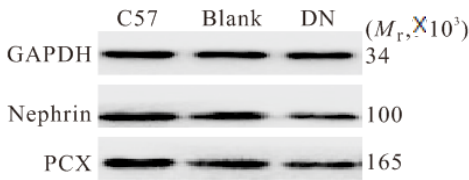


图2 各组小鼠肾组织中nephrin、PCX蛋白表达

Fig 2 Expression of nephrin and PCX in mice kidney tissues

表4 喂前8周后各组小鼠肾组织中nephrin、PCX蛋白水平( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

Table 4 Levels of nephrin and PCX in mice kidney tissues after feeding 8 weeks ( $n=15, \bar{x} \pm s$ )

Group	Nephrin/GAPDH	PCX/GAPDH
C57	1.10 $\pm$ 0.17	0.98 $\pm$ 0.20
Blank	0.68 $\pm$ 0.09 $\Delta$	0.74 $\pm$ 0.14 $\Delta$
DN	0.40 $\pm$ 0.06 $\Delta$ · $\blacktriangle$	0.41 $\pm$ 0.12 $\Delta$ · $\blacktriangle$

$\Delta P < 0.01$ , vs. C57 group;  $\blacktriangle P < 0.01$ , vs. blank group

## 2.6 相关性分析

以UmAlb为因变量,nephrin、PCX为自变量,进行多元线性回归分析,结果(表5)提示各组小鼠尿中nephrin、PCX蛋白含量与UmAlb呈正相关

表5 UmAlb与尿中nephrin、PCX相关性分析

Table 5 Correlation analysis between UmAlb and the nephrin and PCX in mice urine

	$\beta$	$t$	$P$
Nephrin	3.636	2.409	0.028
PCX	5.270	7.032	0.000

胞病变情况较轻。

## 2.5 各组小鼠肾组织中nephrin、PCX蛋白表达

喂养8周后,与C57组比较,DN组、空白组小鼠肾组织中nephrin、PCX蛋白表达下调( $P < 0.01$ ),DN组nephrin、PCX蛋白水平也低于空白组( $P < 0.05$ )。见图2、表4。

(相关系数  $r = 0.920$ , 决定系数  $R^2 = 0.829$ ,  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

DN蛋白尿发生机制复杂,为诸多因素综合所致的结果,其中足细胞损伤是导致蛋白尿不可忽视的因素。足细胞形态改变可先于蛋白尿的出现<sup>[2]</sup>,并随着足细胞丢失及结构破坏,蛋白尿增加明显<sup>[3]</sup>。Nephrin、PCX是足细胞结构的重要蛋白分子,在肾小球滤过屏障中起到分子屏障及电荷屏障的作用。Nephrin是位于足细胞裂孔膜的特异蛋白,正常人尿中则检测不到,尿中nephrin的出现提示糖尿病早期肾损害,DN患者肾组织中nephrin表达下调及重新分布先于肾小球损害,并与蛋白尿程度呈负相关<sup>[4]</sup>。PCX是足细胞标志蛋白之一,临床研究<sup>[5]</sup>表明尿中PCX是评估早期肾小球损伤的重要指标之一,其浓度的高低反映肾小球病变情况,并与蛋白尿呈正相关。本实验中,MKR转基因小鼠自发形成了2型糖尿病<sup>[6]</sup>,经高脂喂养及单肾切除后,FBG、UmAlb呈上升趋势,与同期C57、空白组小鼠相比显著增加,肾组织中足细胞结构蛋白nephrin、PCX丢失,足突融合、裂孔膜增宽等病变明显加重。这可能是由于高脂喂养可加重MKR鼠体内糖脂代谢紊乱,增加胰岛负荷及胰岛素抵抗<sup>[7]</sup>,而单肾切除可导

致孤立肾的代偿肥大,肾肥大既是 DN 的一个独立危险因素<sup>[8]</sup>,同时,与高糖、高脂等因素共同促使 DN 的进展,即结构上肾小球肥大甚至固缩、系膜增生、内皮细胞破坏、足细胞密度降低及结构异常等病理改变加重<sup>[9]</sup>,功能上 UmAlb 持续上升,甚至大量蛋白尿。

本研究发现, DN 组、空白组足细胞均有形态改变, DN 组病变更重,足突融合,裂孔膜增宽明显,两组肾组织中 nephrin、PCX 蛋白表达较 C57 组均下调,同时 UmAlb 及尿中 nephrin、PCX 蛋白含量升高, DN 组差异更明显。高糖、大量氧自由基、血管紧张素系统活化等均能抑制肾组织中 nephrin 表达<sup>[10]</sup>,而尿中 PCX 可从一定程度上反映足细胞的丢失情况<sup>[11]</sup>,提示 DN 组小鼠存在足细胞结构异常及足细胞丢失。相关性分析示尿中 nephrin、PCX 含量与蛋白尿呈正相关,说明足细胞结构损伤是导致蛋白尿的重要原因。因此,通过监测 DN 患者尿中 nephrin、PCX 蛋白含量的无创方法对于 DN 的临床诊治具有重要意义。

### 参 考 文 献

- 1 Menzel S, Moeller MJ. Role of the podocyte in proteinuria. *Pediatr Nephrol*, 2011; 26(10): 1775-1780.
  - 2 Torbjornsdotter TB, Perrin NE, Jaremko GA, *et al.* Widening of
- (上接第 705 页)
- 3 Chen LH, Jiang CC, Watts R, *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of melanoma cells by the ARC protein. *Cancer Res*, 2008; 68(3): 834-842.
  - 4 冯 婧, 陈宝元, 郭美南等. 间歇低氧气体环境模型的建立. *天津医科大学学报*, 2006; 12(4): 509-512.
  - 5 王 鸿, 原福胜, 王君霞等. 甲醛和甲苯联合染毒对小鼠神经行为的影响. *环境与健康杂志*, 2010; 72(11): 959-962.
  - 6 Quan Stuart F, Chan Cynthia S, Dement William C, *et al.* The association between obstructive sleep apnea and neurocognitive performance—the Apnea Positive Pressure Long-term Efficacy Study (APPLES). *Sleep*, 2011; 34(3): 303B-314B.
  - 7 Yang XH, Liu HG, Liu X, *et al.* Thioredoxin and impaired spatial learning and memory in the rats exposed to intermittent hypoxia. *Chin Med J (Engl)*, 2012; 125(17): 3074-3080.
  - 8 O' noghue FJ, Wellard RM, Rochford PD, *et al.* Magnetic resonance spectroscopy and neurocognitive dysfunction in obstructive sleep apnea before and after CPAP treatment. *Sleep*, 2012; 35(1): 41-48.
  - 9 甄先通. 基于磁共振影像的阿尔茨海默病脑皮层厚度分析的研究. 兰州: 兰州大学, 2009.
  - 10 Doonan F, Catter TG. Detection of DNA fragmentation in retinal apoptosis by TUNEL. *Methods Mol Biol*, 2013; 935

foot processes in normoalbuminuria adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Nephrol*, 2005; 20(6): 750-758.

- 3 Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts longterm urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and miemalbuminuria. *Diabetologia*, 1999; 42(11): 1341-1344.
- 4 Menon R, Mohd Noor FS, Draman CR, *et al.* A retrospective review of diabetic nephropathy patients during referral to the suburban nephrology clinic. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2012; 23(5): 1109-1114.
- 5 吕娇凤, 姚全良, 胡龙华等. 尿液足细胞标志蛋白 podocalyxin 评估肾功能损伤的意义. *广东医学*, 2012; 33(22): 3440-3441.
- 6 喻 嵘, 成细华, 胡 伟等. MKR 转基因小鼠糖尿病发病特点的初步探讨. *中国实验动物学报*, 2007; 15(5): 333-337.
- 7 魏占英, 沈 丽, 冯晓慧等. 高脂饲料喂养时间和 STZ 剂量对建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响. *医学研究杂志*, 2014; 43(2): 42-46.
- 8 杨俊伟, 黎磊石, 张 真等. 大黄治疗糖尿病肾病的实验研究. *中华内分泌代谢杂志*, 1993; 9(4): 222.
- 9 印红爱, 吴勇军, 喻 嵘等. 高脂喂养加单侧肾切除制作小鼠糖尿病肾病模型研究. *湖南中医药大学学报*, 2013; 33(11): 17-27.
- 10 杨涛涛, 陈民利. 足细胞蛋白 Nephrin、Podocin 与肾小球疾病. *中国比较医学杂志*, 2013; 23(11): 72-76.
- 11 Petemann A, Hoegge J. Podocyte damage resulting in podocytopathy: A potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephrol Clin Pmet*, 2007; 106(2): 61-66.

(2014 - 12 - 15 收稿, 2015 - 04 - 07 修回)

编辑 汤 洁

(14): 207-213.

- 11 Tsai YW, Wang YR, Wang PS, *et al.* Intermittent hypoxia after transient focal ischemia induces hippocampal neurogenesis and c-Fos expression and reverses spatial memory deficits in rats. *PLoS One*, 2011; 6(8): e24001. doi: 10.1371/journal.pone.000024001.
- 12 王赞峰, 代 冰, 康 健. 慢性间断低氧对大鼠脑内缺氧诱导因子-1 $\alpha$  表达和神经细胞凋亡的影响. *中国病理生理杂志*, 2010; 26(3): 593-595.
- 13 Mazumdar B, Meyer K, Ray R. N-terminal region of gelsolin induces apoptosis of activated hepatic stellate cells by a caspase-dependent mechanism. *PLoS One*, 2012; 7(8): e44461. doi: 10.1371/journal.pone.0044461.
- 14 Tian XF, Cui MX, Yang SW, *et al.* Cell death, dysglycemia and myocardial infarction. *Biomed Rep*, 2013; 1(3): 341-346.
- 15 袁伟伟, 林秋雄, 朱杰宁等. 靶向 caspase-8 小发夹 RNA 减轻去血清/缺氧诱导的人骨髓间充质干细胞凋亡. *中国病理生理杂志*, 2014; 30(7): 1172-1178.
- 16 王一蓉, 毛海峰, 陈嘉勤. 虎纹捕鸟蛛毒素对脑缺血模型大鼠海马肿瘤坏死因子 $\alpha$  通路的影响. *中国组织工程研究*, 2014; 36(18): 5813-1818.

(2014 - 10 - 27 收稿, 2015 - 03 - 27 修回)

编辑 余 琳