

· 肾脏病基础 ·

细胞骨架蛋白与肾脏疾病*

张 梅 李晓玫

关键词 肾脏病 细胞骨架蛋白

细胞骨架(cytoskeleton)是真核细胞维持生命活动的重要组成成分,包括微丝、微管和中间丝。其中,微丝是由肌动蛋白(actin)、肌动蛋白结合蛋白以及肌球蛋白(myosin)三者构成,其基本成分是肌动蛋白,分子量(M_r)为43 KD。肌动蛋白单体呈球形(G-actin),是含有375个氨基酸的单链多肽,其组装成的螺旋状纤维称为肌动蛋白多聚体或纤维状肌动蛋白(F-actin)。微管是由 α 、 β 两种微管蛋白和少量微管结合蛋白(MAPs)聚合而成,其基本构成单位是 α 、 β 微管蛋白, M_r 均约50 KD。中间丝(intermediate filament)是一类形态相似的中空管状蛋白纤维,其单体是线状多肽,每个单体卷曲组成二聚体,两个二聚体组成四聚体,再由8组平行的四聚体原纤维横向联系,组成完整的、非极性结构的中间丝。这三种细胞骨架成分由不同蛋白质以不同方式组成不同直径的纤维,按机体的生理需要在时间和空间上受细胞内外因素的调控而组装或去组装,并分别与细胞质膜及核膜相互作用。细胞骨架正常分布使不同的细胞维持特有的形态和弹性,占一定的空间方位,并使细胞粘着、识别和通讯;而其动态变化则是调控细胞运动、形态和跨膜信息转导的结构基础,使细胞得以应答不同细胞之间、细胞与微环境之间的交往和“社会性”活动,从而实现生理或病理状态下复杂的细胞功能。近年来,在基础与临床研究发现,细胞骨架成分的异常表达及分布可能与多种疾病发生、发展过程中细胞表型异常有关,其部分改变并非仅为细胞病理表型变化,而且可能直接影响细胞功能和疾病的病理生理过程。本文就有关肾脏疾病中细胞骨架蛋白的改变及其病理生理意义的研究现状进行综述。

1 肾脏固有细胞的细胞骨架蛋白标志物

迄今为止,除在内皮细胞中尚未见关于细胞骨架蛋白作为表型标志物的报道外,各种类型肾脏固有细胞的表型标志蛋白中均有相当一部分为特定的细胞骨架蛋白。例如,胚胎期肾小球系膜细胞表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)并活跃增生、分泌细胞外基质,呈增生/分泌型表型,而成年肾小球系膜细胞无或仅有极少量 α -SMA的表达,但表达其它类型肌动蛋白、myosin、纽蛋白(viculin)和 talin 等成分,形成其胞浆及突起的纤维样结构,呈现静止表型^[1]。又如,收缩相关蛋白 pp44 是主要分布于足细胞足突的肌动蛋白相连多肽,是成熟足细胞的标志之一^[2]。肾小管上皮细胞在发育过程中表达波形蛋白(vimentin),表明其为间充质来源细胞。随着发育的进展,波形蛋白的表达逐渐减弱并消失,成熟的肾小管上皮细胞表达上皮细胞标志物角蛋白^[3]。正常状态下,肾间质内的固有纤维细胞仅表达波形蛋白,成纤维细胞特异蛋白1(ESP1)和二种非平滑肌肌动蛋白(α 和 β 亚类)^[4]。

研究表明,各种肾脏固有细胞的表型特征可随生理和病理状态而发生变化。在动物模型的研究中观察到,在机体逐渐衰老的过程中,系膜细胞(MC)可发生表型转化,重新转化为类似胚胎期的增生/分泌型,并可观察到系膜细胞数目及系膜区细胞外基质质量增加,肾小球逐渐肥大^[5]。在肾脏疾病状态下,不同细胞均可发生表型转化,由病变初期的受损靶细胞转而主动参与病变进程,其转化的特征之一是其细胞骨架蛋白的变化^[6]。

2 细胞骨架蛋白与肾小球疾病

在多种原发和继发性肾小球疾病的实验动物模型中,已经观察到不同细胞骨架蛋白的表达、分布变

[基金项目] *国家自然科学基金(NO:30070351)和教育部跨世纪优秀人才基金(NO:39910210474-231-C04)资助

[作者单位] 北京大学第一医院肾内科(北京,100034)

化,并对其机制及可能的病理意义进行了不同的解释。例如:在体外培养的MC中,正常细胞的应力纤维组成张力索,可见F-actin表达;当MC受到刺激发生原位伸展时,会出现短而弯曲的F-actin分布零乱的现象。我们以往的研究发现,不同细胞因子对MC表型改变的作用不尽相同,炎症性细胞因子白细胞介素-1(IL-1)可刺激其表型标志物 α -SMA表达增加,并使 α -SMA在细胞内的分布向核周转位积聚,细胞内C-Jun氨基末端激酶(JNK)及P38通路可能是介导这一作用的主要信号转导途径^[7];而多肽类生长因子血小板源生长因子(PDGF)对MC表型转化的影响表现为短时作用刺激 α -SMA表达而持续作用抑制 α -SMA表达,其作用可能与信号转导通路中Raf-1和JNK的调控作用有关^[8]。此外有人观察到,应用IL-1刺激足细胞发生表型转化后,可见细胞内出现高度规则排列微丝网架,其上有规律排列的致密体, α -actin、 α -辅肌动蛋白(α -actinin)、pp44的表达均明显增加。应用外源性低密度脂蛋白或肾小球微小病变患者尿蛋白提取物刺激肾小管上皮细胞,均可诱导 α -SMA表达,并促使细胞增生并分泌细胞外基质蛋白^[9,10]。

在以系膜病变为主的抗Thy1肾炎动物模型中,研究发现 α -SMA、中间丝结蛋白(desmin)和vimentin于3~14天时,在MC中表达增高,而 α -SMA的表达与MC活跃增生程度正相关,因而, α -SMA表达被认为是MC被致病因子激活、由静止表型向增生表型转化的标志物^[11~17]。有学者用荧光染料双重标记F-actin和vimentin,并以激光共聚焦显微镜观察其在糖尿病大鼠肾小球足细胞和MC中的分布,并与正常大鼠进行比较,结果发现:正常肾小球足细胞的胞体和足突中均具有含vimentin成分的束状纤维,F-actin仅呈薄层状存在于足突的基底部;而在系膜区可见F-actin形成密集、规则的网带状结构。在糖尿病肾小球中,足细胞和肾小球系膜细胞中vimentin和F-actin的分布与正常时相似,但足细胞中含vimentin成分的束状纤维密度减低、变细且分布不规则,系膜区含F-actin的纤维组装异常极为明显。由此提示,细胞骨架蛋白的重分布及其去组装参与肾小球毛细血管血流的重分布,可能是糖尿病时肾小球高灌注的原因之一^[11]。此外,在5/6肾切除导致肾小球硬化和抗肾小球基膜肾病的动物模型中还发现,肾小球壁层上皮细胞在病变早期就出现 α -SMA

表达,并伴有其上皮细胞标志蛋白E-钙粘素(E-cadherin)的消失。至病变晚期,在细胞纤维性新月体中出现肾小球壁层上皮细胞贴附于球囊基膜,内含大量贯穿细胞的肌动蛋白束,细胞的极性、微绒毛和紧密连接均消失。研究发现,细胞新月体仅有少量 α -SMA阳性细胞,而在细胞纤维性新月体中 α -SMA阳性细胞占主要成分,因此, α -SMA阳性肾小球壁层上皮细胞的出现可能提示其表型转化成为肌纤维细胞,与肾小球新月体形成可能有密切关系^[12]。

人类肾小球疾病的研究结果与动物体内研究的发现十分相似。我们对人类膜增生性肾炎的研究发现,患者肾活检组织中肾小球系膜区的 α -SMA表达确实增加,应用免疫组化染色结合计算机图象分析发现,随着MC增生程度的加重及系膜区细胞外基质积聚的增多, α -SMA的表达程度也增加,三者呈平行变化并具有高度相关性^[13]。国外的研究也有类似结果,如Kim等^[14]对86例肾小球肾炎患者的肾活检标本分析了 α -SMA和细胞增生标志Ki-67的变化,发现 α -SMA在肾小球表达与细胞增生活跃有关。虽然在人类糖尿病肾病和新月体肾炎中尚无关于 α -SMA表达细胞与血流灌注及新月体形成关系的相应研究,但我们对人类膜增生性肾炎的研究曾发现,在部分肾小球肾小囊部位有 α -SMA环绕,提示肾炎患者可能存在肾小球上皮细胞表型转化^[15]。

细胞骨架蛋白及其结合蛋白在肾小球以外部位表达的意义及其与病变进展的关系受到广泛关注。Ando等^[16]曾对38例IgA肾病患者的肾活检标本分析了actin结合蛋白caldesmon的变化,发现其不仅是MC激活的标志物,同时在肾间质细胞浸润处表达也上调,其染色主要位于胞浆和肌纤维母细胞的足突部分,在caldesmon表达高者CD68多呈强阳性,同时其尿蛋白水平也显著增高,提示肾间质caldesmon表达与肌纤维细胞增加和IgA肾病的病变进程相关。在人类膜增生性肾小球肾炎中,我们曾发现肾小管上皮细胞可失去其表型标志物角蛋白,转而出间质细胞标志物波形蛋白及肌纤维细胞标志物 α -SMA,并可游走至肾间质中。同时, α -SMA阳性的肾小管-间质细胞均有增生现象,肾间质中 α -SMA阳性的肌纤维细胞增多与波形蛋白阳性的间质细胞分布区域相似,并伴有I型胶原积聚增多,提示肾炎时 α -SMA表达细胞的出现标志着肾小管上皮细胞的转分化和肾间质肌纤维细胞增多,可能是

肾间质纤维化病变进展的标志^[15]。近年来,国外学者对多种肾小球疾病患者的肾活检标本进行了研究,结果证实在正常人和微小病变的肾组织中肾小管上皮细胞仅表达角蛋白而无 α -SMA 染色。而部分 IgA 肾病和急进性肾小球肾炎患者的肾活检组织中可发现处于表型转化中间阶段的细胞,可观察到其肾小管立方上皮细胞同时表达 α -SMA 和角蛋白,而在肾皮质小管纤维化部位可见肾小管上皮细胞表达 α -SMA 增加,在 α -SMA 染色阳性的小管细胞中其胶原和 α -SMA 的染色也是阳性,提示肾小管 α -SMA 表达与间质纤维化高度相关^[17]。还有学者检测了膜性肾病患者肾间质内 α -SMA 表达情况并进行长期追踪观察,结果发现肾活检时肾间质 α -SMA 的染色强度与病变进展数年后的肾小球滤过率(GFR)下降程度相关,因此提出肾间质 α -SMA 的表达可能是早期判断肾病预后的有效指标^[18]。这一结论尚有待于对不同肾小球疾病更多临床前瞻性研究加以证实。

3 细胞骨架与肾小管疾病

肾小管上皮细胞拥有高度极化的腔面膜和基膜,并有明显不同的脂类和蛋白成分,具有许多结构差异并与不同的生理生化功能有关。细胞腔面膜侧与尿液直接接触,其中很多膜蛋白与尿液中水、离子和大分子的重吸收有关。细胞基膜侧紧邻肾间质环境,参与维持细胞的正常状态和信号识别与转导。正常情况下,肾小管上皮细胞中以肌动蛋白为基础、有序排列的细胞骨架是维持正常刷状缘结构、上皮细胞极性、紧密连接完整性以及上皮细胞与基膜粘附的结构基础。对近端肾小管上皮细胞的研究显示,其腔面膜侧的微丝通过 actin 结合蛋白(villin、fimbrin、ezrin 等)与腔面膜结合,构成微绒毛,对维持葡萄糖、氨基酸、 HCO_3^- 等的重吸收十分重要;其基膜侧的微丝通过 actin 相关蛋白(如 vincullin、talin、 α -actinin、paxillin、tensin 等)与细胞膜的蛋白如 Na^+ - K^+ -ATP 酶、整合素等结合,将其锚定在基膜侧,以维持肾小管上皮细胞的极性。它是维持细胞内较低 Na^+ 浓度及其所致的细胞内浓度梯度差的关键因素;基膜侧 Na^+ - K^+ -ATP 酶的正常位置通过与部分膜相关的细胞骨架蛋白(如 ankyrin、fodrin、spectrin)直接相互作用来调控。此外,微丝还与 E-钙粘素相连,可防止液体从细胞间渗漏到肾间

质^[19]。

细胞骨架与肾小管疾病的关系一直为学术界研究的热点问题,其中最引人注目的是关于肾缺血的研究^[20]。体外培养的肾小管细胞研究首先证实,急性缺血性损伤使细胞内 ATP 耗竭并引起细胞骨架的损伤,由此可导致肾小管上皮细胞刷状缘完整性破坏、紧密连接功能损害和细胞极性的丧失。近端肾小管上皮刷状缘的破坏是急性缺血性肾损伤的早期超微结构事件,微绒毛结构的完整性通常依赖于其轴心肌动蛋白束的存在,当 ATP 耗竭时微绒毛轴心束中的肌动蛋白快速消失。应用荧光显微镜观察发现,ATP 耗竭诱导肌动蛋白束和微丝的去组装,使细胞的应力纤维破坏,这一改变并非 F-actin 解聚成 G-actin 单体,而是由于 F-actin 束变短形成短而粗的雪茄形片段的的结果^[21]。对近端肾小管上皮细胞 LLC-PK₁ 的研究显示,伴随 ATP 耗竭,细胞骨架蛋白肌球蛋白 myosin 1 与 F-actin 在细胞中的分布改变,转位于微绒毛和细胞的外周,而未与应力纤维在一起,这种变化可能与微绒毛塌陷有关^[22],在 ATP 补充后可被逆转^[23]。在双侧肾蒂夹闭急性缺血模型中,缺血 5 min 可使微绒毛处 F-actin 显著减少;缺血 15 min,肾小管腔中可见片状脱落的 F-actin;缺血 50 min 时腔面膜 F-actin 几乎全部消失,而胞浆中的 F-actin 无明显变化^[24]。用细胞松弛素 D 使 F-actin 解聚可见与缺血所致的相同病理改变,同时肾小管上皮细胞对钠离子、锂离子等的重吸收减少^[25]。还有人发现,当诱导肾小管上皮细胞 actin 重构时,观察到与纤溶相关的组织型纤溶酶原激活剂(tPA)、尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)的 mRNA 表达下降,tPA 活性减低以及纤溶酶原表达显著抑制,这种变化可被细胞骨架解聚剂细胞松弛素 D 所抑制^[26],提示微丝紊乱确实可使细胞结构及功能受损。在缺血性损伤时,细胞骨架分布紊乱还导致位于细胞基底侧的 Na^+ - K^+ -ATP 酶易位于细胞腔面膜侧,导致钠、水等多种重要物质的转运紊乱^[27];由于肾小管上皮细胞间紧密连接的闸门作用受损,细胞正常极性丧失,使肾小管腔内的肾小球滤液发生返漏,造成肾间质水肿而压迫肾小管^[28]。正常情况下,肾小管上皮细胞与基质粘连的过程包括肌动蛋白微丝与肌动蛋白-结合蛋白装配、细胞与细胞粘附、细胞膜极化的建立和各种细胞内及细胞间的信号传导途径形成,任何一步受到干扰,细胞与基质的粘附将被破坏。研究发现,缺血损伤可使细胞极性丧失,整

合素蛋白分布紊乱,上皮细胞与基质的粘附破坏,因而肾小管上皮细胞与基膜分离脱落落入肾小管管腔。缺血后肌动蛋白含量及其分布是否恢复,对于肾小管重吸收功能的重建是必不可少的^[22],在缺血后肾小管上皮细胞出现 vimentin 的再表达,意味着细胞的去分化,可能是提示细胞再生的早期标志。由此可见,细胞骨架蛋白的变化对急性肾小管坏死的病理生理进展和恢复过程均极为重要。

近年来还发现不同致病性代谢因素、细胞因子及金属中毒均可影响肾小管上皮细胞内的细胞骨架蛋白表达并与细胞功能改变密切相关。如给大鼠灌服氯化镉 14 天,发现肾皮质中镉大量积聚,肾小管上皮细胞中微管减少或消失且排列紊乱,使细胞内刷状缘蛋白的再循环减少,导致刷状缘的转运功能丢失^[29]。另有学者研究寒冷刺激对大鼠肾小管的影响发现,经冷处理 15 min,近端肾小管上皮细胞中的微管网络几乎全部破坏,可见 gp330、H⁺-ATPase 等蛋白存在于胞浆中;待温暖 60 min 后上述蛋白重新位于囊泡上,微管网络结构恢复^[30]。还有研究发现,微管相关蛋白 dynein 及 dynactin 复合体可出现在集合管的主细胞上并与细胞内囊泡的转运功能有关,该复合体可能参与血管加压素调节的水通道蛋白 2 (AQP2) 囊泡的转运^[31]。远端肾小管细胞系 A6 细胞中,用膜片钳技术检测发现,细胞表层肌动蛋白网靠近刷状缘的 Na⁺ 通道,细胞松弛素 D 可诱导 Na⁺ 通道激活,加入肌动蛋白结合蛋白,可以抑制自发的以及肌动蛋白诱导的 Na⁺ 通道的激活^[32]。此外,我们曾在药物相关性间质性肾炎患者肾活检标本的免疫组化研究中发现,急性间质性肾炎患者中肾小管细胞 -SMA 的表达与其增生细胞核抗原 (PCNA) 的表达正相关,而慢性间质性肾炎患者肾间质内出现大量 -SMA 阳性细胞,与 型胶原分布一致,提示肾小管及肾间质 -SMA 的表达增高与肾小管细胞的转分化和肾间质纤维化程度密切相关^[33]。应用人外周血单核巨噬细胞条件培养基与人肾小管上皮细胞系 HK-2 进行共培养,发现单核巨噬细胞条件培养基可直接诱导肾小管上皮细胞增生、表达 -SMA 以及分泌细胞外基质增加,表明疾病状态下局部浸润的炎症细胞可与肾小管细胞相互作用并诱导其转分化^[34]。

4 细胞骨架与肾脏纤维化病变

不同类型的肾脏纤维化病变均有细胞骨架蛋白

表达的改变。在生理性衰老的大鼠中,肾小球系膜细胞和肾小管间质细胞中的 -SMA 表达均可增高,而限制饮食可以使其表达下降^[35]。Milan 鼠在无高血压的情况下,发育至 10 个月时可出现大量蛋白尿,血清肌酐增加,肾脏病理显示 5% 以上的肾小球发生节段性或球性硬化,残存肾小球轻度肥大,电镜下可见足细胞 Desmin 表达增加,同时间质成纤维细胞表达 -SMA 的增加,肾小管间质损伤的面积 > 25%^[36]。另外,采用激光共聚焦显微镜和速冷蚀刻技术对梗阻性肾病的肾小球形态进行研究,发现足细胞胞体和足突的细胞骨架由大量中间丝组成,而肌动蛋白微丝和微管未见显著改变^[37]。在肾次全切除的动物模型中,免疫荧光可见肾近端肾小管上皮腔面膜的肌动蛋白增多,同时肾小管上皮的 uPA mRNA 含量和纤溶活性下降^[28]。在 5/6 肾切除的肾小球硬化模型中,免疫组化和原位杂交均显示第 3 周时肾小管上皮细胞表达 -SMA,定量分析表明 -SMA 表达阳性的肾小管上皮细胞和间质中的肌纤维母细胞数目与肾小管间质纤维化的严重程度密切相关^[38]。还有作者对 49 例 IgA 肾病患者肾活检标本中的肾小球进行研究,发现非肌型肌球蛋白重链与系膜增生和系膜基质的积聚明显相关,而非肌型肌球蛋白重链表达较高的患者预后较差^[39]。进一步研究表明,对肾脏纤维化过程进行干预治疗后,随纤维化病变的减轻细胞骨架蛋白的表达也可降低^[40]。因此,上述特定的细胞骨架蛋白可以作为肾小球硬化和肾间纤维化的标志物,其表达改变与肾脏纤维化病变的进展呈正相关。

5 细胞骨架与遗传性肾脏病

新近研究表明,在遗传相关的肾脏疾病中,细胞骨架可能在发病过程中也是关键环节之一。Kaplan 等^[41]研究了家族性局灶节段性肾小球硬化的三个家系,发现编码辅肌动蛋白 -actinin-4 的基因 ACTN-4 突变,呈常染色体显性遗传。-actinin-4 是一种影响肌动蛋白丝交联的蛋白。体外实验证明,突变型 ACTN-4 比野生型 ACTN-4 编码的 -actinin-4 与 F-actin 的结合更强。ACTN-4 基因突变使肾小球足细胞的肌动蛋白调节改变可能是这三个家系中患者发病的原因。

小结 细胞骨架蛋白及其结合蛋白在肾脏固有细胞中表达程度、分布、组装及去组装形式均与细胞

的表型转化密切相关,在某些肾脏疾病中特定细胞骨架蛋白在不同部位的过表达和分布变化与疾病的病理生理进程有关。目前,对细胞骨架的研究主要侧重于对其表达水平的研究上,而对于疾病状态下细胞骨架蛋白的调控因素及其改变与细胞功能变化的关系所知甚少,加强有关研究有助于深化对不同肾脏疾病发病机制的认识。

参 考 文 献

- 1 王 玉,李晓玫译. α -肌动蛋白在肾系膜细胞重塑过程中的变化及其意义. 国外医学泌尿系统分册,1997,17(4):172
- 2 Shirato I, Sakai T, Kimura K, *et al.* Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am J Pathol*, 1996, 148(4):1283
- 3 Strutz F, Caron R, Tomaszewski J, *et al.* Transdifferentiation: A new concept in renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 1994, 5:819
- 4 Strutz F, Okada H, Lo CW, *et al.* Identification and characterization of fibroblast-specific protein-1 (FSP-1). *J Cell Biol*, 1995, 130:393
- 5 Romano LA, Ferder L, Insera F, *et al.* Intraglomerular expression of α -smooth muscle actin in aging mice. *Hypertension*, 1994, 23(Pt 2):889
- 6 王 玉,李晓玫. 肾脏固有细胞的表型转化特征及其病理意义. 中国病理生理杂志, 2002, 18(10):1303
- 7 王 玉,李晓玫,王海燕. 白介素-1通过JNK/P38信号转导通路调控肾系膜细胞表达 α -平滑肌肌动蛋白. 生理学报, 2002, 54(3):244
- 8 李晓玫,唐嘉薇,李 彪,等. 丝裂素活化蛋白激酶信号转导途径对血小板源生长因子所致鼠肾系膜细胞表型转化的调控作用. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(6):347
- 9 李 健,李晓玫,王海燕. 低密度脂蛋白活化人肾小管上皮细胞促进肾间质成纤维细胞生物学表型改变. 中华医学杂志, 2000, 80(10):787
- 10 程叙扬,李晓玫,唐嘉薇,等. 微小病变患者尿蛋白对肾小管上皮细胞的损伤作用及其机制研究. 中华肾脏病杂志, 2002, 18(6):398
- 11 Cortes P, Mendez M, Riser BL, *et al.* F-actin fiber distribution in glomerular cells: structural and functional implications. *Kidney Int*, 2000, 58(6):452
- 12 Ng YY, Fan JM, Mu W, *et al.* Glomerular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in the evolution of glomerular crescent formation. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14:2860
- 13 王 玉,邹万忠,李晓玫. 肾小球肾炎中系膜细胞 α -平滑肌肌动蛋白表达与细胞表型变化的关系. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(4):206
- 14 Kim O. Immunohistochemical study of the expression of α -smooth muscle actin and the proliferation marker Ki-67 of glomerulonephritis. *J Korean Med Sci*, 2001, 16(4):455
- 15 王 玉,李晓玫,邹万忠,等. 人类肾小球肾炎间质细胞表型转化的研究. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(1):7
- 16 Ando Y, Moriama T, Oka K, *et al.* Enhanced interstitial expression of caldesmon in IgA nephropathy and its suppression by glucocorticoid-heparin therapy. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14(6):1408
- 17 Jinde K, Nikolic-Paterso DJ, Huang XR, *et al.* Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(4):761
- 18 Badid C, Desmouliere A, McGregor B, *et al.* Interstitial α -smooth muscle actin: a prognostic marker in membranous nephropathy. *Clin Nephrology*, 1999, 52(4):210
- 19 李晓玫,蔡 琪,王海燕. 急性肾小管坏死时肾小管上皮细胞损伤与修复的机理. 中华肾脏病杂志, 1999, 15(4):261
- 20 郭啸华,杨俊伟. 细胞的极性与缺血性急性肾功能衰竭. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2000, 9(4):167
- 21 Hinshaw DB, Armstrong BC, Beals TF, *et al.* A cellular model of endothelial cells. *J Surg Res*, 1988, 44:527
- 22 Mblitoris BA. Putting the actin cytoskeleton into perspective: pathophysiology of ischemic alterations. *Am J Physiol*, 1997, 272:F430
- 23 Wagner MC, Mblitoris BA. ATP depletion alters myosin I beta cellular location in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol*, 1997, 272:C1680
- 24 Kelleman PS, Bogusky RT. Microfilament disruption occurs very early in ischemic proximal tubule cell injury. *Kidney Int*, 1992, 42:896
- 25 Kelleman PS, Clark RAF, Hoilien CA, *et al.* Role of microfilament in maintenance of proximal tubule structural and functional integrity. *Am J Physiol*, 1990, 259:F279
- 26 Essig M, Terzi F, Burtin M, *et al.* Mechanical strains induced by tubular flow affect the phenotype of proximal tubular cells. *Am J Physiol*, 2001, 281(4):F751
- 27 Mblitoris BA. Ischemia-induced loss of epithelial polarity: potential role of the actin cytoskeleton. *Am J Physiol*, 1991, 260:F769
- 28 Mblitoris B. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase that redistributes to apical membrane during ATP depletion remains functional. *Am J Physiol*, 1993, 265:F693
- 29 Sabolic I, Herak Kramberger CM, Brown D. Subchronic cadmium treatment affects the abundance and arrangement of cytoskeletal proteins in rat renal proximal tubule cells. *Toxicology*, 2001, 165(2-3):205
- 30 Breton S and Brown D. Cold-induced microtubule disruption and relocalization of membrane protein in kidney epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9(2):155
- 31 Maples D, Schroer TA, Ahrens N, *et al.* Dynein and dynactin colocalize with AQP2 water channels in intracellular vesicles from kidney collecting duct. *Am J Physiol*, 1998, 274(2Pt2):F384
- 32 Antiello HF, Stow JL, Prat AG, *et al.* Actin filaments regulate epithelial Na^+ channel activity. *Am J Physiol*, 1991, 261:C882
- 33 杨 莉,李晓玫,郑 欣,等. 药物相关性间质性肾炎病人细胞表型特征及其与炎症/纤维化病变的关系. 中华医学杂志, 2001, 81(2):73
- 34 杨 莉,李晓玫,王 荣,等. 单核巨噬细胞对肾小管上皮细胞活化的作用及其机制初探. 中国病理生理杂志, 2002, 18(10):1217
- 35 Razaque MS, Shimokawa I, Nazneen A, *et al.* Life-long dietary restriction modulates the expression of collagens and collagen-binding heat shock protein 47 in aged fischer 344 rat kidney. *The Histochemical J*, 1999, 31:

123

- 36 Floege J, Hackmann B, Kliem V, *et al.* Age-related glomerulosclerosis and interstitial fibrosis in Milan normotensive rats: a podocyte disease. *Kidney Int*, 1997, 51(1): 230
- 37 Matsuda A, Terada N, Ueda H, *et al.* Morphological studies of glomeruli in obstructive kidneys by confocal laser scanning microscopy and quick-freezing replica method. *Histol Histopathol*, 1998, 13(2): 337
- 38 Ng YY, Huang TP, Yang WC, *et al.* Tubular epithelial-myofibroblast trans-differentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int*, 1998, 54: 930-846

- 39 Mise N, Kimura K, Nagai R, *et al.* Mesangial expression of a nonmuscle myosin heavy chain, SMemb, is associated with glomerular sclerosis and renal prognosis in IgA nephropathy. *Nephron*, 1998, 78(3): 284
- 40 Oldroyd SD, Thomas CL, Gabbiani G, *et al.* Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. *Kidney Int*, 1999, 56(6): 2116
- 41 Kaplan JM, Kim SH, North KN, *et al.* Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genet*, 2000, 24: 251

[收稿日期] 2002-05-04 [修回日期] 2002-06-18

(本文编辑 加兴 丁大洪)

(上接第257页)

无疑是很必要的。人源标本的不足、遗传背景的复杂性和不可控性是长期以来困扰人类疾病研究的难题。以模型动物代替人体实验是解决这一问题的常用方法。db/db小鼠是Leptin受体基因缺陷导致的先天肥胖性2型糖尿病小鼠,具有高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特性。其发病过程亦与人2型DN的发病过程非常相似^[4],是国际上广为采用的研究DN的模型动物^[1]。解放军肾脏病研究所以往的工作已证实大黄酸能够有效地降低db/db小鼠高血脂、高血糖,逆转胰岛素抵抗,减少蛋白尿和保护肾脏功能的作用^[2,3,8]。为了全面系统地研究DN发病的分子机制和大黄酸治疗的分子机制,我们首先利用国际学术界广泛接受的Affymetrix公司生产的标准化基因芯片和标准化芯片检测工作站对db/db DN小鼠肾脏基因表达谱进行了检测和分析^[5],观察比较了db/db小鼠在DN状态、以及经大黄酸治疗后肾脏基因表达谱的改变情况,发现了很多差异表达基因。在此基础上,我们又利用定量RT-PCR的方法对基因芯片的检测结果进行了检验分析,发现了不少新的DN相关基因。其中有一些是未知功能的基因。揭示这些基因的功能及其在DN发生、发展过程中的可能作用无疑是非常重要的。

小鼠“RIKEN cDNA 0610006H10”基因是2002年由Eukaryota等提交到genebank数据库的,至今尚未见任何有关其功能的报道。我们的研究表明,“RIKEN cDNA 0610006H10”基因与db/db小鼠的DN密切相关。为了进一步研究其功能,我们利用RT-PCR的方法克隆了“REKEN cDNA 0610006H10”基因cDNA(包含了“REKEN cDNA 0610006H10”基因从起始密码子ATG到终止密码子TAA的完整阅读

框)^[6],本文又进而利用它构建了表达载体,并在大肠杆菌中进行了初步的表达研究。从上述研究结果来看,我们得到了所预期的“REKEN cDNA 0610006H10”基因原核表达载体,并且这一表达载体是在大肠杆菌中表达的。这一工作为我们进一步研究“REKEN cDNA 0610006H10”基因编码蛋白的结构和功能,制备“REKEN cDNA 0610006H10”基因编码蛋白的相应抗体,并进而从蛋白水平研究“REKEN cDNA 0610006H10”基因在机体中的表达,从而最终探讨其在DN发生发展过程中的作用创造了条件。

参 考 文 献

- 1 Coleman DL. Diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetes*, 1982, 31 (Suppl 1): 1
- 2 LIU ZH, LI Y, CHEN ZH, *et al.* Glucose transporter-1 in human glomerular mesangial cells modulated by transforming growth factor-beta and rhein. *Acta pharmacol Sin*, 2001, 22(2): 169
- 3 朱加明,刘志红,李颖健,等. 大黄酸对 GLUT1 基因转染系膜细胞功能的影响. *中华内科杂志*, 2001, 40: 503
- 4 朱加明,刘志红,黄燕飞,等. 大黄酸对 db/db 小鼠糖尿病肾病疗效的观察. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2002, 11: 3
- 5 刘志红,郑敬民,吴义超,等. db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏基因表达谱及大黄酸对其的影响. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2002, 11: 201
- 6 郑敬民,刘志红,张鑫,等. db/db 小鼠糖尿病肾病相关基因的分析 and 克隆. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(3): 406
- 7 J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南, 第二版. 科学出版社出版, 1996, 19~79
- 8 刘志红,李颖健,朱加明,等. 葡萄糖转运蛋白对小鼠肾小球系膜细胞己糖胺通路的影响. *中华内分泌杂志*, 2001, 17(6): 370

[收稿日期] 2003-04-22

(本文编辑 丁大洪)