

纤溶系统对膜性肾病大鼠足细胞损伤的影响

梁静¹, 张渊², 曹灵³, 孟祥龙¹, 王莉^{2*}

(1. 四川省医学科学院·四川省人民医院城东病区肾脏科, 成都 610110; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院肾脏科, 成都 610072; 3. 泸州医学院附属医院肾病内科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨早期预防纤溶紊乱对防止 MN 进展有重要意义。**方法** 按改良 Border 法制作 MN 大鼠模型, 正式免疫第 1、2、3、4 周末检测全血 uPA、tPA 及 PAI-1 的表达水平; 取大鼠肾组织进行光镜、电镜观察肾组织病理学改变; 采用免疫组化方法检测肾足细胞 nephrin、WT1 蛋白表达含量, 并进行相关性分析。**结果** 与正常组及干预组大鼠相比, 模型组大鼠的全血 uPA、tPA 水平明显减少, 而 PAI-1 水平明显增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 电镜显示肾小球足细胞广泛足突融合至消失; GBM 基质出现“钉样突起”, 肾间质纤维化程度较重。肾小球足细胞分布区 WT-1 和 nephrin 蛋白表达下调, 其中 nephrin 蛋白表达量变化有统计学意义 ($P < 0.01$)。相关性分析显示, 大鼠全血 tPA 和 uPA 水平与肾组织 nephrin 蛋白的表达变化呈正相关, 全血 PAI-1 水平与肾组织 nephrin 蛋白的表达变化呈现负相关。**结论** 在 MN 发展中, 纤溶系统对足细胞损伤凋亡具有重要意义, 早期评估预测 MN 足细胞损伤情况或可为防治早期 MN 步入终末期肾脏病找到又一治疗靶点, 亦可为临床研究治疗 MN 的药物提供新的思路。

【关键词】 膜性肾病; 足细胞; Nephrin; WT-1; 纤溶系统

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0283-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.013

Effect of fibrinolytic system on the podocyte injury in rats with membranous nephropathy

LIANG Jing¹, ZHANG Yuan², CAO Ling³, MENG Xiang-long¹, WANG Li^{2*}

(1. Department of Nephrology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital East Branch, Chengdu 610110, China; 2. Department of Nephrology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072; 3. Department of Nephrology, Affiliated Hospital to Luzhou Medical College, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To observe the expression of uPA, tPA and PAI-1 in whole blood of rat membranous nephropathy (MN) models induced by cationic bovine serum albumin (C-BSA), and to explore the effect of fibrinolytic system on podocyte apoptosis and pathological changes. To explore the possible preventive and therapeutic effects and the possible mechanisms of early prevention of fibrinolysis. **Methods** We developed a MN model with the modified Border method. At the end of the 1st, 2nd, 3th, and 4th week of immunization, respectively, the levels of whole blood uPA, tPA and PAI-1 were determined by ELISA. The rat kidney tissues were examined by light microscopy and electron microscopy to identify the pathological changes. The expression levels of nephrin and WT1 were detected with immunofluorescence staining and their correlation was analyzed. **Results** Compared the treatment group with control group, the levels of whole blood uPA, tPA and PAI-1 of the model group were decreased, while PAI-1 was elevated, showing a significant difference ($P < 0.05$). The degree of renal interstitial fibrosis was more serious. Correlation analysis showed that the whole blood tPA and uPA levels were positively correlated with the changes of nephrin protein expression in the kidney tissue, while the whole blood PAI-1 level was negatively correlated with the nephrin protein expression in the kidney tissue. **Conclusions** In the process of MN development, the fibrinolytic system may have important significance for podocyte apoptosis. Determination

【基金项目】 四川省卫生厅科研课题(编号:110238)。

【作者简介】 梁静(1981-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肾脏纤维化相关疾病的研究。Email: liangjing9743@163.com。

【通讯作者】 王莉(1962-), 女, 博士, 主任医师, 从事各种肾脏疾病的诊断及血液透析、腹膜透析技术的研究。Email: scwangli62@163.com。

of early phase of MN podocyte injury may be another therapy target for prevention of the disease development, and then provide new ideas for clinical research and drug development for MN.

[Key words] Kidney; Membranous nephropathy; Podocyte; Nephryn; WT-1; Fibrinolytic system; Rats; Pathology

Corresponding author: WANG Li, Email: scwangli62@163.com

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是一种非炎症性肾小球疾病,表现为肾小球细胞外基质合成与降解失衡而导致的肾小球基底膜普遍增厚及肾小球硬化。纤溶系统在膜性肾病的发生发展中发挥重要的作用^[1]。作为纤溶系统中重要的活性物质,血浆中组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, tPA)及其抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)之间的动态平衡,尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)等物质对维持微血管的正常生理功能起重要作用^[2]。本研究通过构建大鼠膜性肾病模型,对膜性肾病血清 uPA、tPA、PAI-1 的变化情况及其对足细胞损伤凋亡的影响及肾脏病理的影响进行了探讨,旨在为临床预测 MN 足细胞损伤及预后提供科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂

兔抗大鼠 nephrin 抗体、兔抗大鼠 WT1 多克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司;阳离子化牛血清蛋白(C-BSA)购自 Chondrex 公司;低分子肝素速碧林购自杭州寒诺菲圣德拉堡民生制药有限公司;大鼠 uPA ELISA 试剂盒购自 Elabscience 公司;大鼠 tPA ELISA 试剂盒购自 Elabscience 公司;大鼠 PAI-1 ELISA 试剂盒购自 Elabscience 公司。

1.1.2 动物及分组

由四川省人民医院实验动物研究所提供雄性、清洁级 SD 大鼠 30 只,体重为(200 ± 20)g,动物适应环境 7 d,将尿蛋白为阴性者随机分为正常组和模型组,正常组 10 只;模型组 10 只;干预组 10 只。

1.2 方法

1.2.1 C-BSA 肾炎模型制作

采用改良版 Border 法^[3],取 C-BSA 1mL 溶解于 0.5 mL 生理盐水中,与等量不完全弗氏佐剂充分乳化,在大鼠颈背部,腹股沟等皮下多点注射,1 周后通过连续 4 周隔日尾静脉注射 C-BSA (16 mg/kg)制作大鼠膜性肾病模型作为模型组,正常组隔日尾静脉注射 1 mL 生理盐水(NS)代替 C-BSA。干预组参照说明书及相关文献^[3]每日分两次皮下注射给

予低分子肝素治疗,确定剂量为 450 U/kg。模型组及正常对照组每日两次皮下注射给予同等剂量的生理盐水。

1.2.2 标本收集

各组大鼠于实验第 1、2、3、4 周末各取 4 只用颈动脉托管法取血各 6 mL 后 4℃ 离心分离血清, -20℃ 冰箱保存以供测定血清 uPa、tPa、PAI-1;第 4 周末对各组大鼠杀检,肾脏取下后剥离肾包膜,取一部分肾组织迅速置于液氮,之后转入 -80℃ 保存;其余肾组织用 4% 多聚甲醛固定,经脱水、透明、浸蜡制成 3 μm 切片备用。

1.2.3 肾脏组织病理形态学

取部分肾脏石蜡切片,分别进行 PASM 染色、Masson 染色^[4],高倍光镜及电镜下观察大鼠肾组织的病理形态学变化。

1.2.4 肾脏组织病理学图像分析

使用 Meta Morph 图像分析系统在 400 倍光镜下随机选取 10 个视野测定每组 PASM 染色切片的肾小球系膜阳性目标吸光度(A)。使用 HMIAS-2000 高清晰彩色病理图文报告分析系统在 400 倍光镜下选取 10 个皮质视野进行拍照,取平均值计算纤维化面积占整个视野间质面积(肾小球、肾小管及血管面积不计算在内)的比值。

1.2.5 免疫组织化学检查

采用 SP 法,石蜡包埋的切片常规脱蜡至水,抗原热修复,体积分数为 3% 的 H₂O₂ 阻断清除内源性过氧化物酶;正常山羊血清封闭液 30℃ 恒温封闭 30 min,分别用抗体效价为 1:100 μL 的兔抗大鼠 nephrin、WT1 多克隆抗体,4℃ 孵育过夜,滴加生物素标记的抗兔抗体(原液),30℃ 孵育 40 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(原液),30℃ 孵育 40 min;最后加 DAB 显色,显微镜下控制显色反应,苏木素复染,中性树胶封片。以肾实质细胞胞质内棕褐色颗粒为阳性,采用 GD-8 病理彩色图像分析处理系统进行分析。

1.2.6 ELISA

血清 uPa、tPa、PAI-1 的检测严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.3 数据统计

全部数据采用 SPSS 17.0 for Windows 软件包统计分析,结果用均数 ± 标准差表示,各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。相关性分析采用线性分析法。

2 结果

2.1 一般指标变化

与正常组相比,模型组血清 uPa 和 tPa 水平明显下降,PAI-1 显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组间比较,模型组血清 uPa 从第 1 周开始显著低于正常组,血清 tPa 水平从第 2 周开始显著低于正常组,血清 PAI-1 从第 2 周开始显著高于正常组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。肝素干预

组一般指标与正常组相似,从第二周开始,模型组较干预组各指标差异有显著性($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 模型组大鼠肾组织病理形态学观察

光镜下可见正常组肾组织病理学检测未见异常;干预组大鼠肾组织病理学检测亦未见明显异常;模型组 HE 染色可见肾小球明显肿大,部分肾小管上皮细胞肿胀,肾间质纤维化程度严重;Masson 染色结果显示嗜复红蛋白有明显沉积;PASM 染色显示 GBM、TBM 显示弥漫性增厚,出现“梯状”外观。电镜观察显示正常组肾组织超微结构正常;模型组肾组织出现明显病理损害,肾小球上皮下可见电子致密物沉积,“钉突”明显可见,肾小球足细胞广泛足突融合甚至消失。见图 1、2。

表 1 各组大鼠血清 uPa、tPa、PAI-1 水平的比较($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

Tab.1 Comparison of serum levels of uPa, tPa, and PAI-1 in the rats

指标 Indexes	周 Weeks	正常组 Normal group	模型组 Model group	干预组 Intervention group
uPa	1	1.13 ± 0.06	0.86 ± 0.04 [*]	1.05 ± 0.03
	2	1.14 ± 0.08	0.71 ± 0.03 ^{*#}	1.06 ± 0.04
	3	1.07 ± 0.02	0.62 ± 0.01 ^{*#}	1.01 ± 0.06
	4	1.03 ± 0.05	0.55 ± 0.01 ^{*#}	0.92 ± 0.12
tPa	1	2.87 ± 0.12	2.58 ± 0.09	2.83 ± 0.21
	2	2.67 ± 0.11	2.36 ± 0.04 ^{*#}	2.62 ± 0.09
	3	2.91 ± 0.07	1.92 ± 0.07 ^{*#}	2.81 ± 0.13
	4	2.83 ± 0.16	1.70 ± 0.08 ^{*#}	2.61 ± 0.06
PAI-1	1	21.85 ± 2.14	22.69 ± 1.53	21.87 ± 3.13
	2	20.64 ± 1.46	23.24 ± 1.08 ^{*#}	20.94 ± 1.47
	3	20.69 ± 1.38	26.51 ± 1.14 ^{*#}	21.74 ± 1.95
	4	22.47 ± 0.42	29.62 ± 1.95 ^{*#}	22.83 ± 0.85

注: * 与正常组相比, $P < 0.05$; # 与干预组相比, $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, $^* P < 0.05$; Compared with the intervention group, $^{\#} P < 0.05$.

2.3 大鼠肾间质纤维化面积

模型组肾组织的纤维化面积为 (28.21 ± 11.53)%, 正常组为 (12.63 ± 5.42)%, 干预组为 (13.12 ± 3.51)%; 与正常组相比,模型组面积更大,差异有显著性($P < 0.01$)。相关性分析显示,大

鼠全血 tPA 和 uPA 水平与肾间质纤维化面积呈现负相关($r = -0.8654, P < 0.05$; $r = -0.8243, P < 0.05$),全血 PAI-1 水平与肾间质纤维化面积呈现正相关($r = 0.8324, P < 0.05$)。

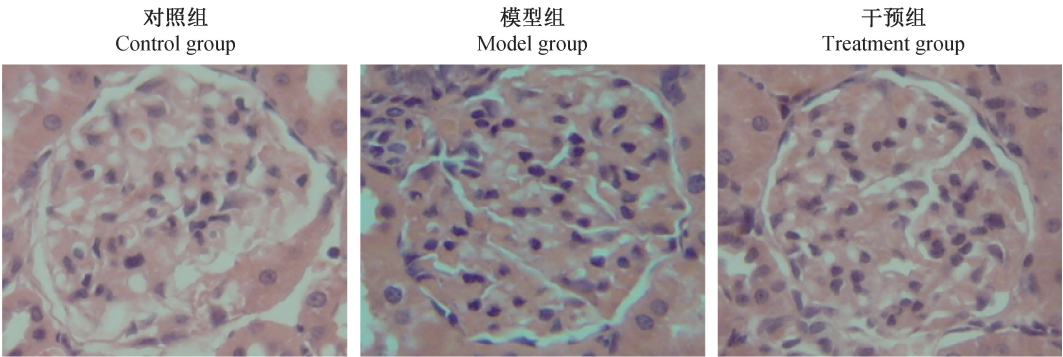
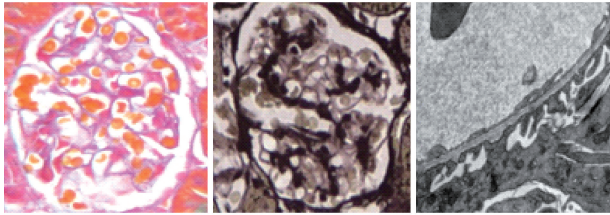


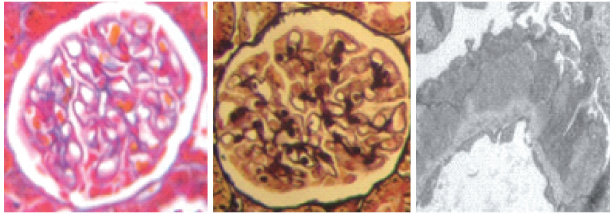
图 1 大鼠肾组织病理形态学变化 ×400; HE 染色

Fig.1 Pathological changes in the rat kidney tissues HE staining ×400

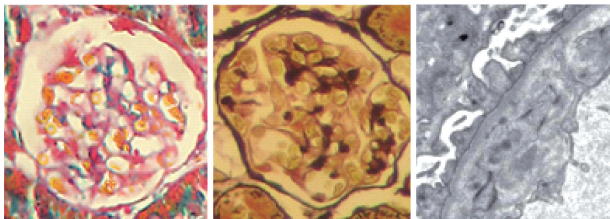
正常组 Control group



模型组 Model group



干预组 Treatment group



注:从左到右依次为 Masson 染色(×400)、PASM 染色(×400)、电镜(×20 000)。

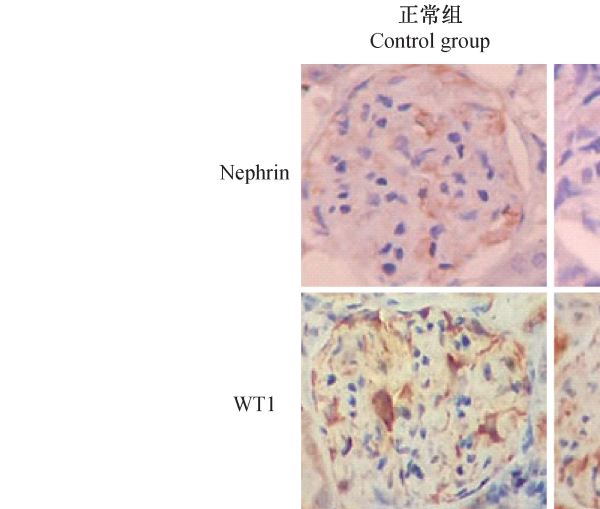
图 2 肾组织病理形态学观察

Note. Pathological changes of the rat kidneys. Masson staining, ×400; PASM staining, ×400; Electron microscopy, ×20 000.

Fig. 2 Pathological observation of the kidney tissues

2.4 肾组织 WT1 蛋白和 nephrin 蛋白的表达变化

正常组肾组织切片中可见 nephrin 呈浅棕色染色沿肾小球毛细血管襻呈均匀、线状分布,肾小管有少量分布;干预组亦未见明显异常;模型组 4 周时 nephrin 表达较正常组显著减少,表达不均,稀疏,部



分区域表达消失,较正常组及模型组差异有显著性($P < 0.01$),WT1 于 MN4 周末时在足细胞核的表达呈深棕色粗大颗粒,与正常组及干预组比较差异无显著性($P > 0.05$)(见表 2、图 3)。

2.5 肾组织 Nephrin 蛋白、WT1 蛋白与全血 tPA、uPA、PAI-1 相关性分析

相关性分析显示,模型组大鼠全血 tPA 和 uPA 水平与肾组织 Nephrin 蛋白的表达变化呈正相关($r = 0.8264, P < 0.05$; $r = 0.8483, P < 0.05$),全血 PAI-1 水平与肾组织 nephrin 蛋白的表达变化呈现负相关($r = -0.8152, P < 0.05$)。全血 tPA 和 uPA、PAI-1 水平与肾组织 WT1 蛋白的表达变化则无明显相关($r_1 = 0.2372, r_2 = 0.2531, r_3 = 0.2483$;均 $P > 0.05$)。

表 2 4 周末各组肾组织 nephrin、WT1 的表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Expression level of nephrin and

WT1 in the kidney tissues at the end of 4th week

组别 Groups	Nephrin	WT1
正常组 Normal	12.35 ± 3.78	25.45 ± 11.37
模型组 Model	5.62 ± 2.03 ^{*#}	22.60 ± 14.16
干预组 Intervention	12.06 ± 4.23	25.14 ± 6.25

注:模型组与正常组比较, * $P < 0.05$;模型组与干预组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$; Compared with the intervention group, # $P < 0.05$.

3 讨论

MN 是一种常见的肾小球疾病,是成人肾病综合征最常见的病因,在原发性肾小球疾病导致的终末期肾病中是第二位或第三位的常见原因。其主要的病理改变是肾小球基底膜上皮下免疫复合物沉积伴 GBM 弥漫性增厚,临床表现为大量蛋白尿或者肾

模型组 干预组
Model group Treatment group

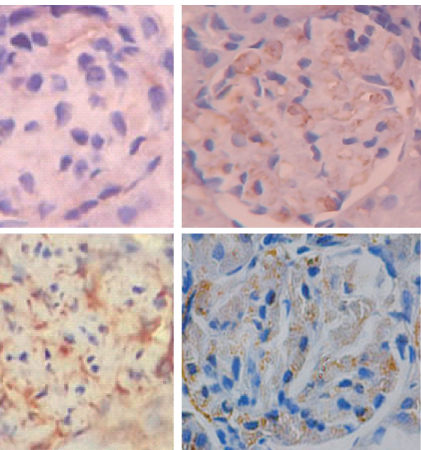


图 3 4 周末两组肾组织 nephrin、WT1 的表达情况

Fig. 3 Expression of nephrin and WT1 in the kidney tissues at the end of 4th week

病综合征,常有高凝状态存在,肾小球硬化、纤维化为各型肾小球疾病终末阶段所常见^[1]。纤溶系统在膜性肾病的发生发展中发挥重要的作用。作为纤溶系统中重要的活性物质,tPA 和 uPA 均能激活纤溶酶原,也是人类血液中仅有的两种纤溶酶原激活物,与 uPA 相比,tPA 结构上的赖氨酸结合部位使其可特异性结合于纤维蛋白血凝块上,进而增加了溶血功能。uPA 在各组织中广泛存在,尤其常见于结缔组织或细胞外组织,可局部活化细胞外间质中的纤溶酶原,形成纤溶酶进而降解大多数糖蛋白^[3]。

PAI-1(纤溶酶原激活物抑制剂-1)是一种单链糖蛋白,相对分子质量 52×10^3 ,含 379 个氨基酸,属丝氨酸蛋白酶抑制物家族^[5]。其主要作用是通过与 PA 形成不可逆的复合物而灭活 tPA(组织型纤溶酶原激活物)的活性,而在病理条件下高表达的 PAI-1 还能灭活 uPA(尿激酶型纤溶酶原激活物)的活性,从而使纤维蛋白因无法降解而在组织中沉积下来,并导致细胞外基质合成增加、降解抑制,进而导致组织纤维化^[5]。

本实验研究结果显示,从第二周末起,与正常组及干预组相比,模型组膜性肾病大鼠的血清 tPA 和 uPA 水平出现明显下降,而 PAI-1 水平则明显上升;相关性分析及各组细胞损伤及调亡的差异提示早期预防纤溶紊乱对防止 MN 进展有重要意义。

膜性肾病的一个重要特征是足细胞损伤。足细胞在膜性肾病病理状态各种损伤因素作用下可能发生若干足细胞特异蛋白分子(nephrin、WT-1 等)表达的下调以及形态学变化,如细胞调亡等^[6]。作为一种高度分化成熟的细胞,足细胞的分裂增殖能力不强,因此足细胞的减少和丢失可作为反映肾小球损伤严重程度和肾硬化进展的重要观测指标及预测指标。Nephrin 是近几年来在足细胞裂孔膜上发现的第一个跨膜糖蛋白,它特异地表达在足细胞的裂孔膜上,对于维持正常的肾小球滤过功能具有重大意义^[7]。有研究发现 nephrin 参与足细胞的重要功能,目前多数研究者认为 nephrin 的减少与蛋白尿的发生关系密切^[7-8]。足细胞特异性蛋白 WT1(Wilms Tumor-1)是一种锌指样转录因子,定位于表达在足细胞核,它是足细胞特异性标志之一^[9-10]。研究发现在局灶节段性肾小球硬化(FSGS)中,WT1 表达下降^[11],本实验免疫组化实验结果显示,MN 模型大鼠中 nephrin 和 WT1 蛋白的表达均明显减少,而 nephrin 蛋白表达的下调更为显著,差异有统计学意义,这与足细胞相对数目和密度的逐渐下调呈正相关关系,而干预组 nephrin 和 WT1 蛋白表达水平及足细胞数目及密度均较正常组无明显差异,相关性分析提示 nephrin 和

WT1 蛋白的表达在维持足细胞数量中可能起重要作用,而足细胞 nephrin 和 WT1 蛋白表达的减少或可作为足细胞调亡的标志,进而作为反映肾小球损伤严重程度和肾硬化进展的重要观测指标及预测指标。

综上,在大鼠 MN 模型构建的早期(第一周)即检测到纤溶系统的重要组成部分 tPA、uPA 的明显下调而 PAI-1 表达则明显上调,这与足细胞 nephrin 和 WT1 蛋白表达下调,足细胞调亡加剧等趋势保持一致,干预治疗及相关性分析提示早期通过监测血浆中纤溶系统动态变化初步估计足细胞损伤调亡情况是可行的,本研究从分子水平揭示 MN 从蛋白尿到足细胞损害肾小球硬化的发病机制。

参 考 文 献

- [1] Wang J, Zhu P, Cui Z, et al. Clinical features and outcomes in patients with membranous nephropathy and crescent formation [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(50): e2294.
- [2] Kunamneni A, Durvasula R. Streptokinase-A drug for thrombolytic therapy: a patent review [J]. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2014, 9(2): 106–121.
- [3] 张燕. 膜性肾病大鼠足细胞转分化情况及川芎嗪对其影响的实验研究[D]. 泸州:泸州医学院,2011:15–17.
- [4] Meyer-Schwesinger C, Meyer TN, Sievert H, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 activity induces polyubiquitin accumulation in podocytes and increases proteinuria in rat membranous nephropathy [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(5): 2044–2057.
- [5] Treweek AT, Maskrey BH, Hickson K, et al. Iodixanol has a favourable fibrinolytic profile compared to iohexol in cardiac patients undergoing elective angiography: A double-blind, randomized, parallel group study [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147196.
- [6] PLOS ONE Staff. Correction: Endocytosed $\beta 2$ -microglobulin amyloid fibrils induce necrosis and apoptosis of rabbit synovial fibroblasts by disrupting endosomal/lysosomal membranes: A novel mechanism on the cytotoxicity of amyloid fibrils [J]. *PLoS One*, 2015, 0141631.
- [7] 杨维娜,任淑婷,钱亦华,等. 阿霉素肾病大鼠肾小球中足细胞数量及 nephrin、VEGF 的表达变化 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2010, 41(3): 458–463.
- [8] 李秋月,李六生,李桂霞,等. 坎地沙坦对糖尿病肾病大鼠足细胞 Nephrin、Podocin 和 CD2AP 表达的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(3): 310–314.
- [9] Sangkhathat S, Maneechay W, Chaiyapan W, et al. Association of Wilms' tumor 1 gene single-nucleotide polymorphism rs16754 with colorectal cancer [J]. *Mol Clin Oncol*, 2015, 3(6): 1401–1405.
- [10] Shimodaira S, Sano K, Hirabayashi K, et al. Dendritic cell-based adjuvant vaccination targeting Wilms' Tumor 1 in patients with advanced colorectal cancer [J]. *Vaccines (Basel)*, 2015, 3(4): 1004–1018.
- [11] Iijima K, Someya T, Ito S, et al. Focal segmental glomerulosclerosis in patients with complete deletion of one WT1 allele [J]. *Pediatrics*, 2012, 129(6): e1621–5.

[收稿日期] 2016-02-23