

· 论 著 ·

α D₃ 对阿霉素肾病大鼠肾组织 WT₁ 表达的影响

林小芹, 易著文, 吴小川, 何小解, 张建江

(中南大学湘雅二医院儿科, 湖南 长沙 410011)

【摘 要】 目的 该研究通过阿霉素肾病大鼠模型, 动态观察 α 骨化醇(α D₃)对肾组织肾母细胞瘤抑制基因(WT₁)表达及其对肾病大鼠蛋白尿的影响。**方法** 120 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组、肾病组、激素组、 α D₃ 组和联合组(激素 + α D₃), 每组 24 只。一次性尾静脉注射阿霉素制备阿霉素肾病模型, 对照组一次性尾静脉注射同体积生理盐水。模型制备 2 周后, 激素组、 α D₃ 组和联合组分别每天灌服泼尼松、 α D₃ 及泼尼松与 α D₃, 共 4 周。对照组和肾病组分别灌服等量蒸馏水。于实验第 2, 4, 6 周末各组随机抽取 8 只大鼠, 收集 24 h 尿标本后处死大鼠, 分离肾组织, 观察肾组织病变。用考马斯亮蓝法检测 24 h 尿蛋白含量, 用间接免疫荧光法检测肾组织 WT₁ 的表达。**结果** 第 2 周末, 肾病组、激素组、 α D₃ 组及联合组大鼠 24 h 尿蛋白含量高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 第 4 周及第 6 周末, 肾病组大鼠尿蛋白逐渐上升, 激素组、 α D₃ 组及联合组尿蛋白降低, 均低于同时点肾病组, 差异有显著性意义($P < 0.01$); WT₁ 表达仅见于肾小球, 肾小管几乎无表达。第 2 周末, 肾病组、激素组、 α D₃ 组及联合组大鼠 WT₁ 表达明显低于对照组($P < 0.01$); 第 4 及第 6 周末, 肾病组 WT₁ 表达进一步减弱, 激素组、 α D₃ 组及联合组 WT₁ 的表达增加, 与同时点肾病组比较, 差异有显著性($P < 0.01$)。第 2 周末, 肾病组、激素组、 α D₃ 组和联合组的病理积分明显高于对照组($P < 0.01$); 第 4 周及第 6 周末, 肾病组大鼠病理积分逐渐增高; 第 4 周末, 激素组、 α D₃ 组、联合组病理积分较第 2 周升高, 第 6 周末下降, 以 α D₃ 组更明显; 第 4 周及第 6 周末, α D₃ 组病理积分明显低于肾病组, 其差异有显著性($P < 0.01$)。肾组织 WT₁ 的表达与 24 h 尿蛋白含量呈负相关关系($P < 0.01$)。**结论** α D₃ 可能通过上调足细胞 WT₁ 的表达, 维持足细胞功能, 减少尿蛋白排出。

[中国当代儿科杂志, 2004, 6(3): 195 - 198]

【关 键 词】 肾母细胞瘤抑制基因; α D₃; 肾病; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2004)03-0195-04

Effect of alphacalcidol on Wilms' tumor 1 gene expression in rats with nephrotic syndrome induced by adriamycin

Xiao-Qin LIN, Zhu-Wen YI, Xiao-Chuan WU, Xiao-Jie HE, Jian-Jiang ZHANG. Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Email: qxl1214@163.com)

Abstract: Objective This paper aims at studying the effects of alphacalcidol (α D₃) on Wilms' tumor 1 gene (WT₁) expression of renal tissues and on proteinuria in rats with nephrotic syndrome so as to understand the mechanism of proteinuria occurrence. **Methods** One hundred and twenty SD rats were randomly assigned into five groups: a Control group, a Nephropathy group, a Prednisone-treated nephropathy group (Prednisone group), a α D₃-treated nephropathy group (α D₃ group) and a Prednisone and α D₃-treated group (Combination group). Nephrotic syndrome rat models were established by an injection of adriamycin via the tail vein. The Control group received an injection of 0.1 ml normal saline. After 2 weeks of injections, different treatments were given for the 5 groups daily for 4 weeks. The Prednisone group was administered prednisone daily (12 mg/kg); the α D₃ group was administered α D₃ daily (0.03 μ g/kg); and the Combination group was administered prednisone (12 mg/kg) and α D₃ (0.03 μ g/kg) daily. The Control group and the Nephropathy group were given distilled water with the same volume as the 3 treatment groups. Every 2 weeks specimens of the urine of 8 rats in each group were collected for 24 hrs in order to detect the 24-hr urinary protein content, and then the rats were sacrificed for histological study. Immunofluorescence was used to detect the WT₁ expression of renal tissues.

[收稿日期] 2004-01-12; [修回日期] 2004-02-12

[基金项目] 湖南省卫生厅重点项目资助(编号 A2003-004); 湖南省社会发展科技项目(编号 03SSY3070)。

[作者简介] 林小芹(1963-), 女, 大学, 讲师。现在湘潭卫校儿科组, 邮编: 411001。主攻方向: 小儿肾脏病。

[通讯作者] 易著文, 湖南省长沙市人民中路 86 号中南大学湘雅二医院儿科, 邮编: 410008。

Results By the 2nd week, the 24-hr urinary protein contents of the Nephropathy group, the Prednisone group, the αD_3 group and the Combination group were significantly higher than that of the Control group ($P < 0.01$). By the 4th and 6th weeks, the 24-hr urinary protein contents increased in the Nephropathy group, while those of the Prednisone group, the αD_3 group and the Combination group gradually decreased compared with those of the 2nd week. There were significant differences between the Nephropathy group and the 3 treated-nephropathy groups ($P < 0.01$). By the 2nd week, the WT_1 expressions of the Nephropathy group, the Prednisone group, the αD_3 group and the Combination group were significantly lower than that of the Control group ($P < 0.01$), while the pathologic scores of the 4 nephropathy groups were significantly higher than that of the Control group ($P < 0.01$). By the 4th and 6th weeks, the WT_1 expression in the Nephropathy group decreased, while those of the 3 treated-nephropathy groups elevated compared with those of the 2nd week. Significant differences were found between the Nephropathy group and the 3 treated-nephropathy groups. The WT_1 expression was negatively correlated to the 24-hr urinary protein content ($P < 0.01$). By the 4th week, the pathologic scores of the Prednisone group, the αD_3 group and the Combination group rose compared with those of the 2nd week, but they decreased by the 6th week. The pathologic scores of the αD_3 group by the 4th and 6th weeks were lower than that of the Nephropathy group ($P < 0.01$). **Conclusions** αD_3 may have protective effects against nephrotic syndrome by increasing the WT_1 expression and decreasing the drainage of proteinuria.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(3): 195-198]

Key words: Wilms' tumor 1 gene; Alfacalcidol; Nephrotic syndrome; Rat

肾病综合征是儿科常见疾病之一,大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症和水肿是其主要临床表现。目前研究证实,蛋白尿的形成与足细胞的足突之间裂孔隔膜的改变密切相关。肾母细胞瘤抑制基因(Wilms' tumor 1 gene, WT_1)是近年来发现的一种与泌尿生殖系统发育有密切关系的基因^[1], WT_1 在肾脏发育的各个阶段都有表达,但出生后仅表达在足细胞中,并对足细胞功能的维持起重要作用^[2]。 α 骨化醇(Alfacalcidol, αD_3)口服后经肝脏代谢,迅速转变为 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 除了在体内调节钙磷代谢的平衡外,还是许多细胞如白血病细胞和来自实体肿瘤细胞的诱导剂,而这些作用绝大多数是通过 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的细胞核受体即VDR(一种具有化学活性的转录因子)来起作用的^[3]。有研究发现VDR是 WT_1 下游的一个靶基因^[4]。 αD_3 是否能调节 WT_1 的表达目前尚不明确。本研究通过阿霉素肾病大鼠模型,动态观察 αD_3 对足细胞 WT_1 表达及其对肾病大鼠蛋白尿的影响,探讨蛋白尿形成的部分可能机制,为 αD_3 治疗儿童肾病综合征提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 肾病大鼠模型制备

120只6周龄、体重180~220 g的雄性SD大鼠(中国科学院上海实验动物中心提供)随机分为5组:正常对照组、肾病组、激素组、 αD_3 组和联合组(激素+ αD_3),每组24只。实验第1天,对照组尾静

脉1次注射0.5 ml生理盐水,其它各组尾静脉1次性注射阿霉素(意大利Farmitalia公司)5 mg/kg制备阿霉素肾病模型。2周后,激素组大鼠每天灌服泼尼松12 mg/kg, αD_3 组灌服 αD_3 (以色列梯瓦制药有限公司,批号930247)0.03 $\mu\text{g/kg}$,联合组灌服泼尼松12 mg/kg和 αD_3 0.03 $\mu\text{g/kg}$,对照组和肾病组分别灌服等量蒸馏水,共给药4周。于实验第2周、4周、6周末各组随机抽取8只大鼠,置代谢笼收集24 h尿标本后处死,腹主动脉采血(分离血清置-20℃冰箱保存),分离肾组织(置-70℃冰箱保存)以备待检。

1.2 24 h尿蛋白含量检测

采用传统的考马斯亮蓝法检测各组大鼠24 h尿蛋白含量。

1.3 肾组织病理学检测及病理积分的评定^[5~7]

肾组织常规石蜡固定、包埋,切片,厚约2~3 μm ,分别予以HE、PAS、PASM及Masson染色,光镜下观察肾脏病理改变。肾小球病理损害程度的评定:①系膜细胞增生:按每个系膜区系膜细胞数目小于3个,3个,4个及大于5个分别计0分,1分,2分,3分。②系膜基质增宽程度与毛细血管腔直径及开放程度相比按毛细血管腔开放良好,基质未见明显增生;基质增生略小于毛细血管腔直径且呈节段性分布;基质增生略大于毛细血管腔直径且呈弥漫性分布,毛细血管腔呈节段性开放不良;基质增生呈弥漫性分布,大部分毛细血管腔开放不良分别计0分,1分,2分,3分。③硬化。④基底膜的改变情况。⑤囊壁粘连情况。③、④、⑤按病变范围未见明显改

变、病变范围小于30%、病变范围在30%~60%之间、病变范围大于60%分别计0分,1分,2分,3分。

1.4 肾组织 WT₁ 表达的检测

用间接免疫荧光法检测肾组织 WT₁ 的表达。实验中所用一抗为山羊抗鼠 WT₁ 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),二抗为 FITC 标记的兔抗山羊多克隆抗体(北京中山生物技术有限公司)。肾组织冰冻切片(厚度为2~3 μm)以丙酮处理30 min后,晾干,放4℃冰箱过夜保存。0.5%纯甲醇室温浸泡30 min灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗3次。将切片浸入0.01 M枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微波炉加热下沸腾后断电,间隔5~10 min后反复1~2次,冷却后0.01 MPBS洗1~2次。正常山羊血清封闭20 min,再依次加用一抗(37℃,3 h)及二抗孵育(37℃,1 h)。在Bio-rad 1024型激光扫描共聚焦显微镜(美国伯乐公司)下采集图像输入计算机。激光扫描共聚焦显微镜 FITC 的激发波长为488 nm,发射波长为530

nm,观察物镜为 pLAPO CS40/0.85。用 CMIAS 多功能真彩病理图像分析系统(北京航空航天大学)测定肾组织 WT₁ 的平均光密度值。

1.5 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理。多组样本间均数比较采用单因素方差分析。相关性采用直线相关分析。

2 结果

2.1 24 h 尿蛋白含量

第2周末,与对照组相比,肾病组、激素组、αD₃ 组及联合组大鼠24 h尿蛋白明显增高($P < 0.01$)。4周及6周末,肾病组大鼠尿蛋白仍逐渐上升,激素组、αD₃ 组及联合组尿蛋白依次出现下降趋势,以联合组尿蛋白下降更明显,与同时间点肾病组比较其差异均有显著性($P < 0.01$)。见表1。

表1 各组大鼠不同实验时间24 h尿蛋白含量

Table 1 24-hr urinary protein contents in 5 groups at various time ($\bar{x} \pm s$, mg)

组别	例数	第2周	第4周	第6周
对照组	24	11.07±2.02	20.12±4.37	26.78±3.66
肾病组	24	369.61±25.43 ^a	421.32±65.16 ^a	514.99±20.72 ^a
激素组	24	389.42±24.78 ^a	354.87±33.04 ^{a,b}	313.70±20.62 ^{a,b}
αD ₃ 组	24	376.26±20.05 ^a	336.15±37.42 ^{a,b}	311.71±27.09 ^{a,b}
联合组	24	377.98±22.61 ^a	299.85±24.76 ^{a,b,c}	238.85±26.65 ^{a,b,c,d}

注: a 与对照组比较 $P < 0.01$; b 与肾病组比较 $P < 0.01$; c 与激素组比较 $P < 0.01$; d 与 αD₃ 组比较 $P < 0.01$

2.2 肾组织 WT₁ 的表达

WT₁ 表达仅见于肾小球,肾小管几乎无表达。2周末,与对照组相比,肾病组、激素组、αD₃ 组及联合组 WT₁ 的表达都明显减少,其差异有显著性意义

($P < 0.01$);第4周及第6周末,肾病组 WT₁ 表达进一步减弱,激素组、αD₃ 组及联合组 WT₁ 的表达增加以 αD₃ 组增加明显,与肾病组同时间点比较,差异有显著性($P < 0.01$)。见表2。

表2 各组大鼠不同实验时间肾组织 WT₁ 平均光密度值

Table 2 Expression of renal WT₁ in 5 groups at various time ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	第2周	第4周	第6周
对照组	24	68.19±1.28	72.73±2.22	71.35±1.67
肾病组	24	25.66±1.43 ^a	13.66±1.32 ^a	8.28±0.81 ^a
激素组	24	26.27±1.19 ^a	26.23±1.49 ^{a,b}	27.98±1.05 ^{a,b}
αD ₃ 组	24	25.97±1.21 ^a	39.38±2.18 ^{a,b,c,d}	44.81±2.74 ^{a,b,c,d}
联合组	24	26.37±1.12 ^a	30.45±1.83 ^{a,b}	31.69±1.82 ^{a,b}

注: a 与对照组比较 $P < 0.01$; b 与肾病组比较 $P < 0.01$; c 与激素组比较 $P < 0.01$; d 与联合组比较 $P < 0.01$

2.3 肾组织病理改变

2周末肾病组、激素组、αD₃ 组和联合组的病理

积分高于对照组,其差异均有显著性($P < 0.01$);第4周及第6周末,肾病组大鼠病理积分逐渐增高;

第4周末,激素组、 α D₃组、联合组病理积分较第2周升高,但低于肾病组;第6周末下降,以 α D₃组更明显;第4周及第6周末, α D₃组病理积分明显低于肾病组,其差异有显著性($P < 0.01$)。见表3。

表3 各组大鼠不同实验时间肾脏病理积分

Table 3 Scores of renal pathologic lesions
in 5 groups at various time ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	第2周	第4周	第6周
对照组	24	0.58±0.16	0.83±0.25	1.08±0.38
肾病组	24	3.68±0.60 ^a	7.01±0.74 ^a	8.82±0.65 ^a
激素组	24	3.37±0.63 ^a	6.02±0.75 ^a	5.35±0.58 ^a
α D ₃ 组	24	3.65±0.47 ^a	4.92±0.63 ^{a,b}	3.78±0.50 ^{a,b}
联合组	24	3.60±0.61 ^a	5.83±0.83 ^a	4.43±0.73 ^a

注: a 与对照组比较 $P < 0.01$; b 与肾病组比较 $P < 0.01$

2.4 尿蛋白与 WT₁ 相关分析

WT₁ 与尿蛋白呈负相关。第2周、第4周、第6周相关系数分别为 -0.994、-0.947、-0.930, 均 $P < 0.01$ 。

3 讨论

肾病综合征蛋白尿的形成与肾小球滤过屏障裂孔隔膜的结构和功能的完整密切相关。近年来研究已发现多个由足细胞表达、分布于裂孔隔膜或足细胞上的蛋白分子,如 nephrin, podocin, alpha-actinin-4, Pax2, WT₁, Pod1 (capsulin, epicardin), Kreisler (maf-1), lmx1b, and mf2 等^[8,9]。有文献报道^[7]编码 nephrin 分子的基因 NPHS1 突变将导致芬兰型先天性肾病综合征,而编码 podocin 或 alpha-actinin-4 分子的基因突变引起先天性节段性局灶性肾小球硬化。由此可见,足细胞及其裂孔隔膜是维系正常肾小球滤过屏障的关键,而与足细胞及其裂孔隔膜相关的一些分子的基因突变,可能是导致肾病综合征大量蛋白尿的直接原因。WT₁ 最初定义为 Wilms 肿瘤抑制基因,很快发现 WT₁ 不仅在肿瘤的发生而且在肾脏、性腺的发育及足细胞功能的维持方面起了重要的作用。Guo^[10]已经证实 WT₁ 是足细胞功能的关键的调节因子,它的表达减少将导致新月体肾小球肾炎和肾小球的硬化。另有研究报道^[11],在 FSGS(局灶节段性肾小球硬化)时受损的足细胞 WT₁ 的表达减弱。本研究发现肾病组大鼠

肾组织 WT₁ 表达随时间延长而下降,而 24 h 尿蛋白含量随时间延长而升高,WT₁ 与蛋白尿呈负相关,提示 WT₁ 可能参与了肾病综合征蛋白尿的形成。肾病大鼠分别给予激素、 α D₃ 及激素和 α D₃ 干预2周及4周后,相应各组大鼠 24 h 尿蛋白含量低于同时间点肾病组,肾组织 WT₁ 表达高于同时间点肾病组,提示激素和 α D₃ 均能够降低肾病大鼠尿蛋白的排泄,使肾组织 WT₁ 的表达升高,其中 α D₃ 组肾组织 WT₁ 表达明显升高,同时观察到经 α D₃ 干预2~4周后, α D₃ 组大鼠肾组织病理积分明显低于肾病组,提示 α D₃ 能上调足细胞 WT₁ 的表达,维持足细胞的功能,减少尿蛋白的排出。

[参 考 文 献]

[1] Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus [J]. Cell, 1990, 60(3): 509-520.

[2] Menke AL, Schedl A. WT₁ and glomerular function [J]. Semin Cell Dev Biol, 2003, 14(4): 233-240.

[3] Maurer U, Jehan F, Englert C, Hubinger G, Weidmann E, Deluca HF, et al. The Wilms' tumor gene product (WT₁) modulates the response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by induction of the vitamin D receptor [J]. J Biol Chem, 2001, 276(6): 3727-3732.

[4] Lee TH, Pelletier J. Functional characterization of WT₁ binding sites within the human vitamin D receptor gene promoter [J]. Physiol Genomics, 2001, 7(2): 187-200.

[5] 何小解,易著文,何庆南. 儿茶素对肾病大鼠血浆肾皮质内皮素、一氧化氮表达影响的研究 [J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(9): 550-554.

[6] 吴小川,易著文,何小解. 小儿紫癜性肾炎肾病病理定量分析 [J]. 湖南医科大学学报, 2000, 25(4): 403-405.

[7] 李志辉,易著文,何小解. 激素耐药型和激素依赖型肾病患儿肾脏病理计量分析 [J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(8): 449-452.

[8] Quaggin SE. Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation [J]. Semin Cell Dev Biol, 2003, 14(4): 233-240.

[9] Tesar V, Zima T, Kalousova M. New findings on the pathogenesis of nephrotic syndrome [J]. Sb Lek, 2002, 103(3): 379-395.

[10] Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison D, Hammes A. WT₁ is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis [J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(6): 651-659.

[11] Ohtaka A, Ootaka T, Sato H. Significance of early phenotypic change of glomerular podocytes detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis [J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(3): 475.

(本文编辑:吉耕中)