

α -actinin-4 在糖尿病大鼠的表达及贝那普利对其的干预作用

殷玉红, 李 英

作者单位: 071000 河北, 保定市第一中心医院肾内科(殷玉红); 河北医科大学第三医院(李 英)

作者简介: 殷玉红(1971-), 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 肾小球疾病, E-mail: yinyuhong3@126.com。

【摘要】 目的 探讨糖尿病肾病发展过程中 α -actinin-4 的表达变化及贝那普利对其的干预作用。方法 建立 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型, 贝那普利对其干预, 应用免疫组化及 RT-PCR 方法观察在糖尿病肾病发展过程中 α -actinin-4 的蛋白及 mRNA 表达变化。结果 8 周时, 糖尿病组染色强度较正常组明显增高 ($P < 0.01$), 12 周时变化更为明显 ($P < 0.01$)。 α -actinin-4 的 mRNA 的表达水平在各时间点与组化结果相同。贝那普利干预组 8 周时 α -actinin-4 表达较糖尿病组明显降低 ($P < 0.05$), 而在 12 周时其表达仍较糖尿病组低, 但无统计学意义。结论 α -actinin-4 在糖尿病肾病发展过程中表达增高, 贝那普利能下调其表达。

【关键词】 α -actinin-4; 蛋白尿

【中图分类号】 R 587.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2009)01-0015-03

The expression of α -actinin-4 in diabetic rats and the effect of benazepril on α -actinin-4 expression YIN Yuhong, LI Ying. The First Centre Hospital in Baoding, Hebei 071000, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the change of α -actinin-4 expression and the effect of benazepril on α -actinin-4 expression. **Methods** STZ-induced diabetic rats were established, benazepril was given to it, immunohistochemical and RT-PCR were employed to study the change of α -actinin-4 protein and mRNA. **Results** At week 8, compared with normal group, the expression of α -actinin-4 protein in diabetic group increased dramatically ($P < 0.01$); At week 12, the expression still raised ($P < 0.01$). The expression of α -actinin-4 mRNA was similar to immunohistochemical staining. At week 8, the expression of α -actinin-4 protein in benazepril group decreased when compared with diabetic group ($P < 0.05$); At week 12, it can also decreased, but had no statistical significance. **Conclusion** The expression of α -actinin-4 increased in diabetic nephropathy and benazepril can normalize it.

【Key words】 α -actinin-4; Proteinuria

糖尿病在我国有较高的发病率, 糖尿病肾病是构成终末期肾衰竭的主要危险因素。糖尿病肾病的早期改变光镜下仅见肾小球扩张, 电镜下则可见裂孔隔膜消失及足突融合。 α -actinin-4 特异表达于肾小球足细胞, 具有交联肌动蛋白微丝的功能, 可以将松散的肌动蛋白交联成具有收缩能力的纤维束, 被认为在保持细胞结构中发挥关键作用^[1]。有研究发现编码 α -actinin-4 的基因 ACTN4 突变可导致局灶节段性肾小球硬化的发生, 足细胞 α -actinin-4 表达的改变与足突融合, 蛋白尿的产生密切相关。本实验拟在探讨糖尿病肾病发生、发展过程中 α -actinin-4

表达变化以及贝那普利对其的干预作用, 进一步了解贝那普利的肾保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 42 只, 体重 170~220 g (河北医科大学实验动物研究所提供), 随机分成两组。实验组 28 只, 采用 0.1 mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液 (pH 4.2) 配制的 2% 链脲佐菌素 (STZ) 溶液, 以 60 mg/kg 单次腹腔注射; 72 小时后尾静脉采血测血糖, 以血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为糖尿病成模标准。对照组 14 只, 腹腔注射同体积的枸橼酸钠缓冲液作为对照。实验组随机分为糖尿

病组和贝那普利干预组各 14 只,贝那普利干预组给予贝那普利 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,每日 1 次,正常对照组与糖尿病组仅给予等量自来水灌胃,每日 1 次。所有动物自由摄取标准饮食和水,不给予降糖药物。于成模 8 周、12 周处死实验组及对照组各 6 只动物获取肾脏标本,同时取血测血糖、血肌酐,处死前 24 小时禁食水,代谢笼留取 24 小时尿, -20°C 冰箱保存测尿蛋白、尿肌酐,计算肌酐清除率,结果用体重校正。所取肾脏皮质标本分为 3 份,1 份以 3% 戊二醛固定用于电镜检查,1 份以 10% 甲醛固定制成蜡块,用于做免疫组化及 PAS 染色,其余标本存于 -80°C 冰箱保存用作 PCR。

1.2 实验方法

1.2.1 生化指标测定 应用日立 7170A 型全自动生化分析仪分析。

1.2.2 免疫组化 石蜡切片脱蜡水化后,3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,微波热处理(98°C , 10 min)修复抗原,正常小牛血清封闭非特异性抗原,分别加入兔抗大鼠 α -actinin-4 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 1:100), 4°C 孵育过夜。加入生物素化二抗,室温下孵育 30 min,滴加 DAB 显色液,苏木素复染,常规脱水、透明、封片。PBS 代替一抗,做阴性对照。棕褐色为阳性着色。应用病理图像分析软件做半定量分析,每个切片随机选取 10 个肾小球(200 倍),测量光密度。

1.2.3 电镜 取肾皮质组织切成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1$

mm 小块,用 3% 戊二醛固定,常规透射电镜制样,超薄切片,透射电镜观察。

1.2.4 RT-PCR 采用 Trizol 试剂提取总 RNA,用紫外分光光度仪检测含量, RNA 的吸光度(A)260 nm/280 nm 比值均在 1.8~2.0。分装后,置于 -80°C 冰箱保存。10 μg 总 RNA 以 Random 9mers 为反转录引物合成 cDNA。以 cDNA 为模板, Taq DNA 多聚酶催化下,进行 PCR 扩增。反应条件为:PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳,紫外灯下拍照,用凝胶成像系统进行分析,以与 β -actin 吸光度的比值表示其相对含量。 α -actinin-4 引物:上游引物为 5'-GCT-GAAGTTCAACCGGATCAT-3',下游引物为 5'-GCTCGCTCCGAAGTTCTTC-3',产物 187bp。 β -actin 引物:上游引物为 5'-AGCCATGTACGT-TAGCCATCC-3',下游引物为 5'-CTCTCAGCT-GTGGTGGTGAA-3',产物 228bp。

1.3 统计学分析 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS9.0 统计软件处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生化指标的变化 8 周、12 周时糖尿病组和贝那普利干预组血糖均明显增高($P < 0.01$)。肾重、24 小时尿蛋白和肌酐清除率糖尿病组和贝那普利干预组明显高于正常组($P < 0.01$),贝那普利干预组较糖尿病组低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 三组生化指标的变化

组别	时间(W)	血糖(mmol/L)	尿蛋白(g/L)	肌酐清除率(ml/min)	肾重(g)
正常组	8	6.11 ± 0.2	13.8 ± 1.7	2.84 ± 1.12	3.98 ± 0.42
	12	6.21 ± 0.2	23.41 ± 7.4	2.92 ± 0.99	4.18 ± 0.42
糖尿病组	8	$28.3 \pm 5.65^{*}$	$276 \pm 71.2^{*}$	$5.87 \pm 0.2^{*}$	$6.96 \pm 0.3^{*}$
	12	$26.78 \pm 6.0^{*}$	$320 \pm 64.80^{*}$	$5.95 \pm 0.21^{*}$	$7.07 \pm 0.43^{*}$
贝那普利组	8	$25.6 \pm 6.87^{\Delta\#}$	$136 \pm 12.11^{\Delta\#}$	$4.28 \pm 0.3^{\Delta\#}$	$6.09 \pm 0.4^{\Delta\#}$
	12	$26.77 \pm 6.03^{\Delta\#}$	$206 \pm 70.89^{\Delta\#}$	$4.79 \pm 0.3^{\Delta\#}$	$6.21 \pm 0.4^{\Delta\#}$

注:在同一时间内,糖尿病组与正常组比较 $^{*}P < 0.01$;贝那普利组与正常组比较 $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\#}P < 0.01$;糖尿病组与贝那普利组比较 $^{\#}P < 0.05$

2.2 病理组织学改变

2.2.1 光镜检查 PAS 染色的光镜切片显示糖尿病组肾小球直径增大,PAS 红染区明显增宽,12 周时变化较 8 周时为重,正常组则无上述变化,贝那普利组与糖尿病组变化较轻,与正常组比较则有轻度系膜扩张,系膜基质轻度增生。

2.2.2 电镜检查 8 周时糖尿病组肾小球基底膜明显不规则增厚,部分裂孔隔膜消失、足突融合,系膜区增宽,细胞外基质增多,毛细血管部分内皮细胞窗孔结构消失,12 周时变化更为明显。贝那普利组

变化较糖尿病组明显减轻,正常组则无上述变化。

2.3 肾皮质 α -actinin-4 蛋白表达 免疫组化染色显示正常组大鼠肾组织 α -actinin-4 为沿肾小球毛细血管祥均匀的点线状分布。8 周时,糖尿病组 α -actinin-4 染色强度较正常组明显增高($P < 0.01$),12 周时变化更为明显($P < 0.01$),贝那普利有改善其变化的作用。8 周时贝那普利对 α -actinin-4 表达的改善具有统计学意义($P < 0.05$),12 周时对 α -actinin-4 表达的改善则无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 肾皮质 α -actinin-4 mRNA 的表达 实验 8 周时与正常组比较,糖尿病组 α -actinin-4 mRNA 表达明显增高($P<0.01$),贝那普利改善其变化($P<0.05$)。12 周时糖尿病组 α -actinin-4 mRNA 表达进一步降低($P<0.01$),贝那普利虽能改善其表达,却无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 免疫组化显示 α -actinin-4 的光密度变化及 α -actinin-4 mRNA/ β -actin mRNA 的吸光度比值

组别	时间(W)	α -actinin-4	α -actinin-4 mRNA/ β -actin mRNA
正常组	8	9.40 $\pm$ 4.35	0.59 $\pm$ 0.05
	12	11.62 $\pm$ 6.97	0.60 $\pm$ 0.03
糖尿病组	8	26.01 $\pm$ 8.18*	0.81 $\pm$ 0.05*
	12	28.37 $\pm$ 12.65*	0.83 $\pm$ 0.01*
贝那普利组	8	18.27 $\pm$ 7.48 Δ	0.72 $\pm$ 0.03 Δ
	12	24.02 $\pm$ 13.37 Δ *	0.77 $\pm$ 0.03 Δ *

注:各组观察数均为 6 份。在同一时间内,糖尿病组与正常组比较,* $P<0.01$;贝那普利组与正常组比较, Δ $P<0.05$;糖尿病组与贝那普利组比较, Δ $P<0.05$,* $P>0.05$

3 讨论

3.1 糖尿病肾病是导致终末期肾衰竭的危险因素,以往对糖尿病肾病的研究主要集中于系膜区的扩张及基底膜的增厚。但最近的研究发现足细胞的损伤在糖尿病肾病的发展过程中起重要作用。已有实验证实了在糖尿病肾病发展过程中肾小球足细胞数目及密度减少^[2,3],并且在尿液中检测到脱落的足细胞^[4],肾小球足细胞数目及密度与蛋白尿的严重程度呈负相关^[2,3]。

3.2 足细胞脱落发生在蛋白尿进展时,而在蛋白尿发生之前就存在足细胞损伤—足突融合。应用透射电镜发现足突融合时,胞质内微丝聚集成斑块状^[5]。 α -actinin-4 特异表达于肾小球足细胞,具有交联肌动蛋白微丝的功能,可以将松散的肌动蛋白交联成具有收缩能力的纤维束,被认为在保持细胞结构中发挥关键作用^[1]。编码 α -actinin-4 的基因 ACTN4 突变可导致遗传性肾小球硬化的发展。Smoyer 等发现,注射氨基核苷嘌呤霉素(PAN)后大鼠 α -actinin-4 蛋白在 PAN 注射后 1 天表达水平即增高,明显早于足突融合及蛋白尿的发生,提示 α -actinin-4 表达改变可能是造成足突融合以致发生蛋白尿的原因^[6]。我们在糖尿病大鼠 8 周时透射电镜下观察即已发现足突融合,同时有 α -actinin-4 表达增加及尿蛋白的出现,未能观察到在足突融合及尿蛋白出现前 α -actinin-4 表达情况,故很难判断 α -actinin-4 表达改变是足突融合的原因还是足突融合后的适应性的结果,这一点有待于进一步观察。

3.3 8 周时 α -actinin-4 表达水平较对照组明显增加,尿蛋白也增加,随着病程进展 12 周时 α -actinin-4 表达及尿蛋白水平进一步增加, α -actinin-4 表达与尿蛋白呈正相关关系,提示 α -actinin-4 表达水平的增加可能是造成肾脏损伤,出现尿蛋白的原因。

3.4 血管紧张素转化酶抑制剂具有肾保护作用,但其肾保护机理尚不清楚。在本实验中应用贝那普利对糖尿病大鼠进行干预,观察其对 α -actinin-4 的调节作用。结果发现 8 周时干预组较糖尿病组 α -actinin-4 表达下降,同时尿蛋白量也较糖尿病组减少,提示血管紧张素 II 在糖尿病肾病发病中的作用以及血管紧张素转化酶抑制剂类药物可能通过调整足细胞细胞骨架分子的表达而起到肾脏保护作用。而在 12 周时,贝那普利对 α -actinin-4 的变化仍有干预作用,却未达到统计学意义,这可能提示随着糖尿病肾病的进展, α -actinin-4 的变化程度超过了这个剂量的贝那普利的干预作用,有学者报道贝那普利的肾保护作用与其剂量呈正相关,增加贝那普利剂量是否对 α -actinin-4 的干预作用达到统计学意义尚有待于进一步探讨。贝那普利 12 周时仍能有效减少尿蛋白排泄,提示其可能通过其他途径达到肾保护作用。

总之,本实验应用 STZ 大鼠模型研究了在糖尿病肾病发展过程中 α -actinin-4 表达增加,同时有蛋白尿的加重。贝那普利对其变化有调节作用。血管紧张素转化酶抑制剂可能通过调节 α -actinin-4 的表达而起到肾保护作用。

参考文献

- 1 Michaud JL, Chaisson KM, Parks RJ, et al. FSGS-associated alpha-actinin-4 (K256E) impairs cytoskeletal dynamics in podocytes[J]. Kidney Int, 2006, 70: 1054-1061.
- 2 Dalla Vestra M, Masiero A, Roiter AM, et al. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2003, 52: 1031-1035.
- 3 White KE, Bilous RW. Estimation of podocyte number: a comparison of methods[J]. Kidney Int, 2004, 66: 663-667.
- 4 张敏,林善琰. 氯沙坦对糖尿病肾病患者尿足细胞排泄的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 2: 72-75.
- 5 李月红,黄海长,邹万忠,等. 局灶节段肾小球硬化症大鼠尿足细胞动态检测及意义[J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 2: 72-75.
- 6 Smoyer WE, Munde LP, Gupta A, et al. Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephritic syndrome[J]. Am J Physiol, 1997, 273(1Pt2): F150-F157.

[收稿日期 2008-08-10][本文编辑 韦辉德 黄晓红]