

## 锰苯甲酸卟啉在嘌呤霉素氨基核苷诱导的大鼠肾脏病模型中的作用

宋瑞花, 白 咪, 张园园, 林加娟, 丁桂霞, 黄松明, 张爱华\*

(南京医科大学附属儿童医院肾脏科, 江苏 南京 210008)

**[摘要]** **目的:**探讨超氧化物歧化酶类似物锰苯甲酸卟啉(MnTBAP)在嘌呤霉素氨基核苷(puromycin aminonucleoside, PAN)诱导的大鼠肾脏病模型中的作用。**方法:**24 只雄性 SD 大鼠按照每组 8 只随机分为正常对照组、模型组(一次性尾静脉注射 150 mg/kg PAN 建立 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型)、MnTBAP 治疗组[造模大鼠于造模当天开始腹腔注射 MnTBAP 10 mg/(kg·d), 共给药 14 d]。收集大鼠 24 h 尿液, Bradford 法检测 24 h 尿蛋白总量;应用透射电镜观察肾小球足细胞的超微结构;实时荧光定量 PCR 法在 mRNA 水平检测足细胞裂孔隔膜蛋白 Nephrin 和 Podocin 的表达量;Western blot 在蛋白质水平检测 Nephrin 和 Podocin 的表达量。**结果:**①与正常对照组相比,模型组大鼠的 24 h 尿蛋白总量明显升高( $P < 0.01$ ),肾脏指数升高( $P < 0.01$ );MnTBAP 治疗后大鼠 24 h 尿蛋白总量较模型组下降( $P < 0.01$ ),肾脏指数较模型组下降( $P < 0.01$ );②透射电镜观察结果表明,模型组大鼠的肾小球足细胞足突出现广泛融合甚至消失,MnTBAP 治疗后这种现象得以改善;③实时荧光定量 PCR 结果显示,模型组大鼠肾皮质 Nephrin 和 Podocin 的 mRNA 表达较正常对照组降低( $P < 0.01$ ),MnTBAP 治疗组 Nephrin 和 Podocin 的 mRNA 表达较模型组增加( $P < 0.01$ );④Western blot 结果显示,模型组大鼠肾皮质 Nephrin 和 Podocin 蛋白的表达较正常对照组降低( $P < 0.01$ ),MnTBAP 治疗组 Nephrin 和 Podocin 蛋白的表达较模型组增加( $P < 0.01$ )。**结论:**MnTBAP 可以降低 PAN 诱导的肾病大鼠的蛋白尿,并明显减轻足细胞损伤。

**[关键词]** 锰苯甲酸卟啉;嘌呤霉素氨基核苷;足细胞

**[中图分类号]** R692.3+1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)11-1321-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20161108

## Effects of MnTBAP on puromycin aminonucleoside induced nephrotic rats

Song Ruihua, Bai Mi, Zhang Yuanyuan, Lin Jiajuan, Ding Guixia, Huang Songming, Zhang Aihua\*

(Department of Nephrology, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of MnTBAP on puromycin aminonucleoside (PAN)-induced nephrotic rats. **Methods:** A total of 24 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into the following groups ( $n=8$  for each group): the control group, the PAN group (one single dose-150 mg/kg of PAN was injected into rats by tail-vein injection) and the MnTBAP-treated group [on the day with injection of PAN, the rats were treated with a daily intraperitoneal injection of 10 mg/(kg·d) MnTBAP for 14 days]. Twenty-four hours urinary protein excretion was detected by the Bradford protein assay. The ultrastructure of glomerular podocyte was observed by the transmission electron microscope. Nephrin and podocin expression levels were measured by real-time PCR and Western blot. **Results:** ①24 hours urinary protein excretion and the renal index of PAN group were significantly increased compared to those of the control group ( $P < 0.01$ ), while the 24 h urinary protein and renal index of the MnTBAP-treated group was lower than those of the PAN group ( $P < 0.01$ ). ②The transmission electron microscope results showed that glomerular podocyte in the PAN group fused and disappeared widely, but it markedly alleviated after MnTBAP treatment. ③Real-time PCR showed that the expression of nephrin and podocin in the PAN group were reduced in comparison to those of the control group ( $P < 0.01$ ), which was restored by MnTBAP treatment ( $P < 0.01$ ); ④Western blot showed that the expressions of nephrin and podocin in the PAN group were reduced in comparison to those of the control group ( $P < 0.01$ ), which was restored by MnTBAP treatment ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** MnTBAP could decrease urinary protein and podocyte injury in PAN-induced nephrotic rats.

**[Key words]** MnTBAP; puromycin aminonucleoside; podocyte

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(11):1321-1325]

**[基金项目]** 国家 973 项目(2013CB530604)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhaihua@njmu.edu.cn

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)是一种肾小球性疾病,其临床特点是大量蛋白尿(尿蛋白>3.5 g/24 h)、低蛋白血症、高脂血症(高甘油三酯血症和高胆固醇血症)、水肿及脂肪尿<sup>[1]</sup>。原发性肾小球疾病如微小病变型肾病、局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerular sclerosis, FSGS)、膜性肾病,以及全身性疾病如糖尿病、系统性红斑狼疮、淀粉样变性等均可以表现为肾病综合征<sup>[2]</sup>。肾病综合征是儿童常见慢性疾病之一,并且最终可进展为慢性肾脏病或终末期肾病<sup>[3]</sup>。

肾病综合征的治疗依据主要来源于 1967—1974 年儿童肾脏疾病的国际研究报告,该研究表明,微小病变型肾病综合征对糖皮质激素治疗的敏感性和特异性分别是 93.1%和 72.2%。但是随着时间的推移,肾病综合征的各病理类型比例发生了变化,FSGS 所占比例有所上升,而 FSGS 对于糖皮质激素治疗不敏感且更容易进展至肾衰竭。南京医科大学附属儿童医院肾脏科资料显示,2003—2006 年难治性肾病占同期肾活检的 15.01%,而 2007—2011 年已上升至同期肾活检的 24.06%。由此可见,激素耐药已经成为肾病综合征治疗中的棘手问题。

本课题组前期研究表明线粒体功能障碍是足细胞损伤的早期事件,保护线粒体功能可以对足细胞起到保护作用<sup>[4-5]</sup>。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)有抗氧化防御功能,可以清除线粒体内的超氧自由基。锰苯甲酸卟啉(MnTBAP),化学式是  $C_{48}H_{28}ClMnN_4O_8$ ,是 SOD 类似物,也具有清除超氧自由基的作用<sup>[6]</sup>。因此为了研究 MnTBAP 是否对足细胞损伤具有保护作用,本研究采用一次性尾静脉注射嘌呤霉素氨基核苷(puromycin aminonucleoside, PAN)制备大鼠肾脏病模型,并予以 MnTBAP 治疗,观察其作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SD 大鼠(南京医科大学实验动物基地);PAN(Sigma 公司,美国);MnTBAP(Santa Cruz 公司,美国);TRIzol、PrimeScript RT Master Mix(TaKaRa 公司,日本);AceQ qPCR SYBR Green Master Mix(Vzayme 公司,美国);裂孔隔膜蛋白 Nephrin 抗体和 Podocin 抗体(Abcam 公司,美国);山羊抗兔抗体(Santa Cruz 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组及动物模型制备

将 24 只雄性 SD 大鼠(体重 80~100 g)按照随机

分组原则分为 3 组,每组 8 只,组别设置为正常对照组、模型组、MnTBAP 治疗组。正常对照组:尾静脉注射生理盐水;模型组:一次性尾静脉注射 150 mg/kg PAN,建立 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型;MnTBAP 治疗组:先一次性尾静脉注射 150 mg/kg PAN 建立 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型,再于造模当天起(第 0 天)腹腔注射 MnTBAP 10 mg/(kg·d),共给药 14 d(第 13 天最后 1 次给药),第 13 天下午 2:00 将大鼠置于代谢笼中收集 24 h 尿液,于第 14 天下午 2:00 集中处理所有大鼠,留取血清和肾皮质用于后续实验。

#### 1.2.2 大鼠 24 h 尿蛋白定量

Bradford 法检测 24 h 尿蛋白总量。

#### 1.2.3 肾小球足细胞超微结构观察

留取体积约 1 mm<sup>3</sup>的肾皮质,经 2.5%戊二醛溶液固定、1%锇酸后固定、脱水、环氧树脂 618 包埋,超薄切片后醋酸铀-柠檬酸铅染色,TEM-1010 透射电镜下观察。

#### 1.2.4 肾皮质总 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR

冰上称取 10 mg 肾皮质,匀浆,TRIzol 一步法提取总 RNA。应用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,取总 RNA 500 ng 用 PrimeScript RT Master Mix 进行逆转录反应,得到 cDNA,具体实验步骤见说明书。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL,以得到的 cDNA 为模版,用 96 孔板,每个样品设置 3 个复孔,内参基因为 GAPDH。采用 Primer3.0 在线设计实时荧光定量 PCR 引物,遵循跨内含子原则,以避免非特异性及引物二聚体产生,引物序列为:Nephrin 上游 5'-TTCAGACCACACCAACATCC-3',下游 5'-AGCCAGGTTTCCACTCCA-3';Podocin 上游 5'-GTG-AGGAGGGCACGGAAG-3',下游 5'-AGGGAGGCGA-GGACAAGAGTTCCT-3';GAPDH 上游 5'-GTCTTCA-CTACCATGGAGAAGG-3',下游 5'-TCATGGATGAC-CTTGGC-CAG-3',引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

#### 1.2.5 肾皮质蛋白质提取及 Western blot

冰上称取 30 mg 肾皮质,加入 300 μL 增强型 RIPA 裂解液冰上匀浆,后置于冰上孵育 15 min,14 500 r/min 离心 30 min,留取上清,取 2 μL 上清用 BCA 法测蛋白质浓度,剩余上清加入 1/4 体积的 5×SDS 上样缓冲液,煮沸 8 min,于 -80℃ 保存。Western blot 检测蛋白质表达量,采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),配制 5%浓缩胶和 10%分离胶,取 30 μg 蛋白质上样,电泳时浓缩胶恒压 65 V

60 min,分离胶恒压 180 V,电泳至溴酚蓝指示剂至分离胶底部。电泳结束后,湿转至 PVDF 膜,转膜后用 5%的脱脂奶粉溶液封闭 PVDF 膜,摇床上室温封闭 2 h。加入适当比例稀释的一抗,于摇床上室温孵育 1 h,4℃过夜。次日,复温 30 min,TBST 洗 4 次,每次 10 min;辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h;TBST 洗 5 次,每次 10 min;ECL 化学发光法显示结果,凝胶成像系统扫描并定量分析条带的光密度值。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件对图像数据进行统计学分析,所有数据的分析结果均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MnTBAP 对 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型尿蛋白及肾脏指数的影响

造模第 13 天收集大鼠 24 h 尿液,检测发现模型组大鼠 24 h 尿蛋白排泄量约 340 mg,较正常对照组明显升高,而 MnTBAP 治疗后尿蛋白明显降低( $P <$

0.01,图 1A)。处死大鼠后称量大鼠体重及双侧肾脏总重量,模型组肾脏指数较正常对照组升高,MnTBAP 治疗可降低肾脏指数( $P < 0.01$ ,图 1B)。

### 2.2 MnTBAP 对 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型足细胞超微结构的影响

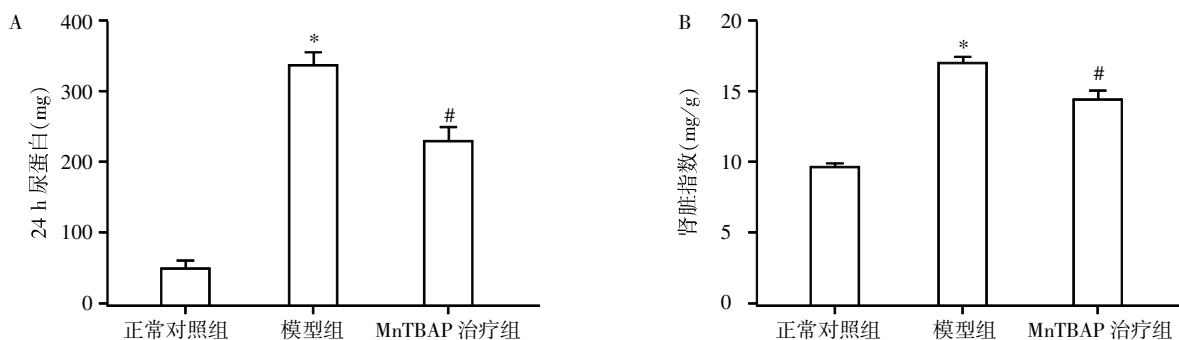
正常对照组大鼠足细胞超微结构正常,模型组大鼠足细胞足突出现广泛融合甚至消失,而 MnTBAP 治疗组大鼠足细胞超微结构较模型组好转(图 2)。

### 2.3 MnTBAP 对 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型足细胞标志性蛋白的影响

实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示,模型组大鼠肾皮质 Nephryn 和 Podocin 的表达量降低至正常对照组的 50%,MnTBAP 治疗后,Nephryn 和 Podocin 的表达量恢复至正常对照组的 85%( $P < 0.01$ ,图 3、4)。

## 3 讨论

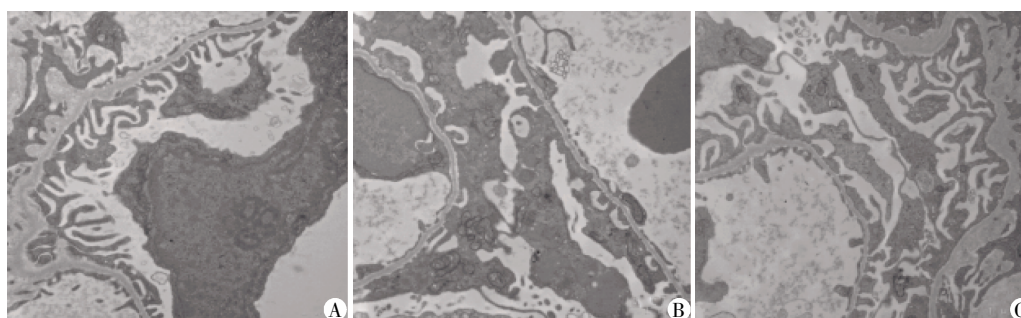
肾病综合征的发病机制尚不明了,就原发性肾病综合征而言,目前认为其致病因素包括免疫、环境、遗传等,其中免疫因素是主要的致病因素,而免疫因素包括体液免疫、细胞免疫和肾脏固有细胞参



A: 24 h 尿蛋白定量; B: 肾脏指数。与对照组相比, \* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.01$  ( $n=8$ )。

图 1 MnTBAP 对 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型尿蛋白及肾脏指数的影响

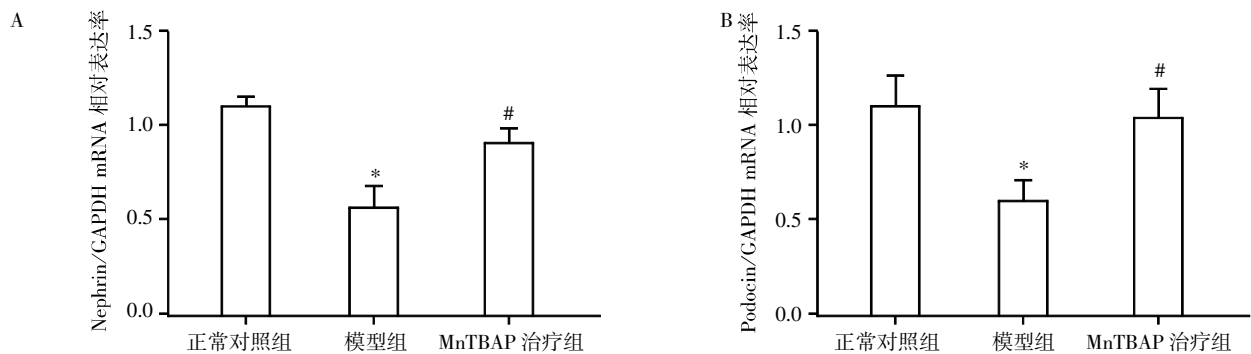
Figure 1 Effect of MnTBAP on urinary protein excretion and the renal index in PAN-induced nephrotic rats



A: 正常对照组; B: 模型组; C: MnTBAP 治疗组。

图 2 MnTBAP 对 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型足细胞超微结构的影响( $\times 20\ 000$ )

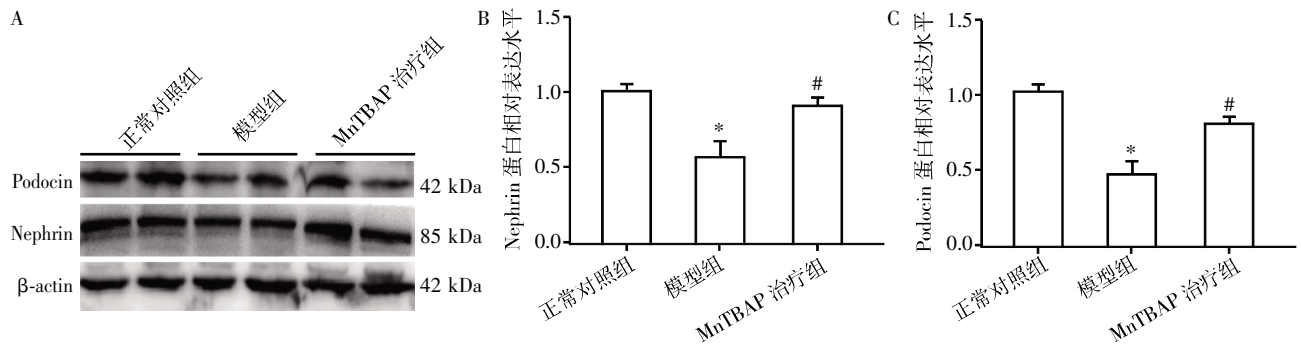
Figure 2 Effect of MnTBAP on ultrastructure glomerular podocyte observed by the transmission electron microscope in PAN-induced nephrotic rats( $\times 20\ 000$ )



A: 定量分析各组 Nephrin mRNA 相对表达水平; B: 定量分析各组 Podocin mRNA 相对表达水平。与正常对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, # $P < 0.01$  ( $n=8$ )。

图 3 MnTBAP 对 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型足细胞标志性蛋白 mRNA 的影响

Figure 3 Effect of MnTBAP on the mRNA expression of nephrin and podocin in PAN-induced nephrotic rats



A: Western blot 检测大鼠肾皮质中 Nephrin 和 Podocin 蛋白的表达; B、C: Nephrin 和 Podocin 蛋白表达的相对定量分析。与正常对照组相比, \* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.01$  ( $n=8$ )。

图 4 MnTBAP 对 PAN 诱导的大鼠肾脏病模型足细胞标志性蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of MnTBAP on the protein expression of nephrin and podocin in PAN-induced nephrotic rats

与的免疫三方面。在临床工作中常见此类患儿反复感染、频繁复发、存在激素耐药等。而激素耐药则是临床治疗中的主要难题,其发病机制复杂。

宏观上,蛋白尿是肾病综合征最初的病理生理改变,且蛋白尿的进展是肾病综合征发展的重要危险因素<sup>[7]</sup>。从微观上,足细胞是肾小球滤过膜的重要组成部分,主要由三部分组成:胞体、主突和足突,一般认为足细胞不可再生且修复能力有限,因此众多研究表明足细胞损伤是肾小球疾病发生和进展的关键因素<sup>[8]</sup>。肾小球滤过屏障由毛细血管内皮细胞、肾小球基底膜及足细胞组成。足细胞位于基底膜的外侧,是防止发生蛋白尿的最后一道屏障,足细胞损伤必然伴随大量蛋白尿<sup>[9]</sup>。研究认为,足细胞基底部的分子、足细胞顶区的分子、足细胞骨架蛋白及裂孔隔膜蛋白(Nephrin、Podocin、CD2AP、ZO-1)的结构和功能改变均会引起蛋白尿<sup>[10-12]</sup>。

除以上机制外,线粒体功能障碍也在肾脏疾病中发挥着重要作用。遗传性线粒体病可导致肾脏疾病,如肾病综合征、肾小管间质疾病、肾小管酸中

毒、范可尼综合征、巴特综合征等;肾脏缺血再灌注损伤中线粒体活性氧的产生及线粒体内钙离子的聚集可能起重要作用;线粒体功能障碍引起的细胞代谢与能量供应异常可导致近端小管转运物质的能力不足,从而引起近端小管的损伤<sup>[13]</sup>。线粒体呼吸链是超氧自由基产生的主要途径,同时也是被超氧自由基损伤的主要靶位点,线粒体的氧自由基损伤是通过两方面:①氧自由基可以直接损伤生物膜结构,与膜脂分子形成脂质过氧化物,损伤膜结构;②氧自由基促使过度活跃的氧化磷酸化产生高线粒体膜电位,产生过多活性氧,从而导致线粒体结构和功能损伤,诱导细胞死亡信号,最终导致组织损伤<sup>[14]</sup>。

PAN 诱导的大鼠肾脏病模型是研究肾病综合征常用的动物模型,对 SD 大鼠尾静脉注射 PAN 后,大鼠会出现大量蛋白尿和足细胞损伤<sup>[15]</sup>。本研究通过检测各组大鼠的 24 h 尿蛋白量可以验证模型制备成功与否,且透射电镜下足细胞也证实出现了损伤,Nephrin 和 Podocin 在 mRNA 及蛋白水平都

出现了明显的下降。对造模大鼠给予 MnTBAP 治疗后,24 h 尿蛋白定量有所下降,电镜下足细胞损伤明显减轻,Nephrin 和 Podocin 的表达也恢复到正常的 85%左右,可见 MnTBAP 确实对模型大鼠起到了很好的保护作用。结合前期研究,认为 MnTBAP 可能通过清除线粒体内的超氧自由基从而保护线粒体功能,进而保护足细胞功能。由此可见,MnTBAP 有望应用于肾病综合征的治疗。

#### [参考文献]

- [1] Chugh SS, Clement LC, Macé C. New insights into human minimal change disease: lessons from animal models [J]. *Am J Kidney Dis*, 2012, 59(2): 284-292
- [2] Macé C, Chugh SS. Nephrotic syndrome: components, connections, and angiopoietin-like 4-related therapeutics [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(11): 2393-2398
- [3] Hussain N, Zello JA, Vasilevska-Ristovska J, et al. The rationale and design of insight into nephrotic syndrome: investigating genes, health and therapeutics (INSIGHT): a prospective cohort study of childhood nephrotic syndrome [J]. *BMC Nephrol*, 2013, 14: 25
- [4] Su M, Dhooonun AR, Yuan Y, et al. Mitochondrial dysfunction is an early event in aldosterone-induced podocyte injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(4): 520-531
- [5] 程 珊, 张爱华. SRT1720 对实验性肾病大鼠足细胞的保护作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013, 33(6): 736-738
- [6] Zhou Q, Gensch C, Keller C, et al. MnTBAP stimulates angiogenic functions in endothelial cells through mitofusin-1 [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 72: 163-171
- [7] Clement LC, Macé C, Avila-Casado C, et al. Circulating angiopoietin-like 4 links proteinuria with hypertriglyceridemia in nephrotic syndrome [J]. *Nat Med*, 2014, 20(1): 37-46
- [8] Akchurin O, Reidy KJ. Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: impact on podocyte pathobiology [J]. *Pediatr Nephrol*, 2015, 30(2): 221-233
- [9] 王玉洁,曹 灵,孙兴旺. 足细胞与蛋白尿发病机制的研究进展[J]. *山东医药*, 2012, 52(19): 90-92
- [10] Dessapt C, Baradez MO, Hayward A, et al. Mechanical forces and TGFbeta1 reduce podocyte adhesion through alpha3beta1 integrin downregulation [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(9): 2645-2655
- [11] Ferrandi M, Cusi D, Molinari I, et al. Alpha-and beta-Adducin polymorphisms affect podocyte proteins and proteinuria in rodents and decline of renal function in human IgA nephropathy [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2010, 88(2): 203-217
- [12] Miao J, Fan Q, Cui Q, et al. Newly identified cytoskeletal components are associated with dynamic changes of podocyte foot processes [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(11): 3297-3305
- [13] 袁杨刚,丁桂霞,张爱华. 线粒体功能障碍与肾脏疾病 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2012, 28(1): 75-77
- [14] Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, et al. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(1): 9-23
- [15] Eddy AA. Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1994, 5(6): 1273-1287

[收稿日期] 2016-03-17