论著

文章编号:1000-5404(2005)13-1364-03

DARPP-32在小鼠肾脏中的表达分布

赵 华,葛 萍,王建平,温海鹰,李恒进 (解放军总医院皮肤科,北京 100853)

提 要:目的 研究DARPP-32在小鼠肾脏组织的表达和分布。**方法** 免疫印记和免疫组化方法检测DARPP-32在小鼠肾脏组织的表达和分布。**结果** 在小鼠组织中,抗DARPP-32多克隆抗体可检测到32×10^3蛋白的表达;DARPP-32染色阳性细胞位于髓质远曲小管、皮质层近曲小管及髓放射区集合管。**结论** DARPP-32很可能是多巴胺调节肾脏钠离子重吸收的一个重要中间环节。

关键词:DARPP-32;肾脏;钠离子
中图法分类号:R322.61;R341;R345.54 **文献标识码**:A

Localization of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein in mouse kidney

ZHAO Hua, GE Ping, WANG Jian-ping, WEN Hai-ying, LI Heng-jin (Department of Dermatology, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and localization of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 000 (DARPP-32) in mouse kidney tissue. **Methods** The cellular localization of DARPP-32 in mouse kidney tissue was detected by immunoblot and immunohistochemistry. **Results** DARPP-32-like immunoreactivity was detected in the medullary thick ascending limb of the loop of Henle, the cortical proximal convoluted tubule, and collecting ducts in medullary rays. The renal tubules were enriched of Na^+, K^+-ATPase for sodium reabsorption. **Conclusion** The participation of DARPP-32 is a likely crucial step of the signal-transduction pathway of dopamine regulation on sodium reabsorption in renal tubule cells.

Key words: DARPP-32; kidney; sodium ion

蛋白磷酸酶(protein phosphatase 1, PP1)是主要的磷酸酶之一,参与调控体内许多重要生理、病理过程[1]。细胞内存在多种调控PP1的蛋白,DARPP-32 (dopamine and camp-regulated phosphoprotein of Mr32 000)是其中一个抑制蛋白。对DARPP-32的研究既往主要集中于中枢神经系统[2,3];以下实验研究DARPP-32在正常小鼠肾脏中的表达分布,为进一步解释DARPP-32在泌尿系统功能调节中的作用提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2月龄雄性C57BL/6J小鼠4只,体质量24~28 g(由NIH动物所提供)。静脉推注苯巴比妥(100 mg/ kg)麻醉,生理盐水灌注30 s后,4%多聚甲醛固定5 min。取出肾脏,4%多聚甲醛后固定2 h,30%蔗糖溶液浸泡过夜,冷冻切片机切片(20 μm)。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 小鼠处死后,取出肾脏和脾脏,剪成碎块,加入一定量50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4, 4 ℃),内含150 mmol/L NaCl,0.25% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 0.25% Sodium deoxycholate, 1 mmol/L EDTA。玻璃匀浆器将其研磨成匀浆。测定蛋白浓度。电泳完成后,TransBlot SD (Bio-Rad)作半干转膜。以TBS (25 mmol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2)含5%脱脂牛奶和0.05% Tween-20作封闭(Blocking)过夜。将膜与1:2 000抗DARPP-32多克隆抗体(Cell Signaling Technology, Inc)室温下孵育1 h,TBS洗3次,与辣根过氧化酶联的抗兔血清孵育0.5 h,PBS洗3次,ECL(Amersham公司)测定反应产物。

1.2.2 免疫组化 免疫组化以漂浮切片用ABC法染色。切片先以1%过氧化氢室温处理10 min,抑制内源性过氧化物酶。TBS洗3次,与含3%正常羊血清的TBS孵育1 h封闭,1:100 DARPP-32多克隆抗体4 ℃孵育过夜。TBS洗3次,1:200稀释的生物素标记的羊抗兔血清室温孵育1 h, TBS洗3次, diaminebenzidine显色。Zeiss显微镜观察、拍照。

作者简介:赵 华(1966-),女,河南省郑州市人,硕士,主治医师,主要从事皮肤神经免疫方面的研究,发表论文10余篇。电话:(010)66939314。

收稿日期:2005-02-16;修回日期:2005-05-27

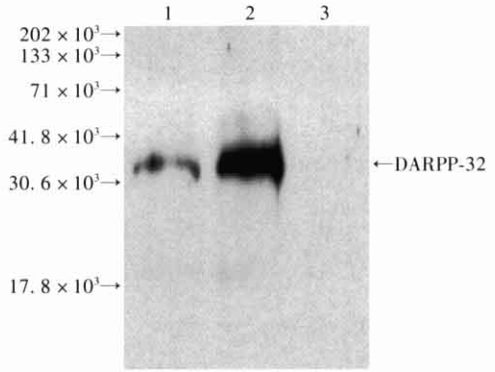
2　结果

2.1　Western blot 结果

抗 DARPP-32 抗体作 Western blot，在小鼠肾脏蛋白匀浆中检测到 1 条清晰可见蛋白带，分子质量 32×10^3 左右，与 DARPP-32 的分子质量大小相符，未见到非特异性蛋白带。已确认阳性表达的脑组织有可见蛋白带，与肾脏组织的表达在同一位置。同为实质性器官的脾脏，无任何可见蛋白带，未见 DARPP-32 表达(图 1)。

2.2　免疫组化结果

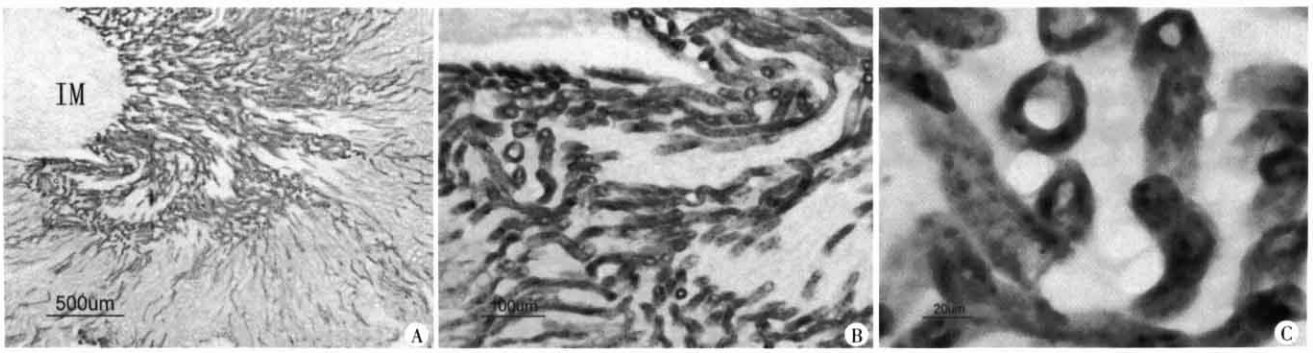
大部分阳性物质位于外髓层，呈致密分布，肾脏髓质放射区，DARPP-32 阳性分布于松散分布类似集合管的条形结构中，皮质层少量，稀疏分布阳性物质(图 2A)。DARPP-32 阳性染色特异性分布于远直小管(mTAC)结构中，主要见于细胞浆(图 2B、C)。



1: Kidney; 2: Brain; 3: Spleen

图 1　肾脏组织 DARPP-32 蛋白水平的表达

Fig 1　Western blot analysis of DARPP-32 expression in kidney



A: The distribution of DARPP-32-like immunoreactivity in mice kidney (ABC × 25); B: DARPP-32 in the mTAC (ABC × 100); C: DARPP-32-like immunoreactivity in cytoplasm (ABC × 400)

图 2　DARPP-32 在肾脏的表达分布

Fig 2　Expression and distribution of DARPP-32 in kidney

3　讨论

蛋白质磷酸化是细胞信号传导的重要过程。磷酸化和去磷酸化是一个动态平衡，二者均可对信号传导系统进行调节[4]。细胞内含有大量进行磷酸化或去磷酸化反应的酶，调控蛋白确保这些磷酸酶的特异性。DARPP-32 是多巴胺和环磷腺苷调节的磷蛋白，属于磷酸酯酶抑制剂 1 家族成员，富集于神经元，是神经元慢突触传导过程中核心信号分子，具有重要生化特性和功能。研究表明 DARPP-32 参与了多种器官的功能调控[1]。本实验 Western blot 可见，所采用的抗 DARPP-32 多克隆抗体特异性很高，在小鼠肾脏蛋白匀浆中该抗体可清楚地检测到一条分子质量为 32×10^3 的蛋白带，而无其它杂带。同为实质性器官的脾脏未发现任何可见蛋白带。为证明抗 DARPP-32 抗体的特异性提供了一个很好的阴性对照，保证免疫组化结果的准确性。小鼠肾脏组织切片中，DARPP-32 的主要分布区域有三：远直小管(mTAC)、近曲小管和集合管。但在亚细胞结构水平，DARPP-32 样颗粒状核样阳性染色结果却是首次报道。分析认为：首先可能由于实验方法的差异，我们使用 ABC 法，而既往报道均为免疫荧光法；其次也可能为物种的差异；我们用小鼠，既往用猴和大鼠；第三我们用的抗体和既往的研究有所不同。另外，以前的报道中均没有高倍镜观察的图片。

肾脏远直小管的主要功能是钠离子重吸收，近曲小管对糖、氨基酸、钠离子、氯离子、中碳酸盐均有重吸收。DARPP-32 在肾脏组织中表达，推测 DARPP-32 在调节肾小管钠离子的重吸收方面可能发挥重要作用[4]。

DARPP-32 为一个可被多巴胺和 cAMP 调控的磷酸化蛋白，在中枢神经系统以外的作用研究较少。肾脏分泌内源性多巴胺，并有多巴胺受体 D1、D2 分布[5]。D1、D2 受体的激活可诱导 cAMP 的产生，从而激活 PKA，磷酸化 DARPP-32，磷酸化的 DARPP-32 可抑制 PP1，调节钠离子重吸收的 Na^+、K^+-ATP 酶可由

PP1调控。综上所述，肾脏可通过分泌多巴胺来调节肾脏钠离子的重吸收。DARPP-32作为这条通路的一个中间环节，并受其它激酶、磷酸酶(如PKG，PP2B)调节[6]，成为一个关键的交汇、枢纽点。因此，研究肾脏在生理、病理状态下DARPP-32表达量和磷酸化状态的改变十分有意义。

参考文献：

[1] Ceulemans H, Bollen M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button[J]. Physiol Rev, 2004, 84(1): 1-39.

[2] Neve K A, Seamans J K, Trantham Davidson H. Dopamine receptor signaling[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2004, 24(3):165-205.

[3] Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, *et al*. DARPP-32: an integrator of neurotransmission[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44: 269-296.

[4] Brismar H, Holtback U, Aperia A. Mechanisms by which intrarenal dopamine and ANP interact to regulate sodium metabolism[J]. Clin Exp Hypertens, 2000, 22(3): 303-307.

[5] Eklof A C, Holtback U, Svennilson J, *et al*. Increased blood pressure and loss of anp-induced natriuresis in mice lacking DARPP-32 gene[J]. Clin Exp Hypertens, 2001, 23(6): 449-460.

[6] Higuchi E, Nishi A, Higashi H, *et al*. Phosphorylation of protein phosphatase-1 inhibitors, inhibitor-1 and DARPP-32, in renal medulla[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 408(2):107-116.

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)13-1366-01

荧光定量PCR技术检测尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒感染的结果分析

Fluorescence quantitative PCR for detection of human papilloma virus of the patients infected condyloma acuminatum

冯文曦，梅 玲，王 宁，郑 红 (第三军医大学西南医院综合实验研究中心，重庆 400038)

女性生殖道尖锐湿疣(condyloma acuminatum，CA)发病率高，危害性大，如能早期发现亚临床和潜伏性人乳头瘤病毒(human papilloma virus，HPV)感染，可控制病情向临床期发展，同时也防止疾病的播散[1]。我们采用荧光定量PCR(FQ-PCR)技术对485例女性生殖道尖锐湿疣、疑尖锐湿疣患者进行了HPV-6、11 DNA检测分析。

1 材料与方法

1.1 标本来源及采样

标本来源于本院门诊妇产科共485例，其中被临床病理诊断为尖锐湿疣(CA)患者148例，疑为尖锐湿疣患者337例。可疑患者外观表现外阴为一般丘疹状突起，阴道壁可见扁平状突起，但表面光滑，无绒毛样感，无菜花样感，色泽和粘膜及皮肤颜色相同，而不呈典型的鸡冠样、菜花样的灰色赘生物。在临床上难以用肉眼与其它生殖道疾病相鉴别。

采样：采集女性阴道或宫颈口分泌物棉拭子样本。采样前，用棉拭子将阴道或宫颈口过多的分泌物轻轻擦拭干净，更用生理盐水浸润的棉拭子，紧贴阴道或宫颈口粘膜，稍用力转动2周，以取得分泌物及脱落细胞。将取样后的棉拭子，放入备有1 ml无菌生理盐水的样品管中，充分漂洗并将棉拭子贴壁挤干。

1.2 仪器与试剂

美国BIO-RAD iCylcer荧光PCR检测仪，人乳头瘤病毒6、11型检测试剂盒(深圳匹基生物技术开发有限公司提供)。

1.3 方法

1.3.1 荧光定量PCR原理 该技术在常规PCR基础上，添加了1条标记了2个荧光基团的荧光双标记探针，分别标记在探针的5′端和3′端。二者可构成能量传递结构，即5′端荧光基团所发出的荧光可被另一荧光基团吸收或抑制。探针的3′端羟基(-OH)已被去除或封闭，不具有延伸能力。当有特异性PCR扩增时，探针会被*Taq*酶的5′→3′外切酶活性作用切断，切下的3′端荧光基团抑制作用消失，从而引起切下的5′端荧光基团信号增长。荧光信号伴随着PCR的进行，PCR产物的增长而增长。

1.3.2 试剂盒使用方法 将标本13 000 r/min离心10 min，去上清液，采用常规碱裂解法提取HPV-DNA。将各反应管放入BIO-RAD iCylcer荧光PCR检测仪上，按下列条件进行扩增：37 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min；95 ℃ 5 s；60 ℃ 30 s。共作42个循环。反应体系设为40 μl。每次检验均做阳性和阴性对照。

1.4 结果分析条件设定

根据试剂盒说明书，建议使用BIO-RAD iCylcer进行结果分析时，基线(baseline)取为2～10或2～15个循环的荧光信号，阈值(threshold)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点，且循环阈值(Ct值)=0.0为准。

1.5 质控标准

阴性对照的Ct值=0.0。阳性对照的Ct值≤30。结果判断：Ct值等于0.0或40.0的样本为阴性。Ct值≤37.0的检测样本为阳性。Ct值<37.0的样本建议重做。重做结果Ct值≤40.0者为阳性，否则为阴性。

(下转1369页)

作者简介：冯文曦(1972-)，男，重庆市人，主管技师，主要从事分子生物学方面的研究。电话：(023)68765466

收稿日期：2004-09-02；修回日期：2005-03-17