论著

文章编号:1000-5404(2007)14-1384-04

Cubilin 反义 RNA 对大鼠肾小管超负荷重吸收白蛋白的抑制作用

刘 俊,何娅妮,杨聚荣,李开龙,丁涵露,张建国,梁海君,詹 俊 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042)

提 要: 目的 探讨经肾动脉灌注腺病毒载体介导 Cubilin 反义 RNA 对肾小管超负荷重吸收白蛋白的抑制作用。**方法** 建立大鼠阿霉素肾病模型,正义 RNA 组和反义 RNA 组分别经肾动脉缓慢灌注 GFP 基因标记的 pAdEasy-Cub 和 pAdEasy-ACub,对照组和模型组灌注等量生理盐水。激光共聚焦显微镜下观察 GFP 的表达,并监测 24 h 尿蛋白量及其他生化指标;光镜下观察肾小管间质病理变化;免疫组化法观察肾小管 Cubilin 基因的表达以及肾小管上皮细胞内白蛋白的沉积。**结果** 转染第 4 天,正、反义 RNA 组肾脏 GFP 基因有较强表达,11 d 达到高峰,可持续至实验结束;反义 RNA 组与其他各组相比,24 h 尿蛋白量明显增高($P<0.01$),小管间质病变轻微,Cubilin 阳性表达率最低,且与白蛋白的沉积呈显著正相关($r=0.896$,$P<0.01$)。**结论** 经肾动脉途径灌注重组腺病毒,能器官靶向性表达外源基因;Cubilin 反义 RNA 对肾小管超负荷重吸收白蛋白有明显的抑制作用,并可以有效地减轻蛋白尿引起的肾间质损伤。

关键词: 腺病毒载体;Cubilin;白蛋白;反义 RNA;蛋白尿;阿霉素

中图法分类号: R394.2;R692.31;R696.202 **文献标识码**: A

Inhibitory effect of Cubilin antisense RNA on albumin overload in renal tubules in rats

LIU Jun, HE Ya-ni, YANG Ju-rong, LI Kai-long, DING Han-lu, ZHANG Jian-guo, LIANG Hai-jun, ZHAN Jun (Department of Nephrology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the inhibitory effect of Cubilin antisense RNA mediated by recombinant adenovirus vector on albumin overload in renal tubules in rats. Methods The rat models of adriamycin (ADR) induced nephritis were established. Cub vector group and ACub vector group underwent infusion *via* renal artery with pAdEasy-Cub, pAdEasy-ACub both marked by GFP gene respectively; control group and model group were given the same dose of normal saline in the same way. The GFP expression was observed by laser scanning confocal microscopy; the changes of uria protein in 24 hours and other biochemical indicators were measured simultaneously; the pathologic changes of renal tubule interstitium were observed under light microscope, and the Cubilin expression and the albumin deposition in renal tubules by immunohistochemistry. Results On the 4th day after transfection, the expression of GFP gene was detected in kidney in Cub vector group and ACub vector group, reached peak on the 11th day, lasted to the end of experiment. Compared with other groups, urine protein in 24 hours in ACub vector group increased obviously ($P<0.01$), the pathologic changes of renal tubule interstitium were mildest, and the positive rate of Cubilin expression was the lowest. The significant positive correlation was found between Cubilin expression and albumin deposition ($r=0.896$, $P<0.01$). Conclusion When recombinant adenovirus vector was injected through renal artery, the introduced gene expressed preferentially in kidney. The transfected Cubilin antisense RNA has significant inhibitory effect on albumin overload in renal tubules and efficiently decreases the renal interstitial injury induced by proteinuria.

Key words: adenovirus vector; Cubilin; albumin; antisense RNA; proteinuria; adriamycin

蛋白尿是肾疾病的重要临床指征及可能的病理因素。研究表明,尿白蛋白既是肾小球疾病的标志物,又可引起肾小管上皮细胞损伤[1]。长期大量蛋白尿,肾小管对白蛋白的重吸收增加,导致肾小管上皮细胞生物学特性改变,引发炎症和纤维化,进而引起肾实质病变乃至肾脏瘢痕形成[2,3]。Cubilin 是一种新近发现的高容量、低亲和力的白蛋白吞饮受体,在近端肾小管上皮细胞刷状缘有较高表达,是生理状态下调控肾脏重吸收白蛋白的关键环节[4]。为进一步阐明在动物体

基金项目:国家自然科学基金(30370534)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370534)
作者简介:刘 俊(1977-),女,四川省成都市人,硕士研究生,医师,主要从事肾脏基础方面的研究。电话:(023)66381262
通讯作者:何娅妮,电话:(023)68757476,E-mail: heynmail@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-03-28;修回日期:2007-04-16

内 Cubilin 基因在蛋白尿肾损害过程中的可能性致病作用，我们采用阿霉素肾病大鼠模型，以 Cubilin 反义 RNA 腺病毒载体为介导，拟在体内水平探讨 Cubilin 反义 RNA 对肾小管超负荷重吸收白蛋白的抑制作用，并为临床前研究提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

含报告基因 GFP 的 Cubilin 正、反义 RNA 腺病毒载体（pAdEasy-Cub、pAdEasy-ACub）由本科梁海君硕士构建，滴度分别为 1.8×10^{10}、2.0×10^{10}pfu/ ml；阿霉素（盐酸多柔比星）购自浙江海正药业公司；山羊抗大鼠 Cubilin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司；辣根过氧化物酶标记绵羊抗大鼠 albumin 单克隆抗体购自 Bethyl 公司；免疫组化试剂盒购自北京中杉公司；Bradford 蛋白定量试剂盒购自北京天根生物公司。SD 雄性大鼠由本院野战外科研究所实验动物中心提供，体质量 200～250 g。

1.2　方法

1.2.1　大鼠分组、建模及肾脏基因转染　　40 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组，每组 10 只，分别为模型组、正常对照组、Cubilin 正义 RNA 腺病毒载体对照组和 Cubilin 反义 RNA 腺病毒载体干预组。除正常对照组外，其余各组均一次性经尾静脉注射阿霉素 7.5 mg/kg，造成阿霉素肾病模型，正常组注射相同剂量生理盐水。于造模第 3 天，各组分别转染生理盐水以及含报告基因（GFP）的 pAdEasy-Cub、pAdEasy-ACub 各 1 ml：大鼠于麻醉下开腹，将肾血管以下腹主动脉以及左肾静脉暂时夹闭，经腹主动脉插管向肾动脉内注入生理盐水、pAdEasy-Cub、pAdEasy-ACub 各 1 ml 至大鼠肾脏，再将肾动脉夹闭，局部作用 45 min 后，退出导管，恢复肾脏血流。动物自由饮水和进食，在注射阿霉素 28 d 后结束实验。

1.2.2　标本收集以及血尿生化检测　　各组动物均在实验开始后第 0、7、14、21、28 天，于代谢笼中收集 24 h 尿液，采用 Bradford 法进行尿蛋白测定；实验结束时，从心脏采血收集各组大鼠血清，采用自动生化分析仪测定血清总蛋白（TP）、白蛋白（ALB）、尿素氮（BUN）、血肌酐（Cr）。

1.2.3　激光共聚焦下监测报告基因（GFP）的表达　　腺病毒转染后第 4、7、11、18、25 天（分别即造模后第 7、10、14、28 天）各组分别处死 1 只大鼠，留取左肾，作冰冻切片，激光共聚焦下观察绿色荧光蛋白的表达。

1.2.4　观察肾小管及肾间质病理变化　　于造模第 28 天断头处死全部大鼠，取左肾组织，10% 甲醛固定，石蜡包埋，制成 4 μm 切片，HE 染色，在光镜下观察肾组织病理改变。

1.2.5　免疫组化方法检测 Cubilin 的表达及白蛋白的沉积

取 4 μm 厚 10% 中性甲醛固定的石蜡切片常规脱蜡水化，滴加 3% H_2O_2 甲醇 10 min（去除内源性过氧化氢酶活性），修复抗原（Cubilin 采用胰蛋白酶消化，白蛋白采用微波修复），正常兔血清封闭 10 min，分别滴加山羊抗大鼠 Cubilin 单克隆抗体（1∶1 000）及辣根过氧化物酶标记绵羊抗大鼠 albumin 单克隆抗体（1∶200），4 ℃过夜。滴加兔抗山羊 IgG，37 ℃孵育 30 min，滴加过氧化物酶标记的链霉亲和素，37 ℃孵育 30 min（白蛋白省去孵育二抗、三抗），联苯二胺（DAB）显色，苏木精复染，以上各步骤间以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS）洗 3 次，每次 5 min，常规脱水透明封片。结果参考 Yang 等的检测方法，在高倍视野下（×400）选取 10 个视野，以出现棕黄色染色为阳性信号，应用图像分析软件（Image Pro-Plus 5.1）测定阳性染色结果的积分光密度（IOD）值，以均值表示每个标本积分光密度值。

1.3　统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，使用 SPSS 12.0 统计软件，组间比较用方差分析；相关性分析采用简单直线相关分析。

2　结果

2.1　24 h 尿蛋白定量及血生化指标测定

7 d 起除正常组外，其余各组均出现不同程度蛋白尿，14 d 起反义 RNA 干预组蛋白尿较其余各组明显增多（$P<0.01$），见表 1。实验结束时模型组、正义 RNA 对照组和反义 RNA 干预组血清 TP、ALB 均明显低于正常对照组（$P<0.01$），且反义 RNA 干预组为各组中最低（$P<0.01$）；各组 BUN、Cr 无显著性差异（$P>0.05$），见表 2。

表 1　各组大鼠 24 h 尿蛋白定量（mg/24 h，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
正常对照组	8.02±1.78	8.29±2.03	8.07±1.66	8.09±1.94	8.64±2.30
模型组	9.20±2.95	22.24±6.42[a]	76.37±11.08[a]	191.73±13.56[a]	309.08±30.01[a]
Cubilin 反义 RNA 组	8.83±2.06	27.57±6.92[ac]	130.18±19.18[abd]	324.78±29.61[abd]	525.63±36.79[abd]
Cubilin 正义 RNA 组	8.90±2.35	24.03±4.81[a]	74.23±9.62[a]	205.31±28.43[a]	318.94±28.43[a]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，c：$P<0.05$，与模型组比较；d：$P<0.01$，与 Cubilin 正义 RNA 组比较

表 2　各组大鼠血清 TP、ALB、BUN、Cr 比较（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	TP（g/L）	ALB（g/L）	BUN（mmol/L）	Cr（μmol/L）
正常对照组	64.46±8.90	25.2±5.77	7.34±1.30	51.58±9.19
模型组	43.31±5.89[a]	12.12±4.11[a]	8.79±2.69	60.21±14.71
Cubilin 反义 RNA 组	25.94±4.20[abc]	6.33±2.11[abc]	8.17±2.41	53.09±11.29
Cubilin 正义 RNA 组	41.08±5.90[a]	10.25±3.67[a]	9.13±2.64	58.75±12.60

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与模型组比较；c：$P<0.01$，与 Cubilin 正义 RNA 组比较

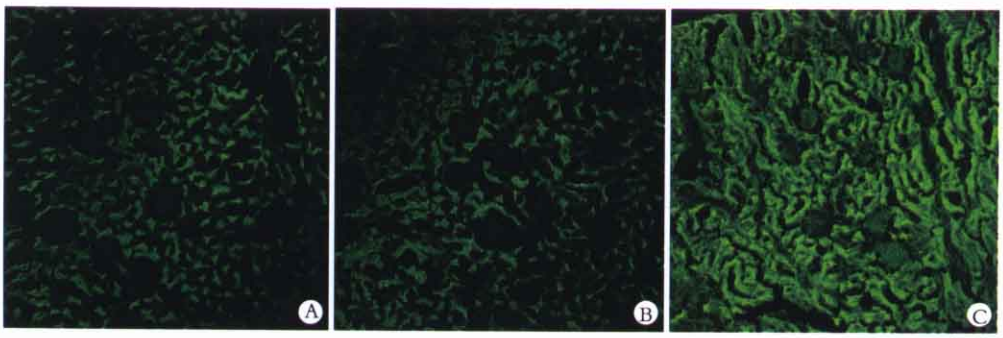
2.2　绿色荧光蛋白的表达

于腺病毒载体转染后第 4 天，正、反义 RNA 组在激光共聚焦下均可以见到较强的绿色荧光，11 d 达到高峰，高表达可持续至实验结束；正常对照组和模型组肾组织仅见微弱的自发荧光，而肝、脾、肺等内脏器官尚未见绿色荧光的表达，见图 1。

2.3　肾脏病理学检查

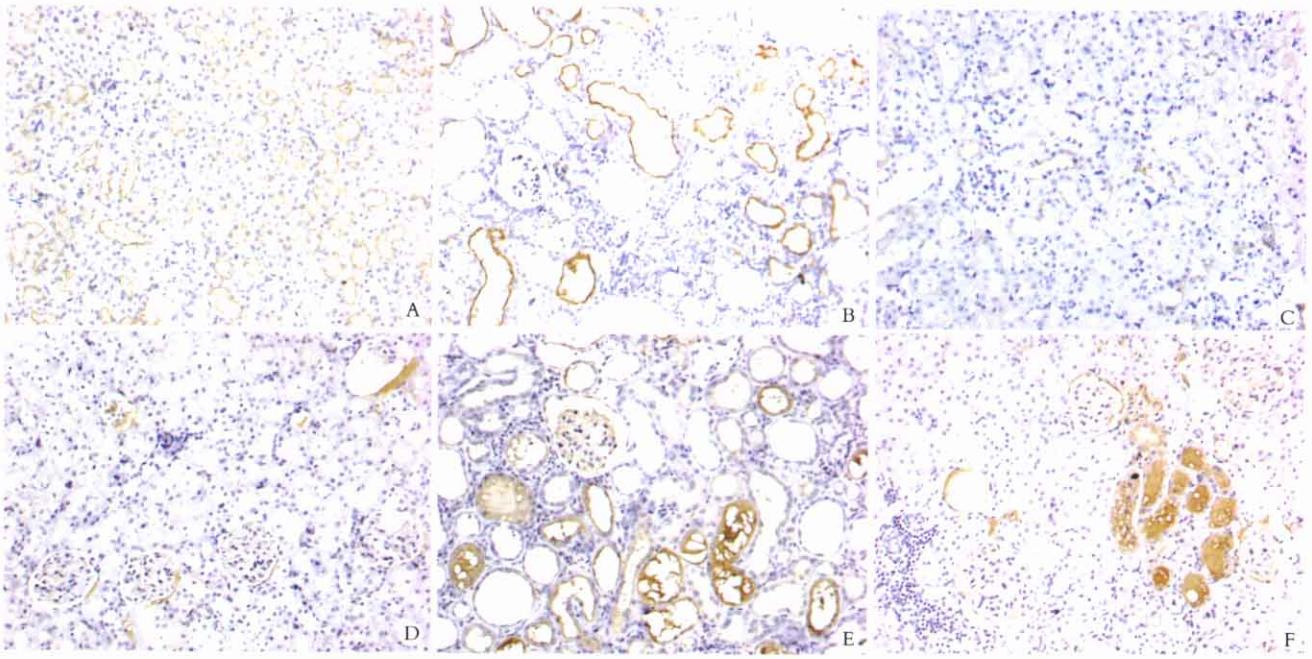
HE 染色示正常对照组肾组织结构正常，炎性细胞极少；模

型组和正义 RNA 对照组表现为小管间质损害，包括肾小管扩张及空泡样变性，肾小管上皮细胞萎缩及基底膜增厚，部分区域可见尿蛋白形成的透明管型；间质水肿、扩大，伴大量弥散或灶性炎性细胞浸润；反义 RNA 干预组肾小管间质损害明显减轻，仅有少量散在炎性细胞浸润，肾小管轻微扩张，管腔中可见大量蛋白颗粒管型形成，见图 2。



A：正常对照组；B：模型组；C：Cubilin 反义 RNA 组

图 1 实验第 28 天激光共聚焦显微镜检测 GFP 在肾脏的表达 （×100）



A、D 为正常对照组；B、E 为模型组；C、F 为 Cubilin 反义 RNA 组； A、B、C：Cubilin 在肾组织中的表达（S-P×200）；D、E、F：白蛋白在肾组织的沉积（直接染色法 ×200）

图 2 实验第 28 天各组大鼠肾组织常规病理及免疫病理变化

2.4 肾组织 Cubilin 的表达和白蛋白的沉积

正常对照组肾小管上皮细胞刷状缘有基础量的 Cubilin 表达，小管上皮细胞细胞质内没有或仅见极少量的白蛋白颗粒；模型组和正义 RNA 对照组 Cubilin 在肾小管上皮细胞刷状缘呈高水平表达，且有大量白蛋白在肾小管上皮细胞内沉积；反义 RNA 干预组 Cubilin 表达较其余各组显著降低（$P<0.01$），可见少量的白蛋白沉积于小管上皮细胞内（图 2），积分光密度值见表 3。

2.5 相关分析

对肾小管上皮细胞 Cubilin 表达与白蛋白水平作相关分析表明，Cubilin 表达与白蛋白沉积呈显著正相关（$r=0.896$，$P<0.01$）。

表 3 各组大鼠 Cubilin 表达与白蛋白的沉积（IOD×10^3，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Cubilin	白蛋白
正常对照组	31.65±6.02	10.35±3.37
模型组	119.54±23.67[a]	82.61±11.52[a]
Cubilin 反义 RNA 组	16.38±4.70[abc]	35.46±4.55[abc]
Cubilin 正义 RNA 组	130.59±29.85[ab]	83.92±11.06[a]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与模型组比较；c：$P<0.01$，与 Cubilin 正义 RNA 组比较

3　讨论

病毒载体介导的反义 RNA 转移技术作为一种可以在个体水平上调控特定基因表达或功能的手段已被广泛采用。其原理是利用基因重组技术体外构建腺病毒表达载体，通过基因转移将反义 RNA 导入靶器官或组织，与靶基因互补结合，有效抑制靶基因的转录、翻译，进而抑制靶基因的表达。靶基因能否被有效抑制，其关键在于载体的表达效率以及载体转移的靶向性。本实验采用的 AdEasy™ XL 系列腺病毒载体具有转染效率高、插入外源基因容量大、安全且容易制备、纯化等特点，成为目前基因治疗最常用的载体之一。但该载体因具有广泛的嗜向性，面临着靶向性差的问题。实验表明，全身应用腺病毒载体（如静脉注射）可引起广泛地组织分布，Wood 等采用报告基因 Ad-luc 从尾静脉注射小鼠，定量分析显示腺病毒仅积聚于肝脏，其次是肺脏，然后是其他各器官系统。本实验通过选取肾动脉注射可增加载体转染的有效性并延长转染时间。正义 RNA 对照组和反义 RNA 干预组经肾动脉注入含报告基因 GFP 的 pAdEasy-Cub、pAdEasy-ACub 后，4 d 在肾脏冰冻切片中可以见到较强的绿色荧光，而此时肝、脾、肺等内脏器官尚未见绿色荧光，11 d 达到高峰，转染可持续 4 周以上，此结果表明经肾动脉注射可以最大限度地提高外源基因的表达效率。

目前白蛋白已被公认为是加速小管间质病变进展的独立危险因素。Cubilin 是近年发现的在肾近曲小管上皮细胞刷状缘侧表达，能够对管腔中白蛋白、脂蛋白等多种尿蛋白成分重吸收的特异性受体，它和另一受体 megalin 共同完成白蛋白对信号途径的激活，在白蛋白尿肾损害中起着极为重要的作用[5,6]。我们在前期体外实验中发现，Cubilin 反义 RNA 的重组腺病毒转染 RRTEpiC 细胞，可以有效抑制近端肾小管上皮细胞表达和分泌 Cubilin 蛋白[7]。所以本实验将 Cubilin 作为抑制肾小管超负荷重吸收白蛋白的靶基因，通过建立阿霉素肾病模型，在体内水平探讨 Cubilin 反义 RNA 对肾小管超负荷重吸收白蛋白的抑制作用。我们发现大鼠尾静脉单剂量注射阿霉素 7.5 mg/kg 后，模型组 7 d 时即出现大量蛋白尿，随后出现明显低蛋白血症；28 d 时见小管细胞刷状缘侧 Cubilin 的表达明显上调，小管细胞内可见大量白蛋白颗粒沉积，光镜下可见明显的小管间质损害，包括小管上皮细胞扩张或萎缩、小管细胞细胞质中白蛋白颗粒明显增多、间质中有散在或灶性单核细胞和淋巴细胞浸润，提示 Cubilin 与肾小管间质病变两者之间可能存在联系。研究报道白蛋白内吞后可通过 PKC 途径，活化 NADPH，产生 ROS，随之活化多种信号途径诱导小管上皮细胞凋亡、小管间质单核巨噬细胞浸润等，从而促进小管萎缩和间质纤维化，加速肾脏病变的进展[8-10]。实验中反义 RNA 干预组与模型组以及正义 RNA 对照组同时出现大量蛋白尿，但反义 RNA 蛋白量明显增多，28 d 时 Cubilin 仅有微量表达且显著低于其他各组，光镜下可见管腔中含有大量蛋白颗粒管型，可小管间质病变却并不明显，提示腺病毒介导 Cubilin 反义 RNA 转染大鼠体内后，通过对 Cubilin 基因表达的封闭作用有效抑制了靶基因的表达，进一步抑制肾小管对白蛋白的超负荷重吸收，减轻了蛋白尿引起的肾损害。本研究在成功建立腺病毒载体转染途径的基础上，从体内水平初步探讨了 Cubilin 基因在蛋白尿肾损害发生发展过程中的可能性致病作用，为下一步临床实验奠定了良好的基础。

参考文献：

[1] Imai E, Nakajima H, Kaimori J Y. Albumin turns on a vicious spiral of oxidative stress in renal proximal tubules[J]. Kidney Int, 2004, 66(5): 2085-2087.

[2] Stephan J P, Mao W, Filvaroff E, *et al*. Albumin stimulates the accumulation of extracellular matrix in renal tubular epithelial cells[J]. Am J Nephrol, 2004, 24(1): 14-19.

[3] Tomlinson D R. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications[J]. Diabetologia, 1999, 42(11): 1271-1281.

[4] Kozyraki R. Cubilin, a multifunctional epithelial receptor: an overview [J]. J Mol Med, 2001, 79(4): 161-167.

[5] Gekle M. Renal tubule albumin transport[J]. Annu Rev Physiol, 2005, 67: 573-594.

[6] Russo L M, Bakris G L, Comper W D. Renal handling of albumin: a critical review of basic concepts and perspective[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(5): 899-919.

[7] 梁海君，何娅妮，杨聚荣，等. 腺病毒介导 Cubilin 反义 RNA 对肾小管上皮细胞 Cubilin 蛋白诱导表达的抑制作用[J]. 第三军医大学学报，2006，28(11)：1157-1160.

[8] Donadelli R, Zanchi C, Morigi M, *et al*. Protein overload induces fractalkine upregulation in proximal tubular cells through nuclear factor kappaB- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(10): 2436-2446.

[9] Tang S, Leung J C, Abe K, *et al*. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells *in vitro* and *in vivo*[J]. J Clin Invest, 2003, 111(4): 515-527.

[10] Nakajima H, Takenaka M, Kaimori J Y, *et al*. Activation of the signal transducer and activator of transcription signaling pathway in renal proximal tubular cells by albumin[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(2): 276-285.

（编辑　王　红）