论著

文章编号:1000-5404(2012)09-0874-05

# 小鼠肾单位发育过程中的经典凋亡和坏死性凋亡

邵姝元[1],刘玉玲[2],郭 敏[3],李晓明[3] (121000 辽宁 锦州,辽宁医学院:病理生理学教研室[1],电镜室[2],组织学与胚胎学教研室[3])

[摘要] **目的** 观察小鼠肾单位发育过程中的程序性细胞死亡现象。**方法** 应用光镜、透射电镜、原位缺口末端标记法及免疫组织化学技术观察胚龄12、14、16、18 d胎鼠肾单位发育过程中的细胞凋亡。**结果** 小鼠肾单位发育过程中的程序性细胞死亡主要有经典凋亡、坏死性凋亡和副凋亡3种方式。随着小鼠胚龄增加,凋亡指数逐渐升高,在胚龄18 d达到高峰[(29.45±3.34)%,$P<0.05$]。Bcl-2和Bax蛋白表达也逐渐增加,均于胚龄18 d达到高峰,分别为(80.52±4.06、33.67±3.42, $P<0.05$)。**结论** 小鼠肾单位发育过程中各部位PCD的表现具有明显差异,出现了多种细胞凋亡形式,其中以经典凋亡为主,还出现了坏死性凋亡和副凋亡。

[关键词] 肾单位; 发育;程序性细胞死亡;坏死性凋亡;小鼠
[中图法分类号] R322.61;R329.25 [文献标志码] A

# Apoptosis and necroptosis in developing of mouse nephron

Shao Shuyuan[1], Liu Yuling[2], Guo Min[3], Li Xiaoming[3] ([1]Department of Pathophysiology, [2]Lab of Electron Microscopy, [3]Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning Province, 121001, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe ultrastructural changes of programmed cell death (PCD) during nephron development in mice. **Methods** Light microscopy, transmission electron microscopy, TUNEL method and immunohistochemical assay were used to observe programmed cell death of the nephrons in mouse kidney at embryonic days 12, 14, 16, and 18. **Results** There were 3 types of PCD found in the development of mouse nephron. They were apoptosis, necroptosis and paraptosis. TUNEL positive cells were increased gradually and reached peak level at embryonic day 18 [(29.45±3.34)%, $P<0.05$]. The expression of Bcl-2 and Bax was increased, and peaked at embryonic day 18 too (80.52±4.06 and 33.67±3.42, $P<0.05$). **Conclusion** There are obvious different changes of PCD among different regions during nephron development in mouse. In the cell death we observed, apoptosis is most common, and necroptosis and paraptosis are also seen.

[**Key words**] nephron; development; programmed cell death; necroptosis; mouse

Supported by the Foundation of Liaoning Department of Education (L2010269). Corresponding author: Li Xiaoming, Tel: 86-416-4673425, E-mail: xiaomingli0@yahoo.com.cn

1972年,Kerr等[1]观察到了细胞凋亡(apoptosis)这一现象,被确认为是程序性细胞死亡(programmed cell death,PCD)。近年来有关PCD的研究让人们对细胞死亡的复杂性与多样性有了进一步认识。除了经典的细胞凋亡,研究者又发现了非凋亡性细胞死亡(nonapoptosis cell death),包括副凋亡(paraptosis)等。越来越多的研究表明非凋亡性细胞死亡也属于PCD[2]。2009年被国际同行所接受和确认,并将胀亡和坏死性凋亡同列为坏死样程序性死亡(necrosis programmed death)[3]。肾单位是尿液生成和排泄的基本结构和功能单位。成熟的肾单位由多个不同部位构成,每个部位的细胞成分不一样。肾单位从S小体发育过程中不但要完成细胞成分发育成熟,而且肾单位的形态也要逐渐完善。在这一过程中PCD起着重要作用。一旦发生PCD紊乱,就会造成畸形如多囊肾。然而PCD对肾单位发育的作用机制尚不十分清楚。本研究应用光镜、透射电镜、原位缺口末端标记法和免疫组织化学技术并结合现代细胞凋亡的理论对小鼠肾单位发育过程中的PCD进行了系统地观察。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物培养和取材

选择体质量25~30 g成年健康昆明小白鼠,按雌雄比例1∶1同窝饲养,以阴道精栓脱落的最早时间计为胚龄0 d(E0 d)。选取胚龄E12、14、16、18 d孕鼠各4只。将孕鼠用乙醚麻醉后剖腹取出胎鼠,将胎鼠剖腹取肾。经肾门冠状面切开,分别入10%福尔马林和2.5%戊二醛固定液中固定。组织块入10%福尔马林固定液中固定24 h,常规脱水、透明,石蜡包埋,切片5 μm,HE染色,光镜下观察。

### 1.2 透射电镜样品的制备及观察

组织块用2.5%戊二醛固定液固定48 h。1%锇酸后固定1 h,常规脱水,环氧树脂定向包埋,使切面与冠状面相一致。

[基金项目] 辽宁省教育厅基金(L2010269)
[通信作者] 李晓明,电话:(0416)4673425,E-mail:xiaomingli0@yahoo.com.cn

做厚度 1 μm 的半薄切片,甲苯胺蓝染色,光镜下定位,再进行超薄切片,厚度 50 ~ 70 nm,醋酸铀、柠檬酸铅染色,透射电镜(JEOL1200EX)观察。应用细胞分类计数器,对发育中肾单位内的经典凋亡、坏死性凋亡和副凋亡出现的次数进行计数,计算 100 次中各类凋亡出现次数的百分比。

### 1.3 原位缺口末端标记法(TUNEL)

切片常规脱蜡至水,滴加蛋白酶 K 湿盒中 37 ℃孵育 30 min,滴加 TUNEL 混合溶液(TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购于 Roche 公司),50 μl/片,湿盒中 37 ℃孵育 60 min,滴加转化剂 POD,50 μl/片,湿盒中 37 ℃孵育 30min,DAB 显色,苏木精复染、脱水、透明、封片。以不含末端脱氧核苷酸转移酶的液体代替。TUNEL 混合液作阴性对照。光学显微镜下观察并摄片。至少计数 500 个细胞,计算凋亡指数(AI),即阳性细胞所占的百分比。

### 1.4 免疫组化染色

切片常规脱蜡至水,3% $H_2O_2$ 室温孵育 8 min,枸橼酸盐微波修复 10 min,BSA 室温孵育 20 min,分别滴加一抗 Bcl-2 和 Bax(1∶50,Santa Cruz 公司)湿盒中 4 ℃过夜,二抗 37 ℃温箱 30 min,SABC 37 ℃温箱 30 min,DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照。光学显微镜下观察并摄片。计算机图像分析系统(HPIAS-1000)对各组阳性细胞进行积分光密度分析。

### 1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行单因素方差分析。

## 2 结果

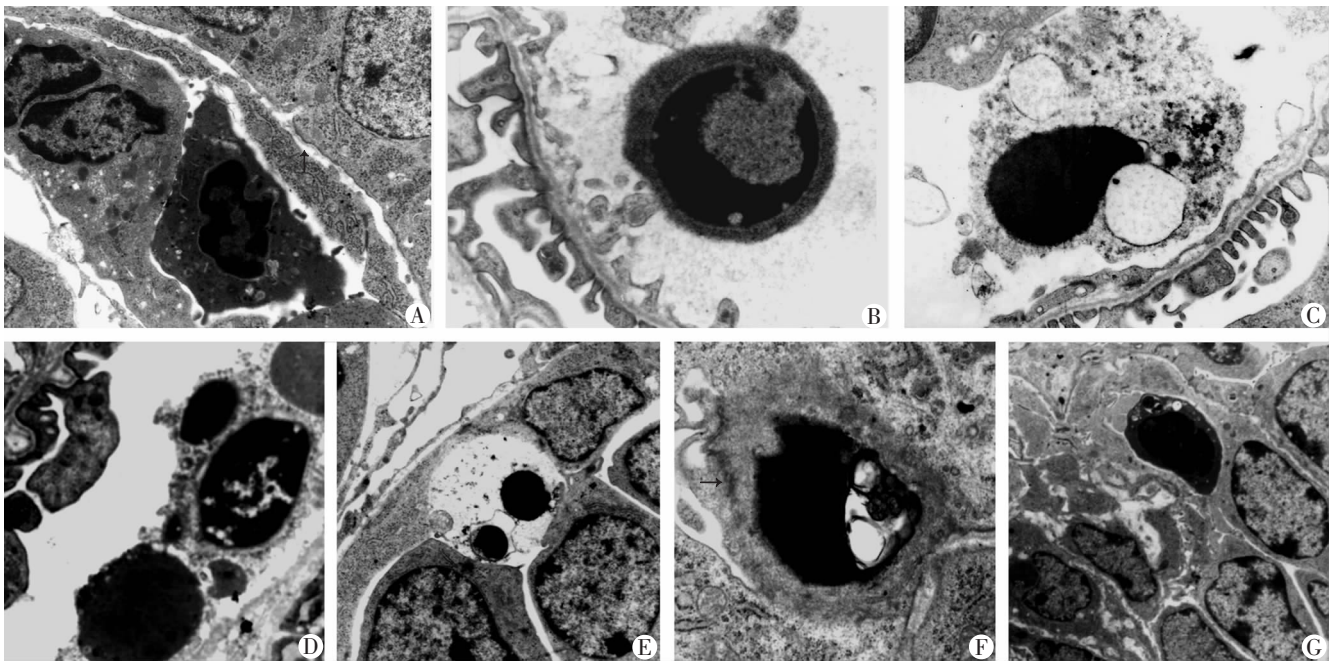
### 2.1 光镜观察

E12 d,肾脏内只见输尿管芽及其分支和生后肾组织,生后肾组织内可见逗号小体和 S 小体。E14 d,出现可辨认的肾小体、近端小管和远端小管,开始出现髓旁肾单位。同时可区分出早期的皮质和髓质。E16 d,肾皮质中肾小体增多,皮质、髓质逐渐增厚,出现髓袢。E18 d,皮质、髓质继续增厚,可见成熟肾小体。

### 2.2 透射电镜观察

2.2.1 肾小体程序性细胞死亡 肾小体,又称肾小球,由血管球和肾小囊组成。肾小体内程序性细胞死亡出现两种形式,即经典凋亡和坏死性凋亡。血管球内皮细胞的凋亡是从 S 小体时期开始的,准确地说是从毛细血管内皮侵入时开始的。此时内皮细胞为矮立方状,孔和内皮的基膜尚未出现,而足细胞的基膜刚刚出现,血管腔非常狭小,可见凋亡细胞皱缩,电子密度高,核染色质集聚(图 1A)。当毛细血管腔出现、滤过屏障成熟时,仍可见内皮细胞经典凋亡,表现为细胞固缩,染色质边聚呈月牙状(图 1B)。在滤过屏障形成之后,内皮细胞肿胀,细胞膜破溃,部分消失,残留的细胞质内出现了空泡结构和固缩了的核染色质碎块(图 1C),此为坏死性凋亡的表现。

肾小囊,又称 Bowman 囊,为肾小管起始部膨大凹陷而成的双层囊。外层为壁层,内层为脏层。壁层细胞既出现了经典凋亡也出现了坏死性凋亡。和内皮细胞一样以经典凋亡为多见,表现为细胞皱缩,核染色质固缩边聚(图 1D)。壁层细胞坏死性凋亡表现为细胞肿胀,细胞膜消失,只残留少量细胞质和固缩的染色质碎块(图 1E)。脏层细胞又称足细胞。足细胞凋亡出现在肾小体发育早期,即完好的滤过屏障出现之前,此时细胞多呈立方形,细胞固缩着色极深,核染色质高度固缩。相对应的内皮细胞尚未成熟,滤过屏障尚未发育完好(图 1F)。晚期或成熟的肾小体内很难见到足细胞凋亡。




A:早期血管球内皮细胞凋亡(×6 000),滤过屏障尚未成熟,足细胞基膜刚出现(↑);B:滤过屏障成熟后血管球内皮细胞凋亡(×6 000);C:血管球内皮细胞坏死性凋亡(×6 000);D:肾小囊壁层细胞凋亡(×5 000);E:肾小囊壁层细胞坏死性凋亡(×5 000);F:足细胞凋亡(×6 000),滤过屏障尚未发育完好(→);G:系膜细胞凋亡(×3 000)

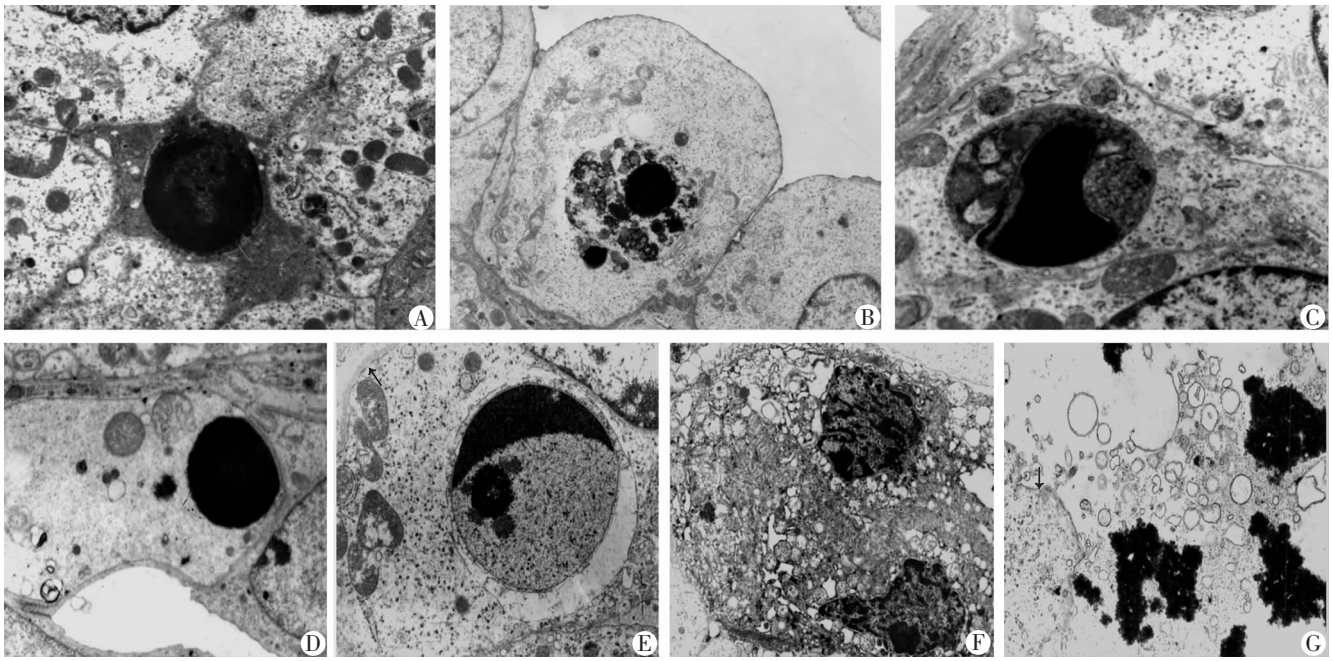
**图 1 透射电镜观察小鼠肾小体细胞凋亡**

肾小球系膜细胞凋亡发现的概率较小，常出现在肾小体发育的中期和晚期。此时毛细血管腔已经出现，系膜细胞凋亡的表现与足细胞相似，细胞皱缩，染色质固缩密集，只是位置不同（图1G）。在所观察的标本中尚未发现足细胞和系膜细胞坏死性凋亡的图像。

2.2.2 肾小管程序性细胞死亡 肾小管包括近端小管、细段和远端小管。在近端小管中未发现任何形式的程序性细胞死亡图像。而肾小管其他部位的程序性细胞死亡出现了3种形式，即经典凋亡、坏死性凋亡和副凋亡。凋亡细胞核染色质固缩、集密常脱落或以凋亡小体形式脱落到小管腔内（图2A），也常常见到小管上皮细胞吞噬邻近细胞凋亡小体的图像（图2B）。早期凋亡的肾小管细胞的突出特点发生在细胞核，表现为染色质局部固缩，细胞皱缩（图2C）。图2D所示为早期细段上皮细胞坏死性凋亡的图像，细胞质肿胀浅淡，少量线粒体等细胞器也肿胀甚至崩解呈空泡状，细胞核染色质固缩，核膜消失，内质网扩张。集合小管细胞坏死性凋亡表现为细胞肿胀，各细胞器如线粒体也呈现出肿胀崩解，染色质固缩边聚呈月牙状（图2E）。同时远端小管上皮还出现了副凋亡的表现，细胞体积增大，细胞内被空泡状线粒体和内质网所充满，核皱缩但染色质无边聚表现（图2F）。尚可见到集合小管腔内含坏死性凋亡细胞碎片及固缩染色质碎块（图2G）。应用细胞分类计数器，对发育中肾单位内的各类凋亡出现的次数进行计数，结果发现经典凋亡最多，占81%，坏死性凋亡占17%，而副凋亡最少，占2%。

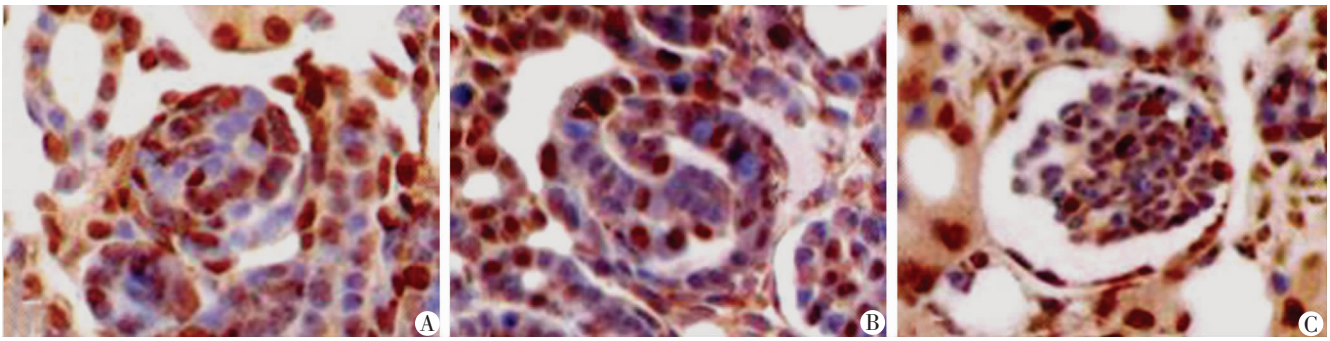
## 2.3 TUNEL染色检测

TUNEL阳性表达定位于细胞核，呈不同程度棕黄色。光镜下在胚胎发育过程中可见明显的TUNEL阳性反应（图3）。随着胚龄的增加，凋亡指数也逐渐增多，E14 d与E16 d分别为[(17.59±3.79)%、(23.12±3.09)%]，在E18 d时达到高峰(29.45±3.34)%，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。



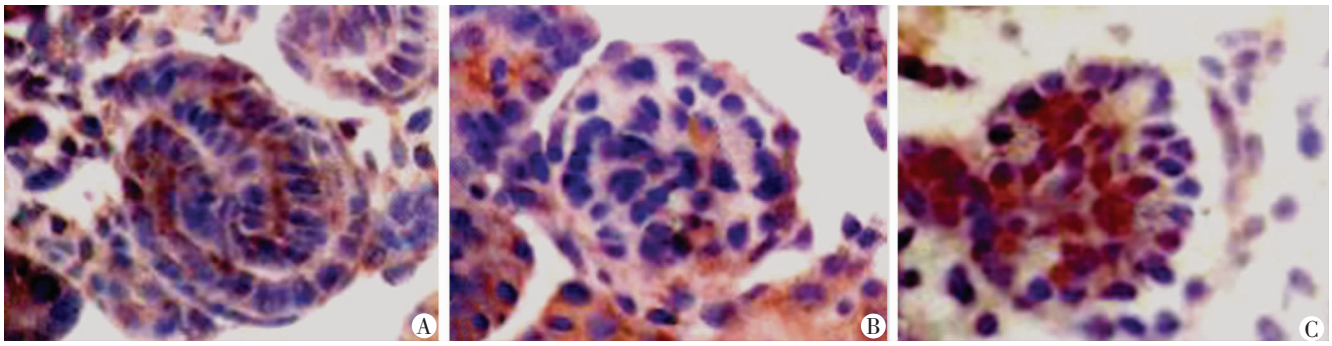

A：肾小管腔内凋亡细胞（×4 000）；B：肾小管上皮细胞吞噬邻近凋亡小体（×5 000）；C：远端小管细胞早期凋亡（×5 000）；D：早期细段坏死性凋亡（×5 000）；E：远端小管坏死性凋亡（×6 000） ↑：小管基膜；F：远端小管副凋亡（×2 500）；G：集合小管腔内含凋亡碎片（×10 000） ↓：小管上皮

**图2 透射电镜观察小鼠肾小管细胞凋亡**




A：E16 d逗号小体TUNEL阳性细胞；B：E18 d S小体TUNEL阳性细胞；C：E18 d成熟肾小体TUNEL阳性细胞

**图3 小鼠胚胎期肾小体TUNEL染色观察** （×400）

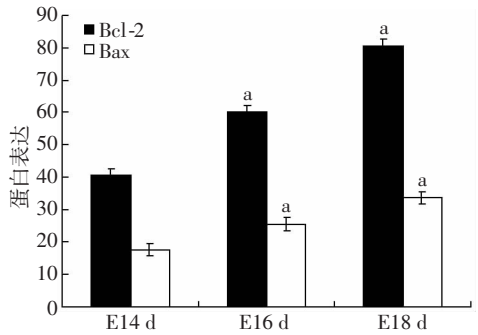



A:E14 d S 小体 Bcl-2 蛋白表达;B:E16 d 毛细血管袢期肾小体 Bcl-2 蛋白表达;C:E18 d 成熟肾小体 Bax 蛋白表达

**图 4　小鼠胚胎期肾小体 Bcl-2 和 Bax 免疫组化观察**　(×400)

### 2.4　Bcl-2 和 Bax 免疫组化染色观察

Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性表达均位于细胞质,可见细小的棕黄色颗粒(图 4)。随着胚胎期肾脏发育成熟 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达均逐渐增加,于胚龄 18 d 达到高峰,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 5)。




a:$P<0.05$,与 E14 d 比较

**图 5　小鼠肾胚胎期肾小体 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达**

## 3　讨论

PCD 是受基因控制的主动性细胞死亡。上个世纪末,人们一直将 PCD 等同于细胞凋亡。近年来,大量研究表明,经典性细胞凋亡只是多种细胞程序性死亡机制当中的一种。此外,还包括自噬性死亡、胀亡、副凋亡、坏死性凋亡等[4-5]。经典细胞凋亡表现为细胞皱缩、染色质边聚、细胞核裂解、细胞膜内陷,形成凋亡小体,但细胞膜完整。副凋亡的典型特征为染色质浓缩,线粒体、内质网肿胀,细胞质空泡化[6]。坏死性凋亡是一种不同于凋亡的新型细胞死亡方式,具有凋亡和坏死的混合型特征。主要表现为细胞膜完整性丧失,线粒体肿胀,自噬,同时其细胞核呈现出凋亡细胞核的表现——细胞核凝聚[7]。本实验通过原位末端标记法在胚胎期小鼠肾脏中检测到了凋亡细胞,随着胚龄的增加,凋亡指数也逐渐增多,在 E18 d 时达到高峰。同时凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 也均呈阳性表达,随着肾脏发育成熟 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达均逐渐增加,但两者比值的变化趋势正好相反,逐渐下降。电镜观察发现,小鼠肾单位发育过程中出现了多种细胞凋亡形式:经典细胞凋亡、坏死性凋亡和副凋亡,其中以经典细胞凋亡为主,坏死性凋亡为辅,副凋亡次之。

构成肾小体的主要细胞有内皮细胞、肾小囊壁层细胞、足细胞和系膜细胞。其中,足细胞和系膜细胞的 PCD 中只有经典凋亡。而内皮细胞和肾小囊壁层细胞的 PCD 要比足细胞和系膜细胞活跃的多。肾小体的发育过程可分为 3 个阶段即原始阶段、生长阶段和成熟阶段[8]。在这 3 个阶段中毛细血管袢的形成和完善以及肾小囊脏、壁层细胞的发育成熟是肾小体发育的中心任务[9]。原始阶段肾小球毛细血管循环尚未建立,滤过屏障尚未成熟。在生长阶段毛细血管循环开始建立,滤过屏障已经发育。观察发现,毛细血管内皮的 PCD 是由经典凋亡和坏死性凋亡组成。经典凋亡从原始阶段出现,并且一直贯穿整个生长期。而坏死性凋亡则在毛细血管腔和滤过屏障出现后才发生。由此推测其意义在于坏死性凋亡崩溃的细胞内容物可以被血流带走,以防止炎症的发生。另一个可发生坏死性凋亡的部位在肾小囊壁层细胞。坏死性凋亡多发生在生长期的肾小体内,从图 2G 可见坏死的细胞内容可经原尿带走。这一推断是否正确尚需进一步确认。

肾小管和集合小管中 PCD 活跃的部位在远端小管、细段和集合小管,并由经典凋亡、坏死性凋亡和副凋亡构成。肾小管内的 PCD 有两个意义,一是促使管腔的形成,二是促进细胞的更新[10]。在发育的肾单位中,近端小管凋亡的超微图像尚无报告,本研究也未发现发育中近端小管细胞凋亡以及其他形式的 PCD 图像。这可能与近端小管细胞单一有关,不需要 PCD 去更换它。PCD 可促进细胞更新,最典型的部位是细段。早期细段上皮细胞是立方形的,管腔十分狭小,通过 PCD 被扁平的细胞所代替[11],本研究结果也证明了这一点,图 2D 所示正是细段上皮细胞坏死性凋亡。与前两种类型的 PCD 相比,副凋亡十分罕见。只在远端小管发育中见到。副凋亡超微结构的特点是染色质浓缩,线粒体、内质网肿胀,细胞质空泡化,本研究与这一描述是一致的。

目前关于PCD的研究是国际上生物学研究的一个热点。但其途径的具体机制尚不十分清楚,它们之间的关系也知之甚少,需要进一步广泛的研究和探讨。清楚认识PCD的潜在机制及其相互联系,不仅有助于人们更好地了解生物发育过程中细胞死亡的作用,而且更有助于人们在肿瘤等疾病治疗中寻找新的靶点。

**参考文献:**


[1] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R, *et al*. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257.

[2] Degterev A, Huang Z, Boyce M, *et al*. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. Nat Chem Biol, 2005, 1(2): 112-119.

[3] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, *et al*. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 3-11.

[4] Hitomi J, Christofferson D E, Ng A, *et al*. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway[J]. Cell, 2008, 135(7): 1311-1323.

[5] Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis [J]. Cell, 2008, 135(7): 1161-1163.

[6] Houwerzijl E J, Blom N R, van-der-Want J J, *et al*. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Blood, 2004, 103(2): 500-506.

[7] van-Doorn W G, Beers E P, Dangl J L, *et al*. Morphological classification of plant cell deaths[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(8): 1241-1246.

[8] Matsuura S, Kondo S, Suga K, *et al*. Expression of focal adhesion proteins in the developing rat kidney[J]. J Histochem Cytochem, 2011, 59(9): 864-874.

[9] Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development[J]. Dev Cell, 2010, 18(5): 698-712.

[10] Kerecuk L, Schreuder M F, Woolf A S. Renal tract malformations: perspectives for nephrologists[J]. Nat Clin Pract Nephrol, 2008, 4(6): 312-325.

[11] 郭敏, 刘玉玲, 孟丽, 等. 小鼠肾脏髓襻细段发育的超微结构[J]. 解剖学杂志, 2001, 24(1): 82-85.


(**收稿**:2011-10-27;**修回**:2011-12-26)

(编辑 吴培红)

# 经验交流

**文章编号**:1000-5404(2012)09-0878-01

## 彩色多普勒超声对小腿肌间静脉丛血栓的诊断分析

张琳娜,杨 植,陈 磊,姜海军 (067000 河北 承德,承德医学院附属医院普外科)

[**关键词**] 彩色多普勒超声;肌间静脉丛;血栓

[**中图法分类号**] R654.404.51 [**文献标志码**] B

小腿肌间静脉丛血栓是下肢深静脉血栓的好发部位,其症状比较隐匿,在临床上常被忽视,由于不能得到及时诊断和治疗,约有20%血栓可向上蔓延,累及胭静脉及其近端静脉,引起严重并发症[1]。早期发现小腿肌间静脉丛血栓对临床治疗有重要意义。本研究对我院2010年1月至2011年1月确诊为小腿肌间静脉丛血栓的89例患者的检查资料及随访情况进行分析,探讨彩色多普勒超声在诊断小腿肌间静脉丛血栓中的应用价值。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

男性67例,女性22例,年龄22~75(63.5±1.2)岁。有手术病史22例,长期卧床18例,外伤史17例,突发下肢肿胀或疼痛不适11例,肿瘤7例,既往下肢深静脉血栓愈后6例,坐飞机或长途车4例,动脉栓塞后3例,醉酒腿部受压1例。绝大部分患者出现不同程度的肿痛、酸胀等症状,仅有少数患者有轻微不适感。

#### 1.2 仪器

采用美国SonoSiteTITAN彩色多普勒超声诊断仪,线阵探头,频率5.0~10.0 MHz,对于肢体肿胀明显、体型肥胖者使用3.5~5.0 MHz凸阵探头。

#### 1.3 方法

患者采取仰卧位或者俯卧位,对于外伤体位配合困难者尽量屈膝,探头置于深静脉走行部位,先常规扫查下肢主干深静脉,然后对患侧小腿纵横扫查。由于小腿肌间静脉自然变异较多,发现肌间静脉丛增宽后,尤其患者诉疼痛明显部位,必须多角度、多方位详细扫查管腔内部回声、管腔透声状况、加压后管径有无变化及血流信号改变情况。操作过程中同时要与对侧进行对比观察。

### 2 结果

66例为单侧单纯肌间静脉丛血栓,其中左侧35例,右侧31例;双侧单纯肌间静脉丛血栓12例;9例合并同侧主干深静脉血栓,2例合并双侧主干深静脉血栓。急性小腿肌间静脉丛血栓彩色多普勒超声表现:早期静脉管腔明显扩张,管腔内充填低回声,呈不规则梭形或管状低回声,可迂曲成枝状,横断面表现为肌间多个圆形或椭圆形低回声,探头加压管腔不能完全压闭或部分压闭,管腔内未探及血流信号(图1);陈旧性血栓表现为管壁内膜不规则增厚,管腔内可见少许中强回声,管腔部分压闭,血流信号变细。

(下转882页)

[**通信作者**] 张琳娜,E-mail: zhangln_cd@126.com