

抗体交联作用促进 Nephrin 簇集于细胞膜脂筏微区

秦晓松* 刘勇 佟威威 岳丹 刘建华 刘岩

(中国医科大学附属盛京医院检验科, 沈阳 110004)

摘要 为研究 nephrin 在细胞膜上的表达特点, 构建 nephrin 和 podocin 的表达质粒, 转染 COS-7 细胞。采用胞吞摄取和抗体交联实验, 发现 nephrin 的内吞囊泡与 GM1 神经节苷脂的十价配体 CTxB 及 podocin 囊泡共存; 特异性抗体交联促进 nephrin 与脂筏(lipid raft)标记物 CTxB 共同聚集于脂筏微区; 蔗糖密度梯度离心显示无论是表达 nephrin 的 COS-7 细胞还是大鼠肾小球细胞中部分 nephrin 与脂筏标志物小窝蛋白(caveolin)等均存在于去污剂抵抗膜成分中。结果提示 nephrin 为脂筏相关蛋白, 并且特异抗体交联促进 nephrin 聚集于脂筏微区。

关键词 nephrin; 脂筏; 抗体交联

肾小球裂孔隔膜(slit diaphragm, SD)是一种特异的细胞内连接, 横跨在足细胞互相交错的足突间, 约 20~50 nm 宽。对维持肾小球滤过屏障起到了非常重要的作用^[1]。Nephrin 是 SD 的主要组成蛋白, 由 1 241 个氨基酸所组成、分子量 180 kDa, 分为细胞外、跨膜区、胞内段三部分, 其中氨基酸端在胞外, 羧基端在胞内, 属免疫球蛋白超家族成员。Nephrin 的细胞外段通过趋同作用桥接于相邻足突间, 形成了拉链样细胞间连接^[2], 因而 nephrin 在足突部位的膜表达是决定 SD 完整性的非常重要的因素, 发生蛋白尿的重要机制之一即是此调节过程的失败。在严重的、早发的芬兰型先天性肾病综合征病人中, 已发现了超过 50 种的 nephrin 突变, 在较温和的微小病变型肾病中也发现了 nephrin 的突变^[3]。因而, 研究 nephrin 在足突膜上的表达和定位有助于对这些疾病的发病机制的进一步认识。本文对 nephrin 在细胞膜的具体定位进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 质粒载体

pcDNA3.1 nephrin V5、pcDNA3.1 HA-podocin、pcDNA3.1 nephrin-GFP 由本室先前构建。全长 nephrin cDNA (NM_004646)被克隆至 pcDNA3.1/V5/His 载体(Invitrogen)构建成 pcDNA3.1 nephrin V5^[4]。将 podocin cDNA (NM_014625)氨基端插入 HA 标签后克隆至 pcDNA3.1 载体(Invitrogen)构建成 pcDNA3.1 HA-podocin^[5]。pcDNA3.1 nephrin-GFP 为由 pEGFP N3 (BD Biosciences)扩增 GFP 片段后插入 pcDNA3.1 nephrin 中 nephrin 的编码序列 3 280 核苷酸处^[6]。所

得克隆被转化至 *E. coli*, 阳性克隆质粒被扩增, 并经酶切及 ABI 377 DNA Sequencer 正反双向测序验证。pCAG EGFP-GPI (Dr.Kondoh惠赠, Osaka University)。

1.2 细胞培养和转染

COS-7 细胞(Riken RCB0539)培养于 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma), 培养液加入 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素。细胞生长于 75 cm² 培养瓶置 37 °C 的湿化 5% CO₂ 培养箱。用于转染的细胞生长于 12 孔板内的盖玻片或 6 cm 培养皿(Nunc)上, 传代 24~48 h 后, 细胞长满 60% 时, 应用 1 μg 的质粒 DNA: 3 μl Transfast Reagent (Promega)依据说明进行转染。转染 3 h 后, 加入含小牛血清的新鲜 DMEM 培养液。

1.3 抗体及试剂

实验中一抗分别为: 多克隆兔抗人 nephrin 氨基端(胞外段)抗体本室先前制备^[4]。小鼠单克隆 Rhodamine-HA 抗体购于 Sigma 公司, Alexa Flour 488/594- 标记的 Cholera toxin subunit B (CTxB)购于 Invitrogen 公司。二抗有 FITC/Texas-Red 标记的羊抗兔 IgG, 购于 Jackson Immuno Research。

1.4 内吞摄取实验

实验前 1 h 将表达 nephrin-V5 和 HA-podocin 的活体 COS-7 细胞置于无血清 DMEM 中。然后用冷 PBS 小心清洗, 表面标记 1 : 80 抗 nephrin 氨基端(胞外段)抗体 / 和 Alexa Flour 594-CTxB, 4 °C, 30 min。注意保持低温, 避免 nephrin 的内吞过程启动。然后

收稿日期: 2010-02-03 接受日期: 2010-03-23

辽宁省自然科学基金(No.20082095)和辽宁省高校科研计划项目资助

* 通讯作者。Tel: 024-96615-72116, E-mail: qinxs@sj-hospital.org

将细胞置于 37 °C 水浴中, 30 min。然后加入 0.2 mol/L 醋酸, 0.5 mol/L NaCl (pH 3.0) 以清除细胞膜表面残留的标记物^[7]。立即 4% 多聚甲醛室温固定 15 min 终止 nephrin 内吞。PBS 缓冲液清洗 3 次, 再经 0.1% Triton X-100 室温作用 3 min, PBS 清洗后, 用含 1% 胎牛血清的 PBS 液封闭 30 min。用 1:500 的 FITC 标记的羊抗兔 IgG/ 和 Rhodamine-HA 小鼠单克隆抗体, 37 °C 温育 1 h。温育结束后, 经 PBS 洗涤, 用 Prolong Antifade (Molecular Probes) 封片。

1.5 去胆固醇处理

细胞用含有 10 mmol/L Methyl β -cyclodextrin (M β CD) 的无血清 DMEM 37 °C 预处理 30 min^[8], 之后进行相关实验。注意在整个实验过程中的清洗、稀释抗体步骤都要应用 M β CD 溶液。

1.6 Nephrin 抗体交联实验

重组质粒 pcDNA3.1 nephrin-V5 和 pCAG EGFP-GPI 转染 COS-7 细胞 48 h 后, 无血清培养液润洗, 1:80 nephrin 兔多克隆抗体 / 和 1:1000 Alexa Flour 488-CTxB 12 °C 温育 1 h。4 °C PBS(+) 清洗 3 次, 用 1:500 的 Texas-Red 标记的羊抗兔抗体 12 °C 温育 1 h, 冷 PBS 缓冲液清洗 3 次, 4% 多聚甲醛室温下固定 15 min。PBS 清洗后, 80% 甲醇和 20% 丙酮后固定, -20 °C, 5 min^[9]。

1.7 Bead-Cell 附着实验

用抗 nephrin 胞外段抗体包被 6 μ m 直径的乳胶珠^[10], 具体方法为 10⁷ 个乳胶珠溶于 PBS 缓冲液, 加入 10 μ g 纯化抗体, 终体积为 1 ml。室温下轻柔混匀 90 min。1.5 ml PBS/1% BSA 阻断 30 min, PBS 清洗 3 次后, 乳胶珠经 PBS 重悬, 加入表达 Nephrin-GFP 的 COS-7 细胞内, 比例为 2 \times 10⁵ 个细胞加 1 \times 10⁵ 个乳胶珠, 温育 30 min, 37 °C。然后 4% 多聚甲醛固定, 封片。

1.8 免疫荧光显微镜技术

所有图像均经 PASCAL 共聚焦显微镜 (Carl Zeiss) 63 \times 油浸物镜下观察并摄取图象。用波长 488 nm 的激发光观察 FITC、Alexa Flour 488 或 GFP 融合蛋白的绿色荧光; 594 nm 的激发光观察 Alexa Flour-594、Texas Red 或 Rhodamine 标记的红色荧光。

1.9 蔗糖梯度离心

为分离细胞抗去污剂膜成分, 细胞裂解液或者大鼠肾小球组织经超声匀浆。匀浆产物 1 000 g 离心 10 min, 取上清液进一步 200 000 g 离心 30 min。在 3 ml 含 0.2% Triton X-100 的 TNE 缓冲液 (250 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, pH 8.0, 蛋白酶抑制剂)^[5] 中重悬, 重复 200 000 g 离心 30 min, 加入

0.3 ml TNE 缓冲液重悬, 加入等体积的 80% 蔗糖液, 调整溶液为 40% 蔗糖液。上层依次覆以梯度蔗糖液 (1.6 ml 35% 蔗糖, 0.8 ml 15% 蔗糖, 0.4 ml 5% 蔗糖, 0.2 ml TNE)。4 °C, 250 000 g 离心 24 h。从上往下依次收集溶液, 最上层 (低浓度) 记为第一层, 每次 0.2 ml, 共 17 等份。

1.10 免疫印迹

将加热煮沸的 20 μ l 蛋白质样品加样至 10% SDS-PAGE 胶上, 经 160 mA 恒流转膜 60 min。用含 50 g/L 的脱脂奶粉的 TBST 封闭液室温振荡封闭 2 h, 以 TBST 洗膜后, 依次滴加抗体, 4 °C 温育过夜, 洗膜 3 次, 每次 15 min。1:2 000 的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 室温振荡反应 60 min, 于暗室曝光到 X 线胶片上, 显影、定影。

2 结果

2.1 Nephrin 内吞可被 M β CD 抑制

M β CD 为一种去胆固醇试剂, 可去除细胞膜的脂质成分。结果发现, 经 M β CD 处理的细胞 nephrin 内吞受到抑制。在对照细胞内, nephrin 显示为清晰的粗点状颗粒, 广泛分布在细胞浆内, 与 CTxB (图 1A) 部分共存; 在同时表达 nephrin 和 podocin 的 COS-7 细胞中, 内吞的 nephrin 呈明亮的点状荧光与 podocin 共存 (图 1B)。Nephrin-podocin 双染的囊泡表现出与 nephrin-CTxB 内吞相似的形态和动力学特点。而经 M β CD 处理后, 同 CTxB 相似, nephrin 仅有少部分进入细胞浆内, 大部分滞留于细胞膜和细胞膜下, 与 podocin 极少共存 (图 1)。

2.2 Nephrin 通过侧方交联组配形成微区

为进一步探明 nephrin 的细胞膜定位, 我们进行了抗体交联实验。当使用特异抗体或者 GM1 神经节苷脂的十价配体 CTxB 后, nephrin 和 GM1 分别被聚簇于细胞表面, 呈现出分散的斑状荧光, 而且两者荧光的高度重叠 (图 2A)。特异抗体诱导的 nephrin 簇集也引起了另一个脂筏标记物 GPI-GFP 的簇集, 两者的斑片状荧光高度重叠 (图 2B)。

2.3 清除细胞膜脂质可影响交联微区域形成

我们进一步研究了 nephrin 交联微区域形成的条件。在抗体包被的乳胶珠与 GFP-nephrin 转染的 COS-7 细胞共同温育后, 我们发现在细胞表面与乳胶珠接触部位出现了断续的、粗点状明亮荧光, 表现出细胞膜的局部簇集。而在经 M β CD 处理后, 细胞表面与乳胶珠接触部位为连续的、光滑的线状荧光 (图 3B)。

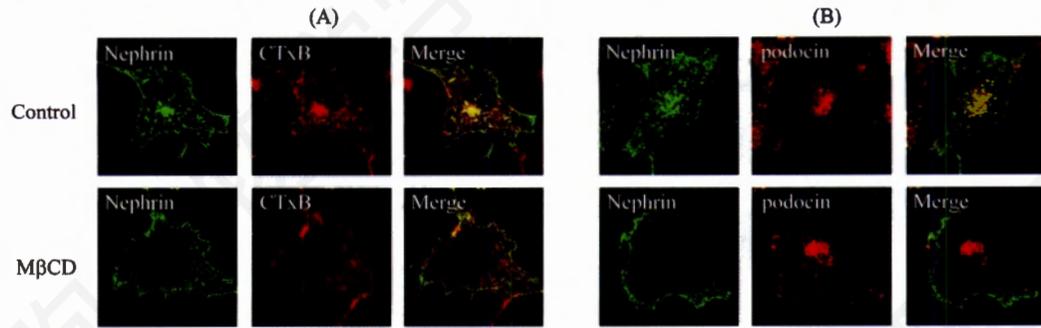


Fig.1 Effects of M β CD on nephrin internalization (630 \times)

Surface-labeled nephrin was taken up into COS-7 cells, in control media (control) or in media supplemented with cholesterol-depleting drug M β CD. M β CD reduced nephrin internalization and colocalization with CTxB (A) and podocin (B).

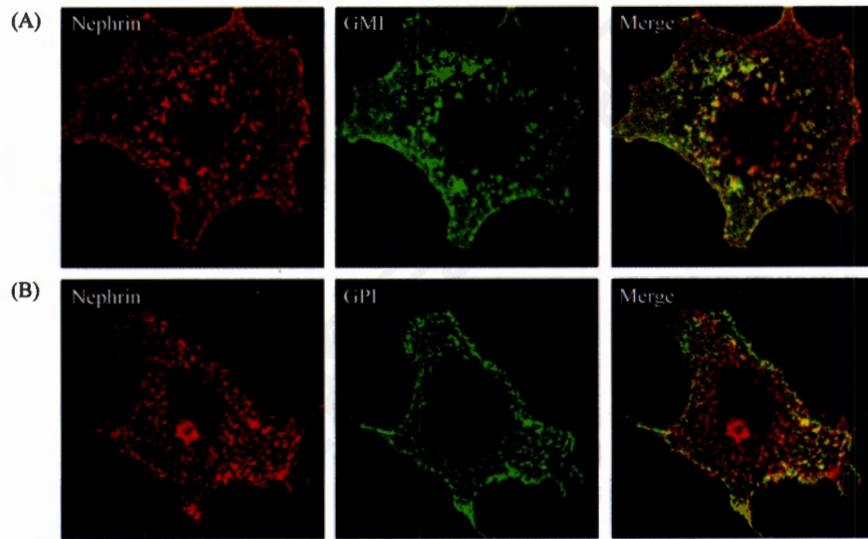


Fig.2 Cross-linking induced copatching of nephrin with the raft markers

A: copatching of nephrin (red) and GM1 (green). Surface nephrin was cross-linked by the nephrin antibody and Alexa Flour 488-CTxB. CTxB is a pentameric ligand that clusters its binding-partner, the ganglioside GM1; B: surface nephrin was cross-linked by the nephrin antibody. Cluster of GFP-GPI (green) was induced by copatching with nephrin (red).

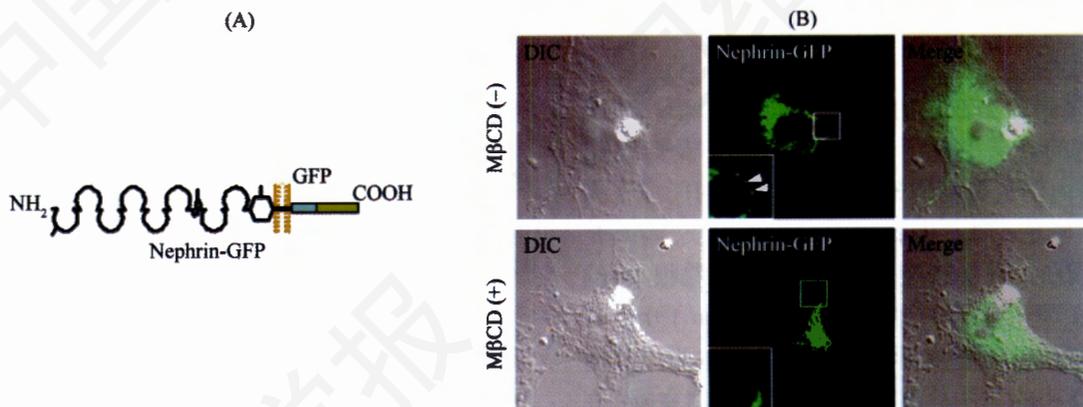


Fig.3 Nephrin-GFP clusters upon its ectodomain cross-linking in cholesterol dependent manner

A: schematic representation of nephrin-GFP constructs. Nephrin consists of an extracellular eight Ig motifs followed by a transmembrane spanning domain, and a 154 amino acid cytoplasmic C-terminal tail. A 230 amino acid derived from the EGFP sequence was inserted by PCR underneath of transmembrane spanning domain. B: cell-beads adhesion assay. Attachment of nephrin antibody coated-latex beads induced nephrin clustering at the cell-bead contact sites on nephrin-GFP expressing COS-7 cells (arrowheads). Treatment of M β CD inhibited nephrin accumulation at contact sites: Images are differential interference contrast (DIC, left), fluorescence (middle), and merged (right).

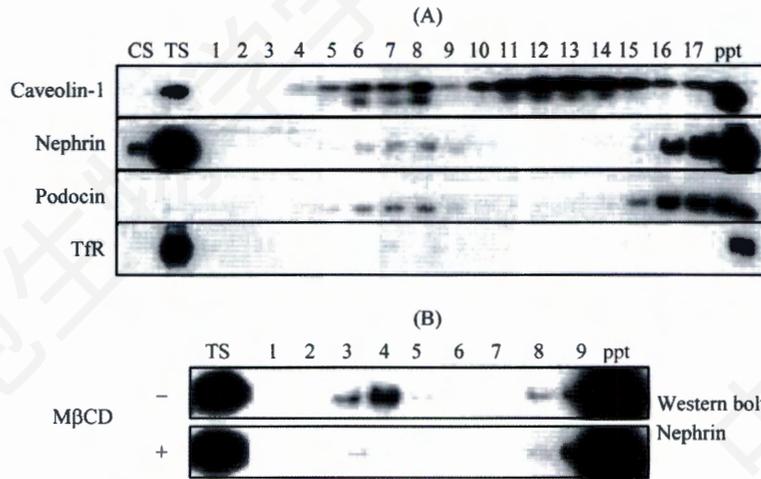


Fig.4 Nephrin constitutes a specialized microdomain that co-internalizes with podocin

A: nephrin co-fractionated to the rafts with podocin. Ultracentrifugation of Triton X-100 insoluble materials from isolated rat glomeruli demonstrated that nephrin and podocin float in the low-buoyant density fractions, whereas a non-raft marker transferrin receptor (TfR) segregates into the heavy bottom fractions. **B:** raft partitioning of nephrin is cholesterol dependent. COS-7 cells either mock-treated or treated with M β CD and then solubilized with 0.2% Triton X-100. M β CD remarkably reduced the amounts of DRM-associated nephrin. TS: Triton-soluble supernatant; ppt: pellet; DRM: detergent resistant membrane; CS: crude supernatant derived from lysate after ultracentrifuge at 100 000 g, 1 h.

2.4 Nephrin 属于脂筏微区组成成分

将大鼠肾小球裂解液经 Triton X-100 处理后, 不溶成分在 4 °C 进行蔗糖梯度密度离心, 结果发现, nephrin 漂浮于低密度区, 集中在第 6、7、8 部分, 即 15% 及 15% 和 35% 蔗糖交界区, 与脂筏标志物小窝蛋白(caveolin)和 podocin 相似, 以胆固醇依赖的方式同位于去污剂抵抗膜(detergent resistance membrane, DRM)区(图 4A)。同样, 在表达 nephrin 的 COS-7 细胞裂解液中, 经蔗糖密度梯度离心, 在低密度 DRM 区有 nephrin 的存在, 而经 M β CD 处理后, 处于 DRM 区的 nephrin 大大减少(图 4B)。

3 讨论

脂筏是指膜脂双层内含有特殊脂质及蛋白质的微区, 微区的外层主要含有鞘脂、胆固醇及 GPI 锚固蛋白, 膜内侧也有相似的微区, 与外侧的脂质不完全相同, 主要是在此区有许多酰化的蛋白质, 特别是信号转导蛋白。两层脂筏是偶联的^[11]。脂筏很小, 约 10~200 nm, 是动态变化的, 半寿期 0.1 ms~1.0 s^[12], 很可能被任何内吞囊泡所捕获。本研究中采用蔗糖密度梯度离心的方法分离脂筏成分, 并依据文献^[5]在传统的 5% 和 30% 密度之间增加了 15% 密度梯度, 相应调整 30% 为 35% 密度, 增加了分层密度, 更有利于观察脂筏区域定位。

Podocin 基因 NPHS2 位于 1q22-31, 由 383 个氨基酸组成, 系足细胞膜脂筏相关蛋白 stomatin 家族成

员, 不同动物种属间 podocin 氨基酸序列亦为高度保守, 提示 podocin 对足细胞功能具有重要作用; podocin 呈发夹样结构插入足细胞膜, 与锚定裂孔隔膜蛋白于足突细胞骨架、维持滤过屏障完整有关^[13]。

Nephrin 的细胞外段能与 nephrin 自身的细胞外区之间发生趋同性相互作用, 这表明, nephrin 在足突裂孔隔膜上通过反式相互作用形成一种异寡聚物受体复合物, 参与 SD 拉链状结构的形成, 维持足细胞正常结构和 SD 的完整性^[14]。我们发现 nephrin 在内吞过程中, 不仅与脂筏相关分子 GM1 共定位, 而且与 podocin 囊泡也高度重合。用特异抗体交联 nephrin 以模仿 nephrin 与细胞外配体相互作用的情况, 也诱发了与 GM1 和 GPI 相似的有序液相(liquid-ordered phase)膜微区聚集。而且无论这种共定位还是抗体诱导的交联都是胆固醇依赖的, 当去除细胞膜的胆固醇, 这种共定位或交联产生的微区不复存在。

我们以往的研究发现, 用转染的 COS-7 细胞和分离出的大鼠肾小球细胞裂解液进行共免疫沉淀分析, nephrin 能将 podocin 共沉淀, 反之亦然。用 COS-7 细胞和分离出的大鼠肾小球细胞裂解液进行 GST-pull down 实验更进一步表明了 nephrin 的羧基端与 podocin 彼此间存在物理上的相互作用^[15]。

本文通过体内和体外研究得到的资料都表明 nephrin 与脂筏微区相关, nephrin 和 podocin 一样, 具有亲脂筏脂质环境的特点, nephrin 和 podocin 共属于脂筏微区, 加上脂筏微区聚集的其他蛋白, 借助于脂

筏这个多蛋白质聚集的微环境, 便于相互作用。此外, 由于脂筏的环境有利于蛋白质的变构, 形成有效的构象, 这些可能都是肾小球 SD 膜维持结构和功能完整性的必要条件。而且脂筏微区的这种稳定特性有助于信号平台的组建并使其通过脂筏相关途径进入细胞^[16], 提示 nephrin 很可能通过脂筏相关途径进行细胞内循环, 参与信号转导, 对肾小球裂孔膜发挥滤过功能, 防止蛋白尿的发生起重要作用, 值得进一步研究。

参考文献(References)

- 1 Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 2006; 354(13): 1387-401.
- 2 Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108(11): 1583-7.
- 3 Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1(4): 575-82.
- 4 Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, *et al.* Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(14): 7962-7.
- 5 Shono A, Tsukaguchi H, Yaoita E, Nameta M, Kurihara H, Qin XS, *et al.* Podocin participates in the assembly of tight junctions between foot processes in nephrotic podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(9): 2525-33.
- 6 秦晓松, 刘勇, 塚口裕康. 人 Nephrin -GFP 融合蛋白真核表达载体的构建和鉴定. *医学分子生物学杂志* 2010; 7(1): 28-32
- 7 Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol Biol Cell* 2003; 14(2): 417-31.
- 8 Keller P, Simons K. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 1998; 140(6): 1357-67.
- 9 Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 1998; 141(4): 929-42.
- 10 Lowin-Kropf B, Shapiro VS, Weiss A. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 1998; 140(4): 861-71.
- 11 Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000; 275(23): 17221-4.
- 12 Hancock JF. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(6): 456-62.
- 13 Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2(5): 271-82.
- 14 Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(4): 918-26.
- 15 秦晓松, 塚口裕康. Nephrin 和 podocin 细胞内共定位及相互作用研究. *实用儿科临床杂志* 2010; 25(17): 1321-5.
- 16 Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(3): 185-94.

Nephrin Clustered in Lipid Raft-associated Microdomain on the Cell Membrane by Antibody Induced Cross-linking

Xiao-Song Qin*, Yong Liu, Wei-Wei Tong, Dan Yue, Jian-Hua Liu, Yan Liu

(Department of Laboratory Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract To explore the expressing character of nephrin on cell membrane, constructed plasmid vectors expressing nephrin, podocin. After COS-7 cells were transfected, internalization assay and antibody induced cross-linking assay were performed. A colocalization of nephrin and CTxB or podocin were found in COS-7 cells. Antibody induced cross-linking assay showed nephrin colocalized with raft markers. After sucrose floatation gradient centrifugation nephrin floated in detergent resistant membrane fraction together with caveolin and podocin but not transferrin. Results suggest that nephrin is a raft-associated protein and can be recruited by antibody cross-linking.

Key words nephrin; raft; antibody induced cross-linking

Received: February 3, 2010 Accepted: March 23, 2010

This work was supported by the Liaoning Natural Science Foundation (No.20082095) and Liaoning Colleges and Universities Science and Research Program

*Corresponding author. Tel: 86-24-96615-72116, E-mail: qinxs@sj-hospital.org