

Nephrin 分子细胞内吞转运途径的研究

秦晓松* 刘勇 吴丽娜 刘建华 王丹丹

(中国医科大学附属盛京医院检验科, 沈阳 110004)

摘要 为研究 nephrin 分子在细胞内的转运途径, 探讨其在维持肾小球裂孔膜完整性上的作用, 构建了 nephrin 真核表达载体, 并转染至 COS-7 细胞内, 应用免疫荧光三重标记的方法, 分别进行细胞内及细胞表面的荧光标记, 联合笼型蛋白介导的内吞(clathrin-mediated endocytosis, CME)和脂筏介导的内吞(raft-mediated endocytosis, RME)标记物, 通过共聚焦显微镜对裂隙膜分子 nephrin 在不同时间点细胞内的内吞转运特点进行研究。结果发现在转运启动 2 min 时, 68.44%±4.65% 的 nephrin 通过 CME 途径进行细胞内转运; 在 20 min 时, 65.24%±4.02% 的 nephrin 以 RME 途径进行转运, 并且两种转运途径均可被相关途径抑制物所阻断。表明 nephrin 通过两种途径进行细胞内转运, 提示不同的转运途径可能与其实现不同功能有关。

关键词 nephrin; 免疫荧光技术; 蛋白质转运

足细胞裂孔膜(slit diaphragm, SD)在肾小球滤过屏障中的重要性越来越受到人们的重视, nephrin 作为裂孔膜的主要组成分子, 其结构和功能也成为研究的焦点。在家族性肾病综合征病人中, 已发现了超过 70 种的 nephrin 突变^[1], 研究发现, 足突细胞的细胞膜和 SD 是通过内吞实现成分蛋白循环的^[2], 肾病患者足突细胞的内吞细胞器增加, nephrin 在融合的足突间表达减少或定位错误^[3,4]。这些发现提示 nephrin 表达过程中的时间、空间调节对维持 SD 完整性起到了关键作用。因而, 研究 nephrin 在 SD 膜上的动态表达及细胞内转运过程对了解这些疾病的发病机制就显得非常重要。哺乳动物细胞膜成分的内吞摄取是通过两种途径进行的, 其一是笼型蛋白介导的内吞(clathrin-mediated endocytosis, CME), 另一途径是不依赖笼型蛋白的、脂筏介导的内吞(raft-mediated endocytosis, RME)^[5]。本文对 nephrin 的细胞内吞途径进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 质粒载体的构建

全长 nephrin cDNA(NM_004646)被克隆至 pcDNA3.1/V5/His 载体(Invitrogen Corp.)构建成 pcDNA3.1 nephrin V5^[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。

1.2 细胞培养

COS-7 细胞(Riken RCB0539)培养于 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma), 培养液中加入 10% 的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素。细胞生长于 75cm² 培养瓶, 37°C 5% CO₂ 培养箱内培养。

1.3 细胞转染

用于转染的细胞生长于 12 孔板内的盖玻片上, 传代 24~48 小时后, 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 小时后, 加入含小牛血清的新鲜 DMEM 培养液。

1.4 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, 制备: 首先扩增 nephrin 第 22~240 位氨基酸部分, 并克隆至 His-tag 载体内, 转化 *E.coli* 后, 用纯化的 Nephrin-His 融合蛋白免疫家兔^[7], 抗原位点为 nephrin 氨基端部分。单克隆小鼠抗 V5 抗体、Alexa Flour 633- 标记的人 transferrin (TfR)、Alexa Flour 488/594- 标记的 Cholera toxin subunit B (CTxB)均购于 Invitrogen 公司。二抗有 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 购于 Jackson Immuno Research; Alexa Flour 633- 标记

收稿日期: 2010-05-21 接受日期: 2010-07-22

辽宁省自然科学基金(No.20082095)和辽宁省高校科研计划(No. L20100610)资助项目

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

的羊抗兔 IgG、Alexa Flour 594- 标记的羊抗小鼠 IgG 购于 Invitrogen 公司。

1.5 内吞摄取实验

实验前 1 小时将表达 nephrin-V5 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 1:500 Alexa Flour 633-Tfn 或 Alexa Flour 488/594-CTxB, 4°C, 30 min。注意保持低温, 避免 nephrin 的内吞过程启动。然后将细胞置于 37°C 水浴中, 启动内吞摄取过程并计时。在指定的时间点(2 min/20 min)加入 0.2 mmol/L 醋酸, 0.5 mmol/L NaCl (pH3.0) 以清除细胞膜表面残留的标记物^[8]。然后立即以 4% 多聚甲醛室温固定 15 min 终止 nephrin 内吞。

1.6 脱钾或去胆固醇处理

脱钾[简称 K⁽⁻⁾]: 细胞用含有 10 mmol/L HEPES 和 20 mmol/L 碳酸钠(pH7.2)的无血清 DMEM 清洗后, 加入水 1:1 稀释的无血清 DMEM, 37°C, 5min。然后加入不含 KCl 的缓冲液[含 140 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 1g/L D- 葡萄糖(pH7.4)], 37°C, 30 min^[9]。去胆固醇: 细胞用含有 10 mmol/L Methyl β-cyclodextrin(MβCD) 的无血清 DMEM 37°C 预处理 30 min^[10]。注意在整个实验过程中的清洗、稀释抗体步骤都要相应应用 K⁽⁻⁾ 或 MβCD 溶液。

1.7 间接免疫荧光显微镜技术

转染 48 小时后, 细胞用于间接免疫荧光检测。

细胞内染色时, 细胞经 PBS 清洗后即被用 4% 多聚甲醛室温下固定 15 min, PBS 缓冲液清洗 3 次, 0.1% Triton-X 100 室温作用 3 min, PBS 清洗后, 用含 1% 胎牛血清的 PBS 封闭 30 min。接下来加入相应的一抗、二抗。

细胞内吞实验时, 4%多聚甲醛室温下固定15 min 结束内吞过程后, 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 封闭 30 min。相应二抗 37°C 孵育 1h。

二抗孵育结束后, 经 PBS 洗涤, 用 Prolong Antifade (Molecular Probes) 封片。

1.8 共存和内吞的定量分析

所有图像均经 PASCAL 共聚焦显微镜(Carl Zeiss, Jena, Germany) 63 × 油浸物镜下观察并摄取图象。用波长 488 nm 的激发光观察 FITC 或 Alexa Flour-488 标记的绿色荧光; 594 nm 的激发光观察 Alexa Flour-594 标记的红色荧光。633 nm 的激发光观察 633- 标

记的蓝色荧光。图像应用 Image Pro Plus Software (Media Cybernetics, MD) 进行细胞内共存定量分析, 每个实验组计数 20 个细胞。

2 结果

2.1 内吞的 nephrin 存在于不同囊泡中

nephrin 在内吞摄取进行 2 min 时, 一部分进入细胞浆内, 表现为细胞膜下分布的细小颗粒, 大部分仍停留在细胞膜(图 1A)。内吞的 nephrin 仅部分与 CME 途径标记物 Tfn(10.22%±1.10%)或 RME 途径标记物 CTxB(13.95%±2.09%)共存(图 1B)。当内吞进行到 20min 时, 原位于细胞膜部分的 nephrin 大部分进入到细胞内, 广泛分布于从细胞膜下到核周的细胞浆内, 形成典型的粗点状分布(图 1A), 其中 13.18%±1.75% 与 Tfn 共存, 57.50%±3.51% 与 CTxB 共存, $P<0.05$ (图 1B)。

2.2 nephrin 的内吞转运可被 K⁽⁻⁾缓冲液和 MβCD 抑制

为进一步明确 nephrin 通过何种内吞转运途径进入细胞内, 我们采用了两种化学抑制剂: K⁽⁻⁾缓冲液和 MβCD 分别处理细胞, 并进行 nephrin 内吞过程的观察。结果发现, K⁽⁻⁾缓冲液和 MβCD 在 2 min 和 20 min 时, 对 nephrin 的内吞有不同程度的抑制, nephrin 不同程度滞留于细胞膜上(图 2A)。将对照组的内吞量设为 1, K⁽⁻⁾缓冲液对 nephrin 内吞的抑制比例分别为: 68.44%±4.65% (2 min)和 47.98%±4.84% (20 min), $P<0.05$; MβCD 处理对 nephrin 内吞的抑制比例分别为: 49.52%±5.27% (2 min)和 65.24%±4.02% (20 min), $P<0.05$ (图 2B)。

2.3 nephrin 通过两种途径被内吞摄取

接下来我们研究了经 K⁽⁻⁾缓冲液或 MβCD 处理的活 COS-7 细胞 nephrin 在内吞不同时间点与 CME 和 RME 途径标记物的共存情况。在内吞启动 2 min 时, 分别有 19.2%±2.89% 和 10.8%±2.01% 与 CTxB 共存, $P<0.05$ (图 3A, 图 3B); 1.90%±0.83% 和 7.92%±1.79% 与 Tfn 共存, $P<0.05$ (图 3C, 图 3D)。当内吞进行到 20 min 时, 分别有 67.25%±3.69% 和 24.30%±4.04% 与 CTxB 共存, $P<0.05$ (图 3E, 图 3F); 7.83%±1.39% 和 8.58%±1.75% 与 Tfn 共存(图 3G, 图 3H)。

3 讨论

内吞是细胞调控表面受体数量、细胞信号, 受体转换和持续时间及信号的性质的基本机能, 在哺乳

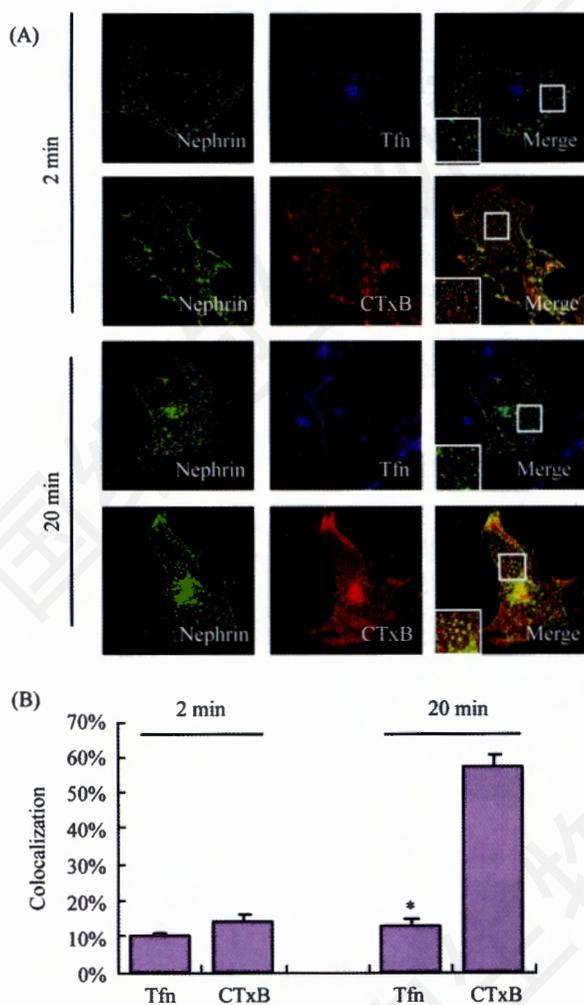


Fig.1 Nephrin internalization with endocytic markers (630×)

A: internalized nephrin colocalized with endocytic markers of CME (Tfn), RME(CTxB) at different degree at certain time point. Insets show magnified view of boxed areas; B: the histogram showed quantification of colocalization. *Compared with CTxB, $P < 0.05$.

动物细胞中, 细胞膜成分的内化主要通过两种途径完成: 笼型蛋白介导的内吞(CME)和不依赖笼型蛋白的、脂筏介导的内吞(RME)。CME途径主要以那些进入早期内涵体的蛋白为靶蛋白, 蛋白与受体分离后可以被循环转运到细胞膜发挥作用; 或者进入降解途径被降解掉。除了这种CME途径, RME途径最近成为被深入研究的焦点。由于RME途径与毒素、SV40病毒、免疫抗原及信号受体等进入细胞的生物进程密切相关^[5], RME途径引起了人们越来越大的兴趣。有意思的是, 最近的研究表明^[11], 这两种不同的内吞途径在细胞中并非是孤立的单独起作用的, 而是整合在一起形成了多样化的信号应答。比如, 转移生长因子受体(TGF-R)根据不同的生理需求而利用

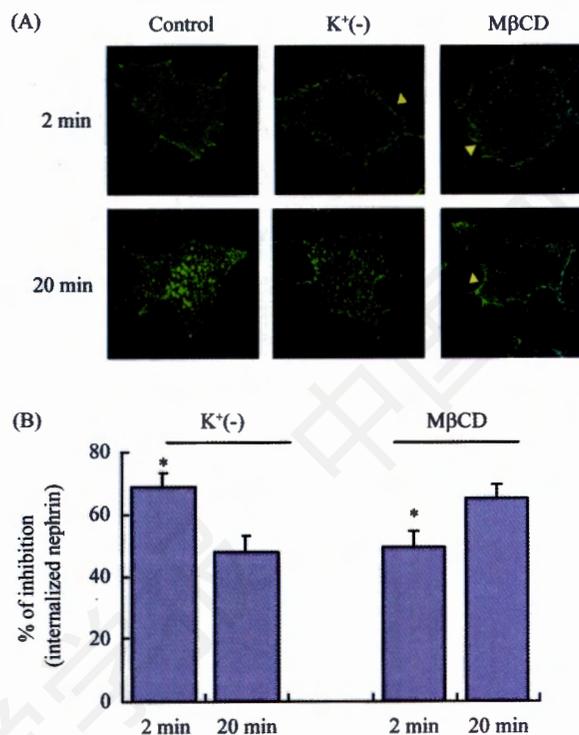


Fig.2 Effects of pharmacological inhibitors on nephrin internalization(630×)

A: K⁺(-) and MβCD inhibited nephrin uptake. Non-internalized nephrin remains on the cell edge (arrow heads); B: histogram represents the percentage of inhibition, showing to which extent internalized signals are reduced by the inhibitors relative to control. *Compared with 20 min, $P < 0.05$.

两种内吞途径进入细胞: CME途径用于信号激活; RME途径用于受体降解。最终的结果则取决于这两种内吞途径的动态平衡。

nephin在足突裂孔膜的表达情况是决定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。本文对nephin的内吞途径进行了初步研究。

我们设计了内吞摄取实验, 用共聚焦荧光显微镜观察nephin被摄取后不同时间点的细胞内定位情况。在4℃低温情况下将表达nephin-V5的活COS-7细胞标记上抗nephin胞外段抗体, 由于低温, nephin内吞不能发生。这时将细胞置于37℃可马上启动内吞过程。我们选取了2 min和20 min作为观察点, 因为在2 min时, CME细胞膜笼型蛋白包被形成的小凹在1~2 min内形成, 6 min完成循环^[12], 而RME途径细胞膜小窝蛋白形成的小凹缓慢开始内吞, 半衰期在20 min左右^[5]。

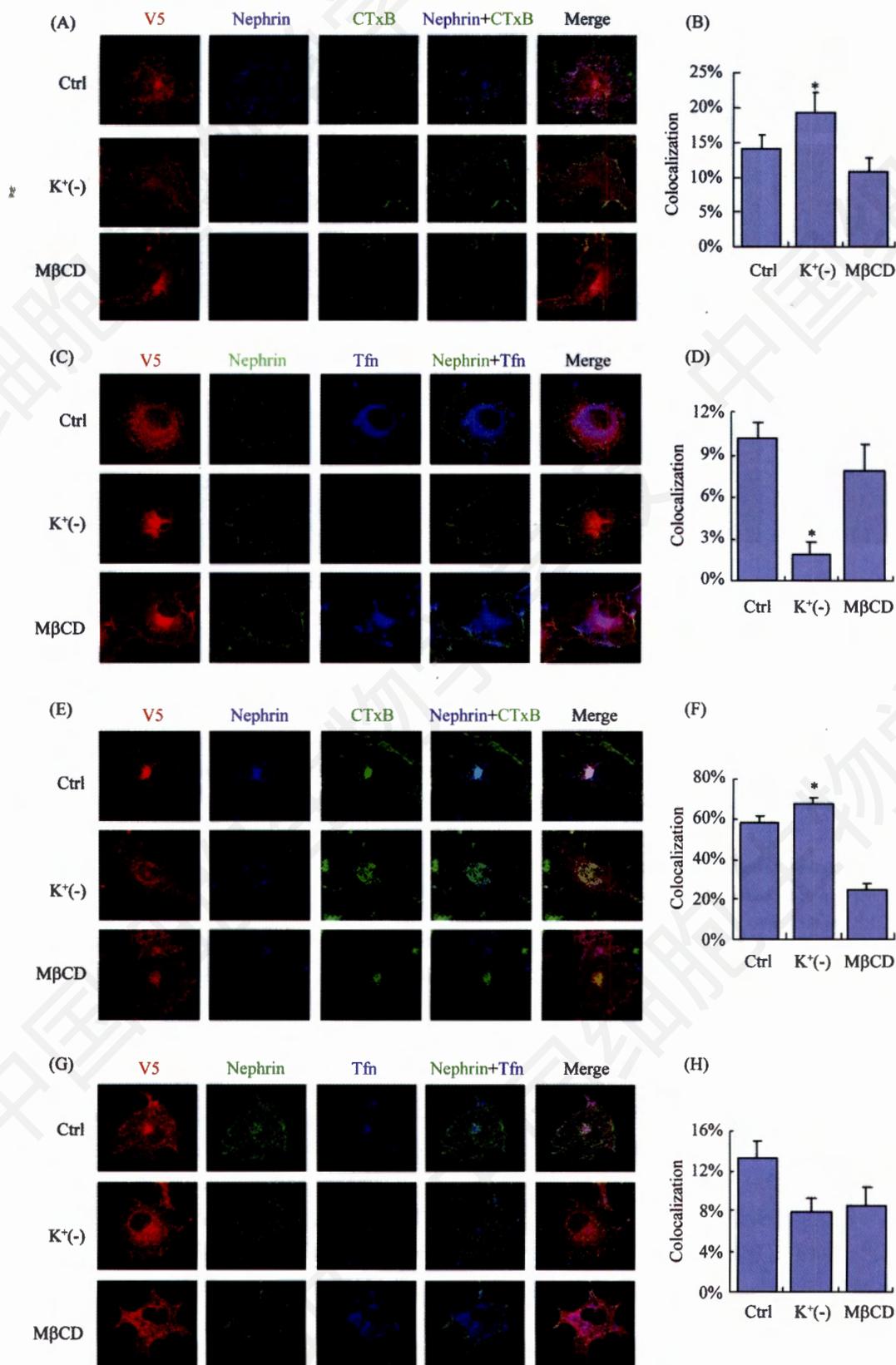


Fig.3 Nephrin internalizes via distinct endocytic routes(630×)

After uptake, in control cells, K⁺(-) buffer treated cells and MβCD treated cells, nephrin, CTxB and Tfn were endocytosed and colocalized in different degrees. A,C: endocytosis happened at 2 min; E,G: endocytosis happened at 20 min; B,D,F,H show the quantification of colocalization of nephrin and indicated markers, corresponding to A,C, E and G. *Compared with MβCD treatment, $P < 0.05$.

我们接下来研究了药物抑制剂的作用。一种是 K^+ (-)缓冲液,通过破坏笼型蛋白网格组装而抑制CME^[9];另一种是 M β CD,一种去胆固醇试剂,主要抑制RME途径,但也对CME途径有一定影响^[10]。我们的结果表明去钾处理主要阻断nephrin的早期内吞(2 min),而在20 min时阻断作用较弱,表明CME是nephrin快速摄取的主要途径。与此相反,M β CD处理主要抑制晚期的内吞,而对早期内吞的抑制作用较小。进一步观察 K^+ (-)缓冲液和M β CD处理后不同的时间点,nephrin与CME和RME标记物的共存情况,为了排除由于nephrin转染效率的不同引起的统计差异,我们同时标记了细胞内V5蛋白,在V5同等表达的情况下,进行实验观察。结果发现CME被抑制时,nephrin则以相对多的比例以RME途径内吞入细胞;反之亦然,而且在内吞早期CME途径被抑制明显,晚期则以RME途径受抑制为主。这些结果再次支持了nephrin通过两种内吞途径进入细胞:CME途径是快速进入,而与脂筏相关的RME途径则是一个相对稳定的途径,进程较慢。

CME的快速动力学可能有助于调节nephrin的连续转运,从而使其能以持续的速率表达于细胞表面。RME途径的缓慢进程可能与nephrin的进一步磷酸化、信号转导等功能相关,仍有待于进一步研究。

本研究采用的COS-7细胞是来源于非洲绿猴肾成纤维细胞并经SV40病毒基因转化的细胞系,转染质粒效率较高。我们使用其他细胞系如Fibroblast NB1RGB、Hela细胞和足突细胞进行nephrin的转染实验,发现在各细胞系中有相近的表达水平,考虑到COS-7便于传代培养、细胞体积较大,便于观察研究的特点,本实验采用COS-7细胞对nephrin进行细胞内转运特点的研究。可能Nephrin在足突细胞中的转运特点与COS-7中不完全相同,我们的研究仍在一定程度上反映了nephrin蛋白的转运特点,为今

后进一步在人足细胞系中进行研究提供了一定的研究基础。

参考文献(References)

- 1 Kitamura A, Tsukaguchi H, Hiramoto R, Shono A, Doi T, Kagami S, *et al.* A familial childhood-onset relapsing nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2007; 71: 946-51.
- 2 Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1583-7.
- 3 Akilesh S, Huber TB, Wu H, Wang G, Hartleben B, Kopp JB, *et al.* Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(3): 967-72.
- 4 秦晓松, 郑锐, 塚口裕康, 土井俊夫. NPHS1两种新突变蛋白分子的细胞内分布. *肾脏病与透析肾移植杂志* 2006;15(5): 438-42.
- 5 Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003; 422: 37-44.
- 6 Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2240-5.
- 7 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: 7962-7.
- 8 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: 417-31.
- 9 Larkin JM, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 1983; 33: 273-85.
- 10 Keller P, Simons K. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 1998; 140: 1357-67.
- 11 Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 112-26.
- 12 Sandvig K, Torgersen, ML, Raa HA, van Deurs B. Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 2008;129: 267-76.

A Study on Endocytosis Pathway of Nephrin

Xiao-Song Qin*, Yong Liu, Li-Na Wu, Jian-Hua Liu, Dan-Dan Wang

(Department of Laboratory Medicine, Shengjing hospital of China medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract To study the intracellular endocytic pathway of nephrin and the possible effects on maintaining the integrate of slit diaphragm. An eukaryotic expression vector of nephrin was constructed and was transfected into COS-7 cells. Triple immunofluorescence was used to stain membrane and plasma expressing nephrin molecules. By using markers of clathrin- and raft-mediated pathways, a laser scanning confocal microscopy was applied to study the endocytic character of nephrin in different time points. 68.44%±4.6% of nephrin was endocytosed via clathrin pathway at 2min, 65.24%±4.02% of nephrin was endocytosed via a raft associated pathway at 20 min. Both routes can be inhibited by the relative inhibitors. The data indicated that both CME and RME pathways were involved in nephrin endocytosis suggesting that nephrin perform its function via distinct pathways.

Key words nephrin; immunofluorescence technique; protein endocytosis

Received: May 21, 2010 Accepted: July 22, 2010

This work was supported by the Liaoning Natural Science Foundation(No.20082095) and Liaoning Colleges and Universities Science and Research Program(No.L20100610)

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