

未分化和分化足细胞生物学性状及 相关结构蛋白表达的变化

姜华军 张春* 常莹¹ 朱忠华 刘建社 邓安国

(华中科技大学同济医学院附属协和医院肾内科, 武汉 430022;

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所, 武汉 430030)

摘要 体外 33 °C 许可条件下培养由 H-2K^b-tsA58 转基因小鼠所建立的未分化足细胞系, 并在 37 °C 非许可条件下诱导其分化。观察足细胞分化后形态学改变; MTT 法测定细胞的生长曲线; 红色荧光染料 PKH-26 标记足细胞, 追踪其在子代细胞中的分布, 检测细胞增殖能力; 流式细胞仪检测细胞周期的改变; Western 印迹检测足细胞相关蛋白 CD2AP、 α -actinin 和足细胞分化相关蛋白 nephrin 的表达; 免疫荧光结合激光共聚焦方法检测 CD2AP、nephrin、 α -actinin、F-肌动蛋白和微管蛋白的表达变化。结果显示: 与未分化足细胞相比, 分化足细胞形态发生改变, 生长速度减慢, 增殖能力下降; 细胞周期表现为 G₀/G₁ 期细胞比例的增多和 S 期及 G₂/M 期的细胞比例下降; CD2AP、nephrin 和 α -actinin 的表达明显增高; CD2AP、nephrin、 α -actinin、F-肌动蛋白和微管蛋白在表达分布上均发生明显的改变。以上结果表明, 足细胞分化后生物学性状明显发生改变, 细胞骨架重新分布; CD2AP、nephrin、 α -actinin、F-肌动蛋白和微管蛋白均在足细胞的分化过程中发挥重要作用。

关键词 足细胞; 分化; 足细胞相关蛋白; 细胞骨架; CD2 相关蛋白

足细胞及其足突间的裂孔隔膜(slit diaphragm, SD)构成了肾小球滤过屏障的最外层, 在维持肾小球结构和功能中发挥重要作用^[1]。体内足细胞在肾脏发生过程中经历了由间充质细胞向上皮细胞转化、足突及 SD 逐渐形成, 终末分化表型的表达等过程^[2]。近年来, 众多的足细胞相关蛋白先后被发现, 其中包括 nephrin、 α -actinin、CD2AP 等。动物实验中, 剔除这些分子的表达可引起足细胞的损伤和显著蛋白尿, 提示它们在维持肾小球滤过屏障中的作用^[3-6]。由于足细胞属终末分化细胞, 在体外原代培养的足细胞不能传代生长, 因此体外研究足细胞的分化及相关蛋白的功能较为困难。随着人们成功构建了 H-2K^b-tsA58 转基因动物, 这才使得足细胞能在体外稳定传代培养^[7,8]。目前, 在足细胞分化即足突形成中, 足细胞相关结构蛋白表达分布的变化及作用尚未阐明。本研究小组成功引进并稳定传代培养由 H-2K^b-tsA58 转基因小鼠建立的足细胞系, 为以上的研究提供了可靠的工具。本文对小鼠足细胞系在分化过程中生物学性状的变化及足细胞相关结构蛋白表达分布的变化进行了研究, 初步探讨这些结构蛋白在足细胞分化中的作用, 为进一步研究足细胞相关蛋白在蛋白尿发生中的作用机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640 培养基、胎牛血清、Trizol、DNase I 均购自 Invitrogen 公司(美国); I 型胶原蛋白、小鼠重组 γ -IFN、碘化丙啶(PI)和 PKH-26 红色荧光染料试剂盒均购自 Sigma 公司(美国); 逆转录试剂盒和 Taq DNA 聚合酶购自 MBI 公司(立陶宛); 兔抗人多克隆 CD2AP (H-290)抗体、 α -actinin(H-300)抗体、synaptopodin (N-14)抗体和羊抗人多克隆 nephrin (N-20)抗体均购自 Santa Cruz 公司(美国); FITC 标记的 phalloidin 购自 Alexis 公司(美国); Oregon Green 488 标记的 paclitaxel 购自 Molecular Probes 公司(美国); FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自 KPL 公司(美国); FITC 标记的兔抗羊 IgG、小鼠抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 以及辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 细胞培养及形态学观察

收稿日期: 2007-06-06 接受日期: 2007-11-13

国家自然科学基金(No.30500245)和湖北省卫生厅科研基金(No. NX200510)资助项目

* 通讯作者。Tel: 027-85726006, E-mail: drzhangchun@yahoo.com

条件永生小鼠足细胞是从H-2K^b-tsA58转基因小鼠肾脏中分离后建立的细胞系,由美国Mount Sinai医学院Mundel教授惠赠,传代数小于15代。足细胞培养方法参照文献^[9]。培养足细胞的培养瓶及培养板等底部均预铺有0.1 mg/ml I型胶原蛋白。未分化足细胞用含10%FBS的RPMI 1640培养基(添加小鼠重组 γ -IFN) 33 °C许可条件下传代培养。诱导分化时,将未分化足细胞置于37 °C非许可条件下(不添加 γ -IFN)传代培养至少2周。倒置显微镜(Nikon ECLIPSE TS100)下观察未分化及已分化足细胞形态。将分化及未分化足细胞分别以 2.0×10^4 个/cm²密度接种于置有载玻片的6孔板内,待细胞贴壁生长24~48 h后取各组细胞,免疫荧光法检测分化及未分化足细胞相关结构蛋白的分布。

1.3 MTT 检测细胞生长曲线

将未分化足细胞以 1.0×10^3 个/孔的密度接种于96孔板,分别置于33 °C许可条件下及37 °C非许可条件下培养,MTT法检测足细胞在不同培养条件下的生长状况(每时间点设6孔)。

1.4 荧光染料标记及不同时间点细胞增殖能力的检测

PKH-26红色荧光染料能特异的和细胞膜的磷脂基团结合,随着细胞的二分裂均匀的分布到子代细胞。用胰蛋白酶消化33 °C条件下培养的足细胞,制备浓度为 1.0×10^7 个/ml的单细胞悬液,然后按照说明书在无菌、避光操作下加入1 μ l PKH-26 荧光染料,标记30 min后用等体积的胎牛血清中止反应,离心后再以无菌PBS洗涤3~5次,最后用正常培养基悬浮。将标记的足细胞以 2.0×10^4 个/cm²密度接种于6孔板内,分别置于33 °C许可条件下及37 °C非许可条件下培养。同时,留取部分细胞以4%多聚甲醛固定,作为对照的母代细胞。3天后,胰蛋白酶消化细胞,制备单细胞悬液,流式细胞仪(FACSCalibur, Becton Dickinson公司,美国)检测各组细胞的增殖情况,即:通过CELL Quest软件获取细胞,获得数据用Mod Fit (proliferation Wizard)软件进行拟合,可得到多项增殖相关数据,包括增殖代数和增殖指数的分析数据。将各组细胞继续以 2.0×10^4 个/cm²密度接种于新的6孔板内,于33 °C许可条件下及37 °C非许可条件下培养,7天后流式细胞仪检测其细胞内平均荧光强度。实验每组设3个样本,实验重复3次。

1.5 Western 印迹

收集分化(37 °C非许可条件下培养至少2周)及

未分化的足细胞,用预冷的PBS洗细胞2次,加入含有50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 0.02% 叠氮钠, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.05% 去氧胆酸钠, 100 μ g/ml PMSF 和 1 μ g/ml 抑蛋白酶肽的细胞裂解液, 4 °C 10 000 g 离心 15 min。取上清液为样品,用BCA蛋白质分析试剂盒测定总蛋白浓度。以每泳道40 μ g总蛋白进行10%SDS-PAGE,后转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉-TBST室温封闭90 min。一抗分别用1:1 000稀释的兔抗人CD2AP、 α -actinin多克隆抗体、羊抗人nephrin多克隆抗体和小鼠抗大鼠GAPDH多克隆抗体,4 °C温育硝酸纤维素膜过夜。用相应的1:2 000稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗37 °C温育2 h,用ECL化学发光剂在暗室使X光胶片曝光、显影、定影。应用图形分析软件对特异性条带进行灰度扫描,以目的蛋白条带与GAPDH蛋白条带的灰度比值表示其相对含量。

1.6 流式细胞仪检测

检测培养细胞中分化的足细胞时,分别将33 °C许可条件下培养的未分化足细胞和37 °C非许可条件下分化2周的足细胞用0.25%胰蛋白酶消化,各取约 4.0×10^5 个细胞,离心后用75%的无水乙醇于4 °C固定2 h。再次离心后加入1:40稀释的兔抗人多克隆synaptopodin抗体300 μ l,4 °C温育过夜。然后加入FITC标记的羊抗兔IgG室温温育1 h,流式细胞仪检测synaptopodin阳性细胞的比率。

检测细胞周期时,将未分化足细胞和分化2周的足细胞用0.25%胰蛋白酶消化后,以 2.0×10^5 个/孔的密度接种于6孔板。细胞贴壁生长48 h后胰蛋白酶消化离心,再经PBS清洗、离心后,用75%的无水乙醇于4 °C固定2 h。再次离心后,用25 μ g/ml PI室温避光温育20~30 min,流式细胞仪测定细胞周期。

1.7 免疫荧光共聚焦检测

用-20 °C预冷的丙酮+无水乙醇(体积比为1:1)固定未分化和分化足细胞15 min,0.3%Triton X-100室温温育10 min,2%FCS+3%BSA室温封闭2 h。(1)检测CD2AP和 α -actinin的表达时,用相应的一抗4 °C温育过夜,然后加入FITC标记的羊抗兔IgG室温温育1 h。(2)检测nephrin的表达时,用一抗4 °C温育过夜,然后加入FITC标记的兔抗羊IgG室温温育1 h。(3)检测F-肌动蛋白的表达时,直接用FITC标记的phalloidin室温温育20~30 min。(4)检测微管蛋白的表达时,直接用Oregon Green 488标记的paclitaxel室温温育20~30 min。经10%~50%缓冲甘油封片后

在共聚焦显微镜(Olympus FV500)下观察照相。

1.8 统计学处理

实验中定量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS13.0 软件进行统计学处理, 计量数据两组间的比较采用 t 检验, 百分比的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 足细胞形态变化

在许可条件下, 即 33 °C 有 γ -IFN 存在, 未分化的足细胞在相互接触之前, 细胞多呈梭形或三角形(图 1A); 在细胞生长汇合后, 细胞呈铺路石样外观(图 1B)。转入非许可条件下诱导足细胞分化, 即 37 °C 无 γ -IFN 存在, 继续培养 2 周后, 细胞出现分化; 细胞贴壁生长面积明显增大, 并从胞体主突伸出大量次级突起, 如图 1C 中箭头所指处, 使细胞呈“树枝”状(图 1C)。

2.2 分化足细胞的测定

Synaptopodin 是一种肌动蛋白相关蛋白, 在分化中的足细胞出现足突时才特异的表达, 被广泛应用于足细胞分化程度的判定^[10]。流式细胞仪检测到 33 °C 许可条件下培养的足细胞 synaptopodin 阳性率为 1.56% (图 2A), 而在 37 °C 非许可条件下培养 2 周的足细胞中 synaptopodin 阳性率达 98.68% (图 2B)。

2.3 足细胞生长曲线

足细胞在许可及非许可条件下的生长曲线如图 3 所示。从第 3 天起, 33 °C 培养的足细胞生长速度明显快于 37 °C 培养的足细胞, 前者于第 4 天起已处于生长曲线的平台期, 而后者在第 5 天才达到生长曲线的平台期。

2.4 足细胞增殖

以 PKH-26 红色荧光染料标记足细胞, 比较不同时间点足细胞的增殖能力。图 4A 为标记的母代细胞(深蓝色), 计算机分析其荧光强度为 $(6.58 \pm 0.47) \times 10^5$, 亮度均一, 标记适中。图 4B 为 33 °C 培养 3 天的足细胞, 其细胞主要以第 4 代(桃红色)和第 5 代(浅蓝色)细胞为主; 而图 4C 中, 37 °C 培养 3 天的足细胞主要以第 3 代(绿色)和第 4 代细胞为主。后者的子代细胞峰值左移速度和构成比明显落后于前者; 以增殖指数为指标来反映细胞的增殖能力, 后者明显低于前者($P < 0.05$), 见表 1。

随着细胞增殖代数的增多, 分布到子代细胞 PKH-26 的荧光强度逐渐减弱, 计算机在分析增殖代

数上受限。以细胞平均荧光强度大体反应细胞增殖的代数, 培养 7 天后, 33 °C 培养足细胞的平均荧光强度明显低于 37 °C 培养足细胞的平均荧光强度 $[(2.19 \pm 0.24) \times 10^3 \text{ vs } (1.16 \pm 0.64) \times 10^4, P < 0.05]$ 。

2.5 CD2AP、 α -actinin 和 nephrin 在未分化和分化细胞中的表达

如图 5 所示, 免疫印迹能够检测出特异性蛋白条带, 以 GAPDH 条带为对照, 特异性蛋白条带与 GAPDH 条带的灰度值的比为该蛋白质的相对含量。结果显示: CD2AP、 α -actinin 和 nephrin 均能够稳定表达在小鼠足细胞系, 且在分化 2 周的足细胞中的表达明显高于未分化足细胞, P 值均 < 0.05 。

2.6 细胞周期的改变

33 °C 培养的未分化足细胞和 37 °C 培养的分化中足细胞接种后 48 h 分别检测其细胞周期的差异(图 6)。结果显示: 足细胞分化 2 周后, 处于 G_0/G_1 期细胞的比例明显高于 33 °C 未分化足细胞($P < 0.05$), 而处于 S 期及 G_2/M 期细胞的比例则明显减少($P < 0.05$), 见表 2。

2.7 足细胞相关蛋白在未分化和分化足细胞中的分布

在未分化足细胞, CD2AP 和 nephrin 主要分布在核周, 在细胞边缘表达微弱(图 7A, 图 7B); α -actinin 则呈粗短的丝状放射样分布在未分化足细胞内(图 7C)。而在分化的足细胞, 随着胞质的伸展和足突的逐渐形成, CD2AP、nephrin 和 α -actinin 的分布均发生明显的改变。CD2AP 散布于胞浆, 且向周边聚集, 次级突起荧光染色明显(图 7D); nephrin 在胞浆内表达增强, 呈颗粒状弥散分布于胞浆, 细胞周边荧光染色明显(图 7E)。 α -actinin 丝在分化足细胞中变得细长, 且在细胞边缘表达增强(图 7F)。

2.8 F-肌动蛋白和微管蛋白在未分化和分化足细胞中的分布

F-肌动蛋白在未分化足细胞内沿细胞长轴线状平行分布(图 8A); 而在分化的足细胞中, F-肌动蛋白在核周形成附着点呈放射状分布, 并伸入到形成的足突中(图 8B)。微管蛋白在未分化足细胞主要分布在核周区域的胞浆处, 且离核愈远处微管蛋白的分布愈稀少(图 8C); 而在分化的足细胞, 微管蛋白的表达增强, 并呈束状分布至胞浆的远端(图 8D)。

3 讨论

本研究表明, 足细胞分化后生物学性状发生了明

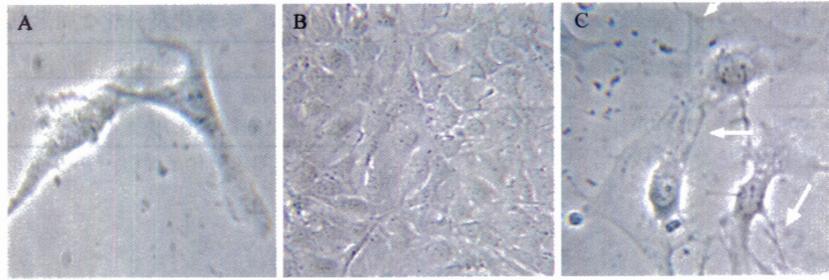


图1 小鼠足细胞在未分化及分化状态下细胞形态

A: 未分化足细胞未形成接触前的形态(400×); B: 未分化足细胞生长汇合后的形态(100×); C: 高倍镜下分化足细胞的形态(400×)。

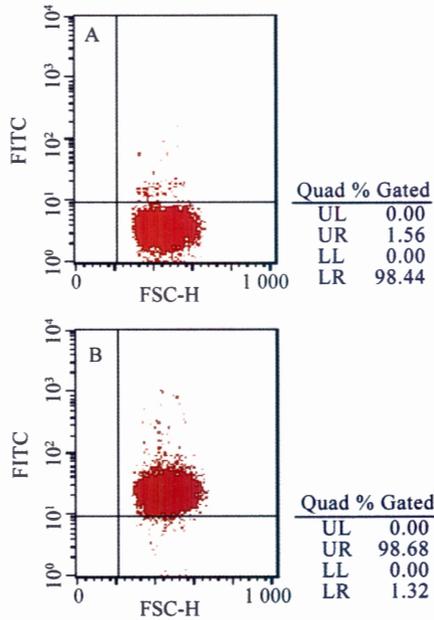


图2 流式细胞仪检测 synaptopodin 阳性细胞

A: 33 °C许可条件下培养的足细胞; B: 37 °C非许可条件下培养2周的足细胞。

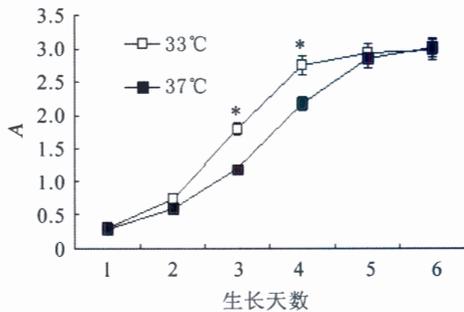


图3 足细胞在 33 °C许可条件及 37 °C非许可条件下的生长曲线

与 37 °C非许可条件下培养的足细胞相比, * $P < 0.05$; $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。

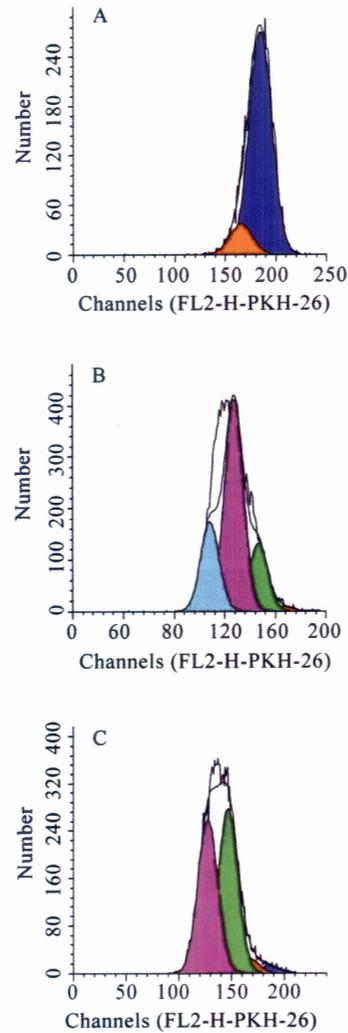


图4 PKH-26 标记足细胞的增殖流式图

A: PKH-26 标记的母代细胞; B: 33 °C许可条件下足细胞第3天的增殖流式图; C: 37 °C非许可条件下足细胞第3天的增殖流式图。

表1 33 °C和 37 °C培养的足细胞第3天增殖情况

组别	母代细胞的 比例(%)	第2代细胞的 比例(%)	第3代细胞的 比例(%)	第4代细胞的 比例(%)	第5代细胞的 比例(%)	增殖指数
33 °C培养的足细胞	0.16 ± 0.08	1.16 ± 0.23	18.22 ± 1.56	56.56 ± 4.69	23.86 ± 2.07	7.22 ± 0.62
37 °C培养的足细胞	2.09 ± 0.34*	4.37 ± 0.80*	48.39 ± 5.05*	45.12 ± 3.93*	0.24 ± 0.10*	4.54 ± 0.36*

与 33 °C对照组比较, * $P < 0.05$; $\bar{x} \pm s$, $n = 9$ 。

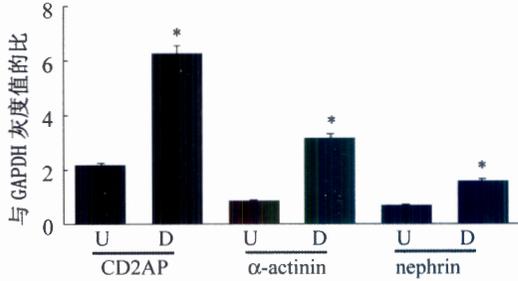
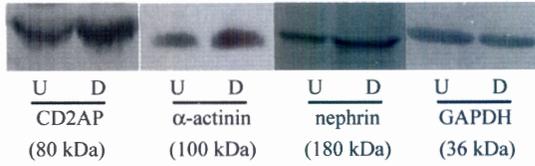


图5 小鼠足细胞 CD2AP、 α -actinin、nephrin 和 GAPDH 的 Western 印迹结果

U: 未分化足细胞; D: 分化足细胞; 分别与相应的 U 比较, * $P < 0.05$; $\bar{x} \pm s$, $n=9$ 。

表2 未分化及分化2周足细胞的细胞周期改变

组别	G ₀ +G ₁ (%)	S (%)	G ₂ +M (%)
未分化足细胞	47.92 ± 3.84	38.70 ± 2.24	13.34 ± 1.05
分化2周足细胞	70.79 ± 4.26*	23.06 ± 1.98*	7.15 ± 0.47*

与 33 °C 未分化足细胞, * $P < 0.05$; $\bar{x} \pm s$, $n=9$ 。

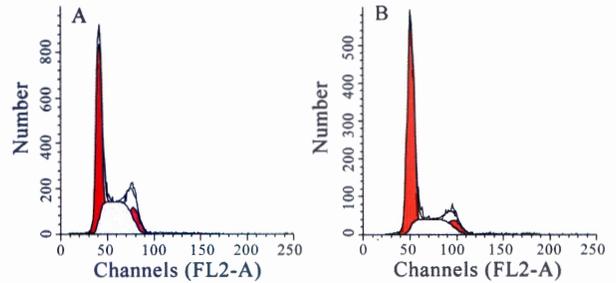


图6 流式细胞仪检测足细胞周期图

A: 33 °C 未分化足细胞的细胞周期流式图; B: 37 °C 分化2周足细胞的细胞周期流式图。

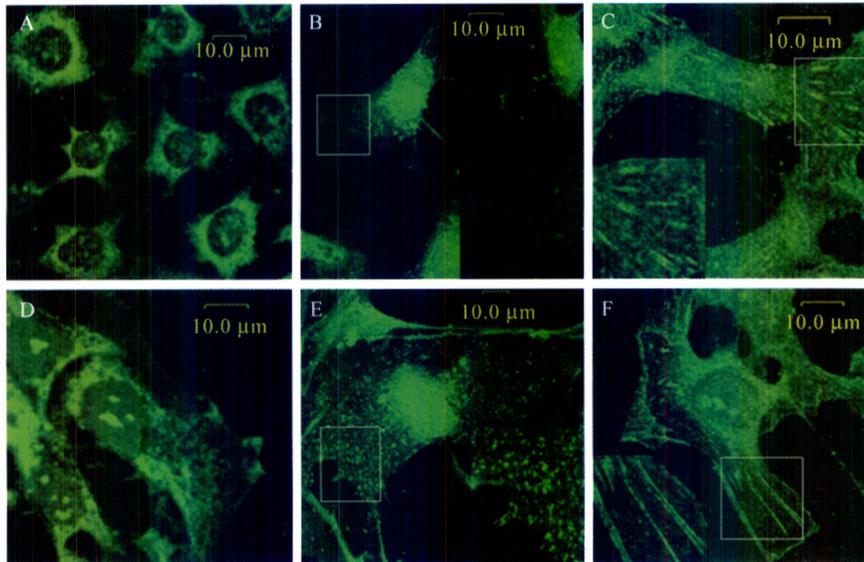


图7 CD2AP、nephrin 和 α -actinin 在未分化和分化足细胞中的分布

A、D: 分别为 CD2AP 在未分化和分化足细胞中的分布; B、E: 分别为 nephrin 在未分化和分化足细胞中的分布; C、F: 分别为 α -actinin 在未分化和分化足细胞中的分布。

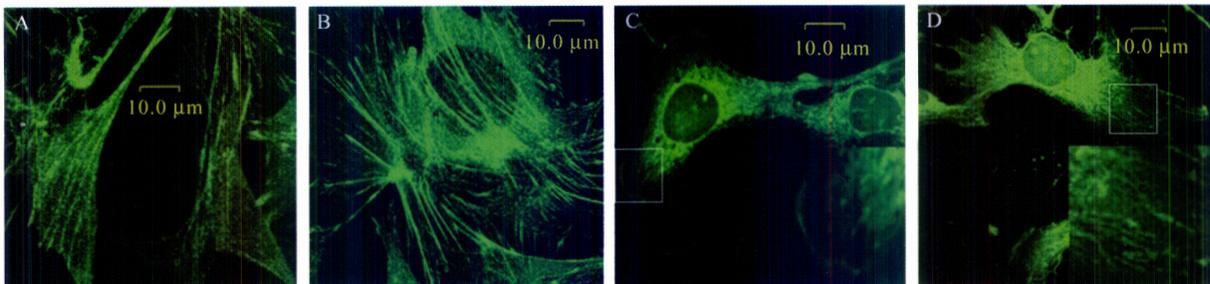


图8 F-肌动蛋白和微管蛋白在未分化和分化足细胞中的分布

A、B: 分别为未分化和分化足细胞 F-肌动蛋白的分布; C、D: 分别为未分化和分化足细胞微管蛋白的分布。

显的变化。其足突逐渐形成, 细胞的生长速度明显减慢; CD2AP、 α -actinin 和 nephrin 的表达和分布发生明显改变; 细胞骨架重新分布。

体外原代培养的足细胞由于其高度分化不能稳定传代生长, 从而使体外足细胞的研究受限。由 H-2K^b-tsA58 转基因动物所建立的足细胞系为足细胞的研究提供了有效可靠的工具^[8]。H-2K^b-tsA58 转基因小鼠是体内导入了温度敏感的 tsA58 永生化基因, 后者受 γ -IFN 诱导的 H-2K^b 启动子的调控^[7]。本研究即采用了这种转基因小鼠建立的足细胞系, 其是目前被普遍接受的、较接近体内足细胞生理特性的细胞系。在许可条件下, 即 33 °C 有 γ -IFN 时, 细胞具有无限增殖的特性; 在非许可条件下, 即 37 °C 无 γ -IFN 存在时, 细胞失去增殖的能力而趋于分化成熟。分化足细胞和未分化足细胞在形态上的差异主要表现在细胞的大小和足突的形成。本文发现, 在未分化细胞, 细胞呈典型的上皮细胞“鹅卵石”状外观; 而在分化细胞, 细胞胞浆向周边伸展, 贴壁生长面积增大, 并且有大量次级足突形成, 使细胞呈现“树枝”状多突起外观, 这与国内外的研究报道基本一致。

随着细胞足突形成, 足细胞生长速度明显减慢。细胞生长曲线提示足细胞进入非许可条件下第 3 天细胞的生长速度即受影响, 这与部分细胞内温度敏感的 SV40 大 T 抗原失活、细胞失去增殖能力有关^[8]。为判定细胞转入非许可条件后增殖能力的改变, 我们以 PKH-26 红色荧光染料标记足细胞, 追踪其在子代细胞内的分布。PKH-26 是亲脂性红色荧光染料, 能特异性与细胞膜上的磷脂基团不可逆的结合, 随着细胞的二分裂增殖, 荧光染料均匀分布到子代细胞^[11]。因此, 追踪细胞内的红色荧光强度即可反应出细胞的增殖代数, 判定细胞的增殖能力^[12]。实验表明, 随着进入非许可条件天数的延长, 其细胞中的 PKH-26 红色荧光强度明显强于同期的未分化对照组, 即表明细胞的二分裂次数落后于同期的未分化足细胞。分化 2 周后, 细胞周期检测发现足细胞 G₀/G₁ 期细胞增多, S 期与 G₂/M 期细胞明显减少。这些结果均提示, 处于分化中的足细胞的增殖能力明显下降。我们用 synaptopodin^[10]来测定 37 °C 下培养 2 周的足细胞分化的比率, 发现绝大多数细胞(98.68%)已经分化或开始分化。但部分细胞仍然具有一定的增殖能力, 这可能与 SV40 大 T 抗原尚未完全失活有关。国外有研究小组严格按照小鼠的体温(39~40 °C)进行诱导分化,

可使绝大部分细胞生长停滞, 但死亡细胞的比例增加^[8]。目前, 大部分研究者采用 37 °C 至少分化 2 周的方法, 此时大部分细胞处于分化状态, 即可代表分化的足细胞^[8,9,13,14]。

足突的形成必然伴随胞内结构蛋白和细胞骨架的改变^[15]。CD2AP、 α -actinin 和 nephrin 是近年来相继被发现的特异性的足细胞相关蛋白, 且 nephrin 是首个被证实的足细胞分化相关蛋白^[13]。表达这些蛋白质的基因突变或缺失均能引起临床上显著的蛋白尿, 为此, 我们研究它们在足细胞分化后的表达分布变化。Western 印迹结果发现, 分化足细胞中这些相关蛋白质表达的增高。免疫荧光检测进一步揭示这些蛋白质在分化和未分化足细胞中的分布差异, 结果发现: 在分化的足细胞中, CD2AP 和 nephrin 由未分化状态下的非特异性核周分布变为向细胞周边聚集, 并且在次级突起处表达明显; 而 α -actinin 随着细胞的伸展, 蛋白丝变得细长, 在细胞周边表达增强。这些结果提示它们均可能在足细胞分化中起重要的作用。有研究报道指出, 足细胞培养传代次数的增加可能会引起 nephrin 表达的丢失^[14]。我们引进的该小鼠足细胞系, 经过传代 10 余次后, Western 印迹和免疫荧光检测显示它们均能稳定表达于足细胞, 间接印证了该细胞系的可靠性。

微丝蛋白和微管蛋白是细胞骨架的主要成分, 是细胞迁移、形态维持、物质的合成和转运等基本细胞生理活动的基础^[16]。在未分化足细胞, F-肌动蛋白主要沿细胞长轴平行分布; 在分化的足细胞, 可见 F-肌动蛋白丝呈放射状延伸到细胞新形成的足突中。这表明在细胞分化中, F-肌动蛋白发生重组。研究中, 我们还发现, 细胞骨架的重组不仅表现在 F-肌动蛋白, 而且还有微管系统的重新分布。在未分化足细胞, 微管表现为弥散的核周分布, 而在分化的足细胞, 微管系统沿细胞的长轴呈束状深入到周边的突起中。这些结果提示 F-肌动蛋白和微管蛋白在足细胞分化、足突形成和分化细胞的形态维持中发挥着重要的作用。肾脏发生中足细胞的分化是维持肾小球结构和功能正常的基础^[2], 随着人们对足细胞及其 SD 结构研究的深入, 相信更多 SD 分子在足细胞分化及其它生理活动中的作用和机制为人们所认识。

综上所述, 足细胞在分化后生物学性状发生改变, 细胞骨架重新分布, CD2AP、nephrin、 α -actinin、F-肌动蛋白和微管蛋白等均可能在足细胞的分化中发挥重要作用。

参考文献(References)

- [1] Asanuma K *et al.* *Clin Exp Nephrol*, 2003, **7**: 255
[2] Horster MF *et al.* *Physiol Rev*, 1999, **79**: 1157
[3] Ruotsalainen V *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 7962
[4] Kos CH *et al.* *J Clin Invest*, 2003, **111**: 1683
[5] Shih NY *et al.* *Science*, 1999, **286**: 312
[6] Kim JM *et al.* *Science*, 2003, **300**: 1298
[7] Kern G *et al.* *Biotechniques*, 2005, **38**: 38, 40, 42
[8] Rops AL *et al.* *Kidney Int*, 2004, **66**: 2193
[9] Mundel P *et al.* *Exp Cell Res*, 1997, **236**: 248
[10] Mundel P *et al.* *J Cell Biol*, 1997, **139**: 193
[11] Lee-MacAry AE *et al.* *J Immunol Methods*, 2001, **252**: 83
[12] Hemmrich K *et al.* *Cells Tissues Organs*, 2006, **184**: 117
[13] Saleem MA *et al.* *Am J Pathol*, 2002, **161**: 1459
[14] Schiwiek D *et al.* *Kidney Int*, 2004, **66**: 91
[15] Kobayashi N. *Microsc Res Tech*, 2002, **57**: 217
[16] Rodriguez OC *et al.* *Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 599

The Changes of Biological Characters and Podocytes Associated Proteins Distribution Profile in Undifferentiated and Differentiated Podocytes

Hua-Jun Jiang, Chun Zhang*, Ying Chang¹, Zhong-Hua Zhu, Jian-She Liu, An-Guo Deng

(Department of Nephrology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology,

Wuhan 430022, China; ¹Institute of Liver Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College,

Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract Conditionally immortalized murine podocyte cell line, which was established from transgenic H-2K^b-tsA58 mice, was cultured in RPMI 1640 medium at 33 °C permissive conditions and shifted to 37 °C non-permissive conditions to induce differentiation. Podocytes morphology changes, growth curve, proliferation ability and cell cycle were measured respectively in undifferentiated and differentiated podocytes. The expressions of CD2AP, α -actinin, nephrin and cytoskeletal proteins (i.e. F-actin and tubulin) were detected by laser scanning confocal microscope. The results demonstrated that in differentiated podocytes, cell morphology changed along with secondary foot process formation and reproductive activity descended. Cells in G₀/G₁ period accumulated and in S, G₂/M period decreased. The expressions of CD2AP, nephrin and α -actinin were elevated in differentiated podocytes. The distribution profiles of podocyte associated proteins and cytoskeletal proteins apparently altered. In conclusion, differentiated podocytes biological characters changed and cytoskeleton rearranged. CD2AP, nephrin, α -actinin, F-actin and tubulin may play a crucial role in podocytes differentiation.

Key words podocytes; differentiation; podocytes associated protein; cytoskeleton; CD2-associated protein

Received: June 6, 2007 Accepted: November 13, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30500245) and the Science Research Foundation of Health Department of Hubei Province (No.NX200510)

*Corresponding author. Tel: 86-27-85726006, E-mail: drzhangchun@yahoo.com