

过敏毒素受体 (C3aR) 在 db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏中的表达及病理意义分析 *

郑敬民 ** 朱小东 张明超 王建平 徐丽丽 谌达程 刘志红

(南京军区南京总医院解放军肾脏病研究所, 全军肾脏病重点实验室, 南京 210002)

摘要 利用半定量 RT-PCR、免疫组化和 Western blotting 的方法, 同时从 mRNA 水平和蛋白质水平对过敏毒素受体(C3aR)在不同病理阶段的 2 型糖尿病肾病模型小鼠——db/db 小鼠肾脏中的表达情况进行了较为系统的分析。结果发现: a. 在糖尿病前的 db/db 小鼠(4 周龄的 db/db 小鼠), C3aR 与作为正常对照的 db/m 小鼠相比没有明显差异。随着肥胖的加剧, 高血糖、蛋白尿的发生和发展, C3aR 在 db/db 小鼠肾脏中的表达显著升高。b. 免疫组化分析显示, C3aR 广泛地表达于 db/m 和 db/db 小鼠肾脏的皮质和髓质, 分布于肾脏的上皮细胞中(包括肾小管上皮细胞、肾小球中的脏层上皮细胞(足细胞)和壁层上皮细胞)。从部位来看, 皮髓交界处的肾小管中 C3aR 表达量明显要比其他部位的多。在肾小球, C3aR 特异地存在于足细胞部位。在 db/m 小鼠, 不同周龄小鼠肾脏中 C3aR 的表达量并没有明显变化, 但在 db/db 小鼠, 从 8 周龄开始, 分布在 db/db 小鼠肾小管上皮细胞和小球足细胞中的 C3aR 均随小鼠周龄的增加而增加, 至少在时间上, 与小鼠糖尿病肾病的发生发展相关, 其中尤以足细胞中和皮髓交界处肾小管上皮细胞中的变化最为明显。c. 在糖尿病肾病小鼠中高表达 C3aR 的肾小管上皮细胞常有空泡变性的情况。上述工作印证了先前对 2 型糖尿病肾病患者肾小球基因表达谱的分析结果, 更加明确了 C3aR 与糖尿病肾病的相关性, 同时揭示了 C3aR 在正常小鼠和糖尿病肾病小鼠肾脏中的表达、分布和变化规律, 有利于进一步揭示 C3aR 的功能及其在糖尿病肾病发生、发展过程中的可能作用, 探讨糖尿病肾病的分子机制。

关键词 过敏毒素受体(C3aR), 过敏毒素, 糖尿病肾病, db/db 小鼠

学科分类号 R587.1, R363.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00150

作为糖尿病的一种重要并发症, 糖尿病肾病已成为导致终末期肾衰的重要原因, 而且其发病率有不断上升的趋势。多年来, 国内外对糖尿病肾病已进行了大量研究。但由于病因的复杂性, 有关糖尿病肾病发病的分子机制仍然不是很清楚, 现有治疗糖尿病肾病的措施仅能部分延缓糖尿病肾病的进程, 而无法从根本上阻断糖尿病肾病的进展^[1]。寻找糖尿病肾病新相关基因, 探讨其在糖尿病肾病发生发展过程中的可能作用, 对于加深对糖尿病肾病分子机制的认识, 发展糖尿病肾病防治方法均具有重要意义。

在前面的工作中^[2-5], 我们研究所利用基因芯片等方法对 2 型糖尿病肾病模型小鼠肾脏基因表达谱和 2 型糖尿病肾病患者肾小球基因表达谱进行了全面的分析, 发现过敏毒素 C3a 的受体基因——C3aR 在糖尿病肾病患者肾小球中表达上调, 提示

过敏毒素受体 C3aR 可能与糖尿病肾病相关。作为一种新的基因表达谱研究方法, 基因芯片检测具有高通量的优势, 但其准确性需进一步地验证。db/db 小鼠是 Leptin 受体基因缺陷导致的先天肥胖性 2 型糖尿病小鼠, 具有高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特性。其发病过程与人 2 型糖尿病肾病非常相似, 是国际上广为采用的研究糖尿病肾病的动物模型。为了进一步探讨 C3aR 与糖尿病肾病的关系, 本文同时从 mRNA 和蛋白质水平对 C3aR 在 db/db 小鼠糖尿病肾病发生发展过程中的表达情况进行了研究, 并就其与糖尿病肾病的关系进行了分析。

* 南京军区南京总医院课题资助项目(2010M027)。

** 通讯联系人。

Tel: 025-80860805, E-mail: zhengjingmin@yahoo.com

收稿日期: 2010-03-24, 接受日期: 2010-06-07

1 材料和方法

1.1 实验动物和实验分组

杂合子 db/m 小鼠从美国 Jackson 动物中心引进, 在南京军区南京总医院动物实验科成功繁殖. 隐性纯合子 db/db 小鼠由 db/m 小鼠交配产生. db/db 小鼠在 4 周龄以后开始出现明显肥胖, 至约 8 周龄时出现白蛋白尿, 开始表现出糖尿病肾病, 此后随着鼠龄的增长, 糖尿病肾病也进一步发展. 选取 4、8、12、16、20 周龄的 db/db 小鼠和 db/m 小鼠各 6 只用于实验. 其中 db/m 小鼠作为正常对照. 测量每组小鼠的体重、血糖、血甘油三酯、血胆固醇、尿白蛋白水平用以评估糖尿病肾病发生发展的指标; 留取小鼠左肾用于提取总 RNA, 以便分析 C3aR mRNA 表达水平, 右肾用于进行组织学及免疫组织化学等检查和分析.

1.2 C3aR mRNA 表达水平分析

采用半定量 RT-PCR 的方法进行 C3aR mRNA 表达水平分析. 抽提小鼠肾脏总 RNA 的 Trizol 试剂购自 Gibco 公司; 合成 cDNA 的逆转录试剂盒购自 Promega 公司; 用于 PCR 扩增的 DNA 聚合酶、dNTPs 等购自上海申能博彩公司; 相关引物也由上海申能博彩公司合成; RNA 抽提和逆转录等具体方法均按操作说明进行. 扩增 C3aR cDNA 的引物序列为: 小鼠 C3aR 引物正义链, 5' taaccagatgagcaccacca 3', 小鼠 C3aR 引物反义链, 5' tgtgatgtgtgtcatgg 3', 扩增片段长度为 178 bp. 扩增小鼠 β -actin cDNA 的引物序列为: 小鼠 β -actin 引物正义链, 5' catcactattggcaacgagc 3', 小鼠 β -actin 引物反义链, 5' tacggatgtcaacgtcacac 3', 扩增片段长度为 131 bp. 其中, β -actin 作为内参. PCR 扩增反应体系如下: 逆转录产物 1 μ l, 10 $\times$ 缓冲液 (不含 Mg^{2+}) 2 μ l, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.0 μ l (扩增 C3aR cDNA 时) 或 1.5 μ l (扩增 β -actin cDNA 时), 10 mmol/L dNTP 混合物 0.4 μ l, 正义、反义引物各 1 μ l, Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l (5U/ μ l), 纯水补至 20 μ l. C3aR 和 β -actin 的 PCR 扩增条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 56 $^{\circ}$ C (扩增 C3aR 时) 或 58 $^{\circ}$ C (扩增 β -actin 时) 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 25 个循环. PCR 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 以 Smartview 分析软件进行密度灰度扫描, 以 C3aR 扩增条带的灰度值除以同一样品 β -actin 扩增条带的灰度扫描值, 所得数值作为样品中 C3aR mRNA 的相对表达水平.

1.3 C3aR 免疫组化分析

C3aR 免疫组化分析采用小鼠肾脏石蜡切片进行. 石蜡切片厚 1.5 μ m, 切片经常规脱蜡和复水处理后, 以常规的高压锅中加热的方法进行抗原修复, 完成抗原修复后的切片进行如下处理: PBS 洗 3 次 (每次 5 min), 3% 牛血清白蛋白封闭 30 min, 经 1:100 稀释的兔抗 C3aR 抗体于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次 (5 min/次), 加猪抗兔抗体孵育 45 min, PBS 洗涤 3 次 (5 min/次), 加 PAP 试剂孵育 45 min, PBS 洗涤 3 次后进行显色反应. 然后以苏木精复染 1 min, 自然风干后封片观察. 上述所用试剂除兔抗 C3aR 抗体是 SANTA Cruz Biotechnology 产品外, 其余均为 DaKo 公司产品.

1.4 C3aR Western blotting 分析

Western blotting 按常规方法进行. 其中小鼠肾脏组织蛋白抽提采用上海康成公司生产的“细胞和组织蛋白抽提试剂盒”, 杂交信号检测采用康成公司的超敏化学发光试剂盒, 所用 C3aR 抗体 (使用时以 5% 脱脂奶粉作 1:500 稀释) 同免疫组化部分, 作为内参的 GAPDH 抗体也购自康成公司. 每一样品的 C3aR 蛋白相对表达水平按如下方式计数: C3aR 杂交信号 (C3aR 条带扫描灰度值)/GAPDH 杂交信号 (GAPDH 条带灰度扫描值).

2 结 果

2.1 实验小鼠的一般情况

如表 1 所示, db/db 小鼠在 4 周龄时虽已出现明显的肥胖, 但此时血糖、血胆固醇、血甘油三酯均未见明显升高, 尿白蛋白排泄与正常对照小鼠相比也没有明显差别, 代表了 db/db 小鼠糖尿病发生前的状态. db/db 小鼠在 8 周龄时, 出现了高血糖、高血脂, 出现了白蛋白尿, 说明此时的 db/db 小鼠已发生糖尿病肾病 (处于糖尿病肾病的早期). 此后, 随着周龄的增加, db/db 小鼠的血糖、血脂水平不断升高, 两者均在约 16 周龄时达到峰值, 此后至 20 周龄仍维持在高水平状态. 同时, 尿白蛋白的排泄量也在不断增加, 约在 20 周龄时达到最大值, 说明随着血糖、血脂水平的不断增加, 高血糖、高血脂状态的延续, db/db 小鼠的糖尿病肾病不断发展, 日渐严重. 对 db/db 小鼠肾脏病理变化的分析也证明了这点 (图 1): 与正常对照的 db/m 小鼠相比, db/db 小鼠 4 周龄时的肾脏切片未见明显异常, 自 8 周龄以后, 逐渐出现肾小球肥大, 基底膜增厚, 系膜区增宽, 直至出现系膜溶解、微血管瘤等严重的糖尿病肾病病理改变.

Table 1 Characteristics of experimental animals

	4 weeks	8 weeks	12 weeks	16 weeks	20 weeks
Body weight (g)					
db/m	13.83 ± 0.52	18.45 ± 0.64	23.38 ± 0.98	26.50 ± 1.51	29.43 ± 1.66
db/db	18.98 ± 1.23*	39.55 ± 1.26*	45.62 ± 2.56*	48.67 ± 1.08*	49.92 ± 1.75*
Plasma glucose levels (mmol/L)					
db/m	9.02 ± 1.10	10.24 ± 1.99	9.97 ± 1.94	10.12 ± 1.59	10.08 ± 1.15
db/db	9.97 ± 1.79	25.77 ± 3.78*	35.14 ± 3.69*	41.49 ± 5.05*	44.61 ± 5.03*
Plasma cholesterol (mmol/L)					
db/m	1.56 ± 0.44	1.65 ± 0.27	1.63 ± 0.34	1.75 ± 0.29	1.75 ± 0.41
db/db	1.79 ± 0.41	2.58 ± 0.51*	2.90 ± 0.53*	3.33 ± 0.46*	3.41 ± 0.68*
Plasma triglyceride (mmol/L)					
db/m	0.91 ± 0.22	0.84 ± 0.28	0.96 ± 0.29	0.87 ± 0.31	0.94 ± 0.35
db/db	0.99 ± 0.31	1.44 ± 0.34*	1.94 ± 0.46*	2.54 ± 0.57*	2.57 ± 0.77*
Urinary albumin excretion (μg/24 h)					
db/m	9.8 ± 2.2	11.0 ± 3.2	13.2 ± 4.4	13.9 ± 5.0	15.2 ± 5.6
db/db	10.3 ± 2.9	106.1 ± 21.9*	172.1 ± 37.4*	251.2 ± 49.3*	291.6 ± 50.9*

Data are the $\bar{x} \pm s$. $n = 6$. * $P < 0.05$ vs. db/m.

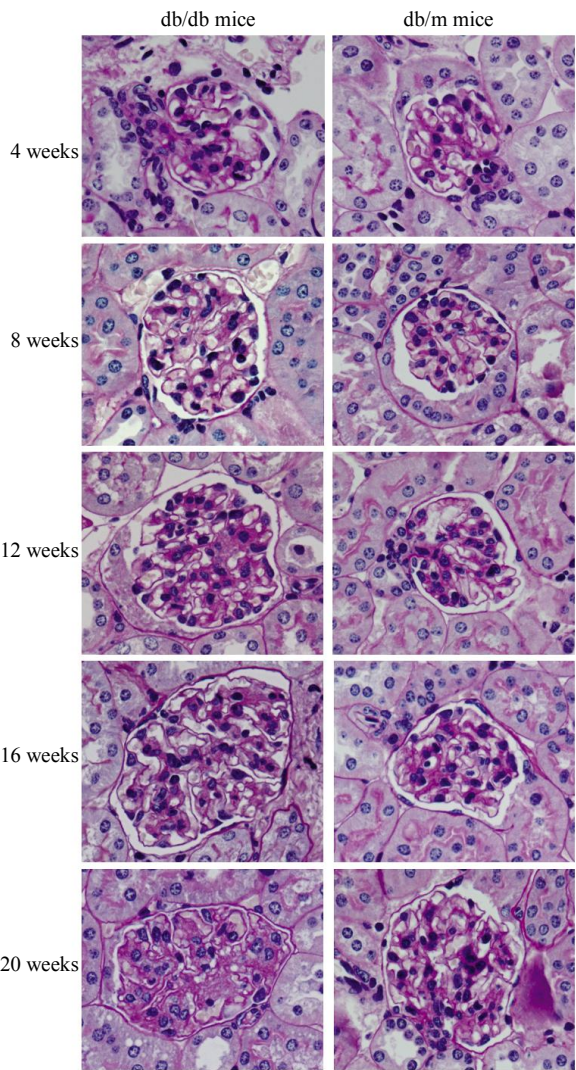


Fig. 1 Glomerular injury increased in the db/db mice with the increase of age (originally 400×)

2.2 糖尿病肾病小鼠肾脏中 C3aR mRNA 和蛋白质水平表达变化分析结果

利用半定量 RT-PCR 的方法，我们对分别代表糖尿病肾病发生发展过程中不同阶段的 db/db 小鼠肾脏中 C3aR mRNA 相对表达水平进行了分析，结果如图 2 所示：与正常对照的同龄 db/m 小鼠相比，4 周龄的 db/db 小鼠(代表糖尿病肾病发生之前)肾

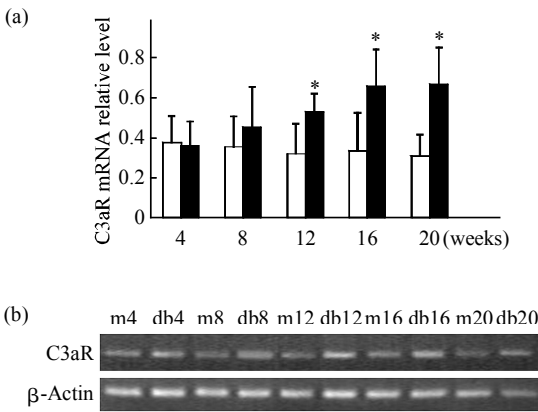


Fig. 2 Increased renal expression of C3aR mRNA in diabetic db/db mice as demonstrated by RT-PCR

(a) Relative expression level of C3aR mRNA in db/db mice of different age which represented different pathological stage of diabetic nephropathy ($n = 6$). ■ : db/db mice; □ : db/m mice. (b) The representative result of RT-PCR as demonstrated by electrophoresis. * $P < 0.05$ vs db/m mice of the same age. m4, m8, m12, m16 and m20 means 4-, 8-, 12-, 16- and 20-week-old db/m mice respectively, while db4, db8, db12, db16 and db20 means 4-, 8-, 12-, 16- and 20-week-old db/db mice as well.

脏中 C3aR 基因的 mRNA 水平没有明显差异, 说明发生糖尿病肾脏病之前, C3aR 基因在 db/db 小鼠与 db/m 小鼠肾脏中的表达在 mRNA 水平上没有差异. 但自 12 周龄开始, db/db 小鼠肾脏中的 C3aR mRNA 水平显著高于同龄的 db/m 小鼠.

利用 Western blotting 方法, 我们又对各年龄组的 db/m 和 db/db 小鼠肾脏中 C3aR 蛋白水平进行了分析, 结果显示, 糖尿病肾病小鼠肾脏组织中 C3aR 蛋白水平也高于对照的 db/m 小鼠(图 3), 这与 C3aR mRNA 分析结果基本相符, 证明 C3aR 基因在糖尿病肾病小鼠肾脏中表达上调.

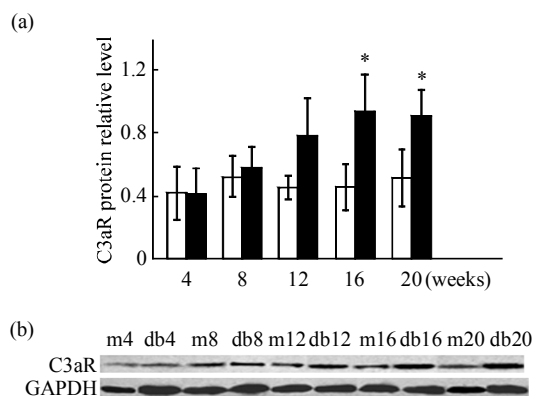


Fig. 3 Increased renal expression of C3aR protein in diabetic db/db mice as demonstrated by Western blotting method

(a) Relative expression level of C3aR protein in db/db mice of different age which represented different pathological stage of diabetic nephropathy ($n=3$). ■: db/db mice; □: db/m mice. (b) The representative result of Western blotting. * $P < 0.05$ vs db/m mice of the same age. m4, m8, m12, m16 and m20 means 4-, 8-, 12-, 16- and 20-week-old db/m mice respectively, while db4, db8, db12, db16 and db20 means 4-, 8-, 12-, 16- and 20-week-old db/db mice as well.

2.3 C3aR 免疫组化分析结果

免疫组化分析显示, 无论是表型正常的 db/m 小鼠还是 db/db 糖尿病肾病小鼠, C3aR 都广泛地存在于肾脏的皮质和髓质, 分布于肾脏的上皮细胞中(包括肾小管上皮细胞、肾小球中的脏层上皮细胞(足细胞)和壁层上皮细胞). 从部位来讲, 皮髓交界处的肾小管中 C3aR 表达量明显要比其他部位的多(图 4). 在肾小球, C3aR 特异地存在于足细胞部位, 在系膜细胞和内皮细胞位置未见明显的 C3aR 分布(图 5).

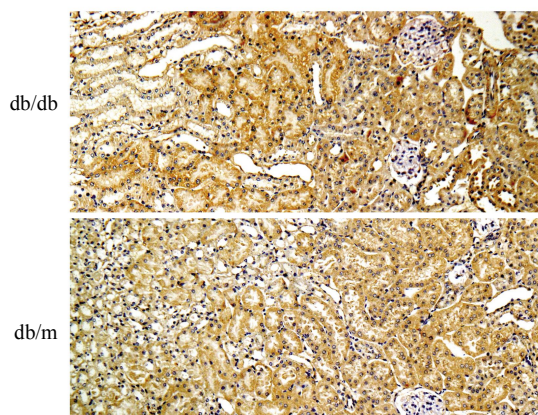


Fig. 4 C3aR is expressed in the renal epithelial cells both in the db/db and db/m mice and the proximal tubule which just located at the intermedial of cortex and medulla have much stronger staining as demonstrated by immunochemistry (originally 200 $\times$)

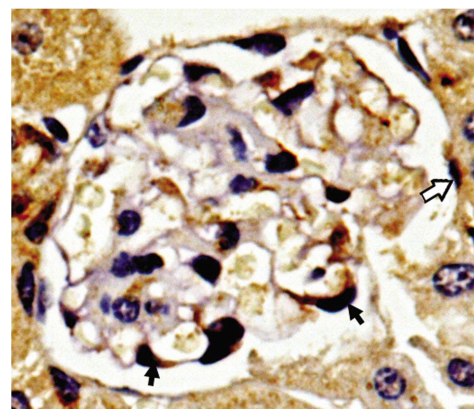


Fig. 5 C3aR was found distributed in the podocytes (black arrow) and parietal epithelial cells (aircored arrow) in the glomerulus (originally 400 $\times$)

与同龄的 db/m 小鼠相比, 4 周龄的 db/db 小鼠肾脏中 C3aR 的表达量没有明显差异, 但从 8 周龄开始, db/db 小鼠肾脏中 C3aR 的免疫组化染色显得要比 db/m 小鼠的强, 且从 8 周龄至 20 周龄, db/db 小鼠肾脏中 C3aR 免疫组化染色总体上有一种逐渐增强的趋势, 其中尤以足细胞中和皮髓交界处肾小管中的变化最为明显(图 6).

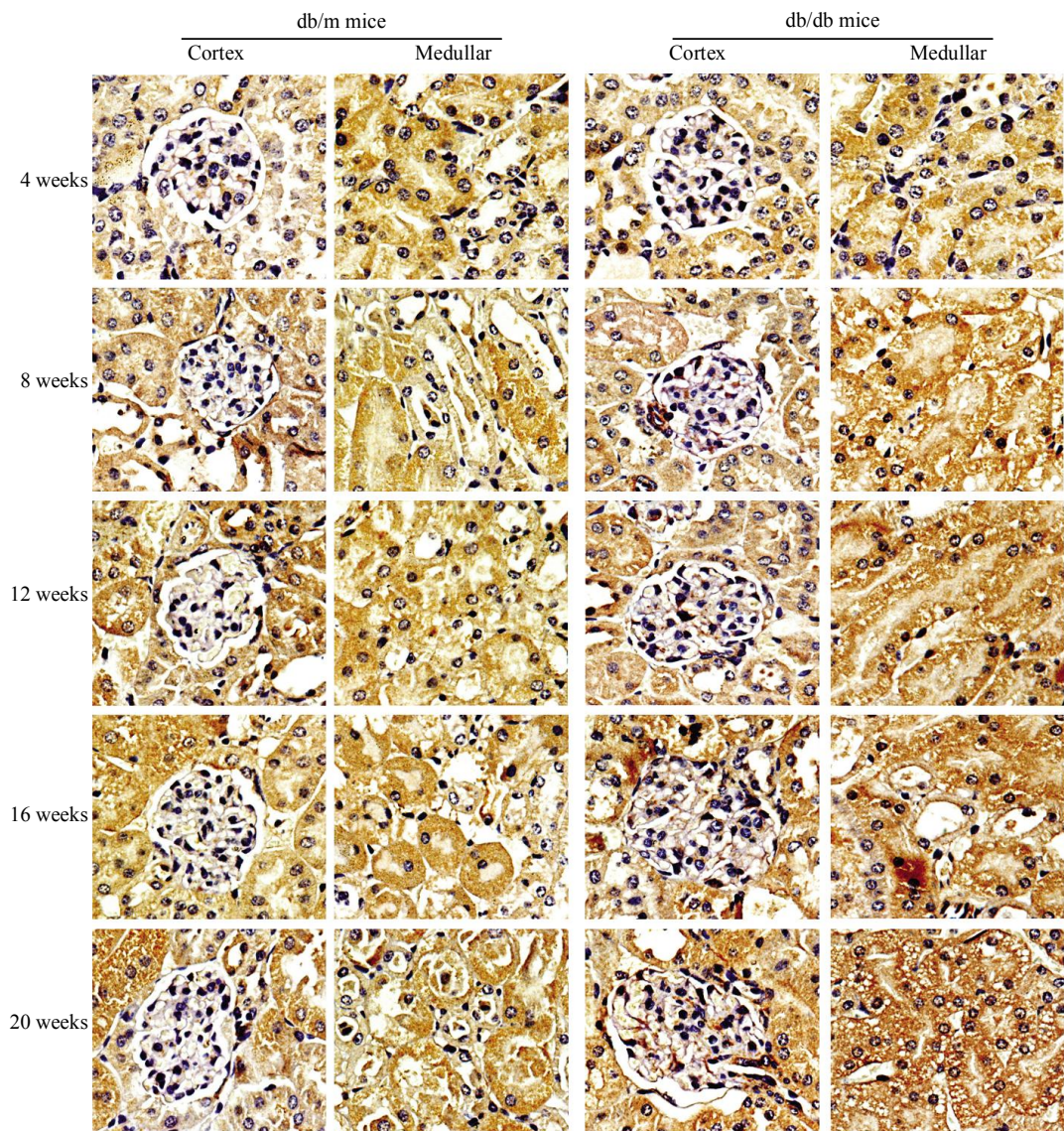


Fig. 6 Comparison of renal C3aR expression in the db/m and db/db mice of different age as demonstrated by immunochemistry (originally 400×)

3 讨 论

过敏毒素 C3a 是一个分子质量约为 9 ku 的小肽。它是各种途径(包括经典途径、替补途径和凝集素途径)的补体激活过程中,补体成分 C3 被 C3 转换酶切割而产生的(C3 被 C3 转换酶切割成 C3a 和 C3b)。作为一个重要的免疫调节分子, C3a 具有趋化和激活白细胞,促进白细胞发生脱颗粒以及分泌各种炎症因子等功能。而 C3a 的这些功能主要是通过与其受体 C3aR 的相互作用而实现的。长期以来,有关 C3a 及其受体 C3aR 的研究主要集中于包括肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、

中性粒细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、单核 - 巨噬细胞、以及树突状细胞在内的各种骨髓来源的细胞^[6]。但 C3aR 也表达于包括脑、肺和肾脏在内的多种器官中的非骨髓来源的组织细胞。从已报道的文献^[7-18]来看,组织细胞上的 C3aR 的功能是多方面的,其与 C3a 的结合除了可诱导不同细胞分泌多种炎症性细胞因子(主要是一些炎症细胞趋化因子),参与炎症调节作用外,还有多种非免疫功能。这包括:介导细胞分化和转分化,通过细胞内信号网络影响细胞存活和凋亡,影响细胞移动和组织系统发育等。自从 2004 年, Braun 等^[13]报道正常人和小鼠肾脏组织细胞(上皮细胞)也表达 C3aR 以

来, 有关 C3aR 与肾脏疾病的关系也已引起了人们的一些注意. 而研究较多的是 C3aR 与狼疮性肾炎的关系. 据报道, C3aR 不仅在狼疮性肾炎患者肾小球中高表达^[19], 而且 C3aR 拮抗剂治疗可显著降低狼疮性肾炎小鼠肾脏的炎症浸润细胞, 减少肾脏组织细胞凋亡, 减小肾损伤, 保护肾功能, 增加小鼠的存活^[12]. 除此之外, 最近, Tang 等^[17]对 C3aR 与蛋白尿性肾病小管损伤的关系进行了探索性研究. 在体外实验中, 他们发现 C3a 和人血清白蛋白均可诱导体外培养的小管上皮细胞发生间充质转分化, 而这种转分化均可被 C3aR 拮抗剂所阻断. 在阿霉素诱导的小鼠肾病模型中, Tang 等发现, 经同样的阿霉素诱导后, C3aR 缺失小鼠的肾脏病变损伤(特别是小管和小管间质病变损伤)程度显著低于野生型小鼠, 同时 C3aR 缺失小鼠发生肾小管上皮细胞间充质转分化的程度也明显低于野生型小鼠. 为此, 他们认为, 由 C3aR 介导的上皮细胞间充质转分化是蛋白尿性肾病小管间质损伤和肾脏纤维化的一个重要原因. 但从我们查阅的文献来看, 至今尚未见任何有关 C3aR 与糖尿病肾病关系的报道.

在此前利用基因芯片分析糖尿病肾病患者肾小球基因表达谱时, 我们曾观察到 C3aR 基因在糖尿病肾病患者肾小球中的表达显著上调, 且表现出随糖尿病肾病的进展而增加的趋势. 为了验证基因芯片的结果, 了解 C3aR 表达变化与糖尿病肾病的关系, 本文中, 我们对 C3aR 在 db/db 小鼠糖尿病肾病发生发展过程中的表达情况进行了较为全面的分析, 结果发现: a. 在正常的 db/m 小鼠, C3aR 特异地表达于肾脏上皮细胞(包括小管上皮细胞、足细胞和壁层上皮细胞), 其中皮髓交界处小管 C3aR 表达较其他部位强; b. 从糖尿病肾病早期开始, db/db 小鼠肾脏中 C3aR 的表达逐渐增加, 并在 16 周龄时达峰值, 此后一直维持在高水平; c. 糖尿病肾病小鼠 C3aR 的表达增加主要发生于肾小球足细胞和肾小管上皮细胞(尤以皮髓交界处小管为甚). 从这些实验结果来看, C3aR 的表达上调至少在时间上与小鼠糖尿病肾病的发生发展过程密切相关.

那么, 糖尿病肾病情况下, C3aR 在肾小球足细胞和肾小管上皮细胞中的表达上调究竟可能有什么样的病理意义呢? 近年来, 有关炎症反应在糖尿病肾病发生发展中的作用已逐渐为人们所认识^[20].

作为体内极重要的免疫反应和调节成分, 虽然补体系统在糖尿病肾病中的作用机制仍然不甚清楚, 但补体沉积和活化在糖尿病肾病中的可能作用也已引起了一些研究者的注意^[21-22]. 据报道, 在有蛋白尿的情况下, 小管上皮细胞存在内在性的 C3 转化酶激活^[7], 这就说明至少在发生糖尿病肾病后(出现蛋白尿), 肾组织中会有内源性 C3a 的产生. 此外, 由于 C3a 是一个小分子, 机体系统性产生的 C3a 也可方便地从血中透过肾小球滤过膜, 与存在于肾小球足细胞和肾小管上皮细胞中的受体——C3aR 相互作用. 而在糖尿病肾病情况下, 肾小球足细胞和小管上皮细胞中 C3aR 的表达上调, 无疑将增加足细胞和小管上皮细胞对系统性和内源性产生的 C3a 的反应性. 这样, 系统性和内源性产生的 C3a 就更有可能通过激活足细胞和小管上皮细胞上的 C3aR, 对足细胞和小管上皮细胞产生各种各样的影响. 根据已报道的 C3aR 的功能^[3-14], 我们推测这种影响很可能包括: a. 促使足细胞和小管上皮细胞分泌炎症性细胞因子(包括各种炎症细胞趋化因子); b. 影响足细胞和小管上皮细胞的存活, 促进它们凋亡; c. 促进小管上皮细胞间充质转分化; d. 也可能促使足细胞发生转型, 使得足细胞的结构和功能都发生改变. 足细胞和小管上皮细胞本身的凋亡自然会使足细胞和小管上皮细胞减少; 而它们分泌的炎症性细胞因子(特别是各种炎症细胞趋化因子)会吸引炎症细胞进入肾组织, 引起或加重肾组织中的炎症状态和炎症损伤; 小管上皮细胞间充质转分化一方面会使小管本身损伤, 另一方面转分化产生的肌纤维母细胞会产生大量的细胞间质, 促进肾间质纤维化; 而足细胞转型也有可能使足细胞与基底膜的黏附力下降, 发生足细胞脱落, 或者使足细胞发生足突融合等病变, 使足细胞失去其本来的功能. 所有这些都会损害肾脏的结构和功能, 推动糖尿病肾病的进展. 而如果情况真是这样, C3aR 将很有可能成为一个有效的防治糖尿病肾病的新靶标. 有意思的是, 在实验中, 我们已观察到, 在糖尿病肾病小鼠, C3aR 高表达的肾小管细胞常伴有较多的空泡变性的情况(图 7), 这从一个侧面验证了我们关于 C3aR 与糖尿病肾病小管病变损伤有关的推断.

尽管如此, 我们目前对于 C3aR 与糖尿病肾病关系的认识仍极为有限, 更多的只是一种科学猜测, 有待于更进一步的验证和探讨.

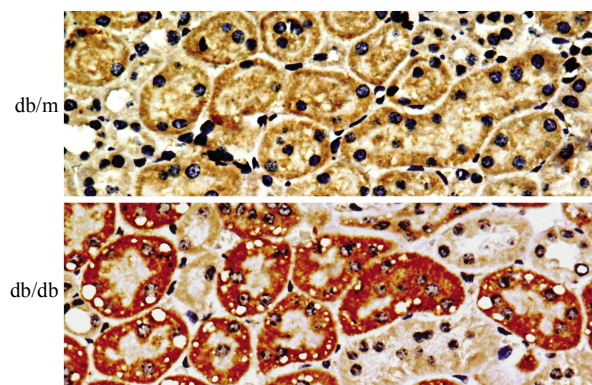


Fig. 7 Vacuolar degeneration was found in the renal tubular cells which expressed much more C3aR in diabetic db/db mice (originally 400×)

参 考 文 献

- [1] Balakumar P, Arora M K, Ganti S S, *et al.* Recent advances in pharmacotherapy for diabetic nephropathy: current perspectives and future directions. *Pharmacol Res*, 2009, **60**(1): 24-32
- [2] 刘志红, 郑敬民, 吴义超, 等. db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏基因表达谱及大黄酸对其的影响. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2002, **11**(3): 201-220
Liu Z H, Zheng J M, Wu Y C, *et al.* *Chin J Nephrol Dialy Transplant*, 2002, **11**(3): 201-220
- [3] 郑敬民, 刘志红, 张 鑫, 等. db/db 小鼠糖尿病肾病相关基因的分析 and 克隆. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**(3): 404-411
Zheng J M, Liu Z H, Zhang X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**(3): 404-411
- [4] 吴义超, 刘志红, 曾彩虹, 等. 糖尿病肾病患者肾小球基因表达谱及其与病情进展的关系. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2004, **13**(6): 503-511
Wu Y C, Liu Z H, Zeng C H, *et al.* *Chin J Nephrol Dialy Transplant*, 2004, **13**(6): 503-511
- [5] 陈 珊, 刘志红, 王瑞石, 等. 糖尿病肾病疾病进展相关基因的基因组学研究. *中华肾脏病杂志*, 2006, **22**(9): 528-534
Chen S, Liu Z H, Wang R S, *et al.* *Chin J Nephrol*, 2006, **22**(9): 528-534
- [6] Peng Q, Li K, Sacks S H, *et al.* The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, **8**(3): 236-246
- [7] Tang Z, Lu B, Hatch E, *et al.* C3a mediates epithelial-to-mesenchymal transition in proteinuric nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2009, **20**(3): 593-603
- [8] Jacob A, Bao L, Brorson J, *et al.* C3aR inhibition reduces neurodegeneration in experimental lupus. *Lupus*, 2010, **19** (1): 73-82
- [9] Proctor L M, Moore T A, Monk P N, *et al.* Complement factors C3a and C5a have distinct hemodynamic effects in the rat. *Int Immunopharmacol*, 2009, **9**(6): 800-806
- [10] Schraufstatter I U, Discipio R G, Zhao M, *et al.* C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. *J Immunol*, 2009, **182**(6): 3827-3836
- [11] Bénard M, Raoult E, Vaudry D, *et al.* Role of complement anaphylatoxin receptors (C3aR, C5aR) in the development of the rat cerebellum. *Mol Immunol*, 2008, **45**(14): 3767-3774
- [12] Bao L, Osawe I, Haas M, *et al.* Signaling through up-regulated C3a receptor is key to the development of experimental lupus nephritis. *J Immunol*, 2005, **175**(3): 1947-1955
- [13] Braun M C, Reins R Y, Li T B, *et al.* Renal expression of the C3a receptor and functional responses of primary human proximal tubular epithelial cells. *J Immunol*, 2004, **173**(6): 4190-4196
- [14] Shinjyo N, Ståhlberg A, Dragunow M, *et al.* Complement-derived anaphylatoxin C3a regulates *in vitro* differentiation and migration of neural progenitor cells. *Stem Cells*, 2009, **27**(11): 2824-2832
- [15] Thurman J M, Lenderink A M, Royer P A, *et al.* C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion. *J Immunol*, 2007, **178**(3): 1819-1828
- [16] Purwar R, Wittmann M, Zwirner J, *et al.* Induction of C3 and CCL2 by C3a in keratinocytes: a novel autocrine amplification loop of inflammatory skin reactions. *J Immunol*, 2006, **177**(7): 4444-4450
- [17] Monsinjon T, Gasque P, Chan P, *et al.* Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J*, 2003, **17**(9): 1003-1014
- [18] Monsinjon T, Gasque P, Ischenko A, *et al.* C3A binds to the seven transmembrane anaphylatoxin receptor expressed by epithelial cells and triggers the production of IL-8. *FEBS Lett*, 2001, **487**(3): 339-346
- [19] Mizuno M, Blanchin S, Gasque P, *et al.* High levels of complement C3a receptor in the glomeruli in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis*, 2007, **49**(5): 598-606
- [20] Rivero A, Mora C, Muros M, *et al.* Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)*, 2009, **116**(6): 479-492
- [21] Xiao X, Ma B, Dong B, *et al.* Cellular and humoral immune responses in the early stages of diabetic nephropathy in NOD mice. *J Autoimmun*, 2009, **32**(2): 85-93
- [22] Østergaard J, Hansen TK, Thiel S, *et al.* Complement activation and diabetic vascular complications. *Clin Chim Acta*, 2005, **361**(1-2): 10-19

Expression and Possible Role of C3aR in The Kidney of Diabetic db/db Mice*

ZHENG Jing-Min**, ZHU Xiao-Dong, ZHANG Ming-Chao, WANG Jian-Ping,

XU Li-Li, CHEN Da-Cheng, LIU Zhi-Hong

(Research Institute of Nephrology, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract C3aR is a receptor of anaphylatoxin C3a and have been reported associated with inflammation disease. Kidney samples were obtained from db/db mice and their db/m littermates at the age of 4, 8, 12, 16 and 20 weeks. The expression of C3aR was assessed by RT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry, and then correlated with biochemical and histological indices of kidney injury. No significant difference of C3aR expression was found in the kidney of db/db mice as compared with the control db/m mice at the age of 4 weeks, a time when all biochemical and histological indices indicated that the mice were in pre-diabetic condition. However, with the development of obesity, hyperglycemia and proteinuria, the renal expression of C3aR in the db/db mice increased as compared with the db/m mice of the same age. Immunohistochemistry analysis revealed that C3aR protein distributed specifically in renal epithelial cells, including tubular epithelial cells, glomerular podocytes and parietal epithelial cells both in db/m and db/db mice. Much more intensity of C3aR immunohistochemical staining was found in the epithelial cells of proximal tubule which just located at the intermedial of cortex and medulla. In the glomerulus, C3aR was found distributed specifically in the podocytes position and no C3aR staining was found in the mesangial and endothelial cells. In diabetic db/db mice, the increased expression of C3aR was found mainly in proximal tubule and podocytes. Interestingly, serious vacuolar degeneration was often observed in tubular cells with higher intensity of C3aR immunohistochemical staining. All these suggested that C3aR might have something to do with the initiation or/and development of diabetic nephropathy, especially in the pathogenesis of tubular cells and podocytes.

Key words C3aR, anaphylatoxin, diabetic nephropathy, db/db mice

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00150

*This work was supported by a grant from Jinling Hospital Fund (2010M027).

**Corresponding author.

Tel: 86-25-80860805, E-mail: zhengjingmin@yahoo.com

Received: March 24, 2010 Accepted: June 7, 2010