

2023 届研究生硕士学位论文

分类号: _____

学校代码: 10269

密 级: _____

学 号: 51201300056



華東師範大學

East China Normal University

硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION

论文题目 金属蛋白酶 ADAMTS18 在小鼠

肾小球滤过屏障形成中的作用研究

院 系: 生命科学学院

专 业: 神经生物学

研 究 方 向: 发育与疾病

指 导 教 师: 张巍 研究员

学 位 申 请 人: 孙敏

2023 年 5 月

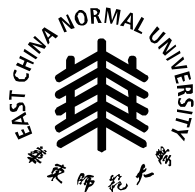
2023 届研究生硕士学位论文

分类号：

学校代码：10269

密 级：

学 号：51201300056



華東師範大學

East China Normal University

硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION

论文题目：金属蛋白酶 ADAMTS18 在
小鼠肾小球滤过屏障形成中的作用
研究

院 系： 生命科学学院

专 业： 神经生物学

研究方向： 发育与疾病

指导教师： 张巍 研究员

学位申请人： 孙 敏

2023 年 5 月

Dissertation for Master's Degree in 2023

University code:10269

Student ID: 51201300056

East China Normal University

Title: Role of metalloproteinase ADAMTS18 in the formation of mouse glomerular filtration barrier

Department/School: School of LifeScience

Major: Neuroscience

Research direction: Development and Disease

Supervisor: Prof. Wei Zhang

Candidate: Min Sun

May, 2023

中文摘要

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type I motifs) 是一类含 I 型血小板反应蛋白模体的解整合素金属蛋白酶, 目前在人类中已发现 19 个家族成员。ADAMTSs 家族成员的主要作用是切割或修饰组织微环境中的细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 成分, 在器官发育、组织形态发生、炎症、肿瘤等多种病理生理过程中发挥重要作用。ADAMTS18 于 2002 年被首次发现命名, 一直被定义为“孤儿 ADAMTS 蛋白”, 即不知功能和底物的 ADAMTS 家族成员。随着生物技术和 *Adamts18* 基因敲除 (*Adamts18^{-/-}*) 小鼠的建立, 包括我们课题组在内的一些国内外研究团队发现: ADAMTS18 主要表达于胚胎发育早期, 通过切割修饰 ECM 分子, 决定众多器官的早期形态发生。ADAMTS18 在人胚胎肾脏中高表达, 提示其可能在肾脏发育过程中发挥作用。课题组前期研究发现, ADAMTS18 在肺、下颌下腺、泪腺等上皮分支类器官的发育和形态发生中发挥重要作用。肾脏属于典型的上皮分支类器官, 但 ADAMTS18 对哺乳动物肾脏发育的确切影响及其内在机制仍不清楚。本论文将对这一科学问题展开研究。

研究方法: (1) 目前尚缺乏抗 ADAMTS18 特异性抗体, 为此采用 qRT-PCR 实验方法检测 *Adamts18* mRNA 在肾脏发育不同阶段的表达水平; 通过 RNA 原位杂交技术检测 *Adamts18* 在肾脏中的表达部位及细胞类型。(2) 通过血液和尿液生化检测及蛋白质组学分析, 探究 ADAMTS18 对小鼠肾功能的影响。(3) 通过透射电镜、HE 染色、过碘酸希夫糖原染色 (Periodic Acid-Schiff stain, PAS) 和六胺银染色 (Periodic Acid-Silver Methemamine, PASM) 等方法, 探究 ADAMTS18 缺失对小鼠肾脏组织形态结构的影响。(4) 通过 qRT-PCR 及免疫组化等方法探究 ADAMTS18 影响肾脏发育的分子机制。(5) 通过马松 (Masson) 染色和免疫印迹 (Western blot) 方法探究 ADAMTS18 缺失在小鼠自发性肾纤维化中的作用。

研究结果: (1) 从 E13.5-出生后 14 天 (P14), 是肾单位形成的关键期 (肾单位由肾小体和肾小管构成; 而肾小体又由肾小球和肾小囊组成)。这个时期,

Adamst18 mRNA 在肾脏中广泛表达，主要的细胞类型包括：输尿管芽顶端上皮细胞和集合管上皮细胞。在出生后 2 周，*Adamst18* mRNA 的数量急剧减少；出生 6 周后，*Adamst18* mRNA 在肾脏中几乎检测不到。（2）与野生型（*Adamts18^{+/+}*）小鼠相比，*Adamts18^{-/-}* 小鼠尿液中出现蛋白尿，且尿液中可溶性 E-cadherin 显著增加。（3）透射电镜结果显示 *Adamts18^{-/-}* 小鼠肾小球中上皮细胞和内皮细胞排列紊乱，细胞内皮细胞从基底膜剥脱，部分基底膜变薄、撕裂，足细胞足突减少和微绒毛化等。（4）*Adamts18^{-/-}* 小鼠肾小球滤过膜成分 *Lama5* 和 *Lamb2* 较 *Adamts18^{+/+}* 小鼠表达显著性降低。（5）不同年龄 *Adamts18^{-/-}* 小鼠并未发现自发性肾纤维化形成。

研究结论：ADAMTS18 是一个与早期肾单位形成相关的阶段特异性基因，通过对肾小球滤过屏障细胞外基质成分的重塑，影响肾小球滤过屏障的形成。

关键词：ADAMTS18，肾小球滤过屏障，蛋白尿，细胞外基质，基因敲除小鼠

ABSTRACT

Research Background: ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type I motifs) includes nineteen members in humans. ADAMTSs are mainly involved in cleaving or modifying the extracellular matrix (ECM) components in the tissue microenvironment, which play an important role in various pathophysiological processes such as organ development, tissue morphogenesis, inflammation and tumor. ADAMTS18, first named in 2002, has long been defined as an "orphan ADAMTS protein," with unknown function or substrate. With the development of biotechnology and the establishment of *Adamts18* gene knockout (*Adamts18^{-/-}*) mice, ADAMTS18 has been found to be mainly expressed in early embryonic development, and determines the early morphogenesis of many organs. ADAMTS18 is highly expressed in human embryonic kidney, suggesting that ADAMTS18 may play a role in kidney development. Our previous studies have found that ADAMTS18 plays an important role in the development and morphogenesis of epithelial branch organoids such as lung, submandibular gland and lacrimal gland. The kidney is an typical epithelial-branching organ, but the exact effects of ADAMTS18 on mammalian kidney development and its underlying mechanisms remain unclear. This study focuses on this scientific problem.

Research methods: (1) Specific antibody against ADAMTS18 is currently lacking, so the expression level of *Adamts18* mRNA at different stages of renal development was detected by qRT-PCR. *Adamts18* expression sites and cell types in kidney were detected by RNA in situ hybridization. (2) The effects of ADAMTS18 on renal function in mice were investigated by blood and urine biochemical tests and proteomic analysis. (3) By means of Periodic Acid-Schiff stain (PAS) and periodic acid-silver metharamine (PASM), the effect of ADAMTS18 deletion on the morphological structure of mouse kidney tissue were explored. (4) qRT-PCR and immunohistochemical methods were used to explore the molecular mechanism of

ADAMTS18 affecting kidney development. (5) Masson staining and Western blot were used to investigate the role of ADAMTS18 deletion in mice with spontaneous renal fibrosis.

Results: (1) The period from E13.5 to 14 days after birth (P14) is the critical period for nephrons formation (nephrons consist of corpuscles and tubules; Renal corpuscles are composed of glomeruli and renal sacs). During this period, *Adamts18* mRNA was widely expressed in kidney, and the main cell types included ureteral bud apical epithelial cells and collecting duct epithelial cells. The amount of *Adamts18* mRNA decreased sharply at 2 weeks after birth. *Adamts18* mRNA is almost undetectable in the kidneys 6 weeks after birth. (2) Compared with wild-type (*Adamts18^{+/+}*) mice, *Adamts18^{-/-}* mice had albuminuria in urine, and soluble E-cadherin in urine was significantly increased. (3) Transmission electron microscopy (TEM) showed that the arrangement of epithelial cells and endothelial cells in the glomerulus of *Adamts18^{-/-}* mice was disordered, the endothelial cells were stripped from the basement membrane, some of the basement membrane was thinner and torn, and the podocyte process was reduced and microvillous. (4) The expressions of *Lama5* and *Lamb2* in glomerular filtration membrane of *Adamts18^{-/-}* mice were significantly lower than those of *Adamts18^{+/+}* mice. (5) No spontaneous renal fibrosis was found in *Adamts18^{-/-}* mice at different ages.

Conclusion: ADAMTS18 is a stage-specific gene associated with early nephron formation. ADAMTS18 influences the formation of glomerular filtration barrier by remodeling extracellular matrix components.

Key words: ADAMTS18, glomerular filtration barrier, albuminuria, extracellular matrix, Gene knockout mice

目 录

1 绪论.....	1
1.1 肾脏的发育过程.....	2
1.2 肾脏滤过系统.....	4
1.2.1 肾脏滤过屏障构成.....	4
1.2.2 肾小球基底膜(GBM).....	6
1.3 遗传性肾病与蛋白尿.....	9
1.4 Adamts 简介	11
1.4.1 ADAMTS 家族简介	11
1.4.2 ADAMTS 家族成员与肾脏.....	12
1.4.3 ADAMTS18 研究现状.....	13
1.5 研究目的与意义.....	14
2 实验材料.....	16
2.1 实验动物.....	16
2.2 实验仪器.....	16
2.3 实验耗材.....	18
2.4 实验试剂.....	19
2.5 常用试剂配方.....	21
3 实验方法.....	23
3.1 小鼠的饲养与繁殖.....	23
3.1.1 小鼠的饲养.....	23
3.1.2 小鼠的繁殖.....	23
3.2 小鼠基因型鉴定.....	24
3.2.1 DNA 的提取	24
3.2.2 PCR	25
3.2.3 琼脂糖凝胶电泳.....	26
3.2.4 基因型判断.....	27
3.3 实时荧光定量(qRT-PCR)	29
3.3.1 总 RNA 提取	29
3.3.2 RNA 浓度测定	31
3.3.3 RNA 反转录为 cDNA	31
3.3.4 qRT-PCR 反应	32
3.4 石蜡组织切片.....	33
3.5 原位杂交.....	35
3.6 小鼠肾功能各指标检测.....	37

3.6.1 血标本留取.....	37
3.6.2 尿标本留取.....	37
3.6.3 生化指标检测.....	37
3.7 透射电镜观察.....	38
3.8 苏木精-伊红染色.....	39
3.9 PAS 染色.....	40
3.10 PASM 染色.....	41
3.11 免疫组织化学(IHC).....	42
3.12 Masson 染色.....	43
3.13 Western Blot.....	44
3.13.1 组织总蛋白抽提.....	44
3.13.2 蛋白浓度测定及蛋白制样.....	44
3.13.3 蛋白免疫印迹(Western blot, WB).....	45
4 实验结果.....	49
4.1 Adamts18 基因在小鼠肾脏中的时空表达特征.....	49
4.1.1 qRT-PCR 检测 Adamts18 mRNA 在小鼠肾组织中的表达.....	49
4.1.2 原位杂交(ISH)检测 Adamts18 mRNA 在小鼠肾脏中的细胞表达类型及分布特征.....	50
4.2 Adamts18 基因敲除小鼠(Adamts18 ^{-/-})出现蛋白尿.....	51
4.3 Adamts18 ^{-/-} 小鼠肾小球结构异常.....	53
4.4 Adamts18 ^{-/-} 小鼠肾组织病理学分析.....	55
4.4.1 Adamts18 ^{-/-} 小鼠小鼠肾组织 HE 染色分析.....	55
4.4.2 Adamts18 ^{-/-} 小鼠小鼠肾组织 PAS 及 PASM 染色分析.....	56
4.5 Adamts18 ^{-/-} 小鼠肾脏 Lama5、Lamb2 的转录表达水平降低.....	58
4.6 Adamts18 ^{-/-} 小鼠肾小球 LAMA5 蛋白表达.....	60
4.7 Adamts18 ^{-/-} 小鼠肾脏其它 ADAMTS 家族成员转录表达分析.....	61
4.8 Adamts18 ^{-/-} 小鼠肾脏自发性纤维化表型分析.....	62
5 讨论.....	64
6 结论.....	69
参考文献.....	70
附录.....	82

插图和附表清单

图 1 : 肾脏发育过程图 ^[12]	3
图 2 : 肾小球滤过屏障结构 ^[23]	4
图 3 : 肾小球基底膜组分图 ^[58]	7
图 4 : 发育期间 GBM 的亚型转化	9
图 5 : ADAMTS 家族成员分类图	11
图 6 : ADAMTS18 结构示意图	13
图 7 : 研究技术路线示意图	15
图 8 : 引物扩增片段示意图和 PCR 基因型鉴定电泳示意图	29
图 9 : <i>Adamts18</i> mRNA 在小鼠肾组织中的表达	50
图 10 : 原位杂交 (ISH) 检测 <i>Adamts18</i> mRNA 在小鼠肾脏中的细胞表达类型及分布特征	51
图 11 : 透射电镜分析 8 周龄野生小鼠 (+/+) 及 <i>Adamts18</i> 基因缺失小鼠 (-/-) 肾小球滤过屏障结构	54
图 12 : 2 周龄和 8 周龄小鼠肾的苏木素-伊红 (HE) 染色	55
图 13 : 小鼠肾组织过碘酸希夫 (PAS) 染色	56
图 14 : 小鼠肾组织切片六胺银 (PASM) 染色	58
图 15 : 肾小球基底膜组分在 2W (A) 和 E16.5 (B) 小鼠 (<i>Adamts18</i> ^{+/+} 和 <i>Adamts18</i> ^{-/-}) 肾脏中的转录表达	60
图 16 : LAMA5 在 2 周龄 (<i>Adamts18</i> ^{+/+} 和 <i>Adamts18</i> ^{-/-}) 小鼠肾小球中的表达	61
图 17 : <i>Adamts18</i> ^{-/-} 小鼠肾脏其它 ADAMTS 家族成员转录表达分析	62
图 18 : <i>Adamts18</i> ^{-/-} 小鼠肾脏自发性纤维化表型分析	63
表 1 : 8 周龄小鼠肾脏的血液生化检测和尿常规检测结果	52
表 2 : 8 周龄小鼠尿液质谱检测结果	53

缩略词

Abbreviations

英文缩写	英文全称	中文全称
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type I motifs	含 I 型血小板结合蛋白 模体的解整合素金属蛋 白酶
AS	Alport syndrome	阿尔波特综合征
CM	Cap mesenchymal	帽状间充质
CMCs	Cap mesenchymal cells	帽状间充质细胞
CAKUT	Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract	先天性肾脏尿路畸形
<i>Col4a1</i>	Collagen type IV alpha 1	IV型胶原 α 1
<i>Col4a2</i>	Collagen type IV alpha 2	IV型胶原 α 2
<i>Col4a3</i>	Collagen type IV alpha 3	IV型胶原 α 3
<i>Col4a4</i>	Collagen type IV alpha 4	IV型胶原 α 4
<i>Col4a5</i>	Collagen type IV alpha 5	IV型胶原 α 5
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
ESL	Endothelial surface layer	内皮表面层
ESRD	End-stage renal failure	终末期肾衰竭
<i>Fbn1</i>	Fibrillin 1	原纤维蛋白 1
<i fn<="" i=""></i>	Fibronectin	纤粘蛋白
FPS	Foot process	足突
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	磷酸甘油醛脱氢酶
GDNF	Glialcellline-Derived Neurotrophic	胶质细胞源性神经营养

	Factor	因子
GBM	Glomerular basement membrane	肾小球基底膜
GFB	Glomerular filtration barrier	肾小球滤过屏障
GFR	Glomerular filtration rate	肾小球滤过率
H&E	Hematoxylin eosin	苏木素-伊红染色
HSPG	Heparan- sulfate proteoglycans	硫酸乙酰肝素蛋白聚糖
HT	Heterozygote	杂合型
IHC	Imunohistochemistry	免疫组织化学
IKD	Inherited kidney diseases	遗传性肾病
ISH	In situ hybridization	原位杂交技术
KO	Knockout	基因敲除型
<i>Lama1</i>	Laminin Alpha 1	层粘连蛋白 α 1
<i>Lama5</i>	Laminin Alpha 5	层粘连蛋白 α 5
<i>Lamb1</i>	Laminin Beta 1	层粘连蛋白 β 1
<i>Lamb2</i>	Laminin Beta 2	层粘连蛋白 β 2
<i>Lamc1</i>	Laminin Gamma 1	层粘连蛋白 γ 1
MET	Mesenchymal-Epithelial transformation	间充质-上皮转化
MM	Metaneptric mesenchyme	后肾间充质
ns	not significant	差异不显著
PAS	Periodic Acid-Schiff stain	过碘酸希夫染色
PASM	Periodic acid-silver metharamine	六胺银染色
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
<i>qRT-PCR</i>	Quantitative Real-Time-PCR	实时荧光定量 PCR
RV	Renal vesicle	肾囊泡
SD	Slit diaphragm	狭缝隔膜
UB	Umetenic bud	输尿管芽
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子

WD	Wolffian duct	沃尔夫氏管，中肾管
WT	Wild type	野生型

1 绪论

肾脏是脊椎动物泌尿系统中的一个重要排泄器官，其功能是过滤血液并将体内多余的水、无机盐和代谢废物等排出，形成尿液排出体外，同时通过重吸收功能保留体内需要的物质和水分，对维持机体的体液平衡和酸碱平衡至关重要。近年来，随着人类生活环境和方式的改变以及寿命的延长，各种原因导致的肾脏疾病人数逐渐增多，其患病率和死亡率不断攀升，给众多家庭带来了沉重的精神负担和经济负担，对肾脏及相关疾病的研究具有重要意义。

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) 是含 I 型血小板结合蛋白基序的解整合素金属蛋白酶，其通过切割或修饰细胞外基质成分，在胚胎发育、器官形态发生、肿瘤、炎症和疾病等多个生理和病理过程中都发挥着非常重要的作用。ADAMTS18 是 ADAMTS 家族中一种不知功能和底物的“孤儿金属蛋白酶”，在人类和小鼠多种组织器官中都有广泛表达。研究发现，ADAMTS18 在一些分支类器官如肺、颌下腺、乳腺和泪腺的分支尖端富集表达，并在这些器官的发育中发挥重要作用。肾脏也是一种典型的分支类器官，且有研究表明 ADAMTS18 在小鼠胚胎肾中高表达，提示 ADAMTS18 可能在哺乳动物的肾脏发育中也发挥着重要作用。

我们课题组在对先前构建的 *Adamts18* 基因敲除小鼠 (*Adamts18^{-/-}*) 进行表型分析时，意外发现 *Adamts18^{-/-}* 小鼠有蛋白尿形成表型。蛋白尿是多种肾脏疾病的常见临床表现，其出现往往意味着肾脏滤过屏障结构受损。

肾脏滤过屏障由内层的内皮细胞、中间层的肾小球基底膜 (GBM) 和外层的足细胞三部分构成，这三者中任一结构成分出现异常都会导致蛋白尿表型的出现。肾小球基底膜 (GBM) 是由内皮细胞和足细胞各自分泌的细胞外基质融合而成，实质上是一种特殊的细胞外基质 (ECM)。据报道，ADAMTS18 通过切割修饰 ECM 分子，在多个组织器官的发育中发挥重要作用。此外，研究表明，GBM 的正常发育和组分的完整性对于肾脏滤过屏障结构的维持和肾正常的滤过功能的发挥至关重要，肾小球基底膜组分的基因缺陷与一系列遗传性的人类疾病有关，例如由 COL4A3、COL4A4 和 COL4A5 基因发生缺陷引起的阿尔波特综

合征以及由 LAMB2 突变引起的皮尔逊综合征, 这些疾病都出现蛋白尿表型并伴随着肾小球滤过屏障结构异常。为了探究 *Adamts18* 基因敲除小鼠出现蛋白尿表型的确切机制, 我们将重点关注 *Adamts18* 缺失对肾小球滤过屏障中的肾小球基底膜 (GBM) 这一结构的发育及影响。

因此, 本课题将利用 *Adamts18*^{-/-} 小鼠, 研究 ADAMTS18 在肾脏滤过屏障发育中的作用, 探究 *Adamts18* 缺失导致小鼠出现蛋白尿的机制。

1.1 肾脏的发育过程

哺乳动物的肾脏发育起源于中间中胚层的生肾索(Nephrogenic cord)^[1], 由于生肾索的不同体节位置及发育时间的不同, 肾脏发育先后经历前肾(Pronephros)、中肾(Mesonephros)和后肾(Metanephros)三个阶段^[2]。在哺乳动物中前肾没有明显的功能作用, 中肾在胚胎发育阶段被认为是生殖系统发育的前体, 这两个器官的发育都是暂时性的, 随着发育的进行它们相继发生退化^[3]。真正具有完整结构和功能的永久性肾脏是由后肾发育而来的, 后肾经过一系列的发育、分化最终形成具有一定功能的成熟型肾脏^[4]。

肾脏是哺乳动物重要的器官, 小鼠肾脏于胚胎 E10.5d 开始发育, E10.5d 天后肾间充质中的一些细胞向 Wolffian 管(Wolffian duct, WD, 也叫中肾管)释放诱导信号分子, 在信号分子的刺激下 WD 其尾端被诱导萌生出一个小的输尿管芽(Umetenic bud, UB)^[5,6], 长出的 UB 随即开始向疏松的后肾间充质方向延伸, 并在延伸的过程中进行分支, 到 E11.5 时, 输尿管芽已经分支形成一个“T”样的结构^[7], 这个时候也是肾脏真正开始发育的阶段。此时初始形成的后肾由“T”形的输尿管芽(UB)和后肾间充质(Metanephric mesenchyme, MM)两部分组成, 后肾间充质围绕输尿管芽尖端呈帽状聚集(这点对于 MM 与 UB 的相互诱导非常重要)^[5], 这时候分支的输尿管芽也通过一种未知的机制建立了一种分子机制, 能够维持后肾间充质中的生肾性程序一直到小鼠出生后的早期^[8-10], 肾脏发育就在 UB 和 MM 之间的相互诱导下开始发生^[11]。

输尿管芽与后肾间充质的诱导包括两个方面: 一方面在后肾间充质的诱导下, UB 进行反复分支, 最终发育形成成熟肾脏的集合管系统网络(在停止分支前输

尿管芽一共经历了 12 次分支^[10]。另一方面 UB 会诱导后肾间充质中的帽状间充质细胞（Cap mesenchymal cells，CMCs）经历间充质-上皮转化（Mesenchymal-Epithelial transformation，MET），形成具有极性的上皮，这部分细胞再经过一系列的形态学变化，最终发育成成熟的肾单位^[11]。

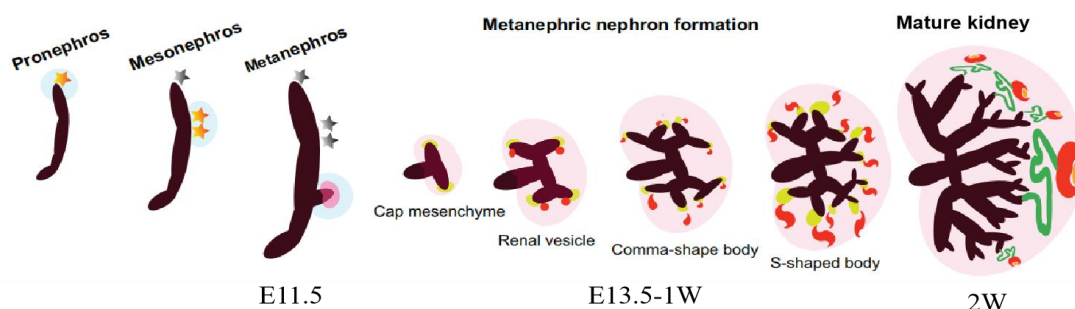


图 1: 肾脏发育过程图^[12]。Pronephros: 前肾; Mesonephros: 中肾; Metanephros: 后肾; Cap mesenchymal: 帽状间充质; Renal vesicle: 肾囊泡; Comma-shaped body: 逗号小体; S-shaped body: S 形小体。

肾单位是肾脏结构和功能的基本单位，由发挥滤过作用的肾小球以及具有重吸收作用的肾小管（包括近端小管、髓袢细段和远端小管）两部分组成^[13]。肾单位的具体发育过程如下：首先，在 E11.5 天时，在输尿管芽尖端（UB）的诱导下，后肾间充质（MM）中的帽状间充质（Cap mesenchymal）室中紧邻输尿管芽尖端的肾单位祖细胞（将来发育分化为肾单位）开始分化，分化-承诺（committed）的肾单位祖细胞可以在帽状间充质室中来回移动，其中一部分完全承诺的肾单位祖细胞从输尿管芽尖端移动到输尿管芽的腋下部位，并聚集成团状，称为管前聚集体，这是分化肾单位的第一个前体形式^[14]。E13.5 天时，管前聚集体发生间充质-上皮转化（MET），形成一个中空的囊肿样上皮结构，叫做肾囊泡（Renal vesicle，RV），这是肾脏发育的第一个阶段^[15,16]，每个肾囊泡将发育形成一个肾单位。随后肾囊泡继续进行增殖和分化，并发生一系列形态学改变，经历逗号小体（Comma-shaped body）和 S 形小体（S-shaped body）两个阶段^[5,17]，肾单位在这个过程中进一步发育。出生后 1 周，UB 停止分支，肾单位中的肾小球基本发育成熟，由于肾单位（或肾小球）的数量由输尿管芽的数量决定^[18]，在

这之后肾单位数量不再增加，肾单位在这一阶段进一步成熟。出生后 2 周，肾脏发育完全成熟^[5]。

1.2 肾脏滤过系统

肾脏的血液滤过过程发生在一个复杂且精细的结构—肾小球中，其滤过功能是通过肾小球滤过屏障(Glomerular filtration barrier, GFB)这一结构实现的^[19]。肾小球滤过屏障因为其结构和功能的复杂性吸引了科研人员几十年^[20]，它是肾小球的重要结构，是迄今为止最复杂的生物膜，对物质的滤过具有选择透过性^[21]。这一性质使 GFB 允许血液中的水和中小分子的无限制通过、几乎完全限制一些大分子物质如血清白蛋白等蛋白质的通过，以及完全限制血液中的红细胞等细胞的通过，从而将血液中的循环细胞和血浆中有价值的大分子物质保留在血液中，因此正常情况下经肾小球滤过的尿液中几乎不含大分子蛋白^[19]。各种原因导致的肾小球滤过屏障结构及功能的改变是蛋白尿产生的病理生理基础^[22]。

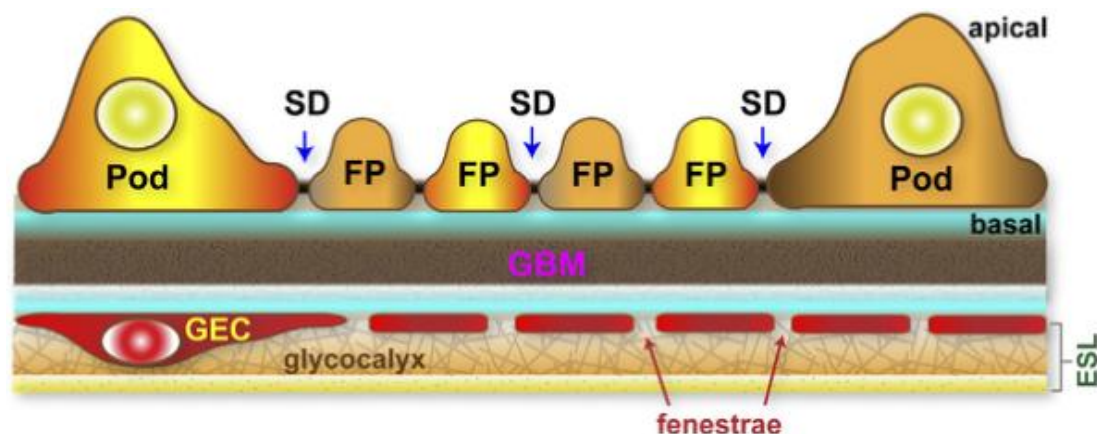


图 2：肾小球滤过屏障结构^[23]。GEC:肾小球内皮细胞；ESL：内皮表面层；glycocalyx：糖萼；fenestrae：窗孔；GBM：肾小球基底膜；Pod：足细胞；FP：足突；SD：狭缝隔膜。

1.2.1 肾脏滤过屏障构成

肾小球滤过屏障由三层结构组成：带负电荷糖萼的开窗毛细血管内皮细胞、肾小球基底膜(Glomerular basement membrane, GBM)和高度特化的足细胞(一种特殊的周细胞样细胞)^[22]，其结构如图 2，这是一种根据分子电荷和大小进行

筛选的高选择性动态过滤结构^[19]。

毛细血管内皮细胞位于肾小球滤过屏障的最内层，其表面具有很多较大的内皮窗孔（宽 60-100 nm），这些窗孔占内皮表面约 20%，使得肾小球毛细血管成为高容量肾滤过性液体快速通过的有效入口^[23]，内皮开窗太大，容易从肾小球滤液中排出白蛋白和其他大蛋白^[24]。在毛细血管窗孔和内皮细胞表面具有一层带负电的糖萼，这是一种糖蛋白纤维晶格，由蛋白聚糖和唾液蛋白组成^[25,26]，在调节滤过屏障渗透性等方面发挥重要作用^[27]。此外，血液中的一些血浆成分吸附在糖萼内，形成一层厚度大于 200 nm 的内皮表面层（Endothelial surface layer, ESL）^[28]。ESL 的强负电荷以及其丝状结构使内皮开窗更窄，对物质的限制性更强。不同 ESL 成分的酶促破坏会导致血浆白蛋白渗透增加^[29,30]。尽管肾小球内皮细胞在肾小球滤过中发挥着重要的作用，但由于缺乏直接证据表明肾小球内皮细胞参与了诱导肾小球滤过功能丧失或蛋白尿的形成这些过程，因此它目前并没有受到重视^[31]。

肾小球基底膜（GBM）是肾小球滤过屏障的中间层，位于内皮细胞和足细胞之间，将脉管系统与尿液空间分隔开^[32]。GBM 实际上是肾小球滤过屏障的细胞外基质（ECM）成分，电子显微镜下的超微结构成像显示，GBM 是一个具有不均匀孔隙的纤维状分层晶格结构，由多种 ECM 蛋白分子组装形成^[33,34]。在功能上，GBM 可以限制血浆蛋白(如白蛋白)等大分子物质进入尿液空间，是肾小球屏障的重要组成部分^[35]。此外作为滤过屏障的中间部分，GBM 还通过 ECM 分子与细胞上的粘附分子（如整合素等）的粘附作用将足细胞和内皮细胞锚定在 GBM 上，从而有效稳定肾小球滤过屏障^[19]。另外，GBM 也是各种配体和分泌因子的库，介导内皮细胞和足细胞之间的细胞通讯，使滤过屏障的三个组成部分在结构和功能上成为一个有序的整体^[19]。因此，GBM 结构的改变不仅会直接影响肾小球滤过导致蛋白尿的发生，还有可能通过影响内皮细胞和足细胞的结构导致肾小球滤过屏障结构进一步破坏，间接导致蛋白尿等产生。

足细胞是肾小球滤过屏障的最外层，本质上是一种终末分化的周细胞样上皮细胞^[36]。成熟的足细胞由一个大的中央胞体和由胞体延伸形成的突起两部分组成，

胞体呈多突状,向外延伸形成一些突起,这些突起末端膨大如足,称为足突(Foot process, FPs)^[37],其通过整合素(integrins)等粘附复合物直接粘附于 GBM 的外侧,包裹着毛细血管^[38]。相邻足细胞的足突之间相互指状交叉相嵌,呈拉链状^[39]。足突之间的空隙称为裂孔,相邻 FPs 之间的空隙通过一个 40 nm 宽的薄膜结构连接,通常称为狭缝隔膜(Slit diaphragm, SD)^[40,41]。SD 的大小决定了不同分子大小的溶质能否正常通过,足突之间形成的指状结构以及 SD 的形成成为阻碍血浆蛋白分子滤过的一个重要屏障^[42]。

在模式生物学研究以及人类遗传学等技术进步的推动下,科研人员已经证明,肾小球滤过屏障的三层结构对其功能的维持都至关重要,这三层结构构成了肾小球滤过的机械和电荷屏障,使相对分子量较大或带负电荷的物质(如白蛋白)不能正常滤出,这三个中的任何一个出了问题都会直接导致蛋白尿的发生^[22]。在 GBM 的三层结构中,由于 GBM 占了液体流量的大部分限制,使其成为肾小球滤过屏障的重要组成部分^[35,43]。对人类以及基因敲除小鼠的遗传学研究表明,GBM 成分对 GBM 的完整性具有重要作用^[44,45],对肾脏滤过至关重要,一些成分的缺失或减少伴随着蛋白尿的发生。例如, COL4A3、COL4A4 和 COL4A5 基因(分别编码 IV 型 Collagen 亚基 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 和 $\alpha 5$)的突变会导致阿尔波特综合征,这是一种针对 GBM 的遗传性疾病,在青春期出现轻度蛋白尿,并最终进展为终末期肾功能衰竭(End-stage renal failure, ESRD)^[46];另外, LAMB2(编码 Laminin $\beta 2$ 亚基的基因)的突变会导致 Pierson 综合征,这是一种常染色体隐性遗传疾病,表现为先天性蛋白尿,并伴有不同的神经和眼部异常表现^[47]。最近的研究表明,GBM 是血浆蛋白的真正屏障,因为在 *Lamb2* 基因缺失小鼠中,蛋白尿的出现先于足细胞结构异常^[48]。

1.2.2 肾小球基底膜(GBM)

基底膜是一层特殊的细胞外基质(ECM)薄层,位于连续的细胞层之下,包围着上皮细胞、内皮细胞、脂肪细胞、肌肉细胞、神经细胞和雪旺细胞等,在各种组织(如肺泡、胎盘、肠上皮、皮肤表皮和血脑屏障等)的相邻隔室之间起选择性屏障的作用。此外,基底膜中的 ECM 成分还参与调节细胞极性、迁移、

存活、增殖、凋亡、分化和信号传导等细胞生物学的多个过程^[49]。肾小球基底膜（GBM）是研究最多的基底膜之一，它作为肾小球滤过屏障的结构组成在肾小球的选择性滤过中发挥重要作用，阻碍血浆中的大分子蛋白进入尿液空间。

1.2.2.1 GBM 组分

超微结构和生化分析研究首次将 GBM 对滤过屏障功能的贡献进行了揭示，这些研究确定了 GBM 中存在的主要成分^[20,50]。尽管 GBM 中可能存在包括肾连接蛋白（Nephronectin）^[51,52]在内的其他数十种其他基质蛋白^[53,54]，但与所有基底膜一样，GBM 主要由 Laminin、Collagen IV、Nidogens 和 Heparan sulfate proteoglycan 这 4 种成分构成^[32,55,56]。此外，Fibronectin 也被报道在 GBM 中发现^[57]，Fibrillin 也是基底膜的成分之一。基底膜的这些组分蛋白具有不同的亚型，因此即使是由相同的几种蛋白分子构成，这些蛋白质的不同亚型组合形成的基底膜在结构和功能上也是不一样的。

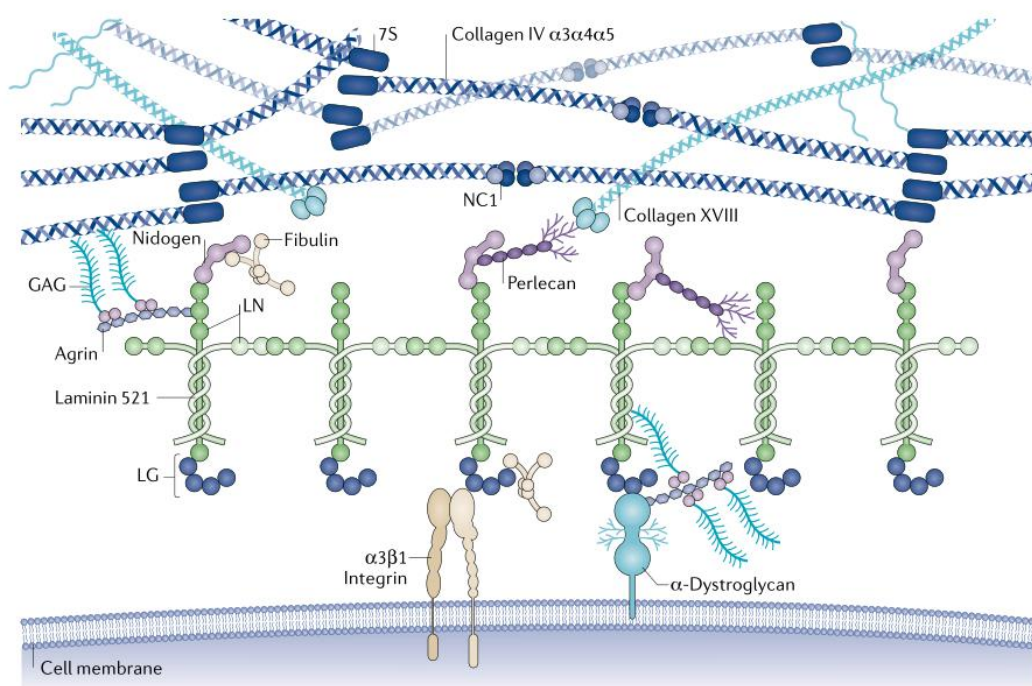


图 3：肾小球基底膜组分图^[58]

Laminin 是基底膜中普遍存在的主要非胶原（NC）成分，具有不同的亚型，以 α 、 β 、 γ 链组成的异源三聚体的形式分泌，参与和其他基底膜成分及细胞的多种相互作用，在 ECM 的分子组装和基底膜的稳定性中发挥着重要作用^[58-60]；在

成熟的 GBM 中，主要的亚型是 Laminin $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ （也称为 Laminin 521）。Collagen IV 是所有基底膜的主要成分，与其他 Collagen 一样也是一种三聚体 ECM 蛋白，是由 3 个由不同亚型组成的三螺旋三聚体，在 GBM 中主要是 Collagen IV $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ 和 Collagen IV $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 两种，被认为提供拉伸和压缩强度^[61]。Collagen IV 是一种大分子蛋白，一旦被分泌出细胞，就会在形成的 Laminin 片附近聚集、组装，形成以晶格形式存在的网络聚合物^[49]。Nidogen 是 GBM 中的第三个成分，是一种哑铃形硫酸化单体糖蛋白，普遍存在于基底膜中，它们在 GBM 中的作用是连接 Laminin 和 Collagen IV，被认为是 Laminin 和 Collagen IV 的交联剂^[45,62]，是基底膜组装的必要条件^[63]。Heparan sulfate proteoglycan（HSPG）的作用也是连接 Laminin 和 Collagen IV 网络并为基底膜提供负电荷。在 GBM 的发育过程中表达的主要 HSPGs 有三种，分别是 Perlecan、Agrin 和 Collagen XVIII^[49]。由于它们的缺失对肾小球的发育和功能没有太大影响，它们在 GBM 中的作用似乎并不重要^[64,65]。在 GBM 的这些丰富成分中，Laminin 和 Collagen IV 是最不可或缺的^[19]。

1.2.2.2 GBM 发育期间的亚型转换

GBM 是一种复杂的大分子结构，在成血管细胞侵入 S 形小体的远端裂隙后，GBM 的发育和组装是独特的，因为在发育的过程中其组分经历了关键的亚型转变^[49]，GBM 发育过程中的组分改变对肾脏滤过功能的维持和肾脏的正常发育至关重要。目前，对 Laminin 和 Collagen IV 这两种组分转变的研究最为深入。

Laminin 的命名是根据其三聚体的亚基组成来定的，例如 Laminin $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ 是由 LAMA5、LAMB2 和 LAMC1 基因编码的三条链组成，并写成 Laminin 521^[66]。早期肾小球前体表达的主要 Laminin 异源三聚体是 Laminin 111（Laminin 1）和 Laminin 511（Laminin 10）^[67,68]，随着肾小球和 GBM 的发育成熟，这些异源三聚体逐渐被 Laminin 521（Laminin 11）取代^[69]，最终 Laminin 11 成为 GBM 中的唯一 Laminins^[67]。因此 GBM 在发育的过程中，Laminin 的亚型主要发生了由 Laminin $\alpha 1$ 向 Laminin $\alpha 5$ 以及 Laminin $\beta 1$ 向 Laminin $\beta 2$ 的转化。用 Laminin 521 替换早期 Laminin 异源三聚体与 Laminin 521 在生理上的重要性相关，研究表明，LAMB2 基因缺失小鼠表现出 GBM 完整性丧失，导致在 Laminin $\alpha 1$ 链被 Laminin

$\alpha 5$ 链取代的阶段肾小球发生停止^[70]。此外在人类中, LAMB2 基因的突变被报道会发展为 Pierson 综合征, 其特征是肾脏、眼部和神经缺陷^[44]。另外, GBM 中 Laminin 521 的减少被报道会影响其对物质的选择透过性, 最终导致白蛋白通过肾小球滤过屏障而泄漏^[48]。这些发现表明, 在早期肾小球中观察到的 Laminin 异源三聚体组分的转变是肾小球后期发育所必需的。

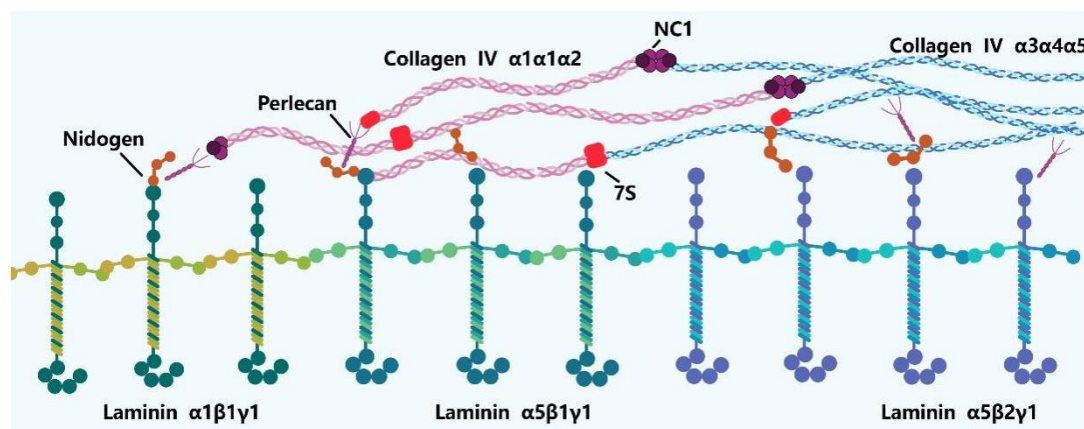


图 4: 发育期间 GBM 的亚型转化

在 GBM 中 Laminin 111 和 Laminin 511 被 Laminin 521 替换的同时, Collagen IV 网络中的亚型转化开关也同时发生^[71]。如图 4, 在发育早期, 内皮细胞和足细胞的基底膜和其他组织的基底膜一样, 由 Collagen IV 的 $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ 网络组成, 但在两个基底膜融合后, Collagen IV $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 网络开始沉积^[71,72]。Collagen IV $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 网络在成熟 GBM 中是特异性存在的, 其对肾小球屏障功能至关重要^[49]。研究表明, 基底膜中 Collagen IV $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 网络的减少或缺失会导致阿尔波特综合征, 其特征是肾脏、听力和眼部表型缺陷^[73,74]。

1.3 遗传性肾病与蛋白尿

肾单位是肾脏结构和功能的基本单位, 由肾小体 (包括肾小球和肾小囊) 和肾小管两部分组成。在小鼠中, 每个肾脏有 12-16000 个肾单位 (数目根据品种不同而有差异)^[10]; 在人类中, 平均每个肾脏约有 100 万个肾单位^[75]。据统计, 在人类中每天大约有 180 升的血液经由肾小球滤过 (约占心输出量的 20%), 尽管其工作量巨大, 肾小球日复一日保持完整^[76]。当肾脏的某一结构或功能出现异常时, 将导致各种肾脏疾病的发生。

世界卫生组织（World Health Organization, WHO）2019 年的数据显示肾脏疾病已经成为了世界十大死亡原因之一，且因其患病率和死亡率不断攀升，目前可将其称之为“流行性疾病”^[77]。遗传性肾病（Inherited kidney diseases, IKD）是众多肾脏疾病中的其中一种，它是指胎儿出生前因体内遗传物质改变（包括染色体结构、数目异常或基因突变）所导致的一类肾脏疾病^[78]，占全部肾脏疾病的 10%-15%，是危害肾脏的一大“元凶”^[79]。遗传性肾病种类繁多，目前已发现了 150 多种 IKD，有学者将其分为了五大类：①遗传性肾小球疾病。包括 Alport 综合征（Alport syndrome, AS）、Fabry 病和薄基底膜肾病等；②先天性肾脏和尿路畸形（Congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT）；③遗传性肾小管和代谢性疾病。包括肾小管酸中毒和 Bartter 综合征等；④遗传性多囊肾病，也称纤毛病；⑤肾结石相关遗传性疾病。包括 Dent 病和原发性高尿酸尿症等^[80]。

过去由于对遗传性肾病的认识不足、其发病隐匿等导致其发现率低，另外由于早期症状不典型、临床表现多样等导致很多医生会对其进行误诊或漏诊，加上其预后较差，约 30%~40% 的 IKD 患儿在 10 年后进展至终末期肾病（End Stage Renal Disease, ESRD）^[79]，使其成为继高血压、糖尿病、肾盂肾炎和肾小球肾炎之后导致 ESRD 的第五大常见原因^[81]，患者最终需要进行透析和肾移植治疗，给患者和全球的卫生系统带来了沉重的负担。因此对肾脏疾病的早期预测和发现就显得尤为重要。随着遗传学和分子生物学的发展，遗传性肾病的诊断率近年来不断升高。目前，约有 78 个基因被证实和 IKD 相关，其中有 10 个基因被定位、克隆^[82]，新的致病基因同时也陆续被发现。致病基因的发现可以使我们通过基因检测手段，在早期甚至产前阶段就对 IKD 进行检测，进行再生育风险评估，提高 IKD 的诊断效率，同时也给 IKD 带来了基因治疗的可能，具有重要的意义。

在多种肾脏疾病中，蛋白尿是最常见的临床表现。在正常情况下经肾小球滤过产生的原尿中基本上不含大分子蛋白质，当每天尿液中蛋白质含量超过 300 mg（或 200mg/L）时，就称为蛋白尿^[22]。蛋白尿一旦出现，可通过诱导肾小管

趋化因子表达、补体激活等途径导致肾小管间质发生炎症和纤维化，从而加速肾脏疾病进展至 ESRD，是影响肾脏疾病预后的一个独立风险因素^[83]。蛋白尿的产生包括两个方面：一方面是肾小球滤过屏障受损导致其对大分子蛋白的选择性丧失，使蛋白质异常渗漏进入尿液当中形成；另一方面则是肾小管对原尿中肾小球正常滤过的少量蛋白质的重吸收出现障碍，导致肾小管中因蛋白质累积增多而形成^[84]。在这两方面中，肾小球滤过屏障受损是导致蛋白尿出现的最主要的一个原因。

1.4 Adamts 简介

1.4.1 ADAMTS 家族简介

具有血小板反应蛋白基序的解整合素金属蛋白酶 ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs)，是一类含有多个结构域、 Zn^{2+} 依赖的分泌型金属蛋白酶，在哺乳动物和无脊椎动物中都普遍存在^[85]。自第一个 ADAMTS 蛋白酶 (ADAMTS 1) 于 1997 年被发现以来，描述该基因家族及其所编码的蛋白质的文献数目迅速增多，有关 ADAMTS 超家族成员的论文至今已经发表了 2000 余篇^[86]。

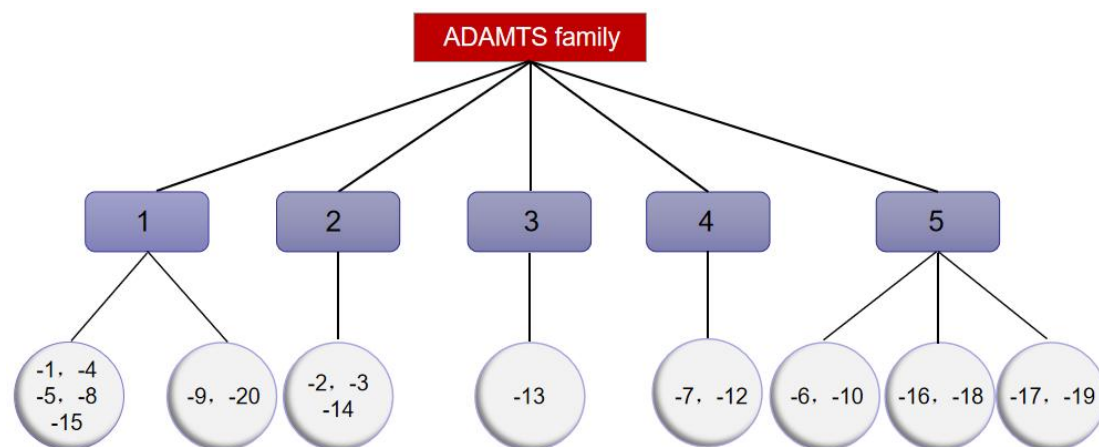


图 5: ADAMTS 家族成员分类图

目前，在哺乳动物中已经发现了 19 个 ADAMTS 家族成员，包括编号为 1 至 20 的 ADAMTS 蛋白，由于 ADAMTS11 被分配给了先前被鉴定为 ADAMTS5 的蛋白，目前不再使用 ADAMTS11 这个名称了^[85,87]。在发现和命名 ADAMTS1

后的十年时间内，所有 ADAMTS 蛋白都得到了鉴定^[86]。根据 ADAMTS 分子结构和底物的不同，19 个 ADAMTS 家族成员被分为五大类（图 5）：①聚糖酶或蛋白多糖酶（包括 ADAMTS1, 4, 5, 8, 9, 15 和 20 七个成员）；②前胶原 N-前肽酶（包括 ADAMTS2, 3, 14 三个成员）；③血管性血友病因子蛋白酶（ADAMTS13）；④软骨寡聚基质蛋白（COMP）裂解酶（包括 ADAMTS7 和 12 两个成员）；⑤“孤儿”金属蛋白酶（包括 ADAMTS6, 10, 16, 17, 18 和 19 六个成员）^[88]。其中，ADAMTS16 和 ADAMTS18 由于在结构和功能上的相似性被分为“孤儿”金属蛋白酶中的同一个子类。

在功能上，ADAMTS 大多通过切割细胞外基质（ECM）发挥其作用^[89]。ADAMTS 介导的底物（包括 ECM、细胞因子和生长因子）切割是 ECM 形成、重塑、稳态和生理适应个体组织、器官系统所必需的^[90]，它们在胚胎发育、血管生成和组织器官形态发生等多种正常生理过程中发挥重要作用^[88]。此外，ADAMTS 也可参与组织破坏，许多 ADAMTS 突变、活性失调或异常表达等也与生殖、肿瘤发生、炎症、关节炎等病理过程相关，导致人类和动物各种遗传和获得性疾病的发生^[88,91,92]，ADAMTS 蛋白酶在生理和病理过程中的多重作用表明了其对我们生物体的重要性。

1.4.2 ADAMTS 家族成员与肾脏

ADAMTS 家族多个成员被报道与肾脏发育及肾损伤有关，包括 ADAMTS1、ADAMTS7、ADAMTS13。其中，Shindo 等人^[93]在他们构建的 *Adamts1* 基因敲除小鼠中发现：*Adamts1* 缺失小鼠肾脏形态及组织结构出现异常，包括杯状体空间增大、肾皮质和髓质组织严重减少、肾盂-输尿管连接处有过度纤维组织积聚从而导致输尿管梗阻发生，但在他们的研究中并没有发现严重的肾功能衰竭的证据^[93,94]；Gao 等人^[95]发现在血管紧张素 II（AngII）介导的炎症性肾损伤老年小鼠中，早期存在肾皮质和髓质肾小管萎缩、肾小管扩张等肾损伤的现象，且在这个过程中 *Adamts7* 的表达也相应增加，提示 ADAMTS7 可能在老年小鼠炎症性肾损伤的发展中起重要的致病作用^[95]。此外，在一个 45 岁患有进展性慢性肾病(CKD)的女性中报道，患者中出现的遗传 *Adamts13* 缺陷为唯一的临床表现，指出

ADAMTS13 与 CKD 之间可能存在某种调节关系,但尚未有明确的研究对其进行证实^[96]。

1.4.3 ADAMTS18 研究现状

ADAMTS18 属于 ADAMTS 家族中的第五类,即未知底物和功能的蛋白酶(也被称为“孤儿”金属蛋白酶)。ADAMTS18 基于先前描述的 ADAMTS 蛋白酶特征序列的相似性,通过计算机筛选人类基因组生物信息学信息库,于 2002 年首次得到鉴定^[97]。目前,与 ADAMTS18 相关的论文已有 70 余篇发表。ADAMTS18 基因位于人类基因组的 16q23 上^[97,98],在 小鼠中,位于小鼠基因组的 8 号染色体上,基因全长 153Kb^[99]。在进化过程中,ADAMTS18 基因相对保守,其中人和小鼠 ADAMTS18 的氨基酸序列同源性高达 89%,且在 小鼠中 ADAMTS18 的组织表达谱也与人类相似^[97]。

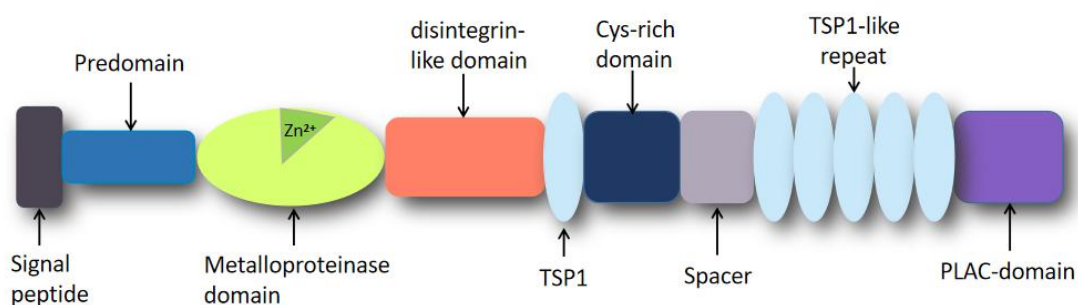


图 6: ADAMTS18 结构示意图

在结构上,ADAMTS18 与其他 ADAMTS 家族成员类似,基本结构包括两个可区分的区域: N 端催化结构域(金属蛋白酶结构域)和羧基末端辅助结构域^[88],其中催化结构域包括一个信号肽结构域、一个可变长度的前肽结构域、一个与 Zn²⁺ 结合的金属蛋白酶结构域以及一个解整合素样结构域四部分^[100]。ADAMTS18 的催化活性取决于其活性位点内与 Zn²⁺ 的结合。在辅助结构域中,与其他 ADAMTS 家族成员一样,ADAMTS18 同样含有一个 I 型血小板反应蛋白基序(TSP1)、一个富含半胱氨酸的结构域、一个间隔结构域,其可变结构域部分为 5 个额外的 C 端 TSP1 重复序列,后跟一个 PLAC 结构域^[101]。

ADAMTS18 在人类和小鼠多种组织器官中都有广泛表达。在人类胎儿中,

ADAMTS18 主要在肺、肾和肝中表达，而在成人组织中，在大脑、心脏、视网膜、骨骼肌、乳腺、肾脏、颌下腺、卵巢、结肠、胃、淋巴结等多种组织器官中都有检测到 ADAMTS18 的表达^[97,98,102,103]。在小鼠中，*Adamts18* 主要在肺、肾、泪腺、包皮腺、颌下腺、神经元系统、卵巢、子宫、血管系统、前列腺等多个组织器官中表达^[104-107]。

据报道^[108]，*Adamts18* 是一个在分支尖端富集表达的基因，在多个分支上皮器官如肺^[109]颌下腺^[110]、乳腺^[111]、泪腺^[112]的分支尖端都有表达，其缺失会导致这些器官结构发育异常及相关疾病的产生。ADAMTS18 在人胚胎肾中高表达，提示其可能与早期肾脏发育相关。一项对肺和肾的研究表明^[113]，ADAMTS18 缺失会导致输尿管的重复生长。此外，与 ADAMTS18 结构和功能相似的 ADAMTS16 被发现在肾小球中表达，*Adamts16* 的反义敲除导致输尿管芽分支点的数量显著减少，从而抑制肾器官培养中的分支形态发生^[114]。这些实验结果表明 ADAMTS16 和 ADAMTS18 主要在输尿管芽的分支和输尿管芽的发育中起着功能作用；但目前并未有研究报道 ADAMTS18 在肾小球滤过屏障及蛋白尿产生中的作用，本论文将对这一科学问题展开研究。

1.5 研究目的与意义

肾脏疾病目前已成为“全球十大死因”之一，因肾脏疾病导致的死亡人数近年来不断攀升。遗传性肾病（Inherited kidney diseases, IKD）占全部肾脏疾病的 10%-15%，是危害肾脏的一大“元凶”。在多种肾脏疾病中，蛋白尿是最常见的临床表现。目前有关蛋白尿的产生机制尚未完全明确。我们课题组前期研究发现，ADAMTS18 与早期器官形态发生密切相关。在对*Adamts18* 基因敲除小鼠进行表型分析时，意外发现*Adamts18*^{-/-}小鼠有蛋白尿形成表型，提示 ADAMTS18 可能与肾小球滤过屏障发育相关，但具体机制尚不清楚，国际上也未见相关报道。本研究拟在*Adamts18*^{-/-}小鼠模型上，利用分子生物学，病理学等手段，探究上述科学问题（技术路线如图 7）。本研究不仅有助于揭示 ADAMTS18 在肾小球滤过屏障发育和蛋白尿产生方面的新机制，也可为遗传性肾病的产前诊断提供新的预测因子，为蛋白尿性肾脏疾病的治疗提供新的分子靶点。

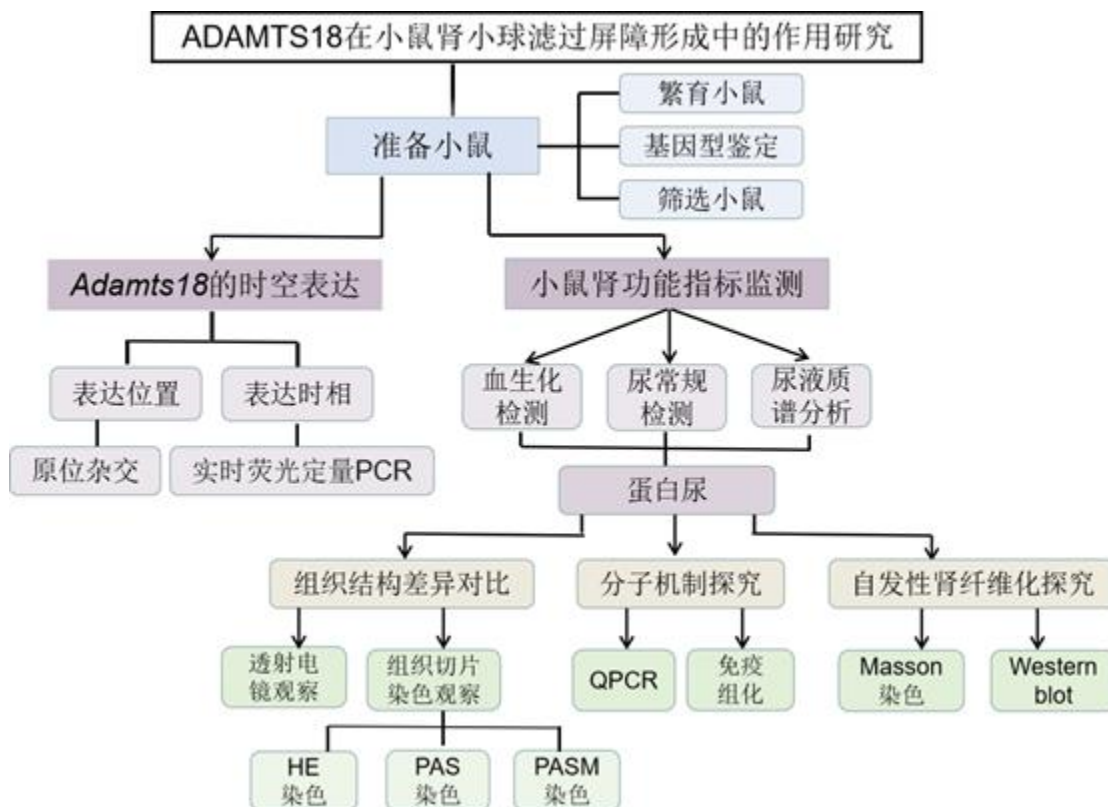


图 7：研究技术路线示意图

2 实验材料

2.1 实验动物

课题组前期构建的 *Adamts18* KO (*Adamts18*^{-/-}) 小鼠是 C57BL/6/129Sv 杂交背景下的小鼠，也是本实验中的主要观察对象和研究对象。本研究中用到的野生型 (*Adamts18*^{+/+}, WT) 小鼠和基因敲除 (*Adamts18*^{-/-}, KO) 小鼠均由亲代雌性杂合 (*Adamts18*^{+/-}, HT) 小鼠繁殖产生，产生的后代子鼠有三种不同的基因型，符合孟德尔遗传定律。

本研究中进行的所有动物实验均符合华东师范大学实验动物伦理委员会和实验动物饲养与使用委员会的相关规定，实验伦理审查编号为：m20160308。

2.2 实验仪器

仪器名称	型号规格	厂家/公司
-80℃超低温冰箱	Forma-86	Thermo
4℃/-20℃冰箱	BCD-219D	Haier (海尔)
高压灭菌锅	LDZX-50KBS	上海申安医疗器械
制冰机	STM-F124	中国 SUNSNOW
微波炉	P70D23NIP-G5(W0)	格兰仕
移液枪	2.5 μl/10 μl/20 μl/100 μl/ 1000 μl	Eppendorf
移液枪	2 μl/10 μl/100 μl/200 μl/ 1000 μl	Gilson
小型瞬时离心机	GMC-260	LabTech
低温高速离心机	5415R	Eppendorf
涡旋震荡器	GE560E	Scientific Industries
磁力搅拌器	81-2	上海司乐仪器

水浴锅	180002A-1CE	Aqua Bath
核酸水平电泳槽	Sub-CellGT	Bio-Rad
蛋白垂直电泳仪	MiniPROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
凝胶成像系统	720BR	Bio-Rad
多功能成像仪	UVP Chemstudio touch	Analytik Jena
组织研磨仪	Tiss-24	上海净信
PCR 仪	iCycler	Bio-Rad
实时荧光定量 PCR 仪	Realplex system	Eppendorf
酶标仪	Epoch	BioTek
体式解剖显微镜	MZ61	广州明美光电技术
普通光学显微镜	XSP-2CA	上海光学仪器六厂
荧光显微镜	DMI3000	Leica
电子天平	T-2002	DENVER
电子分析天平	BS124S	Sartorius
10 ml 移液器	73261	德国 Matrix
电热恒温干燥箱	DHG-9075A	上海一恒仪器
一体式石蜡包埋机	EG1160	Leica
轮转切片机	RM2235	Leica
电热恒温水槽	DK-8D	上海精宏
HybEZ 杂交炉	310013	Advanced Cell Diagnostics
超净工作台	SW-CJ-2FD	苏净安泰 (Airtech)
生物安全柜	NU-440-600E	Nuair

2.3 实验耗材

耗材名称	厂家/公司
无粉乳胶手套	扬子医疗器械
一次性医用口罩	碧云天生物
枪头 (10 μ l/100 μ l/1000 μ l)	上海越夷生物
RNase and DNase Free 枪头 (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	Thermo Fisher Scientific
DNase/RNase Free 离心管 (0.2 ml/0.6 ml/1.5 ml)	Axygen
普通 EP 管	碧云天生物
RNase and DNase Free EP 管	Thermo Fisher Scientific
移液管	Corning
离心管	BD-FALCON
PCR 管	碧云天生物
PCR 八连管	国盛生物
培养皿/孔板	Corning
锥形瓶 (100 ml/200 ml)	上海晖创化学仪器
巴氏吸管	圣光医用
手术器械 (眼科剪、镊子等)	施强医疗器械有限公司
医用注射器	康德莱集团
医用棉球	亚申科技
纱布	稳健医疗
称量纸	新华纸业
滤纸	沃华滤纸

高级擦镜纸	富阳特种纸业
保鲜膜	脱普日化
封口膜	Parafilm
锡箔纸	上海克林莱塑料
PVDF 膜	Millipore
上样梳	Bio-Rad
转印滤纸	碧云天生物
水浴漂浮板	Bio-Rad
组织包埋盒	江苏世泰实验器材有限公司
毛笔	Leica
刀片	Leica
载玻片	江苏世泰实验器材有限公司
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司
计时器	Abcam

2.4 实验试剂

试剂名称	厂家/公司
无水乙醇/95%乙醇	上海润捷化学
无水甲醇	江苏强盛化学
异丙醇	上海润捷化学
氯仿	上海润捷化学
甲醛	国药集团
蛋白酶 K	Merck
DEPC 水	翊圣生物

50×TAE	碧云天生物
琼脂糖	BIOWEST
PCR Master Mix	翊圣生物
YeaRed 核酸染料	翊圣生物
GeneGreen	天根生物
DNA Marker	北京博奥龙 biodragon
氯化钠 (NaCl)	上海润捷化学
氯化钾 (KCl)	上海润捷化学
十二烷基硫酸钠 (SDS)	北京鼎国生物
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	上海展云化工
乙二胺四乙酸 (EDTA)	鼎国生物
磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	国药集团
十二水合磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	国药集团
戊巴比妥钠	国药集团
双氧水 (H ₂ O ₂)	国药集团
BSA	Sigma-Aldrich
Tween-20	新加坡 MP Biomedicals
RIPA 强裂解液	碧云天生物
蛋白酶抑制剂	MCE (MedChemExpress)
蛋白定量试剂盒 (BCA 法)	碧云天生物
CFAS any KD PAGE 蛋白电泳凝胶制备 试剂盒 1/2 型	陕西中辉赫彩生物医药科技有限公司
蛋白 Marker	上海天能科技有限公司

脱脂奶粉	中国伊利
山羊血清	爱必信（上海）生物科技有限公司
ECL 显色试剂盒	翊圣生物
二甲苯	国药集团
水杨酸甲酯	国药集团
石蜡	Leica
中性树胶	上海标本模型厂
DAB 显色试剂盒	北京中杉金桥生物
总 RNA 提取试剂盒	翊圣生物
反转录试剂盒	翊圣生物
HE 染色试剂盒	北京索莱宝 Solarbio
改良 Masson 三色染色试剂盒	北京索莱宝 Solarbio
糖原 PAS 染色试剂盒	北京索莱宝 Solarbio
PASM 基底膜六胺银染色试剂盒	北京索莱宝 Solarbio

2.5 常用试剂配方

(1) 鼠尾裂解液 (500 ml):

试剂	用量
1 M Tris HCl	10 ml
500 mM EDTA	5 ml
NaCl	11.7 g
SDS	5 g
ddH ₂ O	定容至 500 ml

(2) 10 ×TBS (1 L):

试剂	用量
NaCl	88 g
Tris	24 g
ddH ₂ O	定容至 1 L

(3) 10 ×PBS (1 L):

试剂	用量
NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	36.3 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
KCl	2.0 g
ddH ₂ O	定容至 1 L

(4) 生理盐水 (1 L):

试剂	用量
NaCl	9.0 g
ddH ₂ O	定容至 1 L

(5) EDTA-Tris 抗原修复液 (1 L, pH=9.0):

试剂	用量
Tris	1.21 g
500 mM EDTA	2 ml
Tween 20	500 ml
ddH ₂ O	定容至 1 L
配好后, 将溶液 pH 调至 9.0	

3 实验方法

3.1 小鼠的饲养与繁殖

3.1.1 小鼠的饲养

本实验使用的 C57BL/6J 和 129S1/SvImJ 杂交背景 (C57BL/6/129Sv) 的 *Adamts18^{-/-}* 小鼠和 *Adamts18^{+/+}* 野生对照小鼠由本课题组前期构建^[109]。小鼠均通过杂合子小鼠(Heterozygote, HT) 雌雄互交所产生。杂合子小鼠自交后代中野生型 (*Adamts18^{+/+}*)、杂合型(*Adamts18^{+/-}*)及基因敲除(*Adamts18^{-/-}*)三种基因型符合孟德尔遗传规律,未发现小鼠有胚胎致死现象,可用于正常实验研究。所有小鼠均饲养于华东师范大学脑功能基因组学教育部重点实验室三楼 SPF 级动物房。本实验中涉及的所有动物实验均严格遵守华东师范大学动物伦理委员会和动物饲养与使用委员会的相关规定。

3.1.2 小鼠的繁殖

小鼠生长发育至大约 8 周龄时性成熟,一般情况下将 2 只雌鼠和 1 只雄鼠(都为杂合, HT) 放入同一笼子中进行饲养。若后续实验需要研究特定发育时期的胚胎小鼠,则需精确小鼠的胚胎发育时间点,具体繁殖步骤如下:

(1) 合笼:雌雄小鼠合笼通常选择在傍晚(6~7 点)进行,笼子放在架子较偏僻的角落或最上层,避免来往的实验人员的声音及脚步声打扰。

(2) 检栓:于次日清晨(6~7 点)查看小鼠的交配情况,若在小鼠阴道口发现有阴道栓(白色或淡黄色的栓塞状分泌物),则可初步判定小鼠怀孕,并将见栓当天中午记为胚胎第 0.5 天(E0.5),第二天即为 E1.5,依此类推。此时无论雌鼠是否见栓,都将其与雄鼠分开,放在不同笼子中,若后续仍需交配,则在当日傍晚(6~7 点)再将其合笼交配即可,见栓的雌鼠单独放在一个笼中进行饲养。

(3) 称重:对于见栓的雌鼠要确定其是否成功受孕,可对其进行称重来辅助判断。一般小鼠在受孕 0~10 天体重变化不大,10 天之后体重涨幅较大,若小鼠在见栓 10 天后体重一直增加则可认为小鼠怀孕,并对小鼠怀孕天数做好记录。

(4) 若雌鼠在合笼多日后仍未见栓，可在笼中放一些生瓜子（富含生育酚）等食物，提高受孕率。

在雌鼠怀孕期间及哺乳期间需注意切勿打扰雌鼠，避免其受到惊吓和刺激而发生产后食仔的现象。小鼠哺乳期大约三周，在母鼠产仔三周时即可结束哺乳期，此时可对仔鼠进行剪脚趾编号，并剪下一小段小鼠尾巴（约 5 mm）于 1.5 ml 离心管中用于后续提取小鼠 DNA 进行基因型鉴定。将编好号的雌、雄仔鼠分笼放置，每个笼子中小鼠数量不宜过多，一般不超过 5 只。

3.2 小鼠基因型鉴定

3.2.1 DNA 的提取

(1) 将上述在动物房剪取的鼠尾（置于 1.5 ml 离心管中）放入离心机中进行短暂离心（7~8 s），确保所有组织都沉到管底。

(2) 将 70%乙醇和无水乙醇提前放入-20℃冰箱进行预冷，以备后续实验使用。此外将蛋白酶 K 从-20℃冰箱取出，于冰上进行解冻。

(3) 配制鼠尾消化液：蛋白酶 K 和鼠尾裂解液以一定的比例（1:25）进行配制。将二者混匀后，向每个装有鼠尾的离心管中加入 500 μl 配制好的消化液，盖紧离心管盖子，用后置于预热的水浴锅中，56℃过夜消化。

(4) 次日观察离心管中组织消化的情况，若管中还残留有较多未消化完全的组织，则在离心管中再补入适量消化液，盖紧盖子后再置于水浴锅中消化数小时，直至消化完全，进行下一步实验。

(5) 组织消化完全后，将离心管从水浴锅中取出，用吸水纸将离心管外壁的水分擦干，将其充分振荡混匀，放入离心机中，12000 rpm，室温离心 10 min。等待离心机离心的过程中可准备一套新的 1.5 ml 离心管，并对管子按顺序进行编号。

(6) 待离心结束后，将离心管取出，取出的过程中动作应尽量轻柔，防止因离心管晃动导致管底的沉淀物混入上清液，污染上清液。吸取 200 μl 上清液于对应编号的新离心管中，向各个离心管中分别加入 1 ml 预冷的无水乙醇，盖紧管盖后上下颠倒 3~5 次，此时在离心管中可见白色絮状 DNA 沉淀，将其放入离心

机中，4°C，12000 rpm，离心 5 min。

(7) 离心结束后，将离心管取出弃上清，分别在每个管中加入 1 ml 预冷的 70% 的乙醇，盖子盖紧后于 4°C 离心机离心，12000 rpm 离心 2 min。

(8) 重复步骤 (7) 1 次。

(9) 取出离心管弃上清，盖紧管盖再将其置于离心机中，空管 12000 rpm 离心 1 min，将离心管壁上的残留液尽量去除。离心结束后，将离心管中的残留液吸出弃去，用黑色记号笔在管壁上将 DNA 沉淀所在的位置圈出，将离心管倒扣在吸水纸上，室温晾干 20 min 左右。

(10) 向每个离心管中加入 50 μ l DEPC 水，并用移液枪对着圈出的沉淀处反复吹打混匀，室温溶解 1 h 后即可得到溶解完全的 DNA 将其储存在 4°C 冰箱待用。

3.2.2 PCR

(1) 设计引物，引物由生工生物合成有限公司（上海）合成，引物序列如下：

引物	序列
<i>Adamts18</i> 引物 1	5'GGTGTGTTGGTTGGTATAGCTGAGCTGGAAA-3'
<i>Adamts18</i> 引物 2	5'-TCTGCTGGAAGAAGAACCTGTAAGTGGAA-3'
<i>Adamts18</i> 引物 3	5'-TTTCCTCCTTCCTTTGCTGCCTTGTCTG-3'

(2) 配制 PCR 反应体系 (15 μ l):

3 引物反应体系如下表:

所用试剂	用量
Master Mix (2 \times)	7.5 μ l
P1	0.3 μ l
P2	0.3 μ l
P3	0.3 μ l
ddH ₂ O	4.6 μ l
共计	13 μ l

2 引物反应体系如下表:

所用试剂	用量
Master Mix (2×)	7.5 μ l
P1	0.3 μ l
P2	0.3 μ l
ddH ₂ O	4.9 μ l
共计	13 μ l

在配制反应体系时，分别配制 3 引物和 2 引物两大反应总体系，再从总体系中吸取 13 μ l 依次加入到每一 PCR 管中，再依次加入对应 2 μ l 先前提取好的 DNA 模板，充分混匀，最终配制成 15 μ l 的反应体系。整个反应体系配制的过程均在冰上进行。

(3) 各反应体系配制好后，将其进行短暂离心 (5~8 s)，使管壁上残留的液体离心至管底，对于 pcr 管中留有的一些小气泡，可用手指轻弹管壁，去除气泡，使管中各反应物充分接触。放入 PCR 仪中，程序设置如下：

步骤	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	15 s
退火	60°C	20 s
延伸	72°C	1 min
终延伸	72°C	5 min
终止	12°C	Hold

变性→退火→延伸设定 30 个循环。

程序结束后，将得到的 PCR 产物置于 4°C 保存，用于后续实验。

3.2.3 琼脂糖凝胶电泳

提前将 250 ml 的锥形瓶、胶板、电泳槽和上样梳等清洗干净并放在桌面上晾干，以备后续实验使用。晾干后将胶板固定于凝胶制胶器的底座上，在固定位置插上梳子。再配制 1.5% 的琼脂糖凝胶，步骤如下：

- (1) 用称量纸称取 1.5 g 琼脂糖粉末，将其倒入先前准备的 250 ml 锥形瓶中，向瓶中加入 100 ml 1×TAE 缓冲液（由 10×TAE 缓冲液稀释 10 倍制成），缓慢晃动锥形瓶，使琼脂糖粉末与缓冲液充分混匀。
- (2) 将锥形瓶放入微波炉中进行高温加热，待液体沸腾后将锥形瓶取出，轻轻晃动锥形瓶，使琼脂糖散开并充分溶解，再将锥形瓶放进微波炉，继续加热使其沸腾，重复操作 2~3 次即可使琼脂糖完全溶解（锥形瓶中无肉眼可见的琼脂糖颗粒）。
- (3) 将锥形瓶取出，放置室温使其冷却，待瓶壁不烫手（大约 60°C）时，吸取 10 μ l GeneGreen 核酸染料（Genegreen :琼脂糖溶液= 1:10000）加入锥形瓶中，轻轻晃动锥形瓶使核酸染料与琼脂糖溶液充分混匀，将其倒入先前安装好的胶板中，室温静置 30~40 min，待胶凝固。
- (4) 将凝固好的琼脂糖凝胶和胶板一起取出，放入电泳槽中，向槽中加入 1×TAE 缓冲液，直至缓冲液完全没过凝胶，垂直向上缓缓将上样梳拔出。
- (5) 吸取先前制好的样品将其加入上样孔，每孔 10 μ l，预留出一个上样孔，加 8 μ l 的 DNA Ladder，盖上盖子，插上电泳槽连接电泳仪的线。
- (6) 接通电源，将程序设为恒压 150 V，电泳时间 50~55 min。
- (7) 电泳结束后，取出凝胶，将其放入凝胶成像系统中，拍照保存用于后续分析实验结果。

3.2.4 基因型判断

本实验中 *Adamts18* 基因敲除小鼠是通过将 *Adamts18* 基因的第 5、6 号外显子敲除得来的（如图 8A）。本实验中所用到的所有小鼠都是通过杂合（*Adamts18*^{+/-}）雌鼠和杂合雄鼠交配得来的，在它们交配所产生的子代中有三种不同的基因型，分别为野生型 *Adamts18*^{+/+}、杂合型 *Adamts18*^{+/-}和基因敲除型 *Adamts18*^{-/-}。根据 *Adamts18* 基因序列我们设计了 P1、P2、P3 三种引物，这三种引物所对应的 *Adamts18* 基因位点如图 8A：P2 引物位于 *Adamts18* 基因敲除片段区域范围内，引物 P1 所对应的位点在基因敲除区域的上游，P3 引物则位于基因敲除区域的下游。根据 P1，P2 和 P3 引物所扩增出的产物片段的大小对小鼠的基因型进行鉴

定。具体鉴定方法如下：

(1) *Adamts18*^{+/+}小鼠：在 *Adamts18*^{+/+}小鼠 *Adamts18* 基因中，由于 P1、P2、P3 这三个引物结合位点都存在，因此在 3 引物体系（3 种引物都存在）中，理论上可以扩增出 P1-P2 之间（404 bp）及 P1-P3 之间（1192 bp）的 2 个不同大小的产物片段，但由于 P1-P3 位点之间的序列太长，而扩增时间有限，在实际扩增的过程中 P1-P3 之间的 1192 bp 的片段无法扩增出来，因此在 3 引物体系中只有一个 404 bp 大小的片段。在 2 引物体系（只存在 P1、P2 两种引物）中，可扩增出 P1-P2 位点之间的产物片段，大小为 404 bp（如图 8B）。

(2) *Adamts18*^{-/-}小鼠：KO 小鼠经基因敲除后，存在于基因敲除区域内的 P2 引物所对应的片段也不存在了，因此 KO 小鼠 *Adamts18* 基因中缺乏引物 P2 的结合位点，只存在 P1 和 P3 这 2 个引物结合位点，且基因敲除后，引物 P1-P3 之间可扩增的序列变短，因此在 3 引物体系中，只能扩增出 P1-P3 位点之间的 272 bp 片段。在 2 引物体系中不能扩增出任何片段（如图 8B）。

(3) *Adamts18*^{+/-}小鼠：HT 小鼠在 3 引物体系中可扩增出大小为 272 bp 和 404 bp 的两个片段，在 2 引物体系中扩增出的是 P1-P2 位点之间的 404 bp 片段（如图 8B）。

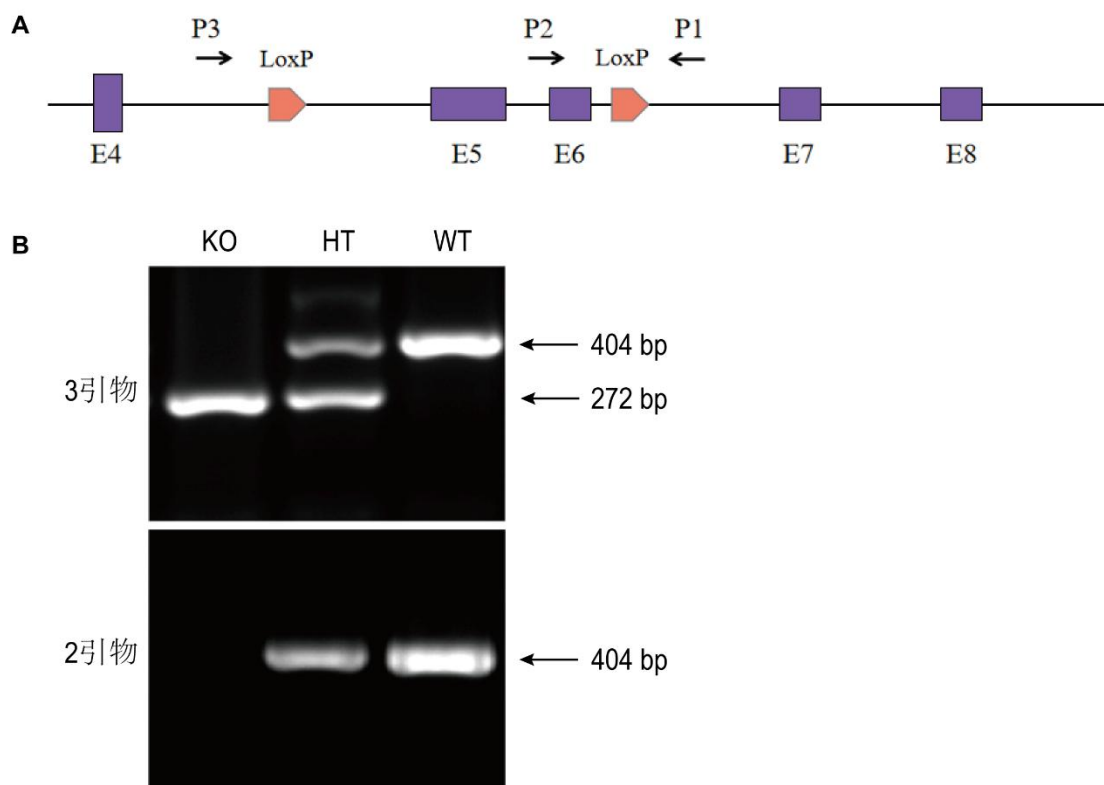


图 8：引物扩增片段示意图和 PCR 基因型鉴定电泳示意图。(A) 引物扩增片段示意图。(B) PCR 基因型鉴定电泳示意图。

3.3 实时荧光定量 (qRT-PCR)

3.3.1 总 RNA 提取

1、实验前准备

将研磨组织所要用的磁珠提前一天清洗干净，与手术剪、镊子、PBS 等一起进行高温高压灭菌处理，以备后续实验使用。在实验前半小时将超净工作台的紫外灯打开，对工作台进行杀菌处理，后续实验所有步骤均在超净工作台中进行。

2、肾脏组织的研磨

(1) 取新鲜的或先前于 -80°C 冰箱冻存的肾组织，用手术剪剪下适当重量（10~20 mg）的肾组织于 2 ml 的研磨管中，向管中加入 500 μl 的裂解液 LB，并在每个研磨管中放入一个磁珠，然后盖紧研磨管盖子，将研磨管放入组织匀浆机中，程序一般设为 30 Hz，60 s。

(2) 提前准备一套新的 1.5 mL RNase-free 离心管，并在离心管盖子表面注明各

组织信息。待组织研磨充分后,将研磨管放入离心机中,12000 rpm 室温离心 5 min,将离心后的上清液转移至新的离心管中(在转移上清液的时候动作应尽量轻柔,防止在吸取上清液的过程中吸到管底的沉淀,污染上清液)。

3、总 RNA 提取

按 YEASEN 公司的细胞/组织总 RNA 提取试剂盒进行提取操作,货号:19221ES50。

(1) 将 DNA 清除柱 A2 套入 2 mL 收集管中备用,并在管盖表面写好各组织信息。

(2) 将 2 中得到的上清液转移至 DNA 清除柱 A2 中,12000 rpm 离心 2 min,保留滤过液,将滤过液转移至新的 1.5 mL RNase-free 离心管中,记录好各管中滤过液的体积。

(3) 向上述滤过液中加入 1.6 倍体积的去蛋白液 PL(首次使用前,按照说明在去蛋白液 PL 中加入相应体积的无水乙醇),用移液枪吹打混匀。此时准备 RNA 吸附柱 A2,将其套入 2 mL 收集管中,备用。

(4) 将(3)中得到的混合液全部转移至 RNA 吸附柱 A2 中,12000 rpm 离心 1 min,弃掉滤过液,将 RNA 吸附柱 A2 放回收集管。

(5) 向管中加入 500 μ l 结合液 BD,室温 12000 rpm 离心 1 min,弃掉滤过液,将 RNA 吸附柱 A2 放回收集管。

(6) 向管中加入 700 μ l 漂洗液 W,室温 12000 rpm 离心 1 min,弃掉滤过液,将 RNA 吸附柱 A2 放回收集管。

(7) 重复步骤(6) 1 次。

(8) 盖紧 RNA 吸附柱 A2 的盖子,空管 12000 rpm 室温离心 2 min,以去除残留的漂洗液 W,准备一套新的 1.5 mL RNase-free 离心管,并在离心管盖子表面写好各组织信息,备用。

(9) 将 RNA 吸附柱 A2 放入新的离心管中,在膜中央加入 50 μ L RNase-free H₂O,室温静置放置 2 min。然后 12000 rpm 室温离心 1 min。收集滤液,此即为 RNA 溶液。将得到的 RNA 溶液进行分装,于-80 $^{\circ}$ C 冰箱进行保存。

3.3.2 RNA 浓度测定

将得到的 RNA 样品溶液各吸 2 μl 滴加在 RNA 浓度测定板的样品孔上，记好样品滴加的顺序，最后一个滴加 2 μl RNase-free H_2O 作为空白对照，将 RNA 浓度测定板的玻璃盖盖上。打开仪器，设置好三个吸光度值（分别为 260，280，230 nm）后，将 RNA 浓度测定板放置在仪器相应位置，机器按程序进行 RNA 浓度的测定，记录所测的每个 RNA 样品的浓度。

3.3.3 RNA 反转录为 cDNA

RNA 反转为 cDNA 包括去除基因组 DNA 和逆转录反应两步，所有步骤均按照 YEASEN 公司的反转 cDNA 说明书（货号：11123ES60）进行操作。具体步骤如下：

（1）在实验前将实验所要用的各反转录产品试剂从 -20°C 冰箱中取出，置于冰上解冻，其中 gDNA digester 和 2 \times Hifair II SuperMix plus 在解冻后进行短暂离心，并在使用前用移液枪将其充分混匀。

（2）去除残留基因组 DNA（gDNA）反应体系的配制（10 μl ）：

试剂	用量 (μl)
5 \times gDNA digester Buffer	2
gDNA digester	1
Total RNA	1-2
DEPC 水	补足至 10

在 RNase free PCR 管中按说明书分别加入上述反应液，其中各管中 Total RNA 的量都定为 1 μg ，所加入的 RNA 体积用 1 μg 除以各样品 RNA 所测浓度来计算，再用 DEPC 水将 10 μl 体系补齐。待体系中所有反应物加完后，将体系中的反应混合液轻轻吹打混匀，若在混匀的过程中管中反应液出现了气泡，可用手指轻弹管壁，将气泡弹走，然后盖紧 PCR 管盖子，短暂离心 7~8 s 后，将其放入 PCR 仪中，设置程序， 42°C 孵育 2 min。

（3）逆转录反应体系的配制（20 μl ）：

待（2）中的反应液孵育结束后，将 PCR 管取出置于冰上，然后分别向各管

中直接加入 10 μl 的 2 \times Hifair II SuperMix plus, 用移液枪将反应液轻轻吹打混匀, 去除气泡并短暂离心后将其放入 PCR 仪中, 设置如下程序进行反应:

温度	时间
25 $^{\circ}\text{C}$	5 min
42 $^{\circ}\text{C}$	30 min
85 $^{\circ}\text{C}$	5 min

反应结束后, 所得到的即为 cDNA 溶液, 将其从 PCR 仪中取出, 置于-4 $^{\circ}\text{C}$ 或于-20 $^{\circ}\text{C}$ (若短期内不使用) 冰箱保存, 可用于后续 qRT-PCR 反应实验。

3.3.4 qRT-PCR 反应

(1) 实验前准备: 在实验前 30 min 将超净工作台的紫外灯打开, 对工作区域进行杀菌处理, 后续实验全程都在超净工作台进行。将实验过程中所要用的各反应试剂从冰箱中取出置于冰上解冻, 然后进行短暂离心, 使用前用移液枪进行混匀。同时将实验中要用到的引物提前配制好。

(2) qRT-PCR 反应体系的配制:

试剂	用量 (μl)
Hieff qPCR SYBR Green Master Mix	10
Forward Primer	0.4
Reverse Primer	0.4
cDNA	1.0
DEPC 水	8.2
共计	20

qRT-PCR 反应体系所要用的反应液及用量如上表所示, 在配制的过程中为了减少误差, 将下述反应物分为两个总体系进行配制: ①模板体系: 即单管中加入模板 cDNA 1 μl 、DEPC 水 8.2 μl , 配制成 9.2 μl 的体系, 总体系根据反应管数进行倍数放大, 一般多配制 0.5 管的量 (吸取反应物的过程中会有损失)。②引物体系: 即 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 10 μl 、正向引物 0.4 μl 、反向引

物 0.4 μl ，配制成 10.8 μl 的体系，同样总体系根据反应管数进行倍数放大，一般多配制 2 管的量。总体系配制好后，将其混匀后短暂离心。

(3) 两大总体系配制好后，分别吸取模板总体系 9.2 μl 沿八连管管壁一侧将其加入管中，模板体系分加完成后，换一个干净的枪头吸取引物总体系 10.8 μl 沿八连管壁另一侧（防止交叉污染）将其加入管中，最终每个 PCR 管中都有 20 μl 的反应物。待所有反应体系加好后，盖上八连管盖子，短暂离心 7 s 后，放入 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪中，按设置好的程序进行反应。

(4) 扩增程序的设置（两步法）：将八连管按顺序放入 PCR 仪中后，设置好以下程序进行反应，程序如下：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	10 s	40
退火/延伸	60°C	30 s	
溶解曲线分析	仪器默认设置		

(5) 结果分析与数据处理：待反应结束后，将数据收集保存，并进行处理分析。目标基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算，以 *Gapdh* 作为内参基因进行校准分析。

3.4 石蜡组织切片

(1) 取材与固定

在取材前一天将取材过程中所要用的镊子、手术剪、PBS 溶液等进行高温灭菌。用颈椎脱臼法将小鼠处死后，用固定针将小鼠四肢固定在泡沫板上（小鼠腹部朝上），喷洒适量 70% 的酒精将小鼠腹部打湿，再用手术剪将小鼠腹部剪开，将小鼠肾脏取下后将其放入 PBS 缓冲液中（PBS 缓冲液在冰上预冷），清洗组织上的血渍和取材过程中粘上的小鼠毛发，后将肾组织转移到 4% 的甲醛溶液中，室温固定过夜。

(2) 脱水：取材第二天待组织固定完全后，准备包埋框，在框上写明小鼠年龄、

组织类型、性别、基因型、编号和时间等信息，将组织转移到相应的包埋框中，将装有组织的包埋框放入 ddH₂O 中清洗 10 min，将固定液洗去。然后按如下步骤进行乙醇梯度脱水：

试剂	时间 (min) × 次数
50%乙醇	15 × 2
70%乙醇	15 × 4
80%乙醇	10 × 2
90%乙醇	5 × 2
95%乙醇	5 × 2
100%乙醇	5 × 2

(3) 透明：组织脱水结束后，将装有组织的包埋框取出，转移至装有水杨酸甲酯的缸中，透明过夜（一般 8~12 h）。第二天上午将组织从水杨酸甲酯溶液中转移至二甲苯中，透明 5~10 min。在二甲苯中透明的过程中可用镊子掰开包埋框，检查组织透明情况，当组织完全变透明后即可将含有组织的包埋框取出，进行下一步骤。

(4) 浸蜡：在浸蜡步骤前至少提前 2 小时将盛有石蜡的蜡缸放进 60℃烘箱中使其融化，透明步骤结束后，将包埋框取出放进已经融好的石蜡中，组织在蜡缸 I、蜡缸 II 中分别浸蜡 1.5 h，使组织被石蜡完全渗透。

(5) 包埋组织：在进行包埋步骤前，提前将石蜡包埋机打开，准备金属包埋框、镊子等。浸蜡结束后将包埋框转移至石蜡包埋机的标本盒存储器中，依次对其进行包埋。将包埋好的金属框转移至冷却台上，使其静置冷却大约 20 min，此时金属框中的石蜡已经凝固成型，用手将其与金属包埋框剥离，得到包埋组织的蜡块，蜡块可放置室温或 4℃冰箱长期保存。

(6) 石蜡切片：

①将蜡块提前 20 min 放入-20℃冰箱中预冷，水浴锅提前进行预热，将温度设为 42℃。

②安装石蜡切片机的刀片，安装蜡块到探头上，调整刀片和探头位置，包括切片

角度、切面位置和距离等。

③开始切片，切片厚度一般为 $5\ \mu\text{m}$ ，将切好的石蜡薄片用镊子轻轻夹起转移至水浴锅中，待其在水面完全展平后，用载玻片将组织薄片小心捞出，使其平展地贴在载玻片上。

④在显微镜下观察切片，若组织完整且石蜡薄片平直，则可用于后续实验。在载玻片上写明组织信息，将其置于切片架上，室温自然晾干或在 60°C 烘箱中烘片 1 h，室温保存备用。

3.5 原位杂交

(1) 准备组织切片：对组织蜡块依次进行切片、展片、贴片以及将切片自然风干，步骤同实验方法 3.4 中的 (6)，唯一不同的地方是原位杂交贴片时所用的玻片是 SUPERFROSTPlus 载玻片。

(2) 烤片：于 60°C 烘箱中将切片进行烘烤，时间为 1 h。结束后室温冷却切片 (5 min)。

(3) 脱蜡：在通风橱中将切片依次浸入以下试剂中进行脱蜡，在浸入不同的试剂时适当上下移动切片架，保证切片充分接触试剂，顺序和时间分别为：

试剂	时间 (min) × 次数
二甲苯	5×2
无水乙醇	1×2

(4) 开启杂交炉， 40°C 加湿平衡 30 min。开启水浴锅，将温度设为 100°C 。

(5) 准备 $1\times$ 靶标修复试剂：将 $10\times$ RNASCOPE 靶标修复试剂稀释为 $1\times$ 的工作液 (70 ml 修复试剂加 630 ml 蒸馏水)。将适量 (浸没切片即可) $1\times$ RNASCOPE 靶标修复试剂倒入塑料染缸中，盖上染缸盖子后将其放在水浴锅中加热至沸腾。

(6) RNASCOPE 双氧水孵育：吸取适量 (约 $20\ \mu\text{l}$) 双氧水滴加在组织上，并保证完全覆盖组织，室温孵育 10 min。结束后，将切片置于蒸馏水中清洗 (在蒸馏水中上下移动切片架)，而后更换蒸馏水，重复清洗一次。

(7) 靶标修复：

a、甩干切片上的残留水分，将切片放入沸腾的靶标修复液中，于 100℃下进行修复，时间为 15 min。

b、结束后将切片放置于盛有蒸馏水的染缸中冷却（上下抽动 3~5 次）。

c、再转移至 100%乙醇中清洗（上下抽动 3~5 次），而后于室温晾干。

（8）画阻水圈：用阻水笔围绕组织周围划一圈，室温使其自然风干（1 min），形成阻水圈。

（9）将切片水平放在切片架的切片槽内（按顺序放），并按紧卡扣。在组织上滴加蛋白酶 plus，将整个切片架放进湿盒中孵育 30 min（40℃）；结束后将切片放在蒸馏水中进行清洗，清洗 2 次。

（10）准备 1×的清洗缓冲液：将 50×清洗缓冲液（60 ml）加入蒸馏水（2940 ml）中，稀释为 1×的溶液，备用。准备 50%的苏木素染色液和新鲜干净的二甲苯，供后续实验使用。

（11）从冰箱（4℃）中取出 RNA scope 2.5 HD Amp1-6 试剂，于室温中平衡；另外在 40℃烘箱中平衡靶标探针、对照探针。

（12）在组织上滴加适量探针（靶标或对照探针），于杂交炉（40℃）中孵育 2 h；结束后，用先前配好的 1×清洗缓冲液清洗切片（摇床清洗 2 min，清洗 2 次）。

（13）接着按下表顺序进行 Amp1-Amp6 的孵育和清洗，各探针孵育的温度和时间如下表：

试剂	温度	时间
Amp1	40℃	30 min
Amp2	40℃	15 min
Amp3	40℃	30 min
Amp4	40℃	15 min
Amp5	室温	30 min
Amp6	室温	15 min

（14）配制信号检测液：瞬离 RED-B 管，以 1:60 的比例将其与 RED-A 配成信号检测液（检测前 5 min 避光配制）。

(15) 甩干切片上的水分，并将组织周围的残留液体用吸水纸擦干，切片平放在湿盒中；在组织上滴加适量（能完全覆盖组织）信号检测液，盖上湿盒盖子，室温孵育 10 min，结束后，将切片浸没在清洗槽（盛有自来水）中，摇床上清洗 2 min，清洗 2 次。

(16) 将切片水分甩干、擦干后，将稀释好的 50% 苏木素染色液滴加在组织上，室温孵育 2 min；结束后，将切片放在自来水下进行冲洗，直至显微镜下组织细胞核变成蓝色。

(17) 将切片放在烘箱中，60℃ 烘烤 12 min，将切片烘干。

(18) 将切片从烘箱中取出，于室温自然冷却（5 min），而后将其浸没在二甲苯溶液中（1 min），用巴氏吸管吸取中性树脂滴加在组织上，盖上盖玻片进行封片，通风橱过夜风干切片。

(19) 次日用显微镜观察切片、拍照。

3.6 小鼠肾功能各指标检测

3.6.1 血标本留取

Adamts18^{+/+} 小鼠和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠（8 周龄）各 8 只进行心脏取血，血液置于采血管中，室温静置 30 min 后置于 4℃ 离心机，1000 g 离心 20 min。吸取上层血清并分装，-20℃ 冰箱进行保存，用于后续血清学指标监测。

3.6.2 尿标本留取

取 8 周龄 *Adamts18^{+/+}* 小鼠和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠各 8 只，每只小鼠单独放入代谢笼中，小鼠正常进食、饮水。收集小鼠 24 h 尿液，记录尿量。将收集的尿液置于离心机（4℃）中，2000 rpm 离心 10 min。吸取并分装上清液于 1.5 ml 灭菌离心管中，管上注明相关信息后，置于 -20℃ 冰箱保存，用于后续尿生化指标及尿液质谱检测。

3.6.3 生化指标检测

将收集的血清和尿样用全自动生化分析仪进行相关指标检测。

3.7 透射电镜观察

(1) 取材：小鼠进行常规麻醉，剖开小鼠腹部，将小鼠肾脏取出，置于 2.5%的戊二醛中，然后将肾组织切成 1 mm^3 左右大小的组织块。

(2) 固定：肾组织小块在戊二醛中固定过夜 (4°C)，而后依次按下表步骤进行操作

步骤	时间 × 次数
0.1M 磷酸漂洗液 (漂洗)	15 min × 3
1% 锇酸固定液 (固定)	3 h × 1
0.1M 磷酸漂洗液 (漂洗)	15 min × 3

(3) 脱水：按下表步骤进行

试剂	脱水温度	时间 (min)	次数
50%乙醇	4°C	15-20 min	1
70%乙醇	4°C	15-20 min	1
90%乙醇	4°C	15-20 min	1
90%乙醇+90%丙酮 (1:1)	4°C	15-20 min	1
90%丙酮	4°C	15-20 min	1
100%丙酮	室温	15-20 min	3

(4) 包埋：按下表步骤进行

包埋试剂	包埋温度	时间
纯丙酮+包埋液 (2:1)	室温	3-4 h
纯丙酮+包埋液 (1:2)	室温	过夜
纯包埋液	37°C	2-3 h

(5) 固化：在烘箱内按如下步骤进行

烘箱温度	固化时间
37°C	过夜
45°C	12 h
60°C	24 h

- (6) 切片：将肾组织切出约 55 nm 厚的薄片。
- (7) 染色：用 3% 的醋酸枸橼酸铅双染色。
- (8) 在老师的指导下，进行透射电镜观察、拍片并分析。

3.8 苏木精-伊红染色

苏木精-伊红染色也称 HE 染色 (Hematoxylin-Eosin staining, HE)，是最常用的组织病理学制片染色方法之一。具体染色步骤如下：

(1) 烤片：将切好的石蜡切片放入 60°C 烘箱中，烘烤 1 h。目的是将组织周围的石蜡融化，还可使组织在载玻片上粘附得更紧密。

(2) 脱蜡复水：烤片结束后，将组织切片依次浸入不同的试剂进行脱蜡。切片脱蜡过程中所浸入的试剂顺序、时间及次数如下表：

试剂	时间 (min) × 次数
二甲苯	10 × 2
100%乙醇	5 × 2
90%乙醇	5 × 2
ddH ₂ O	5 × 2

脱蜡结束后，将切片放入盛有蒸馏水的染色缸中浸洗 5 min。

(3) 苏木素染色：在进行染色前，将苏木素原液用蒸馏水稀释至 50% 浓度，滤纸过滤后备用。从蒸馏水中将切片取出，甩干切片上水分，再用吸水纸将组织周围的水擦干（擦拭过程尽量小心，避免擦掉组织）。在组织上滴加苏木素染液，染色 1~2 min，流水冲洗 5~10 min，使切片返蓝。

(4) 伊红染色：染色前，同样将片子甩干、擦干，在组织上滴加伊红染液，染色 10~30 s，流水下冲洗 3~5 min。

(注：在进行染色时，不同组织染色时间及流水冲洗时间不完全相同，可通过镜检观察具体染色情况来对其进行灵活调整)。

(5) 烘片：将切片于 60°C 烘箱中烘 12 min，将片子烘干。

(6) 封片：将烘好的片子浸入二甲苯中，时间 1~2 min，用中性树胶进行封片，待切片晾干后即可观察拍照。

3.9 PAS 染色

(1) 肾脏组织进行固定、脱水、包埋、切片等步骤如前 3.4 所述。

(2) 按 3.8 中步骤将肾脏组织切片进行烤片和常规脱蜡至水，在蒸馏水中浸洗 5 min(在进行脱蜡步骤前可提前 30 min 将氧化剂和 Schiff 染色液从 4°C 冰箱拿出，待其恢复室温后，避光使用)。

(3) 用巴氏吸管吸取氧化剂滴在组织上，使氧化剂覆盖整个组织，室温避光处理 5~8 min(具体氧化时间可根据不同时期的肾组织进行调整)。

(4) 将切片置于流水下冲洗 1 min，放入盛有蒸馏水的染缸中，室温浸洗 5 min。

(5) 吸取 Schiff 染色液滴在组织上，使染液覆盖整个组织，室温避光浸染 10~20 min(具体浸染时间可根据不同时期的肾组织进行调整)。

(6) 将切片放在自来水下，流水冲洗 10 min。

(7) 吸取苏木素染色液滴在组织上，室温染细胞核 1.5 min。

(8) 倾去苏木素染液，不经水洗，直接吸取酸性分化液(试剂 D)滴在组织上，室温分化 2~5 s。

(9) 将切片置于自来水下，流水冲洗 10~15min，使其返蓝。(在冲洗的过程中可在显微镜下观察组织，根据返蓝效果停止流水冲洗，不同时期的肾组织流水冲洗返蓝时间不同。)

(10) 将染色好的切片于 60°C 烘箱中烘 12 min，将片子烘干。

(11) 将烘干后的切片放入装有二甲苯的染缸中，液面完全覆盖组织，室温透明 2 min，最后在组织上滴加中性树胶，盖上盖玻片封片，待晾干后即可在显微镜下进行观察、拍摄。

3.10 PASM 染色

- (1) 按 3.8 中步骤将肾脏组织切片进行烤片和常规脱蜡至水。
- (2) 用巴氏吸管吸取氧化剂滴加在组织切片上,于室温避光条件下氧化 15 min,而后用蒸馏水对着组织切片冲洗,水洗 2 min。
- (3) 水洗后甩去切片上多余水分,用吸水纸将组织周围的水分擦干,后吸取铁明矾溶液滴加在组织上,室温避光染色 10 min,染色结束后切片用蒸馏水洗 2 min。
- (4) 配置六胺银工作液:取一个 1.5 ml 的离心管,分别吸取 500 μ l 六胺银原液和硼酸钠溶液,等量混合均匀,盖紧离心管盖子,将其放入 60 $^{\circ}$ C 烘箱中,预热 3-5 min。
- (5) 将清洗过后的切片甩干、擦干然后平放在湿盒内(湿盒内要注入适量蒸馏水,防止后续恒温染色过程中切片上染液快速蒸干,影响染色效果),吸取预热的六胺银工作液滴加到组织上,滴加量尽可能多一点,完全覆盖组织。盖上湿盒盖子,将湿盒放入 60 $^{\circ}$ C 烘箱中,染色 1.5 h,直至切片呈烟草黄色或黑色为止。
(注:由于液体在 60 $^{\circ}$ C 烘箱中易蒸发,因此在这个过程中每隔 20 min 查看切片上六胺银工作液残留情况,若工作液残留不多需及时在组织上补加)。而后将切片置于蒸馏水中浸洗 1 min。
- (6) 将片子甩干、擦干,吸取海波溶液滴加在组织上完全覆盖组织,室温染色 1 min,而后于蒸馏水中浸洗 1 min。
- (7) 将片子甩干、擦干,吸取氯化金溶液滴加在组织上,室温对切片进行调色 1 min,而后切片于蒸馏水中浸洗 2 min。
- (8) 用伊红染液对切片进行复染 1 min,蒸馏水洗 1 min。
- (9) 将染色完成的切片于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中烘 12 min,将片子烘干。
- (10) 将烘干后的切片放入装有二甲苯的染缸中,室温透明 2 min,最后在组织上滴加中性树胶,盖上盖玻片封片,待晾干后即可在显微镜下进行观察、拍摄。

3.11 免疫组织化学 (IHC)

(1) 按配方提前配制 EDTA-柠檬酸钠抗原修复液, 并将 PH 调至 9.0, 放置于 4°C 冰箱, 备用。

(2) 组织切片烤片、脱蜡复水步骤同 HE 染色 (步骤 3.8)。在脱蜡复水步骤进行的过程中提前将水浴锅开好, 设为 100°C, 并将装有抗原修复液的塑料染缸放进煮沸的水浴锅中进行预热, 以备后续实验使用。

(3) 抗原修复: 待水浴锅中的抗原修复液温度升至 96°C 左右时, 将置于蒸馏水中的切片转移至水浴锅中盛有抗原修复液的染缸, 然后盖上染缸的盖子, 切片于保持亚沸腾状态的染缸中煮 12 min 进行抗原修复, 结束后将染缸取出, 于室温进行冷却复性 (大约 30~40 min)。结束后将切片浸入另一盛有蒸馏水的染缸中, 摇床快速清洗, 5 min/次, 清洗 3 次。清洗切片的过程中可配制下一步骤要用到的 3% H₂O₂ (30% 的 H₂O₂ 用蒸馏水稀释 10 倍即可, 现用现配, 避光)。

(4) 去除内源性过氧化物酶: 将清洗好的切片依次取出, 用吸水纸把组织周围的水擦干, 切片水平放置在湿盒中, 吸取 3% H₂O₂ 滴加在组织上, 使其完全覆盖组织, 盖上湿盒盖子, 室温避光处理 30 min。结束后, 甩去片子上的残留液体, 将切片放在盛有 TBST 的染缸中, 清洗 3 次 (摇床), 5 min/次。清洗切片的过程中配制封闭液—5% 山羊血清 (TBST 稀释)。

(5) 封闭: 将清洗好的切片取出, 擦干后用指甲油在组织周围画上一圈 (阻水圈), 待指甲油风干后, 在组织上滴加封闭液 (5% 山羊血清), 室温封闭 1 h。

(6) 孵育一抗: 根据抗体说明书按比例稀释一抗溶液 (抗体稀释液为 1% 的山羊血清)。待封闭结束, 倾去切片上的封闭液, 擦干组织周围的残留液体后将切片放在湿盒中, 滴加一抗, 确保组织被完全覆盖, 置于 4°C 冰箱进行过夜孵育。

(7) 次日将湿盒从 4°C 冰箱中取出, 于室温复温 30 min。按 1:50 的稀释比 (HRP 标记山羊抗兔原液: 1% 的山羊血清) 配制二抗溶液, 放置于 4°C 冰箱备用。复温结束后, 将切片放置于盛有 TBST 的染缸中清洗, 5 min/次, 清洗 3 次。

(8) 孵育二抗: 将清洗好的切片擦干, 平放在湿盒中, 在组织上滴加二抗溶液, 盖上湿盒盖子, 室温孵育 2 h。结束后同样用 TBST 清洗切片 3 次, 5 min/次。在

清洗的过程中按照说明书以 17: 1: 1: 1 (蒸馏水: A 液: B 液: C 液) 的比例提前配制 DAB 显色液。

(9) DAB 显色: 将 DAB 显色液滴加在组织上, 盖上湿盒盖子, 室温避光处理 10 min (显色过程中可通过显微镜观察染色效果, 根据染色情况适当延长或缩短染色时间), 将切片置于蒸馏水中清洗, 结束染色。

(10) 苏木素染核: 将苏木素原液用蒸馏水稀释至 50% 浓度, 过滤后使用。用巴氏吸管吸取苏木素滴加在组织上, 室温染色 1~2 min, 结束后将其置于自来水下冲洗, 使其返蓝。

(11) 切片进行烘干、封片。同 HE 染色的步骤 (10) - (11)。

3.12 Masson 染色

(1) 肾脏组织进行固定、脱水、包埋、切片等步骤如前 3.4 所述。

(2) 按 3.8 中步骤将肾脏组织切片进行烤片和常规脱蜡至水。

(3) 在玻璃染缸中倒入 Bouin's 氏液, 直至液面能将切片上组织覆盖。将切片放进玻璃染缸中, 60°C 烘箱中静置媒染 1 h, 而后将切片取出, 流水冲洗 10 min。

(4) 吸取天青石蓝染色液滴加在组织上, 使染液覆盖整个组织。室温染色 2~3 min, 而后流水冲洗切片 2 次, 每次 10~15 s。

(5) 同样的方法吸取 Mayer 苏木素染色液滴加在组织上, 室温染色 2~3 min, 而后用洗瓶 (内装有蒸馏水) 对着组织冲洗 2 次, 每次 10~15 s。

(6) 丽春红品红染色液滴染组织 5 min, 而后用蒸馏水冲洗 2 次, 每次 10~15 s。

(7) 吸取磷钼酸溶液将其滴加在组织上, 室温染色 10 min。

(8) 倾去磷钼酸溶液, 切片不水洗, 直接将苯胺蓝溶液滴加在组织上, 室温染色 5 min。

(9) 倾去苯胺蓝溶液, 吸取弱酸溶液滴加在组织上, 使其完全覆盖组织, 室温处理 1 min。

(10) 将切片浸入 95% 乙醇溶液中, 室温脱水 30 s。

(11) 切片浸入 100% 乙醇溶液中, 脱水 2 次, 第一次 30 s, 第二次 1 min。

(12) 将脱水后的切片放入装有二甲苯的染缸中, 完全覆盖组织, 室温透明 2 min,

最后在组织上滴加中性树胶，盖上盖玻片封片，待晾干后即可在显微镜下进行观察、拍摄。

3.13 Western Blot

3.13.1 组织总蛋白抽提

(1) 实验前准备：在实验前一天准备手术剪、镊子、磁珠，置于高温高压灭菌锅进行灭菌处理，其中磁珠灭好后置于 -20°C 冰箱进行预冷，备用。

(2) 从 -80°C 冰箱取出之前冻存的肾组织，于冰上进行解冻。用镊子将组织从管中取出，手术剪剪下适当重量（10-20 mg）的肾组织于研磨管中，记录组织重量。根据组织重量分别在各管中加入相应体积的 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂（具体为：每 10 毫克组织加 100 μl RIPA 裂解液和 1 μl 蛋白酶抑制剂）。

(3) 在各研磨管中加入一颗预冷好的磁珠，盖紧研磨管盖子，将其置于研磨机中，30 Hz 条件下研磨 60 s（若研磨结束后管中还残留有未充分研磨的组织，再适当延长研磨时间）。

(4) 将研磨管取出置于离心机中，12000 rpm， 4°C 离心 5 min。在离心的过程中准备一套新的 1.5 ml 离心管，并在管上注明各组织信息，备用。

(5) 离心结束后，吸取上清液于新准备好的相应离心管中，所取上清即为蛋白上清液，取部分上清液进行蛋白浓度测定，对剩余蛋白上清液进行分装（每管 20~40 μl ），于 -80°C 冰箱进行保存，避免反复冻融。

3.13.2 蛋白浓度测定及蛋白制样

1、蛋白浓度测定

蛋白浓度用 BCA 法进行测定，按照说明书进行如下操作：

(1) 梯度配制蛋白标准品。按照说明书配制 0.5 mg/ml 蛋白标准品及 BCA 工作液，在 96 孔板第一排的 8 个孔中按照说明书依次加入不同量的 0.5 mg/ml 的蛋白标准品，用 PBS 将每个孔补足到 20 μl ，得到一系列浓度梯度的蛋白标准品。

(2) 加入待测样品。96 孔板第二排设为样品孔，在每个孔中加入 1 μl 样品，再加入 19 μl PBS 补足到 20 μl 。为了保证样品浓度测量的准确性，每个样品设置两

个重复样品孔。

(3) 在所有蛋白标准品孔和样品孔中分别加入 200 μl BCA 工作液，而后将 96 孔板置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中避光反应 30 min。

(4) 结束反应后，将 96 孔板放置于酶标仪中，设置程序，测定各孔在 A562 波长的吸光度，将数据导出并保存，用于后续各样品浓度的计算。

(5) 根据蛋白标准品各孔的吸光度值以及对应的浓度制作标准曲线， $R^2 \geq 0.99$ ，得到直线回归方程。将各样品孔的吸光度值（两个复孔的平均值）代入直线回归方程中，即可算出样品的蛋白浓度。

2、蛋白制样

由于各样品所提总蛋白浓度不一致，为了保证在所有样品总蛋白浓度一致的前提下对目标蛋白进行定量，在每次制样前需要将各样品蛋白浓度用 PBS 调齐。具体如下：如若每个样品每孔蛋白量定为 20 μg ，则各样品每孔所需蛋白上清液体积 = 蛋白总量/各样品蛋白浓度。每孔所需 5 \times loading Buffer 的体积 = 每孔总制样体积/5，最后每孔各蛋白样中所加 PBS 体积 = 总制样体积-所加蛋白上清液体积- 5 \times loading Buffer 体积，从而保证每个上样孔中总蛋白量是一样的。

加完后，将各管内容物混匀，而后置于离心机中，12000 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 瞬离（7~8 s）。离心结束后，将各管蛋白放入金属浴中，99 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 使蛋白变性，变性后的蛋白样液置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱进行保存，用于后续实验。

3.13.3 蛋白免疫印迹（Western blot, WB）

(1) 准备工作：实验前将玻璃板清洗干净，置于室温自然晾干，备用。提前准备好后续实验要用到的电泳液（1 \times Running Buffer）和转膜液（1 \times Transfer Buffer）。

(2) 制胶：按照产品说明书，配制电泳中要用到的凝胶，包括分离胶和浓缩胶。待胶凝固后，可直接用于后续电泳操作步骤，也可放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱暂时保存（若不立即进行实验）。

(3) 组装电泳槽内芯：凝胶凝固后，将制好的胶板卡紧电泳槽内芯一侧（胶板短板一侧朝内），电泳槽内芯另一侧用一块空白板插入，然后将两块板用电泳槽内芯两侧的侧卡夹固定住。

(4) 检漏：将固定好的电极芯置于水平桌面，向其倒入配好的 1×Running Buffer 进行检漏，数分钟后若桌面不见槽中液滴渗漏，说明电极芯组装完好，可用于接下来的电泳操作。此外，在检漏的过程中，可将蛋白样品从-20℃冰箱取出，置于室温冰盒上解冻，4℃短暂离心后使用。

(5) 电泳液加入：将电泳槽内芯卡在电泳槽上，注意电极芯安放方向，即电泳槽内芯上的正极（红色）卡住电泳槽正极（红色）一侧，负极（黑色）一侧同理，即“红对红，黑对黑”。组装好后，向电泳槽内芯中补足 1×Running Buffer，直至加满，小心地将梳齿竖直向上拔出，再将 1×Running Buffer 倒入电泳槽至相应标记位置。

(6) 上样：将蛋白样按顺序缓慢加入胶孔中，根据目的蛋白分子大小选择合适量程的蛋白 Marker，分别加在第一个和最后一个胶孔当中。若加完蛋白样和蛋白 Marker 后胶中还有空孔，则剩下的空孔用相同体积的 1×Loading buffer 补齐。

(7) 电泳：加完样后，盖上电泳槽盖子，将盖子上的电缆线插入电泳仪，同样遵循“红对红，黑对黑”原则。打开电泳仪电源开关，将电泳仪设为恒流 25 mA（可根据实际情况调整），进行电泳。电泳过程中可随时查看蛋白 Marker 条带跑开情况，当与目的蛋白分子大小相对应的蛋白 Marker 条带跑到胶大致中间的位置时，可停止电泳。

(8) 转膜：

a、待电泳快结束（还剩 10 min）前，准备切胶工具、转膜夹、小滚轮、转印滤纸和不锈钢方盘，向方盘中倒入预先配制的 1×Transfer buffer，并润湿转印滤纸。此时用剪刀裁剪出一张合适大小的 PVDF 膜，并剪去 PVDF 膜的一个角（本实验中剪去其右上角）作为标记，将其浸没于无水甲醇中活化，1 min 后，用塑料镊子将活化的 PVDF 膜取出，浸没在 1×Transfer buffer 中，待用。

b、停止电泳后，将胶板取出平放在水平桌面，根据蛋白 Marker 的指示，找到目的蛋白所在胶的位置，用切胶工具将目的蛋白所在区域的胶切下，并同样在胶的右上角切去一个角，蒸馏水洗去胶上残留的泡沫，将胶小心的转移到转膜夹黑色面滤纸的表面，调整胶的摆放位置，使胶尽量平齐的贴在滤纸上，若胶和滤纸之

间出现了气泡，要将气泡排除出去。

c、用塑料镊子将润湿的 PVDF 膜挑起，覆盖在胶的表面，且将 PVDF 膜切去角的一侧贴在胶上切去角的一侧（通过角的标记，可以知道转膜后膜上蛋白样的顺序），排出膜和胶之间的气泡，将转膜夹白色面的三层滤纸轻轻覆盖在膜上，用小滚轮从滤纸一侧滚向另一侧，将膜和胶之间可能存在的气泡排出，合上转膜夹，用白色滑块锁住转膜夹，将其竖直插入转印电极芯中，注意转膜夹黑色面（负极）对着转印电极芯黑色面（负极）。

d、将转印电极芯插入转膜槽中，向槽中灌入转膜液（1×Transfer Buffer）至相应指示位置（4 gel 处），盖上转膜槽上盖，将线缆插入电泳仪（注意正、负极插入对应），打开电源开关，将电泳仪设为恒压 100 V，开始转膜。在转膜的过程中会大量产热，导致转膜时的电压降低，若转膜时间较长，在转膜的过程中可多次查看转膜时的电压变化，电压较低时可暂停转膜，更换预冷的转膜液后再继续转膜。

（9）封闭：在转膜结束前配制 5%的脱脂奶粉（2.5 g 脱脂奶粉+ 50 ml TBST），用涡旋器将其混合均匀，待其充分溶解后可作为封闭液以及抗体稀释液。转膜结束后，将膜取出，与胶接触的一面朝上浸没在封闭液当中，在摇床上室温慢摇封闭 2 h。

（10）孵育一抗：在封闭结束之前，按照抗体说明书给出的比例用 5%的脱脂奶粉稀释抗体。待封闭结束，将配好的抗体倒入蜡盘中，用塑料镊子将 PVDF 膜取出浸没在蜡盘中的一抗当中，将蜡盘放置于冰箱，4°C过夜孵育。

（11）洗膜：次日，将 PVDF 膜取出置于一个小方盒中，在方盒中倒入 TBST 溶液，使其能够将膜浸没，将方盒放在摇床上，室温快摇洗膜 5 次，每次 6 min。

（12）孵育二抗：根据一抗选择合适的二抗，按照抗体说明书以一定比例稀释二抗，同样用蜡盘进行二抗孵育，室温孵育 2 h。孵育结束后，同样用 TBST 洗膜，摇床快速洗膜 5 次，6 min/次。

（13）显影：

a、按照 ECL 显色液说明书将两种显色液以 1: 1 等体积（各取 500 μ l）混合均

匀。待膜洗好后，用塑料镊子将膜夹起，于一张干净的吸水纸上将膜上的 TBST 液稍稍沥干，而后用移液枪吸取配好的显影液将其均匀的滴加在膜上，室温避光反应 3 min。

b、待反应结束后，将膜夹起平放在显影仪上，按照成像系统中设置好的程序进行显影、拍照，将拍好的条带照片进行保存。

4 实验结果

4.1 *Adamts18* 基因在小鼠肾脏中的时空表达特征

肾脏发育需要依赖于特定时空表达的蛋白来精准调控。尽管已有研究显示 ADAMTS18 在人胚胎肾脏中表达^[97]，但其在肾脏发育过程中的具体表达时相、部位及细胞类型来源仍不清楚；其表达量是否会随着肾脏的发育成熟而发生动态改变也未知。为此，本研究首先探究了 *Adamts18* 基因在小鼠肾脏中的表达特点。由于目前尚缺乏抗 ADAMTS18 特异性抗体，我们通过原位杂交（ISH）和实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）的方法对 *Adamts18* mRNA 在野生型小鼠肾组织中的时空表达特点进行探究。

4.1.1 qRT-PCR 检测 *Adamts18* mRNA 在小鼠肾组织中的表达

从胚胎发育 13.5 天（E13.5）-出生后 14 天（P14），是肾单位形成的关键期。肾单位由肾小体和肾小管构成，而肾小体又由肾小球和肾小囊组成。通过 qRT-PCR，我们检测了 *Adamts18* mRNA 在小鼠肾组织不同发育时相（E13.5、E16.5、1 周、2 周、5 周和 8 周）的表达。结果显示（图 9），从后肾肾单位发育的起始阶段（E13.5）到肾脏发育成熟阶段（2 周），*Adamts18* 在肾脏中均有表达，在出生后 2 周（2W）其表达量最高；出生 5W 后，*Adamts18* mRNA 在肾脏中几乎检测不到。上述结果提示，*Adamts18* 是一个与早期肾单位形成相关的阶段特异性基因。

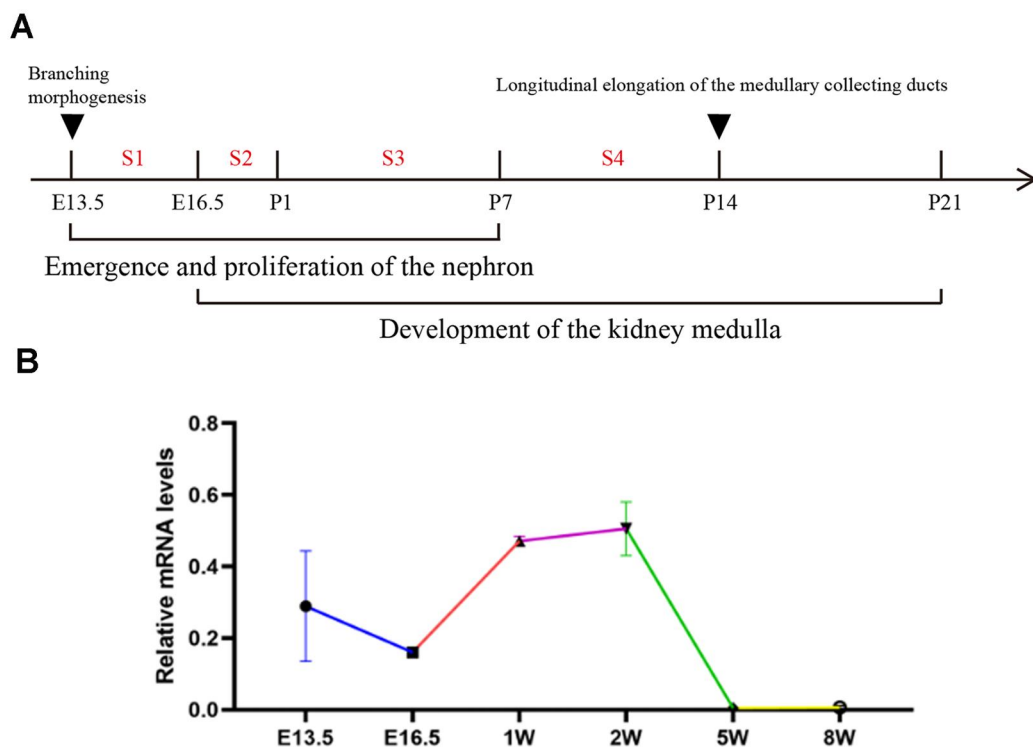


图 9: *Adamts18* mRNA 在小鼠肾组织中的表达。(A)小鼠肾脏发育模式图。E13.5, 肾脏分支形成期; E13.5-P7, 肾单位发育期(包括逗号小体期、S 形小体期和毛细血管袢期); 2W, 肾髓质集合管延长期; E16.5-P21, 肾髓质发育期。(B) qRT-PCR 检测 *Adamts18* mRNA 在小鼠肾组织中的表达。*Adamts18* mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算, 以 *Gapdh* 为内参基因进行数据校准。数据以 Mean \pm SD (n = 3/ 时间点) 表示。S, stage (发育时相); E, embryo (胚胎); P, postnatal (出生后); W, week (周)。

4.1.2 原位杂交 (ISH) 检测 *Adamts18* mRNA 在小鼠肾脏中的细胞表达类型及分布特征

为了进一步探究 *Adamts18* 在小鼠肾脏中的细胞表达类型及分布特征, 我们收集了小鼠肾脏发育关键期 (E13.5、E16.5、P1 和 2W) 肾组织样本, 进行原位杂交实验。结果显示 (图 10), E13.5, *Adamts18* mRNA 主要在间质细胞祖细胞和输尿管芽分支尖端表达; E16.5, *Adamts18* mRNA 主要在输尿管芽分支尖端表

达；出生后 1 天 (P1), *Adamts18* mRNA 表达于输尿管芽分支尖端及集合管上皮；出生后两周 (2W), *Adamts18* mRNA 仅在集合管上皮表达。

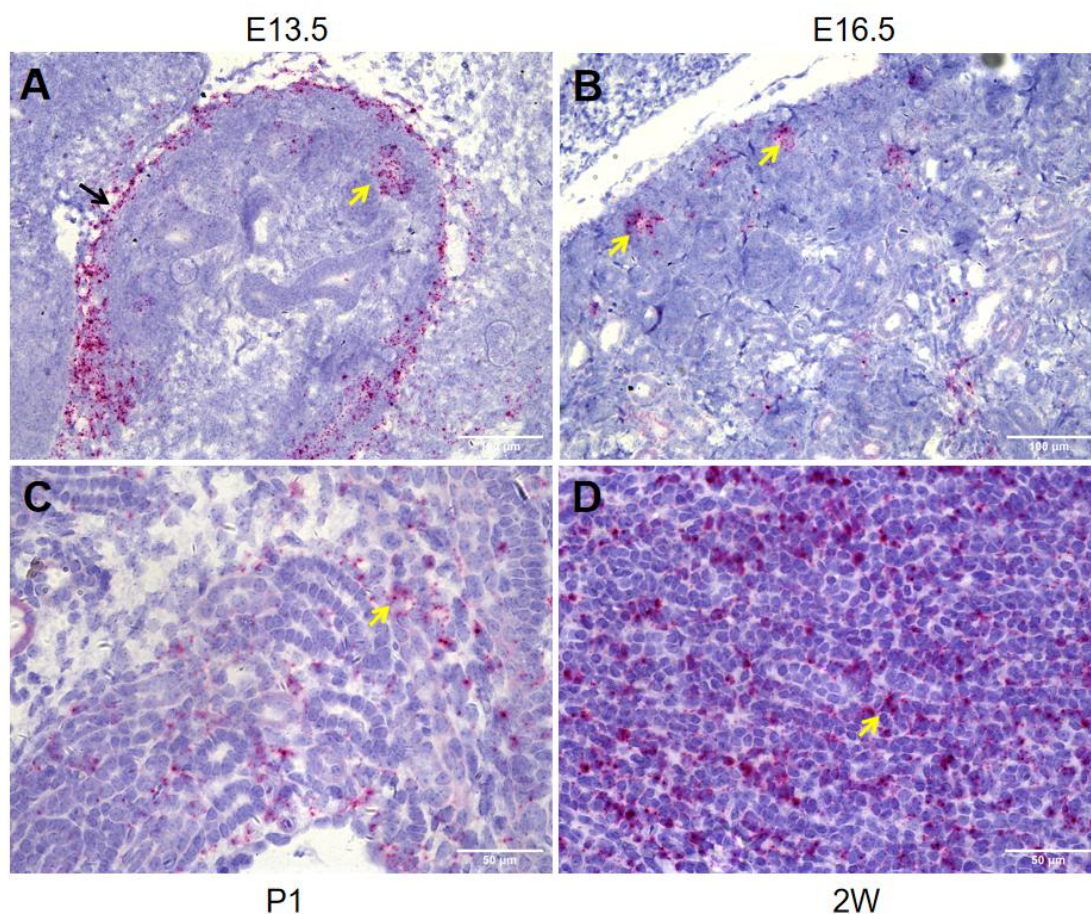


图 10: 原位杂交 (ISH) 检测 *Adamts18* mRNA 在小鼠肾脏中的细胞表达类型及分布特征。 (A) E13.5 天野生型小鼠肾脏 *Adamts18* mRNA 分布。黄色箭头所示阳性点为输尿管芽尖端, 黑色箭头所示阳性点为间质细胞祖细胞。(B) E16.5 天野生型小鼠肾脏 *Adamts18* mRNA 的分布。黄色箭头所示阳性点为输尿管芽尖端。(C) 出生 1 天 (P1) 野生型小鼠肾脏 *Adamts18* mRNA 的分布。黄色箭头所指阳性点为集合管上皮。(D) 出生 2 周 (2W) 野生型小鼠肾脏 *Adamts18* mRNA 的分布。黄色箭头所指阳性点为集合管上皮。E13.5 (A) 和 E16.5 (B) 图片比例尺为 100 μm ; P1 (C) 和 2W (D) 图片比例尺为 50 μm 。

4.2 *Adamts18* 基因敲除小鼠 (*Adamts18*^{-/-}) 出现蛋白尿

Adamts18 时空表达特征结果提示, ADAMTS18 蛋白很可能与早期肾单位形

成相关，并影响肾脏功能。我们对 8 周龄野生小鼠 (*Adamts18^{+/+}*) 及 *Adamts18* 基因敲除小鼠 (*Adamts18^{-/-}*) 小鼠进行了常规肾功能检测，包括血液生化检测和尿常规检测。

表 1: 8 周龄小鼠肾脏的血液生化检测和尿常规检测结果

检测指标	单位	<i>Adamts18^{+/+}</i>	<i>Adamts18^{-/-}</i>	P值	参考值范围
血生化检测:					
血葡萄糖	mmol/L	4.44 ± 0.56	4.60 ± 0.48	0.53	3.6-6.7
血尿素氮	mmol/L	7.48 ± 1.76	7.60 ± 1.52	0.89	2.9-7.5
血肌酐	μmol/L	121.78 ± 24.88	129.88 ± 20.85	0.46	62-133
尿常规检测:					
尿白细胞		-	-	-	-
尿亚硝酸盐		-	-	-	-
尿胆原	μmol/L	11.35 ± 1.53	11.67 ± 1.37	0.70	<16
尿蛋白		≥++ (1/8)	≥++ (6/8)	0.01*	-
尿比重		1.066 ± 0.026	1.054 ± 0.023	0.36	1.015-1.025
尿隐血		-	-	-	-
尿酸碱度		6.2 ± 1.2	5.32 ± 0.81	0.11	4.6-8.0
尿维生素C	mmol/L	0.69 ± 0.18	0.70 ± 0.15	0.89	0.29-0.74

表注: 血生化检测指标包括，血葡萄糖 (GLU)、血尿素氮 (BUN) 和血肌酐 (Creatinine)。尿常规检测指标包括尿白细胞 (LEU)、尿亚硝酸盐 (NIT)、尿胆原 (URO)、尿蛋白 (PRO)、尿比重 (SG)、尿隐血 (BLO)、尿酸碱度 (PH) 和尿维生素 C (Vitamin C)。n = 8/组。

小鼠血生化检测结果显示 (表 1)，*Adamts18^{+/+}* 小鼠和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠血液中葡萄糖、肌酐和尿素氮水平未见显著性差异。尿常规检测结果显示，*Adamts18^{-/-}* 小鼠较 *Adamts18^{+/+}* 小鼠出现明显的蛋白尿 ($P = 0.117$, 卡方检验)。

由于 *Adamts18^{-/-}* 小鼠存在较为严重的蛋白尿，我们随后通过质谱法分析了不同基因型小鼠的尿液成分。结果显示 (表 2)，*Adamts18^{-/-}* 小鼠尿液中出现 E-

cadherin 蛋白，质谱评分列所有尿蛋白成分第二位。已有研究显示，尿可溶性 E-钙粘蛋白可作为糖尿病肾病诊断的生物标志物^[115]，提示 *Adamts18*^{-/-}小鼠对肾脏损伤更为敏感。

表 2：8 周龄小鼠尿液质谱检测结果

Protein	Score	Match hit	emPAI
Serum albumin precursor	2316	65	2.22
Epithelial-cadherin precursor	492	10	0.30
Serotransferrin precursor	488	20	1.22
Serine protease inhibitor A3K precursor	204	6	0.50
Major urinary protein 2 precursor	139	4	0.83
Keratin, type II cytoskeletal 5	89	1	0.05
Keratin, type II cytoskeletal 1	85	2	0.10
Keratin, type II cytoskeletal 8	68	1	0.06
Hemoglobin subunit alpha	67	1	0.23
Keratin, type I cytoskeletal 10	64	2	0.12
Glial fibrillary acidic protein			
Same set peptide also match with	63	1	0.07
Keratin type II cuticular Hb5			
Liver carboxylesterase N precursor	59	3	0.11
Major urinary protein 3 precursor	57	1	0.16
Hemoglobin subunit epsilon-Y2			
Same set peptide also match with Hemoglobin subunit beta-1 or beta-2	47	1	0.21
Development and differentiation-enhancing factor 2	35	1	0.03

4.3 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾小球结构异常

肾小球滤过屏障由肾小球内皮细胞、肾小球基底膜以及足细胞是构成，其结构异常会导致肾小球对血液中血浆蛋白等大分子物质滤过作用增强，并超出肾小

管对大分子蛋白重吸收作用的最大限度，导致蛋白尿出现。为了探究 *Adamts18*^{-/-} 小鼠出现蛋白尿是否与其肾小球滤过屏障结构异常相关，我们对 8 周龄 *Adamts18*^{+/+} 小鼠和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾小球结构进行透射电镜分析。

电镜结果显示（图 11），在 *Adamts18*^{+/+} 小鼠中，肾滤过屏障结构正常，内皮细胞和足细胞形态规则并紧密地粘附在基底膜两侧、足细胞规则排列在肾小球毛细血管壁外周且系膜细胞均匀分布在肾小球毛细血管之间。而在 *Adamts18*^{-/-} 小鼠中，肾滤过屏障结构明显异常，包括内皮细胞出现空泡样变性、内皮细胞与基底膜之间的粘附并不紧密，两者之间出现了明显的夹层空隙（即内皮细胞剥脱）、基底膜变薄、局部系膜细胞增殖、足细胞数目减少且发生内陷被肾小球毛细血管网环绕，足突消失发生微绒毛化等。

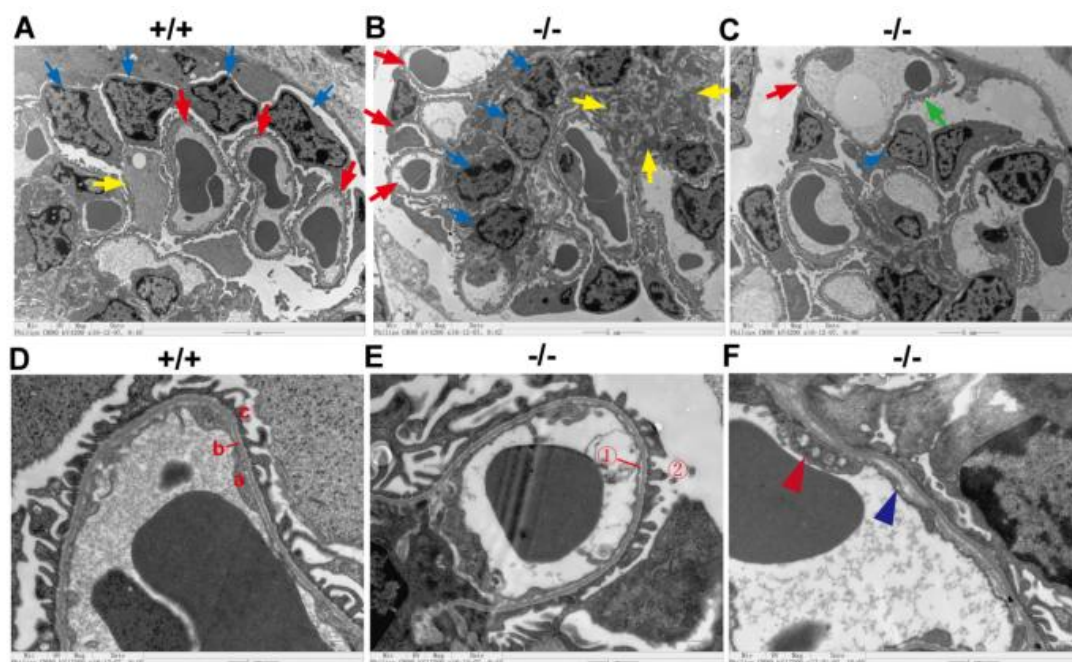


图 11：透射电镜分析 8 周龄野生小鼠 (+/+) 及 *Adamts18* 基因缺失小鼠 (-/-) 肾小球滤过屏障结构。(A) *Adamts18*^{+/+} 小鼠足突细胞（蓝色箭头）规则排列于肾小球毛细血管（红色箭头）外周，系膜基质细胞（黄色箭头）均匀分布于肾小球毛细血管间。(B) *Adamts18*^{-/-} 小鼠足突细胞内陷，被肾小球毛细血管网环绕，毛细血管间系膜基质细胞增殖（黄色箭头）。(C) *Adamts18*^{-/-} 小鼠足突细胞数量变少，内陷并被肾小球毛细血管网环绕，足突微绒毛化（绿色箭头）。(D) *Adamts18*^{+/+} 小鼠肾小球滤过屏障由内皮细胞 (a)、基底膜 (b) 及足突细胞 (c)

三层构成，内皮细胞及足突均紧密规则地排列粘附于基底膜两侧。(E-F) *Adamts18*^{-/-}小鼠足突微绒毛化 (E-②)、基底膜变薄 (E-①)、基底膜与内皮细胞间出现明显夹层 (蓝色短箭头)，内皮细胞出现空泡样变性 (红色短箭头)。标尺分别为 5 μm (A-C) 和 1 μm (D-F)。

4.4 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾组织病理学分析

4.4.1 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾组织 HE 染色分析

蛋白尿被认为是肾小球损伤的指标。长期大量的蛋白尿会刺激肾小管上皮细胞，诱导其凋亡，导致肾小管萎缩。为了探究 *Adamts18* 缺失对小鼠肾组织整体结构 (包括肾小球和肾小管) 的影响，我们收集了 2W 和 8W 的小鼠肾组织，进行苏木素-伊红 (HE) 染色。HE 染色结果显示，*Adamts18*^{-/-}小鼠肾组织结构与 *Adamts18*^{+/+}小鼠相比，肾小球形态规则，结构清楚，肾小管结构完整、清晰，未见显著病理学改变。

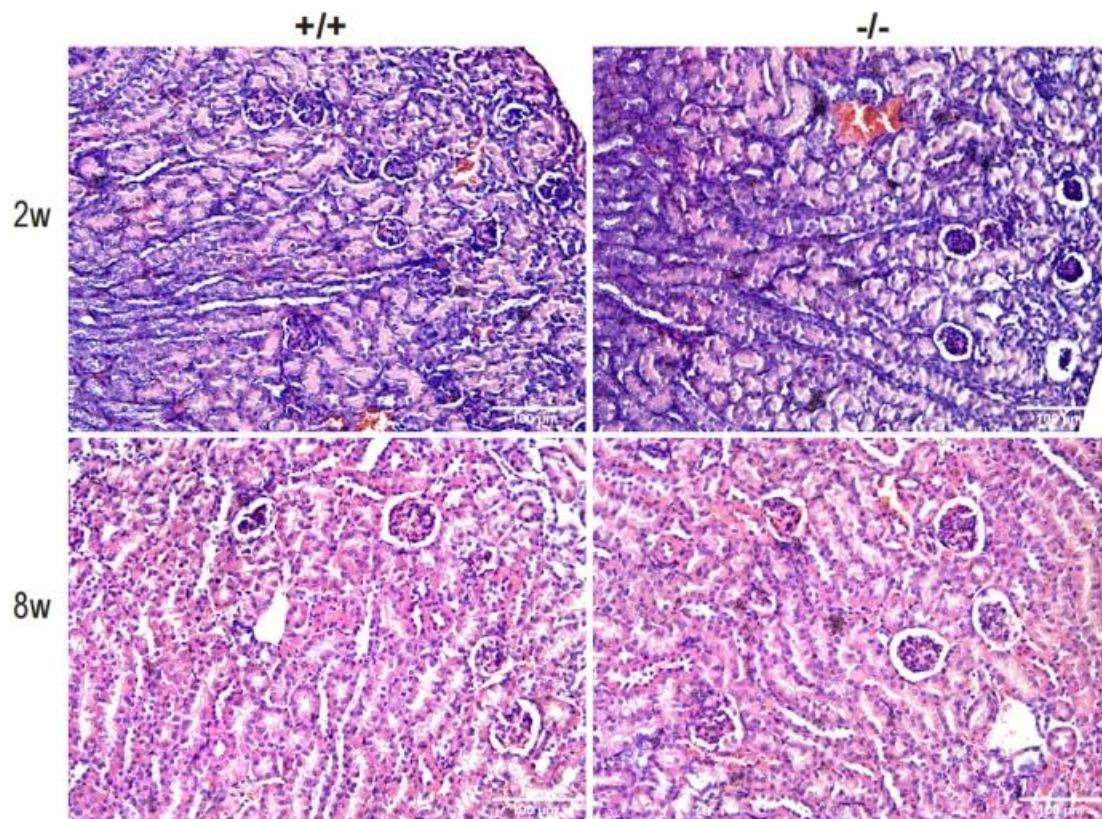


图 12: 2 周龄和 8 周龄小鼠肾的苏木素-伊红 (HE) 染色。每个时期样本数为 3 (n = 3)，每个样本至少观察了 5 个视野。图片标尺 100 μm。

4.4.2 *Adamts18*^{-/-}小鼠小鼠肾组织 PAS 及 PASM 染色分析

大分子血浆蛋白在肾小球系膜区中的堆积可引起系膜细胞损伤、增生以及系膜基质合成增加。为了探究 *Adamts18* 缺失对小鼠肾组织系膜细胞的影响，如系膜细胞是否发生增殖、系膜基质是否扩张以及基底膜形态是否发生改变，我们分别收集了 2 周（2W）、8 周（8W）、9 月龄（9M）和 14 月龄（14M）小鼠的肾组织，进行 PAS 和 PASM 染色。

4.4.2.1 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏系膜细胞 PAS 染色

过碘酸希夫（PAS）染色能较好的显示系膜基质，可用于观察肾小球系膜区的病理改变。结果显示（如图 13），在 2W、8W、9M 和 14M，*Adamts18*^{-/-}小鼠肾组织与 *Adamts18*^{+/+}小鼠相比，未发现系膜细胞增殖及系膜基质扩张等异常表型。

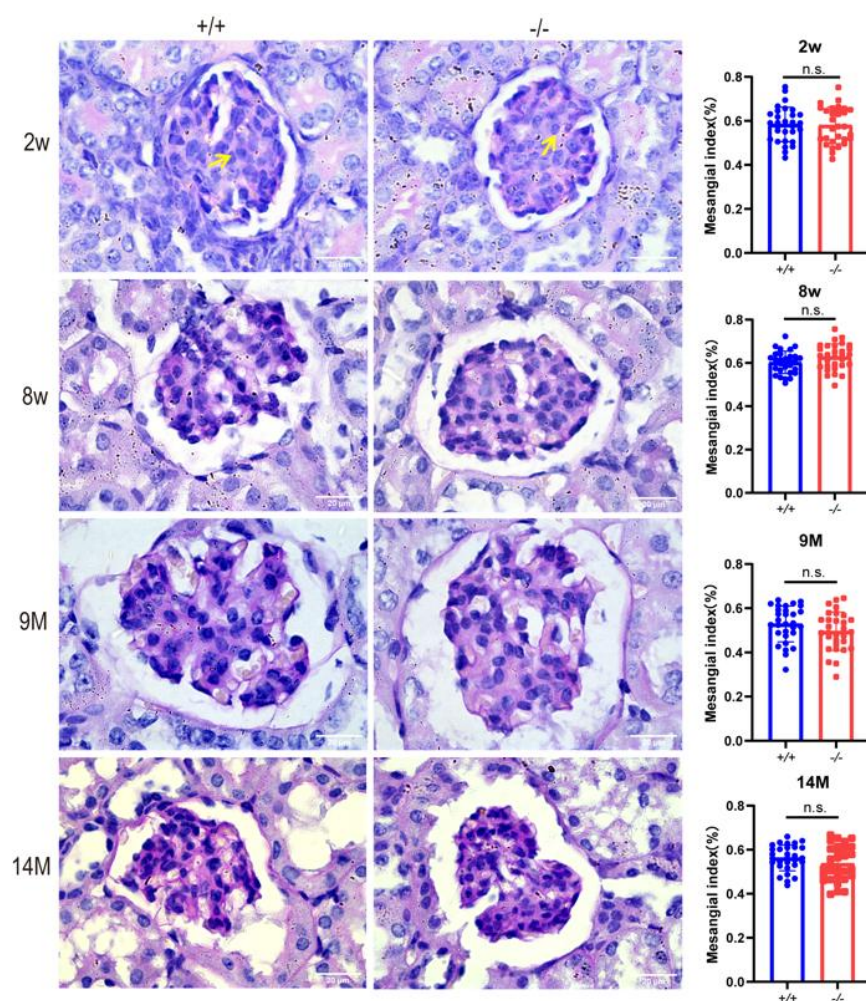


图 13: 小鼠肾组织过碘酸希夫（PAS）染色。图中黄色箭头所指为系膜细胞（位

于毛细血管之间，核小而圆），系膜细胞之间染色较深（紫红色）的区域即为系膜基质。放大倍数为 1000 \times ，标尺为 20 μm 。不同基因型小鼠每个时期样本数为 3 ($n=3$)，每个样本观察 30 个肾小球。n.s.,无显著性差异 (Student' t test)。

4.4.2.2 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏基底膜 PASM 染色

PASM 染色可用于观察肾小球基底膜 (GBM) 和肾小管基底膜 (TBM)，阳性染色结果为 GBM、TBM 呈黑色。为了进一步探究 *Adamts18* 缺失对肾脏基底膜 (包括 GBM 和 TBM) 的影响，我们对 2W、8W、9M 和 14M 的小鼠肾组织进行 PASM 染色。结果显示 (如图 14)，在 2W、8W、9M 和 14M，*Adamts18*^{-/-}小鼠肾组织与 *Adamts18*^{+/+}小鼠基底膜形态结构未见异常，未出现基底膜 (包括 GBM 和 TBM) 变薄或增厚等异常病理表型。

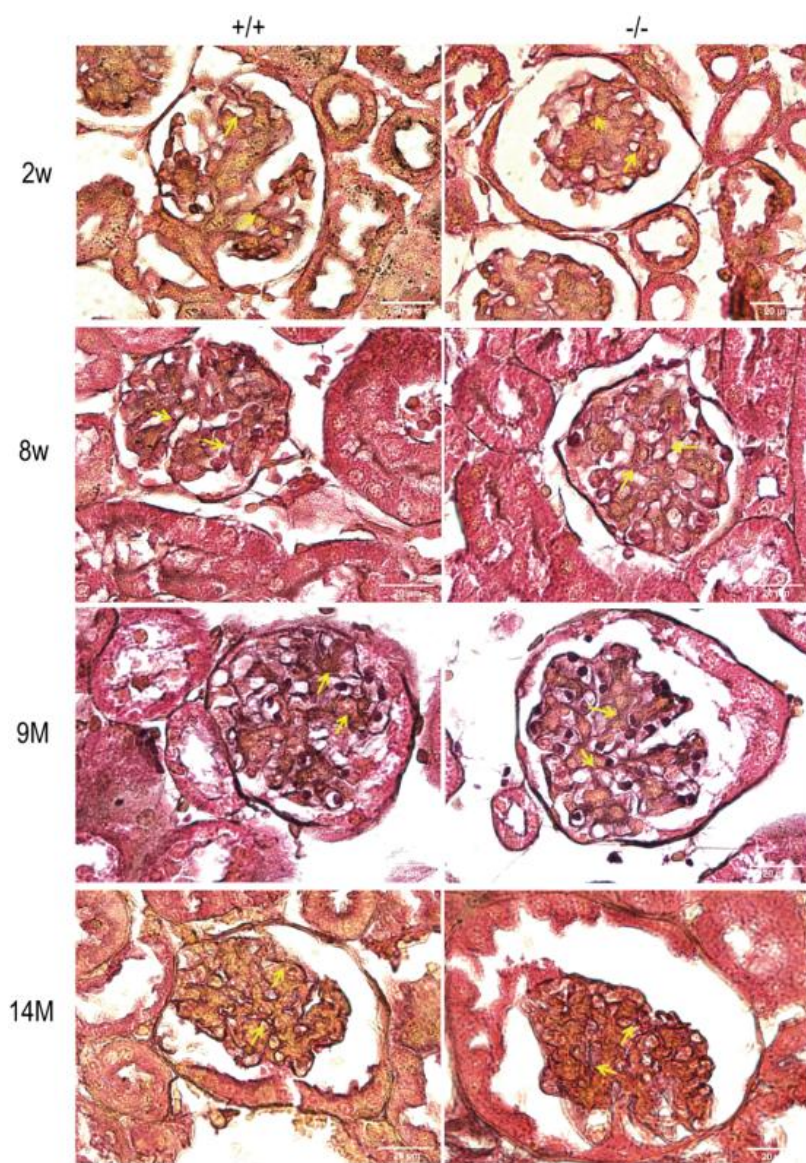


图 14: 小鼠肾组织切片六胺银 (PASM) 染色。黄色箭头所示为基底膜 (PASM 染色呈黑色)。放大倍数为 $1000\times$ ，标尺为 $20\ \mu\text{m}$ 。不同基因型小鼠每个时期样本数为 3 ($n=3$)，每个样本至少观察 10 个肾小球视野。

4.5 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏 *Lama5*、*Lamb2* 的转录表达水平降低

前述电镜结果显示, *Adamts18*^{-/-}小鼠肾小球基底膜变薄。肾小球基底膜(GBM)主要由 Laminin、Collagen IV、Nidogens 和 Heparan sulfate proteoglycan 组成, 其中 Laminin 和 Collagen IV 是最主要的成分, 这两种基底膜组分随着 GBM 的发育其亚型会发生向成熟型亚型的转化(见前言), 且 Laminin (*Lama5*、*Lamb2* 突变) 和 Collagen IV (*Col4a3*、*Col4a4*、*Col4a5* 突变) 成熟型亚型基因的突变分

别被报道与肾脏滤过屏障结构发育异常和以 GBM 缺陷为表型的阿尔波特综合征有关。

为了探究 ADAMTS18 影响小鼠肾小球滤过屏障发育的分子机制，即 *Adamts18* 缺失是否影响了 GBM 各成分的表达，以及其缺失是否会影响 GBM 的亚型转化过程，我们分别对 2 周龄 *Adamts18^{+/+}* 小鼠与 *Adamts18^{-/-}* 小鼠基底膜组分基因进行 qRT-PCR 分析，检测其在转录（mRNA）水平的表达变化。在本实验中，我们除了检测肾小球基底膜 Laminin 和 Collagen IV 各亚基组成基因（包括 *Lama1*、*Lama5*、*Lamb1*、*Lamb2*、*Lamc1*、*Col4a1*、*Col4a2*、*Col4a3*、*Col4a4*、*Col4a5*）外，还对基底膜中的其它成分如 Fibronectin 和 Fibrillin（包括 Fibrillin 1 和 Fibrillin 2）的基因（*Fn*、*Fbn1*、*Fbn2*）转录表达进行检测。

结果显示（如图 15A），在小鼠肾脏发育成熟时（2W），Laminin 的两个成熟型亚型基因 *Lama5*、*Lamb2* 的转录表达水平在 *Adamts18^{-/-}* 小鼠中较 *Adamts18^{+/+}* 小鼠显著性降低，而 Collagen IV 的成熟型亚型基因 *Col4a3*、*Col4a4*、*Col4a5* 的转录表达水平在不同基因型小鼠中未见显著性差异。此外，*Col4a1*、*Fn* 和 *Fbn1* 的转录表达水平在 *Adamts18^{-/-}* 小鼠中较 *Adamts18^{+/+}* 小鼠显著降低。

Lama5 和 *Lamb2* 编码的 Laminin $\alpha 5$ 和 Laminin $\beta 2$ 是在肾脏发育成熟时期表达的重要 GBM 成分，也正是 GBM 发生亚型转化所涉及到的组分。由此，我们推测 *Adamts18* 的基因敲除影响了 Laminin 亚型转化。为此，我们对在肾脏发育早期阶段（E16.5）涉及 Laminin 亚型转化的 5 个基因（*Lama1*、*Lama5*、*Lamb1*、*Lamb2*、*Lamc1*）及其它基底膜组分基因（*Col4a1*、*Fn*、*Fbn1*、*Fbn2*）在转录水平上的表达进行了 qRT-PCR 检测。结果显示（如图 15B），E16.5 时，编码 Laminin 的五个亚型基因（包括成熟型亚型基因 *Lama5*、*Lamb2*）在 *Adamts18^{+/+}* 小鼠和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠中的表达未见显著性差异（图 15B）。与 *Adamts18^{+/+}* 小鼠相比，*Fn* 和 *Fbn2* 在 *Adamts18^{-/-}* 小鼠中的转录表达水平显著性降低。

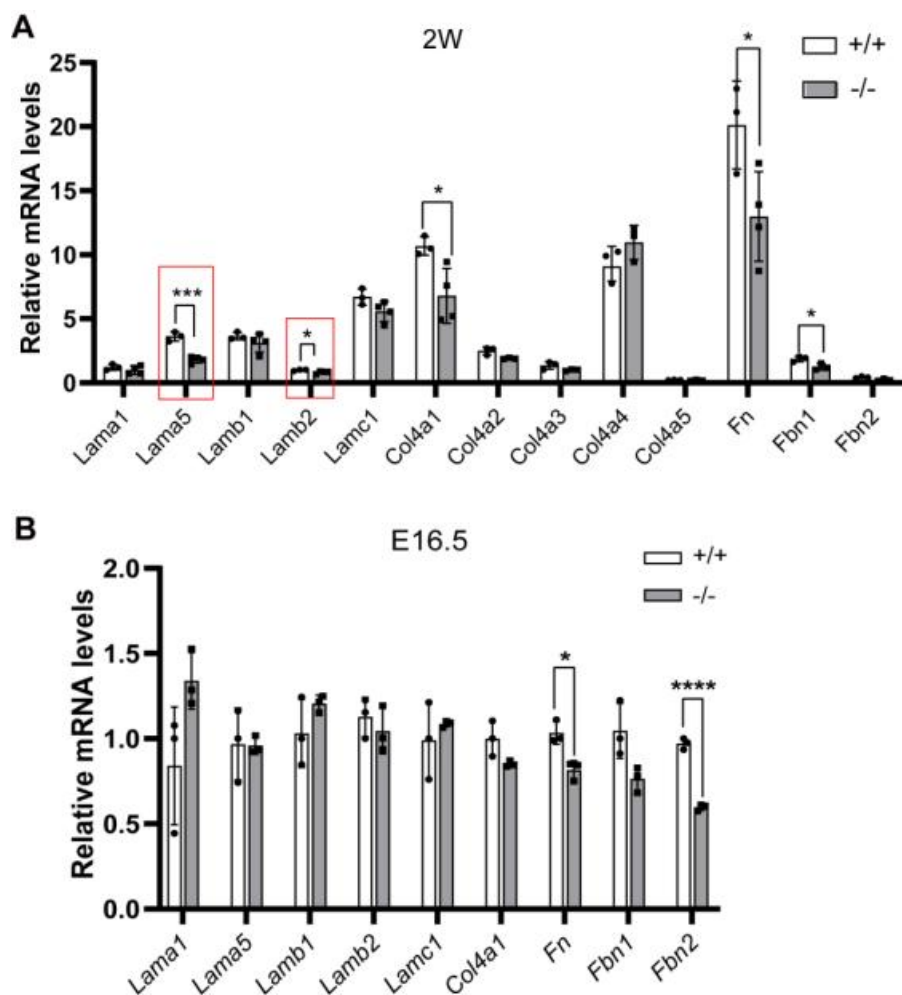


图 15: 肾小球基底膜组分在 2W(A)和 E16.5(B)小鼠(*Adamts18*^{+/+}和 *Adamts18*^{-/-})肾脏中的转录表达。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各基底膜成分 mRNA 的相对表达量, 以 *Gapdh* 为内参基因进行数据校准。数据以 Mean \pm SD (n = 3/组) 表示。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (Student t 检验)。

上述结果提示, *Adamts18* 缺失可能影响了基底膜主要成分 Laminin 亚型转化过程, 成熟型 *Lama5* 和 *Lamb2* 亚型在 *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾脏发育成熟时期(2W) 转录表达较 *Adamts18*^{+/+} 小鼠显著降低。

4.6 *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾小球 LAMA5 蛋白表达

qRT-PCR 结果显示, *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾脏中 *Lama5* 和 *Lamb2* 在转录水平的表达显著降低。*Lama5* 基因的失活被报道与 GBM 形态结构发育异常和足细胞足突消失导致蛋白尿形成相关。为了进一步探究 *Lama5* 在 *Adamts18* 缺失小鼠肾小

球中蛋白水平的表达情况，我们对 2 周龄的 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾组织进行了免疫组织化学染色，结果显示（如图 16），与 *Adamts18*^{+/+} 小鼠肾小球相比，LAMA5 蛋白阳性染色信号在 *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾小球中显著减弱。

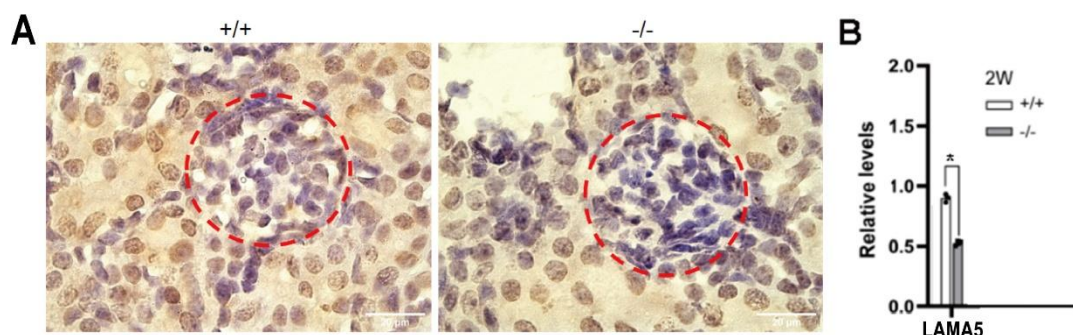


图 16: LAMA5 在 2 周龄 (*Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-}) 小鼠肾小球中的表达。(A) 代表性免疫组化染色，棕黄色部分为阳性染色，红色圆圈区域为肾小球。放大倍数为 1000 \times ，标尺为 20 μm 。(B) LAMA5 在 2 周龄 (*Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-}) 小鼠肾小球中的相对表达（阳性信号以倍率表示），样本数为 3 ($n = 3$)，每个样本观察了 10 个视野，* $p < 0.05$ (Student t 检验)。

4.7 *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾脏其它 ADAMTS 家族成员转录表达分析

新近研究发现，ADAMTS 家族的一些成员（如 ADAMTS2, 3, 4, 7, 16）亦参与早期肾脏发育^[12]。此外，ADAMTS1 和 ADAMTS13 也被报道与肾脏发育和慢性肾脏疾病发生相关^[93,96]。为了探究 *Adamts18*^{-/-} 小鼠中其它家族成员的转录表达（包括 *Adamts1, 2, 3, 4, 7, 13, 16*），我们收集了 2W 小鼠肾脏组织，进行 qRT-PCR 分析。

结果显示（图 17A），与 2 周龄 *Adamts18*^{+/+} 小鼠相比，*Adamts16* 的 mRNA 表达水平在 2 周龄 *Adamts18*^{-/-} 小鼠中显著性升高；*Adamts1, 2, 3, 4, 7, 13* 转录表达水平在 2 周龄 *Adamts18*^{+/+} 小鼠与 *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾脏组织中未见显著性差异。我们随后检测了 E16.5 天 *Adamts18*^{+/+} 小鼠与 *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾脏组织中 *Adamts16* mRNA 表达变化。结果显示（图 17B），*Adamts16* 转录表达在 E16.5 天 *Adamts18*^{+/+} 小鼠与 *Adamts18*^{-/-} 小鼠肾脏组织中未见显著性差异。

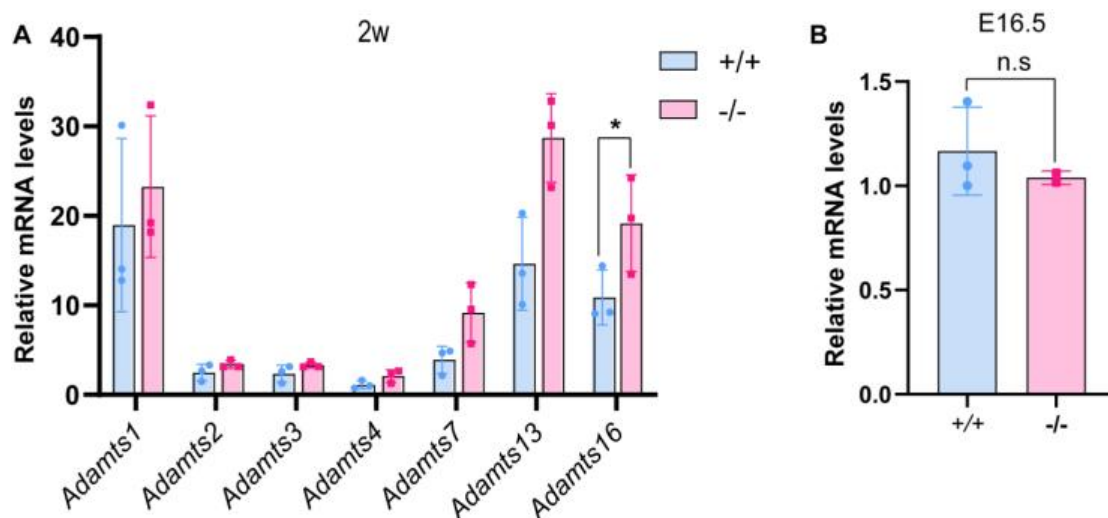


图 17: *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏其它 ADAMTS 家族成员转录表达分析。(A) 2 周龄小鼠肾 ADAMTS 家族蛋白转录表达。(B) E16.5 小鼠肾组织 *Adamts16* 转录表达。WT 小鼠样本数为 3 (n=3), KO 小鼠样本数为 2 (n=2)。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 ADAMTS 家族蛋白 mRNA 的相对表达量, 以 *Gapdh* 为内参基因进行数据校准。数据以 Mean \pm SD (n=3/组) 表示。n.s., 无显著性差异; *p < 0.05 (Student t 检验)。

4.8 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏自发性纤维化表型分析

尿蛋白进入肾小管后会刺激肾小管上皮细胞产生一些炎症因子和趋化因子, 最终导致肾小管间质甚至肾小球出现纤维化表型^[83]。*Adamts18*^{-/-}小鼠出现蛋白尿表型促使我们进一步探究 *Adamts18*^{-/-}小鼠是否会有自发性纤维化表型。我们对 9 月龄 (9M) 及 14 月龄 (14M) 小鼠肾脏进行了 Masson 染色 (蓝色胶原沉积的面积大小反映纤维化的程度), 并对小鼠肾脏进行了 Western blot 分析, 通过对 α -SMA (肌成纤维细胞标志物, 其表达的多少与肾纤维化程度呈正相关) 的半定量探究 ADAMTS18 缺失对小鼠肾脏自发性纤维化的影响。结果显示(图 18A-B), *Adamts18*^{+/+}小鼠与 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏组织中胶原沉积未见显著性差异; α -SMA 表达在 *Adamts18*^{+/+}小鼠与 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏组织中亦未发现显著性差异。

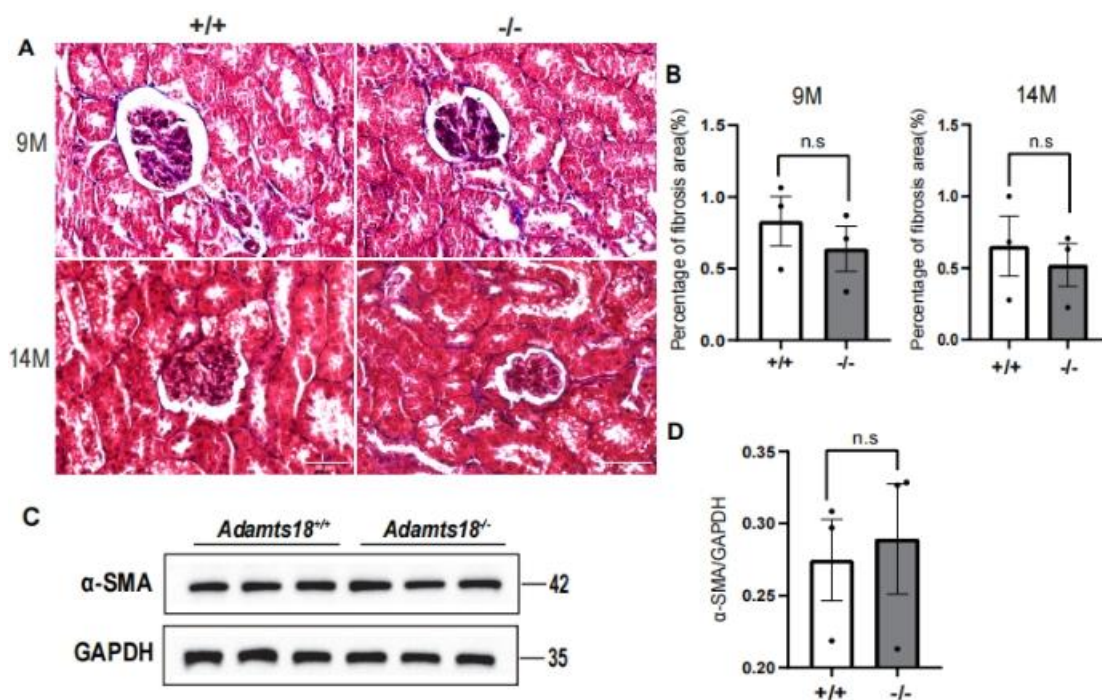


图 18: *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏自发性纤维化表型分析。(A) Masson 染色检测 9 月龄和 14 月龄 *Adamts18*^{+/+}小鼠与 *Adamts18*^{-/-}小鼠纤维化病变。蓝色表示胶原沉积程度。(B) 采用 ImageJ 软件对 Masson 染色中蓝色胶原沉积进行量化, 每只小鼠观察了 10 个视野。(C) Western Blot 检测 9 月龄 *Adamts18*^{+/+}小鼠与 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏中 α -SMA 表达。(D) ImageJ 软件对 C 图蛋白表达进行半定量分析。数据以 Mean \pm SD 表示 (n = 3/组)。n.s., 无显著性差异 (Student' t test)。

5 讨论

肾小球滤过屏障功能的完整性依赖于内皮细胞、肾小球基底膜、足细胞足突三层结构之间的交互作用。细胞外基质是基底膜的重要成分，越来越多的证据表明，基底膜缺陷是导致遗传性肾病的重要原因之一，主要表现为蛋白尿。ADAMTS18 作为一种细胞外基质金属蛋白酶，可通过切割修饰细胞外基质成分分布或含量，影响细胞间、细胞与基质间相互作用，从而调控组织器官发育和疾病^[111]。本研究通过检测 *Adamts18* 时空表达特征、*Adamts18* 基因敲除小鼠肾病综合征相关表型和组织病理改变、肾小球滤过屏障结构的发育和相关分子表达，探究 ADAMTS18 在肾小球滤过屏障发育和相关疾病中的作用。

为了阐明 ADAMTS18 在小鼠肾脏发育及稳态平衡中的潜在作用，我们检测了小鼠 *Adamts18* mRNA 在肾脏发育过程中的时空表达(图 9、10)。从 E13.5-出生后 14 天 (P14)，是肾单位形成的关键期(肾单位由肾小体和肾小管构成；而肾小体又由肾小球和肾小囊组成)。结果显示，在这个时期，*Adamts18* mRNA 在肾脏中广泛表达，主要的细胞类型包括：间质细胞祖细胞、输尿管芽顶端上皮细胞和集合管上皮细胞。在出生后 2 周，*Adamts18* mRNA 的数量急剧减少；出生 6 周后，*Adamts18* mRNA 在肾脏中几乎检测不到。这些数据表明 ADAMTS18 是一个与早期肾单位形成相关的阶段特异性基因。与我们的发现相似，Rutledge 等人^[113]也发现 *Adamts18* mRNA 在肾脏的输尿管芽尖端表达。而肾脏的发育过程是：在输尿管芽和后肾间充质细胞两者的相互诱导下，后肾间充质发生间充质-上皮转化 (MET) 形成管前聚集体，然后经过一系列的形态变化过程(肾囊泡、逗号小体、S 形体、毛细血管祥期肾小球)，最终发育分化形成具有完整肾单位的肾脏^[116]。ADAMTS18 在肾脏发育过程中的时空表达特点的结果提示 ADAMTS18 参与肾脏发育过程的调节。

蛋白尿是肾小球疾病中常见的症状表现，也是肾滤过屏障功能障碍(肾小球损伤)的指示，蛋白尿的严重程度可以反映肾小球损伤的程度^[117]。此外，蛋白尿的出现本身还会对肾小管上皮细胞产生直接性的损害作用，导致肾小管上皮细胞发生凋亡^[118]。我们在对小鼠肾功能检测中发现部分 *Adamts18* 基因敲除小鼠

出现了蛋白尿,提示 ADAMTS18 缺失可能影响肾脏的发育,导致肾脏功能缺陷。本研究中只检测了 8W 小鼠肾功能,且本研究所用小鼠为 C57B6/129Sv 杂交背景,因此只有部分小鼠呈现蛋白尿表型。我们推测,随着小鼠年龄的增大,出现表型的小鼠比率可能进一步增加。我们将在今后的研究中进一步动态评估各年龄段基因敲除小鼠肾脏表型。

肾病综合征根据组织病理特点可分为膜性肾病、微小病变型肾病、系膜增生性肾小球肾炎以及局灶性节段性肾小球硬化等多种类型,遗传性肾病综合征是指由于编码肾小球滤过屏障组成蛋白的基因或其他相关基因突变所致的一种先天性肾病综合征。过碘酸希夫染色(Periodic Acid-Schiff stain, PAS)显示基底膜、系膜基质、糖原及糖蛋白呈紫红色,细胞核呈蓝色,对于观察基底膜病变、各种细胞的增生及渗出、细胞外基质的增多等病变具有优势。过碘酸六胺银染色(Periodic acid-silver methemamine, PASM)显示毛细血管基底膜呈黑色,细胞核呈蓝色,红细胞呈红色。通过六胺银染色可以更清晰地显示基底膜病变与细胞外基质增多,便于对基底膜的链环、钉突和双轨征的观察,同时,也可以观察动脉的血管弹力膜、鲍曼囊壁和嗜银蛋白的沉积等。为了检测 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏是否有肾病综合征的病理学特征,其出现时间和发展过程,我们采用 HE 染色、PAS 染色和 PASM 染色的方法对 2W、8W、9M 和 14M 的 *Adamts18*^{-/-}小鼠和 *Adamts18*^{+/+}小鼠肾脏的组织结构进行了观察和比较。结果显示:*Adamts18*^{-/-}小鼠肾脏组织染色未呈现明显的系膜增生和局灶性肾小球硬化等病理表现,这可能与 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾病综合征相关病变较轻相关。因此,我们在下一步研究中将增加小鼠数量、对有重度蛋白尿表型的小鼠进行组织病理检测来进一步明确 *Adamts18*^{-/-}小鼠蛋白尿和肾脏病理改变之间的相关性。

肾小球滤过屏障(Glomerular filtration barrier, GFB)缺陷是导致蛋白尿的最主要的原因之一。*Adamts18*在肾脏发育过程中的时空表达特点的结果提示 ADAMTS18 可能通过修饰 ECM 影响肾小球滤过屏障的结构。为此,我们通过透射电镜(TEM)对 2W 小鼠的 GFB 结构进行了观察,结果显示 *Adamts18*^{-/-}小鼠的 GFB 出现了包括内皮细胞空泡化和脱落、肾小球基底膜(GBM)变薄以及

足细胞足突消失、足突微绒毛化、内皮细胞和足细胞位置关系紊乱等多种结构异常。这些 GFB 结构异常在多数由于 GFB 组成蛋白的编码基因或其他相关基因突变致的遗传性肾病小鼠模型中也被观察到,提示 ADAMTS18 可能通过影响 GFB 组成蛋白或其相关成分而与调控 GFB 发育和功能。

肾小球滤过屏障(GFB)结构由内层的内皮细胞、中间层的肾小球基底膜和外层的足细胞三部分组成。在 GFB 的三层结构中,肾小球基底膜是由内皮细胞和足细胞产生的细胞外基质(ECM)成分,对 GFB 结构发育和肾脏滤过功能至关重要^[49]。肾小球基底膜的主要成分包括 Laminins、Collagen IV、Nidogens(巢蛋白)和硫酸乙酰肝素蛋白多糖(包括 Agrin、Perlecan 和 Collagen XVIII 等),其中 Laminin 和 Collagen IV 构成的基本网络是 GBM 的主要部分^[19]。另外,在 GBM 发育的过程中会发生基底膜组分的亚型转换,例如对于 Laminin 来说,从肾脏发育早期的 Laminin 111 到发育过程中的 Laminin 511 最后到发育成熟阶段的 Laminin 521,在这个过程中,发生的是 Laminin $\alpha 1$ 向 Laminin $\alpha 5$ 、Laminin $\beta 1$ 向 Laminin $\beta 2$ 的亚型转化。同样, Collagen IV 在 GBM 发育的过程中也存在相应的亚型转换,从发育早期的 Collagen IV $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ 逐渐发育转化为 Collagen IV $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ 网络。课题组前期的研究也表明, ADAMTS18 作为一种细胞外基质金属蛋白酶可通过影响细胞外基质成分(如 Laminin、Fibronectin、Fibrillin、Collagen 等)的分布或含量,影响细胞间、细胞与基质间相互作用,影响细胞骨架和相关信号通路,从而影响组织器官发育和疾病(如内脏脂肪发育、树突形成、泪腺发育、血管发育等)。为此,我们检测了肾小球基底膜(GBM)主要成分特别是涉及 GBM 亚型转化的成分的表达,以探究 *Adamts18* 缺失基因敲除导致 GFB 结构异常的分子机制。

qRT-PCR 结果显示,在肾脏发育成熟(2W)时期, *Lama5* 和 *Lamb2* 的 mRNA 在 *Adamts18*^{-/-}小鼠表达比 *Adamts18*^{+/+}小鼠显著性降低,而在肾脏发育早期(E16.5)阶段,这两个基因的表达在 *Adamts18*^{+/+}小鼠和 *Adamts18*^{-/-}小鼠中没有显著性差别。*Lama5* 免疫组织化学结果显示,与 *Adamts18*^{+/+}小鼠相比, Laminin $\alpha 5$ 蛋白表达水平在 2W 的 *Adamts18*^{-/-}小鼠肾小球基底膜中的表达明显降低。*Lama5* 和 *Lamb2*

是主要在肾脏发育成熟时期表达的基因且其编码蛋白涉及 Laminin 亚型转化, 我们的结果提示 *Adamts18* 基因敲除可能影响了 Laminin 亚型转化过程, 使早期型 Laminin 亚基在肾脏发育至成熟的过程中不能成功的转化为成熟型的 Laminin α 5、Laminin β 2 亚型, 从而影响 GFB 结构发育。关于这一结论还需进一步采用跟多 Laminin 亚型抗体组合检测 *Adamts18*^{-/-}小鼠 GBM 中 Laminin 亚型的组成来确证。而关于 ADAMTS18 是通过怎样的机制影响 Laminin 亚型的表达, 也需要进一步研究。

Laminin α 5、Laminin β 2 是肾小球基底膜的重要成分, 且 *Lama5* 和 *Lamb2* 基因均已被证明是单基因遗传的遗传性肾病的致病基因^[119-121]。由 *Lama5* 基因编码的层粘连蛋白 α 5 (Laminin α 5) 是成熟肾小球基底膜中主要的 α 链。对 Alport 综合征或蛋白尿患者靶向基因测序表明 LAMA5 基因突变与成人发作的局灶节段性肾小球硬化 (FSGS) 之间的联系^[122]。Miner 等人的研究发现, *Lama5* 基因敲除小鼠在肾小球发生的毛细血管环阶段由于在 GBM 中 Laminin α 5 取代 Laminin α 1 的亚型转换失败, 导致在缺乏正常的 GBM, 肾小球上皮细胞 (足细胞) 紊乱, 内皮细胞和系膜细胞从收缩的肾小球中挤出, 导致完全无血管化肾小球^[123]。我们在透射电镜下观察到 2W 的 *Adamts18* 基因敲除小鼠肾小球中足细胞与内皮细胞位置关系紊乱的现象与此相似, 即 *Adamts18* 基因敲除小鼠足细胞内陷, 被肾小球毛细血管网环绕, 而野生型小鼠足细胞规则排列于肾小球毛细血管外周 (图 11)。*Lamb2* 编码层粘连蛋白 β 2 (Laminin β 2), 其突变导致 Pierson 综合征 (先天性肾病综合征-小角膜综合征)。Jarad.G 等人的研究发现, *Lamb2* 敲除小鼠足细胞足突消失、其 GBM 更容易被大分子铁蛋白穿透^[48]。这些表明肾小球基底膜组分基因 *Lama5* 和 *Lamb2* 对肾脏滤过屏障至关重要, 它们的基因敲除会导致 GBM 和足细胞的形态结构发生改变, 且会引发蛋白尿的产生。

Morais 等人^[12]的研究发现, 肾脏 ECM 组分中除了有 *Adamts18* 外, 还有 *Adamts2*、*3*、*4*、*7*、*16* 的表达, 此外, ADAMTS1 和 ADAMTS13 也曾被报道与肾脏结构发育和慢性肾脏疾病有关, 为了探究 *Adamts18* 基因敲除是否会对 ADAMTS18 家族的这些成员的表达有影响, 我们对 2W 小鼠的肾脏进行

qRT-PCR 实验,以检测 WT 和 KO 小鼠中 *Adamts1*、*2*、*3*、*4*、*7*、*13*、*16* 的 mRNA 表达水平。结果发现, *Adamts18* 基因敲除使得 *Adamts16* 在 2W 时的 KO 小鼠中显著性升高,但不影响其他 ADAMTSs 家族分子的表达,并且 *Adamts16* 在 E16.5 这个时间段的表达水平在 WT 和 KO 小鼠中没有显著性差异。ADAMTS16 是 ADAMTS 家族成员中与 ADAMTS18 亲缘关系最近的一个成员,它们都属于“孤儿”金属蛋白酶一类,并且 ADAMTS16 和 ADAMTS18 的氨基酸序列同源性的为 57%,特别是在催化结构域其同源性高达 85%^[101]。由于 ADAMTS16 和 ADAMTS18 在结构和功能上的相似性,我们推断, *Adamts16* 在 2W 时表达升高可能是对 KO 小鼠因 *Adamts18* 基因敲除导致 *Lama5* 和 *Lamb2* 表达降低进行的一个补偿。

由于蛋白尿进入到肾小管中会刺激肾小管上皮细胞,导致许多炎症和纤维化介质的表达和补体激活,使得肾小管间质炎性细胞浸润和持续纤维化,最终加速肾脏疾病进展至终末期肾功能衰竭^[124]。为了探究我们的 *Adamts18* 基因敲除小鼠中出现的蛋白尿是否进一步导致肾小管间质损伤而发生纤维化,我们进行了 Masson 染色和 Western blot 双重实验进行探究。结果表明出现蛋白尿的 *Adamts18*^{-/-} 小鼠蓝色胶原沉积较少、与 *Adamts18*^{+/+} 小鼠没有显著性差异且肌成纤维细胞的标志物 α -SMA (其表达程度与纤维化呈正相关) 的表达在 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠中没有显著性差异,这两个实验平行说明了 *Adamts18*^{-/-} 小鼠中蛋白尿的出现并未导致进一步的纤维化病变。

本文首次发现 ADAMTS18 可影响肾小球滤过屏障结构发育和功能,并且初步揭示 *Adamts18* 基因可能通过影响肾小球基底膜中 Laminin α 5、Laminin β 2 的表达而影响 Laminin 亚型转化而导致肾小球滤过屏障结构异常。关于细胞外基质金属蛋白酶类的编码基因 MMPs, ADAMs, ADAMTSs 的突变与遗传性肾病(肾病综合征)的相关性的研究很少。本文首次提供了编码基质金属蛋白酶的 ADAMTS18 基因可能为遗传性肾病的一个新的致病基因的实验证据,为寻找鉴定遗传性肾病致病基因拓展了视角,为揭示该病新的致病机制提供了线索。

6 结论

1. 金属蛋白酶 ADAMTS18 在输尿管芽尖端的表达可能通过作用于后肾间充质来影响后肾肾单位（肾小球滤过屏障）的发育。
2. 金属蛋白酶 ADAMTS18 可影响肾小球滤过屏障结构发育, 导致 ADAMTS18 缺失小鼠因肾小球滤过屏障结构发育异常出现蛋白尿表型。
3. 本研究初步揭示了金属蛋白酶 ADAMTS18 通过调控 LAMA5 等细胞外基质重塑影响肾小球滤过屏障发育和蛋白尿形成。

参考文献

- [1] Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(1): 53-67.
- [2] Khoshdel Rad N, Aghdami N, Moghadasali R. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Development: From the Embryo to the Kidney Organoid[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 183.
- [3] 陈文清. 胚胎后肾间充质干细胞分化为上皮细胞的关键因子和 Notch 信号通路的初步研究[D]. 浙江大学, 2012.
- [4] Little M H. Returning to kidney development to deliver synthetic kidneys[J]. *Dev Biol*, 2021, 474: 22-36.
- [5] 季佳瑶. Robo2 调控小鼠肾脏和输尿管发育的研究[D]. 南开大学, 2012.
- [6] Sainio K, Suvanto P, Davies J, et al. Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium[J]. *Development*, 1997, 124(20): 4077-4087.
- [7] McMahon A P: Chapter Three - Development of the Mammalian Kidney, Wassarman P M, editor, *Current Topics in Developmental Biology*: Academic Press, 2016: 31-64.
- [8] Hartman H A, Lai H L, Patterson L T. Cessation of renal morphogenesis in mice[J]. *Dev Biol*, 2007, 310(2): 379-387.
- [9] Cebrián C, Borodo K, Charles N, et al. Morphometric index of the developing murine kidney[J]. *Dev Dyn*, 2004, 231(3): 601-608.
- [10] Short K M, Combes A N, Lefevre J, et al. Global quantification of tissue dynamics in the developing mouse kidney[J]. *Dev Cell*, 2014, 29(2): 188-202.
- [11] Saxén L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney[J]. *Pediatr Nephrol*, 1987, 1(3): 385-392.
- [12] Morais M, Tian P, Lawless C, et al. Kidney organoids recapitulate human

- basement membrane assembly in health and disease[J]. *Elife*, 2022, 11.
- [13] Oxburgh L. Kidney Nephron Determination[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2018, 34: 427-450.
- [14] Li H, Hohenstein P, Kuure S. Embryonic Kidney Development, Stem Cells and the Origin of Wilms Tumor[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(2).
- [15] Schell C, Wanner N, Huber T B. Glomerular development--shaping the multi-cellular filtration unit[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 39-49.
- [16] Michos O. Kidney development: from ureteric bud formation to branching morphogenesis[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(5): 484-490.
- [17] Eskild-Jensen A, Frøkiaer J, Djurhuus J C, et al. Reduced number of glomeruli in kidneys with neonatally induced partial ureteropelvic obstruction in pigs[J]. *J Urol*, 2002, 167(3): 1435-1439.
- [18] Nagalakshmi V K, Yu J. The ureteric bud epithelium: morphogenesis and roles in metanephric kidney patterning[J]. *Mol Reprod Dev*, 2015, 82(3): 151-166.
- [19] Scott R P, Quaggin S E. Review series: The cell biology of renal filtration[J]. *J Cell Biol*, 2015, 209(2): 199-210.
- [20] Farquhar M G. Editorial: The primary glomerular filtration barrier--basement membrane or epithelial slits?[J]. *Kidney Int*, 1975, 8(4): 197-211.
- [21] Butt L, Unnersjö-Jess D, Höhne M, et al. A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease[J]. *Nat Metab*, 2020, 2(5): 461-474.
- [22] Haraldsson B, Nyström J, Deen W M. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(2): 451-487.
- [23] Levick J R, Smaje L H. An analysis of the permeability of a fenestra[J]. *Microvasc Res*, 1987, 33(2): 233-256.
- [24] Russo L M, Sandoval R M, Mckee M, et al. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states[J]. *Kidney Int*, 2007, 71(6): 504-513.

- [25] Rostgaard J, Qvortrup K. Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries--site of the filtration barrier?[J]. *Cells Tissues Organs*, 2002, 170(2-3): 132-138.
- [26] Curry F E, Adamson R H. Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor[J]. *Ann Biomed Eng*, 2012, 40(4): 828-839.
- [27] Weinbaum S, Tarbell J M, Damiano E R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007, 9: 121-167.
- [28] Hjalmarsson C, Johansson B R, Haraldsson B. Electron microscopic evaluation of the endothelial surface layer of glomerular capillaries[J]. *Microvasc Res*, 2004, 67(1): 9-17.
- [29] Gelberg H, Healy L, Whiteley H, et al. In vivo enzymatic removal of alpha 2-->6-linked sialic acid from the glomerular filtration barrier results in podocyte charge alteration and glomerular injury[J]. *Lab Invest*, 1996, 74(5): 907-920.
- [30] Jeansson M, Haraldsson B. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(1): F111-116.
- [31] Satchell S C, Braet F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(5): F947-956.
- [32] Miner J H. The glomerular basement membrane[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(9): 973-978.
- [33] Kubosawa H, Kondo Y. Ultrastructural organization of the glomerular basement membrane as revealed by a deep-etch replica method[J]. *Cell Tissue Res*, 1985, 242(1): 33-39.
- [34] Hironaka K, Makino H, Yamasaki Y, et al. Pores in the glomerular basement membrane revealed by ultrahigh-resolution scanning electron microscopy[J]. *Nephron*, 1993, 64(4): 647-649.
- [35] Ninomiya T, Perkovic V, De Galan B E, et al. Albuminuria and kidney function

independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(8): 1813-1821.

[36] Mundel P, Shankland S J. Podocyte biology and response to injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(12): 3005-3015.

[37] Gerke P, Sellin L, Kretz O, et al. NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(6): 1693-1702.

[38] Lennon R, Randles M J, Humphries M J. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5: 160.

[39] Perico L, Conti S, Benigni A, et al. Podocyte-actin dynamics in health and disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(11): 692-710.

[40] Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(1): 253-307.

[41] Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(13): 1387-1401.

[42] Rodewald R, Karnovsky M J. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse[J]. *J Cell Biol*, 1974, 60(2): 423-433.

[43] Mänttari M, Tiula E, Alikoski T, et al. Effects of hypertension and dyslipidemia on the decline in renal function[J]. *Hypertension*, 1995, 26(4): 670-675.

[44] Zenker M, Aigner T, Wendler O, et al. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities[J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(21): 2625-2632.

[45] Barker D F, Hostikka S L, Zhou J, et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome[J]. *Science*, 1990, 248(4960): 1224-1227.

[46] Kashtan C E. Alport Syndrome: Achieving Early Diagnosis and Treatment[J]. *Am J Kidney Dis*, 2021, 77(2): 272-279.

[47] Matejas V, Hinkes B, Alkandari F, et al. Mutations in the human laminin beta2

(LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum[J]. *Hum Mutat*, 2010, 31(9): 992-1002.

[48] Jarad G, Cunningham J, Shaw A S, et al. Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*^{-/-} mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8): 2272-2279.

[49] Naylor R W, Morais M, Lennon R. Complexities of the glomerular basement membrane[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(2): 112-127.

[50] Timpl R. Recent advances in the biochemistry of glomerular basement membrane[J]. *Kidney Int*, 1986, 30(3): 293-298.

[51] Müller-Deile J, Dannenberg J, Schroder P, et al. Podocytes regulate the glomerular basement membrane protein nephronection by means of miR-378a-3p in glomerular diseases[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(4): 836-849.

[52] Zimmerman S E, Hiremath C, Tsunozumi J, et al. Nephronection Regulates Mesangial Cell Adhesion and Behavior in Glomeruli[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(4): 1128-1140.

[53] Lennon R, Byron A, Humphries J D, et al. Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(5): 939-951.

[54] Randles M J, Humphries M J, Lennon R. Proteomic definitions of basement membrane composition in health and disease[J]. *Matrix Biol*, 2017, 57-58: 12-28.

[55] Miner J H. Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier[J]. *Pediatr Nephrol*, 2011, 26(9): 1413-1417.

[56] Suh J H, Miner J H. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2013, 9(8): 470-477.

[57] Abrahamson D R. Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane[J]. *Am J Physiol*, 1987, 253(5 Pt 2): F783-794.

[58] Miner J H, Yurchenco P D. Laminin functions in tissue morphogenesis[J]. *Annu*

Rev Cell Dev Biol, 2004, 20: 255-284.

[59] Timpl R, Brown J C. The laminins[J]. Matrix Biol, 1994, 14(4): 275-281.

[60] Colognato H, Yurchenco P D. Form and function: the laminin family of heterotrimers[J]. Dev Dyn, 2000, 218(2): 213-234.

[61] Arif E, Nihalani D. Glomerular Filtration Barrier Assembly: An insight[J]. Postdoc J, 2013, 1(4): 33-45.

[62] Aumailley M, Wiedemann H, Mann K, et al. Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV[J]. Eur J Biochem, 1989, 184(1): 241-248.

[63] Fox J W, Mayer U, Nischt R, et al. Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV[J]. Embo j, 1991, 10(11): 3137-3146.

[64] Goldberg S, Harvey S J, Cunningham J, et al. Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(7): 2044-2051.

[65] Harvey S J, Jarad G, Cunningham J, et al. Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity[J]. Am J Pathol, 2007, 171(1): 139-152.

[66] Durbeej M. Laminins[J]. Cell Tissue Res, 2010, 339(1): 259-268.

[67] Miner J H, Patton B L, Lentz S I, et al. The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform[J]. J Cell Biol, 1997, 137(3): 685-701.

[68] Sorokin L M, Pausch F, Durbeej M, et al. Differential expression of five laminin alpha (1-5) chains in developing and adult mouse kidney[J]. Dev Dyn, 1997, 210(4): 446-462.

[69] Miner J H, Lewis R M, Sanes J R. Molecular cloning of a novel laminin chain,

alpha 5, and widespread expression in adult mouse tissues[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(48): 28523-28526.

[70] Miner J H, Li C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane[J]. *Dev Biol*, 2000, 217(2): 278-289.

[71] Miner J H, Sanes J R. Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches[J]. *J Cell Biol*, 1994, 127(3): 879-891.

[72] Miner J H. Developmental biology of glomerular basement membrane components[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1998, 7(1): 13-19.

[73] Hudson B G, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, et al. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(25): 2543-2556.

[74] Hudson B G. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(10): 2514-2527.

[75] Bertram J F, Douglas-Denton R N, Diouf B, et al. Human nephron number: implications for health and disease[J]. *Pediatr Nephrol*, 2011, 26(9): 1529-1533.

[76] Gorriz J L, Martinez-Castelao A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression[J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2012, 26(1): 3-13.

[77] Coresh J, Stevens L A, Levey A S. Chronic kidney disease is common: what do we do next?[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(4): 1122-1125.

[78] 邹万忠. 我国肾脏病理学的现状和未来[J]. *中华病理学杂志*, 2005(08): 496-499.

[79] Mekahli D, Liutkus A, Ranchin B, et al. Long-term outcome of idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome: a multicenter study[J]. *Pediatr Nephrol*, 2009, 24(8): 1525-1532.

- [80] Soliman N A. Orphan kidney diseases[J]. *Nephron Clin Pract*, 2012, 120(4): c194-199.
- [81] Ong A C, Devuyst O, Knebelmann B, et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the changing face of clinical management[J]. *Lancet*, 2015, 385(9981): 1993-2002.
- [82] Joshi S, Andersen R, Jespersen B, et al. Genetics of steroid-resistant nephrotic syndrome: a review of mutation spectrum and suggested approach for genetic testing[J]. *Acta Paediatr*, 2013, 102(9): 844-856.
- [83] Birn H, Christensen E I. Renal albumin absorption in physiology and pathology[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(3): 440-449.
- [84] Nielsen R, Christensen E I. Proteinuria and events beyond the slit[J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25(5): 813-822.
- [85] Porter S, Clark I M, Kevorkian L, et al. The ADAMTS metalloproteinases[J]. *Biochem J*, 2005, 386(Pt 1): 15-27.
- [86] Apte S S. ADAMTS Proteins: Concepts, Challenges, and Prospects[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2043: 1-12.
- [87] Apte S S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(46): 31493-31497.
- [88] Kelwick R, Desanlis I, Wheeler G N, et al. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family[J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 113.
- [89] Schnellmann R, Sack R, Hess D, et al. A Selective Extracellular Matrix Proteomics Approach Identifies Fibronectin Proteolysis by A Disintegrin-like and Metalloprotease Domain with Thrombospondin Type 1 Motifs (ADAMTS16) and Its Impact on Spheroid Morphogenesis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17(7): 1410-1425.
- [90] Paulissen G, Rocks N, Gueders M M, et al. Role of ADAM and ADAMTS

- metalloproteinases in airway diseases[J]. *Respir Res*, 2009, 10(1): 127.
- [91] Dubail J, Apte S S. Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics[J]. *Matrix Biology*, 2015, 44-46: 24-37.
- [92] Mead T J, Apte S S. ADAMTS proteins in human disorders[J]. *Matrix Biology*, 2018, 71-72: 225-239.
- [93] Shindo T, Kurihara H, Kuno K, et al. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(10): 1345-1352.
- [94] Mittaz L, Ricardo S, Martinez G, et al. Neonatal calyceal dilation and renal fibrosis resulting from loss of Adamts-1 in mouse kidney is due to a developmental dysgenesis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(2): 419-423.
- [95] Gao Y X, Yu C A, Lu J H, et al. ADAMTS-7 expression increases in the early stage of angiotensin II-induced renal injury in elderly mice[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2013, 38(1): 121-131.
- [96] Bramham K, Hilton R, Horsfield C, et al. ADAMTS-13 deficiency: can it cause chronic renal failure?[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(2): 742-744.
- [97] Cal S, Obaya A J, Llamazares M, et al. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains[J]. *Gene*, 2002, 283(1-2): 49-62.
- [98] Jin H, Wang X, Ying J, et al. Epigenetic identification of ADAMTS18 as a novel 16q23.1 tumor suppressor frequently silenced in esophageal, nasopharyngeal and multiple other carcinomas[J]. *Oncogene*, 2007, 26(53): 7490-7498.
- [99] Wang J, Zhang W, Yi Z, et al. Identification of a thrombin cleavage site and a short form of ADAMTS-18[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(4): 692-697.
- [100] Rose K W J, Taye N, Karoulias S Z, et al. Regulation of ADAMTS Proteases[J].

Front Mol Biosci, 2021, 8: 701959.

[101] Wei J, Liu C J, Li Z. ADAMTS-18: a metalloproteinase with multiple functions[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2014, 19(8): 1456-1467.

[102] Peluso I, Conte I, Testa F, et al. The ADAMTS18 gene is responsible for autosomal recessive early onset severe retinal dystrophy[J]. Orphanet J Rare Dis, 2013, 8: 16.

[103] Xiong D H, Liu X G, Guo Y F, et al. Genome-wide association and follow-up replication studies identified ADAMTS18 and TGFBR3 as bone mass candidate genes in different ethnic groups[J]. Am J Hum Genet, 2009, 84(3): 388-398.

[104] Ataca D, Caikovski M, Piersigilli A, et al. Adamts18 deletion results in distinct developmental defects and provides a model for congenital disorders of lens, lung, and female reproductive tract development[J]. Biol Open, 2016, 5(11): 1585-1594.

[105] Ye S, Yang N, Lu T, et al. Adamts18 modulates the development of the aortic arch and common carotid artery[J]. iScience, 2021, 24(6): 102672.

[106] Lin X, Wang C, Zhang Q, et al. ADAMTS18 regulates vaginal opening through influencing the fusion of Mullerian duct and apoptosis of vaginal epithelial cells in mice[J]. Reprod Biol, 2021, 21(3): 100537.

[107] Zhu R, Pan Y H, Sun L, et al. ADAMTS18 Deficiency Affects Neuronal Morphogenesis and Reduces the Levels of Depression-like Behaviors in Mice[J]. Neuroscience, 2019, 399: 53-64.

[108] Rutledge E A, Benazet J D, McMahon A P. Cellular heterogeneity in the ureteric progenitor niche and distinct profiles of branching morphogenesis in organ development[J]. Development, 2017, 144(17): 3177-3188.

[109] Lu T, Dang S, Zhu R, et al. Adamts18 deficiency promotes colon carcinogenesis by enhancing β -catenin and p38MAPK/ERK1/2 signaling in the mouse model of AOM/DSS-induced colitis-associated colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(12): 18979-18990.

- [110] Yang N, Zhang Q, Ye S, et al. Adamts18 Deficiency Causes Spontaneous SMG Fibrogenesis in Adult Mice[J]. *J Dent Res*, 2022, 101(2): 226-234.
- [111] Ataca D, Aouad P, Constantin C, et al. The secreted protease Adamts18 links hormone action to activation of the mammary stem cell niche[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1571.
- [112] Wang L, Sun M, Zhang Q, et al. ADAMTS18 regulates early branching morphogenesis of lacrimal gland and has a significant association with the risk of dry eye in mice[J]. *Exp Eye Res*, 2022, 218: 109020.
- [113] Rutledge E A, Parvez R K, Short K M, et al. Morphogenesis of the kidney and lung requires branch-tip directed activity of the Adamts18 metalloprotease[J]. *Dev Biol*, 2019, 454(2): 156-169.
- [114] Jacobi C L, Rudigier L J, Scholz H, et al. Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(26): 18811-18824.
- [115] Koziolok M, Mueller G A, Dihazi G H, et al. Urine E-cadherin: A Marker for Early Detection of Kidney Injury in Diabetic Patients[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(3).
- [116] Bertram J F, Young R J, Spencer K, et al. Quantitative analysis of the developing rat kidney: absolute and relative volumes and growth curves[J]. *Anat Rec*, 2000, 258(2): 128-135.
- [117] Charles C, Ferris A H. Chronic Kidney Disease[J]. *Prim Care*, 2020, 47(4): 585-595.
- [118] 丁丽红. 蛋白尿引起肾小管间质损伤新机制[D]. 东南大学, 2015.
- [119] Funk S D, Lin M H, Miner J H. Alport syndrome and Pierson syndrome: Diseases of the glomerular basement membrane[J]. *Matrix Biol*, 2018, 71-72: 250-261.
- [120] Chen Y M, Kikkawa Y, Miner J H. A missense LAMB2 mutation causes congenital nephrotic syndrome by impairing laminin secretion[J]. *J Am Soc Nephrol*,

2011, 22(5): 849-858.

[121] Falcone S, Nicol T, Blease A, et al. A novel model of nephrotic syndrome results from a point mutation in Lama5 and is modified by genetic background[J]. *Kidney Int*, 2022, 101(3): 527-540.

[122] Kaimori J Y, Kikkawa Y, Motooka D, et al. A heterozygous LAMA5 variant may contribute to slowly progressive, vinculin-enhanced familial FSGS and pulmonary defects[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(23).

[123] Miner J H. Building the glomerulus: a matricentric view[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(4): 857-861.

[124] Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage?[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(11): 2974-2984.

附录

附表 1. qRT-PCR 引物

Genes	Primers
<i>Gapdh</i>	Forward:5'GTGGAGTCATACTGGAACATGTAG3' Reverse:5' AATGGTGAAGGTCGGTGTG 3'
<i>Adamts18</i>	Forward:5' CCTCAAGTTGTCTGCTCCATCA 3' Reverse:5' GCTGAAGAAATCCACGCAAGA 3'
<i>Lama1</i>	Forward:5' GCTATCCTGCCACATCAAAC 3' Reverse:5' CAAGGACTGCACTTGTGAGC 3'
<i>Lama5</i>	Forward:5' TTGGAGAATGGCGAGATTGTG 3' Reverse:5' CGAAGTAACGGTGAGTAGGAGA 3'
<i>Lamb1</i>	Forward:5' TCTGTGAACCATGTACCTGTGA 3' Reverse:5' GACACTGACCAGCAATGAGAC 3'
<i>Lamb2</i>	Forward:5' ACCCACACGGTTCGGGATG 3' Reverse:5' ACAGCCAGGTACATCCAAGG 3'
<i>Lamc1</i>	Forward:5' TGCCGCCAATGTGTCAATC 3' Reverse:5' TGCCACTCGTACAATGTCATC 3'
<i>Col4a1</i>	Forward:5' AAGAGAAGACAGGACCAATGAA 3' Reverse:5' TTCTGTCCAACCTCACCTGTCAA 3'
<i>Col4a2</i>	Forward:5' GACCGAGTGCGGTTCAAAG 3' Reverse:5' CGCAGGGCACATCCAACCTT 3'
<i>Col4a3</i>	Forward:5' CAAAGGCATCAGGGGAATAACT 3' Reverse:5' ATCCGTTGCATCCTGGTAAAC 3'
<i>Col4a4</i>	Forward:5' CGGGCTAACAGCATTACTGC 3' Reverse:5' CCAGAAAGGGGGACTGGAGT 3'
<i>Col4a5</i>	Forward:5' GTCCACCAGGTACAGAAGGTC 3' Reverse:5' CTCCTTTCAAACCAGGTAAGCC 3'
<i>Fn</i>	Forward:5' AAGAGAAGACAGGACCAATGAA 3' Forward:5' TTGAGAGCATAGACACTGACTT 3'
<i>Fbn1</i>	Forward:5' GCCAGAAAGGGTACATCGG 3' Reverse:5' ACACACCTCCCTCCGTT 3'
<i>Fbn2</i>	Forward:5' GTGAAACCACACAGAAATGTGAA 3' Reverse:5' GAACAGTCGCCAGTCTCAC 3'

<i>Adamts1</i>	Forward:5' GGGAAAGCCATCAGGACCAGGA 3' Reverse:5' TTAGACCGCTGCCGTGGAAGT 3'
<i>Adamts2</i>	Forward:5' TCTACCACAGGGAGTCGGACCT 3' Reverse:5' CGCCGCATTGTCTTGTTTCAGC 3'
<i>Adamts3</i>	Forward:5' TCTACCACAGGGAGTCGGACCT 3' Reverse:5' CGCCGCATTGTCTTGTTTCAGC 3'
<i>Adamts4</i>	Forward:5' TCGCTTCCGCTCCTGCAACA 3' Reverse:5' TGAAGAGGTCGGTTCGGTGGTT 3'
<i>Adamts7</i>	Forward:5' TCACCAGGTTTCCTTGACCGTG 3' Reverse:5' CCAGCTTGGAGTGACAGGTGGT 3'
<i>Adamts13</i>	Forward:5' GAGCCAGACGATCAACCCC 3' Reverse:5' TCCTCAGTGATAAGGCAACTCC 3'
<i>Adamts16</i>	Forward:5' GCAACCCCAAGACACGACCT 3' Reverse:5' ACACGCTCCAGTTTCCCACA 3'