文章编号:1000-5404(2008)13-1239-03

论著

骨形态发生蛋白-7 诱导人肾成纤维细胞间质-上皮转化的研究

黄云剑,王梓华,赵景宏,张静波 (第三军医大学新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨骨形态发生蛋白-7(bone morphogenic protein-7, BMP-7)能否诱导人肾成纤维细胞出现间质-上皮的转化。方法 原代培养获得人肾间质成纤维细胞,传至第 3 代用于本实验。培养液中添加 1 000 ng/L BMP-7 72 h 后,观察细胞形态变化,MTT 法检测细胞增殖,ELISA 法测定上清Ⅰ胶原含量,Western blot 分析 E-cadherin 和 Pax2 蛋白表达。结果 细胞与 BMP-7 孵育 72 h 后,出现细胞聚集类似小管细胞团块。与对照组相比,成纤维细胞增殖活性减低,Ⅰ型胶原分泌下降,上皮标志物 E-cadherin 和肾发生的标志分子 Pax2 表达增加。结论 肾成纤维细胞至少保持部分它胚胎时的印迹和可塑性,BMP-7 可诱导人肾成纤维细胞呈现间质-上皮的转化。

关键词:BMP-7;肾成纤维细胞;间质-上皮细胞的转化
中图法分类号:R322.61;R329-33;R329.24 文献标识码:A

Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts

HUANG Yun-jian, WANG Zhi-hua, ZHAO Jing-hong, ZHANG Jing-bo (Renal Disease Research Center, Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore whether bone morphogenic protein-7 can induce mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts. Methods Human renal fibroblasts isolated from the resected kidney tissues owing to renal tumors were primarily cultured. The passage 3 renal fibroblasts were used in this experiment. The morphologic changes of the renal fibroblasts were observed by phase contrast microscopy after being subjected to DMEM-F12 control medium or medium containing 1 000 ng/ml rhBMP-7 for 72 h. The cell proliferation was measured by MTT. The levels of type I collagen secretion in supernatant was determined by ELISA. E-cadherin and Pax2 protein expressions were detected by Western blot. Results Incubation of adult renal fibroblasts with 1 000 ng/ml rhBMP-7 induced the formation of epithelial cell aggregates within the confluent cell monolayer. The proliferation of the renal fibroblasts and the type I collagen expressions were decreased while E-cadherin and Pax2 expressions were increased, as compared with the untreated fibroblasts. Conclusion Adult renal fibroblasts have retained at least part of their embryonic epithelial imprint and plasticity. BMP-7 can induce renal fibroblast to epithelial cell.

Key words: BMP-7; renal fibroblast; mesenchymal to epithelial transition

肾间质细胞和上皮细胞之间存在相互的转化现象。在肾发生早期,通过间质-上皮细胞的转化(mesenchymal to epithelial transition, MET)后,肾间质可转化为肾小管细胞,参与肾单位的形成;而在成体肾疾病状态下,上皮细胞可通过上皮-间质细胞转化(epithelial to mesenchymal transitions, EMT),增加纤维细胞的数量,参与肾纤维化的形成[1]。最近研究表明,骨形态发生蛋白-7(bone morphogenic protein-7, BMP-7)在肾发生早期促进 MET,在成体肾疾病条件下抑制 EMT,表明 BMP-7 对维持肾小管正常转化,保持其结构和功能完整有着重要的作用[2]。在成体肾疾病状态下,BMP-7 是否仍然具有促进 MET 的作用,存在 BMP-7 在肾发生早期的功能呢?假如这样现象存在,那么我们将找到一个能有效促进 MET、恢复肾小管正常分化的药物。因此,本研究旨在了解 BMP-7 是否能诱导体外培养人肾间质成纤维细胞出现间质-上皮细胞的转化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

BMP-7(美国 R&D 公司)、DMEM-F12 培养液(Gibco 公

基金项目:国家自然科学基金(30570871)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570871)
作者简介:黄云剑,男,四川省大邑县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肾脏疾病基因治疗方面的研究。电话:(023)68774921
通信作者:王梓华,E-mail:wangzihua2001@163.com
收稿日期:2007-07-24 修回日期:2007-12-20

司)、优等胎牛血清(TBD 公司)、胰蛋白酶(Gibco 公司)、一抗 E-cadherin 和 Pax2(Santa Cruz 公司)、一抗波形蛋白、细胞角蛋白、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司)、Ⅰ型胶原试剂盒(上海森雄生物技术公司),其余无机盐均为国产分析纯产品。

1.2 实验方法

1.2.1 成纤维细胞的培养 无菌条件下取肾肿瘤切除的正常极肾组织,去除肾包膜及肾盂组织,分离皮质和髓质,切取突入肾盂的肾乳头组织,剪成 1 mm^3 大小碎块,加入 0.1% 胶原酶溶液 37 ℃消化后 15 ~ 20 min,将组织块分别通过 80、150 目的不锈钢筛网,用 DMEM-F12 培养液收集细胞悬液,计数。成纤维细胞鉴定 培养的细胞经倒置相差显微镜下观察呈梭型,用 S-P Kit 免疫组化方法鉴定,第 3 代细胞用于实验。实验前 24 h 换成不含血清的 DMEM 培养,使细胞处于静止状态。将细胞分为 2 组:对照组,用 DMEM-F12 培养细胞;BMP-7 组,培养液 BMP-7 浓度为 1 000 ng/L。每组同时设 3 个复孔,分别观察 72 h 后各指标的情况。

1.2.2 MTT 方法检测细胞增殖 将对数生长期细胞以 5×10^4 ml^{-1} 的细胞数接种于 96 孔培养板中,每孔 0.2 ml。细胞贴壁后,换成不含血清的 DMEM 培养 24 h,然后分组,每组设 6 个复孔。在反应结束前 4 h 每孔加入 15 μl MTT (5 mg/ml)溶液,继续孵育,实验结束后,弃上清,每孔加入 200 μl 二甲基亚砜,在微型混合器上振荡 10 min,酶标仪 490 nm 测每孔吸光度[D(490)]。

1.2.3 细胞培养上清液的Ⅰ型胶原含量测定 以 1×10^4 ml^{-1} 的细胞数接种于 24 孔板,分组后,置 37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后,收集细胞培养上清液。按Ⅰ型胶原试剂盒说明书进行。

1.2.4 Western blot 分析 细胞经预冷的 RIPA 裂解液后,12 000 × g,4 ℃离心 20 min 提取细胞蛋白成分。以 Bradford 法测定上清蛋白质含量。经煮沸 5 min 后行 10% SDS-PAGE 垂直凝胶电泳,电转移蛋白质到 PVDF 膜上,膜在 5% 牛血清白蛋白 TBST 液(10 mmol/L Tris · HCl,150 mmol/L NaCl,0.05% Tween-20,pH 8.0)封闭,37 ℃室温 1 h,TBST 洗膜后分别与抗 E-cadherin 抗体、抗 Pax2 抗体(1∶1 000)和抗 β-actin 抗体孵育 37 ℃,2 h,再用 HRP 标记的二抗杂交和辣根过氧化酶标记的链霉卵白素液杂交,37 ℃,1 h,TBST 洗膜后在暗室中加 ECL 发光试剂,X 线胶片下曝光,常规方法显影、定影。杂交信号在图像分析系统中进行光密度分析。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计分析软件行 t 检验。

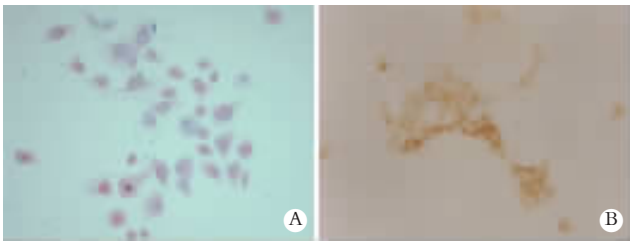
2 结果

2.1 成纤维细胞抗波形蛋白免疫组化染色结果

培养的细胞在倒置相差显微镜下用 S-P Kit 免疫组化方法鉴定,细胞抗波形蛋白单抗阳性,抗细胞角蛋白阴性,故证实为人肾间质成纤维细胞成纤维细胞(图 1)。

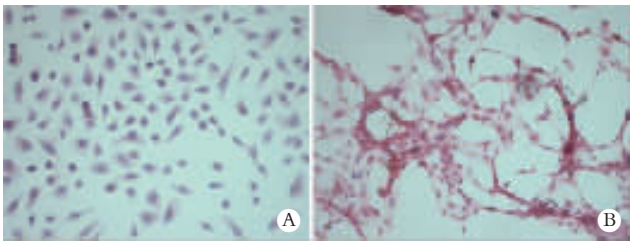
2.2 BMP-7 对肾间质成纤维细胞形态的影响

肾间质成纤维细胞与 1 000 ng/L BMP-7 孵育 72 h 后,与对照组相比,细胞聚集出现类似小管细胞管样结构形成(图 2)。



A 抗细胞角蛋白阴性;B 抗波形蛋白阳性

图 1 成纤维细胞抗波形蛋白免疫组化染色阳性 (S-P ×200)



A 对照组;B BMP-7 组

图 2 成纤维细胞出现类似小管细胞管样结构形成 (HE ×200)

2.3 BMP-7 对肾间质成纤维细胞增殖的影响

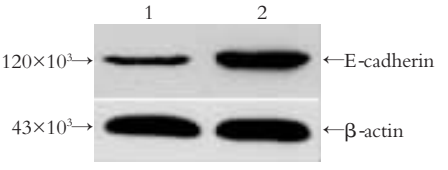
肾间质成纤维细胞与 1 000 ng/L BMP-7 孵育 72 h 后,与对照组相比,细胞增殖能力显著下降 27.9% ($P < 0.05$)。

2.4 BMP-7 对肾间质成纤维细胞分泌Ⅰ型胶原的影响

肾间质成纤维细胞与 1 000 ng/L BMP-7 孵育 72 h 后,与对照组相比,细胞分泌Ⅰ型胶原显著下降 17.8% ($P < 0.05$)。

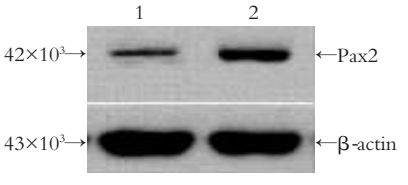
2.5 BMP-7 对肾间质成纤维细胞表达 E-cadherin 和 Pax2 的影响

肾间质成纤维细胞与 1 000 ng/L BMP-7 孵育 72 h 后,与对照组相比,Western blot 结果显示 E-cadherin 和 Pax2 表达显著增加($P < 0.05$,图 3、4)。



1 对照组;2:BMP-7 组

图 3 BMP-7 对肾间质成纤维细胞表达 E-cadherin 的影响



1 对照组;2:BMP-7 组

图 4 BMP-7 对肾间质成纤维细胞表达 Pax2 的影响

3 讨论

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是肾脏疾病进展到终末期肾功能衰竭的共同病理途径,其程度和范围决定了肾功能的恶化趋势,因此,减轻 RIF 一直肾科研究难点之一。RIF 主要表现为间质肾小管

凋亡、纤维细胞增生和间质细胞外基质（extracellular matrix，ECM）大量产生和沉积。ECM 主要来源于间质的成纤维细胞，Iwano 等[3] 发现纤维化肾脏中新出现的成纤维细胞大约 36% 来自上皮-间质细胞转化、14%～15% 来自骨髓和剩下来自局部成纤维细胞的增生，因此，如何减少上皮-间质细胞转化、减少成纤维细胞数目已成为 RIF 的治疗重点。本研究采用人肾成纤维细胞培养，观察 BMP-7 是否有能力诱导人肾成出现间质-上皮细胞的转化，如果 BMP-7 有这样的功能，RIF 局部成纤维细胞的数目和 ECM 堆积量将大为减轻，从而缓解 RIF 的程度和范围。

上皮细胞具有和肾成纤维细胞很多不一样的特性，如细胞增殖能力低，胶原分泌少，以及特有的上皮样管样结构和标志物形成。E-cadherin 是上皮细胞内主要的黏附分子，是上皮细胞黏附和表型主要标志物。研究显示在胚胎后肾发育的早期，当 E-cadherin 表达增多时，就表明间充质细胞出现了向上皮的转化[4]。为验证肾成纤维细胞是否还保存一些胚胎时的印迹和可塑性，我们体外培养肾成纤维细胞，选用后肾发生、发育的重要调控因子 BMP-7 作为刺激因子，观察是否会诱导这一现象的发生。我们发现 1 000 ng/L BMP-7 与成纤维细胞孵育 72 h 后，成纤维细胞聚集出现类似小管细胞管样结构形成，MTT 检测显示成纤维细胞增殖活性减低，Ⅰ型胶原分泌下降，Western blot 分析显示肾成纤维细胞出现 E-cadherin 表达增加，表明肾成纤维细胞存在胚胎时的可塑性，在 BMP-7 的诱导下出现向上皮的转化现象。

肾单位发育过程包括肾小球和肾小管的发生、血管的形成和肾单位的成熟。肾单位起源于后肾间充质。在后肾发育的早期，间充质细胞与输尿管芽接触，并在输尿管芽的诱导下，间充质细胞压缩成团，出现间充质-上皮的转分化，再延长为肾囊泡，折叠成 comma 型小体，以后变成 S 型小体，其中 S 型小体的与输尿管芽接触部分分化为远端小管，中间部分分化为近端小管，远端部分发育为 Bowman capsule 和肾小球的足细胞，随着血管球突入勺状囊样结构的中间枝的部位，形成不成熟的肾小球[5]。在这些发育过程中，Pax2 基因参与了间充质-上皮细胞的分化调控。Pax2 基因主要表达于肾单位形成的间充质-上皮细胞转化阶段，如在 wollfian 导管、输尿管芽、集合管、未被诱导的后肾间充质、压缩间充质、comma 小体，在成熟的肾脏 Pax2 基因表达消失。突变的 Pax2 基因会导致肾囊泡不能形成，即间充质-上皮化受阻，表明 Pax2 在诱导间充质细胞-上皮转分化调控中起着重要的作用[6]。我们的结果显示体外培养的肾成纤维细胞在 BMP-7 诱导下 Pax2 的表达增加，说明 BMP-7 诱导成纤维细胞间质-上皮细胞的转化与其诱导 Pax2 基因的表达有关。

在成年个体，肾小管上皮细胞向成纤维细胞转化的现象较为多见，在纤维化组织中表现尤为显著。因此，阻断上皮细胞向成纤维细胞转化或诱导成纤维细胞出现间质-上皮细胞的转化均有助于缓解肾小管间质纤维化程度[1]。BMP-7 是骨形态发生蛋白（BMPs）家族的成员之一。近年研究显示 BMP-7 是后肾发生、发育的重要调控因子[7]。胚胎早期，BMP-7 主要表达在输尿管芽、后肾间充质和早期的肾小管，缺乏 BMP-7 的鼠会出现肾发生的标志分子，如 Pax2 和 Wnt4 表达下调，输尿管芽数减少，后肾间充质肾发育减缓，最终肾发育停止。同时，BMP-7 基因表达不足还是肾纤维化进展的重要原因之一，体外培养肾小管细胞添加 BMP-7 和体内给予 BMP-7 后，均可降低肾纤维化，该机制与 BMP-7 抑制上皮细胞－间质细胞的转化有关[2,8,9]。本研究结果显示肾成纤维细胞在 BMP-7 的作用下，Pax2 表达增加，出现类似小管管样结构，细胞增殖活性减低，Ⅰ型胶原分泌下降，并出现上皮标志物 E-cadherin 表达增加，说明 BMP-7 对肾成纤维细胞作用类似于对后肾间充质的诱导上皮化作用，同时，也提示肾成纤维细胞至少保持部分它胚胎时的印迹和可塑性，因此，我们可以利用这一特性，应用 BMP-7 使肾成纤维细胞向上皮转化，来达到减轻肾纤维化，减缓肾衰竭进程的目的。

参考文献：

[1] Chaffer C L, Thompson E W, Williams E D. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1－3)：7－19.

[2] Zeisberg M. Bone morphogenic protein-7 and the kidney：current concepts and open questions[J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(3)：568－573.

[3] Iwano M, Plieth D, Danoff T M, *et al*. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3)：341－350.

[4] Mah S P, Saueressig H, Goulding M, *et al*. Kidney development in cadherin-6 mutants：delayed mesenchyme-to-epithelial conversion and loss of nephrons[J]. Dev Biol, 2000, 223(1)：38－53.

[5] Brenner B M. 布伦纳-雷克托肾脏病学[M]. 第 6 版. 北京 科学出版社, 2001：68－92.

[6] Dziarmaga A, Quinlan J, Goodyer P. Renal hypoplasia：lessons from Pax2[J]. Pediatr Nephrol, 2006, 21(1)：26－31.

[7] Yanagita M. Modulator of bone morphogenetic protein activity in the progression of kidney diseases[J]. Kidney Int, 2006, 70(6)：989－993.

[8] Wahab N A, Mason R M. A critical look at growth factors and epithelial-to-mesenchymal transition in the adult kidney. Interrelationships between growth factors that regulate EMT in the adult kidney[J]. Nephron Exp Nephrol, 2006, 104(4)：e129－e134.

[9] 干　磊，吴雄飞，吴　亿. 反义 α 肌动蛋白基因腺病毒载体对 TGF-β1 刺激的肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 28(13)：1301－1304.

（编辑　吴培红）