DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.011

论著

文章编号:1000-5404(2002)07-0778-04

酸性成纤维细胞生长因子诱导大鼠肾小管上皮细胞转分化的作用及机制

钟 波,张 玉景 (第三军医大学附属新桥医院肾内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨酸性成纤维细胞生长因子(Acid fibroblast growth factor aFGF)在大鼠肾小管上皮细胞株(NRK)转分化中的作用,为肾小管-间质纤维化的防治提供理论依据。方法 在NRK细胞的培养基内加入不同剂量的重组人aFGF,并在Ⅰ型胶原处理过及未处理的玻璃表面,无血清培养6 d。使用透射电镜、免疫细胞化学对肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞形态及表型的转变进行评估。结果 不同剂量的aFGF(1、10、50 ng/ml)处理后的NRK细胞形态和表型发生不同程度的改变:体积增大、失去尖端-基底极性和微绒毛、细胞延长、具有浸润特征的前后向双末端极性、出现肌动蛋白中间丝结构。免疫组化和Western blot分析显示加入aFGF后角蛋白表达减少,有肌成纤维细胞的特异性标志物α-平滑肌动蛋白(α-SMA)的表达。α-SMA阳性细胞的比例与aFGF的浓度呈正相关,亲和抗aFGF抗体可消除这种转分化现象。加入aFGF后,在玻璃表面α-SMA阳性细胞数(34.4±0.090)%较Ⅰ型胶原处理培养表面α-SMA阳性细胞数(74.6±0.101)%有显著差异($P<0.05$)。结论 aFGF在促进肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转分化的过程中有重要的意义,该过程亦与细胞的生长环境有关,提示肾小管上皮细胞的表型转化是肾间质纤维化的重要原因。

关键词:酸性成纤维细胞生长因子;肾小管上皮细胞;上皮细胞-肌成纤维细胞转分化
中图法分类号:R322.61;R329.28;R392.11 文献标识码:A

Acid fibroblast growth factor induces renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro*

ZHONG Bo, ZHANG Jing (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the possible mechanisms of acid fibroblast growth factor (aFGF) in the phenotypic transformation of rat renal tubular epithelial cells line (NRK) *in vitro*. **Methods** Normal rat renal tubular epithelial line (NRK) were cultured for 6 d on the plate with or without collagen type Ⅰ-coating and in the absence or presence of aFGF at different doses. Transdifferentiation of tubular cells into myofibroblasts was assessed with electron microscopy and by detecting the expression of α-smooth muscle actin (α-SMA) and cytokeratin. **Results** NRK cells cultured on collagen-coated or not coated plates showed a normal epithelial morphology. But the cells cultured with 50 ng/ml aFGF on collagen-coated plates showed profound changes, including elongated and enlarged cell body, loss of apical-basal polarity and microvilli, formation of new front-end back-end polarity, appearance of actin microfilaments and features of invasiveness. These morphological changes were companied by phenotypic changes. Immunohistochemical staining showed that the addition of aFGF to subconfluent cell culture caused the loss of the epithelial marker cytokeratin and novo expression of α-SMA. The transformed cells showed a fibroblast-like reorganization of actin fibers along with the cell axis. The percentage of cells expressing α-SMA was increased along with concentrations of aFGF in a dose-dependent manner, which was inhibited by the addition of anti-aFGF antibody. Compared with the cells growing on plates without coating, cell cultured on collagen-coated plates showed a significance increase ($P<0.05$) in the percentage of cells expressing α-SMA in response to aFGF. **Conclusion** aFGF is a key mediator that regulates, in a dose-dependent manner, the transdifferentiaton of renal tubular epithelial cells into $\alpha\text{-SMA}^{+}$ myofibroblasts. This transdifferentiation is markedly enhanced by growth on collagen type Ⅰ. These findings indicate a novel pathway that may contribute to renal tubulointerstitial fibrosis.

Key words: acid fibroblast growth factor; renal tubular epithelial cells; epithelial-myofibroblast transdifferentiation

以往研究表明肾脏疾病的发展和预后与肾小球的损害有关。然而,近年来的研究表明,肾小管-间质损害程度与肾功能预后的关系较肾小球的损害更为密切。肾间质纤维化几乎是所有肾脏疾病的最终结果。细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)在肾间质的过度沉积是引起肾间质纤维化的主要原因。在肾间质中合成和分泌ECM的细胞有成纤维细胞,肾小管上皮细胞和血管内皮细胞,其中成纤维细胞是产生ECM的主要细胞。在外源性刺激下,成纤维细胞增生,获得平滑肌细胞的某些特征,如表达α亚型的肌动蛋白,并逐渐成为间质的主要细胞,同时产生大量细胞外基质,从而导致肾间质纤维化。目前研究显示,肌成纤维细胞部分由肾小管上皮细胞转化而来。转分化定义为已分化细胞内结构蛋白表型发生改变的现象。在鼠肾间质纤维化模型中已发现成纤维细胞数量增加部分归因于上皮细胞的转分化,且转化后的肌成纤维细胞在细胞外基质增加和肾间质纤维化中作用更大。但迄今为止,肾小管上皮细胞表型转分化的机制及影响因素尚不清,

作者简介:钟 波(1972—),男,河南省漯河市人,硕士,主治医师,主要从事肾间质纤维化机制的研究。现在解放军第306医院内科工作,北京 100101

收稿日期:2001-06-13;修回日期:2001-10-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

有待于进一步研究。

作者以大鼠肾小管上皮细胞株(NRK)为研究对象初步探讨酸性成纤维细胞生长因子(Acid fibroblast growth factor aFGF)在上皮细胞转分化中的作用及可能机制。

1　材料和方法

1.1　细胞培养

大鼠肾上皮细胞株 NRK(CRL-6509, Rockville, MD, USA)购自武汉大学生物技术中心。RPMI1640 培养液增补 10% 新生小牛血清、100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素, $NaHCO_4$ 调整 pH 值为 7.4, 37 ℃, 5% CO_2 培养箱中培养。1/4 传代率进行传代。

1.2　实验分组

设未加重组人 aFGF(华美公司产品)的细胞为对照组; 按照加入 aFGF 在培养基中的浓度设 1 ng/ml 组、10 ng/ml 组和 50 ng/ml 组; 在含 50 ng/ml 重组人 aFGF 和 5 μg/ml 亲和多克隆兔抗 aFGF 抗体(美国 Sigma 公司)培养基中培养的细胞为抗体组。实验过程中, 每隔 72 h 更换新鲜培养基, 同时加入新鲜 aFGF 和/或相应抗体, 每组均设 5 个样本进行实验。

1.3　细胞形态的观察

1.3.1　倒置显微镜下观察转分化过程中各组细胞形态的变化

1.3.2　透射电镜下观察转分化过程中各组细胞形态的变化

取纯化细胞, 离心, 3% 戊二醛固定。1% 锇酸固定, 常规脱水包埋, LKBV 型超薄切片, JEM-2000EX 透射电镜下观察 NRK 细胞的超微结构。

1.4　免疫细胞化学 S-ABC 法染色测定 NRK 细胞 α-SMA、角蛋白

将细胞培养在 6 孔塑料培养板中, 培养板细胞生长表面上用Ⅰ型胶原进行处理或无处理因素条件下, 细胞在含 0、1、10、50 ng/ml 重组人 aFGF 培养基中培养 6 d, 实验过程中, 每隔 72 h 更换新鲜培养基, 同时加入新鲜 aFGF 和/或相应抗体。纯丙酮固定细胞, 纯甲醇加 H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶。正常血清封闭, 加一抗, 即抗 α-SMA 单克隆抗体、抗角蛋白单克隆抗体(美国 Sigma 公司), 4 ℃过夜。依次加入生物素化山羊抗小鼠/兔 IgG 和 SABC, DAB 显色, 苏木精轻度复染。脱水, 透明, 封固。显微镜观察。高倍镜下(× 400)观察 200 个细胞, 数出阳性染色的细胞数。

1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 8.0 软件进行 t 检验、单因素方差分析和直线相关性分析。

2　结果

2.1　aFGF 引导 NRK 上皮细胞-肌成纤维细胞转分化的形态学变化

培养在玻璃培养瓶或 6 孔塑料培养板的 NRK 细胞形成紧密的卵石样排列的融合单层, 细胞生长在Ⅰ型胶原处理过的培养表面上, 未加处理因素时, 细胞也呈现这种典型的上皮生长特征。透射电镜观察显示这些细胞为立方型或球型, 为尖端-基底极性, 细胞表面存在微绒毛, 细胞内见不到肌动蛋白中间丝结构, 见图 1。

aFGF 介入 6 d 后, 可引导 NRK 细胞出现典型的成纤维细胞形态学的改变, 这些改变与介入 aFGF 的剂量相关, 同时也与细胞培养表面的特性(使用Ⅰ型胶原处理)有关, 当 aFGF 浓度为 1 ng/ml 时, 电镜观察显示细胞逐渐肥大、形态上向梭型发展、但仍保持上皮的极性和微绒毛, 当 aFGF 浓度为 10 ng/ml 时, 即可引导复杂的形态学的变化, 包括细胞延长、肥大、失去紧密卵石样生长模式, 当 aFGF 浓度增加为 50 ng/ml 时, 上皮细胞完全失去了细胞表面的微绒毛和细胞的极性, 细胞延长、与周围细胞分离, 形成胞质突起, 和前后向双末端极性。透射电镜观察显示这种已转分化的细胞呈现典型的肌成纤维细胞形态学特征, 胞质中表达肌动蛋白中间丝结构, 沿细胞轴和胞质突起分布, 见图 2。

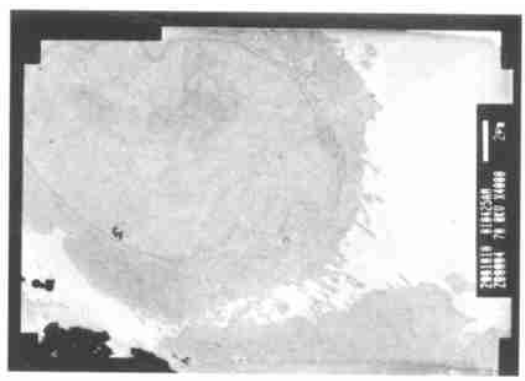


图 1　玻璃培养表面 NRK 上皮细胞显示正常上皮细胞特征, 尖端-基底极性尖端表面存在微绒毛　(TEM× 4 000)

Fig 1　NRK cells cultured on the plates without coating showing normal epithelial appearances with apical-basal polarity and microvilli on cell surface　(TEM× 4 000)

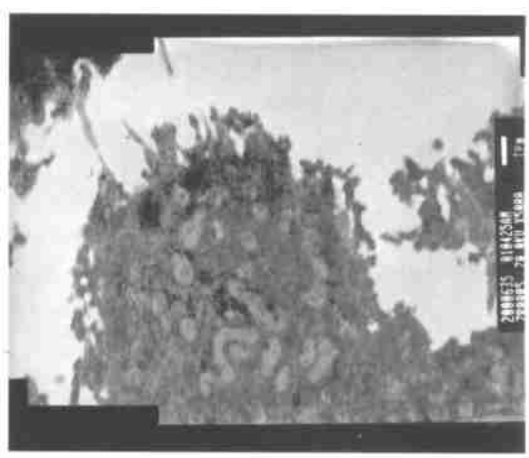


图 2　α FGF 浓度为 50 ng/ml Ⅰ型胶原处理过培养表面 NRK 上皮细胞, 细胞微绒毛消失, 胞质中表达肌动蛋白中间结构, 沿细胞轴和胞质突起分布　(TEM× 5 000)

Fig 2　NRK cells cultured on collagen plates with 50 ng/ml aFGF showing loss of microvilli and appearance of actin microfilaments along with the cell axis　(TEM× 4 000)

酸性成纤维细胞生长因子引导 NRK 上皮细胞-肌成纤维细胞转分化的能力被亲和抗-aFGF 抗体消除, 细胞保持其极性、微绒毛、紧密连接、和典型的上皮生长模式, 无形态学的改变和肌动蛋白中间丝的形成。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 aFGF 剂量与胶原处理培养表面与肾小管上皮细胞转分化的关系

实验结果显示，未加入 aFGF 时，细胞表现为正常的上皮形态学特征和典型的贴壁生长模式，角蛋白染色阳性，个别细胞 α-平滑肌动蛋白染色阳性，见图 3。当介入 aFGF 后，培养表面均出现表达 α-平滑肌动蛋白阳性的细胞，见图 4。而 aFGF 引导的细胞转分化特征均出现在表达 α-平滑肌动蛋白阳性的细胞中，如形态上延长、肥大，孤立的浸润生长模式，沿细胞轴或胞质突起染色强阳性的胞质肌丝结构。



图 3 玻璃培养表面 NRK 上皮细胞与平滑肌动蛋白免疫细胞化学染色 (SABC× 400)

Fig 3 Immunohistochemical staining of α-SMA in NRK cells cultured on the plates without coating (SABC× 400)



图 4 α**FGF** 浓度为 **50 ng/ml** Ⅰ 型胶原处理过培养表面 **NRK** 上皮细胞与平滑肌动蛋白免疫细胞化学染色 (SABC× 400)

Fig 4 Immunohistochemical staining of α-SMA in NRK cells cultured on collagen plates with 50 ng/ml aFGF (SABC× 400)

α-SMA 染色阳性的细胞的百分比与 aFGF 的剂量有关，即当培养基中 aFGF 的浓度增加时，α-SMA 染色阳性的细胞的百分比逐渐增加，呈剂量依赖性正相关（$r=0.912$，$P<0.05$）；当培养基中亲和多克隆兔抗 aFGF 抗体的浓度为 5 μg/ml 时，α-SMA 染色阳性的细胞的百分比，较 50 ng/ml 组显著降低（$P<0.05$），见表 1。

在未加入 aFGF 的情况下，生长在胶原处理过的培养表面上 α-SMA 染色阳性的细胞的百分比与无胶原处理时无显著增加，当培养基中加入 aFGF 时，生长在胶原处理过的培养表面上 α-SMA 染色阳性的细胞的百分比较无胶原处理时显著增加（$P<0.05$），见表 2。

表 1 **aFGF** 对上皮细胞胞质表达 α-**SMA** 的影响（α-**SMA** 阳性细胞数%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effect of aFGF on the expression of α-SMA in NRK cells (% of α-SMA$^+$ cells, $\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	% of α-SMA$^+$ cells
Control	5	1.7±0.008
1 ng/ml	5	10.2±0.018 *
10 ng/ml	5	30.6±0.086 *
50 ng/ml	5	32.7±0.110 *
Anti-aFGF antibody	5	8.3±0.019 *▲

*: $P<0.05$ *vs* control; ▲: $P<0.05$ *vs* 50 ng/ml group

表 2 Ⅰ 型胶原处理培养表面对 **aFGF** 引导的上皮细胞表达 **a-SMA** 的影响（α-**SMA** 阳性细胞数%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effect of aFGF on the expression of α-SMA in NRK cells cultured on collagen Ⅰ coated plates (% α-SMA$^+$ cells, $\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Without collagen Ⅰ	Collagen Ⅰ treated
Control	5	2.8±0.013	3.0±0.030
50 ng/ml	5	34.4±0.090	74.6±0.101 *

*: $P<0.05$ *vs* without collagen

3 讨论

各种原因引起的上皮细胞的损伤或局部生长环境的变化可影响细胞的分化状态，使具有紧密连接特性的上皮细胞失去了上皮细胞特性且转化为独立的、具有活动能力的成纤维细胞。上皮-间质转化的过程中，上皮细胞受细胞外基质或其他信号的刺激而启动间质形成基因表达，细胞前端伸出丝状伪足至细胞外基质，随后在伪足引导下整个细胞体进入细胞外基质，上皮细胞获得了类似间质细胞的运动特征，进而引起了上皮基底膜的裸出和断裂，新形成的细胞具有肌成纤维细胞的特性，纤粘连蛋白、蛋白多糖和胶原纤维等细胞外基质大量无序堆积，形成小管-间质纤维化[1~3]。而目前已知促进上皮－间质转化的原因主要有以下几类：整合素；FSP_1（成纤维细胞特异性蛋白编码基因）；一些原癌基因如 r-src，c-fos，r-ras，r-mos；某些生长因子或细胞因子如转化生长因子 β（Transforming growth factor-β，TGF $\beta_{1\sim3}$）、中肾管抑制因子（Mullerian inhibiting factor，MIF）、转化生长因子 α（Transforming growth factor-α，TGFα）等[5]。酸性成纤维细胞生长因子属于成纤维细胞因子超家族成员，具有功能多样性，它既可以作为一种有效的有丝分裂原，又可以作为一种播散因子，通过与特异性细胞表面受体相结合，启动受体的酪氨酸残基自身磷酸化引导细胞的增殖、分化等各种生物学效应。

实验表明 aFGF 可引导肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转分化，包括细胞超微结构的变化，表达间质细胞标志 α-SMA，以及失去上皮标志角蛋白。这一过程与加入 aFGF 的剂量、细胞的生长状态和细胞的生长环境有关。首先，aFGF 引导细胞转分化具有剂量依赖性，当 aFGF 的浓度为 1 ng/ml 时，α-SMA 蛋白含量略有增加，但不能驱动完全的形态学上的转分化过程，电镜

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

观察显示部分细胞变大、延长、失去部分表面的微绒毛，形态上有向梭型发展的趋势，但尚未出现完全的前后双末端极性和浸润生长模式。aFGF 的浓度为 10 ng/ml 时，细胞失去紧密生长模式，与周围细胞分离，开始形成胞质突起。当 aFGF 的浓度为 50 ng/ml，细胞完全失去了上皮特性而表现为成纤维细胞特性。结果提示肾脏疾病中 aFGF 的过表达可能是引导肾间质纤维化的一种新的途径。其次，在Ⅰ型胶原处理过的培养表面上生长可加强 aFGF 引导细胞转分化过程，但胶原处理本身并不能启动上皮细胞的转分化。上皮细胞向间质细胞转分化的过程与细胞外基质蛋白如Ⅰ型胶原、纤粘连蛋白有关，这与国外的研究报告相一致[4]。

提示体内环境中各种病理变化引起的肾小管基底膜损伤引起小管上皮细胞与间质中细胞外基质成分接触而导致小管上皮－间质转分化，可能成为肾间质纤维化的始动因素之一[5]。

参考文献：

[1] Evers E E, Zondab G C, Malliri A. Rho family protein in cell adhesion and cell migration[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(10): 1 269－1 274.
[2] Hay E D. Biogenesis and organization of extracellular matrix[J]. FASEB J, 1999, 13 (Suppl 2): S 281－283.
[3] Strutz F, Muller G A, Neilson E G. Transdifferentiation: a new angle on renal fibrosis[J]. Exp Nephrol, 1996, 4(5): 267－270.
[4] Huber S M, Braun G S, Seger S. Metanephrogenic mesenchyme to epithium transition induces profound expression changes of ion channels[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 279(1): F65－76.
[5] Ng Y Y, Huang T P, Yang W C, *et al*. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats[J]. Kidney Int, 1998, 54(3): 864－876.

（编辑　陈聪连）

文章编号：1000-5404(2002)07-0781-01

个案与短篇

间质性膀胱炎 5 例报告

Report of 5 cases interstitial cystitis

季惠翔，张家华，金锡御　（第三军医大学附属西南医院全军泌尿外科中心，重庆 400038）

间质性膀胱炎（Interstitial cystitis, IC）又称之为“膀胱粘膜下纤维化”、“痛性膀胱炎”、“Hunner 溃疡病”等，是以尿频、尿急、膀胱潴尿痛为主要症状的一种少见疾病，美国报道发病率为 2.4～30/10 万[1,2]，国内尚未见有关发病率的报道。我院自 1990 年至今共收治 5 例，均符合美国国立关节炎、糖尿病、消化系疾病和肾脏病中心（National Institute of Arthritis Diabetes and Digestive and Kidney Diseases NIADDKD）提出的诊断标准，经膀胱水压扩张、膀胱灌注、口服药物等治疗，病情缓解。现报告如下。

1　临床资料

1.1　临床表现

5 例病人均为女性，年龄 26～57 岁，病程 2～4 年，均有严重尿频、尿急，夜尿尤甚，严重者日间排尿 20～30 次，夜尿 8～10 次，每次尿量 20～150 ml，有明显膀胱区潴尿痛，排尿后可缓解，在脊髓麻醉状态下膀胱容量 100～750 ml，2 例伴有腰骶部疼痛及性交痛。5 例病人均被长期误诊为泌尿系慢性感染或盆腔炎，经抗感染、抗结核治疗无效。

1.2　检查结果

实验室检查：尿常规显示有少量红细胞，多次尿沉渣涂片、血沉、中段尿培养均无异常。尿动力学检查：3 例示逼尿肌无抑制收缩，2 例因功能性膀胱容量不足 200 ml，故未行尿动力学检查。膀胱镜检查：麻醉状态下，70 cmH_2O 注水至最大容量，维持 5 min 后放水，见灌注液呈淡血性，5 例病人均有膀胱粘膜裂隙、草莓状斑片出血及小血管球存在，其中 1 例观察到典型 Hunner 溃疡，近出血或溃疡处深达肌层取多块组织进行活检，病理结果：光镜下见膀胱粘膜及肌层大量炎细胞浸润，1 例伴有平滑肌纤维化，符合 IC 表现。

1.3　治疗及结果

本组 5 例病人经膀胱镜检查、水压扩容后，口服阿米替林 50 mg/d，同时膀胱灌注肝素钠 10 万 U 3 次/周，灌注初期若膀胱刺激症状严重，合用利多卡因 100 mg 同时灌注，3～4 周后 4 例潴尿痛及尿频症状均有不同程度缓解，膀胱容量大者疗效更好，门诊坚持治疗随访 3～6 个月无恶化，另 1 例（病理回报有肌纤维化者）同法治疗 3 个月，潴尿痛缓解，尿频缓解不明显。

2　讨论

2.1　病因学

间质性膀胱炎的病因不十分清楚。泌尿系感染、血液淋巴回流受阻、自体免疫、膀胱粘膜通透性异常、神经体液因素异常等都曾被报道过，但研究结果多互相矛盾。膀胱粘膜通透性异常曾受到高度重视，但电镜、免疫组化等方法未发现明确形态学依据。目前多倾向于 IC 为一种多病因引起的神经体液改变，即药物、寒冷、精神、损伤、毒素等因素刺激感觉神经末梢释放多种神经肽，继而肥大细胞被激活，释放组胺、激肽、PGD2、TNFα、ILs 等多种细胞因子，导致血管充血、水肿、内皮细胞、膀胱细胞或组织受损，诱发溃疡、出血、甚至自体免疫，引起一系列 IC 临床表现[3]。

（下转 785 页）

作者简介：季惠翔（1971－），男，上海市人，硕士，医师，主要从事男科学方面的研究。电话：(023)68754000－73086

收稿日期：2001-02-13；修回日期：2001-09-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net