

• 基础实验研究论著 •

肾小管上皮细胞炎性损伤中的转分化—获得组织干细胞潜能的研究

皮 蕾¹, 姜 倦^{2△}, 黄 彬², 欧阳涓², 陈培松², 崔颖鹏², 刘云峰¹, 郭彩娇¹

(1. 广州市妇女儿童医疗中心检验部, 广东广州 510623; 2. 中山大学第一附属医院检验医学部, 广东广州 510000)

摘要: 目的 研究肾脏纤维化过程中转分化的肾小管上皮细胞获得的组织干细胞潜能。方法 体外建立局部肾素-血管紧张素(Ang II)系统炎性环境下肾小管上皮细胞(NRK-52E)转分化的细胞模型, 观察其胚胎肾发育基因 Pax2 和组织干细胞表面标志 CD133 分子的表达和变化情况。结果 局部高浓度 Ang II 可刺激 NRK-52E 细胞表达 Pax2 和 CD133 分子, 其作用呈剂量和时间依赖关系。结论 炎性损伤导致肾小管上皮细胞转分化后可获得组织干细胞潜能。

关键词: 肾小管上皮细胞; 转分化; Pax2; CD133**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.005**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2014)14-1825-03**Study on transdifferentiation -acquiring tissue stem cell potency during renal tubular epithelial cells inflammatory damage**Pi Lei¹, Jiang Tang^{2△}, Huang Bin², Ouyang Juan², Chen Peisong², Cui Ying peng², Liu Yunfeng¹, Guo Caijiao¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Municipal Women and Children Medical Center,

Guangzhou, Guangdong 510623, China; 2. Department of Laboratory Medicine, First

Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: Objective To study the potency of transdifferentiated renal tubular epithelial cells for acquiring the tissue stem cells during renal fibrosis. **Methods** The in vitro cellular model of renal tubular epithelial cells(NRK-52E) transdifferentiation under the inflammatory environment of the local renin-angiotensin (Ang II) system was established. The expression and change situation of the embryonic kidney developmental gene Pax2 and the tissue stem cell surface marker CD133 were observed. **Results** Local high concentration of Ang II could stimulate the NRK-52E cells to express Pax2 and CD133 molecule, its effect demonstrated the dose- and time-dependent relation. **Conclusion** The inflammatory damage leads to the transdifferentiated renal tubular epithelial cells potency to acquire the tissue stem cell.

Key words: renal tubular epithelial cell; transdifferentiation; Pax2; CD133

进行性肾脏纤维化是各种晚期肾脏病的共同特征。大量研究已经证实在这个过程中存在肾小管上皮细胞向间充质细胞的转分化(epithelial-mesenchymal transdifferentiation, EMT)^[1-2], 这一发现推翻了过去的传统观念: 即上皮细胞是一种终末分化细胞, 一旦分化完成将终生保持该细胞形态。近年来, 人们一直致力于肾小管上皮细胞转分化的发生机制及意义的研究, 试图寻找能够延缓、甚至终止晚期肾脏病不可逆进展的策略。

众所周知, 在各种急、慢性损伤中, 高浓度炎症因子环境是导致损伤发生、发展的重要因素, 近年来局部肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin-system, RAS)的作用已受到高度重视。为此, 本组体外建立了局部高浓度肾素-血管紧张素系统(Ang II)炎性环境下肾小管上皮细胞(NRK-52E)转分化的细胞模型, 采用间接免疫荧光及流式细胞分析等技术, 证实了炎性损伤时成年肾小管上皮细胞可以通过转分化转化为组织干细胞, 获得干细胞的分化潜能。

1 材料与方法**1.1 材料** 肾近曲小管上皮细胞系 NRK-52E, 由中山大学附属第一医院肾病实验室提供。**1.2 分组** 细胞计数后, 分别把 2×10^6 个肾小管上皮细胞接种至各皿内, 待细胞亚融合时, 弃去选择性培养基, 加入无血清

DMEM/F12 培养基同步化 24 h 随机分为以下各组: (1) 空白对照组: 加入无血清 DMEM/F12 培养基; (2) Ang II 刺激组: 加入 Ang II 刺激细胞; 以 10^{-7} 、 10^{-9} 、 10^{-11} mol/L 3 个不同刺激浓度和 5、10、15、20、25、30 min 6 个不同刺激时间点刺激。

1.3 细胞间接免疫荧光方法检测体外 Ang II 刺激各组 Pax2 蛋白的表达及其变化 在各刺激时间点固定细胞, 以兔抗 Pax2 多克隆抗体和 FITC 标记羊抗兔 IgG 二抗孵育 NRK-52E 细胞, 间接免疫荧光方法检测体外 Ang II 刺激各组 Pax2 蛋白的表达。

1.4 流式细胞术方法检测体外 Ang II 刺激各组中 CD133 的表达及其变化 在各刺激时间点收集并固定细胞, 制成单个细胞悬液, 以纯化小鼠 CD133 抗体及 PE 标记羊抗小鼠 IgG 孵育 NRK-52E 细胞, 流式细胞术检测体外 Ang II 刺激各组中 CD133 的表达及其变化。

1.5 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据方差齐性检验结果, 两组间比较采用独立样本 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析或者 Kruskal-Wallis H 检验。所有数据均用 SPSS 10.0 统计软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果**2.1 NRK-52E 细胞在 Ang II 刺激下胚胎肾标志物 Pax2 蛋白的表达及变化** 细胞间接免疫荧光结果显示, NRK-52E 细

胞中 *Pax2* 蛋白的表达水平对 Ang II 作用也呈剂量和时间依赖关系。以不同浓度 (10^{-7} 、 10^{-9} 、 10^{-11} mol/L) Ang II 刺激 NRK-52E 细胞 15 min, 10^{-9} mol/L 组 *Pax2* 蛋白的表达达峰值。

表 1 10^{-9} mol/L Ang II 刺激不同时间点 *Pax2* 蛋白阳性细胞百分比 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min
空白对照组	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Ang II 刺激组	0.00 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01 *	0.15 \pm 0.04 *	0.20 \pm 0.06 *	0.16 \pm 0.04 *

*: $P < 0.05$, 与空白对照组相比。

表 2 不同浓度 Ang II 刺激细胞 15 min *Pax2* 蛋白阳性细胞百分比 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	10^{-7} mol/L	10^{-9} mol/L	10^{-11} mol/L
空白对照组	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Ang II 刺激组	0.07 \pm 0.04 *	0.20 \pm 0.08 *	0.06 \pm 0.02 *

*: $P < 0.05$, 与空白对照组相比。

表 3 10^{-9} mol/L Ang II 刺激不同时间点 CD133 阳性细胞百分比 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
空白对照组	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Ang II 刺激组	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	7.78 \pm 5.08 *	25.70 \pm 7.93 *	14.00 \pm 9.54 *	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

*: $P < 0.05$, 与空白对照组相比。

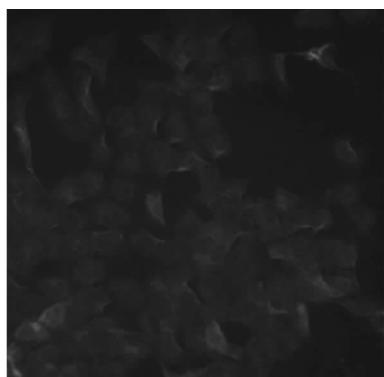


图 1 NRK-52E 细胞空白对照 *Pax2* 免疫荧光染色 (200 \times)

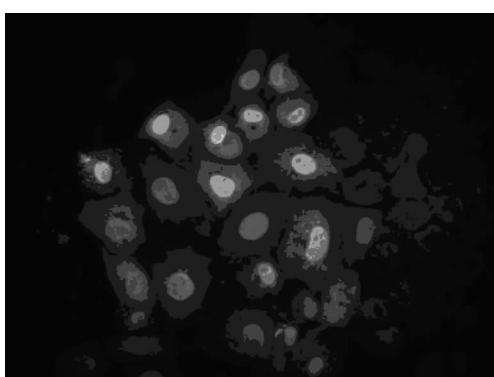


图 2 10^{-9} M Ang II 刺激 NRK-52E 细胞 15 min *Pax2* 免疫荧光染色 (200 \times)

3 讨 论

自 Strutz 等^[1]于 1995 年首先证实肾脏损伤过程中肾小管上皮细胞可转分化为间充质细胞以来, EMT 在晚期肾脏病

用相同浓度的 Ang II 刺激细胞不同时间, *Pax2* 蛋白表达刺激 15 min 时达到最高水平(见表 1,2, 图 1,2)。

2.2 NRK-52E 细胞在 Ang II 刺激下组织干细胞标志物 CD133 的表达及变化 NRK-52E 细胞在 Ang II 刺激下可表达组织干细胞标志物 CD133, 其表达变化呈剂量、时间依赖关系。CD133 在以 10^{-9} mol/L 浓度 Ang II 刺激细胞 10 min 时开始表达, 刺激 15 min 时达高峰, 刺激 25 min 时表达消失。以 10^{-7} 、 10^{-11} mol/L 的 Ang II 刺激细胞时, 细胞不表达 CD133, 见表 3。

持续进展中的作用已日益受到人们的关注。有研究显示, 大约有超过三分之一的间充质细胞起源于肾小管上皮细胞^[3]。

诱导肾小管上皮细胞发生 EMT 的机制是复杂的。局部或循环中的细胞因子在肾小管上皮细胞发生逆向分化过程中的诱导作用尤为令人重视。很多研究在集中探讨肾脏损伤时, 肾小管上皮细胞浸浴环境对 EMT 的诱导, 尤其是局部 RAS, 目前已被认为是一种重要的炎性介质系统。Ang II 是 RAS 中具有血管活性的主要肽类, 也是炎症反应的一个关键因子, 其可诱导许多细胞因子和化学因子的表达, 包括 TGF2 β 、肿瘤坏死因子 2 α (TNF2 α)等^[4]。有研究表明在人类膜性肾病中, Ang II 可以导致肾脏的肌纤维母细胞激活^[5-7]。本实验成功建立了局部 RA5 炎性环境下肾小管上皮细胞(NRK-52E)转分化的细胞模型, 为研究肾小管上皮细胞转分化的机制和生物学作用奠定了基础。

Pax2 是泌尿生殖发育的早期调控基因, 可在前、中、后肾发育的全过程中有序地开启和表达, 在发育和调控的过程中起到重要的作用, 被认为是胚胎肾的标志物之一。本组以往的实验已经证实^[8], 成年肾小管上皮细胞通过转分化可获得胚胎期 *Pax2* 的重新表达, 这一现象提示发生转分化的成年肾小管上皮细胞可能重新获得胚胎发育期的某些细胞生物学行为, 获得干细胞的增殖分化潜能, 像组织干细胞一样表达组织干细胞表面标志, 旨在参与肾脏损伤的修复过程。

CD133 分子是一个公认的干细胞表面标志。有研究证明肾脏中的 CD133 $^{+}$ 细胞代表了一个多能的成体组织固有的干细胞群体, 具有有限的自我更新能力, 可在体外扩增, 并能够分化成上皮细胞和内皮细胞, 在肾脏损伤修复中起到比骨髓干细胞更加重要的作用^[9]。

本研究发现, Ang II 刺激 NRK-52E 细胞(下转第 1829 页)

活性在恢复期时增高更明显,这可能和 AT-Ⅲ、PC、PS 的遗传方式有关。AT-Ⅲ、PS 为常染色显性遗传,而 PC 为常染色体隐性遗传。本组资料显示,中老年患者比青年患者多,遗传性的缺陷比后天获得性可能性小,即使同时存在 AT-Ⅲ、PC、PS 的遗传缺陷,但 PC 缺陷的发病率低,如果要达到一样的发病率,PC 缺陷就要有获得性外在因素,如术后、肾病、肝病、感染、外伤等参与,而获得性因素受抗凝、抗感染、溶栓、扩张血管治疗影响较大。所以恢复期的药物干预对 PC 缺陷影响大一些,这可能也是 PC 活性在恢复期时升高明显,造成与健康对照组之间差异无统计学意义的原因之一^[7]。

脑梗死发生时,由于各种原因所致的局部脑组织区域血液供应障碍,而使脑组织发生不同程度的不可逆性损伤,导致组织缺血、缺氧性病变坏死,进而产生临幊上对应的神经功能缺失的表现。本组资料研究表明随着梗死面积的增大,AT-Ⅲ、PC、PS 活性呈不断降低的趋势,且差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明在不同梗死范围的比较中,发现 AT-Ⅲ、PC、PS 活性与梗死范围密切相关,由于梗死患者均为与患者预后相关的因素,因此,早期检测其活性可提高预后情况。脑梗死患者血浆中 AT-Ⅲ、PC、PS 活性同时下降,导致抗凝及抗纤溶作用减弱,使全血处于高凝状态,加速血栓形成,使梗死范围进一步扩大,导致病情复发和加重。一种可能是部分患者自身有先天性缺陷症,另一种可能是在血栓形成及发展过程中,动脉粥样硬化斑块破裂,内皮细胞受损,使合成减少。同时组织因子释放,参与抗凝血时被消耗。PC、PS 活性的下降可能还与心磷脂抗体的作用有关。其机制为心磷脂抗体与血浆 PC 及 PS 结合后,竞争性抑制其与磷脂的结合,抑制了血浆 PC 及 PS 的活性;其次心磷脂抗体与血浆 PC 结合后,可以抑制对凝血因子

(上接第 1826 页)

后,发生 EMT 的细胞可表达胚胎肾的标志物 *Pax2* 蛋白质,其作用与细胞所受的 Ang II 刺激浓度与孵育时间有密切关系。与此同时,这些细胞也呈现 CD133 分子的表达,表达变化呈剂量和时间依赖性。CD133 分子的表达趋势在时间上与 *Pax2* 蛋白的表达基本趋同,提示胚胎发育基因 *Pax2* 与 CD133 分子表达之间可能存在一定的序列开启关系。

因此本组认为炎性因子 Ang II 可刺激肾小管上皮细胞表达胚胎肾的标志物 *Pax2* 及组织干细胞的标志 CD133 分子的现象,提示了肾小管上皮细胞在发生 EMT 的过程中可能获得了具有组织干细胞的潜能,其可能分化为肾小管上皮细胞,对受损的肾小管起积极修复、参与肾脏组织结构的重建作用。然而,对于晚期肾脏病来讲,肾脏最终仍然发生了肾小管间质纤维化,从而导致肾小管间质纤维化的不可逆性。故而,本组认为经 EMT 后的肾小管上皮细胞可能具有不同的功能和命运,EMT 组织干细胞向何种方向分化,可能取决于病变损伤的性质、持续时间及肾脏局部的微环境变化,可能涉及复杂的基因、信号调控系统,这些尚有待于今后更进一步的研究证实。

参考文献

- [1] Strutz F, Okada H, Wlo C, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1 [J]. Cell Biol, 1995, 130 (1): 393-405.

V 的灭活作用,导致血栓形成^[8]。

综上所述,血浆 AT-Ⅲ、PC、PS 在脑梗死患者中活性降低,早期联合检测对脑梗死患者的判断预后及指导治疗具有一定价值。

参考文献

- [1] 李新,王纪佐,张哲成. 脑梗死患者血浆蛋白 C、蛋白 S 动态观察 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2004, 30 (1): 54-55.
- [2] 黄彬, 钟武平, 陈茶. 脑梗死患者血浆活化蛋白 C 抵抗、蛋白 C 和蛋白 S 活性的测定 [J]. 临床检验杂志, 2002, 20 (1): 54-55.
- [3] 孙爽, 孙莉, 周春奎. 血浆蛋白 C、蛋白 S 与脑梗死的相关性研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24 (5): 551-553.
- [4] 李运刚, 潘旭东, 韩仲岩. 老年脑梗死患者蛋白 C 系统及抗凝血酶系统测定的研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2002, 4 (2): 104-106.
- [5] Simioni P, de Ronde H, Prandoni P, et al. Ischemic stroke in young Patients with activated protein C resistance. A report of three cases belonging to three different kindreds [J]. Stroke, 1995, 26 (5): 885-890.
- [6] 刘宇明, 许治强, 周伯荣, 等. 蛋白 C、抗凝血酶Ⅲ在缺血性脑血管病发病机制中的作用 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2011, 18 (5): 379-380.
- [7] 张本平, 梁庆成. 蛋白 C、蛋白 S 活性与缺血性脑血管病的相关性研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2007, 41 (4): 365-366.
- [8] 周志才, 张赛. 抗凝血酶-Ⅲ、血浆蛋白 C 在脑梗死中的病因学意义 [J]. 中国综合临床, 2006, 22 (8): 702-703.

(收稿日期: 2014-02-08)

- [2] Ng YY, Huang TP, Yang WC, et al. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubular interstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats [J]. Kidney, 1998, 54 (2): 864-887.
- [3] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis [J]. Am J Pathol, 2001, 159 (4): 1465-1475.
- [4] Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, et al. Inflammation and angiotensin II [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35 (6): 881-900.
- [5] Mezzano SA, Aros CA, Drogue A, et al. Renal angiotensin II upregulation and myofibroblast activation in human membranous nephropathy [J]. Kidney Int Suppl, 2003, 64 (86): 39-45.
- [6] SHAO-LING ZHANG, Babak Moiniand Julie R. Ingelfinger: Angiotensin II Increase Pax-2 expression in fetal kidney cells via AT2 receptor [J]. Am Soc Nephrol, 2004, 15 (6): 1452-1456.
- [7] 孙阳, 郑法雷. 血管紧张素 II 与肾脏间质纤维化 [J]. 中华内科杂志, 1999, 38 (3): 202-204.
- [8] 皮蕾, 姜锐. PAX2 基因在肾小管上皮细胞转分化中的作用 [J]. 华中医学杂志, 2007, 31 (1): 7-10.
- [9] Benedetta B, Stefania B, Cristina G, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney [J]. Am J Pathol, 2005, 166 (2): 545-555.

(收稿日期: 2014-01-08)