

骨形态发生蛋白-7 对马兜铃酸诱导人肾小管上皮细胞转分化的影响

许勇芝 黄浩 刘华锋 陶静莉 梁东 陈孝文

摘要 目的 探讨骨形态发生蛋白-7 (bone morphogenetic protein-7, BMP-7) 对马兜铃酸 (Aristolochic acid, AA) 诱导的肾小管上皮细胞转分化的拮抗作用, 以期为马兜铃酸肾病 (Aristolochic acid nephropathy, AAN) 寻找治疗新措施。方法 应用不同浓度 BMP-7 (75 ng/mL、150 ng/mL、300 ng/mL) 处理经 AA (10 μ g/mL) 诱导转分化的体外培养人近端肾小管上皮细胞株 (HK-2 细胞), 然后应用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 及 Western blotting 技术分别检测 α -SMA mRNA 及蛋白的表达水平。结果 BMP-7 呈剂量依赖方式逆转 AA 诱导的 HK-2 细胞 α -SMA 基因及蛋白的表达。结论 BMP-7 可以通过抑制马兜铃酸诱导的人肾小管上皮细胞转分化从而可能成为 AAN 的防治潜在新药。

关键词 马兜铃酸肾病; 骨形态发生蛋白-7; 肾小管上皮细胞; 转分化

Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 on Aristolochic Acid Induced Renal Tubular Epithelial Cells Trans-differentiation XU Yong-zhi, HUANG Hao, LIU Hua-feng, et al *Institute of Nephrology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Guangdong (524001)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on aristolochic acid induced renal tubular epithelial cell trans-differentiation to look for new therapeutic approach for aristolochic acid nephropathy (AAN). **Methods** *In vitro* cultured human proximal renal tubular epithelial cell line HK-2 cells were treated with different concentrations of BMP-7 (75 ng/mL, 150 ng/mL and 300 ng/mL) after trans-differentiation of the cells was induced by AA (10 μ g/mL). Levels of α -SMA mRNA and protein expressions were detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting respectively. **Results** BMP-7 reversed the AA inducing α -SMA expressions in HK-2 cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** BMP-7 can inhibit the trans-differentiation of human renal tubular epithelial cell induced by AA, thereby might be a new potential drug for AAN prevention and treatment.

KEYWORDS aristolochic acid nephropathy; bone morphogenetic protein-7; renal tubular epithelial cells; trans-differentiation

马兜铃酸肾病 (Aristolochic acid nephropathy, AAN) 是由于一次超大剂量或长期不合理摄入含马兜铃酸 (Aristolochic acid, AA) 中草药而引起的肾脏疾病, 临床主要表现为急性肾小管坏死或慢性肾小管-间质纤维化, 以后者多见且难处理, 常快速进展为慢性肾衰竭。AA 引起慢性肾损害的发生机制尚不十分清楚, 但肾小管上皮细胞坏死、凋亡及转分化是其主要病理生理机制。

目前 AAN 的治疗措施极有限, 甚至在慢性肾病中普遍有效的血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 类药物在 AAN 中的治疗价值也不肯定^[1], 因此, 寻找有效

AAN 治疗措施是本病目前研究的重点之一。骨形态发生蛋白-7 (bone morphogenetic protein-7, BMP-7) 是 TGF- β 超家族成员, 许多研究证实其可以延缓慢性肾脏纤维化^[2-4]。BMP-7 最为突出的生理功能之一是可诱导肾间充质细胞向上皮细胞转分化, 而抑制肾小管上皮细胞间充质细胞转分化^[5,6]。本研究观察了 BMP-7 对 AA 所诱导的肾小管上皮细胞转分化的拮抗作用, 报告于下。

材料与方法

1 细胞培养与鉴定 人类近端肾小管上皮细胞株 (HK-2) 由上海第二医科大学瑞金医院肾科陈楠教授惠赠, 从液氮复苏后培养于含 10% FCS、100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基 (GIBCO, USA) 中并进行传代培养, 培养条件为 37

基金项目: 广东省中医药局资助项目 (No. 104081)

作者单位: 广东医学院附属医院肾病研究所 (广东湛江 524001)

通信作者: 刘华锋, Tel: 13828206812, E-mail: hf-liu@263.com

℃、5% CO₂、100% 湿度。经相差显微镜、扫描电镜以及免疫细胞化学(Cytokeratin18 蛋白染色)鉴定证实为肾小管上皮细胞后用于实验。将 HK-2 细胞以 1 × 10⁵ 密度接种于 6 孔板中,用含 10% FCS(GIBCO, USA)的 DMEM/F12 培养液(GIBCO, USA)培养 24 h 后,换用无血清培养基同步 24 h 后用于实验。实验开始时,按如下分组法加入 AA 和 BMP-7 (R&D, USA),继续孵育 48 h 后收集细胞,每一实验均重复 3 次。实验共分 5 分组:(1)空白对照组:无 AA 及 BMP-7;(2)单纯 AA 处理组:AA 10 μg/mL;(3) AA 10 μg/mL + BMP-7 75 ng/mL 组;(4) AA 10 μg/mL + BMP-7 150 ng/mL 组;(5) AA 10 μg/mL + BMP-7 300 ng/mL 组。

2 HK-2 细胞 α-SMA mRNA 的含量 采用 RT-PCR 法检测,用 Trizol 试剂(Invitrogen, USA)一步法抽提细胞总 RNA。继之应用 ThermoScript™ RT-PCR System(Invitrogen, USA)进行 cDNA 第一链合成。PCR 引物序列、扩增条件及产物长度(表 1),PCR 扩增系统包括 10 × PCR 缓冲液 2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL, 10 mmol/L dNTP mix 0.4 μL, 5 mmol/L 正链及反链引物各 0.8 μL, Taq 酶(上海生工)2 U, cDNA 1 μg,最后加 H₂O 至总体积 20 μL。各取 5 μL PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳,应用 UVP 凝胶成像系统进行结果分析,以目的基因(α-SMA)扩增带积分吸光度与内参基因(GAPDH)扩增带积分吸光度之比值表示 α-SMA mRNA 表达量。

表 1 PCR 特异性引物及扩增条件

指标	引物序列	扩增条件	产物长度
α-SMA	sense: 5' ACTGGGACGACATG- GAAAAG 3'	94 ℃ 45 s, 58.1 ℃ 45 s,	240 bp
	antisense: 5' CATCTCCAGAG- TCCAGCAGC 3'	72 ℃ 1 min, 38 cycles	
β-actin	sense: 5' ATCATGCTTTGAGAC- CTTCAACACC 3'	94 ℃ 45 s, 55.4 ℃ 45 s,	552 bp
	antisense: 5' CATGGTGCTGC- CGCCAGACAG 3'	72 ℃ 1 min 30 cycles	

3 HK-2 细胞 α-SMA 蛋白表达水平 采用 Western blotting 检测。每孔细胞加入 100 μL 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40 100 μg/mL PMSF, Aprotinin 1.6 μg/mL),置 4 ℃ 冰箱裂解过夜,次日 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min 获上清液,应用考马斯亮蓝法测定总蛋白浓度。蛋白溶液与 5 × 上样缓冲液(0.1 mol/L Tris-Cl, pH 6.8, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 50% 甘油, 5% 2-巯基乙醇)按 4:1 混匀后 100 ℃ 煮沸 5 min,按每孔 20 μg 蛋白上样;继之于 12% SDS-PAGE 中进行电泳(电压 130 V,约 60 min),电泳完毕后按 100 V 恒压条件下于低温条件下电转 1.5 h。依蛋白

Standard(Bio-Rad, USA)条带裁切 PVDF 膜,然后于封闭液(1 × TBS-T, 5% 脱脂牛奶)中 4 ℃ 封闭过夜,次晨 PVDF 膜分别与兔抗人 GAPDH 一抗(Santa Cruz, 1:4 000 稀释的)或鼠抗人 α-SMA 一抗(Santa Cruz, 1:4 000 稀释)37 ℃ 孵育 1 h。TBS-T 洗膜 4 × 5 min 后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠/兔二抗(Santa Cruz, 均按 1:5 000 稀释)37 ℃ 孵育 1 h,TBS-T 洗膜 4 × 5 min,最后用不含 Tween-20 的 TBS 洗膜 1 次。暗室中用 ECL 试剂(Bio-Rad, USA)显影,X 线(日本富士)拍照,条带经扫描仪扫描后,用图像分析软件 Gel-Pro Analyzer 进行积分光密度分析。

4 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

结 果

1 BMP-7 对 AA 诱导的 HK-2 细胞形态的影响(图 1) 相差显微镜下见空白对照组(图 1A)HK-2 细胞呈多边形铺路石状,细胞紧密衔接,融合成单层,单纯 AA 处理组 HK-2 细胞在 48 h 开始出现形态学改变,由多边形铺路石状改变为梭形长条状,且细胞数目减少,且排列紊乱,至 72 h 改变更为突出(图 1B)。BMP-7 处理组则随着 BMP-7 浓度的升高,细胞形态改变较单纯 AA 单独处理组逐渐减轻(图 1C~D)。

2 BMP-7 对 AA 诱导的 HK-2 细胞 α-SMA mRNA 和蛋白表达的影响 与空白对照组比较,单纯 AA 处理组 α-SMA mRNA 表达量显著升高($P < 0.01$);不同浓度 BMP-7 处理组 α-SMA mRNA 表达量较单纯 AA 处理均显著下降($P < 0.05$),且随着 BMP-7 浓度的增加呈逐渐下降趋势(表 2 和图 2)。单纯 AA 处理组 α-SMA 蛋白表达较空白对照组显著升高($P < 0.05$);加入 BMP-7 处理后 α-SMA 蛋白表达随着 BMP-7 浓度的增加呈逐渐下降趋势,但小剂量及中剂量 BMP-7 组与单纯 AA 处理组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而高浓度 BMP-7 组与单纯 AA 处理组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2 和图 3)。

表 2 BMP-7 对 AA 诱导的 HK-2 细胞表达 α-SMA mRNA 和 α-SMA 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	α-SMA mRNA	α-SMA 蛋白
空白对照	3	0.0704 ± 0.0182	0.00 ± 0.00
单纯 AA 处理	3	0.4118 ± 0.0405**	0.4567 ± 0.0551*
10 μg/mL AA + 75 ng/mL BMP-7	3	0.2931 ± 0.0312 ^Δ	0.4033 ± 0.0252
10 μg/mL AA + 150 ng/mL BMP-7	3	0.2023 ± 0.0503 ^Δ	0.3733 ± 0.0252
10 μg/mL AA + 300 ng/mL BMP-7	3	0.1057 ± 0.0214 ^Δ	0.1600 ± 0.0361 ^Δ

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与单纯 AA 处理组比较,^Δ $P < 0.05$

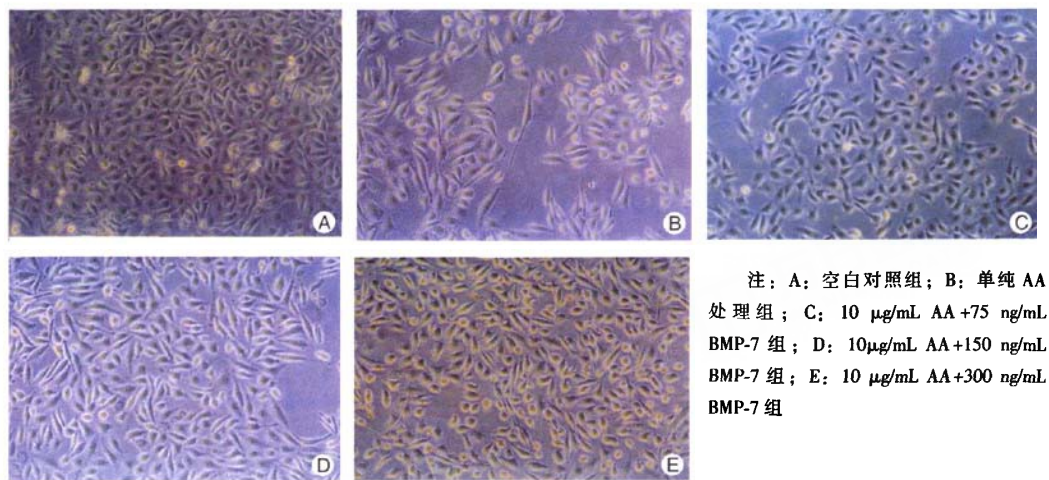
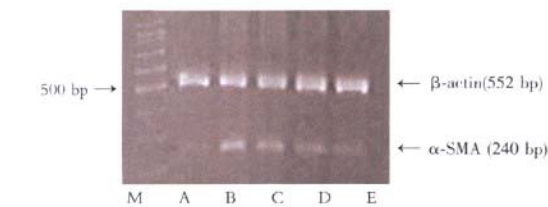
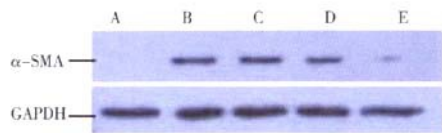


图 1 BMP-7 对 AA 诱导的 HK-2 细胞形态的影响 (72 h, 200×)



注:A:空白对照组;B:单纯 AA 处理组;C:10 $\mu\text{g/mL}$ AA+75 ng/mL BMP-7 组;D: 10 $\mu\text{g/mL}$ AA+150 ng/mL BMP-7 组;E: 10 $\mu\text{g/mL}$ AA+300 ng/mL BMP-7 组

图 2 BMP-7 对 AA 诱导的 HK-2 细胞 $\alpha\text{-SMA}$ mRNA 表达的影响



注:A:空白对照组;B:单纯 AA 处理组;C:10 $\mu\text{g/mL}$ AA+75 ng/mL BMP-7 组;D:10 $\mu\text{g/mL}$ AA+150 ng/mL BMP-7 组;E:10 $\mu\text{g/mL}$ AA+300 ng/mL BMP-7 组

图 3 BMP-7 对 AA 诱导的 HK-2 细胞 $\alpha\text{-SMA}$ 蛋白表达的影响

讨 论

Vanherweffhem JL 等^[7]1993 年首次报道长期使用含 AA 中草药制剂的减肥药后引起快速进展的肾间质纤维化病变,现将之称为马兜铃酸肾病。随之大量的

临床资料表明,AAN 以肾小管萎缩及间质纤维化为主要病理特征^[8],本研究发现,HK-2 细胞在 AA 的作用下,细胞由多边形铺路石状变为长梭形,且细胞数目减少,排列紊乱,逆转录-聚合酶链反应及免疫印迹技术检测均显示细胞大量表达 $\alpha\text{-SMA}$,此结果验证了 Wen 等^[9]的结果:即一定剂量 AA 可促进肾小管上皮细胞转分化。肾小管上皮细胞转分化可能是导致 AAN 患者肾小管固有细胞减少、间质纤维细胞大量增生的主要机制之一,因此至少在理论上,控制肾小管上皮细胞转分化对 AAN 具有较好的治疗作用。

BMP-7 已被证实是一个重要的抗纤维化细胞因子,慢性肾脏疾病时,其活性降低可能是促使肾小管-间质纤维化的发生机制之一。在肾脏的发育过程中,肾脏的上皮细胞和间质细胞中存在着独特的可塑性,即肾脏的间质细胞有向上皮细胞转化的特性,BMP-7 是这种转化的必要因素。在病理情况下,BMP-7 可能通过抑制肾小管上皮细胞凋亡^[10]、减少促炎因子的表达^[11]、阻断 TGF- β 的信号转导^[12]、拮抗 TGF- β 对肾小管上皮-间质的转分化作用^[13],促进细胞外基质降解^[10]而拮抗肾小管-间质纤维化,在维持正常肾功能、抑制肾小球和肾间质纤维化中具有重要作用^[14]。因而它可能是一种有前途的治疗慢性肾脏病的潜在药物^[15],但它在 AAN 中的作用如何,国内外未见文献报道。在本研究中,我们观察到不同浓度 BMP-7 处理经 AA 诱导转分化的 HK-2 细胞,发现 BMP-7 呈剂量依赖方式拮抗 AA 所致的细胞形态学改变和 $\alpha\text{-SMA}$ 表达,表明 BMP-7 对 AA 引起的 HK-2 细胞转分化能够起到

很好的拮抗作用,此结果初步证实 BMP-7 是治疗 AAN 有前途的潜在药物,值得进一步进行体内研究。

参 考 文 献

- [1] 郑法雷. 马兜铃酸肾病的特点及其防治中的有关问题[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2005, 14(6): 540-541.
- Zheng FL. Characteristics and issues related to prevention and treatment of aristolochic acid rephropathy[J]. Chin J Nephrol Dial Transplantation, 2005, 14(6): 540-541.
- [2] Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9): 8094-8100.
- [3] Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, et al. Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285(6): F1060-1067.
- [4] Kalluri R, Zeisberg M. Exploring the connection between chronic renal fibrosis and bone morphogenic protein-7[J]. Histol Histopathol, 2003, 18(1): 217-224.
- [5] Zhang XL, Selbi W, de la Motte C, et al. Bone morphogenic protein-7 inhibits monocyte-stimulated TGF-beta 1 generation in renal proximal tubular epithelial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1): 79-89.
- [6] Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, et al. Adenoviral gene transfer of BMP-7, Id2, or Id3 suppresses injury-induced epithelial-to-mesenchymal transition of lens epithelium in mice[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(1): C282-289.
- [7] Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs[J]. Lancet, 1993, 341(8842): 387-391.
- [8] Yang CS, Lin CH, Chang SH, et al. Rapidly progressive fibrosing interstitial nephritis associated with Chinese herbal drugs[J]. Am J Kidney Dis, 2000, 35(2): 313.
- [9] Wen XY, Zheng FL, Gao RT, et al. Function and mechanism of renal tubule epithelia differentiation induced by AA[J]. Chin J Nephrol Dialysis Transplant, 2000, 9(30): 206-209.
- [10] Morrissey J, Hruska K, Guo G, et al. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(Suppl 1): S14-21.
- [11] Gould SE, Day M, Jones SS, et al. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells[J]. Kidney Int, 2002, 61(1): 51-60.
- [12] Li JH, Zhu HJ, Huang XR, et al. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(6): 1464-1472.
- [13] Xu Y, Wan J, Jiang D, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells[J]. J Nephrol, 2009, 22(3): 403-410.
- [14] Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, et al. Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation and product inhibitors[J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1825-1833.
- [15] Bechtel W, Zeisberg M. Bone morphogenic protein-7 (BMP7) and the kidneys: insights into the future management of chronic kidney diseases[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2009, 134(34-35): 1688-1691.

(收稿: 2008-12-12 修回: 2009-11-18)

第五届全国中西医结合围手术期医学研讨会征文通知

为了促进现代外科理论和中西医结合围手术期管理研究的学术探讨和经验交流,推动本领域临床实践和研究的不断深入,中国中西医结合学会围手术期专业委员会定于 2010 年 5~6 月间在浙江省杭州市举办“第五届全国中西医结合围手术期医学研讨会”,届时将邀请美国、日本的国际知名外科专家及国内本领域的院士和专家作专题报告,介绍 21 世纪外科围手术期医学的新理论、新思路和新发展,以及中西医结合围手术期管理医学的最新进展,并进行学术交流。现征文如下。

1 征文内容 (1)围手术期管理医学研究的新进展:围手术期管理医学研究的理论探讨;快速康复外科新理念研究的前沿动态;中医、中西医结合方法在术后快速康复中的应用展望。(2)快速康复外科与中医药/中西医结合医学研究:快速康复技术应用的中西医结合临床经验交流;围手术期营养支持研究;微创新技术、新成果研究;相关临床研究、基础研究;其他。

2 征文要求 (1)论文内容真实可靠,具备科学性、先进性、实用性。(2)全文 3 000 字左右,并附 400 字左右中文摘要。全文及摘要打印稿各 1 份(A4 纸、加盖公章),或用 E-mail 传送电子版。(3)请务必注明作者姓名、工作单位、通讯地址、邮编和联系电话。(4)论文截稿日期:2010 年 4 月 15 日。(5)会议具体时间、地点另行通知。

3 联系人 浙江省中医院外科(浙江省杭州市邮电路 54 号,邮编:310006)张勤(手机:13588887282),周济春(13777361870)。传真:0571-87077785;E-mail: zjc0305@live.cn