

## · 基础研究 ·

川芎嗪对 TGF- $\beta_1$  诱导人胚肾近端小管上皮细胞转分化影响的实验研究王俊然<sup>1</sup>, 郑素琴<sup>2△</sup>, 邢红英<sup>3</sup>

(1. 河北省唐山市妇幼保健院病理科 063000; 2. 河北联合大学基础医学院病理学教研室, 河北唐山 063000; 3. 河北省唐山市唐海县医院病理科 063000)

**摘要:**目的 利用原代培养的人胚肾近端小管上皮细胞作为研究对象, 探讨川芎嗪(TMP)对转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 诱导的人胚肾近端小管上皮细胞转分化的影响。方法 采用胶原酶消化后系列网筛过滤, 再用密度梯度离心分离纯化细胞的方法, 进行人胚肾近端小管上皮细胞的原代培养。原代培养的人胚肾近端小管上皮细胞传至第 2 代后分为 5 组, 空白对照组、10 ng/mL TGF- $\beta_1$  刺激组、5 ng/mL TMP+10 ng/mL TGF- $\beta_1$  刺激组、10 ng/mL TMP+10 ng/mL TGF- $\beta_1$  刺激组及 20 ng/mL TMP+10 ng/mL TGF- $\beta_1$  刺激组。刺激 48 h 后, 采用倒置相差显微镜、透射电子显微镜、酶化学染色和免疫细胞化学方法检测细胞的转分化情况。**结果** TGF- $\beta_1$  刺激人胚肾近端小管上皮细胞后细胞拉长呈梭形, 细胞间隙加大; 电子显微镜下细胞失去极性, 微绒毛减少直至消失; 碱性磷酸酶染色阴性; 细胞角蛋白 18(CK-18)表达减弱, 波形蛋白(Vimentin)表达增强, 并表达  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白抗体( $\alpha$ -SMA)。各浓度 TMP+10 ng/mL TGF- $\beta_1$  刺激组细胞的上述变化均有不同程度的减弱, 减弱程度与 TMP 浓度呈正比。**结论** TMP 能以浓度依赖方式阻止 TGF- $\beta_1$  诱导的人胚肾近端小管上皮细胞的转分化。

**关键词:** 细胞转分化; 转化生长因子  $\beta_1$ ; 川芎嗪; 人胚肾近端小管上皮细胞; 肾间质纤维化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)06-0578-03

### Experimental study on effect of ligustrazine on transdifferentiation of primary culture human embryo renal proximal epithelial cells induced by TGF- $\beta_1$

Wang Junran<sup>1</sup>, Zheng Shuqin<sup>2△</sup>, Xing Hongying<sup>3</sup>

(1. Department of Pathology, Tangshan Maternal and Child Health Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China;

2. Department of Pathology, College of Basic Medicine, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000 China;

3. Department of Pathology, Tanghai County Hospital, Tangshai, Hebei 063000, Chian)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of ligustrazine on the transdifferentiation of primary culture human embryo renal proximal epithelial cells induced by TGF- $\beta_1$ . **Methods** The cortical tissue was digested with collagenase, and removed contaminating glomeruli and larger fragments by filtration, then further purified by isopycnic centrifugation using Percoll. The cultured cells were divided into five groups after subculture till passages: normal control group, 10 ng/mL TGF- $\beta_1$  group, 5 ng/mL ligustrazine + 10 ng/mL TGF- $\beta_1$  group, 10 ng/mL ligustrazine + 10 ng/mL TGF- $\beta_1$  group and 20 ng/mL ligustrazine + 10 ng/mL TGF- $\beta_1$  group. After stimulating for 48 h, the changes of the cells were observed by microscope and transmission electron microscope, and the transdifferentiation of the cells were detected by the histochemistry enzyme staining and immunocytochemistry. **Results** After the stimulation with transforming growth factor- $\beta_1$ , the cultured human embryo renal proximal tubular cells induced profound morphological changes, with cells developing marked hypertrophy, becoming elongated, and losing the cobblestone growth pattern, disassociated with neighboring cells. Electron microscopy showed that the transformed cells completely lost epithelial polarity and microvilli on the cell surface, histochemical enzyme staining negative and express of little cytokeratin-18, more vimentin and  $\alpha$ -smooth muscle actin. These change were decreased by ligustrazine in a dose-dependent fashion. **Conclusion** Ligustrazine can partially prevent TGF- $\beta_1$  inducing transdifferentiation of human embryo renal proximal tubular cells in a dose-dependent fashion.

**Key words:** cell transdifferentiation; transforming growth factor betel; tetramethylpyrazine; human embryo renal proximal tubular cell; renal interstitial fibrosis

肾间质纤维化是由多种原因引起的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分在肾间质内过度沉积, 其纤维化包括肾小球硬化和肾间质纤维化, 它是各种不同病因引起的慢性肾脏疾病进展到终末期肾衰竭的共同表现。大量动物实验和临床研究表明, 肾脏疾病的预后主要取决于肾间质纤维化受累的程度。Strutz 等<sup>[1]</sup>提出, 在肾间质纤维化的发生、发展过程中伴随肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞的转分化, 且转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 在肾小管上皮细胞转分化中起重要作用。

川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)是从川芎中提取的生

物碱单体, 是一种钙离子拮抗剂, 具有抑制自由基产生、改善血液流变学、抑制血小板聚集、调节脂质代谢等药理活性。近年来的临床和药理实验显示 TMP 具有抗纤维化作用<sup>[2-3]</sup>, 但其作用机制尚未阐明。本实验用不同浓度的 TMP 加 TGF- $\beta_1$  刺激原代培养的人胚肾近端小管上皮细胞, 探讨 TMP 对 TGF- $\beta_1$  诱导的原代培养的人胚肾近端小管上皮细胞转分化的影响, 为临床对肾间质纤维化的防治提供线索。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料** 选用因前置胎盘、重度妊娠高血压综合征

△ 通讯作者, E-mail: zh88eng@hotmail.com。

等病理原因剖宫产终止妊娠或外伤原因导致流产的正常胎儿(胎龄为 4~5 个月,死亡时间在 2 h 以内)的肾脏经家属同意,医院伦理道德委员会通过。外观检查无畸形,且经病理解剖检查证实无病变。

**1.1.2 主要试剂** DMEM/F12 细胞培养基、ITS 辅助营养物购自 Gibco 公司; Percoll 细胞分离液购自美国 Parmica 公司; I 型胶原酶购自美国 Sigma 公司; 盐酸 TMP 注射液购自上海现代哈森药业有限公司; 人重组 TGF-β<sub>1</sub> 购自英国 PeproTech 公司; 波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体购自细胞角蛋白 18(CK-18)单克隆抗体购自福州迈新生物技术有限公司; α 平滑肌肌动蛋白抗体(α-SMA)单克隆抗体、即用型免疫组化 SABC 试剂盒 DAB 显色剂购自武汉博士德生物有限公司; 细胞碱性磷酸酶染液试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

**1.2 方法**

**1.2.1 细胞培养及鉴定** 采用胶原酶消化后系列网筛过滤,再用密度梯度离心分离纯化细胞的方法,进行人胚肾近端小管上皮细胞的原代培养。应用透射电子显微镜观察超微结构、酶化学染色检测碱性磷酸酶和免疫细胞化学方法检测细胞标志蛋白的方法进行细胞鉴定。

**1.2.2 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激细胞** 原代培养的人胚肾近端小管上皮细胞传至第 2 代后分为 5 组,即无血清对照组(N 组)、10 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 刺激组(T 组)、5 ng/mL TMP+10 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 刺激组(TT5 组)、10 ng/mL TMP+10 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 刺激组(TT10 组)和 20 ng/mL TMP+10 ng/mL TGF-β<sub>1</sub> 刺激组(TT20 组)。刺激 48 h 后,倒置相差显微镜观察细胞形态;透射电子显微镜观察细胞是否具有肌成纤维细胞的超微结构特征;碱性磷酸酶偶氮色素法显示近端小管上皮细胞刷状缘上特异性的标志酶碱性磷酸酶的变化;免疫细胞化学方法检测细胞表型标志物 CK-18、Vimentin 和 α-SMA 的表达。应用自动图像分析系统对免疫细胞化学结果进行半定量分析。

**1.3 统计学处理** 所有实验均重复 3 次。采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。所有计量资料数值以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数比较用 *t* 检验和方差分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 人胚肾近端小管上皮细胞的鉴定** 倒置相差显微镜下细胞呈多边形鹅卵石样,界限不清,排列紧密,折光性强;细胞核大,圆形或卵圆形,细胞质较少。细胞形态与 Rodilla 和 Hawkaworth<sup>[4]</sup> 培养所得细胞相同,符合上皮细胞镜下特点(封 4 图 1)。透射电子显微镜下见培养的细胞近似圆形或立方形,细胞界限不清,细胞器丰富;细胞核大,偏向一侧;一侧的细胞膜向外凸出形成许多微绒毛,相对侧的细胞质内线粒体丰富。培养细胞经碱性磷酸酶化学染色后,有紫黑色的弧形染色,符合近端小管上皮细胞刷状缘上碱性磷酸酶阳性的特征。免疫细胞化学染色,CK-18 强阳性、Vimentin 微弱阳性、α-SMA

阴性。

**2.2 TMP 对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的人胚肾近端小管上皮细胞转分化的影响**

**2.2.1 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激后人胚肾近端小管上皮细胞的倒置相差显微镜下观察。**N 组人胚肾近端小管上皮细胞呈多边形鹅卵石样,排列紧密。T 组可见人胚肾近端小管上皮细胞拉长,由原来的多边形转变为梭形,细胞间隙加大,排列稀疏。有些细胞还可见细胞突起,形态似成纤维细胞(封 4 图 2)。各浓度 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激组细胞形态介于上述两者之间(封 4 图 3)。TMP 浓度越高细胞形态越接近于多边形,TMP 浓度越低细胞形态越接近于梭形。

**2.2.2 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激后人胚肾近端小管上皮细胞的透射电子显微镜观察。**N 组透射电子显微镜下可以看到细胞近似圆形或立方形,细胞核大,细胞质内细胞器丰富,细胞一侧可见密集排列的线粒体,另一侧可见细长浓密的微绒毛。T 组可见人胚肾近端小管上皮细胞拉长变形,细胞器减少,微绒毛短而稀疏甚至消失。各浓度 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激组细胞形态介于上述两者之间。细胞的变化与 TMP 的浓度呈负相关。

**2.2.3 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激后人胚肾近端小管上皮细胞的碱性磷酸酶染色。**TGF-β<sub>1</sub> 刺激人胚肾近端小管上皮细胞后,与 N 组比较,碱性磷酸酶染色阳性细胞率明显减少,各浓度 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激组碱性磷酸酶染色阳性细胞率介于 T 组和 N 组之间,且与 TMP 浓度的变化呈正相关。各组之间差异均有统计学意义(*P*<0.01),见表 1。

表 1 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激后人胚肾近端小管上皮细胞的碱性磷酸酶染色结果

组别	阳性细胞( $\bar{x} \pm s, \%$ )	<i>n</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
N 组	98.362±1.231	12		
T 组	0.043±0.013*	12	8.24	0.001 1
TT5 组	12.532±2.314*■	12	7.69	0.002 3
TT10 组	28.355±1.632*■▲	12	6.45	0.004 3
TT20 组	42.946±3.864*■▲◆	12	4.69	0.009 4

\*:*P*<0.01,与 N 组比较;■:*P*<0.01,与 T 组比较;▲:*P*<0.01,与 TT5 组比较;◆:*P*<0.01,与 TT10 组比较。

**2.2.4 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激后人胚肾近端小管上皮细胞的免疫细胞化学染色。**10 ng/mL 的 TGF-β<sub>1</sub> 刺激人胚肾近端小管上皮细胞后,与 N 组比较,上皮细胞标志物 CK-18 表达减弱,间充质细胞标志物 Vimentin 表达增强,并出现肌成纤维细胞的特异性标志物 α-SMA 的表达。各浓度 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激组细胞形态介于上述两者之间。各指标的变化随着 TMP 浓度的升高越来越不明显。各组数据间差异均有统计学意义(*P*<0.01),见表 2。

表 2 TMP+TGF-β<sub>1</sub> 刺激后人胚肾近端小管上皮细胞的免疫细胞化学染色结果( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

标志物	OD					<i>F</i>	<i>P</i>
	N 组	T 组	TT5 组	TT10 组	TT20 组		
CK-18	0.590 4±0.038 9	0.154 4±0.020 8*	0.184 5±0.013 5*■	0.237 2±0.015 2*■▲	0.353 3±0.021 4*■▲◆	40.36	<0.000 1
Vimentin	0.094 6±0.007 0	0.521 6±0.009 4*	0.453 6±0.012 6*■	0.360 5±0.016 7*■▲	0.206 6±0.021 2*■▲◆	82.30	<0.000 1
α-SMA	0.013 6±0.002 5	0.372 4±0.011 1*	0.324 2±0.056 1*■	0.252 3±0.010 6*■▲	0.125 9±0.007 8*■▲◆	100.23	<0.000 1

\*:*P*<0.01,与 N 组比较;■:*P*<0.01,与 T 组比较;▲:*P*<0.01,与 TT5 组比较;◆:*P*<0.01,与 TT10 组比较。

### 3 讨 论

近年来对肾间质纤维化的研究主要集中在细胞水平,肾小管上皮细胞是主要的研究平台。现已有商品化的人近端肾小管上皮细胞株 HK-2 出现,国内对肾小管病变机制的研究多以此为研究材料。但由于细胞株在基因转染、病毒诱导等永生化的过程中或反复传代过程中可能丧失某些功能,因而不适合特定研究的需要。此外细胞株是未分化的细胞,对机体环境信号的适应和应变调节能力不及分化的原代细胞,而细胞的适应和应变能力正是细胞治疗有可能改变疾病进程的关键所在<sup>[5]</sup>。基于 HK-2 细胞株的研究结果不能完全代表体内的实际情况,而原代培养的细胞较细胞株更接近体内的正常状态。本实验用原代培养的人胚肾近端小管上皮细胞所得的结果更具有说服力。

肾间质纤维化的一个显著特点是肌成纤维细胞的聚集。肌成纤维细胞的结构介于成纤维细胞和平滑肌细胞之间,具有两种细胞的双重特征,兼具分泌 ECM 和收缩的功能,有高度增殖性,是促进肾脏纤维化形成的主要细胞成分<sup>[6]</sup>。最近有学者报道在不同的肾脏疾病动物模型以及多种人类肾脏疾病的组织标本中发现<sup>[7-8]</sup>。肾小管上皮细胞可以发生向成纤维细胞/肌成纤维细胞的转化,称作小管上皮肌成纤维细胞转分化(tubular epithelial mesenchymal transition, TEMT)。这种细胞转分化是在多种损伤因子长期刺激下发生的细胞表型的改变<sup>[9]</sup>,其特征就是肾小管上皮细胞逐渐失去原有的上皮细胞表型而获得间质肌成纤维细胞的特征,表达  $\alpha$ -SMA<sup>[10]</sup>,参与肾间质纤维化<sup>[11-12]</sup>。

TGF- $\beta_1$  是一种调节细胞生长和分化的多肽。患有肾间质纤维化的肾脏疾病患者,肾间质中 TGF- $\beta_1$  水平明显升高。大量研究证明 TGF- $\beta_1$  在肾间质纤维化中起重要作用<sup>[13]</sup>。主要表现在:刺激 ECM 成分合成;抑制 ECM 降解;增加 ECM 受体如整合素的表达,从而增加 ECM 与细胞间的相互作用。邓剑波等<sup>[14]</sup>的研究表明,TGF- $\beta_1$  能促进人肾间质成纤维细胞表达 I 型胶原,提示 TGF- $\beta_1$  有促进肾组织纤维化的作用。最近又有研究提示 TGF- $\beta_1$  在肾小管上皮细胞转分化中起重要作用。Fan 等<sup>[15]</sup>用体外培养的方式证实,TGF- $\beta_1$  可以促进大鼠肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转分化,表达  $\alpha$ -SMA,其作用呈剂量依赖性,且该作用能够被 TGF- $\beta_1$  中和抗体基本阻断。TGF- $\beta_1$  主要来源于间质细胞,肾小管细胞也可产生 TGF- $\beta_1$ 。在各种损伤因子的刺激下,肾间质中的成纤维细胞活化,TGF- $\beta_1$  分泌增加,同时浸润到损伤局部间质中的单核巨噬细胞也分泌大量 TGF- $\beta_1$ ,局部增加的这些 TGF- $\beta_1$  刺激近端肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转分化,细胞失去黏附能力,游走进入间质,进一步分泌 TGF- $\beta_1$  等细胞因子,以自分泌的方式促进自身转分化为肌成纤维细胞,加速肾间质纤维化的发展。研究如何有效地阻断这一过程成为肾间质纤维化的治疗的一个有效途径。

有资料显示,TMP 可改善肾小管功能损害患者的肾小管功能<sup>[2]</sup>,而其作用机制尚不清楚。作者采用接近体内状态的人胚肾近端小管上皮细胞作为研究平台,用不同浓度的 TMP+TGF- $\beta_1$  对其进行刺激,采用免疫细胞化学和电子显微镜超微观察等方法,观察细胞表型特征的变化情况,研究 TMP 对肾小管上皮细胞转分化的影响。研究结果显示:TMP 能以剂量依赖方式阻断 TGF- $\beta_1$  导致的人胚肾近端小管上皮细胞拉长;电镜下微绒毛减少;上皮细胞标志物 CK-18 表达减弱;间充质细胞标志物 Vimentin 表达增强;及肌成纤维细胞特异性标志

物  $\alpha$ -SMA 的表达。这些证据表明,TMP 通过阻断 TGF- $\beta_1$  导致的人胚肾近端小管上皮细胞向肌成纤维细胞的转分化,而发挥抗肾间质纤维化的作用。

### 参考文献:

- [1] Strutz F, Okada H, Lo CW, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker, FSP1[J]. *J Cell Biol*, 1995, 130(2):393-405.
- [2] 贾怀玉, 胡韬韬, 曹阳, 等. 川芎嗪对肾小管功能损害保护作用的临床观察[J]. *中国现代中医杂志*, 2006, 23(19):2858.
- [3] 曹灵, 孙兴旺, 于国华, 等. 川芎嗪对人肾间质成纤维细胞增殖和形态的影响[J]. *现代预防医学*, 2006, 33(10):1936.
- [4] Rodilla VR, Hawkaworth GM. Isolation and culture of human renal cortical cells with characteristics of proximal tubules[A]. In: Jones GE, Totowa. *Method in Molecular Medicine: Human cell culture protocols* [M]. Totowa: Human Press Inc, 1996:407-417.
- [5] 熊应祖, 梅倩, 徐淑云. 肾组织上皮细胞的培养及其应用进展[J]. *中国药理学通报*, 1999, 15(4):303-306.
- [6] Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast: a quarter century after its discovery [J]. *Am J Surg Pathol*, 1998, 22(20):141-147.
- [7] Eddy AA. Molecular insights into the renal interstitial fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1996, 7(12):2494-2508.
- [8] Okaka H, Strutz F, Danoff TM, et al. Possible pathogenesis of renal fibrosis[J]. *Kidney Int*, 1996, 54(5):37-38.
- [9] Gabbiani G. The biology of the myofibroblast[J]. *Kidney Int*, 1992, 41(3):530-532.
- [10] Jinde K, Nikolic-Paterson DJ, Huang XR, et al. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis[J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(4):761-769.
- [11] Ito Y, Aten J, Bende RJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis[J]. *Kidney Int*, 1998, 53(4):853-861.
- [12] Frazier KS, Paredes A, Dube P, et al. Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation[J]. *Vet Pathol*, 2000, 37(4):328-335.
- [13] Frishberg Y, Kelly CJ. TGF-beta and regulation of interstitial nephritis[J]. *Miner Electrolyte Metab*, 1998, 24(2/3):181-189.
- [14] 邓剑波, 王代红, 张耀全, 等. TGF- $\beta_1$  对人肾成纤维细胞热休克蛋白 47 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2007, 36(5):419-421.
- [15] Fan JM, Ng YY, Hill PA, et al. Transforming growth factor-beta regulates epithelial-myofibroblast transdifferentiation in Vitro[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(4):1455-1467.