

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001634

骨形成蛋白 7 能减轻 TGF- β 1 诱导的人足细胞损伤

陈利群, 吕智美, 葛俭俭, 余心逸, 甘 华
(重庆医科大学附属第一医院肾内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察骨形成蛋白(bone morphogenetic protein 7, BMP-7)抑制转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导的人足细胞转分化作用及其机制研究。**方法:**构建及鉴定 pcDNA 3.1rh BMP-7 质粒, 体外培养人足细胞, 先后予 10、20、50、100、200 μ g/mL 重组的 BMP-7 诱导足细胞, 分别在培养 24、48、72 h 收集细胞, 流式细胞试验检测细胞凋亡率, 以此选择重组 BMP-7 最适的刺激浓度和最适的作用时间点。实验分为正常对照组、TGF- β 诱导组(TGF- β)及质粒转染组(PEGF-BMP-7), 质粒转染组加入重组 BMP-7 100 μ g/mL 预处理 48 h 后, 而 TGF- β 诱导组和 PEGF-BMP-7 组分别予 5 ng/mL TGF- β 1 处理足细胞后, 通过免疫荧光观察足细胞 Podocin、 α -SMA、VIM 的表达变化; 收集细胞抽取总 RNA 和总蛋白, 应用 RT-PCR 和 Western blot 观察重组 BMP-7 对人足细胞 Podocin、 α -SMA、VIM 的 mRNA 和蛋白表达的影响。**结果:**①本实验成功构建 pcDNA 3.1rh BMP-7 质粒, 转染的人足细胞能稳定表达 BMP-7, 质粒转染组 BMP-7 蛋白表达水平(0.487 ± 0.012)较正常对照组(0.251 ± 0.012)和 TGF- β 诱导组(0.151 ± 0.015)明显增高($P < 0.001$); ②Real-time PCR 检测结果显示 TGF- β 诱导组足细胞 Podocin 的 mRNA 表达水平(0.285 ± 0.013)较正常对照组(1.057 ± 0.090)明显降低($P < 0.001$), 而质粒转染组足细胞 Podocin 的 mRNA 表达水平(0.693 ± 0.077)较 TGF- β 诱导组有升高趋势($P = 0.003$); TGF- β 诱导组和质粒转染组足细胞的 α -SMA (1.257 ± 0.039 和 1.028 ± 0.093)、VIM (1.114 ± 0.097 和 0.821 ± 0.059)的 mRNA 表达较正常对照组(0.357 ± 0.089 和 0.403 ± 0.020)明显升高($P < 0.001$), 质粒转染组足细胞 α -SMA 和 VIM 的 mRNA 较 TGF- β 诱导组有下降趋势($P = 0.011$, $P = 0.002$)。Western blot 检测结果显示 TGF- β 诱导组足细胞 Podocin 的蛋白表达水平(32.923 ± 5.301)较正常对照组(101.807 ± 9.208)明显降低($P < 0.001$), 而质粒转染组足细胞 Podocin 的蛋白表达水平(90.507 ± 7.810)较 TGF- β 诱导组有升高趋势($P < 0.001$); TGF- β 诱导组和质粒转染组足细胞的 α -SMA (116.120 ± 8.300 和 93.832 ± 10.602)、VIM (124.016 ± 9.702 和 100.801 ± 6.801)的蛋白表达较正常对照组(35.730 ± 4.892 和 43.801 ± 2.600)明显升高($P < 0.001$), 质粒转染组足细胞 α -SMA 和 VIM 的蛋白较 TGF- β 诱导组有下降趋势($P = 0.017$, $P = 0.007$)。**结论:**TGF- β 1 可诱导人足细胞发生转分化, 导致其 α -SMA、VIM 表达增高, Podocin 表达减少, BMP-7 能显著抑制此现象, 提示 BMP-7 可逆转足细胞 EMT, 对足细胞损伤具有保护作用。

【关键词】骨形成蛋白 7; 转化生长因子 β 1; 人足细胞; 上皮细胞转分化

【中图分类号】R977.15

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-03-07

Protective effect of bone morphogenetic protein 7 on TGF- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition of podocyte

Chen Liqun, Lü Zhimei, Ge Jianjian, Yu Xinyi, Gan Hua

(Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the protective effect of bone morphogenetic protein 7 on TGF- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition of podocyte. **Methods:** The pcDNA 3.1rh BMP-7 plasmid was constructed and identified. Human podocytes were cultured in vitro, with different concentrations (10, 20, 50, 100, 200 μ g/mL) of recombinant BMP-7 stimulating podocytes for 24, 48, 72 h and were collected in the cell respectively. The death rates of cells were detected by flow cytometry, and the optimal stimulation concentrations and time points of recombinant BMP-7 were selected. The experiment was divided into normal control group, TGF beta 1 stimulation group (TGF- β 1) and plasmid transfection group (PEGF-BMP). PEGF-BMP group was transfected podocyte with 100 μ g/mL recombinant BMP-7 pretreatment after 48 hours; the human podocytes of TGF- β 1 and PEGF-BMP groups were stimulated respectively with 5 ng/mL TGF- β 1. Alterations of specific markers in cultured podocytes were observed by immunofluorescence; and 72 hours after treatment, the cells of different groups were harvested, the mRNA expressions of Podocin, SMA, VIM in

作者介绍: 陈利群, Email: cqll1970@163.com,

研究方向: 肾小球肾炎发病机制研究。

通信作者: 甘 华, Email: ghzxcgkd@163.com。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研计划资助项目(编号: 2011-2-092)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180410.1326.002.html>

(2018-04-10)

podocyte were detected by RT-PCR and the protein expressions of Podocin, SMA, VIM in podocyte were detected by Western blot. **Results:** ①pcDNA 3.1rh BMP-7 plasmid was constructed successfully and stably expressed BMP-7 was transfected in human podocytes. The expression level of BMP-7 protein in PEGF-BMP group (0.487 ± 0.012) was significantly higher than that in normal control group (0.251 ± 0.012) and TGF beta induction group (0.151 ± 0.015) ($P < 0.001$). ②Real-time PCR analysis showed that mRNA expression of podocin was significantly decreased in TGF beta 1 group (0.285 ± 0.013) than in normal control group (1.057 ± 0.090) ($P < 0.001$), while mRNA expression of podocyte was increased in PEGF-BMP-7 group (0.693 ± 0.077) than in TGF beta 1 group ($P = 0.003$); the mRNA expression of α -SMA, VIM were significantly increased in TGF beta 1 group ($1.257 \pm 0.039, 1.114 \pm 0.097$) and PEGF-BMP-7 group ($1.028 \pm 0.093, 0.821 \pm 0.059$) than in normal control group ($0.357 \pm 0.089, 0.403 \pm 0.020$) ($P < 0.001$), but mRNA expression of α -SMA, VIM were decreased in PEGF-BMP group than in TGF beta 1 group ($P = 0.011, P = 0.002$). Western blot showed that protein expression of podocin was significantly decreased in TGF beta 1 group (32.923 ± 5.301) than in normal control group (101.807 ± 9.208) ($P < 0.001$), while protein expression of podocyte was increased in PEGF-BMP-7 group (90.507 ± 7.810) than in TGF beta 1 group ($P < 0.001$); the protein expression of α -SMA, VIM were significantly increased in TGF beta 1 group ($116.120 \pm 8.300, 124.016 \pm 9.702$) and PEGF-BMP group ($93.832 \pm 10.602, 100.801 \pm 6.801$) than in normal control group ($35.730 \pm 4.892, 43.801 \pm 2.600$) ($P < 0.001$), but protein expressions of α -SMA, VIM were decreased in PEGF-BMP-7 group than in TGF beta 1 group ($P = 0.017, P = 0.007$). **Conclusion:** The expression of α -SMA and VIM in human podocyte induced by TGF beta 1 was increased, podocin expression decreased, while BMP-7 inhibited this effect and showed the protective effect on podocyte.

[Key words] bone morphogenetic protein 7; transforming growth factor beta 1; podocyte; epithelial-mesenchymal transition

足细胞是肾小球滤过屏障最外层的肾小球脏层上皮细胞,是一个高度分化的细胞,损伤后很难再生。近年来有研究表明^[1-3],在足细胞损伤时也可发生上皮-间充质细胞转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。足细胞发生 EMT 后将会导致肾小球滤过屏障受损,出现蛋白尿,严重时可导致足细胞从肾小球基底膜上脱离或凋亡,加重蛋白尿及肾小球硬化,其损伤的严重程度能预测和判断蛋白尿的发生与发展^[4]。因此抑制足细胞转分化、维持足细胞正常形态是阻断肾病进展的关键。

骨形成蛋白(bone morphogenetic protein 7, BMP-7)属于转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)细胞因子超家族成员, BMP-7 是调控胚胎期肾脏发育过程中间充质细胞向上皮细胞转分化的重要细胞因子。BMP-7 不仅在肾脏发育过程中具有重要作用,而且还与多种肾脏疾病的发生、发展和转归有着密切的联系。目前 BMP-7 在肾脏足细胞转分化中的作用机制尚未明确。

本实验利用表达人 BMP-7 基因的重组腺病毒载体,观察 BMP-7 对转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)诱导的人足细胞转分化的影响,探讨 BMP-7 在足细胞转分化中的作用及其可能机制,为临床肾病治疗提供新的理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物有限公司);逆转录聚合酶链反应试剂盒(大连宝生物工程有限公司);倒置荧光显微镜(Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany);T4 DNA 连接酶、Hind III、BamH I 购自美国Takara 公司;引物由上海生物工程技术有限公司合成。人抗 BMP-7、nephrin、VEGF 和 WT-1 抗体,羊抗人 Podocin 多克隆抗体、 α -SMA、Vimentin 均购自美国 SantaCruz 公司。

1.2 人足细胞培养

切除尿常规和肾功能检查无异常的肾脏肿瘤患者的肾组织,立即放入 4℃的 RPMI1640 培养液中。分离肾皮质,在 80 目筛网上剪碎、研磨至糜状,滤液依次过 40、120 目筛网,最后收集 120 目筛网上的肾小球,1 000 r/min 离心 5 min,去上清,完全培养基重悬肾小球,转入培养瓶培养,培养条件为 37℃、5% CO₂ 和 95% O₂ 培养 1 周后,过筛去除肾小球,再传代培养 7 d 后行免疫荧光染色,经过固定、穿孔破膜,1% BSA 封闭后分别加一抗 nephrin(1:50)、VEGF(1:100)和 WT-1(1:100)4℃过夜,再加 1:200 二抗室温避光反应 1 h,上述 3 种蛋白同时阳性的细胞鉴定为足细胞。

1.3 pcDNA 3.1rh BMP-7 质粒的构建及鉴定

引物的设计与合成:根据 GenBank 中 BMP-7 cDNA 序列(109471414)设计及合成引物。插入片段制备:PCR 反应体系(50 μ L),10 $\times$ Buffer 5 μ L, dNTP 6 μ L, Mg²⁺ 5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 模板 cDNA 0.5 μ L, 上游、下游引物各 1 μ L, ddH₂O

31 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,92 $^{\circ}\text{C}$,40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$,5 min,32 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,切胶回收目的条带。PCR 产物的酶切体系:上述 PCR 产物 20 μL ,*Hind* III 2 μL ,*Bam*HI 2 μL ,10 $\times$ Buffer 5 μL ,ddH₂O 21 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,取酶切产物 7 μL 行电泳检测阳性片段。载体制备 (30 μL):pcDNA 3.1 质粒 1 μL ,10 $\times$ Buffer 3 μL ,*Hind* III 1 μL ,*Bam*HI 1 μL ,ddH₂O 24 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜,电泳后切胶回收目的片段。连接:pcDNA 3.1 载体 2 μL ,10 $\times$ T4 Buffer 1.5 μL ,T4 DNA ligation 1 μL ,插入片段 1 μL ,ddH₂O 9.5 μL ,室温下反应过夜。电转入大肠杆菌 DH10B 中,Kan 筛选,阳性菌克隆接种至 4 mL LB(加 Kan),37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌过夜,提取质粒,*Eco*R I 单酶切鉴定,进一步双向测序鉴定 pcDNA3.1BMP-7。

1.4 转染人足细胞

转染前 4 h 接种 1×10^6 人足细胞于 6 孔板上,4 h 后将上述构建的质粒 2 μg ,Superfect Transfection 10 μL 和无血清培养基 400 μL ,振荡摇匀,室温孵育 20 min 左右,加入培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h,换正常培养液培养 24 h,挑选阳性克隆,筛选转染 pcDNA3.1 BMP-7 的细胞,获得稳定转染的人足细胞。

1.5 Western blot 检测转染的人足细胞

收集细胞培养上清液,加入 5 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液,沸水加热 10 min,超声仪剪切,抽取其总蛋白。12% SDS-PAGE 分离蛋白,应用电转移法将蛋白转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭过夜,先加一抗兔抗人 BMP-7(1:100)的室温孵育 2 h,PBS 清洗后再加二抗(1:200),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,ECL 发光,X 片显像。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

Annexin V 是一种 Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白,凋亡细胞的 DNA 可被碘化丙啶着色,产生红色荧光,坏死细胞则不能,故可作为检测细胞中晚期凋亡的灵敏指标之一。体外培养人足细胞,予 10、20、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组 BMP-7 刺激人足细胞,分别于 24、48、72 h 收集细胞,利用流式细胞仪检测细胞凋亡率,筛选重组 BMP-7 的最适刺激浓度和作用时间点。

1.7 细胞免疫荧光

培养的人足细胞接种于 6 孔板上,加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人重组 BMP-7 预处理 48 h 后,TGF- β 诱导组和质粒转染组再分别加 5 ng/mL TGF- β 1 刺激足细胞,72 h 后予 4%多聚甲醛固定 10 min,加 1%的 BSA(0.3% Triton X-100)1 h 室温阻止非特异性结合,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,再加 DyLight 594 标记的 IgG 抗体

在室温下反应 1 h,予 DAPI 着染细胞核,于倒置荧光显微镜下观察摄像。

1.8 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)

将体外培养人足细胞分为 3 组:正常对照组、TGF- β 诱导组(TGF- β 组)及质粒转染组(PEGF-BMP-7 组),质粒转染组足细胞根据 1.3 步骤加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的人重组 BMP-7 预处理 48 h 后,TGF- β 诱导组和质粒转染组再分别加 5 ng/mL TGF- β 1 刺激足细胞,72 h 后收集细胞,利用 Trizol 试剂抽取细胞总 RNA,取 2 μg RNA 反转录成 cDNA。Podocin、 α -SMA、Vimentin 的引物由上海生物工程技术有限公司设计并合成。引物及 PCR 扩增条件见表 1,PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,BIO-RAD 凝胶成像分析系统分析,实验结果以目的基因相对表达量[目的基因条带吸光度(absorbance,A)与 β -actin 基因条带 A 的比值]来表示。

1.9 免疫蛋白印迹(Western blot)

分离出的约 10^7 人足细胞,含 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 溶液 0.8 mL 溶解提取细胞总蛋白。取 50 μg 的蛋白质,8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至醋酸纤维素膜上,含 1%干牛奶和 1% BSA、兔 IgG(1:500)混合液封闭 1 h,分别加入一抗:羊抗人 Podocin 和多克隆抗体 1:300 稀释后(α -SMA 1:200 稀释后,Vimentin 1:500 稀释后)的单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 液洗脱后,再加兔抗羊 IgG 二抗,室温孵育 1 h,TBST 液洗脱后,与 ECL 试剂反应 1 min 左右,X 胶片显影,IBAS 图像处理系统扫描测定胶片感光去带的感光密度,并进行积分处理。

1.10 统计学处理

所有资料采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理数据,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组质粒 pcDNA3.1rh BMP-7 鉴定

*Eco*R1 酶单酶切重组质粒 pcDNA3.1rh BMP-7,其酶切产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后可见 490 bp 左右条带(图 1 上图)。

2.2 稳定转染人足细胞 BMP-7 蛋白表达

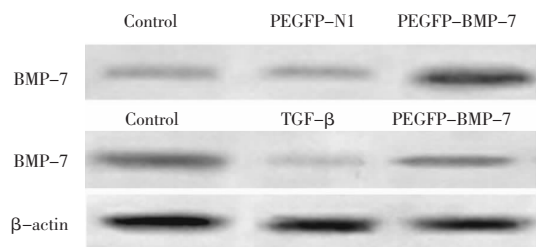
正常对照组、TGF- β 诱导组和质粒转染组足细胞 BMP-

表 1 目的基因引物序列及其扩增条件、扩增产物

Tab.1 Primer sequences amplification conditions and products of the target gene

引物名称	引物序列	扩增条件	扩增产物长度 (bp)
Podocin	F:5' -TCAAGCCCTCTGGATTAG-3'	95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,	392
	R:5' -CTTCATGCTGCTTTCAT-3'	72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,30 个循环	
α -SMA	F:5' -TCT GTA AGG CCG GCT TTG-3'	95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,	585
	R:5' -TCACGCTCAGCAGTAGTAACG-3'	72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,40 个循环	
Vimentn	F:5' -CTCTGGCAGCTCTTGACCTT-3'	95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火	332
	R:5' -CTGCACCTGTCTCCGGTATT-3'	1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,32 个循环	

7 蛋白表达分别为 0.251 ± 0.012 、 0.151 ± 0.015 和 0.487 ± 0.012 ; 3 组的 BMP-7 蛋白表达水平的差异具有统计学差异 ($F=522.190, P=0.000$)。TGF- β 诱导组的 BMP-7 蛋白表达水平较正常对照组低 ($P=0.000$), 而质粒转染组 BMP-7 蛋白表达水平较正常对照组和 TGF- β 诱导组明显增高 ($P=0.000$), 有统计学意义 (图 1 下图)。



上图 重组质粒 pcDNA3.1rh BMP-7 的 EcoRI 酶单酶产物

下图 Western blot 法检测人足细胞的 BMP-7 蛋白表达

图 1 重组质粒 pcDNA3.1rh BMP-7 鉴定和人足细胞 BMP-7 蛋白表达

Fig.1 Recombinant plasmid pcDNA3.1rh BMP-7 was identified and the protein expression of BMP-7 in podocytes were detected by Western -blot

2.3 流式细胞仪检测足细胞凋亡率

体外培养人足细胞, 细胞培养 24、48、72 h 分别收集细胞, 不同浓度 (10、20、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 的重组 BMP-7 在刺激足细胞 48 h, 其足细胞凋亡率分别为 4%、5.7%、6.8%、8%、10%。而正常对照组足细胞基本上没有发生凋亡。故选择 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 48 h 为最适刺激浓度和时间点。

2.4 免疫荧光观察 BMP-7 对足细胞 Podocin、 α -SMA、VIM 的影响

正常情况下, 足细胞特异性标志物免疫荧光显示呈强阳性, 本实验结果可看出 TGF- β 1 刺激 72 h 后, 足细胞的 Podocin、 α -SMA、VIM 表达减弱, 而质粒转染足细胞的 Podocin、 α -SMA、VIM 表达增强, 如图 2~4 所示。

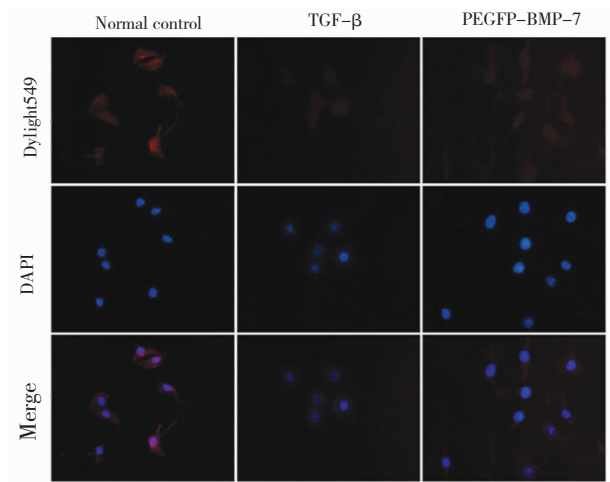


图 2 人足细胞 Podocin 的表达

Fig.2 Expression of Podocin in human podocytes

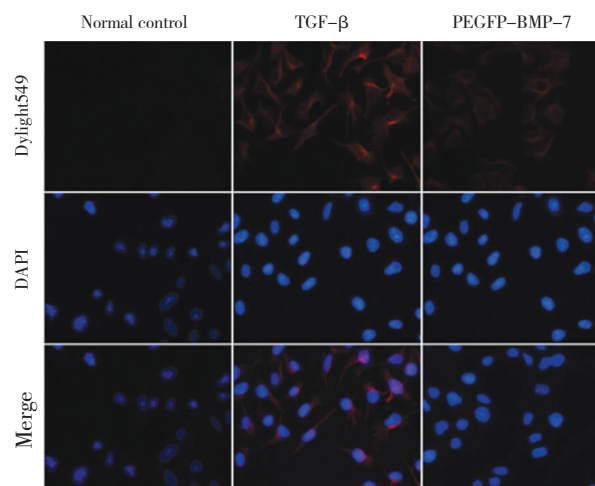


图 3 人足细胞 α -SMA 的表达

Fig.3 Expression of α -SMA in human podocytes

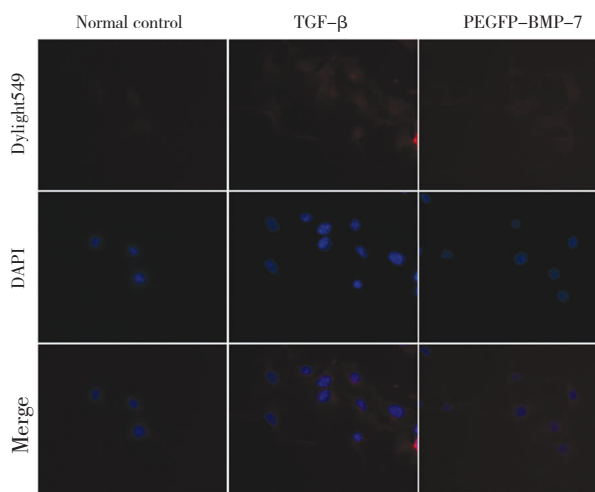


图 4 人足细胞 VIM 的表达

Fig.4 Expression of VIM in human podocytes

2.5 Real-time PCR 检测 BMP-7 对 TGF- β 1 诱导足细胞 Podocin、 α -SMA、VIM 的 mRNA 表达的影响

正常对照组、TGF- β 诱导组和质粒转染组足细胞 Podocin 的 mRNA 表达水平分别为 1.057 ± 0.090 、 0.285 ± 0.013 和 0.693 ± 0.077 ; 3 组足细胞 Podocin 的 mRNA 表达水平差异具有统计学意义 ($F=43.404, P=0.000$); TGF- β 诱导组足细胞 Podocin 的 mRNA 表达水平明显低于正常对照组 ($P=0.000$), 但质粒转染组足细胞 Podocin 的 mRNA 表达水平较 TGF- β 诱导组有升高趋势 ($P=0.003$)。正常对照组、TGF- β 诱导组和质粒转染组足细胞 α -SMA 的 mRNA 表达水平分别为 0.357 ± 0.089 、 1.257 ± 0.039 和 1.028 ± 0.093 ; 3 组足细胞 α -SMA 的 mRNA 表达水平差异具有统计学意义 ($F=108.840, P=0.000$); TGF- β 1 诱导组足细胞 α -SMA 的 mRNA 表达明显高于正常对照组 ($P=0.000$), 但质粒转染组足细胞 α -SMA 的 mRNA 表达较 TGF- β 诱导组有下降趋势 ($P=0.011$)。正常

对照组、TGF- β 诱导组和质粒转染组足细胞 VIM 的 mRNA 表达水平分别为 0.403 ± 0.020 、 1.114 ± 0.097 和 0.821 ± 0.059 ;3 组足细胞 VIM 的 mRNA 表达水平差异具有统计学意义 ($F=86.467$, $P=0.000$);TGF- β 诱导组足细胞 VIM 的 mRNA 表达明显高于正常对照组 ($P=0.000$),但质粒转染组足细胞 VIM 的 mRNA 表达较 TGF- β 诱导组有下降趋势 ($P=0.002$)。见表 2。

表 2 Real-time PCR 检测足细胞 Podocin、 α -SMA、VIM 的 mRNA 相对表达量

Tab.2 The mRNA expression of Podocin, α -SMA, VIM in podocytes detected by real-time PCR

组别	Podocin	α -SMA	VIM
正常对照组	1.057 ± 0.090	0.357 ± 0.089	0.403 ± 0.020
TGF- β 诱导组	0.285 ± 0.013^a	1.257 ± 0.039^a	1.114 ± 0.097^a
质粒转染组	0.693 ± 0.077^{bc}	1.028 ± 0.093^{ad}	0.821 ± 0.059^{ac}
F 值	43.404	108.840	86.467
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与正常对照组比较, $P < 0.001$;b,与正常对照组比较, $P=0.003$;c,质粒转染组与 TGF- β 诱导组比较, $P=0.002$;d,质粒转染组与 TGF- β 诱导组比较, $P=0.011$;e,质粒转染组与 TGF- β 诱导组比较, $P=0.005$

2.6 Western blot 检测 BMP-7 对 TGF- β 1 诱导足细胞 Podocin、 α -SMA、VIM 蛋白表达的影响

正常对照组、TGF- β 诱导组和质粒转染组足细胞 Podocin 的蛋白表达水平分别为 101.807 ± 9.208 、 32.923 ± 5.301 和 90.507 ± 7.810 ;3 组足细胞 Podocin 的蛋白表达水平差异具有统计学意义 ($F=70.738$, $P=0.000$);TGF- β 诱导组足细胞 Podocin 的蛋白表达水平明显低于正常对照组 ($P=0.000$),但质粒转染组足细胞 Podocin 的蛋白表达水平较 TGF- β 诱导组有升高趋势 ($P=0.000$),而与正常对照组比较差异无统计学意义 ($P=0.119$)。正常对照组、TGF- β 诱导组和质粒转染组足细胞 α -SMA 的蛋白表达水平分别为 35.730 ± 4.892 、 116.120 ± 8.300 和 93.832 ± 10.602 ;3 组足细胞 α -SMA 的蛋白表达水平差异具有统计学意义 ($F=75.427$, $P=0.000$);TGF- β 诱导组足细胞 α -SMA 的蛋白表达明显高于正常对照组 ($P=0.000$),但质粒转染组足细胞 α -SMA 的蛋白表达较

TGF- β 诱导组有下降趋势 ($P=0.017$)。正常对照组、TGF- β 诱导组和质粒转染组足细胞 VIM 的蛋白表达水平分别为 43.801 ± 2.600 、 124.016 ± 9.702 和 100.801 ± 6.801 ;3 组足细胞 VIM 的蛋白表达水平差异具有统计学意义 ($F=104.215$, $P=0.000$);TGF- β 诱导组足细胞 VIM 的 mRNA 表达明显高于正常对照组 ($P=0.000$),但质粒转染组足细胞 VIM 的 mRNA 表达较 TGF- β 诱导组有下降趋势 ($P=0.007$)。见表 3。

3 结 论

蛋白尿发生的关键因素主要是足细胞损伤,在缺氧、药物、高糖、TGF- β 等病理损伤的刺激下足细胞发生由上皮细胞向间充质细胞的转分化改变,使足细胞形态学结构发生变化,失去其特异性,从而损害肾小球滤过屏障的完整性而引发蛋白尿,故足细胞的保护作用越来越受到关注^[5-7]。足细胞在损伤早期主要表现为间充质转分化,包括裂隙膜相关蛋白 (Podocin、P-cadherin、Nephrin) 及骨架相关蛋白 (α -actinin-4、F-actin) 表达减少,而 EMT 相关蛋白,如肌动蛋白 α -SMA、结蛋白 desmin、ZO-1、成纤维细胞特异蛋白-1 (FSP-1) 等表达上调。Yamaguchi 等^[8]发现在糖尿病肾病患者尿中的足细胞处于非凋亡状态,但足细胞表达成纤维细胞特异蛋白-1 升高,提示足细胞发生转分化改变,故从肾小球基底膜脱落,导致蛋白尿出现。另外在高糖环境或 AGEs 等诱导足细胞 ZO-1 的表达异常,同时伴随着蛋白尿的产生^[8]。因此,观察 Podocin、 α -SMA、VIM 表达可间接反映足细胞 EMT 的发生发展过程。

在多种细胞的 EMT 过程中,转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 被认为是最重要的诱导因子之一^[9]。因此本研究选用 TGF- β 1 作为处理因素,观察重组 BMP-7 对 TGF- β 1 诱导的人足细胞转分化的影响。本实验结果表明,TGF- β 1 刺激人足细胞后,足细胞 α -SMA、VIM 的 mRNA 和蛋白表达升高,而 Podocin 的 mRNA 和蛋白表达水

表 3 Western blot 检测足细胞 Podocin、 α -SMA、VIM 的蛋白表达

Tab.3 The protein expression of Podocin, α -SMA, VIM in podocytes detected by Western blot

组别	Podocin	α -SMA	VIM
正常对照组	101.807 ± 9.208	35.730 ± 4.892	43.801 ± 2.600
TGF- β 诱导组	32.923 ± 5.301^a	116.120 ± 8.300^a	124.016 ± 9.702^a
质粒转染组	90.507 ± 7.810^{bc}	93.832 ± 10.602^{ad}	100.801 ± 6.801^{ac}
F 值	70.738	75.427	104.250
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与正常对照组比较, $P < 0.001$;b,与正常对照组比较, $P=0.119$;c,质粒转染组与 TGF- β 诱导组比较, $P < 0.001$;d,质粒转染组与 TGF- β 诱导组比较, $P=0.017$;e,质粒转染组与 TGF- β 诱导组比较, $P=0.007$

平下降,进一步证实 TGF- β 1 可诱导人足细胞发生转分化。

BMP-7 是 BMPs 家族的一员,具有多种重要的生理作用。BMP-7 主要集中于肾脏的集合管和足细胞,足细胞表面存在 BMP-7 受体,其与 BMP-7 结合,对足细胞起保护作用。BMP-7 是重要的足细胞存活因子及抗纤维化因子^[10]。近年来,肾脏病动物实验模型发现,某些肾脏病的发生与 BMP-7 减少有关^[11-14],在糖尿病肾病患者和糖尿病肾病动物模型中,在高糖环境下,肾小球足细胞的 BMP-7 表达明显下降,而维持 BMP-7 的活性可防止甚至逆转糖尿病肾病功能性和结构性改变^[15-16]。体外研究中发现 BMP-7 能减轻高糖对肾小球系膜细胞、足细胞或肾小管上皮细胞的损害,减少细胞外基质产生,提示 BMP-7 有肾脏保护作用^[17]。但关于 BMP-7 在足细胞转分化作用及机制尚缺乏研究。

转分化生长因子 β 1 和骨形成蛋白 7 是一对相互拮抗的调控凋亡的细胞因子,调节 TGF- β 1/BMP-7 平衡对足细胞病的治疗有潜在价值^[18]。在嘌呤核苷酸诱导的肾病大鼠模型中,活性维生素 D 可以恢复 TGF β 1/BMP-7 平衡,从而减轻足细胞损伤和蛋白尿^[13]。本研究选用人足细胞为对象,构建表达 BMP-7 的重组质粒,且能稳定转染人足细胞,观察重组 BMP-7 对 TGF- β 1 诱导的人足细胞转分化的作用。本实验研究发现,TGF- β 1 刺激人足细胞后,足细胞 α -SMA、VIM 的 mRNA 和蛋白表达升高,而 Podocin 的 mRNA 和蛋白表达水平下降,使用重组 BMP-7 后,足细胞 α -SMA、VIM 的 mRNA 和蛋白表达较 TGF- β 1 诱导组明显下降,而 Podocin 的 mRNA 和蛋白表达水平升高,提示 BMP-7 可能逆转了 TGF- β 1 诱导的足细胞转分化,推测其可能的机制与其直接抑制 TGF- β 1 有关。目前 BMP-7 抑制 TGF- β 1 诱导的足细胞表型转化的分子机制及信号途径尚未阐明,而且对肾脏病动物模型及患者的足细胞损伤的干预作用也不明确,需要进一步研究探讨。

参 考 文 献

- [1] Leeuwis JW, Nguyen TQ, Dendooven A, et al. Targeting podocyte-associated diseases[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62(14): 1325-1336.
- [2] Zhang C, Xia M, Boini KM, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in podocytes mediated by activation of NADPH oxidase in hyperhomocysteinemia[J]. *Pflugers Arch*, 2011, 462(3): 455-467.
- [3] Yamaguchi Y, Iwano M, Suzuki D, et al. Epithelial-mesenchymal

transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 54(4): 653-664.

- [4] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(2): 212-222.
- [5] Lee HS. Mechanisms and Consequences of TGF- β overexpression by podocytes in progressive podocyte disease[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 129-140.
- [6] Lü S, Liu G, Sun A, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate diabetic glomerular fibrosis in vivo and in vitro by inhibiting TGF- β signalling via secretion of bone morphogenetic protein 7[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2014, 11(4): 251-261.
- [7] Du M, Wang Q, Li W, et al. Overexpression of FOXO1 ameliorates the podocyte epithelial-mesenchymal transition induced by high glucose in vitro and in vivo[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(4): 416-422.
- [8] Ha TS, Choi JY, Park HY, et al. Ginseng total saponin improves podocyte hyperpermeability induced by high glucose and advanced glycosylation endproducts[J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26(10): 1316-1321.
- [9] Nyhan KC, Faherty N, Murray G, et al. Jagged/notch signalling is required for a subset of TGF β 1 responses in human kidney epithelial cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(12): 1386-1395.
- [10] Phillips AO, Fraser DJ. BMP-7 stops TGF- β in peritoneal fibrosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(4): 1036-1038.
- [11] Mitu GM, Wang S, Hirschberg R. BMP7 is a podocyte survival factor and rescues podocytes from diabetic injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(5): F1641-1648.
- [12] Leeuwis JW, Nguyen TQ, Chuva De Sousa Lopes SM, et al. Direct visualization of Smad1/5/8-mediated transcriptional activity identifies podocytes and collecting ducts as major targets of BMP signalling in healthy and diseased kidneys[J]. *J Pathol*, 2011, 224(1): 121-132.
- [13] Xiao HQ, Shi W, Liu SX, et al. Podocyte injury is suppressed by 1, 25-dihydroxyvitamin D via modulation of transforming growth factor- β 1/bone morphogenetic protein-7 signalling in puromycin aminonucleoside nephropathy rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(7): 682-689.
- [14] Yamada S, Nakamura J, Asada M, et al. Twisted gastrulation, a BMP antagonist, exacerbates podocyte injury[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89135.
- [15] Ivanac-Janković R, Čorić M, Furić-Čunko V, et al. BMP-7 protein expression is downregulated in human diabetic nephropathy[J]. *Acta Clin Croat*, 2015, 54(2): 164-168.
- [16] Kumar PA, Welsh GI, Raghu G, et al. Carboxymethyl lysine induces EMT in podocytes through transcription factor ZEB2; implications for podocyte depletion and proteinuria in diabetes mellitus[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 590(3): 10-19.
- [17] Chen T, Zheng LY, Xiao W, et al. Emodin ameliorates high glucose induced-podocyte epithelial-mesenchymal transition in-vitro and in-vivo[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(4): 1425-1436.
- [18] Tossidou I, Schiffer M. TGF- β /BMP pathways and the podocyte[J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(4): 368-376.

(责任编辑:方 济)