

LIF 诱导小鼠胚胎后肾间充质细胞分化形成肾上皮细胞

唐国华¹, 屈丽华²

(1. 南华大学生命科学研究中心, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学医学院组织学与胚胎学教研室)

摘要: **目的** 观察白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)能否诱导后肾间充质细胞(metanephric mesenchymal cells, MMCS)分化形成肾上皮细胞,并探讨其机制。 **方法** 取孕 11.5 天的鼠胚胎,分离后肾间充质组织,去除输尿管芽,Pax-2 染色鉴定。对鉴定后的肾间充质细胞进行体外培养,并在培养液中加入细胞因子成纤维细胞生长因子(FGF2)、转化生长因子(TGF- α)和 LIF 进行诱导,用免疫荧光染色和 RT-PCR 检测后肾间充质细胞分化形成肾上皮细胞过程中的形态学和基因表达变化。 **结果** 经细胞因子 LIF 处理,后肾间充质细胞由排列杂乱无序的细胞发育形成有连续基底膜的肾小球。RT-PCR 检测发现上皮细胞标记因子(E-cadherin、Collagen IV、podocalyxin)的表达逐渐增高。 **结论** LIF 能诱导后肾间充质细胞分化形成肾上皮细胞,可为肾脏疾病的细胞治疗提供实验依据。

关键词: 后肾间充质细胞; 上皮细胞; 白血病抑制因子; 诱导

中图分类号:Q21 文献标识码:A

LIF on Induced Mesenchymal-epithial Conversion in Mouse Metanephros

TANG Guohua, QU Lihua

(Life Science Research Center, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the biological characteristic in mesenchymal-epithial conversion. **Methods** We isolated the metanephric mesenchyme cells from E11.5 embryo without Ureteric Bud and identified it with Pax-2 staining. **Results** The isolated metanephric mesenchyme cells developed from a disorganised array into small chains with continuous basement membranes in the presence of Leukemia inhibitory factor (LIF). And RT-PCR results showed the expression of the marker protein of epithelial cell, such as E-cadherin, Collagen IV, and podocalyxin were also affected. **Conclusion** LIF induced mesenchymal-epithial conversion in mouse metanephros.

Key words: metanephric mesenchyme cells; epithelial cells; Leukemia inhibitory factor; induce

肾脏是人体重要的器官,不仅能分泌尿液、排泄代谢废物,还具有调节血压、体液平衡,以及骨骼密度的功能。全球有 10% 的慢性肾脏疾病患者进展为慢性肾功能不全、尿毒症,是导致人类死亡的主要原因之一^[1-2]。国内外学者们一直致力于研究肾脏发育的分子机制,并试图利用干细胞移植,修复肾脏损伤,重建终末期肾病患者肾脏的功能。

胚胎后肾间充质细胞是一种多潜能干细胞,研

究表明它能分化形成肾上皮细胞^[3-4]。因此,利用后肾间充质细胞移植治疗很可能成为改善急性肾小管坏死预后的重要方法^[4-5]。白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是一类细胞因子,最早发现于小鼠 Krebs II 腹水瘤细胞条件培养液中,能诱导白血病细胞株 M1 细胞向正常细胞分化^[6]。已有研究报道 LIF 能诱导神经前体细胞分化为星形胶质细胞、少突神经胶质细胞及感觉神经元^[7-8]; JAK-STAT 信号介导的 LIF 受体激活是形成上皮小管所必需^[9-10],提示 LIF 在细胞分化过程中具有重要作用。本文分离并鉴定后肾间充质细胞,利用体外细胞培养技术,在培养液中加入细胞因子 LIF 进行诱

收稿日期:2013-05-27

基金项目:湖南省自然科学衡阳市联合基金(10JJ9016)资助。

作者简介:唐国华,学士,副教授,研究方向:细胞生物学, E-mail: tgh1@163.com.

导,用免疫荧光染色和 RT-PCR 检测后肾间充质细胞分化形成肾上皮细胞过程中的形态学和基因表达变化,旨在阐明后肾间充质细胞分化形成上皮细胞过程中的生物学特性变化,理解肾脏发生和发育过程,为肾脏组织工程学研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Balb/c 小鼠(湖南斯莱克景达实验动物有限公司);兔多克隆抗体 Pax2 (1:250,Abcam),laminin $\alpha 5$ (1:250,Abcam),anti-rabbit FITC (1:250,Santa Cruz);DMEM-LG 培养基(Gibco);胎牛血清 FBS (Gibco);胰酶(Amersco);转化生长因子(transforming growth factor alpha,TGF- α) (10 ng/mL,Boehringer Mannheim),成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF 2)

(50 ng/mL,Boehringer Mannheim)和白血病抑制因子 LIF (10 units/mL,Chemicon);RNeasy Mini Kit (Qiagen);Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen);引物(Invitrogen);VECTASHIELD Fluorescent Mounting Media(Vector Laboratories)。

1.2 方法

1.2.1 后肾间充质细胞的分离和培养 取孕 11.5 天 Balb/c 雌鼠(以发现阴栓当日为受孕 0.5 天),断颈处死,在解剖显微镜下剥离胎盘,获取 E11.5 小鼠胚胎。未分化的后肾间充质细胞位于胚胎后肢的后 1/3 处,即输尿管的背侧,输尿管芽向背部延伸处^[11]。在小鼠前肢下方横向剪断,沿胚胎神经管纵向剪开,截断尾部;根据后肾位置及其形状分离得到胚胎后肾间充质组织,去除输尿管芽(图 1);将解剖分离后组织置于 4℃ 预冷的 DMEM 清洗备用。

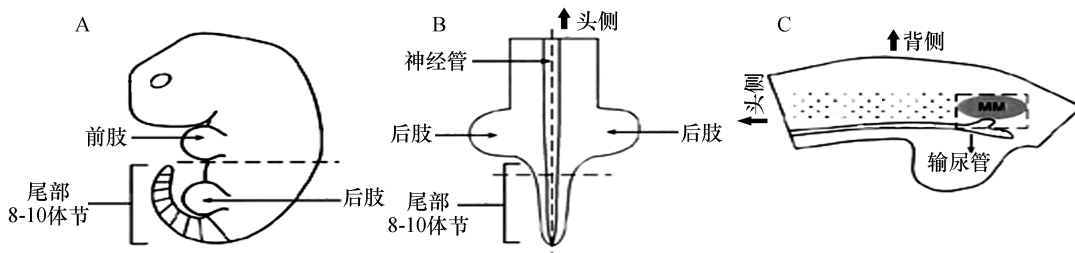


图 1 分离后肾间充质组织解剖示意图 A:沿虚线,即从胚胎前肢的下方横向剪断;B:沿神经管纵向剪开,并截去尾部,使输尿管暴露于视野下;C:未分化的后肾间充质细胞(MM)位于胚胎后肢的后 1/3 处,即输尿管芽向背部延伸处

1.2.2 后肾间充质细胞的培养和分化诱导 将解剖分离的后肾组织在胶原酶溶液中(DMEM + 10% FBS + 0.2% 胶原酶 + 50 IU/mL DNase) 37℃ 孵育 15 min;残存后肾组织以 0.25% 胰酶/0.02% EDTA (1:1) 室温消化至组织块消失;加入含 10% FBS 的 DMEM,1 000 r/min 离心 5 min;弃上清,含 10% FBS 的 DMEM 重悬细胞,细胞浓度调整至 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$,放入 37℃、含 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。分别加入生长刺激因子 TGF- α (10 ng/mL)、FGF 2 (50 ng/mL) 和 LIF (10 units/mL),以诱导后肾间充质细胞分化形成肾上皮细胞^[3,12-14]。

1.2.3 后肾间充质细胞的鉴定 将解剖分离好的后肾间充质组织或者涂有后肾间充质细胞的玻片放在 4% 多聚甲醛固定 20 min;PBST (0.2% 的 Triton X-100) 处理 10 min,增加膜的通透性;含 1% BSA 的 PBS 封闭 15 min;加入一抗 Pax2 (1:250,Abcam) 或

laminin $\alpha 5$ (1:250,Abcam) 4℃ 孵育过夜;PBS 洗 3 次,每次 5 min;加入荧光素标记的二抗 anti-rabbit FITC (1:250,Santa Cruz) 室温下避光孵育 1 h;PBS 洗 3 次,每次 5 min;防荧光淬灭封片剂(VECTASHIELD)固定,荧光显微镜下观察。

1.2.4 RT-PCR 分析 RNeasy Mini Kit 试剂盒提取分离好的小鼠后肾间充质细胞 RNA(见试剂盒抽提方法);分光光度计(Nanodrop)检测 RNA 的浓度和质量;Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase 合成 cDNA (500ngRNA 每个反应)。引物序列如下:

Wt1	forward:5-GGAAGTGATTTCGAAATGATGTG,
	reverse:5-ATGGTITGGGGAAGTGCAGCGG;
Wnt4	forward:5-GTGACCGGACAGTGCACGGG,
	reverse:5-GGTACAGCAGCCAGCAGCGT;
Pax2	forward:5-GTGGTGAGGCAGCGCATCGT,
	reverse:5-ATGCCCTCGGCTAGCAGCCT;
Collagen IV	forward:5-GTGGTGAGGCAGCGCATCGT,

	reverse;5-ATGCCCTCGGCTAGCAGCCT;
E-cadherin	forward;5-GGAAGTGATTGCGAAATGATGTG,
	reverse;5-TCAGAACCACTCCCCTCATAG;
Laminin α 5	forward;5-GACTGGCGCTGCTAGGCCGAG,
	reverse;5-CAGCGCTCCGTGCCATCGAT;
Podocalyxin	forward;5-CAAGGGAGCGCCTGCTGTCG,
	reverse;5-AATGCCTGCTGGTCCCGGCT;

2 结 果

2.1 小鼠后肾间充质组织的分离和鉴定

利用后肾间充质细胞标记基因 Pax-2 抗体,对解剖分离得到的后肾组织进行染色,免疫组化分析表明小鼠后肾间充质组织定位正确(图2)。

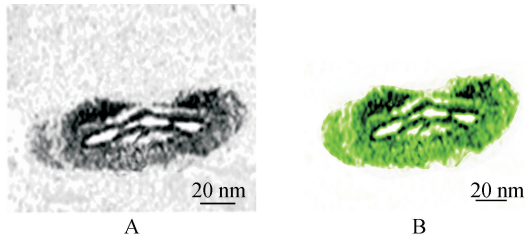


图2 Pax2 抗体鉴定后肾间充质组织 A:普通光学显微镜观察;B:荧光显微镜剥离 E12.5 胚胎中的后肾间充质组织,兔多克隆抗体 Pax2 染色,表达阳性

2.2 后肾间充质细胞的分化诱导

分离的后肾间充质组织经胶原酶和胰酶消化形成单一、悬浮的后肾间充质细胞。用免疫荧光染色检测上皮细胞基底膜极性蛋白 laminin α 5 的表达情况。结果显示:FGF2/TGF- α 培养 48 h,基底膜极性蛋白 laminin α 5 不表达,细胞无极性且排列紊乱,表明细胞还未被诱导分化为上皮细胞(图3A,3D)。加入 LIF 培养 48 h,laminin α 5 蛋白开始表达,细胞成簇,具有顶端膜等上皮细胞的特点,细胞由原来的无规则排列增殖形成“S”或“C”型小体样的链状结构(图3B,3E)。LIF 诱导 1 周后,细胞簇进一步发育形成具有连续基底膜包围的肾小管或者肾小球结构(图3C,3F)。

RT-PCR 结果显示:加入 FGF2、TGF- α 培养 48 h 后,Wt1、Pax2 和 Wnt4 等与细胞聚集形成相关的蛋白在后肾间充质细胞中有表达,早期的上皮胶原蛋白 Collagen IV 在这个时期也有表达,而特异性上皮细胞标记蛋白 E-cadherin,laminin α 5 以及足细胞标记蛋白 podocalyxin 不表达;加入 LIF 诱导培养 48 h 后,细胞粘性蛋白 E-cadherin 以及基质蛋白 laminin α 5 开始表达,而足细胞的标志蛋白 podocalyxin 则在诱导 1 周后,才有表达,标志着肾小球开始形成(图4)。

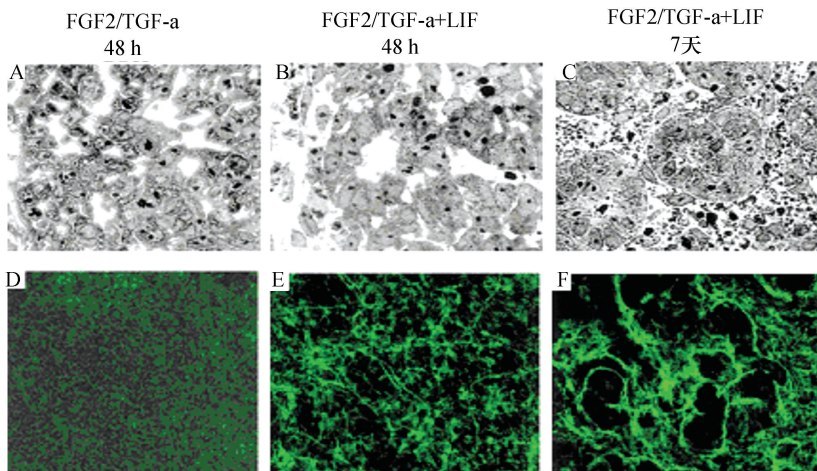


图3 LIF 诱导后肾间充质细胞分化为上皮细胞的生物形态学变化 A-C:普通光学显微镜观察;D-F:荧光显微镜. A,D:FGF2/TGF-a 处理培养后肾间充质细胞 48 h,细胞呈不规则排列,laminin α 5 不表达;B,E:FGF2/TGF-a/LIF 处理培养后肾间充质细胞 48 h,细胞呈链状排列,伴随着基底膜蛋白 laminin α 5 的表达;C,F:由基底膜蛋白 laminin α 5 包围,细胞开始形成管状和早期的肾小球结构

3 讨 论

后肾间充质细胞是肾脏的多能干细胞,经过间

充质-上皮细胞的分化过程,形成极性细胞,最终能分化为肾单位^[3,15-16]。肾单位是肾脏的结构和功能单位。因此,利用后肾间充质细胞治疗肾脏疾病成为国际研究焦点。

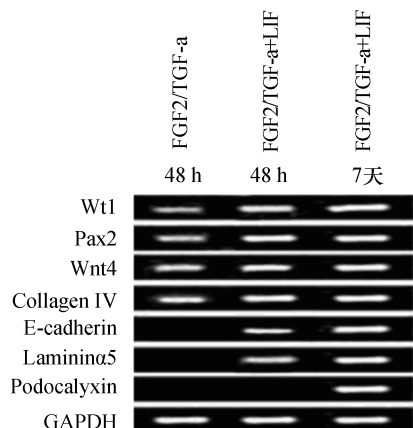


图4 RT-PCR检测后肾间充质细胞分化形成上皮细胞过程中的基因表达变化

肾脏发育过程中,肾单位上皮细胞的形成是受各种不同细胞之间信号相互作用。该相互作用包括输尿管芽、后肾间充质细胞和肾基质三者之间的网络调控^[16-21]。本实验分离了上皮始祖细胞(即后肾间充质细胞),直接采用上皮细胞发育所需的生长因子处理,使得复杂的调控网络简单化。转化生长因子(TGF-α)和成纤维细胞生长因子(FGF)是保持细胞正常生长和增殖,并保证细胞分化为上皮细胞所必需的刺激因子。若无上述刺激因子,后肾间充质细胞会出现凋亡现象^[22];加入 FGF2/TGF-α 处理,后肾间充质细胞至少能存活 1 周以上,但并不能诱导分化形成上皮细胞^[3,23]。而白血病抑制因子(LIF)是后肾间充质细胞分化为肾上皮细胞所必需的因子^[12,14]。本实验中生长刺激因子作用对象为单一的上皮始祖细胞,排除了输尿管芽或者肾基质对后肾间充质作用的干扰,研究了转录调控子(Pax-2, WT-1),细胞基质蛋白(E-cadherin, lamininα5, Collagen IV),糖蛋白(Podocalyxin),信号分子(Wnt4)与肾上皮细胞各个发育阶段之间的直接关系,解决了细胞示踪技术不成熟这一难题。

本实验利用 LIF 诱导单一后肾间充质细胞的模型,对后肾间充质分化为上皮细胞的生物学特性进行了研究。laminin α5 免疫荧光染色结果显示,无 LIF 处理,后肾间充质细胞不能分化形成上皮细胞;加入 LIF 刺激,无规则排列的细胞增殖聚集(图 3A,3D),形成“S”或“C”型小体样的链状结构(图 3B,3E),进一步发育形成连续基底膜包围的肾小管或者肾小球结构(图 3C,3F)。本实验还发现,在 TGF-α 和 FGF 诱导下,后肾间充质细胞高表达

Pax2、WT-1、Wnt4 和 Collagen IV,使得后肾间充质细胞区别于其他间质细胞^[24-26]。Collagen IV 的高表达标志着后肾间充质细胞已经在向上皮细胞转化^[24]。但是 E-cadherin, lamininα5, podocalyxin 等细胞极性标记分子只有在加入刺激因子 LIF 后才开始表达,细胞极性标记分子的表达标志着肾小球的形成(图 4)^[27-29]。综上所述,本课题组成功分离了后肾间充质细胞,证实了 LIF 能诱导小鼠后肾间充质细胞分化为肾小囊和肾小管上皮细胞,LIF 诱导细胞分化过程中伴随细胞极性标记分子基因的高表达,本研究为阐明肾脏发生发育的分子机制及慢性肾脏疾病的细胞治疗法提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Hadaya K, de Rham C, Bandelier C, et al. Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2008, 8 (12): 2674-2683.
- [2] Coresh J, Levey AS, Levin A, et al. A stable definition of chronic kidney disease improves knowledge and patient care [J]. *BMJ*, 2013, 347 (11): 5553.
- [3] Karavanova ID, Dove LF, Resau JH, et al. Conditioned medium from a rat ureteric bud cell line in combination with bFGF induces complete differentiation of isolated metanephric mesenchyme [J]. *Development*, 1996, 122 (12): 4159-4167.
- [4] Villanueva S, Ewertz E, Carrion F, et al. Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 121 (11): 489-499.
- [5] Yokote S, Yokoo T. Organogenesis for kidney regeneration [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2013, 18 (2): 186-190.
- [6] Metcalf D, Hilton D, Nicola N. Clonal analysis of the actions of the murine leukemia inhibitory factor on leukemic and normal murine hemopoietic cells [M]. *Leukemia*, 1988, 2(4): 216.
- [7] Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, et al. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway [J]. *Science*, 1997, 278 (5337): 477-483.
- [8] Murphy M, Reid K, Hilton DJ, et al. Generation of sensory neurons is stimulated by leukemia inhibitory factor [J]. *PNAS*, 1991, 88 (8): 3498-3501.
- [9] Boccaccio C, Andò M, Tamagnone L, et al. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the

- STAT pathway[J]. *Nature*, 1998, 391(6664):285-288.
- [10] Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor[J]. *Science*, 1998, 281(5383):1683-1686.
- [11] Challen GA, Martinez G, Davis MJ, et al. Identifying the molecular phenotype of renal progenitor cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(9):2344-2357.
- [12] Barasch J, Yang J, Ware CB, et al. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF[J]. *Cell*, 1999, 99(4):377-386.
- [13] Oliver JA, Barasch J, Yang J, et al. Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(4):799-809.
- [14] Plisov SY, Yoshino K, Dove LF, et al. TGF beta 2, LIF and FGF2 cooperate to induce nephrogenesis[J]. *Development*, 2001, 128(7):1045-1057.
- [15] Yang J, Blum A, Novak T, et al. An epithelial precursor is regulated by the ureteric bud and by the renal stroma[J]. *Dev Biol*, 2002, 246(2):296-310.
- [16] Chai OH, Song CH, Park SK, et al. Molecular regulation of kidney development[J]. *Anat Cell Biol*, 2013, 46(1):19-31.
- [17] Barasch J, Qiao J, McWilliams G, et al. Ureteric bud cells secrete multiple factors, including bFGF, which rescue renal progenitors from apoptosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 1997, 273(5):757-767.
- [18] Grobstein C. Inductive interaction in the development of the mouse metanephros[J]. *J Exp Zool*, 1955, 130(2):319-339.
- [19] Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, et al. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret[J]. *Nature*, 1994, 273(5):380-383.
- [20] Barasch J, Yang J, Qiao J, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates mesenchymal growth and regulates epithelial branching during morphogenesis of the rat metanephros[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(9):1299-1307.
- [21] Barasch J. Genes and proteins involved in mesenchymal to epithelial transition[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001, 10(3):429.
- [22] Koseki C, Herzlinger D, al-Awqati Q. Apoptosis in metanephric development[J]. *J Cell Biol*, 1992, 119(5):1327-1333.
- [23] Barasch J, Pressler L, Connor J, et al. A ureteric bud cell line induces nephrogenesis in two steps by two distinct signals[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 1996, 271(1):50-61.
- [24] Dudley AT, Godin RE, Robertson EJ. Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(12):1601-1613.
- [25] Zhou TB. Signaling pathways of PAX2 and its role in renal interstitial fibrosis and glomerulosclerosis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2012, 32(6):298-303.
- [26] Hou XM, Chen X, Wang YL. The role of Pax2 in regulation of kidney development and kidney disease[J]. *Yi Chuan*, 2011, 33(9):931-938.
- [27] Mori K, Yang J, Barasch J. Ureteric bud controls multiple steps in the conversion of mesenchyme to epithelia[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(4):209-216.
- [28] Miner JH, Li C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin $\alpha 5$ demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane[J]. *Dev Biol*, 2000, 217(2):278-289.
- [29] Piepenhagen PA, Nelson WJ. Biogenesis of polarized epithelial cells during kidney development in situ: roles of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and membrane cytoskeleton organization[J]. *Mol Biology Cell*, 1998, 9(11):3161-3177.

(此文编辑:蒋湘莲)