

胚胎肾分支形态发生调控因素

王伟玲, 杨宝学

(北京大学基础医学院药理学系, 分子心血管学教育部重点实验室, 北京 100191)

【摘要】 胚胎肾发育最初阶段是中肾导管尾端在胶质细胞源性神经营养因子诱导下向背侧长出输尿管芽, 而后成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子、骨形成蛋白、基质金属蛋白酶、整合素和粘附分子相继表达, 作用于输尿管芽和间充质细胞, 诱导分支形态发生, 包括输尿管芽向间充质侵入、延伸以及间充质细胞向上皮转化。上述这些分子在功能上存在部分重叠与拮抗, 维持细胞增殖和分化的平衡, 从而保证输尿管芽形成正常的分支结构。本文对肾脏发育时期分支形态发生的调控因素进行综述。

【关键词】 肾脏发育; 分支形态发生; 生长因子; 整合素; 粘附分子

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)03-0040-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.003.009

Regulation of Branching Morphogenesis in Kidney Development

WANG Wei-ling, YANG Bao-xue

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Sciences Ministry of Education, Beijing 100191, China)

【Abstract】 Development of the kidney is initiated when the caudal region of the Wolffian duct (WD) swells and then buds out into the adjacent metanephric mesenchyme (MM) induced by GDNF. Then FGF, HGF, BMP, MMP, integrin and adhesion molecules are expressed in the UB and MM result in branching morphogenesis, including the ureteric bud (UB) invagination into the MM, the elongation of the UB and mesenchymal-epithelial transition (MET). Those molecules function in maintaining a balance of cell proliferation and differentiation to ensure normal formation of the branches. Also, there are parts of overlap and antagonist between those growth factors. This review focuses on the regulation of branching morphogenesis.

【Key words】 Kidney development; Branching morphogenesis; Growth factor; Integrin; Adhesion molecule

肾脏发育是一个极其精细的过程, 发育的不同阶段形成不同的器官(如前肾, 中肾, 后肾), 后肾的发育起始于输尿管芽的形成, 当输尿管芽顶端侵入后肾间充质, 输尿管芽和后肾间充质相互诱导, 按时空顺序依次表达相应基因, 释放转录因子、生长因子、细胞因子、细胞外基质和黏附分子, 促使后肾发育成熟。

GDNF 及其受体

胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 是转化生长因子- β (TGF- β) 超家族的一个亚家族中的一员, 属于半胱氨酸蛋白家族。GDNF 亚家族受体由两部分构成, 一部分为跨膜受体 RET, 另一部分共同受体

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (No. 30870921, 81170632), 高等学校博士学科点专项科研基金 (20100001110047)。

【作者简介】 王伟玲, 女 (1987-), 硕博连读生, 膜通道药理学, E-mail: wangwl_1014@163.com。

【通讯作者】 杨宝学, 博士生导师, E-mail: baosue@bjmu.edu.cn。

GFR α 1-4 (GDNF family receptor) 可与 GDNF 家族成员高度亲和结合。受体与配体结合后激活以下通路: Ras/ERK、三磷酸肌醇激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3-kinase)、磷脂酶 C (phospholipase C gamma, PLCr)^[1], 对输尿管芽生长和分支形态发生都有促进作用。

Gdnf -/-, *Ret* -/-, 或者 *Gfra1* -/- 的小鼠不能形成正常的输尿管芽, 肾脏发育不良, 甚至不能发育^[2], 证明了 GDNF 在诱导输尿管芽出芽方面发挥重要作用。对 *Ret* -/- 和野生型细胞的嵌合体研究显示野生型细胞集中在输尿管芽顶部, 而 *Ret* -/- 突变型细胞较少^[3], 提示 GDNF/Ret 信号还具有促 ND 细胞迁移的能力。RET 激活后诱导 Wnt11 在输尿管芽顶端表达, 而 Wnt11 进一步诱导间充质中 GDNF 的表达^[4]。另一个被 RET 调节的基因是 *Sprouty1* (*Spry1*), 在输尿管芽生长和分支形成中起到负反馈调节作用。有趣的是 *Gdnf* -/-, *Spry1* -/- 或 *Ret* -/-, *Spry1* -/- 的小鼠肾脏发育正常, 而 *Gdnf* -/- 或 *Spry1* -/- 小鼠肾脏发育显著异常, 初步的研究证明正常情况下 GDNF 和 FGF 均受 *Spry1* 抑制, 但 GDNF 诱导输尿管芽出芽和延伸的作用占主要地位, 当 GDNF 和 *Spry1* 敲除后 FGF 的抑制解除, 得以发挥功能, 从而能够形成正常的肾脏。然而 *Gdnf* -/-, *Spry1* -/- 或 *Ret* -/-, *Spry1* -/- 的小鼠与野生型小鼠和 *Spry1* 单敲小鼠在分支形态发生存在显著不同, 揭示了 GDNF 在分支形态发生过程中的特异性作用^[5]。还有一种抑制 GDNF 信号的分子是臂板蛋白(class 3 semaphorins, *Sema3*), 抑制 GDNF 的表达和 RET 的磷酸化, 敲除了 *Sema3a* 引起肾脏体积的短暂性增大, UB 分支形成增多, 在组织培养条件下过表达 *Sema3a* 后则产生相反的效果^[6]。

Microarray 技术检测还发现了其他 GDNF/Ret 下游的蛋白, 包括趋化因子受体 *Cxcr4*, 趋化因子 *Crlf1*, 信号抑制因子 *Dusp6* 和 *Spred2*, 转录因子 *Myb*, *Etv4*, *Etv5*^[7], 这些蛋白的作用还有待于进一步研究。最近对嵌合体的研究显示野生型细胞分布于输尿管芽顶端, 而 *Etv4* -/-, *Etv5* -/- 的细胞分布在输尿管芽顶端之外的部位, 与 *Ret* -/- 的细胞分布范围类似, *Etv4* -/-, *Etv5* -/- 的细胞分布更加局限, 提示 *Etv4*, *Etv5* 可能是多个通路的下游^[8]。

故一旦出芽成功, GDNF 经正反馈环促进新芽不断生长分支, 分支到一定程度, GDNF 又可经负

反馈环, 减慢输尿管芽分支, 调节输尿管芽数量和大小。

FGF 及其受体

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF) 是由 150 ~ 200 个氨基酸组成的细胞间的信号分子, 在各种器官胚胎的形态发生和细胞分化过程中起着重要的作用。FGF 与其膜受体 FGFR 结合后, FGFR 发生二聚体化, 激活其下游的信号通路: PLC γ 途径; Ras/Raf/MEK/ERK 途径; JAK/STAT 途径; PI3-kinase, 以上 4 条路径相互作用形成复杂的网络调节机制。

FGF7 和 FGF10 表达于间充质细胞, 以高亲和力与 FGFR2b 结合, 激活下游信号通路, 调节输尿管芽生长和肾单位形成的数量。FGFR2 等位基因在输尿管芽特异性敲除, 肾脏体积显著性减小, 输尿管芽分支少、肾单位少、输尿管芽茎柄稀而细。缺乏 FGF7 或 FGF10 小鼠的肾脏明显小于正常小鼠, 离体的输尿管芽培养系统显示 FGF7 引起的输尿管芽以紧凑的方式分支, 无明显的茎柄和壶腹, FGF10 则刺激形成茎柄和明显的壶腹。FGF8 mRNA 在胚胎 12 d 的肾脏开始表达, 条件敲除掉间充质 FGF8 导致严重的肾发育不全^[9]。这些结果表明 FGF 系列生长因子对于输尿管芽分支形成是重要的。

最近的研究显示 FGFR1 能够与 *Spred1* 的 SPR 结构域和 *Sprouty/Spred* 家族中成员相连, 起到抑制 Ras/Raf/ERK 的作用, 同时 *Spred* 能够延长 FGFR1 在细胞膜上的保留时间, 使其与配体充分作用^[10], 提示 FGF 信号与 GDNF 存在重叠与相互作用。而 *Gdnf* 或 *Ret* 单敲小鼠肾脏发育显著异常, 在 *Gdnf* 或 *Ret* 单敲的基础上去除 *Spry* 后, 肾脏能够正常发育, 但是这种逆转作用在敲除 *Fgf10* 后消失了, 也就是说 *Gdnf* -/-, *Spry1* -/-, *Fgf10* -/- 小鼠肾脏发育不全, FGF10 发挥作用并不依赖 GDNF, 提示还存在其他信号通路调控^[5]。

HGF 及其受体

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF) 属于酪氨酸激酶受体超家族的一员, 1991 年, Bottaro^[11] 通过²⁵¹I 标记的 HGF 与细胞蛋白的共价交联直接证明 C-MET 为 HGF 的受体。胚胎 11 d 肾间充质细胞即有 HGF 和 C-MET 的表达, HGF 与

受体 Met 特异结合后,可诱导 Met 上的酪氨酸磷酸化,激活细胞内多个信号通路,包括 PLC、Ras、ERK1/2 和 PI3-kinase 等途径,从而调节细胞的增殖、分化、形态发生和迁移。

Vargas^[12]发现 HGF 能够刺激后肾间叶细胞向上皮分化,同时在输尿管芽的管状形态发生中起重要作用。Montesano 等^[13]证实 HGF 可诱导胶原凝胶培养系统中的犬肾细胞 (madine darby canine kidney, MDCK) 形成管状结构。研究表明,HGF 经 MET 介导的 PI3-kinase 激活可诱导内髓集合管上皮细胞 (mIMCD-3) 增殖、迁移和分支,对于趋化现象和集合管形成起重要作用。Akashi Togawa^[14]的研究显示 HGF 能够上调 Cdc42 的表达量使细胞间紧密连接蛋白降解,促进 MDCK 细胞迁移,进一步的实验证明 HGF 的这种作用是依赖 Erk 通路的。

BMP 及其受体

骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 为转化生长因子- β (TGF- β) 家族中的一大亚类,自从上世纪 90 年代最早报道了 *Bmp7* 基因缺失的小鼠肾发育不全^[15],关于 BMP 在肾发育过程中作用成为研究热点,揭示了 BMP 在中肾管的形成、输尿管芽的形成、分支形态发生、肾单位祖细胞的存活和增殖等过程发挥重要作用。

BMP2 在输尿管芽周的间充质组织中表达,肾组织培养和输尿管芽离体培养实验显示 BMP2 可抑制输尿管芽生长分支。BMP4 和 BMP5 参与集合管后阶段肾盂和输尿管的发育调控,BMP4 主要在中肾和输尿管周围间充质组织中表达,对抗后肾间充质释放的诱导信号 GDNF,抑制 Wnt11 表达,从而抑制中肾管不适宜位点萌芽,减少中肾异位输尿管分支的数目以及增加输尿管形态的延长,体外实验表明,外源 BMP4 同样抑制输尿管芽的形成,证实这一因子有能力直接影响输尿管芽分支形态形成^[16, 17]。BMP7 是胚胎肾发育的重要的诱导因子,表达于后肾间充质及输尿管芽及其衍生物,低浓度 BMP7 通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶促进输尿管芽分支形成,高浓度则抑制分支形成^[18]。在体内,BMP7 主要起到抑制间充质细胞的过度增生的作用,从而协调输尿管芽分支和小管上皮的形成^[19]。GREMLIN1 (GREM1) 是内源的 BMP4 拮抗剂,Alexandre Goncalves 的研究显示 GREM1 还能拮抗 BMP7,*Grem1* 敲除小鼠肾发育不全,但给予外源

BMP4 或 BMP7 抑制剂后则能形成正常的肾脏^[20]。

细胞外基质

细胞外基质 (extracellular matrix) 是胚胎发育过程中主要有间充质细胞合成并分泌的大分子物质,包括纤维性成分 (胶原蛋白、弹性蛋白和网织蛋白)、连接蛋白 (纤维粘连蛋白、层粘连蛋白) 和空间充填分子 (主要为糖胺聚糖),对细胞增殖和分化发挥重要调控作用。

体外实验显示,在纯基质胶中培养,IMCD 细胞可形成多细胞包囊,在 I 型胶原中培养,IMCD 细胞则形成实心分支索,在胶原和基质胶混合凝胶中培养,IMCD 细胞形成中空分支管状结构,由此可见,细胞与基质相互作用在上皮组织结构形成过程中起重要作用^[21]。研究这些基质成份发现, I 型胶原、层粘连蛋白和纤维连接蛋白能促进成年小鼠的 IMCD 形成分支管状结构,IV 型胶原和玻连蛋白则起到抑制作用^[9]。最近的研究显示纤维连接蛋白能够诱导上皮细胞产生 Btbd7 蛋白,Btbd7 蛋白而上调 Snail2,抑制 E-钙黏蛋白表达,促进芽体裂隙的形成,体外实验证明 Btbd7 具有促进 MDCK 细胞迁移的功能^[22]。

由于输尿管芽形成过程涉及细胞增殖、迁移、扩展,当细胞丝状伪足向外延伸时,需要降解周围的基质,作为降解细胞外基质的主要降解酶—基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 在分支形态发生过程同样发挥重要作用。Catherine Arnould^[23]的研究显示 *Mmp9* -/- 小鼠肾脏发育延迟,体内体外实验显示 MMP9 缺失后 Caspase3 表达上调,细胞凋亡增加,表明在肾脏发育阶段 MMP9 抑制间充质细胞凋亡。*Mmp14* -/- 的小鼠肾脏发育过程中不能进行正常的分支形态发生。此外,MMP14 能够使 ECM 重构从而诱导分支形态发生,促进 BMP 的表达或自分泌形式促进细胞迁移^[24]。

整合素

作为许多 ECM 的受体,整合素 (integrin) 在胚胎发育过程中的作用不可忽视。整合素属于细胞表面受体, α , β 亚基以非共价键结合,介导细胞与细胞外基质相互作用,其细胞外区与特异的细胞外基质成份 (如: IV 型胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白) 结合,促进细胞粘附,其胞内区可将生物信号传导至细胞内参与细胞的分裂、增殖。

整合素能够诱导 MDCK 细胞和肾形成分支^[25]。用抗体阻断整合素的功能后,髓质集合管的形成受阻,证实整合素在髓质集合管形成过程中是不可缺的重要中介物^[21]。

当在输尿管芽特异性敲除整合素 $\alpha 3$ 亚基,肾乳头不能形成或形成异常^[26]。整合素 $\alpha 8$ 在间充质细胞呈极性分布, $\alpha 8$ 缺失小鼠的输尿管芽不能形成分支,同时间充质细胞也不能转化为上皮细胞。 $\beta 1$ 在胚胎 10.5 dUB 顶端表达,*Hox b7/Cre* 小鼠特异性敲除整合素 $\beta 1$ 后肾脏分支形成异常,在出生后发生进行性肾损伤,并出现水通道蛋白 AQP2 表达的减少^[25]。研究发现,由 FGF 介导的经典的信号途径也需要整合素 $\beta 1$ 的参与。在 $\beta 1$ 整合素敲除而 FGFR 维持正常活性的情况下,FGF 信号依旧有所减弱^[25],因此,整合素 $\beta 1$ 除了在粘附和细胞迁移方面发挥其经典作用之外,在输尿管芽分支形态发生中也起到介导某些生长因子信号传导的作用。

粘附相关蛋白

介导细胞间粘附的分子,钙黏蛋白和整合素发挥着主要作用,与细胞分裂、迁移、分化和凋亡紧密相关,在维持实体组织形成以及在生长发育过程中细胞选择性相互聚集、重排有重要作用^[27]。

钙黏蛋白是一类钙离子依赖的粘附分子家族,在肾脏发挥过程中有许多钙黏蛋白的表达,输尿管芽上主要表达 E-钙黏蛋白,而在间充质钙黏蛋白种类存在一定的转换^[28],钙黏蛋白的胞浆部分与 catenin 相互作用,主要调节细胞骨架和信号通路传导,敲除 E-钙黏蛋白的 MDCK 细胞 3D 培养条件下

形成大量囊泡而非小管样结构^[28]。Clara Martinea-Rico 等^[29]将磁珠用纤连蛋白和多聚赖氨酸分别包备,与 S180 细胞或过表达 E-钙黏蛋白的细胞共孵育,而后使用双针检测技术(dual pipette assay)检测将磁珠和细胞分离开的作用力,结果发现过表达 E-钙黏蛋白的细胞与纤连蛋白包备的磁珠作用力最大,也就是说 E-钙黏蛋白与纤连蛋白产生的粘附作用最强,提示钙黏蛋白在介导细胞-基质间相互作用发挥一定作用。

还有一些蛋白虽然不属于粘附因子,但起到细胞粘附的作用,比如 *Kif26b*,属于驱动蛋白家族,作为 *Sall1* 的下游调节间充质细胞间的粘附,在胚胎 10.5 d 于后肾间充质表达。*Kif26b* -/- 的间充质细胞与输尿管芽细胞间的紧密连接减弱,整合素 $\alpha 8$ 分布的极性也减弱,导致间充质的 GDNF 减少,过表达 *Kif26b* 使细胞间粘附增强^[30]。

结语

胚胎肾的发育受多种因素的制约和调节(图 1),尽管已经知道上述因素能影响胚胎肾的发育,但还有很多机制尚不清楚。大量研究显示成熟肾脏在病理状态下高表达的分子,在肾脏发育过程中也高表达,而且细胞表型的改变类似于胚胎肾发育过程中后肾间充质细胞向上皮细胞转分化的逆过程,提示肾脏损伤后细胞的再生过程和肾脏胚胎发育过程有着极其密切的关系,对肾发育的研究也有助于理解后天性肾脏疾病发生的病理生理机制。

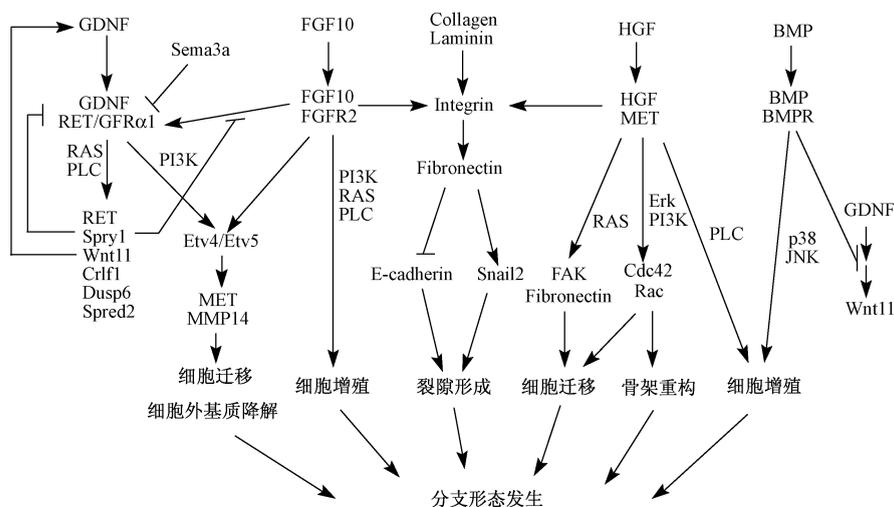


图 1 胚胎肾分支形态发生调控因素

Fig. 1 Regulation of branching morphogenesis in kidney development

参考文献:

- [1] Costantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances[J]. *Differentiation*, 2006, 74(7):402-421.
- [2] Skinner M A, Safford S D, Reeves J G, et al. Renal aplasia in humans is associated with RET mutations[J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(2):344-351.
- [3] Chi X, Michos O, Shakya R, et al. Ret-dependent cell rearrangements in the Wolffian duct epithelium initiate ureteric bud morphogenesis[J]. *Dev Cell*, 2009, 17(2):199-209.
- [4] Majumdar A, Vainio S, Kispert A, et al. Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development[J]. *Development*, 2003, 130(14):3175-3185.
- [5] Michos O, Cebrian C, Hyink D, et al. Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(1):e1000809.
- [6] Tufro A, Teichman J, Woda C, et al. Semaphorin3a inhibits ureteric bud branching morphogenesis[J]. *Mech Dev*, 2008, 125(5-6):558-568.
- [7] Lu B C, Cebrian C, Chi X, et al. Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(12):1295-1302.
- [8] Satu Kuure X C. The transcription factors Etv4 and Etv5 mediate formation of the ureteric bud tip domain during kidney development[J]. *Development*, 2010, 137:1975-1979.
- [9] Grieshammer U, Cebrian C, Ilagan R, et al. FGF8 is required for cell survival at distinct stages of nephrogenesis and for regulation of gene expression in nascent nephrons [J]. *Development*, 2005, 132(17):3847-3857.
- [10] Zhuang L, Villiger P, Trueb B. Interaction of the receptor FGFR1 with the negative regulator Spry1 [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(9):1496-1504.
- [11] Bottaro D P, Rubin J S, Faletto D L, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c - met proto-oncogene product[J]. *Science*, 1991, 251(4995):802-804.
- [12] Vargas G A, Hoefflich A, Jehle P M. Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality [J]. *Kidney Int*, 2000, 57(4):1426-1436.
- [13] Liu Z, Greco A J, Hellman N E, et al. Intracellular signaling via ERK/MAPK completes the pathway for tubulogenic fibronectin in MDCK cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353(3):793-798.
- [14] Togawa A, Sfakianos J, Ishibe S, et al. Hepatocyte Growth Factor stimulated cell scattering requires ERK and Cdc42-dependent tight junction disassembly[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(2):271-277.
- [15] Dudley A T, Lyons K M, Robertson E J. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye[J]. *Genes Dev*, 1995, 9(22):2795-2807.
- [16] Cain J E, Bertram J F. Ureteric branching morphogenesis in BMP4 heterozygous mutant mice [J]. *J Anat*, 2006, 209(6):745-755.
- [17] Cain J E, Nion T, Jeulin D, et al. Exogenous BMP-4 amplifies asymmetric ureteric branching in the developing mouse kidney in vitro [J]. *Kidney Int*, 2005, 67(2):420-431.
- [18] Davies J. Intracellular and extracellular regulation of ureteric bud morphogenesis [J]. *J Anat*, 2001, 198(Pt 3):257-264.
- [19] Hogan B L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development [J]. *Genes Dev*, 1996, 10(13):1580-1594.
- [20] Goncalves A, Zeller R. Genetic analysis reveals an unexpected role of BMP7 in initiation of ureteric bud outgrowth in mouse embryos [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e19370.
- [21] Karihaloo A, Nickel C, Cantley L G. Signals which build a tubule [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2005, 100(1):e40-45.
- [22] Onodera T, Sakai T, Hsu J C, et al. Btd7 regulates epithelial cell dynamics and branching morphogenesis [J]. *Science*, 2010, 329(5991):562-565.
- [23] Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(5):698-712.
- [24] Mori H, Gjorevski N, Inman J L, et al. Self-organization of engineered epithelial tubules by differential cellular motility [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(35):14890-14895.
- [25] Zhang X, Mernaugh G, Yang D H, et al. beta1 integrin is necessary for ureteric bud branching morphogenesis and maintenance of collecting duct structural integrity [J]. *Development*, 2009, 136(19):3357-3366.
- [26] Liu Y, Chattopadhyay N, Qin S, et al. Coordinate integrin and c-Met signaling regulate Wnt gene expression during epithelial morphogenesis [J]. *Development*, 2009, 136(5):843-853.
- [27] Gumbiner B M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(8):622-634.
- [28] Marciano D K, Brakeman P R, Lee C Z, et al. p120 catenin is required for normal renal tubulogenesis and glomerulogenesis [J]. *Development*, 2011, 138(10):2099-2109.
- [29] Martinez-Rico C, Pincet F, Thiery J P, et al. Integrins stimulate E-cadherin-mediated intercellular adhesion by regulating Src-kinase activation and actomyosin contractility [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 5):712-722.
- [30] Uchiyama Y, Sakaguchi M, Terabayashi T, et al. Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(20):9240-9245.

[修回日期]2011-12-13