第二军医大学学报 2009年6月第30卷第6期 http://www.ajsmmu.cn
Academic Journal of Second Military Medical University, Jun. 2009, Vol. 30, No. 6

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00668

·论 著·

骨髓间充质干细胞肾动脉注射移植修复裸鼠急性肾小管坏死

董兴刚,冯 健,俞志满,过 源
上海市第二人民医院中西医结合肾病科,上海 200011

[摘要] **目的**:探讨骨髓间充质干细胞(MSCs)移植对裸鼠急性肾小管坏死(ATN)的修复作用,为MSCs移植治疗ATN提供实验依据。**方法**:5周龄裸鼠随机分为健康对照组、ATN模型组、MSCs移植治疗组。ATN模型采用50%甘油肌内注射诱导,MSCs移植采用经肾动脉注射途径向肾脏内移植增强型绿色荧光蛋白(EGFP)标记的MSCs。实验期间观察饮食、活动等变化,检测血肌酐(Scr)水平,H-E染色观察肾组织病理学变化,荧光显微镜观察EGFP标记的阳性细胞在裸鼠肾脏的分布及数量。**结果**:ATN模型组裸鼠肾脏肾小管上皮细胞变性、局部坏死,病变于肾皮质或皮髓交界处明显,而肾小球未见明显异常。MSCs移植治疗组的肾小管上皮细胞无混浊肿胀和细胞核固缩溶解,间质无明显的充血和水肿。MSCs细胞移植后第14天的受体鼠肾小管中EGFP阳性细胞明显增多。**结论**:肾动脉注射途径移植的MSCs能定位于肾小管上皮,可促进ATN中损伤的肾小管上皮细胞的修复。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;干细胞移植;急性肾小管坏死;绿色荧光蛋白;裸鼠
[中图分类号] R 692.6 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2009)06-0668-04

Transplantation of marrow mesenchymal stem cells through renal artery in repair of acute tubular necrosis in nude mice

DONG Xing-gang, FENG Jian, YU Zhi-man, GUO Yuan
Department of Integration Medicine for Kidney Diseases, The Second People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200011, China

[**ABSTRACT**] **Objective**: To investigate whether transplantation of mesenchymal stem cells(MSCs) through renal arteries can protect kidney from acute tubular necrosis(ATN), so as to lay a foundation for MSC transplantation in treatment of ATN. **Methods**: Five-week-old nude mice were randomly divided into three groups: normal control group ($n=10$), acute tubular necrosis(ATN) model group without($n=10$) and with MSCs treatment group($n=11$). ATN nude mice were induced with 50% glycerin. MSCs labeled with enhanced green fluorescent proteins(EGFP) were injected into kidney through renal arteries. Serum creatinine was determined in all groups and pathological changes of renal tissues were detected using H-E staining. The amount and distribution of the EGFP-marked MSCs in renal tissues were determined with fluorescence microscope. **Results**: Degeneration and exfoliation of renal tubular epithelial cells, and even renal tubular tamponade with cast-off cells were observed in the ATN group; these pathological changes were mainly located at renal cortex and juncture of renal cortex and medulla. The damages were greatly alleviated in the ATN + MSCs transplantation group, with no swelling of epithelial cells, nuclear condensation or edema. Fourteen days after MSCs transplantation, EGFP positive cells were increased in renal tubules of recipient mice. **Conclusion**: The MSCs transplantation *via* renal artery can locate in renal tubular epithelium, and promote the repair of injured renal tubular epithelial cells.

[**KEY WORDS**] bone marrow mesenchymal stem cells; stem cell transplantation; acute tubular necrosis; green fluorescent protein; nude mice

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6): 668-671]

急性肾衰竭(acute renal failure, ARF)是临床上常见危重急症,尽管其发病原因各不相同,但是病理学上均有急性肾小管上皮细胞坏死(acute tubular necrosis, ATN)的表现。研究[1-2]已经证实,ARF的高病死率与急性肾小管上皮细胞损伤密切相关。对于急性肾小管上皮细胞损伤,目前临床尚无有效的

[收稿日期] 2008-10-20 [接受日期] 2009-04-07
[基金项目] 上海市黄浦区卫生事业发展奖励基金(HWY-2004128). Supported by the Grants from the Huangpu Health Development Program of Shanghai(HWY-04128).
[作者简介] 董兴刚,副主任医师. E-mail:dongxg118@hotmail.com

治疗方法,而提供新生的肾小管上皮细胞是治疗的关键。研究[3-5]表明,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)在一定条件下能向肾脏细胞转化,参与急性肾小管上皮细胞损伤和坏死的修复,但相关研究[6]仍存在争议。

因此,本研究采用甘油建立 ATN 裸鼠模型,经肾动脉途径注射 MSCs,观察 MSCs 移植后对肾小管上皮细胞的修复作用,探讨 MSCs 移植治疗 ATN 的可能价值。

1 材料和方法

1.1 动物分组 5 周龄 BALB/cA 雌性裸鼠 31 只,购自中国科学院上海实验动物中心,随机分为 3 组:健康对照组($n=10$)、ATN 模型组($n=10$)、MSCs 移植治疗组($n=11$)。

1.2 MSCs 的分离和培养 增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)标记的 MSCs 由上海交通大学医学院健康科学研究所金颖教授惠赠,制备方法:取成年 EGFP C57 BL/6-6TgN 转基因小鼠(6～10 周龄),颈椎脱臼处死,无菌条件下分离并截取双侧胫骨和股骨,抽取骨髓细胞,骨髓冲洗液用 Percoll 分离液进行分离并收集骨髓细胞。将骨髓细胞接种于含有 10%胎牛血清的 DMEM 低糖培养液的培养瓶中,置于 37℃、饱和湿度的 5% CO_2 培养箱中培养,定时换液,待细胞克隆完全形成后,胰蛋白酶消化传代。传 1～2 代获得足量的细胞,用胰蛋白酶消化后收集,PBS 重悬成 1×10^6 细胞/ml 的细胞悬液,检查细胞活力在 95%以上,备用于细胞移植。

1.3 ATN 模型的建立 操作在无菌手术室完成。裸鼠在接受注射前 18 h 至注射后 8 h 禁饮。ATN 模型组和 MSCs 治疗组将甘油(Sigma,美国)用双蒸水稀释成 50%(V/V),按 7.5 ml/kg 在后肢肌内注射;健康对照组注射等量生理盐水。实验过程为 14 d,实验结束时处死裸鼠。

1.4 MSCs 的移植 MSCs 移植治疗组裸鼠在甘油肌内注射后,立即开始 MSCs 移植。切开腹壁及腹膜,进入腹腔,分离出腹主动脉,经腹主动脉插管向肾动脉内注入 MSCs 悬液(细胞数为 1×10^6)。注射完毕,压迫止血,最后缝合腹膜及皮肤。健康对照组和 ATN 模型组不注射 MSCs。

1.5 标本的采集及检测 MSCs 移植后第 14 天,将裸鼠以 2%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉,开胸,心脏穿刺取血,日立 7150 自动生化分析仪检测血肌酐(Scr)水平;然后用 100 ml 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 3.0)经心脏冲洗,再用 500 ml 含 4%多聚甲醛 0.1 mmol/L PBS(pH 3.0)灌注固定。灌毕立即取双侧肾脏标本,常规切片 H-E 染色,光学显微镜下观察病理学改变,同时制备肾组织冰冻切片,采用直接免疫荧光显微镜观察 EGFP 的表达。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验进行组间比较,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MSCs 形态学观察 经体外培养后,相差显微镜下可见大量小鼠 MSCs 细胞,荧光显微镜下观察显示所有 MSCs 均表达 EGFP(图 1)。

2.2 裸鼠的一般情况及 Scr 水平的变化 MSCs 移植治疗组肾动脉导入 MSCs 术中死亡 4 只,余 7 只存活情况良好。健康对照组和 ATN 模型组各 10 只均存活良好。ATN 模型组和 MSCs 移植治疗组裸鼠注射 50%甘油后,出现精神萎靡不振、反应迟钝、倦缩,4 h 内可见血尿,持续 1～3 d,尿量明显减少。健康对照组、ATN 模型组、MSCs 移植治疗组裸鼠的 Scr 分别为(4.51±2.13)、(5.57±2.53)、(4.94±2.73) μmol/L,组间差异无统计学意义。

2.3 肾组织病理学改变 健康对照组裸鼠肾组织肾小球和肾小管形态结构正常(图 2A);模型组肾组织肾小管均可见肾小管上皮细胞变性,混浊肿胀,个别细胞核固缩溶解,部分肾小管上皮细胞坏死脱落于管腔内,肾间质充血、水肿(图 2B);MSCs 移植治疗组肾组织肾小管损伤比模型组明显好转(图 2C)。

2.4 肾组织免疫荧光显微镜观察结果 MSCs 移植治疗组裸鼠肾组织肾小管上皮中可见绿色荧光分布于肾小管上皮,与受者肾小管上皮细胞一起构成完整的肾小管结构(图 3)。

3 讨 论

甘油注射制备的 ATN 模型类似人类横纹肌溶解综合征所致 ATN,是目前公认的病变稳定的 ATN 模型制备方法之一[2,7]。甘油可以引起肌肉溶解和溶血,释放出大量的肌红蛋白和血红蛋白,经过肾小球滤过后聚集成块堵塞肾小管,导致肾小球出入球小动脉收缩,肾小球滤过率下降。本研究采用 7.5 ml/kg 甘油肌内注射制备裸鼠 ATN 模型,裸鼠肾脏病变重,病理表现为肾小管上皮细胞变性、混浊肿胀,个别细胞核固缩溶解,肾间质充血、水肿,近端肾小管病变显著,说明所建模型比较理想。

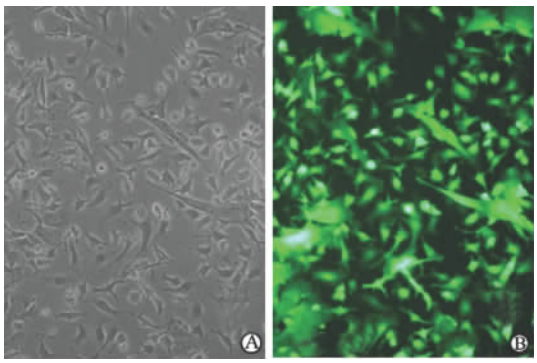

图 1　MSCs 的形态学观察结果

Fig 1　Morphology of mesenchymal stem cells

A: Under phase contrast microscope; B: Under fluorescence microscope(EGFP positive). Original magnification: ×200

已有文献[8-10]报道 MSCs 可以分化为肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞和血管内皮细胞。最近有学者[11-13]研究了 MSCs 对 ARF 时肾实质细胞的修复及肾功能的影响，证明移植 MSCs 可以修复受损肾脏并可以分化为肾小管上皮细胞，从而恢复肾脏的组织结构和功能。Herrera 等[5]对甘油诱导的 ATN 小鼠模型输注 GFP 标记的干细胞，21 d 后肾小管可见 GFP 阳性细胞，同时小管上皮细胞标志物 cytokeratin 染色也呈阳性，表明骨髓源性干细胞会迁移至肾小管损伤部位，并分化为肾小管上皮细胞，在修复过程中起作用。因此认为 MSCs 具有分化为肾小管上皮细胞的潜能，在治疗急性肾衰竭中可能扮演重要角色。

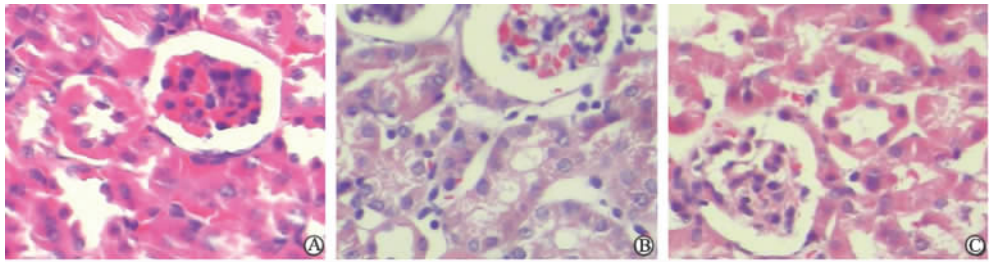

图 2　各组肾组织病理学改变

Fig 2　Pathology of kidney tissues in different groups(H-E staining)

A: Normal control group; B: ATN nude mice; C: ATN nude mice with MSCs transplantation. Original magnification: ×400

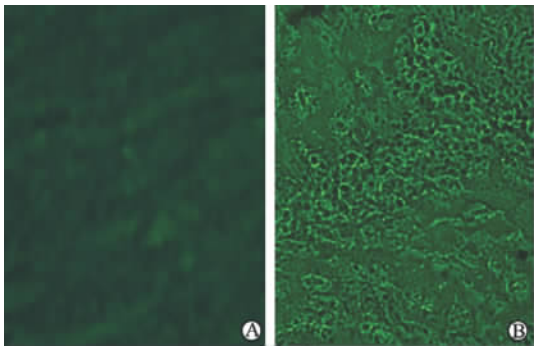

图 3　裸鼠肾组织肾小管上皮中绿色荧光蛋白的表达

Fig 3　EGFP expression in tubular epithelial cells in kidney tissues of mice

A: No EGFP-positive cells were found in ATN mouse without MSCs transplantation; B: EGFP-positive tubular epithelial cells were found in a ATN mouse 14 days after MSCs transplantation. Original magnification: ×200

Imasawa 等[4]报道将携带 GFP 的转基因小鼠的骨髓移植给同种异体的受体小鼠，为避免供体小鼠和受体小鼠之间的异体排斥反应，对受体小鼠进行致死剂量的照射，使得实验过于繁琐。本研究采用无异种和异体排斥反应的裸鼠进行 MSCs 移植，可以避免对受体小鼠进行致死剂量的照射，从而使实验设计方案简便。本研究发现，MSCs 移植治疗 ATN 能明显减轻肾脏的病理损伤。同时免疫荧光检测发现肾小管上皮中可见大量的绿色荧光分布，亦即 MSCs 广泛分布于肾小管上皮，说明 MSCs 移植对坏死的肾小管上皮细胞具有修复作用。本研究观察了 MSCs 移植后 14 d 的实验结果，发现 MSCs 细胞移植后第 14 天的受体鼠肾小管中 GFP 阳性细胞明显增多，与文献[5]结果类似。

综上所述，本研究初步提示经过肾动脉注射途径移植的 MSCs 有利于坏死的肾小管上皮细胞的修复，为 MSCs 治疗急性肾损伤提供了一定的实验证据。但是 MSCs 参与损伤肾脏结构和功能修复的具体机制仍需进一步研究。

（**志谢**　本研究得到上海交通大学医学院健康科学研究所金颖教授和姜华助理研究员以及第二军医大学卫生勤务学系卫生统计学教研室孟虹教授的支持和帮助，在此一并表示感谢！）

[参 考 文 献]

[1]　Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure

[J]. Lancet,2005,365:417-430.

[2] Yonemura K,Goto T,Sakao Y,Endo M.[Acute tubular necrosis: pathogenesis, pathophysiology, and therapy][J]. Nippon Rinsho,2006,64(Suppl 2):493-496.

[3] da Silva L B,Palma P V,Cury P M,Bueno V. Evaluation of stem cell administration in a model of kidney ischemia-reperfusion injury[J]. Int Immunopharmacol,2007,7:1609-1616.

[4] Imasawa T,Utsunomiya Y,Kawamura T,Zhong Y,Nagasawa R,Okabe M,et al. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells[J]. J Am Soc Nephrol,2001,12:1401-1409.

[5] Herrera M B,Bussolati B,Bruno S,Fonsato V,Romanazzi G M,Camussi G. Mesenchymal stem cell contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury[J]. Int J Mol Med,2004,14:1035-1041.

[6] Lin F,Moran A,Igarashi P. Intrarenal cells,not bone marrow-derived cells,are the major source for regeneration in postischemic kidney[J]. J Clin Invest,2005,115:1756-1764.

[7] Singh D,Chander V,Chopra K. Antihypertensive drug with antioxidant properties protects against glycerol induced acute renal failure[J]. Am J Nephrol,2003,23:415-421.

[8] Huls M,Russel F G,Masereeuw R. Insights into the role of bone marrow-derived stem cells in renal repair[J]. Kidney Blood Press Res,2008,31:104-110.

[9] Tae S K,Lee S H,Park J S,Im G I. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine[J]. Biomed Mater,2006,1:63-71.

[10] Gupta S,Verfaillie C,Chmielewski D,Kren S,Eidman K,Connaire J,et al. Isolation and characterization of kidney derived stem cells[J]. J Am Soc Nephrol,2006,17:3028-3040.

[11] Kumar S,Chanda D,Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells[J]. Gene Ther,2008,15:711-715.

[12] Pountos I,Corscadden D,Emery P,Giannoudis P V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation ,expansion and application[J]. Injury,2007,38(Suppl 4):S23-S33.

[13] Ozawa K,Sato K,Oh I,Ozaki K,Uchibori R,Obara Y,et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells[J]. J Autoimmun,2008,30:121-127.

[本文编辑] 孙 岩

· 消 息 ·

《第二军医大学学报》征订启事

《第二军医大学学报》(CN31-1001/R,ISSN 0258-879X)是由第二军医大学主办的国内外公开发行的综合性医药卫生类学术期刊,1980 年 6 月创刊。本刊面向全国和海外作者征稿,主要报道基础、临床、预防、军事医学、药学和中国医学等领域的最新科研成果。由著名肝胆外科专家、国家最高科技奖获得者吴孟超院士任主编。辟有:院士论坛、专家论坛、专题报道、论著、研究快报、临床病理(例)讨论、病例报告等栏目。读者对象主要为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、预防机构人员和高等医药学院校的师生。

本刊一直被《中文核心期刊要目总览》确认为“中国综合性医药卫生类核心期刊”;是“中国科学引文数据库统计源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”;被包括中国学术期刊综合评价数据库、万方数据——中国数字化期刊群等在内的国内所有重要检索系统收录,并被荷兰《医学文摘》(EMBASE)、美国《化学文摘》(CA)、剑桥科学文摘(CSA)、英国《国际农业与生物科学中心(CABI)文摘》数据库、英国《公共健康研究数据库》(Global Health)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstracts Journal)、波兰《哥白尼索引》等国际检索系统收录。先后获得“第二届国家期刊奖百种重点期刊奖”、“第三届国家期刊奖提名奖”和“全国高校精品科技期刊奖”,并被评为“2008 年中国精品科技期刊”。

本刊为月刊,A4 开本,80 g 铜版纸彩色印刷,每期定价 15 元,全年共 180 元。可在当地邮局订阅(邮发代号 4-373),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地 址:上海市翔殷路 800 号《第二军医大学学报》编辑部,邮编:200433

联系人:商素芳 电 话:021-81870787,021-81870788 转 824 分机

E-mail:bxue@smmu.edu.cn 或 bxue304@yahoo.com.cn

http://www.ajsmmu.cn 或 http://journals.smmu.edu.cn