

生理条件下骨髓细胞参与肾小管上皮细胞的更新

李保春¹, 张 懿¹, 刘先峰¹, 崔若兰¹, 程 涛²

(1. 第二军医大学长海医院肾内科, 上海 200433; 2. 美国匹兹堡大学肿瘤研究中心, PA 15213)

[摘要] **目的:** 观察生理情况下骨髓细胞能否分化成肾小管上皮细胞。**方法:** 绿色荧光蛋白(GFP)标记的 C57BL/6 转基因小鼠提供骨髓, 同种无荧光标记的 C57BL/6 小鼠分为 3 组, 每组各 15 只。正常对照组未做任何处理; 全身照射组经致死剂量 γ 射线全身均匀照射后不接受骨髓移植, 1 周内处死; 骨髓移植组照射后接受骨髓移植, 分别于移植后 56 d、84 d 分 2 批处死小鼠。取 3 组小鼠血液行血常规、血肌酐、尿素氮检测, 同时取其肾脏标本行 H-E 染色。流式细胞仪检测骨髓移植组骨髓细胞中 GFP 阳性细胞比例, 免疫组织化学法观察 GFP 阳性细胞在其肾脏内的分布及数量。**结果:** 与正常对照组相比, 放射组和骨髓移植组的血尿素氮和肌酐无明显变化。肾脏病理检查示全身致死剂量 γ 射线照射未造成小鼠肾脏组织结构和生理功能的明显改变, 但血常规提示其三系减少, 与其他 2 组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。荧光显微镜和激光共聚焦显微镜发现骨髓移植后 56、84 d 的受体鼠肾小管中有少量 GFP 阳性细胞存在, 流式细胞仪检测发现其骨髓中 GFP 阳性细胞的比例分别为 $(78.75 \pm 5.99)\%$ 和 $(79.58 \pm 4.60)\%$, 免疫组化定量结果显示 GFP 阳性细胞所占肾小管上皮细胞的比例分别为 $(4.17 \pm 1.66)\%$ 和 $(3.88 \pm 1.35)\%$, 两亚组间比较无明显差别。**结论:** 在无肾小管损伤的生理情况下, 骨髓细胞也可以参与肾小管上皮细胞的更新。

[关键词] 骨髓细胞; 肾小管; 绿色荧光蛋白; 激光共聚焦显微镜

[中图分类号] R 334.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0607-04

Role of bone marrow cells in renewal of renal tubular epithelial cells under physiological condition

LI Bao-chun¹, ZHANG Yi¹, LIU Xian-feng¹, CUI Ruo-lan¹, CHENG Tao² (1. Department of Nephrology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. University of Pittsburgh Cancer Institute, Centre Ave., Pittsburgh, PA 15213, USA)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe whether bone marrow cells (BMCs) can differentiate into the renal tubular epithelial cells under physiological condition. **Methods:** Transgenic C57BL/6 mice labeled with green fluorescent protein (GFP) served as bone marrow donors and C57BL/6 mice without fluorescence labeling were divided into 3 groups: normal group (N, $n=15$), total body irradiation group (TBI, $n=15$), and bone marrow transplantation (BMT, $n=15$) group. The mice in Group N received no treatment, those in Group TBI were irradiated with lethal dose of γ rays but received no transplant (sacrificed within 1 week after irradiation), and those in Group BMT were transplanted with BMCs after the irradiation (sacrificed at 58 and 84 days after transplantation). Blood samples were obtained from all 3 groups for routine analysis and analysis of urea nitrogen and plasma creatinine. Meanwhile, mice kidneys were harvested for H-E staining. The amount of GFP positive BMCs in mice of BMT group was determined by flow cytometry; the distribution and amount of GFP positive cells in renal tissues were observed by immunohistochemistry. **Results:** There was no difference in the levels of urea nitrogen and plasma creatinine between the 3 groups. Lethal-dose total body irradiation resulted in no significant change in renal histological structure and function, but RBC, WBC and PLT of the mice in TBI group were markedly reduced compared with those in the other 2 groups ($P < 0.05$). Green fluorescence was seen in renal tubular epithelium of mice on 56 and 84 days after transplantation by fluorescent microscope and laser scanning confocal microscope. Flow cytometry result showed that GFP positive BMCs were $(78.75 \pm 5.99)\%$ and $(79.58 \pm 4.60)\%$ in recipient mice on 56 and 84 days after transplantation, respectively; and immunohistochemistry staining showed that GFP positive cells in renal tubular epithelial of the recipient mice were $(4.17 \pm 1.66)\%$ and $(3.88 \pm 1.35)\%$, respectively ($P > 0.05$). **Conclusion:** Bone marrow cells may participate in renewal of tubular epithelial cells even without the renal tubular damage.

[KEY WORDS] bone marrow cells; renal tubule; green fluorescent protein; laser scanning confocal microscope

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 607-610]

最近多个骨髓细胞移植的实验中发现一个共同特点, 就是骨髓细胞功能性地重建缺血性损伤的器官。研究^[1,2]发现骨髓间质干细胞可以修复缺血性肾小管损伤。这些研究不仅证明骨髓源间质细胞有能

[基金项目] 国家自然科学基金(30270620, 30370664). Supported by National Natural Science Foundation of China(30270620, 30370664).

[作者简介] 李保春, 教授, 博士生导师。

* Corresponding author. E-mail: libaochun@medmail.com.cn

力在体内分化成肾小管上皮细胞,而且证明重建坏死的肾小管S₃段的细胞绝大部分来自于骨髓源性的细胞。那么在生理条件下骨髓细胞是否能够分化为肾小管上皮细胞呢?本研究以绿色荧光蛋白(GFP)标记C57BL/6小鼠的骨髓细胞,观察了在生理情况下骨髓来源细胞向肾小管上皮细胞的转化情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂 4~6周龄(体质量18~22g)绿色荧光蛋白(GFP)标记的转基因雄性C57BL/6小鼠10只为骨髓供体,系美国匹兹堡大学肿瘤研究中心程涛教授惠赠;6~8周龄(体质量18~22g)清洁级雌性C57BL/6小鼠45只,购自第二军医大学实验动物中心。羊抗megalin多抗、PE标记的兔抗羊二抗(Santa-Cruz公司),兔抗GFP多抗(Abcam公司),生物素标记的羊抗兔二抗试剂盒(Labvision公司),⁶⁰Co放射源(第二军医大学辐照中心)。

1.2 实验动物分组和处理 清洁级雌性C57BL/6小鼠45只随机分成3组,每组各15只。正常对照组不做任何处理;单纯放射(TBI)组给予致死剂量 γ 射线照射,不行骨髓移植,全身照射后1周处死;骨髓移植(BMT)组致死剂量照射后行骨髓移植,分别于移植后56d处死7只、84d处死8只。

1.3 骨髓移植模型的建立

1.3.1 骨髓有核细胞的获取 GFP标记的C57BL/6小鼠脱臼处死,75%乙醇浸泡约5~10min,无菌条件下分离出小鼠的胫骨和股骨,剪刀分别剪去两端的骨皮质,1ml注射器7号针头以LG-DMEM冲出骨髓后,将骨髓液依次经过7号和4号针头吹打,经200目钢筛过滤制成单细胞悬液,红细胞裂解液4℃裂解红细胞10min,PBS洗涤,将得到的细胞在含10%FBS的LG-DMEM中重悬成单细胞悬液,检查细胞活力后备用(要求细胞活力在95%以上)。

1.3.2 骨髓移植 移植前5d受体鼠开始饮用含红霉素(250mg/L)的抗生素溶液进行肠道准备。移植当日小鼠置于特制的表面多孔的塑料盒内,全身均匀接受⁶⁰Co照射(总剂量7.5Gy),照射后6h内,以1ml注射器25号针头经尾静脉按每只 $2 \times 10^6/0.2$ ml注射供体小鼠骨髓有核细胞。移植后小鼠移入超净台中并在附带空气过滤帽的塑料透明鼠盒中喂养。食物经⁶⁰Co照射消毒,饮水(pH3~5)经高压消毒。移植后受体鼠饮用含红霉素的抗生素溶液至少2周。

1.4 血常规、血肌酐、尿素氮检测 麻醉小鼠,心脏

取血20 μ l,抗凝、稀释,检测血常规。另抽取血液1ml,分离收集血清,Beckman自动生化仪测定血清尿素氮、血清肌酐。

1.5 小鼠肾脏组织的H-E染色 小鼠肾组织用10%中性甲醛溶液固定后行H-E染色。

1.6 GFP的检测

1.6.1 流式细胞仪 将BMT组受体鼠于56、84d处死后,摘取双侧胫骨、股骨,剪刀分别剪去两端的骨皮质,1ml注射器7号针头以LG-DMEM冲出骨髓后,将骨髓液依次经过7号和4号针头吹打,经200目钢筛过滤制成单细胞悬液,红细胞裂解液4℃裂解10min,PBS洗涤,将得到的细胞在LG-DMEM中重悬成单细胞悬液,流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)检测骨髓细胞中GFP阳性细胞比例。

1.6.2 免疫组织化学法 饲养动物至预定时间,以2%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉,开胸,先用100ml 0.01mmol/L的磷酸盐缓冲液(PB,pH7.3)经心脏冲洗血液,再用500ml含4%多聚甲醛0.1mmol/L PB(pH7.3)灌注固定。灌注取一侧肾脏标本置于上述相同的固定液中后固定4h(4℃),然后移入含25%蔗糖的0.1mmol/L的PB中,4℃过夜,冷冻连续切片,行免疫组化染色,于荧光显微镜(Olympus公司)和激光共聚焦显微镜(Leica公司)下观察。

另一侧肾脏置于10%中性甲醛溶液中固定做石蜡切片,58℃烘干18h,常规脱蜡至水;3% H_2O_2 抑制内源性过氧化物酶;抗原修复,PBS洗 3×3 min;加GFP一抗(鼠)1:500,4℃过夜,PBS洗 3×3 min;b-SAR IgG 1:200,37℃,30min,PBS洗 3×3 min;S-HRP 1:400,37℃,30min;0.4%DAB+0.03% H_2O_2 显色12min,水洗,苏木精衬染,常规树脂封片。计算机图像分析计算GFP阳性细胞比例。

1.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS统计软件进行统计处理。

2 结果

2.1 一般情况 TBI组小鼠精神萎靡,进食减少,在照射后1周开始死亡,故在小鼠死亡高峰到来之前处死小鼠,取得标本。BMT组小鼠精神健旺,饮食基本如常,在观察期内体质量增加不明显,毛发逐渐变为灰白。

2.2 血常规及血生化结果 TBI组小鼠外周血三系细胞均减少,其中白细胞和血小板减少最明显,红细胞下降较少。BMT组经56、84d的骨髓重建,受体小鼠外周血白细胞、红细胞和血小板均恢复到基线水平。而各组血尿素氮和肌酐无明显变化(表1)。

表 1 3 组小鼠血常规、血尿素氮及肌酐结果

Fig 1 Blood routines, plasma nitrogen and creatinine of mice in 3 groups

Group	n	$(\bar{x} \pm s)$				
		WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	PLT ($\times 10^{12}/L$)	BUN ($c_B/\text{mmol} \cdot L^{-1}$)	SCr ($c_B/\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$)
Normal	15	7.12 \pm 1.72	9.90 \pm 1.04	0.98 \pm 0.18	10.30 \pm 2.06	16.20 \pm 3.42
TBI	15	3.10 \pm 0.99*	6.12 \pm 1.71*	0.23 \pm 0.08*	9.74 \pm 1.87	17.60 \pm 2.07
BMT						
D56	7	6.58 \pm 1.45	8.44 \pm 0.90	8.55 \pm 1.20	11.44 \pm 2.63	18.60 \pm 3.78
D84	8	7.32 \pm 1.34	1.02 \pm 0.19	1.01 \pm 0.11	10.68 \pm 1.70	17.60 \pm 2.41

TBI: Total body irradiation group; BMT: Bone marrow transplantation group; * $P < 0.05$ vs normal group

2.3 H-E 染色结果 TBI 和 BMT 组肾脏组织切片基本正常。

2.4 GFP 的检测结果 骨髓移植后 56 d 和 84 d, 受体鼠骨髓中 GFP 阳性细胞的比例分别为 (78.75 \pm 5.99)% 和 (79.58 \pm 4.60)%, 两者无明显差别。荧光显微镜下, BMT 组小鼠于骨髓移植后 56 d、84 d 在肾小管中可见绿色荧光(图 1)。激光共聚焦显微镜下, 叠加相的影像更清楚地显示了绿色荧光位于肾小管中(图 2)。免疫组化结果显示, 骨髓移植后 56 d、84 d, 小鼠肾小管中均可检测到 GFP 阳性细胞(图 3, 棕色为阳性), 计数 GFP 阳性细胞所占肾小管上皮细胞的比例分别为 (4.17 \pm

1.66)%、(3.88 \pm 1.35)%, 两者无明显差别。

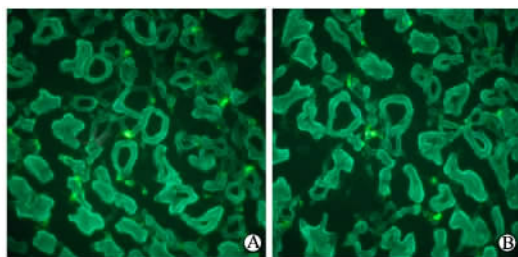


图 1 荧光显微镜下骨髓移植后 56 d(A)、84 d(B) 肾小管上皮细胞中的 GFP

Fig 1 GFP in tubular epithelial cells on D 56(A) and D 84(B) after bone marrow transplantation by fluorescence microscope

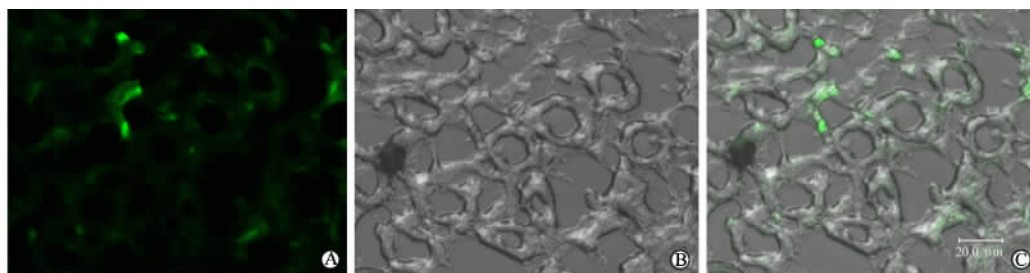


图 2 激光共聚焦显微镜下 BMT 后 84 d 肾小管上皮细胞中的 GFP

Fig 2 GFP in tubular epithelial cells on D 84 after bone marrow transplantation by laser scanning confocal microscope($\times 200$)

A: Fluorescence image; B: Transmission image; C: Overlapping image

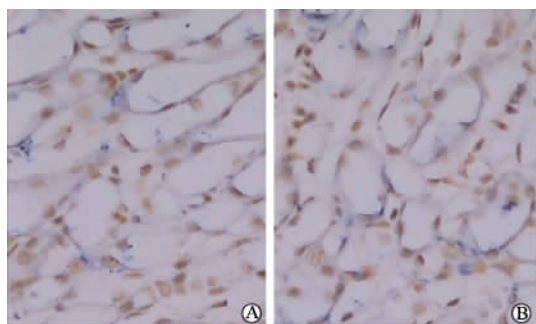


图 3 骨髓移植后 56 d(A) 和 84 d(B) 受体鼠肾小管上皮细胞中的 GFP 表达量

Fig 3 GFP in tubular epithelial cells on D 56(A) and D 84 (B) after bone marrow transplantation($\times 200$)

3 讨论

各种肾脏疾病渐进发展为终末期肾功能衰竭时只能借助于肾脏替代治疗——透析和肾移植。透析存在着各种并发症, 生存质量不高, 肾移植也由于受到供体短缺的限制而无法在临床上广泛开展。近年来, 随着分子生物学等技术的一系列进展, 以细胞为基础的成体干细胞治疗日益受到国内外学者的广泛关注, 骨髓细胞是目前最为广泛应用的细胞治疗中的一种种子细胞。不管是人类, 还是鼠类, 其骨髓源性细胞在一定条件下都有能力跨谱系分化成为其他组织类型的细胞, 比如成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞^[3~5], 甚至还

可分化为肌肉细胞^[6],表达组织特异的蛋白,如心脏、肝脏、大脑、骨骼肌和血管上皮的蛋白^[7~11]。

在骨髓源性细胞向肾脏实质细胞分化的研究中,人们发现,骨髓来源的细胞在一定条件下可以分化成为各种肾小球细胞及肾小管上皮细胞^[12~15],有助于修复肾损伤。此外,还有文献报道,即使没有肾脏损伤,骨髓细胞也能在生理条件下参与肾脏细胞的自我更新。比如 Poulosom 等^[16]将雄性大鼠的骨髓移植给雌性鼠,结果在受体鼠肾小管内中发现了Y染色体阳性细胞,这些细胞不仅具有小管上皮细胞表型,而且表达肾小管特异的细胞色素 P450 酶 CYP1A2。这些研究表明,植入的骨髓细胞在生理环境下参与了肾小管上皮的更新。

在本实验中,致死剂量⁶⁰Co 照射虽然引起小鼠血常规三系的明显减少,但血尿素氮、肌酐的检验及 H-E 染色证明,全身致死剂量的 γ 射线照射并未造成小鼠肾脏组织结构和功能的明显损伤。骨髓移植组受体鼠血常规基本正常及其骨髓细胞中 GFP 阳性细胞的比例几近 80%,说明受体鼠在骨髓移植后骨髓重建成功,荧光显微镜及激光共聚焦显微镜都在受体鼠的肾小管上皮处观察到了绿色荧光的存在,免疫组化定量检测发现,骨髓移植后第 56 天和第 84 天肾小管上皮处均有绿色荧光蛋白的表达,而且表达量没有明显差异。因此,本实验结果显示,在生理情况下骨髓细胞也能够参与肾小管上皮细胞的更新,尽管在这种情况下骨髓细胞向肾小管上皮细胞分化的水平很低,仅占肾小管上皮细胞总数的 2%~6%。

关于骨髓源性细胞是否能向肾脏细胞转分化,目前尚存在很大的争议。一些学者认为,即使是在急性肾小管坏死模型中,骨髓细胞促进肾小管功能恢复的最可能的作用方式还是通过旁分泌途径引起促炎症因子的下调和抗炎症因子的上调,促进残余肾小管细胞的分化及增生,从而最终修复了肾小管的结构及功能^[17,18]。因此,关于骨髓细胞与肾小管上皮细胞再生的相互关系还有待于进一步去阐明,但不管其机制如何,如何促进骨髓细胞向肾脏细胞的转分化从而寻求一种治疗各种肾脏损伤的新型治疗手段,仍是我们继续探索的方向。

[参考文献]

[1] Orlic D. Stem cell repair in ischemic heart disease: an experi-

mental model[J]. *Int J Hematol*, 2002, 76(Suppl 1):144-145.

[2] Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors[J]. *Cell*, 2002, 110:429-441.

[3] Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure[J]. *Kidney Int*, 1993, 43:1160-1178.

[4] Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure[J]. *N Engl J Med*, 1996, 334:1448-1460.

[5] Sutton TA, Molitoris BA. Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure[J]. *Semin Nephrol*, 1998, 18: 490-497.

[6] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:10344-10349.

[7] Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:4080-4085.

[8] Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans[J]. *Hepatology*, 2003, 2:11-16.

[9] Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells[J]. *Gene Ther*, 2001, 9:754-758.

[10] Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors[J]. *Science*, 1998, 279:1528-1530.

[11] Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, et al. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke[J]. *Stroke*, 2002, 33:1362-1368.

[12] Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, et al. Bone marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 553-562.

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

[14] Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, et al. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure[J]. *Kidney Int*, 2002, 62:1285-1290.

[15] Lin F, Cordes K, Li L, et al. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 1188-1199.

[16] Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration[J]. *J Pathol*, 2001, 195:229-235.

[17] Togel F, Hu Z, Weiss K, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289:F31-F42.

[18] Krause D, Cantley LG. Bone marrow plasticity revisited: protection or differentiation in the kidney tubule[J]? *J Clin Invest* JT, 2005, 115: 1705-1708.

[收稿日期] 2006-03-01

[修回日期] 2006-06-02

[本文编辑] 曹 静