

人骨髓多潜能成体祖细胞分化后细胞移植治疗兔心肌梗死

王晓华¹, 吴中海^{1*}, 唐力军²

(1. 南方医科大学基础医学部生理学教研室, 广州 510515; 2. 解放军福州总医院普通外科, 福州 350002)

[摘要] **目的:** 体外分选纯化人骨髓多潜能成体祖细胞(MAPCs), 诱导分化, 观察其分化后细胞移植治疗心肌梗死的疗效, 初步探讨 MAPCs 移植治疗心肌梗死的可行性。 **方法:** 取适量志愿者骨髓采用梯度密度离心法分离获取单个核细胞并行贴壁培养, 将获取的细胞通过 CD45⁻/GlyA 免疫微磁珠负分选(MACS)分离出 MAPCs; 锥虫蓝拒染试验测定分选后细胞活力, 流式细胞仪鉴定分选后细胞纯度; 传代后的细胞与 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度 5-氮杂胞苷(5-aza)共孵育 24 h, 通过透射电镜对诱导后的细胞进行鉴定, 并将诱导后的 MAPCs 移植于兔心肌梗死部位, 观察其对兔心功能的改善情况。 **结果:** MACS 分选前后 MAPCs 细胞活力分别为 (96.7 \pm 1.7)%、(96.0 \pm 2.4)%, 无显著差异; 获取的 CD45⁻/GlyA⁻ 细胞纯度大于 98%。分选后传代的 MAPCs 经 5-aza 诱导后, 透射电镜检查可见大量的粗大肌丝; 细胞移植治疗心肌梗死兔 4 周后, MAPCs 移植组左室射血分数、左室侧壁运动幅度、左室收缩期室壁增厚率, 以及左室最大压力上升速率 (dp/dt), 均明显高于心梗模型组和空白对照组 ($P < 0.05$ 或 0.01), 但低于假手术组 ($P < 0.05$); 空白对照组与心梗模型组相比无显著差异。 **结论:** MACS 分离出的高纯度人 MAPCs 在体外经 5-aza 诱导后能够向肌源性细胞分化, 兔心梗区内植入诱导后的 MAPCs 能够改善心功能。

[关键词] 人骨髓多潜能成体祖细胞; 细胞分化; 细胞移植; 心肌梗塞

[中图分类号] R 542.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0853-05

Differentiated bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells in treatment of rabbit cardiac infarction

WANG Xiao-hua¹, WU Zhong-hai^{1*}, TANG Li-jun² (1. Department of Physiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of General Surgery, General Hospital, PLA Fuzhou Military Area Command, Fuzhou 350002)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the biological characteristics and the differentiation ability of multipotent adult progenitor cells (MAPCs) *in vitro* and to observe the clinical outcome of MAPC differentiated cells in treatment of ischemic heart disease (IHD) in rabbits, so as to assess the feasibility of transplanting MAPCs in treatment of cardiac infarction. **Methods:** The bone marrow mononuclear cells were separated from volunteer bone marrow by gradient density centrifugation. The mononuclear cells were separated in CD45⁻ and GlyA⁻ fractions by magnetic cell sorting (MACS). The viability of MAPCs was assessed by trypan-blue assay and their purity were detected by flow cytometry. After cultured with 5-azacytidine (10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, MAPCs were subjected to transmission electron microscopic observation. The myogenic cells differentiated from MAPCs were transplanted into the myocardial infarction sites in rabbits and the improvement of their cardiac function was evaluated. **Results:** The viability of unpurified MAPCs were (96.7 \pm 1.7)%, which was not significantly different from that of the purified MAPCs (96.0 \pm 2.4)%. The purity of MACS-sorted CD45⁻ and GlyA⁻ cells was >98%. Thick myofibers were observed by transmission electron microscopy after induction with 5-aza. Four weeks after transplantation, the left ventricle ejection fraction, the movement extent of left ventricle, left ventricle systolic wall thickening and dp/dt of rabbits were all higher than those of the control group and cardiac infarction model group ($P < 0.05$ or 0.01), but lower than those of the sham operation group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The human MAPCs can differentiate into myogenic cells in the presence of 5-aza. The cardiac function of cardiac infarcted rabbits can be improved by MAPCs transplantation.

[KEY WORDS] multipotent adult progenitor cells from bone marrow; cell differentiation; cell transplantation; myocardial infarction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 853-857]

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植能够减少心肌梗死面积, 促进缺血心脏功能恢复^[1~4], 但是 MSCs 均一性差, 移植的效率有待进一步提高。多潜能成体干祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs)^[5~8]在人和啮齿动物骨髓中广泛存在, 体外培养能成为均一的单克隆

间充质干细胞, 可诱导分化为成血管细胞和成肌细胞等前体细胞, 这种纯度高、成分均一的单克隆 MAPCs 很可能是更理想的细胞来源。本实验在改

[作者简介] 王晓华, 硕士生, 主治医师。

E-mail: wxh862007@sina.com

* Corresponding author. E-mail: wzl@fimmu.com

进细胞培养基及免疫磁性分离(magnetic activated cell sorting, MACS)分选方法的基础上,以5-aza对其进行定向诱导分化,并将诱导后的MAPCs移植于兔心肌梗死部位,研究其对心脏功能改善的情况。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成人骨髓由临床志愿者提供(经学校伦理委员会批准);清洁级雄性新西兰大白兔50只,2.5~3.0 kg,由南京军区福州总院动物实验中心提供;MAPCs培养基自制(低糖DMEM, MCDB-201,胰岛素,转铁蛋白,牛血清白蛋白,地塞米松,硒仕钠抗坏血酸 2-磷酸盐,亚油酸,谷氨酰胺等);Ficoll,5-aza(Sigma公司);小鼠抗兔CD45、Gly-A、胎牛血清(Gibco公司);羊抗鼠IgG-FITC、IgG-PE(晶美公司);CD45、Gly-A cell isolation kit、MACS高强磁场、阴性选择柱(Miltenyi公司);流式细胞仪(Beckman公司);CO₂孵箱、低温离心机(Heraeus公司);彩色多普勒超声诊断仪(Philips公司);电子透射显微镜(Hitachi公司);生物机能实验系统(成都BL-410)

1.2 人骨髓单个核细胞的获取及培养 按临床常规骨髓穿刺操作采集志愿者髂骨内骨髓5~20 ml,置淋巴分离液中2 500 r/min,15 min密度梯度离心。获取的单个核细胞以 1×10^6 加入自制的MAPCs培养基中,37℃、饱和湿度,5%CO₂孵育箱连续培养,48 h首次换液,3~4 d换液1次,待贴壁细胞接近长满瓶底时,0.25%胰酶消化,离心收集,镜下计数,继续接种传代培养,为MACS分选作准备。

1.3 MACS法分选MAPCs 标准Buffer重悬细胞,调整浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /ml。按20 μ l/ml比例加入CD45微型磁珠,6~12℃孵育15 min。洗涤、离心、细胞重悬,加至阴性选择柱上,于磁分离仪的磁场中流过,得阴性细胞液,300 r/min,10 min,离心得CD45⁻细胞,1 ml标准Buffer将CD45⁻细胞重悬。按20 μ l/ml细胞悬液比例加入Gly-A微型磁珠。重复步骤得CD45⁻,Gly-A⁻MAPCs细胞。

1.4 分选后细胞活力的测定和细胞纯度的检测

1.4.1 锥虫蓝拒染试验测定细胞活力 随机取100个高倍镜视野($\times 200$)计数100个分选前后的细胞,计数锥虫蓝拒染细胞所占百分比,了解MACS分选前后细胞活力(细胞存活率)。细胞计数:细胞数/ml=4个大方格总数/ $4 \times 10^4 \times$ 稀释倍数。细胞

存活率=0.5%锥虫蓝染色阴性细胞/100个细胞/HP $\times 100\%$ 。

1.4.2 流式细胞仪鉴定分选后细胞纯度 标准Buffer洗涤样品,300 r/min,10 min,离心收集CD45⁻,Gly-A⁻细胞(MAPCs)。弃上清后加入一抗(1:500,CD45⁻、Gly-A⁻)各300 μ l,混匀,室温反应30 min。标准Buffer洗涤两次,弃上清,加1:50二抗500 μ l,室温反应30 min。标准Buffer洗涤2次,加1%的多聚甲醛,对一抗的表达情况进行分析。一抗替换为小鼠IgG_a作为阴性对照。

1.5 MAPCs的传代、培养及定向诱导分化和鉴定 经MACS筛选出的MAPCs密度调整为 1×10^6 /ml,贴壁连续传代培养。取第2代细胞,加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度5-aza与细胞共孵育,24 h后更换培养液,继续用不含5-aza的自制培养基培养。诱导后10 d,收获细胞,透射电镜检查并摄片,观察细胞内有无肌丝表达。

1.6 实验动物分组及模型建立 实验兔随机分为4组(各组均为12只):假手术组,心肌梗死模型组,MAPCs移植组,空白对照组。除假手术组外,其他各组均结扎左冠状动脉前降支建立兔心肌梗死模型。1周后,MAPCs移植组兔取诱导后的MAPCs细胞悬液分4点注射到心肌梗死兔左室前壁,空白对照组注射等体积不含血清的培养液,心肌梗死模型组不进行MAPCs移植治疗,假手术组只开胸,不结扎冠状动脉也不进行其他处理。

1.7 手术前后兔心功能的测定 彩色多普勒超声心动图于手术前后、细胞移植4周后分别检测各组成动物左室射血分数、左室侧壁运动幅度及左室收缩期室壁增厚率,血流动力学监测左心室最大压力上升速率(dp/dt)。

1.8 统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人骨髓单个核细胞和分选后MAPCs的培养 相差显微镜下观察结果表明:初接种的骨髓单个核细胞呈圆球状分散悬浮于培养液中,有少量造血细胞,48 h后换液去除非黏附细胞,留下来的细胞大多贴壁成梭型生长。培养1周左右时,梭型细胞基本铺满瓶底。

分别计数经 MACS 筛选前后细胞数, 平均每 1×10^6 /ml 贴壁细胞可分选出约 $(5 \sim 10) \times 10^4$ /ml 数量级的 MAPCs。筛选出的 MAPCs, 培养 24 h 内, 即可见贴壁细胞, 数目不断增加, 48 h 后细胞基本贴壁, 更换培养基, 细胞形态和骨髓基质细胞接近, 贴壁生长, 呈长梭型, 但细胞纯度高, 几乎无其他类型细胞, 约 5 d 后有细胞克隆团形成, 平均 9~14 d 传代 1 次, 体外扩增 5 代细胞数大约能达到 1×10^8 。镜下观察传代的、未行诱导分化的 MAPCs 细胞形态稳定, 未出现异常分化现象。(图 1A、1B)

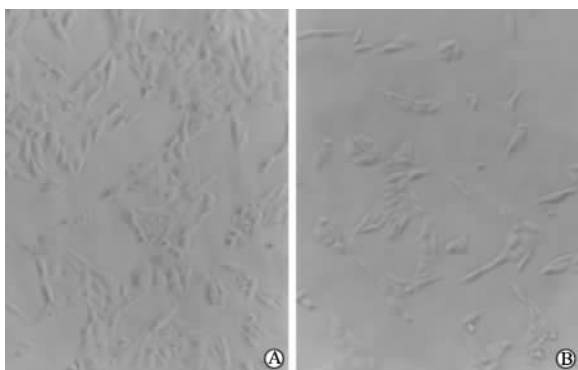


图 1 MACS 筛选出的 MAPCs 原代(A)及第 6 代(B)生长形态

Fig 1 Morphology of multipotent adult progenitor cells purified from human bone marrow by magnetic activated cell sorting (X100)

A: Primary passage; B: The 6th passage

2.2 细胞活力鉴定和细胞纯度的检测结果 锥虫蓝拒染试验计数发现分选前后 MAPCs 的细胞活力(细胞存活率)分别为 $(96.7 \pm 1.7)\%$ 和 $(96.0 \pm 2.4)\%$, 表明分选前后细胞活力水平无明显改变

($P > 0.05$)。流式细胞仪检测我们经 MACS 分选获取的 $CD45^-$ 、 $Gly-A^-$ 细胞纯度大于 98%。

2.3 诱导后 MAPCs 超微结构的观察 经 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度 5-aza 诱导培养 10 d 后电镜观察, 细胞内可见大量的粗大肌丝(图 2)。

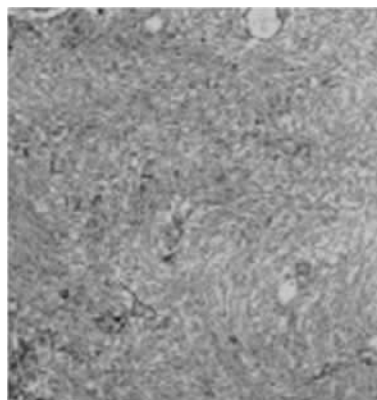


图 2 5-aza(10 μmol/L)诱导 10 d 后 MAPCs 透射电镜图

Fig 2 Thick myofibers in MAPCs 10 d after 5-aza(10 μmol/L) induction by transmission electron microscopy (X35 000)

2.4 动物模型建立情况和心功能检测结果 假手术组无 1 例动物死亡, 心梗模型组及空白对照组死亡率分别为 16.67% (2/12) 和 8.33% (1/12); MAPCs 移植治疗组为 16.67% (2/12), 各组间无显著差异。

2.4.1 超声心动图观察结果 术后 4 周, MAPCs 移植组左室射血分数、左室侧壁运动幅度、左室收缩期室壁增厚率均明显高于心梗模型组和空白对照组, 低于假手术组 ($P < 0.05$); 而空白对照组与心梗模型组相比无显著差异。具体见表 1。

表 1 各组动物心动图检测心功能变化

Tab 1 Cardiac function state in different groups

($\bar{x} \pm s$)

Group	n	LVEF (%)			LVFWS D(l/mm)			LVΔT (%)		
		pre-operation	post-operation	4 weeks after transplantation	pre-operation	post-operation	4 weeks after transplantation	pre-operation	post-operation	4 weeks after transplantation
Sham	12	64.8 ± 3.3	63.9 ± 4.9	65.4 ± 4.8	2.73 ± 0.31	2.81 ± 0.22	2.79 ± 0.32	31.7 ± 3.2	29.6 ± 6.4	30.8 ± 5.3
		MI	10	63.6 ± 6.2	39.5 ± 3.9*	40.2 ± 4.7*	2.93 ± 0.38	0.95 ± 0.31*	1.10 ± 0.41*	29.2 ± 4.3
Blank	11	65.7 ± 2.4		38.2 ± 5.6*	40.9 ± 5.8*	2.72 ± 0.42	0.97 ± 0.31*	1.06 ± 0.34*	28.8 ± 4.8	10.2 ± 3.9*
		MAPCs	10	62.8 ± 3.5	38.8 ± 6.1*	51.9 ± 5.7*△	2.83 ± 0.47	0.98 ± 0.13*△	1.88 ± 0.29*△	30.9 ± 3.9

* $P < 0.05$ vs sham group, △ $P < 0.05$ vs MI group. MI: Myocardium infarction

2.4.2 血液动力学检测结果 左心室内最大压力上升速率(dp/dt)是反映心功能的一项重要指标,与心肌收缩能力呈正相关。4周后各组存活动物心脏血流动力学检测结果显示:MAPCs移植组、假手术组、心梗模型组和空白对照组 dp/dt 分别为 5.62 ± 0.53 、 7.02 ± 0.38 、 2.98 ± 0.57 和 3.01 ± 0.43 。MAPCs移植治疗组明显高于心梗模型组及空白对照组($P < 0.01$),低于假手术组($P < 0.05$);而空白对照组与心梗模型组相比无差异。

3 讨论

心肌细胞再生治疗急性心肌梗死是一种前景很好的方法,保护(增加)具有收缩功能的有效心肌细胞是治疗各种心肌损伤最为合理的途径。近年来,干细胞移植为心肌梗死的治疗提供了一种新思路。MSCs不仅可以分化为同胚层的成体细胞,而且在特定情况下尚可跨胚层分化,被认为是最有希望的工程细胞之一。但是,由于MSCs是许多种细胞的混合,其动物实验及临床疗效并不理想,因此,选择一种纯度高、成分均一的更理想的细胞来源是决定干细胞移植效果的关键,这对进一步广泛深入的研究及临床应用显得尤其重要。多潜能成体祖细胞(MAPCs)可通过阴性筛选获得,是用MACS剔除骨髓中CD45、Gly-A阳性细胞,并进行体外培养及扩增获得的,与MSCs表达特性一致^[9],是MSCs的一个亚群^[10]。这种细胞可倍增50次以上,具有与胚胎干细胞相似的分化能力,植入体内后可进一步分化为表型和功能均成熟的相应成体细胞。

本研究通过密度梯度离心^[12]、贴壁培养筛选^[13]、MACS分选这3个步骤,每 1×10^6 /ml贴壁细胞可分选出约 $(5 \sim 10) \times 10^4$ /ml数量级的MAPCs,分选效率高于常规约一个数量级。锥虫蓝拒染试验结果证明MACS分选前后的细胞活力无明显改变;流式细胞术检测结果显示分选后的细胞纯度仍保持在98%以上。磁性分选技术(MACS)分选骨髓干细胞的主要原理^[11]是,将细胞用超级顺磁性的MACS Microbeads(MACS微型磁珠)做特异性的标记,然后通过一个放在强而稳定磁场中的分选柱,分选柱里的基质造成一个高梯度磁场。被磁性标记的细胞滞留在柱里而未被标记的细胞则流出。当分选柱移出磁场后,滞留在柱内的磁性标记细胞就可以被洗脱出来,达到富集纯化的目的。微

小磁珠可直接将筛选所得的细胞用于下一步实验而不影响细胞的生物学特性。与传统技术相比,它具有省时、简便、分离纯度好、分离容量大等优点。

在CD45、GlyA免疫微磁珠成功分选骨髓源MAPCs基础上,我们以 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度的5-aza处理细胞^[14],通过透射电镜观察经诱导后10d的MAPCs超微结构,发现有较多数目的细胞内有肌丝表达,并可见粗大的肌丝。这说明经过诱导的MAPCs已转化成为肌源性细胞。5-aza是胞嘧啶核苷类似物,可以取代胞嘧啶核苷参与DNA合成,它诱导分化的机制可能是通过对DNA中一些胞嘧啶核苷去甲基,使控制分化的特定调控基因上的阻遏蛋白编码基因去甲基化而发生构型改变,起到激活表达肌细胞基因的作用^[15],从而促使MAPCs向肌细胞方向分化。

进一步评估细胞移植后心功能的变化,发现兔发生心肌梗死的心脏移植MAPCs后 dp/dt 较移植前明显升高,说明注射MAPCs能够明显改善心肌梗死动物的心功能。分析其可能机制包括:(1)MAPCs分化的肌细胞,具有较高的弹性,加强了心室壁的应力,从而限制梗死后瘢痕组织过度扩张,防止心室重构。在本实验中,衡量移植组动物左室收缩功能的指标(左室收缩期室壁增厚率和左室侧壁运动幅度)均较心梗模型组高;(2)MAPCs分化为心肌样细胞,同宿主细胞相互融合形成新的心肌组织,从而使具有收缩功能的细胞数量得到较大保存,进而增加心功能。但是即使是移植了MAPCs,实验动物的心功能也没有完全恢复正常,其原因一方面可能是移植的细胞数量不足,成活率低,未能与周围心肌细胞发生很好的耦合;另一方面,存活并分化的细胞并不能完全替代已经梗死后瘢痕化的组织,或尚未与宿主细胞发生完全耦联,收缩不够协调所造成的。这些问题有待进一步更深入的研究探讨。

本研究结果证实了MAPCs经5-aza诱导后可向肌源性细胞转化,经注射到心肌梗死兔左室前壁后能够明显改善心功能,但还存在如何进一步提高其向心肌细胞分化能力,诱导后的细胞安全性怎么样,以及高龄或者接受过化学性、放射性治疗的供体用于治疗是否可行等问题,还需要做更多、更细致的工作。

[参考文献]

[1] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regen-

- erate infarcted myocardium[J]. Nature,2001,410: 701-705.
- [2] Kocher AA,Schuster MD,Szabolcs MJ,et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function[J]. Nat Med,2001,7: 430-436.
- [3] Tse HF,Kwong YL,Chan JK,et al. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation[J]. Lancet,2003,361: 47-49.
- [4] Perin EC,Dohmann HF,Borojevic R,et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe,chronic ischemic heart failure[J]. Circulation,2003,107: 2294-2302.
- [5] Reyes M,Lund M,Verfaillie CM,et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. Blood,2001,98: 2615-2625.
- [6] Reyes M,Dudek A,Verfaillie CM,et al. Origin of endothelial progenitors in human post-natal bone marrow[J]. J Clin Invest,2002,109: 337-346.
- [7] Schwartz RE,Reyes M,Verfaillie CM,et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells[J]. J Clin Invest,2002,109: 1291-1302.
- [8] Jiang Y,Jahagirdar BN,Reinhardt RL,et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature,2002,418: 41-49.
- [9] Pittenger MF,Mackay AM,Beck SC,et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science,1999,284: 143-147.
- [10] Reyes M,Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells[J]. Ann NY Acad Sci,2001,938:231-235.
- [11] Wynter EA,Coutinho LH,Marsh JC,et al. Comparison of purity and enrichment of CD34⁺ cell of bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed of apheresis) using five separation systems[J]. Stem Cells,1995,13: 524-532.
- [12] Lisignoli G,Remiddi G,Cattini L,et al. An elevated number of differentiated osteoblast colonies can be obtained from rat bone marrow stromal cells using a gradient isolation procedure[J]. Connect Tissue Res,2001,42: 49-58.
- [13] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. Science,1997,276: 71-74.
- [14] Wakitani S,Saito T,Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine [J]. Muscle Nerve,1995,18: 1417-1426.
- [15] Taylor SM. 5-Aza-2-deoxycytidine: cell differentiation and DNA methylation [J]. Leukemia,1993,7(Suppl 1): 3-8.
- [收稿日期] 2006-06-19 [修回日期] 2006-07-20
[本文编辑] 贾泽军,邓晓群

长海医院成功完成国内首例自体肾脏移植手术

为解除肾脏动脉瘤随时可能大出血的危险,第二军医大学长海医院2006年7月18日成功将患者仅剩的一只左肾“取出”,在剥离了动脉瘤后再重新“移植”回其体内。手术由泌尿外科主任孙颖浩教授、血管外科主任景在平教授先后上台主刀,历时11h。据检索,如此高难度的自体肾移植手术在国内未见有报道。

患者,男,50岁,4年前一次例行体检时,被B超查出“右肾囊肿”,2年后接受了“右肾切除术”。今年5月,行CTA检查,发现患者左肾动脉远端有动脉瘤。动脉瘤存在于肾动脉远端,已进入肾窦内部,无法采用常规的局部解剖肾动脉主干再切除动脉瘤的方法,而且患者的右肾已经被切除,手术风险很大。为此,长海医院血管外科邀请了泌尿外科、影像科、肾内科、麻醉科等专家进行会诊,正在中国参加学术会议的国际知名血管外科专家Noppney也亲自赶来参加讨论。院方同时还与国外一些医学机构进行了远程会诊。专家们经多方讨论,并与患者进行充分沟通,决定打破常规,采取先切除左肾,然后剥离动脉瘤,然后再进行肾脏重建的手术方法,既去除动脉瘤,又保住患者唯一的左肾。

手术分5个阶段:先是泌尿外科专家从血管丛中取出左肾;然后由血管外科专家把鸡蛋般大小、瘤壁已非常薄的动脉瘤从肾窦里慢慢剥离出来;再从患者体内取2根自体大隐静脉进行远端动脉“通道”再造;其后是血管外科专家剥离肾静脉和肾动脉的血管以重新搭建肾功能“通道”;最后由泌尿外科专家把输尿管重建到患者的膀胱上去。

术后,被清除了动脉瘤的左肾成功“移植”回患者体内,输尿管当即流出尿液,表示肾功能基本恢复。