

# 骨髓间充质干细胞对阿霉素肾病大鼠肾脏nephin表达的影响\*

董晨, 杨焕丹, 丰炳峰, 关凤军, 赵彤

## Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on nephrin expression in the kidney of adriamycin-induced nephritic rats

Dong Chen, Yang Huan-dan, Feng Bing-feng, Guan Feng-jun, Zhao Tong

### Abstract

**BACKGROUND:** Numerous studies have addressed bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation for treating acute kidney injury, but few reports have concerned BMSCs transplantation for chronic kidney disease.

**OBJECTIVE:** To investigate the repair effects of BMSCs transplantation on podocytes of adriamycin-induced nephrotic rats via abdominal aorta and effects on Nephrin mRNA expression in the kidney.

**METHODS:** BMSCs of Sprague Dawley rats were harvested, cultured and purified by whole bone marrow method + adherence screening method, and then used for transplantation. The Sprague Dawley rats were randomly assigned to three groups: normal group: normal Sprague Dawley rats, no intervention; model group: injection of adriamycin once into caudal vein 5 mg/kg + infusion of saline 1 mL into abdominal aorta on the same day; BMSCs group: injection of adriamycin once into caudal vein 5 mg/kg + infusion of stem cells  $1 \times 10^7$  into abdominal aorta on the same day, about 1 mL volume. Eight rats from each group were collected at 7, 14 and 28 days following treatment. The cell membrane antigens were detected with flow cytometry analysis. The urine protein was measured at 24 hours using sulfosalicylic acid-sodium sulfate turbidimetric method. Serum albumin and blood fat were examined utilizing automatic biochemistry analyzer. The renal histological changes were observed under transmission electron microscope and using hematoxylin-eosin staining. The expression of Nephrin mRNA in the kidney tissues was measured using reverse transcription-polymerase chain reaction.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with normal group, rats in model group developed nephropathy characterized by ascites, proteinuria, hypoalbuminemia, hypercholesterolemia, and progressive renal injury. However, the symptoms in BMSCs group were significantly ameliorated compared with model group. Nephrin mRNA expression in kidney was significantly decreased in the model group compared with normal group ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, Nephrin mRNA expression was increased in BMSCs group ( $P < 0.05$ ). Results have suggested that BMSCs play a protective effect in adriamycin-induced nephrotic rats via increasing nephrin mRNA expression in kidney tissue.

Dong C, Yang HD, Feng BF, Guan FJ, Zhao T. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on nephrin expression in the kidney of adriamycin-induced nephritic rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(32): 5897-5902. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Department of Pediatrics, Hospital Affiliated to Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China

Dong Chen★, Master, Chief physician, Department of Pediatrics, Hospital Affiliated to Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China dc2260@163.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Department of Education of Jiangsu Province, No 08KJJB320018\*

Received: 2010-03-03  
Accepted: 2010-05-10

### 摘要

**背景:** 目前对于骨髓间充质干细胞移植治疗急性肾损伤的研究较多, 但对治疗慢性肾脏疾病的研究报道甚少。

**目的:** 观察经腹主动脉近肾动脉处移植的骨髓间充质干细胞对阿霉素肾病大鼠足细胞的修复作用及对肾脏 Nephrin mRNA 表达的影响。

**方法:** 全骨髓法+贴壁筛选法分离培养纯化 SD 大鼠骨髓间充质干细胞用于移植。SD 大鼠随机数字表法分为 3 组: 正常组为正常 SD 大鼠, 无任何干预措施; 模型组大鼠尾静脉 1 次注射阿霉素 5 mg/kg+当日腹主动脉注入生理盐水 1 mL; 骨髓间充质干细胞治疗组大鼠尾静脉 1 次注射阿霉素 5 mg/kg+当日腹主动脉注入干细胞  $1 \times 10^7$  个, 体积约 1 mL。各组于处理后 7, 14, 28 d 3 个时间点各取 8 只大鼠用于取材。流式细胞仪对骨髓间充质干细胞表面分子进行鉴定, 磺基水杨酸-硫酸钠比浊法测 24 h 尿蛋白, 全自动生化分析仪测血生化指标(白蛋白、血脂), 苏木精-伊红染色及透视镜下观察肾脏组织的病理变化, RT-PCR 检测肾组织 Nephrin mRNA 的表达。

**结果与结论:** ①与正常组相比, 模型组大鼠均出现肾病综合征表现, 以腹水、大量蛋白尿、低蛋白血症、高胆固醇血症及足细胞足突广泛融合为特征; 骨髓间充质干细胞治疗组较模型组则有明显改善。②与正常组相比, 模型组大鼠肾组织 Nephrin mRNA 表达明显降低( $P < 0.05$ ); 骨髓间充质干细胞治疗组与模型组相比, 肾组织 Nephrin mRNA 表达有所回升( $P < 0.05$ )。提示骨髓间充质干细胞移植能明显增加阿霉素肾病大鼠肾组织 nephrin mRNA 的表达, 并对受损的肾脏组织起到一定的保护作用。

**关键词:** 肾病综合征; 骨髓间充质干细胞; 移植; nephrin; 阿霉素; 蛋白尿; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.32.002

董晨, 杨焕丹, 丰炳峰, 关凤军, 赵彤. 骨髓间充质干细胞对阿霉素肾病大鼠肾脏 nephin 表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32):5897-5902. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

徐州医学院附属医院儿科, 江苏省徐州市 221000

董晨★, 女, 1965 年生, 江苏省徐州市人, 汉族, 1999 年徐州医学院毕业, 硕士, 主任医师, 主要从事小儿肾脏疾病诊断及治疗的研究。dc2260@163.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2010)32-05897-06

收稿日期: 2010-03-03  
修回日期: 2010-05-10  
(20091203001/WL Q)

## 0 引言

微小病变型肾病综合征时, 大量蛋白尿是其最主要的临床特点, 而足细胞损伤是蛋白尿

发生的主要机制<sup>[1-3]</sup>。该病变中的足细胞经历一种表型的转变, 后果即是滤过屏障的有效滤过率下降, 伴随大量蛋白滤出而造成肾病综合征。因此, 如何修复受损的足细胞成为研究的热点。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesen

mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种具有多项分化潜能的干细胞,不仅可以分化为骨、软骨、脂肪细胞等间质组织,更可以向肾实质细胞转化<sup>[4]</sup>。在肾脏领域, BMSCs已有治疗急性肾功能衰竭和急性肾小管损伤的成功报告<sup>[5-6]</sup>,但BMSCs对慢性肾脏疾病如肾病综合征的治疗作用则报道甚少。因此,设想能够运用干细胞的归巢、自我更新和分化的能力,将干细胞移植后在适当的微环境下诱导分化为足细胞,从而对损伤的足细胞起到修复和再生作用。

实验建立大鼠微小病变型肾病模型,通过腹主动脉近肾动脉处移植BMSCs,观察BMSCs对阿霉素肾病大鼠足细胞的修复作用。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2008-09/2009-07在徐州医学院中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 清洁级SD雄性大鼠95只,体质量120~180 g,由徐州医学院实验动物中心提供,各组大鼠体质量差异无显著性意义,饲养环境及饮食饮水无差异,实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准<sup>[7]</sup>。

**主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
阿霉素,批号 C80301A	浙江海正药业股份有限公司 产品
DMEM-F12	GBICO 公司
胎牛血清	杭州四季青
TRizol-A+总 RNA 提取试剂、Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒	TIANGEN 生物工程有限 公司
模板 DNA 链及 PCR 引物	上海捷瑞生物工程有限公司
恒温 CO <sub>2</sub> 培养箱	美国 Sheldon 公司
超净操作台	苏州净化设备公司
SC-101 型鼓风电热恒温干燥箱	浙江省嘉兴市新胜电器厂
PCR 反应仪	Bio-Rad Laboratories Inc 公司
电泳仪	上海医用恒温设备厂

**实验方法:**

**BMSCs体外分离培养<sup>[8-10]</sup>、纯化及鉴定<sup>[11-12]</sup>:** 取体质量120~180 g雄性SD大鼠5只,无菌条件下分离出大鼠股骨和胫骨,离体的骨骼放入灭菌PBS中冲洗。剪去干骺端,暴露骨髓腔,用无血清的含100 mg/L青霉素、链霉素100 mg/L的DMEM-F12培养基反复冲洗骨髓腔,直至腔内所有骨髓冲净。接种于含体积分数为10%胎牛血清的DMEM-F12培养基,置于37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱内培养。3 d首次换液,以后每

3 d换液1次,7~14 d细胞生长融合达80%~90%以上,以0.25%胰蛋白酶消化后按1:3的比例传代培养。倒置显微镜下逐日观察细胞形态。细胞传至第3代时吸弃培养液,PBS洗涤3次,加入胰酶+EDTA溶液消化细胞,制成细胞悬液备用。

**细胞表面抗原流式细胞仪检测:** 收集第3代大鼠BMSCs,PBS洗涤3次,调节细胞浓度至 $3 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ,平均分至3个Eppendorf管中。分别加入FITC-CD45, FITC-CD90单克隆抗体10 μL。室温下避光孵育30 min,PBS洗涤3次后上流式细胞仪检测。同时用PBS代替一抗作空白对照。

**阿霉素肾病模型制备与动物分组:** 剩余90只大鼠随机数字表法分为3组:正常组( $n=24$ )、模型组( $n=33$ )和BMSCs治疗组( $n=33$ )。每组再随机分为处理后7, 14, 28 d 3个观察时间点,正常组每个观察时间点8只,模型组和BMSCs治疗组每个观察时间点11只。参照Bertani等<sup>[13-14]</sup>在1982年创建的经典微小病变型肾病(minimal change nephrotic syndrome, MCNS)动物模型,模型组、BMSCs治疗组经尾静脉一次性注射速溶型阿霉素(5 mg/kg,用生理盐水溶解)制备动物模型。

**细胞移植:** 造模即日, BMSCs治疗组大鼠用10%的水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,沿腹正中中线剪开腹腔,暴露腹主动脉,用动脉夹夹闭双肾动脉分支两端腹部手术下经腹主动脉近肾动脉处分别注射1 mL BMSCs悬液( $1 \times 10^7$ 个细胞),模型组注射1 mL生理盐水,分笼饲养,分别于实验7, 14, 28 d进行病理检查。

**移植后功能学检测:**

**24 h尿蛋白的检测:** 于造模后7, 14, 28 d各个时间点处死大鼠前用代谢笼收集大鼠24 h尿液,磺基水杨酸-硫酸钠比浊法测24 h尿蛋白。

**血生化指标白蛋白、血脂的检测:** 于造模后7, 14, 28 d各个时间点,各组大鼠眶周采血1 mL,离心保留血清,全自动生化分析仪测血白蛋白、血脂变化。

**肾脏标本的留取:** 各个时间点大鼠麻醉取血后,迅速取出肾脏,所有标本分成3份,1份以3%戊二醛固定用于电镜检查,1份以体积分数为10%甲醛固定制成蜡块,剩余1份置入-80 °C冰箱待检RT-PCR。

**肾组织苏木精-伊红染色:** 肾组织经体积分数为10%中性缓冲甲醛固定,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片(厚度为4 μm),苏木精-伊红染色观察。

**电镜观察:** 取1 mm×1 mm×1 mm的肾皮质,经2.5%戊二醛固定、漂洗、1%饿酸后固定、脱水、环氧树脂包埋及聚合、修块及切片,超薄切片后醋酸铀-柠檬酸铅染色,透射电镜下观察。

**肾组织Nephrin mRNA检测:** 采用Trizol试剂提取肾皮质总RNA,具体方法参见说明书。

## 引物序列:

## Nephrin

上游引物: 5'-AGC CTC TTG ACC ATC GCT AA

下游引物: 5'-CCC AGT CAG CGT GAA GGT

## AG

PCR扩增条件为反转录50 °C 30 min、PCR初始反应94 °C 2 min、变性94 °C 30 s、退火58 °C 45 s、延伸65 °C 1 min、30个循环、最终延伸65 °C 10 min。GAPDH作为内参照,产物经1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统吸光度扫描拍照,计算mRNA相对含量:

Nephrin mRNA吸光度值/GAPDH吸光度值
----------------------------

**主要观察指标:** ①BMSCs的纯化及鉴定。②移植后24 h尿蛋白、血白蛋白、血脂的变化。③足细胞足突结果观察。④肾组织Nephrin mRNA表达的变化。

**设计、实施、评估者:** 实验设计、干预实施及结果评估为全部作者,均经过系统培训,未采用盲法评估。

**统计学分析:** 由第二作者应用SPSS 13.0软件进行统计处理,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组数据进行正态性和方差齐性检验,各组间比较行 $t$ 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 实验过程中模型组大鼠死亡6只,BMSCs治疗组大鼠死亡4只,考虑为手术创伤、PAN不良反应等有关,正常组全部存活。每个时间点均按8只大鼠进行统计学处理。

**2.2 BMSCs的纯化及鉴定** 第3代BMSCs形态上趋于一致,呈梭形的成纤维细胞样,呈漩涡状或辐射状排列,见图1。

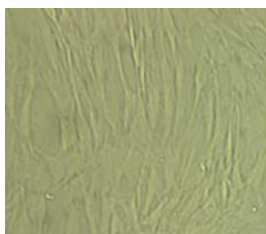
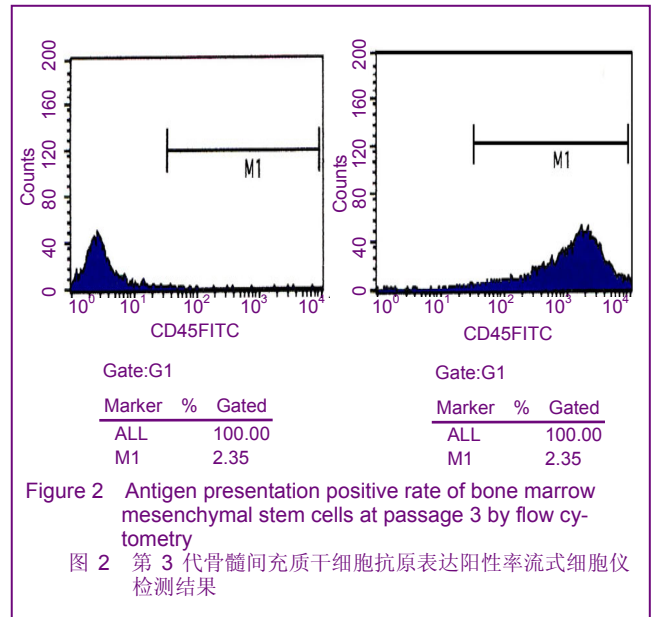


Figure 1 Morphological observation of the third passage of bone marrow mesenchymal stem cells under an inverted microscope (x400)

图1 倒置显微镜观察第3代骨髓间充质干细胞形态变化(x400)

**2.3 流式细胞仪分析结果** 细胞间充质干细胞标记物CD90表达阳性,阳性率为98.6%,造血干细胞标志物CD45呈低表达,符合BMSCs表面标志表达,见图2。



### 2.4 移植后功能学检测结果

**各组大鼠24 h尿蛋白及血白蛋白、血胆固醇检测结果:** 阿霉素造模后第7天开始出现蛋白尿,14 d后蛋白尿明显增加,28 d达高峰,与正常组相比,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。BMSCs治疗组第7天尿蛋白和模型组相比无明显变化( $P > 0.05$ ),第14,28天尿蛋白有所减少,与模型组相比,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 各组不同时间点24 h尿蛋白变化  
Table 1 24 h urinary protein changes at various time points in each group ( $\bar{x}\pm s$ , n=8, mg/d)

Group	7 d	14 d	28 d
Normal	5.05±0.93	5.62±1.16	5.44±1.10
Model	14.03±1.71 <sup>a</sup>	66.29±3.32 <sup>a</sup>	161.24±4.54 <sup>a</sup>
BMSCs	13.92±1.60 <sup>ab</sup>	25.82±1.95 <sup>ab</sup>	36.34±2.87 <sup>ab</sup>

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. normal group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. model group

血白蛋白也出现类似的规律,模型组白蛋白逐渐减低,和正常组相比,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),BMSCs治疗组14~28 d后白蛋白回升,和模型组相比,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 各组不同时间点血白蛋白变化  
Table 2 Serum albumin changes at various time points in each group ( $\bar{x}\pm s$ , n=8, g/L)

Group	7 d	14 d	28 d
Normal	39.81±1.54	36.35±1.62	35.00±4.30
Model	28.61±1.98 <sup>a</sup>	25.30±1.12 <sup>a</sup>	15.70±2.14 <sup>a</sup>
BMSCs	29.04±2.82 <sup>ab</sup>	30.01±2.39 <sup>ab</sup>	28.06±1.64 <sup>ab</sup>

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. normal group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. model group

模型组血总胆固醇在造模后7~28 d逐渐升高,和正常组相比,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),BMSCs治

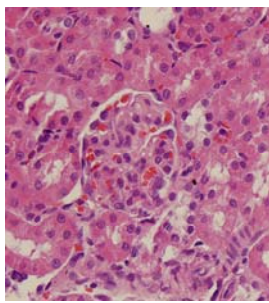
疗组胆固醇明显降低, 和模型组相比, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见表3。

表3 各组不同时间点胆固醇值变化  
Table 3 Cholesterol value changes at various time points in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ , mmol/L)

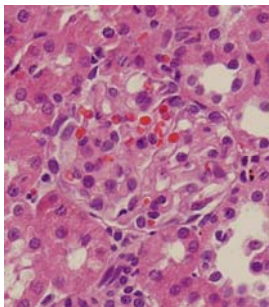
Group	7 d	14 d	28 d
Normal	2.97±0.41	3.31±0.33	3.07±0.36
Model	6.50±0.16 <sup>a</sup>	6.70±0.46 <sup>a</sup>	8.34±0.28 <sup>a</sup>
BMSCs	6.31±0.22 <sup>ab</sup>	5.50±0.37 <sup>ab</sup>	5.16±0.67 <sup>ab</sup>

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. normal group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. model group

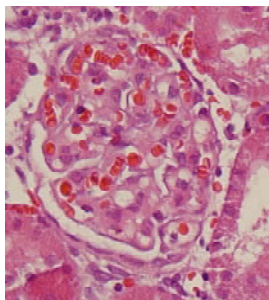
各组28 d时肾脏病理结果: 光镜检查, 模型组肾小球仅见轻度充血, 正常组和BMSCs治疗组均未见明显改变。电镜检查, 正常组足突清晰完整、未见融合; 模型组肾小球基底膜上皮细胞轻度肿胀, 足突广泛融合; BMSCs治疗组肾小球病变明显减轻, 仅见部分足突融合, 和模型组比较有明显改善, 见图3, 4。



a: Normal group



b: Model group

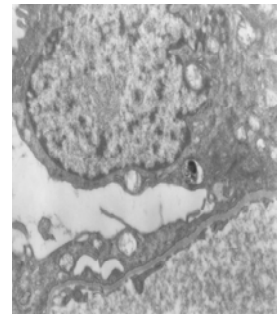


c: Bone marrow mesenchymal stem cells group

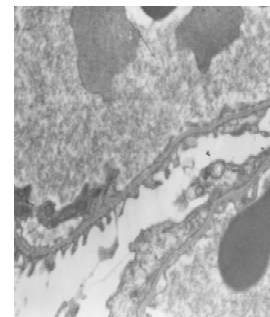
Figure 3 Hematoxylin-eosin staining results of nephridial tissue of rats from each group at 28 d ( $\times 200$ )  
图3 各组大鼠28 d肾组织苏木精-伊红染色结果( $\times 200$ )



a: Normal group, clear foot process structure



b: Model group, extensive fusion of foot process, even disappearance



c: Bone marrow mesenchymal stem cells group, partial fusion of foot process

Figure 4 Electron microscope results of nephridial tissue of rats from each group at 28 d ( $\times 10\ 000$ )  
图4 各组大鼠28 d肾组织电镜结果( $\times 10\ 000$ )

肾组织nephrin mRNA表达的影响: 模型组nephrin mRNA表达水平逐渐下降, 28 d降至最低, 和正常组相比, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。BMSCs治疗组14 d nephrin mRNA表达升高, 28 d明显升高, 和模型组相比, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见表4, 图5。

表4 各组不同时间点 nephrin mRNA 相对表达量 nephrin /GAPDH  
Table 4 Nephrin mRNA expression nephrin/GAPDH at various time points in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Group	7 d	14 d	28 d
Normal	0.820±0.021	0.810±0.027	0.790±0.032
Model	0.650±0.056 <sup>a</sup>	0.400±0.037 <sup>a</sup>	0.210±0.027 <sup>a</sup>
BMSCs	0.660±0.054 <sup>a</sup>	0.720±0.040 <sup>b</sup>	0.760±0.032 <sup>b</sup>

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. normal group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs. model group



Figure 5 2% agarose gel electrophoresis results of nephrin mRNA  
图5 nephrin mRNA 2%琼脂糖凝胶电泳结果

### 3 讨论

BMSCs是一种成体干细胞, 具备干细胞的特征, 并具有免疫调节功能<sup>[15-16]</sup>。在既往的实验中, 亦发现BMSCs具有许多明显的优势: 容易提取、纯化, 产量高、纯度高等特点, 是细胞移植理想的种子细胞。本实验采用全骨髓法分离培养细胞, 利用BMSCs贴壁生长的特性, 经过多次换液去除未贴壁细胞, 传代时严格控制胰酶的量和消化时间, 利用BMSCs较易脱落的特点, 保证其在短时间内与培养瓶底分开, 巨噬细胞等则因贴壁性强仍贴附于培养瓶底, 通过反复传代细胞形态趋于一致, 从而使干细胞得到增殖和纯化。实验中发现, BMSCs接种初期可见大量悬浮细胞, 24 h后观察大部分细胞开始贴壁生长, 贴壁生长的细胞呈单个分散存在或形成数个细胞克隆, 开始伸角变形, 呈圆形、多角形、长梭形等多种形态。传至3代, 细胞纯化, 形态较为单一, 呈长梭形贴壁生长, 以平行排列生长为主或呈漩涡状生长。

目前, 国际细胞治疗学会间充质及组织干细胞委员会提出了鉴定人来源间充质干细胞的3条最低标准<sup>[12]</sup>, 该声明特别指出, 对于动物来源的BMSCs, 除第二条标准不具有普遍意义的适用性外, 第一、第三条描述的生物学特征同样适用于动物来源BMSCs。本实验流式细胞仪结果显示培养的细胞稳定表达CD90, 而CD45阴性, 与文献报道一致<sup>[17-18]</sup>。说明实验培养的细胞既非造血干细胞, 也非成纤维细胞, 而符合间充质干细胞的特性。作为借鉴, 本实验在证明了体外分离的大鼠骨髓MSCs对塑料器皿的贴附特性、以及细胞表面分子的初步鉴定之后, 因时间、精力限制未做体外诱导实验。

已有实验表明, BMSCs可向肾实质细胞转化, 并有关于BMSCs治疗急性肾缺血损伤、急进性肾炎等的报道<sup>[19-23]</sup>。阿霉素肾病是一经典的实验性肾病模型, 阿霉素肾病模型大鼠的肾脏病理形态学改变和临床表现与人类的微小病变肾病相似。目前, 蛋白尿产生的具体机制尚不明确, 在阿霉素肾病大鼠, 足细胞受损被认为是导致蛋白尿的最初的、也是最重要的因素<sup>[24-26]</sup>。本实验也显示, SD大鼠注射阿霉素7 d后尿蛋白开始升高, 14 d出现大量蛋白尿, 28 d仍明显升高, 差异有显著性意义。同时伴有低蛋白血症、高脂血症, 差异亦有显著性意义。肾脏病理结果也显示: 光镜下肾小球形态正常, 而电镜下可见肾小球上皮细胞呈弥漫性足突融合。以上均符合微小病变型肾病的临床、实验室检查特点, 也说明实验制备的阿霉素肾病模型是成功的。

肾小球足细胞足突间裂孔隔膜(slit diaphragms, SD)是肾小球滤过屏障最重要的组成部分<sup>[27-28]</sup>, 直到近年与此结构有关的蛋白才逐渐被阐明, 如nephrin、

CD2-AP、podocin、等。既往在较多动物实验和人类获得性肾病综合征中, 均有报道nephrin的表达的下降, 如Luimula等<sup>[29]</sup>在嘌呤霉素肾病大鼠观察到nephrin mRNA表达下降, Furness等<sup>[30]</sup>在微小病变和膜性肾病患者中发现nephrin mRNA表达下降。本实验中, 注射阿霉素7 d后nephrin mRNA表达减少, 14 d时其表达明显减少, 28 d时降至最低。本实验结果与Luimula、Furness等报道的相似, 可见裂孔隔膜分子nephrin的表达的降低可能与蛋白尿的发生发展密切相关。本实验也显示经BMSCs注入的BMSCs治疗组在14, 28 d时大鼠肾组织nephrin mRNA表达明显升高, 和模型组相比差异有显著性意义。同时伴有尿蛋白降低, 血白蛋白升高, 胆固醇降低, 和模型组相比差异亦有显著性意义。因此推测BMSCs移植对阿霉素肾病大鼠的保护作用可能通过提高nephrin mRNA的表达而实现的。同时也观察到虽经积极治疗, BMSCs治疗组大鼠在尿蛋白、白蛋白、胆固醇数值上和正常组比较还是有差别的, 可能与观察时间短, 且肾病综合征是多病因疾病有关。至于各组大鼠不同时间点的肌酐、尿素氮数值差异均无显著性意义, 考虑与观察时间短、阿霉素肾病模型为微小病变型及及早干预有关。

虽然一系列的动物实验都倾向BMSCs具有向肾实质细胞分化的能力, 但众多研究者们认为, BMSCs究竟分化成为何种细胞与受损部位的微环境密切相关。BMSCs是如何移入受损肾脏的? 在受损肾脏的微环境下, 又是如何分化成为各类肾脏细胞, 从而修复肾损伤的? 到目前为止, 这些问题尚未得到详细的阐述。但相信随着细胞与分子生物学理论和技术的快速发展, 上述问题一定会得到圆满解决。BMSCs移植一定会成为治疗肾脏疾病的新手段, 从而更好的造福人类。

### 4 参考文献

- [1] Mustafa G, Khan PA, Iqbal I, et al. Simplified quantification of urinary protein excretion in children with nephrotic syndrome. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2007;17(10):615-618.
- [2] Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int*. 2008;74(1):22-36.
- [3] Asanuma K, Yanagida Asanuma E, Faul C, et al. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol*. 2006;8(5):485-491.
- [4] Tögel F, Hu Z, Weiss K, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1):31-42.
- [5] Lin F. Stem cells in kidney regeneration following acute renal injury. *Pediatr Res*. 2006;59(4):74-78.
- [6] Prodromidi EI, Poulosom R, Jeffery R, et al. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells*. 2006;24(11):2448-2455.
- [7] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-03.
- [8] Stein E, Blaimauer K, Bauer S, et al. High expression of integrin beta1 correlates with high proliferation capacity in oral keratinocytes. *Wien Klin Wochenschr*. 2007;119 (9-10):318-322.

- [9] Feng BF, Dong C, Guan FJ. Xuzhou Yixueyuan Xuebao. 2009; 29(4):226-229.  
丰炳峰,董晨,关凤军.全骨髓培养大鼠骨髓间充质干细胞及其生物学特性[J].徐州医学院学报,2009,29(4):226-229.
- [10] Li YJ, Li N, Hu LS, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(1):71-74.  
李艳菊,李宁,胡亮杉,等.大鼠骨髓间充质干细胞体外培养方法的改进[J].中国组织工程杂志与临床康复,2009,13(1):71-74.
- [11] Zhou DH, Huang SL, Wu YF, et al. Zhonghua Erke Zazhi. 2003; 41(8): 607-610.  
周敦华,黄绍良,吴燕峰,等.人体间充质干细胞体外扩增及生物学特性研究[J].中华儿科杂志,2003,41(8):607-610.
- [12] Romanov YA, Darevskaya AN, Kabaeva NV, et al. Optimum conditions for culturing of Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal precursor cells. Bull Exp Biol Med. 2006;142(4): 515-520.
- [13] Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. Lab Invest. 1982;46(1):16-23.
- [14] Korzets Z, Pomeranz A, Golan E, et al. Pefloxacin in adriamycin induced nephrotic syndrome in the rat. Nephrol Dial Transplant. 1997;12 (2):286-288.
- [15] Li H, Sun LY. Zhonghua Yixue Zhazhi. 2006;86(7):501-503.  
李慧,孙凌云.间质干细胞的免疫调节及免疫治疗作用研究进展[J].中华医学杂志,2006,86(7):501-503.
- [16] Liu YB, Qian HR, Hong DF, et al. Zhonghua Yixue Zhazhi. 2007; 87(30):2136-2139.  
刘颖斌,钱浩然,洪德飞,等.骨髓间充质干细胞对植物血球凝集素刺激的T淋巴细胞CD25表达的影响[J].中华医学杂志,2007,87(30): 2136-2139.
- [17] omini M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4): 315-317.
- [18] Anokhina EB, Buravkova LB. Heterogeneity of stromal precursor cells isolated from rat bone marrow. Tsitologii. 2007;49(1):40-47.
- [19] Jackson L, Jones DR, Scotting P, et al. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. J Postgrad Med. 2007;53 (2):121-127.
- [20] Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, et al. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(5):815-820.
- [21] Bruno S, Grange G, Deregiub MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. J Am Soc Nephrol. 2009;20(5):927-928.
- [22] Chhabra P, Brayman KL. The use of stem cells in kidney disease. Curr Opin Organ Transplant. 2009;14(1):72-78.
- [23] Morigi M, Inrona M, Imberti B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. Stem Cells. 2008;26(8):2075-2082.
- [24] Jang HJ, Zhang C, Chang Y, et al. Xibao Shengwuxue Zhazhi. 2008;30(1):82-88.  
姜华军,张春,常莹,等.未分化和分化足细胞生物学性状及相关结构蛋白表达的变化[J].细胞生物学杂志,2008,30(1):82-88.
- [25] Fogo AB. Mechanisms of progression of chronic kidney disease. Pediatr Nephrol. 2007;22(12):2011-2022.
- [26] Tryggvason K, Wartiovaara J. How does the kidney filter plasma? Physiology (Bethesda). 2005;20(7):96-101.
- [27] Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. Physiol Rev. 2003;83(1):253-307.
- [28] Geske P, Huber TB, Sellin L, et al. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins, nephrin and NEPH1. J Am Soc Nephrol. 2003;14(4):918-926.
- [29] Luimula P, Ahola H, Wang SX, et al. Nephrin in experimental glomerular disease. Kidney Int. 2000;58(4):1461-1468.
- [30] Furness PN, Hall LL, Shaw JA, et al. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. Nephrol Dial Transplant. 1999;14(5):1234-1237.

来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 江苏省教育厅自然科学基金(08KJB320018)。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**课题的创新点:** ①骨髓间充质干细胞已有对急性肾功能衰竭和急性肾小管损伤的成功报道,但对慢性肾脏疾病的治疗作用则报道甚少。本文论述了干细胞对慢性肾脏疾病-阿霉素肾病大鼠的治疗作用。②目前,干细胞移植的方法主要包括局部注入或经周围静脉注入 2 种方法,但都有一定的局限性。实验通过腹主动脉近肾动脉处注射细胞,使细胞顺动脉血流机械性进入肾小球以确保足够的干细胞进入肾脏组织。

**课题评估的“金标准”:** 本实验中应用的金标准有:

(1)阿霉素造模成功后,肾病综合征诊断的标准:包括大量蛋白尿、低白蛋白血症、高脂血症、水肿。(2)骨髓间充质干细胞鉴定的标准,国际细胞治疗学会间充质及组织干细胞委员会提出了鉴定人来源间充质干细胞的 3 条最低标准: ①在标准培养条件下,间充质干细胞必须具备对塑料底物的贴附性。②通过流式细胞仪检测,间充质干细胞群体表达 CD105、CD73 及 CD90 阳性率 ≥ 95%,而 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79a 或 CD19、HLA-DR 阳性率 ≤ 2%。③经体外诱导,间充质干细胞必须能向成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞分化。该声明特别指出,对于动物来源的间充质干细胞,除第 2 条标准不具有普遍意义的适用性外,第 1、3 条描述的生物学特征同样适用于动物来源间充质干细胞。

**设计或课题的偏倚与不足:** 本实验通过电镜下观察肾小球足细胞足突的变化及半定量 RT-PCR 检测肾组织 Nephrin mRNA 的表达,对干细胞移植后的疗效进行了评价。但干细胞移植入肾组织后,在肾组织的定位、分化及通过什么方式起到治疗作用,则未进行证明。下一步可通过相应的实验如对移植的干细胞进行标记示踪,再通过免疫荧光、免疫组织化学等相关的方法进行检测,从而使实验进一步完善。

**提供临床借鉴的价值:** 骨髓间充质干细胞移植作为细胞治疗的一种新方法,可促进急性肾损伤后肾功能的恢复,参与免疫调节及组织修复;且骨髓间充质干细胞具有取材容易、体外扩增能力强、具有多向分化潜能、植入体内后无免疫排斥等特性,使其具有广阔的临床应用前景。但是,仍有许多有待解决的问题,如探索分离有效成分的新方法,建立一套完整有效的体外培养、扩增、鉴定、定向诱导分化体系,在不改变其干细胞特性的前提下,实现快速、大规模的扩增,为其基础和临床研究提供充足的细胞来源。

CRTER 杂志“脐带血干细胞”的组稿内容: 本刊学术部

- 脐带血干细胞的采集、分离、培养。
- 脐带血干细胞的复苏。
- 脐带血干细胞的临床应用。
- 脐带血干细胞的储存。
- 脐带血干细胞的诱导、分化。
- 脐带血干细胞的生物学特点。
- 脐带血干细胞的科研应用。