

人脐带间充质干细胞不同输注途径对急性肾小管坏死的影响☆

李芳¹, 胡祥^{1,2}, 赵红梅¹, 贾丹兵¹, 党智杰¹

Influence of different infusion methods of human umbilical cord mesenchymal stem cells on acute tubular necrosis

Li Fang¹, Hu Xiang^{1,2}, Zhao Hong-mei¹, Jia Dan-bing¹, Dang Zhi-jie¹

Abstract

¹Department of Nephrology, the 211 Hospital of Chinese PLA, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China;
²Shenzhen Beike Cells Engineering Research Institute, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Li Fang☆, Doctor, Chief physician, Department of Nephrology, the 211 Hospital of Chinese PLA, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
weizhaohongmei@163.com

Received: 2010-07-24
Accepted: 2010-09-01

BACKGROUND: Studies have confirmed that exogenous mesenchymal stem cells can migrate and establish in the nephridial tissue following ischemia/reperfusion injury, differentiate into renal tubular epithelial cells, and recover structure and function of the kidney. At present, it is controversial which is better, arterial injection or intravenous injection, for transplanting stem cells.
OBJECTIVE: To observe the effects of different transplantation methods of human umbilical cord mesenchymal stem cells on dogs with acute tubular necrosis (ATN).
METHODS: Healthy dog models of ATN were established and randomly divided into two groups. Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells were labeled with DAPI. Then the cells were injected through peripheral veins and right femoral artery into model dogs' body. 24 hours later, histological changes were observed by light microscope, and the survival of human umbilical cord mesenchymal stem cells was evaluated by fluorescent microscope.
RESULTS AND CONCLUSION: Under common optical microscope, pathological changes such as swelling, degeneration and necrosis appeared in renal tubular epithelial cells in both groups. The injected human umbilical cord mesenchymal stem cells could survive in the affected kidney. There was no significant difference on fluorescence intensity between two groups ($P > 0.05$). These indicated that transplanted human umbilical cord mesenchymal stem cells by two pathways can survive in the kidneys. The outcomes were similar in repairing the kidney. Compared with arterial injection, the transplantation of intravenous injection obtained little trauma.

Li F, Hu X, Zhao HM, Jia DB, Dang ZJ. Influence of different infusion methods of human umbilical cord mesenchymal stem cells on acute tubular necrosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(40): 7470-7473.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究已证实外源性间充质干细胞能够迁移、定居于缺血再灌注损伤后的肾组织中分化为肾小管上皮细胞, 恢复肾脏组织结构的功能。目前对以动脉注射或静脉注射途径移植干细胞哪种更好仍存在争议。
目的: 观察人脐带间充质干细胞经不同途径移植对家犬急性肾小管坏死的影响。
方法: 建立健康家犬急性肾小管坏死模型, 以随机编号法分为 2 组, 分别以外周静脉注射及右股动脉介入经肾动脉直接注射 DAPI 标记的人脐带间充质干细胞。移植后 24 h, 光镜下观察肾组织形态改变, 荧光显微镜下观察人脐带间充质干细胞植入实验动物体内后的存活情况。
结果与结论: 普通光镜下观察可见两组动物肾小管上皮细胞均出现广泛肿胀、变性、坏死等病理变化。经外周静脉注射及经肾动脉直接注射的人脐带间充质干细胞均在病损肾脏中成活, 且两组荧光强度差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。说明两种途径移植人脐带间充质干细胞均可在肾脏内定植, 修复肾脏组织结构的效果相当, 相对于动脉注射途径, 经静脉注射移植途径创伤较小。
关键词: 移植途径; 人脐带间充质干细胞; 急性肾小管坏死; 干细胞; 干细胞移植
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.40.013

李芳, 胡祥, 赵红梅, 贾丹兵, 党智杰. 人脐带间充质干细胞不同输注途径对急性肾小管坏死的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(40):7470-7473. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

1解放军第 211 医院肾内科, 黑龙江哈尔滨市 150086; 2深圳市北科细胞工程研究所, 广东省深圳市 518000

李芳☆, 女, 1963 年生, 上海市人, 回族, 2000 年毕业于哈尔滨医科大学, 主任医师, 主要从事肾脏病学研究。
weizhaohongmei@163.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:1673-8225 (2010)40-07470-04

收稿日期: 2010-07-24
修回日期: 2010-09-01
(20091224013/GW-Q)

0 引言

急性肾小管坏死是急性肾功能衰竭最常见的原因之一, 一旦发生肾小管坏死就只能采取血液净化治疗, 尚无有效加速肾小管上皮细胞修复的方法。间充质干细胞是来源于发育早期中胚层和外胚层的一类具有多向分化潜能的干细胞, 可以诱导分化为骨骼肌、平滑肌、骨、软骨、脂肪、心肌细胞、神经细胞及造血干细胞等多种类型细胞。间充质干细胞最早从骨髓中分离培养, 而相对于骨髓间充质干细胞, 人

脐带间充质干细胞因取材容易、来源广泛, 且不涉及伦理问题, 被认为是新型的种子细胞, 且最近研究表明脐带间充质干细胞异种移植后没有免疫排斥反应^[1-2]。

目前, 国内外对于干细胞移植在治疗急性肾小管坏死方面的研究越来越深入, 多项研究已证实骨髓间充质干细胞可以向肾小管上皮细胞分化并修复受损的肾小管上皮细胞^[3-6]。并有研究发现, 在肾脏缺血再灌注损伤兔模型中, 骨髓干细胞移植能较早地降低肾脏缺血再灌注损伤后血清肌酐和尿素氮水平, 在一定程度上促进缺血再灌注损伤后肾功能修复^[7-8]。

外源性骨髓间充质干细胞能够迁移、定居于缺血再灌注损伤后的肾组织中并分化为肾小管上皮细胞, 从而恢复肾脏的组织结构和功能^[9-10], 但是对其移植途径仍存在争议。本实验在前期工作的基础上, 着眼于细胞移植的途径, 探索以外周静脉注射与股动脉介入经肾动脉直接注射两种不同移植方法对急性肾小管坏死的作用。

1 材料和方法

设计: 随机分组, 对比观察动物实验。

时间及地点: 于2009-12在哈尔滨医科大学实验动物中心完成。

材料:

实验动物: 健康家犬14只, 体质量15~20 kg, 由哈尔滨医科大学实验动物中心提供, 均饲养于哈尔滨医科大学动物实验中心无特定病原体(SPF)屏障环境。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。

DAPI标记的人脐带间充质干细胞: 由深圳市北科细胞工程研究所提供。脐带采集经供者及其家属同意并已签知情同意书, 采集后用间充质干细胞培养液培养, 细胞活力 $\geq 90\%$, 病原菌排查未检出细菌, 至第4代时用DAPI标记后用于本实验。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清、IMDM 培养基	美国 Sigma 公司
0.2%二氯化汞溶液	姜堰市环球试剂厂
4, 6-二乙酰基-2-苯基吲哚(DAPI)	美国 Biotium 公司
脐带间充质干细胞	深圳市北科细胞工程研究所
超净工作台	中国苏净集团安泰公司
eclipseE400 型荧光显微镜	Nikon 公司
组织切片机	Leica 公司
Olympus CX6 光学显微镜	日本 OLYMPUS
SIEMENS 数字血管机(DSA)	德国西门子公司
3K18 型台式离心机	北京医用离心机厂

实验方法:

家犬急性肾小管坏死模型制备: 所有动物随机编号, 自由饮食, 记录体质量。将14只家犬随机分为静脉注射组与动脉注射组, 每组7只。两组均采用0.2% HgCl₂(按7 mg/kg)肌肉注射建立急性肾小管坏死模型。由于目前没有犬的急性肾衰竭诊断标准, 实验采用内科学急性肾衰竭的定义^[11], 据此作为实验中急性肾衰竭的诊断标准。观察动物一般状态及死亡情况。造模前及造模后24, 48 h分别采血进行血生化指标测定并留取尿液作尿常规测定, 血肌酐的绝对值每日平均增加44.2 $\mu\text{mol/L}$ 或88.4 $\mu\text{mol/L}$; 或在24~72 h内血肌酐

值相对增加25%~100%^[11]。造模成功的实验动物进入实验。

人脐带间充质干细胞移植:

静脉注射组: 将造模成功的家犬经外周静脉缓慢注射以DAPI标记的人脐带间充质干细胞悬液, 细胞总数为 1.5×10^7 。

动脉注射组: 将造模成功的家犬分别用3%异戊巴比妥钠, 按照1.5 mL/kg剂量静脉麻醉。待麻醉起效后, 将家犬仰位四肢固定于X射线下的平板上, 于右腹股沟区切开皮肤, 钝性分离股动脉, 用充满肝素盐水的硬膜外麻醉导管于右股动脉插入, 经腹主动脉进入左肾动脉0.3~0.5 cm, 暂时压闭腹主动脉, 经导管缓慢注射5 mL 脐带间充质干细胞悬液, 细胞总数为 1.5×10^7 , 右股动脉切口用无损伤缝合线吻合。所有家犬继续喂养24, 48 h。见图1, 2。



Figure 1 Kidney development
图1 肾脏显影



Figure 2 Stem cell transplantation via femoral artery
图2 经股动脉移植干细胞

肾脏病理及荧光观察: 干细胞移植24 h后, 处死动物, 取出肾脏, PBS灌注洗涤, 取肾脏组织置于体积分数为10%中性甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色, 普通光镜下观察肾脏组织学变化及肾小管损伤程度; 并取肾脏组织用滴有生理盐水的锡纸包裹后于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存下送检, 制成冰冻切片进行荧光显微镜观察并摄片, 观察肾脏组织显示荧光的部位及强度, 以评判移植细胞的存活情况。

主要观察指标: 干细胞移植后肾组织形态改变及其植入实验动物体内后的存活情况。

设计、实施、评估者: 由全体作者共同完成。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 11.0软件完成

统计处理, 组间比较采用 t 检验, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,

$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入家犬14只, 实验过程中两组于造模后细胞移植前各死亡1只。2组各有6只进入结果分析。

2.2 肾脏组织形态学观察 普通光镜下观察可见两组动物肾小管上皮细胞均出现广泛肿胀、变性、坏死等病理变化, 见图3, 4。

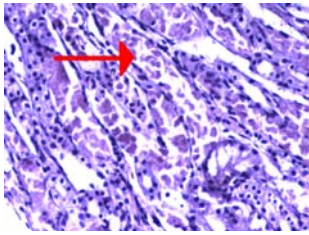


Figure 3 Hematoxylin-eosin staining of morphological changes in the kidney in the intravenous injection group. Arrow shows renal tubular epithelial cells ($\times 200$)

图3 静脉注射组苏木精-伊红染色观察肾脏组织形态学变化, 箭头所示为肾小管上皮细胞($\times 200$)

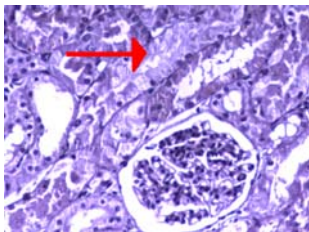


Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of morphological changes in the kidney in the arterial injection group. Arrow shows renal tubular epithelial cells ($\times 200$)

图4 动脉注射组苏木精-伊红染色观察肾脏组织形态学变化, 箭头所示为肾小管上皮细胞($\times 200$)

2.3 DAPI 标记干细胞定位观察 荧光显微镜下观察两组动物肾脏内有大量 DAPI 标记细胞定植, 绿色荧光主要集中在肾小管中, 荧光强度均为 3+, 肾小球无荧光显示, 见图 5, 6。

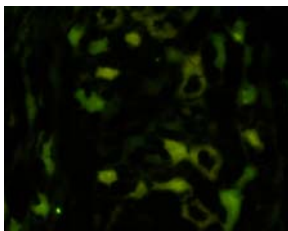


Figure 5 Green fluorescence in the renal tubular epithelial cells in the intravenous injection group ($\times 40$)

图5 静脉注射组肾小管上皮细胞可见绿色荧光($\times 40$)

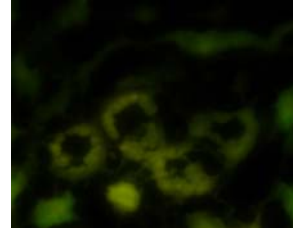


Figure 6 Green fluorescence in the renal tubular epithelial cells in the arterial injection group ($\times 40$)

图6 动脉注射组肾小管上皮细胞可见绿色荧光 ($\times 40$)

2.4 不同移植途径免疫荧光强度的比较 每组每只动物随机取30张免疫荧光照片, 强度以+表示, +为1分, ++为2分, 以此类推。计算每组平均积分为平均荧光强度, 静脉注射组为 80.67 ± 2.95 , 动脉注射组为 81.17 ± 3.81 , 两组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

急性肾小管坏死中肾小管上皮细胞最易遭受毒性损伤, 引起急性肾小管坏死肾毒性原因包括部分抗生素、化学毒物、重金属、对比剂和高浓度的内源性毒素, 导致肾小管上皮细胞变性、坏死。关于肾小管新生细胞的来源有3个方面的假说, 一是来源于肾脏固有成熟的细胞; 二是来源于肾脏固有未分化的干细胞; 三是来源于循环中的细胞^[12], 包括外源性途径的细胞。基于这种认识, 目前治疗急性肾小管坏死的重要措施在于预防肾小管坏死的加重, 包括慎用肾毒性药物, 避免有毒化学物质和重金属损伤肾脏, 积极纠正水、电解质和酸碱平衡紊乱, 恢复有效循环血容量, 有效地抗感染和抗休克治疗, 通过血液净化部分替代肾脏工作, 维持内环境稳定, 以等待肾小管上皮细胞的修复。一旦肾小管损坏严重而不能完全恢复, 就可能进入慢性肾功能衰竭阶段, 需长期或终身以来肾脏替代治疗或肾移植^[13]。

间充质干细胞是一类具有显著自我更新和多向分化的细胞, 其来源丰富, 主要存在于骨髓、脐血、脐带、全身结缔组织和器官间质^[14-15]。Kale等^[3]实验证实骨髓间充质干细胞移植可显著降低血清尿素氮水平, 促进肾功能恢复, 移植的间充质干细胞可定殖在肾小管, 但在肾小球中未发现。通过对缺血再灌注肾损伤大鼠移植间充质干细胞能够迁移, 定殖于缺血再灌注损伤后的肾组织中并分化为肾小管上皮细胞, 从而恢复肾脏组织结构和功能^[16]。间充质干细胞移植可促进损伤肾组织细胞再生, 在肾衰竭及其他肾脏疾患的肾实质细胞修复中意义重大。但从骨髓提取干细胞存在有自身局限性, 近年研究报道脐带中富含间充质干细胞, 易于获得, 分离成功率高^[17]。脐带间充质干细

胞与骨髓间充质干细胞相比较优势明显,相对纯净,与干细胞输注相关的病毒和病原微生物感染率远低于骨髓移植^[18];人脐带间充质干细胞含量丰富,较为原始,生物活性强(端粒酶较骨髓间充质干细胞长),分化能力强(脐带间充质干细胞高表达CD146);可在体外进行分离、培养、扩增迅速,且生物性能稳定,多次传代扩增仍能保持旺盛功能^[19],可以为实验和临床提供充足的细胞来源;人脐带间充质干细胞不表达或低表达免疫排斥相关标记,免疫原性低,是一类低免疫原性细胞,不需经过严格配对使用,适宜于不同个体之间的移植^[20]。因此,本实验选择人脐带间充质干细胞作为研究对象。

目前肾脏干细胞移植相关研究多采用外周静脉注射和经肾动脉直接注射两种途径。外周静脉注射创伤小,患者易于接受,但有研究显示此种方法细胞定位差^[21],影响治疗效果,经肾动脉直接注射法定位准确,可以使体外培养的细胞准确移植到肾脏,达到最佳治疗效果。但其缺点同样明显,例如创伤性较大,对技术水平及设备要求高。临床上广泛开展比较困难。

本实验对经外周静脉注射与股动脉介入经肾动脉直接注射法两种移植途径对急性肾小管坏死的治疗效果进行了比较,结果表明两种途径移植后,肾脏组织的荧光强度对比无明显差异,说明通过外周静脉注射途径移植不影响干细胞在体内定植,修复肾脏组织结构,是一种创伤小、且有效的干细胞移植方法。已有研究表明,间充质干细胞在体内可定向分化成肾小管上皮细胞或间充质干细胞通过促进肾脏局部自分泌和旁分泌生长因子、抗炎因子和抑制炎症因子等,促进肾脏固有的祖细胞向肾小管上皮细胞分化,及存活的间充质干细胞向肾小管上皮细胞分化等,以促进损伤肾小管上皮细胞的修复^[3, 22-25]。本实验为临床脐带间充质干细胞移植途径的选择提供了实验依据,为脐带间充质干细胞移植在急性肾损伤治疗中的广泛推广提供了依据。

4 参考文献

- [1] Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of parkinson's disease. *Stem Cells*. 2006;24(3):781-792.
- [2] Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, et al. Myocyte death, growth and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2003;92(2):139-150.
- [3] Kale S, Karihaloo A, Clark PR, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest*. 2003;112(1):42-49.
- [4] Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol*. 2001;195(2):229-235.
- [5] Lin F, Cordes K, Li L, et al. Haematopoietic stem cells contribute to the regeneration of Tenal tubules after renal ischemia-reperfusion injury mice. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(5):1188-1199.
- [6] Zhang T, Zhou Y, Zhang Y, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(3):478-481.
张婷,周云,张亚,等. 体外诱导骨髓间充质干细胞向肾小管上皮细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(3):478-481.
- [7] Xiao LJ, Li YJ, Yu YM, et al. Nanfang Yike Daxue Xuebao. 2006, 26(5):561-563.
肖丽佳,李亚洁,余月明,等. 兔自体骨髓干细胞移植对缺血再灌注损伤

- [8] 肾功能的影响[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(5):561-563.
Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, et al. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*. 2004;14(6):1035-1041.
- [9] Wang GX, Wang Y, Zhang ZH. Zhonghua Miniao Waiké Zazhi. 2005, 26(8):535-538.
王共先,汪洪,张中华. 骨髓间充质干细胞移植对缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2005, 26(8):535-538.
- [10] Wu YC, Liu ZH, Ji SM, et al. Shenzangbing yu Touxu Shen Yizhi Zazhi. 2003;12(1):53-57.
吴义超,刘志红,季曙明,等. 肾外细胞在移植肾组织损伤修复中的作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12(1):53-57.
- [11] Qian JQ. Beijing: Renmin Weisheng Chubanshe. 2004:536-538.
钱家麒. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:536-538.
- [12] Xie YS, Chen XM. Zhonghua Shenzangbing Zazhi. 2006, 22(11):658-660.
谢院生,陈香美. 急性肾小管坏死后的修复与再生[J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 22(11):658-660.
- [13] Wang ZG. Beijing: Beijing Kexue Jishu Chubanshe. 2003:858-861.
王质刚. 血液净化学[M]. 2版. 北京:北京科学技术出版社, 2003:858-861.
- [14] Pan XH, Zhang BZ, Pang RQ. Yunnan: Yunnan Keji Chubanshe. 2004:120-121.
潘兴华,张步振,庞荣清. 干细胞—人类疾病治疗的新希望[M]. 云南:云南科技出版社, 2004:120-121.
- [15] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multiline age potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
- [16] Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, et al. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int*. 2002;62(4):1285-1290.
- [17] Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, et al. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001;86(10):1099-1100.
- [18] Qiao C, Xu W, Zhu W, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int*. 2008;32(1):8-15.
- [19] Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *Orthop Res*. 1991;9(5):641-650.
- [20] Lü LL, Liu YJ, Xu ZS, et al. Fujian Yike Daxue Xuebao. 2006;40(2):99-104.
吕璐璐,刘拥军,许贞书,等. 脐带间充质干细胞的分离和生物学形态[J]. 福建医科大学学报, 2006, 40(2):99-104.
- [21] Zhang Y, Huang PP. Guoji Yizhi yu Xueye Jinghua Zazhi. 2007, 5(4):39-42.
张彦,黄平平. 人脐带间充质干细胞的生物特性及应用前景[J]. 国际移植与血液净化杂志, 2007, 5(4):39-42.
- [22] Barash IM, Chonragui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108(7):863-868.
- [23] Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(7):1794-1804.
- [24] Roufosse C, Cook HT. Stem cells and renal regeneration. *Nephron Exp Nephrol*. 2008;109(2):e39-45.
- [25] Imai E, Ito T. Can bone marrow differentiate into renal cells? *Pediatr Nephrol*. 2002;17(10):790-794.

来自本文课题的更多信息—

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。

课题的意义: 目前干细胞移植主要有两类途径,即经动脉注射及经静脉注射,至于哪种移植方法较好,仍存在着争议。实验在前期工作基础上,着眼于干细胞移植途径,探索经外周静脉注射与股动脉介入经肾动脉直接注射两种不同移植方法对急性肾小管坏死的作用,以便更好地指导临床应用。

课题评估的“金标准”: 文章采用组间比较的方法观察两种移植途径对人脐带间充质干细胞在急性肾小管坏死上皮细胞定植的影响,结果显示两种移植途径无显著差异,未应用“金标准”评估。

设计或课题的偏倚与不足: 实验观察时间较短,未观察人脐带间充质干细胞定植后对肾功能的影响,故只能说明其在肾小管细胞定植,而不能说明其是否有改善肾脏功能的临床意义,这需要在以后进一步实验中考虑。

提供临床借鉴的价值: 实验着眼于干细胞输注途径,讨论了经动脉及经静脉两种途径对干细胞在急性肾小管坏死肾小管上皮细胞定植的影响,为干细胞在临床肾脏疾病的应用产生一定的促进作用。

