

# 黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞对顺铂诱导肾小管上皮细胞凋亡的影响

王 威, 姜 燕, 王巍巍, 张金元(解放军第四五五医院肾脏科, 南京军区肾脏病研究所, 上海市 200052)

## 文章亮点:

- 1 干细胞移植用于治疗急性肾损伤的有效性已经被多个研究证实, 但其对肾小管上皮细胞损伤的修复机制尚不明确。
- 2 实验建立顺铂诱导肾小管上皮细胞建立急性肾损伤的体外模型, 利用 Transwell 小室建立共培养系统, 创新性地应用中草药提取物黄芪甲苷孵育人脂肪源性干细胞间接共培养, 观察其对肾小管上皮细胞凋亡的保护作用及作用机制。
- 3 结果表明黄芪甲苷孵育的人脂肪源性干细胞对顺铂诱导的肾小管上皮细胞凋亡具有抑制作用, 从而有利于肾小管损伤的早期恢复, 其保护机制可能与增加胰岛素样生长因子 1 分泌, 抑制 caspase-3 表达、上调 Bcl-2 水平有关。

## 关键词:

干细胞; 脂肪干细胞; 黄芪甲苷; 人脂肪源性干细胞; 急性肾损伤; 肾小管上皮细胞; 顺铂; 国家自然科学基金

## 主题词:

干细胞; 肾小管; 上皮细胞; 细胞凋亡

## 基金资助:

国家自然科学基金(81100493); 上海市基础研究重大项目子课题(12DJ1400203); 上海市优秀青年医学人才培养计划(XYQ2011012); 南京军区医学科技创新项目重点课题(10Z008)

## 摘要

**背景:** 干细胞移植用于治疗急性肾损伤的有效性已经被多个研究证实, 但其对肾小管上皮细胞损伤的修复机制尚不明确。

**目的:** 观察黄芪甲苷孵育后的脂肪源性干细胞对顺铂诱导的肾小管上皮细胞凋亡的保护作用及机制。

**方法:** 实验分为 4 组。2.5  $\mu\text{mol/L}$  顺铂诱导肾小管上皮细胞 24 h, 建立肾小管细胞损伤模型(顺铂损伤组); 将脂肪源性干细胞与损伤肾小管上皮细胞共培养(脂肪源性干细胞+损伤肾小管上皮细胞组); 利用 Transwell 小室将 20 mg/L 黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞 48 h 后与损伤肾小管上皮细胞共培养(黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞+损伤肾小管上皮细胞组); 以正常肾小管上皮细胞做对照(正常对照组)。

**结果与结论:** 与肾小管上皮细胞损伤组相比, AV/PI 和 TUNEL 结果均显示脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组和 20 mg/L 黄芪甲苷脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组肾小管上皮细胞发生凋亡的比例和数量明显减少; ELISA 结果表明 20 mg/L 黄芪甲苷脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组胰岛素样生长因子 1 分泌显著提高( $P < 0.05$ ); Western blot 进一步显示 20 mg/L 黄芪甲苷脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组 caspase-3 蛋白水平明显下降, 而 Bcl-2 的表达量明显增加( $P < 0.05$ )。表明黄芪甲苷孵育的人脂肪源性干细胞对顺铂诱导的肾小管上皮细胞凋亡具有抑制作用, 从而有利于肾小管损伤的早期恢复, 其保护机制可能与增加胰岛素样生长因子 1 分泌, 抑制 caspase-3 表达、上调 Bcl-2 水平有关。

王威, 姜燕, 王巍巍, 张金元. 黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞对顺铂诱导肾小管上皮细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28):4498-4503.

## Effects of adipose-derived stem cells cultured with astragaloside on cisplatin-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells

Wang Wei, Jiang Yan, Wang Wei-wei, Zhang Jin-yuan (Department of Nephrology, the 455 Hospital of Chinese PLA, Nephrology Center of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, Shanghai 200052, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** The validity of stem cell transplantation for acute kidney injury has been verified by many studies. However, the mechanism of repair of tubular epithelial cell injury remains unclear.

**OBJECTIVE:** To investigate protective effects and mechanisms of adipose-derived stem cells cultured with astragaloside on the apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by cisplatin.

**METHODS:** There were four groups. Renal tubular epithelial cells were induced by 2.5  $\mu\text{mol/L}$  cisplatin for 24 hours. Models of renal tubular cell injury were established in the cisplatin group. Adipose-derived stem cells were cocultured with renal tubular epithelial cells of injured kidney in the adipose-derived stem cells + renal tubular epithelial cells group. Using Transwell chamber, adipose-derived stem cells were incubated with 20 mg/L astragaloside for 48 hours, and then cocultured with renal tubular epithelial cells in the astragaloside-incubated adipose-derived stem cells + renal tubular epithelial cells group. Normal renal tubular epithelial cells served as

王威, 女, 1986年生, 河北省邯郸市人, 汉族, 2013年上海中医药大学毕业, 硕士, 主要从事干细胞在急性肾损伤中的基础研究。

通讯作者: 王巍巍, 博士, 副主任医师, 解放军第四五五医院肾脏科, 上海市 200052

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.012  
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)28-04498-06

稿件接受: 2014-05-06

Wang Wei, Master, Department of Nephrology, the 455 Hospital of Chinese PLA, Nephrology Center of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, Shanghai 200052, China

Corresponding author: Wang Wei-wei, M.D., Associate chief physician, Department of Nephrology, the 455 Hospital of Chinese PLA, Nephrology Center of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, Shanghai 200052, China

Accepted: 2014-05-06

controls (normal control group).

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with renal tubular epithelial cell injury group, AV/PI and TUNEL results demonstrated that the apoptotic rate and number of renal tubular epithelial cells were apparently reduced in the adipose-derived stem cells + renal tubular epithelial cells group and 20 mg/L astragaloside-incubated adipose-derived stem cells + renal tubular epithelial cells group. ELISA results displayed that insulin-like growth factor-1 levels were significantly elevated in the 20 mg/L astragaloside-incubated adipose-derived stem cells + renal tubular epithelial cells group ( $P < 0.05$ ). Western blot assay results exhibited that caspase-3 protein levels were noticeably diminished, but Bcl-2 expression was significantly increased in the 20 mg/L astragaloside-incubated adipose-derived stem cells + renal tubular epithelial cells group ( $P < 0.05$ ). Results suggested that astragaloside-incubated human adipose-derived stem cells suppressed the apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by cisplatin, which contributes to the early recovery of injured renal tubule. Its protective mechanism was probably associated with the secretion of insulin-like growth factor-1, inhibition of caspase-3 expression and upregulation of Bcl-2 levels.

**Subject headings:** stem cells; kidney tubules; epithelial cells; apoptosis

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81100493; the Shanghai Basic Research Major Project (Sub-topic), No. 12DJ1400203; the Shanghai Outstanding Young Medical Personnel Training Program, No. XYQ2011012; the Key Topic in Medical Technology Innovation Project of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, No. 10Z008

Wang W, Jiang Y, Wang WW, Zhang JY. Effects of adipose-derived stem cells cultured with astragaloside on cisplatin-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(28):4498-4503.

## 0 引言 Introduction

急性肾损伤是临床上常见的急危重症, 尽管近年来肾脏替代治疗技术和危重病救治水平得到显著提高, 但病死率仍高达30%~50%<sup>[1]</sup>。急性肾损伤的主要病理表现和病变机制是肾小管上皮细胞的损伤<sup>[2]</sup>, 可表现为细胞的凋亡、坏死、转分化, 而随后肾功能的恢复也主要取决于肾小管上皮细胞的再生。目前急性肾损伤的治疗仍然以支持疗法为主<sup>[3]</sup>, 尚无特异性治疗方法阻止疾病的进展。随着干细胞技术的快速发展, 干细胞移植为急性肾损伤的治疗研究提供了一个新的途径<sup>[4]</sup>。

近年来, 干细胞移植用于改善急性肾小管损伤已被多数研究证实, 其修复机制主要是旁分泌作用, 如分泌抗凋亡因子、抗炎因子等<sup>[5-8]</sup>, 从而通过抑制细胞凋亡、改善损伤局部的微环境<sup>[9-11]</sup>。种子细胞的选择是细胞移植治疗的基础和关键。尽管不同组织来源的干细胞具有相同的特点, 但是在增殖分化能力、取材难易程度以及细胞表面标记物的表达等方面却存在着明显的差异。脂肪源性间充质干细胞已在脂肪组织中被分离出来, 在适宜的培养环境中, 脂肪源性干细胞可诱导分化为心肌样细胞、肝细胞、血管内皮细胞、成骨细胞、软骨细胞等<sup>[12-15]</sup>。

由于干细胞本身以及其分化的子代细胞的存活、生长需要合适的微环境, 干细胞或培养干细胞植入损伤的组织后, 由于周围组织缺血缺氧, 环境恶劣, 移植的大部分干细胞并不能够存活, 这一问题显著降低了干细胞在组织损伤修复中的效果。因此, 抑制干细胞凋亡、维持或促进其增殖分化能力是干细胞用于修复治疗的一个关键。那么选择有效的能抑制干细胞凋亡促进其增殖的药物对干细胞进行干预, 可能也是提高细胞的移植存活率和治疗效果的一条有效途径。目前, 人们采取了多种方法试图提高干细胞移植的生存率从而有效治疗急性肾损伤, 如: N-乙酰-5-甲氧基色胺预处理<sup>[16]</sup>, 胰岛素样生长因子1, 肝细胞生长因

子, 血管内皮生长因子基因修饰等等。

黄芪甲苷来源于豆科植物膜荚黄芪, 绵毛黄芪, 其药理作用主要有: ①增强机体免疫力、提高机体的抗病能力。②抗病毒作用。③抗应激功效。④作为促生长剂。⑤改善心肺功能。

作者的前期研究已表明, 黄芪甲苷可促进脂肪源性干细胞增殖, 且并不影响人脂肪源性干细胞的分化能力<sup>[17]</sup>。本实验体外培养人肾小管上皮细胞, 通过顺铂诱导细胞凋亡制作急性肾损伤的体外模型; 并通过Transwell建立人脂肪源性干细胞与肾小管上皮细胞的共培养系统, 观察黄芪甲苷繁育后的人脂肪源性干细胞对顺铂诱导的肾小管上皮细胞凋亡的影响并进行相关机制的探讨。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 分组对照细胞学体外实验。

**时间及地点:** 2012年12月至2013年7月在解放军第四五五医院肾内科实验室完成。

**材料:**

**黄芪甲苷:** 分子式为 $C_{41}H_{68}O_{14}$ ; 化学结构式见图1。

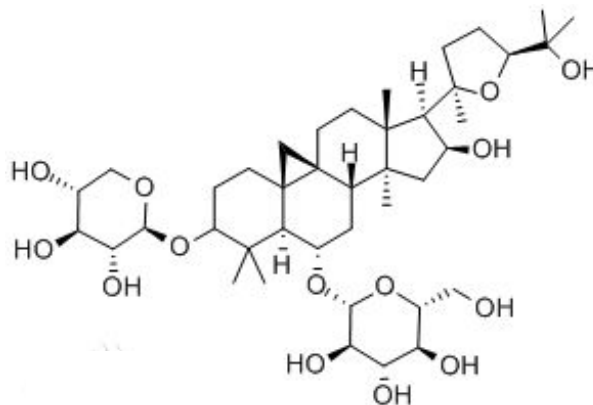


图1 黄芪甲苷的化学结构式

Figure 1 Chemical structural formula of astragaloside

#### 黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞对顺铂诱导肾小管上皮细胞凋亡的影响实验所用试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
人脂肪源性间充质干细胞(原代细胞)	美国ATCC公司
肾小管上皮细胞(ATCC公司细胞传代)	上海原创生物技术有限公司
黄芪甲苷	中国药品生物制品检定所
顺铂	sigma公司
脂肪源性干细胞培养液、脂肪源性干细胞成骨诱导液、脂肪源性干细胞成脂诱导培养液	Cyagen公司
DMEM/F-12培养液	Gibico公司
0.4 μm共培养小室	Costar公司
SP试剂盒	上海长岛生物技术有限公司
DAB显色试剂盒	武汉博士德生物技术有限公司
Annexin V-FITC/PI	美国invitrogen公司
细胞凋亡检测试剂盒	武汉博士德
兔抗人Caspase-3、Bcl-2、Bax多克隆抗体	Cell signaling公司
辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG	Jackson Immuno Researd公司

#### 实验方法:

**细胞培养及共培养体系建立:** 肾小管上皮细胞和脂肪源性干细胞常规复苏后分别用含体积分数5%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基和体积分数为10%的脂肪干细胞完全培养基, 置于37 °C、体积分数5% CO<sub>2</sub>温箱中培养。将脂肪源性干细胞和肾小管上皮细胞按4×10<sup>5</sup>/4×10<sup>5</sup>比例接种于Transwell共培养板的上下室, 建立上下双层细胞共培养体系。肾小管上皮细胞贴壁后经一定浓度顺铂诱导24 h后与人脂肪源性干细胞共培养, 48 h后检测肾小管上皮细胞凋亡情况。

**实验分组:** 实验分为4组: ①正常对照组。②顺铂损伤组: 用2.5 μmol/L的顺铂诱导肾小管上皮细胞24 h。③脂肪源性干细胞与损伤肾小管上皮细胞共培养组(干细胞+损伤肾小管上皮细胞组): 用Transwell小室将脂肪源性干细胞与损伤的肾小管上皮细胞间接共培养。④黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞 48 h后与损伤肾小管上皮细胞共培养组(黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组): 先予20 mg/L黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞, 再应用Transwell小室与损伤的肾小管上皮细胞共培养。

**流式细胞检测肾小管上皮细胞凋亡:** 通过AV/PI法检测顺铂对肾小管上皮细胞损伤情况。肾小管上皮细胞以5×10<sup>5</sup>接种于6孔板, 贴壁后加相应浓度的顺铂于对应组中, 诱导24 h后在六孔板上方放入0.4 μm的Transwell小室, 分别与脂肪源性干细胞和20 mg/L 黄芪甲苷孵育的脂肪源性干细胞共培养48 h后收集各组细胞, 将每组细胞重悬于100 μL试剂盒缓冲液中, 并加入相应的AV、PI荧光染液, 室温放置15 min后加入400 μL缓冲液上机检测。

**TUNEL检测:** 肾小管上皮细胞接种于6孔板(预先放置无菌细胞爬片), 24 h后除对照组外, 加入2.5 μmol/L顺铂诱导24 h, 后吸去旧培养液各组均加入DMEM/F12培养液, 共培养组则在肾小管上皮细胞上放置孔径0.4 μm的Transwell小室分别与脂肪源性干细胞和20 mg/L黄芪甲苷的脂肪源性干细胞共培养, 48 h后用40 g/L多聚甲醛固定, 通过抗地高辛标记, 结合链酶亲和素-过氧化物酶, DAB显色, 镜下观察细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡的细胞。

**ELISA检测胰岛素样生长因子1细胞因子表达:** 共培养48 h后, 收集各组下室细胞培养液上清, 按照ELISA检测试剂盒操作程序操作, 酶标仪上根据说明书于波长450 nm处测定各孔吸光度(A)值, 以标准品A值为纵坐标、浓度为横坐标, 绘制标准曲线; 根据样品A值在标准曲线上分别查找对应的含量。

**Western blot检测肾小管上皮细胞caspase-3、Bax、Bcl-2的表达:** 将肾小管上皮细胞消化收集后, 加入蛋白裂解液充分裂解, 提取蛋白并检测含量, 取等体积蛋白样品, 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜、封闭, 依次加入一抗(抗caspase-3抗体、抗Bax抗体、抗Bcl-2抗体)及HRP标记IgG。胶片分析仪对蛋白条带进行处理分析。

**主要观察指标:** 通过顺铂诱导肾小管上皮细胞凋亡制作急性肾损伤的体外模型, 观察肾小管上皮细胞凋亡、胰岛素样生长因子1细胞因子的分泌水平以及肾小管细胞凋亡信号途径中的相关蛋白表达情况。

**统计学分析:** 采用SPSS 16.0统计分析软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用方差分析, 组间两两比较采用LSD-t检验。P < 0.05认为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 流式细胞仪AV/PI法检测肾小管上皮细胞凋亡结果** 正常对照组仅有少量肾小管上皮细胞发生细胞凋亡, 顺铂损伤组凋亡数量、比例明显增加。与顺铂损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组肾小管上皮细胞发生凋亡的比例减少, 20 mg/L黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组减少更为明显。见图2。

**2.2 TUNEL 检测肾小管上皮细胞凋亡** 以细胞核被染成棕褐色为阳性表达, 与正常对照组相比, 顺铂损伤组核染色阳性细胞所占比例明显增多。与顺铂损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组的损伤减轻, 阳性表达减少, 20 mg/L 黄芪甲苷脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组修复作用更为明显。见图3。

**2.3 胰岛素样生长因子 1 细胞因子水平检测结果** 2.5 μmol/L 顺铂诱导剂量下, 与顺铂损伤组相比, 共培养后胰岛素样生长因子 1 水平上调(P < 0.05), 且 20 mg/L 黄芪甲苷脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组较干细胞+损伤肾小管上皮细胞组上调更为明显(P < 0.05, 图4)。

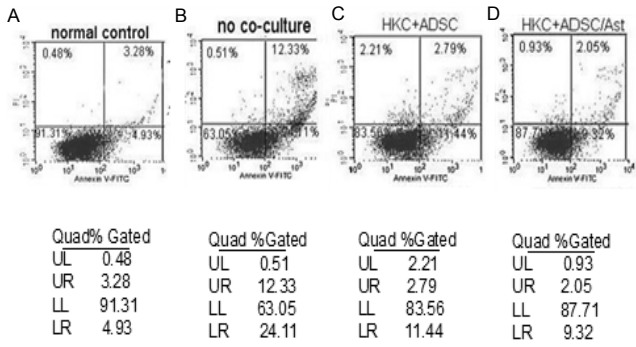


图2 AV/PI 检测肾小管上皮细胞凋亡结果

Figure 2 AV/PI detection results of the apoptosis of renal tubular epithelial cells

图注: 图中 A 为正常对照组; B 为顺铂损伤组; C 为干细胞+损伤肾小管上皮细胞组; D 为黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组。与顺铂损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组肾小管上皮细胞发生凋亡的比例减少, 20 mg/L 黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组减少更为明显。

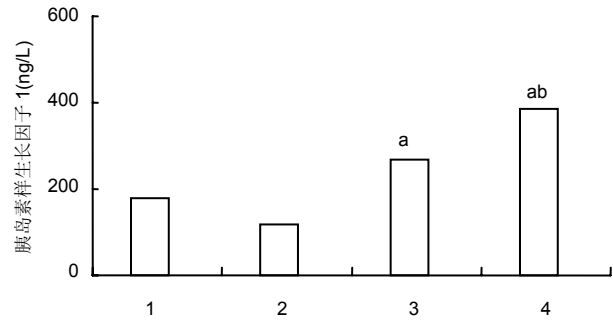


图4 肾小管上皮细胞培养液中胰岛素样生长因子1表达水平

Figure 4 Insulin-like growth factor-1 expression levels in the medium of renal tubular epithelial cells

图注: ①1: 正常对照组; 2: 顺铂损伤组; 3: 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组; 4: 黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组。②与顺铂损伤组相比, 共培养后胰岛素样生长因子1水平上调( $P < 0.05$ ), 且黄芪甲苷脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组较干细胞+损伤肾小管上皮细胞组上调更为明显。与损伤组相比,  $^a P < 0.05$ ; 与干细胞+损伤肾小管上皮细胞组相比,  $^b P < 0.05$ 。

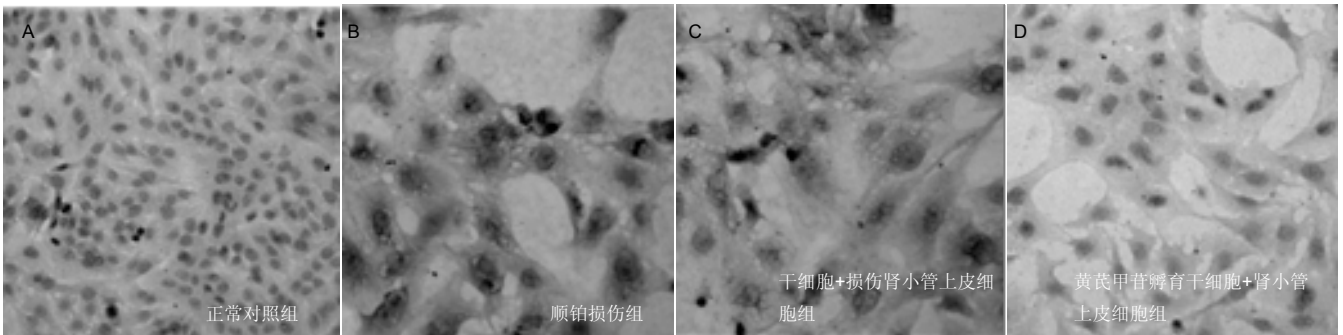


图3 TUNEL 检测肾小管上皮细胞凋亡结果( $\times 100$ )

Figure 3 TUNEL results of the apoptosis of renal tubular epithelial cells ( $\times 100$ )

图注: 与顺铂损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组的损伤减轻, 阳性表达减少, 20 mg/L 黄芪甲苷脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组修复作用更为明显。

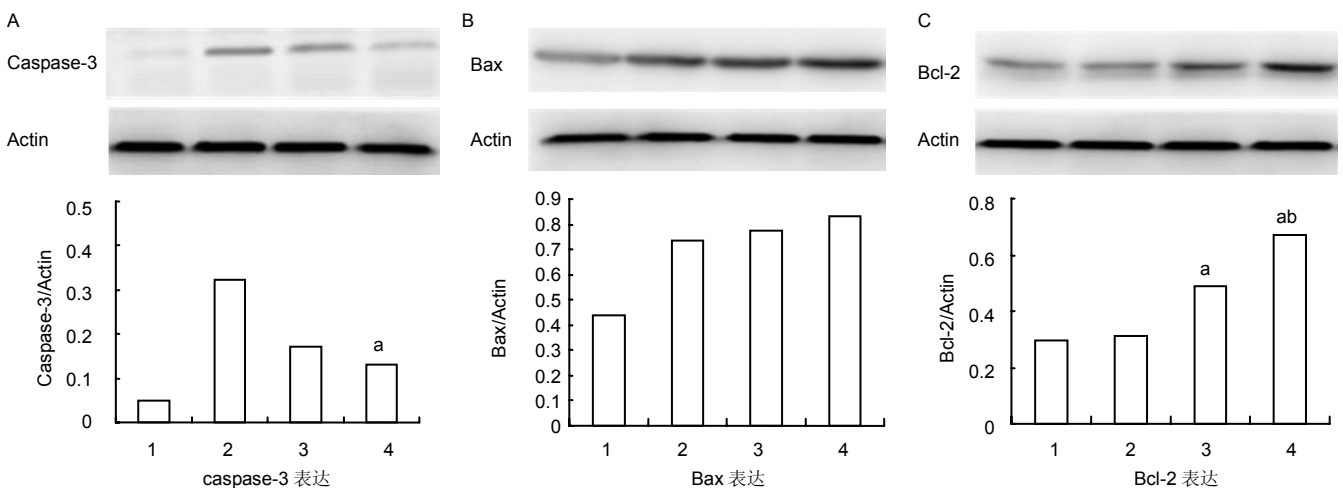


图5 Western blot 检测肾小管上皮细胞 caspase-3、Bax、Bcl-2 表达结果

Figure 5 Western blot assay results of caspase-3, Bax and Bcl-2 expression in renal tubular epithelial cells

图注: ①1: 正常对照组; 2: 顺铂损伤组; 3: 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组; 4: 黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组。②与顺铂损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组与 20 mg/L 黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组细胞 Caspase-3 的表达量明显减少。与顺铂损伤组相比,  $^a P < 0.05$ 。与损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组与 20 mg/L 黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组中 Bax 蛋白表达未见明显变化。与顺铂损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组与 20 mg/L 黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组细胞内 Bcl-2 蛋白的表达量明显增加。与顺铂损伤组相比,  $^a P < 0.05$ ; 与干细胞+损伤肾小管上皮细胞组相比,  $^b P < 0.05$ 。

**2.4 caspase-3表达水平检测结果** 顺铂损伤组较正常对照组 caspase-3 活性片段的蛋白表达水平明显增加, 与顺铂损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组共培养后 caspase-3 表达减少, 20mg/L 黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组与之相比差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 图 5A)。

**2.5 Bax 表达水平检测结果** 正常对照组表达少量 Bax 蛋白, 顺铂损伤组较正常对照组 Bax 活性片段的蛋白表达水平明显增加, 与顺铂损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组与 20 mg/L 黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组中 Bax 蛋白表达未见明显变化(图 5B)。

**2.6 Bcl-2表达水平检测结果** 正常对照组表达少量 Bcl-2 蛋白。与正常对照组相比, 顺铂损伤组细胞内 Bcl-2 的蛋白表达水平略有降低。与顺铂损伤组相比, 干细胞+损伤肾小管上皮细胞组与 20 mg/L 黄芪甲苷孵育干细胞+肾小管上皮细胞组细胞内 Bcl-2 蛋白的表达量明显增加( $P < 0.05$ ); 与干细胞+损伤肾小管上皮细胞组相比, 20 mg/L 黄芪甲苷孵育人脂肪源性干细胞后变化更为明显( $P < 0.05$ ), 见图 5C。

### 3 讨论 Discussion

近年来, 以修复重建受损组织与器官的再生医学蓬勃发展, 并成为多学科交叉、融合而迅速发展的领域, 其中干细胞移植治疗是各学科研究的热点。但由于干细胞移植时, 靶目标内移植的细胞数量有限且部分干细胞并不能够存活, 如何提高移植后干细胞的存活率是当前干细胞移植治疗亟待解决的问题。将中药有效成分应用于干细胞的研究日益受到人们的关注。

急性肾损伤的主要病理表现和病变机制是肾小管上皮细胞的损伤, 可表现为细胞的凋亡、坏死、转分化, 并分泌多种细胞因子, 而随后肾功能的恢复也主要取决于肾小管上皮细胞的再生。与细胞坏死的不可逆性相比, 细胞凋亡(尤其早期)更易通过干预得到逆转。本实验以 2.5  $\mu\text{mol/L}$  顺铂干预肾小管上皮细胞, 建立体外的急性肾损伤细胞模型。应用 AV/PI 和 TUNEL 法检测共培养后肾小管上皮细胞的凋亡状况, 结果显示, 与正常对照组相比, 顺铂损伤组凋亡的细胞增多, 脂肪源性干细胞共培养后, 修复作用明显增加, 经 20 mg/L 黄芪甲苷共孵育的脂肪源性干细胞修复作用进一步加强。

脂肪源性干细胞有强大的分泌和调控多种细胞因子水平的功能。胰岛素样生长因子 1 是胰岛素样生长因子家族中的一种, 通过与胰岛素样生长因子 1 受体相结合产生生物学效应。近些年来, 研究发现胰岛素样生长因子 1 不仅具有胰岛素类似的功能以及介导生长激素的作用, 还是多种类型细胞凋亡的一个重要抑制因子<sup>[18-19]</sup>。更有研究报道在葡萄糖和氧化剂诱导的人和鼠肾小球膜细胞凋亡中, 胰岛素样生长因子 1 依赖 PI3K/Akt 和 MAPK 两大途径, 降低

Bax/Bcl-2 的比值, 增加 Bad 磷酸化, 最终抑制细胞凋亡<sup>[20]</sup>。本实验人脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组与 20 mg/L 黄芪甲苷人脂肪源性干细胞+肾小管上皮细胞组胰岛素样生长因子 1 分泌显著增多, 表明黄芪甲苷孵育的脂肪源性干细胞可以增加胰岛素样生长因子 1 的分泌, 从而抑制肾小管上皮细胞凋亡, 这与大多数的文献报道相一致。

caspase-3、Bax、Bcl-2 均为肾小管细胞凋亡信号途径中的相关蛋白, caspase-3 蛋白的表达直接反映了细胞损伤的严重程度, 而 Bax、Bcl-2 分别作为促凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白而平衡存在。Western blot 实验结果表明, 人脂肪源性干细胞与顺铂诱导过的肾小管上皮细胞共孵育后, 可减少 caspase-3 的活性表达抑制肾小管上皮细胞凋亡, 对于 Bax 的表达虽没有观察到明显的抑制作用, 但可以通过增强 Bcl-2 的表达抑制凋亡最终达到减少肾小管上皮细胞损伤的目的, 其中 20 mg/L 黄芪甲苷孵育过的人脂肪源性干细胞与肾小管上皮细胞共培养后调控凋亡相关蛋白的作用更为明显。

总之, 研究结果证实 20 mg/L 黄芪甲苷孵育后可增强其旁分泌效应, 促使胰岛素样生长因子 1 水平升高, 并调控肾小管细胞凋亡相关蛋白 caspase-3 和 Bcl-2 的表达。因此, 推测黄芪甲苷可通过促进人脂肪源性干细胞的增殖<sup>[21-29]</sup>、增加其旁分泌效益、调控肾小管细胞的某些凋亡信号途径对人脂肪源性干细胞体内移植治疗急性肾损伤产生有利的影响。当然, 这一推论还有待于在动物实验及临床研究中进一步证实。

**作者贡献:** 设计、实施及评估均为作者, 第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 没有与相关伦理道德冲突的内容。

**学术术语:** 上皮细胞-是位于皮肤或腔道表层的细胞。上皮细胞根据器官的不同而有所指不同: 尿常规的上皮细胞, 是衰老、脱落的皮细胞, 没有很特定的指向意义。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

### 4 参考文献 References

- [1] Huber JM, Tagwerker A, Heining D, et al. The proteasome inhibitor bortezomib aggravates renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297(2): 451-460.
- [2] Jayati Sengupta. Pediatric AKI and management. *Clinical Queries: Nephrology*. 2013;2(3): 91-95.
- [3] Luo J, Zhao X, Tan Z, et al. Mesenchymal-like progenitors derived from human embryonic stem cells promote recovery from acute kidney injury via paracrine actions. *Cytotherapy*. 2013;15(6):649-662.
- [4] Liu N, Tian J, Cheng J, et al. Effect of erythropoietin on the migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the acute kidney injury microenvironment. *Experimental Cell Res*. 2013;319(13):2019-2027.

- [5] Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:2921-2928.
- [6] Chen Y, Qian H, Zhu W, et al. Hepatocyte growth factor modification promotes the amelioration effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on rat acute kidney injury. *Stem Cells Dev.* 2011;20:103-113.
- [7] Bi B, Guo J, Marlier A, et al. Erythropoietin expands a stromal cell population that can mediate renoprotection. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295: 1017-1022.
- [8] Zisa D, Shabbir A, Suzuki G, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 390(3): 834-838.
- [9] Bi B, Schmitt R, Israilova M, et al. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(9):2486-2496.
- [10] Eliopoulos N, Zhao J, Bouchentouf M, et al. Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin nephrotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(6):1288-1298.
- [11] Zarjou A, Kim J, Traylor AM, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells in cisplatin-induced renal injury require heme oxygenase-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300(1):254-262.
- [12] Yen-Ta Chen, Cheuk-Kwan Sun, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Protects Kidneys against Ischemia-Reperfusion Injury through Suppressing Oxidative Stress and Inflammatory Reaction. *J Transl Med.* 2011;9:51.
- [13] Liu Y, Yan X, Sun Z, et al. Flk-1+ adipose-derived mesenchymal stem cells differentiate into skeletal muscle satellite cells and ameliorate muscular dystrophy in mdx mice. *Stem Cells Dev.* 2007;16(5):695-706.
- [14] Li K, Han Q, Yan X, et al. Not a Process of Simple Vicariousness, the Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Renal Tubular Epithelial Cells Plays an Important Role in Acute Kidney Injury Repairing. *Stem Cells Dev.* 2010;19(8):1267-1275.
- [15] Yuan L, Wu MJ, Sun HY, et al. VEGF-modified human embryonic mesenchymal stem cell implantation enhances protection against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300: 207-218.
- [16] Mias C, Trouche E, Seguelas MH, et al. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem Cells.* 2008;26:1749-1757.
- [17] 王葳, 姜燕, 王巍巍, 等. 黄芪甲苷对脂肪源性干细胞体外生物学行为的影响[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(2): 220-224.
- [18] Kenchappa P, Yadav A, Singh G, et al. Rescue of TNF $\alpha$ -inhibited neuronal cells by IGF-1 involves Akt and c-JunN terminal kinases. *J Neurosci Res.* 2004;76(4): 466-474.
- [19] Bencomo E, Pérez R, Arteaga MF, et al. Apoptosis of cultured granulosa-lutein cells is reduced by insulin-like growth factor 1 and may correlate with embryo fragmentation and pregnancy rate. *Fertil Steril.* 2006;85(2): 474-480.
- [20] Kang BP, Urbonas A, Baddoo A, et al. IGF-1 inhibits the mitochondrial apoptosis program in mesangial cells exposed to high glucose. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(5): 1013-1024.
- [21] 方萍, 邓叔华, 刘柏炎. 黄芪及其有效成分对干细胞影响的研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2014, 12(7): 161-163.
- [22] 姜燕, 王葳, 李泽争, 等. 张金元黄芪甲苷孵育的脂肪源性干细胞对顺铂诱导的急性肾损伤小鼠的保护作用[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(2): 114-117, 后插3-后插5页.
- [23] 王葳. 黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞对顺铂诱导肾小管上皮细胞损伤的保护作用及机制研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2013.
- [24] 彭小娟, 白海, 王存邦, 等. 黄芪甲苷对人骨髓间充质干细胞体外增殖及细胞因子表达的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(8): 1452-1455.
- [25] 王葳, 姜燕, 王巍巍, 等. 黄芪甲苷孵育脂肪源性干细胞对顺铂诱导的肾小管上皮细胞损伤的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29(7): 520-524.
- [26] 王莹, 李文媛, 刘贵波, 等. 黄芪皂甙IV联合ADSC对坐骨神经缺损后大鼠运动功能的修复作用[J]. *山东医药*, 2013, 53(39): 4-6.
- [27] 何文涓, 袁志坚, 张兰芳, 等. 黄芪注射液对兔脂肪来源的间充质干细胞体外增殖和细胞周期的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(24): 165-168.
- [28] 何文涓, 何晓升, 袁志坚, 等. 黄芪甲苷对兔脂肪来源的间充质干细胞体外增殖和细胞周期的影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(6): 466-468.
- [29] 何文涓, 张兰芳, 袁志坚, 等. 黄芪多糖对兔脂肪来源的间充质干细胞体外增殖的影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(5): 387-389.