

人端粒酶反转录酶基因修饰脐带间充质干细胞移植治疗急性肾损伤

王天生¹, 张建军²(天津市第五中心医院肾内科, 天津市 300451; ²天津市第四中心医院神经外科, 天津市 300451)

文章亮点:

- 1 人端粒酶反转录酶基因转染脐带间充质干细胞移植大鼠肾组织内, 在人端粒酶反转录酶转染组可以见到较多 CM-Dil 阳性细胞数, 提示肾组织中有来源于雄性大鼠的 CM-Dil 标记的脐带间充质干细胞。
- 2 反转录病毒 PLXSN 为载体介导的人端粒酶反转录酶基因转染脐带间充质干细胞移植对大鼠急性肾损伤具有明显的修复作用。

关键词:

干细胞; 移植; 人端粒酶反转录酶; 脐带脐血干细胞; 基因修饰; 脐带间充质干细胞; 移植; 大鼠; 急性肾损伤; 修复; 端粒酶反转录酶; 干细胞移植; 肾损伤

主题词:

组织工程; 干细胞; 脐带间充质干细胞; 大鼠; 肾损伤

缩略语:

人端粒酶反转录酶; Human telomerase reverse transcriptase, hTERT

王天生, 男, 1968年生, 汉族, 主治医师。

通讯作者: 王天生, 天津市第五中心医院肾内科, 天津市 300451

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)23-03686-06

稿件接受: 2015-05-02

http://www.crter.org

摘要

背景: 人端粒酶反转录酶(hTERT)是调控增殖及定向分化的首选生长因子之一, 具有多重生物学效应, 为建立基因工程的永生干细胞系奠定了基础。

目的: 探讨人端粒酶反转录酶基因修饰脐带间充质干细胞移植对大鼠缺血再灌注诱导的急性肾损伤的治疗作用。

方法: 体外培养人脐带间充质干细胞, 构建缺血再灌注诱导的大鼠急性肾损伤模型, 建模后将大鼠随机分为3组: 对照组尾静脉注射 1 mL L-DMEM 培养液; 空载病毒组: 尾静脉注射 1 mL 经空载病毒转染人脐带间充质干细胞悬液; hTERT 转染组尾静脉注射 1 mL 经 PLXSN-hTERT 转染的人脐带间充质干细胞悬液。

结果与结论: 移植后第 3, 28 天苏木精-伊红染色检查示 hTERT 转染组的肾小管损伤评分<空载病毒组<对照组($P < 0.05$)。移植后第 28 天, CM-Dil 阳性细胞数为 hTERT 转染组>空载病毒组>对照组($P < 0.05$)。移植细胞后第 1, 3, 14, 28 天血肌酐、尿素氮水平均为 hTERT 转染组<空载病毒组<对照组($P < 0.05$)。结果证实, hTERT 基因修饰脐带间充质干细胞移植对大鼠急性肾损伤具有明显的修复作用。

王天生, 张建军. 人端粒酶反转录酶基因修饰脐带间充质干细胞移植治疗急性肾损伤[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(23):3686-3691.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.23.014

Human telomerase reverse transcriptase gene-modified umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for acute kidney injury

Wang Tian-sheng¹, Zhang Jian-jun² (¹Department of Nephrology, the Fifth Tianjin Central Hospital, Tianjin 300451, China; ²Department of Neurosurgery, Tianjin 4th Centre Hospital, Tianjin 300451, China)

Abstract

BACKGROUND: The human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is one of preferred growth factors for regulating proliferation and directional differentiation, has multiple biological effects, and lays the foundation for genetically engineered immortalized stem cell lines.

OBJECTIVE: To investigate the effect of hTERT gene-modified umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on acute kidney injury induced by ischemia and reperfusion in rats.

METHODS: The human umbilical cord mesenchymal stem cells were cultured *in vitro*. Rat models of acute kidney injury induced by ischemia and reperfusion were established. Rat models were randomly divided into three groups. Rats in the control group were injected with 1 mL L-DMEM medium through caudal vein. Rats in the negative transfection group were injected with 1 mL umbilical cord mesenchymal stem cell suspension after empty virus transfection through caudal vein. Rats in the hTERT transfection group were injected with 1 mL umbilical cord mesenchymal stem cell suspension after PLXSN-hTERT transfection through caudal vein.

RESULTS AND CONCLUSION: At 3 and 28 days after transplantation, hematoxylin-eosin staining showed renal tubular damage score in the hTERT transfection group < negative transfection group < control group ($P < 0.05$). At 28 days after transplantation, the number of CM-Dil-positive cells in the hTERT transfection group > negative transfection group > control group ($P < 0.05$). At 1, 3, 14, and 28 days, serum creatinine and urea nitrogen levels in the hTERT transfection group < negative transfection group < control group ($P < 0.05$). The results confirm that

Wang Tian-sheng, Attending physician, Department of Nephrology, the Fifth Tianjin Central Hospital, Tianjin 300451, China

Corresponding author: Wang Tian-sheng, Department of Nephrology, the Fifth Tianjin Central Hospital, Tianjin 300451, China

Accepted: 2015-05-02

hTERT gene-modified umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation has a significant repair effect on acute kidney injury in rats.

Subject headings: Tissue Engineering; Stem Cells; Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells; Rats; Renal Injury

Wang TS, Zhang JJ. Human telomerase reverse transcriptase gene-modified umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for acute kidney injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(23):3686-3691.

0 引言 Introduction

急性肾损伤是较严重和普遍的一组肾脏疾病, 严重威胁着人类的健康, 其在人群中的发病率和死亡率均很高^[1-3]。目前临床采用血透和肾移植的治疗方法, 但血透医疗费用高昂, 且只能替代肾脏的部分功能, 而肾移植又面临器官来源短缺的最大难题^[4-6]。因此, 为肾损伤探索更有效的治疗方法是现今肾脏病研究的重要课题^[7-9]。

近年来干细胞移植被广泛应用于肾脏病的治疗及研究, 研究发现干细胞可以向内皮细胞、肾脏细胞等分化的优点, 可能从源头上解决器官损伤所带来的一切问题^[10-12]。越来越多的证据表明干细胞在急性肾损伤方面具有较好疗效, 并展现出广阔的临床应用前景^[13-14], 但干细胞是否有明确的治疗肾损伤作用尚不肯定^[15-16]。人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因能以端粒酶RNA为模板反转录合成端粒酶DNA, 还可通过与其他分子相互作用而发挥不同的生物学功能。

实验采取PLXSN病毒作为载体介导hTERT基因转染脐带间充质干细胞移植到大鼠急性肾损伤模型中, 探讨其对大鼠急性肾损伤修复作用影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2012年10月至2014年8月在天津医科大学总医院动物实验室完成。

材料:

实验动物: 清洁级1月龄SD大鼠70只, 雌雄各半, 体质量180-220 g, 购自中国医学科学院动物实验室, 动物质量合格证号: SCXK20090028。

hTERT基因转染实验相关试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
CM-Dil	Sigma公司
胰蛋白酶	Gibco公司
流式抗体CD31、CD34	Coulter公司
Trizol、Lipofectamine™2000	Invitrogen公司
Western blot化学发光试剂	Santa cruz公司
兔抗人hTERT抗体、HRP-羊抗兔IgG、PVDF膜	英国RS Biotech公司
超净工作台	苏州安泰空气技术公司
荧光倒置显微镜	日本Nikon公司

实验方法:

脐带间充质干细胞的制备、鉴定、标记: 实验经过伦理委员会批准取足月妊娠剖宫产健康胎儿的脐带, 以PBS充分冲洗, 剔除血管后, 剩余的间质组织切割成直径约1 mm³的组织块, 体积分数0.1% II型胶原酶, 体积分数0.25%胰酶37 °C消化30 min, 离心后去上清, 将组织块与细胞接种于培养皿, 含体积分数5%胎牛血清的DMEM培养基中培养。第1次传代后每3 d按1:3比例传代, 进行扩增培养。取P3代细胞, 消化后加入PEFITC标记的CD73, CD105, HLA-DR, CD31, VWF, KDR, CD34, CD45, CD235a流式抗体及相应对照标记, 流式细胞仪检测鉴定为脐带间充质干细胞。吸取CM-Dil液5 μL至1.5 mL的EP管中, 加入1 mL完全培养液, 吹打均匀, 即得CM-Dil标记液。取贴壁浓度达90%融合的细胞, 吸弃培养液, PBS洗3次, 加入上述标记液40 μL/cm², 于37 °C、体积分数5%CO₂、饱和湿度恒温培养箱中孵育20 min, 吸弃标记液, 加入37 °C的完全培养液5 mL, 孵育, 10 min后吸弃, 继续加入培养液重复清洗2次。培养24 h后在倒置荧光显微镜下观察CM-Dil标记效果和细胞形态变化。随机选取5个视野, 计数CM-Dil阳性细胞数及细胞总数, 计算标记率。标记率=视野内阳性细胞总数/视野内细胞总数×100%。移植时PBS洗涤细胞3次, 将终浓度调为1×10¹⁰ L⁻¹备用。

缺血再灌注诱导的急性肾损伤模型构建及细胞移植:

参照文献[17]方法构建缺血再灌注诱导的大鼠急性肾损伤模型, 建模过程中死亡10只, 将剩余大鼠60只随机分为3组: hTERT转染组、空载病毒组 and 对照组每组20只。hTERT转染组及空载病毒组200 g/L乌拉坦按1.2 g/kg剂量腹腔注射麻醉满意后, 腹部正中切口暴露肾脏, 用无损伤性动脉夹夹住双侧肾蒂, 40 min后松开血管夹, 再灌注后进行细胞移植^[18]。移植方法如下: 对照组尾静脉注射1 mL L-DMEM培养液; 空载病毒组尾静脉注射1 mL经空载病毒转染人脐带间充质干细胞(2×10⁶个)悬液; hTERT转染组尾静脉注射1 mL经PLXSN-hTERT转染的人脐带间充质干细胞(2×10⁶个)悬液。

PLXSN-hTERT转染及检测: 取生长良好的第4代脐带间充质干细胞, 培养在含体积分数10%小牛血清的DMEM培养基中, 体积分数5%CO₂, 37 °C恒温密闭式培养箱中培养。每2 d传代1次, 于实验时取对数生长期的细胞, 按6×10⁴/孔将脐带间充质干细胞接种于24孔板中, 于3 d后进行PLXSN-hTERT转染: 弃掉培养液, 用PBS洗涤2次, 从瓶内吸取残余的培养液, 按感染倍数(multiple infection,

MOI)= 10^5 加入无血清的 L-DMEM 培养基稀释的 PLXSN-hTERT, 使其彻底覆盖细胞培养面积, 在 37°C 恒温下孵育 2 h, 之后分别加入适量胎牛血清和 L-DMEM 培养基, 按常规贴壁细胞继续培育 1 周后进行下列实验。在检测前 3 d 勿更换细胞培养液。在同等条件下进行空载病毒转染, 转染 1 次/d, 共 3 d, 再同等培养条件下作正常细胞为对照组。

Western blot 检测: 将每组选 1 只大鼠肾组织细胞悬液分别经离心半径 16 cm, 800 r/min, 离心 5 min, 收集目的细胞, 细胞弃培养液后加 400 μL 蛋白裂解液, 提取总蛋白, 行 Bradford 法测定蛋白的浓度。5% 浓缩胶 40 V 恒压 1 h, 10% 分离胶恒压 60 V, 3.5 h, 湿转 14 V 恒压 14 h, 37°C 摇床封闭 2 h, 加入兔抗人 hTERT 抗体 (1:800), 37°C 摇床孵育 2 h, TBST 洗膜 5 min/每 4 次, 加入 HRP-羊抗兔 IgG (1:700), 37°C 摇床孵育 1.5 h, TBST 洗膜 5 min/每 4 次。二甲苯联苯胺显色。经 3 次重复试验后行 Quantity one 图像分析, 评定蛋白的表达水平用目的条带与 β -actin 条带吸光度面积积分的比值。

生长曲线测定: 将同时期转染前后的脐带间充质干细胞分别制成单细胞悬液, 计数后按 1.5×10^4 /孔浓度接种于 24 孔板上, 每组设 3 个复孔, 置于 37°C 、体积分数 5% CO_2 孵箱培养。在培养第 2 天起, 同一时间每天消化每组细胞 3 个孔, 置于 37°C 、体积分数 5% CO_2 孵箱培养 2 d 后, 进行精确计数并绘制细胞生长曲线图。

苏木精-伊红染色及组织学观察和评分: 于移植细胞后第 3, 28 天分别取 3 组大鼠各 5 只的左肾标本进行苏木精-伊红染色。缺血再灌注诱导的急性肾损伤主要表现为肾小管损伤, 包括肾小管坏死、刷状缘消失、肾小管扩展和管型形成。根据肾脏评分体系及综合病理损伤评分^[19]: 0 分为正常肾脏, 1 分为小损伤 (范围 <5%), 2 分为中等损伤 (范围 5%–25%), 3 分为中重度损伤 (范围 >25%–75%), 4 分为严重损伤 (>75%)。

免疫荧光观察 CM-Dil 阳性细胞数: 于移植细胞后第 28 天对组织切片进行荧光显微镜观察。每张切片在高倍镜 ($\times 200$) 下任取 10 个视野, 计算每个视野中的 CM-Dil 阳性细胞数, 取其均值作为各组的 CM-Dil 阳性细胞数。

肾功能检测: 于移植细胞后第 1, 3, 14, 28 天, 3 组分别取 5 只大鼠, 从眼眶内眦静脉采血检测血清肌酐和尿素氮。

主要观察指标: 对脐带间充质干细胞形态及标记进行观察; 对移植细胞后肾组织损伤情况进行观察; 观察移植后各组的 CM-Dil 阳性细胞数。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析及 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 纳入大鼠 70 只, 造模后脱失及死

亡共 10 只, 最终计入结果分析的数量 60 只, 每组 20 只。建模流程见 **图 1**。

2.2 脐带间充质干细胞形态及标记结果 培养三四天后, 贴壁的细胞明显增多, 并出现有丝分裂, 部分细胞克隆呈集落状生长, 形态呈单一的长梭形, 胞体中央膨大, 培养七八天, 细胞铺满培养瓶底面, 成漩涡状生长, 漩涡中心的细胞为复层生长, 周围大部分细胞胞体呈单层的漩涡状或辐射状 (**图 2A**)。流式细胞仪检测结果显示 CD34, CD45, CD90, CD105, CD29 及 CD49 阳性, 脐带间充质干细胞均一性好, 纯度达 98% 以上。培养 24 h 时, CM-Dil 标记的脐带间充质干细胞在荧光显微镜下呈红色荧光, FCM 检测细胞标记率达 100% (**图 2B**)。

2.3 CM-Dil 标记的脐带间充质干细胞形态观察 移植后第 28 天, CM-Dil 阳性细胞数 3 组比较: hTERT 转染组最多, 空载病毒组次之, 对照组最少 ($P < 0.05$)。

2.4 转染后各组 hTERT 蛋白的表达 转染 48 h 后, hTERT 转染组的脐带间充质干细胞检测到 hTERT 蛋白表达明显增加, 而对照组和空载病毒组 hTERT 蛋白无表达, 说明 hTERT 基因已稳定整合入 hTERT 转染组脐带间充质干细胞中, 且可以行目的蛋白的稳定表达, 如 **图 3**。

2.5 转染后各组细胞增殖情况 细胞生长曲线检测显示, 转染后 2–5 d 与对照组和空载病毒组比较, hTERT 转染组脐带间充质干细胞的增殖能力显著增强 ($P < 0.05$), 见 **表 1**。

表 1 转染后各组细胞增殖能力比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$, $\times 10^4$)
Table 1 Comparison of reproductive activity of cells in each group after transfection

转染时间(d)	对照组	空载病毒组	hTERT 转染组
1	2.04 \pm 0.14	2.05 \pm 0.15	2.05 \pm 0.16
2	3.24 \pm 0.25 ^a	4.45 \pm 0.18 ^a	5.14 \pm 0.35
3	4.96 \pm 0.26 ^a	8.53 \pm 0.27 ^a	10.24 \pm 0.37
4	8.25 \pm 0.36 ^a	12.64 \pm 0.68 ^a	15.12 \pm 0.87
5	12.34 \pm 0.74 ^a	16.22 \pm 1.06 ^a	19.32 \pm 1.27

表注: 与 hTERT 转染组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.6 移植后大鼠肾组织苏木精-伊红染色和组织学评分结果 移植后第 3, 28 天, hTERT 转染组的肾小管损伤评分为 (2.0 \pm 0.15), (1.3 \pm 0.10) 分, 空载病毒组为 (3.0 \pm 0.18), (2.2 \pm 0.13) 分, 对照组分别为 (3.8 \pm 0.17), (2.6 \pm 0.15) 分, 3 组间比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。缺血再灌注诱导的急性肾损伤主要表现为肾小管坏死, 管型形成, 刷状缘消失和小管扩张, 见 **图 4**。

2.7 移植后大鼠肾组织 CM-Dil 阳性细胞数比较 移植后第 28 天, CM-Dil 阳性细胞数: hTERT 转染组最多 (27.2 \pm 4.50), 空载病毒组次之 (18.25 \pm 3.71), 对照组未见 CM-Dil 阳性细胞, 各组之间差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。见 **图 5**。

2.8 移植后大鼠肾功能变化 移植后第 1, 3, 14, 28 天, 大鼠肌酐、尿素氮水平均为 hTERT 转染组 < 空载病毒组 < 对照组 ($P < 0.05$), 见 **表 2**。

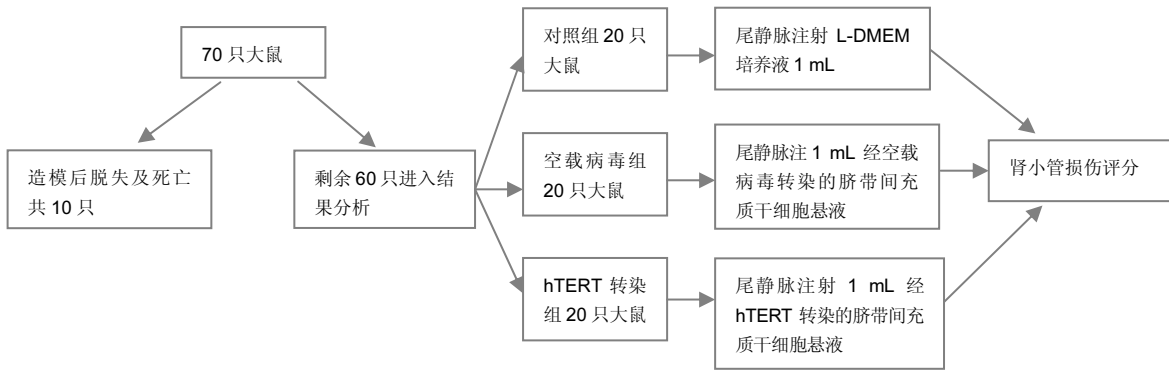


图 1 建模流程图

Figure 1 Flowchart of model establishment

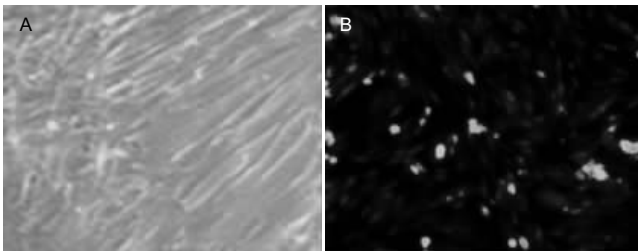


图 2 脐带间充质干细胞形态

Figure 2 Morphology of umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为扩增纯化后的第 3 代脐带间充质干细胞形态(光学显微镜, $\times 200$), 脐带间充质干细胞均一性好, 形态呈成漩涡状生长, 漩涡中心的细胞为复层生长; B 为培养 24 h 时 CM-Dil 标记的脐带间充质干细胞形态(荧光显微镜, $\times 100$), CM-Dil 标记的阳性细胞数目增多。



图 3 转染 48 h 后各组人端粒酶反转录酶(hTERT)蛋白的表达

Figure 3 hTERT protein expression in each group at 48 hours after transfection

图注: 在 hTERT 转染组检测到 hTERT 蛋白表达明显, 对照组和空载病毒组 hTERT 蛋白无表达。

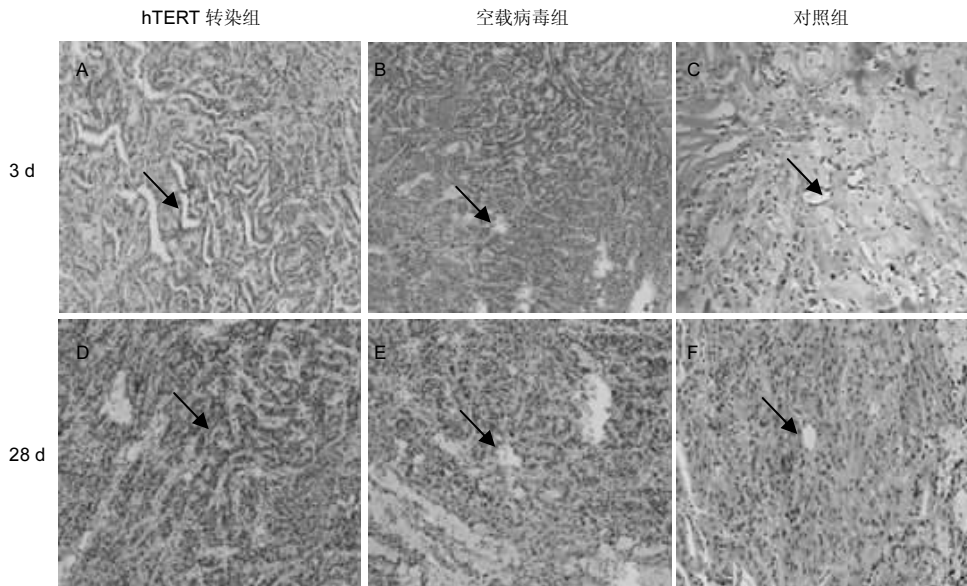


图 4 移植后第 3, 28 天缺血再灌注大鼠急性肾损伤病理图片(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

Figure 4 Pathological images of rats with acute kidney injury induced by ischemia and reperfusion at 3 and 28 days after transplantation (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

图注: 缺血再灌注诱导的急性肾损伤主要表现为肾小管坏死(箭头), 管型形成, 刷状缘消失和小管扩张。



图 5 移植后第 28 天大鼠肾组织损伤区 CM-Dil 阳性细胞观察(免疫荧光染色, $\times 200$)

Figure 5 CM-Dil-positive cells in the injury site of the rat kidney at 28 days after transplantation (immunofluorescence, $\times 200$)

图注: hTERT 转染组 CM-Dil 阳性细胞 > 空载病毒组; 对照组未见 CM-Dil 阳性细胞; 箭头所指代表 CM-Dil 阳性细胞。

表2 移植后3组大鼠肾功能检测指标比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Comparison of renal function test indexes of rats from each group after transplantation

项目	对照组	空载病毒组	hTERT 转染组
血肌酐($\mu\text{mol/L}$)			
1 d	71.3 \pm 5.1	40.5 \pm 3.4	36.5 \pm 3.1
3 d	56.4 \pm 2.2	32.6 \pm 2.9	27.1 \pm 4.3
14 d	39.2 \pm 4.2	26.5 \pm 1.8	16.3 \pm 3.3
28 d	34.0 \pm 3.3	17.6 \pm 1.6	10.2 \pm 2.2
尿素氮(mmol/L)			
1 d	25.3 \pm 2.7	19.5 \pm 1.5	16.3 \pm 2.2
3 d	21.9 \pm 2.2	17.5 \pm 1.4	14.2 \pm 1.3
14 d	16.2 \pm 3.3	14.6 \pm 2.6	11.1 \pm 1.5
28 d	13.3 \pm 1.7	11.2 \pm 1.8	8.2 \pm 1.2

表注: 移植后第1, 3, 14, 28天, 血肌酐、尿素氮水平均为hTERT转染组<空载病毒组<对照组($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

现阶段随着干细胞技术的进步为肾脏疾病的治疗提供了新方法。急性肾损伤是由导致肾脏结构或功能变化的损伤所引起的肾脏功能的减弱, 是一种较为常见的临床综合征, 其发病率和死亡率均较高^[19-21]。各种原因都可诱发急性肾损伤的发生。而目前临床上血透和肾移植的治疗方法都具有各种各样的困难^[22-23]。近些年来, 干细胞技术的进步使得脐带间质干细胞有效治疗急性肾损伤成为可能^[24-25]。

干细胞移植对急性肾损伤的修复具有较好的疗效。目前较为有前景应用于肾脏替代治疗的干细胞主要有脐带间充质干细胞、诱导型多能干细胞、胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞^[26-28]。其中, 脐带间充质干细胞是一类具有来源广泛、易于保存和采集、无异体排斥、可多向分化、避免伦理争议等诸多优点的并具有自我更新和多向分化能力的干细胞。多项研究表明脐带间充质干细胞可能通过旁分泌或自分泌方式分泌细胞因子和营养因子从而使一些受损的细胞进行自我修复^[29-30]; 亦可向病变部位组织渗透融合、替代或补充损伤细胞, 起到恢复受损细胞功能的作用。有研究发现, hTERT基因的siRNA表达载体能与靶基因进行有效结合, 且能降解hTERT mRNA, 减低端粒酶活性, 使hTERT蛋白的表达下调, 进而导致细胞生长抑制, 增殖速度减低^[31-32]。

实验经hTERT载体转染后, 细胞增殖平均数增多, 这与Zhou等的研究结果一致^[33], 表明了干细胞治疗后, 肾组织病理学提示肾脏病理改变明显减轻。RT-PCR检测和Western blot检测结果发现hTERT转染后使体外培养的脐带间充质干细中hTERT基因蛋白水平和mRNA的表达有明显的增强, 提示了经hTERT转染后的脐带间充质干细胞可以更好的发挥对受损肾组织的修复作用。移植后第3天, 通过苏木精-伊红染色检查示, hTERT转染组的肾小管损伤评分低于空载病毒组和对照组, 可见肾组织得以修复。以往大量对不同进展性肾损伤动物模型进行的研究结果, 均表明了脐带间充质干细胞对损伤肾组织发挥着有益

作用^[34-45]。

综上所述, 实验采用hTERT基因修饰脐带间充质干细胞移植治疗大鼠急性肾损伤, 其结果表明了脐带间质干细胞移植能够促进大鼠急性肾损伤的修复。随着干细胞研究的进展, 脐带血充质干细胞移植治疗急性肾损伤疾病已成为医学界研究的热点之一。

致谢: 感谢天津医科大学总医院神经外科刘宝斌医师及天津市第四中心医院张建军医师在实验过程及统计学方面的帮助。

作者贡献: 实验设计、评估、资料收集和成文均为王天生。

王天生和张建军负责实验实施。王天生对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 端粒酶-是一种由多个结构单位组成的具有反转录合成端粒重复片段至染色体3'末端来补充端粒丢失的核蛋白复合体。目前已经鉴定出来的成分有: 端粒酶RNA组分、端粒酶相关蛋白和端粒酶反转录酶。端粒酶的激活可以延缓细胞的衰老, 甚至使细胞永生。端粒酶反转录酶与细胞端粒酶的活性高低密切相关。

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] 杨婷, 陈广华, 薛胜利, 等. 无血清和含胎牛血清培养基培养的脐带间充质干细胞生物学特性比较研究[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(9):715-719.
- [2] 杨大志, 罗惠莉, 易伟宏, 等. 转染骨形态发生蛋白-2基因的人脐带间充质干细胞成骨研究[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(8): 1580-1583.
- [3] 毛立军, 李望, 杨春华, 等. SATB1、hTERT基因在前列腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(4): 603-604.
- [4] 杨磊, 丁巍, 张敏敏, 等. NF- κ B在醛固酮所致大鼠肾损伤中的作用及相关机制[J]. 中华肾脏病杂志, 2011, 27(9):673-677.
- [5] 沈建明, 叶婷婷, 王黎萍, 等. 依达拉奉对心肺复苏后大鼠肾损伤的保护作用及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(6):778-779.
- [6] 侯玉森, 柴家科, 刘玲英, 等. 脂多糖预处理对人脐带间充质干细胞内毒素耐受的影响[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(12):948-951.
- [7] 张险峰, 江应安, 印安宁, 等. 端粒酶反转录酶基因启动子调控FADD表达载体诱导人结肠细胞凋亡的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(7):1139-1179.
- [8] 寇晨程, 陈丑彦, 曾峰, 等. 大鼠肾损伤早期三七总皂苷对肾皮质小管细胞Bax的影响[J]. 中华创伤杂志, 2014, 30(2):185-188.
- [9] 严波, 陈方敏, 石家齐, 等. 人端粒酶反转录酶基因反义核酸结合位点的筛选[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(12):2101-2104.
- [10] 华杰, 龚健, 何志刚, 等. 血小板裂解液替代胎牛血清培养间充质干细胞[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(4):744-746.
- [11] 程文, 苏筠, 马宏青, 等. 联合RNA干扰TR及TERT对膀胱移行细胞癌BIU-87细胞株端粒酶活性及其增殖的影响[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(40):2847-2852.
- [12] 王丹, 暴一众, 胡显兴, 等. 整合剂PBCBG对急性钡中毒大鼠的促排效果及肾损伤的保护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2012, 32(4):337-341.

- [13] 胡志娟,任路平,王超,等.鹅脱氧胆酸对高果糖饮食致大鼠肾损伤的保护作用及其机制[J].中华肾脏病杂志,2013,29(2):129-135.
- [14] 沈干,丛笑倩.小鼠胚胎干细胞分化细胞永生生化后致瘤性研究[J].中华整形外科杂志,2012,28(1):33-39.
- [15] 卢文艺,赵明峰,柴笑,等.活性氧介导铁过载对脐带间充质干细胞及其造血支持作用的研究[J].中华医学杂志,2013,93(12):930-934.
- [16] 王劲亮,王卫星,余建华,等.罗格列酮保护大鼠重症急性胰腺炎肾损伤的机制[J].中华实验外科杂志,2012,29(5):896-899.
- [17] Ttigel 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:F31-F42.
- [18] 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.
- [19] Chen YT, Sun CK, Lin YC, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia— reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *J Transl Med.* 2011;9:51-67.
- [20] 曾慧兰,钟启,贾海涛,等.氯化钴作用人脐带间充质干细胞的差异蛋白质组学分析[J].中华血液学杂志,2011,32(11):739-743.
- [21] 马西臣,谭玉利,杨亦彬,等.肾损伤分子1在鱼胆中毒大鼠尿和肾脏的表达[J].中华肾脏病杂志,2009,25(4):322-323.
- [22] 胡凡果,只向成,史玉荣,等.人端粒酶反转录酶shRNA抑制乳腺癌T47D细胞增殖活性的研究[J].中华实验外科杂志,2013, 30(4):667-670.
- [23] 孙东翀,杨勇,魏志涛,等.人脐带间充质干细胞与肌肉微粒共培养及其诱导干细胞成肌分化的研究[J].中华实验外科杂志,2013, 30(2):339-341.
- [24] 陈绍坤,刘岚,税青林,等.联合干扰人端粒酶反转录酶和端粒重复序列结合因子2基因的表达对乳腺癌MCF-7细胞生长的抑制作用[J].中华肿瘤杂志,2010,32(2):93-97.
- [25] 方明星,董士民.亚甲蓝预先给药对脓毒症诱发大鼠急性肾损伤的影响[J].中华麻醉学杂志,2014,34(2):241-244.
- [26] 翟晓东,陈振雨,冷向锋,等.局部移植人脐带间充质干细胞治疗大鼠皮瓣缺血再灌注损伤[J].中华整形外科杂志,2012,28(3):203-207.
- [27] 马群兴,李彤,赵越,等.脐带间充质干细胞与脐血CD34⁺细胞联合移植治疗心肌梗死[J].中华胸心血管外科杂志,2014,30(2):82-89.
- [28] 高加胜,刘荣福.间充质干细胞在急性肾损伤中的研究进展[J].国际泌尿系统杂志,2012,32(4):549-552.
- [29] 范宁建,冯世庆,刘举,等.人脐带间充质干细胞联合布洛芬修复大鼠脊髓损伤[J].中华实验外科杂志,2013,30(1):112-114.
- [30] 刘少鹏,俞小芳,钟一红,等.经肾动脉移植脂肪干细胞对大鼠急性缺血性肾损伤的治疗作用[J].中华肾脏病杂志,2013,29(10):768-774.
- [31] 宋扬,徐韬,杨明坤,等.RNA干扰hTERT基因慢病毒表达载体的构建及鉴定[J].中国组织工程研究,2014,18(11):1724-1729.
- [32] Ninichuk V, Gross O, Segerer S, et al. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int.* 2006;70(1):121-129.
- [33] Zhou K, Zhang H, Jin O, et al. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice. *Cell Mol Immunol.* 2008;5(6):417-424.
- [34] 吴灵芝,李水彬,程刚卫,等. hTERT基因转染对人神经元活力的影响[J].赣南医学院学报,2014;34(2):170-173.
- [35] 靳斌,王伟,刘泽阳,等.外源hTERT基因转染对老年大鼠供肝缺血再灌注损伤的防护作用[J].山东大学学报:医学版,2013,51(8):13-16.
- [36] Qiu Z, Zhou D, Sun D. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Int Braz J Urol.* 2014;40(4):553-5561.
- [37] Shalaby RH, Rashed LA, Ismaail AE, et al. Hematopoietic stem cells derived from human umbilical cord ameliorate cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Am J Stem Cells.* 2014;3(2):83-96.
- [38] Jang HR, Park JH, Kwon GY, et al. Effect of preemptive treatment with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on the development of renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307(10):F1149-F1161.
- [39] Peng X, Xu H, Zhou Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate cisplatin-induced acute and chronic renal injury. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013; 238(8):960-970.
- [40] Peng X, Xu H, Zhou Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate cisplatin-induced acute and chronic renal injury. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013.
- [41] Dorrnsoro A, Robbins PD. Regenerating the injured kidney with human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(2):39.
- [42] Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(2):34.
- [43] Li W, Zhang Q, Wang M, et al. Macrophages are involved in the protective role of human umbilical cord-derived stromal cells in renal ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2013;10(3):405-416.
- [44] Fang TC, Pang CY, Chiu SC, et al. Renoprotective effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in immunodeficient mice suffering from acute kidney injury. *PLoS One.* 2012;7(9):e46504.
- [45] Park JH, Hwang I, Hwang SH, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells prevent diabetic renal injury through paracrine action. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;98(3):465-473.