

骨髓间充质干细胞移植与肾脏病*

卫 静 袁发焕 黄云剑[△]

(第三军医大学新桥医院肾内科 重庆 400037)

摘要 :骨髓间充质干细胞是目前广受关注的一群成体干细胞 ,具有取材容易 ,增殖能力强 ,生物学特性稳定 ,可以跨胚层分化 ,低免疫源性 ,参与受损组织修复等优点 ,随着组织工程的兴起和发展以及其自身所特有的生物学特性 ,人们逐渐认识到将骨髓间充质干细胞作为肾脏病移植治疗的种子细胞具有良好的应用前景。本文就骨髓间充质干细胞的生物学特性及其在肾脏病移植治疗中的进展做一综述。

关键词 :间充质干细胞 ,肾脏病 ,移植

中图分类号 :Q813 R318.06 R392.4 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)10-1987-04

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Kidney Disease*

WEI Jing, YUAN Fa-huan, HUANG Yun-jia[△]

(Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing, China 400037)

ABSTRACT: Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) are a population of adult stem cells and have many advantages, e.g. they are easily available, have high proliferation capability, characteristics of biology are stable, have the potential of multidirectional differentiation, their immunogenicity is lower and participate in repairing functional tissue after injury. With the rise and development of tissue engineering, as well as their own characteristics of biology, people gradually realize that it has potential clinical application to use bone marrow mesenchymal stem cells as seed cells transplatation in the treatment of kidney diseases. The essay is to review the biologic characteristics and application prospects of MSCs in transplantation for kidney disease.

Key words: Mesenchymal stem cell; Kidney disease; Transplantation

Chinese Library Classification(CLC): Q813, R318.06, R392.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)10-1987-04

近年来 ,随着细胞生物实验技术的快速发展 ,对于干细胞的研究与应用已成为生命科学的研究热点。干细胞是一类未分化细胞 ,具有自我复制、自我更新、多向分化潜能等特性。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells ,MSCs)是其中一种成体干细胞 ,因其具有取材容易 ,增殖能力强 ,生物学特性稳定 ,可以跨胚层分化 ,低免疫源性等优点 ,被广泛应用于多种疾病的治疗研究中 ,具有良好的临床应用前景^[1]。MSCs 移植治疗肾脏疾病的研究起步较晚 ,但目前大多数学者都认为 MSCs 具有向肾脏实质细胞分化的潜能 ,可以参与肾脏损伤后的再生和修复 ,减轻肾脏损害的程度 ,具有保护肾脏的作用。本文就 MSCs 的生物学特性及在肾脏疾病中的应用做一综述。

1 骨髓间充质干细胞的生物学特性

1976 年 ,Friedenstein^[2]首先报告骨髓中存在一种纺锤形的成纤维细胞集落形成单位(CFU-F) ,它具有高度的自我更新和多向分化潜能 ,可促进造血细胞克隆形成 ,因而推测这种细胞

可能是间质细胞的前体细胞。随后 ,其它研究小组报道从骨髓中可分离到有粘附能力的非造血干细胞 ,它们能分化为成熟的间质细胞。1991 年 ,Caplan^[3]把这些具有黏附能力 ,在体外能高度扩增 ,并可多向分化的细胞群命名为间充质干细胞(MSCs)。2001 年 Minguell^[4]等将 MSCs 定义为 :存在于骨髓基质内的非造血细胞来源的细胞亚群 ,他们可以在体外扩增 ,在体外经诱导后可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、肌管、神经细胞与支持造血干细胞的基质。

1.1 骨髓间充质干细胞的形态

一般认为 ,MSCs 体积小 ,核浆比大 ,呈梭形。刚分离的 MSCs 形态多样 ,12 小时开始贴壁 ,24~36 小时贴壁完成。刚贴壁的细胞呈纺锤形、梭形或椭圆形 ,细胞核居中 ,一般有 2 个或多个胞核。随着培养时间的延长 ,细胞体积逐渐增大 ,呈集落样生长 ,部分细胞呈三角形或多角形。传代后的细胞大部分呈梭形或多角形 ,呈漩涡状排列。Colter^[5]等认为培养的 MSCs 中形态较小的细胞是循环干细胞 ,有较强的增殖能力 ,克隆形成率

* 基金项目 :国家自然科学基金资助项目(30570871) ;重庆市科委自然科学基金项目(CSTC,2007BB5017)

作者简介 :卫静(1977-) ,女 ,博士研究生 ,主治医师 ,主要从事肾脏病细胞治疗方面的研究。

电话 : (023) 68774621 ,Email :weijing1977@21cn.com

[△] 通讯作者 :黄云剑

(收稿日期 :2011-03-21 接受日期 :2011-04-16)

高,而形态较大的细胞为成熟的 MSCs,克隆形成率低,随着细胞传代次数的增加,细胞形态、排列基本趋于一致。

1.2 骨髓间充质干细胞的分化潜能

骨髓间充质干细胞具有多向分化能力是其作为“种子细胞”进行细胞移植治疗受损靶器官的基础。研究表明 MSCs 能够在外界及体内微环境的作用下分化为特定的组织细胞,而且 MSCs 不仅可以定向分化为中胚层细胞,还可以横向向外胚层、内胚层细胞分化^[6-8]。

1.2.1 体外诱导分化 骨髓间充质干细胞自我更新与分化是由细胞外部环境的信号与细胞内在的“程序”共同决定的,而在很大程度上,细胞内在的遗传因素的发挥需要外部信号的参与及调控,即细胞外环境的改变可以促进细胞的更新与分化。以往对 MSCs 进行体外诱导即是通过向细胞培养基中加入各种诱导因子如血清、糖分、维生素以及各种细胞因子等促进细胞分化,或者是与其它细胞共培养,利用其它细胞分泌的各种因子完成 MSCs 的诱导分化。经典的成骨诱导方法既是在 MSCs 培养液里添加 β -甘油磷酸钠、维生素 C、地塞米松、胎牛血清,几周后骨髓间充质干细胞即可呈现形态改变,细胞内碱性磷酸酶活性上调,细胞外基质中矿化物质沉积等成骨细胞特性。而在培养基中加入地塞米松及胰岛素,细胞即可分化为含有脂滴的脂肪细胞。此外,骨髓间充质干细胞还可以与其它细胞共培养而向特定细胞分化。Richardson^[9]等将人 MSCs 和髓核细胞单独及共同培养,观察髓核细胞在或不在细胞接触的情况下能否促进 MSCs 分化,结果显示:当细胞接触培养后 7d,定量 PCR 显示 MSCs 中的髓核标记基因显著增加,且随细胞比例而变化,在未接触细胞培养后,不管其细胞比例如何,髓核细胞及 MSCs 中髓核标记基因均无显著变化,说明人髓核细胞和 MSCs 接触共同培养可以促进 MSCs 分化。

1.2.2 体内诱导分化 体内实验研究结果表明,骨髓间充质干细胞具有多胚层分化潜能。Xiang^[10]等采用 型胶原-黏多糖支架培养骨髓间充质干细胞 3 周,再移植到犬膝关节软骨缺损处,12 周后犬膝关节功能恢复,缺损处被软骨组织充填。Arnhold 等^[11]将 BMSC 移植入视紫红质基因敲除鼠眼内,发现移植的细胞不仅能整合进 RPE,而且在神经上皮各层显示出神经元和神经胶质细胞的形态,更有意义的是它维持了光感受器细胞的存活。

2 骨髓间充质干细胞移植与肾脏病

2.1 肾小球疾病

为了研究 MSCs 对肾小球疾病损伤修复的作用,2001 年 I-masawa^[12]等将 GFP 标记的骨髓干细胞移植入经钴 60 γ 射线照射的小鼠体内后,2~24 周观察发现,移植受体鼠肾小球内的 GFP 阳性细胞呈时间依赖性增加,激光共聚焦显微镜显示这些细胞位于肾小球的系膜区,将受体鼠的肾小球分离后培养,约 84% 的细胞呈结蛋白阳性,这些细胞中有 60% 的细胞呈 GFP

阳性,在培养液中加入血管紧张素 后,GFP 阳性细胞产生收缩反应,提示骨髓干细胞有分化成肾小球系膜细胞的潜能。同年 Ito^[13]等也发现将带有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)标记的骨髓干细胞植入抗 -Thy1 肾炎小鼠体内,在重建的小球中,11%~12% 的细胞来自植入的骨髓。在肾炎的进程中,骨髓来源的 CD45 阳性细胞仅一过性增多,而 CD45 阴性细胞持续增加并始终占骨髓来源细胞的一半以上,系膜细胞特异性标记显示骨髓来源的 Thy1 阳性细胞持续增加直到重构停止,最终达到肾小球细胞总数的 7%~8%。激光扫描显微镜显示骨髓来源的 Thy1 阳性细胞为肾小球毛细血管提供结构支持,提示他们是系膜细胞,Thy1 是间充质干细胞的表明标志物,这一结果提示间充质干细胞在体内可分化为系膜细胞。

Rookmaaker^[14]等将骨髓移植入受体鼠体内 5 周后,用抗 Thy1.1 抗体诱导受体鼠发生抗 -Thy1.1 肾炎,7 天后观察发现抗 -Thy1.1 肾炎鼠供体骨髓来源的细胞分化为肾小球内皮细胞,且该细胞数目较未诱导肾炎受体鼠显著增加了 4 倍多,并呈时间依赖性增加,28 天后供体骨髓来源的内皮细胞水平仍保持较高,且供体骨髓来源的肾小球系膜细胞数目增加了 7 倍多。Hayakawa^[15]将绿色荧光蛋白转基因小鼠骨髓移植入受体鼠内,5 周后尾静脉注射 Habu 蛇毒制备肾炎模型,经激光共聚焦显微镜检查及免疫组化分析发现,注射蛇毒后 1~3 天内,有大量 GFP 阳性细胞存在于肾小球内,7 天后肾小球内 GFP 阳性细胞减少,其中 2.24% 的 GFP 阳性细胞表达血管内皮特异性标志物-血栓调节素(TM),42 天后肾小球内 GFP 阳性细胞同时表达 TM 抗体的细胞为 $2.11 \pm 0.13\%$,且这种水平可以稳定 12 个月。2006 年 Hauger^[15]将 SPIO 标记的 MSCs 经尾静脉移植入抗 -Thy1 肾炎模型鼠体内,6d 后 MRI 扫描 T2 加权像肾脏皮质区可见低信号改变,免疫组化及荧光观察显示该变化是有 SPIO 所致,而将 SPIO 标记的 MSCs 移植入正常鼠体内,MRI 扫描未见异常信号改变,提示 SPIO 标记的 MSCs 可以在病变肾小球内定植。

最近一些研究认为 MSCs 在体内不仅可以分化为肾脏实质细胞,而且还可以通过分泌多种细胞因子促进肾小球损伤修复,改善肾功能。Kunter^[17]等将 MSCs 经左肾动脉移植入抗 -Thy1 肾炎模型鼠左肾内,第 4~10d 观察,20~50% 的肾小球内可见荧光标记的 MSCs,免疫双标 85~95% 的 MSCs 不表达内皮细胞、系膜细胞等特异性标志物,但模型鼠血肌酐、尿素氮水平明显下降,肾小球病理改变明显减轻,该学者认为 MSCs 主要是通过分泌多种细胞因子促进肾小球损伤的修复。另一些学者也有类似的发现,Uchimura 等将 MSCs 经左肾动脉移植入抗 -Thy1 肾炎模型鼠肾内,7d 后观察,左肾肾小球内可见 CM-Dil 标记的细胞,其中 $16.5 \pm 1.2\%$ 的细胞同时表达内皮细胞标志物 RECA-1,肾小球微血管密度值较右肾明显提高,认为 MSCs 进入体内通过分化为内皮细胞参与受损肾小球的重建,并且提出 MSCs 还可以分泌大量的 VEGF 增强内皮细胞活力,促进内

皮细胞生长。

2.2 急性肾小管坏死

急性肾小管坏死主要是缺血和 / 或肾毒性损害所引起的 , 尽快提供新生的肾小管细胞 , 恢复肾小管功能是治疗的关键。Kale^[18]等将纯化的骨髓细胞移植入缺血 / 再灌注损伤模型 , 发现该细胞可以分化为肾小管上皮细胞重建坏死的肾小管。Anjos-Afonso^[19]等将携带 eGFP 的慢病毒转染 MSCs 移植入轻微创伤的模型鼠体内 , PCR 及免疫组化观察显示该细胞可以分化为肌纤维母细胞 , 肺上皮细胞及肾小管上皮细胞等多种细胞。另外一些学者也有相似发现^[20-22] , 分别通过不同的诱导方式建立急性肾小管坏死模型 , 将 MSCs 经静脉注入动物模型体内后不同时相点观察 MSCs 定植、肾小管病理改变及肾功能恢复情况 , 发现 MSCs 移植后可以定植于肾小管 , 减少肾小管上皮细胞坏死数量 , 促进肾功能恢复。

Togel^[23]等持相反的观点 , 通过建立 I/R 模型 , 移植 MSCs 后进行连续观察 , 未发现 MSCs 分化为小管细胞表型 , 但移植鼠肾脏内明显观察到坏死组织减少 , 炎症细胞浸润减轻 , 该学者发现移植后的 24 小时 , 炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IFN γ 和 iNOS 显著减少 , 而抗炎因子 IL-10 和 bFGF、TGF- α 和 Bcl-2 表达上调。他们认为 MSCs 不是通过分化为靶细胞发挥效应 , 而是依赖复杂调控的旁分泌机制对肾脏的修复起重要作用。还有些学者认为 MSCs 的作用机制可能有时间效应 , 早期表现为旁分泌 , 在后期有可能分化为受损靶器官细胞^[24]。总之目前比较公认的是只有 MSCs 而非造血干细胞有此修复作用。

3 问题与展望

MSCs 由于取材方便、增殖旺盛 , 分化组织类型广泛 , 易于携带外源基因 , 自体移植避免了免疫排斥反应 , 不存在社会伦理、道德观念等方面的问题 , 在组织工程、细胞移植与基因治疗方面拥有广阔应用前景。前期实验结果也基本上肯定了 MSCs 在促进受损肾脏再生修复、保护肾功能方面有明确的效果。但目前仍存在诸多问题 : ① MSCs 的特征性标记物还不明确 , 到目前未发现 MSCs 特异性标志物 ② MSCs 修复受损肾脏的机制仍存在争议 , 究竟是 MSCs 直接分化为肾实质细胞 , 还是通过减轻炎症对肾脏的损害 , 抑或通过其它尚未发现的机制促进肾脏损伤的修复 ③ 如何促进 MSCs 在肾内的完全意义上的转化 ④ MSCs 移植的方法、细胞的数量和最佳时机等还不确定 ⑤ MSCs 移植后的效果、安全性等问题仍需基础和临床应用研究来进一步解决完善。相信随着这些难题的解决 , 人类可以通过有效手段介导 MSCs 在体内的生物学行为 , 使其达到特异性和预期性的治疗目的 , 从而为未来肾脏疾病的治疗提供一条新的有效的途径。

参考文献(References)

[1] Duffy GP, Ahsan T, O'Brien T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time- and dose-dependent manner in vitro. *Tissue Eng Part A* [J]. 2009, 15 (9):

2459-2470

- [2] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. *Exp Hematol*, 1976,4(5):267-274
- [3] Caplan AI. Mesenchymal stem cells [J]. *J Orthop Res*, 1991, 9 (5): 641-650
- [4] Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. *Exp Biol Med*, 2001,226(6):507-520
- [5] Colter DC, Class R, DiGirolano GM, et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97 (7): 3213-3218
- [6] Nafar M, Parvin M, Sadeghi P, et al. Effects of stem cells and granulocyte colony stimulating factor in reperfusion injury [J]. *Iran J Kidney Dis*, 2010, 4(3): 207-13
- [7] Singaravelu K, Padanilam BJ. In vitro differentiation of MSC into cells with a renal tubular epithelial-like phenotype [J]. *Ren Fail*, 2009, 31 (6): 492-502
- [8] Jiang HT, Qu LL, Li Y, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduce Intestinal Ischemia/Reperfusion Injuries in Rats[J]. *Journal of Surgical Research*, 2011,168(1.1): 127-134
- [9] Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2006,24 (3):707-716
- [10] Xiang Z, Hu W, Kong Q, et al. Preliminary study of mesenchymal stem cells-seeded type I collagen-glycosaminoglycan matrices for cartilage repair[J]. *Zhongguo Xuefu Chongjian Waikexue*, 2006,20(2): 148-154
- [11] Arnold S, Absenger Y, Klein H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007,245(3): 414-422
- [12] Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, et al. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001,12(7):1401-1409
- [13] Ito T, Suzuki A, Imai E, et al. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001,12(12):2625-2635
- [14] Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, et al. Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis[J]. *Am J Pathol*, 2003,163(2):553-562
- [15] Hayakawa M, Ishizaki M, Hayakawa J, et al. Role of bone marrow cells in the healing process of mouse experimental glomerulonephritis [J]. *Pediatr Res*, 2005,58(2): 323-328
- [16] Hauger O, Frost EE, van-Heeswijk R, et al. MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy[J]. *Radiology*, 2006,238(1):200-210
- [17] Kunter U, Rong S, Djuric Z, et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephri-

- tis[J]. J Am Soc Nephrol, 2006,17(8):2202-2212
- [18] Kale S, Karihaloo A, Clark PR, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule [J]. J Clin Invest, 2003,112(1):42-49
- [19] Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions[J]. J Cell Sci, 2004,117(Pt 23): 5655-5664
- [20] Morigi M, Introna M, Imberti B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice[J]. Stem Cells, 2008,26(8):2075-2082
- [21] Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, et al. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of cd44 following acute tubular injury[J]. Kidney Int, 2007, 72(4):430-441
- [22] Bi B, Schmitt R, Israilova M, et al. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect [J]. J Am Soc Nephrol, 2007,18(9):2486-2496
- [23] Togel F, Hu Z, Weiss K, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005,289(1): F31
- [24] Patschan D, Plotkin M, Goligorsky MS. Therapeutic use of stem and endothelial progenitor cells in acute renal injury [J]. Curr Opin Pharmacol, 2006, 6(2):176-183

(上接第 2000 页)

- [23] Grieve DJ, Byrne JA. Role of oxidative stress in cardiac remodelling after myocardial infarction[J]. Heart Lung Circulation, 2004, 13:13
- [24] Qin F, Simeone M, Patel R, et al. Inhibition of NADPH oxidase reduces myocardial oxidative stress and apoptosis and improves cardiac function in heart failure after myocardial infarction [J]. Free Radic Biol Med, 2007, 43(2):271-281
- [25] Das S, Engelman RM, Maulik N, et al. Angiotensin preconditioning of the heart: evidence for redox signaling [J]. CellBiochem Biophys, 2006, 44: 103-131
- [26] Saotome M, Katoh H, Yaguchi Y, Tanaka T, Satoh H, Hayashi H. Transient opening of mitochondrial permeability transition pore by reactive oxygen species protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296 (4): H1125-1132
- [27] Shen YT, Depre C, Yan L, et al. Repetitive ischemia by coronary stenosis induces a novel window of ischemic preconditioning [J]. Circulation, 2008, 118(15):1961-1969
- [28] Jiang JL, Zhang XH, Li NS, et al. Probuco decreases asymmetric dimethylarginine level by alternation of protein arginine methyltransferase I and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2006,20 (4): 2812-294
- [29] Yi GH, Zhong CM, Yan PY, et al. Effects of probucol on paraoxonase 1 expression and oxidative stress in hyperlipidemic mice [J]. Cell Biol Int, 2008, 32(1): 672-671
- [30] 赵水平,王星,洪绍彩,等.普罗布考对动脉粥样硬化兔血红素氧合酶 1 表达的影响 [J].中国动脉硬化杂志, 2008,16(6):4402-444
- Zhao Shuiping, Wang Xing, Hong Shaocai, et al. Effect of Probuco on Heme Oxygenase-1 in Rabbits with Atherosclerosis [J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2008,16(6)
- [31] Beck K, Wu BJ, Ni J, et al. Interplay Between Heme Oxygenase-1 and the Multifunctional Transcription Factor Yin Yang 1 in the Inhibition of Intimal Hyperplasia[J]. Circ Res, 2010 Oct 28[Epub ahead of print]
- [32] Tsai MH, Jiang MJ. Reactive oxygen species are involved in regulation of α 1-adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction[J]. J Biomed Sci, 2010 Aug 23, 17:67
- [33] Oyama J, Satoh S, Suematsu N, et al. Scavenging free radicals improves endothelial dysfunction in human coronary arteries in vivo[J]. Heart Vessels, 2010 Sep;25(5):379-85.Epub 2010 Jul 31
- [34] 蒋敏海,顾小林,卢国跃,等.依达拉奉对脑缺血再灌注大鼠海马一氧化氮的影响[J].中国实用神经疾病杂志,2008.11(5):4-5
- Jiang Minhai, Gu Xiaolin, Lu Guoyue, et al. Effects of Edaravone on NO concentration in rat hippocampus with transient cerebral ischemia and reperfusion [J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2008, 11(5):4-5
- [35] Fu JJ, Huang H, Liu J, et al. Tanshinone A protects cardiomyocytes against oxidative stress-triggered damage and apoptosis [J]. Euro J Pharmacol, 2007, 568(1-3): 213-221
- [36] 陈海明,叶攀,丹参酮 A 对血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J].中药材, 2008, 31(4): 569-572
- Chen Haiming, Ye Pan. Tanshinone A protects endothelial cells against oxidative stress-triggered damage [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2008,31(4):569-572
- [37] 苗平.银杏达莫治疗慢性缺血性心脏病疗效观察[J].中国实用医药, 2010,5 (3):123
- Miao Ping. Yinxingdamo treatment for patients with chronic ischemic cardiomyopathy[J]. China Practical Medical, 2010,5(3):123