

论著 · 实验研究

骨髓间充质干细胞移植对嘌呤霉素氨基核苷 肾病大鼠足细胞修复作用的研究

杨焕丹 董晨 关凤军 高莉莉 赵彤 丰炳峰

(徐州医学院附属医院儿科,江苏 徐州 221000)

[摘要] 目的 探讨骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)移植对嘌呤霉素氨基核苷(puromycin aminonucleoside,PAN)肾病大鼠足细胞修复作用及其对裂孔隔膜分子 Nephin 表达的影响,为 BMSCs 移植治疗肾病综合征提供实验依据。方法 45 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为 3 组,每组 15 只。模型组:一次性腹腔注射 PAN(0.15 mg/g)造模;BMSCs 组: PAN 造模 + BMSCs 移植(细胞移植前经 Brdu 标记示踪);对照组:不予以造模。实验第 10 天杀鼠,留取标本行血、尿、肾组织超微结构检测,免疫组化检测肾脏 Brdu 标记阳性细胞的表达,半定量 RT-PCR 及 Western blot 方法检测 Nephin 表达变化。结果 模型组大鼠出现大量蛋白尿、血白蛋白降低、胆固醇升高,伴有广泛足突的融合。与模型组比较,BMSCs 组尿蛋白、血胆固醇降低,血白蛋白回升及足突融合现象改善,差异有统计学意义($P<0.05$);免疫组化显示,BMSCs 组肾组织中可见阳性细胞,模型组及对照组未见阳性细胞;半定量 RT-PCR 及 Western blot 显示,模型组 Nephin 相对表达量较对照组明显下降,BMSCs 组与模型组比较有所增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 BMSCs 移植对 PAN 肾病大鼠足突融合有一定的改善,Nephin 表达的变化可能在其中发挥了作用。 [中国当代儿科杂志,2010,12(6):483-487]

[关键词] 骨髓间充质干细胞;移植;嘌呤霉素氨基核苷;肾病综合征;Nephin;大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)06-0483-05

Bone mesenchymal stem cell transplantation repairs glomerular podocytes in rats with puromycin aminonucleoside-induced nephrosis

YANG Huan-Dan, DONG Chen, GUAN Feng-Jun, GAO Li-Li, ZHAO Tong, FENG Bing-Feng. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221000, China (Dong C, Email:dc2260@163.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of bone mesenchymal stem cell (BMSC) transplantation on repair of glomerular podocytes and on the Nephin expression in rats with puromycin aminonucleoside (PAN)-induced nephrosis. **Methods** Forty-five Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups ($n = 15$ each): a nephrosis model group that received a single intraperitoneal injection of PAN (0.15 mg/g); a BMSC transplantation group that received a single intraperitoneal injection of PAN (0.15 mg/g) followed by BMSC transfusion; a control group that received a single intraperitoneal injection of normal saline. Ten days after injection, the rats were sacrificed. The 24 hrs urinary protein content and serum albumin and cholesterol levels were measured 24 hrs before sacrifice. Changes of glomerular podocytes were observed under an electron microscope. Brdu labeled positive cells in kidneys were measured by immunohistochemical technology. RT-PCR and Western blot were used to assess the expression of mRNA and protein of Nephin. **Results** In the nephrosis model group, urinary protein and blood cholesterol contents increased, plasma albumin content decreased compared with those in the control group. Extensive fusion of podocyte foot processes was observed in the nephrosis model group. The BMSC transplantation group had decreased urinary protein and blood cholesterol contents and increased plasma albumin content compared with the nephrosis model group. Fusion of podocyte foot processes was also improved. Brdu labeled positive cells were seen in kidneys in the BMSC transplantation group, but not in the nephrosis model and the control groups. Nephin mRNA and protein expression decreased significantly in the nephrosis model group compared with that in the control group. The BMSC transplantation group had increased Nephin mRNA and protein expression compared with the nephrosis model group. **Conclusions** BMSCs can repair glomerular podocytes in PAN-induced nephrosis rats, and the changes of Nephin expression may be involved in the process. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (6):483-487]

Key words: Bone mesenchymal stem cell; Transplantation; Puromycin aminonucleoside; Nephrosis; Nephin; Rats

[收稿日期]2009-12-02;[修回日期]2010-01-22
[基金项目]江苏省教育厅自然科学基金(08KJB320018)。
[作者简介]杨焕丹,女,硕士研究生。
[通信作者]董晨,主任医师。

微小病变型肾病(minimal change nephrotic syndrome, MCNS)是儿科肾病综合征中最常见的病理类型,大量蛋白尿是其最基本的临床特点。近年来发现蛋白尿的发生与肾小球滤过屏障受损密切相关^[1-3]。足细胞和足突间裂孔隔膜是肾小球滤过屏障的重要组成部分,有多个足细胞表达的分子先后被发现,Nephrin 是其中最为重要的一种。治疗方面目前仍以肾上腺皮质激素及细胞毒性药物为主,但部分患儿出现激素耐药或抵抗,从而导致复发或频发。研究表明,骨髓间充质干细胞(BMSCs)在一定条件下能向肾实质细胞转化^[4],并已有干细胞治疗急性肾功能衰竭和急性肾小管损伤的成功报告。但 BMSCs 对慢性肾脏疾病的治疗作用报道甚少。本研究采用嘌呤霉素氨基核苷(puromycin aminonucleoside, PAN)制作经典微小病变型肾病模型,将体外扩增异体 BMSCs 输入 PAN 造模大鼠体内,探讨 BMSCs 对大鼠肾病综合征治疗的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重 90 ~ 120 g,由徐州医学院实验动物中心提供,实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。L-DMEM、胎牛血清(Hyclone 公司),胰蛋白酶、BrdU、PAN (Sigma 公司),荧光标记小鼠抗大鼠单克隆抗体 CD90、CD45 (AbD 公司),TRNzol-A⁺ 总 RNA 提取试剂盒、一步法 RT-PCR 试剂盒(北京天根公司),PCR 引物(上海英潍捷基公司合成),Nephrin 兔多克隆抗体 IgG (Abcam 公司),GAPDH 鼠单克隆抗体 IgG (北京中杉金桥)及荧光标记二抗由实验室提供。

1.2 BMSCs 的体外培养、鉴定及标记

1.2.1 BMSCs 的体外培养及鉴定 健康雄性 SD 大鼠,引颈处死,无菌条件下取出双侧股骨,剪两侧骨端,L-DMEM 液反复冲洗骨髓腔获取骨髓细胞;收集冲洗液,1 000 r/min 离心 6 min,弃上清,加入含 12.5% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基重悬细胞;移入培养瓶中,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。几次换液后,待原代培养的细胞增殖近整个培养瓶的底面时,0.25% 胰酶消化 1:3 传代,体外扩增 3 代后,流式细胞仪检测 CD45、CD90 的表达,取第 3 代 BMSCs 备用。

1.2.2 BMSCs 的体外标记 第 3 代 BMSCs 至 80% 融合时,加入 BrdU 使其终浓度为 10 μmol/L。避光孵育 48 h,0.25% 胰酶室温下消化、离心、PBS

洗涤、收集细胞。

1.3 动物分组及 BMSCs 移植

4 周龄健康雄性 SD 大鼠 45 只,随机分为 3 组,每组 15 只。模型组:一次性腹腔注射 PAN (0.15 mg/g) 建立微小病变型肾病模型,并于造模即日腹部手术下经腹主动脉近肾动脉处输注生理盐水 0.5 mL。BMSCs 组:一次性腹腔注射 PAN (0.15 mg/g) 建立微小病变型肾病模型,并于造模即日腹部手术下经腹主动脉近肾动脉处输注 1 × 10⁶ 个/L BMSCs 细胞悬液 0.5 mL。对照组:不予造模,仅腹部手术下经腹主动脉近肾动脉处输注 0.5 mL 生理盐水。所有大鼠饲养于代谢笼中,给予标准饲料、自由饮水,每日观察大鼠活动、毛发、体重及存活情况。实验第 10 天处死大鼠留取肾标本。所有标本分成 4 份,一份用于电镜检查,一份用于免疫组化检测,剩余两份置入 -80℃ 冰箱用于 PCR、Western blot 检测。

1.4 24 h 尿蛋白测定及血清学检查

处死大鼠前留取 24 h 尿标本,采用磺基水杨酸-硫酸钠比浊法测定 24 h 尿蛋白。腹主动脉取血,全自动生化分析仪检测血白蛋白、总胆固醇的变化。

1.5 免疫组化法观察肾组织 BMSCs 分布

实验具体步骤按照一抗说明书进行。石蜡切片后,常规脱蜡水化,3% H₂O₂ 30 min 封闭内源性过氧化物酶,热修复抗原,加入 BrdU 抗体稀释液(稀释度 1:50)4℃ 过夜,PBS 冲洗,滴加生物素化二抗,孵育后,滴加 SABC 37℃ 20 min,PBS 冲洗,DAB 显色,脱水、透明、封片、显微镜下观察。

1.6 半定量 RT-PCR

采用 Trizol 试剂提取肾皮质总 RNA,具体方法参见说明书。Nephrin 上游引物 5'-AGCCTCTTGAC-CATCGCTAA,下游引物 5'-CCCAGTCAGCGTGAAG-GTAG。PCR 扩增条件为逆转录 50℃ 30 min、PCR 初始反应 94℃ 2 min、变性 94℃ 30 sec、退火 58℃ 45 sec、延伸 65℃ 1 min、27 个循环、最终延伸 65℃ 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。

1.7 Western blot 检测 Nephrin 蛋白变化

取 100 mg 肾组织置裂解液 1 mL 匀浆,Lorry 法测定蛋白质浓度,调成相同浓度,加入样品 buffer,沸水煮 5 min。取 40 μL 样品电泳、转膜,以 Washing-buffer 配置新鲜 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加一抗,

4℃湿盒中过夜,次日加 FITC 荧光标记的二抗室温避光孵育 1 h。Washing-buffer 连洗 3 次每次 5 min,滤纸吸干,扫描照相,测定其光密度。管家基因 GAPDH 作为蛋白上样量对照,目的蛋白与 GAPDH 相比得到相对量。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,所有资料均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并进行方差齐性检测。方差齐时组间比较采用 One-way ANOVA 检验,方差不齐时采用 Welch 法和 Brown-forsythe 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 的培养及鉴定

贴壁生长的第 3 代细胞形态比较一致,呈漩涡状或辐射状排列,为成纤维细胞样。流式细胞仪结果显示细胞均一性较好,间充质干细胞的表面标记 CD90 表达阳性,造血干细胞的表面标记 CD45 表达阴性。

2.2 动物的一般情况

实验过程中,模型组大鼠活动明显减少、毛发直

立、食欲下降、体重减低、出现腹水,并于实验第 1、5、8 天各死亡 1 只,考虑为手术创伤、PAN 副作用等有关。而 BMSCs 组无明显腹水,食欲及消瘦情况较模型组明显改善,无死亡。

2.3 24 h 尿蛋白及血生化指标的改变

与对照组相比,模型组大鼠出现大量蛋白尿、低白蛋白血症、高脂血症、腹水,以实验第 10 天最为明显。BMSCs 组表现为尿蛋白、血清胆固醇改善及血白蛋白回升。见表 1。

2.4 肾脏病理改变

电镜下,对照组肾组织足细胞足突清晰完整、无融合现象;模型组肾小球基底膜上皮细胞肿胀,足细胞足突广泛融合;BMSCs 组肾小球病变明显减轻,仅见部分足突融合,与模型组比较有明显改善。见图 1。

2.5 5-Brdu 免疫组化检测

细胞核呈红棕色、颗粒状分布的细胞为阳性细胞。BMSCs 组大鼠肾组织中,可见到 Brdu 阳性细胞的分布,数量不等。模型组及对照组大鼠的同部位肾组织均未见 Brdu 标记的阳性细胞。见图 2。

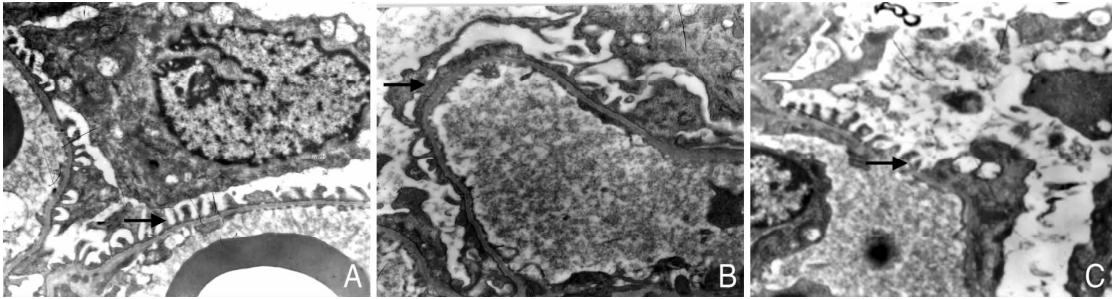


图 1 各组大鼠肾组织透射电镜结果(×10 K)。 A:对照组,足突结构清晰; B:模型组,足突广泛融合; C:BMSCs 组,足突部分融合,部分结果清晰。箭头所示足突结构。

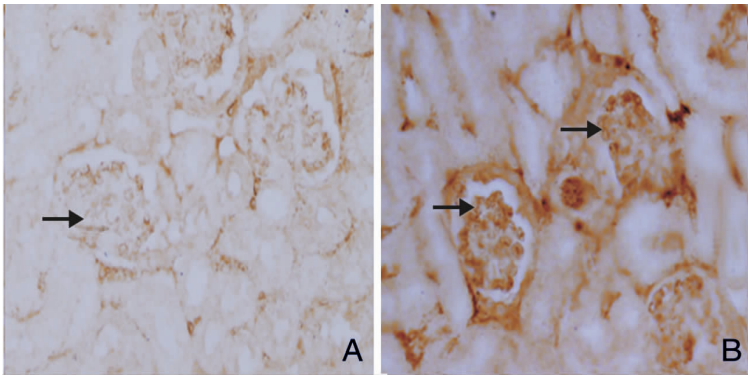


图 2 Brdu 标记肾组织的免疫组化检测(×400) A:对照组,箭头表示肾组织 Brdu 表达阴性。 B:BMSCs 组,箭头表示 Brdu 标记阳性细胞在肾组织的表达呈红棕色,颗粒状。

2.6 半定量 RT-PCR 分析

模型组大鼠肾组织 Neph rin mRNA 表达与对照组比较显著下降,差异有统计学意义, $P<0.05$; BMSCs 移植后 10 d,Neph rin mRNA 在大鼠肾脏中的表达 BMSCs 组较模型组明显增加,差异有统计学意义, $P<0.05$ 。见表 1。

2.7 Western blot 分析

模型组大鼠肾组织 Neph rin 蛋白表达明显下降,与对照组比较差异有统计学意义, $P<0.05$; BMSCs 组大鼠肾组织 Neph rin 蛋白的表达较模型组明显增多,差异有统计学意义, $P<0.05$ 。见表 1。

表 1 各组大鼠 24 h 尿蛋白及血清学指标 ($\bar{x}\pm s$)

	例数	24 尿蛋白总量(mg)	血清白蛋白(g/L)	血清总胆固醇(mmol/L)	Neph rin mRNA	Neph rin 蛋白
对照组	15	10.2±2.1	25.4±1.1	2.13±0.27	0.85±0.04	0.83±0.01
模型组	12	192.5±20.0 ^a	15.6±2.0 ^a	5.63±0.79 ^a	0.28±0.04 ^a	0.32±0.03 ^a
BMSCs 组	15	61.8±10.4 ^{a,b}	22.2±1.1 ^{a,b}	2.36±0.55 ^{a,b}	0.68±0.33 ^{a,b}	0.65±0.06 ^{a,b}
F 值		1187.1	93.1	91.2	248.7	197.4
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$

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^[5-6],是细胞移植最为理想的种子细胞。目前从骨髓中分离 BMSCs 的方法主要有全骨髓贴壁筛选法、密度梯度离心法、流式细胞仪分离法、免疫磁珠分选法。密度梯度法分离的细胞虽然纯度较高,但常影响细胞的增殖活力且操作较繁琐。后两种方法分选后的细胞亦出现增殖缓慢等问题,加之成本较高和技术难度大,在某种程度上也限制了这些方法的应用。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,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。对纯化的第 3 代细胞行流式细胞仪及干细胞表面标记 CD45、CD90 鉴定,结果显示本实验分离培养的细胞符合间充质干细胞的特性。

PAN 肾病大鼠模型是经典的微小病变型肾病模型,其损伤机制主要包括氧化损伤机制、炎细胞浸润机制及足细胞损伤机制。肾小球足细胞损伤后,足突融合、足突之间裂孔隔膜 neph rin、podocin 等表达降低,从而出现蛋白尿^[7-9]。本实验一次性给予大鼠一定剂量的 PAN 后,模型组大鼠出现大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症、腹水,并伴有活动减少、毛发直立、体重减低,这与经典的肾病模型相符合,提示造模成功。

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、IgA 肾病、急性肾炎、IgA 肾病等的报道^[10-11]。目前利用干细

胞移植干预动物模型的时机主要有:造模与干预同时进行或造模成功后再给予干预。而干细胞移植的方法主要有:局部注入或经周围静脉注入 2 种方法。局部注入的方法应用较多,但其一次移植细胞数量有限,而经周围静脉注入也存在移行到靶组织复制、移行到位细胞数量少等问题。在本研究的前期实验中,曾于造模成功后(即出现肾病综合征的典型表现)再通过腹主动脉近肾动脉处输注 BMSCs,使细胞顺动脉血流进入肾小球,确保更多的细胞进入肾脏组织以充分发挥其作用。但因模型组大鼠在手术过程中及手术后死亡率较高,且 PAN 试剂价格昂贵,从而限制了本方法的使用。因此,本实验选择在造模的同时 BMSCs 组大鼠即给予干细胞干预。结果表明 BMSCs 组大鼠的一般情况明显改善:腹水减轻、尿蛋白降低,同时血清白蛋白迅速回升、血脂明显降低。电镜下 BMSCs 组足突结构有所恢复呈部分融合现象。

本研究免疫组化结果显示,Brd u 阳性的细胞在 BMSCs 移植的肾组织中广泛分布,表明 BMSCs 移植后能够分布到受损部位,改善足突融合及裂孔间隙,加速足突和裂孔间隙的恢复,起到一定的修复作用。但由于免疫组化有受检测者主观影响大、不能定量等缺点,在随后的研究中将进一步行标记细胞的免疫荧光检测,以使研究进一步得到完善。

已知裂孔隔膜是肾小球滤过膜的重要屏障,对维持正常的肾小球滤过功能具有重大意义^[12]。在人类先天性和后天性肾病综合征中均发现 Neph rin 表达和分布的异常^[13],在 Heymann 肾炎和 PAN 肾病动物模型中亦发现 Neph rin 表达显著下降^[14-15]。本研究用半定量 RT-PCR 及 Western blot 方法观察

BMSCs 组 Neph rin mRNA 及其蛋白的表达,显示较模型组明显增加,表明 BMSCs 移植可增加 Neph rin 表达,这可能是其发挥治疗作用的重要机制之一。

虽然 BMSCs 移植治疗肾脏疾病的研究尚处于初步阶段,有许多问题需要解决,如移植时间、移植细胞的数量、移植后细胞的作用机制等,但是BMSCs 移植治疗肾病综合征作为一种与其他传统方法不同的治疗方法,将为临床上肾病综合征的治疗提供一种新的方法。

[参 考 文 献]

[1] Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint[J]. *Kidney Int*, 2008, 74(1): 22-36.

[2] Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P, et al. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(5): 485-491.

[3] Mustafa G, Khan PA, Iqbal I, Hussain Z, Iqbal MM. Simplified quantification of urinary protein excretion in children with nephrotic syndrome[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2007, 17(10): 615-618.

[4] Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C, 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): 31-42.

[5] 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.

[6] 刘颖斌,钱浩然,洪德飞,王建伟,李江涛,王许安,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.

[7] Guan N, Ding J, Deng JH, Zhang J, Yang JJ, Yang JY, et al. Key molecular events in puromycin aminonucleoside nephrosis rats [J]. *Pathol Int*, 2004, 54(9): 703-711.

[8] Hosoyamada M, Yan K, Nishibori Y, Takiue Y, Kudu A, Kawakami H, et al. Neph rin and podocin expression around the onset of puromycin aminonucleoside nephrosis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 97(2): 234-241.

[9] Matsui I, Ito T, Kurihara H, Imai E, Ogihara T, Hori M, et al. Snail, a transcriptional regulator, represses neph rin expression in glomerular epithelial cells of nephrotic rats[J]. *Lab Invest*, 2007, 87(3): 273-283.

[10] Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(6): 795-804.

[11] Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(7): 1743-1755.

[12] Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(1): 253-307.

[13] Luimula P, Ahola H, Wang SX, Solin ML, Aaltonen P, Tikkanen I, et al. Neph rin in experimental glomerular disease[J]. *Kidney Int*, 2000, 58(4): 1461-1468.

[14] Hauser PV, Collino F, Bussolati B, Camussi G. Neph rin and endothelial injury [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009, 18(1): 3-8.

[15] Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Kawachi H, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M, et al. Activated macrophages down-regulate podocyte neph rin and podocin expression via stress-activated protein kinases[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(4): 706-711.

(本文编辑:黄 榕)