

· 综述 ·

干细胞移植在肾脏疾病中的应用

黄丹琳 综述 易著文 审校

(中南大学湘雅二医院儿科肾脏病专科/湖南省小儿肾脏病临床中心,湖南 长沙 410011)

〔摘 要〕 该文总结干细胞移植在肾脏损伤修复中的治疗证据,着重讨论干细胞种类的选择、移植方法的选择、干细胞抵达肾脏的可能机制和它起效的可能机制。脐带间充质干细胞的应用具有广阔的前景,但细胞移植的途径和最佳剂量仍有待进一步研究。干细胞抵达肾脏的机制可能和靶部位表达和释放趋化干细胞的因子有关,而干细胞的旁分泌和内分泌功能可能是它发挥作用的主要的机制。关于干细胞移植治疗肾脏疾病还有许多问题有待解决,但是干细胞移植仍是急慢性肾脏疾病的治疗中一个充满前景和希望的治疗策略。

[中国当代儿科杂志,2012,14(2):154-160]

〔关 键 词〕 干细胞移植;肾脏疾病
〔中图分类号〕 R725 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1008-8830(2012)02-0154-08

Application of stem cell transplantation in kidney diseases

HUANG Dan-Lin, YI Zhu-Wen. Division of Pediatric Nephrology, Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China (Yi Z-W, Email: yizhuwen@yahoo.com.cn)

Abstract: This paper summarizes the current literature on the potential therapeutic role of stem cell transplantation for kidney injury and repair and focuses on the choice of types of stem cells, the method of transplantation, and the mechanisms of stem cell homing to injured renal tissues and its protective effects. The application of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) shows wide prospects, but the approach and optimal dose of cell transplantation are under intensive investigation. Signals that regulate stem cell homing to injured renal tissues may be related to chemokines or factors released in the target site. Several studies have pointed out that paracrine and endocrine of stem cells are the most likely mechanism of action in the injured nephron. Many questions remain unanswered but stem cell-based therapy is a promising new strategy for acute and chronic kidney diseases. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14 (2):154-160]

Key words: Stem cell transplantation; Kidney disease

临床上多种肾脏疾病不论其原发病如何,若慢性进展则最终会发展为终末期肾病(end-stage renal disease,ESRD)。ESRD病人只能实施血液透析、腹膜透析和肾移植等替代疗法,虽然肾脏替代治疗近几年有进一步的发展,但透析的并发症多、生存质量不高;肾移植又由于供体短缺、免疫抑制、外科手术并发症等造成欠佳的移植效果,故研究人员希望找到更好的办法来治疗或预防慢性肾脏病(chronic kidney disease)的发生。

近年来干细胞移植(stem cell transplantation)在肝病、心脏疾病、血液疾病、自身免疫性疾病等各个研究领域逐步发展和广泛应用,同样也为肾脏疾病治疗学的研究带来了新的契机。随着对肾脏固有细胞重塑过程的认识和再生医学的发展,干细胞移植治疗肾脏疾病的动物实验报道也日渐增多。有关干细胞移植和肾脏疾病的综述较多,但是有关细胞移植治疗肾脏疾病的移植方法、剂量、到达肾脏的可能机制,目前尚无比较系统的综述。本文总结了部分干细胞移植在肾脏损伤修复中的治疗证据,着重讨论干细胞种类的选择、移植方法的选择、干细胞抵达肾脏的可能机制和起效的可能机制,进一步探讨干细胞移植在肾脏疾病的治疗中的可能前景,为干细胞治疗肾脏疾病的动物实验设计和临床研究提供一定的背景资料。

〔收稿日期〕2011-07-27;〔修回日期〕2011-10-16
〔作者简介〕黄丹琳,女,博士。

1 干细胞种类的选择

干细胞(stem cells)是一类具有自我更新和全能分化潜力的细胞,目前,有4种干细胞可以用于肾脏疾病的治疗,包括胚胎干细胞(embryonic stem cells)、成体肾干细胞、胚胎肾干细胞和非肾脏来源的成体干细胞。在肾脏中至少有26种终末分化细胞型,它们在形态学上可辨认,有明确的定位与功能,因此,要想使受损肾脏再生,首先要找到拥有分化为多种肾脏细胞类型潜能的细胞。

胚胎干细胞是由囊胚期内细胞团或原始生殖细胞经体外分化抑制培养,在体外筛选出的细胞,具有全能性,有证据显示胚胎干细胞可分化为肾脏实质细胞,但Thomson等^[1]发现若将胚胎干细胞直接引入肾实质,不能形成肾组织而更易成为畸胎瘤,故胚胎干细胞的非限制性生长和潜在的致癌性限制了它在临床上的应用,而且对胚胎干细胞的研究在道德伦理和法律上仍存在争议。因此,胚胎干细胞移植用于肾脏病的治疗尚有很多问题需要解决。

许多研究提示,肾脏损伤时的修复主要是来源于内源性的肾脏干细胞的增殖^[2-3]。目前认为,来自肾脏鲍曼氏囊尿极端的一群壁层上皮细胞,可能是成体肾干细胞,称之为成人壁层上皮多能祖细胞(adult parietal epithelial multipotent progenitors, APEMPs),它拥有多能分化潜力及自我更新能力,能置换受损的小球及管状上皮细胞并使它们再生^[4]。Mazzeinghi等^[5]研究发现给由丙三醇所致的急性肾衰竭小鼠注射APEMPs,小鼠血尿素氮(BUN)水平降低,且在远端和近端肾小管都可以见到与APEMPs相关的肾小管细胞的再生。APEMPs能够从自体得到,拥有很强的自我更新潜能,且无需免疫抑制疗法,也没有致肿瘤性和分化异常的风险,因此可用于治疗肾脏疾病。

哺乳类动物肾脏的发育是由中胚层的输尿管芽细胞和后肾间充质2种细胞群之间交互作用的结果。体外研究显示后肾间充质细胞(metanephric mesenchyme cells, MMCs)在适当的诱导条件下,可以分化为肾单位^[6]。近几年,有研究者采用不同的方法运用后肾间充质在原位长出新的肾脏,在光镜或电镜下,由它形成的成熟肾单位和集合管与正常肾脏无区别^[7],以上均提示胚胎后肾间充质含有胚胎肾干细胞。近年国内有学者将MMCs移植至庆大霉素所致急性肾衰竭大鼠体内,发现MMCs可归巢到损伤的肾小管,促进肾功能恢复及减轻肾小管病理损

害^[8]。焦玉清等^[9]将MMCs移植到阿霉素肾病大鼠体内,发现MMCs移植对改善阿霉素肾病大鼠肾组织纤维化有促进作用。MMCs具有发育的多潜能性及自我更新的能力,却似乎没有致瘤的风险,因此理论上MMCs是最理想的移植细胞来源,但伦理问题制约着MMCs的研究。与肾脏修复相关的非肾脏来源的成体干细胞主要为骨髓干细胞、非骨髓源间充质干细胞和诱导多能干细胞。骨髓内存在有多种类型干细胞,其中主要有造血干细胞(hematopoietic stem cells)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。有学者认为骨髓造血干细胞移植后在体内分化成的巨噬细胞可能和后期的肾脏间质纤维化有关,所以部分学者转向研究骨髓MSCs^[10]。骨髓MSCs对肾脏的保护作用最早由Morigi等^[11]在2004年报道,他们从大鼠的骨髓分离MSCs并且移植到顺铂所致的急性化学性肾损伤的小鼠体内,在移植后的第4天和第11天的时候,观察到肾脏结构的改善和肾小管细胞增生的明显增加。国内也有学者报道骨髓MSCs移植对嘌呤霉素氨基核苷肾病大鼠足突融合有一定的改善作用^[12]。Imberti等^[13]提出肾小管细胞的增生与MSCs释放的因子(如胰岛素样生长因子)的刺激有关,进一步的研究也提示输注MSCs后肾功能的改善可能与旁分泌和内分泌机制有关^[14]。虽然骨髓是MSCs的主要来源,但是由于取材不方便,有造成病毒感染的可能,且随着年龄的增长,MSCs数量和多向分化能力也随之下降,限制了它的应用,需要寻找一种新的MSCs来源。随着MSCs研究的不断深入,已可从脐带、脐血、脂肪^[15]、骨骼肌和肝脏^[16]等多种组织中分离培养MSCs。2000年,Erices等^[17]首次报道了脐血中可以分离得到MSCs,随后研究者又分别从脐静脉内皮和内皮下、脐带Wharton's胶质和血管周围组织中分离培养出了MSCs,并建立了脐带MSCs的分离培养方法^[18]。颜小华等^[19]从尾静脉移植人脐血MSCs至缺氧缺血性脑损伤新生鼠模型中,未见植入反应和其他任何副作用;Lu等^[18]将脐带源MSCs静脉输入移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)小鼠模型,发现它可显著减轻小鼠急性GVHD的严重程度。以上说明来源于脐血或脐带的MSCs不仅很少引起免疫排斥反应,还具有免疫调节作用。目前体外实验证实脐血或脐带MSCs在体外具有多向分化能力,能成脂成骨分化,在冷冻复苏后此性能不变^[20-21]。动物实验也提示脐血或脐带MSCs移植后能够在体内存活、迁移^[22],对急性肾损伤^[23-24]、狼疮性肾炎^[25]等疾病有一定的治疗作用。除了MSCs,

人们又发现普通的成体体细胞经过特殊处理也能返祖具有干细胞的特性,2006 年日本 Takahashi 等^[26]在《细胞》上率先报道了诱导多能干细胞的研究。他们把 Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 这 4 种转录因子通过逆转录病毒导入成年小鼠尾部皮肤成纤维细胞,使其新重编程而得到一种类似胚胎干细胞的细胞类型。随后世界各地不同科学家陆续发现其他方法同样也可以制造这种细胞,诱导多能干细胞的来源已从小鼠成纤维细胞和皮肤细胞,扩展到了小鼠肝细胞和胃上皮细胞、人皮肤成纤维细胞、胰腺 β 细胞和外周血细胞等^[22-25]。在应用方面,多能干细胞已成功诱导成为多种细胞:如心肌细胞、神经细胞、造血细胞、内皮细胞和视网膜细胞等^[27-34]。诱导多能干细胞是通过诱导成体体细胞而得,因此避免了伦理、免疫等问题,但是目前用诱导多能干细胞治疗人类疾病仍然需要克服许多关键障碍,大约有 20% 的诱导多能干细胞衍生的细胞可以发生肿瘤,故在诱导多能干细胞被考虑用于人类疗法之前,研究人员需要发展出安全的方法来解决这些以及其他可能的问题^[35]。

评估各种来源干细胞潜在的临床效果,本文作者发现,胚胎干细胞虽然有最佳分化潜能,但其应用却受到伦理道德的制约,且生成畸胎瘤的风险也很大。与之相比,胎儿肾中的干细胞虽然有很强的再生能力,也不存在致癌的潜在风险,但它们只能由供体提供,也存在伦理问题。而成人肾干细胞通过肾活检就能从自体中得到,可通过扩增得到用于治疗的量,且无需免疫抑制疗法,也没有致肿瘤性和分化异常的风险,有助于肾脏疾病治疗的前景。另外,MSCs 被认为是最适合进行细胞治疗的一种原始细胞,因为它们不像胚胎干细胞一样有伦理的限制或是可以转化为肿瘤细胞。其中骨髓 MSCs 易获取,其疗效在急性肾衰和慢性肾衰的肾脏病模型中均得到证实,且免疫原性较低,无需培养扩增就能得到治疗所需的数量,可用于同种异体细胞治疗,但有学者发现骨髓 MSCs 可错误分化为脂肪细胞,从而抵消早前的保护作用^[36]。而脐带 MSCs 来源广泛,便于取材,对供者无不利影响,不影响脐带造血干细胞的保存,无道德伦理问题的限制。因此,作为一种新型种子细胞,脐带 MSCs 的应用也具有广阔的前景。

2 移植方法的选择

外源的干细胞,能迁移、定居于受损的肾组织并进一步发挥作用^[37],但是目前对于干细胞移植的途

径、剂量以及时机还存在争议。

外源性干细胞治疗肾脏疾病首先面临的是移植途径的选择,从何种途径移植干细胞,使之能够更好地迁移定位到肾脏,是众多学者努力探讨的问题。肾脏作为血供丰富的腹膜后器官,干细胞移植途径主要有局部注射和血管内注射,局部注射主要包括肾内注射和肾包膜下注射,从理论上说可以达到更好的治疗浓度,但是可能在局部引起更强的炎症反应;血管内注射包括外周静脉注射和动脉注射,外周静脉注射操作相对简便,但是经过肝、肺、脾等器官,真正归巢到肾脏的干细胞数目可能有限。近年来,有学者尝试肾内注射干细胞治疗肾脏疾病,Quimby 等^[38]将自体的骨髓或脂肪来源的 MSCs 在 B 超引导下直接注射到慢性肾脏病猫的肾脏内,观察到有两只猫在细胞移植后 60 d 血清肌酐水平有明显下降,但是有两只慢性肾脏病Ⅳ期的猫分别在细胞移植后 42 d 和 100 d 死亡,肾脏病理均显示有广泛的间质纤维化和大量的淋巴细胞、浆细胞浸润,所以肾内注射细胞治疗慢性肾脏病的疗效还有待进一步的研究。Rogers 等^[39]将孕 15 d SD 大鼠的胚胎后肾移植到成年的杂交 SD 大鼠肾包膜下,发现后肾能够继续发育生长。陈丹等^[40]将胚胎后肾 MSCs 于肾包膜下移植到庆大霉素诱导的急性肾小管坏死模型的 SD 大鼠体内,发现细胞可迁移至损伤的肾小管上皮,说明胚胎后肾 MSCs 移植后能够在肾包膜下的微环境中存活,并逐渐向损伤的肾组织迁移。肾包膜下注射可作为一种比较精确的定位于肾脏的治疗方法,为肾脏病的干细胞治疗提供了一条切实可行的新途径。除了器官局部注射途径,血管内注射细胞移植是更常用的方法。Asanuma 等^[41]将荧光标记的人骨髓 MSCs 经肾动脉注射至梗阻性肾纤维化模型大鼠,结果发现直到第 4 周在肾间质都可以检测到荧光标记的外源 MSCs;国内也有学者探讨了骨髓 MSCs 移植对裸鼠急性肾小管坏死的修复作用,采用经肾动脉注射途径移植增强型绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的 MSCs,荧光显微镜观察到 MSCs 细胞移植后第 14 天的受体鼠肾小管中 GFP 阳性细胞明显增多,说明肾动脉注射途径移植的 MSCs 能定位于肾小管^[42]。除了动物实验,徐璐等^[43]对 3 例慢性肾功能不全、尿毒症期患者行亲属活体供肾移植,经移植肾动脉以输血器加压快速输注骨髓 MSCs,结果 3 例患者骨髓 MSCs 输注过程顺利,移植过程中、移植后未发生栓塞、感染、移植物抗宿主病等并发症,移植肾功能恢复顺利,结果说明经移植肾动脉输注骨髓 MSCs 具

有临床可操作性。除了肾动脉途径,陆续有学者研究其他动脉途径移植干细胞的可能性。董晨等^[44]观察了经腹主动脉近肾动脉处移植骨髓 MSCs 对阿霉素肾病大鼠足细胞的修复作用;Cao 等^[23]将人脐带 MSCs 经左颈动脉注射移植到急性肾损伤大鼠体内,发现移植的 MSCs 主要定位在肾损伤部位;凌斌等^[45]经股动脉移植骨髓 MSCs 到多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome)模型兔体内,激光共聚焦显微镜观察移植后 MSCs 在多器官功能不全综合征动物模型宿主内的存活情况。以上研究说明,不论是从肾动脉,还是腹主动脉、股动脉或是颈动脉,移植的细胞都可以定位到肾脏,但是陆续有学者研究发现动脉移植干细胞可能导致肾脏局部的副作用。Yoo 等^[46]将超顺磁性氧化铁标记的异体 MSCs 通过肾动脉导管插入术移植到两只健康的狗体内,细胞移植后1周内,实验动物的血清肝酶都有明显的升高,肾组织病理学发现肾实质内有含有超顺磁性氧化铁的干细胞,细胞移植后35 d 肾脏包膜下的肾皮质出现肾小球萎缩、肾小管坏死和间质纤维化等改变,提示 MSCs 通过肾动脉注入可能会导致局部炎症反应。Cao 等^[23]也发现经颈动脉注射移植的 MSCs 可以导致肾脏局部的充血和炎症。但是 Kunter 等^[47]从左肾动脉注射骨髓 MSCs 到系膜增生性肾小球肾炎模型大鼠体内,却没有发现临床的或组织病理学的栓塞改变。以上提示动脉注射干细胞到器官局部,是否出现局部的栓塞或炎症反应,可能与细胞输注的剂量、速度及动物模型的选择等多方面有关。既然动脉注射相对麻烦,又有可能导致局部的副作用,那简单易行的静脉注射途径是否同样有效呢? Kunter 等^[47]从左肾动脉和尾静脉分别注射 PKH26 标记的骨髓 MSCs 到抗 THY1.1 系膜增生性肾小球肾炎模型大鼠体内,在移植后的6 d 内,免疫荧光显微镜下两种干细胞输注途径的实验动物肾脏内均可发现荧光阳性的细胞。李芳^[48]等以外周静脉注射及右股动脉介入经肾动脉直接注射4',6-二脒-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)标记的人脐带 MSCs 到急性肾小管坏死家犬体内。移植后24 h,荧光显微镜下观察人脐带 MSCs 植入实验动物体内后的存活情况,结果发现两种方法移植的人脐带 MSCs 均在病损肾脏中成活,且两组荧光强度差异无显著性意义,说明两种途径移植人脐带 MSCs 均可在肾脏内定植,相对于动脉注射途径,经静脉注射移植途径创伤较小。Herrera 等^[49]将 GFP 阳性的骨髓 MSCs 静脉移植到丙三醇肌注所致的急性肾衰竭模型小鼠和

正常小鼠体内,发现干细胞能归巢到模型小鼠的肾脏,而在正常小鼠肾脏没有 GFP 阳性细胞。GFP 阳性的细胞主要定位在肾小管上皮层。周阳等^[50]将 PKH67 标记的外源性骨髓 MSCs 分别经尾静脉和上腔静脉移植到正常 Wistar 大鼠体内,发现体外培养的 MSCs 在移植后的第5天定位于肾脏(主要是肾小管),且与输注方式无关。以上研究均提示,肾脏疾病的外源性干细胞治疗,静脉输注可能是一简便有效的途径,移植的干细胞可以随着血循环迁移定位到受损的肾组织。

干细胞移植的细胞数量、体积及移植时机迄今为止没有一个明确的标准,因为动物模型、移植途径等不同,干细胞移植的剂量在国内外文献的报道中各不相同^[51]。同为大鼠模型,Togel 等^[52]将 1.5×10^6 骨髓 MSCs 通过动脉输注到缺血/再灌注模型大鼠体内;Kunter 等^[36]选用 2×10^6 骨髓 MSCs 通过动脉输注到系膜增生性肾小球肾炎模型大鼠体内;Choi 等^[53]则通过静脉输注 1×10^6 骨髓 MSCs 到5/6肾切除模型大鼠体内。部分学者使用小鼠作为动物模型,Bi 等^[14]通过尾静脉输注 $1 \sim 2 \times 10^5$ 骨髓 MSCs 到顺铂所致急性肾小管坏死模型小鼠体内;同样的模型,Morigi 等^[37]静脉输注了 5×10^5 人骨髓 MSCs;Ezquer 等^[54]同样选择静脉输注 5×10^5 骨髓 MSCs 到1型糖尿病模型小鼠体内。相对于大型动物,研究者选用了更大数量级的干细胞移植,Devine 等^[55]将 $1.8 \sim 2.5 \times 10^7$ 的人骨髓 MSCs 静脉移植到狒狒体内,Behr 等^[56]则通过动脉输注 5×10^7 骨髓 MSCs 到缺血/再灌注模型绵羊体内。有文献报道 MSCs 输注患者所需细胞数为 $1.0 \sim 2.0 \times 10^6/\text{kg}$ ^[57],按照《医学动物实验实用手册》,根据不同物种每千克体重占体表面积的不同,耐受性不同及人与大鼠每公斤体重药物剂量折算方法来计算,大鼠应输注细胞 $5 \times 10^6/\text{只}$ (200 g/只)。张学锋等^[58]以 $5 \times 10^6/\text{只}$ 的脐带 MSCs 静脉注射正常大鼠体内,观察大量脐带 MSCs 输注的安全性,实验结果发现一次性静脉移植 5×10^6 人脐带 MSCs,不会引起大鼠摄食量、体重、血液学、肝肾功能、脏器系数等变化,大鼠组织脏器也未出现病理学改变。综上所述, 10^6 数量级的 MSCs 移植到大鼠体内,应该是个安全有效的剂量范围。相对于小鼠模型,细胞移植的数量稍小于大鼠模型, 10^5 应该是合理的剂量范围,而相对于大型动物模型,应该把细胞数量增加到 10^7 。同时,本文作者也注意到进入血循环的 MSCs 在归巢到靶器官之前会不同程度地被其他器官如肺、骨髓、脾脏和皮肤等截留,这点在静脉输注 MSCs 时尤为明显。

Bentzon 等^[59]将带有荧光标记的人骨髓 MSCs 经尾静脉注射到免疫耗竭小鼠体内观察其在全身各组织器官的分布、定植和存活情况,结果表明输注的细胞在首过即被微血管系统有效“扣留”后,只有很少的细胞在移植 4 周后仍然存在于肺、心和肾脏。Kunter 等^[47]从左肾动脉注射 PKH26 标记的骨髓 MSCs 到抗 THY1.1 系膜增生性肾小球肾炎模型大鼠体内,在移植后的第 4、6、10 天,动脉细胞移植组肾小球阳性荧光的面积没有明显变化,但荧光强度随时间有一定的下降。以上实验说明,移植细胞在靶器官的量可能随着时间有下降,故有学者考虑反复多次移植干细胞,以达到持续治疗的目的。Zhang 等^[60]使用 1×10^7 骨髓 MSCs 静脉移植治疗肾移植的大鼠,采用每周 1 次,共 4 次的细胞移植频率。而 Semedo 等^[61]采用每两周一次,每次 2×10^5 (共 3 次)骨髓 MSCs 静脉移植治疗 5/6 肾切除模型大鼠。

总之,因为研究者采用的动物模型、移植途径、观察项目等不同,目前有关细胞移植的最佳剂量和次数没有公认的数据,故模型和检测方法的标准化在进一步的研究中显得尤其重要。

3 干细胞抵达治疗靶位的机制

动物实验表明,肾脏损伤时,会出现成体肾干细胞的迁移或进入循环的 MSCs 的肾脏归巢,但是有关细胞迁移或归巢的机制不明,有待进一步阐明。损伤部位常常伴有血管损伤或炎症反应造成的血管通透性增加,这是有利于干细胞漏出以进入损伤部位的,但目前认为更为重要的是靶部位可以表达和释放趋化干细胞的因子,故干细胞选择性的体内分布是有着其分子机制的。

细胞迁移指的是细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的浓度梯度后而产生的移动。趋化因子作为一种信号分子通过与细胞膜表面上的受体结合,启动细胞内信号,激活或抑制肌动蛋白结合蛋白的活性,最终改变细胞骨架的状态,引起细胞的移动。基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 就是一种重要的趋化因子,属于 CXC 趋化因子家族,广泛地表达于各种细胞和组织中,其对细胞的趋化作用由其受体 CXCR4 来调节。Mazzeinghi 等^[5]等认为肾组织的缺血性损伤可正向调节趋化因子 SDF-1,随后便有表达 CXCR4 的干细胞活化。在所知趋化因子受体中,人 APEMPs 显示了对 SDF-1 受体 CXCR4 及 CXCR7 的高表达性。向小鼠受损肾组织静脉注射 APEMPs 能降低急性肾功能衰竭程度及阻止肾纤维化,但当

阻断 CXCR4 时,则无此疗效,而且只有 CXCR4 和 CXCR7 均存在活性时 APEMPs 才能向内皮迁移。以上证明至少是一些 SC 亚群的迁移离不开 SDF-1 及其受体途径。

进入循环的 MSCs 在体内分布部位广泛,包括骨髓、心肌、肺、脑、皮肤、肝脏、肾等重要脏器,但是它的分布又有向损伤部位靶向分布的特点,这与器官组织结构和 MSCs 本身特点有关。透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是细胞外基质的主要成分之一,它可以直接与某些细胞表面受体相互作用,转导细胞内信号,调节细胞的运动,CD44 是一种分布广泛的跨膜糖蛋白,作为细胞表面的 HA 受体,它不仅可以介导细胞与基质间的黏附,而且 CD44 与 HA 结合后可以促使多种细胞伸出伪足,细胞运动能力增强。Herrera 等^[62]分析了静脉移植到丙三醇所致急性肾衰竭模型小鼠的 MSCs 归巢到肾脏与 CD44 和它的受体 HA 之间的关系。他们发现在体外,HA 对干细胞有趋化作用,且作用呈剂量依赖性,这种作用可以被抗 CD44 的单克隆抗体阻断;在体内,干细胞通过外周静脉注射到急性肾衰竭模型小鼠体内可以迁移到受损的肾组织,同时伴有肾内 HA 的增加以及肾脏功能和形态学上的恢复。但是如果 MSCs 之前被抗 CD44 抗体或是可溶性 HA 等处理,移植到体内就失去了肾脏归巢的能力。来源于 CD44 基因敲除小鼠的 MSCs 不能定位到受损的肾组织,但如果将能表达 CD44 的基因片段导入这种细胞,新构建的细胞又恢复迁移归巢到受损肾组织的能力。所以 Herrera 等^[62]认为 CD44 和 HA 的相互作用促进了外源性的 MSCs 归巢到受损肾组织。

总之,受损肾组织对干细胞的“召唤”作用及其机制还有待进一步的研究。

4 MSCs 移植治疗肾脏疾病的可能机制

实验室研究提示在急性或慢性肾损伤时 MSCs 移植在肾组织结构和肾功能的恢复方面起到重要作用,但关于在肾损伤时移植的 MSCs 是如何发挥它的保护作用的,还有许多问题没有解答。目前认为 MSCs 促进损伤肾脏的修复可能的机制为:①迁移到肾组织并且分化为肾脏固有细胞;②与宿主的固有细胞融合成新的细胞,且具有成熟细胞的表型;③释放旁分泌和内分泌因子;④刺激局部固有细胞的再生,促进内源性的修复。以上机制间的相互作用及它们在肾损害修复中的重要性还有待进一步的研究。

越来越多的学者认为,相比干细胞在损伤的肾

单位直接转化增殖为固有细胞,干细胞的旁分泌和内分泌功能是它发挥作用的更重要的机制。Bi等^[14]将雄性小鼠骨髓来源的MSCs腹腔注射到顺铂所致急性肾小管坏死模型雌性小鼠体内,不论是细胞移植后24 h还是96 h都没有在肾实质检测到Y染色体阳性的细胞,但是仍可观察到内源性肾小管上皮细胞的增生增加和凋亡减少,肾损伤的严重程度减轻。另外将培养过外源性MSCs的条件培养基通过腹腔注射到小鼠体内,同样能起到减少肾小管上皮细胞凋亡,增加存活率和减轻肾损伤的作用,提示培养基中有肾脏保护因子存在。Kunter等^[47]从尾静脉注射PKH26标记的骨髓MSCs到抗THY1.1系膜增生性肾小球肾炎模型大鼠体内,即使从第6天开始肾内未检测到荧光阳性的细胞,大鼠肾小球的修复也明显加快,这可能与旁分泌的细胞因子有关,而并不是MSCs分化成了肾小球的固有细胞。Humphreys等^[63]发现细胞移植后1~2 d内就可以观察到肾脏的保护作用,而这么短的时间还不足以让MSCs归巢到肾脏并分化成肾脏固有细胞,他们认为外源性MSCs的分化并不是它起作用的主要机制。MSCs具有旁分泌的功能,能分泌一系列因子,包括生长因子、细胞因子和前列腺素类,如血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF-1)和骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)等。Togel等^[52]发现剔除VEGF基因片段的MSCs的肾脏保护作用明显下降,提出VEGF是由MSCs分泌的最主要的肾脏保护因子。VEGF是与肾小球功能和刺激管周毛细血管增生相关的重要因子,VEGF能直接保护肾脏上皮细胞免受损伤,这些都与肾小管的再生有关。HGF可以改善细胞的生长,减少细胞的凋亡和有利于新生血管的形成和组织的重建。IGF-1同样具有促进有丝分裂和抗细胞凋亡的作用。HGF和IGF-1在急性肾损伤时能起肾脏修复作用,它们的分泌是和MSCs的保护作用相关的。这些因素也许是MSCs抗肾小管损伤和肾纤维化的可能机制。MSCs不仅能分泌这些肾脏保护因子,而且在伤害性刺激时(如肿瘤坏死因子、内毒素和缺氧)可以产生更多的类似生长因子和细胞因子。郭琦等^[64]用缺血再灌注损伤的肾脏组织匀浆,并将含有肾毒性物质的上清液培养骨髓MSCs,发现骨髓MSCs在肾损伤的微环境中能够上调保护性细胞因子。提示MSCs对肾脏的修复作用不仅仅通过直接分化为肾脏固有细胞,更重

要的是依赖复杂调控的旁分泌,减轻损伤肾脏的炎症反应,为后期肾脏的修复起着重要作用。

除了MSCs的可塑性和细胞因子的分泌功能, MSCs的免疫调节、免疫抑制功能^[60,65]也值得关注。它们能在体外抑制免疫细胞的活性和增生,抑制淋巴细胞或是树突状细胞产生前炎症因子。MSCs的免疫抑制作用是与剂量相关的,并且与主要组织相容性复合物无关。虽然MSCs诱导的免疫抑制作用的机制还不是很清楚,但是它的这种特性在免疫抑制和再生医学方面将会有很大的作用。

目前,关于干细胞移植治疗肾脏疾病还有许多问题没有解答。比如促使干细胞定位到损伤组织的信号是什么,移植的干细胞是通过何种机制调节旁分泌和内分泌活性,尤其是外源性的干细胞在体内的长期行为是什么。尽管有很多问题有待解决,但是干细胞移植仍是慢性肾脏疾病的治疗中一个充满前景和希望的治疗策略。

[参 考 文 献]

- [1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147.
- [2] Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney[J]. J Clin Invest, 2005, 115(7): 1756-1764.
- [3] Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Chiara DM, Cantino D, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney[J]. Am J Pathol, 2005, 166(2): 545-555.
- [4] Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, Mazzinghi B, Sagrinati C, Netti GS, et al. Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(12): 3128-3138.
- [5] Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells[J]. J Exp Med, 2008, 205(2): 479-490.
- [6] Oliver JA, Barasch J, Yang J, Herzlinger D, Al-Awqati Q. Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(4): F799-F809.
- [7] Levashova ZB, Plisov SY, Perantoni AO. Conditionally immortalized cell line of inducible metanephric mesenchyme[J]. Kidney Int, 2003, 63(6): 2075-2087.
- [8] 刘喜红,易著文,陈丹,何小解,莫双红. 胚胎后肾间充质细胞移植对急性肾小管坏死肾小管上皮细胞凋亡和增生的影响[J]. 中华儿科杂志, 2007, (11): 863-864.
- [9] 焦玉清,易著文,何小解,刘喜红,何庆南,黄丹琳. 后肾间充质细胞移植治疗大鼠慢性阿霉素肾病[J]. 中华肾脏病杂志, 2009, 25(12): 930-935.
- [10] Lin F, Moran A, Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney[J]. J Clin Invest, 2005, 115(7): 1756-1764.
- [11] Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M,

- et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(7): 1794-1804.
- [12] 杨焕丹,董晨,关凤军,高莉莉,赵彤,丰炳峰. 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[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(6): 483-487.
- [13] Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, Corna D, Longaretti L, et al. Insulin-like growth factor-I sustains stem cell mediated renal repair[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(11): 2921-2928.
- [14] Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H, Cantley LG. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(9): 2486-2496.
- [15] 殷莉波,赵文秀,尹震宇,杨中萌,张琼,王效民. 人脂肪间充质干细胞的分离培养及其鉴定[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(32): 5997-6000.
- [16] 毕薇薇,黄若洋,刘洋. 人胎儿肝脏间充质干细胞的体外培养及生物学特性研究[J]. *中国医药生物技术*, 2010, 5(4): 277-280.
- [17] Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood[J]. *Br J Haematol*, 2000, 109(1): 235-242.
- [18] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials[J]. *Haematologica*, 2006, 91(8): 1017-1026.
- [19] 颜小华,陈晓. 脐血间充质干细胞静脉移植治疗新生大鼠缺血缺血性脑损伤[J]. *中国新生儿科杂志*, 2006, (3): 158-161.
- [20] Caballero M, Reed CR, Madan G, van AJA. Osteoinduction in umbilical cord- and palate periosteum-derived mesenchymal stem cells[J]. *Ann Plast Surg*, 2010, 64(5): 605-609.
- [21] Zhang HT, Chen H, Zhao H, Dai YW, Xu RX. Neural stem cells differentiation ability of human umbilical cord mesenchymal stromal cells is not altered by cryopreservation[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 487(1): 118-122.
- [22] 蔡馥丞,黄亚玲,熊念,鲁娜,钟严艳,王涛. 脐带间充质干细胞植入脑缺血模型仔鼠存活、增殖及分化[J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24(8): 618-621.
- [23] Cao H, Qian H, Xu W, Zhu W, Zhang X, Chen Y, et al. Mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord ameliorate ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats[J]. *Bio-technol Lett*, 2010, 32(5): 725-732.
- [24] Chen Y, Qian H, Zhu W, Zhang X, Yan Y, Ye S, et al. Hepatocyte growth factor modification promotes the amelioration effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on rat acute kidney injury[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(1): 103-113.
- [25] Gu Z, Akiyama K, Ma X, Zhang H, Feng X, Yao G, et al. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates lupus nephritis in MRL/lpr mice[J]. *Lupus*, 2010, 19(13): 1502-1514.
- [26] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [27] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells[J]. *Science*, 2008, 321(5889): 699-702.
- [28] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [29] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells[J]. *Curr Biol*, 2008, 18(12): 890-894.
- [30] Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood[J]. *Blood*, 2009, 113(22): 5476-5479.
- [31] Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells[J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): e30-e41.
- [32] Karumbayaram S, Novitch BG, Patterson M, Umbach JA, Richter L, Lindgren A, et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(4): 806-811.
- [33] Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, Salvagiotto G, Rehauer W, Vodyanik M, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(3): 559-567.
- [34] Hiram Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, et al. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 458(3): 126-131.
- [35] Rossant J. Stem cells: the magic brew[J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 260-262.
- [36] Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Muller-Newen G, Djuric Z, et al. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(6): 1754-1764.
- [37] Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, 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.
- [38] Quimby JM, Webb TL, Gibbons DS, Dow SW. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study[J]. *J Feline Med Surg*, 2011, 13(6): 418-426.
- [39] Rogers SA, Hammerman MR. Transplantation of rat metanephroi into mice[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 280(6): R1865-R1869.
- [40] 陈丹,易著文,刘喜红,何庆南,黄丹琳,吴小川,等. 胚胎后肾间充质细胞肾包膜下移植对急性肾小管坏死大鼠的保护作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2009, 25(3): 191-197.
- [41] Asanuma H, Vanderbrink BA, Campbell MT, Hile KL, Zhang H, Meldrum DR, et al. Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis[J]. *J Surg Res*, 2011, 168(1): e51-e59.
- [42] 董兴刚,冯健,俞志满,过源. 骨髓间充质干细胞肾动脉注射移植修复裸鼠急性肾小管坏死[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30(6): 668-671.
- [43] 徐璐,廖德怀,陈正,马俊杰,李光辉,方佳丽,等. 肾移植中经移植肾动脉输注骨髓间充质干细胞3例报告[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, (53): 10049-10052.
- [44] 董晨,杨焕丹,丰炳峰,关凤军,赵彤. 骨髓间充质干细胞对阿霉素肾病大鼠肾脏 nephrin 表达的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(32): 5897-5902.
- [45] 凌斌,陈静,王廷华,潘兴华,孙洁. 骨髓间充质干细胞移植下调 MODS 兔心、脾、肾组织中细胞凋亡因子 Apaf-1 mRNA 表达[J]. *昆明医学院学报*, 2010, 31(3): 14-20.
- [46] Yoo JH, Park C, Jung DI, Lim CY, Kang BT, Kim JH, et al. In vivo cell tracking of canine allogenic mesenchymal stem cells administration via renal arterial catheterization and physiopathological effects on the kidney in two healthy dogs[J]. *J Vet Med Sci*, 2011, 73(2): 268-274.
- [47] Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D, et al. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(8): 2202-2212.

[48] 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.

[49] Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury[J]. Int J Mol Med, 2004, 14(6): 1035-1041.

[50] 周阳,任野萍. 外源性骨髓间充质干细胞在肾脏的分布[J]. 哈尔滨医科大学学报,2010,44(1):56-59.

[51] Zhou K, Zhang H, Jin O, Feng X, Yao G, Hou Y, et al. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice[J]. Cell Mol Immunol, 2008, 5(6): 417-424.

[52] Togel F, Cohen A, Zhang P, Yang Y, Hu Z, Westenfelder C. Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(3): 475-485.

[53] Choi S, Park M, Kim J, Hwang S, Park S, Lee Y. The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(3): 521-529.

[54] Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, Carpio D, Yanez AJ, Conget PA. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2008, 14(6): 631-640.

[55] Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion[J]. Exp Hematol, 2001, 29(2): 244-255.

[56] Behr L, Hekmati M, Lucchini A, Houcinet K, Faussat AM, Bornstein N, et al. Evaluation of the effect of autologous mesenchymal stem cell injection in a large-animal model of bilateral kidney ischaemia reperfusion injury[J]. Cell Prolif, 2009, 42(3): 284-297.

[57] Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy[J]. J Clin Oncol, 2000, 18(2): 307-316.

[58] 张学峰,张美荣,胡建霞,王丽,张桂芝,邵磊,等. 异种脐带间充质干细胞静脉应用的安全性[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(32):5971-5975.

[59] Bentzon JF, Stenderup K, Hansen FD, Schroder HD, Abdallah BM, Jensen TG, et al. Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330(3): 633-640.

[60] Zhang W, Qin C, Zhou ZM. Mesenchymal stem cells modulate immune responses combined with cyclosporine in a rat renal transplantation model[J]. Transplant Proc, 2007, 39(10): 3404-3408.

[61] Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, Maria Avancini Costa Malheiros D, Antonia dos Reis M, Shimizu MH, et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model[J]. Stem Cells, 2009, 27(12): 3063-3073.

[62] Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, 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.

[63] Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury[J]. Annu Rev Med, 2008, 59: 311-325.

[64] 郭琦,万建新,梁萌. 急性肾损伤微环境上调骨髓间充质干细胞分泌肾脏保护性生长因子[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009,10(6):494-497.

[65] 刘奎利,刘德忠,金建刚,李海斌,史迎昌,黎立,等. 异体脐带间充质干细胞对大鼠心脏移植的免疫调节[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(6):1048-1052.

(本文编辑:邓芳明)

· 消息 ·

中国医师协会新生儿专业委员会暨中国医师协会 第二次全国新生儿科学术会议征文通知

经中国医师协会新生儿专业委员会常委会研究决定,并报中国医师协会学术会员部批准,第二次全国新生儿科学术会议定于2012年3月23日~25日在北京召开。现开始征文,与新生儿各专业有关的论文(基础研究、临床研究、护理及管理)均可投稿,参加会议者将授予国家级继续教育学分6分。请将论文电子版全文及800字以内的结构式摘要发至新生儿专业委员会办公室电子邮箱:xinshengerywyh@126.com,投稿截止日期为2012年2月29日。

联系人:张倩 电 话:010-84024716

中国医师协会新生儿专业委员会
2011年10月20日