

·综述 General review·

干细胞移植治疗终末期肾病的实验研究

孙军辉, 滕皋军

【关键词】 干细胞;移植;终末期肾病

中图分类号:R692.5 文献标识码:A 文章编号:1008-794X(2006)-10-0632-04

Experimental researches on treatment of end-stage nephropathy with stem cells transplantation SUN Jun-hui, TENG Gao-jun. Department of Interventional Radiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Stem cell possesses the capability of self-regeneration and multidirectional differentiation. Although renal transplantation being the best way for the treatment of end-stage nephropathy, the shortage of donor kidney arouses the treatment with transplantation of stem cells taking emphasis in recent years. The process and mechanism of this therapy are complicated and the authors review in detail the experimental research advancement on stem cells engraftment for the treatment. The correlative interventional technology is also evaluated. (J Intervent Radiol, 2006, 15: 632-635)

【Key words】 Stem cells; Transplantation; Kidney

干细胞相关研究已成为目前生命科学研究热点之一,而干细胞移植治疗疾病又是其中研究的重点。终末期肾病是各种慢性肾脏病进行性发展的最终结果,只能实施血液透析、腹膜透析和肾移植,前两者称为不完全替代治疗,并发症多、生存质量不高;肾移植为完全替代,然而由于供体短缺、免疫抑制、外科手术并发症^[1]以及长期等待肾源^[2],都限制了肾移植的开展,因此人们也希望将干细胞移植用于终末期肾病,尤其是肾功能衰竭的治疗,以期获得突破。近年来,介入放射学的进步和发展已使多种疾病的治疗发生了革命性的改观,并已在某些疾病的治疗过程中发挥了主导作用。研究者也对将介入技术应用于干细胞移植治疗终末期肾病进行了探索。

干细胞是一类具有自我更新能力和多系分化的细胞。按生存阶段可以分为:胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)和成体干细胞(adult stem cell, ASC)。ES 细胞为囊胚期内细胞团或原始

生殖细胞经体外分化抑制培养筛选出的细胞。ASC 是成体组织中保留的未完全分化的那部分原始细胞,具有多能性或为专能性干细胞。多能性指其可以分化为所有三个胚层的组织,但不能分化为胚外组织。专能性干细胞是由多能干细胞进一步分化而来,它只能分化为本系统各谱系的细胞。同时,干细胞的自我更新和分化受多种信号机制和微环境的影响。

1 ES 细胞移植在肾脏研究中的应用

由于至今未能确认并定位成体肾脏干细胞^[3],而 ES 细胞具有全能性(totipotent),即可在适合条件下分化为所有三个胚层及胚外组织。所以人们希望将其应用于肾脏,能够使 ES 细胞分化为肾脏实质细胞,从而改善和恢复肾功能。有研究者发现嵌合型胎儿的胚胎生殖细胞(EG 细胞)可形成肾脏组织^[4]。Thomson 等^[5]将人 ES 细胞注入免疫缺陷小鼠,形成了三个胚层组织组成的良性畸胎瘤,其中含有胎肾组织。

目前,将 ES 细胞用于治疗肾脏疾病还存在较大困难。因为要在体内生成有功能的肾组织,需要在体外对 ES 细胞预分化。若将 ES 细胞直接引入肾实质,不能形成肾组织而更易成为畸胎瘤。由于肾脏有 26 种细胞,而每种细胞对肾功能恢复均有重

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(20040286037);东南大学国家自然科学基金预研项目(XJ0490168);东南大学优秀博士学位论文基金(YB550518)

作者单位:210009 南京 东南大学附属中大医院介入放射科

通讯作者:滕皋军

要作用,这些细胞的特征各不相同,要么引入一个能分化成所有 26 种细胞类型的祖细胞,要么在体外分别分化成这些细胞类型再引入体内。然而,ES 细胞分化为肾脏细胞的体内外调节因子至今还不清楚。因此,ES 细胞移植用于肾病的治疗尚有很多问题需要解决。

2 骨髓干细胞(bone marrow stem cells,BMC)移植在肾脏研究中的应用

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,HSC)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)。MSC 存在于骨髓基质,是骨髓中一类非造血干细胞,估计数量为骨髓有核细胞的 0.001% ~ 0.01%。骨髓 MSC 具有跨胚层的多向分化能力,已知可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和心肌细胞等,这已被众多的体外及体内实验证实^[6]。BMC 有以下特点:①供者来源相对容易,BMC 的体外培养,扩增相对简单,便于临床工作的开展;②BMC 来源于成人,因而避免了用 ES 细胞治疗所带来的伦理上的争论;③在一些自身干细胞尚未被证实的器官系统(例如肾脏),BMC 可能是较好的选择。

因此,学者们做了较多研究。Ito 等^[7]将携带增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因的转基因小鼠(EGFP 鼠)的骨髓移植入野生型小鼠,移植 21 d 后用 Thy-1 抗体诱导肾小球肾炎,发现 11% ~ 12% 修复的肾小球细胞来源于移植的骨髓。Imasawa 等^[8]将绿色荧光蛋白(GFP)转基因 C57BL/6j(B6)小鼠的骨髓注入经 8.0 Gy 钴 60 照射的同系小鼠中构建嵌合体骨髓。在骨髓移植后的肾脏中追踪到 GFP 阳性细胞。这些 GFP 阳性细胞定位于肾小球、肾小球周围和肾间质,提示骨髓细胞可转变成肾小球细胞。而且在骨髓移植后 2 ~ 24 周内,GFP 阳性细胞的数量以时间依赖的方式增加,同时分离培养这些肾小球细胞发现 60% 结合素阳性细胞表达 GFP,提示小鼠骨髓细胞有分化为肾小球系膜细胞的潜能。来源于遗传易患性肾小球硬化的小鼠的骨髓在受者体内形成了硬化性肾小球系膜(平滑肌或肾小球血管)。证据包括受者硬化的肾小球形态学特征和肾小球细胞遗传学上向供者方面的改变^[9]。Poulsom 等^[10]将 C57/Slack 雄性小鼠的骨髓注入经射线预处理后的同系雌性小鼠的尾静脉中,用原位杂交和免疫组化方法鉴定 Y 染色体和肾小管上皮细胞的表面抗原。骨髓移植 13 周后,在雌性小鼠的肾组织切片中鉴定到

近 8% 的 Y 染色体阳性细胞为肾小管上皮细胞,并且也鉴定出了 Y 染色体阳性的足细胞。提示骨髓来源的细胞可分化成肾小管上皮细胞和肾小球足细胞。Kraus 等^[11]研究发现雄雌小鼠分别做为供受者,骨髓移植后雌性小鼠的一些肾小管上皮细胞中 Y 染色体阳性。

Kale 等^[12]观察缺血再灌注模型上 BMC 修复急性肾小管坏死,发现亚致死剂量照射的小鼠接受带有 LacZ 基因同种异体骨髓 12 周后,2% ~ 5% 的肾小管细胞表达 LacZ 基因表达产物,说明 BMC 在正常的肾小管中只有少量的分化;缺血再灌注一定时间的小鼠外周血中 Lin-Sca-1 + ckit + 细胞比例升高,说明缺血再灌注损伤可以动员 BMC 入血。全骨髓移植后 16 周建立缺血再灌注模型,发现来源于供体骨髓的细胞主要位于外髓质部的肾小管,而皮质部这类细胞未见明显增加,提示外源性的 BMC 可以选择性地修复外髓质部的大部分肾小管坏死。Suzuki 等^[13]发现血小板生长因子(PDGF)在移植入受体大鼠的骨髓细胞转化为肾小球系膜样细胞过程中起关键作用,无论在体外培养还是活体移植此种作用都非常明显。Morigi 等^[14]发现顺铂注入肾血管造成的小鼠急性肾功能衰竭后,移植入的骨髓 MSC 可以恢复肾小管结构及功能。Lin 等^[15]将雄性小鼠的造血干细胞植入缺血再灌注损伤的雌性小鼠后发现干细胞植入后可以分化成为肾小管细胞,形成肾脏近端小管。

虽然 BMC 移植应用于肾脏研究取得了许多进展,但也面临许多有待解决的问题:如骨髓有多种干细胞,究竟哪一种 BMC 参与肾脏修复?尽管在动物模型证实了造血干细胞可分化为肾小管上皮细胞,而 MSC 可以分化为肾小球系膜细胞,但目前还不能确定哪一类 BMC 在全骨髓移植后向肾脏细胞分化。另外,BMC 分化而成的肾脏细胞占整个肾脏细胞百分比很少,很难确定对肾功能恢复有多大帮助。还有,BMC 增殖、归巢、分化成肾脏各种细胞的机制尚不清楚,如何使干细胞靶向移行到损伤区;在肾脏的分化和植入中,适合不同 BMC 生存和分化的体内环境又是如何等问题均需在以后的研究中解决。

3 胎肝干细胞应用于肾脏的研究

多项研究表明胎肝组织中存在多种干细胞,主要有肝干细胞、HSC 和 MSC 等^[16]。Hoppo 等^[17]发现小鼠胎肝中可分离出三种干细胞,即 CD 49 f(+)细胞,

表达 AFP、ALB 及 CK19, 为肝干细胞; CD 45(+) 细胞表达 HSCs 标志, 为 HSCs; Thy(+) 细胞, 表达间充质系列标志如肌动蛋白、波形蛋白等为 MSC。Imasawa 等^[8]从羊胎肝中分离出了多能 MSC。Gotherstrom 等^[19]分离得到人胎肝 MSC。

胎肝干细胞具有自身的特点, 它们比骨髓发育早, 比 BMC 原始、幼稚、自我更新能力强, 具有较长的端粒及较高的端粒酶活性, 具有较少的免疫原性和较少的免疫活性, 对逆转录病毒介导的基因转染更敏感^[20]。胎儿组织中分离的细胞比成体细胞的生长能力更强, 倍增时间更短^[21]。其他研究也表明从胎肝中分离得到的干细胞比脐血或骨髓中的干细胞增殖能力更强^[22]。

人们业已开始探索将胎肝干细胞应用于肾脏研究。廖继东等^[23]采用单克隆免疫磁珠细胞技术分离小鼠胎肝 Sca-1 + 干细胞, 将雄性小鼠 Sca-1 + 干细胞输注到经致死剂量全身照射的雌性小鼠体内, 结果在肾小管上皮内和肾小球边缘, 分别发现存在 Y 染色体阳性的供体来源的细胞, 同时呈现肾组织的部分特征, 证明小鼠胎肝 Sca-1+ 干细胞具有向肾组织上皮细胞分化的潜能。综上所述, 胎肝干细胞在肾病等疾病治疗方面也具有一定的应用前景, 进一步研究胎肝干细胞分化可塑性的特点, 将有助于其在治疗终末期肾病的研究及应用。

4 介入技术与肾脏干细胞移植

何种干细胞移植途径更适合治疗肾功能衰竭等弥漫性肾病, 这是人们在肾脏干细胞移植中亟待解决的问题。以往干细胞移植多采用局部注入或经周围静脉注入 2 种方法。前者应用较多, 这种方法对于局灶性病灶尤其是局部缺血病灶较适宜, 如心肌、脑缺血病灶等, 但其一次移植细胞数量有限, 而且细胞弥散、移行均较慢, 要想达到治疗效果, 往往需多次注射^[24,25]。显然, 此法不适于治疗弥漫性病灶。经周围静脉注入的干细胞分布较弥漫, 但也存在移行到靶组织、靶器官机制较复杂, 移行到位细胞数量少等问题^[26]。由于肾动脉及其分支呈辐射状分布, 经肾动脉移植干细胞是否便于移植细胞弥漫分布; 是否更利于治疗肾功能衰竭等弥漫性肾病。近年, Bos 等^[27]将 SPIO 标记的 MSC 经肾动脉打入大鼠正常肾脏进行了尝试, 结果 MRI 可较好显示移植入细胞, 绝大多数 MSC 弥漫分布于肾小球中。诚然, 无论是局部注射和经静脉注射还是经肾动脉行干细胞移植, 能否令细胞在局部停留以及移植入的干

细胞的生存、增殖和分化状况目前均尚存在许多疑问, 但相对于前 2 种移植途径, 经肾动脉干细胞移植更便于干细胞短期集中弥漫分布于肾脏中, 可能更适于治疗肾衰等弥漫性肾病。因此, 可以预见, 在未来干细胞移植治疗终末期肾病的研究进程中, 介入放射学技术将会发挥其特有的作用。

[参考文献]

- [1] Wolfe RA, Asby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant[J]. N Engl J Med, 1999, 341: 1725 - 1730.
- [2] Meier-Kriesche H, Kaplan B. Waiting time on dialysis as the strongest modifiable risk factor for renal transplant outcomes: A paired donor kidney analysis[J]. Transplantation, 2002, 74: 1377 - 1381.
- [3] Al-Awqati Q, Oliver JA. Stem cells in the kidney (review)[J]. Kidney Int, 2002, 61: 387 - 395.
- [4] Gabriela DH, Justin AF, Anne M. Pluripotential stem cells derived from migrating primordial germ cells[J]. Differentiation, 2001, 68: 220 - 226.
- [5] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282: 1145 - 1147.
- [6] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284: 143 - 147.
- [7] 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: 2625 - 2635.
- [8] 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: 1401 - 1409.
- [9] Cornacchia F, Fornoni A, Plati AR, et al. Glomerulosclerosis is transmitted by bone marrow-derived mesangial cell progenitors [J]. J Clin Invest, 2001, 108: 1649 - 1656.
- [10] Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration[J]. J Pathol, 2001, 195: 229 - 235.
- [11] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell [J]. Cell, 2001, 105: 369 - 377.
- [12] Kale S, Yarihaloo A, Clark PR, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule[J]. J Clin Invest, 2003, 112: 42 - 49.
- [13] Suzuki A, Iwatani H, Ito T, et al. Platelet-derived growth factor plays a critical role to convert bone marrow cells into glomerular mesangial-like cells[J]. Kidney Int, 2004, 65: 15 - 24.
- [14] Morigi M, Imberti B, Zoja C, 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: 1794 - 1804.

[15] Lin F, Cordes K, Li L, et al. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. J Am Soc Nephrol, 2003, 14: 1188 - 1199.

[16] Chagraoui J, Lepage NA, Anjo A, et al. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Blood, 2003, 101: 2973 - 2982.

[17] Hoppe T, Fujii H, Hirose T, et al. Thy1-positive mesenchymal cells promote the maturation of CD 49 f-positive hepatic progenitor cells in the mouse fetal liver[J]. Hepatology, 2004, 39: 1362 - 1370.

[18] Krupnick AS, Balsara KR, Kreisel D, et al. Fetal liver as a source of autologous progenitor cells for perinatal tissue engineering[J]. Tissue Eng, 2004, 10: 723 - 735.

[19] Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, et al. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells [J]. Am J Obstet Gynecol, 2004, 190: 239 - 245.

[20] Globerson A. Hematopoietic stem cells and aging (review)[J]. Experimental Gerontology, 1999, 34: 137 - 146.

[21] Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem, 1997, 64: 278 - 294.

[22] Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. J Exp Med, 1993, 178: 787 - 791.

[23] 廖继东, 张 洹. 胎肝干细胞抗原阳性细胞向肾脏细胞分化的研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 83: 1686 - 1690.

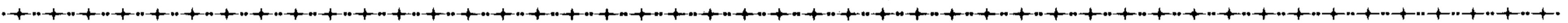
[24] Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction[J]. Circulation, 2003, 107: 2290 - 2293.

[25] Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, et al. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 16267 - 16272.

[26] Dodd CH, Hsu HC, Chu WN, et al. Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T-cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles [J]. J Immunol Meth, 2001, 256: 89 - 105.

[27] Bos C, Delmas Y, Desmouliere A, et al. In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver[J]. Radiology, 2004, 233: 781 - 789.

(收稿日期:2005-09-01)



·会议纪要·

第六届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会会议纪要

第六届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会于2006年9月15日-9月18日在浙江省杭州市之江饭店会议中心隆重举行。本次会议由上海同仁医院与浙江省中医药大学第一医院联合举办。《中华放射学杂志》、《中华消化内镜杂志》、《世界华人消化杂志》和《介入放射学杂志》共同协办。卫生部科技教育司、上海市卫生局以及浙江省卫生厅等相关领导参加了会议开幕仪式,并分别就卫生部“十年百项”技术推广、国家级继续医学教育、上海市重大医学成果转化等项目背景作了介绍,对推广成果规范提出了新的要求。肖湘生、李麟荪、杨仁杰、程永德、李彦豪、吴云林、龚彪、李宁等五十余位国内著名介入放射学、消化内镜以及外科学方面专家参加了会议专题演讲及沙龙研讨。来自北京、上海、浙江、河北、四川、黑龙江、江苏、安徽、甘肃、江西、内蒙古、福建、云南、甘肃、辽宁、湖南17个省市自治区的320名代表报名参加了会议。到会参加研讨会暨学习班的代表中,高级技术职称170名,中级技术职称121名,初级技术职称28人,分别占总人数的54.2%、38.5%和7.3%。本次会议通过由专家专题演讲、录象演播、现场操作演示以及沙龙研讨专家与代表互动等多种形式着重介绍消化道恶性病变消化内镜、介入放射学、外科以及其他综合治疗的新技术与新方法。参加会议的代表们学习积极性极高,求知欲望十分强烈,会场认真的学习气氛使专家演讲的激情也欲罢不能。尽管中午课程都在临近1点结束,下午更是延迟到傍晚6点30分之后,但会场仍每每座无虚席。而在晚上举行的消化道支架技术研讨沙龙则气氛变得更为热烈。参会专家与代表围绕消化道管腔内支架治疗应用技术以及出现的问题亮出各自观点进行激烈的讨论,一些专家列举实际案例就消化道内支架治疗中的热点问题针锋相对地质疑与辩论。直至晚上10点40分主持人断然终止研讨议程时满场代表仍意犹未尽。

专题演讲和研讨结束后,由介入放射和消化内镜相关专家分别进行了食管支架、肠道支架、PTCD和ERCP胆道支架、内镜操作技术以及消化道肿瘤血管介入的现场操作演示。由于观摩演示的展示厅偏小,因而显得尤其拥挤。许多代表挤站着观看演示直至傍晚6点结束。

此次会议学术气氛相当浓厚。在紧凑有序的专题演讲间隙不少代表踊跃通过手机短信进行提问,演讲专家也不厌其烦地通过投影仪现场认真解答。会后许多专家和代表普遍感慨参加此会受益非浅,认为大会为不同学科间相互学术交流和研讨搭建了一个沟通平台。并建议今后多举行类似的研讨沙龙和短信答疑,以能带动更多有相关经验者参与互动交流。不少代表表态:如获下届会议通知,一定积极参加。

第六届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会主题内容“消化道恶性梗阻的动脉内灌药联合内支架治疗应用技术”是卫生部第二轮面向农村和基层推广适宜技术“十年百项”计划项目和上海市重大医学成果转化项目。该项目开展以来已先后在上海、河北邢台、宁夏银川、黑龙江哈尔滨、江苏南京举办五届全国研讨会并在上海、江苏沭阳、甘肃兰州等地举办地区性继续教育学习班。因其内容涉及肿瘤内科诊治、消化内镜操作及介入放射学技术等边缘学科高新技术,对消化道恶性梗阻性病变治疗的实用性强、临床疗效好,故深受相关专业从业医师的普遍欢迎。此次会议的圆满结束,为消化道恶性病变介入治疗技术的进一步推广应用起到积极的推动作用。

我们将不断进取,进一步总结经验,继续积极筹备相关内容的研讨会议,为我国消化道病变介入诊疗技术的发展和提高搭建一个有一定质量和水平的交流平台。

茅爱武 吕宾

2006年10月1日