

## ·实验研究 Experimental research·

## 肾动脉移植骨髓间充质干细胞治疗大鼠慢性肾病结果分析

陆发承, 王家平, 邢艺苑, 万珊杉, 韩磊

**【摘要】 目的** 分析和评价经肾动脉途径移植骨髓间充质干细胞(BMSC)对慢性阿霉素肾病模型大鼠的治疗结果。**方法** 采用 50 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠作为实验动物。其中 2 只 12 周龄大鼠用于 BMSC 分离培养;12 只作为空白对照组(N 组),36 只经尾静脉注入阿霉素制作慢性肾病大鼠模型,并随机分为慢性肾病对照组(C 组)、经肾动脉移植 BMSC 组(A 组)和经尾静脉移植 BMSC 组(V 组),每组 12 只。N 组经尾静脉注入等量 0.9%氯化钠溶液。**结果** A 组、V 组、C 组在各观察时点血尿素氮、血肌酐、24 h 尿蛋白、24 h 尿微量蛋白水平均明显高于 N 组( $P<0.01$ )。移植后 1、2 周 A 组 24 h 尿微量蛋白均低于 C 组( $P<0.01$ ),且血肌酐均较 C 组和 V 组低( $P<0.01$ );移植后 1 周 A 组 24 h 尿蛋白、24 h 尿微量蛋白均明显低于 V 组( $P<0.01$ ),但 2 周时与 V 组差异无统计学意义。**结论** 经肾动脉途径移植 BMSC 可提高细胞归巢效率,并提高对损伤组织的修复作用。

**【关键词】** 骨髓间充质干细胞;干细胞移植;肾动脉;肾病

中图分类号:R344.1 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2017)-04-0351-04

**Bone marrow mesenchymal stem cells transplantation via renal artery for the treatment of chronic nephropathy in rats: analysis of experimental results** LU Facheng, WANG Jiaping, XING Yiyuan, WAN Shanshan, HAN Lei. Department of Radiology, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan Province 650101, China

Corresponding author: WANG Jiaping, E-mail: jpwang12@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) transplantation via renal artery in treating experimental rats with adriamycin-induced chronic nephropathy. **Methods** A total of 50 male Sprague-Dawley (SD) rats were used as experimental animals. Two rats were used for the isolation and culture of BMSC. Twelve rats were designed as blank control group (group N); in other 36 rats adriamycin was injected through caudal vein to establish rat models of chronic nephropathy, these 36 rats were randomly and equally divided into three groups with 12 rats in each group: control group (group C,  $n=12$ ), BMSC transplantation via renal artery group (group A,  $n=12$ ), and BMSC transplantation via caudal vein group (group V,  $n=12$ ). For the rats of group N, the same amount of normal saline was injected through caudal vein. **Results** At each observation point, the levels of blood urea nitrogen, serum creatinine, 24 h urinary protein and 24 h urinary microprotein in group A, V and C were remarkably higher than those in group N ( $P<0.01$ ). One and two weeks after BMSC transplantation, the 24 h urinary microprotein level in group A was significantly lower than that in group C ( $P<0.01$ ); the serum creatinine level in group A was significantly lower than that in group C and group V ( $P<0.01$ ). One week after BMSC transplantation, both the 24 h urinary protein level and 24 h urinary microprotein level in group A were strikingly lower than those in group V ( $P<0.01$ ), but two weeks after BMSC transplantation these differences between group A and group V became not statistically significant. **Conclusion** BMSC transplantation via renal artery can improve cell-homing efficiency and improve the repair of damaged tissue as well. (J Intervent Radiol, 2017, 26: 351-354)

**【Key words】** bone marrow mesenchymal stem cell; stem cell transplantation; renal artery; nephropathy

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.04.016

作者单位: 650101 昆明医科大学第二附属医院放射科

通信作者: 王家平 E-mail: jpwang12@hotmail.com

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)是一类能够定向迁移并定植于损伤部位,可通过转分化、融合或旁分泌机制对受损部分进行修复的多功能成体干细胞<sup>[1-2]</sup>。近年 BMSC 移植治疗急慢性肾脏疾病成为研究热门,治疗慢性终末期肾病也越来越受到关注。然而目前动物模型移植研究面临 BMSC 向受损部位归巢数量不足等问题。本研究旨在观察经动脉途径移植 BMSC 对慢性阿霉素肾病大鼠的治疗结果,并评价其疗效。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

50 只清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠(四川大学实验动物中心),其中 2 只 12 周龄大鼠用于 BMSC 分离培养,36 只 14 周龄大鼠为实验对象,12 只 14 周龄大鼠作空白对照(N 组)。实验试剂包括胎牛血清(FBS)(中国医学科学院生物工程研究所)、L-DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)、阿霉素(美国 Sigma 公司)、带绿色荧光的重组 Ad5/F35 腺病毒载体(中国本元正阳基因技术公司)。

### 1.2 造模及分组

造模手术在全身麻醉下进行,实验大鼠取俯卧位固定,经左侧肋脊角切口,切除左肾并经尾静脉注入阿霉素(4 ml/kg),术后待大鼠自然清醒,1 周后再次经尾静脉注入等量阿霉素(4 ml/kg),连续 2 周。术后每周连续经眼内眦静脉取血检测肾功能。按文献报道<sup>[3]</sup>,以血肌酐、尿素氮升高水平及贫血作为造模成功标准。造模成功后 36 只阿霉素肾病模型大鼠随机分为对照组(C 组)、经肾动脉移植 BMSC 组(A 组)、经尾静脉移植 BMSC 组(V 组),每组 12 只。N 组经尾静脉注入等量 0.9%氯化钠溶液。

### 1.3 BMSC 培养及标记

取 2 只 12 周龄大鼠股骨及胫腓骨置于磷酸缓冲液(PBS)中,用含 10%FBS 的 L-DMEM 培养液冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞悬液,之后加入 Ficoll 分离液,2 000 r/min 离心 30 min 后收集沉淀的骨髓细胞,PBS 吹打后以 1 600 r/min 再离心 10 min,弃上清液,PBS 溶解细胞后接种在塑料培养瓶中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培育。用流式细胞仪鉴定细胞表面抗原。取体外培养至 P4~P6 代 BMSC,观察其生长至 80%融合后,置于 2%O<sub>2</sub>、93%N<sub>2</sub> 和 5%CO<sub>2</sub> 环境中 48 h 使之缺氧,之后用 Ad5/F35 腺病毒载体(绿色荧光)转染,培养 6 h 后加等量 L-DMEM 培养液,24 h 后用倒置显微镜观察绿色荧光表达情况。

### 1.4 BMSC 移植

BMSC 染色标记后用 0.1%胰酶消化,含 10% FBS 的 L-DMEM 培养基终止消化后离心,无血清 L-DMEM 培养基制备悬浮细胞,取  $1.5 \times 10^6$  个细胞/ml 经肾动脉注入 A 组大鼠(具体操作步骤:大鼠麻醉、消毒、固定,对腹部预先作 1 cm 开口,逐层分离暴露腹主动脉及肾动脉,0.9%氯化钠溶液纱布覆盖切口;随后在左颈总动脉开口 0.5~0.8 cm,PE10 导管对颈动脉插管,DSA 动态观察下将导管推送至肾动脉开口处,推注少量对比剂证实后,在预先腹部开口处用棉签辅助 PE10 导管插入相应肾动脉,推注对比剂证实导管在肾动脉内,推注 BMSC 细胞悬液。术毕,逐层缝合大鼠颈部及腹部切口,切口处滴上少量抗生素预防感染,待大鼠清醒后归笼);取等量 BMSC 细胞经尾静脉穿刺注入 V 组大鼠。N 组及 C 组大鼠经尾静脉注入等量 L-DMEM 培养液。

### 1.5 观察指标

实验观察指标:①血尿素氮、血肌酐、24 h 尿蛋白和 24 h 尿微量蛋白。分别于末次 BMSC 移植后即日(0 周)、1 周、2 周将大鼠放入单只代谢笼,收集 24 h 尿液和经眼内眦取血,采用全自动生化仪检测大鼠上述指标。②BMSC 移植后分布。末次移植后 1 周,每周处死各组大鼠各 4 只,取肾组织,直接放液氮冻存;用光学相干层析成像(OCT)包埋机-20℃包埋,作冰冻切片,厚度约为 6  $\mu$ m,缓冲甘油封片后置于激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用重复测量资料方差分析,各组间两两比较用 LSD-*t* 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BMSC 纯化和鉴定

取传代至 P4 至 P6 的 BMSC 作流式细胞仪表型鉴定,表面标志为 CD44、CD29、CD11b、CD4 的阳性率分别为 98.6%、96.9%、1.9%、2.2%。经 Ad5/F35 腺病毒转染,换等量全培养液培养 24 h,绿色荧光表达率为 75%,细胞呈多角形,且与正常培养细胞无明显差异。

### 2.2 BMSC 移植结果

在各个观察时间点,A 组、V 组、C 组血尿素氮、血肌酐、24 h 尿蛋白及 24 h 尿微量蛋白水平均明显高于 N 组( $P < 0.01$ )。0 周时 A 组、V 组 24 h 尿蛋

白和血肌酐较 C 组无明显改善,且 1 周时 V 组血肌酐与 C 组相比并无明显改善,A 组却改善明显( $P<0.01$ )。1 周时 A 组、V 组 24 h 尿蛋白及 24 h 微量蛋白均低于 C 组( $P<0.01$ ),且 A 组较 V 组明显下降。2 周时 V 组血肌酐与 C 组相比略有下降,但差异无统计学意义,而 A 组血肌酐均比 C 组及 V 组低( $P<0.01$ );A 组、V 组 24 h 尿蛋白和 24 h 微量蛋白

仍均低于 C 组,但差异无统计学意义(表 1)。

### 2.3 BMSC 移植后肾组织分布

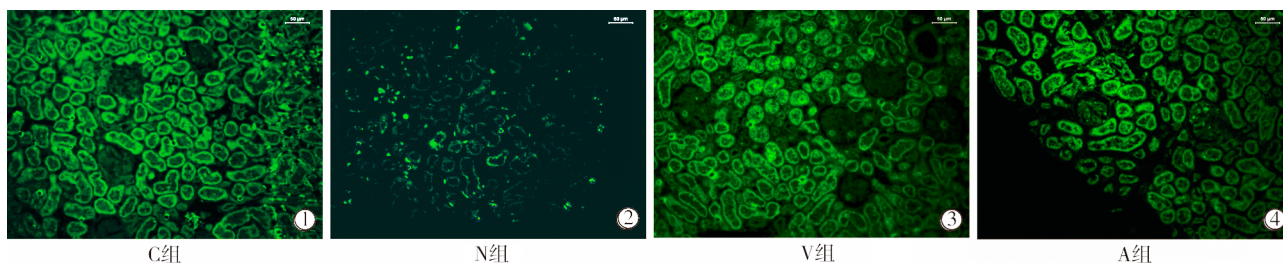
移植后第 2 周末,激光共聚焦显微镜检查显示,N 组、C 组几乎无 BMSC 分布(图 1①②);V 组可见 BMSC 分布于肾小管周围,肾小球内未见分布(图 1③);A 组肾小球及肾小管区域均有 BMSC 分布(图 1④)。

表 1 BMSC 移植后各组大鼠血尿素氮、血肌酐、24 h 尿蛋白及 24 h 尿微量蛋白对比

$\bar{x}\pm s$

组别	血尿素氮/(mmol/L)			血肌酐/( $\mu$ mol/L)		
	0 周	1 周	2 周	0 周	1 周	2 周
N 组( $n=12$ )	2.50 $\pm$ 0.39	2.14 $\pm$ 0.23	2.55 $\pm$ 0.42	33.25 $\pm$ 4.67	34.50 $\pm$ 3.92	33.25 $\pm$ 4.03
C 组( $n=12$ )	6.49 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	7.17 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	6.67 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	76.50 $\pm$ 6.61 <sup>a</sup>	90.42 $\pm$ 6.92 <sup>a</sup>	101.78 $\pm$ 10.68 <sup>a</sup>
A 组( $n=12$ )	6.39 $\pm$ 0.46 <sup>abc</sup>	5.44 $\pm$ 0.46 <sup>abc</sup>	6.28 $\pm$ 0.43 <sup>abc</sup>	73.67 $\pm$ 5.74 <sup>abc</sup>	87.25 $\pm$ 6.27 <sup>abc</sup>	99.58 $\pm$ 9.83 <sup>abc</sup>
V 组( $n=12$ )	5.66 $\pm$ 0.43 <sup>ab</sup>	3.50 $\pm$ 0.80 <sup>ab</sup>	5.44 $\pm$ 0.31 <sup>ab</sup>	72.58 $\pm$ 4.74 <sup>ab</sup>	70.33 $\pm$ 8.36 <sup>ab</sup>	89.75 $\pm$ 2.80 <sup>ab</sup>
F 值 <sub>时间</sub>		22.715			84.932	
F 值 <sub>组间</sub>		331.543			506.138	
F 值 <sub>交互</sub>		11.529			13.789	
组别	24 h 尿蛋白/(mg/L)			24 h 尿微量蛋白(ng/L)		
	0 周	1 周	2 周	0 周	1 周	2 周
N 组( $n=12$ )	25.83 $\pm$ 1.92	25.81 $\pm$ 1.72	26.1 $\pm$ 1.62	23.41 $\pm$ 1.83	25.28 $\pm$ 1.30	24.93 $\pm$ 1.26
C 组( $n=12$ )	46.02 $\pm$ 3.07 <sup>a</sup>	54.93 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	49.41 $\pm$ 3.20 <sup>a</sup>	46.32 $\pm$ 2.20 <sup>a</sup>	56.62 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	42.32 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup>
A 组( $n=12$ )	46.15 $\pm$ 2.98 <sup>abc</sup>	39.29 $\pm$ 2.34 <sup>abc</sup>	39.63 $\pm$ 2.87 <sup>abc</sup>	44.58 $\pm$ 3.26 <sup>abc</sup>	34.98 $\pm$ 2.09 <sup>abc</sup>	37.88 $\pm$ 1.17 <sup>abc</sup>
V 组( $n=12$ )	46.49 $\pm$ 2.29 <sup>ab</sup>	30.42 $\pm$ 2.59 <sup>ab</sup>	37.33 $\pm$ 3.21 <sup>ab</sup>	43.17 $\pm$ 3.33 <sup>ab</sup>	31.57 $\pm$ 1.97 <sup>ab</sup>	36.89 $\pm$ 1.24 <sup>ab</sup>
F 值 <sub>时间</sub>		25.845			48.058	
F 值 <sub>组间</sub>		564.179			808.929	
F 值 <sub>交互</sub>		51.492			70.765	

注:<sup>a</sup>与 N 组比较, $P<0.01$ ;<sup>b</sup>与 C 组比较, $P<0.01$ ;<sup>c</sup>与 V 组比较, $P<0.01$



①②C 组、N 组上无绿色荧光;③V 组在肾小管上有绿色荧光;④A 组在肾小管和肾小球上均有绿色荧光

图 1 激光共聚焦显微镜下绿色荧光蛋白标记 BMSC 在肾脏分布情况

### 3 讨论

机体组织受损伤时,具有多向分化潜能并能够产生多种细胞因子和生长因子的 BMSC,能够迁移并定植于受损部位,参与损伤修复。已有不同研究证实,BMSC 在治疗动物慢性肾损伤方面有着重要作用。

目前在实验研究选择 BMSC 移植方式上,有大鼠肾脏局部移植<sup>[4]</sup>、大鼠静脉移植<sup>[5]</sup>及大鼠肾动脉移植等。Cheng 等<sup>[6]</sup>在局部移植研究中发现,经腹腔内和肾包膜下移植的 BMSC 不能迁移至受损伤部位。目前应用最多的静脉移植,主要包括尾静脉移植<sup>[7]</sup>和下腔静脉移植<sup>[8]</sup>。通过静脉移植途径,国内外学者均证明在损伤较为明显的皮髓质交界部位的肾小管和肾间质内发现有标记的 BMSC<sup>[9-12]</sup>。影响

BMSC 经静脉途径移植治疗作用的一个重要因素是 BMSC 归巢问题。然而目前对 BMSC 归巢机制并不明确,且经静脉注入的 BMSC 归巢后也很少在肾小球内定植,这对促进肾脏祖细胞再生、保护肾功能的影响不能忽视<sup>[13]</sup>。目前经肾动脉途径移植报道有限。本研究通过对比尾静脉与肾动脉两种途径移植 BMSC 治疗 SD 大鼠慢性肾病,发现末次移植 1 周后 A 组、V 组在 24 h 尿蛋白、24 h 微量蛋白 2 个指标上与 C 组相比明显下降,且以 A 组效果显著,同时 A 组血肌酐水平相比 V 组、C 组明显下降,这一结果在末次移植后第 2 周还存在;表明在一段时间内,经肾动脉途径移植 BMSC 的治疗效果优于经尾静脉途径。此外,经绿色荧光标记的 BMSC 在 A

组末次移植后 11 d 即可在 SD 大鼠肾脏肾小球和肾小管内观察到,而 V 组则于第 2 周末才能在肾小管内观察到,提示 BMSC 经肾动脉移植与经静脉移植相比,能够在相对短时间内将较多数量 BMSC 集中至受损部位,并可能同时对肾小球及肾小管发挥相应的修复作用。

综上所述,对于 BMSC 移植治疗,外源 BMSC 移植途径能直接影响归巢至靶器官的 BMSC 数量,并关系到 BMSC 对受损器官的治疗效果<sup>[14]</sup>。经肾动脉移植途径移植能够准确快速地将 BMSC 送至靶器官,不仅可避免归巢途中诸如在肺脏及肝脏毛细血管床上滞留等不利情况,而且还能在靶器官内获得必要的营养成分而取得更好的治疗效果<sup>[15-16]</sup>。因此,经肾动脉途径移植 BMSC 既提高归巢效率,又提高对损伤组织的修复作用。但本实验未涉及 BMSC 治疗慢性肾病分子机制、信号通路等方面研究,有待于进一步实验研究探索。

#### [参 考 文 献]

- [1] 王共先,符彦基. 骨髓间充质干细胞移植修复肾损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12: 7422-7426.
- [2] 边晓慧,赵桂锋,孙立,等. 骨髓间充质干细胞延缓大鼠残肾模型肾纤维化的研究[J]. 中国医科大学学报, 2014, 43: 131-135.
- [3] 刘韵璐,廖志航,陈东辉,等. 两种造模方法致大鼠实验性肾病模型的肾功能及病理变化比较[J]. 中药药理与临床, 2011, 27: 117-119.
- [4] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. J Neurol Sci, 2001, 189: 49-57.
- [5] 刘楠梅,程劲,黄健,等. CXCR4 基因修饰对骨髓间充质干细胞向急性肾损伤微环境定向迁移的放大效应及机制[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2013, 22: 118-124.
- [6] Cheng K, Rai P, Plagov A, et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms[J]. Exp Mol Pathol, 2013, 94: 466-473.
- [7] 胡红林,邹丛,习小庆,等. 骨髓间充质干细胞治疗肾缺血再灌注损伤的免疫调节机制[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18: 5977-5982.
- [8] Wu J, Sun J, Sun HS, et al. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats[J]. Cell Transplant, 2008, 16: 993-1005.
- [9] 孙军辉,滕皋军. 干细胞移植治疗终末期肾病的实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2006, 15: 632-635.
- [10] 李维,冯江敏,邹杰,等. 骨髓源性干细胞移植对慢性马兜铃酸肾病大鼠的治疗作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2007, 23: 336-337.
- [11] Li W, Jiang H, Feng JM, et al. Isogenic mesenchymal stem cells transplantation improves a rat model of chronic aristolochic acid nephropathy via up-regulation of hepatic growth factor and down-regulation of transforming growth factor  $\beta 1$  [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 368: 137-145.
- [12] 边晓慧,何平,孙广萍,等. 慢性肾衰竭模型中透明质酸和 CD44 对骨髓间充质干细胞归巢及修复作用的影响[J]. 中国全科医学, 2014, 17: 2103-2108.
- [13] 盖维,戴春,吕昌云. 骨髓间充质干细胞对糖尿病肾病大鼠足细胞相关分子 nephrin 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15: 600-602.
- [14] 程庆,白志明. 骨髓间充质干细胞归巢研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2001, 21: 1105-1108.
- [15] Ruan GP, Han YB, Wang TH, et al. Comparative study among three different methods of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation following cerebral infection in rat[J]. Neurol Res, 2013, 35: 212-220.
- [16] Mathiasen AB, Kastrup J. Non-invasive in-vivo imaging of stem cells after transplantation in cardiovascular tissue[J]. Theranostics, 2013, 3: 561-572.

(收稿日期:2016-07-07)

(本文编辑:边 信)