

·实验研究 Experimental research·

骨髓间充质干细胞不同途径输注对阿霉素肾病大鼠 AQP1、AQP2 表达的影响

韩磊, 张文卿, 孙寰, 陆发承, 简远熙, 邢艺苑, 王家平

【摘要】目的 评估骨髓间充质干细胞(MSC)分别通过肾动脉和尾静脉移植方式对大鼠慢性肾病(CKD)模型肾损伤修复的疗效,比较不同移植方式对CKD大鼠水通道蛋白(AQP)1、AQP2表达差异的影响。**方法** 实验取50只大鼠,2只制备骨髓MSC;36只经尾静脉输注阿霉素构建CKD模型,随机分为阿霉素CKD(A-C)组($n=12$)、骨髓MSC经肾动脉输注(M-A)组($n=12$)、骨髓MSC经尾静脉输注(M-V)组($n=12$);另12只为正常对照(N)组。末次骨髓MSC移植隔1周后检测大鼠24 h尿量、24 h尿蛋白定量、血清钠及血清白蛋白,免疫组化检测肾组织AQP1、AQP2表达。**结果** 与A-C组相比,M-V组、M-A组大鼠血清白蛋白及24 h尿量均增高($P<0.05$),24 h尿蛋白及血清钠水平均降低($P<0.05$),M-A组24 h尿蛋白较M-V组降低更明显($P<0.05$)。M-V组、M-A组大鼠肾脏AQP1、AQP2表达均较A-C组降低($P<0.05$),M-V组、M-A组间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 骨髓MSC移植可增加血清白蛋白,降低尿蛋白、血清钠和肾实质细胞内AQP1、AQP2表达,对修复阿霉素CKD大鼠肾损伤有作用。在一定时间内肾动脉途径移植效果优于外周静脉途径,但两种移植途径的效果差异与AQP1、AQP2表达无明显关联。

【关键词】 骨髓间充质干细胞;移植途径;阿霉素肾病;AQP1;AQP2

中图分类号:R344.1 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2017)-11-1015-05

Influence of infusion of mesenchymal stem cells by different routes on the expression of AQP1 and AQP2 in rats with adriamycin-induced nephropathy HAN Lei, ZHANG Wenqing, SUN Huan, LU Facheng, JIAN Yuanxi, XIN Yiyuan, WANG Jiaping. Department of Radiology, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan Province 650101, China

Corresponding author: WANG Jiaping, E-mail: jiapingwang12@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cell (MSC) infusion transplantation via renal artery and via caudal vein in treating chronic kidney disease (CKD) in rats, and to compare the expressions of aquaporin1 (AQP1) and aquaporin2 (AQP2) between the two transplantation routes. **Methods** A total of 50 male SD rats were selected for this experiment. Two experimental rats were used to make preparation of bone marrow MSC. CKD model was established with infusion of adriamycin via caudal vein in 36 rats. The 36 CKD models were randomly divided into adriamycin-induced renal failure model control group (A-C group, $n=12$), MSC transplantation through the right renal artery group (M-A group, $n=12$) and MSC transplantation through the caudal vein group (M-V group, $n=12$). The remaining 12 male SD rats were used as the blank control group (N group). One week after the last bone marrow MSC transplantation, the 24 h urine volume, 24 h urinary protein content, serum sodium content and serum albumin level were measured, and AQP1 and AQP2 expressions in the kidney tissue were determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with A-C group, the serum albumin level and 24h urine volume in both M-V group and M-A group were significantly increased ($P<0.05$), while 24h urinary protein content and serum sodium content were remarkably decreased ($P<0.05$). The 24h urinary protein content in

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.11.012

基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项项目(2017FE467)、云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(2017HB037)

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: jiapingwang12@163.com

the M-A group was obviously lower than that in the M-V group ($P<0.05$). The AQP1 and AQP2 expressions in the kidney tissue in both M-V group and M-A group were strikingly lower than those in the A-C group ($P<0.05$), but no statistically significant differences in AQP1 and AQP2 expressions existed between the M-V group and the M-A group ($P>0.05$). **Conclusion** MSC transplantation can increase serum albumin, and lower urinary protein, serum sodium and the expressions of AQP1 and AQP2 in renal parenchymal cells, which has the effect on repairing renal injury of adriamycin-induced CKD rats. For a given period of time, the clinical curative effect of MSC transplantation via renal artery is better than that of MSC transplantation via peripheral vein, but the difference in curative effect between the two MSC transplantation pathways has no obvious correlation with AQP1 and AQP2 expressions. (J Intervent Radiol, 2017, 26: 1015-1019)

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cell; transplantation pathway; adriamycin-induced nephropathy; aquaporin1; aquaporin2

慢性肾病(CKD)患病率高,治疗手段有限,目前仍为维持性透析与肾移植。随着再生医学发展,骨髓间充质干细胞(MSC)移植逐渐为CKD治疗提供了新策略^[1]。但采用不同移植途径对于改善肾功能、延缓肾间质纤维化、促进肾间质及肾小管上皮细胞生长的疗效差异仍不明确。水通道蛋白(aquaporins, AQP)是一类广泛分布于各种组织细胞、具特异性孔道的快速转运水分子^[2]。研究显示AQP1、AQP2主要分布于肾组织,在尿液浓缩中发挥重要功能^[3]。AQP在病损肾实质细胞内高表达,但国内外相关研究对于不同方式输注骨髓MSC是否调控AQP1、AQP2表达,从而影响肾功能尚不明确。本实验旨在评估不同输注方式移植骨髓MSC对阿霉素肾病大鼠的治疗效果及对AQP1、AQP2表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

取50只12周龄清洁级成年雄性Sprague-Dawley大鼠(昆明医科大学动物房提供),体重(120 ± 10)g;2只用作骨髓MSC制备,36只实验用,12只作为正常对照。主要试剂:L-DMEM培养基(上海卡迈舒公司)、胎牛血清(FBS)(中国医学科学院生物工程研究所)、阿霉素(美国Sigma公司)、AQP1一抗、AQP2一抗(美国Santa公司)。

1.2 骨髓MSC体外培养、低氧处理及标记

随机选取2只大鼠股骨及胫腓骨,收集骨髓细胞,流式细胞技术分析细胞表面抗原。体外培养骨髓MSC(代次:P4),观察细胞生长至融合度达80%时予以48h缺氧处理($2\%O_2+93\%N_2+5\%CO_2$),用AD5/F35-增强型绿色荧光蛋白(EGFP)转染,6h后加等量L-DMEM培养基继续培养1d,倒置相差显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)表达。

1.3 模型建立及动物分组

实验组大鼠全身麻醉下切除左肾,经尾静脉注入2.5 ml/kg阿霉素,自然清醒;1周后再次尾静脉注入等量阿霉素,连续2周;建模成功标准为血内生肌酐、尿素氮升高和血红蛋白含量较正常值下降。36只大鼠建模成功,平均时间约为8周,分为阿霉素CKD(A-C)组、骨髓MSC经肾动脉输注(M-A)组、骨髓MSC经尾静脉输注(M-V)组,每组12只。另12只大鼠为正常对照(N)组,在其余3组注射阿霉素时予尾静脉注入等量0.9%氯化钠溶液。将异体大鼠 2×10^6 个/ml骨髓MSC由尾静脉移植至M-V组,同样数目骨髓MSC由肾动脉途径移植至M-A组。首次骨髓MSC输注后第2周,用同样方法进行第2次移植。其余两组尾静脉注入等量等频L-DMEM培养基。

1.4 样本收集及检测

血、尿标本收集及检测:末次骨髓MSC移植隔1周后,大鼠置于单只代谢笼内,采集24h尿后行割尾取血。采用全自动生化仪检测其24h尿量及尿蛋白定量、血清钠及血清白蛋白。

免疫组化染色检测肾组织AQP1、AQP2表达:各组大鼠于血尿标本收集(末次骨髓MSC移植后2周)后处死,取肾组织液氮冻存,制冰冻切片(厚度约为5 μm),4%多聚甲醛固定,用一抗和生物素化二抗(IgG)进行免疫组化染色,检测肾组织AQP1、AQP2表达,电镜观察细胞质和细胞膜形态变化,其中棕色颗粒代表阳性组织相,磷酸缓冲液(PBS)取代一抗用作阴性对比,显微照相($100\times$),Image-Pro Plus 6.0分析软件求出阳性细胞区域内颗粒平均光密度值。

1.5 统计分析

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。组间比较用单因素方差分析,各组多重比较用最小显著性差

异检验。 $\alpha=0.05$ 作为本实验统计学检验水准。

2 结果

2.1 血清及尿液检验

大鼠末次骨髓 MSC 移植后隔 1 周检测 24 h 尿量、24 h 尿蛋白定量、血清钠及血清白蛋白变化结果显示, A-C 组、M-V 组、M-A 组尿蛋白定量高于 N 组 ($P<0.05$), 24 h 尿量较 N 组低 ($P<0.05$); M-V 组、M-A 组 24 h 尿量较 A-C 组有明显提高 ($P<0.05$), 同时 24 h 尿蛋白定量仍比 A-C 组有显著降低 ($P<0.05$), 尤其是 M-A 组 24 h 尿蛋白定量较 M-V 组显著降低 ($P<0.05$); A-C 组、M-V 组、M-A 组血清白蛋白较 N 组显著下降 ($P<0.05$), 其中骨髓 MSC 输

注后血清白蛋白均较 A-C 组明显上升 ($P<0.05$), 但 M-V 组、M-A 组间差异无统计学意义 ($P>0.05$); A-C 组、M-V 组、M-A 组血清钠水平较 N 组明显升高 ($P<0.05$), 其中 M-V 组、M-A 组血清钠水平平均比 A-C 组降低 ($P<0.05$), 但 M-V 组、M-A 组间差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

2.2 肾细胞 AQP1、AQP2 平均光密度

末次骨髓 MSC 移植后第 2 周检测 AQP1、AQP2 表达, 细胞内棕色颗粒提示阳性组织相, 结果显示 AQP1、AQP2 表达在 A-C 组比 N 组明显增强 ($P<0.05$), M-V 组、M-A 组表达均较 A-C 组降低 ($P<0.05$), M-V 组、M-A 组间差异无统计学意义 ($P<0.05$), 见图 1、表 2。

表 1 4 组大鼠血清及尿液检验结果变化

组别	24 h 尿量/ml	24 h 尿蛋白定量/mg	血清钠/(mmol/L)	血清白蛋白/(g/L)
N 组 (n=12)	20.76±0.82	25.76±2.34	137.97±1.12	32.43±1.49
A-C 组 (n=12)	13.92±0.34 ^a	49.14±2.21 ^a	141.64±0.75 ^a	21.88±1.54 ^a
M-V 组 (n=12)	15.87±0.21 ^{a,b}	40.35±2.62 ^{a,b}	138.95±0.24 ^{a,b}	23.52±1.27 ^{a,b}
M-A 组 (n=12)	15.95±0.17 ^{a,b}	37.92±2.98 ^{a,b,c}	138.83±0.32 ^{a,b}	23.88±1.40 ^{a,b}

注: ^a 与 N 组相比, $P<0.05$; ^b 与 A-C 组相比, $P<0.05$; ^c 与 M-V 组相比, $P<0.05$

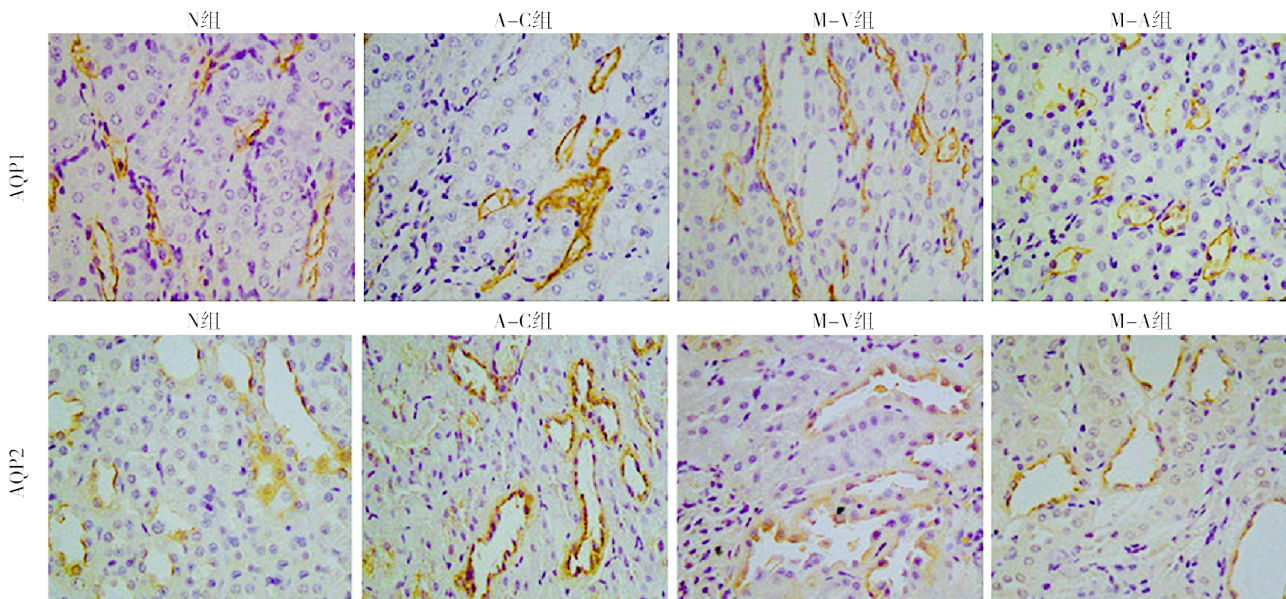


图 1 AQP1、AQP2 在各组大鼠肾实质细胞内的免疫组化染色比较 (×100)

表 2 AQP1、AQP2 在各组肾脏标本中的平均光密度 $\bar{x} \pm s$

组别	AQP1	AQP2
N 组 (n=12)	0.22±0.02	0.20±0.01
A-C 组 (n=12)	0.35±0.01 ^a	0.32±0.02 ^a
M-V 组 (n=12)	0.33±0.02 ^{a,b}	0.30±0.02 ^{a,b}
M-A 组 (n=12)	0.32±0.01 ^{a,b}	0.30±0.01 ^{a,b}

注: ^a 与 N 组比较, $P<0.05$; ^b 与 A-C 组比较, $P<0.05$

3 讨论

CKD 在病理上是不可逆性改变, 结局为终末期肾病, 已成为世界各国面临的重大生命健康问题。

目前对 CKD 治疗有一定局限性, 急需创新、有效的治疗方法加以改进^[4]。阿霉素诱导动物 CKD 病变同人体慢性局灶节段性肾小球硬化类似, 是目前公认能较好地模拟人体 CKD 的动物模型^[5]。国内外研究表明, 随着细胞生物学技术发展, 骨髓 MSC 作为一种具有多向分化潜能的多能干细胞, 可促进损伤肾脏血管新生和内皮组织细胞修复, 在 CKD 治疗中具有广泛的应用前景, 受到越来越多学者关注。但骨髓 MSC 对肾脏的修复作用仍有待深入研究^[6-7]。前期相

关研究提出,骨髓 MSC 对肾脏的修复作用与移植方式有关^[8]。当前骨髓 MSC 移植在 CKD 方面的研究结果不尽相同,有关细胞移植方式(局部、动脉和静脉途径输注等)的研究报道有限,在移植方式选择上存在较大争议。Cheng 等^[9]研究发现,经腹腔内和肾包膜下移植的骨髓 MSC 未迁移至受损部位,无助于改善治疗效果。白彝华等^[8]在 CKD 大鼠体内,依次通过尾静脉、肾动脉输注骨髓 MSC,发现肾动脉输注 MSC 组大鼠肾内出现炎症反应较轻微,肾功能恢复较快。谢周滔等^[10]经动脉及静脉输注小鼠骨髓 MSC 后,虽然 2 种术式均能改善肾功能受损,但经静脉途径输注的创伤较小,治疗效果更优。Zhang 等^[11]研究提示,静脉途径虽操作简便、安全,但所输注 MSC 大部分归巢于肺而不是受损的肾脏。因此,骨髓 MSC 移植通过何种途径能较好改善 CKD 大鼠肾功能及其在不同移植途径中的作用机制,有待进一步研究。

本实验结果显示 A-C 组与 N 组相比血清白蛋白显著下降,24 h 尿蛋白定量显著增高,提示阿霉素诱导下 A-C 组大鼠肾功能受损,CKD 进展过程中血清白蛋白以尿蛋白形式通过尿液排泄途径丢失;骨髓 MSC 移植后,M-V 组、M-A 组血清白蛋白均较 A-C 组显著增高,24 h 尿蛋白定量也均较 A-C 组显著降低,说明骨髓 MSC 输注可减轻阿霉素 CKD 大鼠尿中蛋白丢失,减少血清白蛋白流失;A-C 组与 N 组相比血清钠明显增高,尿量明显减少,输注骨髓 MSC 后 M-V 组、M-A 组血清钠比 A-C 组显著减少,24 h 尿量较 A-C 组明显增多,尤其是 M-A 组 24 h 尿蛋白定量较 M-V 组显著降低,均表明移植骨髓 MSC 于受损肾小管可促进肾功能改善,且经肾动脉途径可较短时间内归巢较多数量骨髓 MSC 至肾脏受损部位,有助于骨髓 MSC 治疗阿霉素 CKD,这与 Cai 等^[12]研究结果一致。但对骨髓 MSC 不同移植方式治疗 CKD 效果差异所涉及病理生理学机制,仍需进一步研究。

CKD 患者易发生尿排泄障碍所致水钠潴留,AQP 在调节机体水平衡和维持内稳态过程中意义重大^[13],因此高表达于肾实质内,同时在病损肾中有明显改变的 AQP 得到广泛关注。AQP1 通常存在于近端肾小管及髓襻降支细段,其重吸收功能与小管基底膜外侧的高渗透压相关^[14];AQP2 通常分布于肾脏集合管,遗传变异所致 AQP2 缺失会发生尿崩症^[15]。国内外研究显示 AQP1、AQP2 下调可降低肾小管对液体的重吸收能力,导致终末期肾病^[16-17]。

本实验检测结果显示,A-C 组大鼠肾组织 AQP1、AQP2 表达均比 N 组上升,提示阿霉素 CKD 模型大鼠水、电解质平衡紊乱与肾小管中 AQP1、AQP2 表达上调有关;M-V 组、M-A 组 AQP1、AQP2 表达均较 A-C 组降低,考虑与骨髓 MSC 移植下调阿霉素 CKD 模型大鼠肾小管中 AQP1、AQP2 表达,从而减轻大鼠水、钠潴留有关,这与 Rodrigues 等^[18]研究结果一致。AQP1、AQP2 免疫组化检测显示,M-A 组平均光密度值较 M-V 组稍低,但差异无统计学意义,推测两种骨髓 MSC 移植途径对受损肾脏肾小管和肾间质的影响无明显差异。

综上所述,骨髓 MSC 移植可促进阿霉素 CKD 大鼠肾损伤修复,并在一定时间内肾动脉途径移植效果优于外周静脉途径;骨髓 MSC 移植可是能通过下调大鼠 AQP1、AQP2 过度表达减轻钠潴留,但在下调 AQP1、AQP2 表达上,两种移植途径间差异无统计学意义。虽然本实验中血、尿标本数据显示肾动脉移植效果优于外周静脉移植,但两种不同途径移植骨髓 MSC 的效果差异与 AQP1、AQP2 表达无明显关联。本实验尚属初步研究,随着骨髓 MSC 治疗 CKD 新技术不断发展,AQP 影响 CKD 修复功能及其分子机制有待进一步深入探索与完善。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] Anan HH, Zidan RA, Shaheen MA, et al. Therapeutic efficacy of bone marrow derived mesenchymal stromal cells versus losartan on adriamycin-induced renal cortical injury in adult albino rats[J]. *Cytotherapy*, 2016, 18: 970-984.
- [3] 刘欣健,贾智明,文建国. 水通道蛋白-2 及其在肾脏疾病中的研究进展[J]. 现代泌尿外科杂志, 2015, 20: 914-918.
- [4] 赵雅培,刘翠景,杨翠英,等. 人尿源干细胞移植治疗慢性肾病大鼠[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20: 4838-4844.
- [5] Sarhan M, El Serougy H, Hussein AM, et al. Impact of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on adriamycin-induced chronic nephropathy[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92: 733-743.
- [6] Papadimou E, Morigi M, Iatropoulos P, et al. Direct reprogramming of human bone marrow stromal cells into functional renal cells using cell-free extracts[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4: 685-698.
- [7] 田红岸,余开湖,林凤平,等. 自体干细胞介入治疗糖尿病足临床效果观察[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25: 1040-1043.
- [8] 白彝华,王家平,王剑松,等. 不同输注途径移植骨髓间充质干细胞对阿霉素肾病大鼠疗效初探[J]. 天津医药, 2013, 41: 1180-1183.

- [9] 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.
- [10] 谢周滔, 王宇成, 冯 时, 等. 骨髓间充质干细胞经不同途径输注对肾缺血再灌注损伤的治疗效果比较[J]. *中华器官移植杂志*, 2015, 36: 600-605.
- [11] Zhang L, Li K, Liu X, et al. Repeated systemic administration of human adipose-derived stem cells attenuates overt diabetic nephropathy in rats[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22: 3074-3086.
- [12] Cai J, Yu X, Xu R, et al. Maximum efficacy of mesenchymal stem cells in rat model of renal ischemia-reperfusion injury: renal artery administration with optimal numbers[J]. *PLoS One*, 2014, 9: e101336.
- [13] Chen Z, Lu F, Fang H, et al. Effect of mesenchymal stem cells on renal injury in rats with severe acute pancreatitis[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238: 687-695.
- [14] Xing L, Wen JG, Frokiaer J, et al. Ontogeny of the mammalian kidney: expression of aquaporins 1, 2, 3, and 4[J]. *World J Pediatr*, 2014, 10: 306-312.
- [15] Holmes RP. The role of renal water channels in health and disease[J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33: 547-552.
- [16] Moeller HB, Fuglsang CH, Fenton RA. Renal aquaporins and water balance disorders[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2016, 30: 277-288.
- [17] Hussein AA, El-Dken ZH, Barakat N, et al. Renal ischaemia/reperfusion injury: possible role of aquaporins[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 204: 308-316.
- [18] Rodrigues CE, Capcha JM, de Bragança AC, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells protect against premature renal senescence resulting from oxidative stress in rats with acute kidney injury[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8: 19.

(收稿日期:2017-03-21)

(本文编辑:边 皓)

•病例报告 Case report•

国产经皮左心室隔离装置治疗心肌梗死后充血性心力衰竭 1 例

夏炜聪, 朱政斌, 丁风华, 陈 馨, 李佩佩, 虞林俊, 张瑞岩

【关键词】 经皮左心室重建术; 左心室隔离装置; 充血性心力衰竭

中图分类号:R528.1 文献标志码:D 文章编号:1008-794X(2017)-11-1019-03

Successful treatment of congestive heart failure due to myocardial infarction with homemade left ventricular partitioning device: report of one case XIA Weicong, ZHU Zhengbin, DING Fenghua, CHEN Xin, LI Peipei, YU Linjun, ZHANG Ruiyan. *Department of Cardiology, Affiliated Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China*

Corresponding author: ZHANG Ruiyan, E-mail: zhangruiyan@263.net (J Intervent Radiol, 2017, 26: 1019-1021)

【Key words】 percutaneous ventricular restoration; left ventricular partitioning device; congestive heart failure

临床资料

患者男, 52 岁。2 年前因突发胸痛当地医院诊断为“急性前壁心肌梗死”, 并于 1 周后行择期左前降支支架植入术, 术后予以阿司匹林、氯吡格雷、瑞舒伐他汀、美托洛尔、贝那普利和口服降糖药等治疗。术后患者时有阵发性心悸, 胸闷气

喘等症状, 于 2016 年 12 月 11 日入我院治疗。入院后超声心动图显示左室壁节段活动异常(广泛前壁), 心尖部室壁瘤形成, 心功能不全。患者既往有糖尿病史、高血压病史和吸烟史。患者此次入院初步诊断冠心病, 陈旧性广泛前壁心肌梗死伴室壁瘤形成, 心功能不全(NYHA III 级)。

患者术前完善常规实验室检测、心超及心脏 CT 检查, 符合行 PVR 术指征, 遂于入院后第 3 天行经皮左心室重建术。术前 2 周及术后 1 周、1 个月和 6 个月分别行超声心动图检查, 利用改良 Simpson 法测定左心室舒张末期容积(LVEDV)、左

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.11.013

作者单位: 200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院心脏科

通信作者: 张瑞岩 E-mail: zhangruiyan@263.net