

• 实验研究 Experimental research •

不同剂量骨髓间充质干细胞对阿霉素肾病大鼠肾纤维化形成的影响

杨 扬, 王家平, 白彝华, 李天祎, 李嘉琦, 张 娅

【摘要】 目的 探讨不同剂量骨髓间充质干细胞(BMSC)对阿霉素慢性肾病大鼠肾纤维化形成的影响及其作用机制。**方法** SD大鼠尾静脉注射阿霉素造模,首次剂量3 mg/kg,2周后相同剂量再次注射。造模成功后将大鼠随机分为M组(模型组,肾动脉注射磷酸缓冲液),A组、B组、C组(肾动脉分别移植 1×10^6 个/mL、 2×10^6 个/mL、 3×10^6 个/mL BMSC,细胞悬液均为0.5 mL),每组各9只。另取9只正常大鼠作为对照组(N组,尾静脉输注等量0.9%氯化钠溶液)。术后第4周测定各组大鼠体重,Masson染色评估肾纤维化程度,过碘酸六胺银(PASM)染色观察肾小球和肾小管基膜改变,免疫组化染色分析转化生长因子(TGF)- $\beta 1$ 、纤维连接蛋白(FN)表达。**结果** BMSC移植4周后,A、B、C组大鼠一般情况均较M组改善,体重改变最明显,体重增长变化为C组>B组>A组,但C组与B组差异无统计学意义($P>0.05$)。Masson染色显示M组表现为典型的肾小球和肾小管纤维化改变,肾组织大面积蓝染,A、B、C组虽也有不同程度肾纤维化改变,但程度和范围均较M组减少($P<0.05$)。PASM染色显示M组肾小球和肾小管基膜明显增厚,A、B、C组肾小球和肾小管基膜增厚程度下降($P<0.05$)。免疫组化染色显示A、B、C组肾组织不同部位TGF- $\beta 1$ 、FN表达与M组比较均下降,尤其是C组下降最明显,仅在部分肾小球和肾小管上皮细胞见少量弱阳性表达。**结论** BMSC移植治疗可延缓阿霉素慢性肾病大鼠早期肾纤维化形成,且该作用随细胞移植数量增加而增强。其机制可能是通过下调TGF- $\beta 1$ 表达抑制细胞外基质过度沉积实现的。

【关键词】 骨髓间充质干细胞;肾动脉;肾纤维化;转化生长因子- $\beta 1$

中图分类号:R692 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2020)-12-1222-05

Effect of different doses of bone marrow mesenchymal stem cells on renal fibrosis in experimental rats with adriamycin-induced nephropathy YANG Yang, WANG Jiaping, BAI Yihua, LI Tianyi, LI Jiaqi, ZHANG Ya. 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 explore the effect of different doses of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) on renal fibrosis in experimental rats with adriamycin-induced nephropathy and to discuss its mechanism. **Methods** A total of 36 adriamycin-induced nephropathy models of SD rat were established by injecting adriamycin via caudal vein, the initial dose of adriamycin was 3 mg/kg and the same dose was injected again after 2 weeks. After successful modeling, the experimental rats were randomly divided into model group (group M, $n=9$, renal injection of phosphate buffer solution), group A ($n=9$, renal injection 0.5 mL of 1×10^6 BMSC), group B ($n=9$, renal injection 0.5 mL of 2×10^6 BMSC) and group C ($n=9$, renal injection 0.5 mL of 3×10^6 BMSC). Other 9 healthy rats were used as control group (group N, injection 0.5 mL of saline via caudal vein). Four weeks after the treatment, the body weight of rats in all groups was measured, Masson staining was adopted to assess the degree of renal fibrosis, PASM staining was employed to observe the changes of renal glomeruli and tubular basement membrane, and immunohistochemical staining was used to test the expressions of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and fibronectin (FN). **Results** Four weeks after

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2020.12.010

基金项目:国家自然科学基金(81860144)、昆明医科大学研究生创新基金(2019S149)

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

BMSC transplantation, the general condition of experimental rats in group A, B and C was more improved than that in group M, and the change of body weight was the most obvious. The order of weight gain was group C > group B > group A, but the difference in body weight between group C and group B was not statistically significant ($P > 0.05$). Masson staining demonstrated that renal glomeruli and tubules showed typical fibrosis changes with large area blue staining of renal tissues in group M, although different degrees of renal fibrosis were observed in group A, group B and group C, their degree and extent were less prominent when compared with group M ($P < 0.05$). PASM staining showed that in group M both renal glomeruli and tubular basement membrane were remarkably thickened, while the degree of which in group A, group B and group C was much less ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining revealed that the expression levels of TGF- β 1 and FN in different parts of the kidney in group A, group B and group C were lower than those in group M, which was more obvious in group C as in the rats of group C only slightly and weakly positive expression could be observed in some renal glomeruli and tubular epithelial cells. **Conclusion** BMSC transplantation can delay the formation of early renal fibrosis in experimental rats with adriamycin-induced chronic nephropathy, and this effect is enhanced with the increase of the amount of transplanted BMSC. This mechanism may be achieved by down-regulating TGF- β 1 expression, resulting in inhibition of excessive deposition of extracellular matrix. (J Intervent Radiol, 2020, 29: 1222-1226)

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cell; renal artery; renal fibrosis; transforming growth factor- β 1

肾间质纤维化是慢性肾病进展至终末期肾病必经的共同病理途径^[1-2],也是加速疾病恶化的关键因素,使得慢性肾病患者肾脏结构发生不可逆病理改变,导致肾衰竭。目前许多研究表明,肾间质纤维化发生发展可能与缺氧、炎症反应、肾脏固有细胞损伤及促纤维化形成因子参与相关^[3-7],但具体机制尚未明确;针对肾间质纤维化的治疗手段有限,主要有抗炎、抗凋亡、调节细胞外基质(extracellular matrix, ECM)形成与降解等^[8-10],效果不理想。随着再生医学兴起,干细胞疗法展现出良好应用前景。有研究表明,脂肪干细胞在动物肾脏疾病模型中可延缓肾间质纤维化^[11-12]。本中心前期研究发现骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)对受损肾组织发挥积极的修复作用,能显著改善肾功能^[13]。本实验旨在研究 BMSC 对阿霉素慢性肾病大鼠肾纤维化形成的影响,并探索其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

47 只雄性清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由昆明医科大学实验动物中心提供(许可证号: SCXK 滇 K2015-0002)。2 只 4 周龄大鼠, 体质量 100~120 g, 用于 BMSC 体外分离培养。45 只 7 周龄大鼠, 体质量 (261 \pm 7.9) g, 其中 36 只用于阿霉素造模, 9 只作为正常对照。主要试剂和仪器: 低糖培养基、胎牛血清(FBS)(美国 Gibco 公司), 阿霉素(美

国 Sigma 公司), BMSC 成骨成脂诱导培养基(赛业苏州生物科技公司), 抗转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)抗体, 苏木精-伊红(HE)、Masson 和过碘酸六胺银(PASM)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技公司), Eclipse Ci 型光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 制备 BMSC

利用 BMSC 具有高度黏附于塑料细胞培养瓶特性, 行体外分离培养。根据宫宇等^[14]报道方法, 无菌条件下取大鼠双侧股骨、胫骨, 磷酸缓冲液(PBS)冲洗骨髓腔, 收集冲洗液, 用 100 μ m 细胞筛过滤去除碎骨片等杂质, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用含 10% FBS、1% 青链霉素双抗和 0.1% 非必需氨基酸的低糖培养基重悬细胞, 接种至细胞培养瓶, 置于细胞孵箱中培养; 待细胞融合至 90%~100% 时予以消化传代, 取 P5 代细胞并用流式细胞仪行表面抗原鉴定, 行成骨成脂诱导分化。

1.3 实验动物造模与分组

36 只大鼠通过尾静脉注射阿霉素方式造模, 首次剂量 3 mg/kg, 间歇 2 周后, 相同剂量再次注射。血肌酐、血尿素氮值和 24 h 尿蛋白水平显著升高后处死大鼠, 取肾制作切片并行 HE 染色, 光镜下观察到肾脏结构符合慢性肾病改变提示造模成功^[15]。本实验中第 2 次注射阿霉素后 7 周左右成模。将造模成功大鼠随机分为 M 组(模型组)、A 组、B 组、C 组, 每组各 9 只; 另取 9 只健康大鼠作为正常对照组(N 组)。N 组大鼠尾静脉注射 0.9% 氯化钠溶液 0.5 mL;

A 组、B 组、C 组大鼠参照陆发承等^[16]介入操作方法,通过肾动脉途径分别移植 BMSC 悬液 0.5 mL,剂量分别 1×10^6 个/mL、 2×10^6 个/mL、 3×10^6 个/mL;M 组则经肾动脉输注等量 PBS。术后 4 周,处死各组大鼠,取肾组织固定备用。

1.4 主要观测指标

术后第 4 周,观察各组大鼠一般情况,如毛发、精神状态、活动度及体重改变等。处死大鼠取肾组织固定 24 h,石蜡包埋,制作 $5 \mu\text{m}$ 石蜡切片。Masson 染色分析各组大鼠肾脏纤维化情况,计算胶原纤维面积百分比,随机挑选各组肾组织切片,以 200 倍视野拍摄,蓝染胶原纤维为阳性信号,计算蓝染区域占整个面积百分比,评估纤维化程度。PASM 染色比较分析各组大鼠肾小球、肾小管基膜变化,基膜增厚为阳性区域,测量阳性面积占视野内组织面积百分比。免疫组化染色法观察分析 TGF- $\beta 1$ 和 FN 在肾组织不同部位分布情况与表达差异。

1.5 统计学分析

数据处理采用 SPSS 23.0 统计学软件。结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用方差分析,两两比较用最小显著性差异 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

阿霉素造模后大鼠精神状态差,毛发毛躁,缺

乏光泽,活动度下降,反应迟钝,食欲差,部分大鼠出现轻度腹泻现象,体重下降。肾动脉移植 BMSC 后,A、B、C 组大鼠食欲改善,精神状态好,活动灵敏,体重逐渐增加,C 组大鼠较 A、B 组改善明显,但各组间体重差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

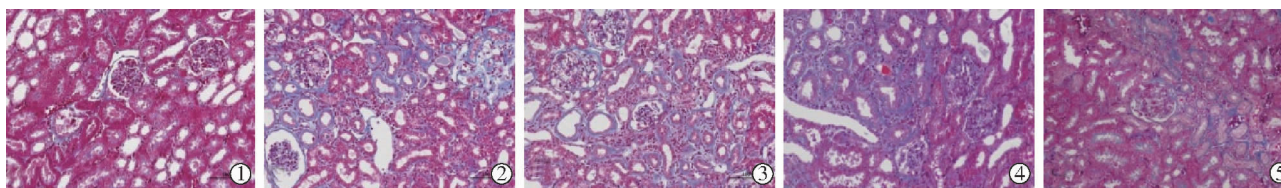
表 1 肾动脉移植 BMSC 后各组大鼠体重比较 $\text{g}, \bar{x} \pm s$

| 组别 | 移植前 | 移植后 2 周 | 移植后 4 周 |
|--------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| N 组($n=9$) | 298.33 \pm 25.04 | 301.56 \pm 25.67 | 302.56 \pm 23.10 |
| M 组($n=9$) | 272.78 \pm 17.77 ^a | 266.11 \pm 13.23 ^a | 266.33 \pm 14.57 ^a |
| A 组($n=9$) | 278.33 \pm 14.02 ^a | 279.67 \pm 13.02 ^a | 283.22 \pm 12.22 ^{ab} |
| B 组($n=9$) | 276.22 \pm 12.20 ^a | 280.22 \pm 11.58 ^a | 283.33 \pm 11.57 ^{ab} |
| C 组($n=9$) | 277.33 \pm 11.74 ^a | 280.11 \pm 11.00 ^a | 286.11 \pm 8.40 ^{ab} |

^a 与 N 组比较, $P < 0.05$;^b 与 M 组比较, $P < 0.05$

2.2 大鼠肾组织 Masson 染色与胶原纤维面积测量

N 组大鼠肾组织正常,肾小球囊周围和肾间质均未见着色。M 组大鼠肾小球囊扩张,间质增宽,部分区域失去正常肾脏结构,被纤维组织代替,呈大面积蓝染表现,大量肾小球囊及肾间质着色;A、B、C 组大鼠肾间质也存在不同程度增宽,但较 M 组窄,肾小球囊和肾间质呈不同程度着色改变,但较 M 组浅,着色程度为 M 组 $>$ A、B、C 组 $>$ N 组,见图 1。半定量结果经统计学分析显示,肾组织胶原纤维面积在 M 组较 N 组显著增大($P < 0.01$),A、B、C 组较 M 组缩小($P < 0.05$),且随着移植细胞增多呈减少趋势,其中 A 组胶原纤维面积大于 B、C 组($P < 0.05$),C 组纤维化改善情况较 B 组好,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。



①N 组;②M 组;③A 组;④B 组;⑤C 组

图 1 各组大鼠肾组织胶原纤维沉积比较(Masson 染色,20 \times)

表 2 肾组织胶原纤维、肾小球肾小管基膜增厚面积测量比较 $\%, \bar{x} \pm s$

| 组别 | 胶原纤维面积 | 基膜增厚面积 |
|--------------|---------------------------------|---------------------------------|
| N 组($n=9$) | 1.00 \pm 0.38 | 2.31 \pm 0.75 |
| M 组($n=9$) | 24.02 \pm 3.05 ^a | 16.46 \pm 2.98 ^a |
| A 组($n=9$) | 19.41 \pm 2.04 ^{ab} | 14.19 \pm 1.84 ^{ab} |
| B 组($n=9$) | 15.09 \pm 2.10 ^{abc} | 11.94 \pm 1.82 ^{abc} |
| C 组($n=9$) | 12.49 \pm 1.49 ^{abc} | 10.89 \pm 1.14 ^{abc} |

^a 与 N 组比较, $P < 0.01$;^b 与 M 组比较, $P < 0.05$;^c 与 A 组比较, $P < 0.05$

2.3 PASM 染色比较各组大鼠肾组织基膜改变

N 组肾小球基底膜、肾小管基膜未见增厚。M 组肾小球基底膜明显增厚,大量肾小管基膜增厚,

PASM 染色见大面积深染区域;A、B、C 组肾组织亦存在不同程度基膜增厚现象,其中以 A 组增厚明显,B、C 组增厚情况有所缓解,肾小管基膜增厚减少,部分肾小球基底膜增厚,见图 2。半定量结果分析显示,与 M 组相比,A、B、C 组肾小球基底膜、肾小管基膜增厚情况均有所改善($P < 0.05$),基膜增厚情况为 A 组 $>$ B 组 $>$ C 组,而 B 组与 C 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.4 肾组织 TGF- $\beta 1$ 表达情况

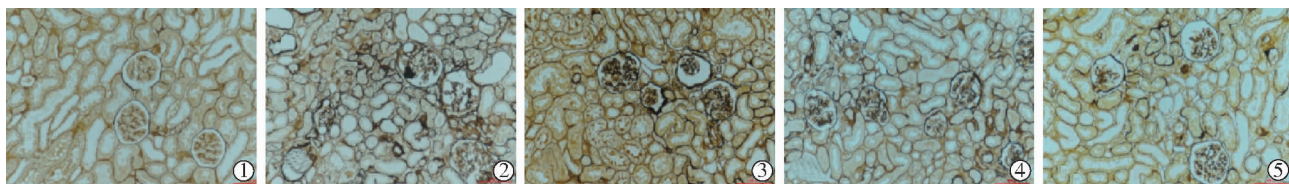
TGF- $\beta 1$ 在 N 组肾组织中不表达或弱阳性表达,在 M 组肾小球和肾小管间质、管腔中强阳性表

达,在 A、B、C 组肾小球、肾间质和肾小管管腔内弱阳性表达,且范围较 M 组小,见图 3。

2.5 肾组织 FN 表达情况

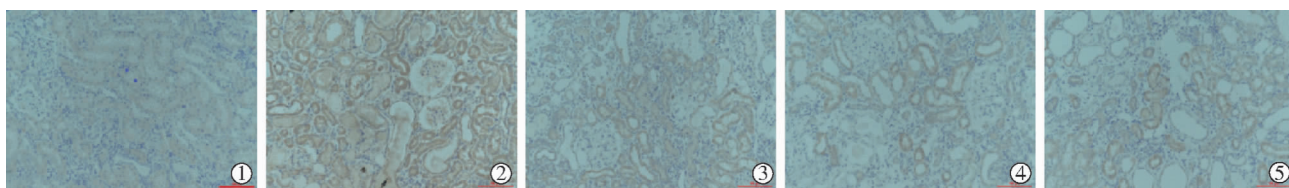
FN 在 N 组不表达或弱阳性表达,在 M 组肾小

球、肾小管管腔及上皮细胞中强阳性表达,在 A、B、C 组肾小球、肾小管上皮细胞中呈阳性或弱阳性表达,但与 M 组比较表达范围缩小,程度减弱,尤其以 C 组改善最为明显,见图 4。



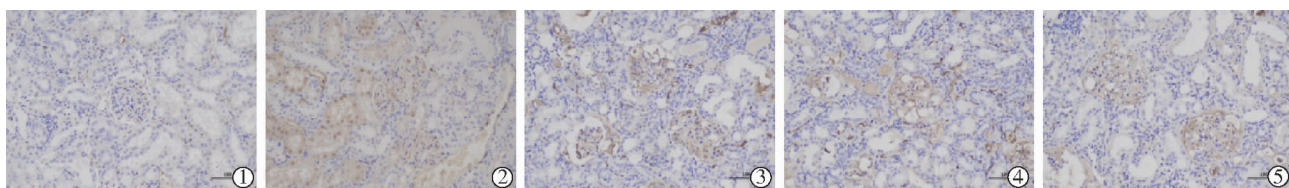
①N 组;②M 组;③A 组;④B 组;⑤C 组

图 2 各组大鼠肾小球肾小管基膜染色结果比较(PASM 染色,20×)



①N 组;②M 组;③A 组;④B 组;⑤C 组

图 3 各组大鼠肾组织不同部位 TGF-β1 表达比较(免疫组化染色,20×)



①N 组;②M 组;③A 组;④B 组;⑤C 组

图 4 各组大鼠肾组织不同部位 FN 表达比较(免疫组化染色,20×)

3 讨论

肾间质纤维化是 ECM 在肾小管和管周毛细血管间过度沉积导致,其特点是肾间质和肾小球均有毛细血管网破坏丢失及纤维状胶原沉积,因此间质纤维化程度被认为是慢性肾脏疾病病程进展的最佳预测因子^[17]。研究表明,病理条件下系膜细胞被激活而过度增殖,系膜细胞可分泌血管基质成分如 IV 型、V 型胶原蛋白、FN,使得 ECM 产生过多,导致肾间质纤维化和肾小球硬化,其中 FN 为 ECM 最主要组成成分,肾小球基底膜增厚则是肾小球硬化直接表现^[18]。

本研究采用 Masson 染色评估肾脏纤维化程度,免疫组化染色观察 FN 在肾组织不同部位表达,PASM 染色比较肾小球基底膜增厚情况。Masson 染色结果显示,阿霉素诱导 SD 大鼠肾组织发生肾小球和肾间质纤维化,M 组肾组织见大量肾小球和大面积肾间质蓝染,着色程度深,而经肾动脉移植不同剂量 BMSC 后,被蓝染的胶原纤维面积呈现减少趋势,着色浅,其中 A 组胶原纤维面积大于 B、C 组

($P < 0.05$),而 C 组纤维化改善情况较 B 组好,但两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示肾动脉移植 BMSC 能够延缓或抑制阿霉素慢性肾病大鼠肾组织纤维化发生发展,并随着移植 BMSC 数量增加而加强对肾脏纤维化的保护作用;免疫组化染色结果显示,M 组肾小球、肾小管管腔及上皮细胞中呈强阳性,A、B、C 组与 M 组相比肾小管管腔中几乎不表达,仅在部分肾小球和肾小管上皮细胞中呈阳性或弱阳性表达,尤其以 C 组改善最为明显($P < 0.05$),提示阿霉素诱导肾纤维化与 ECM 过度沉积有关,而肾动脉移植 BMSC 能减少肾组织尤其是肾小管中 ECM 过度沉积,改善肾间质纤维化;PASM 染色结果显示,M 组肾小球基底膜明显增厚,A、B、C 组与 M 组相比肾小球基底膜增厚情况均有所改善($P < 0.05$),提示肾动脉移植 BMSC 能减少肾小球中 ECM 过度沉积,缓解肾小球硬化。

关于肾脏纤维化形成机制的研究众多,目前较为一致的观点是,TGF-β 及其介导的 Smad 或非 Smad 信号通路导致纤维化。TGF-β1 是目前研究最

为明确的促纤维化因子,参与导致慢性肾脏病并进展至终末期肾病的动态病理过程,其可能通过以下方式促进肾脏纤维化:一是 TGF- β 1 直接诱导 ECM 形成;二是通过抑制基质金属蛋白酶(MMP)并诱导其拮抗剂基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP)显著抑制 ECM 降解,刺激 ECM 积累;三是诱导肾脏固有细胞(如肾小管上皮细胞)发生上皮-间质细胞转化(EMT),引起成纤维细胞增生,分泌产生大量 ECM;四是直接刺激肾脏系膜细胞增生,导致 ECM 过度沉积^[19-20]。本实验通过检测 TGF- β 1 表达变化探索阿霉素诱导肾纤维化的可能机制,结果发现高剂量(3×10^6 个/mL)BMSC 通过肾动脉移植后能明显改善大鼠一般情况,尤其对体重的恢复较为明显;与 M 组相比,A、B、C 组 TGF- β 1 在肾小球、肾间质及肾小管管腔内呈弱阳性表达,不仅程度较 M 组弱,且范围较 M 组小;提示 BMSC 延缓或抑制肾脏纤维化的作用,可能是通过下调 TGF- β 1 表达,从而抑制上述几种可能作用途径实现的。

综上所述,在以 ECM 过度沉积为特征的肾脏纤维化中,BMSC 对阿霉素诱导的早期肾纤维化形成具有积极的治疗作用,其机制可能是通过下调 TGF- β 1 表达减少 ECM 在肾组织不同部位沉积,进而发挥延缓或抑制肾脏纤维化的作用,而高剂量 BMSC 效果更为明显。

[参考文献]

- [1] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10: 493-503.
- [2] Meng XM. Inflammatory mediators and renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 381-406.
- [3] Li ZL, Liu BC. Hypoxia and renal tubulointerstitial fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 467-485.
- [4] Chen SF, Chen M. Complement activation in progression of chronic kidney disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 423-441.
- [5] Yang Z, He LJ, Sun SR. Role of endothelial cells in renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 145-163.
- [6] Zhao JH. Mesangial cells and renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 165-194.
- [7] Yin Q, Liu H. Connective tissue growth factor and renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 365-380.
- [8] Wang Z, Li S, Wang Y, et al. GDNF enhances the anti-inflammatory effect of human adipose-derived mesenchymal stem cell-based therapy in renal interstitial fibrosis[J]. *Stem Cell Res*, 2019, 41: 101605.
- [9] Yang H, Zhang WR, Xie TT, et al. Fluorofenidone inhibits apoptosis of renal tubular epithelial cells in rats with renal interstitial fibrosis[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52: e8772.
- [10] Liu F, Zhuang SG. New therapies for the treatment of renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 625-659.
- [11] 吕春燕,李娟. 干细胞治疗梗阻性肾病:研究现状与存在问题[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18:8184-8188.
- [12] 吕春燕,李进辉,刘伟伟,等. 不同剂量脂肪干细胞移植对早期肾纤维化形成的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21: 4685-4690.
- [13] 邢艺苑,王家平,陆发承,等. 骨髓间充质干细胞经肾动脉途径不同移植次数对大鼠阿霉素肾病的修复作用比较[J]. *介入放射学杂志*, 2017, 26:641-645.
- [14] 宫宇,王鸿飞,夏海军. 全骨髓贴壁接触培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18:51-56.
- [15] 白桦华,王家平,王剑松,等. 经肾动脉插管造影骨髓间充质干细胞移植对阿霉素肾病大鼠的影响[J]. *中国临床研究*, 2015, 28:702-705.
- [16] 陆发承,王家平,邢艺苑,等. 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[J]. *介入放射学杂志*, 2017, 26: 351-354.
- [17] Djurdjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis[J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 16-36.
- [18] Zhao JH. Mesangial cells and renal fibrosis [A]. *Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies*[M]. Berlin: Springer Link, 2019.
- [19] Ma TT, Meng XM. TGF- β /Smad and renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 347-364.
- [20] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12: 325-338.

(收稿日期:2020-02-02)

(本文编辑:边 皓)