论著

文章编号:1000-5404(2005)01-0016-04

小鼠骨髓源性干细胞迁移到缺血再灌注损伤肾脏内表达CK18和RCA的观察

代静澜,叶本兰 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察小鼠骨髓源性干细胞(bone marrow derived stem cells, BMSCs)在缺血再灌注(I/R)损伤肾脏内表达细胞角蛋白18(Cytokeratin 18, CK18)和蓖麻凝集素(Ricinus communis, RCA)的情况。**方法** 制备BALB/c雌鼠肾脏缺血再灌注损伤模型,亚致死剂量^{60}Co照射后通过尾静脉移植同系雄鼠骨髓细胞,于移植后不同时相点采用PCR检测受体鼠骨髓中Sry基因表达,免疫组化染色结合Y染色体荧光原位杂交(Y-FISH)观察受体肾脏中骨髓源性干细胞的分化情况。**结果** 骨髓移植15 d后,PCR检测到受体鼠骨髓中有Sry基因表达;骨髓移植30 d后,连续切片免疫组化染色结合Y-FISH观察到受体鼠肾脏中存在Y^+/$CK18^+$和Y^+/RCA^+细胞。**结论** 静脉移植的骨髓源性干细胞可迁移到I/R损伤肾脏,并在局部微环境诱导下表达肾小管上皮细胞的表型特征CK18和RCA。

关键词: 骨髓源性干细胞;缺血再灌注;肾小管上皮细胞

中图法分类号: R322.61; R329.21; R654.1 **文献标识码:** A

Roles of bone marrow-derived stem cells in regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice

DAI Jing-lan, YE Ben-lan (Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To test whether murine bone marrow-derived stem cells (BMSCs) can contribute to the regeneration of renal tubular epithelial cells after ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods** The female mice with bilateral I/R injured kidney received transplantation of bone marrow mononuclear cells isolated from homologous male mice *via* the tail vein after sublethal irradiation. After bone marrow transplantation (BMT), Sry expressions in the bone marrow of the recipient mice were detected by PCR. Serial-section analysis of Y chromosome fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry with CK18 or RCA were performed to observe the differentiation of bone marrow-derived stem cells in the I/R injured kidney. **Results** At 15 d after BMT, PCR analysis confirmed the presence of Sry gene expression in the bone marrow of the recipient mice. AT 30 d after BMT, Y^+/$CK18^+$ and Y^+/RCA^+ cells were detected in the renal tubules of the recipients. **Conclusion** The microenvironment of the injured kidney can induce BMSCs to differentiate into renal tubular epithelial cells which express CK18 or RCA and participate in the regeneration of the injured renal tubule. The results suggest the clinical potential of BMSCs in the cell replacement therapy for renal failure.

Key words: bone marrow-derived stem cell; ischemia reperfusion injury; renal tubular epithelial cell

近年的研究表明骨髓源性干细胞具有极强的可塑性,在适宜条件下可跨系统分化为多种组织细胞,如神经元、神经胶质细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、血管内皮细胞、肝细胞、多种上皮细胞(肺泡、食管、胃、结肠、胆管等)[1~5]。目前动物实验和一些临床病例采用骨髓源性干细胞移植治疗心肌梗塞,观察到干细胞可在梗塞区分化为心肌细胞和血管内皮细胞,促进局部心肌的再生和血管形成,显示其在损伤组织修复中的巨大潜力[6]。鉴于上述研究结果,本研究制备肾脏缺血再灌注损伤的动物模型,观察移植的骨髓源性干细胞迁移到损伤肾脏以及在局部表达CK18和RCA的情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康SPF级BALB/c小鼠35只,雌雄兼有,鼠龄6~8周,体质量(20±2) g,由第三军医大学实验动物中心提供。实验前3 d腹腔注射青霉素预防手术及照射后感染。

作者简介:代静澜(1972-),女,四川省宜宾市人,硕士研究生,助教,主要从事肾脏生理学方面的研究。电话:(023)68752254

收稿日期:2004-06-14;修回日期:2004-10-19

1.2　实验方法

1.2.1　小鼠肾脏缺血再灌注(I/R)损伤模型的制备　　采用 0.2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后，将雌性小鼠俯位固定于蛙板上，在背部中线两侧行 1.5～2.0 cm 切口，游离双侧肾蒂，采用无损伤动脉夹夹闭双侧肾蒂 30 min 后，恢复血流灌注，单层间断缝合切口。

1.2.2　小鼠骨髓单个核细胞的分离及培养　　同系 BALB/c 雄鼠颈椎脱臼处死后，取双侧股骨和胫骨，用 IMDM 培养基冲洗骨髓腔，获得骨髓细胞悬液。文献[7]报道小鼠骨髓单个核细胞比重范围较大，以分离液比重为 1.082 g/ml 时分离效果较佳，因此本实验分离液比重以此为据。采用密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞，IMDM 完全培养基原代培养 3 d。

1.2.3　细胞移植　　将培养液及悬浮细胞移入，再以 0.25%胰酶消化贴壁细胞，用 IMDM 培养基终止消化后一并移入离心管中，离心(800 r/min×5 min)洗涤 2 次。用 4 g/L 台盼蓝以 1∶10 体积比染色记数，检查细胞活力达 98%以上，调整骨髓单个核细胞悬液浓度，进行细胞移植。

BALB/c 雌鼠于缺血再灌注术后 2～3 h 装入有机玻璃分隔盒内，接受 7.0 Gy 剂量 ^{60}Co 照射，Co 源距小鼠中线距离 80 cm，剂量率 0.985 5 Gy/min。于 ^{60}Co 照射后 4 h 内通过尾静脉注射进行细胞移植，细胞数量为 1×10^7/只，移植的细胞悬液量为 0.3 ml/只[8]。

1.2.4　受体鼠骨髓中 Y 染色体检测　　①骨髓细胞 DNA 抽提：骨髓移植后 7、15、30、60 d 采集受体鼠骨髓细胞($n=5$)，以酚/氯仿抽提法提取和纯化基因 DNA。②PCR 检测 Sry 基因：小鼠 Y 染色体性别决定区(Sry)引物购于上海生物工程技术服务公司。Sry：Primer1：5′-ATT TAT GGT GTG GTC CCG-3′；Primer2：5′-GCT GTA AAA TGC CAC TCC-3′。PCR 扩增条件：96 ℃变性 6 min，加入 1 μl *Taq* 酶，开始 PCR 循环：94 ℃变性 60 s，52 ℃退火 60 s。72 ℃延伸 60 s，共 35 个循环。③用 0.5×TBE 制备 1.5%的琼脂糖凝胶，加入终浓度为 1.5 ng/ml EB。取 5 μl PCR 产物与 2 μl 加样缓冲液混合加入电泳孔，以 PCR 标准分子量 Marker 作为片段大小参照，电泳后于紫外灯下观测照相。

1.2.5　连续切片进行免疫组化与荧光原位杂交(FISH)　　骨髓移植后 7、15、30、60 d 取受体鼠($n=5$)用 4%多聚甲醛灌注固定，取肾脏按常规方法制备成 4 μm 厚的石蜡切片。同时制作雌、雄对照标本。

连续切片细胞角蛋白 18(CK18)免疫组化染色与 Y 染色体荧光原位杂交(Y-FISH)：CK18 免疫组化步骤：切片 70 ℃烘烤 1 h，置入二甲苯 10 min×3 脱蜡，下行乙醇至水，3%双氧水中 10 min，0.01 mol/L PBS 漂洗，加入 1∶400 的 CK18，湿盒内 4 ℃过夜，0.01 mol/L PBS 漂洗，滴加生物素化羊抗小鼠，室温 20 min，0.01 mol/L PBS 漂洗，加入 SABC 室温 20 min，0.01 mol/L PBS 漂洗，以 DAB 显色剂镜下控制显色，PBS 漂洗，镜下观察照相。Y-FISH 步骤：8%(W/V)硫氰酸钠 80 ℃ 10 min 清除蛋白质，0.01 mol/L PBS 漂洗，4 mg/ml 胃蛋白酶(0.1 mol/L HCl 配制)37 ℃消化 30 min 后以甘氨酸中止，4%多聚甲醛固定 2 min，0.01 mol/L PBS 漂洗，系列乙醇脱水，滴加 FITC 标记的 Y 染色体探针 10 μl/张，70 ℃共变性 10 min 后，置 37 ℃湿盒杂交过夜，标本漂洗于暗处 45 ℃进行，依次以 50%甲酰胺/0.5×SSC、2×SSC、0.1%Tween-20/4×SSC、0.01 mol/L PBS 漂洗，碘化丙啶(PI)复染，缓冲甘油封片。以雄性和雌性鼠肾脏切片分别作 Y 染色体阳性和阴性对照。

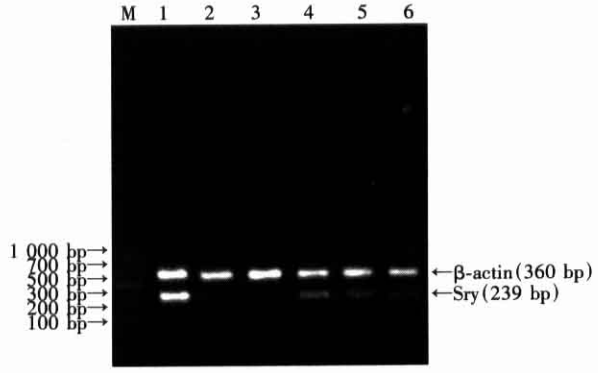
连续切片蓖麻凝集素(RCA)组化染色与 Y-FISH：RCA 组化染色步骤：切片 70 ℃烘烤 1 h，置入二甲苯 3×10 min 脱蜡，下行乙醇至水，3%双氧水中 10 min，0.01 mol/L PBS 漂洗，1∶400 的生物素偶联的 RCA(Vector)室温条件 30 min，0.01 mol/L PBS 漂洗后加入 SABC 室温 20 min，0.01 mol/L PBS 漂洗 4×5 min，加入 DAB 显色剂镜下控制显色，蒸馏水洗涤，常规苏木精复染，中型树脂封片，照相。Y-FISH 步骤同前。

激光共聚焦显微镜(TCS-NT，Leica)检测 FITC 标记的 Y 染色体：FITC 荧光素激发波长 490 nm，发射波长 520 nm，PI 激发波长 535 nm，发射波长 617 nm，应用 Leica powerScan 图像处理软件进行切片扫描、取图、图像叠加。

2　结果

2.1　受体雌鼠 Sry 基因检测

采用 PCR 技术从骨髓移植后 15、30、60 d 受体雌鼠骨髓细胞提取的 DNA 中均扩增出 239 bp 的 Y 染色体性别决定区 Sry 基因片段(图 1)。



M：Marker；1：Positive control；2：Negative control；3－6：At 7，15，30，60 d after transplantation

图 1　受体雌鼠髓中 Sry 基因表达

Fig 1　Sry gene expression in the bone marrow of recipient mice by PCR

2.2　连续切片 CK18 / RCA 组织化学染色和 Y-FISH

雄性小鼠肾脏切片 Y-FISH，激光共聚焦显微镜下观察到 PI 复染的红色细胞核内有 FITC 标记的黄色荧光点(图 2)，染色体信号多位于细胞核周边，与文献[1]报道相符。雌性对照组细胞核内无黄色荧光信号(图 3)。受体鼠骨髓移植 30 d 后作连续切片进行 CK18/RCA 组化染色和 Y-FISH，可观察到部分 Y^+/$CK18^+$ 及 Y^+/RCA^+ 细胞(图 4、5)，主要位于缺血再灌注病理损伤较为明显的肾皮、髓质交界部和皮质部的肾小管内。计数 5 个视野内 Y^+ 细胞的比例，骨髓移植后 30、60 d 分别为(5.6±1.6)%和(5.2±0.9)%。

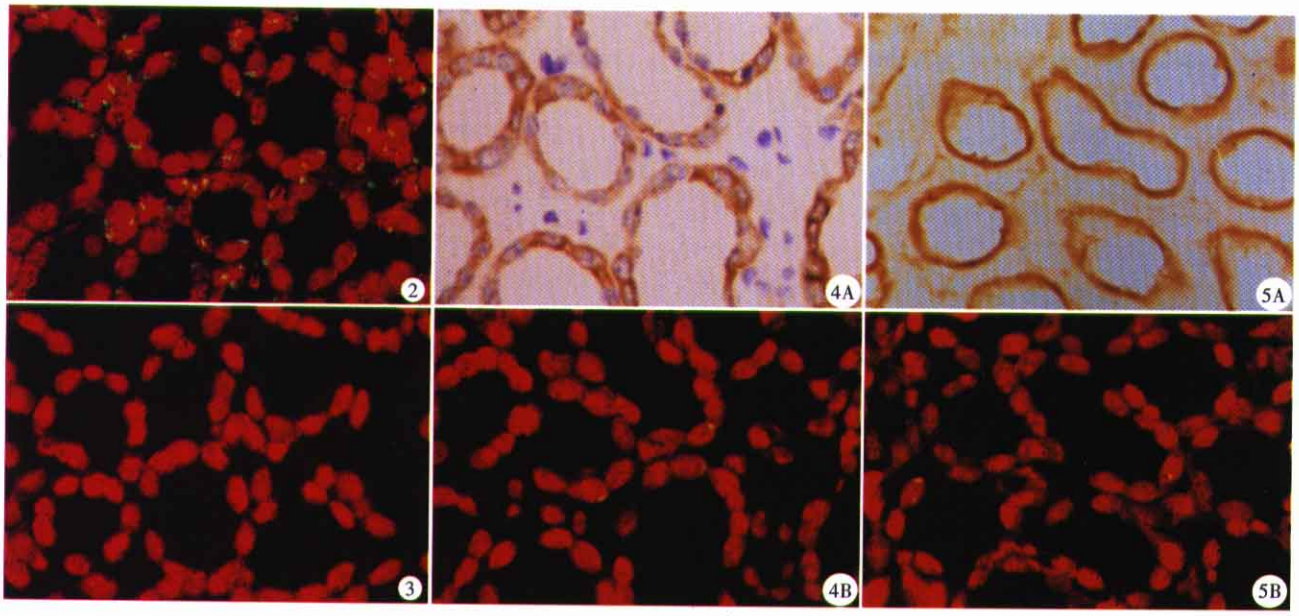


图2 雄性小鼠肾脏 Y-FISH （FITC,PI 复染×1 000） 细胞核内可见 Y 染色体

Fig 2 FISH analysis of the male mouse kidney （FITC, PI counterstaining×1 000）

图3 雌性小鼠肾脏 Y-FISH （FITC,PI 复染×1 000） 细胞核内未见 Y 染色体

Fig 3 FISH analysis of the female mouse kidney （FITC, PI counterstaining×1 000）

图4 I/R 组小鼠骨髓移植 30 d （×1 000） A：连续切片 CK18 免疫组化；B:Y-FISH 可见少量 $Y^+/CK18^+$ 细胞

Fig 4 Serial-section analysis of the I/R injured mouse kidney at 30 d after BMT （×1 000） A: Immunohistochemical staining for CK18 (DAB); B: Y-FISH (FITC, PI counterstaining) Some $Y^+/CK18^+$ cells could be detected in the renal tubules

图5 I/R 组小鼠骨髓移植后 30 d （×1 000） A：连续切片 RCA 免疫组化；B:Y-FISH 可见少量 Y^+/RCA^+ 细胞

Fig 5 Serial-section analysis of the I/R injured mouse kidney at 60 d after BMT （×1 000） A: Immunohistochemical staining for RCA (DAB); B: Y-FISH (B, FITC, PI counterstaining) Some Y^+/RCA^+ cells could be detected in the renal tubules

3 讨论

目前动物实验中观察骨髓干细胞在体内的分化情况，通常以 Y 染色体荧光原位杂交结合免疫组化染色法，观察移植的雄性骨髓干细胞在雌性受体内表达某些特异性细胞标记蛋白的情况。采用此方法，已证实骨髓源性干细胞可在体内跨系统、跨胚层分化为多种组织细胞。在肾脏的研究中，Ito 等[9]在制备的肾小球肾炎动物模型中，观察到移植的骨髓源性干细胞可分化为肾小球系膜细胞。此外，对 IgA 肾病小鼠模型移植正常小鼠骨髓细胞也能有效缓解其肾小球病变的程度[10]，提示骨髓源性干细胞可能参与损伤肾组织的再生修复。由此，本实验制备 BALB/c 雌鼠肾脏缺血再灌注损伤模型，造成以肾小管上皮细胞变性、坏死、脱落和间质出血为主的病理损害，通过尾静脉注射移植同系雄鼠骨髓细胞，以 Y 染色体作为其标志，观察移植的骨髓源性干细胞在受体损伤肾脏内表达肾小管上皮细胞的表型标志 CK18 和 RCA 的情况。

我们在细胞移植 15 d 后受体鼠骨髓细胞提取的 DNA 中扩增出 Y 染色体性别决定区 Sry 基因片段，提示骨髓源性干细胞具有归巢能力，可植入受体骨髓中长期存活，有助于 ^{60}Co 照射后的小鼠恢复造血功能。受体鼠在骨髓移植前接受一定剂量的 ^{60}Co 照射，可抑制免疫排斥反应，同时腾空受体骨髓龛，利于异体骨髓源性干细胞的植入。我们在实验中降低国外动物实验中常用的 12 Gy 的致死性移植预处理剂量，选用 7 Gy 照射剂量，以达到在最大限度腾空骨髓龛的同时，减轻受体鼠的急性放射反应，利于受体小鼠存活[8]。

细胞角蛋白是位于细胞内的多基因编码的非水溶性纤维性多肽，存在于各种上皮细胞中，肾脏内肾小管上皮细胞优先表达细胞角蛋白 18[11]。蓖麻凝集素(RCA)是一类非免疫源性蛋白质，它具有与细胞表面特定糖基以非共价键结合的生物学特性，研究表明近曲小管、部分远曲小管、集合管以及髓袢节段的肾小管上皮细胞腔缘对蓖麻凝集素有特异的亲和性[12]。我们在实验中以 CK18 和 RCA 作为肾小管上皮细胞的表型特征，采用连续切片 CK18/RCA 组化染色结合 Y 染色体荧光原位杂交法，于骨髓移植 30 d 后在雌性受体

损伤肾脏内观察到 $Y^+/CK18^+$ 和 Y^+/RCA^+ 细胞，可见静脉移植的骨髓源性干细胞可迁移到缺血再灌注损伤肾脏内，并在局部微环境诱导下表达肾小管上皮细胞的表型特征 CK18 和 RCA。Krause 等[13]曾将分离培养的造血干细胞移植给受照小鼠，以后在受体鼠的呼吸道、消化道、皮肤等处观察到移植的造血干细胞表达相应部位上皮细胞的表型标志，但在肾脏内未找到表达肾小管上皮细胞标志的造血干细胞，Krause 认为是由于移植细胞中缺乏骨髓间充质干细胞所致。实验中我们对 I/R 雌鼠移植的骨髓源性干细胞中包含有间充质干细胞和造血干细胞等类型，因此所观察到的 $Y^+/CK18^+$ 和 Y^+/RCA^+ 细胞具体来源于哪一类干细胞尚需通过进一步的实验予以明确。

骨髓源性干细胞在缺血再灌注损伤肾脏内表现出的分化潜能为损伤肾小管的修复和再生提供了新思路，如果能通过骨髓干细胞移植实现肾小管上皮细胞"原位"的再生和扩增，取代坏死的肾小管上皮细胞。或者通过患者自身的骨髓干细胞体外诱导成肾小管上皮细胞，从而获得种子细胞构建人工肾小管，取代衰竭的肾小管，就可以从根本上解决肾小管功能衰竭的难题，而目前需要我们进一步明确的问题还有很多，例如参与分化的骨髓源性干细胞的具体类型、骨髓干细胞迁移到肾脏局部定居的机制及诱导分化的环境等等，因此要实现上述目标，还有很长的路要走。

参考文献：

[1] Theise N D, Henegariu O, Grove J, *et al*. Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow[J]. Exp Hematol, 2002, 30(11): 1333 - 1338.

[2] Theise N D, Nimmakayalu M, Gardner R, *et al*. Liver from bone marrow in humans[J]. Hepatology, 2000, 32(1): 11 - 16.

[3] Mezey E, Key S, Vogelsang G, *et al*. Transplanted bone marrow generates neurons in human brains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(3): 1364 - 1369.

[4] Kocher A A, Schuster M D, Szabolcs M J, *et al*. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function[J]. Nat Med, 2001, 7(4): 430 - 436.

[5] Fukada S I, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, *et al*. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 6): 1285 - 1293.

[6] Jackson K A, Majka S M, Wang H, *et al*. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells[J]. J Clin Invest, 2001, 107(11): 1395 - 1402.

[7] Scriba A, Luciano L, Steiniger B. High-yield purification of rat monocytes by combined density gradient and immunomagnetic separation[J]. J Immunol Methods, 1996, 189(1): 203 - 216.

[8] 陈松林，张　成，黄　文. 亚致死量放疗对 Duchenne 型肌营养不良鼠骨髓干细胞移植的影响[J]. 中山大学学报，2003，24(2)：109 - 112.

[9] 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(12): 2625 - 2635.

[10] Imasawa T, Utsunomiya Y. Stem cells in renal biology: bone marrow transplantation for the treatment of IgA nephropathy[J]. Exp Nephrol, 2002, 10(1): 51 - 58.

[11] 蔡文琴，王伯沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 245.

[12] Schulte B A, Spicer S S. Histochemical evaluation of mouse and rat kidneys with lectin-horseradish peroxidase conjugates[J]. Am J Anat, 1983, 168(4): 345 - 362.

[13] Krause D S, Theise N D, Collector M I, *et al*. Multi-organ, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell[J]. Cell, 2001, 105(3): 369 - 377.

（编辑　刘洪娥）

（上接 15 页）

讨论

Bell 麻痹是指原因不明的由于茎乳孔内面神经非化脓性炎症所致的急性面神经麻痹，又称面神经炎。近来的研究证实本病与病毒感染有关[1]，并运用单纯疱疹Ⅰ型病毒(HSV-1)建立了小鼠 Bell 麻痹模型。另有学者认为是面神经本身或外周病变所致[2]，面神经受凉引起局部营养血管痉挛，导致神经缺血、水肿及面神经受压。外周因素则认为茎乳孔内骨膜炎使面神经受压或血液循环障碍，产生面神经麻痹。临床上常见单侧 Bell 麻痹，而双侧同时出现 Bell 麻痹极为罕见，需要排除 GBS、重症肌无力、双侧中耳炎等疾病造成的双侧周围性面瘫。本例患者于发病后 1 周行腰穿检查脑脊液变化，无蛋白－细胞分离现象，疲劳试验及新斯的明试验均为阴性，故排除了 GBS 和重症肌无力。头颅 MRI 等检查项目排除了神经系统其它疾病。Schattner 等[3]报道过 1 例双侧 Bell 麻痹患者，最后证实为急性淋巴细胞性白血病造成的神经损害。因此对于双侧周围性面瘫诊断为 Bell 麻痹时必需慎重，应全面检查排除其它疾病，必要时可进行骨穿。

关键词：Bell 麻痹；面瘫；面神经炎

中图法分类号：R745.12　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Wakisaka H, Hato N, Honda N, *et al*. Demyelination associated with HSV-1-induced facial paralysis[J]. Exp Neurol, 2002, 178(1): 68 - 79.

[2] 杜　洪，李哲生. 贝尔氏面瘫的病因学说[J]. 国外医学：耳鼻咽喉科学分册，1993，17(3)：129 - 132.

[3] Schattner A, Kozak N, Sandler A, *et al*. Facial diplegia as the presenting manifestation of acute lymphoblastic leukemia[J]. Mt Sinai J Med, 2001, 68(6): 406 - 409.

（编辑　汪勤俭）