

预处理策略促进间充质干细胞修复急性肾损伤的机制研究进展

李雯婕, 邓旖婷, 谢天蔚, 姜大朋

[摘要] 急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是临床上常见的危重病症。近年来,虽然研究者对AKI病理生理机制进行了深入探索,但临床治疗仍局限于透析和肾移植。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有抗细胞凋亡、免疫调节、抗氧化和促进血管生成等作用,为AKI的治疗提供了新方向。研究人员在此基础上开展了一系列临床试验,但是结果并不理想。主要原因是MSCs植入率低、存活率低、旁分泌能力受损和作用延迟等。因此,研究人员采取了一系列预处理措施以提高MSCs存活率和旁分泌能力。作者将对近年来AKI治疗中的各种MSCs预处理措施进行综述。

[关键词] 急性肾损伤;间充质干细胞;预处理;存活率;旁分泌能力

[中图分类号] R69 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-3097(2020)06-0392-04

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2020.06.016

Advances in the mechanism of mesenchymal stem cell pretreatment to repair acute kidney injury

LI Wenjie, DENG Yiting, XIE Tianwei, JIANG Dapeng

(Department of Urology Shanghai Children's Medical Center,

Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

[Abstract] Acute kidney injury (AKI) is a common, severe clinical condition. Despite the in-depth exploration of the physiological and pathological mechanism of AKI in recent years, the clinical therapeutic choices are still limited to dialysis and renal transplantation. Mesenchymal stem cells (MSCs) provide a new therapeutic direction for AKI due to their effects in anti-apoptosis, immune regulation, anti-oxidation and promoting angiogenesis. Based on these findings, researchers carried out a series of clinical trials, but the results were not satisfactory. The main reasons are low implantation rate, poor survival rate, impaired paracrine ability and delayed action of MSCs. Researchers developed a series of pretreatment measures to improve the survival rate and paracrine ability of MSCs. In this review, we summarized some of the research results of various MSCs pretreatment measures in AKI treatment.

[Key words] Acute kidney injury (AKI); Mesenchymal stem cells (MSCs); Preconditioning strategy; Survival rate; Paracrine ability

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是指48 h内肾功能急剧下降,血清肌酐(serum creatinine, Scr)上升,大于 $26.5 \mu\text{mol/L}$ 或增加 $\geq 50\%$ (达到基线值的1.5倍),尿量 $< 0.5 \text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 持续超过6 h^[1]。一旦发生AKI,患者在重症监护室停留的时间和住院时间明显延长,病死率显著增加。AKI病因众多,病理生理学机制十分复杂。目前,AKI的治疗方案仍局限于透析和肾移植,高昂的费用和供体器官的

短缺限制了这2种治疗方案的临床应用。而近几十年干细胞治疗领域的突破性进展为数百万AKI患者带来希望。研究表明,干细胞可以通过多种机制促进肾小管上皮细胞的修复。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其免疫原性低、多能分化能力高、隔离侵入并且分布广泛,在AKI治疗方面具有广泛的应用前景^[2]。

虽然MSCs在动物模型中作用显著,但其与临床应用之间依然存在着巨大差距。2017年,Swaminathan等^[3]选取心脏手术后发生AKI的患者,使用MSCs疗法进行了随机、双盲、多中心的2期临床试

[基金项目] 上海市自然科学基金(19ZR1432800)

[作者单位] 200127 上海,上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心泌尿外科(李雯婕,邓旖婷,谢天蔚,姜大朋)

[通讯作者] 姜大朋, E-mail: jdp509@163.com

验(NCT01602328)。对随机选取的156名受试者进行研究后,发现两组患者的肾功能恢复所需要的时间、需要透析的比率和30 d死亡率均相近。为什么MSCs无法体现其优越性? Silva等^[4]认为, MSCs临床作用局限性可能与植量不足、存活率低、旁分泌能力受损有关。为解决这一问题,近年来研究者们探索出一系列提高MSCs作用的方法。作者就提高AKI中MSCs作用的方法进行总结,并分析影响MSCs疗效的各种因素。

1 提高MSCs存活率的措施

MSCs的低存活率使MSCs的治疗受到了很大影响,原因有移植后失巢凋亡、缺血、炎症、活性氧与抗氧化剂之间的失衡等^[5,6]。以下预处理措施能够保护MSCs免受有害环境的干扰,提高MSCs的存活率。

1.1 与细胞因子或化合物一起培养 实验证明,多种细胞因子或化合物有细胞保护作用,通过一系列细胞信号转导通路提高细胞存活率来改善MSCs在AKI中的治疗效果。

1.1.1 细胞因子 研究表明,用胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)预处理MSCs能促进其增殖,减少凋亡。Xinaris等^[7]用IGF-1预处理MSCs发现,在AKI模型中,肾内移植IGF-1预处理MSCs的数量在第1天显著增多,至第4天仍然维持较高水平,其部分原因是预处理MSCs对H₂O₂诱导的氧化损伤具有更强的抵抗力。

1.1.2 使用药物联合培养MSCs Cai等^[8]发现,用阿托伐他汀预处理MSCs,通过抑制Toll样受体4信号的表达,植入MSCs的存活率显著提高。Mias等^[5]向缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)诱导的AKI大鼠的肾实质内注射用褪黑素预处理的MSCs,其存活率显著提升,并通过诱导血管生成和肾细胞增殖,加快了肾功能的恢复。

1.2 改善微环境 体外扩增期间,一系列细胞表面分子的缺失使细胞间粘附能力下降^[9]。Xu等^[10]发现三维球体培养的MSCs能产生更多细胞外基质(extracellular material, ECM),将其输入I/R诱导的AKI大鼠模型后, MSCs的存活率以及MSCs治疗AKI的效果均提高。

1.3 热敏水凝胶 移植后,失去与ECM锚定连接的MSCs在恶劣的细胞微环境中很容易发生失巢凋亡^[11]。热敏水凝胶能改善微环境,提高移植细胞的存活率^[12]。Gao等^[13]用壳聚糖氯化物水凝胶作为细胞载体,将MSCs运送入I/R诱导的AKI大鼠体内,

观察到水凝胶支架可以提高移植MSCs的存活率。

1.4 基因修饰 与其他处理措施相比,基因修饰是一个提高MSCs存活率更精确的方法。通过基因改造,使MSCs过表达细胞因子或抗细胞凋亡基因,提高其在受损组织中的存活率^[14]。Liu等^[15]构建了血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)修饰的骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells-BMSCs),发现HO-1-BMSCs在I/R诱导的AKI肾匀浆上清液(模拟AKI微环境)中存活率提高。

2 提高MSCs的旁分泌能力

分泌旁分泌介质是受损组织中MSCs再生的主要机制。MSCs可以分泌各种细胞因子、生长因子和蛋白质,发挥抗凋亡、免疫调节、抗氧化和促进血管再生的作用^[16-18]。

2.1 低氧 实验证明,低氧预处理后的BMSCs移植能更有效改善I/R大鼠肾功能、修复肾脏组织损伤,其作用机制可能与低氧预处理促进BMSCs旁分泌肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和碱性成纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等有关。Liu等^[19]用200 μm/L氯化钴低氧预处理BMSCs 24 h,发现低氧预处理BMSCs移植组中,HGF和bFGF的水平相较于常氧培养BMSCs移植组均显著升高。目前研究认为,HGF、bFGF等细胞因子通过旁分泌作用,下调肾脏局部促炎细胞数量,上调抗炎细胞数量,降低局部促炎因子表达,从而抑制AKI相关炎症反应,促进肾脏损伤修复。

2.2 加入细胞因子或化合物联合培养 加入细胞因子或化合物联合培养也能提高MSCs的旁分泌能力。Bai等^[20]用细胞因子白介素-17A预处理MSCs后,将其导入AKI大鼠体内,该组大鼠急性肾小管坏死评分、Scr和血尿素氮水平均显著下降。

2.3 改善培养条件 改善培养环境有助于提高MSCs的旁分泌能力。3D球状体培养MSCs促进了bFGF、HGF、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和肿瘤坏死因子诱导基因-6(tumor necrosis factor-inducible gene 6, TSG-6)的分泌^[10]。

2.4 热敏水凝胶 热敏水凝胶不仅提高了MSCs的存活率,而且提高了其旁分泌能力。Feng等^[21]表示,使用IGF-1C结构域(IGF-1C-domain, IGF-1C)修

饰的壳聚糖水凝胶促进了 IGF-1C、HGF 和 EGF 的表达。

2.5 基因修饰 使用慢病毒载体使 BMSCs 中 CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor, CXCR4) 过表达, 可以提高 HGF、骨形态发生蛋白-7 和白介素-10 的表达水平, 体内实验中也观察到肾功能明显改善^[22]。此外, 脂质运载蛋白-2 (lipocalin 2, Lcn-2) 在肾小管上皮细胞再生与增殖中发挥着重要作用, 是对抗 AKI 的保护因子^[23]。Roudkenar 等^[24]通过修饰 MSCs 基因上调 Lcn-2 的表达, 促进 HGF、IGF-1、VEGF 和成纤维母细胞生长因子的分泌。

3 影响 MSCs 治疗 AKI 疗效的因素分析

由于 MSCs 的高度异质性和 AKI 的病理生理复杂性, MSCs 最佳组织来源、细胞类型、AKI 治疗剂量和时间等因素的变化, 都能影响 MSCs 治疗 AKI 的疗效。

3.1 MSCs 的类型与疗效 直至目前, BMSCs 仍然是各种动物 AKI 模型中使用最广泛的一种 MSCs, 也是目前临床研究中唯一证实有效的 MSCs。但 BMSCs 有其自身局限性, 如相对侵袭性和数量限制^[25]。诱导多能干细胞来源的 MSCs (induced pluripotent stem cell-derived MSCs, iPSC-MSCs) 是单克隆细胞系 MSCs 从 iPSC 分离出来的分支, iPSC 的自我更新能力成为 MSCs 无限、无创的来源。iPSC-MSCs 的应用可以解决一些临床“瓶颈”, 如获得性 MSCs 的异质性、与供体细胞衰老相关的疾病等^[26]。虽然研究人员已经研发出不使用病毒载体的诱导方法, 但仍存在致癌风险。因此, 需要更多的研究来证明何为 AKI 患者最好的选择。

3.2 MSCs 的不同输送方式与疗效 在动物模型中, 静脉注射、动脉注射、腹腔内注射和肾内注射是 4 个主要的输送方式。2013 年的一项 Meta 分析证明, 与腹腔内注射、静脉注射相比, 动脉注射 MSCs 能使 Scr 明显下降^[27]。由于 Meta 分析的局限性, 很难明确哪一条输送途径对 AKI 的治疗是最好的。因此, 作者需要更多的研究来解决这一问题。

3.3 异体和自体 MSCs 的疗效比较 截至目前, 仅一项研究比较了 AKI 中异体和自体 MSCs 的安全性和有效性。给 I/R 诱导的 AKI 大鼠不同剂量的同种异体和自体 MSCs, 它们均发挥肾脏保护作用。此外, 同种异体组中一系列纤维化相关基因表达减少, 这或许提示异源 MSCs 的潜在疗效更好^[28]。

4 总结和展望

总之, 在临床 AKI 治疗中 MSCs 需要量取决于其存活率和旁分泌能力。各种预处理措施均提高了 MSCs 的存活率和旁分泌能力, 但鉴于不同 MSCs 治疗方案之间的巨大差异性, 很难证明哪一种预处理措施是最好的。根据 MSCs 的捐赠者、来源、路线时间和移植所需剂量的不同, 需要调整相应的预处理措施。一个理想的 AKI 治疗方案不仅能提高 MSCs 的存活率和旁分泌能力, 而且还要规避潜在的毒副作用。随着这一领域研究的不断深入, 作者期待着 MSCs 治疗 AKI 的光明前景。

【参考文献】

- [1] 罗从娟, 张利, 陈香美. 间充质干细胞治疗急性肾损伤的研究进展 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2013, 2(3): 148-153.
- [2] Zhao L, Hu C, Zhang P, et al. Preconditioning strategies for improving the survival rate and paracrine ability of mesenchymal stem cells in acute kidney injury [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(2): 720-730.
- [3] Swaminathan M, Stafford-Smith M, Chertow GM, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of aki after cardiac surgery [J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(1): 260-267.
- [4] Silva LHA, Antunes MA, Dos Santos CC, et al. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 45.
- [5] Mias C, Trouche E, Seguelas MH, et al. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/ mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney [J]. Stem Cells, 2008, 26(7): 1749-1757.
- [6] He N, Zhang L, Cui J, et al. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells [J]. Bone Marrow Res, 2014, 2014: 128436.
- [7] Xinaris C, Morigi M, Benedetti V, et al. A novel strategy to enhance mesenchymal stem cell migration capacity and promote tissue repair in an injury specific fashion [J]. Cell Transplant, 2013, 22(3): 423-436.
- [8] Cai J, Yu X, Zhang B, et al. Atorvastatin improves survival of implanted stem cells in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Nephrol, 2014, 39(6): 466-475.

- [9] Ahmadbeigi N, Seyedjafari E, Gheisari Y, et al. Surface expression of CXCR4 in unrestricted somatic stem cells and its regulation by growth factors[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(7): 687-692.
- [10] Xu Y, Shi T, Xu A, et al. 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(7): 1203-1213.
- [11] Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, et al. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases [J]. *J Pathol*, 2012, 226(2): 380-393.
- [12] Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, et al. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44(3): 654-660.
- [13] Gao J, Liu R, Wu J, et al. The use of chitosan based hydrogel for enhancing the therapeutic benefits of adipose-derived MSCs for acute kidney injury [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(14): 3673-3681.
- [14] Gnecci M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells [J]. *Nat Med*, 2005, 11(4): 367-368.
- [15] Liu N, Wang H, Han G, et al. Enhanced proliferation and differentiation of HO-1 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the acute injured kidney [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 946-956.
- [16] He A, Jiang Y, Gui C, et al. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning [J]. *Can J Cardiol*, 2009, 25(6): 353-358.
- [17] Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(12): 1496-1500.
- [18] Garg A, Newsome PN. Bone marrow mesenchymal stem cells and liver regeneration: believe the hypoxia! [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(5): 108.
- [19] 刘红, 丁小强, 王华, 等. 低氧预处理 BMSCs 对大鼠 AKI 修复能力的影响及其机制研究 [J]. *浙江医学*, 2016, 38(21): 1712-1716.
- [20] Bai M, Zhang L, Fu B, et al. IL-17A improves the efficacy of mesenchymal stem cells in ischemic-reperfusion renal injury by increasing Treg percentages by the COX-2/PGE2 pathway [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(4): 814-825.
- [21] Feng G, Zhang J, Li Y, et al. IGF-1 C domain-modified hydrogel enhances cell therapy for AKI [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(8): 2357-2369.
- [22] Liu N, Patzak A, Zhang J. CXCR4-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve repair of acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(7): F1064-F1073.
- [23] Jung M, Sola A, Hughes J, et al. Infusion of IL-10-expressing cells protects against renal ischemia through induction of lipocalin-2 [J]. *Kidney Int*, 2012, 81(10): 969-982.
- [24] Roudkenar MH, Halabian R, Tehrani HA, et al. Lipocalin 2 enhances mesenchymal stem cell-based cell therapy in acute kidney injury rat model [J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(1): 103-117.
- [25] Morigi M, Benigni A. Mesenchymal stem cells and kidney repair [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28(4): 788-793.
- [26] 陈媛媛, 黄永增, 蔡晓珍, 等. 2008—2017 年诱导多能干细胞进展热点可视化分析 [J]. *转化医学杂志*, 2020, 9(2): 84-87.
- [27] Wang Y, He J, Pei X, et al. Systematic review and meta-analysis of mesenchymal stem/stromal cells therapy for impaired renal function in small animal models [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2013, 18(3): 201-208.
- [28] Tögel F, Cohen A, Zhang P, et al. Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(3): 475-485.

(收稿日期: 2019-07-30 本文编辑: 宋冬梅)