

·实验研究 Experimental research·

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

邢艺苑, 王家平, 陆发承, 简远熙, 万珊珊, 韩 磊

【摘要】 目的 比较分析骨髓间充质干细胞(BMSC)经肾动脉途径单次或多次移植于阿霉素肾病大鼠后对其肾功能的改善作用。**方法** 以阿霉素经尾静脉输入构建大鼠慢性肾病模型 32 只, 随机分为 M0、M1、M2、M3 组(4×n, n=8), 另选 8 只为正常对照组(N 组)。以 2×10^6 个/ml、单次 0.5 ml 分别移植 BMSC 细胞 0 次(M0 组)、1 次(M1 组)、2 次(M2 组)、3 次(M3 组), 不进行 BMSC 移植组别每次操作以 L-DMEM 培养基 0.5 ml 作为安慰剂对照, 移植间隔为 1 周。移植前及末次移植后 1、2 周末检测大鼠血尿素氮、血肌酐、24 h 尿蛋白、24 h 尿微量蛋白, 末次移植 1 周末制作病理片并于激光聚焦显微镜下观察大鼠肾脏病理和 BMSC 细胞在肾脏内分布情况。**结果** M0、M1、M2、M3 组在各观察点血尿素氮、血肌酐、24 h 尿蛋白总量、24 h 尿微量蛋白均明显高于 N 组($P < 0.001$), 末次移植第 1 周末 M2、M3 组 24 h 尿蛋白总量、24 h 尿微量蛋白明显低于 M1 组($P < 0.05$), M2、M3 组间差异无统计学意义($P = 0.063$)。**结论** BMSC 经肾动脉途径移植 2 次治疗大鼠阿霉素肾病效果最宜。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 阿霉素肾病; 疾病模型, 动物; 大鼠, Sprague-Dawley; 肾动脉途径
中图分类号: R692 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2017)-07-0641-05

Transplant of bone marrow mesenchymal stem cells via renal artery route in experimental rats with adriamycin-induced nephropathy: comparison of the repair effect on renal function between different times of transplant XING Yiyuan, WANG Jiaping, LU Facheng, JIAN Yuanxi, WAN Shanshan, HAN Lei. Department of Radiotherapy, Second Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan Province 650101, China

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

【Abstract】 Objective To compare the repair effect on renal function between different times of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplant via renal artery route in experimental rats with adriamycin-induced nephropathy. **Methods** Adriamycin-induced nephropathy model was established in 32 rats through injection of adriamycin through the caudal vein. Based on the scheduled times of BMSCs transplant, the experimental rats were randomly and equally divided into M0 group (zero time), M1 group (one time), M2 group (2 times) and M3 group (3 times) with 8 rats in each group. Other 8 SD rats were used as normal control group (N group). Single dose of 0.5 ml BMSC suspension (2×10^6 cells/ml) was transplanted to the rats of M0 group (zero time), M1 group (one time), M2 group (2 times) and M3 group (3 times), for the rats of the groups not receiving BMSC transplant a single dose of 0.5 ml L-DMEM culture medium, used as a placebo, was adopted to replace BMSC suspension. The transplant interval was one week. Before transplant as well as one and two weeks after last time of transplant, the serum urea nitrogen, serum creatinine, 24 h urine protein and 24 h urine microprotein were tested, and one week after last time of transplant pathological sections were made for laser focusing microscope examination to observe renal pathological changes and the distribution of BMSC cells in the kidney. **Results** The values of serum urea nitrogen, serum creatinine, 24 h urine protein and 24 h urine microprotein determined at each observation time point in M0 group, M1 group, M2 group and M3 group were significantly higher than those in N group ($P < 0.001$). The values of 24 h urine

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2017.07.015

作者单位: 650101 昆明医科大学第二附属医院放射治疗科

通信作者: 王家平 E-mail: jiapingwang12@163.com

protein and 24 h urine microprotein determined at one week after last time of transplant in M2 group and M3 group were strikingly lower than those in M1 group ($P<0.05$), but these differences between M2 group and M3 group were not statistically significant ($P=0.063$). **Conclusion** For the treatment of adriamycin-induced nephropathy in experimental rats, two times of using BMSCs transplant via renal artery route can achieve optimal curative effect. (J Intervent Radiol, 2017, 26: 641-645)

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cell; adriamycin-induced nephropathy; disease model, animal; rat, Sprague-Dawley; renal artery route

骨髓间充质干细胞(BMSC)在体内能靶向迁移至损伤组织及慢性炎症部位并分化发育,以对其进行修复^[1]。研究证实 BMSC 具有促进急慢性肾损伤修复的积极作用^[2],但对慢性肾病的研究尚少。慢性肾脏病发展到终末期肾病阶段的主要治疗方法有维持性透析和肾移植。随着再生医学研究进展, BMSC 在慢性肾病的应用价值得到充分认识,外源性 BMSC 可分化为肾小管细胞,形成肾脏近端小管而选择性修复外髓质部大部分肾小管坏死^[3]。干细胞移植方式是决定外源给予干细胞运行途径及归巢数量的主要因素,直接关系到对靶器官的修复效果^[4],已有研究证实外周静脉途径输注效果不及经肾动脉介入途径移植^[5]。本研究以阿霉素慢性肾病大鼠为模型,通过肾动脉途径,以不同干细胞移植次数观察比较大鼠肾功能、肾脏病理及免疫荧光干细胞定植效果及其作用差异,并分析原因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

42 只清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由昆明医科大学实验动物中心提供。2 只 12 周龄雄性 SD 大鼠骨髓作为供体 BMSC 来源, 14 周龄体质量 (150 ± 10) g 雄性大鼠 32 只作为受体, 另 8 只设为正常对照组(N 组)。阿霉素购自美国 Sigma 公司, 胎牛血清(FBS)购自中国医学科学院医学生物研究所, L-DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司。

1.2 模型制作与分组

40 只大鼠造模前禁水 12 h, 自由进食。称重后以 10% 水合氯醛(0.32 ml/100 g)腹腔注射麻醉, 于大鼠左侧肋脊角切除左侧肾, 其中 32 只大鼠以 2.5 mg/kg 剂量给尾静脉注射阿霉素(1 次/周, 连续 2 周), 之后每周取眼内眦血检测肾功能, 于第 8 周末参考刘韵璐等^[6]方法, 以血肌酐、尿素氮升高并贫血表示阿霉素慢性肾病模型构建成功, 然后随机分为干细胞未移植对照组(M0 组, $n=8$)、1 次移植组(M1 组, $n=8$)、2 次移植组(M2 组, $n=8$)、3 次移植

组(M3 组, $n=8$); N 组 8 只大鼠在模型组注射阿霉素时予以等量 0.9% NaCl 注射至尾静脉。

1.3 BMSC 培养、标记及移植

从 2 只 12 周龄健康大鼠股骨和胫骨内分离骨髓, 根据 BMSC 细胞有高度黏附于塑料培养皿特征, 从中分离收集 BMSC 细胞并体外培养, 经流式细胞仪计数细胞表面标记。培养传代至第 4~6 代, 倒置显微镜观察细胞呈旋涡状生长, 具有多型性。取生长至 80%~90% 融合细胞, 置于 2% O₂、93% N₂ 和 5% CO₂ 缺氧盒中 48 h 造成 BMSC 缺氧, 用 Ad5/F35 腺病毒携带的增强型绿色荧光蛋白转染液转染, 培养 6 h 后加等量全培养液, 24 h 后倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况。以 L-DMEM 培养基制备悬浮 BMSC 悬液 (2×10^6 个/ml) 备用。M1、M2、M3 组大鼠腹腔麻醉后开腹暴露腹主动脉, 找到右侧肾动脉, 以头皮针穿刺肾动脉, 将配备好的 BMSC 悬液以单次 0.5 ml 分别注射予 M1、M2、M3 组大鼠, 然后拔除头皮针, 以止血明胶局部轻压止血后逐层缝合关腹。首次移植第 1 周末重复操作, 对 M2、M3 两组进行第 2 次移植; 首次移植第 2 周末重复操作, 对 M3 组进行第 3 次移植, 剂量均同第 1 次。不进行 BMSC 移植组在每次操作同时注入等量 L-DMEM 培养基。

1.4 观察指标

实验观察各组血尿素氮、血肌酐、24 h 尿蛋白、24 h 尿微量蛋白、病理片及 BMSC 细胞分布。分别于首次移植前(0 周)、末移植后 1、2 周末于清洁代谢笼收集大鼠 24 h 尿液并于内眦取血, 采用 7170A 型全自动生化仪(日本 Hitachi 公司)检测 24 h 尿蛋白、24 h 尿微量蛋白, 苦味酸法检测血尿素氮和血肌酐。末次输注后 1 周, 将每组大鼠各处死 4 只, 取右肾切片(厚度约 2 mm)若干制成 5 μ m 石蜡切片, 行苏木精-伊红(HE)染色。肾组织取出后直接放液氮冻存, 用 OCT 包埋剂-20℃包埋后制成 6 μ m 冰冻切片, 缓冲甘油封片后于激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \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,组间两两比较用最小显著差数法(LSD)- t 法, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BMSC 分离纯化与鉴定

P4~P6 代大鼠 BMSC 细胞形态均一,呈梭形,表型 CD29、CD4、CD44、CD11b 阳性率分别为 96.9%、2.2%、98.9%、1.9%。Ad5/F35 腺病毒转染 6 h 后,细胞呈多角形,换等量全培养液 24 h 后观察绿色荧光表达率为 75%,形态与正常培养细胞无明显差异,见图 1。

2.2 BMSC 移植结果

M0、M1、M2、M3 组在各观察点血尿素氮、血肌

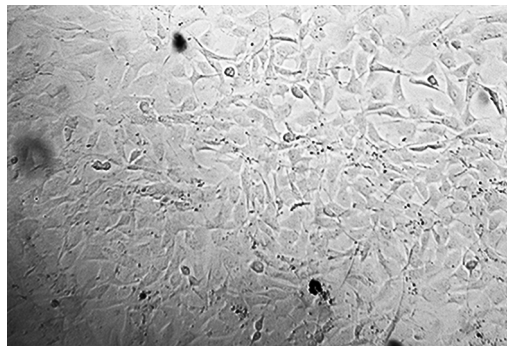


图 1 P4 代 BMSC 细胞具多形性

酐、24 h 尿蛋白总量、24 h 尿微量蛋白均明显高于 N 组($P<0.001$),末次移植第 1 周末 M2、M3 组 24 h 尿蛋白总量、24 h 尿微量蛋白明显低于 M1 组($P<0.05$),M2、M3 组间差异无统计学意义($P=0.063$),见表 1。血肌酐、尿素氮间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 BMSC 移植前后实验大鼠 24 h 尿蛋白及 24 h 尿微量蛋白比较

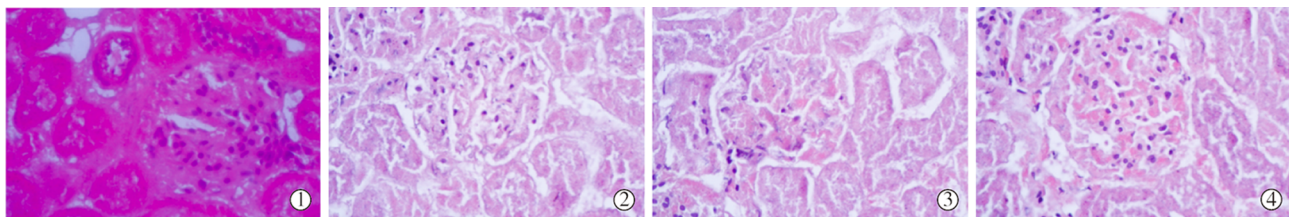
组别	24 h 尿蛋白/mg			24 h 尿微量蛋白/ng		
	移植前	末次移植 1 周末	末次移植 2 周末	移植前	末次移植 1 周末	末次移植 2 周末
N 组($n=8$)	25.87 \pm 1.66	25.92 \pm 0.99	26.07 \pm 1.42	23.46 \pm 1.83	24.92 \pm 1.38	25.16 \pm 1.64
M0 组($n=8$)	46.34 \pm 2.78*	49.66 \pm 3.20*	53.74 \pm 1.87*	46.31 \pm 2.96*	47.29 \pm 2.36*	51.54 \pm 3.32*
M1 组($n=8$)	46.15 \pm 2.46*	39.46 \pm 1.73*	37.42 \pm 3.69*	43.70 \pm 3.32*	37.88 \pm 1.24*	36.32 \pm 3.09*
M2 组($n=8$)	46.49 \pm 2.29*	30.29 \pm 2.42**	33.97 \pm 1.12**	44.58 \pm 3.26*	29.46 \pm 2.78**	30.04 \pm 1.57**
M3 组($n=8$)	46.53 \pm 2.08*	30.81 \pm 4.20** Δ	33.44 \pm 11.02** Δ	44.32 \pm 2.61*	28.51 \pm 3.01** Δ	31.70 \pm 8.62** Δ

注: *与 N 组比较, $P<0.001$; *与 M1 组比较, $P<0.05$; Δ 与 M2 组比较, $P=0.063$

2.3 肾脏病理检查结果

N 组肾脏肾小球、肾小管、肾间质未见明显异常;M0 组可见肾间质大片状纤维化,肾小球系膜区细胞基质,部分肾小球可见局灶节段性硬化、系膜细胞和基质增生,伴大量炎性细胞浸润,其间有萎缩肾小管,部分肾小管上皮细胞可见颗粒、空泡变性,有崩解坏死甚至脱落的肾小管上皮细胞,见图 2①;M1 组肾小球系膜细胞和基质不同程度增生,个别肾小球可见球囊粘连,部分肾小球毛细血管襻受

压闭塞,个别肾小管可见上皮细胞再生,肾间质可见局灶状纤维化及炎性细胞浸润,见图 2②;M2 组肾间质纤维化不明显,可见小灶状炎性细胞浸润,其间大部分肾小球毛细血管襻扩张,部分肾小球系膜区可见不同程度细胞增生和基质增多,肾小管无明显萎缩,见图 2③;M3 组肾小球区细胞及基质明显增多,细胞有少许肿胀,肾小管处细胞富集,管腔变小,少见炎性细胞,仍有部分纤维化存在,见图 2④。



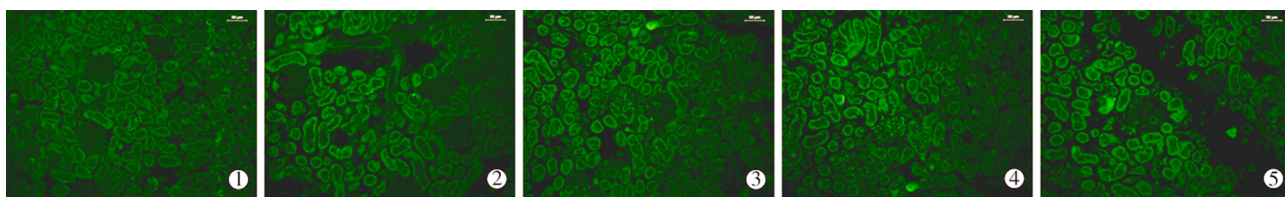
①N 组基质纤维化明显,其间肾小管萎缩,小管上皮细胞有空泡变性征象;②M1 组肾间质局灶纤维化,肾小管可见上皮细胞再生,肾小球可见部分球囊粘连;③M2 组肾小球毛细血管襻扩张,肾小管无明显萎缩,肾间质纤维化不明显;④M3 组肾小球区细胞及基质明显增多,细胞有少许肿胀,肾小管处细胞富集,管腔变小,少见炎性细胞,仍有部分纤维化存在

图 2 实验大鼠肾脏病理检查结果

2.4 BMSC 在肾组织中分布

末次移植 1 周末,激光共聚焦荧光显微镜下 N 组、M0 组几乎无绿色荧光分布;M1 组绿色荧光在

肾小管处分布,肾小球内未见;M2、M3 组绿色荧光不仅在肾小管处有分布,在肾小球系膜区也可见少量分布,见图 3。



①②N 组、M0 组几乎无荧光显示;③M1 组可见肾小管处有荧光分布,肾小球内未见;④⑤M2 组、M3 组不仅在肾小管处有荧光分布,在肾小球系膜区也可见少量荧光

图 3 激光共聚焦荧光显微镜下观察各组荧光分布情况

3 讨论

慢性肾脏病进展是一不可逆过程,现今有效治疗手段一般为替代治疗。BMSC 可定向分化发育为新细胞,以替换损伤细胞行使功能,已证实对慢性肾病有确切的修复作用。既往实验研究表明,BMSC 作用于实验动物受损器官并非单纯越多越好,大剂量 BMSC 可能造成动物体内局部阻塞,甚至死亡,并且在不同器官中发挥效果的最佳剂量也不相同^[7-9]。以往经动脉途径将 BMSC 植入大鼠肾脏实验均以 10^6 剂量为最宜^[10-12],有效避免了可能导致的微血管阻塞并可获明显的修复效果。本实验末次移植 BMSC 第 1 周末检测数据显示,M2、M3 组肾功能整体上比 M1 组有明显改善,但 M3 组对比 M2 组并未因增加 1 次移植表现出肾功能明显改善,且出现个体差异增大,效果不稳定;第 3 次移植后可明显观察到大鼠腹部移植入路创口愈合情况不如前 2 次移植后,存在短时间内多次外科手术对大鼠机体整体损伤问题,也可能正因为多次穿刺肾动脉导致肾动脉受损,影响了正常血流灌注。采用经颈总动脉-肾动脉置管给药方法有助于避免多次手术损伤^[13],但易引入对比剂,引起感染、血流改变等,同样是可造成肾脏损伤等的干扰因素。造模大鼠左肾已切除,BMSC 移植后虽可纠正受损右肾部分功能,但整体肾功能很难达到 N 组水平,2 次移植后可能已达到或接近最大程度改善,再次移植无法使肾功能上限进一步提高。有报道显示 BMSC 过量堆积于肾组织而不被利用,同样会对肾脏正常细胞产生一定损害作用,单纯增加移植次数对损伤肾脏肾功能改善并不能起叠加作用,甚至有一定反作用,其机制可能涉及血管阻塞细胞堆积所致供氧不足,大量 BMSC 分化发育所致耗氧量增大^[14]。考虑到本实验 2 次移植时间间隔为 1 周,也可能在每次移植后 BMSC 没有足够时间充分分化发育,导致堆积损伤。但有研究证实 BMSC 对缺血-再灌注肾损伤发挥作用的时间主要集中在每次移植后早期^[12]。本研究对象为慢性肾病模型,观察时间适当延长,但末次移

植第 2 周末检测数据较第 1 周末变化并不显著($P>0.05$),可见 BMSC 对慢性肾病肾组织修复作用同样集中于移植早期。

本研究末次移植第 1 周末病理检查显示 M1 组肾小管细胞肿胀程度比 M2、M3 组严重,且免疫荧光显示 BMSC 单纯聚集于肾小管处,肾小球处几乎没有,而 M2、M3 组均可见系膜区少量免疫荧光分布,表明 BMSC 对肾损伤的主要作用集中表现于对肾小管的修复,对病理损伤较重、炎症范围较大的阿霉素慢性肾病有着更为广泛的修复作用。

[参考文献]

- [1] Hang HL, Xia Q. Role of BMSCs in liver regeneration and metastasis after hepatectomy[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20: 126-132.
- [2] Du T, Cheng J, Zhong L, et al. The alleviation of acute and chronic kidney injury by human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells triggered by ischemia-reperfusion injury via an endocrine mechanism[J]. Cytotherapy, 2012, 14: 1215-1227.
- [3] 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.
- [4] 程庆, 白志明. 间充质干细胞归巢的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21: 1105-1108.
- [5] Ruan GP, Han YB, Wang TH, et al. Comparative study among three different methods of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation following cerebral infarction in rat[J]. Neurol Res, 2013, 35: 212-220.
- [6] 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.
- [7] 海泉, 陈烽烽, 周诚, 等. 脐带间充质干细胞临床前安全性考察[J]. 四川医学, 2016, 37: 237-240.
- [8] 祁兵, 翁孝刚, 王涛, 等. 不同剂量人脐带间充质干细胞对 I 型糖尿病大鼠的影响[J]. 中国卫生标准管理, 2014, 5: 60-61.
- [9] 蔡文渊. 不同剂量干细胞移植治疗急性心肌梗死的荟萃分析[D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
- [10] 仙淑丽, 刘英莉, 方均燕, 等. BMSC 对肾小管上皮细胞的保护作用及其作用机制[J]. 中华全科医学, 2013, 11: 1666-1668.
- [11] 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, 12: 1180-1183.
- [12] 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.
- [13] 许卫国, 杨建勇, 李鹤平, 等. 建立大鼠肝动脉插管途径的方法学研究[J]. 介入放射学杂志, 2007, 16: 264-265.

- [14] Yoo JH, Park C, Jung DI, et al. In vivo cell tracking of canine allogenic mesenchymal stem cells administration via renal arterial catheterization and physiopathological effects on the kidney in two healthy dogs[J]. J Vet Med Sci, 2011, 73: 269-274.

(收稿日期:2016-09-19)

(本文编辑:边 佑)

•病例报告 Case report•

1 例 CT 引导下肺穿刺活检继发空气栓塞形成

李昌燕, 刘建莉, 赵开飞

【关键词】肺穿刺; 空气栓塞; 护理

中图分类号:R735 文献标志码:D 文章编号:1008-794X(2017)-07-0645-02

Air embolism secondary to CT-guided pulmonary puncture biopsy in one patient LI Changyan, LIU Jianli, ZHAO Kaifei. Section I, Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province 563003, China

Corresponding author: ZHAO Kaifei, E-mail: zhaokaifei0852@sina.com (J Intervent Radiol, 2017, 26: 645-646)

【Key words】pulmonary puncture; air embolism; nursing

1 临床资料

患者男, 60 岁, 因“体检发现右肺占位性病变 3 d”入院, 3 d 前在当地县医院体检发现右肺占位性病变, 无咳嗽、咯痰及咯血, 无低热、盗汗等结核中毒症状。既往有肺结核病史 45 年, 为进一步治疗于 2016 年 6 月 28 日入住我院。

入院后胸部 CT 平扫+增强扫描: 诊断右肺占位性病变, 性质待查(图 1①②)。多次痰找抗酸杆菌阴性, 心电图检查为正常心电图。为明确诊断于 7 月 2 日行 CT 引导下肺部病变穿刺活检。术时患者俯卧 CT 检查床上, CT 扫描确定穿刺点及进针方向、深度(图 1③), 用 18 G 穿刺活检枪(COOK 公司)从背部进针并确认穿刺针位于病变内(图 1④), 进行 1 次穿刺, 取出 1 条组织送检病理学及脱落细胞检查。手术顺利, 术中患者未诉特殊不适。术毕患者起床后咳嗽、咯新鲜血液约 10 ml 后突发意识丧失伴全身大汗淋漓, 血压 60/40 mmHg, 心率 110~120 次/min, 双肺呼吸音清, 未闻及干湿啰音。立即予多巴胺、间羟胺升压, 地塞米松 10 mg 改善症状, 行气管插管、呼吸囊辅助呼吸。复查胸部 CT 提示: 心脏、大血管多发气体密度影(图 2)。头颅 CT 未见明显异常。诊断: 肺穿刺活

检后继发心脏、大血管空气栓塞。经积极抗休克、气管插管、呼吸囊辅助呼吸 5 min 后患者血压及意识逐渐恢复正常, 能正确回答问题, 无肢体感觉、运动障碍。诉心前区疼痛, 遂送入病房, 予头低足高位, 5 L/min 面罩吸氧, 注射用奥拉西坦营养脑细胞, 甘露醇脱水、降低颅内压, 低分子肝素钙抗凝防止栓塞面积增大, 并请相关科室协助治疗, 经治疗后 3 d 患者未诉特殊不适, 复查胸部 CT 提示心脏、大动脉气体消失。病理诊断: 肺结核。治疗 1 周后带四联抗结核药物出院, 随访 5 个月无明显不适。

2 讨论

CT 引导下肺穿刺活检常用于肺部疾病的诊断, 对临床治疗具有重要的指导意义, 该手术主要并发症有气胸、血气胸、咯血等, 而体循环空气栓塞是一种非常罕见而严重的并发症, 发生率 0.02%~0.40%^[1], 国内外文献仅见个案报道, 患者起病急、病情重、死亡率高, 临床上应引起重视^[2-3]。

2.1 体循环空气栓塞原因分析

气体经肺静脉-左心房-左心室-升主动脉进入体循环的途径主要有 3 种可能^[4]。①肺内空气经穿刺道进入肺静脉: 当穿刺针穿破空洞、空腔、支气管或肺泡且同时穿破邻近肺静脉, 形成气道-肺静脉瘘, 空气经穿刺针道进入肺静脉; ②空气经穿刺针直接进入肺静脉: 穿刺针刺破肺静脉后拔出针

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.07.016

作者单位: 563003 贵州 遵义医学院附属医院骨一科(李昌燕)、介入科(刘建莉、赵开飞)

通信作者: 赵开飞 E-mail: zhaokaifei0852@sina.com