

· 基础研究 ·

过表达 CXCR4 的骨髓间充质干细胞对共培养低氧/复氧肾小管上皮细胞的修复作用

刘楠梅 梅长林 张金元 田军 程劲

【摘要】 **目的** 构建 CXCR4 质粒并转染小鼠骨髓间充质干细胞(BMSC),与低氧/复氧(hypoxia/re-oxygenation, HR)预处理的肾小管上皮细胞(RTEC)共培养,观察 CXCR4-BMSC 对 HR-RTEC 的修复效应并探讨其机制。**方法** 采用基因转染技术获得 CXCR4-BMSC(CXCR4-BMSC/eGFP, eGFP 为示踪基因)和 null-BMSC(BMSC/eGFP),检测转染细胞的 CXCR4 表达。RTEC 于低氧/复氧环境中各培养 12 h 获得 HR-RTEC,体外模拟急性肾损伤(AKI)细胞模型。BMSC 与 HR-RTEC 共培养 12 h,免疫荧光法检测 HR-RTEC 的凋亡细胞比例,Western 印迹法检测 HR-RTEC 内的凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-3 和 Bcl-2 水平,结晶紫法计数迁移 BMSC 数量。以 HR-RTEC 上清液分别干预 BMSC、CXCR4-BMSC 和 null-BMSC,免疫荧光法检测各组 BMSC 角蛋白 18(CK18)的表达,ELISA 法检测 BMSC 上清中骨形态发生蛋白 7(BMP-7)、肝细胞生长因子(HGF)和白细胞介素 10(IL-10)的浓度。**结果** 成功转染的 CXCR4-BMSC 可高效表达 CXCR4。HR-RTEC 分别与 BMSC、CXCR4-BMSC、null-BMSC 共培养后,凋亡细胞比例均有下降,尤以与 CXCR4-BMSC 共培养组降低最为明显,并伴随着细胞内 cleaved Caspase-3 水平显著降低、Bcl-2 表达升高(均 $P < 0.05$)。结晶紫计数显示 CXCR4-BMSC 向 HR-RTEC 培养室的迁移数量最多。经 HR-RTEC 上清液干预后,BMSC、CXCR4-BMSC 和 null-BMSC 均仅能微量表达 CK18,各组间差异无统计学意义。CXCR4 过表达可显著增加 BMSC 的 BMP-7、HGF 和 IL-10 分泌。**结论** 过表达 CXCR4 的 BMSC 对共培养 HR-RTEC 的修复效应增强,BMSC 的定向迁移能力增加和迁移 BMSC 的分泌能力增强可能是 CXCR4-BMSC 的作用机制。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 肾小管上皮细胞; 修复; 低氧/复氧; CXCR4

Effect of CXCR4-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the repair of the co-cultured hypoxia/re-oxygenation renal tubular epithelial cells and its possible mechanism LIU Nan-mei*, MEI Chang-lin, ZHANG Jin-yuan, TIAN Jun, CHENG Jin. *Department of Nephrology, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Kidney Research Institute of PLA. Department of Nephrology, the 455th Hospital of PLA, Kidney Research Institute of Nanjing Military Area, Shanghai 200003, China.

Corresponding author: MEI Chang-lin, Email: chlmei1954@126.com

【Abstract】 Objective CXCR4-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells (CXCR4-BMSC) were constructed and co-cultured with hypoxia/re-oxygenation pretreated renal tubular epithelial cells (HR-RTEC). Repair of HR-RTEC was detected and the possible mechanism was also

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.11.007

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81300568);全军医学科技青年培育基金(13QN050);上海市青年科技启明星计划项目(12QA1405000);上海市自然科学基金(11ZR1449600);上海市基础研究重大项目(12DJ1400203);上海市卫生系统优秀青年人才培养计划(XYQ2013088)

作者单位:200003 上海,第二军医大学附属长征医院肾内科 解放军肾脏病研究所(刘楠梅、梅长林),解放军第四五五医院肾内科 南京军区肾脏病研究所(张金元、田军、程劲)

通信作者:梅长林,Email: chlmei1954@126.com

discussed. **Methods** CXCR4-BMSC (CXCR4-BMSC/eGFP, eGFP as the tracer gene) and null-BMSC (BMSC/eGFP) were obtained by gene transfection technique, and the level of CXCR4 in the transfected cells was detected. RTEC was cultured under hypoxia/re-oxygenation condition for 12 h, respectively, to obtain HR-RTEC, which was used to simulate AKI in vitro. BMSC and HR-RTEC were co-cultured for 12 h, and the proportion of apoptotic cells among the HR-RTEC was assayed by immunofluorescence technique. Western blot was used to test the protein levels of cleaved Caspase-3 and Bcl-2. The number of migrating BMSC was also assayed. After culturing with the HR-RTEC culture supernatant, the expression of cytokeratin 18 (CK18) in BMSC was tested by immunofluorescence staining. Cytokines including bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), hepatic growth factor (HGF) and interleukin-10 (IL-10) in the BMSC culture supernatant were detected by ELISA method. **Results** Expression of CXCR4 was enhanced in CXCR4-BMSC. Proportions of the apoptotic cells among HR-RTEC after being co-cultured with BMSC, CXCR4-BMSC and null-BMSC were all decreased, especially in the C/H group. The decreased cleaved Caspase-3 and enhanced Bcl-2 were also observed in HR-RTEC. The number of migrating CXCR4-BMSC was the highest. Proportions of CK18⁺ cells in BMSC, CXCR4-BMSC and null-BMSC were all low and showed no difference. However, CXCR4 overexpression in BMSC stimulated secretions of BMP-7, HGF and IL-10. **Conclusions** CXCR4-overexpressing BMSC has more repair effect on the co-cultured HR-RTEC, the enhanced migration ability and secretion ability of CXCR4-BMSC are the possible mechanisms.

【Key words】 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; Hypoxia/re-oxygenation; Renal tubular epithelial cells; CXCR4; Repair

急性肾损伤(AKI)状态下,骨髓间充质干细胞移植后可优先向肾脏归巢,通过分化^[1-2]及旁分泌功能^[3-4]参与AKI的修复,但修复效能有限^[5-6]。移植BMSC的肾脏归巢能力以及归巢至肾脏的BMSC分化、分泌功能成为影响AKI修复效率的关键因素。基质细胞衍生因子1(stromal cell derived factor, SDF-1)/CXCR4轴是诱导BMSC定向归巢的重要生物轴^[7-9]。有学者认为该生物轴参与了对BMSC分泌效应的调控^[10-11]。AKI状态下肾脏微环境中的SDF-1水平上升^[12],但大量体外扩增可显著降低BMSC表面的CXCR4表达^[13-14],以致削弱了SDF-1/CXCR4轴的效应。因此,上调BMSC的CXCR4表达成为提高移植BMSC的AKI修复效能的新思路。本实验采用低氧/复氧预处理肾小管上皮细胞形成HR-RTEC,体外模拟缺血再灌注损伤诱导的AKI。采用基因转染技术上调BMSC的CXCR4表达,通过transwell小室实现BMSC与HR-RTEC共培养,观察过表达CXCR4的BMSC对HR-RTEC的修复效应,并通过CXCR4-BMSC的归巢能力和归巢CXCR4-BMSC的分化、分泌能力的检测探讨其机制,为提高BMSC体内移植治疗AKI效能提供实验基础。

材料与方法

1. 细胞与试剂:小鼠BMSC株、小鼠RTEC株(美国ATCC公司);293FT细胞(中科院上海细胞所);Gateway[®] BP Clonase[™] II Enzyme Mix、Gateway[®] LR Clonase[™] II Plus Enzyme Mix和Lipofectamine 2000(美国Invitrogen);QIAquick Gel Extraction Kit(德国QIAGEN);质粒小提试剂盒(北京天根);PE标记的CD44抗体、FITC标记的CD45抗体(美国BD Biosciences);Alexa Fluor 647标记的抗小鼠CXCR4抗体、Alexa Fluor 647标记的小鼠IgG2b, κIsotype Ctrl(美国BioLegend);Anaero培养袋(日本MGC);transwell小室(美国Coring);低糖及无糖DMEM培养基、胎牛血清(FBS)(美国Invitrogen);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(武汉碧云天);兔抗小鼠cleaved Caspase-3、Bcl-2单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology);兔抗小鼠角蛋白18(CK18)多克隆抗体(美国Bioworld Technology);Cy3标记的羊抗兔二抗(美国Jackson公司);Hoechst 33342染液(美国Sigma);骨形态发生蛋白-7(BMP-7)、肝细胞生长因子(HGF)、白细胞介素10(IL-10)ELISA检测试剂盒(上海圆创)。

2. CXCR4-BMSC和null-BMSC的制备:采用Gateway技术获得包含CXCR4基因的质粒

(pLV-CXCR4/eGFP, eGFP 为示踪基因), 同时构建 pLV-eGFP 作为空白对照。脂质体法转染 293FT 细胞获得慢病毒原液 lenti-CXCR4/eGFP 和 lenti-eGFP, 稀释后分别感染 BMSC 获得 CXCR4-BMSC (CXCR4 - BMSC/eGFP) 和 null - BMSC (BMSC/eGFP), null-BMSC 作为对照。将野生型 BMSC、CXCR4-BMSC 和 null-BMSC 制成单细胞悬液, 分别加入 PE 标记的抗 CD44 抗体、FITC 标记的抗 CD45 抗体, 室温避光孵育, 流式细胞仪检测上述抗原表达。

3. 转染细胞表面的 CXCR4 表达: PBS 重悬 CXCR4-BMSC 和 null-BMSC 制成单细胞悬液, 实验组加入 Alexa Fluor 647 标记的抗小鼠 CXCR4 抗体, 同型对照组加入 Alexa Fluor 647 标记的小鼠 IgG2b, κIsotype Ctrl, 空白对照组加入 PBS。4℃ 避光孵育 30 min, MACS Quant 流式细胞仪检测分析。

4. HR-RTEC 制备: 将 4×10^5 个/孔的小鼠 RTEC 接种于 6 孔板中, 置于 Anaero 培养袋 (3% O₂+92%N₂+5%CO₂) 中用无糖 DMEM 培养基培养 12 h 后, 移至 CO₂ 培养箱 (95% 空气+5%CO₂) 换用含 10%FBS 的低糖 DMEM 培养基继续培养 12 h 获得 HR-RTEC, 体外模拟 AKI^[15-16]。

5. 细胞共培养: 采用 transwell 体系进行细胞共培养: HR-RTEC 准备完毕后, 将 6 孔板嵌入 transwell 小室 (小室底部为聚碳酸酯膜, 膜孔径 8μm), 将重悬的 BMSC、CXCR4-BMSC、null-BMSC 分别接种于 transwell 小室内, 接种密度为 1.8×10^5 个/室, 再次置于 CO₂ 培养箱中共孵育 12 h。实验共分 4 组: 对照组 (transwell 小室中仅加入低糖 DMEM 培养液); BMSC/HR-RTEC 共培养组 (B/H 组); CXCR4-BMSC/HR-RTEC 共培养组 (C/H 组); null-BMSC/HR-RTEC 共培养组 (N/H 组)。

6. HR-RTEC 的凋亡检测: 采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测 6 孔板中 HR-RTEC 的凋亡, 细胞浆呈绿色荧光为凋亡阳性细胞。每份标本随机选取 10 个非重叠视野, 计数凋亡阳性细胞所占百分率, 取其均数。

7. HR-RTEC 凋亡相关蛋白表达: Western 印迹法检测 HR-RTEC 中 cleaved Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达水平。裂解液裂解 6 孔板中的 HR-RTEC, 离心取上清, 测蛋白浓度。经 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 封闭后分别加入兔抗

小鼠 cleaved Caspase-3 单抗和兔抗小鼠 Bcl-2 单抗, 4℃ 孵育过夜, 清洗后加入羊抗兔 IgG 孵育 1 h。ECL 作用 1~2 min, 将混合液滴加于 PVDF 膜表面, 孵育 1~2 min。用 Fiuorchem HD2 凝胶成像分析系统观察、照相。测量各条带的灰度值, GAPDH 为内参照, 蛋白表达强度用二者灰度值的比值表示。

8. BMSC 的定向迁移: 细胞分为 B/H 组、C/H 组和 N/H 组, 共培养结束后取出 transwell 小室, 棉签轻轻拭去小室微孔膜上层的细胞, 结晶紫染色法计数迁移至微孔膜下层细胞数量, 每组设定 6 个复孔。

9. BMSC 的肾向分化能力检测: 成功制备 HR-RTEC 后, 收集 6 孔板中的上清液, 用上清液分别孵育 BMSC、CXCR4-BMSC 和 null-BMSC 12 h, 体外模拟迁移至 AKI 肾脏微环境中的干细胞。用免疫荧光染色法检测 BMSC 的 CK18 表达: 4% 多聚甲醛固定 30 min, 洗涤后加入穿透液轻摇 30 min, 室温封闭 5 min 后加入兔抗小鼠 CK18 抗体, 37℃ 孵育 1 h; 后加入 Cy3 标记的羊抗兔二抗, 37℃ 避光孵育 1 h; Hoechst 33342 染液进行核复染, 避光孵育 30 min; 洗去染液, 荧光显微镜下观察。所有细胞的细胞核均呈现蓝色, 细胞浆同时显示橙红色为 CK18 阳性细胞 (CK18⁺ 细胞), 每份标本随机选取 10 个非重叠视野, 采用计算机图像分析系统 (Image-Pro Plus 6.0) 计数 CK18⁺ 细胞所占百分比, 取其均数。

10. AKI 微环境下的 BMSC 分泌能力检测: 经 HR-RTEC 上清液培养 12 h 后, 分别收集 BMSC、CXCR4-BMSC 和 null-BMSC 的培养上清, 按照 ELISA 检测试剂盒说明书分别检测上清中的 BMP-7、HGF、IL-10 的浓度。

11. 统计学处理: 用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异的比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

结 果

1. CXCR4-BMSC 的制备: 经质粒构建、慢病毒包装及转染后成功获得 CXCR4-BMSC (CXCR4-BMSC/eGFP) 和 null-BMSC (BMSC/eGFP)^[15]。流式细胞仪检测结果显示基因修饰后的 BMSC

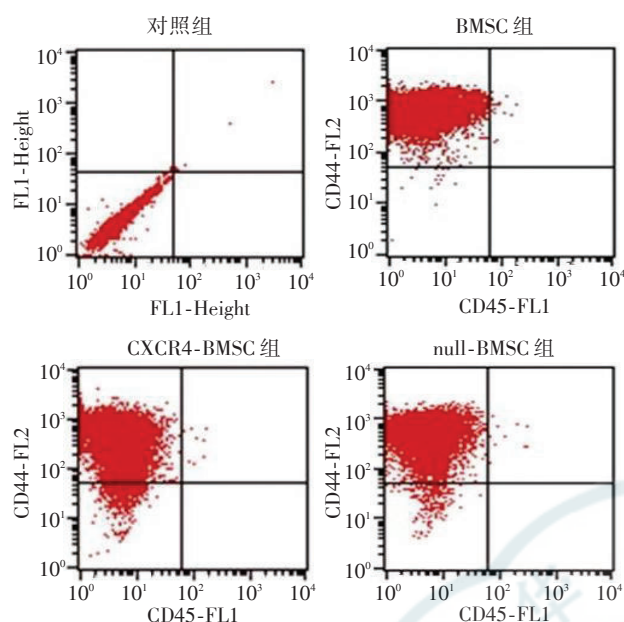
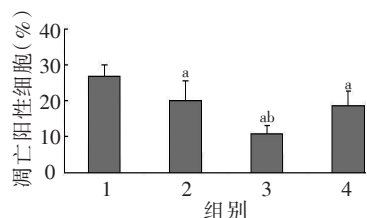


图 1 转染后的 BMSC 表面标志物的鉴定(流式细胞术)

(CXCR4-BMSC 和 null-BMSC)同野生型 BMSC 一致,均为 CD44 高表达、CD45 低表达,表明病毒转染未改变 BMSC 的基本表型,以未加抗体的野生型 BMSC 为阴性对照。见图 1。

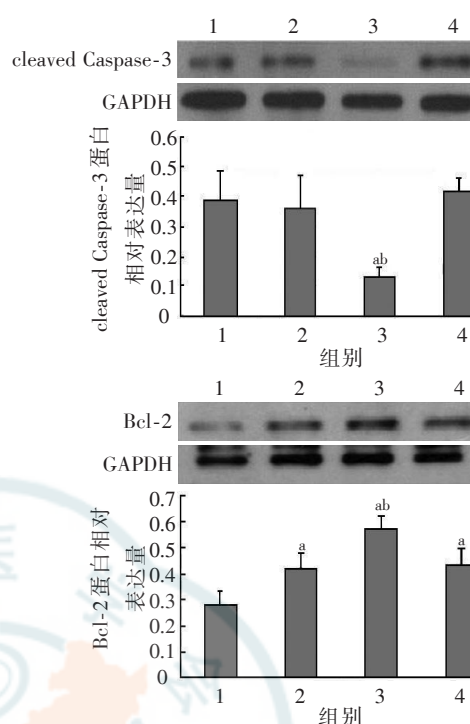
2. 转染 BMSC 的 CXCR4 表达:流式细胞术结果提示 null-BMSC 细胞表面的 CXCR4 阳性表达率较低,经 CXCR4 基因修饰的 BMSC 中,细胞表面 CXCR4 阳性(CXCR4⁺)细胞比率升高,组间比较差异有统计学意义[(47.53±4.40)%比(7.21±0.36)%, $P < 0.05$]。

3. 共培养 HR-RTEC 的修复:对照组为单纯 HR-RTEC 孵育 12 h,transwell 小室中仅加入低糖 DMEM 培养液。与对照组相比,BMSC 共培养的 3 组细胞(B/H 组、C/H 组、N/H 组)HR-RTEC 凋亡阳性细胞比率下降,以 CXCR4-BMSC 共培养组(C/H 组)最为显著($P < 0.05$)。见图 2。Western 印迹结果显示,与对照组相比,CXCR4-BMSC 共培养组



注:1:对照组;2:BMSC/HR-RTEC 共培养组(B/H 组);3: CXCR4-BMSC/HR-RTEC 共培养组(C/H 组);4: null-BMSC/HR-RTEC 共培养组(N/H 组);与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 B/H 组比较,^b $P < 0.05$

图 2 各组 HR-RTEC 凋亡阳性细胞比率的比较($n=6$)



注:1:对照组;2:BMSC/HR-RTEC 共培养组(B/H 组);3: CXCR4-BMSC/HR-RTEC 共培养组(C/H 组);4: null-BMSC/HR-RTEC 共培养组(N/H 组);与对照组比较,^a $P < 0.05$;与 B/H 组比较,^b $P < 0.05$

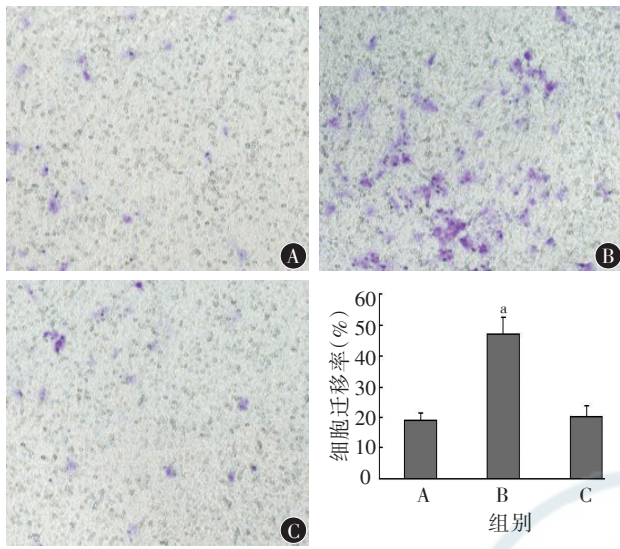
图 3 各组细胞 cleaved Caspase-3、Bcl-2 蛋白的表达(Western 印迹)

(C/H 组)HR-RTEC 中 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平下降,Bcl-2 蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。见图 3。

4. BMSC 的迁移: B/H 组、C/H 组和 N/H 组的细胞迁移数分别为(19.00±2.37)、(50.83±5.57)和(20.17±3.76)。空载体转染并不额外影响 BMSC 的迁移能力,而经 CXCR4 基因修饰后的 BMSC 向 HR-RTEC 培养室迁移能力显著增强($P < 0.05$)。见图 4。

5. BMSC 的体外分化:用 HR-RTEC 上清液培养 BMSC,免疫荧光法检测培养 BMSC 的 CK18 (RTEC 特异性标志物^[17])表达。结果显示各组培养的 BMSC 均仅微量表达 CK18,且 BMSC、CXCR4-BMSC 和 null-BMSC 中 CK18 阳性细胞比率的差异无统计学意义,说明 CXCR4 过表达对 BMSC 的 CK18 表达无影响。见图 5。

6. 各组 BMSC 上清中的细胞因子水平:ELISA 法检测模拟 AKI 微环境中培养的 BMSC 分泌的部分细胞因子水平。与 BMSC 相比,CXCR4-BMSC 上清中 BMP-7、HGF 和 IL-10 水平升高($P < 0.05$)。见表 1。



注: A: BMSC/HR-RTEC 共培养组 (B/H 组); B: CXCR4-BMSC/HR-RTEC 共培养组 (C/H 组); C: null-BMSC/HR-RTEC 共培养组 (N/H 组); 迁移的 BMSC 呈紫色改变; 与 B/H 组比较, ^a*P* < 0.05

图 4 B/H 组、C/H 组和 N/H 组细胞迁移率的比较 (×200)

表 1 各组 BMSC 上清中的细胞因子水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s, n=6$)

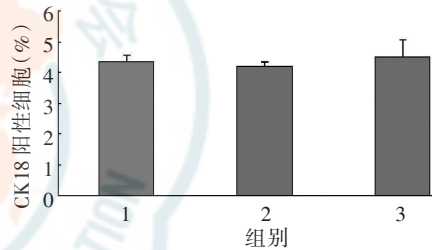
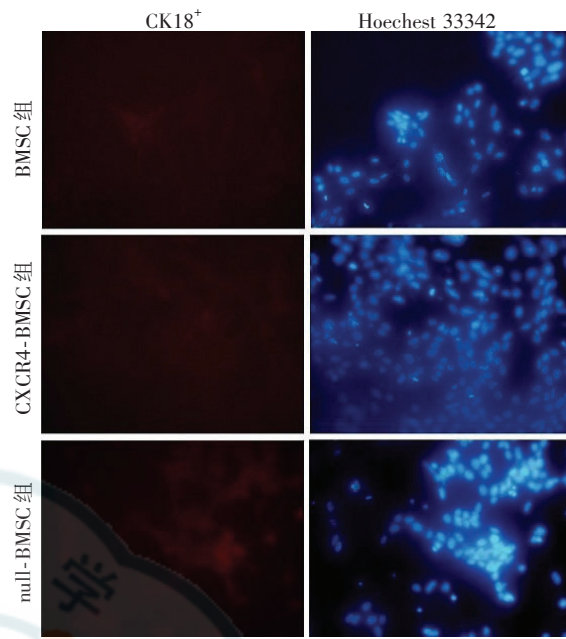
组别	BMP-7	HGF	IL-10
BMSC 组	37.83±3.55	19.57±3.24	14.16±1.90
CXCR4-BMSC 组	50.73±2.72 ^a	29.20±2.08 ^a	22.97±2.12 ^a
null-BMSC 组	35.61±4.10	18.52±4.75	16.06±1.62

注: 与 BMSC 组比较, ^a*P* < 0.05

讨 论

AKI 是临床常见病, 其发病率及病死率均居高不下^[18], 目前尚无特殊治疗方法阻止疾病进展。干细胞治疗为肾脏疾病的治疗提供了新的途径, BMSC 是比较理想的移植用“种子细胞”, 将其用于 AKI 修复具有重要意义^[1-4], 但现有的研究结果显示这种修复效能是有限的^[5-6]。

移植细胞向损伤部位的归巢是 BMSC 移植治疗前提, SDF-1/CXCR4 轴是近年来干细胞迁移及归巢行为研究的热点。本研究中我们将 RTEC 进行 HR 预处理, 体外模拟 AKI, 已检测证实在 HR-RTEC 上清中 SDF-1 浓度有显著升高^[15-16]。但在正常状态下 BMSC 细胞表面的 CXCR4 表达率低^[9], 并且多次的分离培养扩增也降低了 BMSC 的 CXCR4 合成^[13-14], 我们通过流式细胞术证实了 null-BMSC 表面的 CXCR4 低表达。这将导致在 BMSC



注: 1: BMSC 组; 2: CXCR4-BMSC 组; 3: null-BMSC 组; CK18⁺ 细胞胞浆呈橙红色荧光, Hoechst 33342 复染后, 细胞核呈现蓝色

图 5 各组 CK18⁺ 细胞比率的比较 (免疫荧光法)

移植治疗 AKI 时, AKI 微环境中升高的 SDF-1 不能通过与 CXCR4 充分结合介导 BMSC 定向迁移, 大大削弱了移植 BMSC 的修复效能。为此, 我们以慢病毒为载体将 CXCR4 基因转入体外扩增的 BMSC, 实现了 BMSC 细胞表面的 CXCR4 过表达, 对细胞表面标志物的检测证实了基因修饰并未改变 BMSC 的生物学状态。通过 transwell 共培养体系我们实现了 HR-RTEC 与 BMSC 的共培养, 共培养后 HR-RTEC 的凋亡比例明显降低, 尤以与 CXCR4-BMSC 共培养组降低最为显著, 同时伴随着 HR-RTEC 内凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-3 水平降低, Bcl-2 水平升高。上述结果提示 CXCR4 基因过表达可增强 BMSC 对共培养 HR-RTEC 的修复效应, 而过表达 CXCR4 的 BMSC 向 HR-RTEC 培养室的定向迁移数量增加为其机制之一。

归巢至肾脏的 BMSC 的分化、分泌能力是影响 AKI 修复效能的重要因素。然而, AKI 后肾组

织局部常常处于氧化应激状态,归巢至肾脏的 BMSC 内活性氧(ROS)大量聚集,会导致 BMSC 出现应激诱导的早熟性衰老(stress-induced premature senescence, SIPS)^[20-21],分化潜能及分泌能力大幅度降低^[22],制约了归巢 BMSC 的修复效能。那么 CXCR4 基因过表达是否会对迁移至 AKI 微环境中的 BMSC 的分化、分泌功能产生直接效应呢?我们采用 HR-RTEC 上清液培养 BMSC,模拟迁移至 HR-RTEC 培养室的 BMSC。免疫荧光检查结果显示 CXCR4-BMSC 的胞浆 CK18 表达并无升高,且各组中 CK18 阳性细胞比率均很低。然而, CXCR4 的过表达却导致了 BMSC 培养上清中 BMP-7、HGF 和 IL-10 的浓度显著增加,这些均为促进 HR-RTEC 修复的重要细胞因子^[23-25]。上述结果表明,迁移至 HR-RTEC 培养室的 BMSC 直接肾向细胞分化效能很低, CXCR4 基因修饰并不能增强迁移 BMSC 的分化潜能,然而却可以显著增强 BMSC 的分泌能力,通过旁分泌效应促进 HR-RTEC 修复,这成为 CXCR4-BMSC 增强共培养 HR-RTEC 修复效能的另一可能机制。

综上,我们认为 BMSC 经 CXCR4 基因修饰后可显著增强对共培养 HR-RTEC 的修复效应, BMSC 的定向迁移能力增加和迁移 BMSC 的分泌能力增强为 CXCR4-BMSC 发挥作用的可能机制。将其用于体内移植时,有望增强 AKI 修复效应,这一推论还有待于动物实验及临床研究的进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Li K, Han Q, Yan X, et al. Not a process of simple vicariousness, the differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells to renal tubular epithelial cells plays an important role in acute kidney injury repairing. *Stem Cells Dev*, 2010, 19: 1267-1275.
- [2] Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 1794-1804.
- [3] Semedo P, Wang PM, Andreucci TH, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate tissue damages triggered by renal ischemia and reperfusion injury. *Transplant Proc*, 2007, 39: 421-423.
- [4] Tögel F, Weiss K, Yang Y, et al. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292: F1626-F1635.
- [5] Hoffmann J, Glassford AJ, Doyle TC, et al. Angiogenic effects despite limited cell survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under ischemia. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 58: 136-142.
- [6] Stolzing A, Scutt A. Effect of reduced culture temperature on antioxidant defences of mesenchymal stem cells. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41: 326-338.
- [7] Cencioni C, Capogrossi MC, Napolitano M. The SDF-1/CXCR4 axis in stem cell preconditioning. *Cardiovasc Res*, 2012, 94: 400-407.
- [8] Wang Y, Luther K. Genetically manipulated progenitor/stem cells restore function to the infarcted heart via the SDF-1 α /CXCR4 signaling pathway. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012, 111: 265-284.
- [9] Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 2003, 107: 1322-1328.
- [10] Du Z, Wei C, Yan J, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing C-X-C chemokine receptor type 4 improve early liver regeneration of small-for-size liver grafts. *Liver Transpl*, 2013, 19: 215-225.
- [11] Liu H, Liu S, Li Y, et al. The role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 axis in the therapeutic effects of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells for renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*, 2012, 7: e34608.
- [12] Tögel F, Isaac J, Hu Z, et al. Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury. *Kidney Int*, 2005, 67: 1772-1784.
- [13] Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, 2006, 24: 1254-1264.
- [14] Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, 2004, 104: 2643-2645.
- [15] 刘楠梅, 田军, 程劲, 等. CXCR4 基因修饰对骨髓间充质干细胞向急性肾损伤微环境定向迁移的放大效应及可能机制. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2013, 22: 118-124.
- [16] 刘楠梅, 梅长林, 张金元, 等. 红细胞生成素对急性肾损伤微环境下骨髓间充质干细胞定向趋化的影响. *中华肾脏病杂志*, 2013, 29: 263-267.
- [17] Baer PC, Bereiter-Hahn J, Schubert R, et al. Differentiation status of human renal proximal and distal tubular epithelial cells in vitro: Differential expression of characteristic markers. *Cells Tissues Organs*, 2006, 184: 16-22.
- [18] Ali T, Khan I, Simpson W, et al. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18: 1292-1298.

[19] Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. SDF - 1 α /CXCR4 - mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. Brain Res, 2008, 1195: 104-112.

[20] Fripiat C, Dewelle J, Remacle J, et al. Signal transduction in H2O2 - induced senescence - like phenotype in human diploid fibroblasts. Free Radic Biol Med, 2002, 33: 1334-1346.

[21] Wei H, Li Z, Hu S, et al. Apoptosis of mesenchymal stem cells induced by hydrogen peroxide concerns both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial death pathway through regulation of caspases, p38 and JNK. J Cell Biochem, 2010, 111: 967-978.

[22] Chen CT, Shih YR, Kuo TK, et al. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Stem Cells, 2008, 26: 960-968.

[23] Zeisberg M, Kalluri R. Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. Pediatr Nephrol, 2008, 23: 1395-1398.

[24] Dai C, Yang J, Bastacky S, et al. Intravenous administration of hepatocyte growth factor gene ameliorates diabetic nephropathy in mice. J Am Soc Nephrol, 2004, 15: 2637-2647.

[25] Hruska KA. Treatment of chronic tubulointerstitial disease: a new concept. Kidney Int, 2002, 61: 1911-1922.

(收稿日期: 2013-07-20)

(本文编辑: 孙玉玲)

· 读者·作者·编者 ·

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

针对当前来稿中统计学方法交待不明或选用不合理以及表述不规范等问题,特提醒注意以下方面:

1. 统计学符号: 按 GB 3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体排印。常用:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} (中位数仍用 M);(2)标准差用英文小写 s ;(3)标准误用英文小写 $S\bar{x}$;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊小写 ν ;(9)概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值,如 t 值、 χ^2 值、 q 值等)。

2. 研究设计: 应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择: 对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时,应说对比组之间的差异具有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t = 3.45$, $\chi^2 = 4.68$, $F = 6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P > 0.05$, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 三种表达方式即可满足需要,无须再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 可信区间。

本刊编辑部