

经肾动脉移植脂肪干细胞对大鼠急性缺血性肾损伤的治疗作用

刘少鹏 俞小芳 钟一红 方艺 刘红 许嵘 郭佳 蔡洁茹 刘同强
谢婷 丁小强

【摘要】 目的 探讨经大鼠左侧肾动脉移植脂肪干细胞(ASCs)对急性缺血性肾损伤(iAKI)的治疗作用,同时观察 ASCs 的体内分布情况。**方法** 采用胶原酶消化法分离培养 ASCs 并鉴定。夹闭 SD 大鼠双侧肾蒂 45 min 建立 iAKI 模型。按随机数字表法分成两组:对照组(再灌注后即刻经左肾动脉注射 500 μ l PBS, $n = 30$)和 ASCs 治疗组(再灌注后即刻经肾动脉移植 5×10^5 ASCs, $n = 30$)。术后 12、24、48、72 h 和 1 周时处死大鼠,测定血清肌酐值(Scr),光学显微镜观察肾脏病理损伤及细胞凋亡、炎症反应及细胞增生情况,荧光显微镜观察 ASCs 在肾、肺、肝、脾、心脏的停留时间及分布情况。**结果** 培养的第 3 代 ASCs 具有成脂、成骨等多向分化潜能,流式细胞仪检测高表达 CD29(99.35%)和 CD90(92.88%),低表达 CD34(0.48%)和 CD45(3.51%)。ASCs 治疗组 Scr 水平各时间点均显著低于对照组(均 $P < 0.05$)。与对照组相比,治疗组左侧肾小管间质损伤评分在再灌注 12、24、48 h 时显著降低(均 $P < 0.05$);肾组织 TUNEL 染色和巨噬细胞浸润染色积分在再灌注 12、24、48、72 h 和 1 周时显著降低(均 $P < 0.05$);核增殖抗原在再灌注 48 h 时显著增加($P < 0.05$),72 h 和 1 周时显著减少(均 $P < 0.05$)。与治疗组右肾相比,治疗组左侧肾小管间质损伤评分在再灌注 24 h 时显著降低($P < 0.05$);肾组织 TUNEL 染色阳性细胞数在再灌注 1 周时减少($P < 0.05$);巨噬细胞浸润染色积分在再灌注 12、48、72 h 和 1 周时减少(均 $P < 0.05$);核增殖抗原 48 h 时增加($P < 0.05$),72 h 和 1 周时减少(均 $P < 0.05$)。荧光显微镜观察显示 ASCs 在肾脏内停留时间超过 1 周,但移植 48 h 后明显减少,肺、肝、脾、心脏仅观察到极少量的 Dil 阳性细胞。**结论** ASCs 经肾动脉移植可显著改善 iAKI 大鼠肾功能、减轻肾脏病理损伤和细胞凋亡、减少炎性细胞浸润、促进损伤后修复,这可能与经肾动脉移植可提高 ASCs 进入损伤肾脏的数量,减少循环过程中的其他器官截留效应有关。

【关键词】 干细胞移植; 再灌注损伤; 细胞增殖; 细胞凋亡; 急性肾损伤

Transplantation of adipose-derived stem cells via renal artery protects against acute ischemic kidney injury LIU Shao-peng, YU Xiao-fang, ZHONG Yi-hong, FANG Yi, LIU Hong, XU Rong, GUO Jia, CAI Jie-ru, LIU Tong-qiang, XIE Ting, DING Xiao-qiang. Department of Nephrology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: DING Xiao-qiang, Email: ding.xiaoqiang@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 Objective To explore the therapeutic effect of adipose derived stem cells (ASCs) transplanted via left renal artery on rat acute ischemia reperfusion kidney injury (iAKI) and the distribution of ASCs in different organs. **Methods** ASCs were isolated from inguinal subcutaneous

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.10.008

基金项目:国家自然科学基金(81000307);上海市科委基础研究重大项目(12DJ1400200);科技部国家科技支撑计划(2011BAJ18B03)

作者单位:200032 上海,复旦大学附属中山医院肾内科(刘红,现在杭州市中医院肾内科;许嵘,现在江苏省中医院肾内科;刘同强,现在常州市第二人民医院肾内科)

通信作者:丁小强,Email:ding.xiaoqiang@zs-hospital.sh.cn

adipose tissue of male SD rats. iAKI model was set in male SD rats by clipping bilateral renal pedicles for 45 min (ischemia reperfusion model). The iAKI rats were randomized into two groups ($n = 30$): control group (renal intra-arterial administration of 500 μ l PBS) and ASCs transplantation group (renal intra-arterial administration of 5×10^5 ASCs). Rats were sacrificed at 12, 24, 48, 72 hours and 1 week after reperfusion to measure renal function by serum creatinine (Scr). Renal pathology, cell apoptosis, inflammation and cell proliferation were analyzed by optical microscope. Distributions of ASCs were measured by fluorescent microscopy. **Results** ASCs at its third passage had the capacities for adipogenic and osteogenic differentiation, positive for CD29, CD90, and negative for CD34, CD45. Compared with control group, Scr in ASCs transplantation group were significantly lower at all time points ($P < 0.05$); score of left renal tubular interstitial damage degree in ASCs transplantation group was markedly lower at 12 hours, 24 hours, 48 hours ($P < 0.05$); TUNEL and macrophage infiltration score in ASCs transplantation group were significantly lower ($P < 0.05$); proliferating antigen increased at 48 hours and decreased at 72 hours and 1 week ($P < 0.05$). Meanwhile, comparing with right kidneys in ASCs transplantation group, score of left renal tubular interstitial damage degree was markedly lower at 24 hours ($P < 0.05$); the number of TUNEL positive cells at 1 week was observably lower ($P < 0.05$); macrophage infiltration score were dramatically lower at 12 hours, 48 hours, 72 hours and 1 week; proliferating antigen increased at 48 hours and decreased at 72 hours and 1 week ($P < 0.05$). Fluorescence microscope observation showed that residence time of ASCs in kidney was more than 7 days, but the number of ASCs significantly reduced after 48 hours, few Dil positive cells could be observed in lung, liver, spleen and heart. **Conclusions** ASCs transplantation via renal artery can significantly improve renal function and ameliorate pathological damage, relieve apoptosis and macrophage infiltration, and enhance the repair process after iAKI. It may due to renal intra-arterial transplantation increasing the amounts of ASCs migrated into the kidney in iAKI and reducing ASCs distribution in other organs.

【Key words】 Stem cell transplantation; Reperfusion injury; Cell proliferation; Apoptosis; Acute kidney injury

近年来骨髓间充质干细胞移植成为急性肾损伤(AKI)有前景的治疗方法,但相比其他来源的干细胞,脂肪源性干细胞(adipose derived stem cells, ASCs)具有独特的优势。首先,脂肪组织分布广泛,容易获取,对患者创伤小,易于接受;其次,细胞群易于分离,增殖速度快,应用方便。以往研究中干细胞移植方法大多采用颈动脉^[1]、尾静脉^[2]等注射方式,归巢至肾脏的干细胞数量少,亟需新的注射途径来提高肾脏干细胞的归巢数量。本研究采用左肾动脉直接注射的方式,研究ASCs对急性缺血性肾损伤(ischemic AKI, iAKI)的治疗作用,并探讨ASCs在体内的归巢和分布情况。

材料和方法

一、动物与试剂

1. 实验动物: 100 ~ 140 g 雄性SD大鼠用于提取ASCs, 250 ~ 300 g 雄性SD大鼠60只用于左肾动脉移植ASCs研究,均由复旦大学上海医学院实

验动物中心提供(清洁级)。

2. 主要试剂: LG-DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清(美国Gibco); I型胶原酶(美国Sigma); 小鼠抗大鼠CD29-PE、CD45-FITC、CD90-FITC(美国Biolegend); CD34-FITC(美国Santa Cruz); CM-Dil(美国Invitrogen); 肌酐测定试剂盒、尿素氮测定试剂盒(美国BioAssay Systems); TUNEL测定试剂盒(南京建成); CD68测定试剂盒(美国Chemicon); Ki-67测定试剂盒(英国Abcam)。

二、ASCs的分离、纯化、鉴定与标记

1. ASCs分离与培养: 取100 ~ 140 g 雄性SD大鼠, 脱颈处死后浸泡于75%乙醇中15 min, 剪开腹股沟处的皮肤, 获取白色的皮下脂肪, 放入有PBS(0.1 mol/L, pH7.2)的培养皿中, PBS冲洗以清除红细胞。将冲洗干净的脂肪组织块放入离心管中剪碎成小块, 加入3 ~ 5倍体积的0.1% I型胶原酶, 在37℃恒温摇床振荡消化45 min。加入同体积完全培养液, 以中和消化液并稀释细胞,

用吸管反复吹打混匀, 1000 r/min 离心 10 min (离心半径 10 min), 弃上清和残留脂肪, 获得细胞沉淀物。加入完全培养液 (低糖 DMEM 培养液, 10% 胎牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 584 mg/L L-谷氨酰胺, pH 7.0 ~ 7.4) 重悬细胞, 接种至 6 cm 培养皿内, 在饱和湿度、5% CO₂、37℃ 标准环境下, 以贴壁纯化的方法进行培养^[3]。

2. ASCs 鉴定: (1) 表面标志检测: 用含 0.02% EDTA 的胰蛋白酶消化第 3 代 ASCs, PBS 收集细胞, 离心后加入 100 μl PBS 制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10⁶/ml, 分别加入 FITC-CD34、FITC-CD45、FITC-CD90 及 PE-CD29 抗体及相应同型对照抗体各 1 μl, 室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤未结合的抗体, 加入 1 ml PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测。(2) 多向分化能力检测: 成脂诱导和成骨诱导参照张雪莲等^[4]的方法进行。

3. ASCs 的 CM-Dil 标记: 依据 Dil 细胞标记说明书, 标记 ASCs, 并用 D-PBS 调整细胞浓度至 1×10⁶/ml (使用细胞计数板定量)。

三、动物模型建立

体视显微镜下大鼠肾动脉内注射 ASCs: 夹闭双侧肾蒂 45 min 建立 SD 大鼠缺血再灌注肾损伤模型。恢复灌注后即刻 (< 1 h), 游离左侧肾蒂, 体视显微镜下分离肾动脉, 穿手术缝合线, 缝合线尽可能靠近近心端。治疗组以 33 号针头穿刺入肾动脉 (穿刺点位于缝合线的远心端), 缓慢推注 500 μl 含 5×10⁵ 个 ASCs 的 PBS。提起缝合线以阻断肾动脉, 拔出注射器, 明胶海绵覆盖穿刺点, 阻断肾动脉 20 ~ 30 s, 观察 2 ~ 3 min, 确认肾动脉无出血, 撤去缝合线, 关腹。对照组注射等量 PBS。

四、标本采集与处理

1. 血液采集与检测: 大鼠下腔静脉采血 5 ml, 分离收集血清, 参照 BioAssay 比色法肌酐、尿素氮测定说明书, 应用酶标仪测定 Scr。

2. 脏器标本采集: 再灌注后不同时间点将大鼠麻醉后分别摘除肾、肺、肝、脾、心等脏器。

3. 冰冻切片制作及肾小球内 ASCs 计数: (1) 冰冻切片 DAPI 染色: OCT 包埋大鼠肾、肺、肝、脾、心后速冻, 用 Leica CM1850 冰冻切片切取 6 μm 厚冰冻切片, DAPI 染色, 荧光显微镜下观察拍照^[5]。(2) 肾组织冰冻切片 ASCs 计数采用 200 倍荧光显微镜下 10 个随机视野 Dil 阳性细胞均值。

五、肾脏组织病理学检查及评分

肾组织常规固定、包埋后, 制备肾组织石蜡切片, 片厚 2 μm, 常规 HE 染色, 光镜下观察病理学损伤, 并进行肾小管间质损伤评分, 具体如下: 每个标本在 200 倍光镜下随机选取皮髓交界处 10 个不重叠视野, 病理损伤指标依据肾小管坏死、上皮细胞刷状缘脱落、管型形成及小管扩张等, 正常为 0 分, 受损肾小管间质 ≤ 10% 为 1 分, 11% ~ 25% 为 2 分, 26% ~ 45% 为 3 分, 46% ~ 75% 为 4 分, > 75% 为 5 分, 以此作半定量分析计算其平均值, 评分值越高代表损伤程度越重^[6]。

六、免疫组化

TUNEL、CD68、Ki-67 分别用于检测肾脏细胞凋亡、巨噬细胞浸润及细胞增殖情况^[7]。TUNEL 阳性细胞、CD68 阳性细胞、Ki-67 阳性细胞评分采用计数 200 倍光镜下皮髓交界处 10 个随机视野阳性细胞均值。

七、统计学处理

计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据符合正态分布时采用方差齐性 (Levene) 检验, 方差齐性时两组数据间比较采用 *t* 检验, 方差不齐时采用 *t'* 检验; 不符合正态分布时采用非参数 (Kruskal-Wallis) 检验。应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。P < 0.05 视为差异有统计学意义。

结 果

一、ASCs 的鉴定

皮下脂肪组织分离的 ASCs 培养 24 h 后开始贴壁, 2 ~ 4 d 体积逐渐增大, 为短梭形或小多角形, 见图 1A; 第 3 代 ASCs 细胞大小和形态趋于一致, 呈长梭形旋涡状、放射状生长, 图 1B。成脂诱导 8 d 后油红 O 染色可见脂肪滴, 见图 1C。成骨诱导 18 d 后 Von Kossa 染色可见矿化结节, 见图 1D。流式细胞仪检测显示, ASCs 高表达 CD29 (99.35%) 和 CD90 (92.88%), 低表达 CD34 (0.48%) 和 CD45 (3.51%), 见图 1E, 符合公认的 ASCs 表型标志^[8-10]。

二、肾功能变化

两组 iAKI 大鼠的 Scr 在 24 h 时达到峰值, 在再灌注后 12、24、48、72 h 及 1 周时, ASCs 治疗组大鼠 Scr 水平均显著低于对照组 (P < 0.05), 见图 2。

三、肾脏病理及评分

再灌注后 12 h 和 24 h, 肾小管上皮细胞坏死、

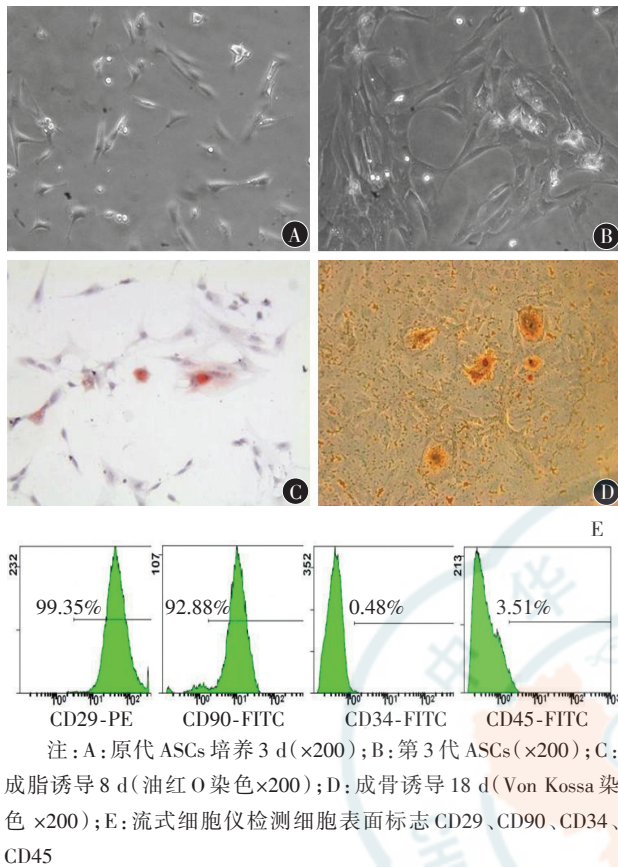
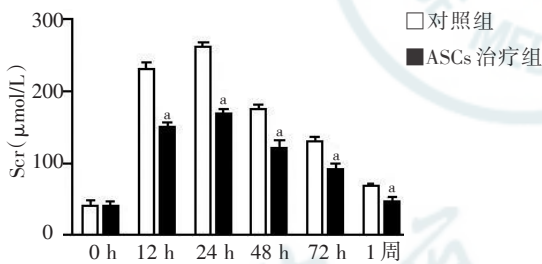


图 1 ASCs 形态学和细胞表型鉴定

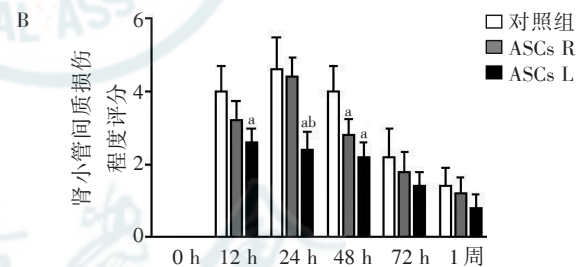
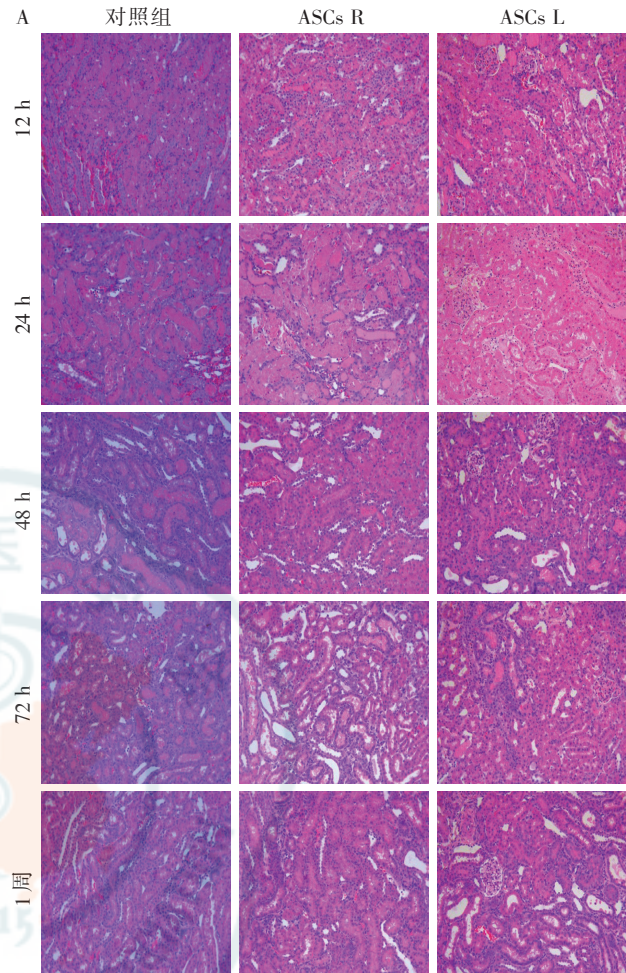


注:与同时时间点对照组比较,^a $P < 0.05$

图 2 各时间点 ASCs 治疗组与对照组血肌酐

脱落、大量管型形成,对照组损伤重,治疗组较轻。再灌注后 48 h 和 72 h 上皮细胞增生修复,其中治疗组修复较好;再灌注 1 周时对照组和治疗组出现不同程度的慢性化改变,包括肾小管上皮细胞萎缩、管腔扩张、间质炎性细胞浸润。肾小管间质损伤评分显示再灌注后 48 h, ASCs 治疗组显著低于对照组 ($P < 0.05$);再灌注后 12、24 和 48 h 时, ASCs 治疗组左肾病理评分显著低于对照组 (均 $P < 0.05$);并且损伤最重时(再灌注后 24 h),治疗组显著低于对照组,且移植组的左肾显著低于未移植的右肾。见图 3。

四、ASCs 对急性缺血性肾损伤大鼠肾脏细胞



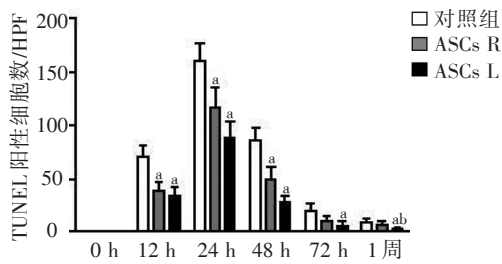
注: A: ASCs 治疗组与对照组不同时间点的肾脏病理表现 (HE $\times 200$); B: 对照组、ASCs 治疗组右肾和左肾小管间质损伤程度评分; ASCs R: ASCs 治疗组右侧肾脏; ASCs L: ASCs 治疗组左侧肾脏;与同时时间点对照组比较,^a $P < 0.05$;与同时时间点 ASCs 治疗组右肾比较,^b $P < 0.05$

图 3 ASCs 对急性缺血性肾损伤大鼠肾病理的影响

凋亡、巨噬细胞浸润及细胞增殖的影响

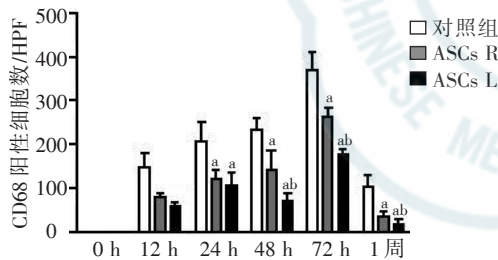
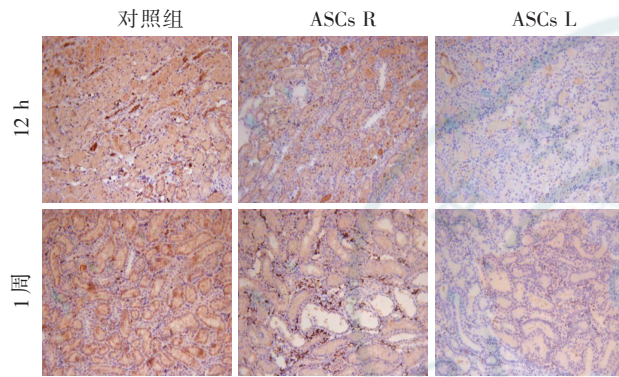
1. 肾组织细胞的凋亡: ASCs 治疗组在再灌注后 12、24 和 48 h 的 TUNEL 阳性细胞数量显著少于对照组 (均 $P < 0.05$); 1 周时治疗组左肾显著少于右肾 ($P < 0.05$)。见图 4。

2. 肾脏巨噬细胞浸润: 12、24、48、72 h 和 1 周时 ASCs 治疗组双侧肾脏 CD68 阳性细胞数量显著



注: ASCs R: ASCs 治疗组右侧肾脏; ASCs L: ASCs 治疗组左侧肾脏; 与同时时间点对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点 ASCs 治疗组右肾比较, ^b $P < 0.05$

图 4 对照组、ASCs 治疗组右肾和左肾的 TUNEL 阳性细胞计数



注: ASCs R: ASCs 治疗组右侧肾脏; ASCs L: ASCs 治疗组左侧肾脏; 与同时时间点对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点 ASCs 治疗组右肾比较, ^b $P < 0.05$

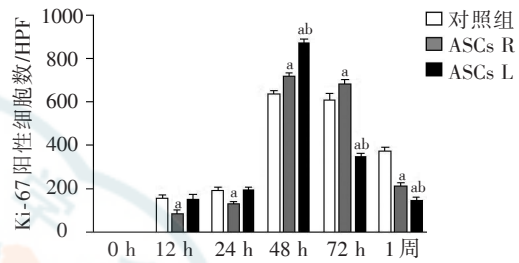
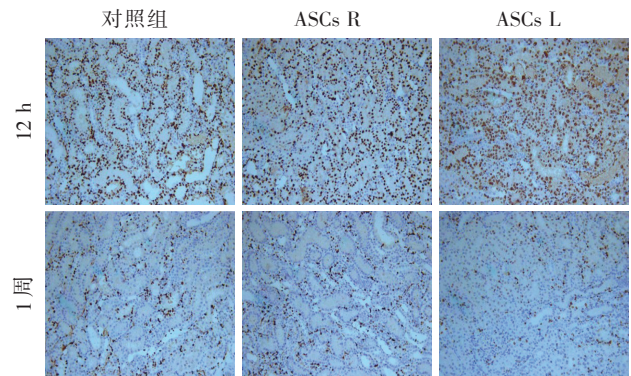
图 5 对照组、ASCs 治疗组右肾和左肾 CD68 阳性细胞的肾脏分布及计数(免疫组化 $\times 25$)

少于对照组(均 $P < 0.05$)。治疗组左肾在 12、48、72 h 和 1 周时显著少于右肾($P < 0.05$)。见图 5。

3. 肾脏 Ki-67 表达水平: 12、24、48 h 时 ASCs 治疗组左肾 Ki-67 阳性细胞数量显著多于治疗组右肾, 且 48 h 时更为明显($P < 0.05$)。72 h 和 1 周时治疗组左肾 Ki-67 阳性细胞数量显著少于另两组(均 $P < 0.05$)。治疗组右肾 48 h 和 72 h 时 Ki-67 阳性细胞数量显著多于对照组, 1 周时显著少于对照组(均 $P < 0.05$)。见图 6。

五、ASCs 肾内及各器官分布

1. ASCs 肾内分布: Dil 阳性细胞主要分布于



注: ASCs R: ASCs 治疗组右侧肾脏; ASCs L: ASCs 治疗组左侧肾脏; 与同时时间点对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与同时时间点 ASCs 治疗组右肾比较, ^b $P < 0.05$

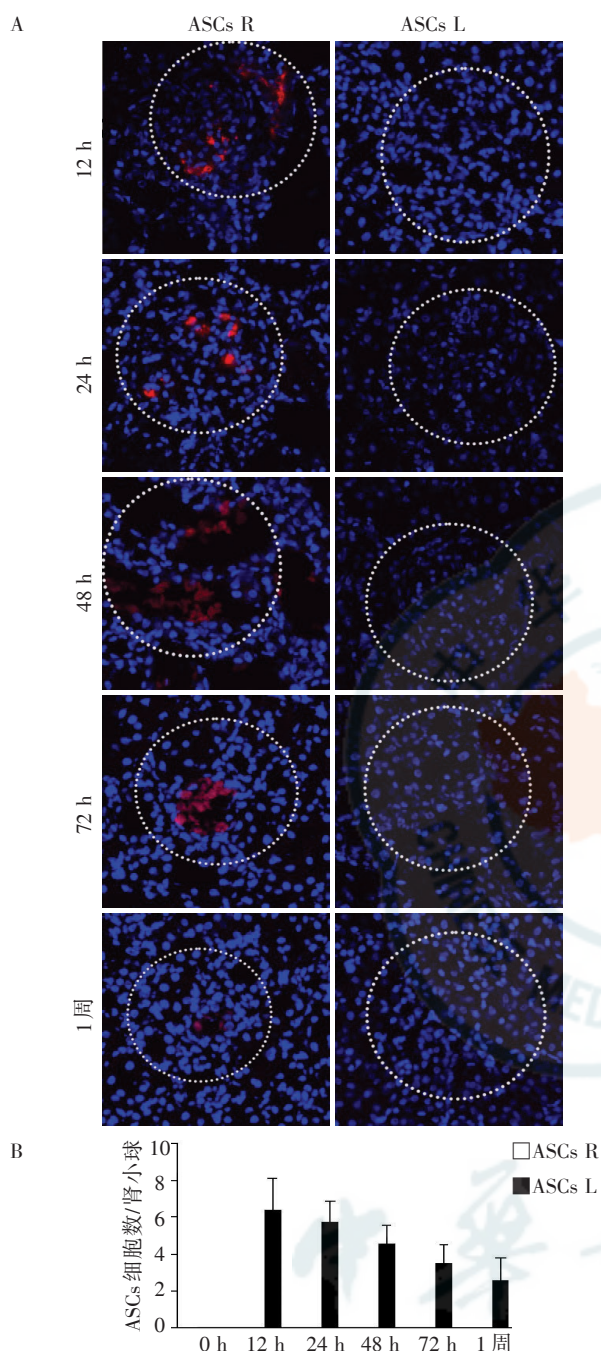
图 6 对照组、ASCs 治疗组右肾和左肾 Ki-67 阳性细胞的肾脏分布和计数(免疫组化 $\times 200$)

左肾小球内, 其中移植后 12 h 和 24 h ASCs 较多(红色荧光), 48 h、72 h 和 1 周的 ASCs 数量显著减少; 右肾所有时间点均未观察到 Dil 阳性细胞。见图 7。

2. ASCs 在肺、肝、脾、心脏的分布情况: 48 h、72 h 肺内存在少量 Dil 阳性细胞, 48 h 肝内存在少量 Dil 阳性细胞, 其他脏器及其他时间均未观察到 Dil 阳性细胞。

讨 论

1964 年, Rodbell^[11]最先陈述了从大鼠脂肪组织中分离成熟的脂肪细胞和脂肪祖细胞的方法。即将分离的大鼠脂肪组织捣碎, I 型胶原酶 37℃ 消化, 离心分离去上清, 得到含有脂肪祖细胞的基质血管成分(stromal vascular fraction, SVF)沉淀。SVF 中含有多种细胞成分, 包括: ASCs、前体脂肪细胞、原始脂肪细胞、循环母细胞、纤维母细胞、内皮细胞等。其中脂肪前体细胞一般采用 DMEM-F12 培养基纯化, 而目前国际上所用的 ASCs 基本为 SVF 的混合成分, 采用低糖 DMEM 培养基贴壁纯化的方法培养。本研究亦采用相同



注: A: 移植后 12 h、24 h、48 h、72 h、1 周 ASCs 在肾脏内的分布情况(共聚焦显微镜 $\times 200$); B: 每个肾小球内不同时间点 Dil 阳性细胞数量

图 7 肾脏 Dil 阳性细胞分布情况

方法培养 ASCs。

外源性 ASCs 治疗 iAKI 的机制可概括为两个方面。首先,移植入体内尤其是进入受损部位或受损附近部位的 ASCs 通过旁分泌机制减轻肾小管上皮细胞坏死,促进受损的肾小管上皮细胞再生^[12-13];其次,外源性 ASCs 靶向归巢至肾脏后直接分化为上皮细胞^[14-15]。无论通过何种机制发挥作

用,干细胞归巢至损伤肾脏的数量及存活率是决定治疗效果的关键因素之一。

本研究结果显示,ASCs 移植对 iAKI 大鼠肾功能和病理损伤具有显著的改善作用,表现为降低 Scr 水平、抑制肾小管上皮细胞凋亡、减少巨噬细胞浸润、促进损伤部位细胞增殖,进而起到修复作用。此外,肾脏炎性反应显著减轻,表现为治疗组肾脏巨噬细胞浸润显著减少,且肾动脉注射的左侧肾脏巨噬细胞浸润较右肾更少。由于 ASCs 是经左肾动脉直接进入左肾,右肾无 ASCs 存在,因此推测 ASCs 本身及其旁分泌作用可有效减轻炎性反应,同时左肾内 ASCs 的内分泌作用对右侧肾脏的炎性反应也有一定的抑制作用。这与 Kim 等^[15]的研究结果一致,后者应用培养 ASCs 72 h 后的完全培养液(离心去除细胞)腹腔应用,可改善顺铂所致 AKI,表明 ASCs 分泌的可溶性成分对 AKI 有保护作用。

目前干细胞移植入体内治疗 AKI 的方法,大多采用尾静脉或颈动脉注射等途径。但全身应用干细胞治疗 AKI 最突出的问题是干细胞向肾脏归巢的数量非常少,且存活率低,其他器官截留严重(主要在肺部滞留)^[2]。如 Togel 等^[16]经颈动脉移植骨髓间充质干细胞(MSCs)治疗 AKI,移植后 24 h 肾脏内已经观察不到 MSCs 的存在,可能与这一途径应用 MSCs 时归巢至肾脏的数量较少有关。Chen 等^[13]虽然发现采用肾内及阴茎静脉注射方式移植入缺血再灌注肾损伤大鼠体内的 ASCs 可通过阻断炎性反应,保护肾血管内皮细胞,抗氧化应激及抗凋亡,参与血管再生等作用保护肾功能,阴茎静脉注射为全身应用 ASCs,归巢率低;而肾内多点注射有一定的危险性,限制今后的临床应用。

采用肾动脉直接注射 ASCs,理论上移植的 ASCs 全部进入损伤肾脏,避免了全身循环过程中的器官截留问题。本研究采用肾动脉注射的方式,对肾脏本身无损伤;并重点观察了移植后 ASCs 在肾脏内停留时间及肺、肝、脾、心脏内分布情况,此外为了进一步评价 ASCs 对缺血再灌注肾脏的保护作用,本研究又检测了肾功能、肾小管间质损伤程度评分、细胞凋亡、炎性反应及增殖等指标。本研究中,肾动脉注射后止血措施为提起缝合线阻断肾动脉 20~30 s,明胶海绵覆盖穿刺点,此过程可能造成肾脏短时间缺血,因此实

验中同时设立了对照组(注射 PBS),其手术过程相同,所以对实验结果没有影响;此外预实验提示,夹闭肾蒂 45 min 的 iAKI 模型与增加阻断肾动脉 20~30 s 步骤的模型(即夹闭双侧肾蒂 45 min+30 s)相比,肾功能和病理无明显差异。我们应用干细胞 Dil 标记体内示踪的方法,证实 ASCs 经肾动脉移植后,12、24 h 肾脏内都存在大量的 ASCs,并且其他脏器内(肺、肝、脾、心)仅有极少量的 Dil 阳性细胞。提示经肾动脉注射途径移植可有效提高外源性干细胞进入损伤肾脏的数量,发挥治疗作用。移植 48 h 后的肾内 ASCs 数量逐渐减少,同时免疫荧光强度逐渐减弱,推测可能为巨噬细胞或中性粒细胞吞噬 Dil 标记的 ASCs 的结果。因此想要达到更好的治疗效果,可能需要序贯 ASCs 的移植,以维持损伤肾脏内干细胞数量,延长作用时间,提高治疗效果。

近年来 ASCs 的旁分泌作用及移植后对 AKI 肾功能的改善作用已逐渐得到相关研究的证实^[17],这为 AKI 的治疗提供了一种新的手段。此外,ASCs 还具有取材方便、来源丰富、扩增迅速、低免疫原性等优势,在 AKI 的治疗方面具有良好的应用前景。然而,为了 ASCs 能更好地应用于 AKI 的治疗,还有许多问题有待解决,包括 ASCs 移植的最佳途径及时间、ASCs 的具体作用方式和机制等。

参 考 文 献

- [1] Altun B, Yilmaz R, Aki T, et al. Use of mesenchymal stem cells and darbepoetin improve ischemia-induced acute kidney injury outcomes. *Am J Nephrol*, 2012, 35: 531-539.
- [2] Furuichi K, Shintani H, Sakai Y, et al. Effects of adipose-derived mesenchymal cells on ischemia-reperfusion injury in kidney. *Clin Exp Nephrol*, 2012, 16: 679-689.
- [3] 邓春华, 孙祥宙, 高勇, 等. 大鼠脂肪组织来源干细胞的分离、培养和生物学特性的研究. *中华男科学杂志*, 2008, 14: 99-105.
- [4] 张雪莲, 马依彤, 王常勇, 等. 大鼠脂肪干细胞的分离培养及基本生物学性状研究. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26: 1217-1219.
- [5] Zhang Y, Zhou L, Bao YL, et al. Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chem Biol Interact*, 2010, 185: 174-181.
- [6] Melnikov VY, Faubel S, Siegmund B, et al. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J Clin Invest*, 2002, 110: 1083-1091.
- [7] Yu X, Lu C, Liu H, et al. Hypoxic preconditioning with cobalt of bone marrow mesenchymal stem cells improves cell migration and enhances therapy for treatment of ischemic acute kidney injury. *PLoS One*, 2013, 8: e62703.
- [8] Yang XF, He X, He J, et al. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 59.
- [9] Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*, 2009, 79: 235-244.
- [10] Mitchell JB, Mcintosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 2006, 24: 376-385.
- [11] Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*, 1964, 239: 375-380.
- [12] Donizetti - Oliveira C, Semedo P, Burgos - Silva M, et al. Adipose tissue-derived stem cell treatment prevents renal disease progression. *Cell Transplant*, 2012, 21: 1727-1741.
- [13] Chen YT, Sun CK, Lin YC, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *J Transl Med*, 2011, 9: 51.
- [14] 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.
- [15] Kim JH, Park DJ, Yun JC, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells protect kidneys from cisplatin nephrotoxicity in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302: F1141-F1150.
- [16] Togel F, Hu Z, Weiss K, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289: F31-F42.
- [17] 王巍巍, 王葳, 姜燕, 等. 脂肪源性干细胞移植对顺铂诱导的小鼠急性肾损伤的影响. *中华肾脏病杂志*, 2012, 28: 727-728.

(收稿日期:2013-08-17)

(本文编辑:杨克魁)