

## · 基础研究 ·

# 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

刘楠梅 梅长林 张金元 田军 程劲 王巍巍

**【摘要】** 目的 观察骨髓间充质干细胞(BMSC)在体外模拟的急性肾损伤(AKI)微环境中的迁移特点,明确红细胞生成素(EPO)干预对BMSC迁移的影响,并探讨其可能机制。方法 肾小管上皮细胞(RTEC)于低氧-复氧(HR)环境中各培养 12 h 获得 HR-RTEC,体外模拟 AKI。采用 Transwell 体系将 BMSC 与 RTEC 共培养。实验分 7 组:对照组(①组单纯 BMSC 培养)、BMSC-RTEC 共培养组(②组)、BMSC-HR-RTEC 共培养+不同浓度 EPO 干预组(③组~⑦组,EPO 浓度:0、1、5、10、50 IU/ml)。共培养 48 h 后检测各组 BMSC 迁移数量,Western 印迹法分别检测下室 RTEC 内的基质细胞衍生因子 1(SDF-1)表达及上室 BMSC 的磷酸化(p)MAPK、MAPK 水平,ELISA 法检测 RTEC 培养上清中的 SDF-1 浓度。结果 BMSC 向 HR-RTEC 培养室的迁移数量增加,EPO 干预可放大此效应,以 10 IU/ml 时最强[与③组比较,(46.67±7.37)个/HP 比(19.00±2.37)个/HP, $P < 0.05$ ]。③组 HR-RTEC 的细胞内 SDF-1 表达水平(0.37±0.01 比 0.19±0.01, $P < 0.05$ )及培养上清中 SDF-1 浓度[(61.64±4.88) μg/L 比(35.26±8.78) μg/L, $P < 0.05$ ]均高于未处理 RTEC(②组),EPO 干预可进一步增加其水平,以 10 IU/ml 时最强[(⑥组与③组比较):(173.53±14.66) μg/L 比(61.64±4.88) μg/L, $P < 0.05$ ],并伴有 BMSC 内 MAPK 磷酸化增强。结论 体外模拟的 AKI 微环境对 BMSC 有定向趋化作用,EPO 干预可增强其趋化效果,其机制可能与 SDF-1 水平增加及 SDF-1-CXCR4 轴下游的信号蛋白 MAPK 的磷酸化有关。

**【关键词】** 骨髓间充质干细胞; 红细胞生成素; 低氧-复氧; 肾小管上皮细胞; 迁移

**Effect of erythropoietin on the oriented chemotaxis of bone-marrow mesenchymal stem cells under acute kidney injury microenvironment** LIU Nan-mei, MEI Chang-lin, ZHANG Jin-yuan, TIAN Jun, CHENG Jin, WANG Wei-wei. Department of Nephrology, Changzheng Hospital Affiliated to The Second Military Medical University, Kidney Research Institute of PLA, Shanghai 200003, China  
Corresponding author: MEI Chang-lin, Email: chlmei1954@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the migration of bone-marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) under acute kidney injury (AKI) microenvironment *in vitro* and the effect of erythropoietin (EPO) intervention, and to explore its underlying mechanism. **Methods** Renal tubular epithelial cells (RTECs) were cultured in hypoxia/ re-oxygenation (HR) condition for 12 h, respectively, in order to establish HR-RTEC. BMSCs and RTECs were co-cultured by Transwell system and were divided into 7 groups: control group (group ①, only BMSC cultured), BMSC-RTEC co-culturing group (group ②), BMSC-HR-RTEC co-culturing + EPO intervention groups (group ③ to group ⑦, EPO concentration: 0, 1, 5, 10, 50 IU/ml). All the groups were cultured for 48 h and the number of migrating

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.04.005

基金项目: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);解放军南京军区科技创新重点项目基金(09Z006);上海市卫生局科研课题青年基金(2009Y119)

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、王巍巍)

通信作者:梅长林,Email: chlmei1954@126.com

BMSCs was detected. Western blotting was applied for the detection of SDF-1 expression in RTECs and p-MAPK and MAPK levels in BMSCs. SDF-1 concentration in the RTECs culture supernatant was tested by ELISA. **Results** The number of BMSCs migrating to the low chamber where HR-RTECs were cultured was increased, and EPO intervention further enhanced this migration which reached the peak at the concentration of 10 IU/ml [Compared with group③, (46.67±7.37) cells vs (19.00±2.37) cells,  $P < 0.05$ ]. Intracellular expression level and the secreted level of SDF-1 in HR-RTECs in group③ were higher than those in RTECs of group② [0.37±0.01 vs 0.19±0.01,  $P < 0.05$ ; (61.64±4.88) μg/L vs (35.26±8.78) μg/L,  $P < 0.05$ ]. EPO intervention increased above SDF-1 levels and reached the peak at the concentration of 10 IU/ml [group⑥ vs group③: (173.53±14.66) μg/L vs (61.64±4.88) μg/L,  $P < 0.05$ ], accompanied with enhanced phosphorylation of MAPK in BMSCs. **Conclusions** AKI microenvironment has obvious chemotaxis effect on BMSCs, and EPO intervention can strengthen this effect. The increased SDF-1 level and enhanced phosphorylation of MAPK, the downstream signal protein of SDF-1/CXCR4 axis, are the possible mechanism for EPO performance.

**【Key words】** Bone-marrow mesenchymal stem cells; Erythropoietin; Hypoxia-re-oxygenation; Renal tubular epithelial cells; Migration

近年来,许多研究证实,干细胞移植有助于急性肾损伤(AKI)的修复,而骨髓间充质干细胞(BMSC)是比较理想的移植用“种子细胞”,它具有独特的移植后向损伤组织迁移的特点<sup>[1-2]</sup>,并锚定于损伤肾脏发挥修复作用<sup>[3]</sup>。但这种迁移效率是有限的,BMSC在其他血供丰富的脏器也会有存留<sup>[4]</sup>,因此,在移植有限数量BMSC的前提下,如果能够增强BMSC向肾脏的迁移能力,势必可以放大其肾脏修复作用。红细胞生成素(EPO)对AKI治疗的有效性已被广泛证明<sup>[5-7]</sup>,但其是否会对BMSC的定向迁移产生有益影响,还未见相关研究。肾小管上皮细胞(RTEC)的凋亡、坏死是AKI最主要的病理表现,而细胞的缺氧-复氧是导致凋亡、坏死的最主要病理基础。本实验采用低氧-复氧(HR)预处理RTEC诱导其凋亡,获得HR-RTEC,体外模拟AKI。利用Transwell体系将BMSC与HR-RTEC共培养,观察BMSC向AKI微环境的定向迁移特点,以及在AKI微环境中加入EPO干预后BMSC迁移的变化,并探讨其可能机制。

### 材料与方 法

1. 细胞与试剂:小鼠BMSC株、小鼠RTEC株(美国ATCC),Anaero低氧培养袋(日本MGC),Transwell小室(孔径:8 μm,美国Corning),胎牛血清(FBS)、低糖DMEM培养基、无糖DMEM培养基(美国Gibco),兔抗小鼠基质细胞衍生因子1(SDF-1)单

抗(英国Abcam),兔抗小鼠磷酸化(p)MAPK和MAPK单抗(美国CST),HRP标记的羊抗兔IgG(美国Southern Biotech)。

2. 实验分组:BMSC、RTEC及HR-RTEC均采用0.25%胰酶消化,调整细胞密度为 $10^8$ /ml,培养液中悬浮1h恢复细胞形态备用。其中HR-RTEC是根据预实验将RTEC首先置于Anaero培养袋(92%N<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>+3%O<sub>2</sub>)中使用无糖DMEM培养基培养12h后,移至5%CO<sub>2</sub>培养箱(95%空气+5%CO<sub>2</sub>)换用含10%FBS的低糖DMEM培养基继续培养12h获得。采用Transwell体系进行细胞共培养:Transwell小室嵌入六孔板中,BMSC于上层小室中培养,RTEC于下室六孔板中培养。实验分为7组(①组~⑦组):对照组(①组:上室内为BMSC,下室内为单纯含10%FBS的低糖DMEM培养基);BMSC-RTEC共培养组(②组);BMSC-HR-RTEC共培养+不同浓度EPO干预组(③组~⑦组:下室六孔板内同时加入不同浓度的EPO(0、1、5、10、50 IU/ml)。小室内BMSC的接种密度为 $1.8 \times 10^5$ /室,下室RTEC的接种密度为 $4 \times 10^5$ /孔,各组均共培养48h。

3. BMSC迁移能力检测:共培养结束后,取出Transwell小室,以棉签轻轻拭去Transwell微孔膜上层细胞,微孔膜下细胞进行染色:PBS清洗3遍,4%多聚甲醛固定20min,1%结晶紫染色30min,PBS清洗至没有紫色为止,显微镜下观察每张滤膜并随机计数5个视野下细胞数,取均值。每组设定6个复孔。

4. RTEC 细胞内及培养上清中 SDF-1 水平检测: (1) 细胞内 SDF-1 蛋白表达的检测采用 Western 印迹法。②~⑦组共培养结束后移去 Transwell 小室, 吸去六孔板内的上清液, 加入 80  $\mu$ l 含有 PMSF 的 RIPA 裂解液冰上充分裂解 RTEC, 离心后取上清, 测蛋白浓度。调整上样量总蛋白量为 100  $\mu$ g, 进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白转移至 PVDF 膜上, 封闭后加入兔抗小鼠 SDF-1 单抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 加入羊抗兔 IgG 继续孵育 1 h, ECL 作用 1~2 min, 将混合液滴加于 PVDF 膜表面, 孵育 1~2 min, 置于 FujiFilm HD2 凝胶成像分析系统中, 观察、拍照。测量条带的灰度值, GAPDH 为内参, 蛋白的表达量为二者灰度的比值。(2) 培养上清 SDF-1 水平检测采用 ELISA 法: 共培养 48 h 后收集②~⑦组下室的 RTEC 培养上清, 按照 SDF-1 ELISA 检测试剂盒说明书进行测定。

5. BMSC 内相关信号蛋白的表达: ②~⑦组细胞作用完毕后, 将 Transwell 小室移至空白六孔板, 加入 80  $\mu$ l 含有 PMSF 的 RIPA 裂解液冰上充分裂解 BMSC, 采用上文描述的 Western 印迹法进行检测, 加入的一抗分别为兔抗小鼠 p-MAPK 和 MAPK 单抗,  $\beta$ -actin 为内参, 蛋白表达量为二者灰度的比值。

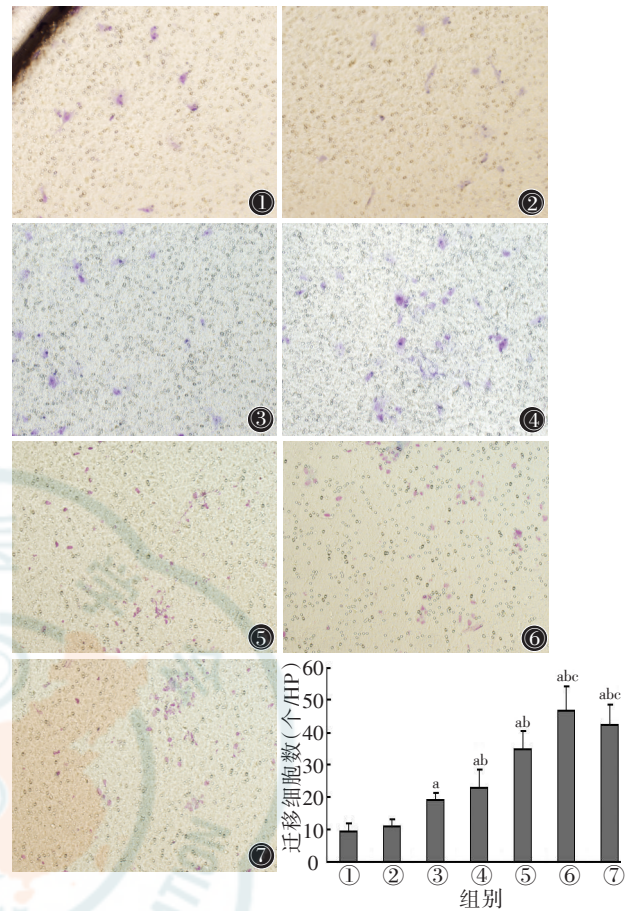
6. 统计学方法: 计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。

### 结 果

1. 体外趋化实验结果: 显微镜下紫色为迁移的 BMSC。HR-RTEC 模拟的 AKI 微环境对 BMSC 有显著趋化效应, EPO 干预使得 BMSC 的迁移数量进一步增加, 显示一定的浓度依赖效应, 以 EPO 10 IU/ml 最为显著, 但进一步增加 EPO 浓度 (50 IU/ml) 对 BMSC 迁移数无更大影响, 见图 1。

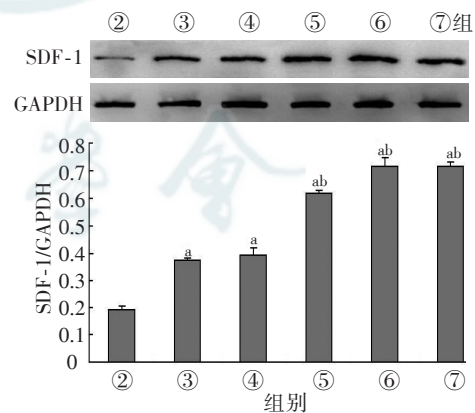
2. RTEC 内 SDF-1 蛋白表达: HR 预处理可显著增加 RTEC 内的 SDF-1 蛋白水平, EPO 干预后 HR-RTEC 内的 SDF-1 蛋白表达进一步增加, 以 EPO 10 IU/ml 最为显著, 进一步增加 EPO 浓度 (50 IU/ml), SDF-1 表达并无明显变化, 见图 2。

3. 下室培养上清中的 SDF-1 浓度: ELISA 检测结果显示, HR-RTEC 培养上清液中的 SDF-1 浓



注: 与①组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与③组比较,  $^b P < 0.05$ ; 与④组比较,  $^c P < 0.05$

图 1 各组 BMSC 的迁移 (显微镜  $\times 200$ )



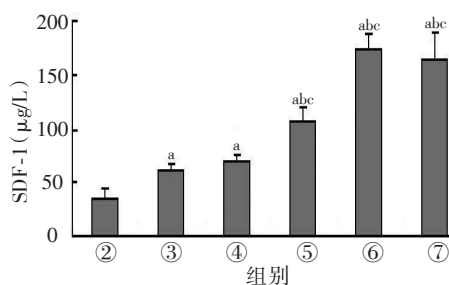
注: 与②组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与③组比较,  $^b P < 0.05$

图 2 各组 RTEC 内 SDF-1 蛋白的表达 (Western 印迹)

度增加, EPO 干预使得上清中的 SDF-1 浓度进一步增加, 以 EPO 10 IU/ml 最为显著, 50 IU/ml EPO 组与 10 IU/ml EPO 组差异无统计学意义, 见图 3。

4. BMSC 内相关信号蛋白的表达: Western 印迹结果表明, 与 HR-RTEC 共培养的 BMSC 内 p-MAPK 水平显著增加。下室中加入不同浓度

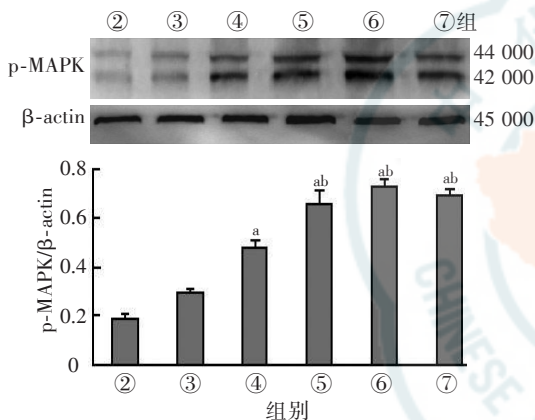




注:与②组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与③组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与④组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

图3 各组下室上清液中 SDF-1 浓度(ELISA)

EPO 共培养后, BMSC 内的 p-MAPK 水平进一步上升, 以 10 IU/ml 最为显著, 见图 4。



注:与②组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与③组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图4 各组 BMSC 内信号蛋白的表达(Western 印迹)

### 讨 论

BMSC 移植有助于 AKI 的修复, 其主要机制为移植后可锚定于损伤肾脏, 通过分化及旁分泌功能参与肾脏修复。但单纯 BMSC 移植的肾脏修复能力非常有限, 移植细胞的靶向迁移数量有限以及 AKI 微环境不利于迁移 BMSC 的存活是备受关注的原因。

当组织损伤后, 自体骨髓中或外源性移植的 BMSC 会以有限的效率优先向损伤组织迁移, 尤其是缺血组织<sup>[8-9]</sup>。肾脏是对缺血再灌注(I/R)损伤非常敏感的器官之一, RTEC 凋亡、坏死是 I/R 引起 AKI 最主要的病理表现。本研究中我们将 RTEC 进行 HR 预处理, 经预实验检测其凋亡率为(32.82±1.16)%, 与 AKI 小鼠的肾小管上皮组织凋亡率一致<sup>[10]</sup>, 可用于体外模拟 AKI。经此预处理的 RTEC 与 BMSC 共培养后, BMSC 的迁移数量显

著增加, 进一步证实了 BMSC 优先向损伤组织迁移的特性<sup>[1-2]</sup>。

尽管如此, 移植后的 BMSC 在血供丰富的器官, 如肺、肝和脾中也会有存留<sup>[4]</sup>, 从而降低了移植修复效率。因此最大限度地增加移植 BMSC 向损伤肾脏迁移的数量成了增强移植修复效能的关键, SDF-1-CXCR4 轴成为调控的靶点。SDF-1 属 CXC 型趋化因子, 在许多脏器中均有表达<sup>[11]</sup>, 缺血微环境下其表达上调<sup>[12]</sup>。肾脏发生 I/R 损伤时, SDF-1 表达亦有上升<sup>[13]</sup>。我们的实验也观察到 HR-RTEC 细胞内及培养上清中 SDF-1 水平均有明显增加。CXCR4 为 SDF-1 的受体, 在 BMSC 的细胞内及细胞表面均有表达<sup>[14]</sup>, 但通常仅存在于细胞内<sup>[15]</sup>, 只在损伤产生的特定细胞因子刺激时 CXCR4 才从 BMSC 细胞内转移至细胞表面<sup>[16]</sup>。损伤局部释放的 SDF-1 即可作为这种特定的细胞因子<sup>[16]</sup>, 动员 CXCR4 迁移至 BMSC 表面并与其特异结合形成 SDF-1-CXCR4 轴, 介导 BMSC 的定向迁移。研究表明此定向迁移呈现 SDF-1 浓度依赖性<sup>[15-19]</sup>, 我们的研究即从增强损伤局部的 SDF-1 浓度着手。

目前认为, EPO 可通过 EPO 受体(EPOR)对多种非造血细胞及组织发挥调节作用。已有文献报道 EPO 干预可增高急性心肌梗死模型大鼠缺血心肌中的 SDF-1 水平<sup>[18-19]</sup>。本研究中, 我们在 HR-RTEC 培养上清中加入不同浓度 EPO 干预, 可观察到其细胞内及上清液中的 SDF-1 水平均有升高, 推测 EPO 是通过 RTEC 表面的 EPOR 发挥作用。但这一效应也存在一定的 EPO 浓度限制性, 以 EPO 10 IU/ml 最显著, 进一步增加 EPO 浓度, SDF-1 水平并无增加, 这或许是因为 EPO 与 EPOR 的结合已达饱和, 尚待今后的实验进一步验证。我们也观察到, EPO 干预后, BMSC 向 HR-RTEC 培养室的迁移数量进一步增加, 其增加趋势与 SDF-1 水平变化趋势一致。这一现象表明 EPO 对 BMSC 迁移能力的调控与增加 SDF-1 水平有关。

目前对 SDF-1-CXCR4 轴介导 BMSC 定向迁移的信号机制尚未完全清楚, 研究较多的是 MAPK 信号通路。SDF-1 与 BMSC 表面的 CXCR4 结合后, 可使 MAPK 信号分子活化, 进而使得细胞核内的多种转录因子磷酸化, 可增加与细胞运动有关的肌动蛋白、肌球蛋白等分泌, 提高 BMSC 迁移能力; 尚可激活纤溶酶, 降解纤溶蛋白凝块有助于

BMSC 进入损伤组织<sup>[20]</sup>。本实验中,我们对各组 BMSC 内 MAPK 活化水平的检测结果显示,与 HR-RTEC 共培养的 BMSC 内 MAPK 磷酸化增加,EPO 干预后 BMSC 内的 MAPK 磷酸化水平进一步增加,推测这也是 EPO 干预增强 BMSC 定向迁移能力的下游信号机制。

综上所述,本实验在体外证明了 EPO 干预可增强 AKI 微环境对 BMSC 的趋化效应,SDF-1 水平增加以及 SDF-1-CXCR4 轴下游的 MAPK 磷酸化增强为 EPO 发挥作用的可能机制。推测在 BMSC 移植修复肾损伤时,联合 EPO 干预,将有望增强移植 BMSC 的肾向迁移能力。不过这还有待动物实验进一步验证。

#### 参 考 文 献

- [1] Ponte AL, Marais E, Gallay N, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells*, 2007, 25: 1737-1745.
- [2] Togel 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.
- [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] Devine SM, Cobbs C, Jennings M, et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 2003, 101: 2999-3001.
- [5] Rjiba - Touati K, Boussema IA, Belarbia A, et al. Protective effect of recombinant human erythropoietin against cisplatin - induced oxidative stress and nephrotoxicity in rat kidney. *Int J Toxicol*, 2011, 30: 510-517.
- [6] Yang FL, Subeq YM, Chiu YH, et al. Recombinant human erythropoietin reduces rhabdomyolysis - induced acute renal failure in rats. *Injury*, 2012, 43: 367-373.
- [7] Rathod DB, Salahudeen AK. Nonerythropoietic properties of erythropoietin: implication for tissue protection. *J Investig Med*, 2011, 59: 1083-1085.
- [8] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci*, 2001, 189: 49-57.
- [9] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow - derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 2003, 108: 863-868.
- [10] 刘楠梅, 田军, 王巍巍, 等. 骨髓间充质干细胞干预对缺血再灌注诱导肾小管上皮细胞凋亡的影响. *中国中西医结合肾病杂志*, 2010, 11: 581-585.
- [11] Horuk R. Chemokines beyond inflammation. *Nature*, 1998, 393: 524-525.
- [12] Li N, Lu X, Zhao X, et al. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell - derived factor - 1alpha. *Stem Cells*, 2009, 27: 961-970.
- [13] Ohnishi H, Mizuno S, Nakamura T. Inhibition of tubular cell proliferation by neutralizing endogenous HGF leads to renal hypoxia and bone marrow - derived cell engraftment in acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294: F326 - F335.
- [14] Ji JF, He BP, Dheen ST, et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells*, 2004, 22: 415-427.
- [15] Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. SDF - 1 $\alpha$ /CXCR4 - mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res* 2008, 1195: 104-112.
- [16] 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.
- [17] Li M, Yu J, Li Y, et al. CXCR4 positive bone mesenchymal stem cells migrate to human endothelial cell stimulated by ox - LDL via SDF - 1 alpha/CXCR4 signaling axis. *Exp Mol Pathol*, 2010, 88: 250-255.
- [18] Lin JS, Chen YS, Chiang HS, et al. Hypoxic preconditioning protects rat hearts against ischaemia-reperfusion injury: role of erythropoietin on progenitor cell mobilization. *J Physiol*, 2008, 586: 5757-5769.
- [19] Klopsch C, Furlani D, Gabel R, et al. Intracardiac injection of erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model. *J Cell Mol Med*, 2009, 13: 664-679.
- [20] Neuss S, Schneider R K, Tietze L, et al. Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. *Cells Tissues Organs*, 2010, 191: 36-46.

(收稿日期: 2012-10-15)

(本文编辑: 王欣)