

• 综 述 •

尿源性干细胞对急性肾损伤的保护作用及机制研究进展*

杨博鑫, 杨 硕 综述, 崔丽艳[△] 审校
北京大学第三医院检验科, 北京 100191

摘 要:急性肾损伤(AKI)是一种发病急、病死率高且预后差的疾病,目前除了透析和替代疗法外没有更及时有效的治疗手段。尿源性干细胞(USCs)是从尿液中分离获得的一种多能干细胞,具有自我更新和多向分化的潜能,作为易于获得、无创且易体外培养的干细胞资源,与泌尿系统高度同源,通常不产生免疫排斥反应,在膀胱组织再生、尿道重建中均有较好的潜能,可以减少炎症和纤维化。同时,USCs 具有抗氧化、抗炎和抗凋亡的细胞保护作用,可以抑制组织损伤,在 AKI 的治疗中具有较好的应用前景。该文重点阐述 USCs 在 AKI 中的保护作用和相关机制的研究进展,为 AKI 的临床防治、预后改善提供了新思路。

关键词:急性肾损伤; 尿源性干细胞; 外泌体; 微小 RNA; 环状 RNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.23.021 **中图法分类号:**R692

文章编号:1673-4130(2021)23-2919-04 **文献标志码:**A

Research progress on the protective effect and mechanism of urine-derived stem cells in acute kidney injury*

YANG Boxin, YANG Shuo, CUI Liyan[△]

Department of Clinical Laboratory, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Abstract: Acute kidney injury (AKI) is a disease with rapid onset, high fatality rate and poor prognosis. At present, there is no more timely and effective treatment besides dialysis and replacement therapy. Urine-derived stem cells (USCs) are pluripotent stem cells isolated from urine with the potential of self-renewal and multi-directional differentiation, as a stem cell resource that is easy to obtain, non-invasive and easy to culture in vitro, it is highly homologous with the urinary system and usually does not produce immune rejection. It has good potential in bladder tissue regeneration and urethral reconstruction, and can reduce inflammation and fibrosis. Meanwhile, USC s have anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic cytoprotective effects, can inhibit tissue damage, and have good application prospects in the treatment of AKI. This article focuses on the research progress of the protective effect of USC s in AKI and related mechanisms. It will provide a new idea for clinical prevention and improvement of prognosis of AKI.

Key words: acute kidney injury; urine-derived stem cells; exosome; microRNA; circRNA

急性肾损伤(AKI)是由多种病因和病理生理机制引起的致死率很高的疾病,以肾功能迅速下降为特点,同时伴有代谢物潴留和水电解质和酸碱平衡失衡。临床上 AKI 主要发生于脓毒血症、急性缺血或缺氧后、服用肾毒性药物等情况。流行病学调查结果显示,AKI 发病率约为 0.5%,住院患者发病率约为 5.0%,重症监护病房患者发病率为 30%~50%^[1]。由于对 AKI 的修复机制不清楚,所以治疗手段有限^[2]。临床实践中排除病因和肾脏替代治疗是目前主要的治疗策略,但是 AKI 病死率仍然很高,为 25%~80%^[2]。因此,找到一种更加有效的 AKI 治疗手段,对降低患者病死率、改善预后至关重要。

近年来,干细胞在再生医学、细胞治疗等领域应

用广泛,干细胞的作用包括抗凋亡、抗肿瘤和新生血管作用等。已证实不同来源的干细胞可以改善 AKI 患者肾功能和肾脏病理形态,但是在临床应用中仍存在问题。例如,胚胎干细胞的应用存在伦理问题,骨髓和脂肪来源的间充质干细胞取材有创且相对较困难,原料稀有,成本较高。而尿源性干细胞(USCs)有干细胞的所有共性,即自我更新和多向分化能力,且从健康人尿液中即可提取,取材简单,成本较低,与泌尿系统高度同源,通常不发生免疫排斥反应,因此,其在泌尿系统疾病的治疗中有非常广阔的应用前景。

1 USC s 的来源、分离与鉴定

USCs 是一种具有自我更新能力和多向分化潜能的自体干细胞。体外实验表明,USCs 可分化为骨细

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(61771022,62071011,81800604)。

[△] 通信作者, E-mail: cliyan@163.com。

本文引用格式: 杨博鑫, 杨硕, 崔丽艳. 尿源性干细胞对急性肾损伤的保护作用及机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(23):

胞、软骨细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞、功能上皮细胞和神经细胞等^[3]。USCs 还可以通过分泌多种营养因子,如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子、胰岛素样生长因子和肝脏生长因子等产生旁分泌效应,促进细胞修复,同时,USCs 还具有调节免疫系统和诱导周围细胞旁分泌效应的能力^[4]。动物试验证实,利用 USC 治疗可以有效减少组织损伤,促进组织修复,同时改善器官组织功能^[5]。USCs 作为新型的干细胞来源,由于其在组织损伤修复中的优势,已成为当今研究的热点。

1.1 USC 的来源 ZHANG 等^[6]于 2008 年从 100 mL 无菌尿液中成功提取分离出 2~7 个祖细胞,命名为“尿源祖细胞”,随后发现这类细胞有类似间充质干细胞跨胚层多向分化的特征,所以改命名为“尿源性干细胞”。有研究将男性肾脏移植入女性体内后收集女性患者的 USC,发现其 USC 中含有 Y 染色体,由此说明 USC 来源于肾脏^[7]。

目前,USCs 的培养方法是首先将尿液装入 50 mL 无菌离心管中,离心力 400×g,离心 10 min,其目的是去除尿液中脱落的上皮细胞和可能对实验产生干扰的物质。磷酸盐缓冲液(PBS)润洗后,将沉淀悬浮在 DMEM 细胞培养基中,同时在培养基中补充加入 10% 胎牛血清、10 ng/mL 人类表皮生长因子、2 ng/mL 血小板源性生长因子、1 ng/mL 转化生长因子、2 ng/mL 纤维细胞生长因子、0.5 μmol/mL 氢化可的松、25 μg/mL 胰岛素、20 μg/mL 转铁蛋白、549 ng/mL 肾上腺素、50 ng/mL 三碘甲状腺原氨酸和 20 U/mL 抗菌药物。将细胞悬液移入细胞培养瓶中,37℃、5% CO₂ 潮湿环境下培养细胞^[8]。开始培养 1~3 d 后,培养基表面会漂浮大量死细胞和血细胞,所以前 3 d 培养基应该每天更换一次,3 d 后,隔天更换一次^[4]。有研究表明,将 USC 在选择性培养基中培养 1~2 周,并在倒置显微镜下进行观察,可见极少量 USC(每 50 mL 尿液中有 2~4 个 USC),USC 呈梭型。继续培养 2 周后细胞融合达到 80%~90% 时传代,传代后生长极其迅速,有非常强的增殖能力^[8]。

1.2 USC 的分离与鉴定 USC 的鉴定包括细胞学形态、细胞表面抗原、RNA 端粒酶活性、核型、分化潜能等。USC 的外观呈米粒样,具有较长的端粒,在增殖过程中端粒可以保持稳定。USC 在表达间充质干细胞时具有的细胞表面标志物有 CD29、CD44、CD54、CD90、CD105、CD117、CD133、CD146、SSEA4 等;不表达的细胞表面标志物有 CD14、CD19、CD31、CD45、人类白细胞抗原-DR、主要组织相容性复合体 II 等^[9]。采用流式细胞术可对其表面标志物进行鉴定。USC 同时还有多能转化潜能,其在不同的培养基中可以转化为不同种类的细胞,例如脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、内皮细胞、神经元细胞等^[10-12]。

2 USC 对 AKI 的保护作用

有研究证明,在不同病因导致的大鼠、猪或猴的 AKI 模型中,利用 USC 修复肾组织起到了明显的改善及保护作用^[13-14]。例如在顺铂导致的 AKI 动物模型中,利用 USC 治疗组尿素、肌酐、肾脏损伤指数等评估肾脏功能的指标均明显低于 PBS 对照组。糖原染色和凋亡染色结果显示,USC 治疗组的肾小管上皮细胞损伤程度轻于 PBS 对照组,同时肿瘤坏死因子-α、BCL-2 蛋白等凋亡因子及白细胞介素-6 等炎症因子表达水平也明显降低^[15]。USC 在缺血再灌注导致的 AKI 中也起到了明显的保护和修复功能^[16]。有研究发现,USC 治疗组除可以明显降低肌酐、尿素、肾脏损伤指数外,还可以明显降低干扰素-γ 和白细胞介素-1β 的表达水平。USC 在脓毒症引起的 AKI 中也有较好的保护作用^[17],脓毒症诱导 AKI 发生时表现为全身血管扩张伴低血压、肾脏低血流灌注、肾小管间质损伤和肾小管内皮功能障碍伴毛细血管血栓形成。USC 通过调节辅助性 T 细胞比例、调控脓毒症免疫应答,从而治疗 AKI。USC 主要通过抗炎、抗凋亡的细胞保护作用,同时抑制组织损伤,从而对 AKI 起保护作用。

3 USC 对 AKI 的保护机制

USC 在 AKI 动物模型中有较好的保护效果,而 USC 对 AKI 的保护作用是如何实现的呢? 有研究提出,USC 分泌的外泌体可能在其中发挥了关键作用^[8]。外泌体是一种被双层薄膜包裹的囊泡,直径为 30~120 nm,可以通过超高速连续离心的方法提取,其在细胞稳态和细胞间通讯中发挥重要作用。USC 可通过降低半胱天冬酶促进有丝分裂作用,达到抗细胞凋亡和抑制细胞损伤的作用。添加 USC 外泌体的培养基可以促进成纤维细胞、内皮细胞、血管的增殖,同时增强成骨功能并抑制破骨功能,从而促进骨组织的增殖。外泌体对癌症、心血管疾病、自身免疫性疾病等均有治疗疗效,其在细胞增殖、炎症、免疫调节、血管反应、细胞凋亡等细胞生物行为调控中发挥重要作用;同时,外泌体还涉及疾病诊断与预后、药物递送等重要医学前沿领域^[18]。

外泌体富含蛋白质、DNA、mRNA、微小 RNA(miRNA)、环状 RNA(circRNA)等,这些物质如果直接暴露在血液和体液中很容易被降解,而由磷脂双分子层组成的外泌体为它们提供了一个安全的载体,这些物质可以作为介质被靶细胞(如巨噬细胞、肾小管上皮细胞、内皮细胞)摄取吸收,从而调节 AKI 的损伤过程^[19]。有研究报道,AKI 的修复主要是通过 USC 的旁分泌机制实现的,而外泌体正是实现旁分泌机制的重要工具^[20]。USC 外泌体可以降低促炎因子(肿瘤坏死因子-α、干扰素 γ、白细胞介素-6、白细胞介素-1β)水平,同时升高抗炎因子(白细胞介素-10 与转化生长因子-β1)水平,降低氧化应激和胶原沉积

水平^[16]。外泌体利用细胞外囊泡介导生物活性内容物,例如脂质、蛋白质和 RNA 至损伤部位,从而达到减少肾小管损伤和细胞凋亡,同时抑制肾脏局部炎症的目的^[21]。有研究证明,给予 AKI 小鼠模型的腹腔注射 USC 与直接注射入肾脏的 USC 均可以减轻 AKI 造成的损伤,同时促进修复^[22],说明 USC 可以通过旁分泌机制治疗 AKI。外泌体内容物治疗 AKI 的机制是当前研究的热点,其中对于治疗 AKI 研究较广泛的是 miRNA 和 circRNA。

miRNA 是由 19~23 个核苷酸组成的非编码内源性单链 RNA,其由核内编码的 miRNA 基因转录为 miRNA 前体,然后在解螺旋酶和 Dicer 酶作用下生成单链 miRNA,在生物体内可以稳定存在。外泌体中的 miRNA 通过降低某些生物标志物的释放,抑制或增强通路,从而实现细胞修复功能。有研究表明,USC 来源的外泌体可以释放 miR-216a-5p,靶向作用于同源性张力蛋白磷酸酶,激活苏氨酸蛋白激酶(AKT)通路,促进 AKT 磷酸化,同时降低半胱天冬酶 3 的表达,抑制细胞凋亡^[8]。而添加 miR-216a-5p 拮抗剂的 USC 对细胞的抗凋亡、抗损伤作用则大大降低,证明 USC 通过外泌体传递 miR-216a-5p 对 AKI 发挥保护作用。有研究显示,miR-30c-5p 可以靶向作用于硫氧还蛋白相互作用蛋白,通过抑制炎症小体 NLRP3 通路减少凋亡相关斑点样蛋白和半胱天冬酶 1 等因子的表达,最终达到抗炎、抗凋亡的作用^[23]。另外,USC 外泌体中富含的 miR-146a-5p 还可以下调白细胞介素-1 受体相关激酶 I,通过抑制核因子激活的 B 细胞的 κ -轻链增强通路 p65 核转位,减轻肾小管上皮细胞的损伤^[21]。

circRNA 作为 miRNA 的分子海绵,竞争性结合 miRNA 的结合位点,使 miRNA 失去其自身功能及对下游靶基因的调节功能^[24],同样影响人类多种致病过程,例如心肌梗死、视网膜血管功能障碍、糖尿病、癌症、精神疾病等^[25]。circRNA 属于目前新的研究热点,但其在 AKI 发生和发展中的作用机制及其在 USC 保护作用中所扮演的角色亟待人们去探索和研究。转录组测序技术显示,1 664 个 circRNA 在人类肾脏组织中呈明显高表达,474 个 circRNA 是肾脏中唯一表达的 circRNA^[26]。有研究发现,在大鼠高血压模型的肾脏组织中有多达超过 12 000 个 circRNA 分子表达^[27]。在缺血再灌注损伤引起的 AKI 模型中,有许多差异表达的 circRNA,如 circ-DNMT3A、circ-AKT3、circ-PLEKHA7 和 circ-MEI^[24]。而在脓毒血症引起的 AKI 细胞模型中, circ-FANCA 表达上调,来自脂多糖处理过的人肾小管上皮细胞的外泌体参与了 circ-FANCA 的体外传递。敲除 circ-FANCA 可以靶向作用于 miR-93-5p,调控氧化应激反应蛋白 1 的表达,促进细胞增殖,减少细胞凋亡、炎症和氧化应激反应,进而减轻脂多糖诱导的 HK2 细胞损伤^[28]。

在 AKI 中 circRNA 的表达谱及其调控机制有待进一步深入研究,而 USC 是否可以靶向调控 circRNA、减轻 AKI 尚需探索。

4 总结与展望

AKI 由于出现突然性的肾功能恶化,目前缺乏特效治疗方法,病死率较高。USC 具有采集简单,成本低廉等优点,并且对于多种疾病的治疗均有明显效果。USC 在各种 AKI 的细胞和动物模型中均发挥保护作用,其主要机制之一是利用 USC 外泌体介导生物活性物质至损伤部位,发挥抗炎、抗凋亡作用。miRNA、circRNA 等在 AKI 的发病和调控中起重要作用,可能成为 AKI 治疗的关键靶点。USC 可以通过外泌体传递 miRNA、circRNA 等重要分子,为 AKI 的治疗提供新思路。

参考文献

- [1] XUE J L, DANIELS F, STAR R A, et al. Incidence and mortality of acute renal failure in medicare beneficiaries [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(4): 1135-1142.
- [2] SAWHNEY S, FRASER S D. Epidemiology of AKI: utilizing large databases to determine the burden of AKI [J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2017, 24(4): 194-204.
- [3] FOX I J, DALEY G Q, GOLDMAN S A, et al. Stem cell therapy. use of differentiated pluripotent stem cells as replacement therapy for treating disease [J]. Science, 2014, 345(6199): 1247391.
- [4] YI H, XIE B, LIU B, et al. Derivation and identification of motor neurons from human urine-derived induced pluripotent stem cells [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 3628578.
- [5] BURDEYRON P, GIRAUD S, HAUET T, et al. Urine-derived stem/progenitor cells: a focus on their characterization and potential [J]. World J Stem Cells, 2020, 12(10): 1080-1096.
- [6] ZHANG Y, MCNEILL E, TIAN H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction [J]. J Urol, 2008, 180(5): 2226-2233.
- [7] BHARADWAJ S, LIU G, SHI Y, et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology [J]. Stem Cells, 2013, 31(9): 1840-1856.
- [8] ZHANG Y, WANG J, YANG B, et al. Transfer of microRNA-216a-5p from exosomes secreted by human urine-derived stem cells reduces renal ischemia/reperfusion injury [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 610587.
- [9] ENG D G, SUNSERI M W, KAVERINA N V, et al. Glomerular parietal epithelial cells contribute to adult podocyte regeneration in experimental focal segmental glomerulosclerosis [J]. Kidney Int, 2015, 88(5): 999-1012.
- [10] SCHOSSERER M, REYNOSO R, WALLY V, et al. Urine is a novel source of autologous mesenchymal stem cells for patients with epidermolysis bullosa [J]. BMC Res Notes, 2015, 8: 767-769.

- [11] LIU G, PARETA R A, WU R, et al. Skeletal myogenic differentiation of urine-derived stem cells and angiogenesis using microbeads loaded with growth factors[J]. Biomaterials, 2013, 34(4):1311-1326.
- [12] KANG H S, CHOI S H, KIM B S, et al. Advanced properties of urine derived stem cells compared to adipose tissue derived stem cells in terms of cell proliferation, immune modulation and multi differentiation[J]. J Korean Med Sci, 2015, 30(12):1764-1776.
- [13] BAULIER E, FAVREAU F, LE CORF A, et al. Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells prevent fibrosis and preserve renal function in a preclinical porcine model of kidney transplantation[J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(7):809-820.
- [14] BOCHON B, KOZUBSKA M, SURYGALA G, et al. Mesenchymal stem cells-potential applications in kidney diseases[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(1):2462-2468.
- [15] SUN B, LUO X, YANG C, et al. Therapeutic effects of human urine-derived stem cells in a rat model of cisplatin-induced acute kidney injury in vivo and in vitro[J]. Stem Cells Int, 2019, 2019:8035076.
- [16] TIAN S, JIANG Z, LIU Y M, et al. Human urine-derived stem cells contribute to the repair of ischemic acute kidney injury in rats[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4):5541-5548.
- [17] ZOU Y F, ZHANG W. Role of microRNA in the detection, progression, and intervention of acute kidney injury[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(2):129-136.
- [18] KO S F, CHEN Y T, WALLACE C G, et al. Inducible pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell therapy effectively protected kidney from acute ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(10):3053-3067.
- [19] LING X, ZHANG G, XIA Y, et al. Exosomes from human urine-derived stem cells enhanced neurogenesis via miR-26a/HDAC6 axis after ischaemic stroke[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1):640-654.
- [20] ASLAM R, HUSSAIN A, CHENG K, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells preserves podocyte homeostasis through modulation of parietal epithelial cell activation in adriamycin-induced mouse kidney injury model[J]. Histol Histopathol, 2020, 35(12):1483-1492.
- [21] LI X, LIAO J, SU X, et al. Human urine-derived stem cells protect against renal ischemia/reperfusion injury in a rat model via exosomal miR-146a-5p which targets IRAK1[J]. Theranostics, 2020, 10(21):9561-9578.
- [22] ASLAM R, HUSSAIN A, CHENG K, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells preserves podocyte homeostasis through modulation of parietal epithelial cell activation in adriamycin-induced mouse kidney injury model[J]. Histol Histopathol, 2020, 35(12):1483-1492.
- [23] LI X, YAO L, ZENG X, et al. MiR-30c-5p alleviated pyroptosis during sepsis-induced acute kidney injury via targeting TXNIP[J]. Inflammation, 2021, 44(1):217-228.
- [24] FANG M, LIU S, ZHOU Y, et al. Circular RNA involved in the protective effect of losartan on ischemia and reperfusion induced acute kidney injury in rat model[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(2):1129-1144.
- [25] JIANG G, MA Y, AN T, et al. Relationships of circular RNA with diabetes and depression[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):7285-7289.
- [26] XU T, WU J, HAN P, et al. Circular RNA expression profiles and features in human tissues: a study using RNA-seq data[J]. BMC Genomics, 2017, 18(Suppl 6):680-688.
- [27] CHENG X, JOE B. Circular RNAs in rat models of cardiovascular and renal diseases[J]. Physiol Genomics, 2017, 49(9):484-490.
- [28] LI H, ZHANG X, WANG P, et al. Knockdown of circFANCA alleviates LPS-induced HK2 cell injury via targeting miR-93-5p/OXSR1 axis in septic acute kidney injury[J]. Diabetol Metab Syndr, 2021, 13(1):7-11.

(收稿日期:2021-04-12 修回日期:2021-08-27)

• 综 述 •

慢性阻塞性肺疾病早期诊断相关标志物研究进展*

杜 颖¹综述, 杨明夏^{2△}审校

1. 大连医科大学, 辽宁大连 116000; 2. 南京医科大学附属常州市第二人民医院
呼吸与危重症学科, 江苏常州 213000

摘 要:慢性阻塞性肺疾病是一组具有多表型的异质性疾病, 吸烟是疾病进展的重要危险因素。慢性阻塞性肺疾病早期阶段一般是指轻/中度慢性阻塞性肺疾病, 多数患者在此阶段无明显临床表现, 就医意识淡薄。因此, 诊断相关生物标志物的研究有助于慢性阻塞性肺疾病的早期防治, 进而延缓肺功能下降速度, 减少医疗费用和降低死亡风险。该文对近 5 年来与慢性阻塞性肺疾病早期诊断标志物相关的研究进行总结。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81472199)。

△ 通信作者, E-mail: cougermx@126.com。

本文引用格式: 杜颖, 杨明夏. 慢性阻塞性肺疾病早期诊断相关标志物研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(23):2922-2926.