

· 基础研究 ·

间充质干细胞条件培养基对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用

李颖, 华岩, 于翔*

(山海关人民医院内分泌科, 秦皇岛 066200)

【摘要】目的 利用微量渗透泵持续恒量地向糖尿病肾病(DN)模型大鼠腹腔内泵入间充质干细胞(MSCs)条件培养基,观察其对DN大鼠的保护作用。**方法** 将30只SD大鼠随机分为3组:正常组, DN模型组和MSCs条件培养基组, 每组10只。正常组给予普通饲料喂养; DN模型组大鼠每天给予高脂高糖饲料; MSCs条件培养基组是对造模成功的DN大鼠植入Alzet微量渗透泵。检测血糖、血清胰岛素和甘油三酯等指标, 观察肾脏病理情况, 免疫印迹法(Western blot)检测肾脏组织nephrin蛋白的表达情况。**结果** 与DN模型组大鼠相比, MSCs条件培养基组的血糖、血清胰岛素、24 h尿蛋白、血肌酐和血尿素氮均显著增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。MSCs条件培养基组大鼠的肾小球系膜截面积与肾小球体积均显著减小($P < 0.05$)。与正常组大鼠相比, MSCs条件培养基组大鼠nephrin蛋白的表达情况显著降低($P < 0.05$), 但与DN模型组相比显著增加($P < 0.05$)。**结论** 微量渗透泵持续泵入MSCs条件培养基可显著改善DN大鼠肾功能。

【关键词】 间充质干细胞; 条件培养基; 糖尿病; 糖尿病肾病; 微渗透泵

【中图分类号】 R587.1 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.02.032

Renoprotective effect of conditioned medium of marrow mesenchymal stem cells on diabetic nephropathy rats model

LI Ying, HUA Yan, YU Xiang*

(Department of Endocrinology, Shanhaiguan People's Hospital, Qinhuangdao 066200, China)

【Abstract】 Objective To determine the protective effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells (MSCs) on the diabetic nephropathy (DN) rats after intraperitoneal osmotic mini-pump implantation. **Methods** Thirty Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into 3 groups, these are, normal control group, DN model group and MSCs conditioned medium group, with 10 rats in each group. The rats of the normal control group were fed common food, while those in DN group and MSCs group were fed a high-fat high-sucrose diet. The MSCs group was implanted with Alzet osmotic pump after DN models were confirmed. Blood glucose, serum insulin, triglycerides and other indices were tested in the 3 groups of rats. Renal structural damage was evaluated by periodic acid-Schiff (PAS) staining. Expression of nephrin in the renal tissues was detected by Western blotting. **Results** The blood glucose, serum insulin, 24-hour urinary protein, serum creatinine and blood urea nitrogen were significantly higher in the MSCs group than in the DN group ($P < 0.05$), and the glomerular mesangial area and the glomerular volume were obviously decreased ($P < 0.05$). The MSCs group had significantly decreased expression of nephrin protein than the normal control group ($P < 0.05$), but the level was higher in comparison with that of the DN group ($P < 0.05$). **Conclusion** Continuous pumping of conditioned medium from mesenchymal stem cells into abdominal cavity exerts a protective effect on the renal function of DN rats.

【Key words】 mesenchymal stem cell; conditioned medium; diabetes mellitus; diabetic nephropathy; miniosmotic mini-pump

Corresponding author: YU Xiang, E-mail: 491252476@qq.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的一种严重并发症。在长期高血糖、高血脂和高血压的刺激下,肾小球微循环系统的微循环滤过压会异常增高,这导致DN发生和不断发展^[1]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可以通过旁分泌途径分泌细胞因子、生长因子及神经营养因

子等生物活性物质,具有抗凋亡、损伤修复、促再生和调节炎症反应等多种综合性作用^[2]。有研究表明干细胞条件培养基具有促血管生成和调节神经功能的作用^[3]。我们利用MSCs主要通过旁分泌的特点来提取和制作MSCs条件培养基,以研究其对DN的治疗和修复作用;同时结合Alzet微量渗透泵可

长效缓慢进行释放的特点,对 DN 大鼠模型进行治疗,观察其对 DN 大鼠的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

SD 大鼠骨髓 MSCs 和 MSCs 专用培养基采购自赛业生物科技有限公司(美国),达尔伯克改良伊格尔(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基和胰酶采购自 HyClone 公司,链脲佐菌素(streptozocin, STZ)购自 Sigma 公司。2ML2 微量渗透泵购自美国 ALZET 公司。

1.2 MSCs 条件培养基的制备

SD 大鼠骨髓 MSCs 用 MSCs 专用培养基进行培养,约 2 d 更换 1 次细胞培养液传代,第 3 代 MSCs 在细胞培养融合度达到约 90% 时弃掉原培养基,更换为 DMEM 无血清培养基。在孵箱内培养 24 h 后收集上清液即为 MSCs 条件培养基。吸取上层条件培养基 2 ml 于 Alzet 微量渗透泵中即为 MSCs 条件培养基 Alzet 微量渗透泵。

1.3 分组和方法

30 只清洁级 SD 雄性大鼠[北京维通利华实验动物技术有限公司],体质量(200 ± 10)g,随机分为 3 组:正常组, DN 模型组和 MSCs 条件培养基组,每组 10 只。正常组给予普通饲料喂养; DN 模型组大鼠每天给予高脂高糖饲料(在普通饲料的基础上加上 10% 蔗糖、5% 奶粉、20% 猪油); MSCs 条件培养基组是对造模成功的 DN 大鼠植入 Alzet 微量渗透泵。

DN 模型大鼠高脂高糖饲料喂养 8 周后,腹腔一次性注射 STZ(35 mg/kg),配制方法:将 STZ 溶解于新鲜配制的 0.1 mol/L 的枸橼酸缓冲液中,溶液浓度为 1%, pH 值维持在 4.2。1 周后检测相关指标,将非禁食血糖 ≥ 16.7 mmol/L 和尿蛋白 ≥ 30 mg/24 h 作为判断 2 型 DN 大鼠模型是否成功标准^[4]。

Alzet 微量渗透泵植入方法:2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,取大鼠仰卧位,去毛备皮,聚维酮碘(碘伏)消毒,在腹部做 1 个 1.5 cm 深的纵切口,植入内置 MSCs 条件培养基的 Alzet 微量渗透泵,逐层缝合,术中严格无菌操作。

1.4 检测指标

处死大鼠前行眶静脉采血,全自动生化分析仪检测血糖、甘油三酯、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(serum creatinine, Scr)等生化指标,电化学发光分析仪检测血清胰岛素水平。处死大鼠前

用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,全自动生化分析仪检测 24 h 尿蛋白。处死大鼠后取一部分肾组织用 10% 甲醛溶液固定,经脱水、包埋,切片,制作 2 μ m 厚度的石蜡切片行过碘酸雪夫氏(periodic acid-Schiff, PAS)染色,观察大鼠肾脏病理形态变化情况,然后对肾脏组织形态学进行定量分析,同时计算平均肾小球系膜截面积和平均肾小球体积。再取一部分肾脏组织于 -80°C 冰箱中保存,用于做 Western 印迹检测。

1.5 Western 印迹检测

取适量大鼠肾组织,经裂解液对组织进行处理,考马斯亮蓝法测蛋白浓度,然后等浓度加入上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水变性 5 min。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育过夜及二抗孵育,通过化学发光及图像分析,测定 nephrin 蛋白的表达情况。

1.6 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠检测指标的比较

与正常组大鼠相比, DN 模型组的血糖、血清胰岛素、甘油三酯、24 h 尿蛋白、血肌酐和血尿素氮均显著增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与 DN 模型组大鼠相比, MSCs 条件培养基组的血糖、血清胰岛素、24 h 尿蛋白、血肌酐和血尿素氮均显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$; 表 1)。

2.2 各组大鼠病理结果

正常组大鼠肾小球、肾小管及肾间质无明显改变; DN 模型组大鼠可见肾小球体积增大,系膜细胞增生,系膜基质增多,肾小管上皮细胞可有水肿; MSCs 条件培养基组大鼠肾损害较 DN 模型组有所减轻(图 1)。在显微镜下进行肾小球系膜截面积与肾小球体积定量分析,结果发现与正常组大鼠相比, DN 模型组的肾小球系膜截面积与肾小球体积均显著增加($P < 0.05$); 而与 DN 模型组相比, MSCs 条件培养基组大鼠的肾小球系膜截面积与肾小球体积均显著减小($P < 0.05$; 表 2)。

2.3 Western 印迹结果

与正常组大鼠相比, MSCs 条件培养基组大鼠 nephrin 蛋白的表达情况显著降低($P < 0.05$), 但与 DN 模型组相比显著增加($P < 0.05$; 图 2)。

表1 各组大鼠检测指标的比较

Table 1 Comparison of detection indices among three groups

(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Index	Normal control group	DN group	MSCs group
Glucose (mmol/L)	5.14 ± 0.29	23.12 ± 1.98 *	17.01 ± 1.89 [#]
Insulin (pmol/L)	179.83 ± 6.01	210.21 ± 3.01 *	191.19 ± 2.89 [#]
Triglycerides (mmol/L)	0.70 ± 0.18	2.39 ± 0.13 *	2.34 ± 0.09
24h urine protein (mg/24h)	5.30 ± 0.19	37.51 ± 0.34 *	26.43 ± 0.41 [#]
Scr (μmol/L)	42.91 ± 0.21	75.25 ± 0.37 *	63.12 ± 0.25 [#]
BUN (mmol/L)	5.56 ± 0.08	28.91 ± 0.10 *	22.12 ± 0.12 [#]

DN: diabetic nephropathy; MSCs: mesenchymal stem cells; Scr: serum creatinine; BUN: blood urea nitrogen. Compared with normal control group, * P < 0.05; compared with DN group, [#] P < 0.05

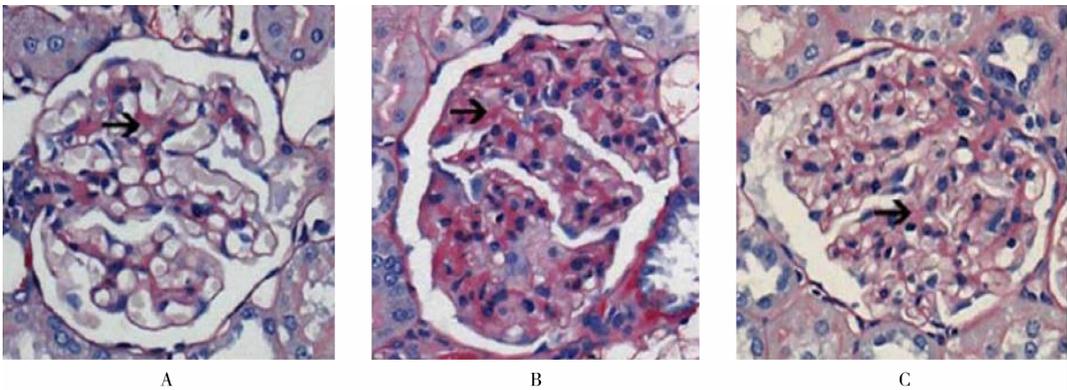


图1 各组大鼠病理变化

Figure 1 Pathological changes in each group of rats (PAS staining × 400)

A: normal control group; B: DN group; C: MSCs group. DN: diabetic nephropathy; MSCs: mesenchymal stem cells; PAS: periodic acid-schiff. Black arrows indicate mesangial area

表2 各组大鼠肾脏病理形态变化情况比较

Table 2 Comparison of morphological changes in kidneys among three groups

(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Index	Normal control group	DN group	MSCs group
Glomerular mesangial area (μm ² × 10 ³)	4.49 ± 0.18	7.49 ± 0.30 *	5.23 ± 0.25 [#]
Glomerular volume (μm ³ × 10 ⁵)	5.52 ± 0.13	8.06 ± 0.25 *	6.89 ± 0.18 [#]

DN: diabetic nephropathy; MSCs: mesenchymal stem cells. Compared with normal control group, * P < 0.05; compared with DN group, [#] P < 0.05

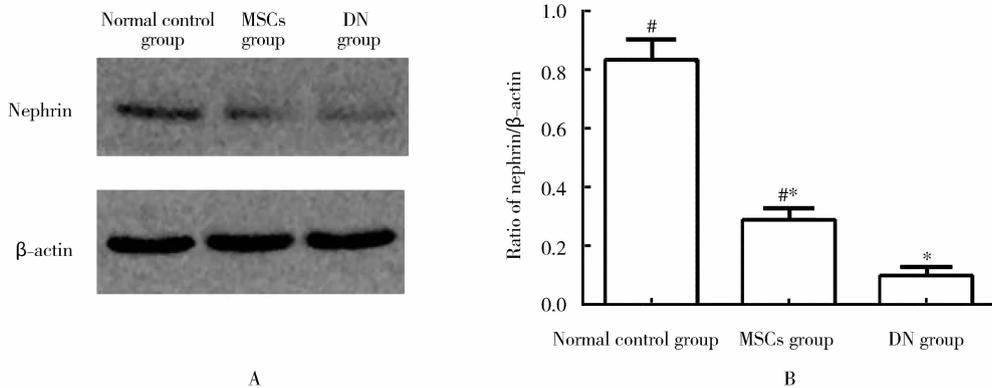


图2 各组大鼠 nephrin 蛋白表达情况

Figure 2 Nephrin protein expression in each group of rats

DN: diabetic nephropathy; MSCs: mesenchymal stem cells. Compared with normal control group, * P < 0.05; compared with DN group, [#] P < 0.05

3 讨论

近年来,干细胞治疗糖尿病的相关研究引起了人们的注意,MSCs 可以通过旁分泌等方式分泌各种生长因子及细胞因子,通过调控免疫的途径来实现对损伤的修复治疗^[5]。然而直接应用 MSCs(如通过注射移植)的方式也存在一些问题,如大鼠尾静脉注射后归巢率低、病理环境下使用时增加感染等问题^[6]。我们利用 MSCs 通过旁分泌机制实现治疗损伤的特性,制备 MSCs 条件培养基,以观察其对于 DN 的治疗作用。MSCs 不仅通过旁分泌分泌细胞因子,而且其条件培养基中的因子可以趋化性的到达损伤部位,使损伤部位细胞增殖、凋亡减轻,这些都是 MSCs 条件培养基治疗作用的一些特点^[7,8]。

MSCs 条件培养基治疗损伤有许多优点,但如何能长期稳定释放连续治疗 DN 是目前存在的问题。如果一次性腹腔注射,随着吸收及时效的延长会影响治疗作用的发挥。我们利用微量渗透泵长效缓慢释放的特点,通过无菌手术植入实验动物皮下或腹腔内,从而使药物持续稳定地释放^[9]。本研究采用 Alzet 2ML2 型微量渗透泵,可装入 2 ml 的条件培养基,并且以恒定速度(5 μ l/h)向外输出,持续时间长达 2 周。该途径给药能够起到持续、恒定的作用,减少药物浓度波动对实验的影响^[10,11]。

本研究结果表明 MSCs 条件培养基缓慢释放的确能降低 DN 大鼠的血糖及胰岛素释放水平,降低血肌酐和血尿素氮,同时减少 24 h 尿蛋白量,进而改善肾功能,然而甘油三酯的变化不太明显,可能是由于实验时间等因素的影响。病理结果也显示 MSCs 条件培养基治疗后能降低系膜截面积和肾小球体积,提示 MSCs 条件培养基能够减轻系膜增生和系膜基质聚集^[12,13]。

Western 印迹监测结果显示,与正常组大鼠相比,MSCs 条件培养基组大鼠 nephrin 蛋白的表达情况显著降低($P < 0.05$),但与 DN 模型组相比显著增加($P < 0.05$),表明 MSCs 条件培养基能减轻一些 nephrin 的损伤,这一结果与 24 h 尿蛋白定量的结果也比较符合。以上结果进一步证明 MSCs 条件培养基缓慢释放对 DN 有治疗修复作用。

综上所述,MSCs 条件培养基对 DN 损伤具有治疗作用,可避免移植细胞带来的不良反应;Alzet 微量渗透泵持续缓慢释放的特性为 MSCs 在 DN 的应用方面提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Ruilope LM, Agarwal R, Chan JC, *et al.* Rationale, design, and baseline characteristics of ARTS-DN: a randomized study to assess the safety and efficacy of finerenone in patients with type 2 diabetes mellitus and a clinical diagnosis of diabetic nephropathy[J]. *Am J Nephrol*, 2014, 40(6): 572-581. DOI: 10.1159/000371497.
- [2] Gnecci M, Danieli P, Malpasso G, *et al.* Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1416: 123-146. DOI: 10.1007/978-1-4939-3584-0_7.
- [3] Guo J, Cheng C, Chen CS, *et al.* Overexpression of fibulin-5 attenuates ischemia/reperfusion injury after middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 3154-3167. DOI: 10.1007/s12035-015-9222-2.
- [4] Ma ST, Liu DL, Deng JJ, *et al.* Effect of arctiin on glomerular filtration barrier damage in STZ-induced diabetic nephropathy rats[J]. *Phytother Res*, 2013, 27(10): 1474-1480. DOI: 10.1002/ptr.4884.
- [5] Lim JY, Park MJ, Im KI, *et al.* Combination cell therapy using mesenchymal stem cells and regulatory T-cells provides a synergistic immunomodulatory effect associated with reciprocal regulation of TH1/TH2 and th17/treg cells in a murine acute graft-versus-host disease model[J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(6): 703-714. DOI: 10.3727/096368913X664577.
- [6] Cantinieaux D, Quertainmont R, Blacher S, *et al.* Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e69515. DOI: 10.1371/journal.pone.0069515.
- [7] Akyurekli C, Le Y, Richardson RB, *et al.* A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles [J]. *Stem Cell Rev*, 2015, 11(1): 150-160. DOI: 10.1007/s12015-014-9545-9.
- [8] Ju GQ, Cheng J, Zhong L, *et al.* Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells facilitate tubular epithelial cell dedifferentiation and growth *via* hepatocyte growth factor induction [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121534. DOI: 10.1371/journal.pone.0121534.
- [9] Wedel J, Weij M, Oosten AS, *et al.* Simultaneous subcutaneous implantation of two osmotic minipumps connected to a jugular vein catheter in the rat[J]. *Lab Anim*, 2014, 48(4): 338-341. DOI: 10.1177/0023677214543089.
- [10] Jankun J. Challenging delivery of VLHL NS plasminogen activator inhibitor-1 by osmotic pumps in diabetic mouse: a case report[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 4(4): 661-664. DOI: 10.3892/etm.2012.639.
- [11] Ewan EE, Hagg T. Intrathecal acetyl-L-carnitine protects tissue and improves function after a mild contusive spinal cord injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2016, 33(3): 269-277. DOI: 10.1089/neu.2015.4030.
- [12] Griffin TP, Martin WP, Islam N, *et al.* The promise of mesenchymal stem cell therapy for diabetic kidney disease[J]. *Curr Diab Rep*, 2016, 16(5): 42. DOI: 10.1007/s11892-016-0734-6.
- [13] Lv S, Liu G, Sun A, *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate diabetic glomerular fibrosis *in vivo* and *in vitro* by inhibiting TGF- β signalling *via* secretion of bone morphogenetic protein 7[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2014, 11(4): 251-261. DOI: 10.1177/1479164114531300.