

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.09.006

文章编号: 1005-8982 (2024) 09-0039-11

实验研究·论著

人脐带间充质干细胞对糖尿病肾病大鼠肾脏HIF-1 α 表达的影响*

高和平, 米焱, 王彩丽, 吴雅茹, 张丁予, 魏凯悦

(内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院 肾内科, 内蒙古 包头 014010)

摘要: **目的** 观察人脐带间充质干细胞(HUMSC)对糖尿病肾病大鼠肾脏缺氧诱导因子(HIF-1 α)表达的影响。**方法** 50只健康清洁级8周龄雄性SD大鼠, 随机选取20只为健康对照组, 其余30只采用链脲菌素复制糖尿病肾病大鼠模型(模型组), 两组大鼠饲养12周。第12周, 随机选取两组大鼠各3只分别尾静脉注射DiR-HUMSCs, 代谢12~16 h后在小动物活体光学3D成像系统下观察DiR-HUMSCs在大鼠体内的分布。随机选取9只模型组大鼠进行HUMSCs移植(HUMSCs移植组)。HUMSCs移植采用尾静脉注射方式移植浓度为 1×10^6 个/mL HUMSCs 500 μ L至大鼠体内, 每周1次, 连续4周, 共28 d。检测3组大鼠的24 h尿蛋白定量(24 h UPro)、血清肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、尿肌酐(Ucr)、尿白蛋白与肌酐比值(UACR)水平; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测3组大鼠血清HIF-1 α 水平; 采用PAS和Masson染色进行肾脏组织病理检测; 免疫荧光法检测3组大鼠肾脏组织HIF-1 α 、Slc12A3和Aquaporin1蛋白的表达。**结果** 移植HUMSCs治疗4周后, 与健康对照组比较, 模型组和HUMSCs移植组大鼠Ucr水平降低($P < 0.05$), Scr、24 h UPro、BUN、UACR均升高($P < 0.05$); 与模型组比较, HUMSCs移植组大鼠Ucr水平差异无统计学意义($P > 0.05$), Scr、24 h UPro、BUN、UACR均降低($P < 0.05$)。糖尿病肾病大鼠病理损伤缓解, 系膜增生和基底膜增厚改善, 小管空泡变性减少, 间质纤维化减轻。模型组大鼠血清HIF-1 α 水平较健康对照组升高($P < 0.05$), HUMSCs移植组血清HIF-1 α 水平较模型组下降($P < 0.05$)。与健康对照组比较, 模型组大鼠肾脏远端小管中HIF-1 α 蛋白水平增加($P < 0.05$); HUMSCs移植组的HIF-1 α 蛋白水平较模型组降低($P < 0.05$)。模型组远端小管标记蛋白Slc12A3水平低于健康对照组($P < 0.05$), HUMSCs移植组Slc12A3水平较模型组升高($P < 0.05$)。HUMSCs移植组的Aquaporin1蛋白水平较模型组和健康对照组均降低($P < 0.05$)。糖尿病肾病大鼠近端小管中无HIF-1 α 表达。**结论** HIF-1 α 主要在糖尿病肾病大鼠肾脏远端小管表达, 且HUMSCs可通过抑制HIF-1 α 的表达修复肾小管的损伤。

关键词: 糖尿病肾病; 人脐带间充质干细胞; 大鼠; HIF-1 α ; 远端小管; 近端小管

中图分类号: R587.2

文献标识码: A

Effect of HUMSC on HIF-1 α expression in diabetic nephropathy rats*

Gao He-ping, Mi Yan, Wang Cai-li, Wu Ya-ru, Zhang Ding-yu, Wei Kai-yue

(Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract: Objective To observe the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUMSCs) on the expression of hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) in the kidneys of rats with diabetic nephropathy.

Methods Fifty healthy clean-grade male SD rats aged 8 weeks were selected, with 20 serving as the

收稿日期: 2023-03-18

* 基金项目: 国家自然科学基金(No:8216030889, No:81760135); 内蒙古自然科学基金(No:2020GG0217); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(No: NJZY20174)

[通信作者] 王彩丽, E-mail: wangcaili213@163.com; Tel: 13514723868

[作者简介] 高和平, 现工作单位鄂尔多斯市中心医院肾内科

healthy control group and the remaining 30 used to replicate a diabetic nephropathy rat model using streptozotocin. After 12 weeks of rearing, three rats from each group were randomly selected and injected intravenously with DiR-labeled HUMSCs. The distribution of DiR-HUMSCs within the rats was observed 12-16 hours later using a small animal live optical 3D imaging system. Nine model group rats underwent HUMSC transplantation, receiving a 500 μ L intravenous injection of 1×10^6 cells/mL HUMSCs weekly for four weeks. The levels of 24-hour urinary protein (24 h UPro), serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), urinary creatinine (Ucr), and urinary albumin to creatinine ratio (UACR) were measured. Serum HIF-1 α levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Renal tissue pathology was examined using PAS and Masson staining, and the expression of HIF-1 α , Slc12A3, and Aquaporin1 proteins in renal tissues was detected using immunofluorescence. **Results** After four weeks of HUMSC treatment, Ucr levels decreased in the model and HUMSC transplantation groups compared to the healthy control group ($P < 0.05$). Scr, 24 h UPro, BUN, and UCAR increased ($P < 0.05$). Compared to the model group, there was no significant difference in Ucr levels in the HUMSC transplantation group ($P > 0.05$), while Scr, 24 h UPro, BUN, and UCAR decreased ($P < 0.05$). Pathological damage in diabetic nephropathy rats was alleviated, with reduced mesangial proliferation, basal membrane thickening, tubular vacuolization, and interstitial fibrosis. Serum HIF-1 α levels were higher in the model group than in the healthy control ($P < 0.05$), and significantly lower in the HUMSC transplantation group compared to the model group ($P < 0.05$). HIF-1 α protein levels were higher in the distal tubules of the model group ($P < 0.05$) and reduced in the HUMSC transplantation group ($P < 0.05$). Slc12A3 levels were lower in the model group compared to the healthy control ($P < 0.05$) and higher in the HUMSC transplantation group compared to the model group ($P < 0.05$). Aquaporin1 levels in the HUMSC transplantation group were lower than in both the model and healthy control groups ($P < 0.05$). There was no expression of HIF-1 α in the proximal tubules of diabetic nephropathy rats. **Conclusion** HIF-1 α is primarily expressed in the distal tubules of diabetic nephropathy rats, and HUMSCs can repair tubular damage by inhibiting the expression of HIF-1 α .

Keywords: diabetic nephropathy; human umbilical cord mesenchymal stem cells; rat; HIF-1 α ; distal tubule; proximal tubule

糖尿病肾病是糖尿病最常见的微血管并发症之一,已经成为终末期肾功能衰竭的重要原因,严重威胁人们的身体健康^[1]。由于糖尿病肾病诱发终末期肾脏疾病的发病率高,需要进行肾脏替代治疗的糖尿病肾病患者数量急剧增加,造成巨大的医疗负担和社会经济负担。糖尿病肾病的发病机制十分复杂,有包括炎症因子释放、氧化应激、糖脂代谢紊乱、血流动力学异常及遗传等多因素参与,目前并未完全阐明。近年来,对低氧反应引起糖尿病肾病患者肾功能损伤防治方法的探索成为了关注焦点。缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是代谢缺氧的主要介质,其异常激活在肾脏疾病的发病中起重要作用。在缺氧条件下,HIF-1的降解受到抑制,导致HIF-1 α 积累。有研究表明,HIF-1 α 在慢性缺氧条件下的积累会诱发足细胞上皮间质转化、细胞骨架紊乱、足突消失和裂隙隔膜功能障碍^[2]。此外,HIF-1 α 也是参与肾脏纤维化的重要因素。HIGGINS等^[3]早在2007年发现,体外低氧环境中HIF-1 α 基因过表达小鼠

的肾脏小管上皮细胞更易发生细胞上皮间质转化,体内通过沉默HIF-1 α 基因减轻肾纤维化模型小鼠的小管间质纤维化;并且,糖尿病肾病患者肾穿刺的肾组织纤维化区域中HIF-1 α 基因高表达。同样,HIF-1 α 参与慢性肾脏病患者肾小管损伤^[4]。近年来,以低氧诱导为治疗靶点开展的临床或基础研究越来越多,基因治疗或新开发的药物均有一定的治疗效果,但现有的治疗药物和方案均不能有效逆转糖尿病肾病的低氧诱导损伤。目前,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cell, HUMSC)在糖尿病肾病的损伤修复中发挥了一定作用,HUMSCs可促进糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化的修复和延缓炎症反应^[5],但是关于HUMSCs影响低氧诱导基因表达的研究尚未见报道。

本研究通过复制糖尿病肾病大鼠模型,移植HUMSCs到其体内,观察糖尿病肾病模型大鼠的肾功能和病理改变、血清HIF-1 α 的变化及肾组织HIF-1 α 在肾小球和肾小管中分布和表达特点,进

一步探讨 HUMSCs 对糖尿病肾病低氧诱导的肾损伤的修复作用,以及 HIF-1 α 表达对糖尿病肾病大鼠肾功能改变的影响。

1 材料与方法

1.1 HUMSCs 的体外培养及鉴定

HUMSCs 原代细胞购自北京清大赛尔有限公司。HUMSCs 原代细胞在含 10% 胎牛血清的 DF-12 培养基、37 °C 和 5% 二氧化碳细胞培养箱中培养。当细胞融合度接近 80% ~ 90% 时传代,并按 1:3 传代接种至细胞皿中,24 h 后换液,每 48 h 更换培养液一次,直到细胞贴壁,并观察细胞形态。

在 HUMSCs 细胞悬液中加入鼠抗人 CD90、CD105、CD44、CD29、CD34 抗体及同型鼠 IgG 抗体[贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司],避光环境下孵育 30 min,随后加入磷酸盐缓冲液(PBS)吹打均匀,1 000 r/min 离心 4 min,弃去上清液,重复 2 次,再次加入 PBS 制成 HUMSCs 悬液,留一管做空白对照,采用流式细胞仪进行 HUMSCs 活性和免疫表型检测。

1.2 复制糖尿病肾病大鼠模型

50 只健康清洁级 8 周龄雄性 SD 大鼠[北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK:(京)2019-0010,实验动物使用许可证号 SYXK:(蒙)2020-0003]进行分笼饲养,给予标准大鼠饲料,自由进食及饮水,定期更换垫料,环境温度恒定于 25 °C,每 12 h 昼夜交替,适应性饲养 1 周。随机选取 20 只为健康对照组,其余 30 只为模型组进行模型复制。30 只大鼠按 35 mg/kg 的剂量腹腔注射链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ),连续注射 3 d。第 4 天每只大鼠尾尖采血测血糖,血糖 > 16.8 mmol/L 为达标,否则继续补打 STZ,直至达到标准。之后继续饲养 12 周,直至镜下观察肾脏组织出现损伤为糖尿病肾病大鼠模型复制成功。观察两组大鼠的血糖和体重变化。

1.3 肾脏组织病理检测

第 8 周时,随机选取两组大鼠各 3 只进行病理检测,模型组肾脏病理损伤不明显;第 12 周时,随机选取两组大鼠各 5 只进行病理检测,模型组肾脏病理损伤,证明糖尿病肾病大鼠模型复制成功。具体操作:去掉右肾包膜后,沿横轴切开,每一半肾脏再

沿横轴切一下,使肾脏薄片变成厚度为原来的 1/2,然后固定于 4% 多聚甲醛,石蜡包埋,4 μ m 厚切片进行 PAS 和 Masson 染色。

1.4 DiR 染料标记 HUMSCs 及免疫组织化学检测大鼠肾脏组织 CD90、CD44 蛋白表达

新鲜配制的近红外荧光(DiR)染料加入计数的 HUMSCs 中,37 °C 下避光孵育 5 min 后 PBS 轻柔清洗细胞 2 次,移植备用,避光保存。第 12 周,随机选取两组大鼠各 3 只分别尾静脉注射 DiR-HUMSCs,代谢 12 ~ 16 h 后在小动物活体光学 3D 成像系统下观察 DiR-HUMSCs 在大鼠体内的分布。为进一步观察移植入健康对照组大鼠和模型组大鼠体内 DiR-HUMSCs 在大鼠肾脏的定位分布,本研究采用人源性和鼠源性间充质干细胞特异性抗体 CD90、CD44 染色大鼠肾脏组织。采用颈椎脱臼法处死大鼠,迅速剪开腹部取出肾脏,去掉肾脏外包膜,沿着横轴切开,在每一半肾脏上再沿着横轴切一下,使肾脏薄片变成厚度成为原来的 1/2,然后固定于 4% 的多聚甲醛溶液中,石蜡包埋,4 μ m 厚切片,依次放入二甲苯 I (10 min),二甲苯 II (10 min),无水乙醇 I (5 min),无水乙醇 II (5 min),95% 酒精(3 min),90% 酒精(3 min),80% 酒精(2 min),70% 酒精(2 min),然后蒸馏水浸洗 2 min。将脱蜡水化后的组织加适量的修复液(0.01 mol 枸橼酸缓冲液,pH 6.0),使用微波炉加热至沸腾进行抗原修复,10 ~ 15 min 后放入冷水中冷却,PBS 冲洗 3 遍。将配制好的 3% 过氧化氢滴加于模型组大鼠切片组织上以阻断内源性过氧化物酶,室温孵育 15 min。用油性笔在组织周围画圈,然后滴加稀释好的一抗;在健康对照组大鼠切片组织上滴加 PBS 做阴性对照。加完一抗后于 4 °C 冰箱孵育过夜。第 2 天,加入聚合物辅助剂,室温或 37 °C 孵育 20 min。PBS 冲洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG,室温或 37 °C 孵育 20 ~ 30 min。切片滴加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下观察,呈棕黄色或棕褐色为阳性。苏木精复染 30 s ~ 1 min。水洗后用 1% 盐酸酒精分化,再用自来水冲洗返蓝。将切片再次自来水冲洗后依次放入 70% 酒精、80% 酒精、90% 酒精、95% 酒精、无水乙醇 I、无水乙醇 II、二甲苯 I、二甲苯 II 中脱水透明,并风干切片。中性树胶封盖玻片和切

片。最后,切片在显微镜下观察或者采集图像。

1.5 HUMSCs 移植

以上实验完成后,模型组大鼠剩余 19 只,随机选取 9 只进行 HUMSCs 移植(HUMSCs 移植组)。HUMSCs 移植采用尾静脉注射方式,移植浓度为 1×10^6 个/mL 的 HUMSCs 500 μ L 至大鼠体内,1 次/周,连续 4 周,共 28 d。健康对照组 9 只大鼠和模型组其他 10 只大鼠不做任何治疗。

为进一步观察 HUMSCs 在大鼠肾脏的分布,用 10% 水合氯醛(300 mg/kg)麻醉剂注射入 HUMSCs 移植组大鼠腹腔,待大鼠彻底麻醉后,打开腹腔,快速摘取大鼠肾脏,利用 Luminaivis II 成像仪记录成像。曝光 5 min 后,采用小动物活体光学 3D 成像系统 Living Image[®] 4.5.2 分析、成像。

1.6 大鼠血糖及肾功能指标的检测

移植 HUMSCs 治疗后,每周通过断尾尖试纸检测 3 组大鼠的血糖,连续检测 4 周。移植 HUMSCs 治疗 4 周后,采用 Chemray 800 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)检测 3 组大鼠的血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)、尿白蛋白与肌酐比值(urinary protein-creatinine ratio, UACR)水平;采用 BCA 蛋白定量法检测 3 组大鼠的尿液 24 h 尿蛋白定量(24-hour urinary protein quantity, 24 h UPro)水平(试剂盒购自美国赛默飞世尔科技有限公司,货号:23227);采用酶联免疫吸附试验检测 3 组大鼠的尿肌酐(urine creatinine, Ucr)水平(试剂盒购自美国赛默飞世尔科技有限公司,货号:EIACUN)。

1.7 酶联免疫吸附试验检测大鼠血清 HIF-1 α 水平

移植 HUMSCs 治疗 4 周后,采用酶联免疫吸附试验(试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:E-EL-R0513c)检测大鼠血清 HIF-1 α 水平。用蒸馏水按 1:20 稀释洗涤缓冲液;手工洗板,每孔加满洗涤液,静置 1 min 后甩尽孔内液体,在吸水纸上拍干,反复洗板 5 次;从室温下平衡 20 min 后的铝箔袋中取出所需板条,剩余板条用自封袋密封放回 4 $^{\circ}$ C 冰箱;设置阴、阳性对照孔和样本孔,阴、阳对照孔中加入阴性对照、阳性对照各 50 μ L;待测样本孔先加待测样本 10 μ L,再

加样本稀释液 40 μ L;随后阴、阳性对照孔及样本孔中各加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗原 100 μ L,用封板膜封住反应孔,37 $^{\circ}$ C 恒温箱温育 60 min;弃去液体,吸水纸上拍干,重复手工洗板 5 次;每孔加入底物 A、B 各 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min;每孔加入终止液 50 μ L,15 min 内,测定 450 nm 波长处各孔的光密度值。采用 Excel 表,以标准品浓度作横坐标,对应光密度值作纵坐标,绘制标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样本浓度。

1.8 3 组大鼠肾脏组织病理检测及免疫荧光染色检测 HIF-1 α 、Aquaporin1、Slc12A3 的表达

移植 HUMSCs 治疗 4 周后,第 29 天,采用颈椎脱臼法处死 3 组大鼠,迅速剪开腹部取出肾脏,去掉肾脏包膜,沿着横轴切开,在每一半肾脏上再沿着横轴切一下,使肾脏薄片厚度成为原来的 1/2,然后固定于 4% 的多聚甲醛溶液中,石蜡包埋,4 μ m 厚切片。一部分采用 PAS 和 Masson 染色进行肾脏组织病理检测,一部分进行免疫荧光染色检测 HIF-1 α 、Aquaporin1、Slc12A3 的表达:PBS 洗 3 次,弃去 PBS 后加入 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min, PBS 洗 2 次并弃去;加入 5% BSA,37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,弃去封闭液;加一抗(HIF-1 α 、Aquaporin 1、SLC12A3),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBS 洗 2 次后加二抗抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBS 洗 2 次后弃去并加入抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)。荧光显微镜下观察并拍照。用 Image J 1.49 软件量化分析荧光图片,结果用平均荧光强度相对值表示。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较用 Tukey 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUMSCs 的生化特征和特征性表面标志物

原代 HUMSCs 培养贴壁生长,48 ~ 72 h 传代 1 次,传至第 3 代时,光镜下观察细胞呈梭状排列,即 HUMSCs 外观为成纤维细胞状(见图 1A)。流式细胞仪实验证实 HUMSCs 的干性标志物 CD29、CD44、

CD90、CD105 的阳性率分别为 99.4%、100%、100% 和 99.8%，而 CD34、CD45、HLA-DR 的阳性率分别为

1.3%、1.6% 和 1.0% (见图 1B)。确认本实验中使用的 HUMSCs 纯度较高，免疫原性较低。

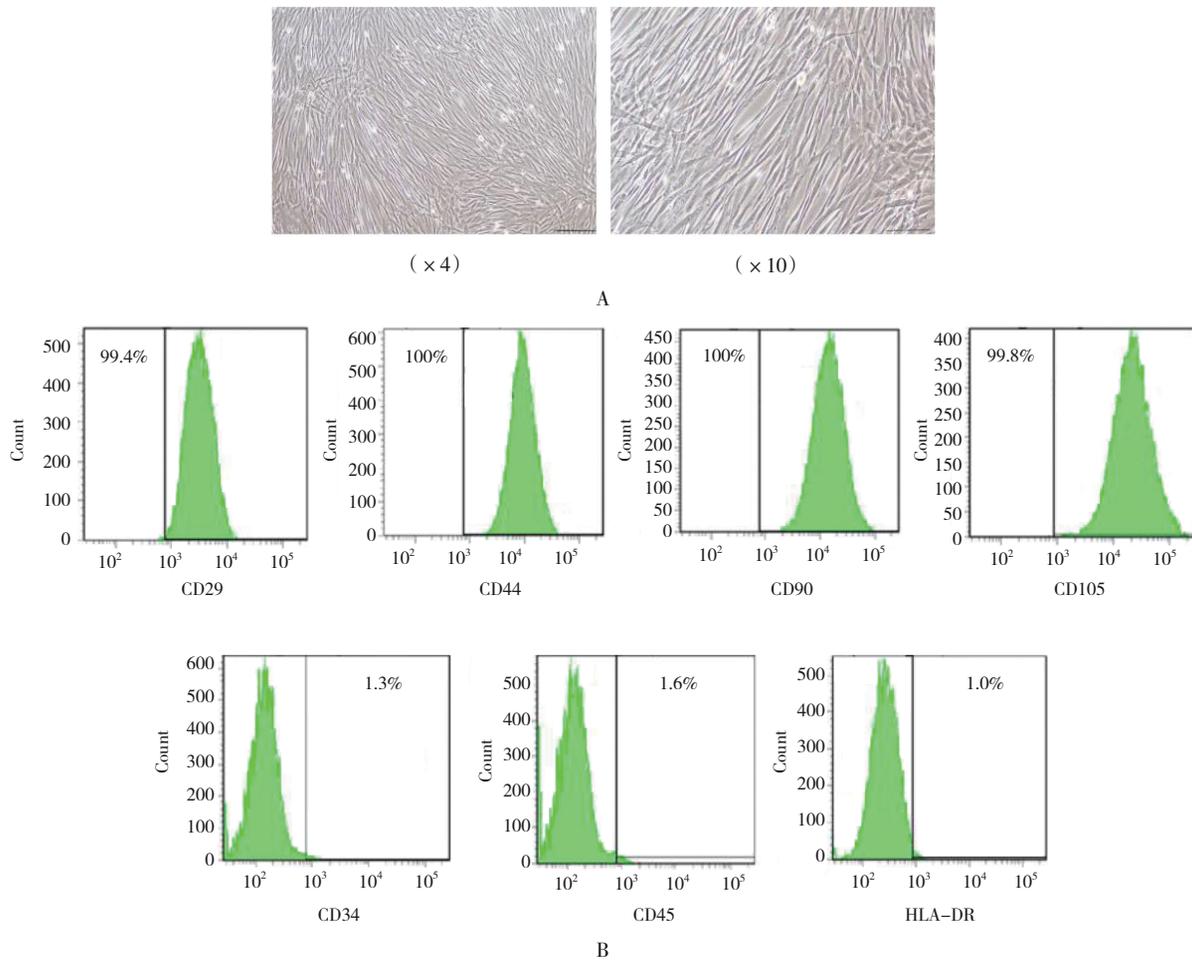


图 1 HUMSCs 的特征性表面标志物

2.2 健康对照组与模型组大鼠模型复制过程中的一般情况比较

健康对照组与模型组大鼠第 0 天的体重和血糖比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。健康对照组与模型组大鼠第 6 天的体重比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；第 6 天的血糖比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 2、4、6、8、10 和 12 周的体重和血糖比

较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；模型组较健康对照组体重轻，血糖水平高。见表 1 和图 2。

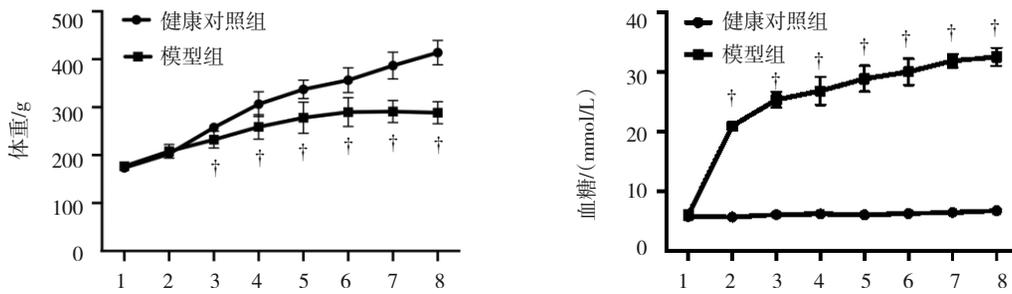
第 12 周时，PAS 染色结果显示模型组大鼠肾脏组织中肾小球基底膜增厚 (红色箭头)，系膜基质增多 (黄色箭头)；Masson 染色结果显示胶原纤维蛋白的沉积增加 (见图 3)。说明糖尿病肾病大鼠模型复制成功。

表 1 健康对照组与模型组模型复制过程中的体重和血糖比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重/g							
		第0天	第6天	第2周	第4周	第6周	第8周	第10周	第12周
健康对照组	20	173.74 \pm 8.38	202.91 \pm 8.71	257.85 \pm 8.05	306.60 \pm 25.94	337.14 \pm 19.38	356.28 \pm 25.81	387.02 \pm 28.02	413.75 \pm 25.49
		176.92 \pm 8.53	208.22 \pm 14.24	232.42 \pm 17.53	258.97 \pm 25.51	278.14 \pm 32.54	289.82 \pm 29.92	290.88 \pm 23.22	288.65 \pm 22.95
F 值		0.496	0.709	12.150	11.980	16.970	19.790	48.840	93.080
P 值		0.495	0.416	0.004	0.005	0.001	0.000	0.000	0.000

续表 1

组别	血糖/mmol/L							
	第0天	第6天	第2周	第4周	第6周	第8周	第10周	第12周
健康对照组	5.72 ± 0.41	5.62 ± 0.47	6.00 ± 0.43	6.16 ± 0.61	5.98 ± 0.31	6.22 ± 0.38	6.38 ± 0.62	6.68 ± 0.72
模型组	5.96 ± 0.26	20.92 ± 0.75	25.32 ± 1.29	26.80 ± 2.39	28.85 ± 2.17	30.02 ± 2.19	31.88 ± 1.11	32.52 ± 1.53
F 值	1.200	1483.460	994.300	349.300	541.780	568.250	1989.740	1161.630
P 值	0.305	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



1: 第0天; 2: 第6天; 3: 第2周; 4: 第4周; 5: 第6周; 6: 第8周; 7: 第10周; 8: 第12周。† 与健康对照组比较, $P < 0.05$ 。

图2 健康对照组与模型组大鼠体重生长曲线和血糖浓度曲线

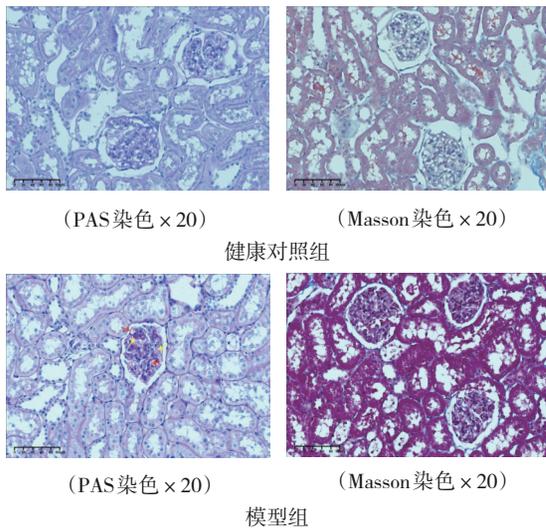


图3 两组大鼠肾脏组织病理图

2.3 HUMSCs 在大鼠肾脏的分布

DiR 染料标记的 HUMSCs 经尾静脉注射到健康对照组和模型组大鼠体内后, 均可在腹部观察到 DiR 染料的荧光分布。模型组大鼠体内荧光主要分布在脾胃与胰腺区, 而健康对照组大鼠体内主要分布在肝脏区(见图 4)。免疫组织化学检测 CD90 和 CD44 蛋白的表达发现, CD44 蛋白在模型组大鼠肾小球和肾小管区中均表达(见图 5, 蓝色箭头), CD90 蛋白主要在肾小球中表达(见图 5, 红色箭头), 证明 HUMSCs 在模型组大鼠肾脏中定植。

2.4 HUMSCs 对糖尿病肾病大鼠肾脏功能的影响

移植 HUMSCs 治疗后, HUMSCs 移植组第 1 周注射干细胞后死亡 3 只, 第 2 周注射后死亡 1 只, 剩余 5 只直到实验结束。模型组在与 HUMSCs 移植组平行时间的第 1 周无死亡, 第 2 周死亡 2 只, 第 3 周无死亡, 第 4 周死亡 3 只, 剩余 5 只; 健康对照组大鼠对照实验后剩余 9 只, 到实验结束时大鼠无死亡。

健康对照组、模型组、HUMSCs 移植组大鼠移植 HUMSCs 治疗第 1、2、3、4 周的血糖比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 模型组和 HUMSCs 移植组血糖高于健康对照组 ($P < 0.05$); 模型组与 HUMSCs 移植组血糖比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

移植 HUMSCs 治疗 4 周后, 健康对照组、模型组、HUMSCs 移植组大鼠的肾功能指标 Ucr、Scr、24 h UPro、BUN、UCAR 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 与健康对照组比较, 模型组和 HUMSCs 移植组大鼠 Ucr 水平降低 ($P < 0.05$), Scr、24 h UPro、BUN、UCAR 均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, HUMSCs 移植组大鼠 Ucr 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Scr、24 h UPro、BUN、UCAR 均降低 ($P < 0.05$) (见表 3)。相较于模型组, HUMSCs 移植组大鼠的肾脏组织增厚的基底膜被改善, 小管空泡变性数量减少, 间质纤维化减轻(见图 6)。

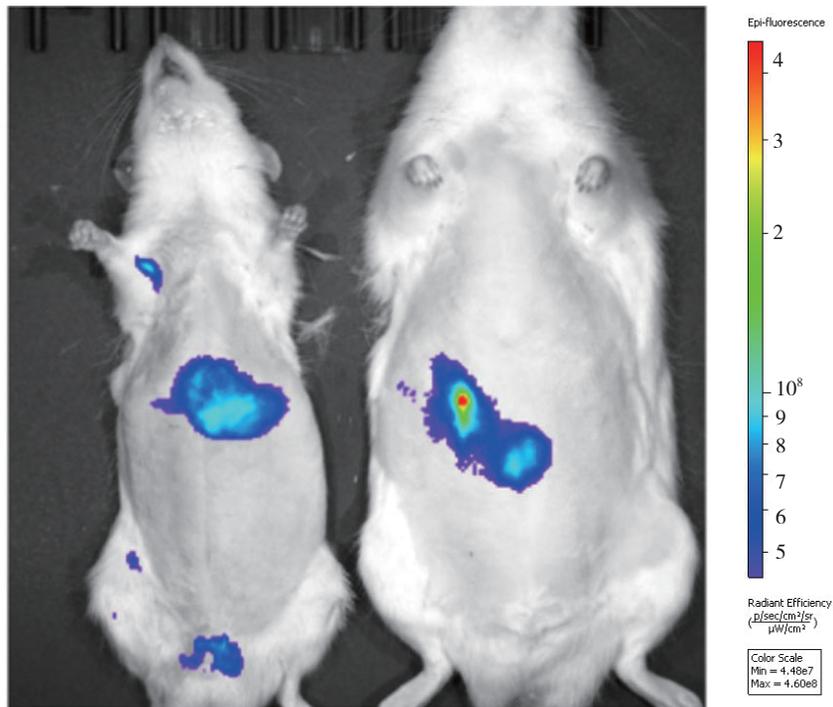
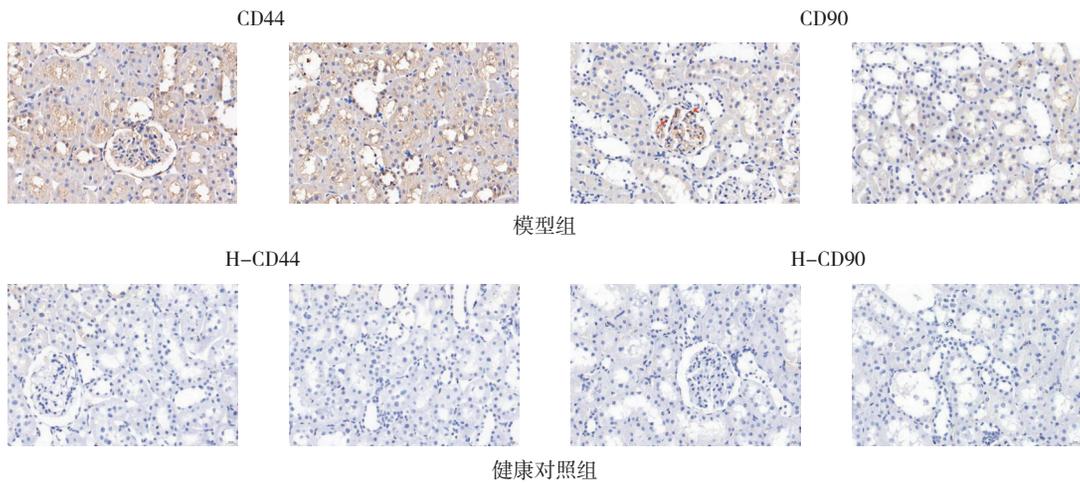


图4 DiR-HUMSCs在大鼠活体内的分布荧光显示图



CD44(蓝色箭头)、CD90(红色箭头)在DiR-HUMSCs移植的模型组大鼠肾组织中表达; CD44、CD90在DiR-HUMSCs移植的健康对照组大鼠肾组织中未见表达。

图5 大鼠肾脏组织 CD90 和 CD44 蛋白的表达 (免疫组织化学 $\times 40$)

表2 3组大鼠移植 HUMSCs 治疗期间的血糖比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	第1周	第2周	第3周	第4周
健康对照组	6.76 \pm 0.21	6.66 \pm 0.92	7.10 \pm 0.54	7.44 \pm 0.27
模型组	33.26 \pm 0.08 [†]	31.72 \pm 1.40 [†]	32.06 \pm 2.60 [†]	32.80 \pm 1.11 [†]
HUMSCs 移植组	33.30 \pm 0.00 [†]	29.08 \pm 2.77 [†]	33.30 \pm 0.00 [†]	31.60 \pm 2.43 [†]
F 值	62 795.67	269.78	461.74	423.66
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: [†]与健康对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 3组大鼠移植 HUMSCs 治疗后肾功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ucr/($\mu\text{mol/L}$)	Scr/($\mu\text{mol/L}$)	24h UPro/(mg/24h)	BUN/(mmol/L)	UACR/(mg/g)
健康对照组	9	1521.07 \pm 320.18	78.27 \pm 8.43	96.47 \pm 7.38	5.09 \pm 0.30	103.62 \pm 16.8
模型组	5	582.00 \pm 62.60 ^①	143.8 \pm 27.69 ^①	267.8 \pm 9.39 ^①	9.82 \pm 0.39 ^①	522.00 \pm 84.97 ^①
HUMSCs 移植组	5	908.00 \pm 199.42 ^①	110.39 \pm 7.61 ^{①②}	187.68 \pm 23.19 ^{①②}	7.34 \pm 0.38 ^{①②}	308.20 \pm 72.50 ^{①②}
F 值		23.320	17.960	161.980	211.680	51.450
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与健康对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

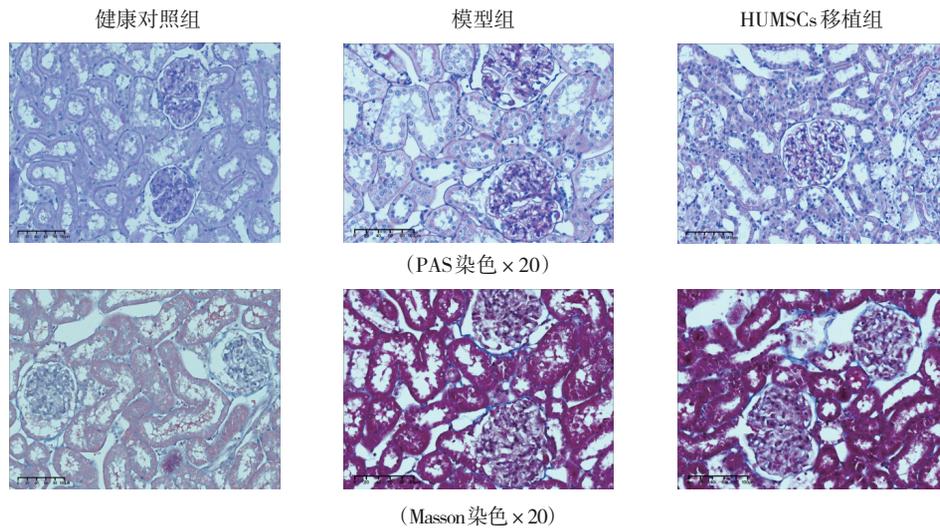
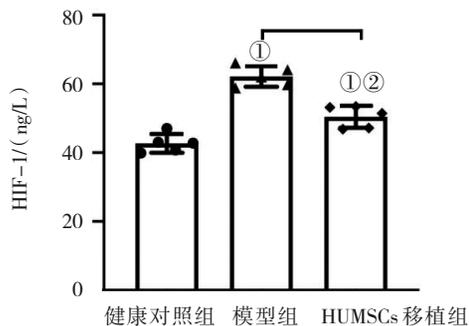


图 6 3组大鼠肾脏组织病理切片

2.5 3组大鼠血清 HIF-1 α 水平比较

移植 HUMSCs 治疗 4 周后, 酶联免疫吸附试验检测健康对照组、模型组、HUMSCs 移植组大鼠的血清 HIF-1 α 水平分别为 (42.69 \pm 2.76)、(62.15 \pm 3.00)、(50.40 \pm 3.20) ng/L, 3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 53.470, P = 0.000$)。模型组大鼠血清 HIF-1 α 水平较健康对照组升高 ($P < 0.05$), HUMSCs 移植组血清 HIF-1 α 水平较模型组降低 ($P < 0.05$)。见图 7。



①与健康对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 7 大鼠血清 HIF-1 α 的水平比较

2.6 3组小鼠 HUMSCs 移植治疗后肾脏组织的 HIF-1 α 、Slc12A3、Aquaporin1 水平比较

HUMSCs 移植治疗后, 免疫荧光染色检测健康对照组、模型组、HUMSCs 移植组大鼠肾脏组织的 HIF-1 α 、Slc12A3、Aquaporin1 水平, 3 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 与健康对照组比较, 模型组大鼠肾脏远端小管中 HIF-1 α 蛋白水平升高 ($P < 0.05$); HUMSCs 移植组的 HIF-1 α 蛋白水平较模型组降低 ($P < 0.05$)。模型组远端小管标记蛋白 Slc12A3 水平低于健康对照组 ($P < 0.05$), HUMSCs 移植组 Slc12A3 水平较模型组升高 ($P < 0.05$)。HUMSCs 移植组的 Aquaporin1 蛋白水平较模型组和健康对照组均降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

免疫荧光染色显示, HIF-1 α 主要在肾小管中大量表达, 肾小球中微量表达, 说明低氧诱导主要发生在肾小管 (见图 8A)。3 组小鼠远端小管标记蛋白 Slc12A3 表达见图 8B, 肾脏远端小管发生低氧诱导反应, 同时远端小管上皮细胞受损。模型组的 HIF-1 α 蛋白绿色荧光强度明显强于健康

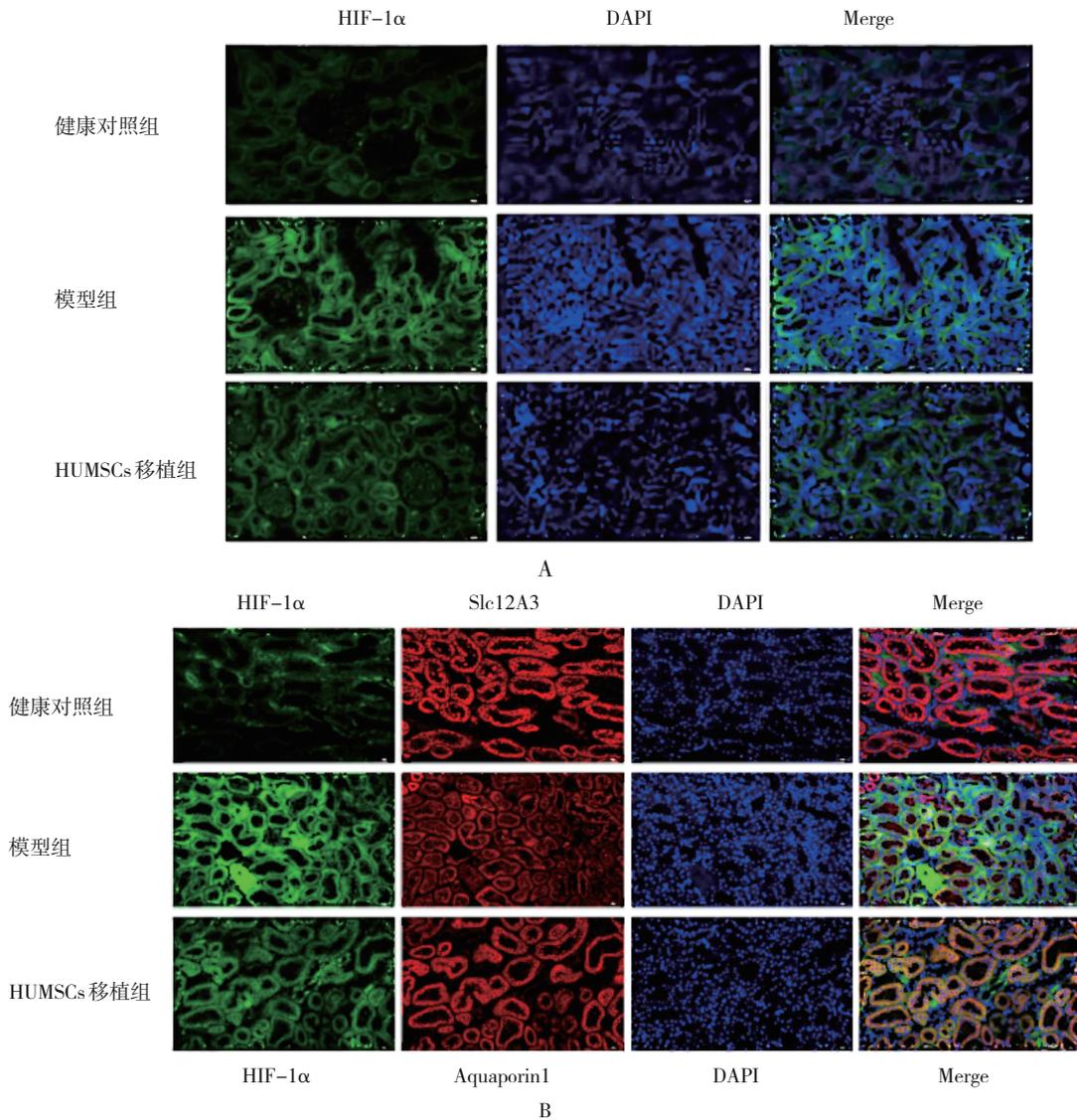
表4 3组小鼠 HUMSCs 移植治疗后肾脏组织的 HIF-1 α 、Slc12A3、Aquaporin1 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肾脏 HIF-1 α	近端小管 HIF-1 α	远端小管 HIF-1 α	远端小管 Slc12A3	近端小管 Aquaporin1
健康对照组	9	23.39 \pm 5.83	11.32 \pm 2.55	14.13 \pm 3.24	289.37 \pm 10.48	233.87 \pm 25.13
模型组	5	277.49 \pm 19.97 ^①	230.04 \pm 29.47 ^①	289.18 \pm 10.84 ^①	130.15 \pm 19.97 ^①	250.72 \pm 29.69
HUMSCs 移植组	5	143.70 \pm 24.32 ^{①②}	102.34 \pm 7.51 ^{①②}	119.47 \pm 10.05 ^{①②}	173.62 \pm 14.57 ^{①②}	93.54 \pm 5.74 ^{①②}
F 值		141.91	116.57	755.54	84.50	61.30
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与健康对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

对照组。同时模型组与健康对照组大鼠的 HIF-1 α 和 Aquaporin1 蛋白在近端小管中无共定位, 说明 HIF-1 α 蛋白主要在远端小管中表达和分布。HUMSCs 移植组的 HIF-1 α 蛋白的绿色荧光信号明

显减弱, Aquaporin1 蛋白的表达也显著降低, 这进一步说明近端小管的损伤并不是由低氧反应引起(见图 8C)。



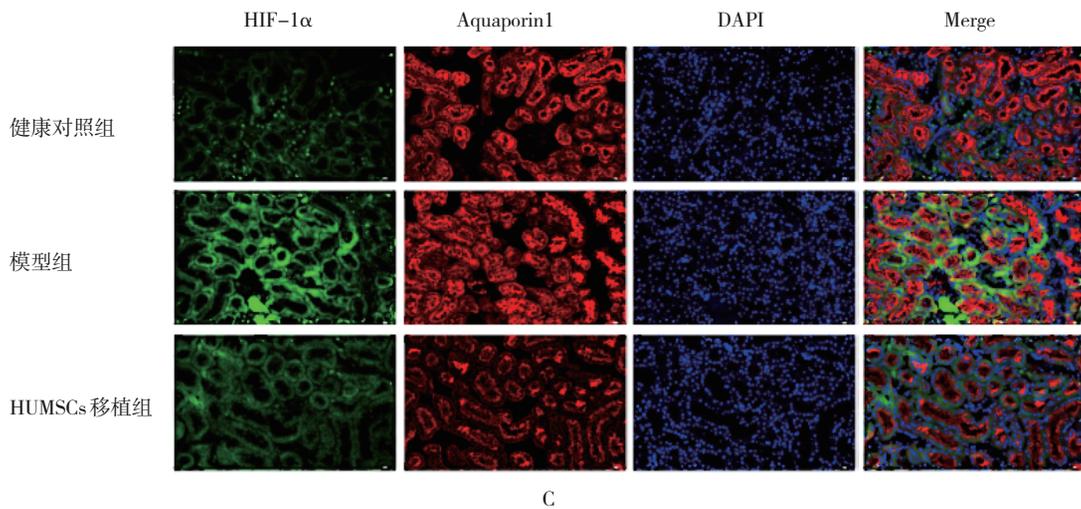


图 8 HUMSCs 对糖尿病肾病大鼠低氧诱导因子表达变化的影响

3 讨论

本研究发现, HUMSCs 明显改善糖尿病肾病大鼠的生存状态, 糖尿病肾病大鼠在移植 HUMSCs 后肾功能指标明显好转, 此外, HUMSCs 显著延缓了糖尿病肾病大鼠肾脏的病理进展, 增厚的肾小球基底膜和增生的系膜基质在移植 HUMSCs 后被改善。更重要的是, HUMSCs 抑制糖尿病肾病大鼠体内低氧诱导的损伤, 移植后糖尿病肾病大鼠血清 HIF-1 α 水平明显降低, 特别是在治疗后糖尿病肾病大鼠肾脏远端小管中 HIF-1 α 的表达被显著抑制, 这说明 HUMSCs 具有调控糖尿病肾病低氧的作用, 且可通过抑制 HIF-1 α 的表达修复肾小管的损伤。

大量的证据表明, 间充质干细胞可有效保护和促修复糖尿病肾病肾脏组织^[6-7]。LI 等^[8]探讨骨髓源间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMD-MSCs) 对糖尿病大鼠肾功能的保护作用, 研究显示, 通过尾静脉 5 次注射 BMD-MSCs 到糖尿病肾病大鼠体内, 血清 BUN 和 Scr 水平, 尿液样本中的糖尿、微量白蛋白、UACR, 肾脏病理学及动物的生存均被显著改善, 但是并未观察到对高血糖的显著影响; BMD-MSCs 移植 48 h 后, 在肾脏损伤区域发现 MSCs 的定位。此外, 脐带源间充质干细胞 (umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, UCMSCs) 也被证实具有延缓 STZ 诱导的糖尿病大鼠肾脏疾病进展的作用。CHEN 等^[9]的研究发现, 对糖尿病肾病大鼠每周输注一次 UCMSCs, 连续 2 周, 大鼠的 24 h UPro、UCAR、Scr 和 BUN 的增加受到抑制,

同时, UCMSCs 改善了糖尿病肾病大鼠肾脏的病理损伤, 并发现这种改善作用可能是通过 UCMSCs 抑制肾脏细胞凋亡, 减轻糖尿病肾病大鼠肾细胞损伤和蛋白尿而实现的。本研究发现, HUMSCs 在移植到糖尿病肾病大鼠体内 24 h 后会内化到肾脏, 可显著降低糖尿病肾病大鼠增加的 BUN、Scr、24 h UPro、UACR 水平, 明显地改善肾小球的系膜增生和基底膜增厚, 减少小管空泡变性, 减轻间质纤维化, 这表明 HUMSCs 有效改善了糖尿病肾病大鼠的肾功能。且在第 2 次移植 HUMSCs 后, 糖尿病肾病大鼠的血糖开始下降, 这表明 HUMSCs 具有调节糖尿病肾病大鼠血糖的作用。

缺氧反应是肾脏适应缺氧和在不同病理条件下生存的机制。近年来, 人们认识到内皮和毛细血管损伤后可以影响肾组织中供氧与耗氧间的平衡, 这在糖尿病肾病的进展中发挥重要作用。因此, 缺氧被认为是糖尿病肾病发生和发展的重要因素^[10]。HIF-1 是代谢缺氧的主要介质, 其异常激活在肾脏疾病的发病机制中起重要作用。在缺氧条件下, HIF-1 的降解受到抑制, 导致 HIF- α 积累。肾脏组织中, HIF-1 在于大多数肾细胞中表达, 大部分表达在近端小管、远端小管、连接小管和集合管的细胞中, 并在缺氧性肾病中发挥调节炎症、纤维化、细胞凋亡和糖酵解等多种功能^[4]。

研究发现, 糖尿病肾病患者肾穿刺组织中 HIF-1 表达紊乱, HIF-1 体系在肾小管间质损伤之前被激活, 从而提出高血糖-HIF 通路学说^[11]。在正常或缺氧条件下, 高血糖可以不同方式激活 HIF-1 的表达,

如晚期糖基化终产物的合成、蛋白激酶C激活、促炎细胞因子、线粒体活性氧等^[12]。本研究发现,糖尿病肾病大鼠血清HIF-1 α 异常升高,其在肾小球和远端小管中均表达增强,并且远端小管中HIF-1 α 的表达高于肾小球和近端小管。因此,本研究推测高糖环境下,HIF-1 α 是引起糖尿病肾病肾小管损伤的重要基因。

已有研究证明,糖尿病肾病缺氧环境中,HIF-1 α 过度活化促进了肾脏间质纤维化,与尿蛋白增多、肾功能减退及肾脏病理形态学的变化密切相关,是糖尿病肾病治疗的靶蛋白^[13]。DEBRA等^[3]研究者发现,通过沉默HIF-1 α 基因可减轻肾纤维化小鼠模型中的间质纤维化。近年来研究表明HIF-1是糖尿病肾病的药物钠/葡萄糖协同转运蛋白2(Sodium/glucose cotransporter 2, SGLT2)抑制剂的作用靶点^[13-15]。SGLT2抑制剂可降低体外培养的肾小管上皮细胞中缺氧诱导的HIF-1 α 蛋白及其靶基因的表达^[13,15],其机制是线粒体耗氧量减少。SGLT2抑制剂治疗糖尿病db/db小鼠可减少HIF-1 α 在肾小球中表达、减轻小管损伤和间质纤维化^[13]。本研究进一步探讨了HUMSCs对糖尿病肾病大鼠HIF-1 α 表达的影响,结果表明,HUMSCs可显著减少HIF-1 α 在糖尿病肾病大鼠肾小球和肾小管中的表达,特别是远端小管细胞中HIF-1 α 的表达被明显减弱,同时标记蛋白Slc12A3蛋白的表达增强。有趣的是,HIF-1 α 并不会引起近端肾小管低氧诱导损伤。这些实验结果有力地证明糖尿病肾病肾脏远端小管HIF-1 α 因子表达增强可能是诱发肾脏损伤的重要原因。

综上所述,本研究表明HUMSCs可改善糖尿病肾病大鼠缺氧反应,其能够通过调控HIF-1 α 在肾脏远端小管的表达而减缓肾脏损伤。因此,HIF-1 α 基因是HUMSCs治疗糖尿病肾病的重要作用靶点。这可能为糖尿病肾病的治疗提供新的见解和思路。

参 考 文 献 :

- [1] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants[J]. *Lancet*, 2016, 387(10027): 1513-1530.
- [2] SINGH A K, KOLLIGUNDLA L P, FRANCIS J, et al. Detrimental effects of hypoxia on glomerular podocytes[J]. *J Physiol Biochem*, 2021, 77(2): 193-203.
- [3] HIGGINS D F, KIMURA K, BERNHARDT W M, et al. Hypoxia

promotes fibrogenesis *in vivo* via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12): 3810-3820.

- [4] LIU J, WEI Q Q, GUO C Y, et al. Hypoxia, HIF, and associated signaling networks in chronic kidney disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 950.
- [5] YIN S Q, LIU W Z, JI C, et al. hucMSC-sEVs-derived 14-3-3 ζ Serves as a bridge between YAP and autophagy in diabetic kidney disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3281896.
- [6] YAP S K, TAN K L, ABD RAHAMAN N Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles ameliorated insulin resistance in type 2 diabetes mellitus rats[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(3): 649.
- [7] 郭春, 叶小康. 间充质干细胞胞外囊泡的研究及应用进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(6): 79-84.
- [8] LI Y M, LIU J P, LIAO G N, et al. Early intervention with mesenchymal stem cells prevents nephropathy in diabetic rats by ameliorating the inflammatory microenvironment[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2629-2639.
- [9] CHEN L, XIANG E, LI C Y, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate nephrocyte injury and proteinuria in a diabetic nephropathy rat model[J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 8035853.
- [10] MORA-GUTIÉRREZ J M, FERNÁNDEZ-SEARA M A, ECHEVERRÍA-CHASCO R, et al. Perspectives on the role of magnetic resonance imaging (MRI) for noninvasive evaluation of diabetic kidney disease[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(11): 2461.
- [11] YANG C, ZHONG Z F, WANG S P, et al. HIF-1: structure, biology and natural modulators[J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(7): 521-527.
- [12] ZHANG X L, GUAN T W, YANG B X, et al. Protective effect of berberine on high glucose and hypoxia-induced apoptosis via the modulation of HIF-1 α in renal tubular epithelial cells[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 669-682.
- [13] BESSHO R, TAKIYAMA Y, TAKIYAMA T, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α is the therapeutic target of the SGLT2 inhibitor for diabetic nephropathy[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14754.
- [14] PACKER M. Mechanisms leading to differential hypoxia-inducible factor signaling in the diabetic kidney: modulation by SGLT2 inhibitors and hypoxia mimetics[J]. *Am J Kidney Dis*, 2021, 77(2): 280-286.
- [15] ZOJA C, XINARIS C, MACCONI D. Diabetic nephropathy: novel molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 586892.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 高和平, 米焱, 王彩丽, 等. 人脐带间充质干细胞对糖尿病肾病大鼠肾脏HIF-1 α 表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(9): 39-49.

Cite this article as: GAO H P, MI Y, WANG C L, et al. Effect of HUMSC on HIF-1 α expression in diabetic nephropathy rats[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(9): 39-49.