

创建可控制的生长环境诱导肾干细胞体外分化肾小管

胡康洪^{1,2}, 闫朝丽³

- (1. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071;
2. 德国雷根斯堡大学 分子和细胞解剖学研究所, 德国雷根斯堡 93051;
3. 内蒙古医学院第一附属医院内分泌科, 呼和浩特 010050)

摘要:干细胞治疗是一种极具前景的临床手段,用以再生因疾病而损伤的人体组织和器官。通过组织工程手段建立一套可控制的体外培养环境,跟踪目前尚不明确的干细胞发育过程尤为必要。最近本课题组通过引入气体组件器和在灌注培养器中建立人工脉管,在世界上首次观察到来自新生兔肾的胚胎干细胞可在醛固酮作用下分化成功能性的肾小管。免疫组织化学显示,肾小管在长达 2 到 5 周的培养时间内维持完整结构而不崩解,运用 Na/K-ATPase 和闭合素抗体荧光标记显示:分化出的肾小管具备上皮细胞典型的基膜管腔膜极性并发育出胞间连丝。因此本研究所创造的技术使得详细研究发育过程成为可能,为肾脏干细胞生长和分化的最佳化提供了一个强有力的体外工具。

关键词:组织工程;人工脉管;醛固酮;肾小管

中图分类号:R318 文献标识码:A 文章编号:1672-6278 (2008)03-0221-04

Creating a Controllable Growth Environment for the Development of Renal Stem Cells into Tubules

HU Kanghong^{1,2}, YAN Zhaoli³

- (1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;
2. Institute of Molecular and Cellular Anatomy, University of Regensburg, Regensburg, Germany 93051;
3. The First Hospital Affiliated to the Inner Mongolia Medical College, Department of Endocrinology, Hohhot 010050, China)

Abstract: The use of stem cells is a valuable therapeutical option for the regeneration of diseased tissues and organs. It is especially important to establish a controllable environment in vitro culture condition by tissue engineering in order to elaborate the unknown process of development of stem cells. Recently, through introducing gas exchange/expander modules and an artificial interstitium within a perfusion culture container, we developed a new culture technology. Our studies revealed that embryonic stem cells from neonatal rabbit kidney developed into functional tubules under the administration of aldosterone. Immunohistochemical labeling results showed that newly developed tubules remained structural intact within 2~5 weeks of culture period, and Na/K-ATPase and fluorescent anti-occludin-labeled results showed that developed tubules possessed the typical luminal-basolateral polarization of epithelial cells and indicated the development of tight junctions. The presented technology makes the exact analysis of developmental process now possible and provides a new powerful tool to optimize growth and differentiation of renal stem cells.

Key words: Tissue engineering; Artificial Interstitium; Aldosterone; Tubule

通信作者 Email: hukgh@wh.iov.cn

1 临床背景

透析和器官移植是目前临床上处理肾衰竭的两种常用治疗方案。然而,高昂的医疗费用,短的透析寿命(一般仅能维持几年)和匮乏的供体器官是造成慢性肾衰竭死亡率高的成因。到目前为止,只有生物人工肾用于临床实验治疗急性或慢性肾功能衰竭,Humes 等在体外构建了有功能的肾小管辅助装置(renal tubule assist device, RAD),并与血滤器结合,在体外治疗尿毒症动物及多器官功能衰竭的患者,取得了一定的疗效^[1-2],但其安全性及效率需进一步研究。

另外, Lanza 等利用成年牛皮肤的遗传物质植入除去了细胞核的卵细胞中,即利用核转移(nuclear transplantation, NT)技术,经过克隆、传代的肾细胞分化、发育形成肾小球及肾小管^[3]。这种 NT 技术制造出患者所需的组织器官如肾脏,可以解决供体不足以及所导致的排斥反应等难题^[4]。但由于治疗性克隆仍然面临伦理和法律的问题,限制了其推广及使用。

而干细胞在肾脏的研究目前多局限于成体干细胞治疗慢性肾功能衰竭^[5],但其增殖、分化能力和可塑性均不如胚胎干细胞,因此胚胎干细胞如果能诱导分化、发育成为肾脏,克服了技术上的难题及找到了决定发育过程的调节因子,则肾脏再生是完全可能的。

再生医学的挑战是如何有目的地控制干细胞,使其定向分化,最终成为功能性实质。这一发育过程始于单个干细胞的激活,经过一系列中间过程,最终发育成为具备一定分化特征的三维结构的器官实质。为了获得有关发育过程的重要信息,一般使用小鼠作为活的孵化器。类似于在人体中的运用,将各自的干细胞直接注射到小鼠体内,然后等待结果。然而,在此期间,受试动物中发生了哪些分子水平上的事件,实际上不清楚。即干细胞移植入体内后,受试动物或患者处于一种“黑箱状态”。我们所能见到的只是发育的终点,而导致这一后果的中间步骤不了解。

2 决定发育过程的调节因子

运用骨髓干细胞作为体外模型,对造血干细胞的发育过程进行了大量研究。今天,造血干细胞的每一步发育过程都已经基本了解。业已发现,一些形态发生素、生长因子和白细胞介素参与整个发育过程的调节。但是,随着研究的深入,发现对不同组织或不同器官,控制其发育的调节因子完全不同。

这些因子包括:形态发生素,生长因子,激素,细胞间通讯和相互作用,细胞外基质,电解质环境,氧分压,营养因素以及细胞生长的流体静力学和流变学环境。所有这些因素合在一起,方能决定干细胞的定向分化。然而,一旦注入患者体内,由于干细胞发育本身的复杂性,其多重分化潜力所带来的风险以及由于疾病引起的环境损伤,比如缺失的微血管、不足的氧分压以及不良的营养供应,都有可能阻止干细胞的发育。

早期的研究集中在调查肾脏的适应性肥大现象。在怀孕期间,由于母体必须接管胎儿的代谢任务,母体肾脏体积明显增大,分娩后,母体肾脏体积又恢复到原先大小。另一个例子是,一旦外科手术摘除一端肾脏,残留的另一个肾脏会变得肥大,以应付机体增高的代谢活力。一些生长因子如肝细胞生长因子(HGF),胰岛素类生长因子(IGF),上皮生长因子(EGF),转化生长因子(TGF)和转化生长因子(TGF)参与这一过程^[6]。毫无疑问,如何将控制肾脏三维扩展的过程运用到再生医学领域,成为人们感兴趣的焦点。

3 干细胞发育肾小管

在肾脏领域,虽然迄今已经获得了不少肾脏在胚胎时期时空发育的基本信息,但是,有关肾小管的分化和三维生长的细节知识仍然不明了^[7-8]。一般认为,首先,肾干细胞/祖先细胞被激活,它们相互聚集成为细胞团,再经成熟和分化成为具备三维结构的肾小管,生长的肾小管具有器官特异性特征,比如具有一定的长度,直线或弯曲的生长方向,恒定的内外直径以及基膜管腔膜上皮极性等,在发育过程中进一步得到确定^[9-12]。

从目前已有的文献看,利用胚胎肾组织中的干细胞或祖先细胞,成功地在体外直接诱导产生完全的肾单位尚未报道。很多研究组的工作是从小鼠或大鼠胚胎获得肾芽基,但是它们在含血清的培养基中仅能维持数日。产生肾小管的另一种方法是,将来自人尿的肾细胞或 MDCK 细胞系包被在细胞外基质蛋白质(ECM)中培植。但是,组成 ECM 的 Matrigel 来自肿瘤细胞。另外,在大多数培养方法中,在培养基中均加入小牛血清刺激细胞生长,小牛血清有可能被朊病毒(prion)污染。一旦组织接触过源于肿瘤的 ECM 或者有朊病毒污染,则不再适合移植于患者体内。为避免以上风险因子,本研究组的所有工作,均只使用不含血清的化学培养基,也不含被任何

ECM 作为生长支架^[13-14]。

4 建立新颖的体外培养技术

为调查肾小管的发育和功能性成熟,迫切需要建立一套有效的可控制的体外培养系统。首先,我们用常规静态培养条件培植胚胎肾干细胞,虽然测试了大量生长因子,但无一取得成功。随后,我们改用灌注培养器培植干细胞,虽然培植条件得到改善,仍然无法使干细胞分化。最后,我们详细研究了培养器中组织外植体所在的微环境,发现培养基的体积数倍大于所培植的组织外植体的体积,这一过大的“死角体积”阻碍了组织外植体的分化^[15]。令人吃惊的是,对体内血液和组织体积进行比较,却未发现存在着这一不一致的关系。

所建立的新的培养系统,应该最大程度减低死角体积从而模拟体内环境。为解决这一关键性技术难题,我们在灌注培养器中引入“人工脉管”^[16]。所谓人工脉管,是一种具有网孔结构的高分子合成材料,它应该具备充分的可变形性,足够的亲水性表面以及最佳的生物适配性。在寻找适于作为人工脉管的材料方面,不能考虑刚性物质。通过对胶原纤维和羊毛等大量海绵类物质进行筛选,最终发现,聚脂羊毛是适于人工脉管的最佳材料。这种物质常规上用于桌布和汽车工业中的滤过材料,在组织工程领域我们首次将它用作填充材料。

在灌注培养器中,将组织外植体放置到双层聚脂羊毛的人工脉管之间。这样,当培养基进入后,可渗入到聚脂羊毛内部的细小纤维中,模拟天然的毛细血管,保证组织表面均匀的液体交换。引入人工脉管不但最大程度地减小了死角体积,也对正在生

长的组织提供了某种程度的机械保护,从而使分化成为可能。

5 引入气体组件器

在灌注培养系统中,以低的传送速度运输培养液对细胞外植体的生长和分化十分重要。经过测试,我们发现培养液最合适的传送速度是 1 ml/h。但是,当培养液以如此缓慢的速率传送时,在材料的转换处,即在运输培养液的乳胶导管和连接器之间,或者在导管和灌注培养器之间,极易产生气泡。小气泡会融合成大气泡。这些气泡形成气栓,破坏了液体灌注的连续性。尤其是气泡在组织外植体表面产生不均匀的培养液交换,导致液压的改变并引起局部营养短缺,给细胞分化带来致命的危害。

为了减少气泡的形成,我们在灌注培养器之前引入气体交换组件器和气体扩展组件器^[15]。利用气体交换组件器,使细胞呼吸所必须的氧气通过一个长的、气体高通透性薄壁乳胶导管传送,避免用常规的高压含氧气体导入技术,从而最大程度地减少气泡。另外,引入气体扩展组件器,使得气泡受机械挤压而分离出去,保证从气体扩展组件器中流出的、进入灌注培养器中的培养液不含气泡。同时,培养液中的氧气含量没有任何减少^[14]。

另外,在灌注培养器内部,设立分离的顶底部,使细胞呼吸所产生的气体,从培养器上部离开,而不是直接进入培养液。最后,离开灌注培养器的培养液不再循环使用,而是通过乳胶导管被导入废液瓶。从而保证持续新鲜的化学培养液以恒定的速率进入灌注培养器内部,提供细胞分化所必需的营养,并及时移去代谢废物(见图 1)。

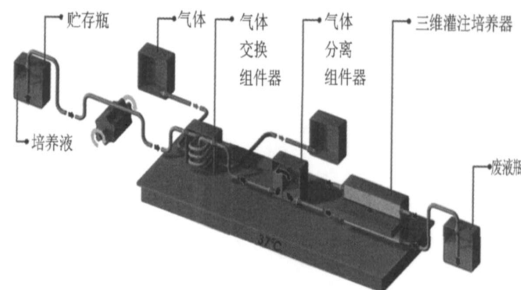


图 1 本研究组创建的新颖的三维细胞培养系统示意图

Fig 1 The schematic illustration of the novel 3D cell culture system developed by our group

6 发现醛固酮诱导分化

利用我们新建的体外培养系统,将肾干细胞置

入灌注培养器中的人工脉管之间,观察其分化情况。初期的研究工作只是部分令人满意,虽然组织外植体能够在培养系统中维持存活状态,但细胞不能显

示典型的分化程度。这意味着,虽然我们已经创建了有利于组织分化的技术条件,但仍然缺乏必要的诱导物刺激分化。于是,我们对大量生长因子和激素进行测试,看其是否能诱导分化。

在随后的实验中,我们发现类固醇激素醛固酮(aldoosterone)展现惊人的诱导分化能力^[17-19]。将 0.1 μM 的醛固酮加入到 IMDM 培养液中,来自新生兔肾皮质部位的胚胎干细胞/祖先细胞经 2 周的灌注培养后,能分化出大量的肾小管。用大豆凝集素(SBA)能够标记这些新生的肾小管。免疫组织化学显示,肾小管在长达 2 到 5 周的培养时间内维持完整结构而不崩解,运用 Na⁺/K⁺-ATPase 和闭合素抗体荧光标记显示:分化出的肾小管具备上皮细胞典型的基膜管腔膜极性并发育出胞间连丝。二维电泳展示了分化后新的蛋白质表达模式。目前,我们正在用 realtime RT-PCR,构建 DNA 文库,电泳迁移率移动法,蛋白质测序,抗体微阵列技术等手段,详细研究醛固酮介导的分化过程。

在内分泌轴系统中,醛固酮可促进肾小管 Na⁺/K⁺-ATPase 而发挥保钠排钾的作用,因此肾小管是醛固酮的下位靶器官。而在内分泌系统均存在着这种激素的调节关系,如垂体 TSH 可促进甲状腺上皮细胞的增殖和生长,ACTH 对肾上腺皮质具有营养作用,而我们发现了醛固酮对肾小管分化的作用,是对内分泌系统这一理论的一个重要补充,值得进一步研究。

7 展望

我们所创建的新的三维体外培养技术,在组织工程领域开辟了如下可能性:

- 仅利用化学培养基使胚胎组织分化;
- 对慢性疾病的组织体进行长期培养,以研究疾病的发展过程;
- 健康或疾病组织体与干细胞共培养;
- 待移植的组织体的条件化;
- 相关药物分子的器官特异性性质筛选;
- 一些化合物胚胎毒性的长期测试;
- 测试新的用于特殊目的的培养液。

参考文献:

[1] Humes HD, Fissell WH, Weitzel WF, et al. Metabolic replacement of kidney function in uremic animals with a bioartificial kidney containing human cells[J]. *Am J Kid Dis*, 2002, 39(5): 1078 - 1087.

[2] Humes HD, Weitzel WF, Bartlett RH, et al. Initial clinical results of the bioartificial kidney containing human cells in ICU patients with acute renal failure[J]. *Kidney Int*, 2004, 66(4): 1578 - 1588.

[3] Lanza RP, Chung HY, Yoo JJ, et al. Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(7): 689 - 696.

[4] Yokoo T, Sakumi R, Ohashi T. Stem cell gene therapy for chronic renal failure[J]. *Curr Gene Ther*, 2003, 3(5): 387 - 394.

[5] Brodie TC, Humes HD. Stem cell approaches for the treatment of renal failure[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(3): 299 - 313.

[6] Williams MJ, Clark P. Microscopic analysis of the cellular events during scatter factor/hepatocyte growth factor - induced epithelial tubulogenesis[J]. *J Anat*, 2003, 203(5): 483 - 503.

[7] Caruana G, Young RJ, Bertram JF. Imaging the embryonic kidney[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2006, 103(2): 62 - 68.

[8] Dressler GR. The cellular basis of kidney development[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 509 - 529.

[9] Han HJ, Sigurdson WJ, Nickerson PA, et al. Both mitogen activated protein kinase and the mammalian target of rapamycin modulate the development of functional renal proximal tubules in matrigel[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117: 1821 - 1833.

[10] Meyer TN, Bush KT, Stuart RO, et al. Spatiotemporal regulation of morphogenetic molecules during in vitro branching of the isolated ureteric bud: toward a model of branching through budding in the developing kidney[J]. *Dev Biol*, 2004, 275(1): 44 - 67.

[11] Lubarsky B, Krasnow MA. Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes[J]. *Cell*, 2003, 112: 19 - 28.

[12] Davies JA. Watching tubules glow and branch[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(4): 364 - 370.

[13] Minuth WW. Neonatal rabbit kidney cortex in culture as tool for the study of collecting duct formation and nephron differentiation[J]. *Differentiation*, 1987, 36(1): 12 - 22.

[14] Hu K, Denk L, de Vries U, et al. Chemically defined medium determines the differential potency of renal stem cells[J]. *Biotechnol J*, 2007, 2(8): 992 - 995.

[15] Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. Tissue factory: conceptual design of a modular system for the in vitro generation of functional tissues[J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(1-2): 285 - 294.

[16] Minuth WW, Denk L, Hu K. The role of polyester interstitium and aldosterone during structural development of renal tubules in serum - free medium[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(30): 4418 - 4428.

[17] Heber S, Denk L, Hu K, et al. Modulating the development of renal tubules growing in serum - free culture medium at an artificial interstitium[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(2): 281 - 292.

[18] Minuth WW, Denk L, Hu K, et al. The tubulogenic effect of aldosterone is attributed to intact binding and intracellular response of the mineralocorticoid receptor[J]. *Central European Journal of Biology*, 2007, 2(3): 307 - 325.

[19] Minuth WW, Hu K, Denk L. Kontrolliertes environment für stammzellen - generierung renaler tubuli in chemisch definiertem kulturmedium[J]. *Bioforum*, 2007, 4: 28 - 29.

(收稿日期: 2008 - 05 - 13)