

大鼠肾组织干细胞的分离培养与鉴定*

杨光¹, 程庆砾^{1△}, 李春霖¹, 贾雅丽², 王静雪², 岳文², 裴雪涛²

1. 解放军总医院 南楼肾脏病科 肾脏疾病国家重点实验室(北京 100853);
2. 军事医学科学院 干细胞与再生医学实验室(北京 100850)

【摘要】 目的 分离培养及稳定扩增大鼠肾组织干细胞(kidney stem cell, KSC), 并鉴定其生物学特征及干细胞特性。方法 从4周龄雄性SD大鼠双肾肾乳头处分离培养KSC, 倒置显微镜下观察细胞形态特征, 通过流式细胞、免疫荧光技术鉴定KSC的表型特征, 通过成骨、成脂诱导分化鉴定其分化能力, 并通过实时定量荧光PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 比较KSC与大鼠肾小管上皮细胞(renal tubular epithelial cell, RTEC)基因表达的差异。结果 KSC呈纺锤形或树枝状生长; 免疫荧光结果显示KSC可表达平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)、波形蛋白(Vimentin)、神经钙粘蛋白(N-Cadherin)、神经巢蛋白(Nestin)、CD133, 不表达钙粘蛋白-E(E-Cadherin)、细胞角蛋白(cytokeratin-18, CK-18)、紧密连接蛋白(zona occludens protein-1, ZO-1); 细胞流式结果显示, CD29、CD90、CD73表达比率分别为99.0%、95.8%和99.9%, CD45阳性率为3.4%; 干细胞标记CD133和Nestin阳性率分别为33.2%和70.2%, 双阳性率为31.4%; 成脂诱导后油红O染色呈红色, 成骨诱导后早期成骨细胞分化标志茜素红染色呈橙红色; qRT-PCR结果显示, 与RTEC相比, 原始胚胎干细胞标记物Nanog、Oct4/pou5f1、Sox2/sry-box-2的mRNA表达量在KSC中增高($P < 0.01$), 间质标记物 α -SMA、Vimentin mRNA表达量在KSC中增高($P < 0.01$), 而成熟的上皮细胞标记物E-Cadherin、CK18 mRNA表达量在KSC中降低($P < 0.01$)。结论 肾乳头部位可以分离培养并稳定扩增出具有间充质干细胞特性的KSC。

【关键词】 肾组织干细胞 分离培养 肾乳头 大鼠

Isolation and Identification of Rat Kidney Stem Cells YANG Guang¹, CHENG Qing-li^{1△}, LI Chun-lin¹, JIA Ya-li², WANG Jing-xue², YUE Wen², PEI Xue-tao². 1. Department of Geriatric Nephrology, PLA General Hospital, State Key Laboratory of Kidney Disease, Beijing 100853, China; 2. Stem Cell and Regenerative Medicine Lab, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
△ Corresponding author, E-mail: qlcheng64@163.com

【Abstract】 **Objective** To isolate and steadily culture kidney stem cells (KSCs) from rat renal papilla, and to identify the biological characteristics of KSCs. **Methods** KSCs were isolated from the tips of renal papilla in 4 weeks-old Sprague-Dawley rats. The morphology of KSCs was observed under inversion microscope, and the phenotype characteristics of KSCs were identified through flow cytometry and immunofluorescence. The abilities of KSCs in adipogenic and osteogenic differentiation were evaluated. The differences of gene expression between KSCs and rat renal tubular epithelial cells (RTECs) were compared using quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** KSCs showed a spindle-shaped and arborization-like growth pattern. Immunofluorescence indicated that KSCs staining with alpha-smooth muscle actin (α -SMA), Vimentin, N-Cadherin, Nestin, CD133 marker, and without E-cadherin, cytokeratin-18 (CK-18), zona occludens protein-1 (ZO-1). The positive staining of CD29, CD90, CD73 were 99.0%, 95.8%, 99.9% respectively, the positive staining of CD45 was 3.4%. The positive stainings of stem cell marker CD133 and Nestin were 33.2% and 70.2% respectively, while the double staining rate was 31.4%. KSCs showed positive staining by oil red O after adipogenic differentiation, and orange calcium deposition by alizarin red staining after osteogenic differentiation. qRT-PCR showed that the expressions of embryonic stem cell marker Nanog, Oct4/pou5f1, Sox2/sry-box-2 in KSCs were higher than those in RTECs ($P < 0.01$), and the expressions of mesenchymal marker α -SMA, Vimentin were also higher in KSCs ($P < 0.01$). Compared with RTECs, the expressions of mature epithelium marker E-Cadherin, CK18 in KSCs were lower ($P < 0.01$). **Conclusion** KSCs were isolated successfully and steadily cultured from the rat renal papilla, which were identified with featured biological characteristics.

【Key words】 Kidney stem cells Isolation Renal papilla Rat

* 国家自然科学基金(No. 81170312、No. 30772296)、北京市自然科学基金(No. 7122163)和解放军总医院扶持基金(No. 2012FC-CXYY-4005)资助

△ 通讯作者, E-mail: qlcheng64@163.com

干细胞广泛存在于人体各个组织脏器中, 如大脑、肠道、肝脏、皮肤等均发现有干细胞存在^[1-4], 这些干细胞被称为组织特异性干细胞, 肾脏中也同样存在这一类干细胞, 2004年 Oliver等^[5]首次提出肾

组织干细胞(kidney stem cell, KSC)存在于肾乳头的干细胞壁龛中,并证实了存在于此处的 KSC 参与了缺血损伤的肾小管上皮细胞的修复,然而由于该处细胞难于分离培养,因此关于 KSC 相关生物学特性的报道较少。为了进一步探讨 KSC 相关生物学特征,本研究在我科老年肾脏实验室既往研究^[6,7]基础上成功地从大鼠肾乳头处分离并稳定培养出 KSC,同时对其干细胞特性进行了进一步鉴定。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞来源

4 周龄清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,由中国医学科学院协和医科大学实验动物研究所提供,动物许可证号:SCXK(京)20090007。大鼠肾小管上皮细胞(renal tubular epithelial cell, RTEC) NRK-52E 购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂及抗体

间充质干细胞(mesenchyma stem cells, MSCs)原代培养基(北京金泽小星生物科技有限公司,基础成分 α -MEM,血清含量 6%),DMEM/F12 培养基、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Gibco 公司),胶原酶 I(美国 Sigma 公司)。成骨、成脂诱导分化培养基(赛业生物科技有限公司)。免疫荧光检测抗体:小鼠抗钙粘蛋白-E(E-Cadherin)多抗、兔抗紧密连接蛋白(zona occludens protein-1, ZO-1)多抗、兔抗纤维连接蛋白(Fibronectin)多抗(santa cruz),小鼠抗大鼠神经巢蛋白(Nestin)抗体、小鼠抗神经钙粘蛋白(N-Cadherin)多抗、4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、山羊血清(美国 BD 公司),小鼠抗肌动蛋白(alpha-actin)多抗(美国 Sigma 公司),兔抗波形蛋白(Vimentin)多抗(Cell Signaling Technology),小鼠抗细胞角蛋白(cytokeratin-18, CK-18)多抗(英国 Abcam 公司),二抗购自中杉金桥公司。细胞流式检测抗体:小鼠抗大鼠 CD90-PE 抗体、小鼠抗大鼠 Nestin 抗体、小鼠抗大鼠 CD73 抗体(美国 BD 公司),小鼠抗大鼠 CD29-APC 及小鼠抗大鼠 CD45-PERCP 抗体(美国 Biologend 公司),兔抗 CD133 多抗(北京博奥森公司),山羊抗小鼠 647、山羊抗兔 488(美国 Invitrogen Alexa 公司)。实时定量荧光 PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂 cDNA 反转录试剂盒、qPCR 扩增试剂盒(日本 TOYOBO)。

1.3 主要仪器

UV5600 型 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus), IX70 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus),解剖显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司),流式细胞分选仪(美国 BD FACS Calibur), IQ5 实时定量荧光 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 KSC 分离培养与传代 4 周雄性 SD 大鼠取双肾,剥离肾被膜,置于解剖显微镜下,沿冠状面纵行切开肾脏,提起输尿管可见花瓣状乳突结构,持显微剪将乳突前尖部完整剪下置入 EP 管中, PBS 清洗、剪碎后加入胶原酶 I 充分消化,离心,弃上清,接种于 25 cm 培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱内,72 h 后于显微镜下观察细胞的贴壁生长情况并换液,之后每隔 2~3 d 换液,当细胞生长至 70%~80% 融合时以 1:2 的比例进行细胞传代,传代标记第 1、2、3、4、5 代(P1、P2、P3、P4、P5)。

1.4.2 RTEC 的培养和传代 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,按 1:5 比例传代。

1.4.3 细胞的免疫荧光检测 取 P3 代细胞接种于 24 孔板中,并生长至 70%~80% 融合,经 4% (体积分数) 多聚甲醛室温固定、0.1% Triton-X-100 破膜、10% 山羊血清封闭 30 min 后,加入一抗 4 °C 过夜,再依次加入二抗、DAPI,置于共聚焦荧光显微镜下观察拍照。

1.4.4 细胞流式检测 KSC 表型标志物 P4 代 KSC 重悬于 100 μ L PBS 中,加入一抗 2 μ L,4 °C 摇床反应 30 min,加入相应二抗 1 μ L(直接标记抗体直接加入抗体 5 μ L),4 °C 摇床,避光 30 min, PBS 清洗 3 次经 100 目筛网过滤后上机检测。

1.4.5 KSC 的成脂、成骨诱导分化 ①成脂诱导分化与鉴定:P3 代 KSC 以 1×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中,按说明书步骤 A 液 3 d、B 液 1 d 的顺序交替 3 个循环,后用 B 液培养 7 d,然后进行油红 O 染色。②成骨诱导分化与鉴定:P3 代 KSC 以 5×10^3 /孔的密度接种于 24 孔板中,细胞贴壁后加入成骨诱导培养基,每 3 d 换液,2 周后茜素红染色观察早期成骨,染色步骤按照说明书进行操作。

1.4.6 qRT-PCR 方法检测细胞基因表达差异 取 P3 代 KSC 及 NRK-52E 细胞,用 Trizol 法提取总 RNA,按照 cDNA 反转录试剂盒说明将 RNA 反转录成 cDNA,然后进行 PCR 反应:引物序列和产物片段见附表,每个标本设 3 个重复管。反应条件:95 °C 预变性 2 min \rightarrow (95 °C 15 s \rightarrow 58 °C 20 s \rightarrow 72 °C 30 s \rightarrow 80 °C 10 s) \times 45 循环 \rightarrow 95 °C 终末延伸

10 s,软件分析基因相对表达量。目的基因的表达采用相对定量法,即以 *GAPDH* 作为内参,计算 ΔCt ,再以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因 mRNA 的相对表

附表 qRT-PCR 引物及反应条件

Table Primer and reaction conditions of qRT-PCR

Gene	Primer sequences (5'-3')	Length
<i>GAPDH</i>	F: AGACAGCCGCATCTTCTTGT	238 bp
	R: TTCCATTCTCAGCCTTGAC	
Nanog	F: GAAGACTAGCAACGGCCTGACT	104 bp
	R: GGTTTCCAGACGCGTTCATC	
<i>Oct4/pou5f1</i>	F: GGCTGGACACCTGGCTTCAGA	141 bp
	R: TGGTCCGATTCCAGGCCCA	
<i>Sox2/sry-box-2</i>	F: CACCATGGCGACCGGGCAACCAG	297 bp
	R: TCAAAGCGTGTACTTATCCTTCTTC	
Vimentin	F: ATGCTTCTCTGGCAGCTTGGACCT	339 bp
	R: ACTGCACCTGTCTCCGGTATTCGTT	
α SMA	F: CTTCTATAACGAGCTTCGC	137 bp
	R: TCCAGAGTCCAGCACAAAT	
E-Cadherin	F: AAAGCAGGAAGAAAACACCCTC	172 bp
	R: AAAGGGCAGCTATCAACATTAG	
CK-18	F: TTGAAACCCGAGATGGGAAA	62 bp
	R: GGCCATTCACCTGGACATGAT	

达量。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KSC 的形态学观察

大鼠肾乳头组织经剪碎、胶原酶 I 消化接种于 MSCs 培养基 24 h 后,细胞及残余小组织块基本贴壁,48 h 后可见细胞呈集落状生长。细胞形态具有多样性,主要有两种细胞,上皮样细胞和成纤维样细胞,4~5 d 可生长至 80% 融合,进行传代,此后以 1:2 的比例传代,约 5~7 d 可传 1 代,传至 P3 代细胞呈短梭形或树枝状,上皮样细胞基本消失,密集处可见成纤维状、旋涡状生长,核较大,部分细胞可见多个核仁(图 1)。

2.2 KSC 的表型特征

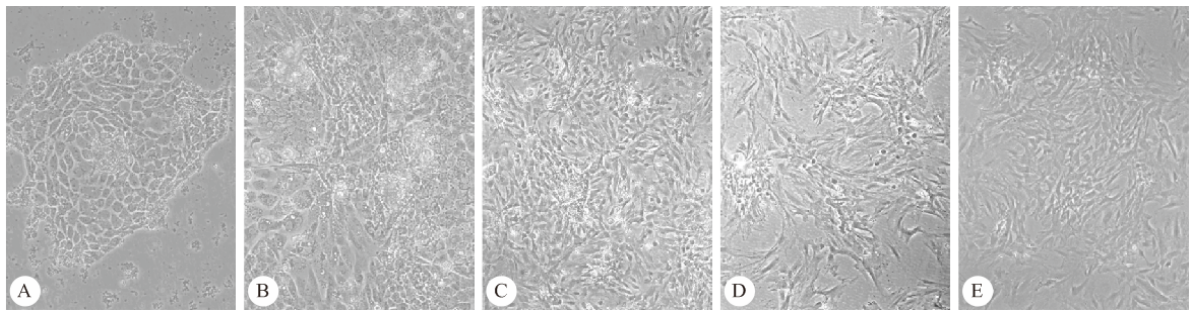


图 1 大鼠肾组织干细胞形态

Fig 1 The cell morphology of KSC from rat

A, B: The 3 d and the 5 d of primitive culture. $\times 100$; C: The 5 d of first-generation cell P1. $\times 40$; D: The 5 d of third-generation cell (P3). $\times 40$; E: The 4 d of fifth-generation cell (P5). $\times 40$

2.2.1 免疫荧光检测细胞表面标记 结果显示, KSC 表达激活的成纤维细胞标记 α -SMA、Vimentin, 表达间质细胞标记 N-Cadherin, 表达干细胞标记 Nestin 和 CD133, 不表达上皮细胞标记 E-Cadherin、CK-18 和 ZO-1, 不表达纤维连接蛋白(图 2)。

2.2.2 流式细胞仪检测细胞表面标记 P4 代 KSC 经流式细胞仪检测细胞表面标志, 结果发现间质干细胞标记 CD29、CD90、CD73 阳性表达, 阳性比率分别为 99.0%、95.8% 和 99.9%; 而造血细胞标记 CD45 阴性表达, 阳性率为 3.4%; 干细胞标记 CD133 和 Nestin, 阳性率分别为 33.2% 和 70.2%, 而两种标记的双阳性率为 31.4%(图 3)。

2.3 KSC 分化能力的鉴定

2.3.1 KSC 的成脂分化 P3 代 KSC 经成脂诱导

体系培养后, 细胞由长梭形逐渐收缩变短, 呈三角形或多边形, 连续诱导 7 d 胞浆内可见小脂滴形成, 随着诱导时间延长, 2 周时脂滴部分融合, 胞浆内充满大小不一的脂滴, 油红 O 染色呈红色(图 4A)。

2.3.2 KSC 的成骨分化 P3 代 KSC 经成骨诱导体系培养后, 1 周左右细胞形态开始发生改变, 呈多角形, 形态不规则, 胞浆内可见较多黑色细小颗粒, 2~3 周左右, 早期成骨细胞分化标志茜素红染色呈橙红色(图 4B)。

2.4 比较 KSC 与 RTEC 基因表达差异

取 P3 代 KSC 及 NRK-52E 细胞, 提取细胞 RNA, 进行 qRT-PCR 检测, 结果显示原始胚胎干细胞标记物 Nanog、*Oct4/pou5f1*、*Sox2/sry-box-2* 在 KSC 的表达量高于 NRK-52E ($P < 0.01$), 间质标记物 α -SMA、Vimentin 在 KSC 的表达高于 NRK-52E

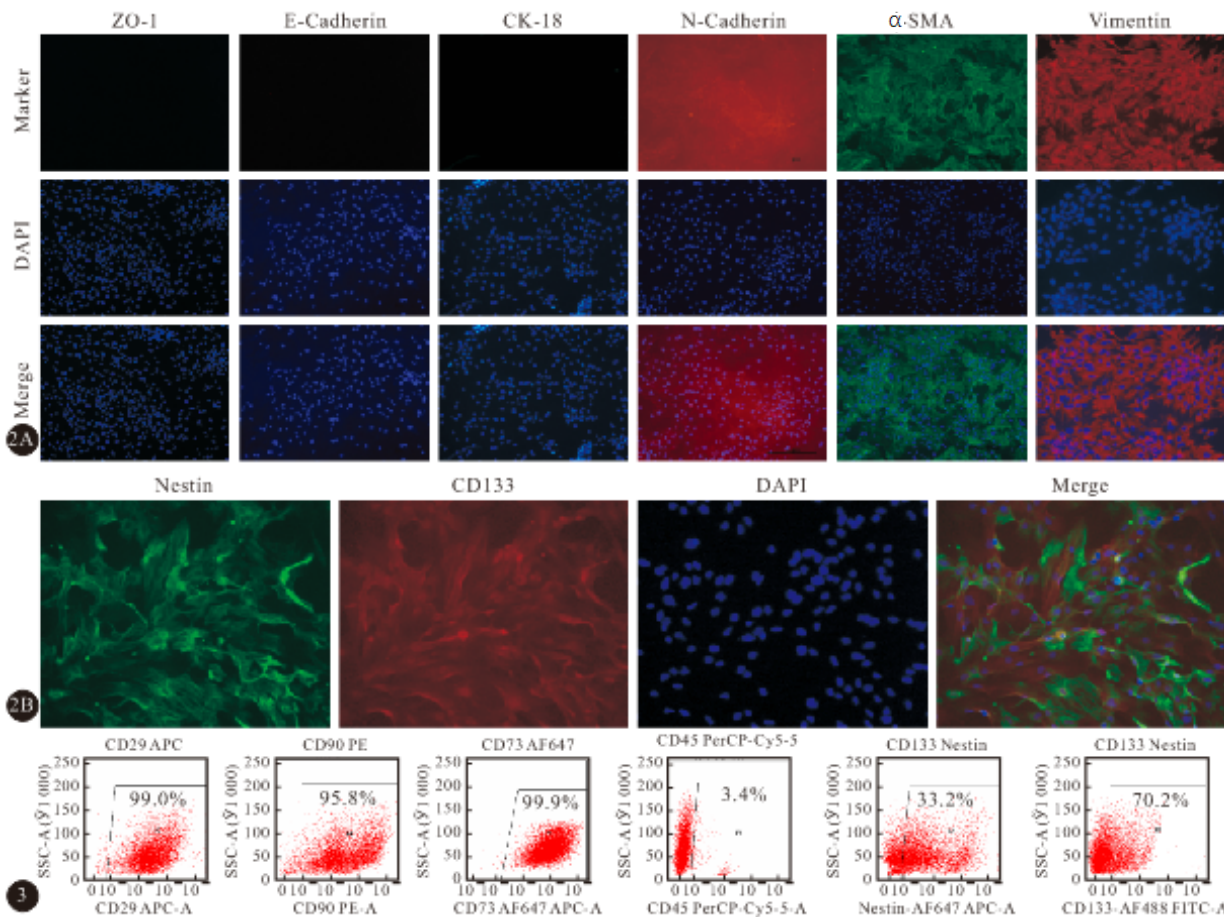


图 2 免疫荧光检测细胞表面标记

图 3 流式细胞仪检测细胞表面标记

Fig 2 Detection of cell surface markers by immunofluorescence

Fig 3 Detection of cell surface markers by flow cytometry

2A: ×100; 2B: ×200

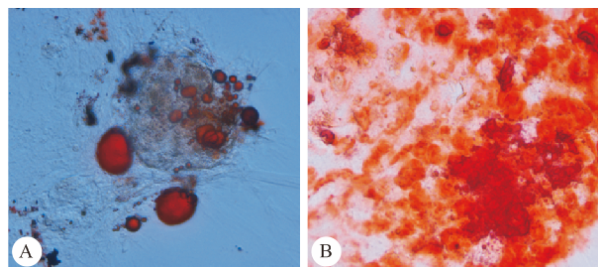


图 4 KSC 成骨、成脂诱导分化。×200

Fig 4 Osteogenesis and adipogenic differentiation of KSC. ×200

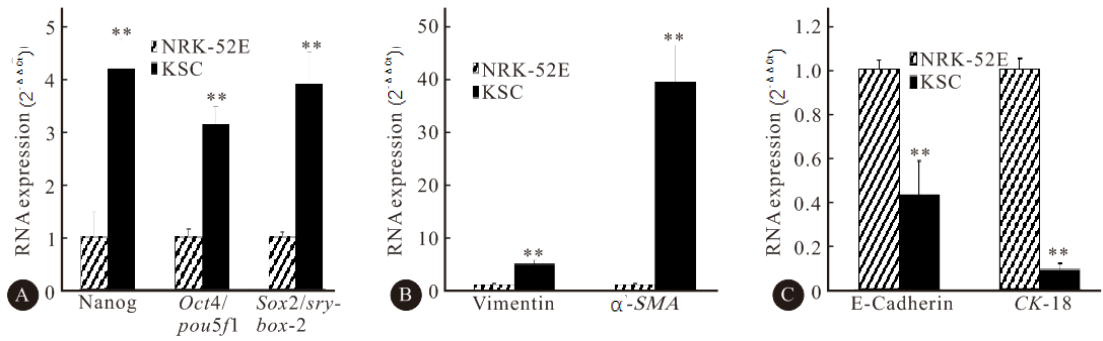
A: Adipogenic differentiation, red oil O staining, alizarin red staining; B: Osteogenesis differentiation, alizarin red staining

($P < 0.01$), 而成熟的上皮细胞标记物 E-Cadherin、CK-18 的表达量 KSC 低于 NRK-52E ($P < 0.01$), 见图 5。

3 讨论

干细胞及其相关的生物治疗是近年来研究的热点, 其中研究较多的是 MSCs。MSCs 来源非常广泛, 除来源于骨髓外, MSCs 还可存在于脂肪组织、

脐带、脐血、肝脏、大脑等组织器官中^[8]。2006 年国际细胞治疗协会间充质和组织干细胞委员会制定了 MSCs 的评估标准^[9]: ①在标准培养条件下, 细胞可在培养瓶中贴壁生长; ②通过细胞流式检测, CD105、CD73 和 CD90 阳性率 $\geq 95\%$, 而造血干细胞标记 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79 或 CD19、HLA-DR 阳性率 $\leq 2\%$; ③具有成骨(通过茜素红或 von Kossa 染色鉴定)、成脂(通过油红 O 染色鉴定)、成软骨(通过阿辛蓝染色鉴定)多向分化的潜能。按照上述标准我们分离的 KSC 也具有 MSCs 的一些主要特征, 首先 KSC 在 MSCs 培养基中具有稳定贴壁生长的特征, 其次 CD90、CD73 阳性率分别为 95.8% 和 99.9%, 而 CD45 阳性率为 3.4%, 再次 KSC 具有成骨、成脂分化的特征。由于我们分离的是大鼠的 KSC, 相关的流式检测抗体较少, 因此 CD105 及其他一些造血干细胞相关标记没有进行检测, 但由于 KSC 是从肾乳头处分离培养, 分离前应用生理盐水对肾脏进行冲洗灌注, 因此混

图 5 KSC 与 NRK-52E 基因表达差异 ($n=6$)Fig 5 The differences of gene expression between KSC and NRK-52E ($n=6$)

A: The embryonic stem cell marker; B: The mesenchymal marker; C: The mature epithelium marker. * * $P < 0.01$, vs. NRK-52E

杂造血干细胞可能性小,多能分化鉴定中我们已成功进行了成骨、成脂两种最主要的分化鉴定,成软骨分化我们将在今后的实验中进行补充。综上所述我们分离的 KSC 具备 MSCs 的一些基本特性。

近年来关于肾脏干细胞存在的部位,研究者提出并验证了很多种假设,如 Ronconi 等^[10]发现, Bowman's 囊的壁层上皮细胞是足细胞的始祖细胞,该处细胞可能会沿着血管壁移行至肾小球毛细血管处形成足细胞;还有研究者从近段肾小管处分离出了肾组织干细胞,这类细胞具有多向分化潜能,并且可以分化为成熟的小管上皮细胞^[11-13]。而肾乳头处存在肾组织干细胞是 2004 年 Oliver 等^[5]首次提出的,该研究者在初生大鼠体内输注 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记,数月后发现 BrdU 在肾乳头处浓聚,说明该处细胞具有低细胞周期这样一种干细胞特性,随后作者用缺血损伤模型证实了标记的细胞分化并移出了肾乳头,参与了肾小管损伤的修复,进一步证实了其干细胞特性。肾乳头主要由集合管、髓袢、血管及间质细胞构成^[14],究竟哪一种细胞是肾乳头处干细胞的来源,从肾乳头处分离出来的干细胞又有哪些特性,由于培养条件及分离方法不同,目前几项研究结果有所差异,Oliver 等^[5]初期研究中分离的 KSC 部分细胞可以同时表达上皮标志 ZO-1 和间质标志 α -SMA,部分细胞还可以表达神经干细胞标志 Nestin,在随后的研究中作者进一步证实了 KSC 主要存在于肾乳头的集合管和间质细胞内,并以细胞间质为主,这一类细胞 CD133、Nestin、Pax-2 表达阳性^[15]。而 Ward 等^[16]从人肾乳头中分离出的 KSC 主要存在于两个部位,即肾乳头间质细胞内和插入在髓袢上皮细胞间。从我们原代培养的过程来看,P0 代细胞混杂有上皮细胞和血管内皮细胞,由于血管内皮细胞对培养基条件要求较高,且贴壁较牢固,胰酶消化 10 min 左右才可以

消化下来,因此随着传代,内皮细胞基本不能存活。上皮细胞在培养中也随着传代而大批量的死亡,最后存活的细胞形态以纺锤形、树枝状为主,与上述文献报道类似,同时我们也进行了相关标记物检测,免疫荧光结果显示 E-Cadherin、CK-18 和 ZO-1 表达均阴性,而激活的成纤维细胞及间质细胞标记 α -SMA、Vimentin、N-Cadherin 表达均为阳性,我们还通过 qRT-PCR 将 KSC 与 NRK-52E 的基因进行比较,结果显示间质标记物 α -SMA、Vimentin 在 KSC 中的基因表达高于 NRK-52E($P < 0.01$),而成熟的上皮细胞标记物 E-Cadherin、CK-18 的表达量 KSC 低于 NRK-52E($P < 0.01$),这与文献报道的骨髓 MSCs 具有一致的表型^[17],与其他研究者报道的肾乳头处 KSC 相比,我们分离培养的 KSC 具有间质细胞特性,不具有上皮细胞特性。

Nanog、Oct4/pou5f1、Sox2/sry-box-2 主要表达于胚胎干细胞、成体干细胞,而在分化的细胞中不表达,是被用来证明干细胞多能性的主要标记物^[18-19]。如 Gupta 等^[20]从肾脏中分离出的干细胞可以表达 Oct4 以及 Pax-2,可直接分化成肾小管上皮细胞,同时具有向三胚层分化的特性(可以分化为内皮细胞、神经元细胞、肝细胞),因此研究者认为肾脏中 Oct4 表达阳性的这一类细胞即为肾组织干细胞。CD133 和 Nestin 也是重要的干细胞标记,如 Bussolati 等^[21]观察到肾脏中 CD133 阳性的这一类细胞可以在体内外分化为上皮细胞和内皮细胞,并可以形成小管和脉管结构。Ward 等^[16]从人肾乳头中分离出了 KSC,这类细胞 E-Catenin、Nestin、CD133 表达阳性,与皮质上皮细胞相比,胚胎干细胞标记 Nanog、Oct4/pou5f1、Sox2/sry-box-2 在 KSC 高表达,并且经 CD133 筛选纯化后上述标记物表达更强。这与我们的研究结果相似,如我们研究结果显示 KSC 可以表达 Nestin、CD133,且胚胎

干细胞标记 *Nanog*、*Oct4/pou5f1*、*Sox2/sry-box-2* 的基因表达水平高于 NRK-52E ($P < 0.01$)。Adams 等^[22]通过不同时间点注射 BrdU 的方法观察到,肾乳头早在小鼠胚胎第 11.25 d 到出生后 7 d 内即已发育成熟,出生 7 d 后此处不再生长而保留其原始细胞的特性,因此肾乳头处具有强大的再生能力,这也进一步解释了我们的研究中从肾乳头处分离的 KSC 胚胎干细胞标志高表达的原因。

在我们团队之前的研究中^[6,7],对大鼠 KSC 的分离培养做了初步的探索,本研究在此基础上进行了方法学的改良,如更换了细胞培养基为 MSCs 原代培养基,取材手法也进一步改良,从而使细胞生长更为稳定,细胞得到了进一步纯化,此外本研究还从多方面对干细胞生物学特性进行了鉴定,研究结果更有说服力。肾乳头处的 KSC 在体外培养难度较大,国外研究者也没有建立成熟稳定的细胞培养方法^[5,15,16],我们的研究团队经过不断探索目前该细胞基本上可以稳定生长,为以后的研究奠定了一定的基础。

综上所述,我们成功的从肾乳头处分离并稳定培养出一类具有 MSCs 特征的肾组织特异性干细胞,为进一步研究肾脏的再生与修复作用奠定了基础。

参 考 文 献

- Hu MS, Rennert RC, McArdle A, *et al.* The role of stem cells during scarless skin wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2014;3(4):304-314.
- Huebert RC, Rakela J. Cellular therapy for liver disease. *Mayo Clin Proc*, 2014;89(3):414-424.
- Appaix F, Nissou MF, Vander SB, *et al.* Brain mesenchymal stem cells: the other stem cells of the brain? *World J Stem Cells*, 2014;6(2):134-143.
- Kim EH, Heo CY. Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. *World J Stem Cells*, 2014;6(1):65-68.
- Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, *et al.* The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest*, 2004;114(6):795-804.
- 温 静,程庆砾,马 强等. 肾组织干细胞对人肾小管上皮细胞损伤修复的作用. *北京大学学报(医学版)*, 2013;45(4):619-624.
- 温 静,程庆砾,马 强等. 大鼠肾乳头组织干细胞的分离与鉴定. *中国组织工程研究*, 2012;16(6):3502-3506.
- Vladislav V, Nebojsa A, Miodrag L, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 2011;29(1):5-

- 10.
- 9 Dominici M, Blanc KL, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006;8(4):315-317.
- 10 Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, *et al.* Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol*, 2009;20:322-332. doi:10.1681/ASN.2008070709.
- 11 Li Y, Wingert RA. Regenerative medicine for the kidney: stem cell prospects & challenges. *Clin Transl Med*, 2013;2(1):11. doi:10.1186/2001-1326-2-11.
- 12 Fujigaki Y. Different modes of renal proximal tubule regeneration in health and disease. *World J Nephrol*, 2012;1(4):92-99.
- 13 Jian KG, Lloyd GC. Cellular maintenance and repair of the kidney. *Ann Rev Physiol*, 2010;72(3):357-376.
- 14 Adams DC, Oxburgh L. The long-term label retaining population of the renal papilla arises through divergent regional growth of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009;297(6):F809-F815.
- 15 Oliver JA, Klinakis A, Faisal H, *et al.* Proliferation and migration of label-retaining cells of the kidney papilla. *J Am Soc Nephrol*, 2009;20(11):2315-2327.
- 16 Ward HH, Romero E, Welford A, *et al.* Adult human CD 133/1 + kidney cells isolated from papilla integrate into developing kidney tubules. *Biochim Biophys Acta*, 2011;1812(10):1344-1357.
- 17 Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, *et al.* The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2014;2. doi: 10.1002/stem.1681.
- 18 Karaöz E, Okcu A, Gacar G, *et al.* A comprehensive characterization study of human bone marrow mscs with an emphasis on molecular and ultrastructural properties. *J Cell Physiol*, 2011;226(5):1367-1382.
- 19 Amini S, Fathi F, Mobalegi J, *et al.* The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tel1, Tbx3, Dpp4 and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anat Cell Biol*, 2014;47(1):1-11.
- 20 Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, *et al.* Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol*, 2006;17(11):3028-3040.
- 21 Benedetta B, Stefania B, Cristina G, *et al.* Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol*, 2005;166(2):545-555.
- 22 Adams DC, Oxburgh L. The long-term label retaining population of the renal papilla arises through divergent regional growth of the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009;297(3):F809-F815.

(2015-03-17 收稿, 2015-07-03 修回)

编辑 沈 进