

# 间充质干细胞上 TNF- $\alpha$ 受体在 脓毒症急性肾损伤中的作用

张蓉蓉, 张淑媛, 张欣洲

(暨南大学 附属第二医院 深圳市人民医院 肾内科, 广东 深圳 518020)

**[摘要]** 脓毒症急性肾损伤的发病率逐年上升,死亡率也逐年提高,寻求一种有效的治疗方法是目前的当务之急. 间充质干细胞是一种多能干细胞,前期已有大量的实验证明,间充质干细胞用于治疗脓毒症急性肾损伤是有效的,并且也有相关证据表明 TNF- $\alpha$  刺激后,可以加强间充质干细胞的这一作用. 众所周知, TNF- $\alpha$  主要是与其相关受体结合以后方可发挥作用, MSC 上同时存在 TNFR1 和 TNFR2 这两种受体,究竟是何种受体在治疗脓毒症急性肾损伤中发挥作用,就此作一综述.

**[关键词]** 间充质干细胞; TNF- $\alpha$  受体; 脓毒症急性肾损伤; 内毒素脂多糖

**[中图分类号]** TP391.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2016)05-0363-05

doi:10.11778/j.jdx.2016.05.001

## The therapeutic effect of tumor necrosis factor alpha receptors on mesenchymal stem cells in acute kidney injury induced by endotoxin

ZHANG Rongrong, ZHANG Shuyuan, ZHANG Xinzhou

(Department of Nephrology, Shenzhen People's Hospital, the Second Affiliated Hospital, Jinan University, Shenzhen 518020, China)

**[Abstract]** The incidence and mortality of sepsis induced acute kidney injury increased year by year, so seek an effective therapeutic method is the top priority currently. A large number of previous experiments have shown that multipotent mesenchymal stem cells had an protective effect on the treatment of sepsis induced acute kidney injury and TNF alpha can strength this protective effect. Proverbially, the TNF alpha can play a role in the acute renal failure mainly after associated with its receptors, and there are two kinds of receptors on mesenchymal stem cells such as tumor necrosis factor alpha receptor 1 and tumor necrosis factor alpha receptor 2. This article will give a summarization about which receptor plays a key role in the treatment of acute kidney injury induced by endotoxin.

**[Key words]** mesenchymal stem cells; tumor necrosis factor alpha receptors; sepsis induced acute kidney injury; lipopolysaccharide

**[收稿日期]** 2016-06-28

**[基金项目]** 深圳市科创委基础研究项目(JCYJ20160422151707152)

**[作者简介]** 张蓉蓉(1991-),女,研究方向:间充质干细胞对脓毒症肾损伤治疗;

通信作者:张欣洲,男,教授,博士研究生导师, Mobile:13622379939, E-mail:xin.zhou@medmail.com.cn

## 1 脓毒症急性肾损伤

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是一种涉及多学科的临床常见的急危重病症,该病突发性高,病程进展快,死亡率高,且发病率逐年上升<sup>[1]</sup>. 在所有的急性肾损伤患者中由内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)所导致的脓毒症是临床诱发 AKI 最重要的原因之一<sup>[2]</sup>. 相关数据显示,虽然近几年在脓毒症急性肾损伤的治疗方面有所进展,但其病死率仍高达 70%,居高不下<sup>[3]</sup>;国内研究也表明,住院患者尤其是 ICU 患者并发急性肾损伤的病死率可高达 60.6%<sup>[4]</sup>. 目前,AKI 的治疗措施相当局限,主要包括一般支持治疗和肾替代治疗. 所以尽快做出早期诊断和干预对于急性肾损伤肾功能的保护具有重要作用<sup>[5]</sup>. 这就对我们探讨急性肾损伤的具体发病机制提出了挑战. 前期研究表明,大量 LPS 进入体内可通过过度激活免疫细胞,使其释放大量的炎性介质如 IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等,从而导致全身炎症反应与代偿性抗炎反应严重失衡,机体处于失去清除病原体能力的病理状态. 细胞因子作为细胞免疫和炎症反应的信号传递物质,在脓毒血症诱发的急性肾损伤的发病过程中起重要作用<sup>[6]</sup>. 在这一过程所有的细胞因子中又以 TNF- $\alpha$  作用居首位,它在炎症反应中,不但产生最快、达到高峰时间最早,而且能刺激其他几种促炎因子如 IL-1、IL-6、IL-8 等的产生和释放,是促进全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)形成的重要因素,这一反应主要发生在器官炎症损伤的早期<sup>[7]</sup>. Toll 样受体 4(Toll-like receptor4, TLR4)是人类发现的第一个 Toll 样相关蛋白,是内毒素跨膜信号转导的关键受体,可广泛表达于免疫相关细胞、上皮细胞和各种上皮细胞,在炎症反应过程中其功能主要是识别革兰氏阴性细菌表面的 LPS,是革兰阴性细菌感染、内毒素血症及由此引起的中毒性休克、SIRS 和脓毒症的主要识别受体<sup>[8]</sup>. LPS 识别细胞表面的 TLR4 后诱导 NF- $\kappa$ B 激酶的活化,使与 NF- $\kappa$ B 结合的 I $\kappa$ B 降解磷酸化, NF- $\kappa$ B 从而游离进入细胞核中,进而参与一系列炎症因子基因的表达调控,同样在炎症反应中起着非常关键的作用<sup>[9]</sup>. 脓毒症急性肾损伤已经成为脓毒症的独立死亡因素,并且病程进展快、死亡率高、治疗的难度及费用大,因此寻找一种经济有效的治疗方法迫在眉睫.

## 2 间充质干细胞治疗肾脏病研究概况

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)来

源于发育早期的中胚层,是一种具有多向分化潜能的成体干细胞,主要来源于骨髓,还可以来源于成人的组织如胎盘、脐带、脂肪以及肾脏等. 越来越多的研究表明,骨髓来源的干细胞可转分化为肾小球系膜细胞、足细胞和肾小管上皮细胞,因而骨髓移植可用于损伤肾的修复<sup>[10]</sup>. 有研究发现,间充质干细胞不表达人类主要组织相容性抗原 MHC-II 类分子和 CD86、CD80、CD40 和 CD40L 等免疫共刺激分子,而低表达 MHC-I 类分子<sup>[11]</sup>,故成为免疫豁免细胞,不刺激同种异体免疫反应,所以在细胞替代治疗、组织工程、再生医学等应用领域的研究显示出极大的价值和前景. 目前对于间充质干细胞治疗肾损伤主要存在两种不同的观点:一种认为 MSCs 具有归巢分化的特点,可以归巢至受损组织分化为肾小管上皮细胞替代受损或坏死组织细胞,从而修复受损的肾组织结构,从而肾功能得以恢复. Yu 等<sup>[12]</sup>研究发现,基质细胞衍生因子 1/趋化因子受体 CXCR4 轴在 MSC 归巢机制中发挥重要作用,在组织损伤的情况下, CXCR4 在骨髓间充质干细胞表面和细胞内的表达量均增加. 另一方面大量研究证实,间充质干细胞还可以通过旁分泌机制,合成和分泌营养因子、细胞因子促进血管化和免疫抑制效应,以及间充质干细胞与免疫细胞间的相互作用,介导调节免疫反应平衡,最终促使局部炎症反应下调,减轻组织炎症损伤<sup>[13]</sup>. 无论在体内还是体外都可以发挥强大的抗炎和免疫抑制作用<sup>[14]</sup>. 有研究发现,在顺铂诱导 SD 大鼠急性肾损伤的模型中,尾静脉注射 BM-MSC 可通过分泌一些细胞因子从而影响抑制细胞凋亡、促进细胞增殖的主要蛋白的表达或激活,而部分局限肾脏损伤,有力地支持 MSC 通过局部的旁分泌机制发挥肾脏保护作用<sup>[15]</sup>. 体外,通过 BMSC 与顺铂损伤的近端肾小管上皮细胞一起共培养, BM-MSC 表现出了促有丝分裂和抗凋亡的作用,这也表明了可溶性因子在 MSC 肾脏保护中发挥作用<sup>[16]</sup>. Manning 等<sup>[17]</sup>表明间充质干细胞不仅可以改善急性移植抗宿主疾病,还可通过调节肾损伤后的早期免疫反应而减缓肾纤维化的进程,因此在治疗类风湿性关节炎、硬皮病等多种免疫性疾病中发挥着巨大的潜能作用<sup>[18]</sup>. 许多肾脏疾病都牵涉到缺血、炎症及免疫损伤等方面, MSCs 可以从炎症和免疫学上发挥治疗效果,这比药物从单一途径治疗具有明显的优势. 但是 MSCs 如何发挥免疫抑制作用的机制并未完全阐明.

### 3 TNF- $\alpha$ 与间充质干细胞

近年来,许多学者相继在动物实验上发现 MSCs 能够参与肾脏损伤的免疫调节、抑制炎症和组织修复等功能. BERNARDO 等<sup>[19]</sup>提出 MSCs 不仅是炎症的感应器而且可能还是炎症反应的调节器,在非炎症环境中 MSCs 可通过增强 T 细胞的免疫应答,进而分泌一些趋化因子将淋巴细胞募集到炎症部位,从而发挥促炎作用. 但在较强炎症状态下,较高浓度的 TNF- $\alpha$  可能会刺激 MSCs 分泌一些细胞因子如 IL-10、PGE2、NO、TGF- $\beta$  等抑制 T 细胞增殖,从而发挥抗炎作用. Hegyi 等<sup>[20]</sup>研究结果还显示:单独使用 TNF- $\alpha$  刺激诱导 MSCs 可使其分泌 PGE2 并具有剂量依赖性的特点. 同时有研究显示:小鼠 BMSCs 可通过体外诱导修饰增强其免疫抑制作用,为干细胞移植治疗炎症性疾患展示出广阔的应用前景<sup>[1]</sup>.

TNF- $\alpha$  是一种促炎细胞因子,它可以促进 BMSCs 的细胞增殖,同时促进多种免疫抑制因子的表达,从而增强 BMSCs 的免疫抑制作用<sup>[21]</sup>. 而且 TNF- $\alpha$  处理后的 MSCs 抑制混合淋巴细胞反应能力显著增强,尤其当细胞密度较低时更为显著. 人们普遍认为, MSCs 作用的主要机制在于其旁分泌功能,而 TNF- $\alpha$  可刺激 MSCs 增加细胞因子的释放<sup>[22]</sup>. 但同时 MSCs 向肾脏的归巢作用在脓毒症肾损伤的治疗中也占有重要地位, Teo 等<sup>[23]</sup>通过高分辨率的动态显微镜观察到在 TNF- $\alpha$  的刺激下,人骨髓 MSC 通过 VCAM-1 和 G 蛋白受体信号通路的方式而优先黏附和跨膜到内皮细胞. TNF- $\alpha$  首先和 MSC 膜上的 TNF 受体 II 结合,然后通过增加 ERK 信号通路蛋白的磷酸化来激活其活性,从而增强 MSC 膜上的 VCAM-1 的表达,进而促进 MSC 的归巢作用参与相应肾损伤的治疗<sup>[24]</sup>. I 型 TNFR(又称 TNFR1),可表达于所有类型的细胞上,在溶细胞活性上起主要作用;反之, II 型 TNFR(又称 TNFR2)仅表达于免疫和内皮细胞上,与信号传递和 T 细胞增殖有关. 相关实验显示, TNF- $\alpha$  受体 1 缺失的小鼠,在注射 LPS 后肾小管上皮细胞凋亡及肾组织中性粒细胞浸润明显减轻,从而避免 LPS 介导的 AKI 发生<sup>[25]</sup>. 综上所述,两型 TNF- $\alpha$  受体在 LPS 介导的脓毒症急性肾损伤中均发挥一定作用.

### 4 问题及展望

虽然大量的研究证据证实了 MSC 可以改善顺铂<sup>[26]</sup>、甘油<sup>[25]</sup>或缺血再灌注损伤<sup>[27]</sup>诱导的 AKI 模

型中实验动物的预后,但 MSC 在受损组织中较低的生存率使人们质疑细胞移植的效果. 并且同时发现在 MSC 的肾脏保护中,进入受损组织的 MSC 数量并不多,更进一步提示 MSC 的肾脏保护作用可能与其释放可溶性因子有关. 所以许多学者进行了大量研究,试图更好地解释干细胞治疗促进受损肾组织再生过程中可能的机制,发现 MSC 的旁分泌作用在 MSC 治疗脓毒症急性肾损伤的中发挥重要作用. 实验表明,小鼠来源的 BM-MSC,在缺血再灌注损伤模型中,通过产生抗凋亡因子、促有丝分裂因子及血管趋化因子,发挥保护肾功能和减轻肾小管损伤的作用<sup>[28]</sup>. 人们普遍认为, MSCs 作用的主要机制在于其旁分泌功能,而 TNF- $\alpha$  可以促进 BMSCs 的细胞增殖,增强 MSCs 抑制混合淋巴细胞反应能力,从而可刺激 MSCs 增加细胞因子的释放<sup>[20]</sup>. 大量实验研究证实, MSC 可以治疗脓毒症急性肾损伤,而 TNF- $\alpha$  可以加强此作用,并且我们可知 TNF- $\alpha$  发挥其作用主要是与其相应靶器官上的受体结合,继而激活下游信号传导通路,最终引发一系列的反应. 同时,我们可知 TNF- $\alpha$  具有受体 1 和受体 2 两种类型受体,受体 1 在体内大多数细胞表面广泛分布,受体 2 分布于造血细胞和内皮细胞,两类细胞胞外同源性为 28%,胞内区没有同源性,说明两者在体内可能介导不同的信号传导途径,从而发挥不同的作用<sup>[29]</sup>. 受体 1 主要介导炎症反应,促进成纤维细胞增殖,而受体 2 抑制造血和调节内皮细胞或中性粒细胞活性,在不同细胞表面受体 1 和受体 2 的数量差别较大,但是受体数量与细胞对 TNF- $\alpha$  的敏感性不成比例性关系. 由此可见,两种受体在炎症反应上都发挥一定作用. MSC 上同时存在 TNF- $\alpha$  受体 1 和 TNF- $\alpha$  受体 2 两种受体,在 TNF- $\alpha$  促进 MSC 治疗脓毒症急性肾损伤中可能都发挥作用,究竟是何种受体起作用或者是两者同时起作用,暂未见相关报道. 在临床工作中,不论是在普通病房还是 ICU 我们一般常见的脓毒症急性肾损伤主要是由革兰氏阴性菌所致,所以明确这一具体机制对于探索脓毒症急性肾损伤的发病机制及新的治疗方法就显得至关重要. 目前许多机构已具有相当成熟的运用 siRNA 干扰细胞得到 TNF- $\alpha$  受体 1 和 TNF- $\alpha$  受体 2 单敲除或双敲除细胞的技术,并且相较于药物性受体基因敲除, siRNA 技术基因敲除获取的细胞在避免药物毒性作用的前提下更多的保留了干细胞所具有的原始功能. 所以这对于进一步的体外和体内实验研究具有重要作用,本课题小组目前正致力于此方面的研究.

## [参考文献]

- [1] 亓俊华, 吴梅, 徐祥, 等. TNF- $\alpha$  对小鼠骨髓间充质干细胞免疫抑制作用影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2015, 51(2): 169–171.
- [2] ZARBOCK A, GOMEZ H, KELLUM J A. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies[J]. Curr Opin Crit Care, 2014, 20(6): 588–595.
- [3] HOLTHOFF J H, WANG Z, PATIL N K, et al. Rolipram improves renal perfusion and function during sepsis in the mouse[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2013, 347(2): 357–364.
- [4] 王敏, 刘虹, 程威. 脓毒症急性肾损伤早期生物标志物的新进展[J]. 中国临床研究, 2016, 29(3): 424–426.
- [5] PRENDECKI M, BLACKER E, SADEGHI-ALAVIJEH O, et al. Improving outcomes in patients with Acute Kidney Injury: the impact of hospital based automated AKI alerts[J]. Postgrad Med J, 2016, 92(1083): 9–13.
- [6] LI G, JIA J, JI K, et al. The neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, attenuates sepsis-related kidney injury in rats[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(3): 767–775.
- [7] HYODO Y, MIYAKE H, KONDO Y, et al. Downregulation of Lectin-like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 After Ischemic Preconditioning in Ischemia-Reperfused Rat Kidneys[J]. Urology, 2009, 73(4): 906–910.
- [8] KNAPP S. Update on the role of Toll-like receptors during bacterial infections and sepsis[J]. Wien Med Wochenschr, 2010, 160(5/6): 107–111.
- [9] ANDERBERG S B, LUTHER T, FRITHIOF R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury[J]. Acta Physiol (Oxf), 2016, DOI:10.1111/apha.12798.
- [10] LIU P, FENG Y, DONG C, et al. Administration of BMSCs with muscone in rats with gentamicin-induced AKI improves their therapeutic efficacy[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97123.
- [11] CHAMBERLAIN G, FOX J, ASHTON B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing[J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2739–2749.
- [12] YU Q, LIU L, LIN J, et al. SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 Axis Mediates The Migration of Mesenchymal Stem Cells to The Hypoxic-Ischemic Brain Lesion in A Rat Model[J]. Cell J, 2015, 16(4): 440–447.
- [13] NASSAR W, EL-ANSARY M, SABRY D, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases[J]. Biomater Res, 2016, 20(1): 21.
- [14] LE BLANC K, RINGDÉN O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience[J]. Journal of Internal Medicine, 2007, 262(5): 509–525.
- [15] QI S, WU D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced acute kidney injury in rats by inhibiting cell apoptosis[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(6): 1262–1272.
- [16] IMBERTI B, MORIGI M, TOMASONI S, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(11): 2921–2928.
- [17] MANNING C N, MARTEL C, SAKIYAMA-ELBERT S E, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate tendon fibroblast responses to macrophage-induced inflammation in vitro[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6(1): 74.
- [18] BURGOS-SILVA M, SEMEDO-KURIKI P, DONIZETTI-OLIVEIRA C, et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells Reduce Acute and Chronic Kidney Damage in Mice[J]. PLoS One, 2015, 10(11): e142183.
- [19] BERNARDO M E, FIBBE W E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation[J]. Cell Stem Cell, 2013, 13(4): 392–402.
- [20] HEGYI B, KUDLIK G, MONOSTORI É, et al. Activated T-cells and pro-inflammatory cytokines differentially regulate prostaglandin E2 secretion by mesenchymal stem cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 419(2): 215–220.
- [21] MIETTINEN J A, PIETILÄ M, SALONEN R J, et al. Tumor necrosis factor alpha promotes the expression of immunosuppressive proteins and enhances the cell growth in a human bone marrow-derived stem cell culture[J]. Experimental Cell Research, 2011, 317(6): 791–801.
- [22] YI T, LEE D, JEON M, et al. Gene expression profile reveals that STAT2 is involved in the immunosuppressive function of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Gene, 2012, 497(2): 131–139.
- [23] TEO G S L, ANKRUM J A, MARTINELLI R, et al. Mesenchymal Stem Cells Transmigrate Between and Directly Through Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Activated Endothelial Cells Via Both Leukocyte-Like and Novel Mechanisms[J]. STEM CELLS, 2012, 30(11): 2472–2486.

Clin Cancer Res, 2014, 20(13): 3507 – 3520.

[ 8 ] CALCE E, MONFREGOLA L, SAVIANO M, et al. HER2-mediated anticancer drug delivery: strategies to prepare targeting ligands highly specific for the receptor [J]. Curr Med Chem, 2015, 22(21):2525 – 2538.

[ 9 ] WHELER J J, ATKINS J T, JANKU F, et al. Multiple gene aberrations and breast cancer: lessons from super-responders[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 442.

[ 10 ] NIENHUIS H H, GAYKEMA S B M, TIMMER-BOSS-CHA H, et al. Targeting breast cancer through its micro-environment: current status of preclinical and clinical re-search in finding relevant targets [J]. Pharmacol Ther, 2015,147: 63 – 79.

[ 11 ] CREIGHTON C J, GIBBONS D L, KURIE J M, et al. The role of epithelial-mesenchymal transition programming in invasion and metastasis: a clinical perspective [J]. Cancer Manag Res, 2013, 5: 187 – 195.

[ 12 ] TANG X Q. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer [J]. Cancer Lett, 2013, 332(1): 3 – 10.

[ 13 ] LI H Y, CUI X Y, WU W, et al. Pyk2 and Src mediate signaling to CCL18-induced breast cancer metastasis[J]. J Cell Biochem, 2014,115(3): 596 – 603.

[ 责任编辑:陈咏梅 ]

(上接第 366 页)

[ 24 ] 陆紫媛,肖 扬,李 力,等. TNF-α 通过 ERK 信号通路刺激骨髓间充质干细胞表达 VCAM-1 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013,21(6):1568 – 1571.

[ 25 ] CUNNINGHAM P N, DYANOV H M, PARK P, et al. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney[J]. J Immunol, 2002, 168(11): 5817 – 5823.

[ 26 ] TOGEL F E, WESTENFELDER C. Kidney protection and regeneration following acute injury: progress through stem cell therapy[J]. Am J Kidney Dis, 2012, 60(6): 1012 – 1022.

[ 27 ] KIDDER D. Mesenchymal stem cells attenuate ischemic acute kidney injury by inducing regulatory T cells through splenocyte interactions [J]. Kidney Int, 2014, 85(4): 981 – 982.

[ 28 ] GATTI S, BRUNO S, DEREKIBUS M C, et al. Mi-crovesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury [J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(5): 1474 – 1483.

[ 29 ] 徐春晓. 肿瘤坏死因子受体生物学功能及其临床应用研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2003,31(1):37 – 41.

[ 责任编辑:刘蔚绥 ]