

蒋超,王超,任晓楠,等. 从人体尿液中分离肾源细胞构建拟肾血管单位小鼠皮下嵌合模型及其初步评价[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 216-222.

Jiang C, Wang C, Ren XN, et al. Construction and preliminary evaluation of a mouse subcutaneous chimeric model of renal vascular unit based on isolation of kidney-derived cells from human urine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 216-222.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.009

从人体尿液中分离肾源细胞构建拟肾血管单位 小鼠皮下嵌合模型及其初步评价

蒋超,王超,任晓楠,周晓辉*

(复旦大学附属公共卫生临床中心,上海 201508)

【摘要】 目的 将健康人体尿液中分离培养的肾源细胞与人源间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)以3:3:2的比例混合,并移植到NOD-SCID免疫缺陷小鼠皮下而构建人源化嵌合小鼠模型。**方法** (1)体外培养MSCs、HUVECs,同时从健康人体尿液中分离培养肾源细胞,并对该细胞进行免疫荧光鉴定。(2)将上述3种细胞以3:3:2的比例混合后与Matrigel基质胶一起注射到NOD-SCID小鼠皮下形成人源组织,通过HE染色、免疫组织化学对移植模型进行鉴定。**结果** (1)成功地从尿液中分离培养出肾源细胞,并检测鉴定了肾小管上皮细胞和集合管细胞;(2)将3种细胞混合后注射到NOD-SCID免疫缺陷小鼠皮下可初步形成小管结构以及与小鼠血管相连接的人源血管结构。**结论** 具有肾小管上皮细胞和集合管细胞的肾源细胞与HUVECs和MSCs皮下移植入NOD-SCID免疫缺陷小鼠体内可形成嵌合的人肾血管单位小鼠模型。该模型可为肾病个体化治疗和相关病毒感染研究提供一个人源化动物模型。

【关键词】 肾源细胞;人肾血管单位小鼠模型;皮下注射;间充质干细胞;人脐静脉内皮细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)02-0216-07

Construction and preliminary evaluation of a mouse subcutaneous chimeric model of renal vascular unit based on isolation of kidney-derived cells from human urine

JIANG Chao, WANG Chao, REN Xiaonan, ZHOU Xiaohui*

(Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China)

Corresponding author: ZHOU Xiaohui. E-mail: zhouxiaohui@shphc.org.cn

【Abstract】 Objective To construct a humanized chimeric mouse model by subcutaneously transplanting NOD-SCID immunodeficient mice with kidney-derived cells cultured from healthy human urine mixed with human mesenchymal stem cells (MSCs) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** (1) Kidney-derived cells were isolated from healthy human urine and cultured *in vitro*. MSCs and HUVECs were also cultured *in vitro*. All three kinds of cells were identified by immunofluorescence. (2) The three cell types were then mixed in a ratio of 3:3:2 and injected

【基金项目】 上海市科学技术委员会实验动物专项(19140905300,19140905301),上海市卫生健康委员会项目(20204Y0335),上海市公共卫生临床中心院级科研课题(KY-GW-2021-05, KY-GW-2021-38),上海实验动物安全控制管理信息平台研究及应用示范(21140900200),生物安全实验室实验动物信息可追溯系统应用评价研究(21140900202)。

Funded by the Laboratory Animal Special Project of Shanghai Science and Technology Commission (19140905300, 19140905301), Shanghai Municipal Health Commission Project (20204Y0335), Shanghai Public Health Clinical Center Hospital Project (KY-GW-2021-05, KY-GW-2021-38), Research and Application Demonstration of Shanghai Laboratory Animal Safety Control Management Information Platform (21140900200), Research on Application Evaluation of Laboratory Animal Information Traceability System in Biosafety Laboratory (21140900202).

【作者简介】 蒋超(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:肾脏病动物模型。Email: 20211300004@fudan.edu.cn

【通信作者】 周晓辉(1973—),男,博士,研究员,研究方向:感染免疫学与实验动物模型。Email: zhouxiaohui@shphc.org.cn

subcutaneously with Matrigel into NOD-SCID mice to develop human tissue. The transplantation model was identified by hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry. **Results** (1) Kidney-derived cells were successfully isolated and cultured from urine, and renal tubular epithelial cells and collecting duct cells were detectable and identified by immunohistochemistry. (2) After subcutaneous injection into NOD-SCID immunodeficient mice, the three kinds of cells initially developed tubule structures and human-derived vascular structures that communicated with the murine systemic circulation. **Conclusions** We successfully created a chimeric mouse model of the human renal vascular unit by subcutaneous transplantation of kidney-derived cells, HUVECs, and MSCs, including renal tubular epithelial cells and collecting tubular cells, into NOD-SCID immunodeficient mice. This model may provide a humanized animal model for research into the individualized treatment of human chronic kidney disease and kidney-related viral infections

【Keywords】 kidney-derived cells; human renal vascular unit mouse model; subcutaneous transplantation; mesenchymal stem cells (MSCs); human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

当前肾病特别是慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 已成为一种全球性的疾病, 为全球卫生健康和经济领域造成巨大的负担^[1]。据估计, 截至 2017 年全球 CKD 患者人数约 6.9 亿人, 其中中国的患病率 10.8%, 患者人数约 1.3 亿人, 排名全球第一位, 给人民的健康和生活带来了巨大的威胁^[2]。

CKD 病因较为复杂, 其致病机制需要个体化精准医学的深入研究。而在 CKD 病程后期进展到终末期肾病 (end stage kidney disease, ESKD) 的患者, 目前除了进行肾透析和肾移植, 没有其它有效的治疗方案。肾透析的病人不仅要承受透析带来的痛苦, 严重影响了病人的生活质量, 而且还需要承担昂贵的医疗费用。虽然肾移植病人比较于肾透析病人有更好的生活质量和更长的存活率, 但是由于新增肾透析病人例数大于肾移植例数, 待移植患者数量持续增加, 造成移植器官短缺问题^[3]。据 2015~2016 年的肾移植数据显示, 在肾透析患者中只有 1 例患者能够接受肾移植手术 (供需比为 1 : 55 ~ 1 : 44)^[4]。而且肾移植的病人由于需要长期服用免疫抑制药物, 也会受到 BK polyomavirus (BKV) 感染, 从而引发 BKV 相关肾病、出血性膀胱炎等一系列疾病, 甚至导致病人死亡^[5]。因此, 亟需为 CKD 患者提供更加有效的治疗方案以及解决肾移植手术后 BKV 感染问题。但无论是 CKD 个体化精准医学研究还是 BKV 感染都缺乏合适的体内研究 (*In vivo*) 模型。

人源化小鼠模型 (humanized mice model), 即把有功能的人类基因、组织或细胞移植入小鼠体内构建而成, 其已经被广泛用于人类疾病的临床前研究和病毒感染性研究^[6]。例如目前比较成熟的免疫系统人源化小鼠, 被用于移植物抗宿主疾病 (graft versus host disease, GVHD)、过敏性疾病和一些病毒

感染性疾病的研究; 肝人源化小鼠模型, 用于肝病、药物代谢和肝炎病毒感染性等研究; 人源性组织异种移植 (patient-derived xenografts, PDX) 模型可用于研究、评价筛选抗肿瘤药物, 为癌症的个体化精准医疗提供了不可缺少的研究工具^[7]。

目前用于 CKD 个体化精准医学研究的肾人源化小鼠模型还非常少见。因此, 本研究探索了一种基于人源细胞构建人肾血管单位皮下嵌合小鼠模型的方法, 主要是将从尿液中分离的肾源细胞 (其中包括了肾小管上皮细胞和集合管细胞) 与 MSCs 和 HUVECs 注射入 NOD-SCID 免疫缺陷小鼠皮下构建而成, 可为 CKD 等相关肾病的个体化精准医学研究、药物筛选和 BKV 感染研究提供一种合适的人源化小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本实验选用 SPF 级 8 周龄 NOD-SCID 雌性小鼠 4 只, 体重 18 ~ 20 g。该小鼠购买于江苏集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK(苏)2018-0008】, 并在上海市 (复旦大学附属) 公共卫生临床中心实验动物部无菌隔离器中饲养【SYXK(沪)2020-0019】。小鼠饲养环境: 温度为 18 ~ 25℃, 湿度适宜, 光照 12 h, 黑暗 12 h, 每笼 3 只, 自由饮水取食。本实验所有操作均符合上海市公共卫生临床中心伦理委员会的伦理批件 (2019-D021)。

1.1.2 细胞

人间充质干细胞 (MSCs) (购买于上海然其生物科技有限公司); 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) (上海交通大学附属第九人民医院于士颜课题组馈赠); 尿液中分离的肾源细胞 (具体方法见后 1.2.1)。

1.1.3 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(11995-065, Gibco); DMEMF/12 培养基(11320-033, Gibco); 肾小管上皮增殖培养基 REGM(CC-3190/CC-4127, Lonza); iCell 原代间充质干细胞无血清培养基(PriMed-iCell-012-SF, 赛百康); PBS 含钙镁离子(SH30256.01, Hyclone); Washing Buffer(DMEM 培养基、HEPES(15630106, Gibco)、GlutaMAX™(35050-061, Gibco)、Primocin™(invivogen)、Rho-kinase inhibitor(Y-27632)、1%青链霉素); Primary Medium 基础培养基(DMEMF/12 培养基、10%胎牛血清 FBS(Gibco)、REGM™ SingleQuots(CC-4127, Lonza)、Primocin™(invivogen)、1%青链霉素); 0.25%胰酶(Gibco); Villin(1D2C3)抗体(sc-58897, Santa Cruz); GATA3 抗体(AF2605-SP, R&D Systems); HLA-A 抗体(ab52922, Abcam); CD13 抗体(32720 s, CST); spectrum Cytokeratin 抗体(ab9377, Abcam); 高分子量 FITC-Dextran(R-FD-007); Matrigel 基质胶(356234, Corning); Cell Adhere™ Laminin-521(77004, Stem Cell)。

生物安全柜(HR40-11B2, Thermo Fisher Scientific, 美国); 超净工作台(SW-CJ-2FD, 苏州智净净化设备有限公司); CO₂ 培养箱(3111, Thermo Fisher Scientific, 美国); 冷冻离心机(Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific, 美国); 普通离心机(TDL80-2B, 上海安亭科学仪器厂); 无菌隔离器; 倒置相差显微镜(Leica, 德国); 荧光倒置显微镜(DMI-3000, Leica, 德国); 恒温水浴锅(博讯, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

(1) 肾源细胞分离与培养: 先收集健康成人尿液 300 ~ 400 mL 于无菌的培养瓶中。在生物安全柜中将其分装到 50 mL 离心管中, 2000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清剩余 1 mL, 然后全部移入 1 个新的 50 mL 离心管中; 加入 15 ~ 20 mL Washing Buffer, 1000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清剩余 0.2 mL; 然后加入 1 mL Primary Medium 悬浮沉淀, 将其转移到 12 孔板中(预先用 laminin-521 包被), 再补入 1 mL Primary Medium, 接下来 3 d 每天加入 1 mL Primary Medium, 第 4 天时吸弃约 4 mL 培养基, 并补入 1 mL REGM 增殖培养基, 之后每天更换一半的培养基, 培养 14 d 左右, 细胞密度 80% ~ 90%, 标记为

P0 代。然后对 P0 代细胞进行 1 : 2 传代。PBS 清洗 1 ~ 2 次, 0.25%胰酶, 37℃, 于 5% CO₂ 培养箱中消化 5 min 后终止消化, 1000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清, 加入新的 REGM 增殖培养基继续培养。

(2) 间充质干细胞(MSCs)培养: 将冻存于液氮中的 MSCs 置于 37℃ 水浴锅复苏后, 加入 5 mL iCell 原代间充质干细胞无血清培养基于 T-25 培养瓶中培养。当培养 2 ~ 3 d 后细胞状态良好, 密度长满 80% ~ 90% 时, 即可 1 : 2 进行传代。将细胞置于生物安全柜中, PBS 清洗 1 ~ 2 次, 0.25%胰酶消化, 1000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清, 加入 5 mL 新的培养基并温和的混匀细胞, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱继续培养。

(3) 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)培养: HUVECs 复苏后于 DMEM 完全培养基中, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 当细胞汇合密度 80% ~ 90%, 可 1 : 2 进行传代。在灭菌的生物安全柜中, 无菌 PBS 清洗 2 遍, 加入 0.25%胰酶于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中消化 2 min 后终止消化, 1000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 加入 5 mL 新 DMEM 完全培养基, 混匀细胞, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱继续培养。

1.2.2 皮下移植肾源细胞、MSCs 和 HUVECs

将培养在 CO₂ 培养箱中生长状态良好的肾源细胞、MSCs 和 HUVECs 置于生物安全柜中, 胰酶消化、离心, 台盼蓝染色并用血球计数板计数: 分别取 1.5×10^6 个肾源细胞, 1.5×10^6 个 MSCs 和 1×10^6 个 HUVECs/只小鼠。然后用 200 μ L Matrigel 基质胶将上面 3 种细胞充分混匀, 并用 1 mL 的无菌注射器将细胞混合物注射入 NOD-SCID 小鼠皮下。待 14 d 时, 从隔离包中取出小鼠, 通过尾静脉注射 50 mg/mL, 0.2 mL 的 200×10^3 高分子量 FITC-Dextran(1 种可注射进入血管中的绿色体内示踪剂, 能够在体内血管中循环), 待 0.5 ~ 1 h 后处死小鼠取出移植植物。

1.2.3 HE 染色

移植植物 10% 的福尔马林固定后, 脱水、透明、石蜡包埋切片、脱蜡, 梯度乙醇复水等步骤后。苏木精染色 2 ~ 3 min, 自来水冲洗, 盐酸酒精溶液分化; 然后用伊红 1 ~ 2 min 染细胞质, 进行脱水, 中性树胶封片, 显微镜检测拍照。

1.2.4 免疫组化

皮下移植植物用 4% 的多聚甲醛固定, 脱水、透明、石蜡包埋切片, 然后将石蜡切片放于 60℃ 烤箱中烤

片 1 h,二甲苯-I、二甲苯-II脱蜡处理后,依次放入无水乙醇、85%乙醇、75%乙醇、蒸馏水中。将复水后的切片置于柠檬酸抗原修复液中,于微波炉内煮沸进行抗原修复,再用 3%过氧化氢清除内源性过氧化物酶。接下来进行抗体孵育,首先将切片组织用 5% BSA 室温封闭 1 h。加入一抗,人类白细胞抗原 HLA-A(用于检测人源血管结构);细胞角蛋白 Cytokeratin(用于检测人源小管结构)4℃冰箱孵育过夜。第 2 天拿出用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加入抗 HLA-A 和 Cytokeratin 的荧光二抗,室温避光孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,最后用 DAPI 染细胞核,封片后在荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.5 细胞免疫荧光

将细胞铺板于 8 孔 Nunc™ Lab-Tek™ 小室中,铺板密度 80% ~ 90%。用 4%组织细胞固定液或者遇冷的 100% 甲醇室温固定细胞 20 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;加入 0.5% TritonX-100 通透 15 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。5% BSA 室温封闭 1 h,分别加入一抗 Villin(肾近端小管上皮细胞标记

物),CD13(肾近端小管上皮细胞标记物),GATA3(集合管细胞标记物),4℃孵育过夜。第 2 天用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,分别加入荧光二抗,室温避光孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;最后加入 DAPI 染色液复染细胞核,PBS 洗涤后于激光共聚焦镜下观察拍照。

2 结果

2.1 尿液中成功分离培养出肾源细胞

人类肾具有广泛的管状结构,如肾近端小管、远端小管、集合管等结构。研究发现人体每天大约有几千个活细胞从肾的管状系统和尿路下游部分(包括输尿管、膀胱和尿道)随着尿液排出体外。其中包括了肾小管上皮细胞、足细胞、尿路上皮细胞和免疫细胞等^[8]。参照相关研究的培养方案^[9],我们用特定的肾上皮细胞培养基(REGM 培养基)定向培养,成功地培养出了肾源细胞。下图是第 5、7、9、11 天生长状态良好的细胞(图 1A,1B,1C,1D)。另外也成功培养了 HUVECs 和 MSCs(图 1E,1F)。

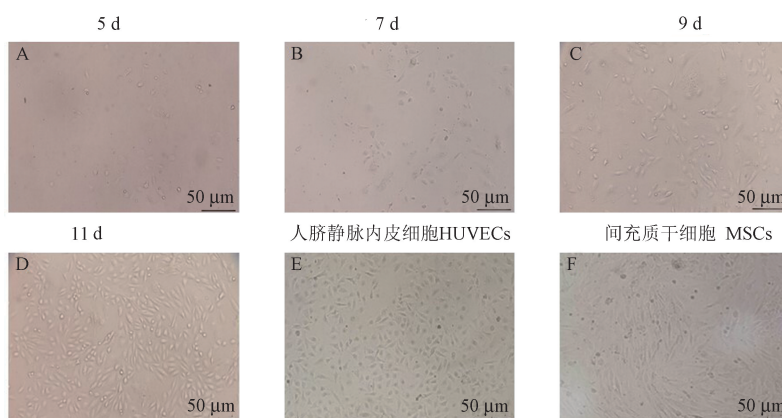
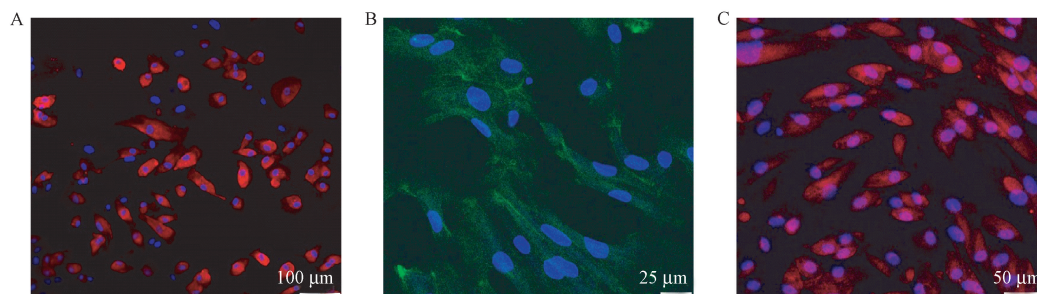


图 1 人体尿液分离的肾源细胞和 HUVECs、MSCs

Figure 1 Kidney-derived cells from human urine and HUVECs, MSCs



注:A:肾近端小管上皮细胞;CD13(红色);B:肾近端小管上皮细胞绒毛蛋白:Villin(绿色);C:集合管;GATA3(红色)。

图 2 肾源细胞免疫荧光鉴定

Note. A. Renal proximal tubular epithelial cells. CD13 (red). B. Renal proximal tubular epithelial cells. Villin (green). C. Collecting tubule. GATA3 (red).

Figure 2 Kidney-derived cells is detected by immunofluorescence

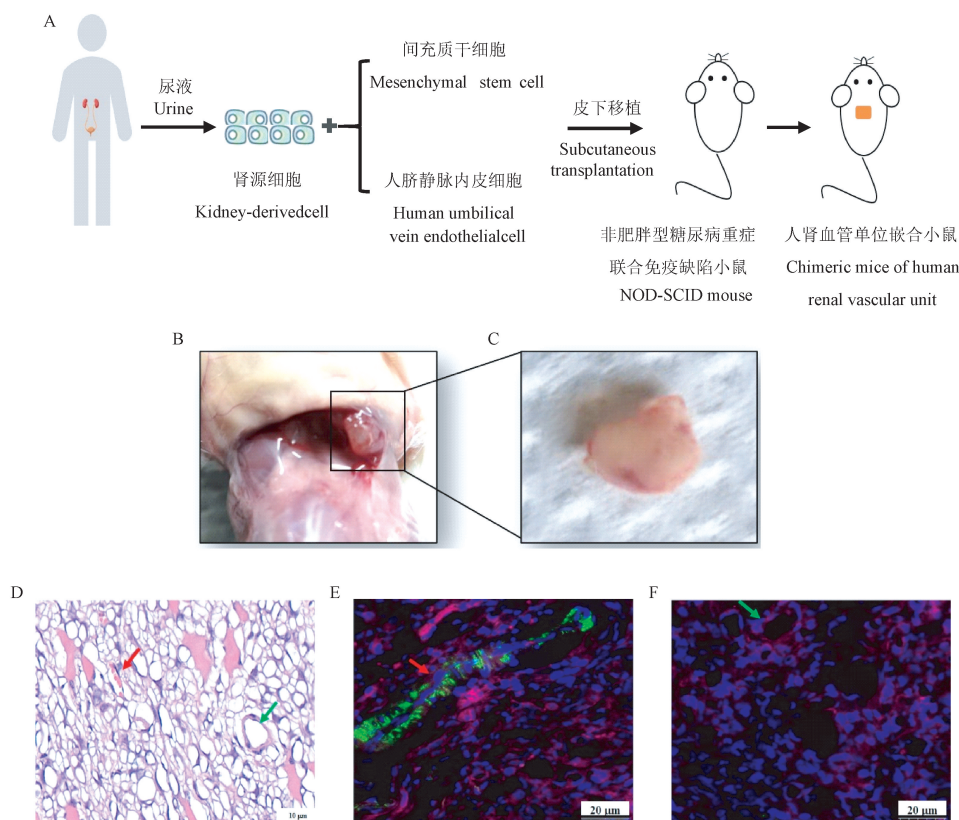
2.2 免疫荧光检测到尿液分离的肾源细胞中存在肾小管上皮细胞和集合管细胞

为了鉴定尿液中分离的肾源细胞组分,通过免疫荧光检测了相关肾小管上皮细胞表面标记物,包括肾近端小管上皮细胞表达的特异性 CD13 (图 2A),绒毛蛋白 Villin (图 2B) 和集合管细胞表达的 GATA3 (图 2C)。结果初步表明,本实验分离获得的肾源细胞中至少包含了肾近端小管上皮细胞和集合管细胞。

2.3 皮下移植肾源细胞、MSCs 和 HUVECs 形成的移植物及人源血管单位和小管结构的检测

按照比例 3 : 3 : 2, 分别取 1.5×10^6 个肾源细胞、 1.5×10^6 个 MSCs 和 1.0×10^6 个 HUVECs, 与 Matrigel 基质胶混合后移植到 NOD-SCID 小鼠皮下, 14 d 后取小鼠皮下移植物 (图 3A)。在取出移植物之前, 尾静脉注射了高分子量的 FITC-dextran (作为

一种体内的示踪剂, 可在小鼠体内血管中随着血液循环分布全身, 用于检测人源血管是否和小鼠血管相连通)。检测结果如下, 肉眼可见小鼠皮下形成了较小的移植块 (图 3B 和 3C)。随后分别通过 HE 染色和免疫荧光对该移植物进行了分析检测。首先通过 HE 染色观察到移植物中具有血管结构 (图 3D 中红色箭头所示) 和小管结构 (图 3D 中绿色箭头所示)。为了进一步确定移植物中形成的血管和小管是否是人类来源的, 随后对其进行了免疫荧光检测。免疫荧光检测结果显示, 移植物中形成的血管能够表达人类白细胞抗原 HLA-A (图 3E); 而且该血管中出现了经尾静脉注射的 FITC-dextran (绿色), 说明该血管是人源血管并与小鼠血管相连通。同时免疫荧光也检测到细胞角蛋白 (Cytokeratin) 表达, 而该蛋白主要表达于小管管腔上皮细胞中, 证明了小管结构的存在 (图 3F)。



注: A: 皮下嵌合的人肾血管单位小鼠模型构建示意图; B, C: 形成于小鼠皮下的移植物; D: 移植物的 HE 染色结果; 血管结构 (红色箭头), 小管结构 (绿色箭头); E: 免疫荧光检测移植物 HLA-A 和 FITC-dextran 结果; 人源血管结构 (红色箭头); F: 免疫荧光检测 Cytokeratin 结果; 人源小管结构 (绿色箭头)。

图 3 皮下移植物的组织病理形态、免疫荧光检测

Note. A. Schematic diagram of subcutaneous construction of human renal vascular unit mouse model. B, C. The grafts formed in the subcutaneous issue of mice. D. HE staining result of the graft. Vascular structure (red arrow), Tubular structure (green arrow). E. Immunofluorescence detection of HLA-A and FITC-dextran results of the graft. Human-derived vascular structure (red arrow). F. Immunofluorescence detection of Cytokeratin result. Human-derived tubular structure (green arrow).

Figure 3 Histopathological morphology and immunofluorescence detection of subcutaneous grafts

3 讨论

研究发现人体泌尿系统中的一些活细胞会随着尿液排出体外,其中包含有肾小管上皮细胞、足细胞、尿路上皮细胞和肾祖细胞等^[8]。已有研究利用尿液中分离培养的肾源细胞建立体外细胞模型来研究相关肾疾病^[10]。例如尿液来源的足细胞、肾近端小管细胞可体外建立遗传性肾疾病 Alport syndrome、遗传性纤毛病变的细胞模型,用于疾病诊断和机制研究^[11-12]。2019 年, Schutgens 等^[13]用囊性纤维化病人尿液中的细胞建立了肾类器官疾病模型,并预测该类器官为临床药物有效性的评估提供了一定的参考性价值。该研究表明尿液来源的细胞在建立肾病类器官体外模型以及评估药物治疗效果等方面存在巨大潜力。2021 年, Wang 等^[8]单独将尿液来源的肾祖细胞,注射到经过手术损伤的免疫缺陷小鼠原位肾中,可形成肾小管管腔结构,包括有肾近端小管、髓袢以及肾远端小管结构,但未形成人源血管结构,且也未对肾小管结构进行功能检测。另外,由于该模型涉及较为复杂的肾切除的肾损手术,而移植后肾功能恢复的程度还无法精确掌控,因而在可推广性上有较大的限制。也有研究将从肾实质中分离获得的肾小管上皮细胞用于肾人源化小鼠模型的构建,该实验最后也检测到了相关肾小管结构^[14]。但是从肾实质中获取细胞需要复杂的手术操作程序,因此难以针对每个疾病个体构建研究模型并用于个体化精准医学研究,从而限制了其推广。

本研究使用尿液分离的肾源细胞(包含肾小管上皮细胞和集合管细胞等),相比较于从肾实质中分离获得的细胞具有明显的优势。除了临床来源充足、容易获取以外,更能代表个体的特征,反映最接近人体的生理表型,具有很大的潜力用于构建基于 CKD 病人的个体化小鼠模型,为 CKD 个体化精准医疗提供研究工具。在精准医疗领域,当前 PDX 模型是被广泛用于肿瘤新药评价筛选,药物治疗策略的选择以及肿瘤新靶标筛选等方面研究。该模型是直接将患者新鲜的肿瘤组织移植于免疫缺陷小鼠体内构建而成,能够较好的保留原发肿瘤的异质性和遗传特性,具有较好的临床结果预见性^[15]。本研究构建的模型与 PDX 模型较有一定相似性,均采自人体的组织或细胞,均移植到免疫缺陷小鼠而构建的模型。由此方法可构建基于病人的个体化肾疾病(例如遗传性肾病)研究模型,作为疾病药物

筛选和疾病机制研究的工具,因此可能具有较好的应用前景。另一方面,这两种模型也有所不同:本研究从尿液分离的肾源细胞不属于肿瘤细胞,没有肿瘤细胞的恶化及转移等特性;此外其体外培养需要肾细胞生长所需的特殊细胞因子和培养基。

除了肾源细胞之外,本实验所构建模型所具有的优势是加入了血管内皮细胞(HUVECs)和间充质干细胞(MSCs)。诚然,肿瘤瘤块等移植物接种到小鼠体内,也可由周边小鼠血管形成增生和侵入,但这种方式对形成功能单位的组织块并不利。而人源移植物如果能形成自身人源血管,并能与宿主小鼠的体循环相连通,对于移植入的人源细胞体内存活,形成甚至恢复相应的组织结构起到非常重要的作用^[14,16]。HUVECs 具有形成人源血管的能力,可在体内形成人源血管结构^[17]。而 MSCs 兼具了多向分化能力和旁分泌功能^[18],通过多种旁分泌机制促进各种组织再生,血管生成、促细胞增殖、抑制凋亡、抗炎和介导免疫反应等^[19]。此外相关研究也表明将血管内皮细胞和 MSCs 同时移植入免疫缺陷小鼠体内可形成稳定的、有功能的血管网络。MSCs 还可形成血管周围细胞稳定血管^[20]。因此肾源细胞与 HUVECs 及 MSCs 按比例同时移植入免疫缺陷小鼠体内,更加有利于肾源细胞在宿主体内形成与宿主小鼠循环系统相连通的模拟人肾血管单位的组织结构,这也是本文重要的集成创新点之一。当然,本研究构建的皮下嵌合小鼠模型在一定程度上模拟了肾血管单位,其成熟程度和功能还未知。因此,后续我们将进一步开展相关实验以及肾包膜下原位嵌合的研究,进而对原位嵌合物进行结构和功能的鉴定和检测,并深入分析基因表达特征。

慢性肾病(CKD)作为全球性的重大疾病,其发病原因及病程结局复杂,亟需开展个体化精准医疗相关研究;目前关于 CKD 个体化精准医学研究缺乏合适的体内研究(*In vivo*)模型。人源化小鼠模型是开展人类疾病机制、药物筛选研发等相关研究比较理想的模型。本研究构建的人肾血管单位小鼠皮下嵌合模型有可能成为 CKD 机制、药物筛选等个体化精准医疗相关研究工具之一。此外,目前对于 CKD 除了肾透析和肾移植外没有其它有效的治疗方法,而肾移植则面临着移植器官短缺和移植后 BKV 感染问题^[21-22]。BKV 感染是临床上导致肾移植术后排斥反应的一个重要诱因,而其感染尚缺乏特异性的治疗药物;BKV 病毒受体尚不明确,主要

特异性感染人类肾中肾小管上皮细胞,进而扩大感染至肾实质、其它尿路部分和血液循环,从而引发 BKV 相关肾病^[23]。目前 BKV 相关研究多为体外细胞培养以及基于人肾类器官的体外感染研究^[13],尚缺乏合适的动物模型。本研究用肾源细胞(其中包括了肾小管上皮细胞)与 MSCs 和 HUVECs 构建皮下嵌合的肾血管单位人源化小鼠模型,能够形成与宿主小鼠相连接的人肾血管单位以及肾小管结构,在一定程度上模拟了人肾血管单位结构,从而也具有用于 BKV 感染体内研究的潜力。

总之,目前肾人源化小鼠方面的研究尚不多见。本研究提供了一种基于人体尿液中肾源细胞而构建的皮下肾血管单位嵌合小鼠模型,可能在肾疾病的发病机制和药物筛选等精准个体化医学研究以及肾特异的病毒感染研究等临床前研究中具有广阔的应用前景。

参 考 文 献(References)

- [1] Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, et al. Global prevalence of chronic kidney disease—a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158765.
- [2] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709–733.
- [3] 林涛. 我国活体肾移植的现状与思考 [J]. *中华器官移植杂志*, 2020, 41(10): 577–578.
Lin T. Current status and thinking of living donor kidney transplantation in my country [J]. *Chin J Organ Transplant*, 2020, 41(10): 577–578.
- [4] 江文诗, Gomez MP, Paez G, 等. 数据之美——聚焦全球器官捐献发展趋势 [J]. *中华移植杂志(电子版)*, 2019, 13(1): 28–33.
Jiang WS, Gomez MP, Paez G, et al. The beauty of data-focusing on the development trend of global organ donation [J]. *Chin J Transplant (Electronic Edition)*, 2019, 13(1): 28–33.
- [5] Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, et al. BK polyomavirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging therapies [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2017, 30(2): 503–528.
- [6] Walsh NC, Kenney LL, Jangalwe S, et al. Humanized mouse models of clinical disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12: 187–215.
- [7] Ito R, Takahashi T, Ito M. Humanized mouse models: application to human diseases [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 3723–3728.
- [8] Wang Y, Zhao Y, Zhao Z, et al. Single-cell RNA-Seq analysis identified kidney progenitor cells from human urine [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(4): 305–312.
- [9] Zhou T, Benda C, Dunzinger S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(12): 2080–2089.
- [10] Bondue T, Arcolino FO, Veys KRP, et al. Urine-derived epithelial cells as models for genetic kidney diseases [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1413.
- [11] Iampietro C, Bellucci L, Arcolino FO, et al. Molecular and functional characterization of urine-derived podocytes from patients with Alport syndrome [J]. *J Pathol*, 2020, 252(1): 88–100.
- [12] Molinari E, Sayer JA, Gunay-aygun M. Using human urine-derived renal epithelial cells to model kidney disease in inherited ciliopathies [J]. *Transl Sci Rare Dis*, 2019, 4(1–2): 87–95.
- [13] Schutgens F, Rookmaaker MB, Margaritis T, et al. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(3): 303–313.
- [14] Pleniceanu O, Harari-steinberg O, Omer D, et al. Successful introduction of human renovascular units into the mammalian kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(12): 2757–2772.
- [15] 李克娟, 黄昊, 高蓓. 人源肿瘤异种移植模型在精准肿瘤医学中的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(1): 91–98.
Li KJ, Huang H, Gao R. Research progress of patient-derived xenografts in precision cancer medicine [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(1): 91–98.
- [16] Long DA, Norman JF, Fine LG. Restoring the renal microvasculature to treat chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2012, 8(4): 244–250.
- [17] Melero-martin JM, Khan ZA, Picard A, et al. *In vivo* vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells [J]. *Blood*, 2007, 109(11): 4761–4768.
- [18] Liu D, Cheng F, Pan S, et al. Stem cells: a potential treatment option for kidney diseases [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 249.
- [19] Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang SY, et al. Engineering robust and functional vascular networks *in vivo* with human adult and cord blood-derived progenitor cells [J]. *Circ Res*, 2008, 103(2): 194–202.
- [20] Kim HK, Lee SG, Lee SW, et al. A Subset of paracrine factors as efficient biomarkers for predicting vascular regenerative efficacy of mesenchymal stromal/stem cells [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(1): 77–88.
- [21] 贺雪梅, 储爱琴, 王玉, 等. 肾移植受者术后感染的回顾性研究 [J]. *中国临床保健杂志*, 2021, 24(1): 121–124.
He XM, Chu AQ, Wang Y, et al. A retrospective study of postoperative infection in kidney transplant recipients [J]. *Chin J Clin Healthc*, 2021, 24(1): 121–124.
- [22] 孔祥瑞, 李修彬, 孙玉洁, 等. 肾移植受者 BK 病毒感染情况分析 [J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(48): 3859–3862.
Kong XR, Li XB, Sun YJ, et al. Analysis of BK virus infection in kidney transplant recipients [J]. *Natl Med J Chin*, 2020, 100(48): 3859–3862.
- [23] 许瀚仁, 王继纳, 杨橙, 等. 肾移植术后 BK 病毒感染与人肾小管上皮细胞的相关性研究进展 [J]. *实用器官移植电子杂志*, 2021, 9(2): 169–172.
Xu HR, Wang JN, Yang C, et al. Research progress on the correlation between BK virus infection and human renal tubular epithelial cells after kidney transplantation [J]. *Prac J Organ Transplan (Electronic Version)*, 2021, 9(2): 169–172.

[收稿日期] 2022-01-06