

肾脏脱细胞基质材料在肾脏再生与修复中的研究进展

单晓彤, 边学燕, 梅劲

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.01.041

【中图分类号】 R692 【文献标志码】 C 【文章编号】 1671-0800(2024)01-0137-04

目前,中国成人慢性肾脏病的患病率约为 8.2%^[1],这无疑给家庭和医疗机构带来了沉重的负担。肾移植作为终末期肾病最有效的治疗手段,其应用也面临着巨大的挑战。据统计,2020 年我国登记等待肾移植人数超过 6 万,器官移植的供需比例严重失衡,器官捐献的数量无法满足移植的需求^[2]。因此,基于肾脏损伤基础上的修复和器官再造成为研究热点。脱细胞基质 (decellularized extracellular matrix, dECM) 由于良好的生物相容性和低免疫原性,已广泛应用于再生医学和组织工程。近年来,随着水凝胶技术和理论的快速发展,人们不仅利用支架进行器官重建,还对肾脏 dECM 水凝胶的再生潜力进行探索。本文主要介绍肾脏 dECM 的制备、组成与结构,回顾了肾脏脱细胞支架与水凝胶在再生与修复中的具体应用,并对其今后的应用前景进行展望。

1 肾脏 dECM

1.1 制备方法 脱细胞的基本原理就是利用化学法、物理法或生物酶法去除组织中的细胞成分,并最大限度地保留细胞外基质 (extracellular matrices, ECM) 中的原有活性组分。脱细胞方法的选择一般由组织特征和预期用途来决定。对肾脏这类实质器官而言,基于原有脉管系统,并借助化学试剂对其进行灌注去细胞是目前最常用的脱细胞方法。常用于脱细胞的化学试剂包括酸、碱、洗涤剂、螯合剂等,其中应用最广泛的就是离子洗涤剂和 非离子洗涤剂。曲拉通 X-100 是典型的非离子洗涤剂,能破坏脂质

和脂质-蛋白质的相互作用;十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 作为离子洗涤剂的代表,不仅可以有效溶解细胞膜,还不会显著破坏 ECM 蛋白^[3]。在对组织进行脱细胞处理时,还要关注化学洗脱剂的浓度。Sauter 等^[4]研究了两种 SDS 浓度 (即 0.66% 和 3%) 对人内皮细胞在大鼠肾脱细胞支架中的黏附和增殖能力的影响。在半定量的再细胞化分析中,当使用 SDS 浓度为 0.66% 的温和脱细胞方案时,动态培养 5 d 后的细胞计数增加了 1 倍以上。物理学方法有冻融和机械力等,其中冻融法有利于保留 ECM 的物理结构,最适合于强和厚的组织^[5];机械震动力通常应用于具有天然剥离平面的器官,如膀胱和小肠^[6]。生物酶法主要通过破坏细胞片段或细胞-基质黏附的特定链来发挥作用,常见的酶试剂有核酸酶、胰酶、胶原酶等。但生物酶的应用不仅会导致 ECM 的超微结构的破坏,还可能带来支架植入后的免疫反应,所以这种方法的应用较少^[7]。

1.2 组成与结构 肾脏 dECM 保留了大量的 ECM 结构蛋白和特异性蛋白,它们不仅赋予组织特异性结构,还时刻影响着细胞的各种生命活动。Nagao 等^[8]对成人肾脏 dECM 的定量研究表明:成人肾脏 dECM 主要由胶原蛋白、层粘连蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖等组成。其中胶原蛋白主要为 IV 型胶原蛋白和 I 型胶原蛋白,分别占比 37% 和 20%;层粘连蛋白占比约 8%;硫酸乙酰肝素蛋白聚糖约占 3%。这些蛋白不仅与细胞生长、分化、迁移等生命活动息息相关,还积极参与肾脏损伤后的修复。如蛋白聚糖不仅是大多数生长因子的储存库,还参与它们生物活性的调节^[9]。在大鼠残肾模型中,肝细胞生长因子不仅可以通过调节巨噬细胞趋化蛋白-1 的小管表

基金项目: 国家自然科学基金(81970653)

作者单位: 315010 宁波,宁波大学附属第一医院

通信作者: 梅劲, Email: tibetn@aliyun.com

达来减轻肾小球和小管间质中的炎症反应^[10],还可以通过多种机制拦截Smad信号转导以拮抗TGF- β 1来抵抗肾脏纤维化^[11]。

除了独特的生物活性物质,dECM还具有与天然组织相似的物理结构。已有研究证明ECM的超微结构和力学性能对细胞迁移和分化、器官特异性细胞命运的决定以及器官发生过程中的自组装存在潜在影响^[12],如当基质硬度接近脑组织硬度时,神经元分化潜能最大^[13];而肾上皮细胞在超过生理刚度的基质上顶基无法极化^[14]。这种组织特异性肾脏dECM可以为特定细胞类型提供最佳底物和理想的细胞-基质相互作用从而保持细胞表型和功能^[15]。因此,肾脏dECM可以提高干细胞分化的可靠性和效率,在肾脏再生中发挥十分重要的作用。

2 肾脏dECM支架与全肾再生/残肾修复

2.1 全肾脱细胞与再细胞化 肾脏dECM支架用于构建完整组织工程肾脏主要涉及到全肾的脱细胞与再细胞化。要进行器官重建,对支架进行再细胞化处理是十分有必要的。但全肾dECM支架的再细胞化仍然面临以下几个不容忽视的问题:(1)肾脏具有十分复杂的天然结构,含有几十种高度特化的上皮细胞类型^[16]。理论上说,将具有分化潜能的各种干细胞播种到支架上,在适宜条件下,可以诱导干细胞定向分化为组织特异性细胞。但目前的研究表明,对脱细胞支架进行再细胞化不能满足器官再造的全部细胞类型。(2)再细胞化很难保证细胞均匀分布到整个支架当中,且细胞数量无法达到正常组织器官水平。为了提高dECM支架再细胞化的程度,Song等^[17]通过肾动脉持续灌注人脐静脉内皮细胞,然后经由输尿管持续灌注大鼠新生肾细胞,同时对器官腔施加负压梯度。这种灌注再细胞化的方式,可以让细胞分布于整个肾小管间室,直至肾小球丛。Caralt等^[18]设计了一个基于灌注的生物反应器,通过肾动脉将人肾皮质上皮细胞以25 ml/min的速度顺行搏动灌注到支架中,然后将流速降至4 ml/min,并持续7 d。这种方法提高了再细胞化的程度,但是高灌注压力诱导细胞外渗并积聚在支架的病灶区域。为了更好地利用dECM支架进行组织工程肾脏的构建,还需要探索完善更多干细胞类型和再细胞化方法。

2.2 dECM支架与残肾修复 关于肾脏dECM支架应用于肾脏的再生与修复,除了进行再细胞化,还可以将dECM支架直接缝合到部分肾脏缺损的动物模型中。Yu等^[18]对部分肾切除的大鼠进行dECM肾脏支架的移植,并在移植后的支架中发现了肾脏再生细胞,免疫荧光也显示除了分布于肾小球,许多巢蛋白阳性细胞存在于肾小管和切缘附近的间质中,后来Tajima等^[19]在猪部分肾切除模型中也得到了同样积极的结果。Wang等^[20]还将肾dECM支架移植到5/6个肾切除大鼠肾脏上,并与明胶海绵覆盖的切口边缘进行比较,以探讨肾dECM支架治疗慢性肾功能衰竭的效果。结果显示支架组血尿素氮和血管紧张素II在大多数时间显著降低,同时其III型胶原和IV型胶原的积累也明显减少。但是基质中肾元再生的机制还没有明确,大多数观点支持dECM支架刺激祖细胞的分化和增殖从而参与肾脏修复。

3 肾脏dECM水凝胶应用于肾脏组织工程

dECM支架在结构和机械上拥有与肾脏组织相似的优点,但也同时存在局限性,例如:固定的形状无法填补不规则缺损,不利于与其他生物材料进行有机结合,支架与种子细胞的结合无法脱离生物反应器等。在后来的研究中,人们尝试对肾脏dECM水凝胶进行各种化学修饰和改造,从而扩大肾脏dECM的应用范围。关于肾脏dECM水凝胶的组织工程应用见图1。

3.1 肾脏dECM水凝胶用于干细胞的传递 近年来,以干细胞为基础的治疗,包括移植诱导多能干细胞、肾祖细胞、胚胎干细胞、间充质干细胞等,被证明可以有效促进肾脏的再生和修复。然而,如何有效输送干细胞到达指定部位仍是一个巨大的挑战。可注射水凝胶因侵入性小、内含丰富的生物活性分子等优点已被组织工程视作输送干细胞的理想载体。

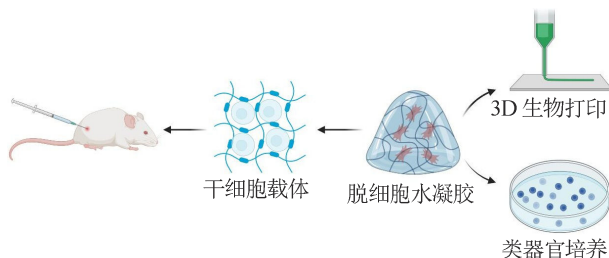


图1 肾脏脱细胞水凝胶的组织工程应用

Zhou 等^[21]利用肾脏 dECM 水凝胶作为可注射支架,将脂肪来源的间充质干细胞输送到缺血肾脏部位,有效改善了大鼠缺血再灌注后受损的肾功能。经改良策略制备的肾 dECM 水凝胶不仅可以提高干细胞移植后在肾脏的保留率和存活率,还能促进生长因子的分泌和上皮分化,从而增强干细胞疗法的潜力。Chu 等^[22]将负载肾祖细胞的猪肾 dECM 和藻酸盐混合水凝胶注入大鼠缺损的肾脏,21 d 后在样本中初步发现了类似肾小球结构的形成和定向细胞网络现象。由此可见,肾 dECM 水凝胶与干细胞联合应用可能是一种十分具有前景的治疗手段。

3.2 肾脏 dECM 水凝胶用于类器官培养 类器官属于三维 (three-dimensional, 3D) 细胞培养物,它拥有与对应器官类似的空间组织并能够重现其部分功能。ECM 水凝胶具有独特的结构和生物活性物质,被广泛应用于类器官的培养。Kim 等^[23]用肾 dECM 水凝胶进行类器官培养时发现:使用肾 dECM 水凝胶培养的血管化肾类器官具有更成熟的肾小球发育模式,且与人肾的相似性更高。体内实验也表明:移植到小鼠肾脏中肾类器官不仅可以加速内皮细胞在宿主小鼠肾脏的募集,还能保持血管的完整性。Guo 等^[24]利用人尿源性干细胞 (urine-derived stem cells, USCs) 培养的三维肾小管类器官为体外肾毒性筛查提供了优化方案。USCs 在没有肾脏 dECM 的二维培养体系中不表达足细胞或肾小管上皮细胞的标记物。因此,他们将肾脏 dECM 水凝胶加入培养基中以诱导 USCs 的分化,培养 14 d 后观察到肾小管样结构,在随后的肾毒性药物实验中也显示出对顺铂和丙酮的高敏感性。由于 USCs 的来源广泛,利用其进行 3D 肾小管类器官的构建在药物开发早期可以作为动物模型的理想代替方案。

3.3 肾脏 dECM 水凝胶用于 3D 生物打印 3D 生物打印通常用于组织工程中,旨在开发具有复杂结构的天然器官支架,最终可用于临床移植。肾脏有着复杂的器官结构和 ECM 组成,传统组织工程方法难以复制,3D 生物打印可以更好地模拟其复杂性和 ECM 分布。Singh 等^[25]开发了一种脱细胞肾源性的生物墨水,并通过海藻酸盐的加入来改善其力学性能。他们利用三维同轴细胞打印系统,分别在肾近端小管上皮细胞和人脐静脉内皮细胞的中空管内直

接制备了混合生物墨水,以此创建了肾小管的 3D 模型。将血管化的肾小管组织移植到免疫缺陷小鼠的肾包膜下部 8 周后,植入物在血管的浸润和功能标记物的表达方面均有十分优秀的表现。令人惊叹的是,将打印物植入单侧输尿管梗阻小鼠模型时,它还表现出抗纤维化的潜力,而这对体外慢性肾脏病模型的研究有很大的帮助。这些生物墨水在疾病建模的微流控设备中的应用也通过血管化的肾近端小管芯片的创建得到验证。Ali 等^[26]开发了一种新型光交联肾脏 ECM 衍生生物墨水配方,与人原代肾细胞混合后,使用集成组织器官打印系统制备肾结构。荧光染色提示:这种生物打印的肾组织构建物不仅表现出天然肾组织的结构特征,还具备了电解质重吸收能力和氨基酸运输活性。

4 展望

肾脏 dECM 材料在组织工程肾脏的构建、促进受损组织再生修复等方面已经取得了积极的结果。但这些令人鼓舞的研究成果大都源于小动物模型和细胞实验,距离其真正应用于临床还需经过漫长的探索。另外,移植后的血栓形成、脱细胞组织的有效再细胞化以及新的 ECM 的建立等都是亟需解决的问题。为了发展临床可行的组织工程肾脏移植,需要新的再细胞化策略和先进的部分肾脏植入疗法以及对再细胞化肾支架进行广泛的体外功能测试。相信在不久的将来,可以通过异种 ECM 来源的肾脏 dECM 材料构建出真正可以应用于临床的生物材料。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

参 考 文 献

- [1] LV J C, ZHANG L X. Prevalence and disease burden of chronic kidney disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 3-15.
- [2] 薛武军. 加强具有中国特色器官捐献与获取组织建设, 促进我国器官移植事业快速发展[J]. 实用器官移植电子杂志, 2021, 9(2): 102-104.
- [3] REMAGGI G, BARBARO F, DI CONZA G, et al. Decellularization detergents as methodological variables in mass spectrometry of stromal matrices[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2022, 28(4): 148-157.
- [4] SAUTER J, DEGENHARDT H, TUEBEL J, et al. Effect of different decellularization protocols on reendothelialization with human cells for a perfused renal bioscaffold of the rat[J]. BMC Biotechnol, 2023, 23(1): 8.
- [5] YANG J, XU Y, LUO S, et al. Effect of cryoprotectants on rat kid-

- ney decellularization by freeze-thaw process[J].Cryobiology,2022,105:71-82.
- [6] GILBERT T W, SELLARO T L, BADYLAK S F. Decellularization of tissues and organs [J].Biomaterials,2006,27(19):3675-3683.
- [7] CARALT M, UZARSKI J S, IACOB S, et al. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation[J]. Am J Transplant, 2015,15(1):64-75.
- [8] NAGAO R J, XU J, LUO P, et al. Decellularized human kidney cortex hydrogels enhance Kidney microvascular endothelial cell maturation and quiescence [J]. Tissue Eng Part A,2016,22(19/20):1140-1150.
- [9] EL NAHAS A M. The role of growth hormone and insulin-like growth factor-I in experimental renal growth and scarring[J].Am J Kidney Dis,1991,17(6):677-679.
- [10] GONG R, RIFAI A, TOLBERT E M, et al. Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES[J].J Am Soc Nephrol,2004,15(11): 2868-2881.
- [11] LIU Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action[J].Am J Physiol Renal Physiol, 2004,287(1):F7-F16.
- [12] LIAO J, XU B, ZHANG R, et al. Applications of decellularized materials in tissue engineering: advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives[J]. J Mater Chem B,2020,8(44):10023-10049.
- [13] SAHA K, KEUNG A J, IRWIN E F, et al. Substrate modulus directs neural stem cell behavior[J]. Biophys J,2008,95(9):4426-4438.
- [14] HAGELAARS M J, YOUSEF YENGEJ F A, VERHAAR M C, et al. Substrate stiffness determines the establishment of apical-basal polarization in renal epithelial cells but not in tubuloid-derived cells[J]. Front Bioeng Biotechnol,2022,10:820930.
- [15] O'NEILL J D, FREYTES D O, ANANDAPPA A J, et al. The regulation of growth and metabolism of kidney stem cells with regional specificity using extracellular matrix derived from kidney[J].Biomaterials,2013,34(38):9830-9841.
- [16] CLARK J Z, CHEN L, CHOU C L, et al. Representation and relative abundance of cell-type selective markers in whole-kidney RNA-Seq data[J]. Kidney Int,2019,95(4):787-796.
- [17] SONG J J, GUYETTE J P, GILPIN S E, et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney[J]. Nat Med,2013,19(5):646-651.
- [18] YU Y L, SHAO Y K, DING Y Q, et al. Decellularized kidney scaffold-mediated renal regeneration[J]. Biomaterials,2014,35(25):6822-6828.
- [19] TAJIMA K, YAGI H, MORISAKU T, et al. An organ-derived extracellular matrix triggers in situ kidney regeneration in a preclinical model[J]. NPJ Regen Med,2022,7(1):18.
- [20] WANG F, LIU X, YU Y, et al. Decellularized kidney scaffold alters the healing response in chronic renal failure[J]. J Biomed Mater Res A,2021,109(11):2101-2110.
- [21] ZHOU C, ZHOU L, LIU J, et al. Kidney extracellular matrix hydrogel enhances therapeutic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells for renal ischemia reperfusion injury[J].Acta Biomater, 2020,115:250-263.
- [22] CHU T L, TRIPATHI G, PARK M, et al. In-vitro and in-vivo biocompatibility of dECM-alginate as a promising candidate in cell delivery for kidney regeneration[J]. Int J Biol Macromol,2022,211:616-625.
- [23] KIM J W, NAM S A, YI J, et al. Kidney decellularized extracellular matrix enhanced the vascularization and maturation of human kidney organoids[J].Adv Sci (Weinh),2022,9(15):e2103526.
- [24] GUO H, DENG N, DOU L, et al. 3-D human renal tubular organoids generated from urine-derived stem cells for nephrotoxicity screening[J].ACS Biomater Sci Eng,2020,6(12):6701-6709.
- [25] SINGH N K, HAN W, NAM S A, et al. Three-dimensional cell-printing of advanced renal tubular tissue analogue[J].Biomaterials, 2020,232:119734.
- [26] ALI M, PR A K, YOO J J, et al. A photo-crosslinkable kidney ECM-derived bioink accelerates renal tissue formation[J]. Adv Healthc Mater,2019,8(7):e1800992.

收稿日期:2023-10-30

(本文编辑:孙海儿)