

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001637

儿童原发性肾病综合征尿源干细胞生物学特征研究

李 昊, 石冬梅, 张元原, 龚梦佳, 阳海平, 陶 立, 王 墨, 李 秋

(重庆医科大学附属儿童医院肾脏内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童感染免疫重庆市重点实验室、
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨正常儿童尿源干细胞(urine-derived stem cell, USC)与原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)患儿尿源干细胞(p-USC)生物学特征差异。**方法:**收集正常儿童及 PNS 患儿清洁中段尿液, 分离培养 USC 及 p-USC, 观察细胞形态差异; CCK-8 检测细胞增殖能力; 流式细胞术检测细胞凋亡及干细胞表面标志物(CD24、CD29、CD34、CD73、CD90、CD105、CD146); 免疫荧光及 Western blot 检测细胞肾系标志物(Pax2)表达; Western blot 检测细胞自噬水平。**结果:**PNS 患儿尿液中存在 2 种形态 p-USC: p-USC I 及 p-USC II。p-USC I 形态与正常 USC 相似: 米粒样、胞体较小、排列紧密。p-USC II 胞体可见少量空泡, 胞体较大, 散在排列。USC、p-USC I 及 p-USC II 最大传代次数分别为 11 代、8 代及 5 代。与 USC 比较, p-USC 增殖能力减弱, 且 p-USC II 减弱更加明显($F=217.300, P=0.000$); p-USC 细胞凋亡无明显差异; p-USC 干细胞表面标志物及周细胞表面标志物表达无统计学差异; p-USC 肾系标志物表达水平下降, 且 p-USC II 下降更明显($F=26.930, P=0.001$); p-USC 自噬水平下降, 差异有统计学意义($F=15.060, P=0.000$)。**结论:**PNS 患儿体内存在 2 种不同形态尿源干细胞: p-USC I 及 p-USC II。与 USC 相比, p-USC 形态有差异、自我更新能力降低、肾系标志物表达下降、自噬水平减弱。

【关键词】儿童 PNS; 尿源干细胞; 肾系标志物; 自噬**【中图分类号】**R692; R725**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-03-11

Biological characteristics of urine-derived stem cells from paediatrics patients with primary nephrotic syndrome

Li Hao, Shi Dongmei, Zhang Yuanyuan, Gong Mengjia, Yang Haiping, Tao Li, Wang Mo, Li Qiu

(Department of Nephrology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders)

【Abstract】Objective: To investigate and compare the biological characteristics of urine-derived stem cells (USCs) from paediatrics patients with primary nephrotic syndrome (p-USCs) and normal children. **Methods:** The clean midstream urine was collected from normal children and paediatrics patients with simple primary nephrotic syndrome. USC and p-USC were cultured and their morphology features were observed by optical microscopy. The cell reproductive capacity was detected by CCK-8; apoptosis difference and stem cells' surface markers were analyzed by flow cytometry (CD24, CD29, CD34, CD73, CD90, CD105, CD146); kidney markers (Pax2) was detected by immunofluorescence and Western blot; autophagy levels was detected by Western blot. **Results:** Two types of cells were found in p-USCs: p-USC I and p-USC II. p-USC I had the same morphology with USC: rice-like, small cell body and closely arranged. p-USC II had bigger cell body, small vacuoles and was dispersedly arranged. The largest passage of USC, p-USC I and p-USC II were 11, 8 and 5 respectively. Compared with those of USC, the proliferation of p-USC was decreased, p-USC II in particular ($F=217.300, P=0.000$); no statistic difference in the apoptotic rate and expression of stem cell surface markers show was observed between USC and p-USC. Compared with those of USC, the expression of Pax2 was decreased in p-USC, but only p-USC II had statistic differences ($F=26.930, P=0.001$). The autophagy level was lower in p-USC than in USC ($F=15.060, P=0.000$).

Conclusion: There were two types of p-USCs in paediatric patients with simple primary nephrotic syndrome, namely p-USC I and

p-USC II. Compared with USC, the p-USC has different morphological features, lower proliferation, Pax2 expression and autophagy level.

【Key words】primary nephrotic syndrome children; urine-derived stem cells; kidney markers; autophagy

作者介绍: 李 昊, Email: 439795594@qq.com,

研究方向: 儿童肾脏及免疫疾病

通信作者: 李 秋, Email: iqi809@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81270802、81470946)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180413.0941.002.html>

(2018-04-13)

原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)是儿童时期最常见的慢性肾脏疾病,也是我国儿童慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)的重要原发疾病之一^[1-3]。激素及免疫抑制剂药物可以使大部分 PNS 达到缓解,但部分患儿存在治疗无效及停药后复发的现象,表明此类药物不足以有效阻止所有儿童 PNS 的慢性化进展。同时,激素及免疫抑制剂治疗时间久,依从性差,可能出现肥胖及生长发育落后等不良反应^[4]。此外,目前没有有效的无创性指标可以反映 PNS 发生发展情况。近年来,干细胞因其具有的优越的再生、替代、修复及分化能力,在多种慢性肾脏疾病中得到广泛的研究。在典型的肾病综合征动物模型中发现,MSCs 移植可以改善肾功能、减少足细胞凋亡、降低肾脏局部炎症因子水平^[5]。目前,干细胞研究主要集中在胚胎干细胞及间充质干细胞。然而,胚胎干细胞及诱导多能干细胞存在伦理问题及自发肿瘤的危险,多数间充质干细胞取材有创、不易分离培养。近年,Zhang 等^[6]首次从尿液中分离出一类具有良好自我增殖能力和多向分化能力的成体干细胞,称为尿源性干细胞(urine-derived stem cells, USCs)。USCs 来源于肾脏,组织上的优势使其成为儿童 PNS 发病及诊疗新的研究方向。本课题组前期已成功建立 PNS 患儿 USCs 分离培养技术^[7],为研究提供了技术支持。

研究表明,儿童 USCs 具有更高的增殖能力、更强的成骨能力及细胞老化减慢的倾向,意味着儿童 USCs 更适用于基础研究,并且可能具有更广泛的临床应用^[8]。然而,疾病状态下机体内环境改变可能对干细胞生物学特性产生不良影响^[9-10]。目前认为,PNS 患儿体内存在不同程度的高脂、炎症因子浸润及免疫紊乱状态^[11-13],此种内环境是否对 p-USCs 生物学特性产生不良影响,尚无相关报道。本研究主要比较 USCs 与 p-USCs 生物学特征差异,为今后探讨 p-USCs 是否可以作为一种无创、有效的反映儿童 PNS 发生发展情况的生物学指标奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

PNS 患儿尿液来源于 2016 年 5 月至 2017 年 7 月我院肾脏内科初诊原发性肾病综合征单纯型患儿入院时清洁中段尿液,共 23 例,其中男性 17 例,女性 6 例,年龄 24~144 月龄,尿蛋白定性++至+++,定量(167 ± 83) mg/(kg·d);正常

儿童尿液来源于我院骨科二病房上肢骨折儿童,共 18 例,其中男性 15 例,女性 3 例,年龄 30~192 月龄。诊断标准:2001 年中华医学会儿科学分会肾脏病学组《小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗》;排除曾使用过激素、免疫抑制剂,患有感染、全身性疾病及遗传性疾病的患儿。

1.2 分离培养

本课题组前期已成功建立儿童 PNS 患儿 p-USCs 分离培养技术。收集正常儿童及 PNS 患儿清洁中段尿,记录总尿量;分离培养原代(P0 代)细胞,选取覆盖 50%~60%孔传至 6 孔板(P1 代);之后继续观察,选取覆盖 80%以上的孔传至 10 cm 培养皿,隔日换液。

1.3 生长曲线

生长良好的 P2 代细胞,接种 96 孔板,分别于第 1、3、5、7、9 天,每孔避光加入 10 μ L CCK-8 后,孵箱孵育 4 h,酶标仪 450 nm 检测其光密度(optical density, OD)值,以天数为横坐标,OD 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.4 倍增时间

消化待测细胞,计数初始接种细胞数及时间,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养;待细胞覆盖 70%~80%时,消化计数终末细胞数及时间。按以下公式计算:培养时间=终末时间-接种时间;群体细胞倍增数= $\log_2$ (终末细胞数/初始细胞数);倍增时间=培养时间/群体细胞倍增数。

1.5 凋亡检测

生长良好的 P3 代细胞,每管加入 5×10^5 mL 细胞,1 500 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次;加入 500 μ L Binding Buffer 重悬;加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后加入 5 μ L Propidium Iodide 混匀,室温避光反应 10 min,1 h 内流式细胞仪检测凋亡情况。

1.6 表面标志物检测

生长良好的 P3 代细胞,每管加入 1×10^6 细胞, PBS 洗涤 2 次,分别加入 5 μ L 抗体(鼠抗人 CD24-FITC、CD29-FITC、CD34-FITC、CD73-FITC、CD90-FITC、CD105-FITC、CD146-FITC、FITC-IgG1),避光,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;重复洗涤 2 次后加入 200 μ L PBS 吹打混匀,流式细胞仪检测表面标志物。

1.7 免疫荧光

生长良好的 P3 代细胞接种于预先处理的细胞爬片 24 h 后,14%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次;0.5% Triton-X 100 打孔 10 min, PBS 洗涤 3 次;加二抗来源 1%BSA 室温封闭 30 min;一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;复温后 PBS 洗涤 3 次,二抗室温避光孵育 60 min;DAPI 室温避光染色 30 min, PBS 洗涤 3 次后封片,荧光显微镜下观察。

1.8 蛋白表达检测

提取生长良好的 P3 代细胞蛋白,BCA 法检测蛋白含量及浓度,双蒸水将蛋白浓度统一调整为 2~4 μ mol/mL;加入上样缓冲液后煮沸 10 min,晾凉后分装保存;Western blot 法检测时每孔加 10 μ L 蛋白样品,以 GAPDH 为内参,检测肾系标志物(Pax2)及自噬相关蛋白(LC3)表达情况。

1.9 统计学方法

所有数据均使用 GraphpadPrism6.0 统计软件进行作图及统计分析处理。所得数值均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多样本组间比较采用单因素方差分析,两组比较采用独立样本 t 检验,倍增时间采用重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 p-USCs 与 USCs 形态比较

正常儿童 USCs 呈米粒样,胞体较小,排列紧密,最多可传至 11 代;本课题组在 PNS 单纯型患儿尿液中发现 2 种形态 USCs:p-USCs I 和 p-USCs II。其中,p-USCs I 形态与正常 USCs 相似,最多传至 8 代;p-USCs II 细胞胞体可见少量空泡,胞体较大,散在排列,最多可传至 5 代(图 1)。

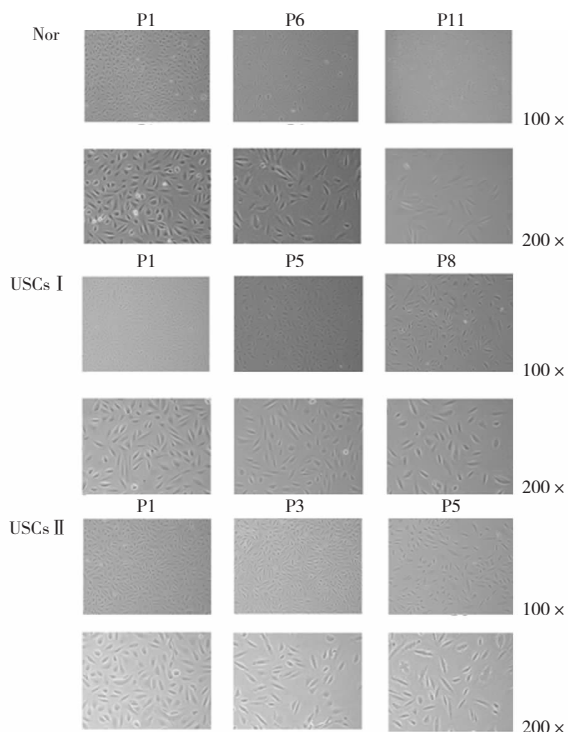


图 1 p-USCs(p-USCs I、p-USCs II)及 USCs 3 种细胞形态
Fig.1 Morphology of p-USCs(p-USCs I, p-USCs II) and USCs

2.2 p-USCs 与 USCs 增殖能力比较

USCs、p-USCs I 及 p-USCs II 细胞均呈对数生长(图 2)。培养第 3 天开始,p-USCs II 较 USCs 及 p-USCs I 生长缓慢,第 5 天有统计学差异($F=9.278, P=0.002$);此后 p-USCs II 生长缓慢更加明显($F=34.010, P=0.000$)。倍增时间显示(表 1),自 P2 代开始,p-USCs(p-USCs I 及 p-USCs II)倍增时间较 USCs 延长,差异有统计学意义($F=28.280, P=0.000$),且随传代次数增加,3 组细胞间倍增时间差异愈加明显($F=217.300, P=0.000$)。相同代数下,p-USCs II 倍增时间较 p-USCs I 延长更明显。

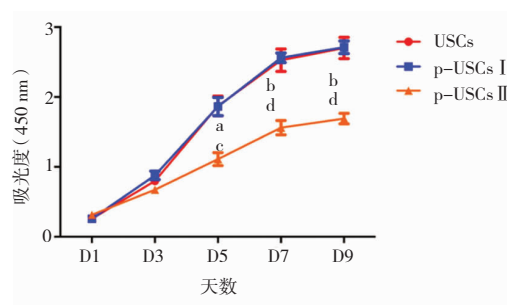


图 2 p-USCs (p-USCs I、p-USCs II) 及 USCs 生长曲线
Fig.2 Growth curve of p-USCs (p-USCs I, p-USCs II) and USCs

2.3 p-USCs 与 USCs 凋亡比较

流式细胞术检测显示(图 3),USCs、p-USCs I、p-USCs II 3 种细胞凋亡无明显差异,经统计学分析 3 种细胞早期凋亡、晚期凋亡及总凋亡无差异。

2.4 p-USCs 与 USCs 表面标志物比较

流式细胞术检测显示(图 4),p-USCs(p-USCs I、p-USCs II)较 USCs CD73 表达降低,差异无统计学意义;p-USCs II 较 USCs 及 p-USCs I CD90 表达下降,差异无统计学意义;其余 CD 标志物(CD24、CD29、CD34、CD105、CD146)3 者表达无差异。

2.5 p-USCs 与 USCs 肾系标志物比较

免疫荧光(图 5A)及 Western blot(图 5B)结果均显示,p-USCs II 肾系标志物(Pax2)表达较 USCs 及 p-USCs I 下降,差异有统计学意义($F=26.930, P=0.001$);p-USCs I 较 USCs 肾系标志物(Pax2)表达有下降趋势。

表 1 p-USCs (p-USCs I、p-USCs II) 及 USCs 倍增时间比较 (h)

Tab.1 Comparison the doubling times of p-USCs (p-USCs I, p-USCs II) with USCs (h)

	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈
USCs	21.69 $\pm$ 0.94	23.23 $\pm$ 1.37	26.05 $\pm$ 1.79	27.73 $\pm$ 1.48	32.37 $\pm$ 2.05	34.43 $\pm$ 2.09	37.81 $\pm$ 1.12	41.07 $\pm$ 2.36
p-USCs I	21.59 $\pm$ 0.67	27.07 $\pm$ 2.37 ^a	31.39 $\pm$ 2.44 ^a	32.86 $\pm$ 1.80 ^b	37.92 $\pm$ 2.85 ^a	44.80 $\pm$ 4.81 ^b	50.63 $\pm$ 2.50 ^b	57.31 $\pm$ 3.30 ^b
p-USCs II	23.34 $\pm$ 2.28	30.62 $\pm$ 1.92 ^{bc}	40.15 $\pm$ 3.08 ^{bc}	48.39 $\pm$ 2.94 ^{bc}	60.07 $\pm$ 3.12 ^{bc}			
F/t 值	3.282	28.280	61.740	185.600	217.300			
P 值	0.060	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:p-USCs I 组/p-USCs II 组与 USCs 组比较,a: $P<0.01$,b: $P<0.001$;p-USC II 组与 p-USCs I 组比较,c: $P<0.001$

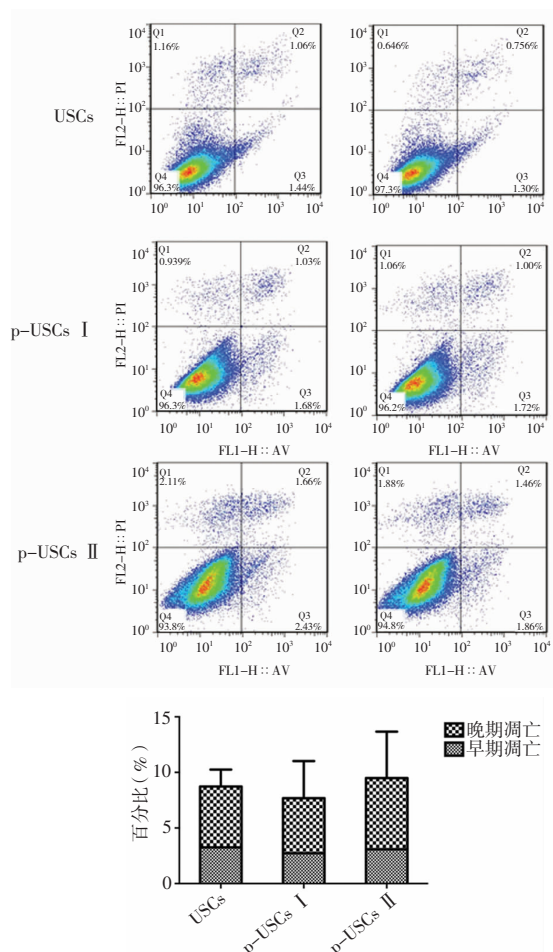


图3 p-USCs(p-USCs I、p-USCs II)及USCs 凋亡

Fig.3 Apoptosis of p-USCs (p-USCs I, p-USCs II) and USC

2.6 p-USCs 与 USC 自噬水平比较

Western blot 结果显示(图 6), p-USCs(p-USCs I、p-USCs II)较 USC 自噬标志蛋白 LC3 II 表达减少($F=15.060$, $P=0.002$); p-USCs I 与 p-USCs II LC3 II 蛋白表达无差异。

3 讨论

尿源干细胞作为一种具有良好自我增殖能力和多向分化能力的成体干细胞,近年来得到了广泛关注。既往研究表明,USCs 具有间充质干细胞特性,表达间充质干细胞标志物(如 CD24、CD29、CD73、CD90)、肾系标志物(CD224、CD13、Pax2 及 Pax8)、肾小球脏层上皮细胞(prodocrin 和 synaptopodin)和壁层上皮细胞特异性标志物(CD146)^[6,14],不表达造血干细胞表面标记物(如 CD34)、肾小管、输尿管及尿道上皮细胞标志物^[15],以上细胞标志物表达水平提示 USC 可能是从肾脏肾小球鲍曼囊的脏层-壁层上皮细胞交界处脱落下的肾干/祖细胞,参与调控生理及病理状态下足细胞的更新及再生^[16-17],USCs 损伤可能影响病理状态下的足细胞修复过程。此外,USCs 源于肾脏,组织来源上的优势使其有望成为替代肾脏组织活检进行儿童 PNS 发生发展判定的一种全新、无创的检测手段。

配对盒基因-2(paired box 2, Pax2)表达于胎肾的小管及间充质中,参与早期上皮细胞转化,肾脏

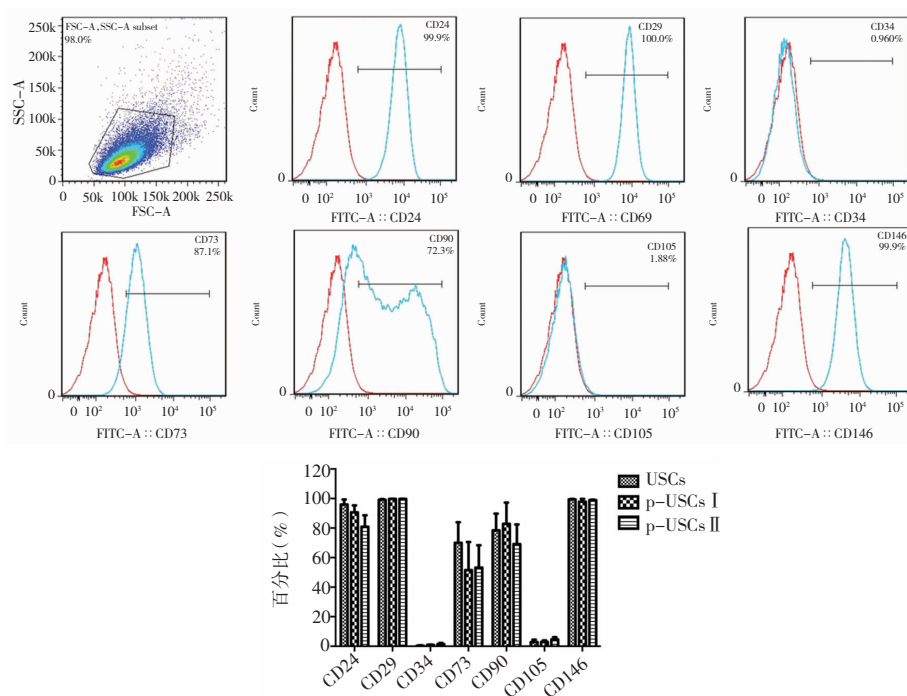


图4 p-USCs (p-USCs I、p-USCs II) 及 USC CD 标志物表达

Fig.4 Expression of CD marker of p-USCs (p-USCs I, p-USCs II) and USC

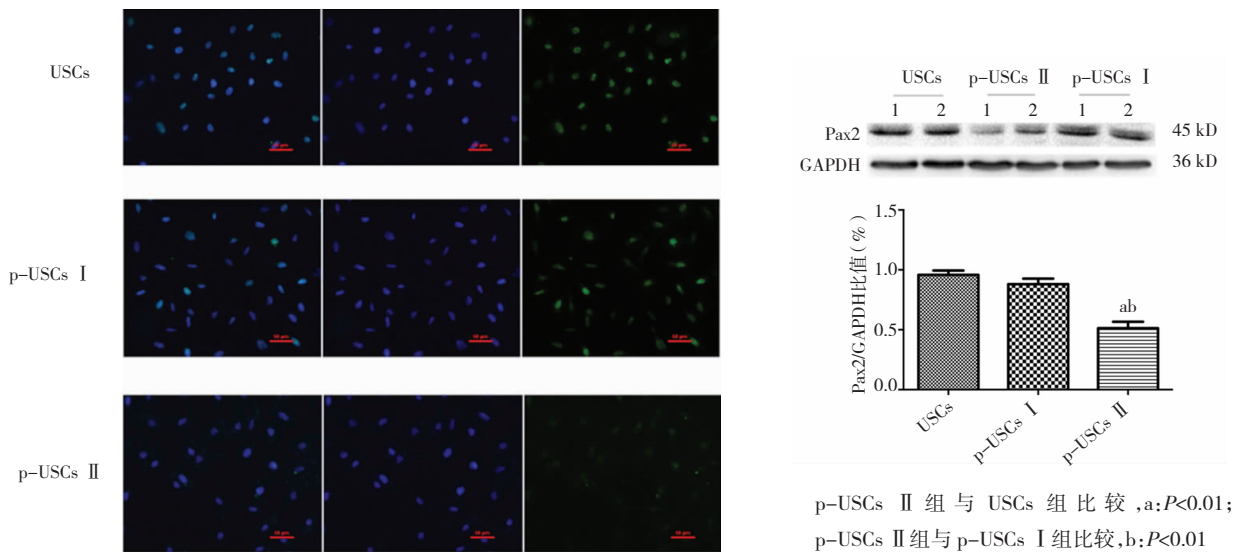


图 5 p-USCs (p-USCs I, p-USCs II) 及 USCs Pax2 表达

Fig.5 Expression of Pax2 of p-USCs (p-USCs I, p-USCs II) and USCs

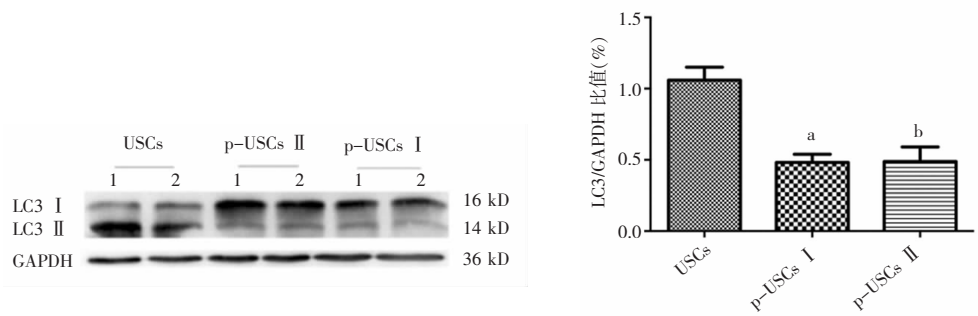
p-USCs I 组与 USCs 组比较, a: $P < 0.01$; p-USCs II 组与 USCs 组比较, b: $P < 0.01$

图 6 p-USCs (p-USCs I, p-USCs II) 及 USCs 自噬水平

Fig.6 Autophagy level of p-USCs (p-USCs I, p-USCs II) and USCs

发育成熟后少量表达于肾小球鲍曼囊上皮细胞及集合管,是肾干/祖细胞生物学特性重要因子之一^[18-19]。本实验发现, p-USCs II Pax2 表达水平较 USCs 及 p-USCs I 下降,差异有统计学意义。我们认为, Pax2 的表达水平差异可能与 p-USCs 状态密切相关, Pax2 是否可以作为一种较为准确的、对 p-USCs 进行分类的筛选指标,需进一步试验。

自噬通过调控胞内蛋白质循环利用,为细胞的增殖、存活提供再利用原料。自噬在生理及病理状态下均有发生,当细胞处于应激(如氧化压力、低氧、饥饿等)状态时维持细胞内环境稳定。然而,过度激活的自噬又会导致细胞凋亡^[20]。足细胞自噬活性与其生物学特征密切相关,正常情况下,足细胞存在基础自噬活性,且相比于肾脏其他细胞表达出更高的自噬水平。在糖尿病肾病小鼠模型中,足细胞自噬活性降低,激活自噬后足细胞损伤及肾小球病理改变减轻^[21]。表明足细胞正常的自噬活性参与维持

其结构及功能完整性,自噬活性的改变可能与足细胞损伤进程密切相关。

自噬在干细胞生物学特性维持过程中同样发挥重要的调节作用。人间充质干细胞自噬活性在维持自我更新能力过程中起着重要的调控作用^[22-25]。本实验发现, USCs 存在基础自噬, p-USCs 自噬活性下降,细胞增殖能力降低。由此推断,正常情况下 USCs 的基础自噬活性参与维持其生物学特性,疾病状态下 p-USCs 受损,自噬活性改变,自我更新能力下降,可能参与儿童 PNS 的发病。

研究表明,自噬活性与应激条件下细胞凋亡相关。但本实验 p-USCs I、p-USCs II 及 USCs 三者早期凋亡及晚期凋亡均无差异,提示 PNS 患儿自噬活性下降可能对 p-USCs 凋亡无影响。由于未检测不同代数下细胞凋亡与自噬情况,故自噬活性改变与 p-USCs 凋亡之间的关系仍需进一步实验研究。

USCs 获取方法无创、安全,价格低,是一种具有

较强自我更新能力的成体干细胞。USCs 源于肾脏,组织来源上的优势使其有望成为替代肾脏组织活检进行儿童 PNS 发生发展判定的一种全新、无创的检测手段。本课题组已成功从 PNS 患儿尿液中分离 p-USCs 进行体外培养扩增,并探讨其生物学特性。研究发现,与 USC 相比,p-USCs 自噬活性下降,细胞增殖能力降低,p-USCs 自噬活性的改变可能与儿童 PNS 发病机制相关。下一步,本课题组拟收集 PNS 患儿不同时期尿液(初发/复发、使用/未用激素、加用/未用免疫抑制剂等),分离培养 USC,比较其生物学特征差异,结合临床特点,探讨不同疾病时期的 USC 是否可以作为一种无创、有效的生物学指标反映儿童 PNS 发生、发展及预后,为儿童肾脏疾病的诊断及治疗提供更好的技术方法。

致谢

感谢重庆医科大学附属儿童医院患儿及家属的理解和配合,感谢重庆医科大学附属儿童医院儿研所各位老师的帮助,感谢美国维克森林大学组织细胞治疗中心主任张元原教授给予的技术指导,感谢各位同门的支持鼓励。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 91 所医院 1990~2002 年小儿慢性肾衰竭 1268 例调查报告[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(10): 724-730.
- [2] Filler G, Young E, Geier P, et al. Is there really an increase in non-minimal change nephrotic syndrome in children?[J]. Am J Kidney Dis, 2003, 42(6): 1107-1113.
- [3] Banaszak B, Banaszak P. The increasing incidence of initial steroid resistance in childhood nephrotic syndrome[J]. Pediatr Nephrol, 2012, 27(6): 927-932.
- [4] Bibiloni Mdel M, Pons A, Tur JA. Prevalence of overweight and obesity in adolescents: a systematic review[J]. ISRN Obes, 2013, 2013: 392747.
- [5] Guo J, Zou Y, Wu Z, et al. Protective effects of mesenchymal stromal cells on adriamycin-induced minimal change nephrotic syndrome in rats and possible mechanisms[J]. Cytotherapy, 2014, 16(4): 471-484.
- [6] Zhang Y, McNeill E, Tian H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction[J]. J Urol, 2008, 180(5): 2226-2233.
- [7] 石冬梅, 李昊, 张原元, 等. 儿童原发性肾病综合征患者尿源干细胞分离培养技术研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(11): 1351-1357.
- [8] Gao P, Han P, Jiang D, et al. Effects of the donor age on proliferation, senescence and osteogenic capacity of human urine-derived stem cells[J]. Cytotechnology, 2017, 69(5): 751-763.
- [9] Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, et al. Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells[J]. Cells Tissues Organs, 2010, 191(6): 453-465.
- [10] Fossett E, Khan WS. Optimising human mesenchymal stem cell numbers for clinical application: a literature review[J]. Stem Cells Int, 2012, 2012: 465259.
- [11] Bagnasco S, Racusen L. Proteinuria and epithelial-to-mesenchymal transition: the role of complement[J]. Am Soc Nephrol, 2009, 20(3): 459-460.
- [12] Kurts C, Panzer U, Anders HJ, et al. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(10): 738-753.
- [13] Liu LL, Qin Y, Cai JF, et al. Th17/Treg imbalance in adult patients with minimal change nephrotic syndrome[J]. Clin Immunol, 2011, 139(3): 314-320.
- [14] Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology[J]. Stem Cell, 2013, 31(9): 1840-1856.
- [15] Chun SY, Kim HT, Lee JS, et al. Characterization of urine-derived cells from upper urinary tract in patients with bladder cancer[J]. Urology, 2012, 79(5): 1186.e1-7.
- [16] Ronconi E, Sagrinati C, Angelotti ML, et al. Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(2): 322-332.
- [17] Appel D, Kershaw DB, Smeets B, et al. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(2): 333-343.
- [18] 侯晓明, 陈星, 王玉林. Pax2 在肾脏发育和肾疾病中的调控作用[J]. 遗传, 2011, 33(9): 931-938.
- [19] Lindoso RS, Verdoorn KS, Einicker-Lamas M. Renal recovery after injury: the role of Pax-2[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(9): 2628-2633.
- [20] Chen W, Sun Y, Liu K, et al. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(12): 1210-1216.
- [21] Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(4): 1084-1096.
- [22] Ihnat MA, Thorpe JE, Kamat CD, et al. Reactive oxygen species mediate a cellular "memory" of high glucose stress signalling[J]. Diabetologia, 2007, 50(7): 1523-1531.
- [23] Guan JL, Simon AK, Prescott M, et al. Autophagy in stem cells[J]. Autophagy, 2013, 9(6): 830-849.
- [24] 任立鹏, 华进联, 彭莎. 自噬在发育及干细胞中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(9): 998-1003.
- [25] Dykstra B, Olthof S, Schreuder J, et al. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells[J]. Exp Med, 2011, 208(13): 2691-2703.

(责任编辑: 方 济)