

文章编号 1006-8147(2021)01-0001-06

论 著

健康成人尿源性干细胞的分离、培养与鉴定

余胡燕,刘颖,顾秋华,连宇航,鲁振宇,李栋

(天津医科大学总医院肾脏内科,天津 300052)

摘要 目的:分离培养和鉴定健康成人尿源性干细胞(USCs)。方法:收集3名健康成人新鲜尿液,采用贴壁培养法分离培养细胞。进一步观察细胞形态,对细胞进行染色体核型分析,流式细胞术检测细胞表面标志物CD73、CD90、CD105、CD34和CD45的表达情况,采用茜素红及油红O染色分别检测钙结节和脂质的形成以验证细胞成骨和成脂分化能力。结果:成功从健康成人新鲜尿液中分离到USCs,该细胞贴壁生长,其外观呈梭形,具有较强的体外增殖能力,且传代过程中其染色体核型并未改变;细胞表面标志物CD73、CD90、CD105的阳性表达率均达到99%,CD34和CD45均呈阴性,阳性率均低于2%;茜素红和油红O染色均呈阳性。结论:从健康成人尿液中成功分离培养出了USCs,并且鉴定了其具有较强的稳定增殖和分化能力。

关键词 尿源性干细胞;体外培养;分离;鉴定

中图分类号 R329.2

文献标志码 A

Isolation, cultivation and identification of healthy adults urine-derived stem cells

YU Hu-yan, LIU Ying, GU Qiu-hua, LIAN Yu-hang, LU Zheng-yu, LI Dong

(Department of Nephrology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To isolate, culture, and identify the urine-derived stem cells (USCs) from healthy adults. **Methods:** Three fresh urine samples from healthy adults were collected and cells were isolated and cultured by adherent culture. Further, we observed the cell morphology, analyzed the chromosome karyotype, detected the expression of cell surface markers CD73, CD90, CD105, CD34 and CD45 by flow cytometry. Alizarin red and oil red O staining were used to detect the formation of calcium nodules and lipid to verify the ability of osteogenic and adipogenic differentiation. **Results:** USCs were successfully obtained from the fresh urine of healthy adults. The cells adhered to the plastic, had a long fusiform appearance and a strong ability of proliferation *in vitro*, and had no change in chromosome karyotype during subculture. The positive expression rates of cell surface markers CD73, CD90 and CD105 were 99%. CD34 and CD45 are negative and positive rates were both less than 2%. Alizarin red and oil red O staining were positive. **Conclusion:** USCs are successfully isolated and cultured from the urine of healthy adults, and its strong ability of stable proliferation and differentiation is identified.

Key words urine-derived stem cell; *in vitro* culture; isolation; identification

人尿源性干细胞(human urine-derived stem cells, h-USCs)是从人体尿液中分离,并可在体外培养环境中大量增殖的一种成体干细胞。2008年,Zhang等^[1]首次报道了尿液中存在h-USCs。该研究以及后续相关研究表明,h-USCs的生物学性质类似于间充质干细胞(MSCs),可能是人体MSCs的新成员。h-USCs可分泌多种细胞因子,包括生长因子、血管生成因子,具有促进组织再生、调节免疫作用,并具备向骨、软骨、脂肪等组织分化的潜能^[2]。目前h-USCs的相关研究仍处在起步阶段,多数集中于h-USCs的应用,而对h-USCs分离培养过程及生物学性质的研究数量不足,且在不同研究中,h-USCs的生物学特性存在较大的差异性。在本研究中,笔

者将尝试从健康成年人自然排出的尿液中提取和培养尿源性干细胞,并对其表面标志物的表达情况和定向分化能力进行分析鉴定,以增进对h-USCs生物学性质的了解,获取更好质量来源的h-USCs,为后续各种疾病治疗和组织工程等研究领域提供可靠的种子细胞。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 D-PBS缓冲液、D-MEM/F-12培养基、胰蛋白酶、D-HANKS平衡盐缓冲溶液、胎牛血清购于美国GIBCO公司;Human CD73、CD90、CD105、CD34和CD45均购于美国BD公司;茜素红购于美国Sigma公司;红油O染液购于中国Solarbio公司。

1.2 主要器材 FACSCanto II流式细胞仪(美国BD公司);CO₂孵箱(美国Thermo公司);50 mL离心管(美国Corning公司);离心机(上海安亭科学仪器厂);倒置生物显微镜(日本Nikon ECLIPSE TE300);

基金项目 赵以成医学科学基金青年孵育项目(ZYYFY2018002)

作者简介 余胡燕(1995-),女,硕士在读,研究方向:肾病学;通信作者:李栋,E-mail:lidong430@126.com。

GS型超净台(苏州姑苏精华设备厂)。

1.3 方法

1.3.1 尿液的收集 尿液采集自天津医科大学总医院体检中心的 3 名健康志愿者。无菌尿瓶中预先添加 10 mL 含 10%FBS、1%双抗的 DMEM 高糖培养基,取 200 mL 清洁中段尿液于其中,12 h 内低温运输至实验室并完成处理。

1.3.2 尿源性干细胞分离与培养 (1)分离和原代培养:将获取的清洁中段尿液经 4℃,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清;再加入 10 mL D-PBS 缓冲液清洗,4℃,1 500 r/min 离心 5 min,收集底部细胞沉淀。将收集的细胞沉淀用 1 mL D-MEM/F-12 培养基重悬,种入 12 孔细胞培养孔板中,置于 37℃,5%CO₂ 细胞培养箱中静置培养。每隔 3 d 无污染则更换培养液,有污染则弃去,同时在倒置显微镜下观察细胞生长情况并进行拍照。上述所有操作步骤均在清洁无菌环境中完成。(2)传代培养:选取细胞覆盖 80%左右的板孔进行细胞传代。用 PBS 洗涤液清洗 1 次;将洗涤完的细胞用 0.05%胰蛋白酶 37℃消化 2 min,倒置显微镜下观察细胞形态;终止消化,反复轻柔吹打细胞悬液,离心后重悬细胞,转移至铺有 0.1%明胶的 12 孔板(标记为 P1)中,放入培养箱中培养 4~6 h 后进行换液,以后每 3~4 d 换 1 次液;待细胞长到 70%~80%时,用胰蛋白酶消化,将细胞传入 10 cm 培养皿中(标记为 P2),每 3~4 d 换 1 次液,依次重复上述步骤传代。

1.3.3 冻存 用 0.05%胰蛋白酶消化处于细胞覆盖率在 70%~80%板孔的细胞,制备成单细胞悬液。再将细胞悬液进行离心,去上清液,留取细胞沉淀。向细胞沉淀中加入无血清细胞冻存液,装入冻存管中,标记细胞来源、细胞培养代数、细胞数量、冻存日期等信息,最后将密封好的冻存管先放入-80℃冰箱中,隔天放入液氮瓶中长期保存。

1.3.4 尿源性干细胞的染色体核型分析 取上述培养的第 8 代细胞进行染色体稳定性分析。培养的细胞用低渗溶液处理,用甲醇乙酸溶液固定。将铺展在玻片上的中期染色体用胰蛋白酶消化,然后进行 Giemsa 染色,在每条染色体上产生 G 带。对捕获的图像进行标准细胞遗传学分析,并使用 CytoVision 软件进行核型分析。

1.3.5 尿源性干细胞表面标志物的鉴定 取 P3 代尿源性干细胞,胰蛋白酶消化离心后,细胞沉淀中加入 PBS 液重悬细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。以 100 μL 分装于 EP 管中。加入 CD73、CD90、CD105、CD34、CD45 单克隆抗体液。4℃冰上孵育

30 min,PBS 液洗涤后,重悬细胞上机检测。以 flowjo 软件进行数据分析。

1.3.6 尿源性干细胞的成骨诱导分化 取 P2 代细胞,按 1 000 个/cm² 的密度铺板于 6 孔板中;当细胞覆盖到板孔的 70%~80%后,每孔加入成骨诱导培养基,放入培养箱中培养;以后每隔 2~3 d 更换 1 次培养基;当培养到 3 周后,将细胞从培养箱中取出,去除板孔中的培养基,用 PBS 液洗涤 2~3 次后,加入 4%多聚甲醛,室温固定 20 min;去除 4%多聚甲醛,再用 PBS 洗涤 2~3 次,每次隔 20 min;最后一次去除 PBS,加入去离子水冲洗,加入配制好的茜素红染色剂,覆盖培养的细胞,室温孵育 30 min;去离子水冲洗后,在倒置显微镜下观察培养细胞染色情况并进行染色。

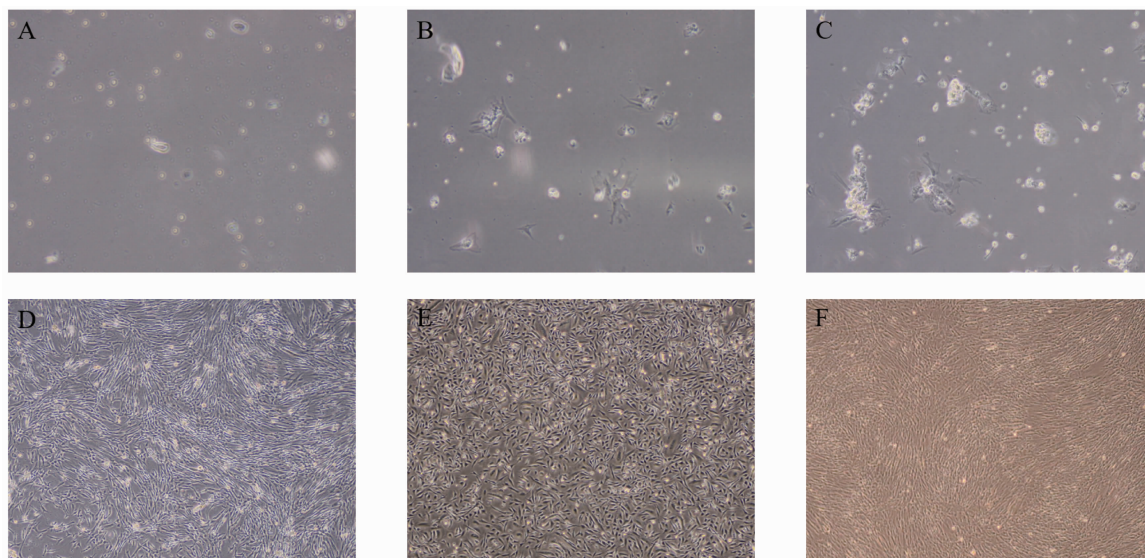
1.3.7 尿源性干细胞的成脂诱导 取 P2 代的细胞,复苏后重复上述操作步骤,此过程将培养基换为成脂诱导培养基培养,2 周后,重复上述步骤用油红 O 染色,在显微镜下观察并进行拍照。

2 结果

2.1 尿源性干细胞的体外培养与细胞形态 尿样取自 3 名健康成人,所有培养样本均未发现细菌或真菌污染。大多数尿液细胞是终末分化的,更换培养基后可将其去除,每 200 mL 尿液分离出 10 个贴壁生长的尿源性干细胞集落。只有少数尿细胞可以附着在培养板上,细胞培养 2 d 后,见图 1A。在接种后 4 d,可以观察到贴壁的细胞集落形成,细胞呈短梭形,见图 1B。在接种后 8 d,细胞集落开始增殖,见图 1C。接种后第 12~15 天达到 90%左右融合,细胞形态逐渐拉长,呈成纤维细胞样形态,多数为长梭形,胞体狭长,胞质有两个突起向外伸出;少部分细胞有较多突起,呈多角星形,细胞在密集处的排列具有一定方向性(图 1D)。P2 代细胞在 3~4 d 达到 90%以上的融合,保持长梭形形态,胞质较原代更加饱满,均匀布满培养板,部分重叠,细胞排列不规则,培养基内的杂质细胞较原代显著减少(图 1E)。P4 代细胞在 2~3 d 达到 90%以上的融合,细胞保持长梭形形态,细胞间紧密贴合,呈旋涡状排列(图 1F)。

2.2 尿源性干细胞的染色体核型 对 P8 代 USC_s 克隆进行染色体核型分析,以验证 USC_s 传代后的染色体稳定性。Ciems_a 显带分析 20 个分裂中期细胞,均具有 2 个 X 染色体以及 22 对常染色体(图 2),未见克隆性核型异常。

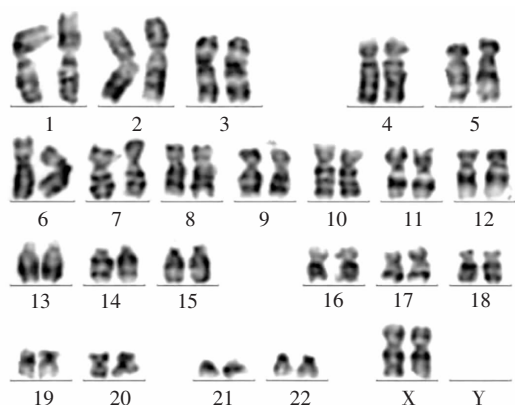
2.3 流式细胞术对 USC_s 进行表面标志物鉴定 用流式细胞仪检测所培养的 P2 代和 P4 代细胞的表面标志物 CD73、CD90、CD105、CD45、CD34 的表达



注:A: 原代细胞培养 2 d 后的形态;B: 原代细胞培养 4 d 后的形态;C: 原代细胞培养 8 d 后的形态;D: 原代细胞培养 12 d 后的形态;E: P2 代细胞培养传代前的形态;F: P4 代细胞传代前的形态

图1 健康成人尿源性干细胞形态观察结果(200×)

Fig 1 Morphological observation of urine-derived stem cells from healthy adults(200×)



注:P8 代 USCs 克隆进行染色体核型分析结果

图2 健康成人尿源性干细胞染色体核型分析结果

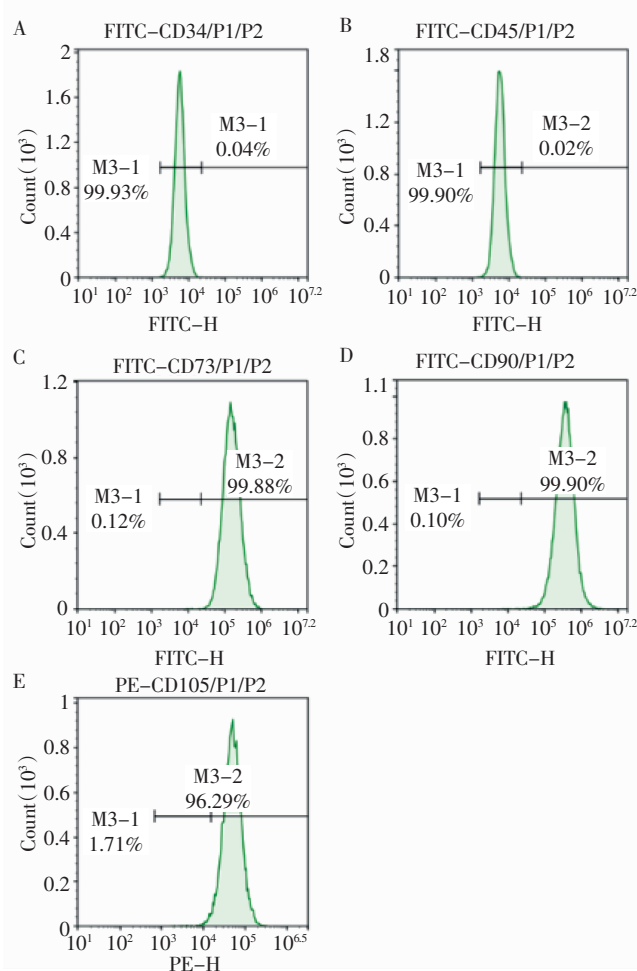
Fig 2 Results of chromosome karyotype analysis of urine-derived stem cells in healthy adults

情况。结果发现,P2 代细胞和 P4 代细胞中 CD73、CD90、CD105 都有极高的表达率,而 CD45、CD34 的表达率极低(图 3、4)。两代细胞中 5 种表面标志分子的具体表达率如表 1 所示。

2.4 尿源性干细胞的分化试验结果

2.4.1 成骨诱导结果 成骨诱导 21 d 后,细胞形态由成纤维细胞样逐渐变为扁条形,细胞排列密集,出现重叠,茜素红染色后可见红色的钙化结节,说明培养的细胞有向成骨细胞分化的能力(图 5A)。

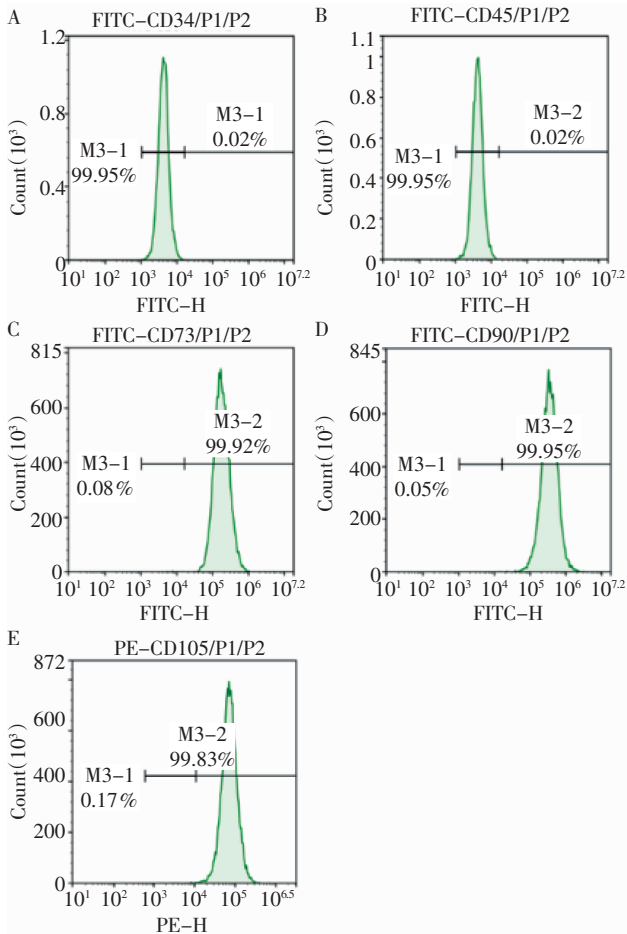
2.4.2 成脂诱导结果 成脂诱导 14 d 后,细胞内有脂滴出现,呈颗粒状或串珠状。油红 O 染色呈红色,说明培养的细胞有向脂肪细胞分化的能力(图 5B)。



注:P2 代尿源性干细胞表面标志物流式分析结果,A、B、C、D、E 分别代表 CD34、CD45、CD73、CD90、CD105

图3 健康成人 P2 代尿源性干细胞表面标志物流式分析结果

Fig 3 Results of surface markers of P2-urine derived stem cells by flow analysis from healthy adults



注: P4 代尿源性干细胞表面标志物流式分析结果, A、B、C、D、E 分别代表 CD34、CD45、CD73、CD90、CD105

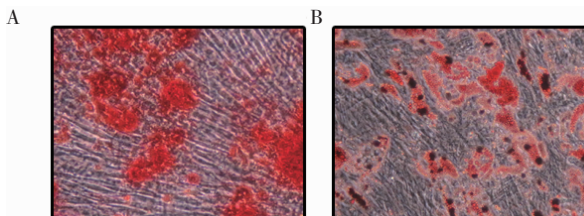
图 4 健康成人 P4 代尿源性干细胞表面标志物流式分析结果

Fig 4 Results of surface markers of P4-urine derived stem cells by flow analysis from healthy adults

表 1 细胞表面标志物的表达情况(%)

Tab 1 Expression of cell surface markers(%)

细胞	CD73	CD90	CD105	CD45	CD34
P2	99.88	99.90	98.29	0.02	0.04
P4	99.92	99.95	99.83	0.02	0.02



注: A: 茜素红染色; B: 油红 O 染色

图 5 健康成人尿源性干细胞成骨、成脂试验染色结果(200×)

Fig 5 Experimental staining results of osteogenesis and adipogenesis of urine derived stem cells from healthy adults(200×)

3 讨论

在再生医学领域, MSCs 是近年的研究热点。USCs 作为 MSCs 可能的新成员, 由于具有采集过程无创、成本低廉、伦理争议少的优势, 受到众多研究

者的关注。目前, h-USCs 在压力性尿失禁、缺血性卒中、糖尿病、急性肾损伤、慢性肾脏病等多种疾病的动物模型中展现出良好的治疗效果, 还可作为泌尿系统重建、骨组织工程的种子细胞^[3-5]。其在泌尿系统与骨组织工程中取得一系列进展, 同时在应用于伤口愈合、肾病治疗、自身免疫性疾病等方面显示出巨大的潜力。人体每天排出的尿液中约有 4×10^3 个活细胞, 这些细胞绝大多数为终末分化细胞(主要有尿路上皮细胞、肾小管上皮细胞等), 少数为分化中细胞, 未分化的干细胞(即 USCs)占比约为 0.2%^[1,9]。本实验采用贴壁培养法, 利用终末分化细胞无附壁性的特点, 在更换培养基时去除终末分化细胞。分化中细胞和 USCs 均可在培养板上贴壁生长, 但分化中细胞增殖能力弱于 USCs, 在经过 2~3 次传代培养后, 培养板中的 USCs 可达到较为可观的纯度^[1]。因此, 本研究采用 P2、P4 代细胞进行流式分析与分化实验, 此时细胞纯度较高且尚未老化。

常用的 MSCs 往往需要有创操作才能从人体中收集, 例如脂肪源性干细胞需要脂肪抽吸术, 骨髓源性 MSCs 需要骨髓穿刺等, 并且有并发症的风险, 这限制了 MSCs 的应用^[7-8]。而 USCs 的采集过程无创, 可以从绝大多数健康或疾病人群中采集, 尤其适合于自体干细胞移植治疗。脂肪、脐带等来源的 MSCs 需要酶消化法从组织块中分离出单个细胞, 而 USCs 原代培养无需酶消化, 避免了酶处理对细胞品质的影响。不同的研究中, USCs 分离培养步骤基本相同, 主要的区别在于培养基不同。USCs 培养基的共同特征在于: (1) 低血清浓度, 一般 2%~10%, 而其他 MSCs 所需血清浓度一般为 10%~20%。(2) 混合了上皮细胞培养基或添加了表皮生长因子, 提示 USCs 可能起源于上皮。USCs 目前无特异性鉴定方法, 主要通过附壁性、细胞形态、自我更新能力、多向分化潜能、表面标志物表达情况对 USCs 进行鉴定。

本实验中分离获取的细胞具有附壁生长的特性, 呈现均一的成纤维细胞样形态, 多次传代培养后, 细胞形态无明显变化, 染色体核型也在传代后保持稳定, 被成骨、成脂诱导培养基培养后可分化为骨、脂肪细胞。笔者还通过流式细胞仪检测了 P2、P4 代细胞的分子标志物, 其高表达 USCs 标志物 CD73、CD90、CD105, 均高于 98%, 不表达造血干细胞标志物 CD34、CD45, 均低于 1%, 并且 P2、P4 代的分子标志物无明显变化, 表明所收获细胞的分子标志物表达水平较为一致, 传代后分子标志物表达稳定。以上各项生物学特性与以往对 USCs 的报道基本一致, 同时也与国际细胞疗法协会对 MSCs 的定义相

符,从而证实本实验采取的分离培养方法可有效地从健康成人尿液中分离得到 USC_s^[9]。

值得注意的是,关于 USC_s 的研究中,CD105 的表达存在显著差异,在多数文献中,CD105 呈高表达或中等程度表达,然而部分研究中出现了最低达 1.8% 的表达水平^[6,10-11]。而在笔者的研究中,CD105 表达呈强阳性,P2 代、P4 代均大于 98%。这种差异性产生的原因值得探讨,因为 CD105 是定义 MSC_s 的标准之一,并且 CD105 的表达水平可能影响干细胞在疾病中的治疗效果。已有研究表明,CD105 阳性的脐血 MSC_s 对于心肌梗死有更好的心脏修复作用,而 CD105 阴性的脂肪 MSC_s 有更好的成骨分化能力^[12-13]。根据 CD105 在其他细胞中表达的研究,CD105 表达受培养环境中转化生长因子- β 、肿瘤坏死因子- α 、是否缺氧、培养基是否含血清等因素影响^[14-16]。但是在关于 USC_s 的研究中,其培养方法基本一致。因此这些环境因素难以解释 CD105 表达的异质性,这种异质性产生的原因似乎是 USC_s 自身因素引起的。有研究以小鼠脂肪 MSC_s 作为研究对象,发现 CD105 阴性细胞在传代培养后仍然保持 CD105 阴性,CD105 阳性细胞在传代后也保持 CD105 阳性,但阳性率随细胞融合度增加而有所降低,表明细胞存在 CD105 阴性或阳性亚群^[17]。由此,笔者认为 USC_s 可能也存在 CD105 阳性与 CD105 阴性的两个细胞亚群,这种观点可以较好地解释 USC_s 中 CD105 表达的差异性。据此观点,本实验中获取的细胞属于 CD105 阳性亚群。目前为止,尚无 USC_s 表达 CD105 的影响因素的研究,USC_s 存在 CD105 阴性/阳性亚群的观点仍需要进一步的实验验证。

目前对于 USC_s 的研究逐渐深入,USC_s 应用的疾病范围也逐渐拓宽。在组织工程应用上,USC_s 在泌尿系统组织重建中的应用研究最为广泛。组织工程尿道由尿路上皮细胞与平滑肌细胞组成,尿路上皮细胞直接接触尿液,需具备屏障功能;平滑肌细胞包裹尿路上皮细胞,为尿路上皮细胞提供支撑、保护作用。USC_s 可向尿路上皮分化,也可向平滑肌细胞分化。研究人员将 USC_s 分化为尿路上皮细胞和平滑肌细胞,并将这两种细胞接种至组织工程支架上,观察到细胞形成多层结构,并向细胞支架内渗透生长,表明 USC_s 有望用于尿道重建。此外,压力性尿失禁、神经源性膀胱动物实验显示,USC_s 促进组织再生与功能恢复,是治疗这些疾病的潜在疗法。在肾脏疾病领域,动物体内实验显示,USC_s 对缺血再灌注损伤和顺铂诱导的急性肾损伤^[18-19]、糖尿病肾

脏并发症^[20]、肾缺血及肾毒性诱导的慢性肾脏病动物模型具有肾脏保护作用^[21]。USC_s 已被广泛认为起源于肾脏,保留有肾组织表观遗传记忆,因此可能在肾谱系分化上具备优势。已有研究对 USC_s 的肾谱系分化进行了探索,结果显示,USC_s 具有与羊水来源干细胞类似的肾谱系分化能力,是一种高质量的种子细胞,可用于肾脏重建^[22]。总之,尽管目前 USC_s 研究仍处于起步阶段,但其已在肾脏疾病治疗和肾脏组织工程领域中显示出巨大的应用潜力。

本实验成功建立了人 USC_s 分离培养体系,并通过形态、分化能力、分子标志物对其进行了鉴定。所获取的 USC_s 形态均一,分化能力强,表面分子标志物表达较一致,满足对 USC_s 进行进一步研究的需求。USC_s 在细胞治疗,特别是在肾脏疾病方面有光明的应用前景,有望在肾脏组织工程、肾脏疾病模型构建方面做出贡献。

参考文献:

- [1] Zhang Y 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
- [2] Zhang D, Wei G, Li P, et al. Urine-derived stem cells: a novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine[J]. Genes Dis, 2014, 1(1): 8
- [3] Nimshitha PAM, Mohammed A, Larisa B, et al. Urine-derived cells for human cell therapy[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 189
- [4] Ling X Z, Zhang G W, Xia Y G, et al. Exosomes from human urine-derived stem cells enhanced neurogenesis via miR-26a/HDAC6 axis after ischaemic stroke[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 640
- [5] Hwang Y C, Cha S H, Hong Y, et al. Direct differentiation of insulin-producing cells from human urine-derived stem cells[J]. Int J Med Sci, 2019, 16(12): 1668
- [6] Lang R, Liu G H, Shi Y A, et al. Self-renewal and differentiation capacity of urine-derived stem cells after urine preservation for 24 hours[J]. Plos One, 2013, 8(1): e53980
- [7] Samih M A, Igne F, Atle L S, et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 168
- [8] Mahmoudifar N, Doran P M. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1340: 53
- [9] Dominici M, Blanc K L, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315
- [10] Chun S Y, Park G B, Kwon T G, et al. Analysis of stability of human urine derived stem cells during serial subcultures[J]. Tissue Eng Regen Med, 2015, 12(S2): 122
- [11] Bharadwaj S, Liu G H, Shi Y A, et al. Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering[J]. Tissue Eng Pt A, 2011, 17(15-16): 2123

(下转第 21 页)

- poventilation in hospitalized patients: prevalence, effects, and outcome[J]. *Am J Med*, 2004, 116(1): 1
- [6] 中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸障碍学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(2011 年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(1): 9
- [7] Kim A M, Keenan B T, Jackson N, et al. Tongue fat and its relationship to obstructive sleep apnea[J]. *Sleep*, 2014, 37(10): 1639
- [8] Newman A B, Foster G, Givelber R, et al. Progression and regression of sleep-disordered breathing with changes in weight: the Sleep Heart Health Study[J]. *Arch Intern Med*, 2005, 165(20): 2408
- [9] White D P. The pathogenesis of obstructive sleep apnea [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(1): 1
- [10] 何权瀛, 陈宝元. 睡眠呼吸病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 119-130
- [11] 曾玮, 李进勇, 付维洋, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者肺功能状况及其影响因素研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2015, 23(11): 29
- [12] Bickelmann A G, Burwell C S, Robin E D, et al. Extreme obesity associated with alveolar hypoventilation; a Pickwickian syndrome[J]. *Am J Med*, 1956, 21(5): 811
- [13] Harada Y, Chihara Y, Azuma M, et al. Obesity hypoventilation syndrome in Japan and independent determinants of arterial carbon dioxide levels[J]. *Respirology*, 2014, 19(8): 1233
- [14] Bonnet M H, Arand D L. Clinical effects of sleep fragmentation versus sleep deprivation[J]. *Sleep Med Rev*, 2003, 7: 297
- [15] Van Dongen H P A, Maislin G, Mullington J M, et al. The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effect of neurobehavioral function and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation[J]. *Sleep*, 2003, 26: 117
- [16] Spiegel K, Tasali E, Penev P, et al. Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite[J]. *Ann Intern Med*, 2004, 141: 846
- [17] Spiegel K, Sheridan J F, Van Cauter E. Effect of sleep deprivation on response to immunization[J]. *JAMA*, 2002, 288: 1471
- [18] Banks S, Dinges D F. Behavioral and physiological consequences of sleep restriction[J]. *J Clin Sleep Med*, 2007, 3: 519
- [19] Dempsey J A, Veasey S C, Morgan B J, et al. Pathophysiology of sleep apnea[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90: 47

(2020-06-19 收稿)

(上接第 5 页)

- [12] Gaebel R, Furlani D, Sorg H, et al. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration[J]. *Plos One*, 2011, 6(2): e15652
- [13] Jiang T, Liu W, Lv X J, et al. Potent *in vitro* chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(13): 3564
- [14] Mark P, Kleinsorge M, Gaebel R, et al. Human mesenchymal stem cells display reduced expression of CD105 after culture in serum-free medium[J]. *Stem Cells Int*, 2013, 2013: 698076
- [15] Sa'nchez-Elsner T, Botella L M, Velasco B, et al. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 43799
- [16] Li C G, Guo B Q, Ding S G, et al. TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1 [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2B): 1189
- [17] Anderson P, Carrillo-Gálvez A B, García-Pérez A, et al. CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities[J]. *Plos One*, 2013, 8(10): e76979
- [18] Tian S F, Jiang Z Z, Liu Y M, et al. Human urine-derived stem cells contribute to the repair of ischemic acute kidney injury in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 5541
- [19] Sun B S, Luo X, Yang C F, et al. Therapeutic effects of human urine-derived stem cells in a rat model of cisplatin-induced acute kidney injury *in vivo* and *in vitro* [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 8035076
- [20] Jiang Z Z, Liu Y M, Niu X, et al. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 24
- [21] Zhang C, George S K, Wu R P, et al. Renal protection of urine-derived stem cells in a chronic kidney disease rat model induced by renal ischemia and nephrotoxicity [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(3): 435
- [22] Choi J Y, Chun S Y, Ha Y S, et al. Potency of human urine-derived stem cells for renal lineage differentiation[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2017, 14(6): 775

(2020-07-25 收稿)