

# 糖尿病肾病患者尿源性干细胞的分离鉴定及与健康人尿源性干细胞的细胞生物学比较研究

陶立<sup>1,2</sup> 马文军<sup>1,2</sup> 龚梦嘉<sup>2</sup> 毕杨<sup>2</sup> 魏光辉<sup>1,2</sup> 张元原<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科, 重庆 400014; <sup>2</sup>重庆医科大学附属儿童医院, 儿科研究所干细胞实验室, 儿童泌尿生殖发育与组织工程重庆市重点实验室, 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地, 重庆 400014)

**摘要** 干细胞移植是糖尿病肾病新的治疗途径, 但异种干细胞存在伦理及免疫排斥等问题。该研究从糖尿病肾病患者尿液中提取出一种类似干细胞的细胞, 称之为糖尿病病人尿源性干细胞(USCs from patients with diabetic nephropathy, D-USCs), 并比较了与健康人尿源性干细胞(urine derived stem cells, USCs)生物学特性的差异。通过观察细胞形态, 流式细胞术检测细胞表面标志物, 茜素红及油红O染色分别检测成骨和成脂分化潜能, 以鉴定其干细胞特性。通过绘制生长曲线比较D-USCs与USCs增殖能力, 人促血管生成因子检测试剂盒检测细胞外分泌因子的表达情况, 流式细胞术检测细胞凋亡率的差异。结果表明, 此类细胞可以在体外分离培养, 连续传代生长, 细胞形态保持米粒状, 表达间充质干细胞标志物(包括CD 24、CD 29、CD 73、CD 90、CD 105)、周细胞标志物(CD 146), 不表达造血干细胞标志物(包括CD 31、CD 34、CD 45), 具有成骨和成脂分化的潜能。与USCs相比, D-USCs的增殖能力受到损伤, 分泌因子种类基本保持一致, 但数量上有所减少, 细胞凋亡率升高。综上所述, 该研究成功从糖尿病肾病患者尿液中提取出尿源性干细胞, 为干细胞移植治疗肾损害提供了可能的新的细胞来源, 避免了异体免疫排斥反应。

**关键词** 尿源性干细胞; 糖尿病肾病; 细胞增殖; 外分泌

## Isolation and Identification of Urine Derived Stem Cells from Patients with Diabetic Nephropathy and Comparison with Urine Derived Stem Cells from Healthy People in Biological Characteristics

Tao Li<sup>1,2</sup>, Ma Wenjun<sup>1,2</sup>, Gong Mengjia<sup>2</sup>, Bi Yang<sup>2</sup>, Wei Guanghui<sup>1</sup>, Zhang Yuanyuan<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Urology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China;

<sup>2</sup>Laboratory of Stem Cell Biology and Therapy, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Children Urogenital Development and Tissue Engineering, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China)

**Abstract** Stem cell transplantation is a new therapy for diabetic nephropathy, but there are some problems such as ethical and immune rejection of xenograft. In present study, we extracted a type of cell which was similar to stem cells from the urine of diabetic nephropathy patients, called urinary stem cell from patients with diabetic

收稿日期: 2017-08-15 接受日期: 2017-11-16

国家自然科学基金(批准号: 81570650、81371704、81370701)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-63633113, E-mail: fyyzhang2016@gmail.com

Received: August 15, 2017 Accepted: November 16, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81570650, 81371704, 81370701)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-63633113, E-mail: fyyzhang2016@gmail.com

网络出版时间: 2018-01-29 17:35:59 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180129.1735.024.html>

nephropathy (D-USCs). And we compared the biological characteristics between D-USCs and urine derived stem cells (USCs) of healthy people. The potential differentiation ability of the cells was examined by the analysis of cell morphology and surface markers via flow cytology and the staining of alizarin red and oil red O, respectively. We also mapped the growth curve to compare D-USCs and USCs of healthy people proliferative capacity. Human angiogenic factor assay kit was applied to examine the expression of extracellular secretion factor, performed flow cytology to detect cell apoptosis. Our results showed that the cells could be cultured *in vitro* continuously, and that their morphology remained the size of the grains. These cells were shown to expressing mesenchymal stem cell markers (including CD 24, CD 29, CD 73, CD 90, CD 105) and weakly cell markers (CD 146) in a lower level. And these cells did not express hematopoietic stem cell markers (including CD 31, CD 34 and CD 45). It also had bone and lipid differentiation potential. Compared with USCs, the proliferative ability of D-USCs was damaged, the secretion factor was basically consistently, the number was decreased and the apoptosis rate was increased. In summary, our results showed that D-USCs were successfully extracted from urine of patients with diabetic nephropathy. Our findings showed that D-USCs might provide a new source of cells for the treatment of renal damage by stem cell transplantation with avoiding allogeneic immune rejection.

**Keywords** urine derived stem cells; diabetic nephropathy; cell proliferation; external secretion

糖尿病是一种系统性、慢性代谢性疾病, 已经成为了全球性的健康问题。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见的慢性微血管并发症, 在西方国家, 糖尿病肾病位居终末期肾病的原发病之首, 占25%~42%<sup>[1]</sup>。目前临床只能通过控制蛋白质摄入、降低血糖、降低血压等危险因素来控制糖尿病的发展, 但是这些措施无法有效地抑制糖尿病肾病的发生与发展。

近年来, 干细胞移植治疗为糖尿病肾病的治疗开辟了新的途径。Zhang等<sup>[2]</sup>在世界上第一次从尿液中分离和鉴定一种干细胞, 称之为尿源性干细胞(urine derived stem cells, USCs)。这种细胞可通过一种非创伤、简单、安全和低成本的方法获得, 与间充质干细胞相比, USCs更容易分离得到单个细胞克隆。此外, USCs来源于肾脏, 具有很强的多向分化能力, 在慢性肾脏疾病的治疗中相对其他成体干细胞可以更高效率地分化为肾小球足细胞和功能性血管内皮细胞<sup>[3]</sup>。体外研究表明, USCs不但可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和平滑肌细胞, 还可以分化为功能性上皮细胞以及神经细胞<sup>[3]</sup>。有文献报道, USCs是组织工程重建膀胱功能的良好种子细胞之一<sup>[4]</sup>。最后, USCs没有肿瘤形成的风险, 有研究发现, 移植USCs于裸鼠皮下和肾包膜下1~3个月后未发现肿瘤组织的形成<sup>[5-6]</sup>, 这使得USCs有一个非常好的临床应用前景。

目前研究及临床使用的干细胞通常来自健康人的捐助, 虽然同种异体间充质干细胞的抗原性小,

但是来自健康人的细胞仍然可能遭受患者机体内受体的免疫排斥以及移植相关的副作用。从临床使用角度来看, 自体干细胞将是最佳的细胞来源。我们首次从糖尿病肾病患者尿液中分离提取出尿源性干细胞(USCs from patients with diabetic nephropathy, D-USCs), 为自体肾组织的修复提供了一个新的细胞治疗思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

糖尿病肾病病人细胞均来源于2016年8月至2017年3月重庆医科大学附属第一医院内分泌科住院糖尿病肾病病人清洁中段尿, 共8例。诊断标准为中华医学会内分泌学分会组织内分泌与肾脏病学相关专家制定的《中国成人糖尿病肾脏病临床诊断的专家共识》<sup>[7]</sup>。正常人的细胞来自健康成年男性, 年龄范围20~25岁。

### 1.2 试剂

F-12、K-SFM、DMEM、0.25%胰蛋白酶和胎牛血清购自Gibco公司。CD Marker、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自BD Pharmingen公司。CCK-8试剂盒购自7 Sea Biotech公司。成骨、成脂分化诱导培养基购自Cyagen公司。人促血管生成因子检测试剂盒购自R&D Systems公司。USCs专用培养基是由无血清的角质形成细胞培养基(K-SFM)和前体细胞培养基1:1混合而成。无血清的角质形成

细胞培养基需补充5 ng/mL表皮生长因子、50 ng/mL牛脑垂体提取物、30 ng/mL霍乱毒素、100 U/mL青霉素和1 mg/mL链霉素。前体细胞培养基包含3/4 DMEM和1/4人F-12、10%胎牛血清、0.4 g/mL氢化可的松、 $10^{-10}$  mol/L霍乱毒素、5 ng/mL胰岛素、 $1.8 \times 10^{-4}$  mol/L腺嘌呤、5 g/mL运铁蛋白加上 $2 \times 10^{-9}$  mol/L 3,3',5'-三碘左旋甲状腺素、10 ng/mL表皮生长因子和1%青霉素-链霉素。

### 1.3 细胞分离与培养

清洁尿道口, 收集200 mL清洁中段尿(非晨尿), 1 500 r/min离心5 min, 弃上清, 加入24 mL培养基充分吹打均匀, 均匀种于24孔板中, 每3 d换1次培养基, 观察到细胞克隆生长至孔板底面积60%~70%时进行传代培养。

### 1.4 D-USCs与USCs形态学观察

原代培养D-USCs第3 d、第7 d分别在显微镜下观察细胞克隆。待生长至60%~70%时传代, 取相同代数的D-USCs和USCs分别于P1、P2、P3代生长至第3 d时进行观察、拍照。

### 1.5 D-USCs与USCs干细胞表面标志物检测

取P2代对数生长期D-USCs和USCs, 分别制成 $1 \times 10^6$ /管细胞悬液, PBS洗2次, 共12管, 分别加入5  $\mu$ L表面标志物抗体, 4  $^{\circ}$ C避光孵育30 min, PBS洗2次, 1 500 r/min离心5 min, 弃上清后, 加入200  $\mu$ L PBS重悬, 流式细胞仪检测。

### 1.6 D-USCs与USCs成骨与成脂诱导

取P2代对数生长期D-USCs和USCs, 分别每孔

$1 \times 10^5$ 细胞接种于6孔板, 成骨与成脂各3个复孔, 细胞生长至60%~70%面积时, 换成诱导培养基。

油红O染色: 成脂诱导培养基培养7 d, 弃培养基, PBS洗3次, 4%的多聚甲醛室温下固定1 h, PBS洗3次, 配置好3:2稀释的油红O染液染色30 min, PBS洗3次, 显微镜拍照。

茜素红染色: 成骨诱导培养基培养21 d, 弃培养基, PBS洗3遍, 4%的多聚甲醛室温下固定1 h, PBS洗3次, 0.1%的茜素红染液染色10 min, PBS洗3次, 显微镜拍照。

### 1.7 D-USCs与USCs增殖能力检测

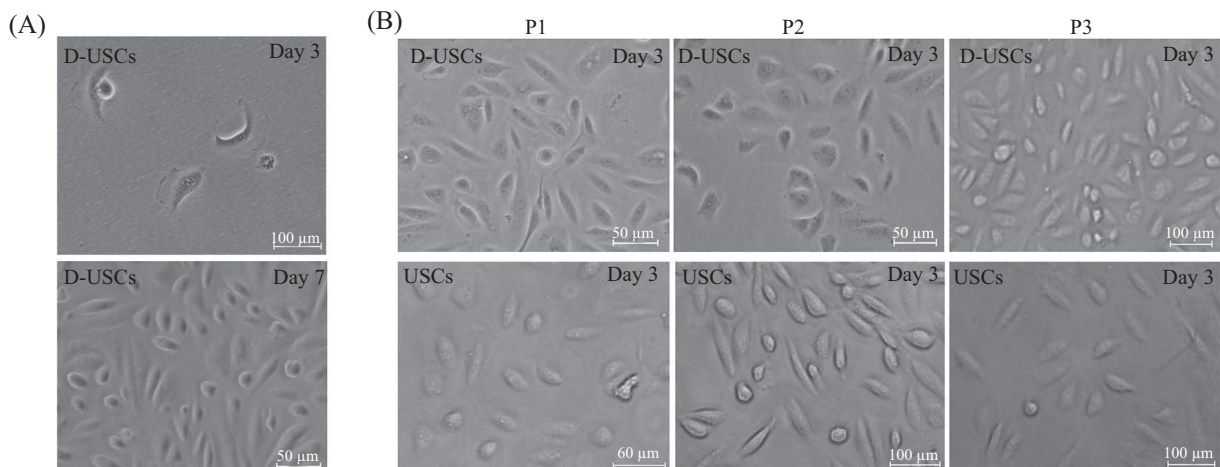
取P2代对数生长期D-USCs和USCs, 每孔1 500个细胞接种于96孔板, 设置4个复孔, 分别于1、3、5、7、9 d, 加入10  $\mu$ L CCK-8试剂, 37  $^{\circ}$ C孵育4 h后, 在450 nm处检测光密度, 以时间为横坐标, 光密度为纵坐标绘制生长曲线。

### 1.8 D-USCs与USCs分泌因子检测

取P2代对数生长期D-USCs和USCs, 以 $5 \times 10^5$ 个细胞的密度接种于10 cm培养皿, 用无血清DMEM培养基连续培养24 h。收集培养基用冻干离心机浓缩成粉末, 用人促血管生成因子检测试剂盒进行检测, X线曝光后用Quantity One软件记录膜片位点, 与说明书参考目录对比后进行分泌因子种类与表达量分析。

### 1.9 D-USCs与USCs凋亡率检测

取P2代对数生长期D-USCs和USCs, 用4  $^{\circ}$ C PBS洗2遍, 重悬于 $1 \times$ binding buffer使浓度为 $1 \times 10^6$ /mL取100  $\mu$ L细胞悬液到流式管, 加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC



A: 原代培养3 d时出现单个克隆细胞; 7 d时, 细胞增殖成集落生长; B: D-USCs和USCs的P1、P2、P3代培养3 d的细胞形态比较。

A: in primary culture 3 d, a single clonal cell appeared; primary cells cultured for 7 d, cell proliferation and formed a cluster; B: comparison of morphology of P1, P2, P3 of D-USCs and USC cells when cultured for 3 d.

图1 D-USCs和USCs细胞形态

Fig.1 Morphology of D-USCs and USC cells

和5  $\mu$ L PI抗体, 充分混匀后室温避光孵育15 min, 每管加入400  $\mu$ L 1 $\times$ binding buffer, 上机检测。

### 1.10 数据统计分析

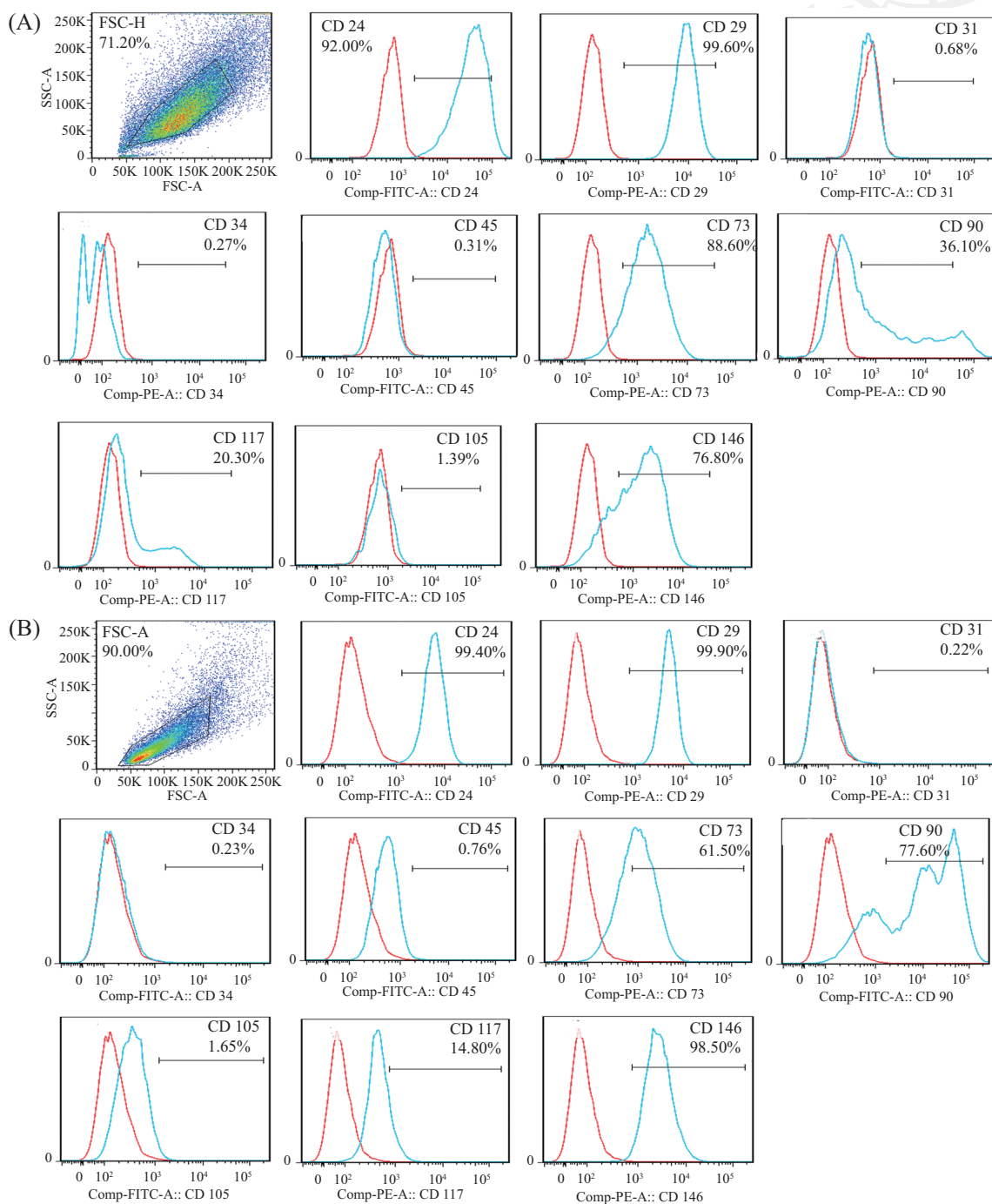
实验数据均用均值 $\pm$ 标准差形式表示, 采用GraphPad Prism V5.0统计软件进行统计学分析,

$P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 D-USCs和USCs细胞形态观察

正常人的USCs呈米粒状, 且体积较小。D-USCs



A: D-USCs细胞表面标志物; B: USC细胞表面标志物。

A: surface markers of D-USCs; B: surface markers of USC.

图2 细胞表面标志物CD 24、CD 29、CD 31、CD 34、CD 45、CD 73、CD 90、CD 105、CD 117和CD 146的流式细胞术检测结果

Fig.2 Surface markers of CD 24, CD 29, CD 31, CD 34, CD 45, CD 73, CD 90, CD 105, CD 117 and CD 146 in cells analyzed by flow cytometry

原代培养3 d时,可以观察到单个细胞克隆的出现。培养7 d时,可见细胞自我增殖呈集落生长(图1A)。细胞集落面积占孔板面积60%~70%时可以进行传代,观察细胞形态,部分呈现不规则形状,仍有大部分维持米粒状,与正常人USCs相比,维持米粒状细胞形态的细胞数较少(图1B)。

## 2.2 D-USCs和USCs细胞表面标志物的表达

采用流式细胞术检测了D-USCs和USCs细胞表面标志物的表达情况。结果显示,两种细胞都表达间充质干细胞表面标志物CD 24、CD 29、CD 73、CD 90、CD 105, D-USCs阳性率分别为92.00%、99.60%、88.60%、36.10%、1.39%, USCs阳性率分别为99.40%、99.90%、61.50%、77.60%、1.65%。两种细胞都表达周细胞表面标志CD 146, D-USCs阳性率为76.80%, USCs阳性率为98.50%。两种细胞都不表达造血细胞的表面标志CD 31、CD 34和CD 45(图2)。该结果表明,从病人尿液中分离提取的细胞比较符合间充质干细胞的特点,与USCs表达的表面标志物没有明显差异。

## 2.3 D-USCs和USCs成骨与成脂诱导观察

细胞经成骨诱导后,细胞形态在第4 d发生变

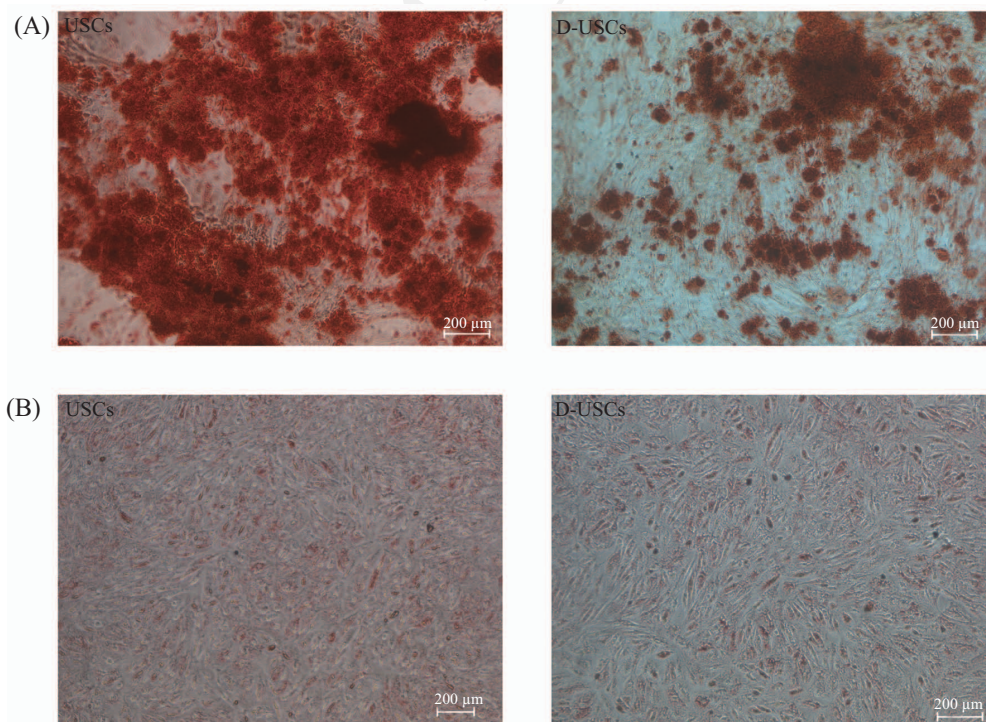
化,呈方型;第8 d时变化明显,呈鹅卵石样;第21 d细胞变为多角状,间质内大量矿盐沉积形成钙化结节。第21 d时用4%多聚甲醛固定细胞,经0.1%茜素红染色后,可见明显的红色结节(图3A),提示该细胞可以向成骨方向分化。成脂诱导7 d后,白光下可观察到细胞内有脂滴,油红O染色后脂滴呈橘红色(图3B),提示该细胞可诱导分化为成脂细胞。以上结果提示, D-USCs和USCs都具有基本的多向分化潜能, USCs诱导效率高于D-USCs,可能与D-USCs在体内高糖环境干性受损有关。

## 2.4 D-USCs与USCs生长曲线描绘

取P2代细胞连续培养9 d,可见细胞均呈对数生长,1~3 d处于生长缓慢期,3~7 d处于快速增长期,7 d后处于平台期。D-USCs生长速度明显低于USCs(图4)。以上结果说明, D-USCs增殖能力要弱于正常人USCs,其原因可能是D-USCs长期处于体内高糖环境下,造成增殖能力降低。

## 2.5 D-USCs与USCs分泌因子检测

释放旁分泌营养因子、促进组织再生是干细胞治疗的重要作用之一。我们采用人促血管生成因子检测试剂盒检测USCs和D-USCs分别培养2 d

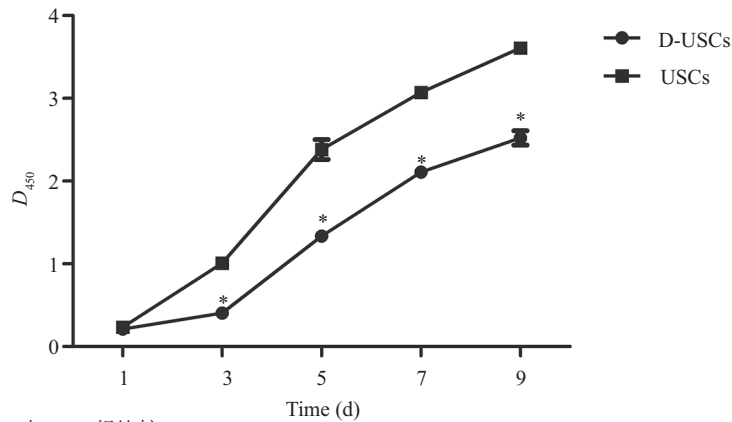


A: 茜素红染色后矿化结节呈红色; B: 油红O染色后脂滴呈橘红色。

A: the mineralization nodules were red after alizarin red staining; B: the lipid droplets were orange after oil red O staining.

图3 细胞成骨和成脂诱导

Fig.3 Osteogenic and adipogenic induction of cells

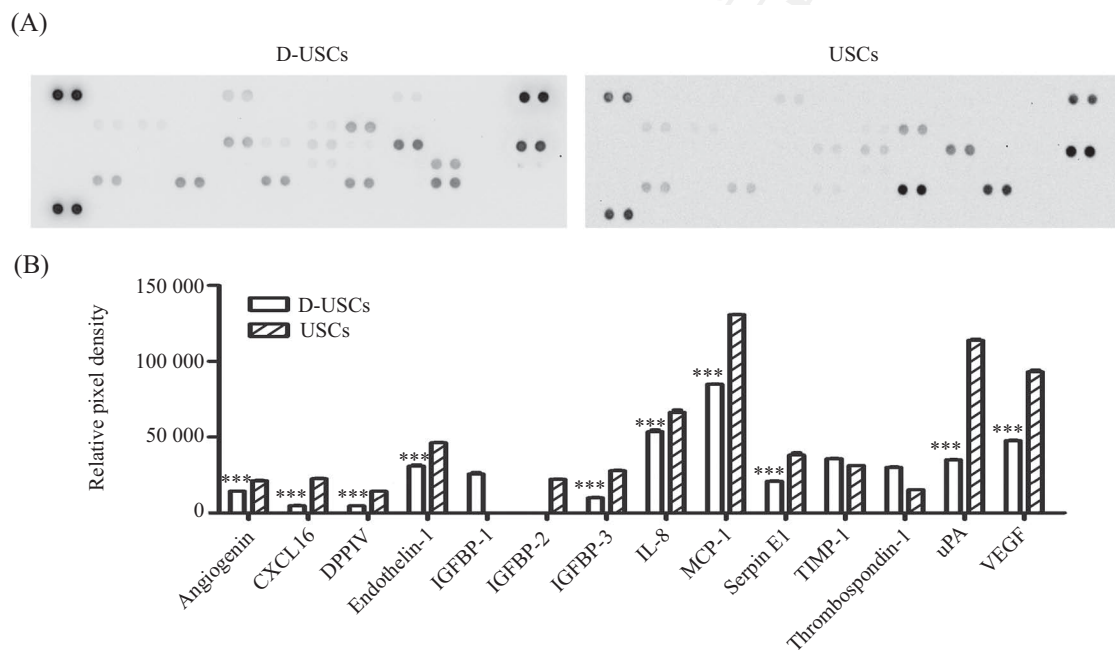


D-USCs和USCs增殖曲线。\* $P < 0.05$ , 与USCs组比较。

Growth curves of D-USCs and USCs. \* $P < 0.05$  vs USC group.

图4 连续培养9 d时D-USCs生长速度低于USCs

Fig.4 The growth rate of D-USCs was lower than that of USC in continuous culture for 9 d



A: X-ray检测D-USCs和USCs血管生成因子表达; B: 半定量分析D-USCs和USCs血管生成因子表达。CXCL16: 趋化因子16; DPPIV: 二肽酰多肽酶4; IL-8: 白细胞介素-8; uPA: 尿激酶型纤溶酶原激活剂。\*\*\* $P < 0.001$ , 与USCs组比较。

A: the levels of angiogenesis array in D-USCs and USC; B: semi-quantitative analysis showed angiogenesis array of D-USCs and USC levels. CXCL16: chemokine ligand 16; DPPIV: dipeptidylpeptidase IV; IL-8: interleukin-8; uPA: urokinase plasminogen activator. \*\*\* $P < 0.001$  vs USC group.

图5 D-USCs大多数细胞外血管生成因子表达低于USCs

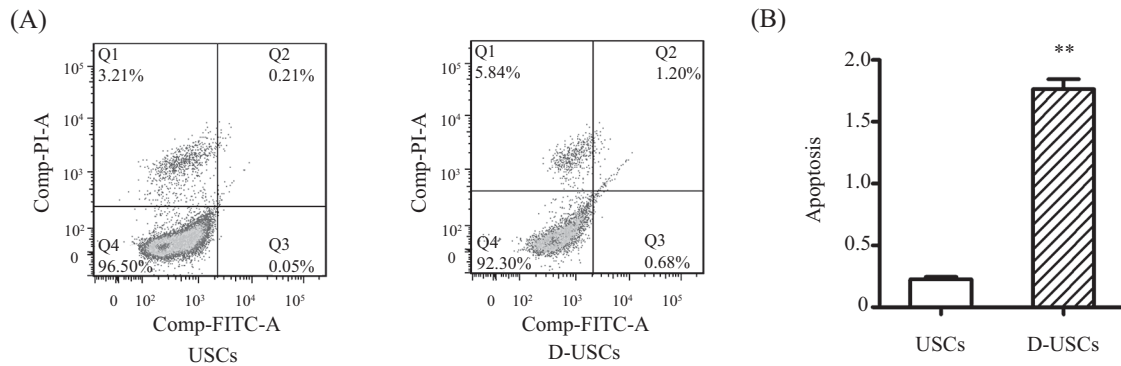
Fig.5 The secretion of most angiogenesis array in D-USCs was lower than that of USC

后的培养基。USCs组检测到13种血管生成相关因子, 包括血管生成素(Angiogenin)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等; D-USCs组除上述因子外, 额外检测到了血小板因子4(platelet factor 4)表达, 可能与糖尿病患者血小板被激活有关<sup>[8]</sup>。除组织金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloprotease-1, TIMP-1)、

血小板应答蛋白-1(thrombospondin-1)、血小板应答蛋白-2(thrombospondin-2)等3个因子外, D-USCs组较USCs组没有明显变化外, 大多数因子表达均比USCs组有大幅度下降(图5)。

## 2.6 D-USCs与USCs凋亡率比较

细胞终末期状态为凋亡或者细胞死亡。本研究采用流式细胞学检测P2代细胞培养到第4 d的细胞凋亡率。结果显示, 与USCs组相比, D-USCs组凋亡



A: 流式细胞学检测USCs和D-USCs细胞凋亡; B: 计算两组平均凋亡率。 \*\* $P < 0.01$ , 与USCs组比较。

A: cell apoptosis of the USCs and D-USCs detected by flow cytometry; B: the average apoptotic rate of two groups. \*\* $P < 0.01$  vs USC group.

图6 D-USCs凋亡高于USCs

Fig.6 Cell apoptosis of the D-USCs was higher than USC

率有显著升高(图6)。D-USCs在病人体内长期处于高糖环境,细胞状态受到损伤,可能导致了体外培养时凋亡率高于正常USCs。

### 3 讨论

干细胞移植治疗是最近医学研究的热点。USCs可作为泌尿系统疾病及泌尿系统器官重建,全新的具有临床应用价值的细胞来源<sup>[9]</sup>。有研究表明,在由肾缺血-庆大霉素诱导慢性肾功能不全的裸大鼠模型中,健康人USCs能改善其肾功能;在糖尿病性功能障碍大鼠模型中,USCs移植可改善阴茎勃起功能<sup>[10]</sup>。在由阴道扩张诱导尿失禁的大鼠实验中,USCs可促进尿道括约肌功能的恢复<sup>[10]</sup>。同样,研究者也希望可以应用USCs移植来改善糖尿病肾病患者肾功能的损害,作为一种新型且有效的治疗方式。然而,USCs移植在其他系统损伤中是否有效还未得到验证。

大量研究表明,干细胞治疗(如骨髓间充质干细胞移植)可有效缓解动物高血糖症状。移植的干细胞可能通过分化成各种肾脏细胞如肾小球足细胞、肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞等肾脏实质细胞,从而修复肾损伤;并能通过免疫调节和旁分泌的作用,缓解肾脏的炎症反应,改善肾功能<sup>[11-12]</sup>。目前研究及临床使用的干细胞通常来自健康人的捐助,异体干细胞移植所面临的最大问题是产生免疫排斥反应<sup>[13]</sup>。我们提出从糖尿病肾病病人的尿液中分离提取尿源性干细胞,再应用到其自身疾病的治疗,可以避免这一问题。

糖尿病高糖环境影响了干细胞的增殖、旁分泌

能力,其作用机制尚未明确。自噬是细胞利用自身溶酶清除受损细胞器和大分子物质来维持内环境稳定的基本现象,生理状态下自噬维持在较低基础水平。有研究表明,在糖尿病的进展中,由于高血糖和糖基化终产物的影响,会激活组织细胞自噬水平升高<sup>[14]</sup>。D-USCs处于体内高糖环境下,自噬水平可能同时升高。AKT/mTORC信号通路在细胞的增殖中起重要作用,自噬激活时mTORC信号通路被抑制,细胞的增殖能力下降。干细胞移植治疗主要是通过释放旁分泌细胞因子<sup>[15-16]</sup>起到相关的治疗作用。有研究表明,USCs可以在体外分泌VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等促血管生成因子<sup>[17]</sup>。低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是mTORC通路下游的调控因子,能够促进红细胞生成素(erythropoietin, EPO)编码基因的转录,从而加速红细胞的大量增殖<sup>[18]</sup>。同时自噬也调控VEGF、bFGF等因子的生成,当mTORC通路被抑制时,相应的细胞因子表达降低。高糖环境下可以促进细胞凋亡,可能由AKT/mTORC通路下游的*Bcl-2*基因和*caspase-3*基因调控。*Bcl-2*复合体包括促凋亡基因*Bax*和抗凋亡基因*Bcl-2*<sup>[19]</sup>。AKT/mTORC通路被抑制,*Bcl-2*表达降低,*Bax*表达升高,导致下游的*caspase-3*活化,促进了凋亡的发生。

本研究发现,糖尿病肾病病人尿源性干细胞在体内增殖和分泌能力均有受损。近年来,为了提升干细胞的疗效,出现了对干细胞进行体外预处理后再移植的方法。这些预处理方法包括基因修饰、药物预处理和低氧预处理等,其中,以低氧预处理的方

法简单、安全、有效, 因为不需使用额外的生长因子、病毒或其他非临床药物。低氧预处理的干细胞是一种具有良好应用前景的干细胞移植策略, 已广泛应用于心、肺、肝、脑和骨骼肌等组织器官损伤修复的研究<sup>[20]</sup>。

综上所述, USCs可以通过一个简单、非侵入性、低成本的避免手术的方法获取。单个细胞克隆可以大量增殖并进行自体USCs移植。我们从糖尿病肾病病人的尿液中提取出了USCs, 在体外可以正常培养与增殖, 表达周细胞/骨髓间充质干细胞的膜表面标记物, 并且具有多向分化的能力, 使自体干细胞移植治疗肾功能不全成为了可能。我们将继续研究如何恢复体内受损的细胞的干性, 提高患者自体干细胞的增殖能力、减少凋亡, 为终末期肾病和泌尿系组织工程提供新的细胞来源, 为进一步的临床应用提供新的思路。

#### 参考文献 (References)

- 1 Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R, Kasper C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2011; 7(1): 17-31.
- 2 Zhang Y, McNeill E, Tian H, Soker S, Andersson KE, Yoo JJ, *et al.* Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol* 2008; 180(5):2226-33.
- 3 Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Wu R, Yang B, He T, *et al.* Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells* 2013; 31(9): 1840-56.
- 4 Bodin A, Bharadwaj S, Wu S, Gatenholm P, Atala A, Zhang Y. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. *Biomaterials* 2010; 31(34): 8889-901.
- 5 Wu S, Wang Z, Bharadwaj S, Hodges SJ, Atala A, Zhang Y. Implantation of autologous urine derived stem cells expressing vascular endothelial growth factor for potential use in genitourinary reconstruction. *J Urol* 2011; 186(2): 640-7.
- 6 Wu S, Liu Y, Bharadwaj S, Atala A, Zhang Y. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32(5): 1317-26.
- 7 中华医学会内分泌学分会. 中国成人糖尿病肾脏病临床诊断的专家共识. *糖尿病天地*(Chinese Society of Endocrinology. Expert consensus on clinical diagnosis of adult diabetic nephropathy in China. *Diabetes World*) 2016; 10(6): 243-53.
- 8 Colwell JA, Winocour PD, Lopes-Virella M, Halushka PV. New concepts about the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Am J Med* 1983; 75(5B): 67-80.
- 9 Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, Markert C, Andersson KE, Atala A, Zhang Y. Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(15/16): 2123-32.
- 10 Ouyang B, Sun X, Han D, Chen S, Yao B, Gao Y, *et al.* Human urine-derived stem cells alone or genetically-modified with FGF2 improve type 2 diabetic erectile dysfunction in a rat model. *PLoS One* 2014; 9(3): e92825.
- 11 Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, *et al.* Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(46): 17438-43.
- 12 Dong X, Zhang T, Liu Q, Zhu JZ, Zhao J, Li J, *et al.* Beneficial effects of urine-derived stem cells on fibrosis and apoptosis of myocardial, glomerular and bladder cells. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 427: 21-32.
- 13 Halban PA, German MS, Kahn SE, Weir GC. Current status of islet cell replacement and regeneration therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(3): 1034-43.
- 14 Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1): 27-42.
- 15 Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, Oba S, Nishimatsu H. Adult stem cells as a tool for kidney regeneration. *World J Nephrol* 2016; 5(1): 43-52.
- 16 Fink KD, Deng P, Torrest A, Stewart H, Pollock K, Gruenloh W, *et al.* Developing stem cell therapies for juvenile and adult-onset Huntington's disease. *Regen Med* 2015; 10(5): 623-46.
- 17 Liu G, Wang X, Sun X, Deng C, Atala A, Zhang Y. The effect of urine-derived stem cells expressing VEGF loaded in collagen hydrogels on myogenesis and innervation following after subcutaneous implantation in nude mice. *Biomaterials* 2013; 34(34): 8617-29.
- 18 Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; 148(3): 399-408.
- 19 Cao Y, Jiang Z, Zeng Z, Liu Y, Gu Y, Ji Y, *et al.* Bcl-2 silencing attenuates hypoxia-induced apoptosis resistance in pulmonary microvascular endothelial cells. *Apoptosis* 2016; 21(1): 69-84.
- 20 Tasso R, Gaetani M, Molino E, Cattaneo A, Monticone M, Bachi A, *et al.* The role of bFGF on the ability of MSC to activate endogenous regenerative mechanisms in an ectopic bone formation model. *Biomaterials* 2012; 33(7): 2086-96.