

保留肾单位术后肾脏保护新策略:缺血预适应介导内皮祖细胞归巢机制

刘昊,吴然,贾瑞鹏*,朱佳庚,于澎,赵炎,葛余正,吴剑平,李文成

(南京医科大学附属南京医院泌尿外科,江苏 南京 210006)

[摘要] 目的:探讨缺血预适应(IPC)介导内皮祖细胞(EPCs)归巢对保留肾单位手术(NSS)后肾功能的保护作用。方法:SD大鼠随机分为对照组(sham)、保留肾单位组(NSS)、缺血预适应+保留肾单位组(IPC)。术后24h分别留取大鼠外周血、肾脏组织。采用血生化、病理学观察肾功能改变;免疫荧光观察3组大鼠肾组织中EPCs归巢情况;免疫组化技术检测肾脏微血管新生;QPCR检测血管生成因子mRNA表达。结果:IPC可显著降低大鼠血肌酐水平及肾小管损伤评分($P < 0.05$),促进EPCs归巢至损伤肾脏组织。与sham组和NSS组相比,IPC组大鼠肾脏组织微血管新生显著增强($P < 0.05$),且基质细胞衍生因子1(SDF-1)mRNA表达升高($P < 0.05$)。结论:IPC可介导EPCs归巢至损伤肾脏,后者可能通过释放血管生成因子,促进肾脏微血管新生,达保护肾功能之目的。

[关键词] 缺血预适应;内皮祖细胞;保留肾单位手术;缺血再灌注损伤

[中图分类号] R699.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)04-432-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130403

New strategy of renal protection after nephron sparing surgery:mechanism of ischemic preconditioning mediated endothelial progenitor cells homing

Liu Hao, Wu Ran, Jia Ruipeng*, Zhu Jiageng, Yu Peng, Zhao Yan, Ge Yuzheng, Wu Jianping, Li Wencheng

(Department of Urology, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of endothelial progenitor cells (EPCs) in modulation of ischemic injury in a nephron sparing surgery (NSS) rat model by ischemic preconditioning (IPC). **Methods:** Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups after right-side kidney nephrectomy; the Sham group underwent surgery without vascular clamping; the NSS group, the renal blood vessels were clamped for 40 min and partial nephrectomy (PN) was performed; the IPC group, the rats were pretreated with 15 min ischemia and 10 min reperfusion. At 24 h after reperfusion, the pool of circulating and kidneys were harvested. We assessed the extent of renal injury, observed the home of EPCs and detected angiogenesis as well as the expression of vascular growth factor. **Results:** Pretreated rats exhibited significant improvements in renal function and morphology. The number of EPCs in the kidneys was increased in the IPC groups as compared to the NSS or sham groups. Neovascularization in peritubular capillaries was markedly increased in the kidneys which treated with IPC. In addition, the expression of SDF-1 mRNA in kidneys of pretreated rats was increased compared to rats subjected to ischemic injury. **Conclusion:** IPC may attenuate renal ischemic injury induced by NSS; EPCs play an important role in renal protection, which involves the promotion of angiogenesis through the release of several angiogenic factors.

[Key words] ischemic preconditioning; endothelial progenitor cells; nephron sparing surgery; ischaemia-reperfusion injury

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 432-437]

[基金项目] 国家自然科学基金(81070597);江苏省卫生厅科教兴卫工程领军人才与创新团队科研课题(LJ201107);江苏省六大人才高峰资助项目(2011-WS-093);江苏省科教兴卫工程重点学科开放课题(KF200942)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: urologist025@sohu.com

研究已证实缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)可动员内源性内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)归巢至缺血性损伤脏器,产生明确的保护作用,但机制尚未明确^[1-2]。保留肾单位手术(nephron sparing surgery, NSS)过程中因阻断肾蒂引发的肾脏缺血性损伤是否也可通过术前予以 IPC

而发挥保护作用呢?本研究通过建立大鼠 NSS、IPC+NSS 模型,探讨 IPC 对 NSS 后肾功能的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠,体重 200~250 g,购于南京医科大学附属南京医院动物实验中心[实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2009-0015]。CD34 单克隆抗体(美国 ABbiotec 公司),Flk 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),TRIzol Reagent(美国 Invitrogen 公司),Go Taq qPCR Master Mix(美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及动物分组

所有 SD 大鼠均 10%水合氯醛腹腔注射麻醉后切除右肾,1 周后随机分为对照组(sham):仅暴露左侧肾脏;保留肾单位组(NSS):夹闭肾蒂 40 min 的同时切除左肾下极(约占全肾体积 1/3),明胶海绵压迫止血;缺血预适应 + 保留肾单位组(IPC):在阻断肾蒂前给予 15 min 缺血/10 min 再灌注处理,余同 NSS 组。以上模型建立参照 Jia 以及 Ramakumar 等^[3-5]的实验研究。恢复血供后 24 h 处死大鼠,每组 10 只。留取外周血、残余肾脏做续检测。

1.2.2 血生化检测

抽取大鼠下腔静脉血 2 ml,2 000 r/min 离心 10 min,取上清应用 Olympus AU2000 全自动生化分析仪检测血肌酐。

1.2.3 肾脏病理学检查以及肾小管损伤评分

肾脏组织固定于 4%多聚甲醛,进行乙醇脱水、石蜡包埋,制作厚度为 5 μm 切片,进行 HE 染色,对肾脏组织进行病理学评估。每张标本在 200 倍镜下取外髓质部 10 个视野。按 0=正常,1=轻微损伤(受损肾小管 < 5%),2=轻度损伤(受损肾小管 5%~25%),3=中度损伤(受损肾小管 26%~75%),4=重度损伤(受损肾小管 > 75%)作半定量分析并计算其均值,作为肾小管坏死的评分指数^[6]。

1.2.4 免疫荧光检测

肾脏组织蜡块标本经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后,血清封闭,加入一抗兔抗大鼠 CD34、小鼠抗大鼠 Flk,4℃过夜。加入二抗后荧光显微镜扫描,CD34⁺ 细胞为红色荧光,Flk⁺ 细胞为绿色荧光,CD34/Flk 双阳性细胞即为 EPCs,表现为黄色荧光。

1.2.5 免疫组织化学染色

肾脏组织蜡块制成 5 μm 切片,经脱蜡、再水化、

抗原修复、血清封闭等过程后。加入兔抗大鼠 CD34 4℃过夜,PBS 洗片后 HRP 标记羊抗兔 IgG,37℃孵育 2 h,洗片后加 DAB 底物显色液 15 min,苏木素衬染,树脂封片后于显微镜下观察。在低倍镜(×40)下找出肾组织中微血管最密集的部位,然后在高倍镜(×200)下进行观察。任何被抗 CD34 抗体染成棕黄色的内皮细胞,无论有或无管腔,只要与邻近的微血管及其它结缔组织成分有明显区别,均作为 1 个微血管计数。每个标本计数 5 个高倍视野下的血管数目。

1.2.6 荧光定量 PCR

肾组织保存于液氮中,每 1 ml TRIzol 溶解 100 mg 组织提取总 RNA,逆转录成 cDNA。所有引物均由美国 Invitrogen 公司合成(表 1)。采用 ABI7500 进行实时 PCR 检测,采用两步法 PCR 程序:预变性 95℃ 2 min;PCR 反应 95℃ 15 s、60℃ 1 min,40 个循环。得出的 Ct 值通过 ΔΔCt 法进行各组间比较分析。

表 1 GAPDH、VEGF、IGF-1、SDF-1 基因引物序列
Table 1 The primer sequences of GAPDH, VEGF, IGF-1, SDF-1

基因名称	引物序列(5'→3')
GAPDH	TGTCGTGGAGTCTACTGGCGTCTT GAGGGAGTTGTCATATTTCTCGTGGT
VEGF	CGAGACGCAGCGACAAGGCA ACCTCTCCAAACCGTTGGCAGC
IGF-1	TTACTTCAACAAGCCCACAGG TACATCTCCAGCCTCCTCAGA
SDF-1	GAGCCATGTCGCCAGAGCCAAC CACACCTCTCACATCTTGAGCCTCT

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学处理,资料均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。方差齐性时多组间资料比较采用 ANOVA 分析,两两比较采用 SNK 法;方差不齐采用非参数检验, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血生化检测

与 sham 组相比,NSS 组与 IPC 组大鼠血肌酐水平有明显升高($P < 0.05$),IPC 组血肌酐较 NSS 组明显降低($P < 0.05$,表 2)。

2.2 肾脏组织学检测及肾小管损伤评分

sham 组无肾小管损伤。NSS 组渗出明显增加,出现管型及管腔扩张,管周细胞脱落,IPC 组亦有

表 2 大鼠血肌酐检查结果

Table 2 Serum creatinine (Scr) in the three groups

组别	肌酐($\mu\text{mol/L}$)
sham 组	56.8 ± 2.7
NSS 组	$164.0 \pm 17.4^*$
IPC 组	$96.2 \pm 11.6^{**}$

与 sham 组相比, $*P < 0.05$; 与 NSS 组相比, $**P < 0.05$ 。

上述病理学改变, 但较 NSS 组损伤减轻(图 1)。NSS 组与 IPC 组肾小管损伤评分明显高于 sham 组。与 NSS 组相比, IPC 组肾小管损伤评分降低($P < 0.05$, 表 3)。

2.3 免疫荧光观察 EPCs 归巢情况

荧光显微镜下观察: sham 组肾组织中 EPCs 数量极少; NSS 组肾脏 EPCs 含量较 sham 组增多; IPC 组 EPCs 含量明显增加且聚集在肾髓质, 以肾髓质

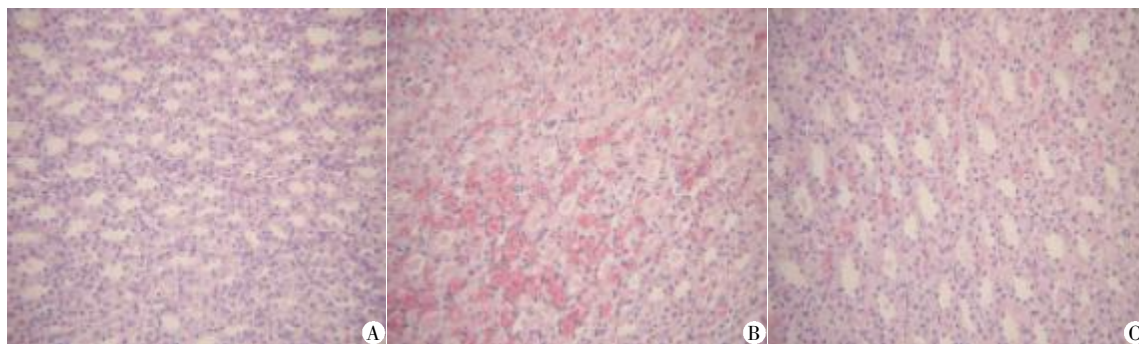
乳头区最为显著(图 2)。

2.4 免疫组化检测微血管新生

sham 组毛细血管罕见 CD34⁺细胞表达; NSS 组毛细血管 CD34⁺细胞表达较 sham 组有所增加, 但染色较浅; IPC 组毛细血管表达 CD34⁺细胞强阳性, 染色较深, 阳性细胞主要集中于皮髓交界处。IPC 组与 NSS 组毛细血管密度(MVD)值明显高于 sham 组($P < 0.05$), 与 NSS 组相比, IPC 组 MVD 值增高($P < 0.05$, 图 3)。

2.5 荧光定量 PCR 检测肾组织中血管生成因子 mRNA 表达

IPC 组大鼠肾组织 SDF-1 表达较 sham 组与 NSS 升高($P < 0.05$), 但后两组之间差别无统计学意义(图 4)。3 组大鼠肾组织中 VEGF、IGF-1 mRNA 表达未见差别。



A: sham 组; B: NSS 组; C: IPC 组。

图 1 3 组大鼠肾脏病理学改变(HE, $\times 200$)Figure 1 Renal tissue histological examination(HE, $\times 200$)

表 3 3 组大鼠肾小管损伤评分

Table 3 Histopathologic scores in the three groups

组别	肾小管损伤评分(分)
sham 组	0
NSS 组	$3.40 \pm 0.45^*$
IPC 组	$2.20 \pm 0.51^{**}$

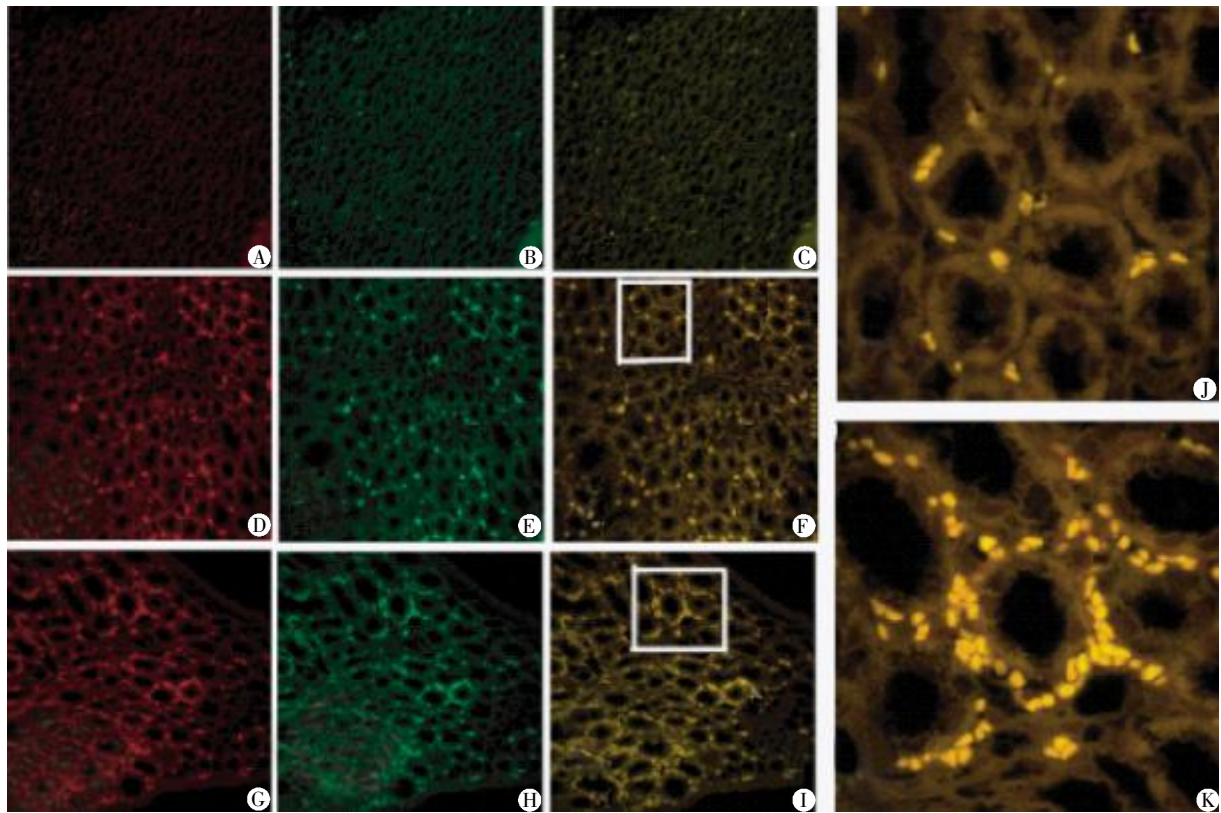
与 sham 组相比, $*P < 0.05$; 与 NSS 组相比, $**P < 0.05$ 。

3 讨论

1997 年, Asahara 等^[7]首先发现一种 CD34⁺细胞可通过整合入受损的毛细血管网对脏器缺血性损伤产生保护作用, 这种 CD34⁺细胞被命名为 EPCs。随后的研究证实, EPCs 可促进内皮细胞再生与血管新生, 减轻器官缺血性损伤^[8-9]。但器官损伤动员 EPCs 的数量有限, 并不能达到有效保护受损脏器的目的。IPC 为一种可诱导机体发挥内源性保护作用, 耐受更长时间缺血的方法, 亦为动员机体 EPCs 的重要方

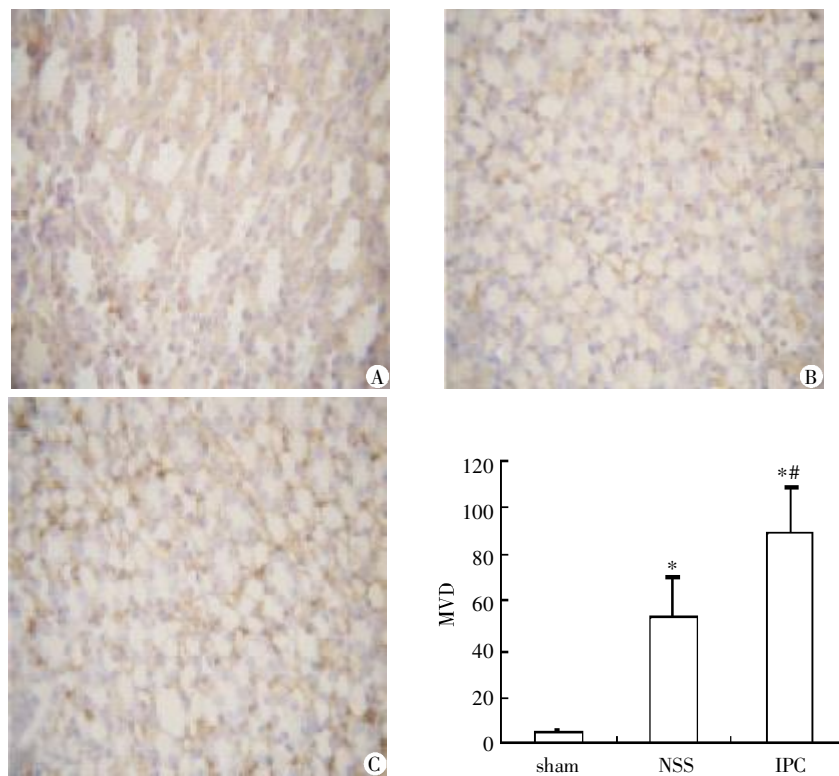
法^[1-2]。Li 等^[1]在心血管领域的研究发现: 经 4 个循环 4 min 缺血/4 min 再灌注处理, 可对因夹闭左前降支 45 min 引起的心肌梗死产生保护作用, 其机制与 IPC 介导 EPCs 归巢至受损心肌相关。Patschan 等^[2]对肾脏的研究证实: 肾脏缺血性损伤 1 周前夹闭单侧肾动脉 25 min, 可动员 EPCs 归巢至肾髓质乳头区, 减轻肾脏缺血再灌注损伤(ischaemia-reperfusion injury, IRI)。NSS 过程中因夹闭肾蒂亦可导致肾脏 IRI, 但 Patschan 等的 IPC 方案因预缺血与缺血性损伤间隔时间长, 临床应用困难。因此探索可行的 IPC 方案可成为治疗 NSS 后肾脏 IRI 的新策略。本研究发现, 与 NSS 组相比, 经 15 min 缺血, 10 min 再灌注处理后, 大鼠血肌酐及肾小管损伤评分下降, 而肾脏 EPCs 含量显著增加, 主要集中在肾髓质乳头区。这表明 15 min/10 min 方案亦可促进机体 EPCs 动员、归巢, 从而保护 NSS 后的肾功能。

促血管新生是 EPCs 修复脏器 IRI 损伤的重要



A~C: sham 组; D~F: NSS 组; G~I: IPC 组($\times 200$); J, F 图中方框放大($\times 400$); K: I 图中方框放大($\times 400$)。
图 2 免疫荧光观察肾脏 EPCs 归巢情况

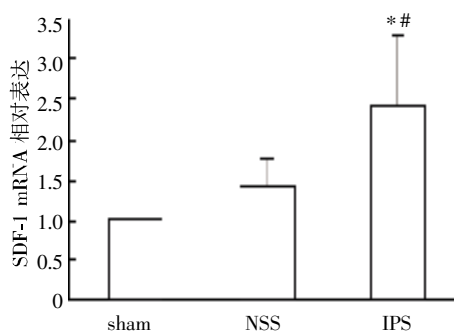
Figure 2 Immunofluorescence staining to show the homing of EPCs to the ischemic kidney



A: sham 组; B: NSS 组; C: IPC 组($\times 200$)。与 sham 组相比, $*P < 0.05$; 与 NSS 组相比, $*P < 0.05$ 。

图 3 免疫组化评估肾脏微血管新生

Figure 3 Immunohistochemical staining for CD34



与 sham 组相比, * $P < 0.05$; 与 NSS 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 3 组大鼠肾脏 SDF-1 mRNA 相对表达

Figure 4 Relative expression of SDF-1 mRNA

机制之一,研究发现,将 EPCs 移植入心肌梗模型大鼠体内可改善缺血后心肌功能,这与 EPCs 增加受损心肌血管新生密不可分^[10]。Chade 等^[11]的研究证实:肾内输注自体 EPCs 可保护微血管结构与功能,减少微血管重塑。本研究发现经 IPC 处理后,大鼠肾髓质小管周围毛细血管新生明显增加,这进一步证实了 EPCs 可通过促进微血管新生而保护肾功能。目前认为 EPCs 促血管新生主要通过两种途径:直接整合入受损的毛细血管网;分泌各种旁分泌因子促血管新生。最近的研究发现,EPCs 移植后,仅有少量的 EPCs 可整合入毛细血管,这表明各种旁分泌因子可能在 EPCs 的组织修复中发挥了更为关键作用^[12-13]。本实验也发现,毛细血管新生最显著部位为肾脏皮髓交界区,而 EPCs 归巢最集中部位为肾髓质乳头区,这也可从侧面反映整合机制在 EPCs 促血管新生中并不占主导地位。

EPCs 可分泌众多促血管生长因子,这些旁分泌因子在血管新生中发挥了各自不同的作用^[14]。同时旁分泌因子可以增强 EPCs 的血管调节功能^[15-16],并促进 EPCs 的动员、归巢和分化^[17-18],表明 EPCs 与其旁分泌因子之间存在正反馈调节,共同完成对器官缺血性损伤的修复。本研究发现:经 IPC 处理后,大鼠肾脏中 SDF-1 mRNA 表达较 NSS 组与 sham 组明显上升($P < 0.05$)。而 3 组 VEGF、IGF-1 mRNA 表达未见明显差别,考虑原因可能为:①EPCs 在血管新生不同时段可分泌不同的细胞因子,因本研究仅设置单一时间点,以上两种因子在其他时间段分泌,故未被检测到;②EPCs 分泌的促血管生成因子具有器官特异性,EPCs 在肾组织中并不分泌上述两种因子。

综上所述,本文认为 IPC 可对 NSS 引起的肾脏 IRI 产生重要的保护作用,其机制可能是通过介导

EPCs 归巢至损伤肾脏,分泌各种促血管生长因子,促进肾小管周围毛细血管新生。IPC 可为 NSS 术后肾脏功能的保护提供新策略。

[参考文献]

- [1] Li M, Nishimura H, Iwakura A, et al. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity[J]. *Circulation*, 2005, 111(9):1114-1120
- [2] Patschan D, Krupinca K, Patschan S, et al. Dynamics of mobilization and homing of endothelial progenitor cells after acute renal ischemia: modulation by ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 291(1):176-185
- [3] Jia RP, Zhu JG, Wu JP, et al. Experimental study on early protective effect of ischemic preconditioning on rat kidney graft[J]. *Transplantation Proc*, 2009, 41(1):69-72
- [4] Ramakumar S, Phull H, Purves T, et al. Novel delivery of oligonucleotides using a topical hydrogel tissue sealant in a murine partial nephrectomy model [J]. *J Urol*, 2005, 174(3):1133-1136
- [5] 谢建军,贾瑞鹏,罗斐莹,等. 缺血预适应对大鼠肾移植早期组织学及 IKK β 、NF- κ B、TNF- α mRNA 表达的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2008, 28(4):503-507
- [6] Furuichi K, Wada T, Iwata Y, et al. Administration of FR167653, a new anti-inflammatory compound, prevents renal ischaemia/reperfusion injury in mice[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(3):399-407
- [7] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 275(5302):964-967
- [8] Yu Y, Gao Y, Qin J, et al. CCR1 promotes the differentiation of endothelial progenitor cells and reendothelialization in the early phase after vascular injury[J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(6):713-724
- [9] Chen L, Wu F, Xia WH, et al. CXCR4 gene transfer contributes to *in vivo* reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(3):462-470
- [10] Schuh A, Liehn EA, Sasse A, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model[J]. *Basic Res Cardiol*, 2008, 103(1):69-77
- [11] Chade AR, Zhu X, Lavi R, et al. Endothelial progenitor cells restore renal function in chronic experimental renovascular disease[J]. *Circulation*, 2009, 119(4):547-557

- [12] Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(3):413-421
- [13] Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals[J]. *Blood*, 2007, 109(5): 1801-1809
- [14] Xu S, Zhu J, Yu L, et al. Endothelial progenitor cells: current development of their paracrine factors in cardiovascular therapy[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 59(4):387-396
- [15] Yi C, Xia W, Zheng Y, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells transferred by vascular endothelial growth factor gene for vascular regeneration of ischemic flaps[J]. *J Surg Res*, 2006, 135(1):100-106
- [16] Yu JX, Huang XF, Lü WM, et al. Combination of stromal-derived factor-1alpha and vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells is more effective for ischemic neovascularization[J]. *J Vasc Surg*, 2009, 50(3):608-616
- [17] Thum T, Hoeber S, Froese S, et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1 [J]. *Circ Res*, 2007, 100(3):434-443
- [18] Henrich D, Hahn P, Wahl M, et al. Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells *in vitro*: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165 [J]. *Shock*, 2004, 21(1):13-16

[收稿日期] 2012-08-15

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。