

• 实验研究 •

# 缺血后处理对大鼠肾缺血再灌注损伤后 CD105 及 endostatin 表达的影响

李爱军<sup>1</sup> 喻俊峰<sup>1</sup> 孙德明<sup>1</sup> 蒋林涛<sup>1</sup> 张满<sup>1</sup> 易成<sup>1</sup> 汪志顺<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:探讨缺血后处理对大鼠缺血再灌注损伤后 CD105 及 endostatin 表达的影响。方法:将雄性 Wistar 大鼠随机分为三组,分别为假手术组(Sham 组)、缺血再灌注损伤组(IRI 组)及缺血后处理组(IPO 组)。采用全自动生化分析仪检测血清尿素氮(BUN)及肌酐(Cr)含量;用 HE 染色观察病理组织学变化;用免疫组织化学法和蛋白质印迹法(Western blot)检测肾组织中 CD105 及 endostatin 的表达。结果:IRI 组血清 BUN 及 Cr 含量较 Sham 组明显升高,IPO 组血清 BUN 及 Cr 含量介于 Sham 组和 IRI 组之间;HE 染色检测发现 IRI 组肾小管上皮细胞坏死明显,肾小管管腔扩张,IPO 组较 IRI 组肾小管上皮坏死明显减轻;免疫组织化学以及 Western blot 检测均发现 CD105 在 Sham 组表达最强,IRI 组表达明显减弱,IPO 组表达则介于前二者之间;endostatin 在 Sham 组表达最弱,在 IRI 组最强,IPO 组则稍强于 Sham 组而明显弱于 IRI 组。结论:缺血后处理能减弱缺血再灌注损伤过程中 endostatin 的表达量,同时增加 CD105 的表达,因而有助于减轻肾脏的缺血再灌注损伤。

**[关键词]** 缺血后处理;缺血再灌注损伤;CD105;endostatin;大鼠

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2015.05.021

**[中图分类号]** R692 **[文献标识码]** A

## Effect of ischemic postconditioning on the expression of CD105 and endostatin after renal ischemia-reperfusion injury in rats

LI Aijun<sup>1</sup> YU Junfeng<sup>1</sup> SUN Deming<sup>1</sup> JIANG Lintao<sup>1</sup>  
ZHANG Man<sup>1</sup> YI Cheng<sup>1</sup> WANG Zhishun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Urology, Renmin Hospital of Three Gorges University, First Renmin Hospital of Yichang City, Yichang, Hubei, 443000, China; <sup>2</sup>Department of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University)

Corresponding author: WANG Zhishun, E-mail: zhishun2005@126.com

**Abstract Objective:** To explore the effect of ischemic postconditioning on CD105 and endostatin after renal ischemia-reperfusion injury in Wistar rats. **Method:** The male Wistar rats were randomly divided into three groups: Sham group, ischemia-reperfusion injury (IRI) group, ischemic postconditioning (IPO) group. Serum blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr) were analyzed by automatic biochemical analyzer. Histopathological changes were observed by HE staining. The expression of CD105 and endostatin in kidney were checked by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** Serum BUN and serum Cr in IRI group were significantly higher than those in Sham group, while serum BUN and serum Cr of IPO group were between the Sham group and IRI group. Significant necrosis of tubular epithelial cells and tubular lumen expansion could be found in hematoxylin in IRI group. Compared with IRI group, tubular necrosis significantly reduced in IPO group. The result of immunohistochemistry showed that the expression of CD105 was the strongest in Sham group, and significantly decreased in the IRI group, and was between them in IPO group, while the expression of endostatin was the weakest in the Sham group, the strongest in IRI group, and IPO group's expression was slightly stronger than the Sham group's but was significantly weaker than IRI group's. Western blot test further supported the results of immunohistochemistry. **Conclusion:** Ischemic postconditioning could reduce the expression of endostatin after IRI, and enhance the expression of CD105, which helps to reduce kidney injury.

**Key words** ischemic postconditioning; ischemia-reperfusion injury; CD105; endostatin; rats

<sup>1</sup>三峡大学人民医院(宜昌市第一人民医院)泌尿外科(湖北宜昌,443000)

<sup>2</sup>武汉大学人民医院泌尿外科

通信作者:汪志顺,E-mail:zhishun2005@126.com

肾脏手术或肾脏移植过程中,肾缺血是导致急性肾功能衰竭的主要原因<sup>[1]</sup>。挽救器官缺血损伤最好的方法是快速完成血流重建,但恢复血流则易导致再灌注损伤。如何提高机体内在的保护机制,

使一个器官抵制再灌注损伤是重要的研究课题。目前,缺血预处理被证实能够减轻肾缺血后再灌注损伤<sup>[2]</sup>。但是,最新研究表明,再灌注最初的几分钟是决定肾缺血最终结局的关键时间段<sup>[1]</sup>,因此,在术者控制下对再灌注进行干预的缺血后处理,可能较缺血预处理有更好的应用前景。

损伤后新生血管生成是机体重要的内在保护机制。CD105(内皮糖蛋白)是 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_3$  转化生长因子的受体,是增殖相关与缺氧诱导蛋白的一种,其表达常与促进血管生成相关;与之相反,Endostatin(内皮抑素)是血管生成抑制因子,其表达常与抑制血管生成有关。因此,本文研究缺血后处理对大鼠肾缺血再灌注损伤后 CD105 及 endostatin 的表达影响,试图从血管生成的角度探讨缺血后处理减轻肾缺血再灌注损伤的机制。现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组

8 周龄健康雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重在 240~280 g。按随机数字表法随机分成三组,即假手术组(Sham 组)、缺血再灌注损伤组(IRI 组)、缺血后处理组(IPO 组)。每组均定缺血再灌注损伤 12 周这一时间点为观察时间点。

### 1.2 动物模型的建立

sham 组用戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔麻醉,并 500 IU 肝素钠腹腔注射。麻醉成功后,游离双肾,切除右肾,缝合腹壁。IRI 组在重复假手术组操作后,再行左肾缺血,夹闭左肾动静脉 50 min,然后开通。IPO 组在左肾缺血 50 分钟后,再按照再灌注 10 s、夹闭 10 s 共重复 6 次后完全开放。所有实验动物在术后 12 周先抽血分离血清,然后立即用颈椎脱臼法处死并剖杀,留取各组大鼠肾脏,行形态学、分子生物学检测。

### 1.3 观察指标及方法

采用自动生化分析仪测定血清尿素氮(BUN)及肌酐(Cr)含量;石蜡切片 HE 染色后,在 Olympus 显微镜下观察其形态学改变;用免疫组织化学及 Western blot 法分别对 CD105 及 endostatin 在大鼠肾脏内的表达进行分析。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS11.5 软件进行数据处理。实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肾功能检测结果

如图 1 和图 2 所示:术后 12 周,IRI 组及 IPO 组血清 BUN 及 Cr 明显高于 Sham 组( $P < 0.01$ ),但 IPO 组血清 BUN 及 Cr 又明显低于 IRI 组( $P < 0.05$ )。两两比较,发现 IRI 组与 Sham 组间差异

有显著统计学意义( $P < 0.01$ );IPO 组与 IRI 组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

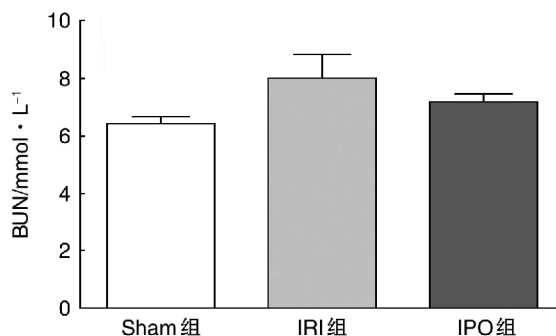


图 1 Sham、IRI、IPO 三组间血清 BUN 的比较

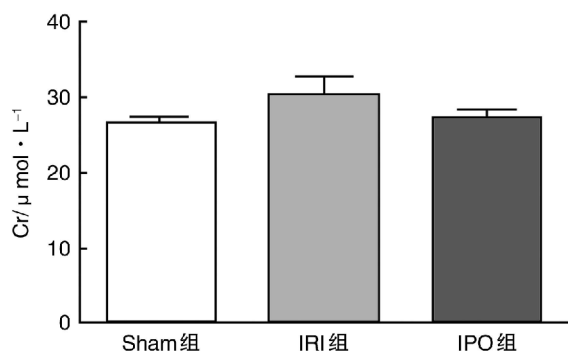


图 2 Sham、IRI、IPO 三组间血清 Cr 的比较

### 2.2 HE 染色显微镜观察结果

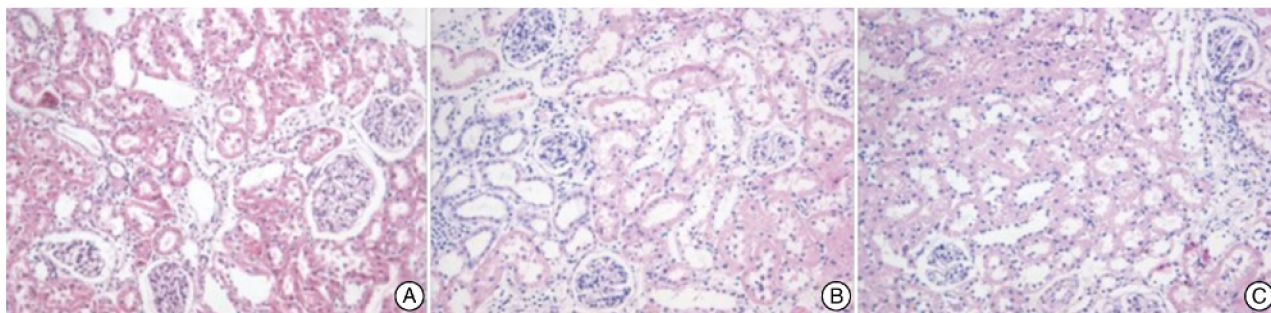
术后 12 周,三组肾组织石蜡切片 HE 染色后在显微镜下发现:与 Sham 组相比(图 3A),IRI 组(图 3B)肾小管上皮细胞坏死明显,肾小管管壁明显变薄,管腔扩张,其内可见管型,同时肾小管周围大量炎性细胞浸润,肾小球血流亦明显减少;IPO 组(图 3C)则只可见部分肾小管上皮细胞水肿样变性,管型少见。

### 2.3 免疫组织化学法观察结果

采用 DAB 染色,并行核复染,阳性结果为棕黄色颗粒。结果发现 CD105 及 endostatin 阳性染色主要分布在肾小管上皮细胞细胞浆内,肾小球为阴性。Sham 组中 CD105 表达最强,IRI 组 CD105 表达最弱,IPO 组表达强于 IRI 组,但稍弱于 Sham 组(图 4)。与之相反,Sham 组中 endostatin 表达最弱,IRI 组中 endostatin 表达最强,IPO 组 endostatin 表达稍强于 Sham 组,但明显弱于 IRI 组(图 5)。

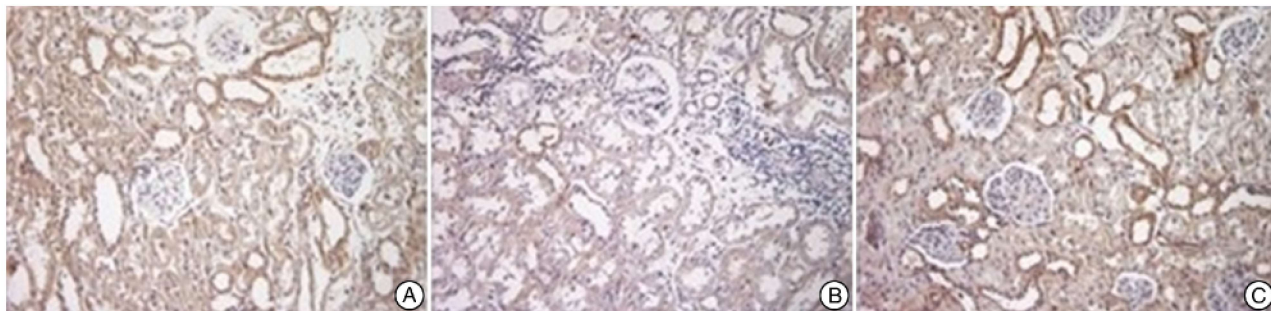
### 2.4 Western blot 检测肾组织胞浆中 CD105 及 endostatin 的表达

Western blot 检测发现,CD105 的表达在 Sham 组最强,IRI 组最弱,IPO 组 CD105 表达强于 IRI 组而稍弱于 Sham 组(图 6);与之相反, endostatin 的表达在 IRI 组最强,在 Sham 组最弱,



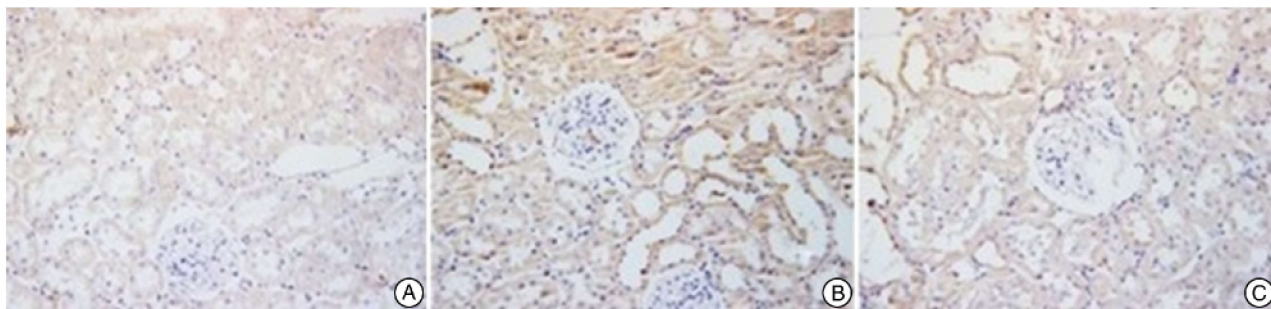
A 代表 Sham 组, B 代表 IRI 组, C 代表 IPO 组

图 3 三组 HE 染色切片比较



A 代表 Sham 组, B 代表 IRI 组, C 代表 IPO 组

图 4 三组免疫组化比较 CD105 表达



A 代表 Sham 组, B 代表 IRI 组, C 代表 IPO 组

图 5 三组免疫组化比较 endostatin 表达

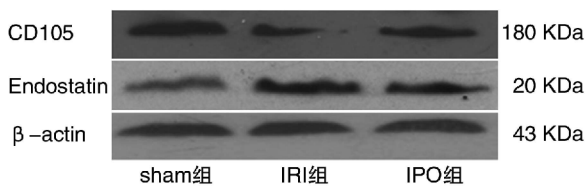


图 6 各组 CD105 及 endostatin 的 Western blot 检测结果

IPO 组则稍强于 Sham 组而明显弱于 IRI 组。

### 3 讨论

缺血预处理对肾脏有明显的保护作用,能够抑制缺血再灌注损伤导致的细胞凋亡<sup>[3~5]</sup>,但是缺血预处理在临床应用中必须在 IRI 发生之前进行,实施的时间窗口较窄,因此存在局限性。相对于缺血预处理,缺血后处理是应用于缺血性事件时的短暂间歇缺血一再灌注交替进行的多个循环。现研究

表明缺血后处理可保护心脏<sup>[6]</sup>、大脑<sup>[7]</sup>、肝脏<sup>[8]</sup>和肾脏<sup>[1,9]</sup>的缺血再灌注损伤。本实验中血生化检查证实缺血后处理能明显改善肾功能,组织学检查也发现缺血后处理可减轻肾小球及肾小管的缺血再灌注损伤。

目前,缺血后处理对肾缺血再灌注损伤的保护机制的研究主要集中在以下几个方面:①减少氧自由基的生成及炎症因子的产生,并加快氧自由基清除速度<sup>[10]</sup>,从而减轻肾缺血再灌注损伤<sup>[11~13]</sup>;②缺血后处理对线粒体膜电位影响,从而减少再灌注时线粒体膜通透性转换孔 MPTPs 的形成<sup>[14]</sup>;③缺血后处理可降低蛋白酶 3、Bax、细胞色素 C 的表达,并通过上调 bcl-2 和 AKt(蛋白激酶 B)表达,从而达到抑制细胞凋亡的作用<sup>[9]</sup>;④缺血后处理下调缺血再灌注损伤后 DAF 及 C5a 的表达水平,从而避

免补体系统的激活<sup>[15]</sup>。

其实损伤后新生血管生成也是机体重要的内在保护机制。机体在缺血缺氧时发生的应激反应中就有缺氧诱导因子通路激活促进新生血管生成从而保护受损器官。CD105 是一种二硫化物连接的同源跨膜蛋白;正常情况下,它主要表达于成人血管的内皮细胞和间质细胞及在胎盘合体滋养体细胞<sup>[16]</sup>。功能上,它是 TGF- $\beta_1$  和 TGF- $\beta_3$  的转化生长因子受体<sup>[17]</sup>,当 TGF- $\beta$  与 CD105 结合时会导致 CD105 去磷酸化<sup>[18]</sup>,去磷酸化的 CD105 促进细胞增殖并激活缺氧诱导蛋白,后者进一步促进新生血管生成,从而减轻机体损伤。与之相反,第十八胶原蛋白的 C-末端片段 endostatin 是众所周知的血管生成抑制因子。体外试验发现它能特异性的抑制血管内皮细胞增生。在缺血损伤的肾脏中发现 endostatin 在肾小球及肾小管细胞内表达增加。本实验中 IRI 组肾小管上皮 CD105 表达最弱,IPO 组则相比 IRI 组表达明显增强;同时,相比假手术组,缺血组老鼠的 endostatin 的表达明显增多,这些不仅说明缺血后处理能明显减轻因缺血再灌注导致的新生血管减少,而且说明缺血后处理可减轻 endostatin 对肾血管内皮细胞及肾小管上皮细胞新生的抑制作用,最终减轻肾小管上皮细胞破坏及肾小管损伤。

综上所述,缺血后处理能减弱缺血再灌注损伤过程中 endostatin 的表达,可减弱其对血管生成的抑制作用,同时增强 CD105 的表达,促进损伤内皮的修复与增殖,有利于新生血管的生成,有助于减轻肾脏的缺血再灌注损伤;也从侧面证实新生血管生成是缺血后处理保护肾免受缺血再灌注损伤的重要保护机制。

#### [参考文献]

- 1 Serviddio G, Romano A D, Gesualdo L, et al. Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23: 1504-1512.
- 2 Jiang S H, Liu C F, Zhang X L, et al. Renal protection by delayed ischaemic preconditioning is associated with inhibition of the inflammatory response and NF-kappaB activation[J]. *Cell Biochem Funct*, 2007, 25: 335-343.
- 3 Ogawa T, Mimura Y, Hiki N, et al. Ischemic preconditioning ameliorates functional disturbance and impaired renal perfusion in rat ischemia reperfused kidneys[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000, 27(12): 467-475.
- 4 Lee H T, Emala C W. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278(3): 380-387.

- 5 Jefayri M K, Grace P A, Mathie R T. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role Of nitric oxide[J]. *BJU Int*, 2000, 85(9): 1007-1013.
- 6 Zhao Z Q, Corvera J S, Halkos M E, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285: H579-H588.
- 7 Yuan Y, Guo Q, Ye Z, et al. Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway[J]. *Brain Res*, 2011, 1367: 85-93.
- 8 Sun K, Liu Z S, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 1934-1938.
- 9 Chen H, Xing B, Liu X, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat[J]. *Transpl Int*, 2008, 21: 364-371.
- 10 Feitoza C Q, Camara N O, Pinheiro H S, et al. Cyclooxygenase 1 and/or 2 blockade ameliorates the renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5: 79.
- 11 Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2002, 11: 301.
- 12 Daemen M A, de Vries B, Buurman W A. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury[J]. *Transplantation*, 2002, 73: 1693.
- 13 Daemen M A, van 't Veer C, Denecker G, et al. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104: 541.
- 14 Zhang W L, Zhao Y L, Liu X M, et al. Protective role of mitochondrial K-ATP channel and mitochondrial membrane transport pore in rat kidney ischemic postconditioning[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124: 2191.
- 15 Wang W, Tang T, Zhang P, et al. Postconditioning attenuates renal ischemia-reperfusion injury by preventing DAF down-regulation[J]. *J Urol*, 2010, 183: 2424.
- 16 Dallas N A, Samuel S, Xia L, et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy[J]. *J Clin Cancer Res*, 2008, 14(7): 1931-1937.
- 17 Duff S E, Li C, Garland J M, et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications[J]. *FASEB J*, 2003, 17: 984.
- 18 Lastres P, Martin-Perez J, Langa C, et al. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin[J]. *Biochem J*, 1994, 301(Pt 3): 765.

(收稿日期:2014-09-12)