

流体剪切力在移植肾机械灌注中的机制及研究进展

王诚 李选鹏 郭霜 张骥 付生军 杨立

【摘要】 近年来,机械灌注临床应用日益成熟,相关设备开发越加完善,其临床获益效果也逐步得到认可。然而,机械灌注对于肾脏的保护机制仍然不明确,可能与机械灌注可以不断提供营养、带走代谢废物以及模拟生理条件下血管内皮经受流体剪切力(FSS)的内环境密切相关。本文就FSS缺失诱发氧化应激反应、FSS突现加重氧化应激损伤以及FSS在机械灌注保存移植肾中的作用进行综述。

【关键词】 流体剪切力(FSS); 供肾; 缺血-再灌注(IR); 机械灌注; 静态低温; 器官移植; 氧化应激; 炎症反应

【中图分类号】 R617 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2018)02-0013-04

肾移植是治疗终末期肾病的最有效手段^[1]。肾脏缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, IR)在移植过程中无法避免,缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是影响移植肾存活时间的关键因素之一。既往临床供肾保存的标准方式是静态低温保存,近年来为降低边缘供肾在保存阶段所受到的IRI,机械灌注保存逐渐应用于供肾保存。经过机械灌注保存的边缘供肾在移植术后短期移植肾功能明显优于静态低温保存的边缘供肾^[2-4]。然而,机械灌注对于供肾的保护机制仍然未知,可能存在的因素包括机械灌注可以不断提供营养、带走代谢废物以及模拟生理条件下血管内皮经受流体剪切力(fluid shear stress, FSS)的内环境。

FSS为血液流动时平行作用于血管内皮的摩擦力,受管径、流体粘稠度和流体模式的影响,可精细调节多种效应分子的反应以及激活血管内皮细胞某些基因表达^[5]。正常生理条件下,体内血管内皮细胞处于连续不断的血液层流中,血流产生的FSS对于维持正常血管内皮细胞功能具有重要意义。现有研究认为内皮细胞膜蛋白或细胞骨架蛋白可以作为机械力的感受器,将物理信号转化为化学信号,从而进一步通过各种信号通路影响细胞的代谢变化。FSS与血管内皮之间的相互作用的研究主要集中在心血管疾病方面,如高血压、动脉粥样硬化等^[6-7]。任何形式的FSS长时间改变都能引起血管内皮细胞功能紊乱,如FSS缺失、

FSS突现及非层流式流体等。本文就FSS在移植肾机械灌注中的机制及研究进展作一综述。

1 FSS缺失诱发氧化应激反应

多项研究表明,在移植肺保存过程中,肺组织在呼吸机的帮助下并未发生组织缺氧,但再灌注后肺组织仍然发生氧化应激损伤,其FSS缺失与突现可能参与其中。在FSS缺失后短时间内,肺毛细胞内皮细胞的机械力感受器可将物理信号转化为化学信号,通过细胞膜去极化而激活磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶(AKT)信号通路,激活尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX)2,产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),后者可激活多种转录因子。上述信号通路的短期激活可能有益于内皮细胞对于FSS缺失的适应,但长时间产生的大量ROS则能诱发内皮细胞炎症反应及细胞凋亡^[8-10]。

2 FSS突现加重氧化应激损伤

IRI是指在缺血的组织器官恢复血流后,不仅无法使组织器官功能得到恢复,反而进一步加重缺血所致的组织器官功能的代谢障碍及结构破坏,甚至出现不可逆损伤。氧化应激反应是IRI的重要损伤机制,氧自由基是参与其反

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.02.013

基金项目: 甘肃省自然科学基金(17JR5RA237)

作者单位: 730030 兰州大学泌尿外科研究所 兰州大学第二医院泌尿外科 甘肃省泌尿系统疾病临床医学中心 甘肃省泌尿系统疾病研究重点实验室

作者简介: 王诚,男,1990年生,硕士研究生,研究方向为肾缺血-再灌注损伤机制, Email: 692166615@qq.com

通讯作者: 杨立,男,1970年生,博士后,主任医师,教授,研究方向为器官移植基础研究, Email: professorsyangli@163.com

应的主要物质,包括羟基自由基、过氧化氢和超氧离子自由基^[11]。肺 IR 相关研究证明,非缺氧的肺组织再灌注时流体的重新恢复诱发了氧化应激反应,其氧化应激产物较单纯缺氧成倍增长,且发现肺组织损伤明显加重。由此可知,器官 IR 时氧化应激损伤并不单是缺氧后恢复供氧产生的氧化应激反应,FSS 的缺失与突现同样会引起并加重氧化应激损伤。

曾有小样本的随机对照研究对机械灌注保存组织器官的效果提出质疑,认为其效果并非明显优于静态低温保存方式^[12]。美国移植受者科学登记数据库大数据分析显示,对于心脏死亡器官捐献(DCD)或供肾扩展标准供体(expanded criteria donor, ECD),在冷缺血时间少于 6 h 的条件下,机械灌注保存与静态低温保存在术后移植物功能延迟恢复(DGF)发生率上并无差异^[13]。可能是由于组织缺氧时间短,细胞可代偿性适应,恢复供氧后可减少组织损伤及再灌注引起的氧化应激产物,而当缺氧时间超过细胞代偿性适应范围,恢复供氧后则会发生 IR 后氧化应激损伤^[14]。

3 FSS 在机械灌注保存移植肾中的作用

2009 年,首篇国际多中心随机对照研究报道了机械灌注保存移植肾的临床研究^[15]。随后机械灌注保存方式在国内应用也不断增多,包括在肝、肾移植等其他器官移植方面^[16]。项和立等^[17]回顾性分析了采用不同保存方式的 340 例 DCD 移植受体临床资料,结果发现机械灌注组的 DGF 发生率明显低于静态低温保存组(11.2% 比 24.1%, $P < 0.05$)。

近年来,国内对于供肾的机械灌注应用日渐增多,在临床应用以及基础研究等方面都做了诸多探索。临床研究方面,何晓顺教授团队正在进行“Lifeport 肾转运器用于 DCD 供肾低温保存的疗效和安全性前瞻性的随机对照研究”;项和立等^[18]对机械灌注在 DCD 供体的评估与维护方面也做了很多研究。基础研究方面,Zhong 等^[19]利用兔肾热缺血 1 h 在体持续灌注模型,对机械灌注保护机制进行研究,发现机械灌注保存方式可以减少 IR 24 h 后肾组织内细胞凋亡。

目前机械灌注的具体作用机制仍不清楚,La Manna 等^[20]采用猪自体肾移植模型研究发现,应用机械灌注保存方式的供肾移植后,细胞内三磷酸腺苷(ATP)水平恢复更快,介导细胞凋亡的穿孔素蛋白表达含量明显低于静态低温保存组。Hosgood 等^[21]构建猪肾离体血液灌注模型,发现机械灌注可改善肾脏 IR 后肾小管功能并减轻肾小管上皮细胞炎症反应。Vaziri 等^[22]在猪肾热缺血 1 h 后分别采用机械灌注保存及静态低温保存 24 h 后行自体移植,以模拟 DCD 供肾移植来研究不同保存方式间的效果差异,发现机械灌注组在改善远期炎症反应、肾小管损伤、间质纤维化方面均明显优于静态低温保存组。

有研究者应用平板流体小室系统提供 FSS,作用于脐

静脉内皮细胞 12 dyn/cm²、24 h 加力适应后,通过模拟器官静态保存 FSS 缺失研究其分子信号通路的变化,结果发现 FSS 缺失后内皮细胞保护因子枯否样因子(Krüppel-like factor, KLF)-2 表达明显减少,且诱发了相关炎症反应及细胞凋亡^[23]。Chatauret 等^[24]在猪肾热缺血 1 h 后分别采用机械灌注保存及静态低温保存两种方式,对两组肾脏进行分析,结果发现机械灌注组磷酸化内皮细胞型一氧化氮合酶(endothelial cell nitric oxide synthase, eNOS)明显增高,保持了一氧化氮(nitric oxide, NO)信号活性。NO 是公认的血管舒张因子,可明显改善移植肾皮质微循环并降低肾动脉阻力,其可能与机械灌注保存所提供的 FSS 激活腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)有关。IR 可导致 ATP 底物过量损耗,从而损伤细胞功能,AMPK 作为生物能量代谢调节的关键分子,可以通过影响细胞物质代谢的多个环节维持细胞能量供求平衡,改善细胞的能量状态从而减轻 IRI^[25]。上述研究均表明机械灌注保存方式不仅可以改善边缘供肾移植术后短期预后,而且能改善远期临床预后。因此,机械灌注保存方式保护供肾的潜在机制研究值得关注,FSS 可能参与其中。

持续不断的流体产生的 FSS 对于维持血管内皮细胞正常稳态具有重要意义,如减轻动脉粥样硬化相关的内皮细胞炎症反应。在炎症反应过程中,白细胞激活的重要步骤包括白细胞在血管内皮细胞表面滚动、粘附和移行,其分子基础是白细胞与血管内皮表面粘附分子的相互作用及细胞因子对粘附分子表达的调节。粘附分子是一类介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间粘附作用的膜表面糖蛋白,参与炎症反应的粘附分子主要有选择素家族、白细胞整合素亚家族和免疫球蛋白超家族^[26]。KLF-2 为锌指样转录因子,可结合于不同的靶基因维持血管内皮细胞正常表型,KLF-2 的高表达不但可以减少粘附分子的表达,而且可以减少炎症因子的释放^[27-28]。已有研究表明静态培养的脐静脉内皮细胞经平板流体小室系统给予 FSS,AMPK 磷酸化快速增高,且 KLF-2 的表达水平升高,持续 24 h 后仍可观察到 AMPK 的激活及 KLF-2 水平明显增高,表明 FSS 有助于维持内皮细胞的稳态。停止 FSS 后,KLF-2 的表达水平随着时间推移开始逐渐下降到基态水平^[7]。同样,在肾小球血管内皮细胞中,FSS 也与 KLF-2 的表达密切相关^[29]。Tozzi 等^[30]收集两组供肾分别采用机械灌注保存及静态低温保存后的保存液,研究发现机械灌注组保存液中炎症因子含量明显低于静态低温保存组,表明机械灌注保存可以减少供肾保存时炎症反应。由此可见,FSS 在机械灌注保存移植肾的过程中扮演着重要角色。

4 结 语

全球范围内的供肾短缺未见缓解,等待肾移植者不断增加,供肾短缺情况在国内也日趋明显。为扩大供肾来源,具有较多术后并发症的 DCD 和 ECD 供肾被广泛用于移植。

此类供体器官对于 IRI 更为敏感, 术后并发症较多, 移植肾存活时间缩短, 因此如何减少该类供肾 IRI 值得研究。静态低温保存一直是临床供肾保存的标准方式, 而现有研究表明经机械灌注保存的边缘供肾在移植术后短期移植肾功能明显优于静态低温保存的边缘供肾。

肾脏血流占心排量的 1/4~1/5, 其血流产生的 FSS 在肾脏血管内皮的稳态作用值得关注。长期以来, 肾脏 IRI 的研究多聚焦在缺氧、能量代谢等方面, 而 FSS 缺失在缺血时不可避免, 对于 FSS 改变与 IRI 之间的关系研究较少。本文综述了 FSS 在移植肾机械灌注中的机制研究进展, 对机械灌注保存供肾的临床应用可起到积极的指导作用, 同时也为其他器官移植保存技术提供相应的信息。

参考文献:

- [1] 张骥, 付生军, 杨立, 等. Lifeport 在肾移植中的应用研究进展 [J]. 器官移植, 2015, 6(5): 298-302. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2015.05.004.
- [2] TRECKMANN J, MOERS C, SMITS JM, et al. Machine perfusion versus cold storage for preservation of kidneys from expanded criteria donors after brain death[J]. *Transpl Int*, 2011, 24(6): 548-554. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2011.01232.x.
- [3] JIAO B, LIU S, LIU H, et al. Hypothermic machine perfusion reduces delayed graft function and improves one-year graft survival of kidneys from expanded criteria donors: a meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81826. DOI: 10.1371/journal.pone.0081826.
- [4] YAO L, ZHOU H, WANG Y, et al. Hypothermic machine perfusion in DCD kidney transplantation: a single center experience[J]. *Urol Int*, 2016, 96(2): 148-151. DOI: 10.1159/000431025.
- [5] ZHOU J, LI YS, CHIEN S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(10): 2191-2198. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303422.
- [6] BAEYENS N, BANDYOPADHYAY C, COON BG, et al. Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(3): 821-828. DOI: 10.1172/JCI83083.
- [7] YOUNG A, WU W, SUN W, et al. Flow activation of AMP-activated protein kinase in vascular endothelium leads to Krüppel-like factor 2 expression[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(11): 1902-1908. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.193540.
- [8] CHATTERJEE S, FISHER AB. Mechanotransduction: forces, sensors, and redox signaling[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(6): 868-871. DOI: 10.1089/ars.2013.5753.
- [9] CHATTERJEE S, NIEMAN GF, CHRISTIE JD, et al. Shear stress-related mechanosignaling with lung ischemia: lessons from basic research can inform lung transplantation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 307(9): L668-L680. DOI: 10.1152/ajplung.00198.2014.
- [10] CHATTERJEE S, FISHER AB. Mechanotransduction in the endothelium: role of membrane proteins and reactive oxygen species in sensing, transduction, and transmission of the signal with altered blood flow[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(6): 899-913. DOI: 10.1089/ars.2013.5624.
- [11] 丁汉东, 廖贵益. 移植肾缺血-再灌注损伤的发生机制及其保护研究进展 [J]. 器官移植, 2016, 7(2): 155-158. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2016.02.015.
- [12] DING HD, LIAO GY. Research progress on mechanism and its protection on ischemia-reperfusion injury of transplant kidney[J]. *Organ Transplant*, 2016, 7(2): 155-158. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2016.02.015.
- [13] WATSON CJ, WELLS AC, ROBERTS RJ, et al. Cold machine perfusion versus static cold storage of kidneys donated after cardiac death: a UK multicenter randomized controlled trial[J]. *Am J Transplant*, 2010, 10(9): 1991-1999. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03165.x.
- [14] GILL J, DONG J, ENG M, et al. Pulsatile perfusion reduces the risk of delayed graft function in deceased donor kidney transplants, irrespective of donor type and cold ischemic time[J]. *Transplantation*, 2014, 97(6): 668-674. DOI: 10.1097/01.TP.0000438637.29214.10.
- [15] SALVADORI M, ROSSO G, BERTONI E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: pathogenesis and treatment[J]. *World J Transplant*, 2015, 5(2): 52-67. DOI: 10.5500/wjt.v5.i2.52.
- [16] MOERS C, PIRENNE J, PAUL A, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(8): 770-771. DOI: 10.1056/NEJMc1111038.
- [17] 程颖. 机械灌注在肝移植中的应用 [J]. 器官移植, 2016, 7(5): 390-393. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2016.05.012.
- [18] CHENG Y. Application of mechanical perfusion in liver transplantation[J]. *Organ Transplant*, 2016, 7(5): 390-393. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2016.05.012.
- [19] 项和立, 薛武军, 田普训, 等. 机械灌注在公民逝世后器官捐献肾移植中的应用 [J]. 中华器官移植杂志, 2015, 36(6): 330-334. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2015.06.002.
- [20] XIANG HL, XUE WJ, TIAN PX, et al. Clinical application of mechanical perfusion in donation after citizen's death donor renal transplantation[J]. *Chin J Organ Transplant*, 2015, 36(6): 330-334. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2015.06.002.
- [21] 项和立, 薛武军, 田普训, 等. 公民逝世后器官捐献供者的评估与维护 [J]. 中华器官移植杂志, 2014, 35(7): 392-395. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2014.07.003.
- [22] XIANG HL, XUE WJ, TIAN PX, et al. Donor evaluation and maintenance of donation after citizen's death [J]. *Chin J Organ Transplant*, 2014, 35(7): 392-395. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2014.07.003.
- [23] ZHONG Z, HU Q, FU Z, et al. Increased expression of aldehyde dehydrogenase 2 reduces renal cell apoptosis during ischemia/reperfusion injury after hypothermic machine perfusion[J]. *Artif Organs*, 2016, 40(6): 596-603. DOI: 10.1111/aor.12607.
- [24] LA MANNA G, CONTE D, CAPPUCILLI ML, et al. An in vivo autotransplant model of renal preservation: cold storage versus machine perfusion in the prevention of ischemia/reperfusion injury[J]. *Artif Organs*, 2009, 33(7): 565-570. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2009.00743.x.
- [25] HOSGOOD SA, YANG B, BAGUL A, et al. A comparison of hypothermic machine perfusion versus static cold storage in an experimental model of renal ischemia reperfusion injury[J]. *Transplantation*, 2010, 89(7): 830-837. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181cfa1d2.
- [26] VAZIRI N, THUILLIER R, FAVREAU FD, et al. Analysis of machine perfusion benefits in kidney grafts: a preclinical study[J]. *J Transl Med*, 2011(9): 15. DOI: 10.1186/1479-5876-9-15.
- [27] GRACIA-SANCHO J, VILLARREAL G JR, ZHANG Y, et al. Flow cessation triggers endothelial dysfunction during organ cold storage conditions: strategies for pharmacologic intervention[J]. *Transplantation*, 2010, 90(2): 142-149. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181e228db.