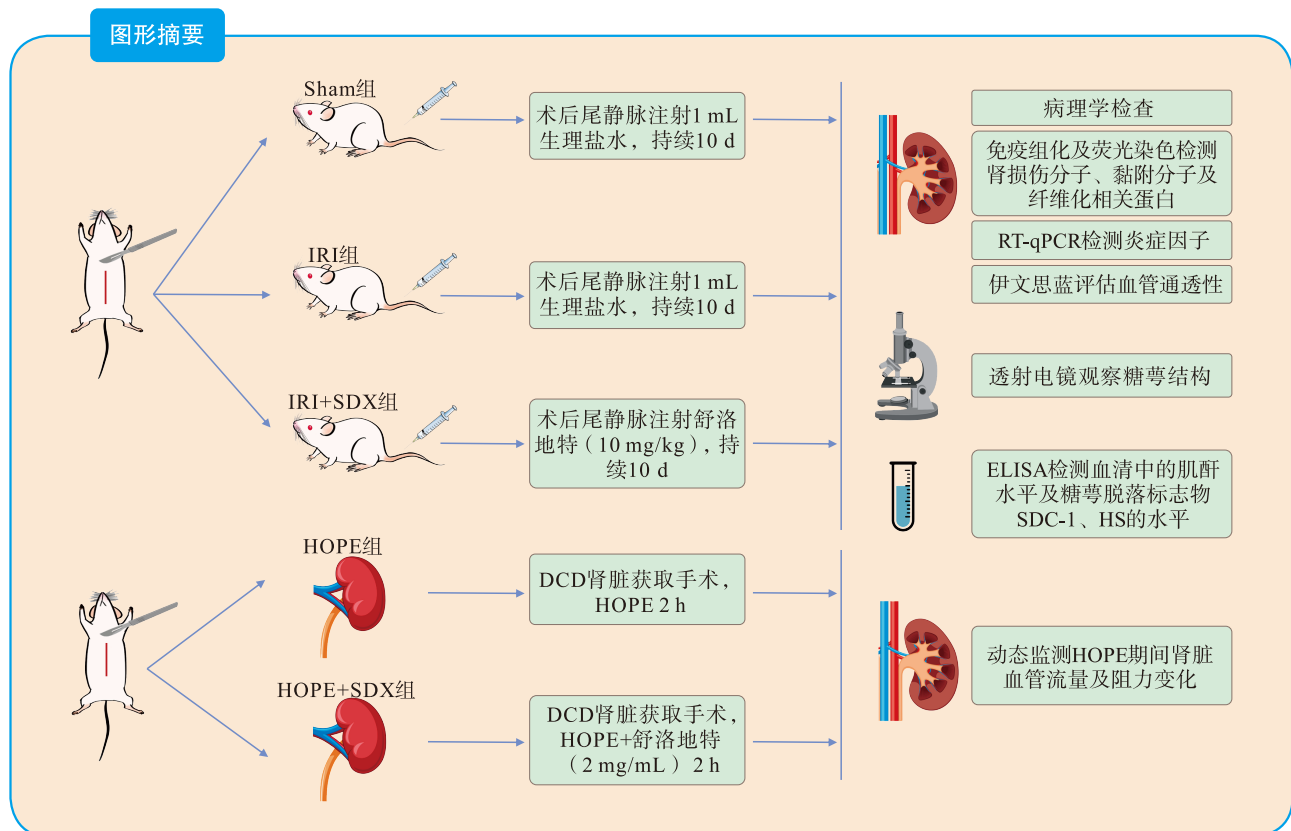


舒洛地特通过保护血管内皮糖萼减轻肾脏长时间缺血-再灌注损伤后肾纤维化

胡超禹 张鹏 孙超 莫舒咏 王彦峰



【摘要】 目的 研究舒洛地特对长时间肾脏热缺血诱导纤维化的改善作用及机制。方法 建立大鼠在体缺血-再灌注损伤 (IRI) 模型, 随机分正常组 (Sham组)、IRI 60 min组 (IRI组)、IRI 60 min+舒洛地特组 (IRI+SDX组), 每组 20 只。病理学检查分析评价各组大鼠肾组织损伤情况及纤维化水平, 免疫组织化学检测肾损伤分子 (KIM)-1、细胞间黏附分子 (ICAM)-1、血管性血友病因子 (vWF)、转化生长因子 (TGF)- β 、 α -平滑肌肌动蛋白 (SMA)、1 型胶原蛋白 (COL-1) 表达水平, 免疫荧光染色检测 CD31 表达情况, 实时荧光

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2025074

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82270793); 深圳市基础研究专项 (自然科学基金) 基础研究面上项目 (JCYJ20240813104159051)

作者单位: 430071 武汉, 武汉大学中南医院肝胆研究院 (胡超禹、莫舒咏、王彦峰); 深圳市人民医院肝胆胰外科 (张鹏); 西安交通大学第二附属医院肝胆胰与肝移植外科 (孙超)

作者简介: 胡超禹 (ORCID 0009-0007-5505-6713), 硕士, 研究方向为肾脏缺血-再灌注损伤与保护, Email: 289165676@qq.com

通信作者: 王彦峰 (ORCID 0000-0002-3859-0937), 主任医师, 研究方向为肾脏缺血-再灌注损伤与保护, Email: yanfengwang@whu.edu.cn

定量聚合酶链反应检测肾组织 KIM-1、ICAM-1、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL-1 β)、IL-6, 透射电镜观察肾脏糖萼结构, 注射伊文思蓝染料评估肾脏血管通透性, 记录各组大鼠存活情况, 检测血清糖萼脱落标志物多配体蛋白聚糖 (SDC)-1、硫酸肝素 (HS) 及血清肌酐表达。建立体外灌注模型, 随机分为单纯低温携氧机械灌注 (HOPE) 组和 HOPE+SDX 组, 每组 5 只, 体外灌注 2 h, 记录灌注参数。**结果** 再灌注后 1 d, 与 Sham 组比较, IRI 组肾组织损伤加重, 肾小管损伤评分升高, KIM-1、ICAM-1、vWF 表达增多, CD31 表达减少, 血清 SDC-1 和 HS 水平升高, 血管通透性增加, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达增多; 与 IRI 组相比, IRI+SDX 组肾组织损伤减轻, 肾小管损伤评分下降, KIM-1、ICAM-1、vWF 表达水平下降, CD31 表达增多, 血清 SDC-1 和 HS 水平降低, 血管通透性下降, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达下降 (均为 $P < 0.05$)。再灌注后 10 d, IRI+SDX 组肾组织损伤进一步减轻。再灌注后 25 d, IRI+SDX 组肾组织 TGF- β 、 α -SMA、COL-1 表达水平降低, 胶原沉积面积下降 (均为 $P < 0.05$)。与 HOPE 组相比, HOPE+SDX 组供肾灌注流量增加, 肾内血管阻力降低 (均为 $P < 0.01$)。**结论** 舒洛地特可通过抑制炎症反应及保护血管内皮糖萼对长时间热缺血所致的肾脏 IRI 及纤维化产生改善效应。

【关键词】 舒洛地特; 低温携氧机械灌注; 肾移植; 缺血-再灌注损伤; 炎症反应; 血管内皮; 糖萼; 纤维化
【中图分类号】 R617, R692 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2025) 03-0009-12

Sulodexide alleviates renal fibrosis following prolonged ischemia-reperfusion injury by protecting vascular endothelial glycocalyx Hu Chaoyu*, Zhang Peng, Sun Chao, Mo Shuyong, Wang Yanfeng. *Institute of Hepatobiliary Research, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: Wang Yanfeng, Email: yanfengwang@whu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effects and mechanisms of sulodexide on renal fibrosis induced by prolonged warm ischemia. **Methods** An *in vivo* ischemia-reperfusion injury (IRI) model was established in rats, which were randomly divided into Sham group, IRI 60 min group (IRI group), and IRI 60 min + sulodexide group (IRI+SDX group), with 20 rats in each group. Pathological examination was used to evaluate renal tissue injury and fibrosis levels in each group. Immunohistochemistry was performed to detect the expression levels of kidney injury molecule (KIM)-1, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, von Willebrand factor (vWF), transforming growth factor (TGF)- β , α -smooth muscle actin (SMA), and type I collagen (COL-1). Immunofluorescence staining was used to detect CD31 expression. Real-time quantitative polymerase chain reaction was employed to measure the expression of KIM-1, ICAM-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6 in renal tissues. Transmission electron microscopy was used to observe the structure of the renal glycocalyx. Evans blue dye was injected to assess renal vascular permeability. Rat survival was recorded, and serum levels of syndecan (SDC)-1, heparan sulfate (HS) and serum creatinine were measured. An *ex vivo* perfusion model was also established, with rats randomly assigned to either the hypothermic oxygenated machine perfusion (HOPE) group or the HOPE+SDX group (five rats per group). Perfusion parameters were recorded after 2 hours of *ex vivo* perfusion. **Results** One day after reperfusion, compared with the Sham group, the IRI group exhibited more severe renal tissue injury, higher tubular injury scores, increased expression of KIM-1, ICAM-1 and vWF, decreased CD31 expression, elevated serum levels of SDC-1 and HS, increased vascular permeability, and higher expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6. Compared with the IRI group, the IRI+SDX group showed reduced renal tissue injury, lower tubular injury scores, decreased expression of KIM-1, ICAM-1 and vWF, increased CD31 expression, lower serum levels of SDC-1 and HS, decreased vascular permeability, and reduced expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 (all $P < 0.05$). Ten days after reperfusion, renal tissue injury was further alleviated in the IRI+SDX group. Twenty-five days after reperfusion, the IRI+SDX group exhibited decreased expression of TGF- β , α -SMA, and COL-1, as well as reduced collagen deposition area (all $P < 0.05$). Compared with the HOPE group, the HOPE+SDX group showed increased renal perfusion flow and decreased intrarenal vascular resistance (both $P < 0.01$). **Conclusions** Sulodexide may alleviate renal IRI and fibrosis caused by prolonged warm ischemia by inhibiting inflammatory responses and protecting vascular endothelial glycocalyx.

【Key words】 Sulodexide; Hypothermic oxygenated machine perfusion; Kidney transplantation; Ischemia-reperfusion injury; Inflammation; Vascular endothelium; Glycocalyx; Fibrosis

全世界范围内等待器官移植的患者数量不断增加,而可供移植的器官数量供不应求,器官移植的供需矛盾日益激烈^[1]。因此大量潜在可用的心脏死亡器官捐献(donation after cardiac death, DCD)器官成为扩大肾移植供者池最主要的器官来源^[2]。缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是肾移植手术过程中不可避免的病理生理过程,包括缺血缺氧损伤和炎症介导的再灌注损伤两个阶段^[3]。热缺血时间的定义是指从心脏骤停到冷灌注开始的时间^[4],是影响供肾质量的重要因素,随着热缺血时间的延长移植功能延迟恢复发生率成指数增加,器官质量恶化越发严重^[5]。而 DCD 供器官不可避免的经历长时间热缺血诱发的严重急性肾损伤(acute kidney injury, AKI),是限制移植成功的危险因素^[6]。IRI 的发生包括以下病理机制,首先器官的缺血缺氧导致细胞无氧代谢和酸中毒,促进了肾小管上皮细胞和血管内皮细胞损伤和死亡。而在血流再灌注后产生肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素(interleukin, IL)-6 和 IL-1 β 等促炎因子,进一步加剧肾小管上皮细胞和血管内皮细胞的损伤^[7-8]。糖萼覆盖于所有血管内皮细胞表面,其功能主要包括血管内皮保护作用(影响内皮细胞功能,调节血细胞和内皮细胞的相互作用,防止细胞在血管内皮上的黏附),维持血管屏障的选择性通透功能,以及感受血流作用力的力学感受器^[9]。肾脏经历长时间热缺血后糖萼结构受损,血管内皮损伤,白细胞聚集,血管通透性增加,纤维化加重。因此减轻肾脏的炎症反应及保护血管内皮对治疗 IRI 以及预防和抑制纤维化进程有着重要意义。

低温携氧机械灌注(hypothermic oxygenated machine perfusion, HOPE)是一种新兴的器官保存技术,在一定时间内可以有效改善缺血缺氧造成的三磷酸腺苷耗竭,为细胞提供营养物质和氧气,维持有氧代谢,减少线粒体氧化应激,进而改善移植器官早期功能。除此之外,HOPE 还具有清除代谢废物、减轻血管痉挛、评估器官功能等优势^[10-12]。舒洛地特是从猪肠黏膜中提取的一种高纯度天然糖胺聚糖,由 80% 的硫酸肝素和 20% 的硫酸皮肤素组成,对血管系统具有多种生物学作用,包括抗炎、抗血栓、抗纤维化、血管调节和内皮保护等^[13]。研究表明,舒洛地特通过使分化的肝窦状内皮细胞得以恢复来延缓小鼠的肝纤维化进程^[14]。此外,还有研究发现舒洛地特预

处理能够通过减轻氧化应激和抑制凋亡以及激活抗凝血酶 III 来减轻肾脏 IRI^[15]。因此,我们猜测在再灌注前后使用舒洛地特可以保护血管内皮减轻糖萼损伤,减轻肾脏纤维化,本研究拟探究舒洛地特对 IRI 所致急性肾损伤和远期预后的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠(10~11 周龄,体质量 350~380 g)购自湖北省疾病控制和预防中心。所有动物被饲养在无病原体环境中,温度 22~24 °C,湿度 60%~70%,并且遵循 12 h 光照/12 h 黑暗循环。放置于通风笼内,并提供标准日粮作为大鼠饲料,实验期间自由饮水,定期更换笼内垫料维持清洁干燥。手术前后禁食 12 h。本实验已通过湖北省安评中心实验动物伦理相关规定(伦理号:202320002)。

1.1.2 主要试剂和仪器 舒洛地特(阿尔法韦士曼,意大利);注射用纤溶酶(北京赛升药业);多配体蛋白聚糖(syndecan, SDC)-1、硫酸肝素(heparin sulfate, HS)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA)试剂盒(睿信生物科技有限公司);血清肌酐测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);伊文思蓝(德国 Merck 公司);抗体均购自武汉塞维尔公司;同时准备蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司);小动物氧合器(东莞科威医疗股份有限公司);KPS-1 肾灌注液、威斯康星大学保存液(University of Wisconsin solution, UW 液)(上海健耕医药科技有限公司);玻璃器官池(南通市海锐实验器材有限公司);手术显微镜(深圳市三镨泰达光学仪器有限公司)。

1.1.3 动物分组 大鼠经过 1 周适应性喂养后,做 IRI 实验的 SD 大鼠按照随机数字表法分为 3 组,每组 20 只:正常组(Sham 组)、IRI 60 min 组(IRI 组)、IRI 60 min+舒洛地特组(IRI+SDX 组)。体外灌注实验的 SD 大鼠按照随机数字表法分为 2 组,每组 5 只,即 HOPE 组、HOPE+SDX 组。

1.2 实验内容与方 法

1.2.1 大鼠单侧 IRI 及纤维化模型的建立及取材 所有外科手术均在戊巴比妥钠(50 mg/kg,腹腔注射)麻醉下进行,氯胺酮(10 mg/kg,腹腔注射)用于控制术后疼痛。再灌注后直至对侧肾脏切除期间,Sham 组和 IRI 组大鼠每日尾静脉注射 1 mL 生理盐

水, IRI+SDX 组大鼠每日尾静脉注射 10 mg/kg 的舒洛地特, 持续 10 d。模型的建立: 麻醉后, 将大鼠置于温控手术装置中的热手术垫 (37 °C) 上。全程连续测量肛门温度, 并保持在 (37.0±0.5) °C。取腹部中线切口暴露左肾蒂并钳夹 60 min 以诱导缺血。松开钳子并关闭腹部后, 术后皮下注射 100 mL/kg 温盐水, 以协助维持水合作用。从麻醉给药到完全清醒, 将动物保存在培养箱 (37 °C) 中。再灌注 10 d 后切除对侧肾脏, 再灌注后 25 d 产生大鼠肾纤维化模型。再灌注 1 d 后每组 6 只取血后安乐死, 获取肾脏组织; 5 只用于评估血管通透性。再灌注 10 d 后每组 3 只安乐死后获取肾脏组织。每组 6 只用于评估生存率, 并在对侧肾脏切除后 1、2、3、5、7、10、14 d 采血测量血清肌酐, 再灌注后 25 d 安乐死后获取肾脏组织。

1.2.2 大鼠 DCD 肾脏模型建立及肾脏获取 采用无肝素化预处理下开胸诱导心脏骤停的方法建立 DCD 大鼠肾模型。麻醉后切开胸腔及双侧膈肌诱导心脏骤停, 在 6~7 min 内观察心脏骤停时间, 将供体大鼠置于 37 °C 加热垫上, 控制热缺血时间 60 min。采用无菌肝素生理盐水 (1 U/mL) 溶解注射用纤溶酶 (10 U/mL) 10 mL, 室温下经腹主动脉原位预冲洗左肾。待肾静脉流出液变清亮后摘取肾脏, 放置肾动脉支架 (24 G), 并置于 4 °C UW 液中保存^[16]。

1.2.3 HOPE 根据先前描述的方法进行 HOPE^[16]。HOPE+SDX 组将舒洛地特 (500 LSU) 加入 25 mL KPS-1 液中 (舒洛地特浓度为 2 mg/mL), 在灌注系统中循环 5 min, 然后将肾脏连接到回路上, 在 4~6 °C 的 HOPE 期间, 维持平均动脉压为 30 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) 灌注 2 h 并记录灌注参数。将特定时间的压力除以同一时间的流量来计算肾脏内血管阻力。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应 再灌注 1 d 后提取肾组织 RNA 并检测浓度及纯度。采用逆转录试剂

盒, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 进行实时荧光定量逆转录聚合酶链反应, 以 β -actin 作为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的计算方法, 对所测得的 Ct 值进行换算, 分析各基因信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 的相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.5 肾组织病理学观察 再灌注 1 d 和 10 d 后肾组织用 10% 多聚甲醛固定 12 h, 石蜡包埋后切片, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色后, 光学显微镜下观察病理学变化, 进行肾小管损伤评分: 0 分, 组织学结构正常; 1 分, 肾小管上皮细胞肿胀、刷状边缘丢失、核固缩或核丢失; 2 分, 肾小管上皮细胞肿胀、刷状边缘丢失、核固缩或核丢失, 损伤范围占 1/3~2/3; 3 分, 肾小管上皮细胞肿胀、刷状边缘丢失、核固缩或核丢失, 损伤范围占整个切片^[17]。再灌注 25 d 后肾组织进行 Masson 染色后使用 Image J 图像分析软件进行半定量分析, 计算肾组织纤维化程度: 胶原容积分数=胶原面积/总面积×100%, 根据 Banff 评分细则分为 0~3 级, 0 级间质纤维化占皮质区域 5%; 1 级间质纤维化占皮质区域 6%~25% (轻度间质纤维化); 2 级间质纤维化占皮质区域 26%~50% (中度间质纤维化); 3 级间质纤维化占皮质区域 >50% (重度间质纤维化)^[18]。

1.2.6 肾组织各因子表达水平检测 再灌注 1 d 后采用免疫组织化学 (免疫组化) 染色检测大鼠肾脏组织肾损伤分子 (kidney injury molecule, KIM)-1、细胞间黏附分子 (intercellular adhesion molecule, ICAM)-1、血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF), 免疫荧光染色检测大鼠肾脏组织 CD31 的表达水平, 评估细胞黏附情况。术后 25 d 免疫组化染色检测转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 、 α -平滑肌肌动蛋白 (smooth muscle actin, SMA)、I 型胶原蛋白 (type 1 collagen, COL-1) 蛋白表达情况, 评估肾脏纤维化情况。采用 Image J 软

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因名称 | 正义链 | 反义链 |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| KIM-1 | 5'-AACGCAGCGATTGTGCATCC-3' | 5'-GTCCACTCACCATGGTAACC-3' |
| ICAM-1 | 5'-AGGTATCCATCCATCCCACA-3' | 5'-GCCACAGTTCTCAAAGCACA-3' |
| TNF- α | 5'-GAGGTCAACCTGCCCAAGTA-3' | 5'-GGGGGCTCTGAGGATTAGAC-3' |
| IL-1 β | 5'-CTGTGACTCGTGGGATGATG-3' | 5'-GGGATTTTGTCTGTTGCTTGT-3' |
| IL-6 | 5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3' | 5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3' |
| β -actin | 5'-CGTTGACATCCGTAAGACC-3' | 5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCAC-3' |

件计算染色阳性面积比例。

1.2.7 血清糖萼脱落标志物及血清肌酐检测 再灌注 1 d 后采集腹主动脉血样 5 mL, 随后安乐死。1 800×g 离心 10 min, 取上清于干净 EP 管中置于 -80 °C 保存备用, 根据 ELISA 检测试剂盒说明书测定血清中 SDC-1、HS 水平。在切除对侧肾脏后 1、2、3、5、7、10、14 d 采集尾静脉血样 0.2 mL, 1 800×g 离心 10 min, 取上清于干净 EP 管中, 根据血清肌酐测量试剂盒说明书测定血清肌酐值。

1.2.8 透射电子显微镜观察糖萼结构 再灌注 1 d 后配置 1% 阿尔新蓝的林格氏液灌注肾脏用于血管内皮糖萼的标记, 灌注结束标记成功后迅速切除直径 0.5~1.0 mm 的小块肾皮质组织, 将其固定在 4 °C 的 2.5% 戊二醛电镜样本固定液中, 用 0.1 mol/L 醋酸钙缓冲液冲洗, 再用 1% 四氧化锇后固定, 然后用蒸馏水冲洗。组织经乙醇脱水后, 用 Agar Scientific 包埋。切片厚度为 50~100 nm, 用 3% 醋酸铀 (水溶液) 和雷诺斯柠檬酸铅溶液染色, 拍摄数字显微照片^[19]。

1.2.9 伊文思蓝染料测量血管通透性 再灌注 1 d 后, 经大鼠尾静脉注射伊文思蓝 (50 mg/kg), 30 min 后经大鼠腹主动脉灌注 0.9% NaCl 冲洗血管中的染料。然后对大鼠实施安乐死及获取肾脏标本, 每个肾脏沿水平面对称切成两块并称重。一半肾脏组织用于在室温下用 100% 甲酰胺 (4 mL/g 肾湿重) 浸泡 24 h 提取伊文思蓝染料。另一半肾组织在 55 °C 下干燥 24 h 并称量干燥前、后肾脏重量以计算干重与湿重之比。使用分光光度法 (620 nm 处) 测定提取的伊文思蓝染料吸光度值, 通过伊文思蓝染料的标准曲线计算得出具体浓度。

1.3 统计学方法

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析和绘图。符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示, 两组独立样本间比较采用非配对 *t* 检验, 组间比较采用单因素方差分析, 然后采用 Tukey 多重比较检验。采用 Kaplan-Meier 生存分析评估生存率。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 舒洛地特治疗降低大鼠 IRI 组织损伤评分并减轻肾小管损伤

HE 染色结果显示, 再灌注后 1 d Sham 组肾小管上皮细胞形态规整, 肾小球与肾小管结构基本正

常; IRI 组肾小管上皮细胞肿胀明显, 肾小管管腔扩张明显, 管腔内可见脱落坏死细胞, 肾小管管型出现, 刷状缘坏死脱落, 间质水肿, 大量炎症细胞浸润, 肾小管损伤评分升高; IRI+SDX 组肾脏组织以上病理损伤减轻, 肾小管损伤评分下降 (均为 P<0.01, 图 1A)。

免疫组化染色结果显示, 与 Sham 组比较, IRI 组大鼠肾小管上皮细胞损伤程度严重, 肾小管管腔受损面积广泛, 皮质和髓质 KIM-1 表达增多; IRI+SDX 组肾小管上皮细胞损伤较 IRI 组减轻, 皮质和髓质 KIM-1 表达减少 (均为 P<0.01, 图 1B)。IRI 组大鼠肾组织 KIM-1 mRNA 相对表达量较 Sham 组增加, IRI+SDX 组 KIM-1 相对表达量较 IRI 组减少 (均为 P<0.01, 图 1C)。

HE 染色结果显示, 再灌注后 10 d, IRI+SDX 组病理损伤进一步减轻, 肾脏结构基本恢复正常水平, 肾组织病理评分进一步降低 (P<0.01, 图 1D)。

2.2 舒洛地特治疗减轻大鼠肾脏 IRI 的炎症反应

再灌注后 1 d, 与 Sham 组比较, IRI 组大鼠血管内皮细胞损伤程度严重, ICAM-1 表达增多, 大量白细胞黏附, 受损面积广泛, 散在分布的血管内皮表现明显的阳性染色; 而 IRI+SDX 组内皮细胞损伤程度较 IRI 组减轻, ICAM-1 表达减少, 白细胞黏附减少 (P<0.01, 图 2A)。

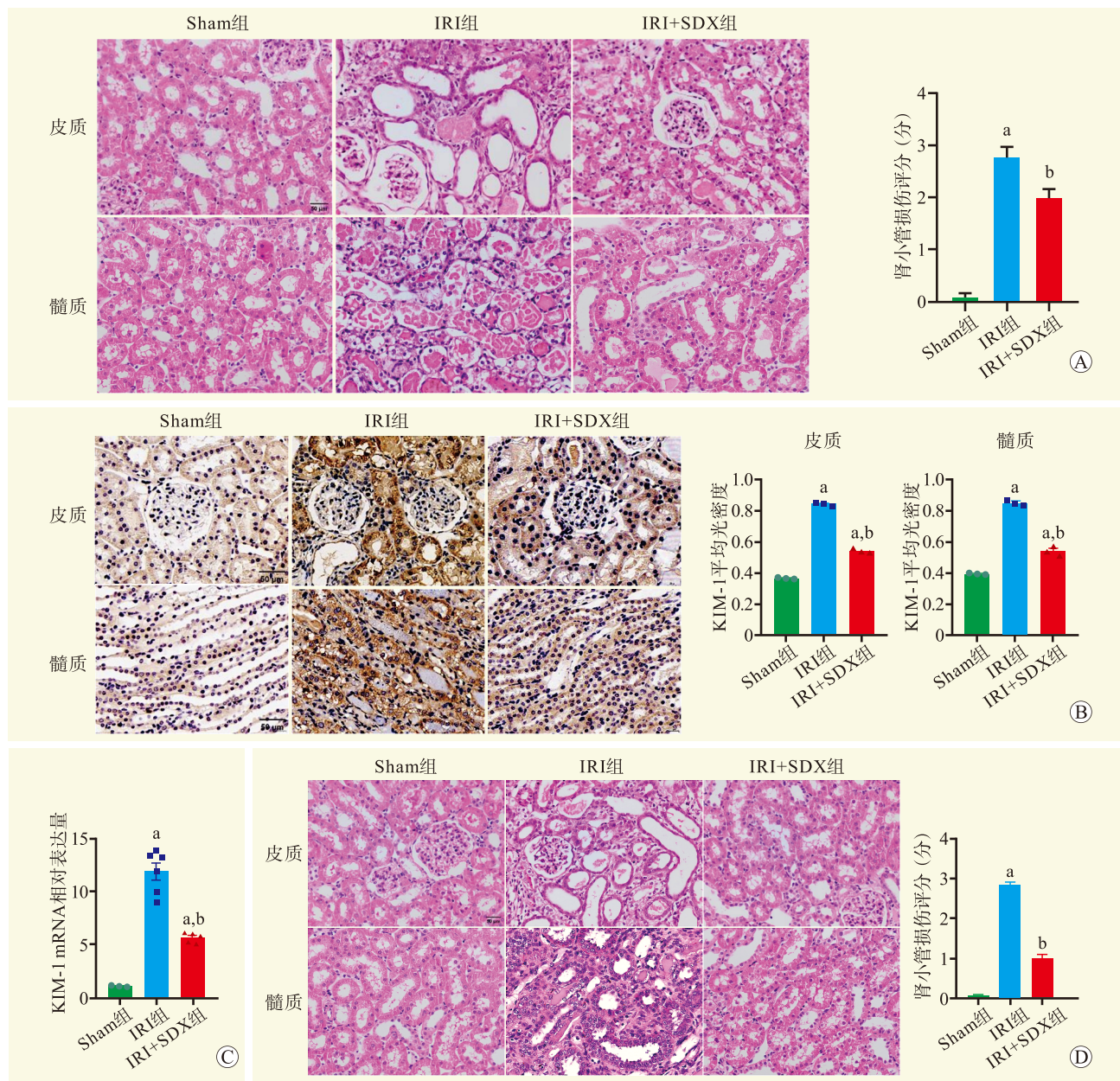
IRI 组肾组织 ICAM-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量较 Sham 组增多, IRI 组+SDX 组肾组织 ICAM-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的 mRNA 相对表达量较 IRI 组减少 (均为 P<0.01, 图 2B~E)。

2.3 舒洛地特保护血管内皮糖萼同时减轻血管痉挛

与 Sham 组比较, 再灌注后 1 d IRI 组大鼠肾组织 vWF 表达增多, 血管内皮细胞被激活, 而 IRI+SDX 组 vWF 表达较 IRI 组减少 (P<0.05, 图 3A)。

与 Sham 组相比, 再灌注后 1 d IRI 组肾脏皮质区肾小管管周毛细血管和髓质直小血管中的 CD31 荧光强度降低且不完整, 而 IRI+SDX 组的血管中表现出 CD31 高表达, 血管完整程度接近正常水平 (P<0.05, 图 3B)。

与 Sham 组比较, 再灌注后 1 d IRI 组大鼠 SDC-1、HS 水平升高, 而 IRI+SDX 组 SDC-1、HS 的水平较 IRI 组降低 (均为 P<0.05, 图 3C、D)。透射电子显微镜下, IRI 组内皮糖萼排列不规则且稀疏, 大部分区域缺失, 管腔内可见大量游离糖萼; IRI+SDX 组



注：A 图为再灌注后 1 d 大鼠肾脏组织 HE 染色及肾小管损伤评分（×400）；B 图为再灌注后 1 d 各组肾组织 KIM-1 表达情况（免疫组化，×400）；C 图为再灌注后 1 d 肾组织 KIM-1 mRNA 相对表达量；D 图为再灌注后 10 d 大鼠肾脏组织 HE 染色及肾小管损伤评分（×400）。与 Sham 组比较，^a $P < 0.01$ ；与 IRI 组比较，^b $P < 0.01$ 。

图 1 肾组织病理改变及肾小管损伤情况

Figure 1 Pathological changes in renal tissue and the degree of tubular injury

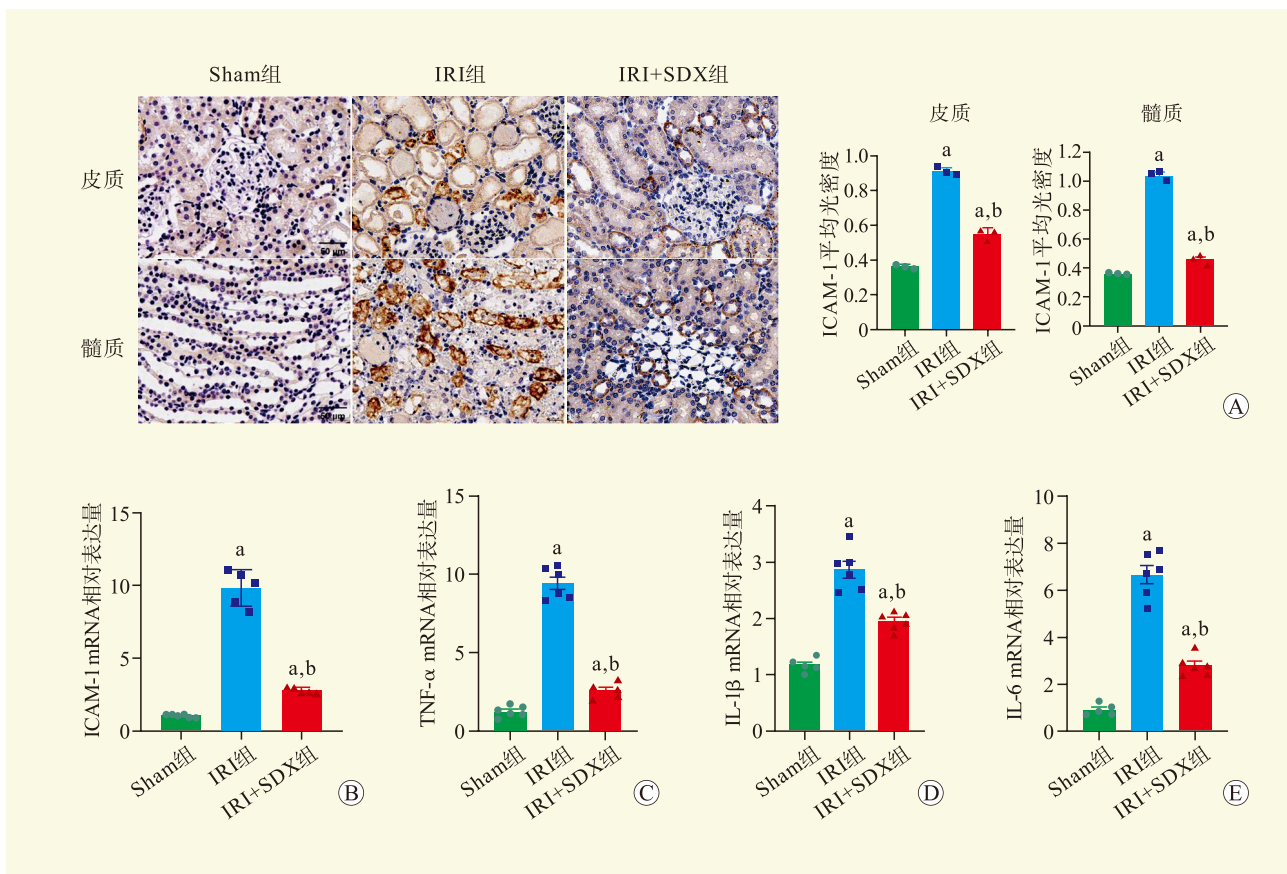
内皮糖萼部分区域排列规则有序且完整，管腔少见游离糖萼，与 Sham 组水平接近（图 3E）。

2.4 舒洛地特维护肾脏血管通透性

再灌注 1 d 后肾脏大体观显示，受损伤的左肾有较强的染色，而对侧肾保留的染料较少。IRI+SDX 组中肾脏的染色情况弱于 IRI 组，肾脏组织中的染料水平低于 IRI 组（ $P < 0.01$ ，图 4）。

2.5 舒洛地特改善大鼠肾脏 IRI 后肾功能同时减轻肾脏纤维化

再灌注 10 d 切除健侧肾脏后，各组大鼠 2 周内全部存活（图 5A）。切除健侧肾脏后 14 d，与 Sham 组比较，IRI 组血清肌酐水平升高，IRI+SDX 组血清肌酐水平升高；与 IRI 组比较，IRI+SDX 组血清肌酐水平降低（均为 $P < 0.05$ ，图 5B）。



注：A 图为再灌注后 1 d 各组肾组织 ICAM-1 染色（免疫组化， $\times 400$ ）；B 图为肾组织 ICAM-1 mRNA 相对表达量；C 图为 TNF- α mRNA 相对表达量；D 图为 IL-1 β mRNA 相对表达量；E 图为 IL-6 mRNA 相对表达量。与 Sham 组比较，^a $P < 0.01$ ；与 IRI 组比较，^b $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠肾组织中 ICAM-1 及炎症因子表达水平比较

Figure 2 Comparison of ICAM-1 and inflammatory factor expression levels in renal tissues of rats among different groups

再灌注后 25 d 肾脏组织 Masson 染色显示，IRI 组有较多胶原沉积在肾小球及肾小管间质，同时小管扩张，肾间质增宽伴有肾小管萎缩，肾间质纤维化病变明显，IRI+SDX 组大鼠肾脏纤维化比例降低，胶原沉积减少 ($P < 0.05$, 图 6A)。与 Sham 组相比，IRI 组 TGF- β 、 α -SMA 和 COL-1 表达增加；而 IRI+SDX 组 TGF- β 、 α -SMA、COL-1 表达量较 IRI 组减少（均为 $P < 0.05$, 图 6B~D）。

2.6 舒洛地特联合 HOPE 治疗可显著改善 DCD 肾脏灌注参数

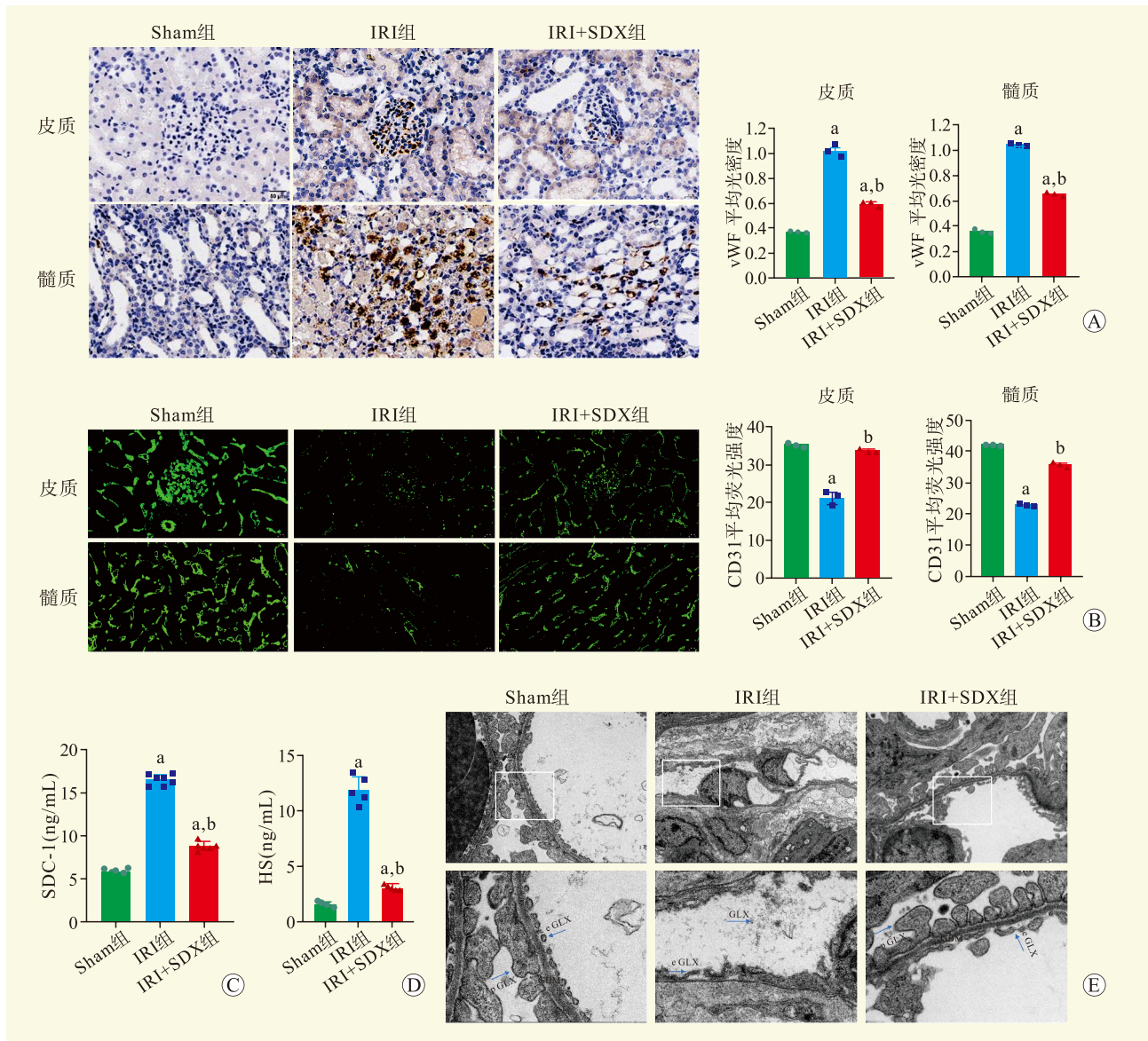
与 HOPE 组相比，HOPE+SDX 组肾脏灌注流量增加，肾内阻力降低，灌注 2 h 结束时，灌注参数恢复良好 [(1.18 \pm 0.03) mL/min 比 (0.49 \pm 0.05) mL/min、(0.25 \pm 0.01) mmHg/(mL \cdot min \cdot 100 g) 比 (0.62 \pm 0.07) mmHg/(mL \cdot min \cdot 100 g)，均为 $P < 0.01$, 图 7]。而 HOPE 组肾脏灌注参数在整个过程中相对稳定，灌注结束时流量及肾内阻力随着灌注时间延长而变

化不大。

3 讨论

肾移植是目前治疗终末期肾病最有效的方法，能极大程度地改善患者的生活质量，提高生存率^[20]。大量潜在 DCD 器官若能得到有效利用，将会在很大程度上缓解供者短缺。DCD 供肾移植后由 IRI 导致的移植物无功能和功能延迟恢复发生率显著增加^[21]，但 IRI 的发病机制复杂，缺乏有效治疗靶点。本研究构建了大鼠 IRI 模型，发现肾脏在热缺血 60 min 再灌注 24 h 以后，大鼠肾小管损伤情况严重，发生炎症风暴，血管内皮遭到破坏，其表面糖萼结构大量脱落，血管通透性增加，炎症反应加重，不利于晚期肾功能恢复并导致肾脏纤维化。

移植术后肾脏不可避免地遭受再灌注损伤，再灌注阶段血流重新恢复后，血管内皮表面糖萼结构的脱落及降解是 AKI 的重要机制，炎症反应攻击裸露的



注：A 图为再灌注后 1 d 各组肾组织 vWF 表达（免疫组化，×400）；B 图为再灌注 1 d 后各组肾组织 CD31 表达（免疫荧光，×400）；C 图为再灌注后 1 d 大鼠血清中 SDC-1 水平；D 图为再灌注 1 d 后大鼠血清中 HS 的水平；E 图为电镜下糖萼结构（eGLX 为内皮糖萼，GBM 为肾小球基底膜，pGLX 为足细胞糖萼）（×8 000，×20 000）。与 Sham 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 IRI 组比较，^b $P < 0.05$ 。

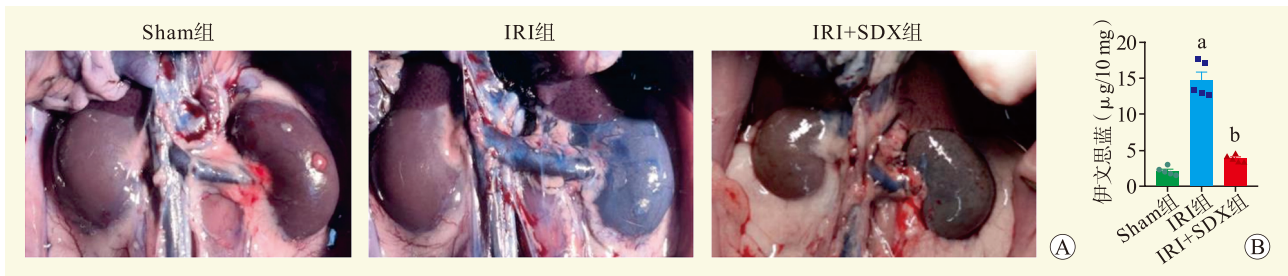
图 3 舒洛地特对血管内皮的影响

Figure 3 The effect of shulotide on vascular endothelium

血管内皮进一步加重肾损伤^[22]。糖萼的主要成分是糖胺聚糖，包括硫酸肝素、硫酸软骨素和透明质酸。糖萼结构在损伤后机体的自然修复缓慢，有研究表明外源性补充糖萼成分，可以有效加速修复受损的糖萼^[23]。糖萼的脱落降解由乙酰肝素酶、透明质酸酶等介导，然而目前尚未有批准用于人类的透明质酸酶抑制剂。舒洛地特是目前唯一一批用于临床的抑制乙酰肝素酶活性的药物^[24]，其构成与糖萼的组成成分相似，为糖萼的修复提供物质来源^[25]，凭借重建和维持糖萼结构

及功能的特性，舒洛地特减少白细胞与内皮细胞之间相互作用，降低促炎因子和趋化因子的释放^[26]，抑制 C-反应蛋白，进而抑制补体系统激活，减轻炎症反应，减轻对内皮糖萼的损害^[27]。

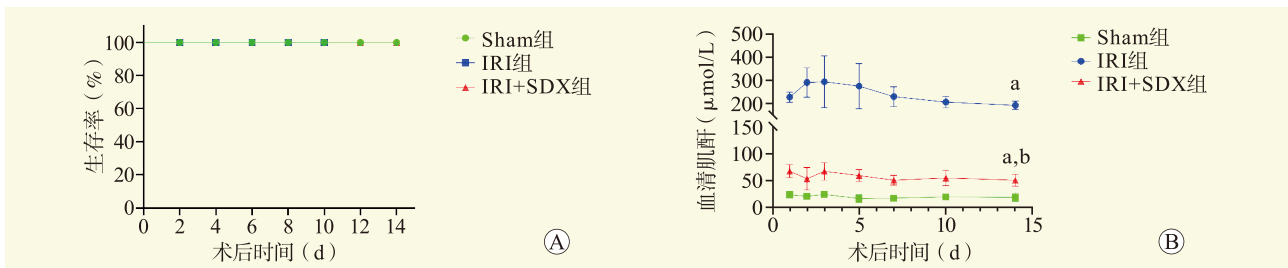
肾移植受者术后血液处于高凝状态，肾脏灌注不足，合并微血栓的形成，表现出缺血性肾病，促进肾脏纤维化的进程。肾移植受者静脉血栓栓塞的发生率高出普通人群 7 倍^[28]。舒洛地特通过抑制 Xa 因子的激活，并与抗凝血酶 III 和肝素辅助因子 II 相互作用来



注：A 图为大鼠肾脏大体观；B 图为大鼠肾脏伊文思蓝染料含量。与 Sham 组比较，^a $P < 0.01$ ；与 IRI 组比较，^b $P < 0.01$ 。

图 4 舒洛地特对肾脏血管通透性的影响

Figure 4 The effect of shulotide on renal vascular permeability



注：A 图为大鼠生存率；B 图为大鼠血清肌酐值。与 Sham 组比较，^a $P < 0.05$ ；与 IRI 组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 5 切除健侧肾脏后大鼠生存率及肾功能比较

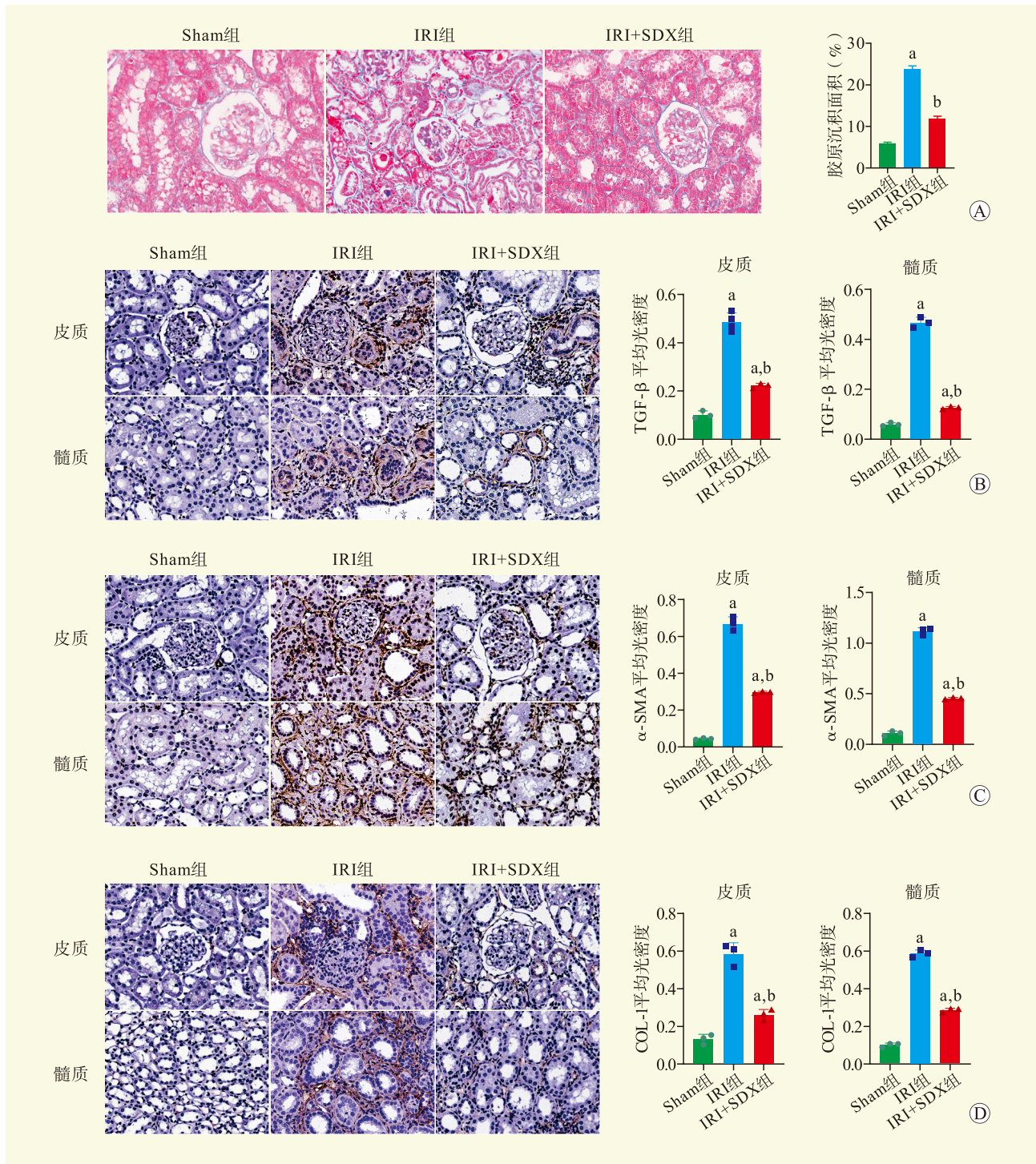
Figure 5 Comparison of survival rate and renal function in rats after removal of healthy kidney

抑制凝血酶的活性，有助于血流通畅和肾脏组织灌注的改善，在不增加出血的风险情况下，减轻肾损伤，延缓纤维化发展^[29-30]。舒洛地特还能够有效预防硫酸乙酰肝素酶-1 通过成纤维细胞生长因子-2 激活炎症通路诱导的肾脏纤维化。在管状细胞中阻止硫酸乙酰肝素酶-1 和基质金属蛋白酶-9 的增加以及 SDC-1 的减少，关闭成纤维细胞生长因子-2 激活的自分泌回路，从而保护晚期肾脏功能并延缓纤维化进程^[31]。既往研究表明，舒洛地特上调肾 Klotho 表达来抑制氧化应激诱导的肾小管间质损伤，预防糖尿病肾病的进展^[32]。舒洛地特为肾小球基底膜有效提供糖胺聚糖，修复基底膜的电荷屏障^[33]，除此之外还可以通过抑制乙酰肝素酶的表达来减轻足细胞损伤，防止糖萼分解脱落，进而阻止蛋白渗漏，改善蛋白尿^[34]。舒洛地特预处理显著降低 IRI 内皮标志物的水平，通过保护内皮细胞来减轻肾脏 IRI^[35]。本研究发现，舒洛地特干预后 IRI 大鼠肾损伤减轻，血管内皮维持相对完整，肾脏血管通透性降低，炎症因子水平下降并延缓肾脏纤维化进展改善肾功能。

HOPE 是离体供肾保存的一种方法，能延长器官保存时间和降低移植功能延迟恢复的发生率。一项临床试验表明，与低温机械灌注相比，经过 HOPE 处理的 DCD 供肾移植后移植功能延迟恢复发生率明

显降低^[36]。与静态冷保存相比，高氧含量的灌注不仅能有效减少活性氧的产生和氧化应激损伤，还可以减少炎症通路的激活，减轻 IRI^[37-38]。本研究中，肾脏热缺血长达 60 min，采用传统 HOPE 处理，阻力指数持续增加，流量进行性降低，提示对于长时间热缺血肾脏，单纯 HOPE 难以达到治疗效果。舒洛地特促进内皮依赖性一氧化氮的产生舒张血管^[39]，并通过降低基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶-9 的表达水平改善内皮功能。一氧化氮通过发挥抗炎、扩张血管、抑制血小板黏附聚集、阻止白细胞附着血管壁、抑制内皮细胞凋亡等作用来保护血管内皮细胞^[40]。这些特性较好地解决了低温下肾脏血管发生痉挛导致灌注不均的问题。缺血后肾脏内血流停滞，凝血系统激活，血管内形成大量血栓，加剧肾脏微循环障碍。本研究使用舒洛地特联合低 HOPE 体外灌注肾脏灌注流量明显增加，肾内阻力明显降低，灌注参数接近正常肾脏灌注水平，为后续移植打下基础。

综上所述，肾脏长时间热缺血后给予舒洛地特能够有效保护肾脏血管内皮，减轻炎症反应，恢复肾功能并延缓肾脏纤维化进程。且舒洛地特联合 HOPE 能够通过减轻血管损伤有效改善 DCD 肾脏功能，有望成为临床 DCD 肾移植术后预防治疗肾脏纤维化的潜在药物，为肾脏 IRI 的治疗提供了



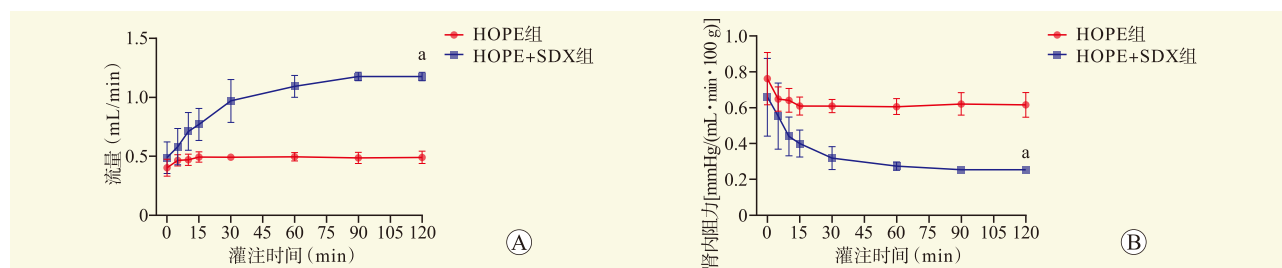
注：A 图为再灌注后 25 d 各组肾组织 Masson 染色 (×400)；B 图为再灌注后 25 d 各组肾组织 TGF-β 表达 (免疫组化, ×400)；C 图为再灌注后 25 d 各组肾组织 α-SMA 表达 (免疫组化, ×400)；D 图为再灌注后 25 d 各组肾组织 COL-1 表达 (免疫组化, ×400)。与 Sham 组比较, ^a*P*<0.05；与 IRI 组比较, ^b*P*<0.05。

图 6 舒洛地特对 IRI 大鼠肾脏纤维化影响

Figure 6 The effect of shulotide on renal fibrosis in rats with IRI

新思路。但本研究仍存在一定局限性, 仅在大鼠在体 IRI 及体外灌注模型中探究了舒洛地特的治疗保护作用, 未使用大鼠肾移植模型验证; 缺乏舒

洛地特保护血管内皮表面糖萼具体作用机制研究; 需要接近人类的大动物相关实验数据验证其保护作用。



注: A 图为 HOPE 期间肾脏灌注流量变化; B 图为 HOPE 期间肾脏肾内阻力变化。与 HOPE 组比较, ^a $P < 0.01$ 。

图 7 舒洛地特联合 HOPE 治疗对肾脏灌注参数的影响

Figure 7 The effect of shulotide combined with HOPE treatment on renal perfusion parameters

参考文献:

- [1] GUO Y, MESSNER F, BECK S E, et al. Gluconate-lactobionate-dextran perfusion solutions attenuate ischemic injury and improve function in a murine cardiac transplant model[J]. *Cells*, 2022, 11(10): 1653. DOI: 10.3390/cells11101653.
- [2] 陈昕, 黄海建, 王晨, 等. 心脏死亡器官捐献供肾零点活检冷冻组织改良 PAS、Masson 和 PASM 染色技术[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2023, 39(9): 1130-1132. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2023.09.024.
- [3] CHEN X, HUANG H J, WANG C, et al. Modified PAS, Masson and PASM staining techniques for frozen tissues of donor kidneys donated by dead heart organs[J]. *Chin J Clin Exp Pathol*, 2023, 39(9): 1130-1132. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2023.09.024.
- [3] HUANG G, YAO Q, YE Z, et al. Gender differential expression of AR/miR-21 signaling axis and its protective effect on renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 861327. DOI: 10.3389/fcell.2022.861327.
- [4] KALISVAART M, DE HAAN J E, POLAK W G, et al. Onset of donor warm ischemia time in donation after circulatory death liver transplantation: hypotension or hypoxia?[J]. *Liver Transpl*, 2018, 24(8): 1001-1010. DOI: 10.1002/lt.25287.
- [5] MADAN S, DÍEZ-LÓPEZ C, PATEL S R, et al. Utilization rates and heart transplantation outcomes of donation after circulatory death donors with prior cardiopulmonary resuscitation[J]. *Int J Cardiol*, 2025, 419: 132727. DOI: 10.1016/j.ijcard.2024.132727.
- [6] CHUMDERMPAETSUK R R, ALVINO D M L, KAUL S, et al. Impact of donor warm ischemia time on graft survival for donation after circulatory death kidney transplantation[J]. *Transplantation*, 2025, 109(3): 504-510. DOI: 10.1097/TP.0000000000005155.
- [7] WANG Y, LI H, JIANG S, et al. The glycolytic enzyme PFKFB3 drives kidney fibrosis through promoting histone lactylation-mediated NF- κ B family activation[J]. *Kidney Int*, 2024, 106(2): 226-240. DOI: 10.1016/j.kint.2024.04.016.
- [8] KAWAMURA M, MATSUMURA S, ABE T, et al. A novel Si-based antioxidant agent attenuates antibody-mediated rejection in allogeneic rat kidney transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2025, S1600-S6135(25): 00035-8. DOI: 10.1016/j.ajt.2025.01.029.
- [9] 黄斌, 周婉, 叶山东. 肾小球血管内皮细胞糖萼与糖尿病肾脏病的研究进展[J]. *中华糖尿病杂志*, 2022, 14(9): 997-1000. DOI: 10.3760/cma.j.cn115791-20211224-00688.
- [10] HUANG B, ZHOU W, YE S D. Research progress of glomerular endothelial glycocalyx and diabetic kidney disease[J]. *Chin J Diabetes Mellit*, 2022, 14(9): 997-1000. DOI: 10.3760/cma.j.cn115791-20211224-00688.
- [10] VASURI F, GERMINARIO G, CIAVARELLA C, et al. Trophism and homeostasis of liver sinusoidal endothelial graft cells during preservation, with and without hypothermic oxygenated perfusion[J]. *Biology*, 2022, 11(9): 1329. DOI: 10.3390/biology11091329.
- [11] BRÜGGENWIRTH I M A, MUELLER M, LANTINGA V A, et al. Prolonged preservation by hypothermic machine perfusion facilitates logistics in liver transplantation: a European observational cohort study[J]. *Am J Transplant*, 2022, 22(7): 1842-1851. DOI: 10.1111/ajt.17037.
- [12] EDEN J, THORNE A M, BODEWES S B, et al. Assessment of liver graft quality during hypothermic oxygenated perfusion: the first international validation study[J]. *J Hepatol*, 2025, 82(3): 523-534. DOI: 10.1016/j.jhep.2024.08.030.
- [13] 吴朝阳, 李湛军, 董武军. 舒洛地特老药新用在治疗新型冠状病毒肺炎中的作用[J]. *世界临床药物*, 2023, 44(8): 865-870,890. DOI: 10.13683/j.wph.2023.08.016.
- [13] WU Z Y, LI Z J, DONG W J. The effect of old drug sulodexide in the treatment of corona virus disease 2019[J]. *World Clin Drug*, 2023, 44(8): 865-870,890. DOI: 10.13683/j.wph.2023.08.016.
- [14] HUANG R, DENG J, ZHU C P, et al. Sulodexide attenuates liver fibrosis in mice by restoration of differentiated liver sinusoidal endothelial cell[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 160: 114396. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114396.
- [15] YIN J, CHEN W, MA F, et al. Sulodexide pretreatment attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6): 9986-9995. DOI: 10.18632/oncotarget.14309.
- [16] ZHANG P, SUN C, MO S, et al. Salvaging donated kidneys from prolonged warm ischemia during ex vivo hypothermic oxygenated perfusion[J]. *Kidney Int*, 2024, 106(2): 273-290. DOI: 10.1016/j.kint.2024.04.018.
- [17] SANCHO-MARTÍNEZ S M, SÁNCHEZ-JUANES F, BLANCO-GOZALO V, et al. Urinary TCP1-eta: a cortical damage marker for the pathophysiological

- diagnosis and prognosis of acute kidney injury[J]. *Toxicol Sci*, 2020, 174(1): 3-15. DOI: 10.1093/toxsci/kfz242.
- [18] YOO D, GOUTAUDIER V, DIVARD G, et al. An automated histological classification system for precision diagnostics of kidney allografts[J]. *Nat Med*, 2023, 29(5): 1211-1220. DOI: 10.1038/s41591-023-02323-6.
- [19] OLTEAN S, QIU Y, FERGUSON J K, et al. Vascular endothelial growth factor-A165b is protective and restores endothelial glycocalyx in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(8): 1889-1904. DOI: 10.1681/ASN.2014040350.
- [20] TATTOLI L, SANTOVITO D, RACITI I M, et al. Risk assessment and management for potential living kidney donors: the role of "third-party" commission[J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 824048. DOI: 10.3389/fpubh.2022.824048.
- [21] RADAJEWSKA A, SZYLLER J, KRZYWONOS-ZAWADZKA A, et al. Mitoquinone alleviates donation after cardiac death kidney injury during hypothermic machine perfusion in rat model[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14772. DOI: 10.3390/ijms241914772.
- [22] HU Z, CANO I, LEI F, et al. Loss of the endothelial glycocalyx component EMCN leads to glomerular impairment[J]. *Circ Res*, 2025, 136(1): 59-74. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.124.325218.
- [23] WANG Y, QU R, DU W, et al. In situ bioorthogonal repair of the vascular endothelium glycocalyx to treat acute lung injury[J]. *Small*, 2024, 20(49): e2405092. DOI: 10.1002/smll.202405092.
- [24] SONG J W, ZULLO J, LIPPHARDT M, et al. Endothelial glycocalyx-the battleground for complications of sepsis and kidney injury[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2018, 33(2): 203-211. DOI: 10.1093/ndt/gfx076.
- [25] BUIJSERS B, MACIEJ-HULME M, JACOBS M, et al. Glycosaminoglycans and fucoidan have a protective effect on experimental glomerulonephritis[J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1223972. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1223972.
- [26] HE Y, ZHANG X, YAO Y, et al. Analysis of the prognostic efficacy of syndecan-1 for patients with ACLF and its functional role in liver regeneration[J]. *BMC Med*, 2025, 23(1): 104. DOI: 10.1186/s12916-025-03931-4.
- [27] ZIELIŃSKI A, JASIŃSKA-SUMIŃSKA K, BRĘBOROWICZ A, et al. Changes of the serum properties and its effect on the endothelial cells restoration in patients with chronic venous disease treated with sulodexide[J]. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*, 2024, 12(5): 101941. DOI: 10.1016/j.jvsv.2024.101941.
- [28] JEONG R, QUINN R R, RAVANI P, et al. Graft function, albuminuria, and the risk of hemorrhage and thrombosis after kidney transplantation[J]. *Can J Kidney Health Dis*, 2020, 7: 2054358120952198. DOI:10.1177/2054358120952198.
- [29] DOU H, SONG A, JIA S, et al. Heparinoids danaparoid and sulodexide as clinically used drugs[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 163: 55-74. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2019.02.005.
- [30] DAS GRAÇAS COELHO DE SOUZA M, LEAL I B, DE ALMEIDA CYRINO F Z G, et al. Effects of different routes of administration and doses of sulodexide on leukocyte-endothelium interaction and tissue perfusion on an animal model of low flow and high pressure in veins[J]. *Phlebology*, 2022, 37(10): 721-731. DOI: 10.1177/02683555221114539.
- [31] MASOLA V, ONISTO M, ZAZA G, et al. A new mechanism of action of sulodexide in diabetic nephropathy: inhibits heparanase-1 and prevents FGF-2-induced renal epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Transl Med*, 2012, 10: 213. DOI: 10.1186/1479-5876-10-213.
- [32] LIU Y N, ZHOU J, LI T, et al. Sulodexide protects renal tubular epithelial cells from oxidative stress-induced injury via upregulating klotho expression at an early stage of diabetic kidney disease[J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 4989847. DOI: 10.1155/2017/4989847.
- [33] ZHAO Q, YIN J, LU Z, et al. Sulodexide protects contrast-induced nephropathy in sprague-dawley rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(3/4): 621-632. DOI: 10.1159/000452575.
- [34] CHEN S, FANG Z, ZHU Z, et al. Protective effect of sulodexide on podocyte injury in adriamycin nephropathy rats[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29(6): 715-719. DOI: 10.1007/s11596-009-0608-0.
- [35] HANA L, TLAPAKOVA K, CIZKOVA D, et al. Prevention of ischemia-reperfusion injury on the porcine model of supra-renal aortic clamp by sulodexide[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2025, DOI:10.1177/13860291241306568 [Epub ahead of print].
- [36] JOCHMANS I, BRAT A, DAVIES L, et al. Oxygenated versus standard cold perfusion preservation in kidney transplantation (COMPARE): a randomised, double-blind, paired, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2020, 396(10263): 1653-1662. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32411-9.
- [37] MESNARD B, OGBEMUDIA E, BRUNEAU S, et al. Pancreas preservation: hypothermic oxygenated perfusion to improve graft reperfusion[J]. *Transplantation*, 2025, 109(1): e1-e10. DOI: 10.1097/TP.0000000000005111.
- [38] LUO J, HU Y, QIAO Y, et al. Hypothermic oxygenated machine perfusion promotes mitophagy flux against hypoxia-ischemic injury in rat DCD liver[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5403. DOI: 10.3390/ijms24065403.
- [39] DAUTH A, BRĘBOROWICZ A, RUAN Y, et al. Sulodexide prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress in porcine retinal arterioles[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2): 388. DOI: 10.3390/antiox12020388.
- [40] RAFFETTO J D, CALANNI F, MATTANA P, et al. Sulodexide promotes arterial relaxation via endothelium-dependent nitric oxide-mediated pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 166: 347-356. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.04.021.

(收稿日期: 2025-01-26)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)