

## 肾动脉内、外膜射频消融对比格犬肾动脉 CD36 和 SR-A 表达的影响

朱利杰<sup>1,2</sup>, 高传玉<sup>1,2</sup>, 王宪沛<sup>1,2</sup>, 齐大屯<sup>1,2</sup>, 白民富<sup>1,2</sup>, 简冬冬<sup>1,2</sup>, 杨宏辉<sup>1,2</sup>

(1.河南省人民医院心血管内科;2.阜外华中心血管病医院,河南省郑州市 450000)

[关键词] 肾动脉射频消融; CD36; SR-A; 肾动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 研究肾动脉内、外膜射频消融对肾动脉清道夫受体 CD36 和 SR-A 表达水平的影响,分析肾动脉射频消融导致肾动脉粥样硬化的潜在风险。**方法** 选取健康比格犬 14 只,雌雄各半,分为实验组(10 只)和对照组(4 只),实验组两侧肾动脉随机分为内膜组(10 条动脉)和外膜组(10 条动脉)。内膜组和外膜组均分为术后 1 个月组(5 条动脉)和术后 3 个月组(5 条动脉),对照组分为术后 1 个月组(4 条动脉)和术后 3 个月组(4 条动脉)。行肾动脉 HE 染色、免疫组织化学染色观察肾动脉的病理改变;通过 Western blot 检测肾动脉 CD36 和 SR-A 表达水平。**结果** (1)肾动脉造影结果:术后 1 个月内膜组出现 1 例肾动脉明显狭窄,其余均未见肾动脉狭窄。(2)肾动脉病理改变:肾动脉射频消融后,HE 染色可见肾动脉灼烧部位中膜平滑肌排列紊乱,内膜局部增厚,结构破坏;免疫组织化学结果可见肾动脉 CD36 表达聚集。对照组血管壁未见明显改变。(3)肾动脉 CD36 和 SR-A 表达:①术后 1 个月,内膜组( $n=5$ )和外膜组( $n=5$ )CD36 和 SR-A 表达量明显多于对照组( $n=4$ )( $P$ 均 $<0.001$ );内膜组( $n=5$ )较外膜组( $n=5$ )CD36 和 SR-A 表达量增加,差异有显著性( $P=0.040$ 和 $P=0.007$ )。②术后 3 个月,内膜组( $n=5$ )和外膜组( $n=5$ )CD36 和 SR-A 表达量明显高于对照组( $n=4$ )( $P$ 均 $<0.001$ );而内膜组( $n=5$ )较外膜组( $n=5$ )CD36 和 SR-A 表达量增加,差异有统计学意义( $P$ 均 $<0.001$ )。**结论** 肾动脉射频消融有导致肾动脉狭窄的可能,内膜消融可能更容易出现肾动脉狭窄;肾动脉内、外膜射频消融均有导致肾动脉粥样硬化的潜在风险。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Effect of renal artery radiofrequency ablation in endarterium or adventitia on the expression of CD36 and SR-A

ZHU Lijie<sup>1,2</sup>, GAO Chuanyu<sup>1,2</sup>, WANG Xianpei<sup>1,2</sup>, QI Datun<sup>1,2</sup>, BAI Mingfu<sup>1,2</sup>, JIAN Dongdong<sup>1,2</sup>, YANG Honghui<sup>1,2</sup>

(1. Department of Cardiology, Henan Provincial People's Hospital; 2. Fuwai Center China Cardiovascular Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China)

[KEY WORDS] renal denervation; CD36; SR-A; renal artery atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of renal artery radiofrequency ablation in endarterium or adventitia on renal artery atherosclerosis by detecting expression levels of renal artery macrophage scavenger receptor (CD36 and SR-A).

**Methods** 14 healthy beagles (7 male, 7 female) were randomly divided into experimental group ( $n=10$ ) and control group ( $n=4$ ), and two arteries in every beagle of the experimental group were randomly assigned to endarterium group (10 artery) and adventitial group (10 artery). At 1 month and 3 months follow-up, renal artery angiography was performed to observe the renal artery morphological change; HE staining and immunohistochemical staining were used to observe the renal artery pathological change; Western blot was used to detect the expression levels of renal artery macrophage scavenger receptor (CD36 and SR-A).

**Results** (1) At 1 month follow-up, 1 case of obvious renal artery stenosis was found in endarterium group. (2) In the experimental group after renal denervation, intimal structure of renal artery was discontinued by HE staining, but no change was found in the control group; Immunohistochemistry showed the higher expression of CD36 in renal artery of experimental group. (3) The expression of scavenger receptors (CD36 and SR-A) in renal artery:

[收稿日期] 2018-08-02

[修回日期] 2018-10-27

[基金项目] 河南省科技攻关项目(172102310291);中国心血管健康联盟-心脏康复与代谢治疗基金(CCA-CRMT-1615)

[作者简介] 朱利杰,硕士研究生,主治医师,研究方向为冠心病的基础与临床研究,E-mail 为 zhulijie7788@163.com。通信作者高传玉,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向为冠心病的基础与临床研究,E-mail 为 gaocy6802@163.com。

①At 1 month follow-up, the expression levels of scavenger receptor CD36 and SR-A were significantly higher in endarterium group ( $n=5$ ) and adventitia group ( $n=5$ ) than that in the control group ( $n=4$ ) ( $P<0.001$ ); And the expression levels of scavenger receptor CD36 and SR-A were significantly higher in endarterium group ( $n=5$ ) than that in adventitia group ( $P=0.040$  and  $P=0.007$ ); ②At 3 months follow-up, the expression levels of scavenger receptor CD36 and SR-A were significantly higher in endarterium group ( $n=5$ ) and adventitia group ( $n=5$ ) than that in control group ( $n=4$ ) ( $P<0.001$ ); And the expression levels of scavenger receptor CD36 and SR-A were significantly higher in endarterium group ( $n=5$ ) than that in adventitia group ( $n=5$ ) ( $P<0.001$ ). **Conclusion** Renal artery stenosis may appear after renal denervation, and it was easier to lead to renal artery stenosis after renal denervation in endarterium; The structure of renal artery endarterium may be damaged (thickening and discontinuous) after renal denervation; and it is higher in endarterium, so it has the potential risk of renal atherosclerosis after renal denervation.

高血压是导致心脑血管疾病死亡的重要原因之一,每年大约有 700 万人因高血压而死亡<sup>[1]</sup>。高血压患者比例逐年增加<sup>[2]</sup>。部分高血压患者在使用多种降压药物后血压仍然控制不佳,所以寻求其他能够有效治疗高血压的方法成为人们研究的热点。肾脏去交感神经术(renal denervation, RDN)作为一种治疗高血压的微创方法在全世界范围内兴起,包括动物实验和临床等诸多领域<sup>[3]</sup>。RDN 可以同时阻断肾动脉传入神经和传出神经<sup>[4]</sup>,在顽固性高血压的治疗中显示卓越的效果。但动物实验中发现肾动脉壁烧灼部位的内皮、中层平滑肌、外膜的纤维化以及蛋白聚糖沉积,而神经纤维免疫组织染色发现神经束周围的神经外膜纤维组织明显增厚,纤维化及胶原沉积明显<sup>[5-7]</sup>。临床研究发现肾动脉内膜射频消融能造成肾动脉损伤,可能导致肾动脉狭窄等并发症。本研究从分子水平进行肾动脉 CD36 和 SR-A 的表达量比较,分析肾动脉内、外膜射频消融对肾动脉粥样硬化的潜在风险。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

14 只健康比格犬(雌雄各半),年龄 12~14 月,体质量 9~12 kg,由扬州四方实验动物科技有限公司提供。本研究获得河南省人民医院动物实验伦理委员会的批准。

### 1.2 实验试剂

0.9% 盐水,肾动脉蛋白裂解液,0.01 mol/L PBS 液,SDS-PAGE 试剂,甘氨酸,Tris 碱,SDS,甲醇,脱脂奶粉,硝酸纤维素膜 NC 膜,滤纸,柯达胶片,发光液,显影液,定影液,4% 多聚甲醛固定液,二甲苯,中性树胶,苏木精染色液,伊红染色液;一抗羊抗狗 IgG(Santa Cruz Biotechnology 公司),二抗兔抗山羊 IgG(武汉博士德生物技术有限公司),戊巴比妥钠

粉剂(德国默克),阿托品(昆明制药集团股份有限公司),肝素钠注射液,庆大霉素注射液。

### 1.3 实验分组

14 只比格犬随机分为实验组(10 只)和对照组(4 只),实验组比格犬两侧肾动脉随机分为内膜组(10 条动脉)和外膜组(10 条动脉)。对照组(8 条动脉)未行射频消融。术后 1 个月和术后 3 个月,实验组分别处死 5 只比格犬,对照组分别处死 2 只比格犬,故内膜组和外膜组肾动脉各 5 条,对照组肾动脉各 4 条。

### 1.4 手术步骤

1.4.1 术前准备 所有拟行肾动脉造影的比格犬,术前 12 h 禁食,术前 6 h 禁水,称重。

1.4.2 麻醉 按 30 mg/kg 静脉注射 3% 戊巴比妥钠,每分钟小于 2 mL 的速度静脉推注,直至麻醉成功,给予阿托品 1 mg 静脉推注,术中出现输液反应时给予地塞米松 1 mg,术中根据实验犬的苏醒、烦躁等适时适量补充 3% 戊巴比妥钠。

1.4.3 手术过程 (1)肾动脉内膜射频消融:①造影观察双侧肾动脉有无狭窄、夹层、血栓、畸形及长短、粗细等情况;②完成造影后,拔出导管,插入 6F 温控大头射频导管,肾动脉内膜由远到近纵横分割的 4~6 个螺旋形位点行射频消融,消融功率 8 W,温度 45 °C,每个点消融持续 2 min;③肾动脉射频消融后再次从肾动脉造影,观察肾动脉有无水肿、夹层、狭窄、血栓形成等;④术后 3 天每天给予肌注庆大霉素 8 万 U 预防术后感染。(2)肾动脉外膜射频消融:①外膜组沿腹直肌一侧切开,逐层分离皮下组织及肌肉,暴露肾脏,然后分离肾脏动静脉,暴露出外膜组肾动脉;②用 6F 温控大头射频导管在生理盐水浸泡下行肾动脉外膜射频消融,同样 4~6 个消融位点,功率为 8 W,温度 45 °C,每个点消融 2 min;③术后 3 天每天肌注庆大霉素 8 万 U 预防术后感染。

### 1.5 HE 染色

处死比格犬,取出肾动脉放于液氮罐中保存。用 10% 中性甲醛固定 24~48 h,脱水,透明,包埋。将包埋有肾动脉组织的石蜡切片切成厚度为 4  $\mu\text{m}$  的切片,至 60  $^{\circ}\text{C}$  烤箱中烘烤过夜,使切片密切黏附在预先使用多聚赖氨酸处理的载玻片。脱蜡,染色,脱水,透明,镜检。

### 1.6 免疫组织化学染色

载玻片防脱片剂处理;切片脱蜡至水;蒸馏水洗 2 min $\times$ 3 次;微波修复抗原;滴加 0.02 mol/L PBS;滴加适量一抗(羊抗狗 IgG);配制二抗工作液;配制 SABC 工作液;DAB 显色;苏木精轻度复染,脱水,透明,封片。

### 1.7 Western blot 分析

分离肾动脉组织,加入裂解液,设定 4  $^{\circ}\text{C}$ ,14000 r/min 离心 20 min,收集上清液行蛋白定量,加入 20  $\mu\text{L}$  的 6 $\times$  变性 Buffer 经 100  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min 后,SDS-PAGE 分离蛋白,调整 300 mA 恒流转膜 2 h。用

0.01 mol/L PBS 液配制 5% 脱脂牛奶封膜,然后用 0.01 mol/L PBST 液稀释一抗(SR-A:1:200,CD36:1:100),用 0.01 mol/L PBST 液洗膜,5 min $\times$ 4 次弃一抗,用 0.01 mol/L PBST 液稀释二抗(内参 1:5000,SERCA2a 1:2000),封膜 2 h,涂发光液后于暗室内用柯达胶片曝光,约 1 min,扫描分析条带灰度值,以灰度值定量代表蛋白水平。

### 1.8 统计学分析

所有数据应用 SPSS17.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肾动脉内、外膜射频消融

术前肾动脉造影均未见明显狭窄;术后 1 个月,内膜组出现 1 例肾动脉中段狭窄,肾脏萎缩;术后 3 个月,内膜组、外膜组和对照组均未见明显的狭窄(图 1)。

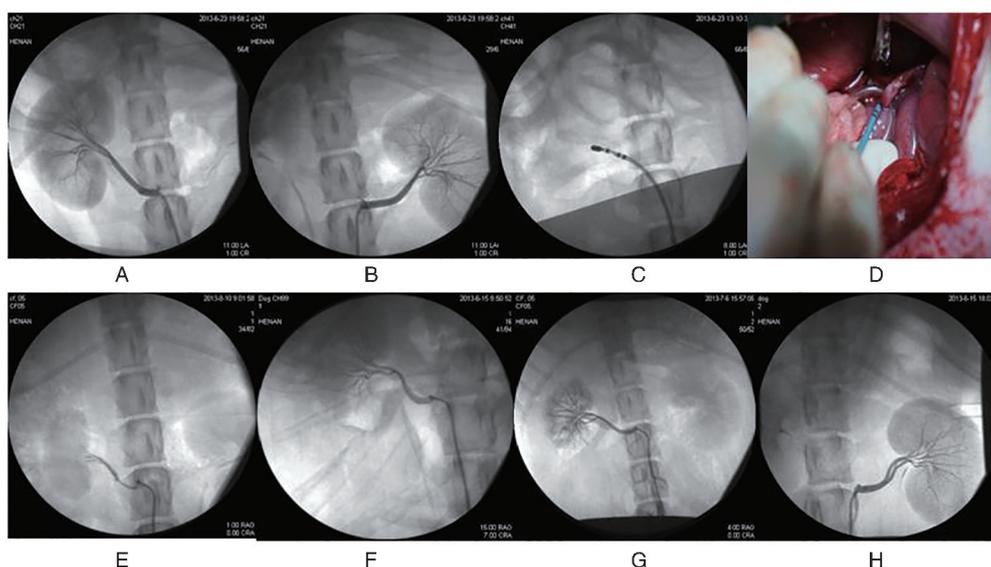


图 1. 肾动脉造影和肾动脉射频消融 A 和 B 分别为右侧和左侧肾动脉造影;C 和 D 分别为肾动脉内膜和外膜射频消融;E 为术后 1 个月内膜组肾动脉造影,肾动脉明显狭窄;F 为术后 1 个月外膜组肾动脉造影;G 为术后 3 个月内膜组肾动脉造影;H 为术后 3 个月外膜组肾动脉造影。

Figure 1. Renal artery angiography and renal artery radiofrequency ablation

### 2.2 肾动脉 HE 染色结果

内膜组消融后内膜局部增厚,结构破坏,中膜平滑肌细胞排列紊乱;外膜组肾动脉内膜结构完整,无明显结构破坏(图 2)。

### 2.3 肾动脉免疫组织化学染色结果

实验组肾动脉 CD36 表达增多,局部可见斑块形成,受体分布比较集中。对照组 CD36 表达未见

明显聚集(图 3)。

### 2.4 肾动脉清道夫受体 CD36 和 SR-A 表达水平

Western blot 检测肾动脉 CD36 和 SR-A 的蛋白表达量,结果发现术后 1 个月,内膜组和外膜组的 CD36 和 SR-A 蛋白表达量明显高于对照组( $P$  均 $<0.001$ ),内膜组 CD36 和 SR-A 的蛋白表达量明显高于外膜组( $P=0.040$  和  $P=0.007$ );术后 3 个月,内

膜组和外膜组的 CD36 和 SR-A 蛋白表达量明显高于对照组 ( $P$  均 $<0.001$ ), 内膜组 CD36 和 SR-A 蛋白

表达量明显高于外膜组 ( $P$  均 $<0.001$ ; 图 4 和图 5)。

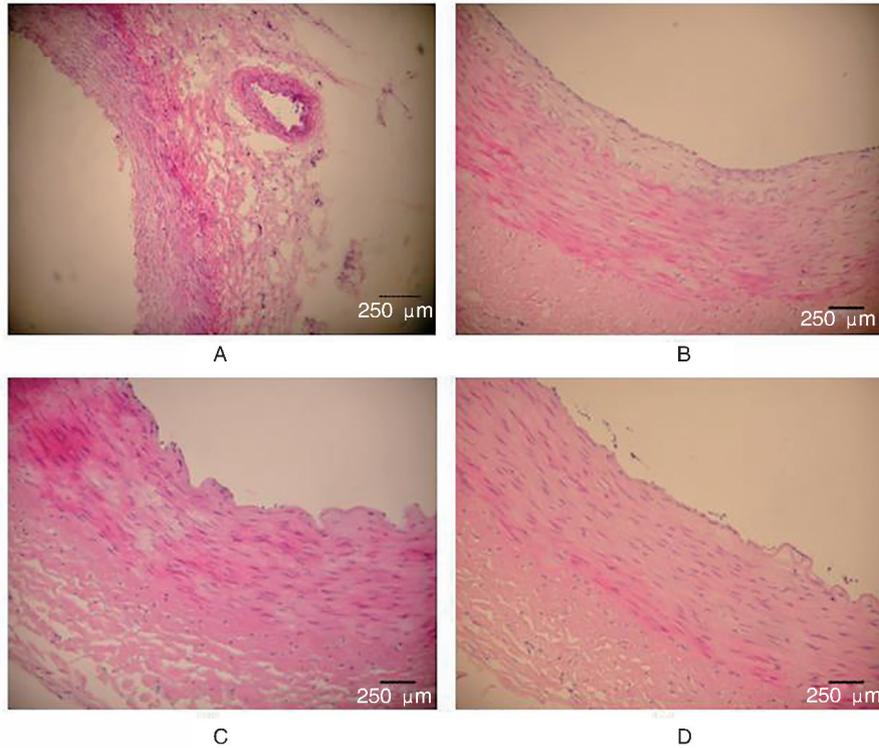


图 2. 消融术后肾动脉 HE 染色结果 A (10×20) 和 B (10×40) 分别为内膜组消融术后 1 个月、3 个月肾动脉 HE 染色结果; 内膜局部增厚, 结构破坏; C (10×20) 和 D (10×40) 分别为外膜组消融术后 1 个月、3 个月肾动脉 HE 染色结果。

Figure 2. HE staining of renal artery after RDN

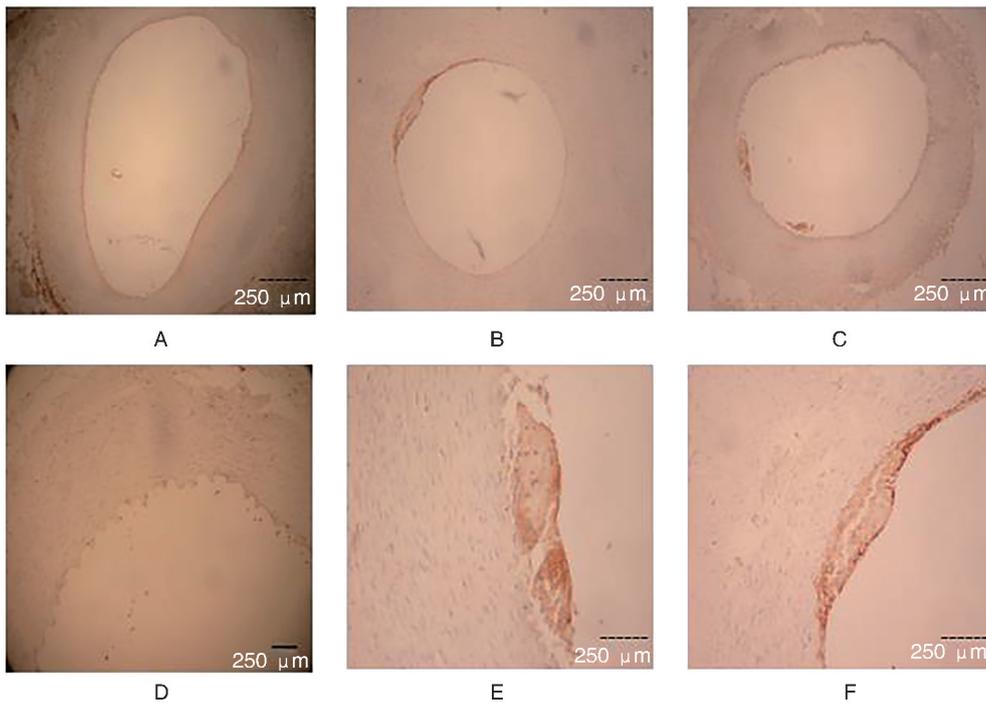


图 3. 免疫组织化学染色检测肾动脉 CD36 表达 A (10×10) 和 D (10×20) 分别为对照组术后 1 个月和术后 3 个月; B (10×10) 和 E (10×20) 分别为内膜组术后 1 个月和术后 3 个月; C (10×10) 和 F (10×20) 分别为外膜组术后 1 个月和术后 3 个月。

Figure 3. The expression of CD36 by immunohistochemical

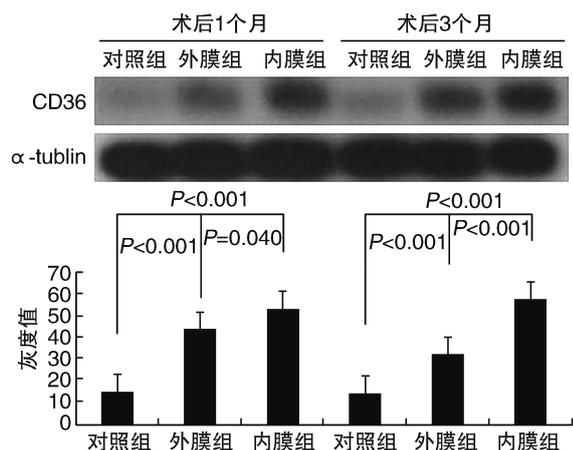


图 4. 术后 1 个月和术后 3 个月肾动脉 CD36 表达量比较  
Figure 4. Comparison of the expression levels of CD36 at 1 month and at 3 months after renal denervation

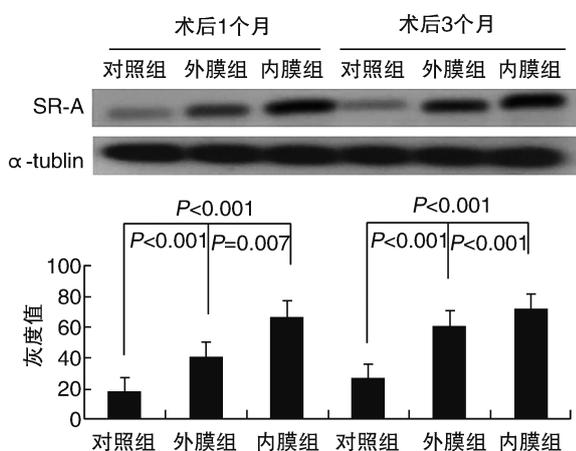


图 5. 术后 1 个月和术后 3 个月肾动脉 SR-A 表达量的比较  
Figure 5. Comparison of the expression levels of SR-A at 1 month and at 3 months after renal denervation

### 3 讨论

肾动脉射频消融术是一种新型的治疗顽固性高血压的方法,这种方法可以同时阻断肾动脉传入神经和传出神经<sup>[4]</sup>,并且在顽固性高血压的治疗中效果显著。Krum 等<sup>[8]</sup>的研究结果引起了医学界的关注,术后患者血压显著下降,其中 18 例手术患者在术后 30 天内进行肾动脉造影未发现明显的肾动脉狭窄。Symplcity HTN-2<sup>[9]</sup>研究中,对手术患者随访 6 个月后,实验组比对照组血压下降 32/12 mmHg,但是实验组出现 1 例肾动脉损伤。在临床研究中对手术患者进行随访仍有明显降压效果<sup>[10]</sup>。在动物试验中<sup>[5-7]</sup>进行的肾动脉射频消融取得了一定的疗效,但有些并发症是无法避免的,肾动脉内

膜消融对肾动脉的损伤已经在以上研究中得以证实,且术后有肾动脉狭窄的出现,但是这些均是术后血管造影或者病理切片所见,而关于消融术后动脉粥样硬化相关蛋白表达是否增加尚无报道。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是导致心脑血管疾病的主要病理生理基础。血管内皮损伤是 As 发生的始动因素<sup>[11]</sup>。近年来越来越多的研究者关注血管外膜在 As 形成中的作用,并且认为血管外膜参与了 As 的发生发展<sup>[12]</sup>。研究发现在 As 发生的早期,外膜炎症即被激活,而且外膜炎症程度越重时血管病变的严重程度越重<sup>[13]</sup>。有研究者通过刺激外膜炎症反应,发现可导致内膜增生性病变形<sup>[14]</sup>。而炎症是免疫过程,血管炎症在 As 的发生发展中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。结果提示外膜炎症与 As 的发生密切相关。成纤维细胞是外膜的主要细胞成分,另外多种免疫细胞如淋巴细胞、巨噬细胞和肥大细胞存在于外膜,对血管起免疫调节作用。外膜成纤维细胞可在促 As 因素的作用下分化为肌成纤维细胞,增殖、迁移至内皮下层,参与 As 病变的形成<sup>[16]</sup>。

在 As 的形成过程中,清道夫受体(scavenger receptor, SR)发挥了极其重要的作用。SR-A 和 CD36 是巨噬细胞吞噬变性低密度脂蛋白的主要受体,吞噬后形成泡沫细胞,从而导致 As 的形成。As 发生早期巨噬细胞聚集到血管壁,通过清道夫受体大量的摄取修饰的 LDL(modified LDL, mLDL),如氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)、ac-LDL 等,造成胞内胆固醇酯的堆积,最终形成泡沫细胞,泡沫细胞形成是 As 病变的早期变化和标志,CD36 的高表达在 As 中发挥重要作用,且抑制 CD36 的表达或干扰其相关信号通路可以显著缓解 As 的严重程度<sup>[17]</sup>。

本研究中,肾动脉内膜射频消融后行肾动脉造影,术后 1 个月出现 1 例明显的肾动脉狭窄,近年的临床试验中有类似报道,提示肾动脉射频消融有导致肾动脉狭窄的风险。肾动脉射频消融后行 HE 染色及免疫组织化学染色可见肾动脉内膜增厚,中膜平滑肌细胞排列紊乱,内膜结构完整性明显受损等,这与以往的动物实验相似<sup>[8]</sup>。肾动脉射频消融术后 1 个月和术后 3 个月,内膜组和外膜组清道夫受体 CD36 和 SR-A 表达量明显高于对照组,且内膜组受体表达量明显高于外膜组。以上研究结果表明,肾动脉射频消融时对肾动脉管壁造成损伤,血管壁损伤后出现 As 受体表达增加,提示肾动脉射频消融存在导致 As 的潜在风险。并且肾动脉内膜射频消融术后 CD36 和 SR-A 表达水平明显高于外膜

射频消融组,提示肾动脉内膜射频消融可能造成更严重的血管损伤,可能与射频消融能量直接作用有关,而血管损伤和氧化应激可能在此过程中起重要作用,但是其中潜在的机制仍不确定,需要进一步研究证实。

综上,肾动脉内、外膜射频消融均可能导致肾动脉结构的受损;肾动脉射频消融术后 As 相关受体 (CD36 和 SR-A) 表达水平明显增加,提示肾动脉射频消融有导致 As 的潜在风险;肾动脉外膜消融术后虽然也导致受体表达明显增加,但是却明显低于内膜射频消融组,故肾动脉外膜射频消融造成肾动脉损伤可能性更小,但仍需进一步研究进行验证。

#### [参考文献]

- [1] Jones DW, Hall JE. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure and evidence from new hypertension trials[J]. *Hypertension*, 2004, 43: 1-3.
- [2] Dorans KS, Mills KT, Liu Y, et al. Trends in prevalence and control of hypertension according to the 2017 American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) Guideline[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 1: 7(11). doi: 10.1161/JAHA.118.008888.
- [3] Schmieder RE, Redon J, Grassi G, et al. ESH position paper: renal denervation an interventional therapy of resistant hypertension[J]. *J Hypertens*, 2012, 30: 837-841.
- [4] Pathak A, Girerd X, Azizi M, et al. Expert consensus: renal denervation for the treatment of arterial hypertension [J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2012, 105: 386-393.
- [5] Katholi RE, Winternitz SR, Oparil S. Decrease in peripheral sympathetic nervous system activity following renal denervation or unclipping in the one-kidney one-clip goldblatt hypertensive rat[J]. *J Clin Invest*, 1982, 69: 55-62.
- [6] Pöss J, Ewen S, Schmieder RE, et al. Effects of renal sympathetic denervation on urinary sodium excretion in patients with resistant hypertension [J]. *Clin Res Cardiol*, 2015, 104(8): 672-678.
- [7] Whitworth JA, Denton DA, Graham WF, et al. The effect of renal denervation on ACTH-induced hypertension in sheep[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1981, 8: 203-207.
- [8] Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study [J]. *Lancet*, 2009, 373: 1275-1281.
- [9] Esler MD, Krum H, Sobotka PA, et al. Renal sympathetic denervation in patients with treatment resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2010, 376: 1903-1909.
- [10] Esler MD, Böhm M, Sievert H, et al. Catheter-based renal denervation for treatment of patients with treatment-resistant hypertension: 36 month results from the SYMPPLICITY HTN-2 randomized clinical trial [J]. 2014, 35: 1752-1759.
- [11] Matsuura E, Atzeni F, Sarzi-Puttini P R, et al. Is atherosclerosis an autoimmune disease? [J]. *BMC Med*, 2014, 12: 47.
- [12] Yun AJ, Doux JD, Bazar KA, et al. Adventitial dysfunction: an evolutionary model for understanding atherosclerosis [J]. *Med Hypotheses*, 2005, 65: 962-965.
- [13] Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, et al. Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implications for plaque vulnerability [J]. *Circulation*, 2002, 105: 2504-2511.
- [14] Donetti E, Baetta R, Comparato C, et al. Polymorphonuclear leukocyte-myocyte interaction: an early event in collar-induced rabbit carotid intimal thickening [J]. *Exp Cell Res*, 2002, 274(2): 197-206.
- [15] 程仕彤, 王绿娅. 关注免疫炎症及其标志物在动脉硬化性心脏病中的作用 [J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(10): 883-888.
- [16] Li G, Chen SJ, Oparil S, et al. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries [J]. *Circulation*, 2000, 101: 1362-1365.
- [17] 彭利君, 张葵, 魏红霞, 等. CD36 的结构、功能调节及其在动脉粥样硬化中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(7): 749-756.

(此文编辑 许雪梅)