DOI:10.16016/j.2097-0927.202309095

舒洛地特失活 YAP 减轻大鼠动静脉瘘新生内膜增生

李雅馨[1],李冰玉[2],林 鑫[2],刘 烜[2],代承麟[2],赵 渝[1],傅麒宁[1],王 韵[2] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血管外科[1],400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院细胞生物学教研室[2]

[摘要] **目的** 研究舒洛地特(sulodexide,SDX)对慢性肾脏疾病(chronic kidney disease,CKD)大鼠动静脉瘘(arteriovenous fistula,AVF)新生内膜增生的作用及调节机制。**方法** 选取体质量(300±50)g 雄性大鼠 18 只,随机分为 3 组($n=6$):AVF 组,对正常大鼠进行 AVF 手术;慢性肾病组(CKD+AVF),大鼠经诱导慢性肾病后进行 AVF 手术+生理盐水灌胃 2 月;舒洛地特组(CKD+AVF+SDX),大鼠经诱导慢性肾病后进行 AVF 手术+8 mg/(kg·d)SDX 灌胃 2 月。HE 染色检测血管内膜增生程度,免疫荧光检测 Hippo 信号通路相关分子 YAP、pYAP、YAP 下游靶蛋白间充质细胞标志分子(connective tissue growth factor,CTGF)表达情况。以不同浓度 SDX(0、2.5、5、10、20、40 μg/mL)处理人脐静脉细胞融合细胞(EAHy926),并以 2.5 μg/mL SDX 分别处理细胞 24、48、72 h,用 CCK-8 法检测细胞存活率。进一步利用 CKD 大鼠血清处理细胞,并在此基础上用 SDX 及 YAP 阻断剂维替泊芬处理,通过 Western blot 实验检测 YAP、pYAP、CTGF 及内皮细胞标志分子 CD31 表达。**结果** HE 染色及免疫荧光结果表明,与 AVF 组大鼠相比,慢性肾病组大鼠瘘口处内膜严重增生($P<0.05$),pYAP 表达微弱而 CTGF 表达增强,舒洛地特组经 SDX 灌胃处理后内膜增生减轻,pYAP 表达增强,CTGF 表达水平降低($P<0.05$)。CCK-8 结果表明,随 SDX 浓度及处理时间的增加,细胞存活率降低($P<0.05$)。Western blot 结果发现,SDX 促进 EAHy926 细胞 pYAP 及 CD31 的表达,抑制了 CTGF 的表达($P<0.05$),与维替泊芬处理效果一致。**结论** 舒洛地特通过阻止 CKD 引起的 YAP 激活,减轻了 AVF 血管内膜增生。

[关键词] 动静脉瘘;新生内膜增生;舒洛地特;YAP;内皮间质化
[中图法分类号] R364.31;R692;R973.2 [文献标志码] A

Sulodexide inhibits neointimal hyperplasia of arteriovenous fistulas in rats through inactivation of YAP

LI Yaxin[1], LI Bingyu[2], LIN Xin[2], LIU Xuan[2], DAI Chenglin[2], ZHAO Yu[1], FU Qining[1], WANG Yun[2]
[1]Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of sulodexide (SDX) in neointimal hyperplasia of arteriovenous fistulas (AVFs) in chronic kidney disease (CKD) rats and its possible mechanism. **Methods** A total of 18 male rats (weighing 300±50 g) were randomly and equally divided into AVF group, CKD+AVF group (CKD induction followed by AVF surgery and then gavaged with normal saline for 2 months), and CKD+AVF+SDX group [treated as in the CKD+AVF group but with 8 mg/(kg·d) SDX gavage]. HE staining was used to observe the degree of neointimal hyperplasia. The expression of Hippo pathway related molecules, Yes-associated protein (YAP), pYAP and connective tissue growth factor (CTGF, YAP downstream target protein, one of mesenchymal marker) was detected by immunofluorescence assay. After human umbilical vein cell fusion EAHy926 cells were treated with 0, 2.5, 5, 10, 20 or 40 μg/mL SDX for 24 h, and with 2.5 μg/mL

[基金项目] 陆军军医大学人才计划(2019);重庆市科卫联合医学科研项目(2021MSXM256)
[通信作者] 王 韵,E-mail:yunwang@tmmu.edu.cn
赵 渝,E-mail:201514@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

SDX for 24, 48 or 72 h, respectively, CCK-8 assay was used to measure cell survival rate. Moreover, the serum sample from CKD rat was used to treat EAHy926 cells, and then the cells were treated with SDX or YAP inhibitor verteporfin. The expression levels of YAP, pYAP, CTGF and endothelial cell marker CD31 were detected by Western blotting. **Results** HE staining and immunofluorescence assay showed that CKD rats had serious neointimal hyperplasia in AVFs ($P<0.05$), and slightly lower expression of pYAP and enhanced expression of CTGF ($P<0.05$) when compared with the rats of the AVF group. While, SDX treatment alleviated the neointimal hyperplasia of AVFs, enhanced the expression of pYAP and reduced the expression of CTGF ($P<0.05$). CCK-8 assay showed that cell survival rate was decreased significantly in a dose- and time- dependent manner after SDX treatment ($P<0.05$). Western blotting revealed that SDX increased the expression of pYAP and CD31 while inhibited the expression of CTGF in EAHy926 cells ($P<0.05$), which was consistent with the effect of verteporfin treatment. **Conclusion** SDX can block YAP activation caused by CKD and attenuate neointimal hyperplasia in AVFs.

[**Key words**] arteriovenous fistulas; neointimal hyperplasia; sulodexide; Yes-associated protein; endothelial-mesenchymal transition

Supported by the Talent Program of Army Medical University (2019) and the Joint Medical Research Project of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2021MSXM256). Corresponding author: WANG Yun, E-mail: yunwang@tmmu.edu.cn; ZHAO Yu, E-mail: 201514@hospital.cqmu.edu.cn

慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)作为一种不可逆的结构性或功能性肾脏损害,已成为全球范围内危害健康的常见病。终末期肾病是慢性肾病发展的终末阶段,终末期肾病患者开通血透通路的首选方式为动静脉瘘(arteriovenous fistulas,AVF)。然而随着使用时间增长,AVF 瘘口静脉端可能因血管新生内膜增生及血栓形成逐渐狭窄。近年来的报告显示,AVF 的 1 年通畅率为 60%,2 年降到 51%[1]。血管内皮细胞损伤引起的新生内膜增生和血栓形成,是导致血管狭窄的主要原因之一[2]。因此,预防新生内膜增生以提高 AVF 通畅率对患者至关重要。

舒洛地特(sulodexide,SDX)是从猪肠黏膜中提取的高度纯化的糖胺聚糖混合物,由 80%的硫酸肝素和 20%的硫酸皮肤素组成,具有抗血栓、抗炎、抑制细胞增殖等作用[3-6]。舒洛地特对血管具有保护作用,在临床上已被应用于糖尿病肾病、慢性动静脉疾病[5-6]的辅助治疗。然而,舒洛地特是否可用于阻止慢性肾病患者 AVF 新生内膜增生过程并不清楚。

YAP 是 Hippo 信号通路的转录因子,Hippo 通路通过调节细胞增殖、分化和迁移,在发育过程中控制器官大小和形态发生[7-8]。在动脉损伤模型中,YAP 的异常调控能引起血管新生内膜增生和血管狭窄[9]。舒洛地特是否可通过调控 YAP 发挥作用也不清楚。作为安全有效的治疗药物,本研究希望了解舒洛地特是否可对 CKD 患者新生内膜增生发挥作用并探究其作用机制,为临床防治动静脉瘘术后血管狭窄提供新的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本实验采用的材料与试剂有:舒洛地特(意大利 Alfasigma 公司);胎牛血清(FBS,美国 Hyclone 公司);青-链霉素(中国碧云天);苏木精-伊红染液(C0105S,中国碧云天);CCK-8(BG0025,中国葆光公司);一抗:YAP(BS9920m,美国 Bioworld 公司);phosphor-YAP(BS94007,美国 Bioworld 公司);间充质细胞标志分子(connective tissue growth factor,CTGF,BS7445,美国 Bioworld 公司);CD31(BS7445,美国 Bioworld 公司)。辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(A0208,中国碧云天);辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG(A0216,中国碧云天);Cy3 标记的山羊抗兔 IgG(A0516,中国碧云天)。

1.2 实验动物与分组

成年雄性 SD 大鼠 18 只,体质量(300±50)g(陆军军医大学动物实验中心提供)。依据随机数字法将大鼠分为 3 组,每组 6 只。① AVF 组,正常大鼠(Ctl)进行 AVF 手术;②慢性肾病组(CKD+AVF 组):大鼠经诱导慢性肾病后进行 AVF 手术+与 3 组等体积生理盐水灌胃 2 月;③舒洛地特组(CKD+AVF+SDX 组):大鼠经诱导慢性肾病后进行 AVF 手术+8 mg/(kg·d) SDX 灌胃 2 月。CKD 模型和 AVF 手术建立参考已有文献进行[10],通过对大鼠进行尾尖静脉采血检测血清尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)和血清肌酐(serum creatinine,Cr)确认 CKD 模型建立成功后进行 AVF 手术。

1.3 样本的收集与固定

于 AVF 术后 8 周进行标本采集,整个过程在异氟醚麻醉下进行,麻醉成功后将大鼠以仰卧位固定,暴露颈部动静脉瘘并在两端结扎,取血管组织,完成采集。采集的血管用生理盐水冲洗管腔后置于 4%多聚甲醛固定液中 4 ℃过夜固定,经各级浓度的乙醇逐步脱水后放入二甲苯透明,再进行浸蜡、包埋和切片等操作。用于电镜观察的标本,在生理盐水冲洗后用 2.5%戊二醛进行固定。

1.4 HE 染色

石蜡切片经烤片、脱蜡、水合后用苏木精染色 5 min,蒸馏水洗涤 3 次后用伊红染色 2 min,再经脱水、透明,最后用中性树脂封片,在光学显微镜下观察。

1.5 免疫荧光

切片脱蜡、复水,在抗原修复液中 100 ℃抗原修复 10 min,经 1.5%H_2O_2 和 50%甲醇淬灭内源性过氧化物酶活性 15 min,0.3%Triton X-100/PBS 通透 20 min,免疫染色封闭液封闭 1 h,4 ℃下滴加一抗孵育过夜,室温下孵育相应的二抗 1 h,然后滴加 DAPI 孵育 5 min,在荧光显微镜下观察拍照。

1.6 细胞培养和处理

内皮细胞株 EAHy926(人脐静脉细胞融合细胞)购自美国细胞培养物收藏中心(American type culture collection,ATCC),用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素抗生素的 DMEM 培养基在 37 ℃、5%CO_2 培养箱中传代培养,每 48 h 更换一次培养液。EAHy926 接种且细胞融合 70%左右,无血清处理后,按不同分组进行处理。细胞分组如下:①对照组(Ctl)、②CKD 大鼠血清处理组(CKD serum)、③ CKD 大鼠血清+舒洛地特处理组(CKD serum+SDX)、④CKD 大鼠血清+维替泊芬处理组(CKD serum+VP)。对照组培养基中加入正常大鼠血清含量为 10%,CKD 大鼠血清处理组为培养基中加入 CKD 大鼠血清含量为 10%,共处理组均先加入 CKD 大鼠血清 1 h 后再加入舒洛地特(2.5 μg/mL)或 VP(0.25 μmol/L)[11],继续培养 24 h。

1.7 细胞增殖检测

细胞以 2 000/孔的密度接种于 96 孔板,分别给予不同浓度(0、2.5、5、10、20、40 μg/mL)舒洛地特处理 24 h,再以 2.5 μg/mL 浓度分别处理 24、48 和 72 h,每组设置 3 个复孔,同时设空白对照组。处理后加入 10 μL 细胞计数试剂盒-8(Cell Counting Kit-8,CCK-8)试剂孵育 2 h,在酶标仪 450 nm 波长下测定各孔吸光度。细胞存活率=(实验组-空白组)/(对照组-空白对照组)×100%。

1.8 蛋白印迹检测

处理后的细胞用 RIPA 裂解液冰上裂解 5 min,刮取细胞裂解液于 EP 管中,4 ℃下以 5 000× g 离心 5 min,收集上清进行蛋白质浓度测定,然后加入上样缓冲液,100 ℃ 加热 5 min 后变性。在 10% SDS-PAGE 电泳凝胶的上样孔中加入 20 μg 样品,以 70 V 的恒压条件浓缩 40 min,120 V 的恒压条件分离 80 min 后,转移到硝酸纤维素膜上,室温封闭 1 h。进一步在 4 ℃分别进行 GAPDH(1∶3 000)、YAP(1∶1 000)、pYAP(1∶1 000)、CD31(1∶1 000)和 CTGF(1∶1 000)一抗孵育过夜,用 TBSTw(Tris-Buffered Saline Tween-20)洗膜 5 min×3 次,与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(1∶3 000),室温孵育 2 h,TBSTw 洗膜 5 min×3 次。按 ECL 显影液说明书显影,放入化学发光仪中成像。

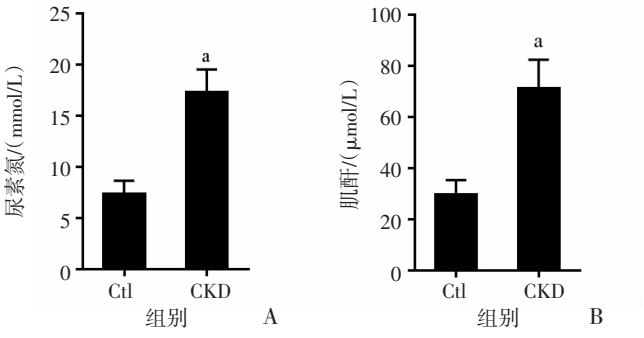
1.9 统计学分析

实验均重复至少 3 次,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 8 进行统计分析并制图,两组之间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CKD 大鼠模型构建

为探讨 SDX 在 CKD 大鼠血管内膜增生中的作用,本研究首先对大鼠进行 CKD 造模。与未进行 AVF 手术前的正常对照(Ctl)组大鼠相比,CKD 大鼠血清尿素氮和血清肌酐显著升高($P<0.05$,图 1),表明 CKD 大鼠建模成功。



a:$P<0.05$,与 Ctl 组比较

图 1 5/6 肾切除术诱导慢性肾病后大鼠尿素氮(A)及肌酐(B)检测结果 ($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

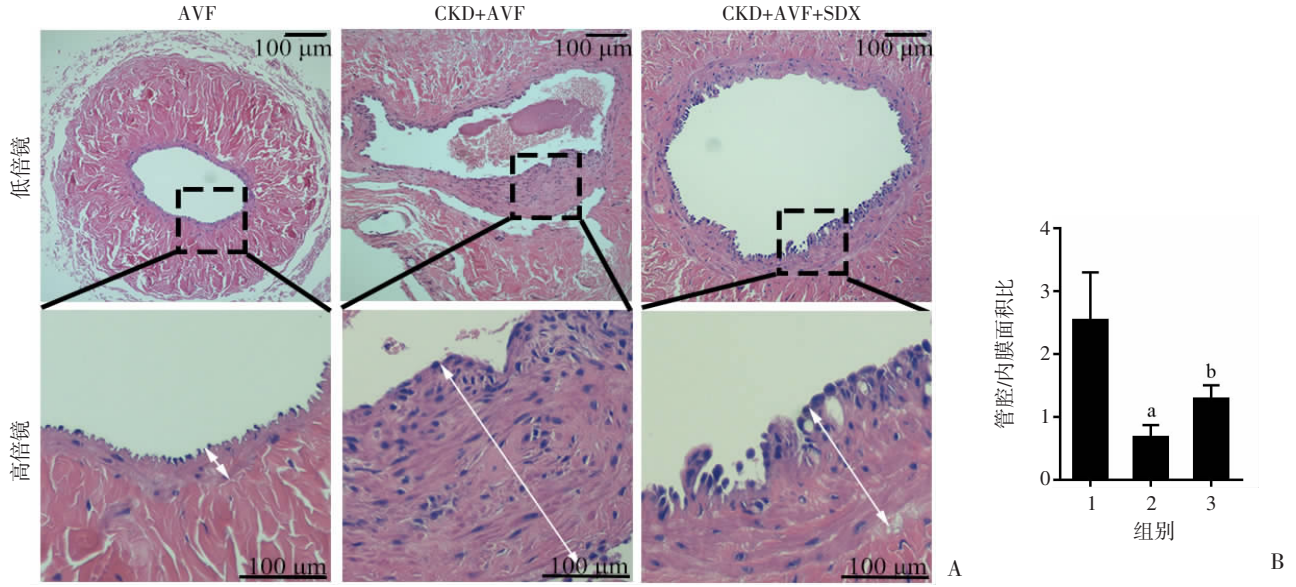
2.2 舒洛地特抑制 CKD 大鼠 AVF 术后血管内膜增生

CKD 建模成功后,对各组大鼠进行 AVF 手术,术后进行 SDX 灌胃,2 个月后检测血管新生内膜厚度。HE 染色结果显示 CKD+AVF 组血管新生内膜较 AVF 组明显增厚,管腔与内膜面积比降低($P<0.05$);在

SDX 灌胃处理后,与 CKD+AVF 组相比,CKD+AVF+SDX 组血管新生内膜增厚程度减轻,管腔与内膜面积比有明显提升(图 2)。

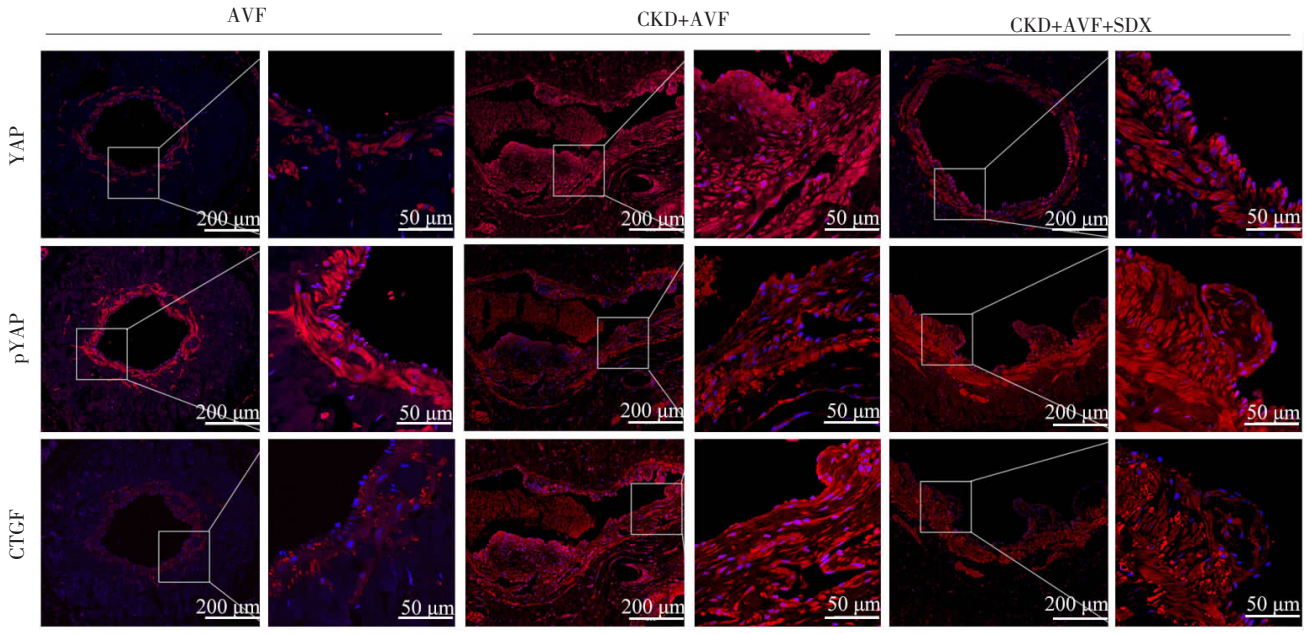
2.3 舒洛地特抑制 CKD 诱导的 YAP 信号激活

为探讨 SDX 抑制新生内膜增殖是否与 YAP 有关,采用免疫荧光检测了 CKD 大鼠 AVF 术后静脉 YAP 及其下游靶分子 CTGF 的表达(图 3)。与 AVF 组相比,CKD+AVF 组大鼠 AVF 瘘口内膜和内皮细胞均表达 YAP 和 CTGF,且内皮细胞中 YAP 和 CTGF 的荧光强度显著增强,而 YAP 磷酸化水平下调,即 pYAP 荧光强度降低。舒洛地特灌胃后,与 CKD+AVF 组相比,CKD+AVF+SDX 处理组 AVF 瘘口 YAP 和 CTGF 的表达降低,YAP 磷酸化水平明显升高。表明 CKD 通过降低 YAP 磷酸化水平激活 YAP 信号,引起了 CTGF 表达;而舒洛地特对 YAP 信号的激活起到阻止作用。



A:大鼠 AVF 组织切片 HE 染色 ⟷:示内膜厚度;B:血管管腔与内膜面积用 ImageJ 软件测量后的比值($\bar{x}\pm s$,$n=6$) 1: AVF; 2:CKD+AVF; 3: CKD+AVF+SDX; a:$P<0.05$,与 AVF 组比较;b:$P<0.05$,与 CKD+AVF 组比较

图 2 CKD 大鼠 AVF 术后新生内膜增生检测

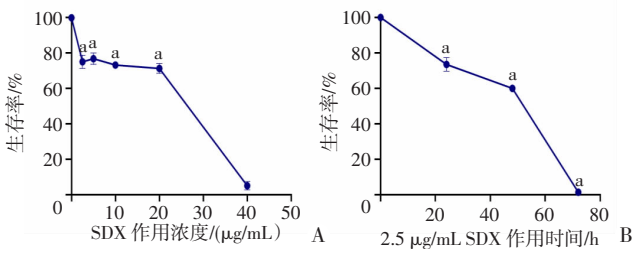


AVF:正常大鼠进行 AVF 手术;CKD+AVF:大鼠经诱导慢性肾病后进行 AVF 手术+生理盐水灌胃 2 月;CKD+AVF+SDX:大鼠经诱导慢性肾病后进行 AVF 手术+8 mg/(kg·d)SDX 灌胃 2 月。

图 3 免疫荧光检测大鼠 AVF 瘘口 YAP 和 CTGF 的表达

2.4　舒洛地特影响 EAHy926 细胞存活率

为了进一步探讨舒洛地特的作用机制,本研究培养了人内皮细胞株 EAHy926 细胞,首先以不同浓度的 SDX(0、2.5、5、10、20、40 μg/mL)处理细胞,检测细胞存活率。CCK-8 检测结果显示,在 SDX 处理 24 h 后,随着 SDX 浓度的增加,细胞存活率逐渐降低。与 0 μg/mL 相比,舒洛地特浓度为 2.5 μg/mL 时,细胞存活率降到 80%(P<0.05,图 4A),在 2.5~20 μg/mL 浓度之间,细胞存活率无明显变化,直到 40 μg/mL 的浓度才出现明显抑制。进一步检测 2.5 μg/mL SDX 处理后 24、48、72 h 的细胞存活率,结果发现随 SDX 处理时间增加,EAHy926 细胞存活率也随之降低。与 0 h 处理组相比,72 h 组 EAHy926 细胞存活率受到显著抑制(P<0.05,图 4B)。因此,为保证 SDX 处理效果,后续实验选择细胞存活率为 80%时 2.5 μg/mL 舒洛地特处理 24 h。



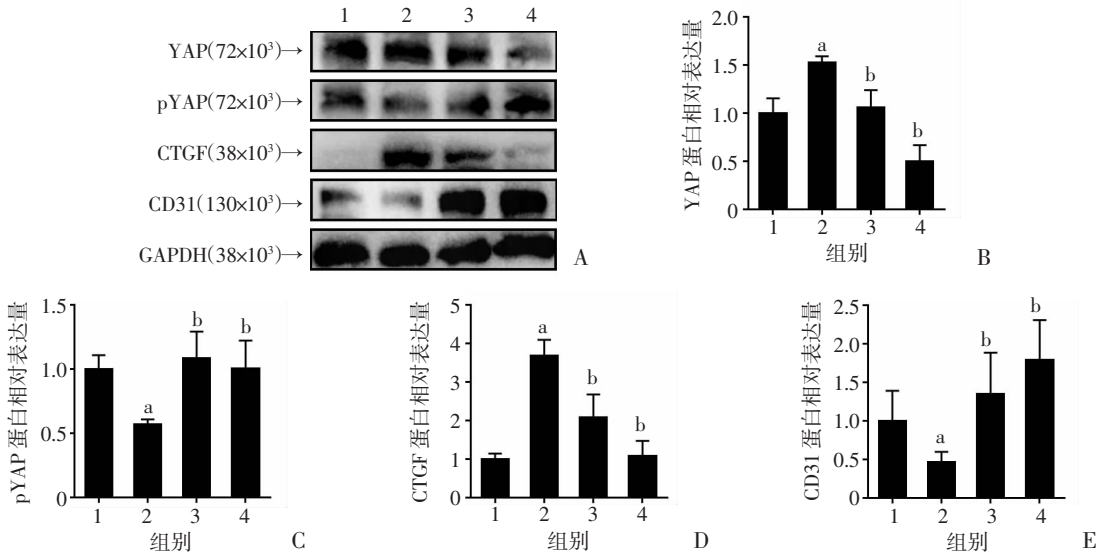
A:不同浓度舒洛地特处理 24 h 后 EAHy926 的存活率 a:P<0.05,与 0 μg/mL 比较;B:2.5 μg/mL 的舒洛地特处理不同时间后 EAHy926 的存活率　a:P<0.05,与 0 h 比较

图 4　舒洛地特对 EAHy926 的存活率的影响　($\bar{x}\pm s$,n=3)

2.5　舒洛地特抑制 CKD 诱导的 EAHy926 细胞 YAP 信号激活

在体外细胞实验过程中,利用 CKD 大鼠血清处理内皮细胞。蛋白印迹结果表明,与用正常大鼠血清处理细胞(Ctl 组)相比,CKD 大鼠血清诱导了内皮细胞 YAP 和 CTGF 的表达,降低了 YAP 磷酸化水平(P<0.05,图 5)。与 CKD serum 组相比,加入 SDX 处理后,CKD serum+SDX 组内皮细胞 YAP 和 CTGF 的表达降低,YAP 磷酸化水平明显升高(P <0.05,图 5),与免疫荧光实验结果一致。本研究进一步在 CKD 大鼠血清处理基础上加入 YAP 信号阻断剂 VP,与 CKD serum 组相比,VP 处理后(CKD serum+VP 组)中 YAP 表达显著降低,YAP 磷酸化水平明显升高,CKD 血清诱导的 CTGF 表达几乎被阻断。CDK 大鼠血清处理后的 YAP、pYAP 和 CTGF 表达在加入 SDX 或 VP 后呈现一致的趋势。

由于 CTGF 不仅是 YAP 的靶效应分子,还是成纤维细胞标志蛋白,提示 CKD 诱导的 YAP 信号激活可能参与了内皮间质化进程。在内皮细胞中 CTGF 已经表达增强的情况下,本研究进一步检测了内皮细胞标志分子 CD31 表达情况。蛋白印迹结果显示,与正常大鼠血清处理组(Ctl 组)相比,CKD 大鼠血清处理(CKD serum 组)细胞中,CD31 水平降低(P <0.05,图 5)。VP 阻断 YAP 信号后 CD31 表达显著提升(P<0.05,图 5A、E),舒洛地特处理后 CD31 表达水平与 VP 组一致(P <0.05,图 5A、E)。结果表明,CKD 大鼠血清诱导了内皮细胞表型转换,舒洛地特通过失活 YAP 抑制了内皮细胞间质化进程。



1:Ctl,培养基中加入正常大鼠血清含量为 10%;2:CKD serum,培养基中加入 CKD 大鼠血清含量为 10%; 3:CKD serum+SDX,培养基中加入 CKD 大鼠血清 1 h 后再加入 SDX(2.5 μg/mL);4:CKD serum+VP,培养基中加入 CKD 大鼠血清 1 h 后再加入 VP(0.25 μmol/L)
A:蛋白印迹检测 EAHy926 细胞内皮间质化相关分子表达;B:YAP 蛋白表达的量化分析;C:pYAP 蛋白表达的量化分析;D:CTGF 蛋白表达的量化分析;E:CD31 蛋白表达的量化分析　a:P<0.05,与 Ctl 组比较;b:P<0.05,与 CKD serum 组比较

图 5　舒洛地特阻止 CKD 大鼠血清诱导 EAHy926 细胞 EndMT 相关分子表达　($\bar{x}\pm s$,n=3)

3 讨论

3.1 内膜增生导致 AVF 功能障碍

具有功能且高流量的 AVF 是 CKD 患者必需的血透通路,而 AVF 失功会阻碍血液透析进程,严重影响患者的生命延续。过度的新生内膜增生是导致 AVF 功能障碍的重要原因之一。在我们以往研究中还发现在 CKD 患者及 CKD 小鼠 AVF 瘘口新生内膜增生会加重[12-13]。阻止新生内膜增生探讨改善 AVF 功能障碍的有效策略一直是重要的临床课题。本研究报道了舒洛地特可通过抑制 CKD 引起的 YAP 激活,阻止内皮间质化进程,从而减轻了 AVF 血管内膜增生。

3.2 舒洛地特对 AVF 的保护作用

舒洛地特是一种长效性、安全的内皮保护药物,具有抗凝血活性,能被血管内皮广泛吸收,其肠外和口服给药对血管疾病的作用已被充分证实,在许多国家已广泛使用[3]。此外,舒洛地特对其他疾病的作用也有不少报道。SHEN 等[14]发现舒洛地特可减少心肌凋亡,保护心肌缺血/再灌注损伤。LIU 等[15]发现舒洛地特可抑制糖尿病大鼠肾脏肾小管间质损伤,发挥抗衰老和抗氧化作用,防止糖尿病肾病的进展。SDX 对 AVF 是否具有保护作用也引起了越来越多的关注。

最近的研究表明,舒洛地特在球囊损伤大鼠颈动脉模型中,减轻了新生内膜增生,舒洛地特通过重建糖萼维持内皮完整性,起到了保护内皮的作用[16]。因球囊对血管的损伤仅限于内皮层,另有学者利用大鼠股动脉与股静脉进行端侧缝合,建立大鼠 AVF 模型,在这种全横断面血管严重损伤情况下,舒洛地特也表现出阻止新生内膜增生的作用[17]。然而,研究中使用的 AVF 模型仅来自正常大鼠。为了更好地模拟 CKD 患者端端缝合的 AVF,本研究对 CKD 大鼠右颈动脉和颈内静脉之间进行了 AVF 端端缝合,建立了 CKD 大鼠 AVF 模型,并利用 SDX 灌胃。结果证实,舒洛地特对 CKD 大鼠的新生内膜增生表现出有益的阻止作用(图 2)。

3.3 舒洛地特通过失活 YAP 减轻新生内膜增生

新生内膜增生由血流动力学改变、内皮屏障损伤、尿毒症、缺氧、炎症等多种因素诱发,Hippo 信号可作为血流动力学引起机械刺激的传感器。已有报道表明单向血流剪切力可抑制 Hippo 信号途径的转录共激活因子 YAP,使其磷酸化,从而降低炎症因子表达,减轻动脉粥样硬化[18]。CKD 大鼠 AVF 瘘口持续处于血流动力学改变及尿毒症的影响下,我们希望了解 *YAP* 在其中所起的作用。激活的 YAP 处于未磷酸化状态,可由胞质转位入核,与转录因子 TEAD 结合,启动 *CTGF* 等靶基因表达。当 Hippo 通路激活时,通过上游激酶 MST1/2 磷酸化 YAP,磷酸化的 YAP 在胞质中被降解,YAP 信号被阻止[8]。因此,靶基因 *CTGF* 表达水平反映了 YAP 激活程度。本研究对 CKD 大鼠 AVF 检测结果表明,CKD 大鼠动静脉瘘口处 YAP 和 CTGF 表达升高,磷酸化 YAP 处于低水平,表明 CKD 促进的新生内膜增生与 YAP 信号激活密切相关;舒洛地特的加入可阻止 YAP 的激活,减轻了 CKD 大鼠的新生内膜增生程度。

3.4 YAP 激活促进内皮间质化

新生内膜增生显著特征为血管平滑肌细胞过度生长,内皮细胞间质化(endothelial-mesenchymal transition, EndMT)也是血管损伤后新生内膜增生过程中平滑肌细胞来源之一[19]。在 EndMT 的过程中,内皮细胞失去其特异性标志物,表达 α 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、纤连蛋白(fibronectin)和 I 型胶原等间充质细胞标志物。既往也有研究报道 TGF-β 诱导的 EndMT 的过程中,需要 YAP 的激活[20]。REN 等人还揭示了敲除血管内皮 *YAP* 基因可以抑制 EndMT[21]。这些结果表明 *YAP* 可能是抑制 EndMT 的潜在靶点。*CTGF* 不仅是 Hippo 信号转录因子 YAP 的下游靶效应分子,也是间质细胞标记物。在 CKD 大鼠 AVF 瘘口或 CKD 大鼠血清处理的内皮细胞中,YAP 表达水平升高,CTGF 表达上调(图 4 和 5);本研究进一步检测了内皮细胞标志物 CD31 的表达,结果发现,伴随着 YAP 信号激活,CD31 表达降低,而通过 VP 阻断 YAP 信号,可恢复 CD31 表达。舒洛地特具有与 VP 相似的作用,它可以通过促进 YAP 磷酸化使 YAP 失活,对 EndMT 进程起到抑制作用。

综上所述,本研究的数据表明,YAP 激活是引起大鼠 AVF 失功的重要因素之一,CKD 促进了 EC 中 YAP 去磷酸化和激活,引起内皮细胞间质化,加重新生内膜增生;舒洛地特可以通过阻止 YAP 激活,抑制 CKD 诱导的 EndMT,从而减轻新生内膜增生,提升 AVF 的长期通畅率。

参考文献:

[1] BYLSMA L C, GAGE S M, REICHERT H, *et al*. Arteriovenous fistulae for haemodialysis: a systematic review and meta-analysis of efficacy and safety outcomes[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2017, 54(4): 513-522. DOI: 10.1016/j.ejvs.2017.06.024.

[2] ROY-CHAUDHURY P, SUKHATME V P, CHEUNG A K. Hemodialysis vascular access dysfunction: a cellular and molecular viewpoint[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(4):

1112-1127. DOI: 10.1681/ASN.2005050615.

[3] COCCHERI S, MANNELLO F. Development and use of sulodexide in vascular diseases: implications for treatment [J]. Drug Des Devel Ther, 2013, 8: 49-65. DOI: 10.2147/DDDT.S6762.

[4] MANNELLO F, LIGI D, CANALE M, *et al*. Sulodexide down-regulates the release of cytokines, chemokines, and leukocyte colony stimulating factors from human macrophages: role of glycosaminoglycans in inflammatory pathways of chronic venous disease[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2014, 12(1): 173-185. DOI: 10.2174/15701611116661311261440 25.

[5] LI R, XING J, MU X, *et al*. Sulodexide therapy for the treatment of diabetic nephropathy, a meta-analysis and literature review[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 6275-6283. DOI: 10.2147/DDDT.S87973.

[6] CARROLL B J, PIAZZA G, GOLDHABER S Z. Sulodexide in venous disease[J]. J Thromb Haemost, 2019, 17(1): 31-38. DOI: 10.1111/jth.14324.

[7] DEY A, VARELAS X, GUAN K L. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine[J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(7): 480-494. DOI: 10.1038/s41573-020-0070-z.

[8] PICCOLO S, DUPONT S, CORDENONSI M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond[J]. Physiol Rev, 2014, 94(4): 1287-1312. DOI: 10.1152/physrev.00005.2014.

[9] WANG X B, HU G Q, GAO X W, *et al*. The induction of Yes-associated protein expression after arterial injury is crucial for smooth muscle phenotypic modulation and neointima formation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(11): 2662-2669. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.254730.

[10] LIANG A L, WANG Y, HAN G F, *et al*. Chronic kidney disease accelerates endothelial barrier dysfunction in a mouse model of an arteriovenous fistula[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 304(12): F1413-F1420. DOI: 10.1152/ajprenal.00585.2012.

[11] HASEGAWA T, SUGIHARA T, HOSHINO Y, *et al*. Photosensitizer verteporfin inhibits the growth of YAP- and TAZ-dominant gastric cancer cells by suppressing the anti-apoptotic protein survivin in a light-independent manner[J]. Oncol Lett, 2021, 22(4): 703. DOI: 10.3892/ol.2021.12964.

[12] WANG Y, LIANG A L, LUO J L, *et al*. Blocking Notch in endothelial cells prevents arteriovenous fistula failure despite CKD[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(4): 773-783. DOI: 10.1681/ASN.2013050490.

[13] WANG W S, WANG Z, TIAN D Y, *et al*. Integrin β3 mediates the endothelial-to-mesenchymal transition via the Notch pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(3): 985. DOI: 10.1159/000493229.

[14] SHEN D P, CHEN R Y, ZHANG L J, *et al*. Sulodexide attenuates endoplasmic reticulum stress induced by myocardial ischaemia/reperfusion by activating the PI3K/Akt pathway[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8): 5063-5075. DOI: 10.1111/jcmm.14367.

[15] LIU Y N, ZHOU J W, LI T 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.

[16] LI T J, LIU X N, ZHAO Z W, *et al*. Sulodexide recovers endothelial function through reconstructing glycocalyx in the balloon-injury rat carotid artery model[J]. Oncotarget, 2017, 8(53): 91350-91361. DOI: 10.18632/oncotarget.20518.

[17] PARK H Y, KANG S, KIM G Y, *et al*. Inhibition of neointimal proliferation of rat carotid artery by sulodexide [J]. J Korean Med Sci, 1997, 12(3): 210-214. DOI: 10.3346/jkms.1997.12.3.210.

[18] WANG L, LUO J-Y, LI B, *et al*. Integrin-YAP/TAZ-JNK cascade mediates atheroprotective effect of unidirectional shear flow[J]. Nature, 2016, 540(7634): 579-582. DOI: 10.1038/nature20602.

[19] TIAN D Y, JIN X R, ZENG X, *et al*. Notch signaling in endothelial cells: is it the therapeutic target for vascular neointimal hyperplasia? [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(8): 1615. DOI: 10.3390/ijms18081615.

[20] SAVORANI C, MALINVERNO M, SECCIA R, *et al*. A dual role of YAP in driving TGFβ-mediated endothelial-to-mesenchymal transition[J]. J Cell Sci, 2021, 134(15): jcs251371. DOI: 10.1242/jcs.251371.

[21] REN Y F, ZHANG Y W, WANG L, *et al*. Selective targeting of vascular endothelial YAP activity blocks EndMT and ameliorates unilateral ureteral obstruction-induced kidney fibrosis[J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2021, 4(3): 1066-1074. DOI: 10.1021/acsptsci.1c00010.

(收稿:2023-09-18;修回:2023-10-25)

(编辑 栗 嘉)