



解放军医学院
解放军总医院

硕士学位论文

分类号: R617

密 级: 公 开

肾移植供受者年龄差对移植肾功能及蛋
白质组的影响

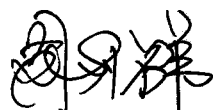
**The Affection of Renal Transplantation
Donor-Recipient Age Difference to Graft
Function and the Proteome of Recipient**

作者姓名: 王昕凝

学科专业: 外科学 (泌尿外科)

导 师: 董隽

答辩委员会主席:



论文答辩日期: 二〇一八年五月三十日

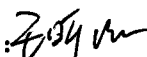
院校地址: 北京市海淀区复兴路 28 号

邮政编码: 100853


解放军医学院 研究生学位论文原创性声明

秉承我院“忠诚、敬业、和谐、创新”的学风，本人声明：所呈交的论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，也不含为获得我院或其他教育机构的学位及证书而使用过的材料，对本文的研究作出贡献的个人或集体，均已在文中做了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：


日期：2018.5.30

指导教师签名：

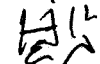
日期：2018.5.30

解放军医学院 研究生学位论文版权使用授权书

本人保证毕业离院后，发表论文或使用论文工作成果时署名为解放军医学院或解放军总医院。学院有权保留并向国家有关部门或机构送交论文原件、复印件和电子版本，可以采用影印、缩印、扫描或其它手段保存论文以供被查阅和借阅。学院可以公布学位论文的全部或部分内容（保密内容除外）。

论文作者签名：

日期：2018.5.30

指导教师签名：

日期：2018.5.30

目 录

| | |
|---------------------------------------|----|
| 中文摘要: | 1 |
| Abstraction: | 3 |
| 前言 | 6 |
| 第一部分 供受者年龄差对移植肾功能的影响 | 8 |
| 1.1 研究目的 | 8 |
| 1.2 研究对象及方法 | 8 |
| 1.3 结果 | 9 |
| 1.4 讨论 | 10 |
| 1.5 小结 | 12 |
| 第二部分 利用 LC-MS/MS 鉴定肾移植供受者血清蛋白质组 | 13 |
| 2.1 研究目的 | 13 |
| 2.2 研究材料 | 13 |
| 2.3 研究方法 | 17 |
| 2.4 结果 | 19 |
| 2.5 讨论 | 34 |
| 2.6 小结 | 37 |
| 第三部分 利用 LC-MS/MS 鉴定肾移植供受者尿液蛋白质组 | 38 |
| 3.1 研究目的 | 38 |
| 3.2 研究材料 | 38 |
| 3.3 研究方法 | 38 |
| 3.4 结果 | 39 |
| 3.5 讨论 | 54 |
| 3.6 小结 | 57 |
| 结 论 | 58 |
| 参 考 文 献 | 59 |
| 文 献 综 述 | 67 |
| 攻读学位期间发表论文 | 82 |

致谢 83

作者：王昕凝

学科专业：外科学（泌尿外科）

导师：董隽

肾移植供受者年龄差对移植肾功能及蛋白质组的影响

中文摘要：

目的：肾源短缺是制约全世界肾移植发展的重要原因，活体肾移植可有效缓解肾源短缺。为增加供肾来源，选择高龄供者作为亲属活体肾移植供体的医疗中心逐渐增多。但随着供者年龄的增长，供肾随之而衰老，功能随之下降，供者年龄及供受者年龄差对肾移植预后影响愈发显著，高龄供者活体供肾肾移植的远期疗效仍有争议，尤其当受者较为年轻时。将衰老器官移植入年轻受者体内后，机体内环境是否影响新器官的衰老进程，供肾的衰老程度和受者体内内环境的衰老程度对移植肾远期功能有何影响。本研究主要目的是通过对比供受者之间的肾功能，鉴定肾移植供体及受体的血、尿蛋白质组，评估供肾的衰老程度的差异与受者内环境的衰老程度的相互作用，反映供受者的年龄因素对肾移植的影响。

方法：选择移植术后 3 年以上的符合筛选标准的老年供肾-年轻受肾的肾移植供受者共 20 对及年轻供肾-老年受肾的肾移植供受者共 6 对，于解放军总医院进行检查及化验并计算 eGFR，使用 SPSS 22 软件采用配对 T 检验对比供受者的 eGFR。然后从两组中各选取 5 对供受者，采用液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 技术对留取血清及尿液样本进行蛋白质组学定量研究，通过 Mascot 搜库软件进行蛋白鉴定，采用 Wilcoxon 秩和检验分析差异蛋白，通过 Gene Ontology 数据库及 IPA Pathway 数据库对鉴定得到的差异蛋白进行生物学功能、通路和蛋白相互作用分析。

结果：1.20 名老年供者平均年龄为 57 岁，平均 eGFR 为 69.27 ml/min；20 名年轻受者平均年龄为 33 岁，平均 eGFR 为 74.07ml/min；6 名年轻供者平均年龄为 38 岁，平均 eGFR 为 97.67ml/min；6 名老年受者平均年龄为 62 岁，平均 eGFR 为 64.46ml/min。

在老年供者-年轻受者组中，年轻受者肾功能与老年供者相近 ($P=0.222$)，而在年轻供者-老年受者组中，年轻供者肾功能优于老年受者 ($P=0.036$)。2.在2组各5对供受者的血样本中，我们共鉴定出了497个蛋白质。我们对老年供者-年轻受者组及年轻供者-老年受者组进行了组内对比，发现老年供者-年轻受者组中有17个差异蛋白，均在老年供者中升高；而年轻供者-老年受者组中有12个差异蛋白，均在老年受者中升高。差异蛋白均在老年个体的血清中升高，说明这些差异蛋白可能参与机体衰老的分子调控过程，如SLC3A2等。差异蛋白主要参与的共同生物学通路包括:Acute Phase Response Signaling, FXR/RXR Activation 以及 LXR/RXR Activation。两组差异蛋白中，有1个共同差异蛋白:SLC3A2，在老年供者及老年受者的血清样本中均升高。SLC3A2主要参与参与细胞氨基酸代谢及整合素的信号调节，推测可能与机体衰老过程有关。3.在2组各5对供受者的尿样本中，我们共鉴定出了975个蛋白质。其中，老年供者-年轻受者组中有12个差异蛋白，4个在老年供者中表达升高，8个在年轻受者中表达升高；而年轻供者-老年受者组中有28个差异蛋白，其中15个在老年受者中表达升高而13个表达降低。两组差异蛋白中，参与的共同生物学通路包括:Acute Phase Response Signaling, Atherosclerosis Signaling, Clathrin-mediated Endocytosis Signaling, Coagulation System, FXR/RXR Activation, LXR/RXR Activation and Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease。有2个共同差异蛋白:SERPINA1和SERPINA3，在年轻受者及老年受者的血样本中均升高。SERPINA蛋白家族均为胰蛋白酶抑制剂，可以作用于包括丝氨酸蛋白酶在内的多种靶点，推测与移植肾的生理性改变有关。

结论:1.供受者年龄差可以影响移植肾功能，而内环境的差异可能导致了移植肾衰老速度的改变;2.年龄可影响血清蛋白质组成分，差异蛋白与炎症反应、脂质代谢等生物学过程有关，其中，SLC3A2可能同内环境衰老过程有关;3.肾移植可影响尿蛋白质组成分，差异蛋白与能量代谢、免疫应答、动脉硬化、凝血等生物学功能有关，其中SERPINA1和SERPINA3可能同内环境与移植肾的相互作用有关。

【关键词】蛋白质组、年龄、肾移植、老年活体供者、衰老

The Affection of Renal Transplantation Donor-Recipient Age Difference to Graft Function and the Proteome of Recipient

Abstraction:

Objection: The shortage of organ donors limited the development of kidney transplantation. And living donor transplantation play an effective role in helping to deal with this problem. The number of centers which choose old living donors for living transplantation is increasing world widely. But with the increasing of the old living donors' age, the influence on the outcome of the renal transplantation from donors' age and donor-recipient age differences is becoming obviously. And the long-term result of renal transplantation from old living donor is still under debating especially when recipients are young. How new bodily internal environment will impact the senescence process of aging graft after transplanted into younger recipient. And how the senescence process of recipients' internal environment and graft influence the long-term outcome of graft. This study focuses on estimating the outcome by donor-recipient age difference living kidney transplantation, with the proteome of donors' and recipients' serum or urinary, to explores weather the aging internal milieu will affect the graft.

Method: 20 young recipients and their corresponding old donors, and 6 old recipients and their corresponding young donors were included in this study. All the relationship between recipients and donors is parent-children. Their kidney functions were tested and compared by SPSS 22 software in pair T test. Then we analyzed the serum and urinary proteome of 5 pairs cases in two groups by LC-MC proteomic mass spectrum technique. The data was searched against the target-decoy RefSeq human database. Wilcoxon-Mann-Whitney test were applied to select data sets. And we landed GO and IPA database to identify proteins by bioinformatic and pathway analysis.

Result: 1. The average age of twenty old donors is 57-year-old, and their average eGFR

is 69.27 ml/min. The average age of twenty young recipients is 33-year-old and their average eGFR is 74.07 ml/min. The average age of six young donors is 38-year-old, and their average eGFR is 97.69 ml/min. The average age of six old recipients is 62-year-old, and their average eGFR is 64.46 ml/min. The kidney function of old donors and young recipients' are similar while young donors' are better than old recipients' ($p=0.222$, $p=0.036$). 2. We identified 497 proteins in serum proteome of 10 cases of 5 pairs in two groups. We compared the proteome data between old donors and young recipients, young donors and old recipients. There are 17 distinct proteins in old donor-young recipient group and all these distinct proteins are highly expressed in the serum of old donors. There are 12 distinct proteins in young donor-old recipient group and all these distinct proteins are highly expressed in the serum of old recipients. The common pathways of distinct proteins in two group are Acute Phase Response Signaling, FXR/RXR Activation and LXR/RXR Activation. And SLC3A2 is the only distinct exists in both two group. 3. We identified 975 proteins in urinary proteome of 10 cases of 5 pairs in two groups. There are 12 distinct proteins in old donor-young recipient group and 4 of these distinct proteins are highly expressed in the urinary of old donors, 8 distinct proteins are lowly expressed. There are 28 distinct proteins in young donor-old recipient group and 15 of these distinct proteins are highly expressed in the urinary of old recipients while 13 distinct proteins are lowly expressed. The common pathways of distinct proteins in two group are Acute Phase Response Signaling, Atherosclerosis Signaling, Clathrin-mediated Endocytosis Signaling, Coagulation System, FXR/RXR Activation, LXR/RXR Activation and Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease. SERPINA1 and SERPINA3 exist in both two group in the meantime.

Conclusion: 1. The donor-recipient age difference influences the graft function and this may because of graft aging speed is changing induced by the difference of internal milieu. 2. The serum proteins of old individuals and young individuals are different. These different proteins are related with immune response, energy metabolism etc. Among the

distinct proteins, SLC3A2 is related to internal milieu senescence process. 3. Renal transplantation can change the urine proteome and these distinct proteins are associated with immune response. energy metabolism, arteriosclerosis etc. Among these proteins, SERPINA1 and SERPINA3 are associated with renal transplantation.

【Key words】 proteome, aging, kidney transplant, old living donor.

前言

肾源短缺是制约肾移植的应用及技术发展的重要原因,因此越来越多的终末期肾病患者采用亲属活体肾移植。亲属活体肾移植优点为组织相容性较高,肾脏缺血时间短,并且避免了 DCD 供者循环障碍带来的肾脏损伤,还可缩短患者透析时间^[1],因而移植肾存活率较高、功能较好,且排异风险较低^[2]。我国亲属肾移植的器官来源多以父母作为供者供肾^[3]。但父母作为供者往往年龄较大,与受者年龄差较大。随着机体的追按衰老,肾脏功能会因原发性肾小球丢失而逐渐下降^[4]。30 岁以后的健康个体 GFR 每年下降大概 1ml/min^[5]。另外,肾脏细胞的免疫抗原性却会随着年龄的增长而增强^[6]。因此,选用年龄较大的供者进行活体肾移植术常会伴有 DGF、急慢性排异反应等并发症发生率增高的风险^[7]。但是,研究显示,供者年龄并非影响移植肾预后的独立危险因素^[8]。年轻的终末期肾病患者,免疫系统比老年患者相对更健康,能对移植肾免疫抗原产生更强烈的免疫反应,因此受者年龄及供受者年龄差也对肾移植远期疗效有一定的影响^[9, 10]。器官衰老过程是机体内环境与脏器互相作用的结果,肾脏的衰老受到内环境的调控。当老年供肾移入年轻受者体内时,年轻的机体内环境会如何影响老年供肾原本的衰老进程目前尚无研究。

Williams 和 Wilkins 于 1994 年提出了蛋白质组 (proteome) 的概念^[11]。蛋白质组学通过对特定时间及环境下细胞或组织中所表达的全部蛋白质的数量、特性等变化进行研究,反映整体的代谢变化及生理功能^[12]。基于质谱技术的蛋白质组学实验方法具有高通量、高灵敏度及高精度的优势,可以获得较全面的生物学信息,对进一步研究机体的生理、病理过程有重要帮助。差异蛋白质组学通过对正常及病理状态下细胞或组织中蛋白表达值进行比较分析,筛选差异蛋白,应用生物信息学统计分析其表达数量、定位及功能等,发现在不同的生理病理条件下所表达的差异蛋白对生理功能的影响,探究机体生理变化、疾病发病机制的线索,或寻找特异性疾病标志物^[13]。蛋白质组学研究中,液相色谱由于变化多样且与质谱兼容性好而被广泛应用,液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 技术通过对蛋白质复合物进行酶切,得到多肽混合物,经过反相色谱柱,分离成不同的馏分,并将不同的肽段馏分上样进行质谱分析,获得肽段片

段序列信息，结合数据库检索鉴定蛋白质，对样本中全部的蛋白质进行精确的定性和定量^[14]。现在，蛋白质组学已经在寻找肾移植后急性排异反应的标志物及急性排异反应的发病机制等多方面上得到广泛应用^[15-17]。

本研究希望通过对肾移植供受者的临床肾功能及血、尿蛋白质组的分析，对处于不同供-受者年龄差的受体内环境中的移植肾，与处于原本内环境中的肾脏进行对比，探究移植肾在不同的内环境中的生理性改变，为供受者年龄对移植肾功能的影响寻找理论依据。

第一部分 供受者年龄差对移植肾功能的影响

1.1 研究目的

供受者的年龄及供受者年龄差均影响移植肾的功能。除因供者年龄增长导致供肾衰老外,受者内环境代谢也受到年龄因素的作用并随之而改变,可对移植肾功能产生重要影响。机体衰老是全身多个器官互相作用的结果,肾脏的衰老受到机体内环境的影响。将一个相对年轻或老年的肾脏移植入受者体内后,肾脏所处的内环境发生了改变。与处于原内环境的肾脏相比,新的内环境如何调控影响移植肾的衰老进程,目前尚无研究。本部分主要通过对在原本内环境的肾脏(供者原肾)与在新的内环境的肾脏(受者移植肾)进行肾功能对比,研究内环境与移植肾之间的年龄差距对肾脏功能的影响。

1.2 研究对象及方法

1.2.1 患者及筛选标准

我们纳入了来自中国人民解放军总医院、北京友谊医院及中国人民解放军 309 医院共 26 对符合筛选标准的活体亲属肾移植供受者。筛选标准为:1、活体供肾,受者接受肾移植术后三年以上;2、供受者现均无严重的全身或泌尿系统疾病;3、受者未发生过临床急性排异反应;4、供受者年龄差 >20 岁。供受者关系为父母子女关系,分别为父母供肾-子女受肾及子女供肾-父母受肾。其中,父母供肾-子女受肾共 20 对,子女供肾-父母受肾共 6 对。我们根据供受者之间的亲属关系及供受者的平均年龄将供受者分为四组:老年供者、年轻受者、年轻供者、老年受者。

除 1 名受者服用西罗莫司、1 名受者服用环孢素 A 外,其余 24 名肾移植受者均接受泼尼松、吗替麦考酚酯及他克莫司的三联免疫抑制方案。所有肾移植受者随访时 FK506 及环孢素 A 血药浓度均处于正常范围内,所有肾移植受者随访时均未发生过临床排异反应。

1.2.2 检查项目

所有供、受者均在随访时于中国人民解放军总医院测量体重、血压、肝肾功、电解质、血糖、血常规、尿常规、移植肾及泌尿系 B 超等检验或检查以排除泌尿系感染、泌尿系结石、泌尿系肿瘤、高血压、糖尿病、肝功能损伤等影响肾功能的全身或泌尿系统疾病，并以 CKD-EPI 公式计算的估计肾小球滤过率 (estimate glomerular filtration rate, eGFR) 表示供受者肾功能。CKD-EPI 公式为：

$$\text{女: (Scr} \leq 0.7 \text{ mg/dl) : eGFR} = 144 \times (\text{Scr} / 0.7)^{-0.329} \times (0.993)^{\text{Age}};$$

$$\text{女: (Scr} > 0.7 \text{ mg/dl) : eGFR} = 144 \times (\text{Scr} / 0.7)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{Age}};$$

$$\text{男: (Scr} \leq 0.9 \text{ mg/dl) : eGFR} = 141 \times (\text{Scr} / 0.9)^{-0.411} \times (0.993)^{\text{Age}} ;$$

$$\text{男: (Scr} > 0.9 \text{ mg/dl) : eGFR} = 141 \times (\text{Scr} / 0.9)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{Age}};$$

1.2.3 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析，采取配对 T 检验进行组内比较，采取独立样本 T 检验进行组间比较，当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

1.3 结果

患者临床数据见表 1。

表 1 老年供者-年轻受者组及年轻供者-老年受者组临床数据

| | 老年供者 | 年轻受者 | 老年受者 | 年轻供者 |
|---------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| 年龄 (y) | 56.79±6.05 | 32.80±6.16 | 62.33±6.40 | 38.00±6.93 |
| 年龄差 (y) | 23.52±2.80 | 23.52±2.80 | 24.33±3.88 | 24.33±3.88 |
| 术后时间 (y) | 4.84±1.57 | 4.84±1.57 | 7.33±3.93 | 7.33±3.93 |
| 体重 (kg) | 67.42±11.44 | 59.63±9.01 | 68.67±16.23 | 67.67±14.50 |
| 白蛋白 (g/L) | 44.86±2.51 | 49.01± 5.66 | 46.72±7.35 | 51.62± 9.99 |
| 肌酐 (umol/L) | 90.94±21.04 | 102.18±15.04 | 101.15±25.51 | 68.18±6.97 |
| 尿素氮 (mmol/L) | 5.98±1.02 | 6.10±1.71 | 6.38±3.02 | 4.77±1.08 |
| eGFR (ml/min) | 69.27±14.10 | 74.07±17.36 | 64.46±16.60 | 97.67±15.43 |

老年供者平均年龄为 56.79 岁，与相应的年轻受者为父母-子女关系，平均年龄差距为 23.52 岁，年轻受者的平均年龄为 32.80 岁，该组平均肾移植术/供肾切取术后时间为 4.84 年。老年供者的平均 eGFR 为 69.27ml/min，相比相应的年轻受者的平均 eGFR (74.07ml/min) 略低，但无统计学差异 ($P=0.222$)。入组的老年受者与年轻供者均为

父母-子女关系, 平均年龄差距为 24.33 岁, 老年受者平均年龄为 62.33 岁, 相应的年轻供者平均年龄为 38.00 岁。该组平均肾移植术/供肾切取术后时间为 7.33 年。老年受者的平均 eGFR 为 64.46ml/min, 显著低于相应的年轻供者的平均 eGFR(97.67ml/min) (P=0.007)。

1.4 讨论

衰老是一种由于实质细胞退化及修复异常导致的内环境稳态进行性下降的生理过程, 最终表现为器官功能性退化, 并受多器官间的互相作用的影响及调控^[18, 19]。肾脏衰老的表现特征为肾小球滤过率下降, 但由于老年个体的肌酐代谢随年龄增长而逐渐下降, 因此虽然 GFR 下降, 但血肌酐却可保持稳定水平^[20]。原发性肾小球毁损、肾单位丢失是肾脏衰老导致的 GFR 下降的主要原因^[21], 微观特点为局灶肾小球硬化、间质纤维化及肾小动脉、微动脉粥样硬化^[22]。此外, 衰老会消耗器官修复能力的储备, 而供肾切取术、肾移植术围手术期的供体、受体的应激反应则会加速肾脏实质细胞修复能力的消耗, 并影响移植肾的术后肾功能^[23]。因此, 供肾者的年龄导致的供肾衰老性改变对移植物的远期功能及长期存活有重要影响。但器官衰老并非器官独自的生理变化, 而是器官与机体内环境互相作用的结果^[24]。器官在机体不同年龄时所处的内环境是变化的, 血流动力学、血液组分及细胞因子等均随衰老而改变。因而, 器官衰老其实与机体内环境的整体变化有密切关联^[25]。对于老年活体供肾而言, 受者的机体内环境的代谢水平也是影响移植肾远期功能的重要因素。

供者年龄是过去器官废用的主要原因之一^[26], 但现在边缘供者 (ECD, Expanded Criteria Donors, 指年龄 > 65 岁的供者或年龄 > 55 岁伴有急性肾损伤、休克或动脉性高血压的供者) 供肾逐年增加^[27]。移植前供者肾活检提示的肾脏损伤并不能预测肾移植术后效果^[28]。多项研究表明, 供者年龄并非移植肾功能衰竭的独立危险因素^[29, 30]。郭丰富等^[31]报道的老年供肾术后 1、3 年移植肾存活率分别为 97.8% 和 77.8%, 血肌酐为 148.40 $\mu\text{mol/L}$, 与年轻供者对比均无显著差异。李金锋等^[32]对比了 66 例边缘供者与标准供者移植术后短期与长期疗效, 两组受者术后 1 年血肌酐、DGF、AR、并发症发生率及人/肾存活率均无统计学差异, 供者年龄并非肾移植预后的独立危险因素。

Gill 等^[33]研究表明, 来自 >55 岁供者的移植肾, 3、5 年存活率分别为 85% 和 76%, 而来自 <55 岁供者的移植肾则分别为 89% 和 82%, 两组差异无统计学意义。一篇对 31 篇文献的系统回顾显示, 老年供肾移植肾 5 年生存率低于年轻供者 (70% vs. 87%, $P=0.21$), 但差异并不显著^[34]。尽管老年活体供肾效果无法媲美年轻供者, 但仍优于尸体供肾。Mirgam 等^[35]认为 60 岁活体供者的移植肾存活率同 20 岁尸体供肾相近。因此有学者认为, 使用老年供者的供肾虽然会增加移植物远期存活的风险, 但与继续透析并等待标准供肾者相比, 这种风险是可以接受的^[36]。

除供者年龄外, 受者年龄也被认为是影响移植肾功能的重要影响因素^[37], 而这种影响可能比供者年龄因素影响更大。老年受者机体免疫力差, 更容易接受免疫原性较强的老年供肾^[38]。而年轻受者免疫系统较强, 更容易对移植肾发生免疫应答反应^[39, 40]。孝晨等^[41]发现虽然移植肾术后 eGFR 水平与供者年龄负相关, 但移植肾代偿能力仅受术前 eGFR 水平及受者年龄影响而非供者年龄。王振等^[10]统计了 327 例活体肾移植受者急性排斥反应 (AR) 发生情况, 老年供者并不增加移植后排异风险, 而供受者年龄组合是 AR 风险的独立危险因素。Chang 等^[42]报道, 决定肾移植半衰期 (50% 肾移植受者出现器官衰竭的时间) 的因素是受者年龄而非供者年龄。Masayuki 等^[9]也发现, 使用 >50 岁的供肾, 受者年龄是移植肾丢失风险的独立危险因素 (15 年移植肾存活率 75% vs. 41%)。Shin 等^[43]也报道, 对年轻受者而言, 老年供者移植肾 10 年存活率低于年轻供者 (83% vs. 62%), 但供者年龄对老年受者影响较小 (5 年移植肾存活率 92% vs. 90%)。Lee^[44]等以供受者年龄相差 20 岁为分界, 发现供受者年龄差过大对 5 年血肌酐水平及 AR 发生率有显著影响, 但移植肾存活率无显著差异。

基础研究方面, 李典耕^[45]及丁瑞^[25, 46]发现, 将老年小鼠的肾脏移植入年轻小鼠体内后, 相比老年小鼠的原肾, 年轻小鼠可使老年肾脏年轻化; 相反, 将年轻小鼠的肾脏移植入老年小鼠体内后, 年轻的肾脏衰老加速; 同时, 新的内环境可显著影响移植肾的基因表达, 这些基因涉及能量代谢、细胞增殖分化等通路。此外, 有文献提出, 伴有局灶性肾小球硬化导致的慢性肾损伤的移植肾在移植入受者体内后可逆转其肾单位的损伤, 并保持较好的移植肾功能^[47]。Kanasaki 等^[45]提出肾脏的衰老过程可被外界干涉延缓甚至逆转^[18]。方佳丽等^[48]发现老龄供肾在青年受者体内 6 个月后病理

学结构改善,间质纤维化速度缓解。近年来,对慢性排异反应的研究表明,其病理过程与肾脏衰老相似,或许对移植肾衰老进程有加速作用^[49,50]。基于以上研究背景,我们提出假设:移植肾功能与受者年龄相关,受者的内环境可能影响移植肾的衰老。本研究通过对比肾移植供受者之间的肾功能,观察来自同一个体的两个肾脏在不同年龄的内环境中的功能情况(即供者与受者间对比),探寻不同年龄差的内环境-肾之间的相互作用影响,探索供受者年龄差与远期肾功能的关系。

活体供肾者将肾脏捐献给受者后,原本处于同一内环境下的衰老表型相近的两枚肾脏中的一枚被移植入受者体内,受者与供者存在的年龄差距导致了二者内环境的不同:在老年供者-年轻受者组中,老年内环境中的老年肾脏被分为老年内环境-老年肾脏(老年供者)及年轻内环境-老年肾脏(年轻受者),受者移植肾相较内环境年轻二十岁以上;而在年轻供者-老年受者组中,年轻内环境中的年轻肾脏被分为年轻内环境-年轻肾脏(年轻供者)及老年内环境-年轻肾脏(老年受者),受者移植肾相较内环境老年二十岁以上。数据显示:在排除临床排异反应、肿瘤、结石、高血压、糖尿病、肾病复发等疾病后,年轻受者的移植肾功能略好于相应的老年供者,而年轻供者的肾功能则明显优于相应的老年受者。肾移植术时的缺血-再灌注损伤及免疫抑制剂的肾毒性会对移植肾造成一定的损伤,因而无论如何移植肾功能都应相对原供肾要差。但本组数据的差异无法单用该因素的影响解释,否则两组内移植肾与原肾之间的功能差距应相近。结合我们的研究设计及研究背景,我们认为供受者的年龄差也可影响移植肾功能,尤其是年轻的内环境可对年老移植肾功能有一定的保护作用,这种作用可能是由于不同年龄的内环境对老年/年轻的移植肾的影响不同:其中年轻的内环境可能对老年肾脏有保护作用,而老年的内环境可能加重年轻肾脏的功能损伤,这种内环境对移植肾的作用可能是对移植肾的衰老的调控造成的。

1.5 小结

供受者年龄差可以影响移植肾功能,而内环境的差异可能导致了移植肾衰老速度的改变。

第二部分 利用 LC-MS/MS 鉴定肾移植供受者血清蛋白质组

2.1 研究目的

根据第一部分研究结果可以得出, 机体内环境衰老程度的变化会影响肾脏功能。研究第二部分的目的是通过对供受者血清蛋白质组分析, 筛查老年及年轻个体间、供肾者及服用免疫抑制剂的受肾者之间的血清差异蛋白, 并通过对差异蛋白的生物信息学分析以估测个体内环境的异同。

2.2 研究材料

2.2.1 样本来源

从研究第一部分所纳入患者中, 选择老年供者-年轻受者组及年轻供者-老年受者各 5 对, 抽取血液样本, 并留存尿液样本用于研究第三部分, 共 20 份样本。

供受者临床资料见表 2

2.2.2 主要试剂

尿素 (美国 Amresco 公司)

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Thermo 公司)

二硫苏糖醇 (DTT) (美国 Calbiochem 公司)

吡啶乙酸 (IAA) (美国 Calbiochem 公司)

质谱级胰酶 (美国 Promega 公司)

超纯水 (美国 Fisher Scientific 公司)

质谱级乙腈 (美国 Fisher Scientific 公司)

三氟乙酸 (TFA) (美国 Fisher Scientific 公司)

质谱级氨水 (天津科密欧公司)

串联质谱标签 (TMT) 标记试剂盒 (美国 Thermo 公司)

C18 反相填料 (Dr. Maisch GmbH 公司)

2.2.3 主要仪器

- 离心柱（美国 Thermo 公司）
- 纳升级液相色谱串联高分辨质谱系统（美国 Thermo 公司）
- Nano-HPLC 系统（丹麦 Proxeon 公司）
- Q Exective 质谱仪（美国 Thermo 公司）
- 分析柱（美国 Upchurch 公司）
- 超声破碎仪（美国 Sonics 公司）
- Speedvac 真空抽干仪（德国 Eppendorf 公司）
- 低温离心机（德国 Eppendorf 公司）
- 紫外分光光度仪（德国 Beckman 公司）
- 电泳仪（北京六一仪器厂）
- 电泳槽（美国 Bio-Rad 公司）

2.2.4 其他

- Proteome Discoverer 2.0 软件-插件包（美国 Thermo 公司）

表 2 蛋白质组检测样本来源患者临床资料

| 供受者 | 供受者年龄 | 性别 | 手术时年龄 (岁) | 现在年龄 (岁) | 体重 (kg) | 肌酐 ($\mu\text{mol/L}$) | 白蛋白 (g/L) | 尿素氮 (mmol/L) | eGFR(ml/min) |
|--------|-------|----|-----------|----------|---------|--------------------------|-----------|--------------|--------------|
| 年轻受者 1 | 27 | 男 | 32 | 38 | 61 | 110.2 | 51.8 | 8.34 | 72.8 |
| 年轻受者 2 | 25 | 男 | 36 | 39 | 69 | 107 | 47.7 | 6.59 | 74.9 |
| 年轻受者 3 | 24 | 女 | 28 | 33 | 48 | 105.3 | 46.1 | 6.27 | 60.1 |
| 年轻受者 4 | 23 | 男 | 20 | 27 | 70 | 102.7 | 44.5 | 1.87 | 85.7 |
| 年轻受者 5 | 21 | 男 | 19 | 24 | 65 | 106 | 44.4 | 6.28 | 84.2 |
| 老年供者 1 | 27 | 男 | 59 | 65 | 70 | 92 | 44 | 5.95 | 74.9 |
| 老年供者 2 | 25 | 男 | 61 | 64 | 80 | 104 | 47.8 | 7.05 | 65.08 |
| 老年供者 3 | 24 | 女 | 52 | 57 | 85 | 101.4 | 44.6 | 6.41 | 53.1 |

| | | | | | | | | | |
|--------|----|---|----|----|----|-------|------|-------|--------|
| 老年供者 4 | 23 | 女 | 42 | 50 | 79 | 60.7 | 45 | 4.82 | 102 |
| 老年供者 5 | 21 | 男 | 50 | 55 | 74 | 100.1 | 43.7 | 5.18 | 72.6 |
| 老年受者 1 | 19 | 女 | 43 | 52 | 57 | 114.3 | 45.2 | 9.17 | 47.6 |
| 老年受者 2 | 23 | 男 | 62 | 66 | 99 | 82.4 | 45.5 | 3.77 | 85.03 |
| 老年受者 3 | 21 | 男 | 65 | 70 | 70 | 96.5 | 39.4 | 6.48 | 68.3 |
| 老年受者 4 | 27 | 男 | 50 | 63 | 68 | 145.5 | 60.9 | 10.82 | 43.67 |
| 老年受者 5 | 28 | 男 | 48 | 58 | 65 | 93 | 45.9 | 4.17 | 77.7 |
| 年轻供者 1 | 19 | 女 | 24 | 33 | 63 | 59.8 | 47.1 | 4.32 | 115.5 |
| 年轻供者 2 | 23 | 女 | 39 | 43 | 88 | 64.6 | 46.7 | 6.16 | 101.09 |
| 年轻供者 3 | 21 | 女 | 44 | 49 | 69 | 77.6 | 48.7 | 5.06 | 77.65 |
| 年轻供者 4 | 27 | 女 | 23 | 36 | 64 | 63.5 | 48.9 | 4.63 | 108.41 |
| 年轻供者 5 | 28 | 女 | 20 | 30 | 45 | 68.4 | 71.9 | 3.01 | 103.37 |

2.3 研究方法

2.3.1 血清样品的制备

- 1.取血浆 5ml 室温 5000g 离心 15 分钟，取上清液为血清。
- 2.取出去除血清 2 种最高丰度蛋白(白蛋白及免疫球蛋白 IgG)的离心柱(Pierce™ Top 2 Abundant Protein Depletion Spin Columns, ThermoScientific) 平衡至室温；
- 3.向离心柱内加入 5 ul 血清，拧紧盖子翻转摇晃 7 次使柱内琼脂糖小珠完全悬起；
- 4.将离心柱固定在翻转摇床上，室温旋转 30 分钟；
- 5.将离心柱坐入 1.5 ml 离心管中，室温 1000g 力离心 2 分钟，离心管内得 400 ul 液体；
- 6.向离心管内加入 20 ul 1M 碳酸氢铵 (NH_4HCO_3)，使溶液中碳酸氢铵的终浓度达到 50 mM，pH 为 8.5；
- 7.将离心管在 95℃加热 2 分钟变性蛋白，然后冷却至室温；
- 8.向离心管中加入 3 ug 测序级胰酶(Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega)，混匀后在 37℃孵育 4 小时消化蛋白，消化后所得肽样品可利用反相微柱进行分级分离。

2.3.2 利用高 pH 反相微柱对消化后所得血清肽样品进行分级分离

- 1.用 100 ul 质谱级乙腈 (Acetonitrile, LC/MS grade, FisherScientific) 活化含 3 mg C18 反相填料 (3 um, Dr. Maisch GmbH) 的反相微柱 2 次；
- 2.用 100 ul 清洗缓冲液 (10 mM NH_4HCO_3 , pH 10) 平衡反相微柱 2 次；
- 3.将肽样品上样至反相微柱上；
- 4.用 100 ul 清洗缓冲液 (10 mM NH_4HCO_3 , pH 10) 清洗反相微柱 2 次；
- 5.用含 6%、9%、12%、15%、18%、21%、25%、30%和 35%乙腈的 pH 为 10 的洗脱液缓冲液各 100 ul，按浓度梯度从低到高的顺序依次洗脱反相微柱，洗脱液分别洗脱至不同的 1.5 ml 离心管中；
- 6.将含 6%、15%、和 25%乙腈，含 9%、18%、30%乙腈，含 12%、21%和 35%

乙腈的洗脱液进行合并，得 3 个部分真空抽干用于后续质谱检测。

2.3.3 胰酶消化后所得肽样品的质谱检测：

1.使用 20 μ l 的上样缓冲液（5% 甲醇，0.1%甲酸）溶解消化后所得肽样品，并取 5 μ l 混合液上样，利用 ThermoScientific 纳升级液相色谱串联高分辨质谱系统（nLC-Easy1000-Q Exactive-HF）采集数据。

2.纳升级液相上样柱规格如下：内径 100 微米、填料为 Dr. Maisch GmbH 公司的 C18 填料（颗粒直径为 3 微米、颗粒孔径为 120 纳米）、填料柱床长度为 2 厘米；纳升级液相分离柱规格如下：内径 150 微米、填料为 Dr. Maisch GmbH 公司的 C18 填料（颗粒直径为 1.9 微米、颗粒孔径为 120 纳米）、填料柱床长度为 12 厘米。流动相 A 为 0.1% 甲酸；流动相 B 为乙腈及 0.1%甲酸。肽分离洗脱梯度如下：0-69 分钟为 5%-31%流动相 B，70-75 分钟为 95%流动相 B。

3.质谱数据以 Data Dependent Acquisition 方式进行采集，Q Exactive-HF 所用参数如下：一级质谱分辨率为 12 万，扫描范围为 300-1400m/z，AGC 为 3E+6，最大离子注入时间为 80 毫秒；二级质谱根据一级质谱中肽片段的信号强度由高向低依次分离碎裂（以 Top 20 模式），二级质谱的分辨率为 1.5 万，二级质谱母离子质量分离窗口为 3m/z，AGC 为 2E+4，离子最大注入时间为 20 ms，HCD 相对碰撞能量为 27%，数据采集时采用 12s 动态排除。

2.3.4 质谱数据的搜库

所得质谱数据运用 Proteome Discoverer V2.0 软件提取谱图，应用 Mascot2.3 搜索引擎鉴定蛋白质和肽段序列。在“Mascot”模板中对数据库搜索的各项参数进行设定：在“Protein Database”中选取人蛋白质序列数据库，所用的数据库为美国生物技术信息国家中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）的人类蛋白质参考序列 RefSeq 数据库；在“Enzyme Name”中选取 Trypsin；在“Maximum Missed Cleavage”中填入 2（代表允许的最大漏切位点数为 2）；在“Instrument”中选 Default；在“Taxonomy”中选 All entries；在“Precursor Mass Tolerance”中填 20 ppm；在“Precursor Mass Tolerance”中填 50 mmu；在“Use Average Precursor Mass”中选 False；在“From Quan Method”中选 None；在“Show All Modifications”中选 False；在“Dynamic

Modification “中除选取通常存在的 Acetyl (Protein N-term)、DeStreak (C)、Oxidation (M)、Carbamidomethyl (C); 肽段水平的假阳性鉴定要小于 1%。

2.3.5 生物信息学分析

采用 Wilcoxon 秩和检验分析差异蛋白。利用 DAVID 对分析得到的差异蛋白列表进行 GO 功能富集分析, 当 p-value 小于 0.05 时即表示差异蛋白在该 GO 条目中出现了富集。GO 数据库 (Gene Ontology) 是一个利用本体标准术语描述基因功能的综合性数据库, 通过对蛋白质的细胞组分 (Cellular Component)、生物过程 (Biological Process) 及分子功能 (Molecular Function) 的注释来描述基因及其相应蛋白质的生物学属性及在细胞内的作用。

采用 IPA 数据库对差异蛋白列表进行生物通路及相互作用网络分析, 当 p-value 小于 0.05 时即表示差异蛋白在该通路条目中出现了富集。IPA 数据库 (Ingenuity Pathway Analysis) 是一款对生物学通路进行分析的软件, 由 Ingenuity Knowledge Base 支持, 不仅可以构筑蛋白质、基因的相互作用模型, 还可以对基因组、RNA、基因芯片、蛋白质组或代谢组学进行数据分析。通过对蛋白质所属的 pathway 进行分析, 可以掌握蛋白质参与的信号转导过程和生物代谢途径。作为构成生命体的基本要素, 通常情况下蛋白质并不是以单体的形式发挥作用, 而是依赖于蛋白质之间的协同作用或形成蛋白复合物来发挥作用 (protein-protein interaction, PPI), 或形成蛋白质复合物来发挥作用完成生命体的新陈代谢活动。

2.4 结果

2.4.1 差异蛋白

在 2 组各 5 对供受者的血样本中, 我们共鉴定出了 497 个蛋白质。我们对老年供者-年轻受者组及年轻供者-老年受者组进行了组内对比, 发现老年供者-年轻受者组中有 17 个差异蛋白, 且均在老年供者中升高, 分别是: MEGF8 (表皮生长因子多重类似域蛋白 8)、PROZ (维生素 K 依赖性糖蛋白 Z)、APOC2 (载脂蛋白 C2)、F10 (凝血因子 10)、APOC4 (载脂蛋白 C4)、LUM (基膜聚糖前体)、FCN3 (无花果酶 3)、

C1S (补体 1 亚单位 S)、C1R (补体 1 亚单位 R)、ITIH2 (中间 α -球蛋白抑制因子 H2)、HGFAC (人肝细胞生长因子激活因子)、B2M (β 2 微球蛋白)、FGA (纤维蛋白原 α 链)、FGG (纤维蛋白原 γ 链)、IL1RAP (白介素 1 受体辅助蛋白)、LTBP1 (转化生长因子 β 1 结合蛋白 1)、SLC3A2 (溶质载体家族 3 成员 2)。

年轻供者-老年受者组中有 12 个差异蛋白均在老年受者中升高, 分别是: ENPP2 (核苷酸焦磷酸酶 2)、PLXDC2 (神经丛蛋白结构域蛋白 2)、SLC3A2 (溶质载体家族 3 成员 2)、APOA1 (载脂蛋白 A1)、CD109、CLEC3B (C-型凝集素域家族 3 成员 B)、C3 (补体 3)、ITIH1 (α -球蛋白中间抑制因子 H1)、GPLD1 (糖基化磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 D1)、GP1BA (人血小板膜糖蛋白 I $\beta\alpha$ 多肽)、PCSK9 (枯草溶菌素前蛋白转化酶 9)、SAA1 (血清淀粉样蛋白 A1)。

其中, SLC3A2 蛋白在 2 组差异蛋白中均有检出, 该蛋白在老年供者及老年受者的血蛋白质组中均较相应的年轻个体表达升高。血蛋白质组中差异蛋白见表 3 及表 4。

2.4.2 差异蛋白功能分析

我们分析了差异蛋白的 GO 功能富集注释。其中, 老年供者-年轻受者组中, 血蛋白质组差异蛋白的细胞组分注释主要为细胞外区域(FGG, F10, LTBP1, FGA, FCN3, LUM, PROZ, IL1RAP, APOC2, ITIH2, C1R, C1S, HGFAC, B2M)、细胞外分泌体 (MEGF8, FGG, FGA, LUM, PROZ, SLC3A2, APOC2, ITIH2, C1R, C1S, B2M)、细胞外空间 (FGG, FGA, LUM, PROZ, APOC2, HGFAC, B2M)、血液微观粒子 (FGG, FGA, FCN3, ITIH2, C1R, C1S) 等。生理过程注释主要包括初始免疫反应 (FGA, IL1RAP, C1R, C1S, B2M)、凝血过程 (FGG, F10, FGA, PROZ)、补体激活 (FCN3, C1R, C1S)、蛋白质水解 (FCN3, C1R, C1S, HGFAC)、细胞外基质构建 (FGG, FGA, LUM)、肽类激素分泌的正性调节 (FGG, FGA) 等。分子功能注释主要为丝氨酸样肽链内切酶的活化 (F10, FCN3, PROZ, C1R, C1S, HGFAC) 及钙离子集合 (MEGF8, F10, LTBP1, PROZ, C1R, C1S)。而在年轻供者-老年受者组中, 血蛋白质组差异蛋白的细胞组分注释主要为细胞外分泌体 (APOA1, ITIH1, SAA1, CLEC3B, C3, PLXDC2, SLC3A2, GPLD1, GP1BA)、细胞外空间 (APOA1, ENPP2, SAA1, CLEC3B, C3, CD109, GPLD1, PCSK9)、细胞外区域 (APOA1, ITIH1, SAA1, CLEC3B, C3)、血液微观粒子 (APOA1,

ITIH1, C3) 等。生物过程注释主要包括肽链内切酶的负性调节 (ITIH1, C3, CD109)、受体介导的巨噬细胞内吞作用 (APOA1, ENPP2, SAA1)、脂蛋白代谢 (APOA1, PCSK9)、磷脂代谢 (APOA1, PCSK9)、胆固醇稳态 (APOA1, PCSK9)、胆固醇代谢途径 (APOA1, PCSK9) 等。分子功能注释主要为载脂蛋白受体结合 (APOA1, PCSK9) 及肽链内切酶抑制物活化 (C3, CD109) 等。血蛋白质组差异蛋白 GO 分析见图 1、2。

2.4.3 差异蛋白通路分析

我们使用了 IPA 通路数据库对差异蛋白进行生物学通路及蛋白相互作用分析。在老年供者-年轻受者组中, 血蛋白质组差异蛋白主要参与的生物学通路包括: 急性期反应信号传导、肝 X 受体/视黄酸受体激活、胆汁酸受体/视黄酸受体激活、外源性凝血酶原激活途径、内源性凝血酶原激活途径、组织因子在肿瘤中的作用、补体系统、凝血系统、甲状腺激素受体/视黄酸受体激活、THOP1 在阿尔兹海默病中的神经保护作用、动脉粥样硬化信号传导、白介素-12 在巨噬细胞中的合成和信号转导、巨噬细胞中一氧化氮和活性氧自由基的合成、网格蛋白介导的细胞内吞作用信号、CD1 脂类抗原的表达、抗原表达途径、淋巴细胞介导的细胞毒素 T 对靶细胞的杀伤作用等生物学通路。而在年轻供者-老年受者组中, 血蛋白质组差异蛋白主要参与的生物学通路包括: 急性期反应信号传导、肝 X 受体/视黄酸受体激活、胆汁酸受体/视黄酸受体激活、山梨醇降解、甘氨酸的生物合成、二磷酸腺苷-D-木糖和二磷酸腺苷-D-葡萄糖醛酸酯的生物合成、脯氨酸降解、胆碱降解、异维 A 酸酯的生物合成、氨基乙磺酸的生物合成、3 磷酸甘油的跨膜穿梭、支链 α 酮酸脱氢酶复合体、苏氨酸降解、丙酮酸降解、 β 丙氨酸降解、丙酮酸发酵为乳酸、2-酮戊二酸脱氢酶复合体、4 氨基丁酸降解、2 氨基 3 羧基粘康酸半醛降解为戊二酰辅酶 A、苯乙胺降解等生物学通路。血蛋白质组差异蛋白 IPA 通路分析见图 3、4。

表 3 老年供者-年轻受者组血清蛋白质组差异蛋白

| GI Number | Name | Entry Name(UniProt) | Accession Number(UniProt) | isoelectric point | molecular weight | Protein Name | Expression |
|-----------|-------|---------------------|---------------------------|-------------------|------------------|---|------------|
| 429836859 | MEGF8 | MEGF8_HUMAN | Q7Z7M0 | 6.45 | 303100 | multiple epidermal growth factor-like domains protein 8 isoform 1 precursor | Down |
| 371502106 | PROZ | PROZ_HUMAN | P22891 | 5.68 | 47053 | vitamin K-dependent protein Z isoform 1 precursor | Down |
| 32130518 | APOC2 | APOC2_HUMAN | P02655 | 4.64 | 11283 | apolipoprotein C-II precursor | Down |
| 4503625 | F10 | FA10_HUMAN | P00742 | 5.68 | 54731 | coagulation factor X isoform 1 preproprotein | Down |
| 4502161 | APOC4 | APOC4_HUMAN | P55056 | 9.19 | 14553 | apolipoprotein C-IV precursor | Down |
| 4505047 | LUM | LUM_HUMAN | P51884 | 6.16 | 38429 | lumican precursor | Down |
| 27754776 | FCN3 | FCN3_HUMAN | O75636 | 6.2 | 32902 | ficolin-3 isoform 1 precursor | Down |
| 41393602 | C1S | C1S_HUMAN | P09871 | 4.85 | 76684 | complement C1s subcomponent isoform 1 preproprotein | Down |
| 66347875 | C1R | C1R_HUMAN | P00736 | 5.89 | 80199 | complement C1r subcomponent precursor | Down |
| 70778918 | ITIH2 | ITIH2_HUMAN | P19823 | 6.4 | 106463 | inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 precursor | Down |
| 4504383 | HGFAC | HGFA_HUMAN | Q04756 | 6.99 | 70681 | hepatocyte growth factor activator isoform 2 preproprotein | Up |
| 4757826 | B2M | B2MG_HUMAN | P61769 | 6.06 | 13714 | beta-2-microglobulin precursor | Up |

| | | | | | | | |
|-----------|--------|-------------|--------|------|--------|--|----|
| 4503689 | FGA | FIBA_HUMAN | P02671 | 5.7 | 94973 | fibrinogen alpha chain isoform alpha-E preproprotein | Up |
| 70906439 | FGG | FIBG_HUMAN | P02679 | 5.37 | 51511 | fibrinogen gamma chain isoform gamma-B precursor | Up |
| 268840382 | IL1RAP | IL1AP_HUMAN | Q9NPH3 | 6.71 | 78602 | interleukin-1 receptor accessory protein isoform 3 precursor | Up |
| 261337165 | LTBP1 | LTBP1_HUMAN | Q14766 | 5.62 | 186768 | latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 isoform LTBP-1L precursor | Up |
| 61744477 | SLC3A2 | 4F2_HUMAN | P08195 | 4.91 | 68101 | cell-surface antigen heavy chain isoform b | Up |

表 4 年轻供者-老年受者组血蛋白质谱差异蛋白

| GI Number | Name | Entry Name(UniProt) | Accession Number(UniProt) | isoelectric point | molecular weight | Protein Name | Expression |
|-----------|--------|---------------------|---------------------------|-------------------|------------------|--|------------|
| 91823274 | ENPP2 | ENPP2_HUMAN | Q13822 | 8.5 | 105200 | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2 isoform 1 preproprotein | Down |
| 40255005 | PLXDC2 | PXDC2_HUMAN | Q6UX71 | 5.99 | 59583 | plexin domain-containing protein 2 isoform 1 precursor | Down |
| 61744477 | SLC3A2 | 4F2_HUMAN | P08195 | 4.91 | 68101 | 4F2 cell-surface antigen heavy chain isoform b | Down |
| 4557321 | APOA1 | APOA1_HUMAN | P02647 | 5.56 | 30777 | apolipoprotein A-I isoform 1 preproprotein | Down |
| 115529484 | CD109 | CD109_HUMAN | Q6YHK3 | 5.59 | 161689 | CD109 antigen isoform 1 preproprotein | Down |

| | | | | | | | |
|-----------|--------|-----------------|--------|------|--------------|--|------|
| 156627579 | CLEC3B | TETN_HUMA N | P05452 | 5.52 | 22536 | tetranectin isoform I precursor | Down |
| 115298678 | C3 | CO3_HUMAN | P01024 | 6.02 | 187148 | complement C3 preproprotein | Down |
| 156119625 | ITIH1 | ITIH1_HUMA N | P19827 | 6.31 | 101389 | inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 isoform a preproprotein | Down |
| 29171717 | GPLDI | PHLD_HUMA N | P80108 | 5.91 | 92336. 45 | phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D precursor | Up |
| 291190772 | GP1BA | GP1BA_HUM AN | P07359 | 5.87 | 71540 | platelet glycoprotein Ib alpha chain precursor | Up |
| 31317307 | PCSK9 | PCSK9_HUMA N | Q8NBP7 | 6.14 | 74286 | proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 preproprotein | Up |
| 295821193 | SAA1 | SAA1_HUMA N | P0DJ18 | 6.28 | 13532 | serum amyloid A-1 protein preproprotein | Up |

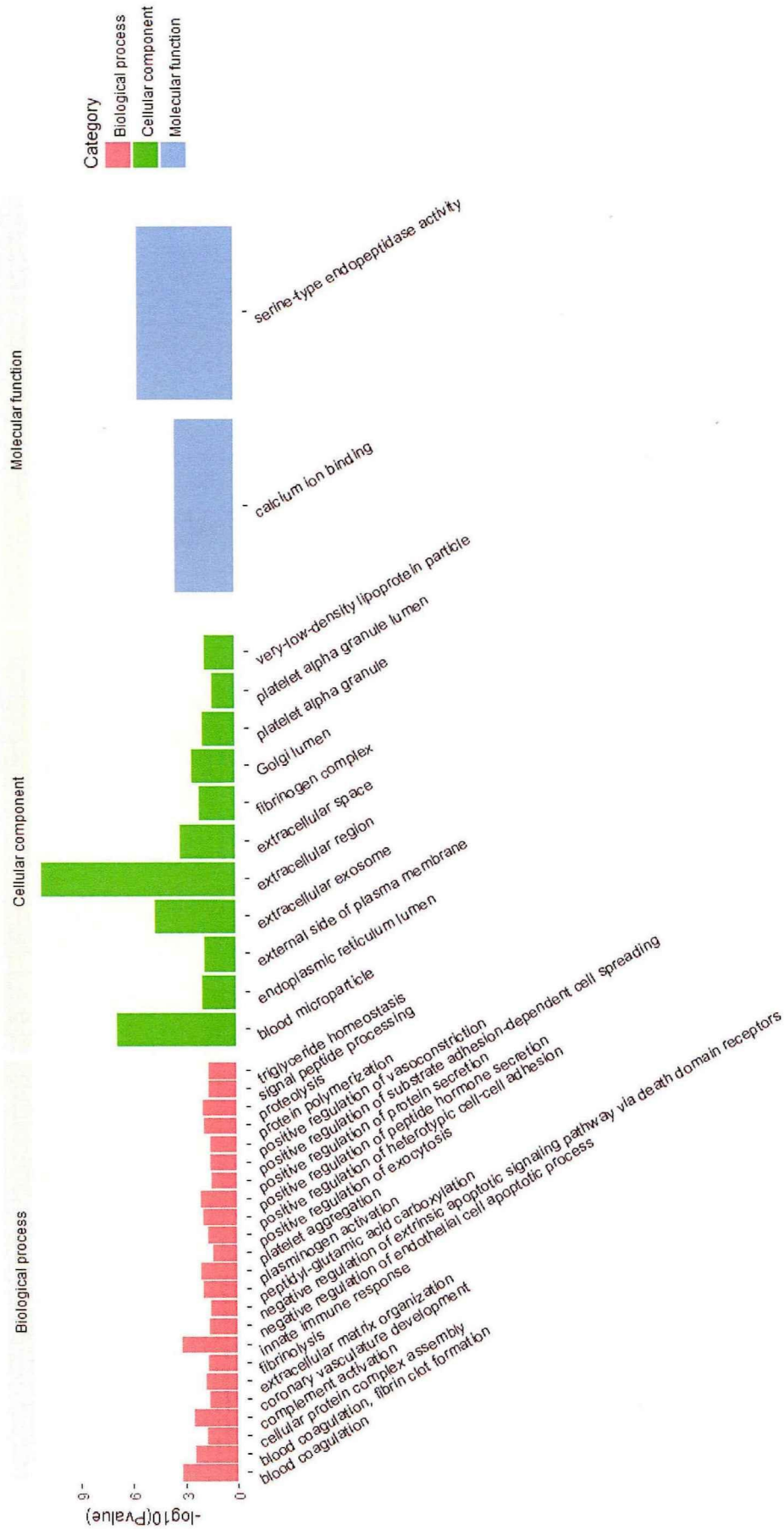


图 1 老年供者-年轻受者组蛋白质组差异蛋白 GO 分析

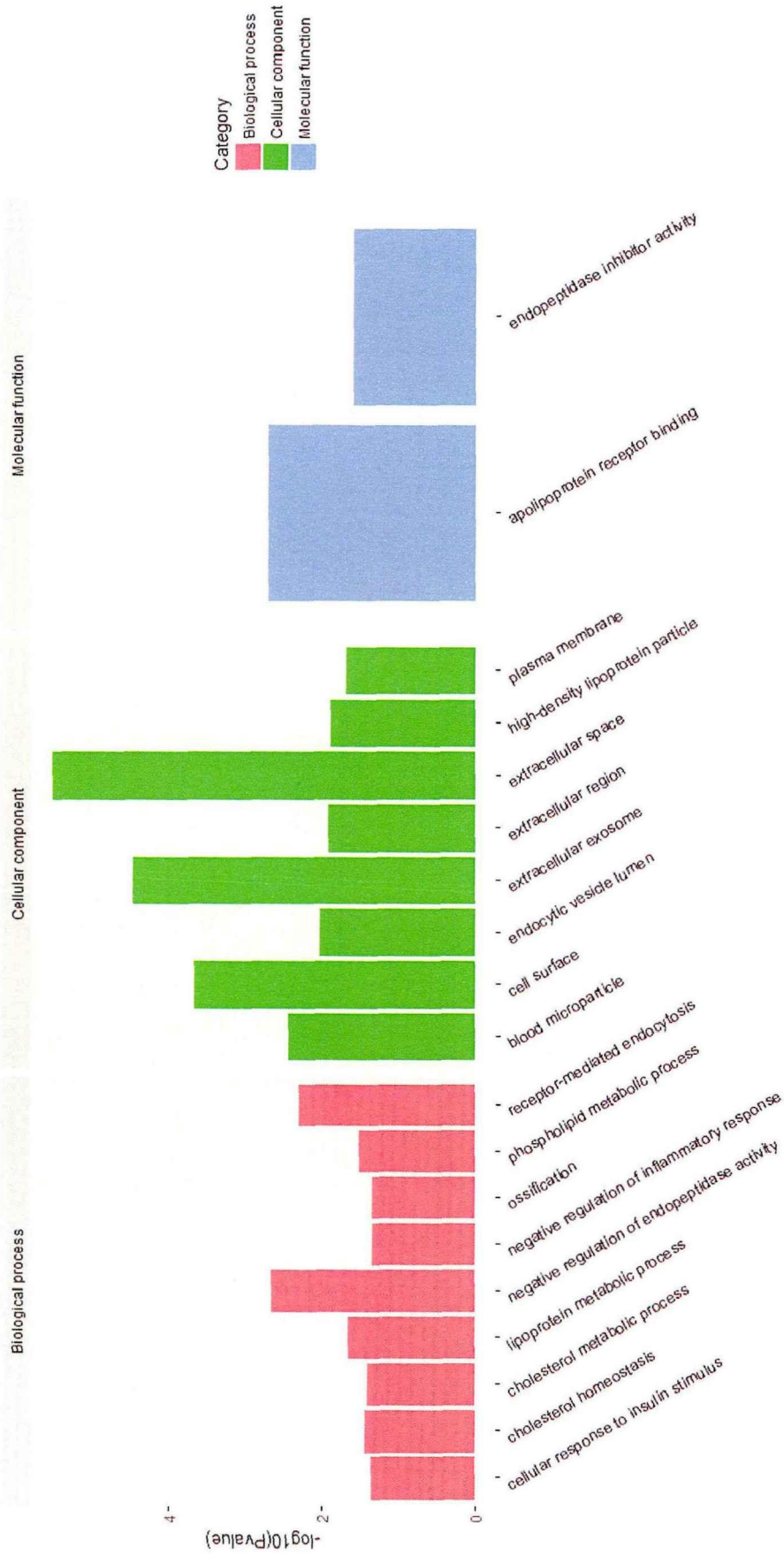


图 2 年轻供者-老年受者组血清蛋白质组差异蛋白 GO 分析

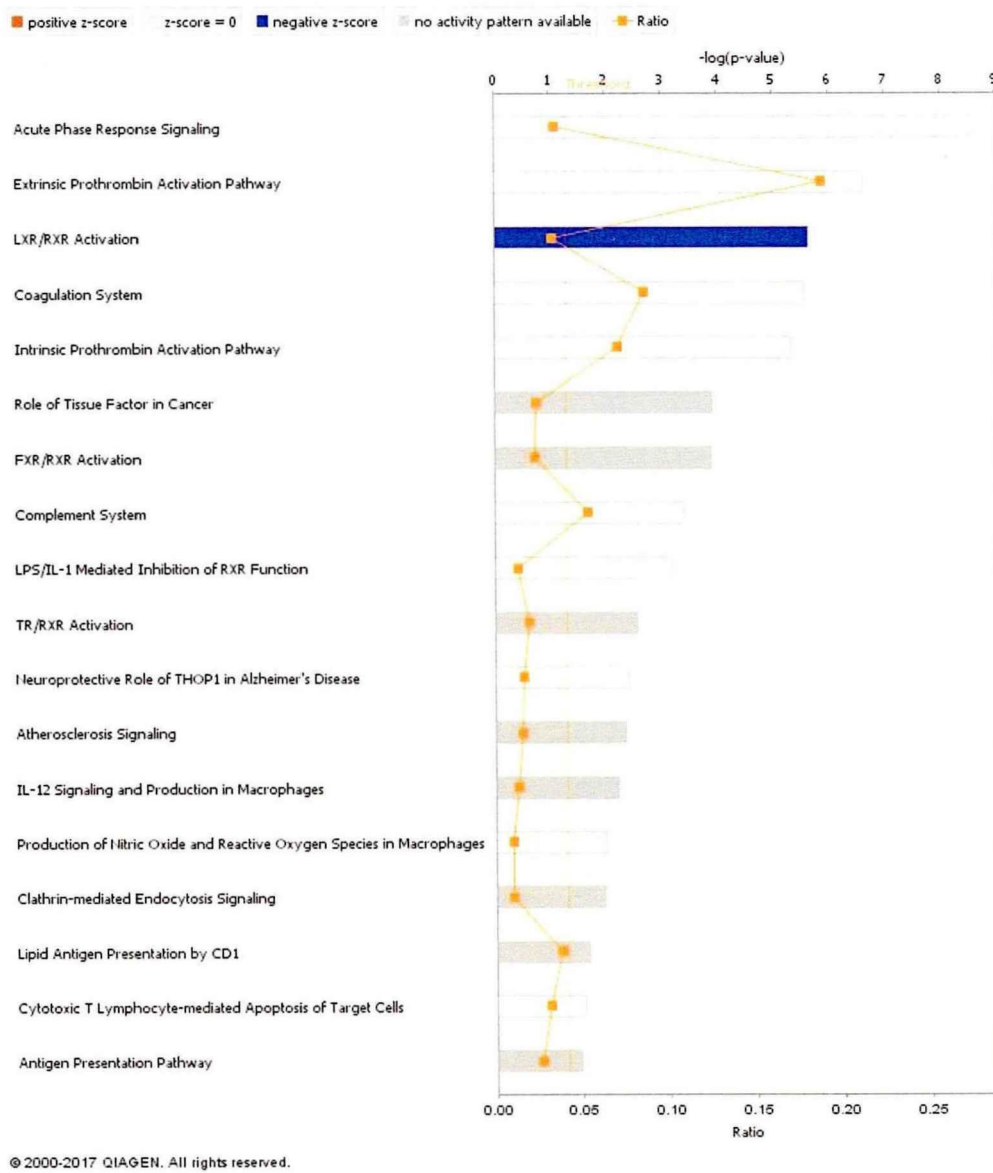
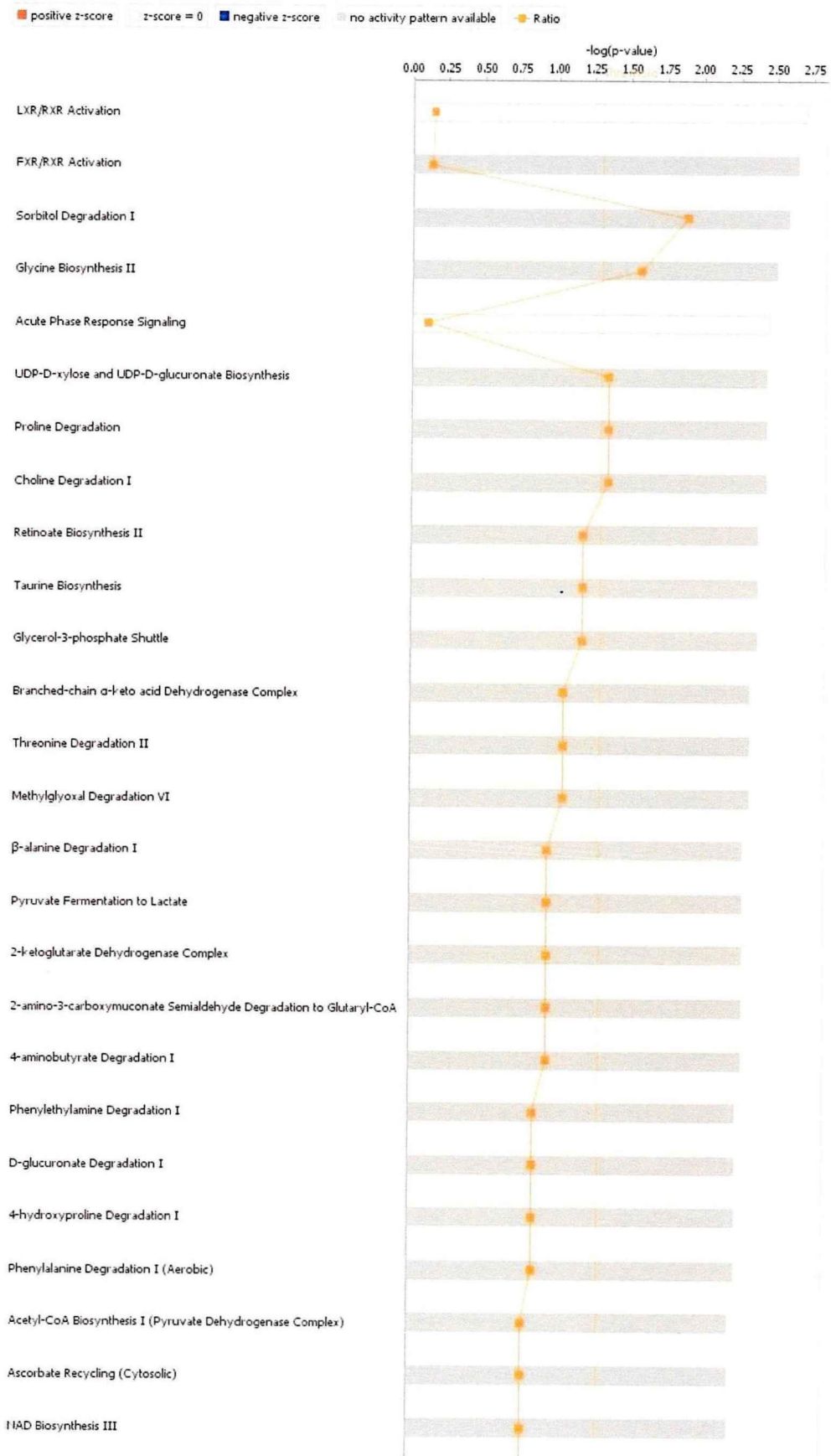
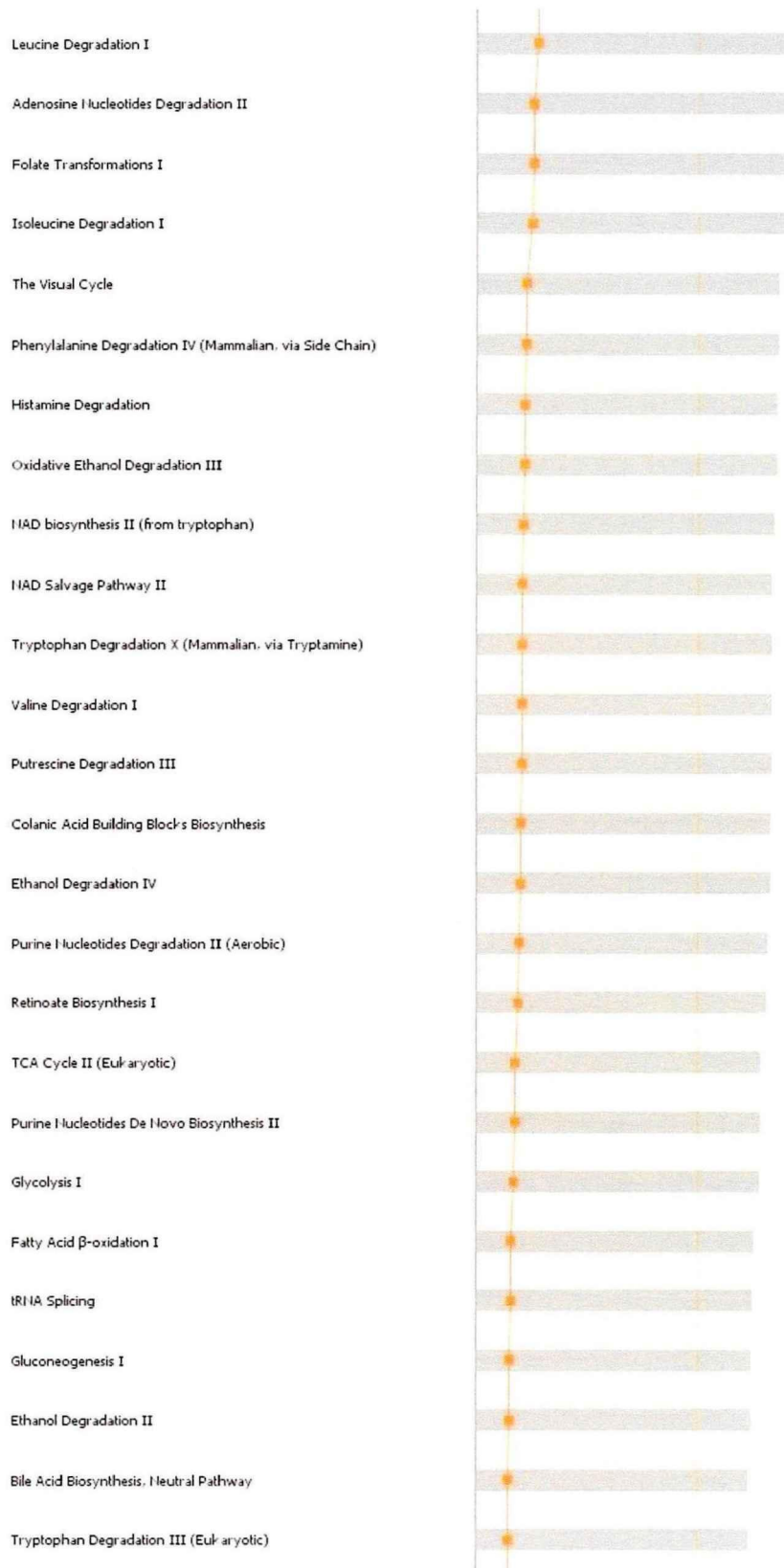


图 3 老年供者-年轻受者组血蛋白质组差异蛋白通路分析







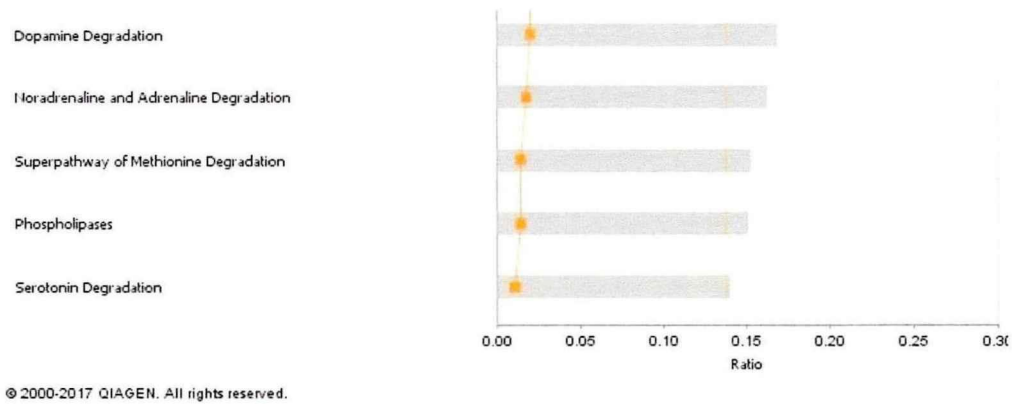


图 4 年轻供者-老年受者组血蛋白质组差异蛋白通路分析

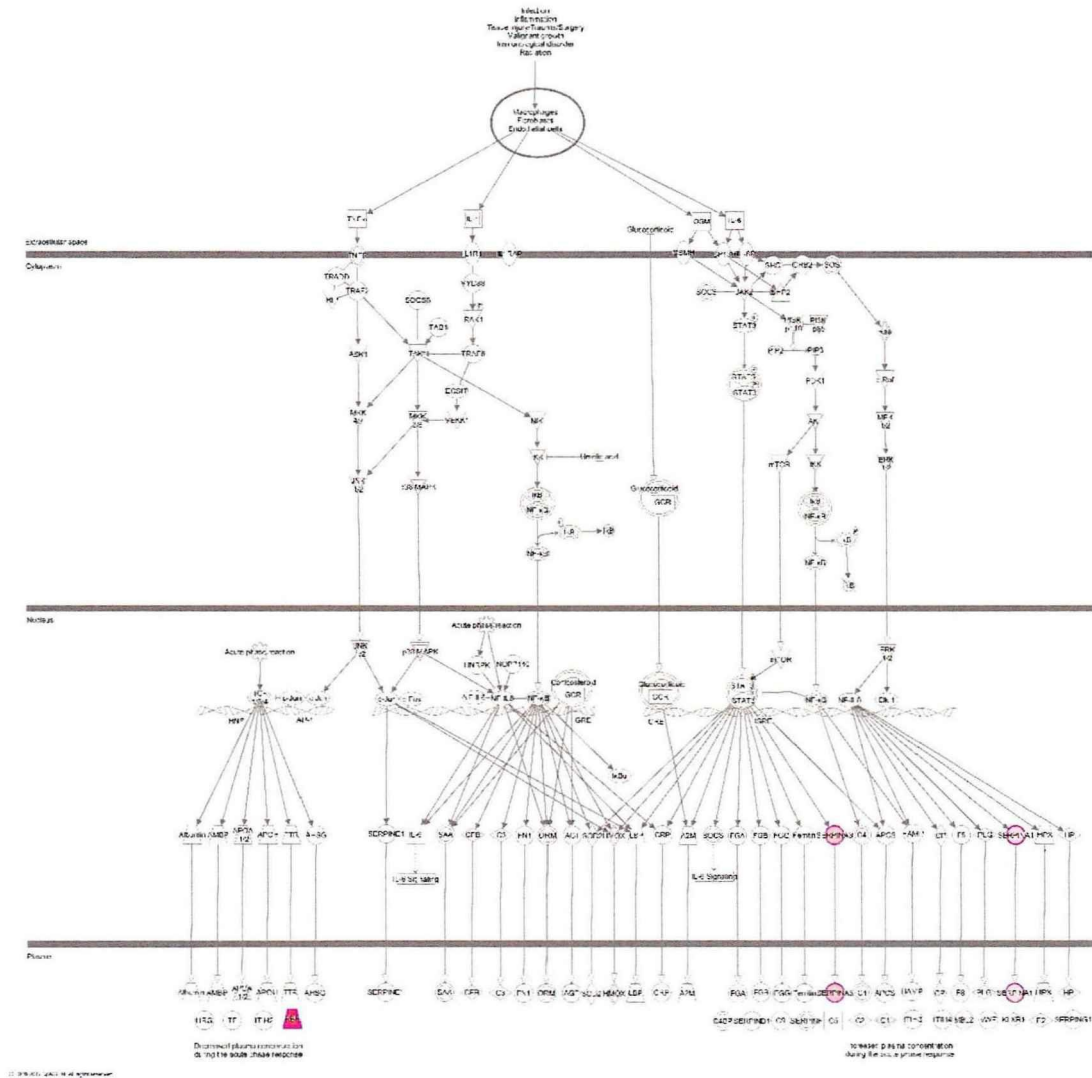


图 5 Acute Phase Response Signaling 通路

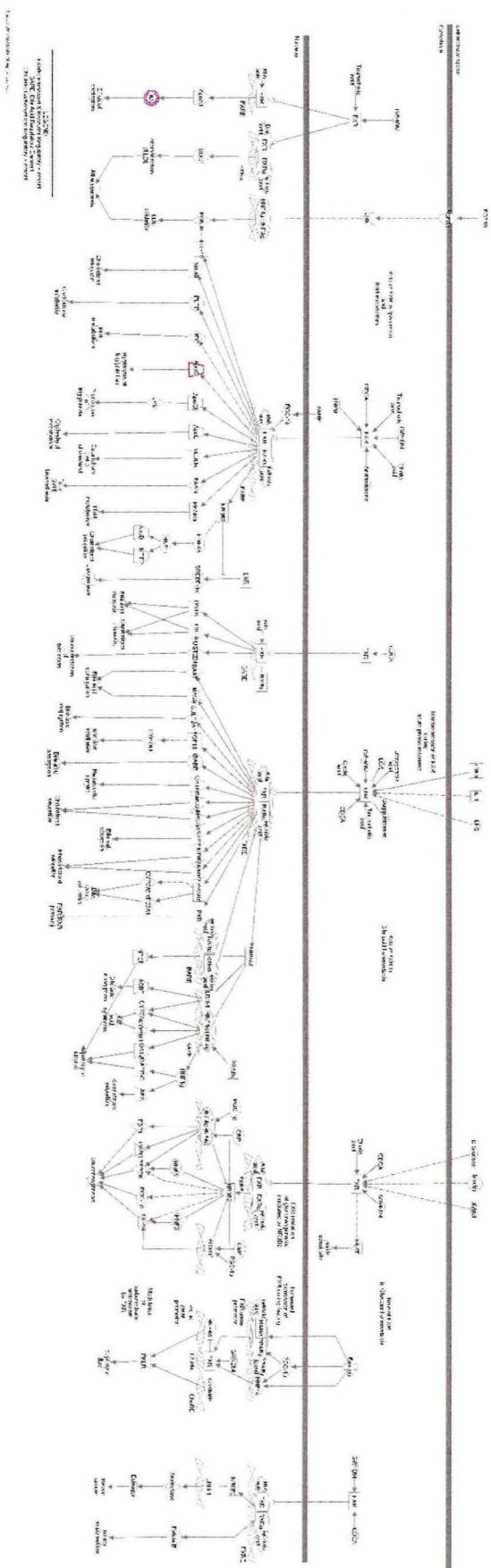


图 6 FXRRXR Activation 通路

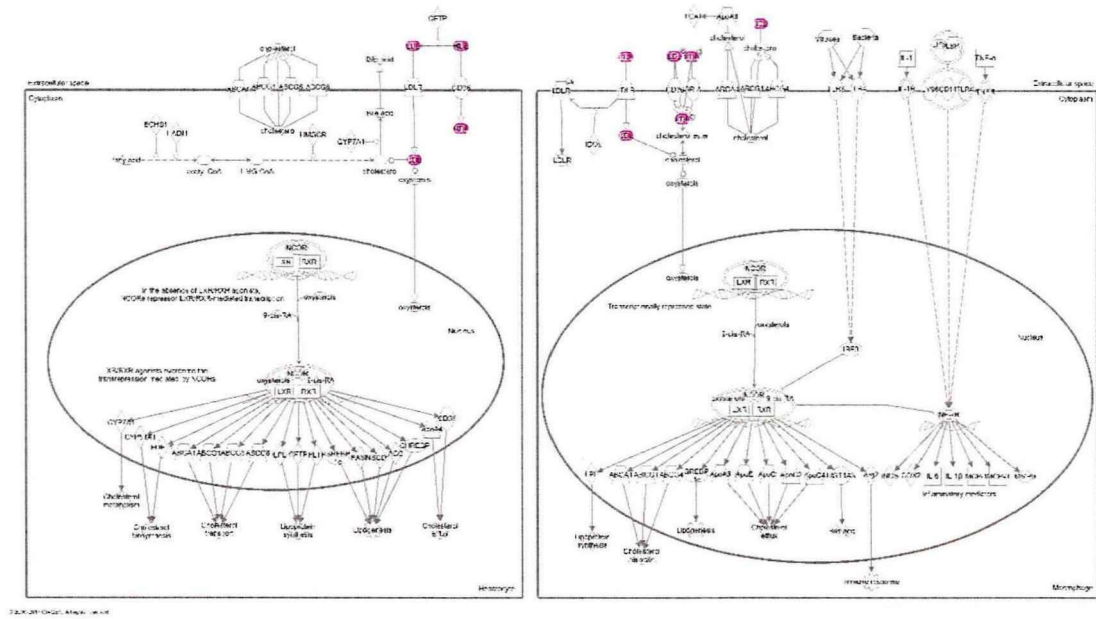


图 7 LXRRXR Activation 通路

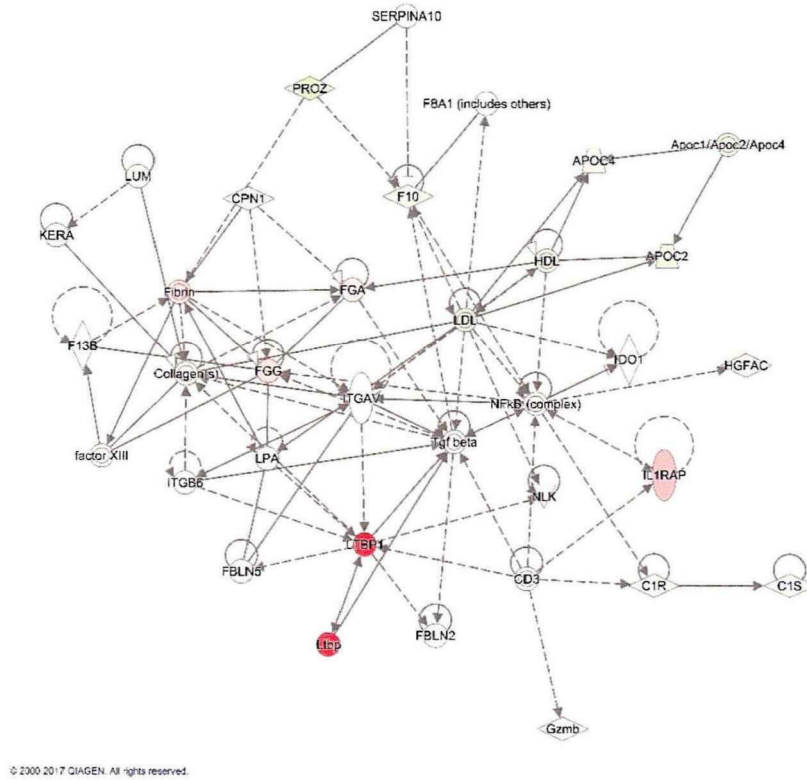


图 8 老年供者-年轻受者组血蛋白质组差异蛋白互相作用网络

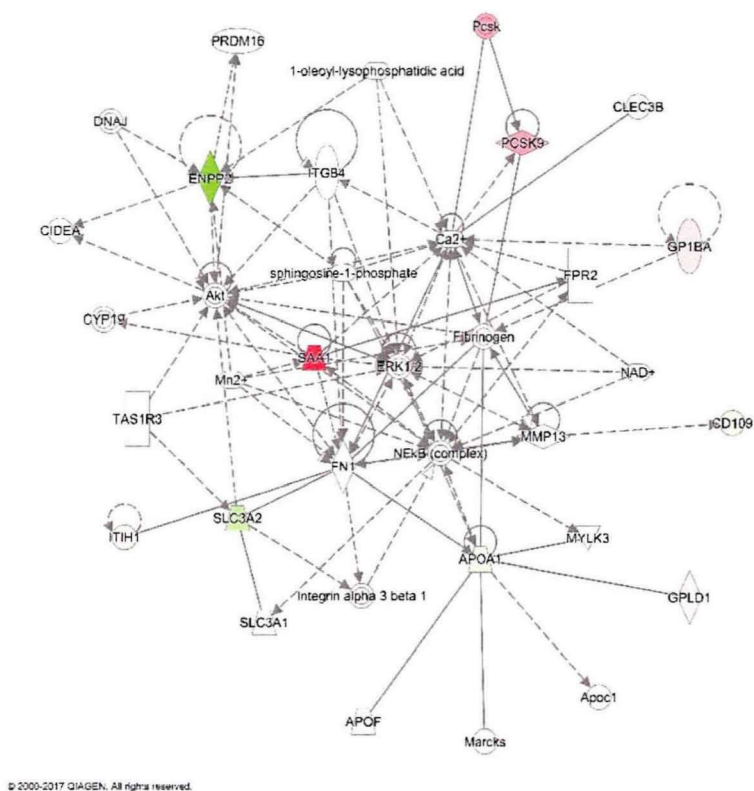


图 9 年轻供者-老年受者组血蛋白质组差异蛋白互相作用网络

2.5 讨论

课题主要研究目的为受者内环境的衰老程度对移植肾功能的影响。我们将个体的一个肾脏置入相对老年或年轻的机体内，与处于原本机体内的另一个肾脏进行对比。即检测在不同的衰老程度的内环境中的原本发育相同的两个肾脏之间的功能差异，并探寻其功能差异的可能原因。由研究背景及研究第一部分可得，机体内环境可能改变移植肾肾脏的衰老速度，年轻的内环境延缓移植肾功能衰退，而老年的内环境加速移植肾功能衰退。因此我们选择使用蛋白质组学技术进行进一步研究。我们分别检测了供受者的血清蛋白质组及尿液蛋白质组并在供受者之间进行对比，筛选差异蛋白。其中，入组患者的年龄差异可导致内环境改变，这种内环境改变受到衰老的调节，并可引起血浆蛋白组的变化；而尿蛋白质组的差异则提示了肾脏的代谢变化。然后应用 GO 数据库对差异蛋白的生物学过程、分子功能及细胞定位进行分析，并通过 IPA 数据库查阅差异蛋白所处的生物学通路。

首先,我们分析了两组供受者的血蛋白质组,结果提示所有的差异蛋白均在老年个体中表达较高,主要来源于老年供者及老年受者。我们推测这些差异蛋白主要反映了老年内环境与年轻内环境之间的差异,而与是否接受肾移植术无关。因此,这些差异蛋白的特点的共同点应该同机体的生理性衰老过程有关。

我们在两组差异蛋白列表中发现了一个共同蛋白: SLC3A2, 又名 CD98hc (CD98 heavy chain)。该蛋白可作为胱氨酸/谷氨酰胺交换二聚体 (CD98, 又名 XC 系统) 的重链部分, 参与细胞氨基酸代谢及整合素的信号调节。CD98 分别由 SLC3A2 和作为轻链的 SLC3A11 组成^[51]。CD98 的轻链主要负责调节氨基酸的跨膜转运^[52], 且轻链的表达依赖于重链的表达调控, 但重链的表达却不受轻链影响^[53]。作为胱氨酸/谷氨酰胺交换二聚体, CD98 将胱氨酸转入细胞内, 成为谷胱甘肽的合成原料, 因此 CD98 的表达对细胞内谷胱甘肽合成有显著影响^[51]。而谷胱甘肽是细胞内主要的抗氧化物质, 可以拮抗线粒体产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及类似 ROS 的亲电子体^[54], 而 ROS 攻击脂质及 DNA 是细胞衰老的机制之一^[55]。除此之外, CD98 还可以通过其重链(SLC3A2)传导整合素信号, 激活 Rac, FAK 及 Akt, 促进细胞增殖及迁移, 并且通过 Akt 在整合素信号通路中的磷酸化作用影响细胞凋亡^[56, 57]。CD98 的功能需 SLC3A2 的结构域参与, 其细胞外域与 CD98 轻链互相作用转运氨基酸, 而细胞膜内及胞浆域则负责传导整合素信号^[58]。SLC3A2 同时是两组的差异蛋白, 并均在老年个体血清中表达较高。我们推测这种表达差异与机体内环境衰老有关, 而 SLC3A2 在机体内的表达或许与体细胞衰老有密切关系。

此外, 载脂蛋白家族中的数个蛋白均在两组差异蛋白中被筛出: APOA1 在老年受者的血清中表达升高, 而 APOC2 及 APOC4 则在老年供者血清中表达升高。这三个蛋白均参与两组间的共同生物学通路。考虑到个体差异, 我们推测该家族蛋白在老年个体内表达相对增高, 活性相对增强。载脂蛋白的主要生物学效应包括: 脂质的结合及转运、脂蛋白结构稳定、脂蛋白代谢调节、识别脂蛋白受体等。载脂蛋白的表达异常可导致血脂代谢的改变^[59]。该家族蛋白在老年个体的血清中表达升高, 结合生物学通路结果, 我们推测, 老年个体的血脂代谢水平较年轻个体有改变, 这种改变可能也同机体年龄增长及内环境衰老有关。

我们对差异蛋白进行了生物信息学分析。其中，GO 分析提示，老年供者-年轻受者组与年轻供者-老年受者组中的差异蛋白均主要位于细胞外环境，或作为血液微观粒子存在，部分差异蛋白来源于细胞外泌体。细胞组分注释提示这些差异蛋白可能是从细胞中释放出来，进入细胞间液或血浆中，参与器官之间的信号调节。在生物学过程注释中，老年供者-年轻受者组的血差异蛋白参与了凝血途径、初始免疫反应、补体激活等生理学过程注释，而年轻供者-老年受者组差异蛋白中高表达的注释主要与脂质代谢及免疫反应相关。两组差异蛋白的分子功能均多作为结合蛋白和激动蛋白产生生物学作用。结合两组结果，我们认为年龄增长对血浆的凝血状态及脂蛋白代谢有重要影响，另外机体免疫系统也会随衰老而改变。

我们分析了两组差异蛋白所处的 IPA 通路并找到了三个共同通路：急性反应期信号、肝 X 受体/视黄酸受体激活和胆汁酸受体/视黄酸受体激活。尽管两组差异蛋白中只有 1 个共同差异蛋白，但同一生物学通路是由多个蛋白质组成的，其本质是蛋白质的连锁反应。某一个生物学通路的组成蛋白可能分别位于两组差异蛋白之中，但均可在该通路中产生作用。因此虽然差异蛋白各异，但它们的生物学效能是相近的。其中，与急性反应期信号相关的差异蛋白分别为老年供者-年轻受者组中的 C1R、ITIH2、C1S、FGA、IL1RAP、FGG 和年轻受者-老年供者组中的 APOA1 和 SAA1。急性反应期信号通路始自感染、炎症、组织损伤、恶性肿瘤增殖等刺激，并激活巨噬细胞、纤维原细胞及内皮细胞释放细胞因子，介导炎症反应。两组差异蛋白均位于急性反应期信号通路的末端，多为效应因子，主要涉及炎性反应中的血液浓缩调控。这提示我们老年个体与年轻个体的血液浓缩调控有差异。与肝 X 受体/视黄酸受体激活相关的差异蛋白分别为老年供者-年轻受者组中的 APOC4、APOC2、FGA、IL1RAP 和年轻受者-老年供者组中的 APOA1 和 SAA1，与胆汁酸受体/视黄酸受体激活相关的差异蛋白分别为老年供者-年轻受者组中的 APOC4、APOC2、FGA 和年轻受者-老年供者组中的 APOA1 和 SAA1。差异蛋白在肝 X 受体/视黄酸受体激活途径涉及巨噬细胞及肝细胞细胞膜 LDL（低密度脂蛋白）的转运，而在胆汁酸受体/视黄酸受体激活途径中的细胞核内胆固醇流失中起作用。视黄酸受体激活、肝 X 受体和胆汁酸受体是核受体家族的重要成员，这些核受体可以通过传导信号对基因模板的翻译进行调节来调节相关

酶类、转运蛋白及信号通路的代谢, 主要对细胞糖代谢及脂质代谢影响较大^[60]。其中, FXR 也参与胆汁酸合成, 解毒和转运, 而 LXR 则对血糖调节起重要作用^[61, 62]。此类通路 with 糖尿病及其他代谢类疾病的发病机制相关^[60]。同时, 两组差异蛋白中的载脂蛋白家族成员 (APOA1、APOC4、APOC2) 与该两个通路相关, 提示我们机体的衰老进程可能与与全身或细胞的脂质代谢、脂质转运等生理学过程有关, 并进而影响机体能量代谢, 此改变或许对器官衰老过程起促进作用。除此以外, 在老年供者-年轻受者组中, APOC4 及 APOC2 还在动脉粥样硬化信号、白介素-12 在巨噬细胞中的合成和信号转导、巨噬细胞中一氧化氮和活性氧自由基的合成、网格蛋白介导的细胞内吞作用信号等通路中起重要作用, 虽然该四个通路没有在年轻供者-老年受者组中显著表达, 但不能排除与样本误差及个体差异有关, 同时该血液蛋白组分的改变与研究第三部分尿液差异蛋白显著性表达的通路是否有关, 尚需进一步研究。

2.6 小结

年龄可影响血清蛋白质组成分, 差异蛋白与炎症反应、脂质代谢等生物学过程有关, 其中, SLC3A2 可能同内环境衰老过程有关。

第三部分 利用 LC-MS/MS 鉴定肾移植供受者尿液蛋白质组

3.1 研究目的

通过对供受者尿液进行蛋白质组分析，来反映肾脏在不同内环境中的变化。

3.2 研究材料

使用研究第二部分纳入供受者的尿液样本，取晨尿中段清洁尿液 50ml，冻入 4℃ 冰箱保存。患者资料见表 2。研究试剂、仪器及软件同 2.2.2-2.2.4

3.3 研究方法

3.3.1 尿蛋白样品的制备

1.取 50ml 尿液室温 5000g 离心 45min，弃去沉淀。

2.取 1 ml 尿液上清加入 2 ml 超速离心管中，室温 200,000 g 离心 75 分钟，弃去上清；

3.向离心管中加入 50 ul 悬浮缓冲液（50mM Tris, 250mM sucrose, pH8.5），室温放置 15 分钟，之后加入 2.5ul 1M 二硫苏糖醇（DTT），混匀 65℃加热 30 分钟；

4.向离心管中加入 200 ul 清洗缓冲液（10mM TEA, 100mM NaCl, pH 7.4），200,000 g 离心 30 分钟，弃去上清；

5.向弃去上清的离心管内加入 30 ul 消化缓冲液（50 mM NH₄HCO₃, pH 8.5），之后加入 500 ng 测序级胰酶（Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega），混匀后在 37℃孵育 4 小时消化蛋白；

6.所得肽样品用于后续的质谱分析。

3.3.2 质谱检测及数据分析

同 2.3.2-2.3.5。

3.4 结果

3.4.1 差异蛋白

在 2 组各 5 对供受者的尿样本中, 我们共鉴定出了 975 个蛋白质。我们对老年供者-年轻受者组及年轻供者-老年受者组进行了组内对比。老年供者-年轻受者组中有 12 个差异蛋白, 其中 8 个在年轻受者中表达较高, 分别是: ART3 (二磷酸腺苷核糖基转移酶 3)、CA4 (碳酸酐酶 4)、RBP4 (视黄醇结合蛋白 4)、BCAM (基底细胞黏附分子)、PRDX6 (过氧化物酶 6)、LDHB (乳酸脱氢酶 B)、SERPINA3 (丝氨酸蛋白酶抑制剂 A1) 和 SERPINA1 (丝氨酸蛋白酶抑制剂 A3); 4 个在老年供者中表达较高, 分别是: VPS4B (细胞液泡蛋白质分选因子 4B)、VTA1 (囊泡运输体 1)、BROX (Bro1 包涵域蛋白及三肽氨基肽酶 1)、TPP1 (三肽基肽酶 1)。

年轻供者-老年受者组中, 老年受者相比年轻供者, 15 个蛋白高表达于老年受者的尿液中, 分别是: AOC1 (阿米洛利敏感性胺氧化酶)、SERPINF1 (色素上皮细胞衍生因子)、ACPP (前列腺酸性磷酸酶)、SERPINA1 ($\alpha 1$ 抗胰蛋白酶)、COL18A1 (XVIII 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链)、AGT (血管紧张肽原)、FGB (纤维蛋白原 β 链)、C3 (补体 3)、SERPINA3 ($\alpha 1$ 抗胰凝乳蛋白酶)、APCS (血清淀粉样蛋白组分 P)、LBP (脂多糖结合蛋白)、HRG (富组氨酸糖蛋白)、F2 (凝血素)、C9 (补体 9)、PGA3 (胃蛋白酶 3)。13 个蛋白高表达于年轻供者的尿液中, 分别是: KRT4 (角蛋白 4)、KRT13 (角蛋白 13)、AHNAK (桥粒结合蛋白)、SERPINB3 (丝氨酸蛋白酶抑制剂 B3)、FABP5 (脂肪酸结合蛋白 5)、A2ML1 ($\alpha 2$ 巨球蛋白样蛋白 1)、SBSN (上池蛋白)、PARK7 (人帕金森病蛋白 7)、ALDOA (果糖二磷酸醛缩酶 A)、CSTB (半胱氨酸蛋白酶抑制剂 B)、ANXA1 (膜联蛋白 A1)、CRYM (晶体蛋白 μ)、PPIB (肽酰脯氨酸顺反异构酶 B)。供受者间总共 28 个差异蛋白。尿蛋白质组中差异蛋白见表 5 及表 6。

3.4.2 差异蛋白功能分析

我们对差异蛋白进行了 GO 注释分析。其中, 老年供者-年轻受者组中, 尿蛋白质组的差异蛋白的细胞组分注释主要为细胞外分泌体 (ART3, RBP4, LDHB, PRDX6,

TPP1, VTA1, VPS4B, SERPINA3, BROX, CA4, BCAM, SERPINA1 等)、细胞外环境 (RBP4, PRDX6, SERPINA3, SERPINA1) 等。生理过程注释主要包括急性期反应 (SERPINA3, SERPINA1)、ESCRT III 复合体解聚 (VTA1, VPS4B)、病毒生命周期 (VTA1, VPS4B) 等。分子功能注释主要为蛋白结合作用 (RBP4, LDHB, PRDX6, TPP1, VTA1, VPS4B, SERPINA3, CA4, BCAM, SERPINA1) 及蛋白质 C 端结合 (VTA1, VPS4B, BCAM)。而在年轻供者-老年受者组中, 尿蛋白质组的差异蛋白的细胞组分注释主要为细胞外分泌体 (ALDOA, C9, C3, FGB, AGT, SBSN, SERPINA3, PGA3, HRG, SERPINA1, LBP, AHNAK, COL18A1, APCS, ANXA1, KRT13, A2ML1, PARK7, ACPP, PPIB, SERPINF1, F2, CSTB, SERPINB3, AOC1, CRYM, FABP5)、细胞外空间 (ALDOA, COL18A1, APCS, C3, ANXA1, A2ML1, ACPP, SERPINF1, FGB, AGT, F2, SERPINA3, CSTB, SERPINA1, LBP, SERPINB3, AOC1)、细胞外区域 (ALDOA, COL18A1, APCS, C9, C3, ANXA1, A2ML1, SERPINF1, FGB, AGT, F2, SERPINA3, HRG, SERPINA1, LBP)、血液微观粒子 (C9, APCS, FGB, C3, AGT, F2, SERPINA3, HRG)、血小板 α 颗粒内腔 (ALDOA, FGB, SERPINA3, HRG, SERPINA1) 等。生物过程注释主要包括肽链内切酶的负性调节 (SERPINF1, C3, AGT, SERPINA3, CSTB, HRG, SERPINA1, SERPINB3, A2ML1)、急性期反应 (APCS, F2, SERPINA3, SERPINA1, LBP)、血小板脱颗粒 (ALDOA, FGB, SERPINA3, HRG, SERPINA1)、蛋白质水解作用的负调节 (F2, CSTB, SERPINB3)、凝血过程 (FGB, F2, HRG)、血管生成的负调节血小板激活 (SERPINF1, AGT, HRG)、炎症应答反应 (C3, ANXA1, SERPINA3, PARK7)、初始免疫应答 (APCS, FGB, ANXA1, LBP) 等。分子功能注释主要为丝氨酸样肽链内切酶抑制剂激活 (SERPINF1, AGT, SERPINA3, HRG, SERPINA1, SERPINB3, A2ML1)、受体结合 (FGB, C3, F2, ANXA1, HRG, LBP, PARK7)、结构分子激活 (COL18A1, FGB, ANXA1, KRT13, KRT4)、同一蛋白结合 (ALDOA, COL18A1, SERPINA1, PARK7, ACPP) 等。尿蛋白质组差异蛋白 GO 分析见图 10、11。

3.4.3 差异蛋白通路分析

我们使用了 IPA 通路数据库对差异蛋白进行生物通路进行了分析，在老年供者-年轻受者组中，尿蛋白质组差异蛋白主要参与的生物学通路包括：急性期反应信号传导、肝 X 受体/视黄酸受体激活、胆汁酸受体/视黄酸受体激活、凝血系统、内源性凝血酶原激活途径、外源性凝血酶原激活途径、补体系统、肝纤维化/肝星状细胞激活、THOP1 在阿尔兹海默病中的神经保护作用、组织因子在肿瘤中的作用、哺乳类动物蔗糖降解途径 V、动脉粥样硬化信号传导、p70S6K 激酶信号、NAD 的磷酸化和脱磷酸化、鸟嘌呤核苷酸降解途径 3、尿酸盐的生物合成/肌苷 5'磷酸的降解、戊二酰辅酶 A 的降解、帕金森病的信号传导、腺苷核苷酸降解途径 2、组胺降解、嘌呤核苷酸的需氧降解途径 II、网格蛋白介导的细胞内吞作用信号、真核生物的色氨酸降解途径 III、NAD 补救途径 II、糖酵解、糖异生、细菌脂多糖/白介素-1 介导的视黄酸受体作用抑制及肌动蛋白细胞骨架信号转导等生物学通路。而在年轻供者-老年受者组中，尿蛋白质组差异蛋白主要参与的生物学通路包括：急性期反应信号传导、肝 X 受体/视黄酸受体激活、胆汁酸受体/视黄酸受体激活、THOP1 在阿尔兹海默病中的神经保护作用、动脉粥样硬化信号传导、白介素-12 在巨噬细胞中的合成和信号转导、丙酮酸发酵为乳酸、巨噬细胞中一氧化氮和活性氧自由基的合成、网格蛋白介导的细胞内吞作用信号、谷胱甘肽的氧化还原反应、凝血系统、三酰甘油降解、硫酸乙酰肝素的生物合成等。共六个通路同时在两组差异蛋白中共同表达：急性期反应信号，动脉粥样硬化信号转导，网格蛋白介导的细胞内吞作用信号，凝血系统，肝 X 受体/视黄酸受体激活、胆汁酸受体/视黄酸受体激活及 THOP1 在阿尔兹海默病中的神经保护作用。尿蛋白质组差异蛋白 IPA 通路分析见图 12、13。

表 5 老年供者-年轻受者组尿蛋白质谱差异蛋白

| GI Number | name | Entry Name(UniProt) | Accession Number(UniProt) | isoelectric point | molecular weight | Protein Name | Expression |
|-----------|-------|---------------------|---------------------------|-------------------|------------------|--|------------|
| 17865802 | VPS4B | VPS4B_HUMAN | O75351 | 6.75 | 49302 | Vacuolar protein sorting-associated protein 4B | Down |
| 21361741 | VTA1 | VTA1_HUMAN | Q9NP79 | 5.86 | 33879 | Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog | Down |
| 124244088 | BROX | BROX_HUMAN | Q5VW32 | 7.55 | 46476 | BRO1 domain-containing protein BROX | Down |
| 5729770 | TPP1 | TPP1_HUMAN | O14773 | 6.01 | 61247 | Tripeptidyl-peptidase 1 | Down |
| 194097380 | ART3 | NAR3_HUMAN | Q13508 | 5.71 | 43923 | Ecto-ADP-ribosyltransferase 3 | Up |
| 4502519 | CA4 | CAH4_HUMAN | P22748 | 7.68 | 35032 | Carbonic anhydrase 4 | Up |
| 55743122 | RBP4 | RET4_HUMAN | P02753 | 5.76 | 23010 | Retinol-binding protein 4 | Up |
| 31543106 | BCAM | BCAM_HUMAN | P50895 | 5.53 | 67404 | Basal cell adhesion molecule | Up |
| 4758638 | PRDX6 | PRDX6_HUMAN | P30041 | 6 | 25034 | Peroxiredoxin-6 | Up |

| | | | | | | | |
|-----------|--------------|----------------|--------|------|-------|---------------------------------|----|
| 291575128 | LDHB | LDHB_HUMA N | P07195 | 5.71 | 36638 | L-lactate dehydrogenase B chain | Up |
| 50659080 | SERPINA 3 | AACT_HUMA N | P01011 | 5.33 | 47650 | Alpha-1-antitrypsin | Up |
| 189163542 | SERPINA 1 | AIAT_HUMA N | P01009 | 5.37 | 46736 | Alpha-1-antitrypsin | Up |

表 6 年轻供者-老年受者组尿蛋白质组差异蛋白

| GI Number | name | Entry Name(UniProt) | Accession Number(UniProt) | isoele ctric point | molecu lar weight | Protein Name | Expressio n |
|-----------|--------------|------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|--|----------------|
| 331999954 | KRT4 | B4DRS2_HUM AN | B4DRS2 | 6.25 | 56013 | keratin, type II cytoskeletal 4 | Down |
| 131412225 | KRT13 | K1C13_HUMA N | P13646 | 4.91 | 49427 | Keratin, type I cytoskeletal 13 | Down |
| 61743954 | AHNAK | AHNAK_HUMA N | Q09666 | 5.8 | 628973 | Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK | Down |
| 5902072 | SERPINA 3 | SPB3_HUMAN | P29508 | 6.35 | 44434 | Serpina3 | Down |
| 4557581 | FABP5 | FABP5_HUMA N | Q01469 | 6.59 | 15033 | Fatty acid-binding protein, epidermal | Down |
| 74271845 | A2ML1 | B3KVV6_HUM AN | B3KVV6 | 5.51 | 161139 | alpha-2-macroglobulin-like protein 1 isoform 1 precursor | Down |

| | | | | | | | |
|-----------|----------|-----------------|--------|------|-------|---|------|
| 260436922 | SBSN | SBSN_HUMA N | Q6UWP8 | 6.5 | 60540 | suprabasin isoform 1 precursor | Down |
| 183227678 | PARK7 | PARK7_HUM AN | Q99497 | 6.32 | 19891 | Protein/nucleic acid deglycase DJ-1 | Down |
| 193794814 | ALDOA | ALDOA_HUM AN | P04075 | 8.3 | 39420 | Fructose-bisphosphate aldolase A | Down |
| 4503117 | CSTB | CYTB_HUMA N | P04080 | 6.96 | 11139 | Cystatin-B | Down |
| 4502101 | ANXA1 | ANXA1_HUM AN | P04083 | 6.57 | 38714 | Annexin A1 | Down |
| 4503065 | CRYM | CRYM_HUMA N | Q14894 | 5.06 | 33775 | Ketimine reductase mu-crystallin | Down |
| 4758950 | PPIB | PPIB_HUMAN | P23284 | 9.42 | 23742 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B | Down |
| 440918691 | AOCI | AOCI_HUMA N | P19801 | 6.68 | 87238 | amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing] isoform 1 precursor | Up |
| 39725934 | SERPINF1 | PEDF_HUMA N | P36955 | 5.97 | 46312 | Pigment epithelium-derived factor | Up |
| 197116348 | ACPP | PPAP_HUMAN | P15309 | 6.54 | 48336 | Prostatic acid phosphatase | Up |
| 189163542 | SERPINA1 | AIAT_HUMA N | P01009 | 5.37 | 46736 | Alpha-1-antitrypsin | Up |

| | | | | | | | |
|-----------|--------------|-----------------|--------|------|--------|------------------------------------|----|
| 110611235 | COL18A1 | CO1A1_HUMA N | P39060 | 5.45 | 153766 | Collagen alpha-1(XVIIII) chain | Up |
| 4557287 | AGT | ANGT_HUMA N | P01019 | 5.87 | 53154 | Angiotensinogen | Up |
| 70906435 | FGB | FIBB_HUMAN | P02675 | 8.54 | 55928 | Fibrinogen beta chain | Up |
| 115298678 | C3 | CO3_HUMAN | P01024 | 6.02 | 187148 | Complement C3 | Up |
| 50659080 | SERPINA 3 | AACT_HUMA N | P01011 | 5.33 | 47650 | Alpha-1-antichymotrypsin | Up |
| 4502133 | APCS | SAMP_HUMA N | P02743 | 6.1 | 25387 | Serum amyloid P-component | Up |
| 31652249 | LBP | LBP_HUMAN | P18428 | 6.23 | 53383 | Lipopolysaccharide-binding protein | Up |
| 4504489 | HRG | HRG_HUMAN | P04196 | 7.09 | 59578 | Histidine-rich glycoprotein | Up |
| 4503635 | F2 | THIRB_HUMA N | P00734 | 5.63 | 70036 | Prothrombin | Up |
| 4502511 | C9 | CO9_HUMAN | P02748 | 5.43 | 63173 | Complement component C9 | Up |
| 119372298 | PGA3 | PEPA3_HUMA N | P0DJ08 | 4.22 | 41976 | pepsin A-3 preproprotein | Up |

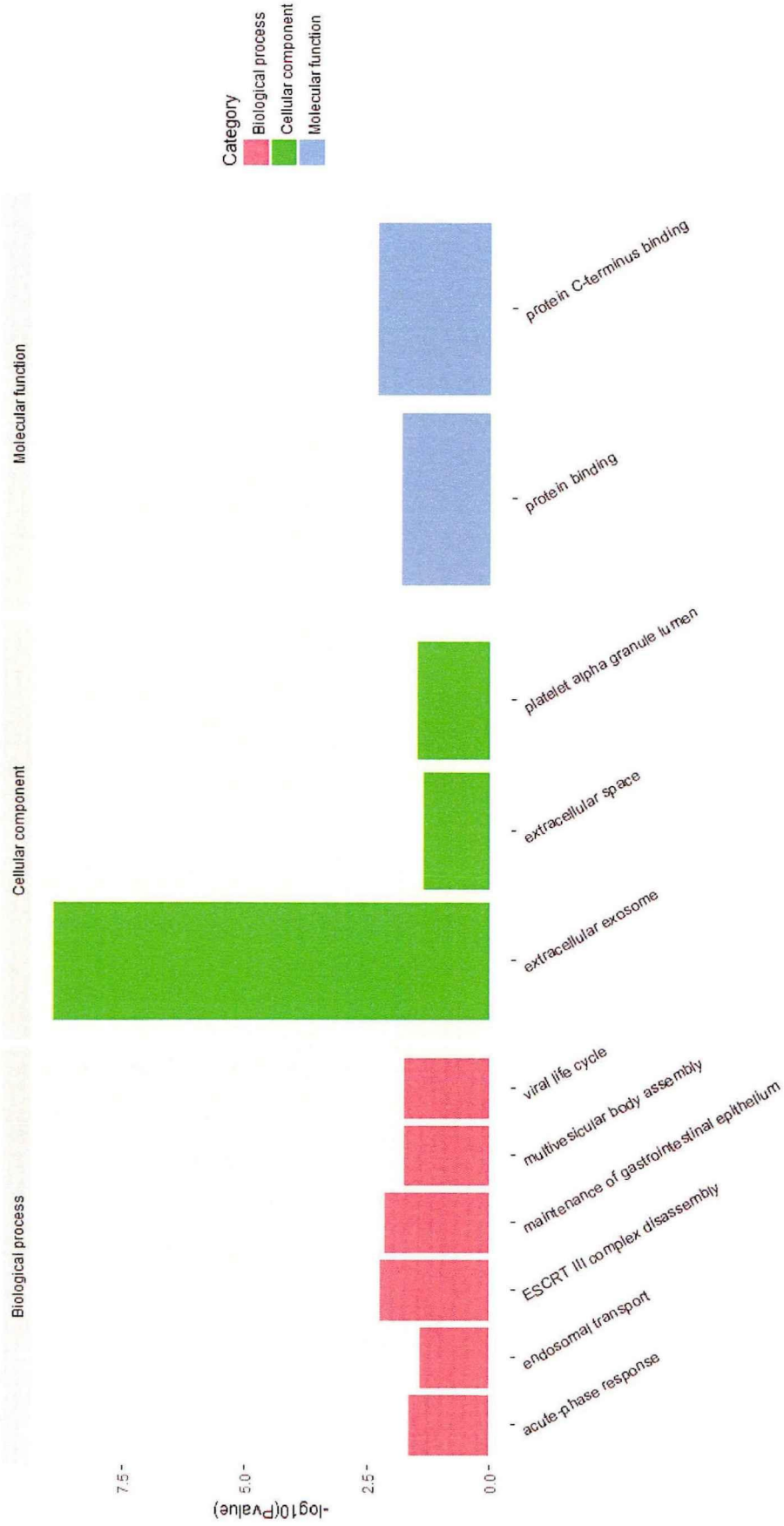


图 10 老年供者-年轻受者组尿蛋白组学差异蛋白 GO 分析

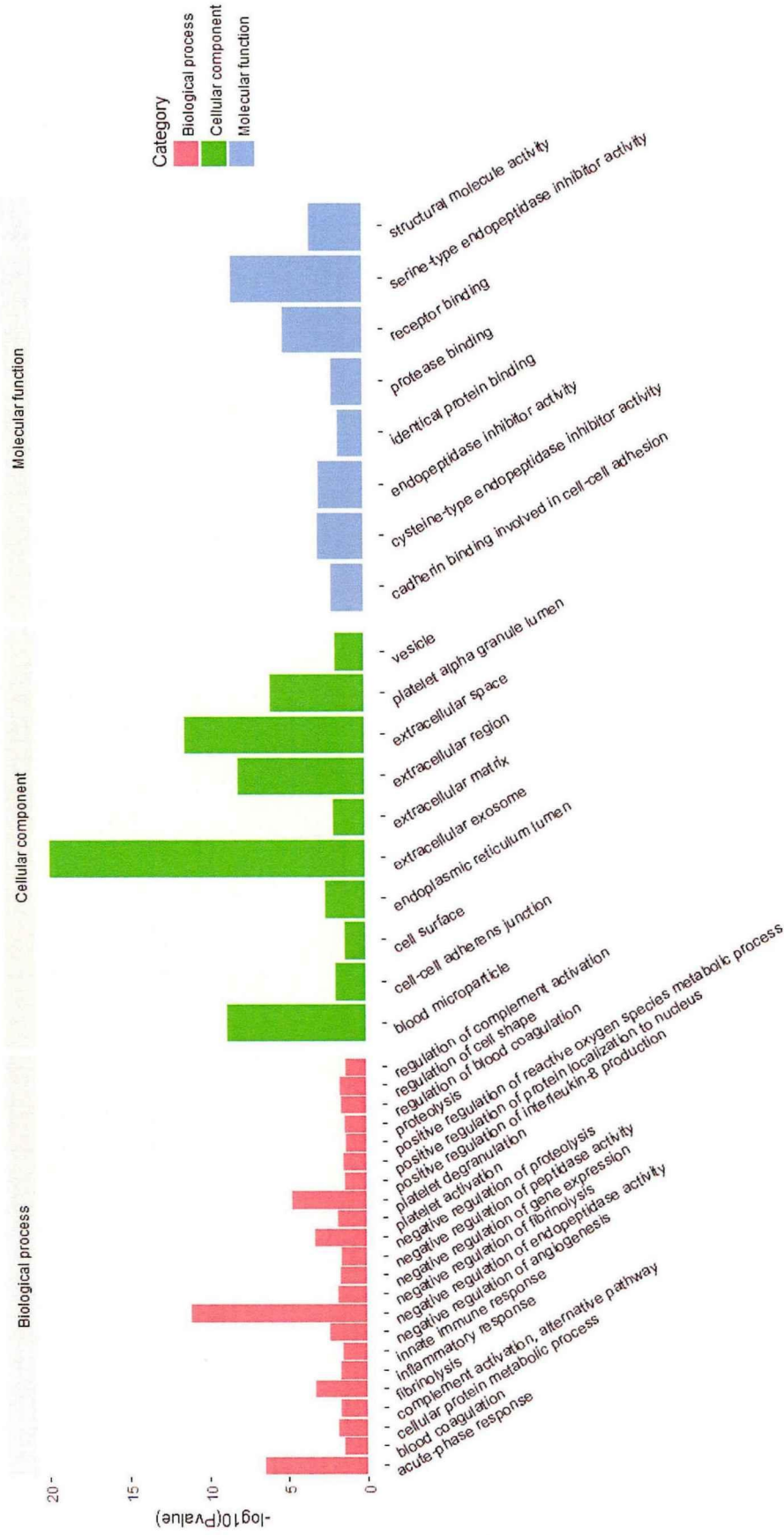


图 11 年轻供者-老年受者组尿蛋白组差异蛋白 GO 分析

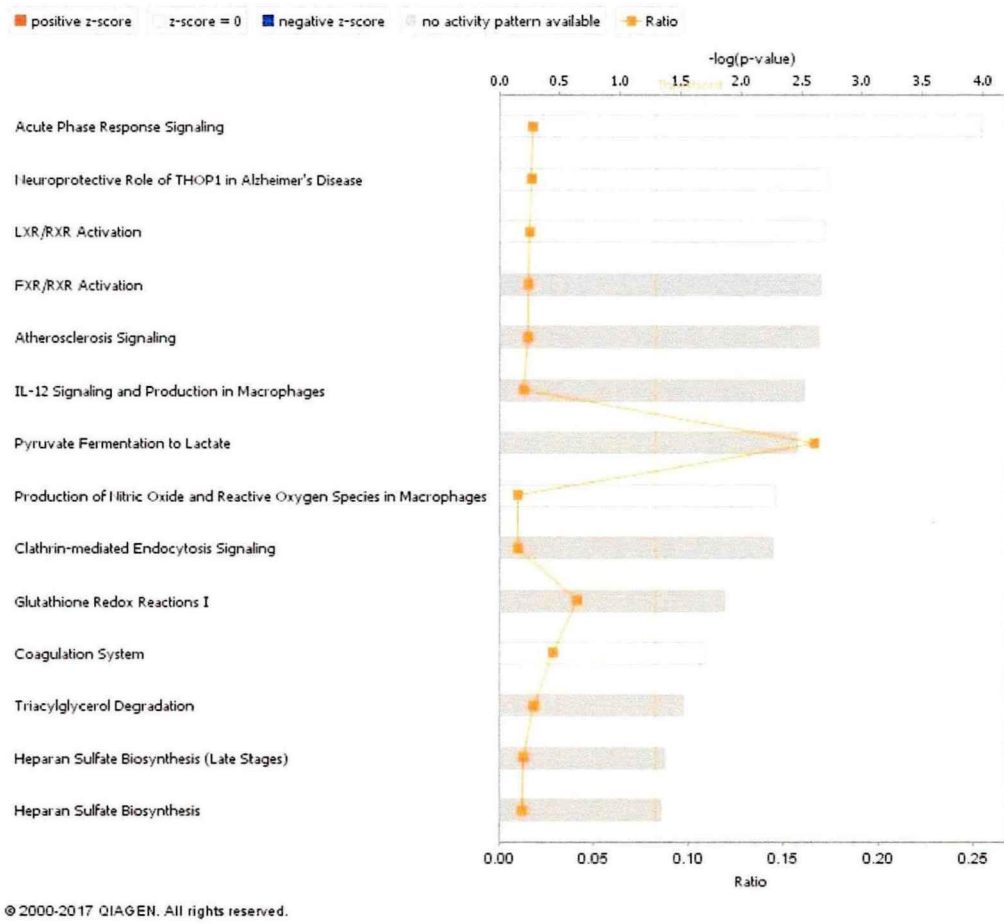


图 12 老年供者-年轻受者组尿蛋白质组差异蛋白通路分析

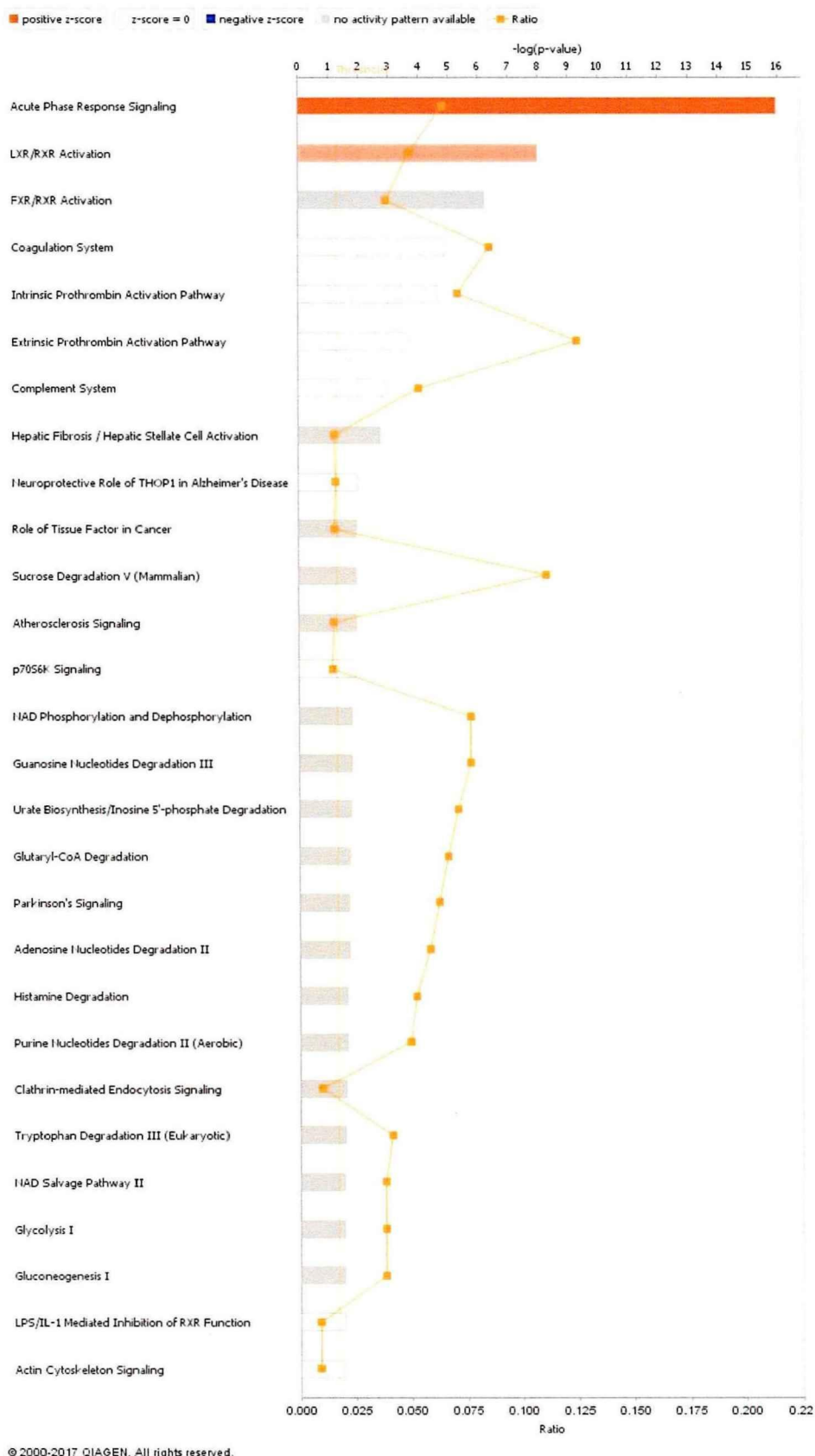


图 13 年轻供者-老年受者组尿蛋白质组差异蛋白通路分析

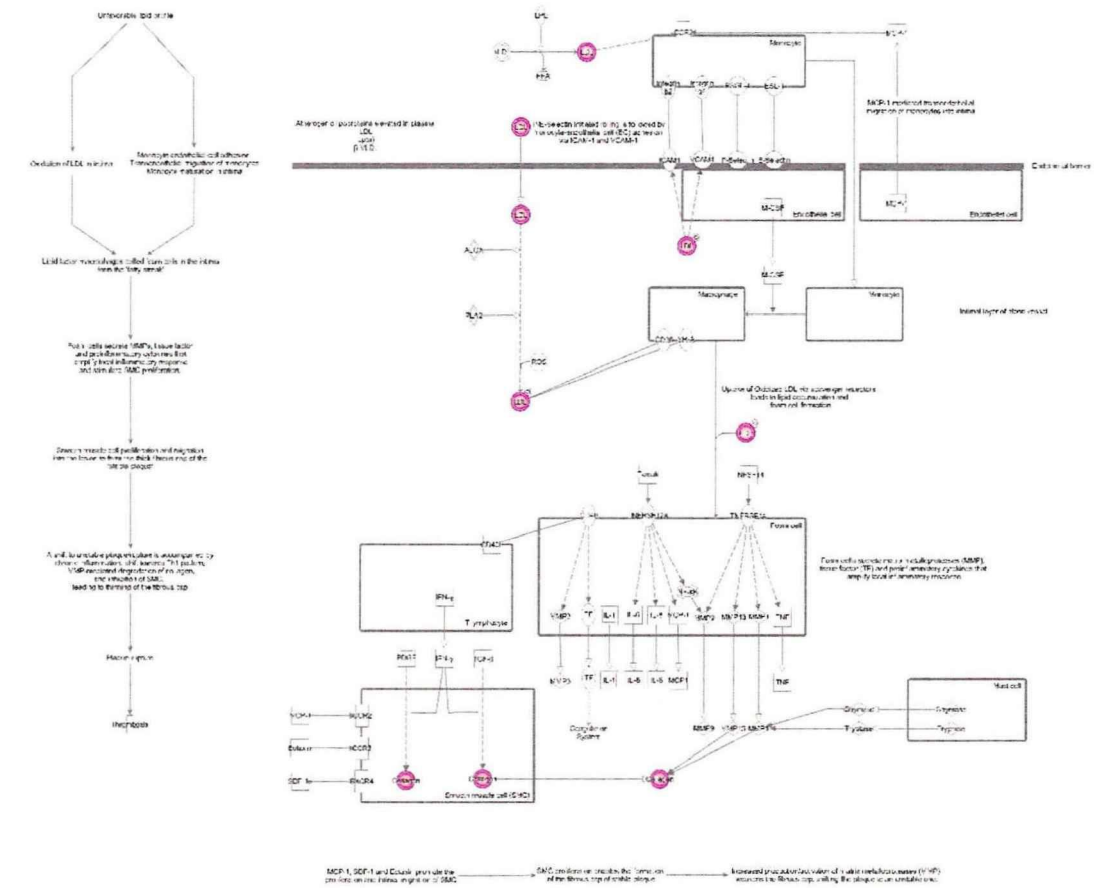


图 14 Atherosclerosis Signaling 通路

万方数据

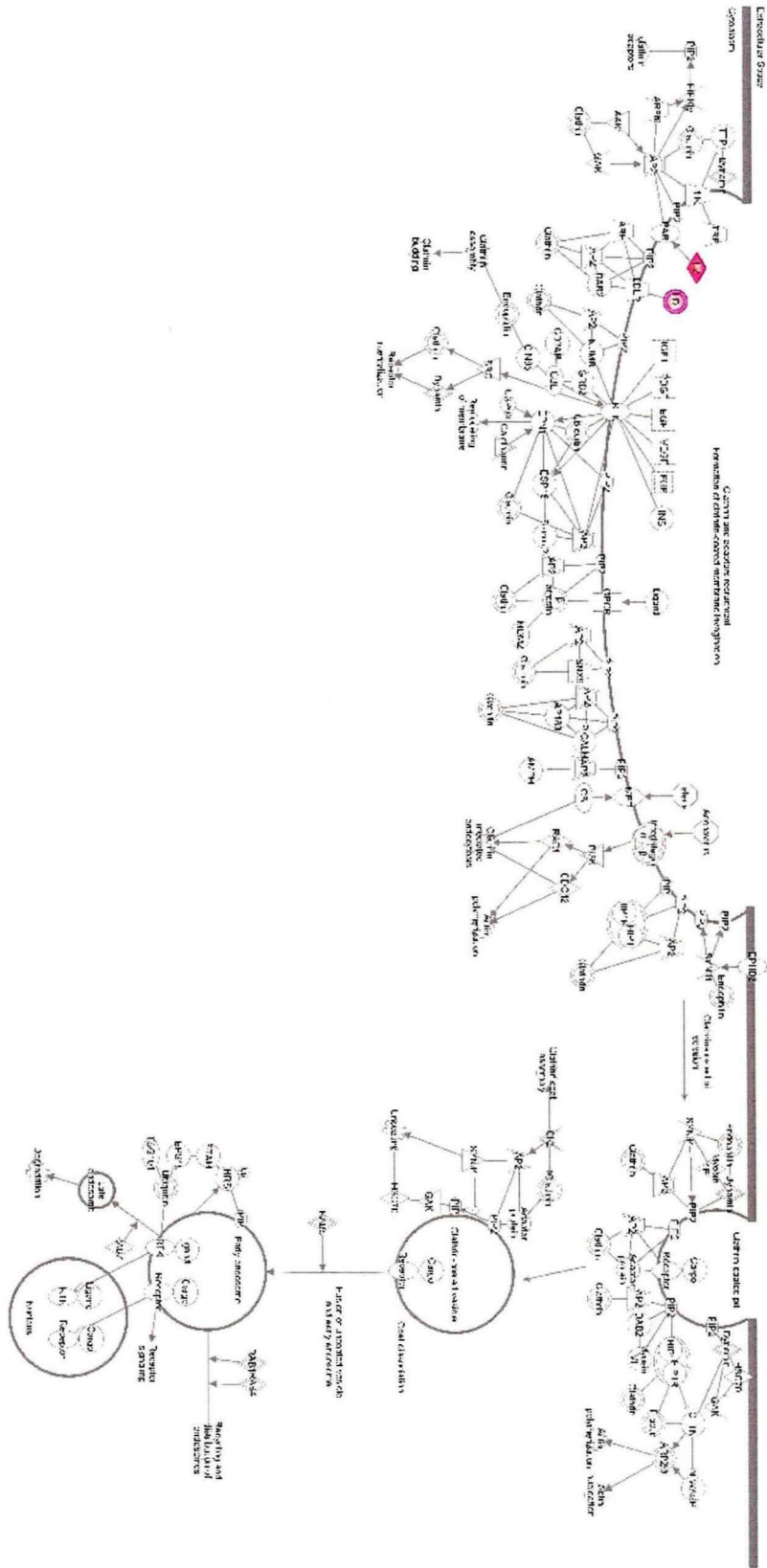
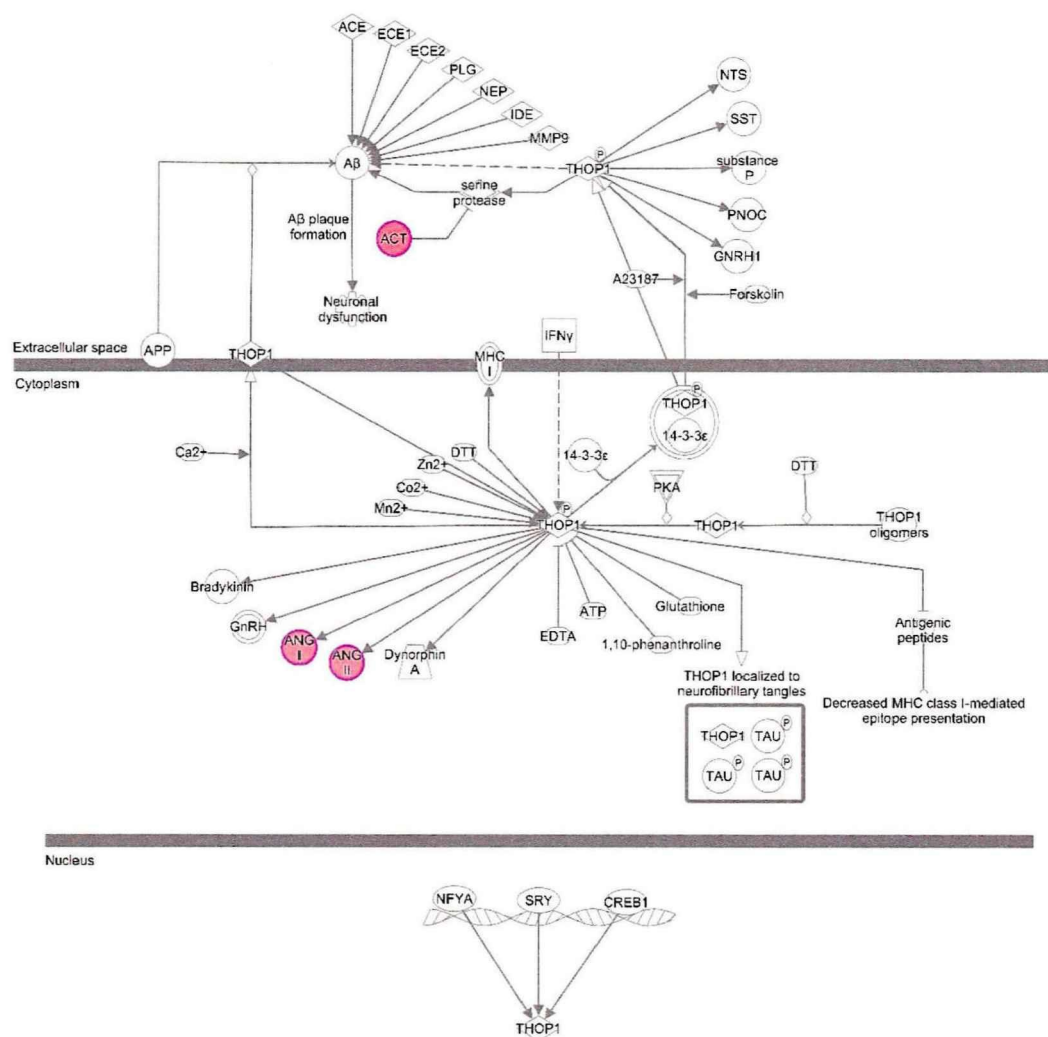
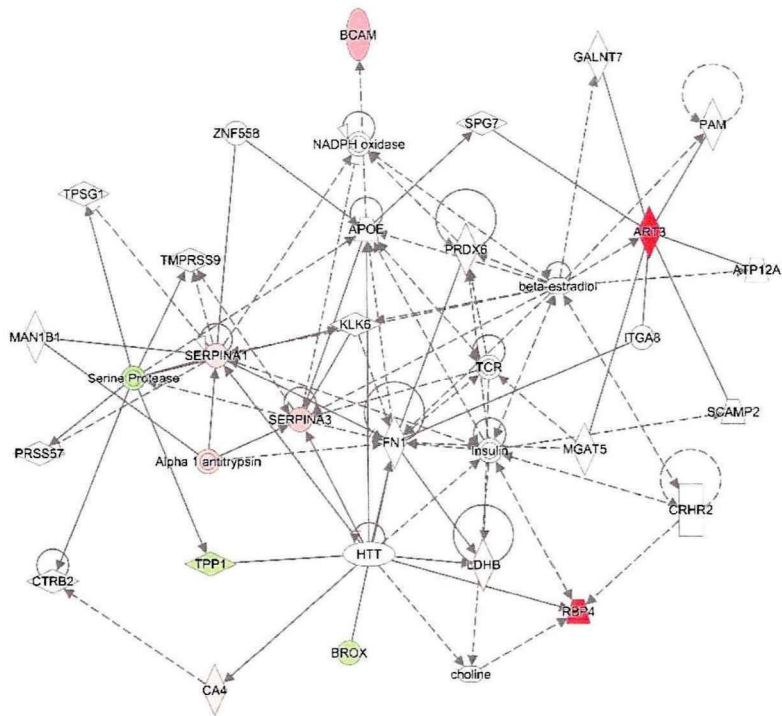


图 15 Clathrin-mediated Endocytosis Signaling 通路



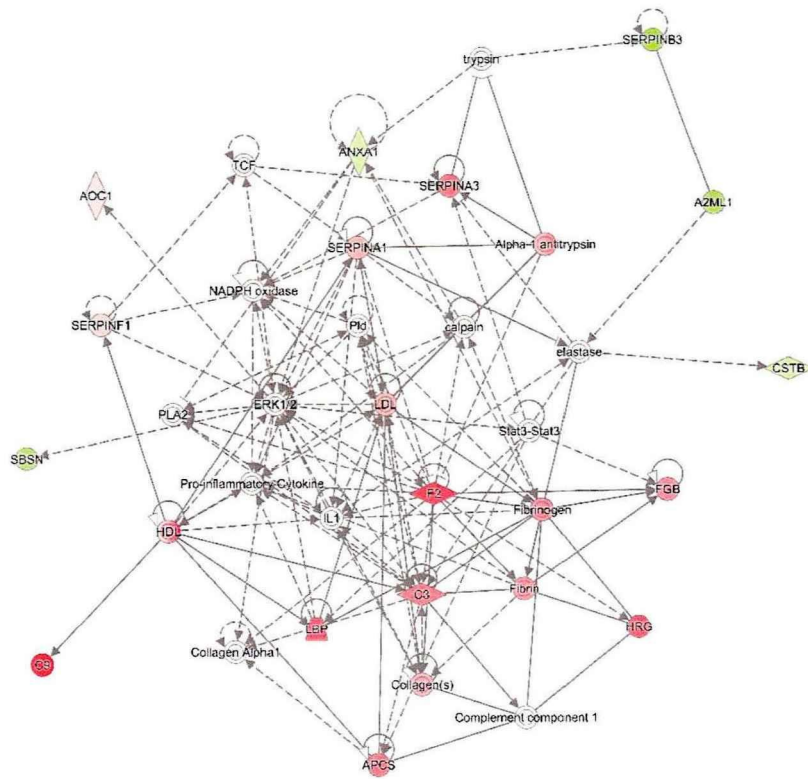
© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

图 16 Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease 通路



© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

图 17 老年供者-年轻受者组尿蛋白质组差异蛋白互相作用网络



© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

图 18 年轻供者-老年受者组尿蛋白质组差异蛋白互相作用网络

3.5 讨论

尿液中蛋白质组成可反映泌尿系统或全身性疾病的特点,由于尿液的获取具有简便、无创等优势,因而是除血浆外最常用于临床研究研究的体液之一,尿蛋白质组学的研究也逐渐受到重视^[63]。在研究第一、二部分的基础上,我们采用了类似的方法对供受者的尿液进行蛋白质组分析,通过筛查差异蛋白并同血蛋白质组差异蛋白做对比,探索机体内环境的衰老对肾脏的影响。

尿蛋白质组差异蛋白中, SERPINA1 和 SERPINA3 同时存在于两组差异蛋白中,且均在年轻受者及老年受者尿液中表达较高,说明这两个蛋白可能与接受肾移植有关联,而同机体内环境衰老关系较小。SERPINA1、SERPINA3 及其家族内的其他蛋白(如 SERPINA4 等)在肾移植术后急性排异反应的患者体液内表达异常升高的现象在国内外均有报道,并被认为可作为一种监测急性排斥反应的标记物^[17, 64-69]。SERPINA 家族蛋白是一类胰蛋白酶抑制剂,主要作用于包括丝氨酸蛋白酶在内的多种靶点^[70]。SERPINA1,中文名 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶,可作为蛋白酶抑制剂作用于包括丝氨酸蛋白酶在内的多种靶点,现已证实与多种癌症的发生机制有关^[71]。Ziegler 等^[72]的研究发现, SERPINA1 在血浆中的含量与急性排异反应有显著相关; Pisitkun 等^[17]也发现发生急性排异反应的患者尿液中 SERPINA1 含量显著高于未发生急性排异反应的肾移植患者。因此有学者认为, SERPINA1 可能通过抑制组织蛋白酶 G(一种与排异反应有关的粒细胞蛋白酶^[74])来反应急性排异反应的发生发展的程度^[65, 66]。SERPINA3,又称 $\alpha 1$ 抗胰凝乳蛋白酶,也是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,也已证实与机体免疫系统对移植物的排异反应有关,可抑制糜蛋白酶及组织蛋白 G 酶的活性^[73],并与包括凝血、补体、凋亡、创伤修复、胚胎发育等多种生理学过程有关^[70]。但是,我们纳入的患者中均无明显急性排异反应发生,但这两种蛋白均在肾移植受者尿中表达增加,此现象的意义尚待进一步研究证明。贾雄飞等^[75]等对发生急性排异反应的肾移植受者行尿蛋白质组检测时发现,急性排异反应受者尿液中, SERPINA3 前体含量明显升高,应用免疫抑制剂则可使其含量逐渐减低,其机制可能为机体为控制 CD8⁺ T 细胞的过度活化而增加了 SERPINA3 的合成及释放。O'Riordan 等^[64]分析了部分急

性排异受者及稳定受者的肾组织活检后发现，二者肾组织中总 SERPINA3 含量无显著差异，推测 SERPINA3 在尿液的升高可能是其与靶蛋白酶之间相互作用的结果，提示其靶向蛋白酶在急性排异反应受者体内活性升高；而 Ziegler 等^[72]对发生急性排异反应的肾移植患者治疗前后的血浆组分研究发现：SERPINA3 的 C 端片段对监测排异反应的发生有 100%的敏感性及 94%的特异性。尽管本研究中我们所纳入的肾移植受者的移植肾功能均在正常范围内，未发生临床排异反应，但 SERPINA3 及 SERPINA1 均在受者尿液中含量较供者高。由于供者不可能发生排异反应，因此这种蛋白质含量差异提示相关靶向蛋白活性在移植肾功能正常的受者体内与健康肾脏相异，可能是肾移植受者排异反应发生的潜在的病理学基础。

我们采用同样的方法对两组尿蛋白质组差异蛋白进行了 GO 分析及 IPA 通路分析。首先，在尿蛋白质组差异蛋白的 GO 注释中，两组差异蛋白的细胞定位注释均包括细胞外泌体、细胞外空间及血小板相关位置，提示差异蛋白主要定位于细胞外环境。尿液中，细胞外环境的蛋白主要源于肾单位滤过的血浆分泌蛋白，表达相对稳定；而若尿蛋白来定位于细胞内，则多源于肾、尿道、膀胱组织表皮脱落细胞或衰老或者损伤导致的蛋白质外释放，这些蛋白相对而言表达较为不稳定^[76]。生理过程注释中，老年供者-年轻受者组差异蛋白主要参与 ESCRT III 复合体解聚、多泡体的组装、急性期反应、核内体转运等生理学过程，而年轻供者-老年受者组差异蛋白主要参与肽链内切酶激活的负性调节、急性期反应、血小板解聚、纤维蛋白酶溶解及其他一些有关凝血、免疫和蛋白质水解的生理学过程。最后，两组差异蛋白的高表达分子功能注释主要为蛋白结合。同血蛋白质组结果相比，尿蛋白质组差异蛋白与血蛋白质组差异蛋白的功能及属性非常接近：例如，尿蛋白质组差异蛋白与血蛋白质组差异蛋白多为细胞外蛋白，多起结合作用，且多与凝血及免疫等生物学过程有关。这一现象提示，尿蛋白质组差异蛋白中可能有一部分蛋白是由于其相关通路在血液中被激活，因而表达较高，并经肾脏滤过后高表达于尿蛋白质组。

IPA 通路分析则也提示尿蛋白质组差异蛋白可能与血蛋白质组差异蛋白关系密切。共七个通路同时在两组差异蛋白中共同表达：急性期反应信号、动脉粥样硬化信号转导、网格蛋白介导的细胞内吞作用信号、凝血系统、肝 X 受体/视黄酸受体激活、

胆汁酸受体/视黄酸受体激活及 THOP1 在阿尔兹海默病中的神经保护作用。其中有三个通路也在血蛋白质组分析中有出现,但尿差异蛋白 IPA 分析中的显著通路均与差异蛋白 SERPINA1 及 SERPINA3 有关。结合上述分析,我们认为尿差异蛋白所激活的通路可能同肾移植有关联,而于机体的整体衰老进程的关系尚需进一步明确。除 SERPINA1 及 SERPINA3 外,急性期反应信号涉及的蛋白包括老年供者-年轻受者组的尿差异蛋白中的 RBP4,以及年轻供者-老年受者组中的 C3, APCS, C9, SERPINF1, FGB, LBP, HRG, F2, AGT 等蛋白。该通路的表达两组中最为显著。正常情况下,受者将移植器官视为外物并产生特异性免疫反应杀伤移植器官的细胞。但使用免疫抑制剂后,受者的免疫系统受抑制,无法产生正常的免疫应答,因此对移植器官产生了免疫耐受。结合临床,我们认为该通路相关蛋白的显著升高与移植肾在受者体内的生理学改变有关,可能反映了受者免疫系统与移植肾的相互作用。但我们所选择的患者均未发生临床排异反应,受者仍处于免疫抑制状态。因此该通路相关蛋白在该类患者尿液中升高的意义仍需进一步研究。肝 X 受体/视黄酸受体激活及胆汁酸受体/视黄酸受体激活涉及的蛋白包括 RBP4, C3, C9, SERPINF1, SERPINA1, LBP, AGT 等。以上三个通路的生理学作用已在研究第二部分有所描述。动脉粥样硬化信号转导包括血浆内动脉硬化相关蛋白升高、单核细胞在内皮细胞上粘附并产生 P/E 选择素、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)介导单核细胞穿过内皮细胞进入血管内膜、巨噬细胞通过清道夫受体摄取氧化 LDL 导致脂质堆积及泡沫细胞生成以及泡沫细胞分泌基质金属蛋白酶(MMP)等炎性因子放大局部炎症反应等步骤,涉及到两组差异蛋白中的 RBP4、SERPINA1 及 COL18A1。该通路在尿差异蛋白中的显著表达可能与移植肾术后动脉硬化有关。移植物动脉硬化是慢性排异反应的病理学特征之一^[77],移植肾内小动脉血管平滑肌细胞因反复的免疫损伤而过度增生并分泌细胞外基质,导致血管内膜增厚并狭窄,最终移植肾缺血、萎缩,而丧失功能^[78]。差异蛋白 SERPINA1、SERPINF2 及 RBP4 在网格蛋白介导的细胞内吞作用信号通路中位于细胞膜外,通过结合细胞膜的低密度脂蛋白受体及蛋白酶激活受体,激活下游 AP2 信号,刺激网格蛋白的组装及对蛋白质、脂质的运输^[79]。同时,凝血系统也是尿蛋白质组差异蛋白表达异常显著的通路。以上五个通路的生理学作用与脂质代谢、脂质转运及动脉硬化等相关,因此我

们猜测以上五个通路的相关差异蛋白可能与移植肾在机体内的微观改变有关,或许涉及到移植肾小动脉硬化的发病机制,并可能进一步导致移植肾功能改变,但仍需进一步研究以证实其作用机制。THOP1 在阿尔兹海默病中的神经保护通路的相关差异蛋白为血管紧张素 AGT、TPP1 及 SERPINA1。THOP1, 英文名为 thimet oligopeptidase, 在神经肽含量较高的组织如大脑、垂体中表达较高,可抑制缓激肽介导的血管生成作用^[80]。IPA 通路图显示, THOP1 可刺激血管紧张素及丝氨酸蛋白酶的作用。该通路相关蛋白的表达差异对肾移植患者的生理学意义尚需进一步探讨。

需要指出的是,我们收集的标本均来自无临床排异反应的肾移植受者及相应供者,因此无法说明尿蛋白质组差异蛋白及相应表达异常的通路与急慢性排异反应有关。但是,通过蛋白质组差异可以得出,即使是未发生临床排异反应的移植肾,其在内环境内的生理状态也与正常肾脏相异,这种生理状态的差异是否与排异反应相关仍需进一步实验。

最后,我们需要说明课题的局限所在:首先,临床结论来源样本较小,需要在大量样本中得到进一步证实。同时,血、尿蛋白质组由于样本量较少,且未找到血、尿蛋白质组间的相同差异蛋白及密切关联。而且我们没有在尿蛋白质组中找到与样本年龄相关的两组共同差异蛋白,无法提供有力的证据来阐述内环境与肾脏衰老过程的影响。我们使用的供受者移植术后时间较短,内环境与肾脏之间的年龄差距对移植肾的影响尚不明显,而且供受者之间的年龄差距还有扩大的空间,进一步研究需要较大的供受者年龄差异及较长的术后时间来增加内环境与移植肾之间的相互影响。

3.6 小结

肾移植可影响尿蛋白质组成分,差异蛋白与能量代谢、免疫应答、动脉硬化、凝血等生物学功能有关,其中 SERPINA1 和 SERPINA3 可能同内环境与移植肾的相互作用有关。

结 论

1. 供受者年龄差可以影响移植肾功能，而内环境的差异可能导致了移植肾衰老速度的改变；

2. 年龄可影响血清蛋白质组成分，差异蛋白与炎症反应、脂质代谢等生物学过程有关，其中，SLC3A2 可能同内环境衰老过程有关；

3. 肾移植可影响尿蛋白质组成分，差异蛋白与能量代谢、免疫应答、动脉硬化、凝血等生物学功能有关，其中 SERPINA1 和 SERPINA3 可能同内环境与移植肾的相互作用有关。

参 考 文 献

- [1] Reese PP, Boudville N, Garg AX. Living kidney donation: outcomes, ethics, and uncertainty. *Lancet*. 2015. 385(9981): 2003-13.
- [2] Alnimri M, Laftavi MR, Kohli R, et al. African-American women and older patients are at risk for a greater decline in renal function following living kidney donation. *Transplant Proc*. 2011. 43(2): 512-5.
- [3] 贾保祥, 苏建荣, 林俊, 田野. 父母为供体的移植受者存活 3 年以上移植肾功能的研究. *临床输血与检验*. 2013. 15(04): 305-309.
- [4] Lim WH, Chang SH, Coates PT, McDonald SP. Parental donors in live-donor kidney transplantation associated with increased rejection rates and reduced glomerular filtration rates. *Transplantation*. 2007. 84(8): 972-80.
- [5] Morrissey PE, Yango AF. Renal transplantation: older recipients and donors. *Clin Geriatr Med*. 2006. 22(3): 687-707.
- [6] de Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis II, et al. Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2001. 12(7): 1538-46.
- [7] Baid-Agrawal S, Frei UA. Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007. 3(1): 31-41.
- [8] 赵纪强, 陈立中, 费继光等. 边缘供者供肾对肾移植受者早期预后的影响. *中华泌尿外科杂志*. 2008. 29(z1): 57-60.
- [9] Tasaki M, Saito K, Nakagawa Y, et al. Effect of donor-recipient age difference on long-term graft survival in living kidney transplantation. *Int Urol Nephrol*. 2014. 46(7): 1441-6.
- [10] 王振, 钱叶勇, 李昆等. 活体供肾移植急性排异反应发生与供受者年龄的关系. *解放军医学院学报*. 2015. (10): 1025-1028.
- [11] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995. 16(7):

- 1090-4.
- [12] Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 1999. 17(3): 121-7.
- [13] Konvalinka A, Scholey JW, Diamandis EP. Searching for new biomarkers of renal diseases through proteomics. *Clin Chem.* 2012. 58(2): 353-65.
- [14] 何华勤. 简明蛋白质组学. 19-20.
- [15] Coskun A, Baykal AT, Kazan D, et al. Proteomic Analysis of Kidney Preservation Solutions Prior to Renal Transplantation. *PLoS One.* 2016. 11(12): e0168755.
- [16] Kim SC, Page EK, Knechtle SJ. Urine proteomics in kidney transplantation. *Transplant Rev (Orlando).* 2014. 28(1): 15-20.
- [17] Pisitkun T, Gandolfo MT, Das S, Knepper MA, Bagnasco SM. Application of systems biology principles to protein biomarker discovery: urinary exosomal proteome in renal transplantation. *Proteomics Clin Appl.* 2012. 6(5-6): 268-78.
- [18] Kanasaki K, Kitada M, Koya D. Pathophysiology of the aging kidney and therapeutic interventions. *Hypertens Res.* 2012. 35(12): 1121-8.
- [19] Weinstein JR, Anderson S. The aging kidney: physiological changes. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010. 17(4): 302-7.
- [20] Giannelli SV, Patel KV, Windham BG, Pizzarelli F, Ferrucci L, Guralnik JM. Magnitude of underascertainment of impaired kidney function in older adults with normal serum creatinine. *J Am Geriatr Soc.* 2007. 55(6): 816-23.
- [21] Meyer TW, Lenihan CR. Glomerular Effects of Age and APOL1. *J Am Soc Nephrol.* 2015. 26(12): 2901-3.
- [22] Kremers WK, Denic A, Lieske JC, et al. Distinguishing age-related from disease-related glomerulosclerosis on kidney biopsy: the Aging Kidney Anatomy study. *Nephrol Dial Transplant.* 2015. 30(12): 2034-9.
- [23] Melk A, Schmidt BM, Braun H, et al. Effects of donor age and cell senescence on kidney allograft survival. *Am J Transplant.* 2009. 9(1): 114-23.

- [24] 童坦君, 张宗玉. 衰老机制及其学说. 生理科学进展. 2007. (01): 14-18.
- [25] 丁瑞. 青年和老年大鼠肾脏互相移植引起的内环境改变对肾脏衰老的影响. (08), 2008.
- [26] Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol*. 1999. 10(1): 167-81.
- [27] Lledó-García E, Riera L, Passas J, et al. Spanish consensus document for acceptance and rejection of kidneys from expanded criteria donors. *Clin Transplant*. 2014. 28(10): 1155-66.
- [28] Wang CJ, Wetmore JB, Crary GS, Kasiske BL. The Donor Kidney Biopsy and Its Implications in Predicting Graft Outcomes: A Systematic Review. *Am J Transplant*. 2015. 15(7): 1903-14.
- [29] Marconi L, Figueiredo A, Campos L, et al. Renal transplantation with donors older than 70 years: does age matter. *Transplant Proc*. 2013. 45(3): 1251-4.
- [30] Galeano C, Marcén R, Jimenez S, et al. Utilization of elderly kidney donors (>70 years) does not affect graft survival in the medium term. *Transplant Proc*. 2010. 42(10): 3935-7.
- [31] 郭丰富, 邵志强, 杨文彦, 王广健, 谭善峰, 何相飞. 供者年龄>50 岁的亲属活体供肾移植. *山东医药*. 2010. (10): 20-21.
- [32] 李金锋, 宋东奎, 丰贵文等. 扩大供肾标准的亲属肾移植临床效果分析. *中华泌尿外科杂志*. 2012. 33(6): 421-425.
- [33] Gill JS, Gill J, Rose C, Zalunardo N, Landsberg D. The older living kidney donor: Part of the solution to the organ shortage. *Transplantation*. 2006. 82(12): 1662-6.
- [34] Iordanous Y, Seymour N, Young A, et al. Recipient outcomes for expanded criteria living kidney donors: the disconnect between current evidence and practice. *Am J Transplant*. 2009. 9(7): 1558-73.
- [35] Laging M, Kal-van GJA, van de Wetering J, Ijzermans JN, Weimar W, Roodnat JI. The relative importance of donor age in deceased and living donor kidney

- transplantation. *Transpl Int*. 2012. 25(11): 1150-7.
- [36] Pahwa M, Chawla A, Dar TI, et al. Live donor kidney transplantation in India: effects of donor and recipient age on graft survival. *Ren Fail*. 2014. 36(2): 222-4.
- [37] Noppakun K, Cosio FG, Dean PG, Taler SJ, Wauters R, Grande JP. Living donor age and kidney transplant outcomes. *Am J Transplant*. 2011. 11(6): 1279-86.
- [38] Slegtenhorst BR, Dor FJ, Elkhail A, et al. Mechanisms and consequences of injury and repair in older organ transplants. *Transplantation*. 2014. 97(11): 1091-9.
- [39] Gheith O, Al-Otaibi T, Halim MA, et al. Early Versus Late Acute Antibody-Mediated Rejection Among Renal Transplant Recipients in Terms of Response to Rituximab Therapy: A Single Center Experience. *Exp Clin Transplant*. 2017. 15(Suppl 1): 150-155.
- [40] Wang Z, Yang H, Si S, et al. Polymorphisms of nucleotide factor of activated T cells cytoplasmic 2 and 4 and the risk of acute rejection following kidney transplantation. *World J Urol*. 2018. 36(1): 111-116.
- [41] 孝晨, 傅茜, 刘龙山等. 不同性别、年龄活体供肾代偿能力的比较. *肾脏病与透析肾移植杂志*. 2012. 21(01): 14-18+52.
- [42] Chang P, Gill J, Dong J, et al. Living donor age and kidney allograft half-life: implications for living donor paired exchange programs. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012. 7(5): 835-41.
- [43] Shin M, Park JB, Kwon CH, Joh JW, Lee SK, Kim SJ. Enhanced significance of donor-recipient age gradient as a prognostic factor of graft outcome in living donor kidney transplantation. *World J Surg*. 2013. 37(7): 1718-26.
- [44] Lee YJ, Chang JH, Choi HN, et al. Donor-recipient age difference and graft survival in living donor kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2012. 44(1): 270-2.
- [45] 李典耕. 青—老年大鼠肾脏交互移植模型的构建及机体内环境衰老关键因子的研究. (02), 2016.

- [46] Ding R, Chen X, Wu D, et al. Effects of Aging on Kidney Graft Function, Oxidative Stress and Gene Expression after Kidney Transplantation. *PLoS One*. 2013. 8(6): e65613.
- [47] Karatzas T, Bokos J, Katsargyris A, et al. Advanced donor age alone is not a risk factor for graft survival in kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2011. 43(5): 1537-43.
- [48] 方佳丽, 陈正, 马俊杰等. 老龄供肾在青年受者体内的病理学改变. *器官移植*. 2015. 6(05): 335-339.
- [49] Joosten SA, van Kooten C, Sijpkens YW, de Fijter JW, Paul LC. The pathobiology of chronic allograft nephropathy: immune-mediated damage and accelerated aging. *Kidney Int*. 2004. 65(5): 1556-9.
- [50] Ferlicot S, Durrbach A, Bâ N, Desvaux D, Bedossa P, Paradis V. The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Hum Pathol*. 2003. 34(9): 924-8.
- [51] Dai Z, Huang Y, Sadee W, Blower P. Chemoinformatics analysis identifies cytotoxic compounds susceptible to chemoresistance mediated by glutathione and cystine/glutamate transport system xc-. *J Med Chem*. 2007. 50(8): 1896-906.
- [52] Huang Y, Dai Z, Barbacioru C, Sadée W. Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*. 2005. 65(16): 7446-54.
- [53] Cantor JM, Ginsberg MH. CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. *J Cell Sci*. 2012. 125(Pt 6): 1373-82.
- [54] Giraudi PJ, Bellarosa C, Coda-Zabetta CD, Peruzzo P, Tiribelli C. Functional induction of the cystine-glutamate exchanger system Xc(-) activity in SH-SY5Y cells by unconjugated bilirubin. *PLoS One*. 2011. 6(12): e29078.
- [55] 李典耕, 孙雪峰, 陈香美. 肾脏衰老机制的探讨. *中华老年多器官疾病杂志*. 2016. 15(4): 302-306.

- [56] Poettler M, Unseld M, Braemswig K, Haitel A, Zielinski CC, Prager GW. CD98hc (SLC3A2) drives integrin-dependent renal cancer cell behavior. *Mol Cancer*. 2013. 12: 169.
- [57] Feral CC, Nishiya N, Fenczik CA, Stuhlmann H, Slepak M, Ginsberg MH. CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102(2): 355-60.
- [58] Fenczik CA, Zent R, Dellos M, et al. Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J Biol Chem*. 2001. 276(12): 8746-52.
- [59] 田卫东, 庞广杰, 李俊, 姜雪婷, 薛歆, 张静. 载脂蛋白基因多态性与冠心病易感性的研究进展. *中国循证心血管医学杂志*. 2014. 6(03): 372-374.
- [60] Ding L, Pang S, Sun Y, Tian Y, Yu L, Dang N. Coordinated Actions of FXR and LXR in Metabolism: From Pathogenesis to Pharmacological Targets for Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol*. 2014. 2014: 751859.
- [61] Xu G, Pan LX, Li H, et al. Regulation of the farnesoid X receptor (FXR) by bile acid flux in rabbits. *J Biol Chem*. 2002. 277(52): 50491-6.
- [62] Cao G, Liang Y, Broderick CL, et al. Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem*. 2003. 278(2): 1131-6.
- [63] Decramer S, de Peredo A G, Breuil B, et al. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2008. 7(10): 1850-62.
- [64] O'Riordan E, Orlova TN, Podust VN, et al. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. *Am J Transplant*. 2007. 7(4): 930-40.
- [65] Siwy J, Zürbig P, Argiles A, et al. Noninvasive diagnosis of chronic kidney diseases using urinary proteome analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2016 .
- [66] Alachkar N. Serum and urinary biomarkers in acute kidney transplant rejection. *Nephrol Ther*. 2012. 8(1): 13-9.

- [67] Günther OP, Shin H, Ng RT, et al. Novel multivariate methods for integration of genomics and proteomics data: applications in a kidney transplant rejection study. *OMICS*. 2014. 18(11): 682-95.
- [68] 陈刚, 吴小候. 大鼠同种异体肾移植急性排异反应蛋白质组学研究. *重庆医科大学学报*. 2014. 39(10): 1466-1470.
- [69] Perez JD, Sakata MM, Colucci JA, et al. Plasma proteomics for the assessment of acute renal transplant rejection. *Life Sci*. 2016. 158: 111-20.
- [70] Zhang S, Janciauskiene S. Multi-functional capability of proteins: alpha1-antichymotrypsin and the correlation with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2002. 4(2): 115-22.
- [71] Chan HJ, Li H, Liu Z, Yuan YC, Mortimer J, Chen S. SERPINA1 is a direct estrogen receptor target gene and a predictor of survival in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2015. 6(28): 25815-27.
- [72] Ziegler ME, Chen T, LeBlanc JF, et al. Apolipoprotein A1 and C-terminal fragment of α -1 antichymotrypsin are candidate plasma biomarkers associated with acute renal allograft rejection. *Transplantation*. 2011. 92(4): 388-95.
- [73] Gibson TL, Cohen P. Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases. *Growth Horm IGF Res*. 1999. 9(4): 241-53.
- [74] Koo DD, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. *Am J Pathol*. 1998. 153(2): 557-66.
- [75] 贾雄飞, 贺伟峰, 罗高兴等. 肾移植急性排异反应早期诊断尿液蛋白质组学研究. *第三军医大学学报*. 2008. (24): 2267-2271.
- [76] Guo Z, Zhang Y, Zou L, et al. A Proteomic Analysis of Individual and Gender Variations in Normal Human Urine and Cerebrospinal Fluid Using iTRAQ Quantification. *PLoS One*. 2015. 10(7): e0133270.

- [77] Womer KL, Lee RS, Madsen JC, Sayegh MH. Tolerance and chronic rejection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001. 356(1409): 727-38.
- [78] Kupferberg H. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 2001. 42 Suppl 4: 7-12.
- [79] 李穆丰. 网格蛋白介导的突触囊泡内吞机制. *中国神经科学杂志.* 2002. (03): 643-647.
- [80] Shrimpton CN, Smith AI, Lew RA. Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling. *Endocr Rev.* 2002. 23(5): 647-64.

文献综述

老年活体供肾风险及移植肾疗效综述

摘要：老年活体供肾肾移植是治疗尿毒症的方法之一，但肾功能随供者年龄增长而下降，因此老年活体供肾者及受者术后并发症风险高，疗效仍有争议。本文对老年活体供肾肾移植的相关报道进行综述。

关键词：老年供者；肾移植；活体供者

Risks and outcomes of kidney transplantation from older living donors

Abstract: Kidney transplantation from older living donor is an important option to treat uremia. But living kidney donation from older donor remains controversial due to higher incidence of comorbidity and greater risk of postoperative complications in both donors and recipients because of decreasing renal function with aging. The outcome of kidney transplantation from older living donor is reviewed in this article.

Key words: old donor; renal transplantation; living donor

肾移植作为终末期肾病的治疗方法可有效提高患者的生活质量和生存率^[1]。但肾源短缺限制了肾移植的发展和应用。活体供肾肾移植的开展有助于缓解肾源短缺，其占比逐年上升^[2]。活体供肾组织相容性高、缺血时间短，受者透析时间短，避免了供者脑死亡带来的肾脏损伤，有排斥率低、器官存活时间长等优点^[3-5]。而且受者术前有充分的治疗时间，纠正水电解质紊乱，改善贫血等全身状况^[6]。因此活体供肾效果优于尸体供肾^[7]。我国活体供者为受者亲属，以父母为主^[8, 9]。但父母作为供者，年龄对供受者均是重要的影响因素。老年活体供肾切取术围手术期及远期并发症风险较高^[10]；而受者出现移植肾功能延迟恢复（DFG）、急性排斥反应（AR）等并发症风险也较高^[11, 12]。因此老年活体供肾的疗效仍有争议。本文就老年活体供肾肾移植的疗效进

行综述。

1. 老年供者的选择

肾功能随年龄增长而逐渐下降, 30 岁以上的健康个体每年 GFR 下降大概 $1\text{ml}/\text{min}$ ^[13], 这同老年肾脏肾小球硬化、功能肾单位减少及肾间质纤维化等微观结构改变有关^[14], 肾动脉硬化及心脏输出量的降低减少了肾血流量, 也促进肾脏衰老^[15, 16]。除 GFR 下降外, 肾小管重吸收及转运功能均同年龄呈负相关^[17]。同时, 老年人易并发糖尿病、高血压、血脂异常等多种以肾脏为攻击靶器官的全身疾病, 加速肾功能衰退^[18]。另外, 肾脏的免疫原性随年龄而增强, 可吸引更多的炎细胞聚集^[19-21], 老年器官移植早期免疫反应更强烈^[22], 导致了老年肾脏抗损伤能力差, 修复损伤能力弱, 肾脏储备能力减少^[23]。

目前国内外指南未规定活体供者的年龄上限^[24-26], 单纯的高龄并非肾脏捐献的绝对禁忌^[25, 27]。但应对 >65 岁的供者充分告知相关风险, 完善包括肾功能、高血压、糖尿病、心血管系统等的术前评估^[24]。尽管年龄并非影响移植肾预后的独立危险因素, 但与年龄相关的长期高血压及 GFR 降低却对移植肾预后有明显影响^[28]。因此对老年供者的筛选应更关注其肾功能及合并症情况而非供者年龄^[29]。

目前多以 GFR 的测定评估肾功能。我国指南推荐活体供者 $\text{GFR} > 80\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ ^[24]。虽然供者 GFR 对移植肾功能有重要影响^[30-32], 但只要符合供肾要求, 较低的术前 GFR 并不会对受者中远期肾功能有不利影响^[33]。评估供者肾功能需考虑到年龄对 GFR 的影响, 老年供者的低代谢水平会影响我们对老年肾脏代偿能力的计算^[34]。英国移植协会依据供者年龄分别制定了 GFR 的要求标准, 例如对于 80 岁的供者, GFR 仅需 $>50\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 即可^[25]。因此, 术前肾功能评估应以 GFR 为主, 综合血肌酐(血肌酐)、肌酐清除率、静脉尿路造影等检查综合判断, 单一指标异常不应轻易否认供者资格^[35, 36]。肾功能正常的老年供者对肾移植预后并无显著影响^[37]。目前对 60 岁以上的供者尚无合适可推荐的 GFR 截断值^[38]。

高血压会导致肾脏慢性损伤。我国一项流行病学调查发现, 高血压发病率为 29.6%, 而 >60 岁的个体高血压发病率为 58.2%, 其中仅有 52.1% 的患者知道自己患有高血压, 11.7% 的患者得到了有效的控制^[39]。因此, 老年供者术前筛查高血压十分必要。但得

到控制的轻中度高血压只是肾脏捐献的相对禁忌^[24]。

2 老年供者供肾切取术后并发症

老年供肾切取术由 Hsu 等^[40]于 2002 年首次报道并取得了较好的疗效。文献报道供肾切除术后 90 天死亡率约为 0.031%，老年供者略高(0.066%)，但并无显著差异^[41]。罗用文等^[42]报道了 44 例后腹腔镜老年活体供肾切取术，术后并发症发生率及术后 6 个月血肌酐与同期中青年供者组相比差异不显著，与其他学者报道相近^[43-46]。符合供肾条件的供者围手术期死亡率并不会因为年龄而改变。

供肾切取术后，余肾血流量及 GFR 迅速升高，可恢复至术前总 GFR 的 70%^[16]，同时由于肾单位过度肥大使肾体积增大 30%^[47]。供者肾功能代偿率与年龄有显著关系^[48]。有研究显示 <50 岁和 >50 岁的供者术后 1 个月肾功能代偿率分别为 12.14% 和 26.82%，但血肌酐水平相近^[49]。郭丰富等^[50]对比了 45 例 >50 岁供者的活体供肾移植与同期 <50 岁供者的术后 1 年肾功能无显著差异。Dols 等^[51]统计了 569 名活体供者术后肾功能，尽管老年供者术后 eGFR 低于年轻供者，但二组 eGFR 下降比例均接近 35%。但是，老年供者术后易出现蛋白尿^[36]。文献报道了 573 名平均年龄为 61.5 岁的活体供者 14 年后出现微量蛋白尿的比率约为 21%^[52]。GFR 的下降及蛋白尿的出现使老年供者终末期肾病的发病率依然稍高于健康人群^[53, 54]。尽管如此，年轻供者预期寿命长，若术后并发糖尿病等相关疾病，有足够的时间最终进展为终末期肾病，风险高于老年供者^[55]。但老年供者预期寿命较短，即使术前因为糖耐量异常等原因肾脏受损，也常因为其他原因死亡而未进展到终末期肾病^[38]。

肾功能下降会增加心血管疾病的发病风险，而老年供者术前合并糖耐量异常及高血压可能性大，因此术后出现心血管并发症的风险也高于年轻供者^[36, 56]。供肾切取后，供者平均动脉压升高约 5mmHg/年^[57]。但由于术前的严格筛查，肾移植供者身体往往较平均人群健康，预期寿命也接近甚至高于平均人群^[3, 41, 58]。因此对符合供肾标准的供者，肾脏捐献并不会增加心血管疾病的发生风险，甚至有数据显示，肾移植供者的心血管疾病风险低于平均人群(2.8%vs. 4.1%)^[41, 59]。而一项对 55 岁以上活体供者的健康调查也没有发现捐肾与心血管疾病发生率有关^[60]。Toyoda^[61]等对活体供者进行了 7 年的随访发现老年供者及年轻供者间的心血管发病风险无显著区别。

3 老年供肾移植肾疗效

老年供肾移植肾预后良好,并不较年轻供者差^[9, 12, 42, 62-67]。郭丰富等^[50]报道的老年供肾术后 1、3 年移植肾存活率分别为 97.8%和 77.8%,血肌酐为 148.40 $\mu\text{mol/L}$,与年轻供者对比均无显著差异。李金锋等^[68]对比了 66 例边缘供者与标准供者移植术后短期与长期疗效,两组受者术后 1 年血肌酐、DGF、AR、并发症发生率及人/肾存活率均无统计学差异,供者年龄并非肾移植预后的独立危险因素。Gill 等^[69]研究表明,接受 >55 岁供肾后 3、5 年存活率分别为 85%和 76%,而接受 <55 岁供者分别为 89%和 82%,两组差异无统计学意义。一篇对 31 篇文献的系统回顾显示,老年供肾移植肾 5 年生存率低于年轻供者 (70%vs. 87%, $P=0.21$),但差异并不显著^[70]。印度一项活体肾移植分析显示,尽管老年供肾移植肾功能较年轻供肾差,但急性排异反应风险(AR)无统计学差异^[71]。贾保祥等^[8]报道父母为供者时,父母供肾移植肾功能劣于子女供肾,但供者年龄并不影响术后移植肾功能及移植肾功能延迟恢复(DGF)或 AR 发生率。方佳丽等^[72]发现老龄供肾在青年受者体内 6 个月后病理学结构改善,间质纤维化速度缓解,为老年供肾应用的安全性提供了病理学的支持。

但相关报道不全支持类似结论。使用 >60 岁供者供肾会加重 DGF 风险 (6.8%vs. 2.5%)^[73]。陈国栋等^[74]报道,老年供肾组术后移植肾血肌酐水平高于年轻供肾组,而且受者发生急慢性排斥反应的几率较高,但 DGF 发生率相近。Galeano 等^[75]分别调查了供者年龄 <50 岁、50-70 岁及 >70 岁的移植肾 5 年生存率 (81%、74%、70%),尽管老年活体供者可获得良好的移植肾存活率,但术后肌酐水平显著劣于年轻供者。研究显示供者年龄 >50 岁患者 2、6 周排斥反应发生率分别为 13.0%和 19.5%,显著高于 <50 岁供者组 (2.8%和 8.5%)^[64]。AR 后肾功能的降低程度与 AR 前的肾功能相关,这取决于供者的年龄及供肾之前肾脏受到的损伤^[76]。因此老年供肾对 AR 的承受能力弱于年轻供肾,AR 导致的移植肾丢失率较高^[19]。一项对 1063 名活体肾移植受者的调查发现,年龄对移植肾存活率有显著影响,尤其是供者年龄 >40 岁时; >70 岁的供者移植肾丢失风险高于 50-59 岁的供者,但接近 50-59 岁的尸体供者^[77]。尽管老年活体供肾效果无法媲美年轻供者,但仍优于尸体供肾。Mirgam 等^[27]认为 60 岁活体供者的移植肾存活率同 20 岁尸体供肾相近。

供者年龄对移植肾慢性排斥反应的作用也存有争议。严群等^[63]的动物实验提示供鼠年龄越大,移植肾中淋巴细胞浸润及间质纤维化越严重。但 Schwarz^[78]等对比了 70 名发生慢性移植物肾病及 120 名未发生慢性移植物肾病的患者,两组患者的供者年龄无明显差异。近年来,对慢性排斥反应的研究表明,其病理过程与肾脏衰老相似,或许对移植肾衰老进程有加速作用^[79, 80]。

受者年龄对移植肾也有显著影响^[73],而这种影响可能比供者年龄因素影响更大。老年受者机体免疫力差,更容易接受免疫原性较强的老年供肾^[81]。而年轻受者免疫系统较强,更容易发生免疫应答^[82, 83]。孝晨等^[34]发现虽然移植肾术后 eGFR 水平与供者年龄负相关,但移植肾代偿能力仅受术前 eGFR 水平及受者年龄影响而非供者年龄。王振等^[84]统计了 327 例活体肾移植受者 AR 发生情况,老年供者并不增加移植后排斥风险,而供受者年龄组合是 AR 风险的独立危险因素。Chang 等^[85]报道,决定肾移植半衰期(50%肾移植受者出现器官衰竭的时间)的是受者年龄而非供者年龄。Masayuki 等^[86]也发现,使用 >50 岁的供肾,受者年龄是移植肾丢失风险的独立危险因素(15 年移植肾存活率 75% vs. 41%)。Shin 等^[87]也报道,对年轻受者而言,老年供者移植肾 10 年存活率低于年轻供者(83% vs. 62%),但供者年龄对老年受者影响较小(5 年移植肾存活率 92% vs. 90%)。Lee^[88]等以供受者年龄相差 20 岁为分界,发现供受者年龄差过大对 5 年血肌酐水平及 AR 发生率有显著影响,但移植肾存活率无显著差异。因此,美国及欧洲的医生更倾向于将老年活体供肾应用于老年受者(old-for-old)^[89]。如果 1 名年轻尿毒症患者有数名潜在供者,那年轻供者是最好的选择,应用年龄匹配策略有助于获得更好的移植肾预后^[66],但如果患者没有更好的选择,老年活体供肾也可以提供非常好的疗效^[77]。尤其是对于老年尿毒症患者而言,使用 1 个老年供者的供肾远优于等待 1 个标准尸体供者^[90]。老年活体供肾的应用和扩大可有效缓解肾源短缺,减少透析时间,而减少尿毒症患者肾移植等待时间已经证实对患者生存和移植肾生存率有非常重要的正面影响^[91]。

4 结语

活体肾脏移植中,保护供者是首要原则。老年个体容易并发多种疾病,对供者的筛查和选择需要谨慎仔细,尽最大可能避免对供者的额外损伤。但对符合条件的老年

活体供者而言，肾脏捐献一方面并不会增加供者的远期风险，另一方面也可以获得良好的肾移植疗效。如果能应用年龄匹配策略，减少供受者之间的年龄差距，则可充分利用现有肾源，为尿毒症患者提供更好的治疗效果。

参考文献

- [1] Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, et al. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant*. 2011. 11(10): 2093-109.
- [2] Ralph AF, Butow P, Hanson CS, et al. Donor and Recipient Views on Their Relationship in Living Kidney Donation: Thematic Synthesis of Qualitative Studies. *Am J Kidney Dis*. 2017. 69(5): 602-616.
- [3] Reese PP, Boudville N, Garg AX. Living kidney donation: outcomes, ethics, and uncertainty. *Lancet*. 2015. 385(9981): 2003-13.
- [4] Alnimri M, Laftavi MR, Kohli R, et al. African-American women and older patients are at risk for a greater decline in renal function following living kidney donation. *Transplant Proc*. 2011. 43(2): 512-5.
- [5] Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, et al. OPTN/SRTR 2012 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant*. 2014. 14 Suppl 1: 11-44.
- [6] 梁涛, 蔡明, 李州利等. 活体供肾与尸体供肾:1 个器官移植中心 2 年 65:169 例肾移植效果比较. *中国组织工程研究与临床康复*. 2010. 14(31): 5717-5720.
- [7] Gill J, Bunnapradist S, Danovitch GM, Gjertson D, Gill JS, Cecka M. Outcomes of kidney transplantation from older living donors to older recipients. *Am J Kidney Dis*. 2008. 52(3): 541-52.
- [8] 贾保祥, 苏建荣, 林俊, 田野. 父母为供体的移植受者存活 3 年以上移植肾功能的研究. *临床输血与检验*. 2013. 15(04): 305-309.
- [9] 郭丰富, 张振, 付猛, 庞爱霞, 朱文彬, 邵志强. 供者年龄对亲属活体供肾移植效果影响研究. *中国医学工程*. 2017. 25(11): 1-3.
- [10] O'Brien B, Mastoridis S, Sabharwal A, Hakim N, Taube D, Papalois V. Expanding the donor pool: living donor nephrectomy in the elderly and the overweight. *Transplantation*. 2012. 93(11): 1158-65.

- [11] Baid-Agrawal S, Frei UA. Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007. 3(1): 31-41.
- [12] 贾保祥, 康颖, 刘杰, 武俊杰, 王云端. 亲属活体肾移植中父母供肾对移植肾长期存活的影响. *中华移植杂志(电子版)*. 2015. 9(04): 178-181.
- [13] Morrissey PE, Yango AF. Renal transplantation: older recipients and donors. *Clin Geriatr Med*. 2006. 22(3): 687-707.
- [14] Lim WH, Chang SH, Coates PT, McDonald SP. Parental donors in live-donor kidney transplantation associated with increased rejection rates and reduced glomerular filtration rates. *Transplantation*. 2007. 84(8): 972-80.
- [15] Leibowitz D, Maaravi Y, Stessman-Lande I, Jacobs JM, Gilon D, Stessman J. Cardiac structure and function and renal insufficiency in the oldest old. *Clin Cardiol*. 2012. 35(12): 764-9.
- [16] Lenihan CR, Myers BD, Tan JC. Glomerular Function and Structure in Living Donors: Lessons from Single Nephron Studies. *Curr Transplant Rep*. 2016. 3: 24-32.
- [17] 叶朝阳, 崔琳琳. 老年人肾脏变化及功能评估. *中华肾病研究电子杂志*. 2015. 4(04): 182-186.
- [18] Nitta K, Okada K, Yanai M, Takahashi S. Aging and chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res*. 2013. 38(1): 109-20.
- [19] de Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis II, et al. Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol*. 2001. 12(7): 1538-46.
- [20] Babizhayev MA. New concept in nutrition for the maintenance of the aging eye redox regulation and therapeutic treatment of cataract disease; synergism of natural antioxidant imidazole-containing amino acid-based compounds, chaperone, and glutathione boosting agents: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Am J Ther*. 2010. 17(4): 373-89.
- [21] Agrawal A, Agrawal S, Cao JN, Su H, Osann K, Gupta S. Altered innate immune

- functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol.* 2007. 178(11): 6912-22.
- [22] Sidman CL, Luther EA, Marshall JD, Nguyen KA, Roopenian DC, Worthen SM. Increased expression of major histocompatibility complex antigens on lymphocytes from aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987. 84(21): 7624-8.
- [23] Epstein M. Aging and the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 1996. 7(8): 1106-22.
- [24] 石炳毅, 林涛, 蔡明. 中国活体供肾移植临床指南(2016 版). 器官移植. 2016. 7(06): 417-426.
- [25] Andrews PA, Burnapp L, Manas D, Bradley JA, Dudley C. Summary of the British Transplantation Society/Renal Association U.K. guidelines for living donor kidney transplantation. *Transplantation.* 2012. 93(7): 666-73.
- [26] Abramowicz D, Cochat P, Claas FH, et al. European Renal Best Practice Guideline on kidney donor and recipient evaluation and perioperative care. *Nephrol Dial Transplant.* 2015. 30(11): 1790-7.
- [27] Laging M, Kal-van GJA, van de Wetering J, Ijzermans JN, Weimar W, Roodnat JJ. The relative importance of donor age in deceased and living donor kidney transplantation. *Transpl Int.* 2012. 25(11): 1150-7.
- [28] 王凯, 曲青山, 苗书斋. 老龄供者亲属活体肾移植疗效分析. 中国组织工程研究与临床康复. 2011. (18): 3395-3397.
- [29] 马枭雄, 周江桥. 扩大标准供体在肾移植中的研究进展. 医学综述. 2016. 22(24): 4859-4862.
- [30] Nordén G, Lennerling A, Nyberg G. Low absolute glomerular filtration rate in the living kidney donor: a risk factor for graft loss. *Transplantation.* 2000. 70(9): 1360-2.
- [31] Hawley CM, Kearsley J, Campbell SB, et al. Estimated donor glomerular filtration rate is the most important donor characteristic predicting graft function in recipients of kidneys from live donors. *Transpl Int.* 2007. 20(1): 64-72.

- [32] 赵杰, 宋文利, 莫春柏, 王智平. 活体肾移植供者肾小球滤过率与受者移植肾功能关系的研究. 天津医药. 2012. 40(01): 31-33.
- [33] 李兆明, 费继光, 王长希, 邱江, 黄刚, 黎东伟. 活体供肾肾小球滤过率对受体中远期肾功能的影响. 热带医学杂志. 2014. 14(11): 1449-1452.
- [34] 孝晨, 傅茜, 刘龙山等. 不同性别、年龄活体供肾代偿能力的比较. 肾脏病与透析肾移植杂志. 2012. 21(01): 14-18+52.
- [35] 赵豫波, 石炳毅, 方佳丽等. 亲属活体供肾移植中供者肾功能的评估. 中国组织工程研究与临床康复. 2011. 15(31): 5781-5784.
- [36] Hourmant M, Lerat L, Karam G. Donation from old living donors: how safe is it. *Nephrol Dial Transplant*. 2013. 28(8): 2010-4.
- [37] 陈正, 潘光辉, 廖德怀等. 老年活体亲属供肾移植的安全性分析. 中华泌尿外科杂志. 2008. 29(1): 21-25.
- [38] Akoh JA, Mathuram TU. Renal transplantation from elderly living donors. *J Transplant*. 2013. 2013: 475964.
- [39] Wang J, Zhang L, Wang F, Liu L, Wang H. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in China: results from a national survey. *Am J Hypertens*. 2014. 27(11): 1355-61.
- [40] Hsu TH, Su LM, Ratner LE, Kavoussi LR. Laparoscopic donor nephrectomy in the elderly patient. *Urology*. 2002. 60(3): 398-401.
- [41] Segev DL, Muzaale AD, Caffo BS, et al. Perioperative mortality and long-term survival following live kidney donation. *JAMA*. 2010. 303(10): 959-66.
- [42] 罗用文, 李钢, 王振等. 后腹腔镜老龄活体供肾肾移植临床分析. 中华医学杂志. 2016. 96(20): 1566-1569.
- [43] Jacobs SC, Ramey JR, Sklar GN, Bartlett ST. Laparoscopic kidney donation from patients older than 60 years. *J Am Coll Surg*. 2004. 198(6): 892-7.
- [44] Tsuchiya N, Satoh S, Sato K, et al. Hand assisted retroperitoneoscopic living donor nephrectomy in elderly donors. *J Urol*. 2006. 175(1): 230-4; discussion 234.

- [45] 王广健, 郭丰富, 邵志强等. 大于 50 岁亲属活体供肾移植效果分析. 中国医学工程. 2010. 18(01): 6-7+10+15.
- [46] Guo FF, Shao ZQ, Yang WY, et al. Clinical analysis of living related renal transplantation with donors older than 50 years in China. *Transplant Proc.* 2010. 42(7): 2471-6.
- [47] Lenihan CR, Busque S, Derby G, Blouch K, Myers BD, Tan JC. Longitudinal study of living kidney donor glomerular dynamics after nephrectomy. *J Clin Invest.* 2015. 125(3): 1311-8.
- [48] Bahous SA, Khairallah M, Al DJ, et al. Renal function decline in recipients and donors of kidney grafts: role of aortic stiffness. *Am J Nephrol.* 2015. 41(1): 57-65.
- [49] 陈劲松, 文吉秋, 季曙明等. 亲属肾移植供者术后早期肾功能变化的影响因素. 肾脏病与透析肾移植杂志. 2013. 22(02): 106-111.
- [50] 郭丰富, 邵志强, 杨文彦, 王广健, 谭善峰, 何相飞. 供者年龄>50 岁的亲属活体供肾移植. 山东医药. 2010. (10): 20-21.
- [51] Dols LF, Kok NF, Roodnat JJ, et al. Living kidney donors: impact of age on long-term safety. *Am J Transplant.* 2011. 11(4): 737-42.
- [52] Fehrman-Ekholm I, Kvarnström N, Söfteland JM, et al. Post-nephrectomy development of renal function in living kidney donors: a cross-sectional retrospective study. *Nephrol Dial Transplant.* 2011. 26(7): 2377-81.
- [53] Mjøen G, Hallan S, Hartmann A, et al. Long-term risks for kidney donors. *Kidney Int.* 2014. 86(1): 162-7.
- [54] Muzaale AD, Massie AB, Wang MC, et al. Risk of end-stage renal disease following live kidney donation. *JAMA.* 2014. 311(6): 579-86.
- [55] Kiberd BA. Estimating the long term impact of kidney donation on life expectancy and end stage renal disease. *Transplant Res.* 2013. 2(1): 2.
- [56] Lam NN, Garg AX. Acceptability of older adults as living kidney donors. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2016. 25(3): 245-56.

- [57] Boudville N, Prasad GV, Knoll G, et al. Meta-analysis: risk for hypertension in living kidney donors. *Ann Intern Med.* 2006. 145(3): 185-96.
- [58] Fehrman-Ekholm I, Elinder CG, Stenbeck M, Tydén G, Groth CG. Kidney donors live longer. *Transplantation.* 1997. 64(7): 976-8.
- [59] Lentine KL, Segev DL. Understanding and Communicating Medical Risks for Living Kidney Donors: A Matter of Perspective. *J Am Soc Nephrol.* 2017. 28(1): 12-24.
- [60] Reese PP, Bloom RD, Feldman HI, et al. Mortality and cardiovascular disease among older live kidney donors. *Am J Transplant.* 2014. 14(8): 1853-61.
- [61] Toyoda M, Yamanaga S, Kawabata C, et al. Long-term safety of living kidney donors aged 60 and older. *Transplant Proc.* 2014. 46(2): 318-20.
- [62] 赵纪强, 陈立中, 费继光等. 边缘供者供肾对肾移植受者早期预后的影响. *中华泌尿外科杂志.* 2008. 29(z1): 57-60.
- [63] 严群, 袁晓奕, 龚建平. 供者年龄与肾移植慢性排斥反应关系的实验研究. *中华器官移植杂志.* 2001. (03): 42-43.
- [64] 张磊, 马麟麟, 马斌荣, 田野. 活体肾脏移植供者年龄和性别对术后早期发生急性排斥反应的影响. *中华医学杂志.* 2008. 88(48): 3407-3410.
- [65] 陈立中, 张磊, 费继光等. 50 岁以上活体亲属供肾移植的中期疗效分析. *器官移植.* 2010. 1(01): 45-49.
- [66] Lionaki S, Kapsia H, Makropoulos I, et al. Kidney transplantation outcomes from expanded criteria donors, standard criteria donors or living donors older than 60 years. *Ren Fail.* 2014. 36(4): 526-33.
- [67] Young A, Kim SJ, Speechley MR, et al. Accepting kidneys from older living donors: impact on transplant recipient outcomes. *Am J Transplant.* 2011. 11(4): 743-50.
- [68] 李金锋, 宋东奎, 丰贵文等. 扩大供肾标准的亲属肾移植临床效果分析. *中华泌尿外科杂志.* 2012. 33(6): 421-425.
- [69] Gill JS, Gill J, Rose C, Zalunardo N, Landsberg D. The older living kidney donor:

- Part of the solution to the organ shortage. *Transplantation*. 2006. 82(12): 1662-6.
- [70] Iordanous Y, Seymour N, Young A, et al. Recipient outcomes for expanded criteria living kidney donors: the disconnect between current evidence and practice. *Am J Transplant*. 2009. 9(7): 1558-73.
- [71] Pahwa M, Chawla A, Dar TI, et al. Live donor kidney transplantation in India: effects of donor and recipient age on graft survival. *Ren Fail*. 2014. 36(2): 222-4.
- [72] 方佳丽, 陈正, 马俊杰等. 老龄供肾在青年受者体内的病理学改变. *器官移植*. 2015. 6(05): 335-339.
- [73] Noppakun K, Cosio FG, Dean PG, Taler SJ, Wauters R, Grande JP. Living donor age and kidney transplant outcomes. *Am J Transplant*. 2011. 11(6): 1279-86.
- [74] 陈国栋, 张霄旦, 史磊, 王小琴, 翟洁, 陈立中. 供体年龄对活体肾移植预后的影响. *中华肾脏病杂志*. 2012. 28(6): 455-459.
- [75] Galeano C, Marcén R, Jimenez S, et al. Utilization of elderly kidney donors (>70 years) does not affect graft survival in the medium term. *Transplant Proc*. 2010. 42(10): 3935-7.
- [76] Gjertson DW. A multi-factor analysis of kidney graft outcomes at one and five years posttransplantation: 1996 UNOS Update. *Clin Transpl*. 1996 : 343-60.
- [77] Berger JC, Muzaale AD, James N, et al. Living kidney donors ages 70 and older: recipient and donor outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011. 6(12): 2887-93.
- [78] Schwarz A, Mengel M, Gwinner W, et al. Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: a protocol biopsy study. *Kidney Int*. 2005. 67(1): 341-8.
- [79] Joosten SA, van Kooten C, Sijpkens YW, de Fijter JW, Paul LC. The pathobiology of chronic allograft nephropathy: immune-mediated damage and accelerated aging. *Kidney Int*. 2004. 65(5): 1556-9.
- [80] Ferlicot S, Durrbach A, Bâ N, Desvaux D, Bedossa P, Paradis V. The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Hum Pathol*. 2003. 34(9):

924-8.

- [81] Slegtenhorst BR, Dor FJ, Elkhali A, et al. Mechanisms and consequences of injury and repair in older organ transplants. *Transplantation*. 2014. 97(11): 1091-9.
- [82] Gheith O, Al-Otaibi T, Halim MA, et al. Early Versus Late Acute Antibody-Mediated Rejection Among Renal Transplant Recipients in Terms of Response to Rituximab Therapy: A Single Center Experience. *Exp Clin Transplant*. 2017. 15(Suppl 1): 150-155.
- [83] Wang Z, Yang H, Si S, et al. Polymorphisms of nucleotide factor of activated T cells cytoplasmic 2 and 4 and the risk of acute rejection following kidney transplantation. *World J Urol*. 2018. 36(1): 111-116.
- [84] 王振, 钱叶勇, 李昆等. 活体供肾移植急性排斥反应发生与供受者年龄的关系. *解放军医学院学报*. 2015. (10): 1025-1028.
- [85] Chang P, Gill J, Dong J, et al. Living donor age and kidney allograft half-life: implications for living donor paired exchange programs. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012. 7(5): 835-41.
- [86] Tasaki M, Saito K, Nakagawa Y, et al. Effect of donor-recipient age difference on long-term graft survival in living kidney transplantation. *Int Urol Nephrol*. 2014. 46(7): 1441-6.
- [87] Shin M, Park JB, Kwon CH, Joh JW, Lee SK, Kim SJ. Enhanced significance of donor-recipient age gradient as a prognostic factor of graft outcome in living donor kidney transplantation. *World J Surg*. 2013. 37(7): 1718-26.
- [88] Lee YJ, Chang JH, Choi HN, et al. Donor-recipient age difference and graft survival in living donor kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2012. 44(1): 270-2.
- [89] Bozkurt B, Kılıç M. Marginal Donors in Renal Transplantation. *Transplant Proc*. 2015. 47(5): 1273-81.
- [90] Knoll GA. Kidney transplantation in the older adult. *Am J Kidney Dis*. 2013. 61(5):

790-7.

- [91] 刘凌霄, 余少杰, 彭龙开等. 婴幼儿脑死亡后供者器官捐献供肾成人双肾移植 23 例. 中华器官移植杂志. 2015. 36(11): 646-651.

攻读学位期间发表论文

- [1] 王昕凝, 罗光达等. 机器人辅助腹腔镜肾部分切除术:单一术者99例经验总结. 中国微创外科杂志. 2017. 17(03): 206-208+227.
- [2] 王昕凝, 孙雪峰等. 肾移植术后供受者尿蛋白质组差异蛋白分析. 解放军医学院学报. 2018. 39(03): 239-242.
- [3] 王昕凝, 董隽. 机器人辅助腹腔镜技术在肾移植手术中的应用进展. 微创泌-尿外科杂志. 2018.7(2):127-130
- [4] 王昕凝, 祖强等. 机器人肾脏切取, 离体肾肿瘤切除及机器人自体肾移植术治疗复杂肾肿瘤附1例报道并文献复习. 微创泌尿外科杂志. 2018.7(3):1-5
- [5] 王昕凝, 董隽. 老年活体供肾风险及移植肾疗效综述. 解放军医学院学报. 已录用
- [6] 王昕凝, 祖强等. 微创手术在肾部分切除术中的应用(单一术者经验介绍). 中国微创外科杂志. 修回
- [7] 王昕凝, 祖强等. 机器人辅助腹腔镜肾移植术1例报道并文献复习. 微创泌尿外科杂志. 在审

致谢

转眼间，我已经在解放军总医院学习了三年，并即将要毕业。从小到大，每一次的毕业都让我格外留恋，要离开这个可以曾经当做家的地方，要告别那些亲如兄弟姐妹的好友。这个操场，我跑过；这层食堂，我来过；这个镜子，我扶过；这把针持，我握过。想一想我这三年的学习生涯，充满了我身边的老师和同伴们。有的教过我手术技巧，有的陪我跑过马路，还有的和我一起熬夜赶过论文。我要说一句：谢谢。

感谢我的导师董隽老师。研二的时候董老师在海南工作，然而仍然远程指导我撰写我的第一篇科研论文。从文章的要义，到每一个字的精炼，都会得到董老师电话里细致的指点。董老师回京后，我第一次尝试腹腔镜手术，是董老师亲自打的 Trocar。遇到特殊病例的时候，董老师总是主动给我提供机会去学习。在门诊的时候，董老师曾多次对我说：“我们要尽可能的帮助能帮到的患者。”我非常感谢董老师对我的教导，老师的恩情是我最珍贵的记忆。

感谢蔡叔叔对我生活和学习上的照顾。感谢肾内科孙雪峰主任对我的课题莫大的引导和支持。

感谢科室张旭主任、卢锦山主任、祖强主任、黄双老师、张磊老师、祝强老师、胡智飞护士长、丁华护士长、刘圣圳师兄、罗光达师兄、巫胜攀师兄、周启玮师兄、彭程、赵健、陈超、聂文远等各位老师及同门们对我的成长予以的指导和帮助。感谢曾轮转的科室的宋青主任、刘辉老师、赵妍老师、王黎老师、马冰主任、黄晓天老师、姜凯主任、罗英主任、王勋老师、马晓辉主任、齐玮老师、李捷主任、王彬老师、梁涛老师、姜向明老师等对我的指导和教学。感谢国家蛋白质中心的黄银老师在科研上对我的帮助。感谢解放军 309 医院的钱叶勇主任及北京友谊医院的田野主任对我课题的帮助。

感谢我的舍友王博和张少甫对我生活上的关怀和照顾。

感谢我的好朋友们：廖松、张庆奎、董李、朱军永、张淼、鲁长风、孙志佳、苏星、刘倩、邝衍绅、宋浩等，感谢你们与我三年的友谊。

感谢我的父母一直以来对我的关爱。