论著

文章编号:1000-5404(2009)19-1884-03

尿毒症患者早期小动静脉纤维化的变化

冯 菁,彭侃夫,吴雄飞 (第三军医大学西南医院肾科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨尿毒症患者早期小动静脉的纤维化改变。**方法** 选择40例慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)Ⅴ期患者在行动静脉瘘手术时留取桡动脉及头静脉各0.5~1 cm。对照组选取4例行手部血管手术患者头静脉,用茜素红、HE及Masson染色三色法判断血管纤维化及钙化程度。同时采用免疫组织化学的方法检测α-平滑肌肌动蛋白(actinalpha, smoothmuscleaorta,α-SMA)、骨形成蛋白-2(bone morphology protein-2,BMP-2)、骨形成蛋白-7(bone morphology protein-7,BMP-7)表达。**结果** 免疫组化α-SMA、BMP-2在CKD患者静脉的表达有明显的升高,与正常人群的静脉有显著性差异($P<0.05$),Masson染色 、HE、茜素红染色提示尿毒症患者静脉改变以纤维化为主,而在尿毒症早期动脉改变不明显。**结论** 尿毒症患者静脉的改变早于动脉的改变,而且以纤维化为主。提示静脉的改变同样可能与尿毒症患者心血管疾病密切相关。

关键词: 尿毒症;动脉;静脉;纤维化
中图法分类号: R446; R543; R692.5 **文献标识码:** A

Fibrosis of middle-small arteries and veins in early-stage uremic patients

FENG Jing, PENG Kan-fu, WU Xiong-fei (Department of Nephrology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the pathological changes of the middle-small arteries and veins of uremic patients in early stage. Methods Forty patients with chronic kidney disease at Ⅴ stage were randomly subjected in our study. Radial artery and cephalic vein about 0.5 to 1 cm in length were obtained by arteriovenous fistula operations. Cephalic veins from 4 trauma patients were taken as control group. Immunohistochemisty with anti-α-SMA (smooth muscle actin-alpha), BMP-2 (bone morphology protein-2) and BMP-7 (bone morphology protein-7) antibodies, alizarin Bordeaux staining, HE staining and Masson trichrome staining were carried out to investigate calcification and fibrosis. Results Compared with control group, the expressions of α-SMA and BMP-2 were up-regulated obviously. Masson trichrome staining indicated fibrosis in the vein from uremic patients. Conclusion Fibrosis may be one of the early pathologic changes in the vein from uremic patients, suggesting the venous alterations may be related to cardiovascular disease of uremic patients.

Key words: uremia; artery; vein; fiberosis

近年来的研究证明心血管疾病是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者致残和致死的主要原因之一[1],研究提示并证实动脉粥样硬化或动脉钙化是导致其发生和发展的主要因素,并最终影响CKD患者的生存率[2]。而尿毒症患者中小静脉血管的病理改变,可导致静脉回流障碍引起组织器官的淤血、缺氧等病理生理学改变。我们在行动静脉内瘘成形手术时,常发现头静脉节段性的变硬,管腔狭窄,甚至完全闭塞。那么尿毒症患者的静脉尤其是中小静脉在早期的改变尚少见文献报道。因此,本研究拟采用免疫组织化学结合茜素红、HE及Masson染色三色法观察头静脉血管在尿毒症早期的病理改变并探讨可能的机制。本研究结果将为尿毒症患者早期心血管系统静脉的纤维化提供实验依据,并可针对尿毒症患者早期静脉改变提出相应的防治措施。

1 资料与方法

1.1 血管标本

2007年12月至2008年6月我院行首次动静脉内瘘手术的患者40例。原发病为:慢性肾小球肾炎30例,高血压肾病8例,病因不明2例,排除糖尿病肾病。在行动一静脉内瘘手术时,分别取桡动脉及头静脉各0.5~1.0 cm,以苦味酸固定,石蜡包埋切片。40例患者中,男性22例,女性18例,年龄(40±17)岁,Scr均>707 mmol/L。以创伤行血管手术的4例患者的动静脉为对照,其中男性3例,女性1例,年龄(35±15)岁,肾功能均正常。所有入选者均知情同意。

作者简介:冯 菁,女,陕西省西安市人,硕士研究生,主治医师,主要从事尿毒症患者心血管并发症的防治,血液净化等领域方面的研究。E-mail: foxmail418@tom.com
通信作者:吴雄飞, E-mail:Wuxfei@126.com
收稿日期:2009-04-16;修回日期:2009-06-19

1.2　血管钙化及纤维化染色

2% 的茜素红(pH 4.1 ~ 4.3)染色 3 min,0.2% 淡绿复染,乙醇脱水,二甲苯透明。橘红色为钙化阳性。HE 染色:苏木精染色 3 min,自来水洗 2 min;1% 盐酸酒精分化 20 s,自来水洗 1 min;伊红染色 1 min,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。观察动、静脉的一般形态结构,血管壁各层有无组织学的异常。Masson 染色三色染色法 1% 地衣红染液染色 30 ~ 60 min。蒸馏水水洗,用 weigert 氏铁苏木液或明矾苏木精液染核 5 ~ 10 min,自来水蓝化,丽春红酸性复红染液染色,2% 亮绿染色 3 ~ 5 min,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,观察肌纤维、细胞质改变程度。

1.3　相关免疫组织化学染色及荧光

α-SMA、BMP-2、BMP-7 免疫组化:采用链霉亲和素-生物素复合物技术(S-P)法。石蜡切片常规脱蜡至水,PBS 浸泡后,3% 过氧化氢孵育 10 min,微波法抗原热修复:切片放入盛有抗原修复液(0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 pH 6.0)的修复盒内,置于微波炉中低档(保持温度 92 ~ 98 ℃之间)10 min(2 个 5 min 之间停 1 min 并检查修复盒液面防止干片),由微波炉内取出修复盒,室温冷却 2 h(切片仍浸于修复液中),以便使蛋白能够恢复原有的空间结构,正常山羊血清室温下封闭 30 min 后,分别加入一抗 1∶100 的 α-SMA、BMP-2、BMP-7 单克隆抗体(购自武汉博士德生物有限公司),4 ℃过夜,次日 PBS 洗 3 次后加入生物素标记的二抗,室温孵育 30 min。加入辣根过氧化物酶标记链霉卵白素,室温孵育 30 min DAB 显色 3 min,苏木精复染。400 倍视野下观察,细胞核呈棕褐色或棕黄色颗粒为阳性。二抗和三抗购自北京中杉公司。阴性对照:用 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.4　图像分析处理

采用真彩色医学图像分析软件(Midia Cybernetics 公司 image-pro-plus 4.5)对免疫组化结果进行半定量分析。每个切片随机选取 8 个视野,均在同一放大倍数(×400)、同一强光下分析。测量相对阳性面积[(即阳性面积/视野)总面积 × 100%],阳性物质灰度值 = 阳性染色面积比 × 平均灰度。取 8 次结果计算均值及标准差。

1.5　统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用统计软件 SPSS 13.0 统计软件处理,行 t 检验。

2　结果

2.1　茜素红染色结果

动脉无明显钙化,静脉为阴性表达。

2.2　HE 染色结果

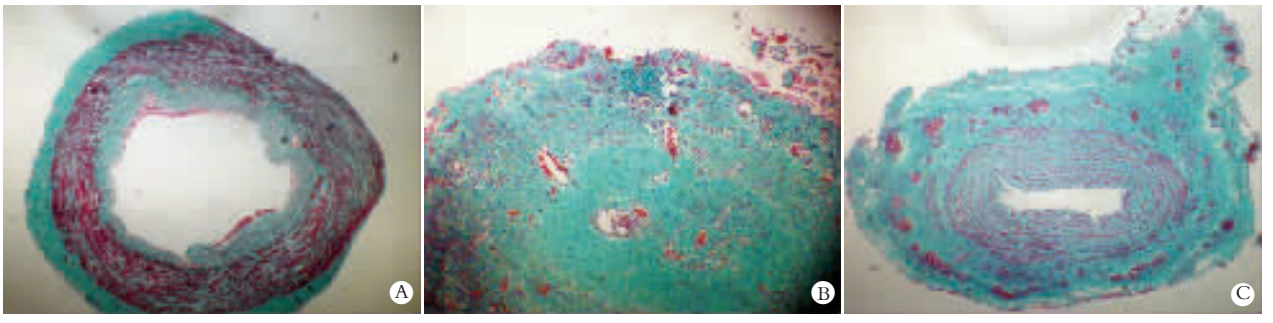
显示正常对照组内膜、中膜、外膜未发现明显异常,而尿毒症组有 4 例患者在头动脉出现改变之前,即出现头静脉明显正常组织结构消失,并有部分静脉出现不同程度纤维化。

2.3　Masson 染色结果

显示正常对照组内膜、中膜、外膜未发现明显异常,而尿毒症组有部分动脉出现中膜增厚,但仍显示 4 例患者在头动脉出现改变之前出现头静脉正常组织结构消失,以内膜变化为主,部分静脉出现不同程度纤维化(图 1)。

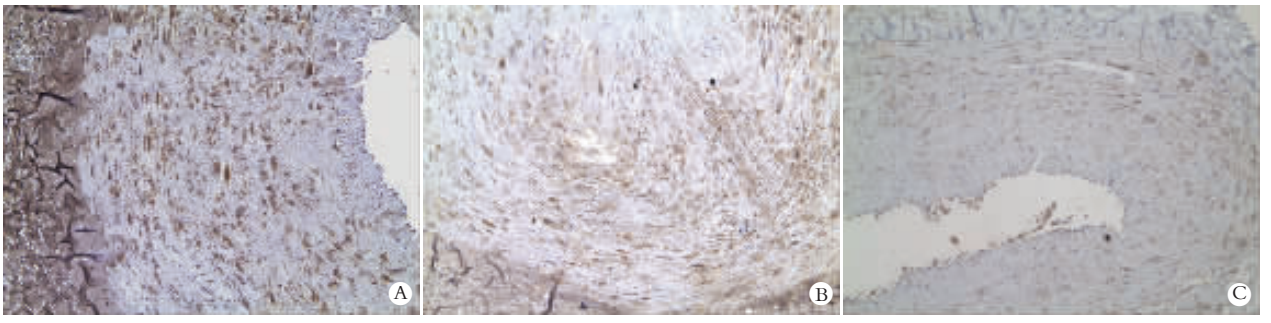
2.4　免疫组化 α-SMA、BMP-2、BMP-7 表达结果

图像分析结果显示 α-SMA、BMP-2 在 CKD 患者静脉的表达中与动脉表达量有显著性差异,并与正常人群的静脉同样有显著性差异($P < 0.05$),BMP-7 动静脉中均以阴性为主,偶有弱阳性,动静脉无显著性差异(表 1,图 2)。



A:尿毒症组动脉;B:尿毒症组静脉;C:正常静脉

图 1　Masson 染色动静脉染色的结果　(Masson 染色 ×40)



A:尿毒症组动脉;B:尿毒症组静脉;C:正常静脉

图 2　α-SMA 动静脉免疫组化染色结果　(S-P ×100)

表1 免疫组化结果比较($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	α-SMA	BMP7	BMP2
动脉(尿毒症)	4 050.75±58.51	2 467.49±409.46	5 020.66±409.46
静脉(尿毒症)	6 261.24±120.23[a]	2 647.92±523.24	3 649.63±523.24[a]
静脉(正常静脉对照组)	2 339.10±246.66	263.47±337.26	2 015.15±211.65

a: $P<0.05$,与正常静脉对照组比较

3 讨论

在CKD的患者中,动脉血管钙化非常普遍,这种改变常从年轻病例中发现,且比一般人群更加严重[3],许多国内外的临床医师及科研工作者都在关注这一现象,对血管钙化的研究多集中在动脉。近年来,我们在临床工作中发现,进行动静脉内瘘成形手术时,肉眼观察下,已发现部分患者在桡动脉尚无明显改变时,头静脉已经发生节段性的变硬,管腔狭窄,甚至完全闭塞,由此推测,并且可能比动脉改变发生的更早。血管包括动脉、静脉和毛细血管3个部分,而在研究心血管疾病血管重塑的时候,焦点大多集中在动脉系统疾病上,认为动脉的改变才是此类患者发生心血管疾病的主要原因[4]。但静脉的改变并少见文献报道,因此本实验通过茜素红钙染色、HE染色、Masson染色分别观察动静脉钙盐沉积情况,纤维化情况及血管的各层结构改变情况,结果提示虽然患者动脉改变不明显,但同时与之伴行的静脉出现较明显的改变,表现为结构层次完全紊乱,中膜、内膜消失,完全纤维化并充填管腔,中间偶有细微小孔供血液流通。所以当出现大量小静脉纤维化时,容易导致回流障碍。如果尿毒症患者心脑等重要生命器官也出现静脉纤维化,那么可直接影响到身体的血液循环变化,进而诱发心力衰竭、心律失常等严重并发症。

CKD患者血管重塑的调节机制比较复杂,是CKD血管重塑研究和中的重点和热点问题,目前尚未阐明,近年来有学者研究认为,其机制主要分为促进和抑制的因子2大类。近年来的研究表明,尿毒症动脉血管中膜钙化与骨的矿化相似[5],是一个受多因素调控的、与骨发生类似的主动的可调节过程。有研究认为随着动脉血管中膜钙化程度的加重,血管平滑肌细胞标记物α-SMA表达明显下调,提示尿毒症患者动脉中膜钙化时血管平滑肌细胞减少,而成骨样细胞增多。而在本研究中显示静脉改变时α-SMA表达并未下调,相反是升高的,其血管明显狭窄,内膜增生,新内膜形成,α-SMA在新生内膜中大量表达,而血管中层则表达减轻,从而证实了在血管病变发生过程中血管平滑肌细胞发生了表型变化,由收缩型向增殖型转化,呈增殖状态,同时分泌大量细胞因子、基质蛋白等,导致血管狭窄,说明动脉与静脉的改变是不同的。近来经研究发现[1,2]造成血管这种特殊的钙化必须具备几个前提,即血管平滑肌细胞转变为具有成骨细胞样特性,加上血管内基质成分失调才可使钙盐沉着其上。不同的因子在CKD血管改变中发挥不同的作用,如BMP-7可以明显减缓此过程,而BMP-2则起相反的作用[6],最后导致趋炎性因子大量积累、异常脂血症等。有人将上述过程比拟为与血管结构重塑相类似的过程[3]。BMP-2是一种强大致血管钙化的蛋白,是重要促进血管钙化的因素。发育中的主动脉和钙化动脉、粥样硬化损伤的内皮细胞中均有BMP-2的表达,是一种强大致血管钙化的蛋白,本实验中免疫组化及免疫荧光显示BMP-2在静脉中也可见阳性。究其原因还需进一步实验及探讨,BMP-7具有细胞因子的特点,用量少而能发挥很大的作用[7],BMP-7可以阻止血管平滑肌细胞向成骨样细胞转化,有实验证明外源性BMP-7可预防血管内膜和中层钙化,BMP-7动静脉中均以阴性为主,偶有弱阳性,尿毒症患者动静脉无明显差异。

血管重塑与尿毒症患者心血管疾病密切相关,因此,探讨血管重塑时各种细胞因子之间的关系,进一步阐明其发生机制,采取有效的预防和治疗措施,降低死亡率,已成为当今基础与临床研究的迫切任务之一。本研究即探讨尿毒症患者中小动、静脉血管病理改变的差异及相关影响因素,对其免疫病理、凋亡相关基因等进行研究,期望发现不同于动脉重塑或硬化的机制,以进一步寻找早期防治的方法,降低尿毒症患者心血管疾病的死亡率。相信如果能够早期发现CKD患者静脉血管重塑、转归等,对于早期干预,并预防心血管相关并发症的诊治有着更为重要的意义。

参考文献:

[1] 付 平,唐万欣. 慢性肾脏病患者血管钙化的诊治进展[J]. 中国血液净化, 2008, 7(5): 233-235.

[2] 郑法雷. 血管保护因子缺乏与慢性肾脏病患者的心血管疾病问题[J]. 中国血液净化, 2005, 4(12): 639-640.

[3] McCullough P A. Evaluation and treatment of coronary artery disease in patients with end-stage renal disease[J]. Kidney Int Suppl, 2005, (95): S51-S58.

[4] 任俊芳,秦旭平. AMPK与心血管重构[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(1):33-36.

[5] Floege j, Ketteler M. Vascular calcification in patients with end-stage renal disease[J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, (19 Suppl 5): V59-V66.

[6] 林善锬. 肾素-血管紧张素系统在肾脏病心血管并发症发生机制中值得注意的一些新认识[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(25): 1729-1731.

[7] White A P, Vaccaro A R, Hall J A, *et al*. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion[J]. Int Orthop, 2007, 31(6): 735-741.

(编辑 王 红)