

内皮细胞标记物及间充质细胞 /肌成纤维细胞标记物在动静脉内瘘狭窄血管中的表达

宁海欢,卓华钦,荣光,叶庆邦
(东莞市第三人民医院肾内科,广东 东莞 523000)

【摘要】 目的 研究内皮细胞标记物及间充质细胞/肌成纤维细胞标记物在动静脉内瘘狭窄血管中的表达情况。方法 选取 2015 年 1 月至 2016 年 12 月间在东莞市第三人民医院肾内科接受治疗的尿毒症患者 60 例,在重建内瘘手术中截取狭窄内瘘静脉血管作为狭窄血管组,选取同期在本院就治疗或者新发现尿毒症患者 40 例,在内瘘成形手术中截取正常静脉血管作为正常血管组;两组分别进行 α -SMA 与 CD31/vWF 免疫荧光双染,寻找两个抗体同时表达细胞。结果 狭窄血管组免疫荧光的染色显示中膜的平滑肌细胞和内膜下的增生肌成纤维细胞内均有 α -SMA 表达,内皮细胞内有 CD31/vWF 表达,有 3 例显示内皮细胞同时有 α -SMA 与 vWF 表达,但却未见 CD31 表达;正常血管组中 27 例标本免疫染色显示中膜的平滑肌细胞和已有内膜下的增生肌成纤维细胞内有 α -SMA 表达,内皮细胞有 CD31/vWF 表达,但没有发现 α -SMA 与 CD31/vWF 同时表达细胞。结论 肌肉纤维细胞主要来源为内皮细胞-间充质细胞的转分化,长期尿毒症患者本身静脉血管内可能已有新生内膜增生存在。

【关键词】 内瘘血管狭窄;间充质细胞;内皮细胞;尿毒症

【中图分类号】 R543 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)07-0898-03

Expression of endothelial cell marker and mesenchymal cells/myofibroblast marker in the veins with arteriovenous internal fistula stenosis. NING Hai-huan, ZHUO Hua-qin, RONG Guang, YE Qing-bang. Department of Nephrology, the Third People's Hospital of Dongguan, Dongguan 523000, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To study the clinical expression of endothelial cell markers and mesenchymal cells/myofibroblast marker in the veins with arteriovenous internal fistula stenosis. **Methods** Veins with arteriovenous internal fistula stenosis collected in the reconstruction of internal fistula from 60 patients with uremia treated in Department of Nephrology in the Third People's Hospital of Dongguan from January 2015 to December 2016 were enrolled as stenotic group. Normal venous vessels collected from 40 patients with uremia treated in the hospital or newly discovered during the same period were used as normal group. The vessels in the two groups were treated with double immunofluorescence staining with alpha-SMA and CD31/vWF, and the cells expressing both the two antibodies were observed. **Results** In the stenotic group, immunofluorescence staining showed expression of alpha-SMA in media smooth muscle cells and intima proliferative myofibroblast, CD31/vWF expression in endothelial cells, and expression of both alpha-SMA and vWF in endothelial cells of 3 cases but without CD31 expression. In normal group, immunofluorescence staining of 27 specimens expression of alpha-SMA in media smooth muscle cells and intima proliferative myofibroblast, expression of CD31/vWF in endothelial cells, with no cells having both alpha-SMA and CD31/vWF expression. **Conclusion** Muscle fiber cells are mainly from the endothelial cells-mesenchymal transdifferentiation. Long-term uremia patients may already have neointimal hyperplasia in the vein.

【Key words】 Internal fistula vascular stenosis; Mesenchymal cells; Endothelial cells; Uremia

尿毒症患者行规律性血透基础是血管径路的功能良好,当前动静脉内瘘为临床较为常用血管的径路方式,患者常见并发症为内瘘血管的狭窄,同时也是致使患者内瘘闭塞,并失去功能的主要因素^[1]。患者内瘘狭窄主要原因是出现了大量的肌成纤维细胞,但肌成纤维细胞出现的原因尚不完全清楚。相关研究显示,肌成纤维细胞出现包含以下几种因素,一是患者骨髓来源成纤维细胞前体细胞招募;二是内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)和转化的生长因子(transforming

growth factor β , TGF- β)引起上皮细胞与间充质细胞的转分化(endothelial to mesenchymal transition, EndoMT);三是受到损伤的血管或组织内成纤维细胞发生增殖、迁移与激活。而经过细胞的追踪分析已验证,机体内肾脏、肺和心脏发生纤维化的主要机制可能为 EndoMT,这也可能是纤维化疾病治疗的一个新靶向^[2-3]。因此,本文通过探讨内皮细胞标记物及间充质细胞/肌成纤维细胞标记物在动静脉内瘘狭窄血管中的临床表达情况,为患者的诊疗提供一些新思路。

基金项目:广东省东莞市社会科技发展(重点/一般)项目(编号:201750715024134)

通讯作者:卓华钦。E-mail:29899466@qq.com

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2015年1月至2016年12月间在东莞市第三人民医院肾内科接受治疗的尿毒症患者60例,其中男性43例,女性17例,平均年龄(62.1±10.5)岁,所有患者经过影像学检测显示有狭窄血管或者血透的流量降低,在重建内瘘的手术中截取狭窄内瘘静脉的血管作为狭窄血管组;选取同期在本院就诊或者新发现尿毒症的患者40例,其中男性29例,女性11例,平均年龄(60.4±8.5)岁,在内瘘成形手术中截取正常静脉血管作为正常血管组。两组患者的年龄、性别等资料比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 主要设备及试剂 (1)主要设备:自动组织的包埋机(型号:ZMN-7803,由孝感阔海医疗公司生产),孵育盒、盖玻片、防脱磨砂的载玻片(由北京中杉金桥公司生产),微波炉(由美的公司生产),石蜡切片机(型号:HM340E,由孝感阔海医疗公司生产),塑料染色架、修复盒(由北京中杉金桥公司生产),荧光显微镜(型号:DFM-70C,由上海万衡精密仪器公司生产)。(2)主要试剂:无水乙醇、磷酸盐缓冲液(PBS)(由北京中杉金桥公司生产),CD31抗体(由美国Abbiotec公司生产),柠檬酸盐、二甲苯(由北京中杉金桥公司生产),DAPI(由美国Vector公司生产),荧光素二抗(由美国Jackson公司生产), α -SMA(由丹麦DAKO公司生产)。

1.3 试验方法 (1)免疫荧光双染^[4]:脱蜡水化,使用高温柠檬酸盐行抗原的修复,50%的胎牛血清(FBS)在室温下封闭1h,一抗CD31/vWF在4℃下过夜;使用PBS缓冲液冲洗3次, α -SMA室温孵育2h,PBS缓冲液3次;荧光素二抗,室温孵育1h,PBS缓冲液3次,2.4.6DAPI 6 L,封片。(2)荧光显微镜:扫描样本,对荧光抗体进行监测,使用计算机收集图像。

1.4 观察指标 观察正常血管和狭窄血管内皮细胞、成纤维细胞和间充质细胞表达情况。

2 结果

2.1 正常血管组检测情况 13例标本的免疫染色显示平滑肌细胞有 α -SMA的表达,内皮细胞有CD31/vWF表达,但未发现同时表达 α -SMA和CD31/vWF细胞,见图1和图2。27例标本的免疫染色显示中膜的平滑肌细胞和已有内膜下的增生肌成纤维细胞内有 α -SMA的表达,内皮细胞有CD31/vWF的表达,但未发现 α -SMA与CD31/vWF同时表达的细胞,见图3和图4。

2.2 狭窄血管组检测情况 免疫荧光的染色显示中膜的平滑肌细胞和内膜下的增生肌成纤维细胞内均有 α -SMA的表达,内皮细胞内有CD31/vWF的表达,有3例显示内皮细胞同时有 α -SMA与vWF的表达,但却未见CD31表达,见图5和图6。

8例免疫荧光的染色显示中膜的平滑肌细胞内有 α -SMA的表达,内皮细胞有vWF的表达,内膜的增生

组织内 α -SMA的染色不显著,而且细胞核的染色比周围的更稀疏,见图7。

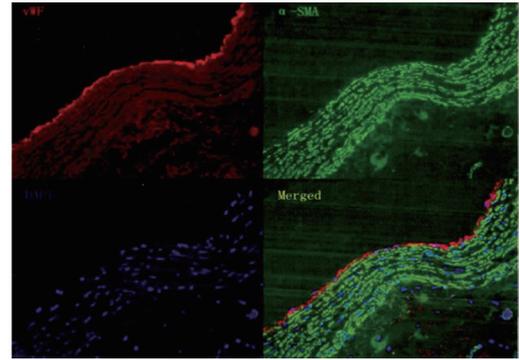


图1 正常的静脉血管内 α -SMA与vWF表达情况($\times 40$)
注:绿色为 α -SMA的荧光素二抗,红色为vWF的荧光素二抗。

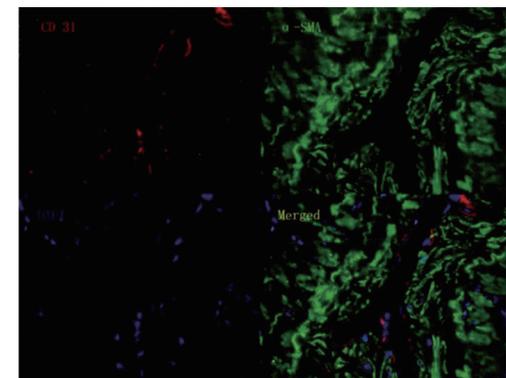


图2 正常的静脉血管内 α -SMA与CD31表达情况($\times 100$)
注:绿色为 α -SMA的荧光素二抗,红色为CD31的荧光素二抗。

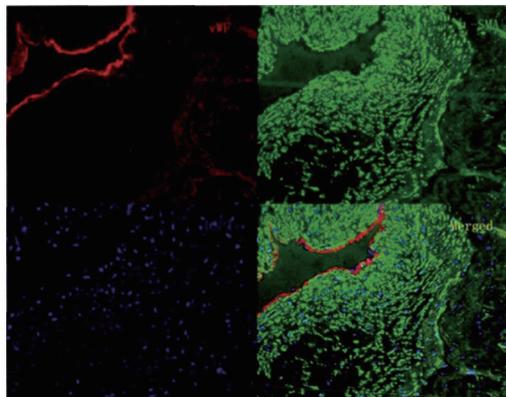


图3 正常的静脉血管内 α -SMA与vWF表达情况($\times 40$)
注:绿色为 α -SMA的荧光素二抗,红色为vWF的荧光素二抗。

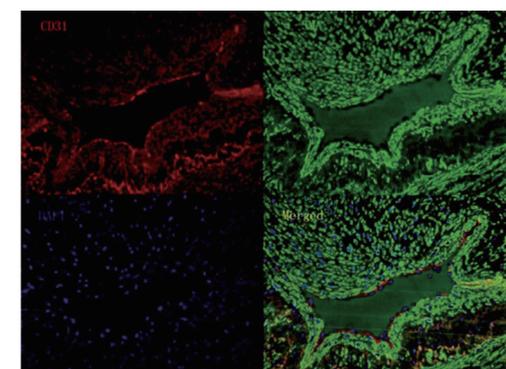


图4 正常的静脉血管内 α -SMA与CD31表达情况($\times 40$)
注:绿色为 α -SMA的荧光素二抗,红色为CD31的荧光素二抗。

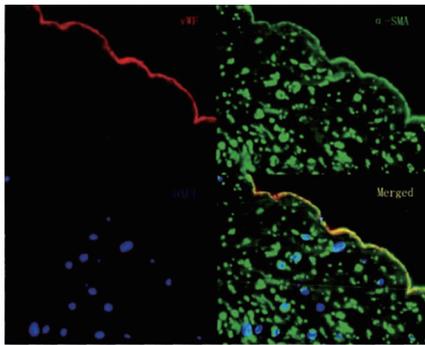


图5 狭窄的静脉血管内 α -SMA与vWF的表达($\times 100$)

注:绿色为 α -SMA的荧光素二抗,红色为vWF的荧光素二抗。

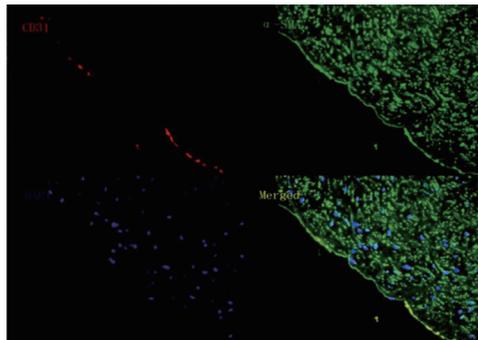


图6 狭窄的静脉血管内 α -SMA与CD31的表达($\times 40$)

注:绿色为 α -SMA的荧光素二抗,红色为CD31的荧光素二抗。图内红色是红细胞非特异性的染色。

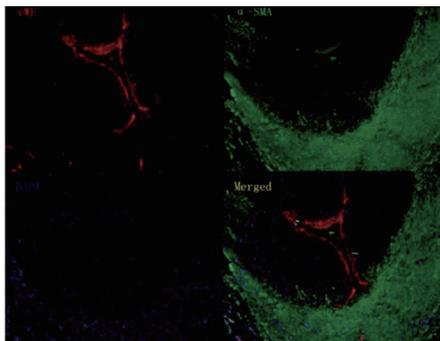


图7 狭窄的静脉血管内 α -SMA与vWF的表达($\times 10$)

注:绿色为 α -SMA的荧光素二抗,红色为vWF的荧光素二抗。

3 讨论

尿毒症患者终身都需要进行血液透析来保持生命,但患者血管径路功能需良好,这也是尿毒症患者“生命线”^[5-6]。目前关于内瘘血管变狭窄影响机制尚不完全清楚,所以缺少有效诊断手段^[7-9]。相关研究显示,无论移植血管内瘘还是自身内瘘,都是由于新生内膜增生而造成狭窄,表现特征是细胞外基质发生沉积、形成微血管和出现肌成纤维细胞^[10]。

上皮细胞和内皮细胞可塑性近似,其中内皮细胞可塑性对疾病的进展与胚胎发育非常重要,相关一些研究显示,在创口愈合、肿瘤相关性纤维化、肺动脉高压、心肾纤维化和动脉粥样硬化等中都可能存在EndMT过程^[11-13]。在EndMT中,内皮细胞特异性的标记物(如vWF、CD31等)表达慢慢失去,获取了肌肉纤维细胞/间充质细胞标记物(α -SMA、FSP-1等)和转移、

扩散能力^[14-15]。本文研究中,60例狭窄血管标本中只有3例看到了 α -SMA与vWF同时表达细胞。这3例标本均是复查时显示内瘘狭窄患者,没有任何临床症状。在显微镜下可以发现,3例患者血管的内膜下均充满了形状不规则肌成纤维细胞而且表达 α -SMA,内皮细胞层有一段内明显表达 α -SMA。说明在患者动静脉内瘘的狭窄进展中,EndMT过程确实存在,且对前期内瘘的狭窄有重要影响。本文截取的40例正常血管标本内有27例静脉已表现出新生内膜增生,其中有9例行血液的透析治疗3年。说明即便患者进行规律血液的透析,长期发展仍会导致内瘘的静脉血管出现新生的内膜增生,发生这一现象需要考虑与患者体内环境的变化有联系。

综上所述,肌肉纤维细胞主要来源为内皮细胞-间充质细胞转分化,并参加了动静脉的内瘘血管狭窄进程;长期尿毒症患者本身静脉血管内可能已有新生内膜增生存在。

参考文献

- [1] 段宏宇,陈晓春.骨髓间充质干细胞对血管成形术后再狭窄的影响[J].中国心血管杂志,2015,15(6):482-483.
- [2] 袁心刚,范顺阳,石磊,等.人骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞的诱导分化[J].山东医药,2014,50(26):71-72.
- [3] 徐东芝.内皮细胞-间充质细胞转分化在动静脉内瘘狭窄中的意义[D].杭州:浙江大学,2013.
- [4] Zaragatski E, Grommes J, Schurgers LJ, et al. Vitamin K antagonism aggravates chronic kidney disease-induced neointimal hyperplasia and calcification in arterialized veins: role of vitamin K treatment? [J]. Kidney Int, 2016, 89(3): 601-611.
- [5] 范越.骨髓间充质干细胞过表达ACE2对心肌细胞和内皮细胞的保护作用[D].南京:南京医科大学,2015.
- [6] 李聪,郝旭,周桥,等.尿毒症患者血清对体外培养的血管内皮细胞的损伤作用[J].上海交通大学学报(医学版),2014,31(7):900-904.
- [7] Maiodna E, Ambekar S, Johnson JN, et al. Dialysis arteriovenous fistula causing subclavian steal syndrome in the absence of subclavian artery stenosis [J]. Case Rep Vasc Med, 2015, 2015: 720684.
- [8] 于海波.剪切力对动静脉内瘘血管内皮细胞的影响[D].天津:天津医科大学,2016.
- [9] 梁新,吴军,韦杏雪,等.尿毒症血清蛋白对血管内皮细胞的损伤作用[J].第三军医大学学报,2014,36(24):2485-2488.
- [10] Kirkpantur A, Balci M, Turkvatan A, et al. Independent association between serum sclerostin levels and carotid artery atherosclerosis in prevalent haemodialysis patients [J]. Clin Kidney J, 2015, 8(6): 737-743.
- [11] 胡留霞.尿毒症患者内瘘侧静脉狭窄的介入治疗与护理[J].医药前沿,2014,55(31):251-257.
- [12] 李宁.甲状腺激素在尿毒症中诱导血管内皮细胞间质转化的作用和机制研究[D].重庆:第三军医大学,2014.
- [13] Fischer EC, Zócalo Y, Galli C, et al. Arterial Stiffness and Renal Replacement Therapy: A Controversial Topic [J]. Int J Nephrol, 2015, 2015: 729609.
- [14] Brahmabhatt A, Remuzzi A, Franzoni M, et al. The molecular mechanisms of hemodialysis vascular access failure [J]. Kidney Int, 2016, 89(2): 303-316.
- [15] 鄢艳,占丹丹,苏晓霞,等.壳聚糖对尿毒症患者血管平滑肌细胞增生的抑制作用及其机制[J].中华肾脏病杂志,2016,32(8):598-603.

(收稿日期:2017-10-23)