

- (5):495-498.
- [5] Li L, Zhang X, Yi Z, et al. MiR-503 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells by regulating PDCD4 [J]. J BUON, 2018, 23(3):579-586.
- [6] Liu F, Song D, Wu Y, et al. MiR-155 inhibits proliferation and invasion by directly targeting PDCD4 in non-small cell lung cancer [J]. Thorac Cancer, 2017, 8(6):613-619.
- [7] West AC, Tang K, Tye H, et al. Identification of a TLR2-regulated gene signature associated with tumor cell growth in gastric cancer [J]. Oncogene, 2017, 36(36):5134-5144.
- [8] 段彦, 孙志刚, 李先乘, 等. 肾透明细胞癌中 microRNA21 和 PDCD4 的表达和生物学意义 [J]. 临床军医杂志, 2015, 43(11):813-816.
- [9] Afonja O, Juste D, Das S, et al. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/nru antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis [J]. Oncogene, 2004, 23(49):8135-8145.
- [10] 戴小丽, 张清, 邱静, 等. PDCD4 和凋亡抑制因子 Livin 在 TNBC 组织中的表达及与预后的相关性研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47(10):1332-1335.
- [11] 王少春, 陈东风, 曹长军, 等. 乳腺癌患者超声钼靶 X 线表现及分子生物学指标临床观察 [J]. 济宁医学院学报, 2013, 36(4):261-271.
- [12] 姜文彬, 任甫. 乳腺浸润性导管癌超声征象与生物学指标相关性的研究 [J]. 中国临床医学影像杂志, 2017, 28(2):89-94.
- [13] 钟李长, 谷丽萍, 马方, 等. 乳腺浸润性导管癌超声声像图特征与 ER、PR、Ki-67 阳性率的关系研究 [J]. 肿瘤影像学, 2019, 28(1):13-14.
- [14] 陈雁威, 于韬. 高频超声在乳腺微小结节良恶性鉴别诊断中的应用价值 [J]. 中国临床医学影像杂志, 2013, 24(2):93-95.

(收稿日期:2019-04-10)

(本文编辑:卜明)

高磷血症对终末期肾脏病的桡动脉钙化的促进作用

贡铁凯 吴耀俊 谭俊华 钟伟 金小彦

【摘要】 目的 研究高磷血症在终末期肾脏病患者桡动脉钙化中的作用。方法 选择 2016 年 7 月—2017 年 10 月本院血液净化中心首次血透的终末期肾病 (ESRD) 患者 30 例作为研究对象, 根据血磷浓度将患者分为对照组 (血磷 ≤ 1.6 mmol/l) 和高磷组 (血磷 > 1.6 mmol/l) 两组, 每组各 15 例。检测两组患者的电解质、甲状旁腺激素、生化及脂质等指标。取 ESRD 患者首次动静脉内瘘手术时边缘切除的桡动脉组织, 免疫组化染色观察 ALP 在桡动脉组织中的表达, 茜素红染色观察桡动脉组织钙化情况。结果 与对照组比较, 高磷组 ESRD 患者的桡动脉钙化明显增加, 高磷组 ALP 表达增加 ($P < 0.05$)。结论 高磷血症促进 ESRD 患者的桡动脉钙化的形成。

【关键词】 高磷血症; 桡动脉钙化; 终末期肾病

[中图分类号] R692.5 [文献标识码] A DOI: 10.3969/j.issn.1002-1256.2019.18.003

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD) 患者最主要的严重并发症, 而血管钙化在 ESRD 患者中广泛存在, 是心血管疾病发生发展的重要因素^[1]。流行病学研究已经证实, ESRD 患者的血管钙化比正常人出现早且更严重。大约 50% 的患者在透析前易出现不同程度的血管钙化^[2]。钙磷代谢紊乱与甲状旁腺功能亢进是 ESRD 患者血管钙化的重要危险因素, 而很多患者在透析前已经存在高磷血症。本研究以首次进入透析前的 ESRD 患者的桡动脉为研究对象, 收集 ESRD 患者动静脉内瘘手术时切除的桡动脉组织标本, 通过 ALP 免疫组化染色和茜素红染色评估高磷血症在 ESRD 桡动脉钙化中的作用。

一、资料和方法

1. 研究对象: 选择 2016 年 7 月—2017 年 10 月在本院血液净化中心首次血透的 30 例 ESRD 患者作为研究对象, 根据血磷浓度将患者分为正常对照组 (血磷 ≤ 1.6 mmol/l) 和高磷血症组 (血磷 > 1.6 mmol/l) 两组, 每组各 15 例。本研究在丹阳市人民医院伦理委员会监督及患者知情同意情况下进行, 伦理证书编号为 2016016。

2. 组织标本: 取 ESRD 患者动静脉内瘘手术时切除的边缘桡动脉组织, 经 4% 甲醛溶液固定, 常规脱水、石蜡包埋, 将石蜡包块连续切片。

3. 临床生化检验: 采集两组患者的静脉血样本, 采用 COULTER AU5800 全自动生化分析仪 (美国 BECKMAN) 检测磷 (硫酸亚铁磷钼蓝比色法)、总蛋白、白蛋白、三酰甘油、总胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、载脂蛋白 A1、载脂蛋白 B、Lpa、钙; 免疫

发光法检测甲状旁腺素水平;血液分析仪检测红细胞、血红蛋白;采用 BNII 全自动蛋白分析仪检测 C-反应蛋白(C-reactive Protein, CRP)。

4. 茜素红染色:4 μm 石蜡切片脱蜡至水,加入茜素红染色液(1:5,凯基生物)室温避光孵育 30 秒,双蒸水冲洗,脱水、透明、封片,200 倍光镜观察。

5. 免疫组化染色:4 μm 石蜡切片脱蜡至水,2% EDTA 微波加热抗原修复 10 min,内源性过氧化物酶阻断剂孵育 10 min,10% 羊血清室温孵育 10 min,加一抗:ALP 抗体(1:200, Santa Cruz),置湿盒 4 °C 孵育过夜;生物素标记的 IgG、链霉菌抗生物素蛋白(免疫组化试剂盒,福州迈新)分别孵育 10 min, DAB 显色(显微镜下控制显色时间), Mayer 苏木精染色,脱水、透明、封片,400 倍光镜观察,每组随机抽取 5 例患者进行阳性染色区域的半定量分析。每张切片随机选取 5 个视野,应用 Image-Pro Plus 软件进行吸光度测量,取平均值作为该切片的吸光度值。

6. 统计学处理:采用 SPSS 23.0 软件行统计学处

理。符合正态分布计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较进行 *t* 检验;非正态分布计量资料用四分位数[M(1/4, 3/4)]表示,组间比较进行 Mann-Whitney U 检验。相关性分析采用 Spearman 相关分析或 Pearson 相关分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 临床资料:两组患者的年龄、体重、体重指数、红细胞、血红蛋白、总蛋白、白蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、载脂蛋白 A、载脂蛋白 B、甲状旁腺激素、血钙、钙磷乘积等临床指标比较,差异均无统计学意义(均 *P*>0.05),见表 1。

2. 高磷血症促进 ESRD 患者桡动脉组织钙化形成:茜素红染色显示,与对照组相比,高磷组桡动脉组织钙化明显加重,且以中膜钙化为主。见图 1。

3. 高磷血症促进桡动脉组织中 ALP 表达明显增加:ALP 免疫组化染色显示,与对照组相比,高磷组桡动脉组织中 ALP 表达明显。见图 2。

表 1 两组患者基本临床资料比较

| 项目 | 对照组(<i>n</i> =15) | 高磷组(<i>n</i> =15) | <i>P</i> 值 |
|--|--------------------|---------------------|------------|
| 年龄($\bar{x} \pm s$, 岁) | 56.4±9.2 | 51.4±12.1 | 0.213 |
| 体重($\bar{x} \pm s$, kg) | 60.47±10.79 | 58.69±8.08 | 0.613 |
| 体重指数($\bar{x} \pm s$, kg/m ²) | 21.57±2.85 | 21.32±2.33 | 0.797 |
| 腰围($\bar{x} \pm s$, cm) | 83.67±13.4 | 80.3±8.26 | 0.414 |
| C 反应蛋白[M(1/4, 3/4), mg/L] | 3.2(1.7, 17.4) | 3.1(1.0, 4.8) | 0.983 |
| 血红蛋白($\bar{x} \pm s$, g/L) | 81.47±16.93 | 83±24.18 | 0.842 |
| 红细胞计数($\bar{x} \pm s$, ×10 ¹²) | 2.68±0.53 | 2.79±0.66 | 0.620 |
| 总蛋白($\bar{x} \pm s$, g/L) | 57.9±9.58 | 61.8±10.96 | 0.305 |
| 白蛋白($\bar{x} \pm s$, g/L) | 30.23±7.63 | 31.79±7.05 | 0.567 |
| 谷丙转氨酶($\bar{x} \pm s$, U/L) | 19.84±14.93 | 16.71±10.08 | 0.507 |
| 谷草转氨酶($\bar{x} \pm s$, U/L) | 17.54±8.3 | 18.78±8.23 | 0.684 |
| 甘油三酯($\bar{x} \pm s$, mmol/L) | 1.47±0.87 | 1.48±0.85 | 0.973 |
| 胆固醇($\bar{x} \pm s$, mmol/L) | 1.21±0.81 | 4.6±0.91 | 0.227 |
| 低密度脂蛋白($\bar{x} \pm s$, mmol/L) | 2.29±0.59 | 2.55±0.6 | 0.245 |
| 高密度脂蛋白($\bar{x} \pm s$, mmol/L) | 1.09±0.41 | 1.07±0.37 | 0.875 |
| 脂蛋白 a($\bar{x} \pm s$, mmol/L) | 540.2±354.7 | 490.1±299.5 | 0.679 |
| 钙($\bar{x} \pm s$, mmol/L) | 2.08±0.2 | 2.02±0.3 | 0.489 |
| iPTH[M(1/4, 3/4), ng/L] | 144.5(92.3, 355.4) | 248.5(113.3, 302.6) | 0.694 |

注:对照组(血磷≤1.6 mmol/l);高磷组(血磷>1.6 mmol/l)

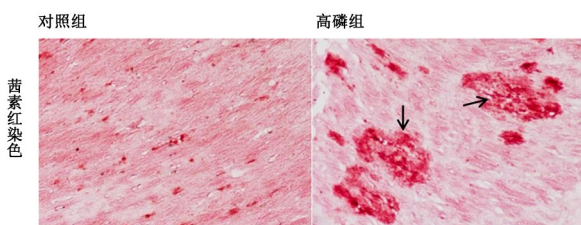


图 1 高磷组的桡动脉钙化增加(茜素红染色×200)

讨论 ESRD 患者的 CVD 发病率和致死率均比正常人群明显增高^[3],而血管钙化是 CVD 的重要危险因素。ESRD 患者的血管钙化存在内膜钙化和中膜钙化两种类型,临床研究显示中膜钙化是 ESRD 患者血管钙化的早期特征^[4],中膜钙化主要发生于血管中膜,弥散分布于整个血管,导致血管顺应性降低、血流动力学异常。ALP 是成骨活动的正相关指标,已有研究显示,组织中出现钙化与 ALP 的表达和细胞外基质纤维密切相关^[5]。本研究主要通过茜素

红染色观察高磷血症与 ESRD 桡动脉钙化的关系,并通过观察高磷血症与桡动脉组织中 ALP 的表达,进一步评估高磷血症促进 ESRD 桡动脉钙化的关系。

本研究选取初次进行血透的 ESRD 患者作为研究对象,基线资料显示,两组患者之间除了血磷水平有差异,其它各项临床资料基本一致,满足设立对照时的“均衡”原则,减少了非实验因素的干扰,便于准确地评估高磷血症在 ESRD 桡动脉钙化中的作用。本研究观察到高磷血症组的血管钙化明显加重,且多位于中膜;高磷组的桡动脉组织中 ALP 表达也明显增加,与对照组比较有统计学意义,进一步提示血磷浓度的增高促进钙化程度加重。

研究证实,动脉中膜主要由血管平滑肌和细胞外基质构成,在高磷血症刺激下,血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 转分化为类成骨细胞,并表达骨涎蛋白、骨钙素和 ALP 等,转分化的 VSMC 能主动沉积羟基磷灰石,形成血管钙化。ALP 可水解焦磷酸,解除其对钙化的抑制作用,并为钙化形成提供了原料。Johnson 等对离体大鼠主动脉的研究显示,在其培养基中加入 ALP 可诱发血管钙化,而焦磷酸盐则可抑制钙化的形成^[6],证实磷酸/焦磷酸的比率可调节钙化的形成。Speer 等的研究证实基质 Gla 蛋白 (matrix Gla protein, MGP) 基因缺陷小鼠的血管钙化部位的软骨细胞绝大部分来源于 VSMC,证实了 VSMC 可向软骨细胞的转分化^[7]。而对于磷在血管钙化中的作用,临床研究证实高磷血症是 ESRD 患者血管钙化的高危因素,临床应用磷结合剂后可观察到血管钙化的延缓,进一步证实高磷促进血管钙化。研究观察到培养的 VSMC 细胞予高磷处理后出现钙化,当钠磷协同转运子 PIT-1 表达下调,磷酸盐入胞受抑制后,钙化随即也受到抑制,当 PIT-1 表达上调时钙化加重,提示磷可直接促进血管钙化^[8]。成纤维细胞生长因子 23 (fibroblast growth factor-23, FGF-23) 可抑制肾脏对磷酸盐的重吸收,低磷饮食能够减轻 FGF-23 缺陷小鼠的高磷血症和血管钙化。

综上所述,本研究证实,高磷血症能够促进 ESRD 桡动脉中膜钙化,且血磷促进钙化的程度与血磷浓度呈正相关。由于 ESRD 患者的血管钙化由多

因素介导,而高磷在其中扮演的角色和具体的细胞机制,仍需进一步研究明确。

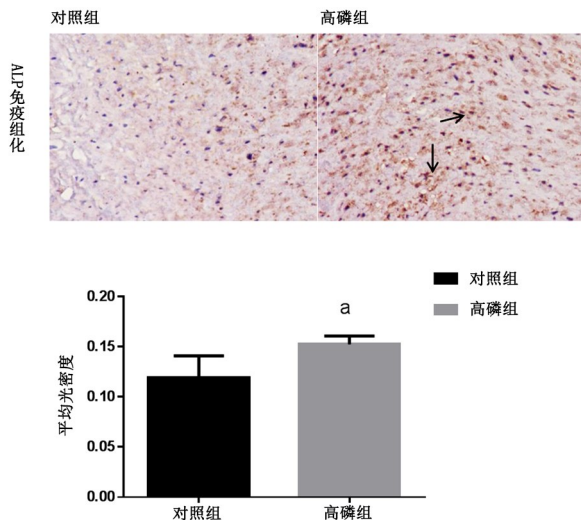


图2 高磷组桡动脉组织中 ALP 表达增加,与对照组比较 $aP < 0.05$ (免疫组化 $\times 200$)

参 考 文 献

- [1] Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification [J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(9): 528-536.
- [2] Tomiyama C, Carvalho AB, Higa A, et al. Coronary calcification is associated with lower bone formation rate in CKD patients not yet in dialysis treatment [J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(3): 499-504.
- [3] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease [J]. Am J Kidney Dis, 1998, 32(5 Suppl 3): S112-119.
- [4] London GM, Guerin AP, Marchais SJ, et al. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality [J]. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(9): 1731-1740.
- [5] Murshed M, Harmey D, Millan JL, et al. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone [J]. Genes Dev, 2005, 19(9): 1093-104.
- [6] Johnson K, Pdewski M, Van Etten D, et al. Chondrogenesis mediated by PPi depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1^{-/-} mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(4): 686-691.
- [7] Speer MY, Yang HY, Brabb T, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries [J]. Circ Res, 2009, 104(6): 733-741.
- [8] Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, et al. Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism [J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(4): 911-916.

(收稿日期:2019-04-17)

(本文编辑:隋会敏)