

血管疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002120

高压氧下调 HIF-1 α 表达抑制动静脉内瘘内膜增生的研究

王寒琛, 李 追, 李相杰, 张 矛

(重庆医科大学附属第一医院血管外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究高压氧疗法(hyperbaric oxygen, HBO) 对于动静脉内瘘(arteriovenous fistula, AVF)的静脉内膜增生(venous neointimal hyperplasia, VNH)的影响。**方法:**36 只健康新西兰兔随机分为 3 组(每组 12 只), 分别为肾衰假手术组(假手术组)、肾衰动静脉内瘘高压氧干预组(实验组)、肾衰动静脉内瘘组(对照组)。各组均以腺嘌呤诱导的方式建立慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)模型, 实验组、对照组新西兰兔建立 AVF, 并对实验组进行高压氧治疗。分别于开始 HBO 干预后第 7、14、28 天各组截取 4 只新西兰兔 AVF 静脉段血管, 用 HE 染色评估各组内膜厚度, 免疫组织化学技术和 Western blot 检测缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的表达。**结果:**①28 d 时, 假手术组未观察到 AVF 静脉端静脉内膜增生, 实验组、对照组平均静脉内膜增生厚度分别为(0.200 5 $\pm$ 0.034 0)和(0.351 4 $\pm$ 0.062 0) mm, 3 组静脉内膜增生厚度差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。②28 d 假手术组、对照组、实验组 HIF-1 α 平均光密度(mean optical density, MOD)分别为 0.003 1 $\pm$ 0.000 8、0.201 6 $\pm$ 0.046 1、0.099 1 $\pm$ 0.027 6, 3 组 HIF-1 α MOD 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。③28 d 假手术组、对照组、实验组 VEGF 分别为 0.008 3 $\pm$ 0.001 9、0.214 3 $\pm$ 0.052 6、0.105 1 $\pm$ 0.040 6。3 组 VEGF MOD 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。④28 d 假手术组、对照组、实验组 MMP-2 MOD 分别为 0.005 1 $\pm$ 0.014 6、0.238 4 $\pm$ 0.090 3、0.109 0 $\pm$ 0.041 5, 3 组 MMP-2 MOD 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。⑤28 d 假手术组、对照组、实验组 HIF-1 α 表达水平分别为 0.114 9 $\pm$ 0.010 2、0.193 7 $\pm$ 0.016 6、0.151 0 $\pm$ 0.018 5, 3 组 HIF-1 α 表达水平差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。⑥28 d 假手术组、对照组、实验组 VEGF 表达水平分别为 0.093 7 $\pm$ 0.011 6、0.214 3 $\pm$ 0.052 6、0.238 6 $\pm$ 0.008 3。3 组 VEGF 表达水平差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。⑦28 d 假手术组、对照组、实验组 MMP-2 表达水平分别为 0.121 6 $\pm$ 0.010 4、0.229 5 $\pm$ 0.026 0、0.175 5 $\pm$ 0.011 8, 3 组 MMP-2 MOD 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论:**HBO 治疗对于 AVF 组织内的 HIF-1 α 、VEGF、MMP-2 表达及血管内膜增生有明显的抑制作用。

【关键词】高压氧; 动静脉内瘘; 慢性肾衰; 静脉内膜增生

【中图分类号】Q95-23

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-07-11

Hyperbaric oxygen downregulates hypoxia-inducible factor-1 α and inhibits venous neointimal hyperplasia of arteriovenous fistula: an experimental study

Wang Hanchen, Li Zhui, Li Xiangjie, Zhang Mao

(Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of hyperbaric oxygen(HBO) on venous neointimal hyperplasia(VNH) of arteriovenous fistula(AVF). **Methods:** A total of 36 healthy New Zealand rabbits were randomly divided into sham-operation+renal failure group (sham-operation group), renal failure+AVF+HBO intervention group(experimental group), and renal failure+AVF group(control group), with 12 rabbits in each group. A model of chronic renal failure was established by adenine induction; the rabbits in the experimental group and the control group were used to establish a model of AVF, and those in the experimental group were given HBO therapy. Four rabbits were selected from each group on days 7, 14, and 28 of HBO intervention, and the vessels of the vein with AVF were collected. HE staining was performed to evaluate intimal thickness, and immunohistochemistry and Western blot were used to measure the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor(VEGF), and matrix metalloproteinase-2(MMP-2). **Results:** On day 28, VNH was not observed in the sham-operation group, and the mean thickness of VNH was 0.200 5 $\pm$ 0.034 0 mm in the experimental group and 0.351 4 $\pm$ 0.062 0 mm in the control group; there was a significant difference in the thickness of VNH between the three groups. On day 28, there was a significant difference in HIF-1 α MOD between the sham-op-

eration group, the control group, and the experimental group (0.003 1 $\pm$ 0.000 8 vs. 0.201 6 $\pm$ 0.046 1 vs. 0.099 1 $\pm$ 0.027 6, $P<0.05$). On day 28, VEGF MOD was 0.008 3 $\pm$ 0.001 9 in the sham-operation group, 0.214 3 $\pm$ 0.052 6 in the control group, and 0.105 1 $\pm$ 0.040 6 in the experimental group, and there was

作者介绍:王寒琛, Email: 1102383825@qq.com,

研究方向: 动静脉内瘘早期功能障碍发生机制。

通信作者:张 矛, Email: zbysz1118@126.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190614.1552.002.html>

(2019-06-17)

a significant difference in VEGF MOD between the three groups ($P<0.05$). On day 28, MMP-2 MOD was $0.005\ 1 \pm 0.014\ 6$ in the sham-operation group, $0.238\ 4 \pm 0.090\ 3$ in the control group, and $0.109\ 0 \pm 0.041\ 5$ in the experimental group, and there was a significant difference in MMP-2 MOD between the three groups ($P<0.05$). On day 28, the expression level of HIF-1 α was $0.114\ 9 \pm 0.010\ 2$ in the sham-operation group, $0.193\ 7 \pm 0.016\ 6$ in the control group, and $0.151\ 0 \pm 0.018\ 5$ in the experimental group, and there was a significant difference in the expression level of HIF-1 α between the three groups ($P<0.05$). On day 28, the expression level of VEGF was $0.093\ 7 \pm 0.011\ 6$ in the sham-operation group, $0.214\ 3 \pm 0.052\ 6$ in the control group, and $0.238\ 6 \pm 0.008\ 3$ in the experimental group, and there was a significant difference in the expression level of VEGF between the three groups ($P<0.05$). On day 28, the expression level of MMP-2 was $0.121\ 6 \pm 0.010\ 4$ in the sham-operation group, $0.229\ 5 \pm 0.026\ 0$ in the control group, and $0.175\ 5 \pm 0.011\ 8$ in the experimental group, and there was a significant difference in MMP-2 MOD between the three groups ($P<0.05$). **Conclusion:** HBO therapy can downregulate the expression of HIF-1 α , VEGF, and MMP-2 in AVF tissue and significantly inhibit VNH.

[Key words] hyperbaric oxygen; arteriovenous fistula; chronic renal failure; venous neointimal hyperplasia

我国目前有慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者近 1.2 亿,其中约 34 万例患者行血液透析治疗^[1]。动静脉内瘘(arteriovenous fistula, AVF)是我国血液透析用血管通路专家共识及美国国家肾脏基金会指南推荐的终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)患者行血液透析治疗的最佳选择^[2-3]。但在 AVF 建立的早期,表现为静脉内膜增生(venous neointimal hyperplasia, VNH)导致的 AVF 成熟障碍,发生率达 28%~53%^[4],严重危及患者的生命安全。

目前 VNH 的分子机制尚未彻底阐明,相关研究表明,组织细胞缺氧在 VNH 的发生机制中扮演重要角色^[5-6]。缺氧环境下缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factors-1 α , HIF-1 α)的表达明显增强,进而诱导其下游一系列靶基因,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)特别是基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的转录激活^[7]。VEGF 与其受体相互作用,会促进血管内皮细胞的分裂、增殖及诱发血管形成^[8];MMP-2 的激活则会促进 AVF 静脉血管内皮内平滑肌细胞的迁移,进而加剧 VNH 的进程。本课题组的前期研究发现,周期性高压氧治疗能显著提升兔 AVF 模型血液中的氧分压与 AVF 组织血管中单位时间内的血流量^[9],改善 AVF 组织局部缺血缺氧的问题,所以本课题拟用高压氧疗法(hyperbaric oxygen, HBO)干预 AVF 模型,观察 HBO 对 HIF-1 α 、VEGF 及 MMP-2 表达和 VNH 的影响。

1 材料与方法

1.1 研究材料

健康新西兰兔 36 只(采购于重庆医科大学动物实验中

心);腺嘌呤;10%水合氯醛;血管显微器械包;GX-3 型台式手术显微镜;全自动生化分析仪;HIF-1 α 一抗 bs-0737R(北京博奥森生物技术有限公司);VEGF 一抗 BA0407(武汉博士德);Anti-MMP2 抗体[4D3](ab2462)(英国 Abcam);SP-9001 免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥);兔抗小鼠二抗 IgG H&L (HRP)(ab6728)(英国 Abcam);山羊抗兔二抗 HRP(ab205718)(英国 Abcam);8-0 无损伤缝线(上海浦东金环医疗用品股份有限公司);化学发光仪(美国 Bio-Rad Chemi Doc XRS+)。

1.2 研究方法

1.2.1 建立慢性肾衰模型 36 只健康新西兰兔,不限性别,体质量 2.0~2.5 kg,经检测血肌酐及血尿素氮确定肾功能正常。随机分为肾衰假手术组(假手术组)、肾衰动静脉内瘘组(对照组)、肾衰动静脉内瘘高压氧干预组(实验组),每组 12 只。因腺嘌呤的代谢产物会阻塞动物肾小管,引起其肌酐、尿素氮及各种电解质紊乱,最终导致肾功能衰竭^[10],故各组以 0.6%腺嘌呤喂养 4 周,然后以 0.3%腺嘌呤喂养 2 周(诱导期),最后以 0.15%腺嘌呤喂养直到实验完毕(维持期)。每周采耳缘静脉血检测血肌酐和尿素氮,维持在正常值 3 倍以上,直至实验完毕。

1.2.2 建立动静脉内瘘 慢性肾衰模型建立成功后,建立左侧颈部动静脉内瘘。10%水合氯醛(1.2 mL/kg)经耳缘静脉麻醉,下颌角于锁骨中点连线处做 1 个 3 cm 切口,钝性分离皮下组织,显露颈静脉。在胸锁乳突肌内缘分离组织,显露出颈动脉。肝素化后,血管阻断钳阻断近远端血流,结扎颈静脉远心端和颈动脉远心端。8-0 缝线以两定点间断缝合合法的方式“端-端”吻合动静脉。吻合完毕后松开阻断钳,可见颈静脉立即充盈,并且可触及明显波动,提示 AVF 建立成功。假手术组仅于兔左侧颈部相同位置做 1 个 3 cm 切口分离血管后缝合。

1.2.3 高压氧治疗 实验组高压氧治疗开始于造瘘后第 2 天,每 7 d 为 1 个周期,每天 1 次,每 5 d 休息 2 d,总共 4 个周期。每次治疗前模型入舱,室温下纯氧洗舱,使舱内氧浓度稳定在 75%以上,随即加压 0.15 MPa 左右,维持该压力 60 min,期间持续低流量进气、排气,保持氧浓度高于 98%。最后缓慢减压 15 min 至常压,模型出舱。假手术组和对照组不进行任何处理。

1.2.4 组织标本提取 AVF 模型建立完毕后第 7、14、28 天从各组随机选取 4 只新西兰兔,麻醉后提取 AVF 的静脉段(瘘口至近段 3 cm),磷酸盐缓冲液(phosphatebuffer solution, PBS)洗净后将 AVF 静脉段组织均分为 2 段,分别用 4%多聚甲醛溶液及液氮固定标本,后续进行免疫组化检测、组织病理学检测及 Western blot 检测。

1.2.5 组织病理学 标本经石蜡包埋处理,作组织切片,切片厚度 5 μm ,行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin staining, HE)染色。于 400 倍光镜下采集图像。使用 Image Pro Plus 6.0 (IPP6.0)图像分析软件进行血管内膜厚度测量。

1.2.6 免疫组织化学 切片脱蜡并水化,修复抗原,冷却至室温。3% H_2O_2 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15~20 min 阻断内源性过氧化物酶活性。磷酸盐缓冲液(phosphatebuffer solution, PBS)漂洗 5 min $\times$ 3 次。正常山羊血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 15~20 min。分别滴加 HIF-1 α 一抗(1:100)、VEGF-A 一抗(1:100)、MMP-2 一抗(1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。山羊抗兔二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20~30 min。PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。滴加 DAB 显色剂显色。苏木精复染 30~60 s。二甲苯透明处理。中性树脂封片。分别在 100 倍及 400 倍光镜下采图。每一血管组织取 3 张不连续切片,每张切片随机选取 10 个 400 倍视野,后续 Image Pro Plus (IPP)6.0 图像分析软件计算各指标的平均光密度(mean optical density, MOD)值。

1.2.7 Western blot 检测 AVF 组织提取蛋白后,进行电泳跑胶。电泳结束后进行转膜,将目的蛋白转至 PVDF 膜上。转膜完成后洗膜缓冲液 Tris buffered saline Tween(TBST)洗膜 5 min $\times$ 3 次。室温下 5%脱脂奶粉封闭 1.5 h。封闭结束后按需要检查的指标分别在膜上滴不同一抗:HIF-1 α 一抗(1:1 000);VEGF-A 一抗(1:200),MMP-2(1:200)一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗膜 5 min $\times$ 3 次。根据不同一抗分别滴加山羊抗兔二抗(1:2 000),兔抗小鼠二抗(1:5 000),室温孵育 2 h。TBST 洗膜 5 min $\times$ 4 次。ECL 显影并采图,将所得条带用 Image J 软件进行灰度值分析。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计学分析,曲线图及柱状图制作采用 Sigmaplot 10.0,实验数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,并进行两两 LSD- t 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。所有实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 CRF 及 AVF 模型的建立

假手术组、对照组和实验组血肌酐初始(0 周)水平分别为(59.25 ± 0.15)、(59.38 ± 0.36)和(56.66 ± 1.48) $\mu\text{mol/L}$ 。诱导期可见血肌酐水平快速上升,第 6 周血肌酐水平分别为(257.87 ± 4.62)、(261.01 ± 5.05)和(260.57 ± 6.59) $\mu\text{mol/L}$,达到初始水平的 3 倍以上。假手术组、对照组和实验组尿素氮

初始(0 周)水平分别为(5.59 ± 0.27)、(5.51 ± 0.63)和(4.83 ± 0.38) $\mu\text{mol/L}$ 。诱导期可见血肌酐水平快速上升,第 6 周尿素氮水平分别为(18.49 ± 0.68)、(17.94 ± 1.25)和(18.42 ± 0.99) $\mu\text{mol/L}$,达到初始水平的 3 倍以上。6~10 周血肌酐及尿素氮水平稳定,提示 CRF 模型建立成功。AVF 的建立均顺利完成,术后未出现动物死亡的情况(图 2)。

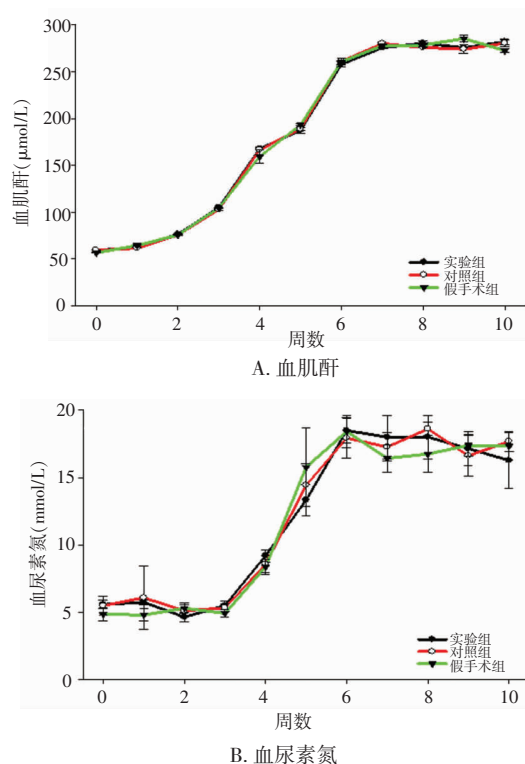
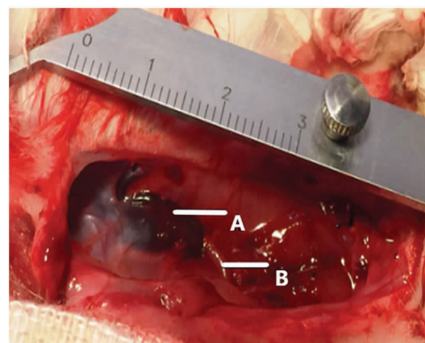


图 1 腺嘌呤诱导慢性肾功能衰竭血尿素氮和血肌酐水平的改变



注:A, AVF 颈静脉端;B: AVF 颈动脉端

图 2 “端-端吻合”建立动静脉内瘘

2.2 AVF 组织病理学结果

28 d 时,假手术组未观察到 AVF 静脉端静脉内膜的增生(图 3A),实验组平均静脉内膜增生厚度为($0.200 5 \pm 0.034 0$) mm(图 3C),对照组为($0.351 4 \pm 0.062 0$) mm(图 3B)。7、14 及 28 d 时,假手术组、对照组和实验组新西兰兔静脉内膜增生厚度差异具有统计学意义(均 $P<0.05$),差异具体表现为实验组静脉内膜增生厚度明显低于对照组(LSD- t 比较, $P<0.05$)。各组新西兰兔静脉内膜厚度见表 1。

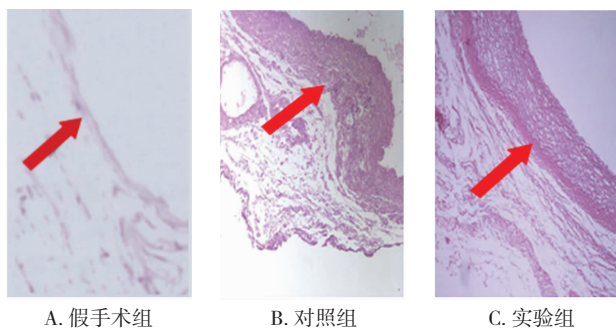


图 3 28 d 静脉内膜石蜡切片成像图

表 1 各组新西兰兔静脉内膜增生厚度 (mm)

分组	7 d	14 d	28 d
假手术组	0.010 5 ± 0.001 4	0.011 2 ± 0.001 1	0.010 3 ± 0.001 1
对照组	0.051 0 ± 0.006 7	0.192 2 ± 0.035 4	0.351 4 ± 0.062 2
实验组	0.049 6 ± 0.001 1	0.108 1 ± 0.044 7	0.200 6 ± 0.034 1
<i>F</i> 值	607.533	301.956	697.398
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:LSD-*t* 比较结果,7 d:假手术组 vs.对照组, $P=0.000$;假手术组 vs.实验组, $P=0.000$;实验组 vs.对照组, $P=0.301$;14 d:假手术组 vs.对照组, $P=0.000$;假手术组 vs.实验组, $P=0.000$;实验组 vs.对照组, $P=0.000$;28 d:假手术组 vs.对照组, $P=0.000$;假手术组 vs.实验组, $P=0.000$;实验组 vs.对照组, $P=0.000$

2.3 免疫组织化学结果

2.3.1 HIF-1 α 的免疫组化结果 28 d 时 HIF-1 α 的免疫组化结果如图 4 所示。表 2 为不同时间各组 HIF-1 α 表达水平的 MOD 结果。28 d 假手术组 HIF-1 α MOD 为 0.003 1 ± 0.000 8, 对照组 HIF-1 α MOD 为 0.201 6 ± 0.046 1, 实验组 HIF-1 α MOD 为 0.099 1 ± 0.027 6。7、14 及 28 d 时,假手术组、对照组和实验组 HIF-1 α MOD 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$),差异具体表现为实验组 HIF-1 α MOD 明显低于对照组(LSD-*t* 比较, $P<0.05$)。

表 2 各组 HIF-1 α MOD

分组	7 d	14 d	28 d
假手术组	0.003 2 ± 0.000 8	0.003 2 ± 0.000 9	0.003 1 ± 0.000 8
对照组	0.242 3 ± 0.058 6	0.217 6 ± 0.052 3	0.201 6 ± 0.046 1
实验组	0.153 0 ± 0.042 0	0.129 0 ± 0.037 2	0.099 1 ± 0.027 6
<i>F</i> 值	84.338	83.727	102.296
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:LSD-*t* 比较结果,7 d:假手术组 vs.对照组, $P=0.000$;假手术组 vs.实验组, $P=0.000$;实验组 vs.对照组, $P=0.000$;14 d:假手术组 vs.对照组, $P=0.000$;假手术组 vs.实验组, $P=0.000$;实验组 vs.对照组, $P=0.000$;28 d:假手术组 vs.对照组, $P=0.000$;假手术组 vs.实验组, $P=0.000$;实验组 vs.对照组, $P=0.000$

2.3.2 VEGF 的免疫组化结果 28 d 时 VEGF 的免疫组化结果如图 5 所示。表 3 为不同时间各组 VEGF 表达水平的 MOD 结果。28 d 假手术组 VEGF MOD 为 0.008 3 ± 0.001 9, 对照组 VEGF MOD 为 0.214 3 ± 0.052 6, 实验组 VEGF MOD 为 0.105 1 ± 0.040 6。7、14 及 28 d 时,假手术组、对照组和实验组 VEGF MOD 差异具有统计学意义(均 $P<0.05$),差异具体表现为实验组 VEGF MOD 明显低于对照组(LSD-*t* 比较, $P<0.05$)。

表 3 各组 VEGF MOD

分组	7 d	14 d	28 d
假手术组	0.008 7 ± 0.003 2	0.009 5 ± 0.002 6	0.008 3 ± 0.001 9
对照组	0.260 6 ± 0.065 2	0.218 7 ± 0.089 2	0.214 3 ± 0.052 6
实验组	0.159 5 ± 0.051 7	0.134 1 ± 0.038 4	0.105 1 ± 0.040 6
<i>F</i> 值	69.381	35.153	72.022
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:LSD-*t* 比较结果,7 d:假手术组 vs.对照组, $P=0.000$;假手术组 vs.实验组, $P=0.000$;实验组 vs.对照组, $P=0.000$;14 d:假手术组 vs.对照组, $P=0.000$;假手术组 vs.实验组, $P=0.000$;实验组 vs.对照组, $P=0.000$;28 d:假手术组 vs.对照组, $P=0.000$;假手术组 vs.实验组, $P=0.000$;实验组 vs.对照组, $P=0.000$

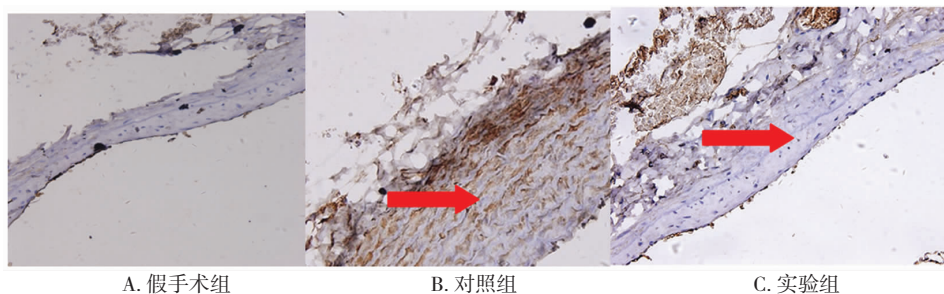
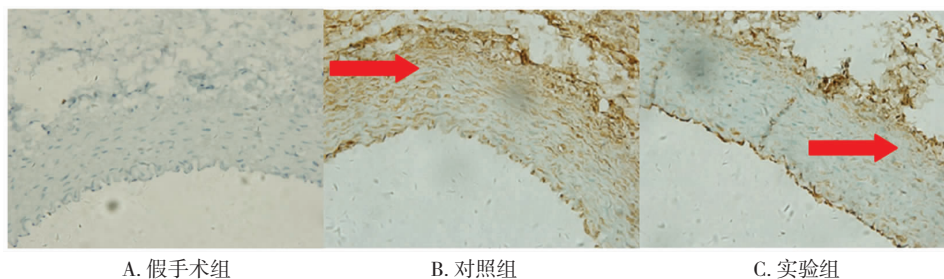
图 4 术后 28 d HIF-1 α 表达水平免疫组化结果

图 5 术后 28 d 的 VEGF 表达水平免疫组化结果

2.3.3 MMP-2 的免疫组化结果 28 d 时 MMP-2 的免疫组化结果如图 6 所示。表 4 为不同时间各组 MMP-2 表达水平的 MOD 结果。28 d 假手术组 MMP-2 MOD 为 0.0051 ± 0.0146 , 对照组 MMP-2 MOD 为 0.2384 ± 0.0903 , 实验组 MMP-2 MOD 为 0.1090 ± 0.0415 。7、14 及 28 d 时, 假手术组、对照组和实验组 MMP-2 MOD 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 差异具体表现为实验组 MMP-2 MOD 明显低于对照组 (LSD- t 比较, $P < 0.05$)。

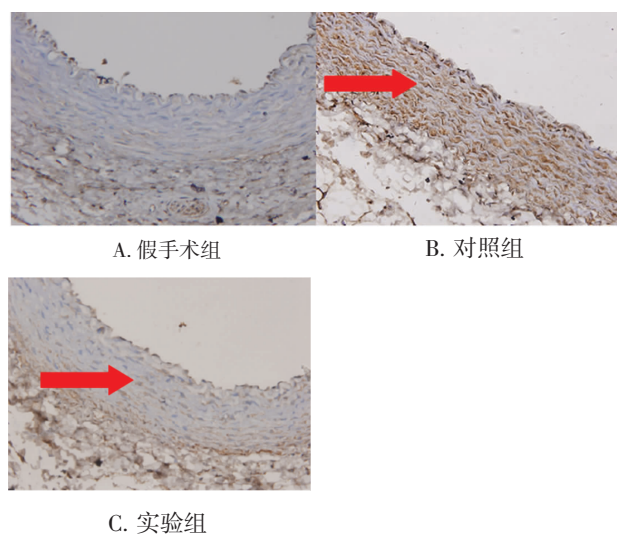


图 6 术后 28 d MMP-2 表达水平免疫组化结果

表 4 各组 MMP-2 MOD

分组	7 d	14 d	28 d
假手术组	0.0054 ± 0.0013	0.0056 ± 0.0013	0.0051 ± 0.0146
对照组	0.2813 ± 0.1066	0.2731 ± 0.0831	0.2384 ± 0.0903
实验组	0.1381 ± 0.0565	0.1223 ± 0.0482	0.1090 ± 0.0415
F 值	39.255	58.426	41.475
P 值	0.000	0.000	0.000

注: LSD- t 比较结果, 7 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$; 14 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$; 28 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$

2.4 Western blot 结果

2.4.1 HIF-1 α 的 Western blot 结果 28 d 时 HIF-1 α 的 Western blot 结果如图 7 所示。表 5 为不同时间各组 HIF-1 α 的表达水平。28 d 假手术组 HIF-1 α 表达水平为 0.1149 ± 0.0102 , 对照组为 0.1937 ± 0.0166 , 实验组为 0.1510 ± 0.0185 。7、14 及 28 d 时, 假手术组、对照组和实验组 HIF-1 α 表达水平的差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 差异具体表现为实验组 HIF-1 α 的表达水平明显低于对照组 (LSD- t 比较, $P < 0.05$)。

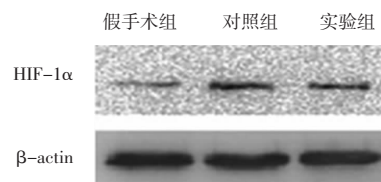


图 7 HIF-1 α 在 AVF 中的表达

表 5 HIF-1 α 的 Western blot 表达水平

分组	7 d	14 d	28 d
假手术组	0.1104 ± 0.0127	0.1124 ± 0.1220	0.1149 ± 0.0102
对照组	0.2309 ± 0.0174	0.2067 ± 0.0144	0.1937 ± 0.0166
实验组	0.1612 ± 0.0129	0.1657 ± 0.0080	0.1510 ± 0.0185
F 值	19.165	41.216	28.735
P 值	0.000	0.000	0.000

注: LSD- t 比较结果, 7 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$; 14 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$; 28 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$

2.4.2 VEGF 的 Western blot 结果 28 d 时 VEGF 的 Western blot 结果如图 8 所示。表 6 为不同时间各组 VEGF 的表达水平。28 d 假手术组 VEGF 表达水平为 0.0937 ± 0.0116 , 对照组为 0.2386 ± 0.0083 , 实验组为 0.1718 ± 0.0169 。7、14 及 28 d 时, 假手术组、对照组和实验组 VEGF 表达水平的差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 差异具体表现为实验组 VEGF 的表达水平明显低于对照组 (LSD- t 比较, $P < 0.05$)。

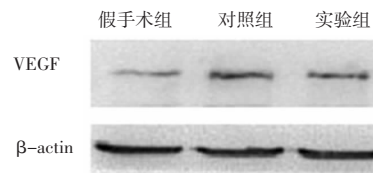


图 8 VEGF 在 AVF 中的表达

表 6 VEGF 的 Western blot 表达水平

分组	7 d	14 d	28 d
假手术组	0.0950 ± 0.0105	0.0883 ± 0.0093	0.0937 ± 0.0116
对照组	0.2290 ± 0.0118	0.2539 ± 0.0094	0.2386 ± 0.0083
实验组	0.1680 ± 0.0048	0.1906 ± 0.0142	0.1718 ± 0.0169
F 值	61.856	54.325	43.661
P 值	0.000	0.000	0.000

注: LSD- t 比较结果, 7 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$; 14 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$; 28 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$

2.4.3 MMP-2 的 Western blot 结果 28 d 时 MMP-2 的 Western blot 结果如图 9 所示。表 7 为不同时间各组 MMP-2

的表达水平。28 d 假手术组 MMP-2 表达水平为 $0.121 6 \pm 0.010 4$, 对照组为 $0.229 5 \pm 0.026 0$, 实验组为 $0.175 5 \pm 0.011 8$ 。7、14 及 28 d 时, 假手术组、对照组和实验组 MMP-2 表达水平的差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 差异具体表现为实验组 MMP-2 的表达水平明显低于对照组 (LSD- t 比较, $P < 0.05$)。

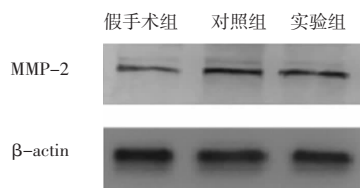


图 9 MMP-2 在 AVF 中的表达

表 7 MMP-2 的 Western blot 表达水平

分组	7 d	14 d	28 d
假手术组	$0.128 2 \pm 0.013 2$	$0.110 8 \pm 0.010 6$	$0.121 6 \pm 0.010 4$
对照组	$0.294 9 \pm 0.010 9$	$0.267 6 \pm 0.011 2$	$0.229 5 \pm 0.026 0$
实验组	$0.222 2 \pm 0.008 4$	$0.208 7 \pm 0.018 1$	$0.175 5 \pm 0.011 8$
F 值	21.743	58.925	40.307
P 值	0.000	0.000	0.000

注: LSD- t 比较结果, 7 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$; 14 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$; 28 d: 假手术组 vs. 对照组, $P=0.000$; 假手术组 vs. 实验组, $P=0.000$; 实验组 vs. 对照组, $P=0.000$

3 讨论

我国 CKD 患者数量及透析患者数量众多, AVF 是他们行血液透析治疗的最佳选择^[2-3]。但是因 VNH 等原因导致的 AVF 早期失功能却会直接影响血液透析治疗, 加剧患者经济负担。所以, 研究有效的 AVF 功能障碍治疗方法, 促进 AVF 的成熟, 有益于提高患者的预期寿命, 减轻患者和社会的经济负担。

VNH 进程中, 缺氧起到极其关键的作用^[5-6]。在缺氧的组织环境内, HIF-1 α 的表达明显高于正常组织。HIF-1 α 是 HIF-1 的一个亚基, 作为调节氧稳态的核心转录因子, 能对缺氧作出应激反应, 并直接影响其下游 100 多个靶基因的表达^[11-12]。HIF-1 α 的生物学作用涉及炎症、血管生长、血管收缩、骨髓造血等多个方面^[13]。VEGF 是 HIF-1 α 下游靶基因之一, 是人体中最主要的一个血管生成因子, 与 VNH 的进展密切相关。在低氧条件下, HIF-1 α 能促进 VEGF mRNA 转录, 并增加其稳定性, 进而使 VEGF 表达增加^[14]。VEGF 可通过激活血管平滑肌内的活性氧信号及核因子- κ B 转录使血管平滑肌向内膜

迁移^[15], 从而加剧血管内膜细胞的增生。缺氧环境下, HIF-1 α 也可以上调 MMPs 的表达^[7]。MMPs 是结缔组织细胞分泌的、有降解细胞外基质 (extracellular matrix ECM) 作用的蛋白酶家族, 在人体细胞外基质构成、伤口愈合和肿瘤细胞转移侵袭的进程中起关键作用^[16-17]。MMP-2 是 MMPs 家族中的一员, 不仅可以降解 EMC 中的主要成分 IV 型胶原, 重塑 EMC 结构, 还能促进平滑肌细胞向血管内膜迁移^[18], 引起血管内膜增生。在 AVF 中 VEGF 和 MMP-2 的高表达加速了 VNH 的进程, 提高了 AVF 早期失功能的发病率。

目前预防 VNH 的措施包括药物治疗^[19]、射线治疗^[20]及基因靶向治疗^[21], 但这些措施在临床上仍未得到广泛应用。本课题组的前期研究发现, 通过周期性高压氧治疗的措施, 能明显提升兔 AVF 模型血液中的氧分压与 AVF 组织血管中单位时间内的血流量, 改善 AVF 组织局部缺血缺氧的问题^[9]。所以本课题组采用 HBO 来干预 CRF 动静脉内瘘模型缺氧的状况, 进而探究 HBO 对 HIF-1 α 及其下游靶基因 VEGF 和 MMP-2 表达的影响, 及抑制 VNH、促进 AVF 成熟的作用。

本课题组用慢性腺嘌呤诱导的方式成功制造了 CRF 模型, 同时成功建立了 AVF 模型, 造模过程中未出现动物死亡的情况。在 AVF 术后, 本课题组对实验组进行了 HBO 治疗, 并提取了各组模型的组织。相比于同期的假手术组, 实验组及对照组的 AVF 静脉内膜均出现了内膜增生的情况, 但是实验组的内膜厚度明显低于同期对照组的内膜厚度。同时, 免疫组化及 Western blot 结果提示, HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 在实验组和对照组中均有阳性表达, 且明显高于假手术组。

血管壁的供氧来自两部分, 外 2/3 的血管供氧来自其滋养血管, 内 1/3 的氧供则源自血管腔内血液中氧的弥散。结合本次试验结果, AVF 造瘘术破坏了 AVF 组织血管壁的完整结构, 同时也破坏了其滋养血管, 因此这些损伤引起了 AVF 组织的缺氧, 上调了组织中 HIF-1 α 、VEGF 及 MMP-2 的表达, 最终引起 AVF 组织内的 VNH。本课题组的分析与 Santilli 等^[22]在人工血管动物模型移植试验中所观察到的结果一致。实验组在经过 HBO 干预后其 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 的表达明显低于对照组。

结合现有的相关研究, 当血管内膜及静脉血管平滑肌细胞处于低氧环境时, HIF-1 α 的表达上调, HIF-1 α 主导的信号通路会被激活^[23-24], 下游的一系列组织因子包括 VEGF、MMPs、血小板生长因子

及成纤维细胞生长因子的释放也相应增加^[25-26]。HBO 治疗改善了 AVF 组织缺氧的情况^[9]。可以得到这样的结论:实验组与对照组之间 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 在表达上的明显差异正是 HBO 的介入引起的,HBO 治疗在改善 AVF 组织缺氧的同时,抑制了 HIF-1 α 的表达,进一步抑制了 HIF-1 α 下游靶基因的表达,减轻了 AVF 组织内细胞增生和细胞迁移的现象,最终起到延缓 VNH 进展的作用。

综上所述,本研究证明高压氧治疗能够通过下调慢性肾衰动静脉内瘘模型 AVF 组织中 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-2 的表达,抑制其静脉血管内膜的增生,有一定的预防 AVF 早期失功能发生的作用。然而,在临床上,ESRD 患者的身体情况与本课题组的模型还有巨大差异,HBO 之于 ESRD 患者是否能发挥出在模型中一样的效果,以及其机制是否相似,还需要进一步探究。

参 考 文 献

- [1] Liu ZH. Nephrology in China[J]. Nat Rev Nephrol,2013,9(9):523-528.
- [2] 王玉柱,叶朝阳,金其庄. 中国血液透析用血管通路专家共识(第1版)[J]. 中国血液净化,2014,13(8):549-558.
- [3] Vascular Access Work Group. Clinical practice guidelines for vascular access[J]. Am J Kidney Dis,2006,48(S1):248-273.
- [4] Asif AP,Roy-Chaudhury P,Beathard GA. Early arteriovenous fistula failure;a logical proposal for when and how to intervene[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2006,1(2):332-339.
- [5] Misra S,Shergill U,Yang B,et al. Increased expression of HIF-1 α ,VEGF-A and its receptors,MMP-2,TIMP-1, and ADAMTS-1 at the venous stenosis of arteriovenous fistula in a mouse model with renal insufficiency[J]. J Vasc Interv Radiol,2010,21(8):1255-1261.
- [6] Misra S,Fu AA,Rajan DK,et al. Expression of hypoxia inducible factor-1 α ,macrophage migration inhibition factor,matrix metalloproteinase-2 and -9,and their inhibitors in hemodialysis grafts and arteriovenous fistulas[J]. J Vasc Interv Radiol,2008,19:252-259.
- [7] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer,2003,3(10):721-732.
- [8] Ferrara N,Gerber HP,Le Coutre J. The biology of VEGF and its receptors[J]. Nat Med,2003,9:669-676.
- [9] Li Z,Li M,Li X,et al. Hyperbaric oxygen inhibits venous neointimal hyperplasia following arteriovenous fistulization[J]. Int J Mol Med,2017,39(5):1299-1306.
- [10] 李相杰. 新西兰兔慢性肾功能衰竭合并动静脉内瘘模型的建立[D]. 重庆:重庆医科大学,2016.
- [11] Martínez Sánchez G,Giuliani A. Cellular redox status regulates hypoxia inducible factor-1 activity. Role in tumour development[J]. J Exp Clin Cancer Res,2007,26(1):39-50.
- [12] Yee Koh M,Spivak-Kroizman TR,Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come,easy go[J]. Trends Biochem Sci,2008,33(11):526-534.
- [13] Rosen ED,Hsu CH,Wang X,et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ :a unified pathway[J]. Genes Dev,2002,16(1):22-26.
- [14] Damert A,Machein M,Breier G,et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in a rat glioma is conferred by two distinct hypoxia-driven mechanisms[J]. Cancer Res,1997,57(17):3860-3864.
- [15] Ma L,Tessier-Lavigne M. Dual branch-promoting and branch-repelling actions of Slit/Robo signaling on peripheral and central branches of developing sensory axons[J]. J Neurosci,2007,27(25):6843-6851.
- [16] Rucci N,Sanità P,Angelucci A. Roles of metalloproteases in metastatic niche[J]. Current Molecular Medicine,2011,11(8):609-622.
- [17] Gingras D,Béliveau R. Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity[J]. Biochim Biophys Acta,2010,1803(1):142-150.
- [18] 唐静,张湘燕,夏婧. HIF-1 α 、MMP-2、VEGF 与肿瘤的侵袭和转移[J]. 贵州医药,2017,41(9):995-996.
- [19] Janardhanan R,Yang B,Vohra P,et al. Simvastatin reduces venous stenosis formation in a murine hemodialysis vascular access model[J]. Kidney Int,2013,84(2):338-352.
- [20] Sun S,Beitler JJ,Ohki T,et al. Inhibitory effect of brachytherapy on intimal hyperplasia in arteriovenous fistula[J]. J Surg Res,2003,115(2):200-208.
- [21] Nieves ET,Yang B,Roy B,et al. Adventitial delivery of lentivirus-shRNA-ADAMTS-1 reduces venous stenosis formation in arteriovenous fistula[J]. PLoS One,2014,9(4):e94510.
- [22] Santilli SM,Wernsing SE,Lee ES. Transarterial wall oxygen gradients at a prosthetic vascular graft to artery anastomosis in the rabbit[J]. J Vasc Surg,2000,31(6):1229-1239.
- [23] Schultz K,Murthy V,Tatro JB,et al. Prolyl hydroxylase 2 deficiency limits proliferation of vascular smooth muscle cells by hypoxia-inducible factor-1 α -dependent mechanisms[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2009,296(6):L921-927.
- [24] Hughes D,Fu AA,Puggioni A,et al. Adventitial transplantation of blood outgrowth endothelial cells in porcine haemodialysis grafts alleviates hypoxia and decreases neointimal proliferation through a matrix metalloproteinase-9-mediated pathway—a pilot study[J]. Nephrol Dial Transplant,2009,24(1):85-96.
- [25] Chanakira A,Dutta R,Charboneau R,et al. Hypoxia differentially regulates arterial and venous smooth muscle cell proliferation via PDGFR- β and VEGFR-2 expression[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2012,302(5):H1173-1184.
- [26] Schultz K,Fanburg BL,Beasley D. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2006,290(6):H2528-2534.

(责任编辑:冉明会)