

• 临床病理专栏 •
(论著)

扩张型心肌病心脏移植受者心脏病理学观察及微血管内皮细胞的表达及分布

武迎 陈东 方微 商建峰 付稳 滕飞 崔亚艳 于玮 朱庆

[摘要] 目的: 观察扩张型心肌病(DCM)心脏移植受者心脏病理学特点及微血管内皮细胞的表达及分布,初步探讨内皮细胞与心肌纤维化的作用。方法: 以2012年1月至2017年6月期间,本院收治的10例因DCM终末期行心脏移植患者的受者心脏作为研究对象。对照组采用来自法医鉴定中心的非疾病死亡的正常成年人尸检心脏标本6例。采用H&E染色、Masson三色组织化学染色观察DCM病理学改变,采用免疫组织化学方法检测CD34和 α -SMA,观察微血管内皮细胞在DCM患者心肌组织中的表达。结果: ①光镜下,终末期DCM的主要病理改变是心肌细胞退行性变,心肌间质纤维化;②通过透射电镜观察发现终末期DCM主要改变是心肌退行性变,心肌肌原纤维Z线排列不规则,部分心肌细胞核肥大,心肌肌原纤维灶性溶解,心肌间质水肿,线粒体增多,线粒体肿胀空泡化,可见髓鞘样结构,心肌间质毛细血管内皮细胞胞质肿胀,细胞连接消失,吞饮小泡减少;③两组心肌组织中均有微血管内皮细胞分布,DCM中CD34表达明显低于对照组, α -SMA的表达明显高于对照组。结论: DCM中血管内皮细胞的超微结构变化,可能导致其功能改变,内皮细胞可能通过内皮间质细胞转化参与了DCM中心肌纤维化。

[关键词] 扩张型心肌病; 心肌纤维化; 微血管内皮细胞; 内皮间质细胞转化; 超微结构

[中图分类号] R54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-5062(2017)12-970-04

Analysis of histopathological features and the expression of microvascular endothelial cells in the end-stage heart transplantation patients have dilated cardiomyopathy WU Ying, CHEN Dong, FANG Wei, SHANG Jianfeng, FU Wen, TENG Fei, CUI Yayan, YU Wei, ZHU Qing Department of Pathology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China

[Abstract] **Objective:** To observe the pathologic features and the expression and distribution of microvascular endothelial cells from transplant recipient hearts of patients with cardiac transplantation due to end-stage dilated cardiomyopathy and the role of endothelial cells and myocardial fibrosis in DCM was discussed preliminarily. **Methods:** From January 2012 to June 2017, 10 cases of transplant recipient heart with the end stage of dilated cardiomyopathy were studied. And 6 cases autopsy heart specimens of normal adults from forensic science center were studied as control group. The pathological feature of DCM were observed by H&E staining and Masson tricolor histological staining. The expression of microvascular endothelial cells in myocardial tissue in patients with DCM was detected by immunohistochemical staining. **Results:** The main pathological changes of the end-stage dilatation of cardiomyopathy are the degeneration of myocardial cells and myocardial fibrosis. Ultrastructural changes indicated the degeneration of myocardial cells, the arrangement of myogenic fibers in the myocardial cells was irregular, Some myocardial nuclei was hypertrophy, focal myocardial myofibrinolysis, myocardial edema, the number of mitochondria was increased, swelling mitochondria and absence of mi-

基金项目: 首都医科大学-北京安贞医院院长科技发展基金课题(2016F01)

作者单位: 100029 首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所 病理科

通信作者: 陈东, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 心肺血管疾病病理专业。E-mail: azchendong@163.com

tochondriacrests and vesicles, the myelin structure of the mitochondria. Capillary endothelial cells in myocardial mesenchymal was swelling, cell connectivity vanished and the number of pinocytotic vesicles decreased. Both of the two groups had the distribution of microvascular endothelial cells. The expression of CD34 in DCM group was significantly lower than that in the control group, and the expression of α -sma was significantly higher than that in the control group. **Conclusion:** Ultrastructural changes of vascular endothelial cells in DCM might lead to functional changes. The endothelial cells in DCM might participate in the myocardial fibrosis by endothelial-mesenchymal transformation.

[Keywords] Dilated cardiomyopathy; Myocardial fibrosis; Microvascular endothelial cells; Endothelial-mesenchymal transformation; Ultrastructure

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)为临床常见的一种心肌疾病,是心力衰竭原因之一,其典型症状为心腔扩张,左侧或者双侧心室功能障碍及收缩能力减退,患者预后差,缺乏有效治疗^[1]。研究表明,心室重构是导致心力衰竭的关键过程^[2]。心肌纤维化是由多种病理因素导致心脏疾病发展至一定阶段所具有的共同病理改变,是心室重构的主要原因。心肌纤维化是 DCM 的主要病理改变,是以心脏间质成纤维细胞过度增殖、胶原过度沉积及异常分布为特征的心脏间质重构。以往研究认为,心脏成纤维细胞主要依靠心脏间质中固有纤维细胞增生、活化而来^[3]。近年来,心脏微血管内皮细胞通过内皮间质转化(endothelial-mesenchymal transition, EndMT)促进心肌纤维化的作用受到高度重视。本文旨在观察终末期 DCM 中微血管内皮细胞的表达及分布,初步探讨微血管内皮细胞在 DCM 心肌纤维化中的作用。

资料与方法

1. 研究对象:本研究分为两组:DCM 组和对照组。DCM 组回顾性研究 2012 年 1 月至 2017 年 6 月期间,本院收治的 10 例因 DCM 终末期行心脏移植患者的受者心脏作为研究对象。患者均为男性,年龄 45 ~ 60 岁。对照组采用来自法医鉴定中心的非疾病死亡的正常成年人尸检心脏标本 6 例。

2. 研究方法:移植受者心脏左心室心肌组织经 10% 中性缓冲甲醛液固定,石蜡包埋,采用常规 H&E 染色进行光学显微镜观察心肌组织病理学改变;采用 Masson 三色组织化学染色标记两组心肌间质纤维化情况;采用免疫组织化学方法检测 CD34 和 α -SMA 在心肌组织中的表达,应用 Elements-BR3.1 软件对免疫组化结果进行分析。显微镜拍摄石蜡切片的免疫组化染色结果,进行半定量分析。计算目标蛋白的阳性面积,同时分析阳性染色面积占整个组织面积的百分比。免疫组织化学采用 S-P

法,试剂盒及抗体均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。透射电镜标本制备及超微病理学观察:将其中 3 例新鲜左心室心肌组织标本快速置于 3% 戊二醛溶液固定,1% 锇酸后固定,丙酮梯度脱水,树脂包埋。光镜下观察半薄切片(1 μ m),对心肌进行定位,制作超薄切片,经醋酸铀及枸橼酸铅双染色后,在透射电镜下观察心肌细胞及微血管内皮细胞的超微结构改变。

3. 统计学方法:采用 GraphPad Prism 5.0 软件。计量数据以均数 \pm 标准差表示,两组比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 终末期 DCM 受者心脏左心室心肌光镜观察 本组终末期 DCM 的病理学特点如图 1。应用 HE 染色及 Masson 三色染色光镜观察发现 DCM 组心肌纤维排列尚规则,心肌细胞退行性变,呈颗粒状变性,心肌间质灶状纤维化较明显,符合 DCM 终末期改变。正常心肌,心肌纤维排列规则,心肌细胞无萎缩、变性,心肌间质无纤维化。

2. 终末期 DCM 受者心脏左心室心肌超微结构观察 本组检测 3 例 DCM 的新鲜左心室心肌组织的超微结构,透射电镜观察主要发现 DCM 的心肌退行性变,心肌肌原纤维 Z 线排列不规则,部分心肌细胞核肥大,心肌肌原纤维灶性溶解,心肌间质水肿,线粒体增多,线粒体灶性空化,可见髓鞘样结构,心肌间质毛细血管内皮细胞增生,内皮细胞胞质肿胀,细胞连接消失,吞饮小泡减少(图 2)。

图 2A 示心肌细胞核肥大,心肌肌原纤维 Z 线排列不规则,心肌肌原纤维灶性溶解,心肌间质水肿,线粒体增多,线粒体灶性空化,可见髓鞘样结构。图 2B 示心肌间质毛细血管内皮细胞增生,内皮细胞胞质肿胀,吞饮小泡减少。

3. 微血管内皮细胞在 DCM 中的表达与分布 10 例 DCM 心肌组织样本及 6 例正常对照组心肌样

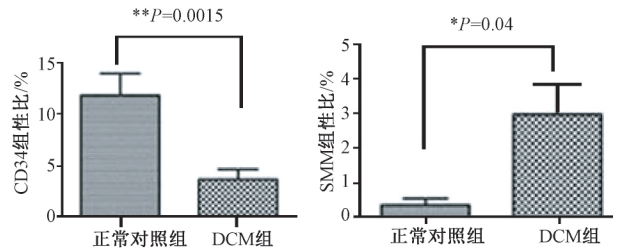
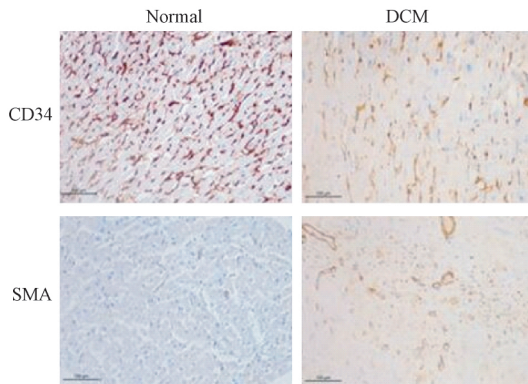
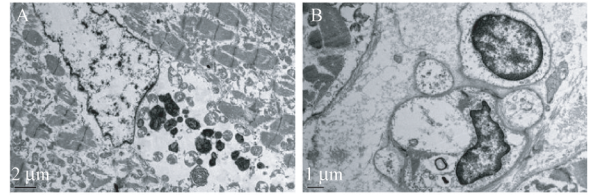
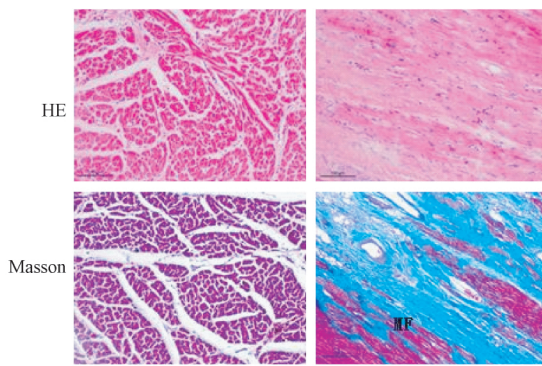


图1 终末期 DCM 左心室心肌镜下病理学特点 注: MF 心肌纤维化; 图2 DCM 左心室心肌超微结构特点 A: 心肌细胞肥大 心肌肌原纤维 Z 线排列不规则 心肌肌原纤维灶性溶角 心肌间质水肿 线粒体增多 线粒体灶性溶角, 可见髓鞘样结构; B: 症肌间质毛细血管内皮细胞增生, 内皮细胞胞质肿胀, 容积小泡减少; 图3 内皮细胞和成纤维细胞标志物在 DCM 心肌中的表达

本分别采用免疫组化检测内皮细胞 (CD34) 和成纤维细胞标志物 (α -SMA) 的表达 (图3)。免疫组化结果显示 CD34 在所有 DCM 患者和正常对照组心肌组织中均有表达, 提示血管内皮细胞在正常心肌组织及 DCM 心肌组织中均有较广泛分布。正常心肌组 CD34 阳性比为 11.82 ± 2.14 , DCM 组 CD34 阳性比为 3.65 ± 0.99 。与正常组心肌组织相比, 在 DCM 心肌组织样本中 CD34 表达明显下降, P 值为 0.0015。成纤维细胞的标志物 α -SMA 在正常心肌组织中仅见少数散在分布, α -SMA 阳性比为 0.37 ± 0.19 ; α -SMA 在 DCM 心肌中阳性比为 2.99 ± 0.89 , α -SMA 表达明显上升, P 值为 0.04。

讨论

EndMT 被认为是上皮间质转分化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的一种亚型, 是指内皮细胞在转录因子的诱导下发生基因表达改变, 细胞-细胞黏着力丧失, 形态及生理学特性向间质表型转变的过程。研究发现 EndMT 不仅在胚胎期心血管系统的发育中发挥重要作用^[4], 而且在心脏纤维

化、动脉粥样硬化、肺动脉高压、心脏瓣膜病及支架后狭窄等心血管疾病中起着重要作用^[5-8]。

心肌纤维化是 DCM 重要的病理学改变, 心肌纤维化的发生导致心肌僵硬增加, 正常心肌结构丧失及病理性心肌重构, 心室壁顺应性下降, 心功能进行性恶化, 最终导致心力衰竭。目前, 心肌纤维化的具体发病机制并不十分明确, 以往研究认为心脏间质固有纤维细胞的增生与活化是主要来源, 此外 CD45 阳性的骨髓造血干细胞也是成纤维细胞的一个重要来源^[9]。近年来内皮细胞通过 EndMT 在组织器官纤维化中的作用日益受到高度的重视, 成为研究热点。越来越多的研究表明异常的 EndMT 被证实是心肌纤维化的关键机制^[10-11]。研究证实在病理状态下, 内皮细胞在细胞因子的作用下向间质细胞转化, 其表型和功能均发生明显改变; 即内皮细胞特异性的蛋白表达减弱甚至消失; 而间质细胞特异性的标志物表达增多。本组终末期 DCM 的主要病理学特点是左心室心肌退行性变, 心肌间质纤维化。我们观察发现在正常人与 DCM 患者左心室心肌间质中都存在微血管内皮细胞的表达, 与正常组

心肌组织相比,在 DCM 心肌组织样本中 CD34 表达明显下降,提示在 DCM 患者左心室心肌中微血管内皮细胞减少,成纤维细胞标志物在正常人左心室心肌中几乎不表达,而 DCM 患者左心室心肌中检测到其特异标志物 α -SMA 表达明显增高,提示在 DCM 患者左心室心肌中成纤维细胞增多,推测可能存在 EndMT,尚需进一步观察两者是否存在共表达,进一步证实。

内皮细胞是组成心脏、血管、淋巴管内壁的主要成分,在调节心血管系统生理功能中起着重要作用,而内皮细胞功能失调则参与了多种心血管疾病的过程。其功能的改变与疾病条件下结构的变化是密不可分的。因此,通过透射电镜,我们观察了 DCM 患者新鲜左心室心肌组织的超微结构特点。观察发现终末期心肌出现明显退行性变,肌原纤维灶状溶解消失,线粒体数目明显增多,可见线粒体变性及空泡化,本组 3 例 DCM 心肌间质中均未观察到明显的心脏固有纤维细胞的增生,而是观察到血管内皮细胞增生,但胞质肿胀明显,胞质内细胞器变性,细胞连接消失,吞饮小泡减少,内皮细胞结构发生改变。这些改变可能是血管内皮细胞间质转化的基础。

研究发现心肌纤维化中调控 EndMT 的信号通路主要是 TGF- β 和 Wnt 通路。经典的 TGF- β 1/sm α d 通路可以引起内皮细胞表型和功能的变化^[12],是报道最多的 EndMT 调控因子。此外,许多转录因子也参与了 EndMT。Medici 等报道,Snail (锌指蛋白转录因子),能抑制内皮细胞表面表达 VE-cadherin,促进内皮细胞表面 FSP-1 等间质细胞表面标志物的表达,从而促进 EndMT^[13]。目前 EndMT 在各种病理变化中的作用研究成为热点,期望通过研究 EndMT 的发病机制,阻断其中的关键信号通路或者靶向作用于重要转录因子,阻止 EndMT 发生,将有助于为心肌纤维化提供新的预防和诊疗策略。

参考文献

[1] Li X1, Huang W2, He B, et al. Role of blocking ADAMI0 hydrolysis site on N-cadherin by single-chain antibody in ventricular

remodeling[J]. Exp Ther Med 2017, 14(5): 4215-4223.

- [2] 梁毓源, 吴敏, 符光炳, 叶张章. 扩张型心肌病左心室重构对心功能和室性心律失常的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(33): 41-43.
- [3] Yano T, Miura T, Ikeda Y, et al. Intracardiac fibroblasts, but not bone marrow derived cells, are the origin of myofibroblasts in myocardial infarct repair. Cardiovasc Pathol 2005, 14: 241-246.
- [4] Xu X, Tan X, Tampe B, et al. Snail is a direct target of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) in hypoxia-induced endothelial to mesenchymal transition of human coronary endothelial cells. J Biol Chem, 2015, 290: 16653-16664.
- [5] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. Nat Med, 2007, 13: 952-961.
- [6] Cheng SL, Shao JS, Behrmann A, et al. Dkk1 and MSX2-Wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial-mesenchymal transition in aortic endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(7): 1679-1689.
- [7] Kato H, Fu YY, Zhu J, et al. Pulmonary vein stenosis and the pathophysiology of "upstream" pulmonary veins. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 148(1): 245-253.
- [8] Richards J, El-Hamamsy I, Chen S, et al. Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: Interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling. Am J Pathol 2013, 182(5): 1922-1931.
- [9] Kania G, Blyszczuk P, Valaperti A, et al. Prominin-1 + /CD133 + bone marrow-derived heart-resident cells suppress experimental autoimmune myocarditis. Cardiovasc Res 2008, 80: 236-245.
- [10] Xu X, Friehs I, Zhong Hu T, et al. Endocardial fibroelastosis is caused by aberrant endothelial to mesenchymal transition. Circ Res, 2015, 116(5): 857-866.
- [11] Ma K L, Liu J, Ni J, et al. Inflammatory stress exacerbates the progression of cardiac fibrosis in high-fat-fed apolipoprotein E knockout mice via endothelial-mesenchymal transition. Int J Med Sci, 2013, 10(4): 420-426.
- [12] Widyananto B, Emoto N, Nakayama K, et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition. Circulation 2010, 121: 2407-2418.
- [13] Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Snad-independent signaling. Biochem J 2011, 437: 515-520.

(2017-11-02 收稿)