

· 基础研究 ·

退行性钙化性主动脉瓣膜病的病理组织学分析

尹彤 王士雯 高磊 李决 王红月 刘蕾 赵玉生

【摘要】 目的 分析退行性钙化性主动脉瓣膜病(DCAVD)不同病变阶段的病理组织学特征。方法 选择尸检和经外科手术的成人主动脉瓣膜标本共55例,利用组织学和免疫组织化学染色方法,对瓣膜内各种物质和细胞的表达情况进行分析。回顾各例心血管危险因素有关的临床记录。结果 不同程度主动脉瓣膜病变均以瓣膜基底部增厚明显,增厚区病灶及附近的纤维层内蛋白质、脂肪和钙盐聚集。免疫组化染色示,不同程度病变中,CD68阳性的单核巨噬细胞浸润,偶尔可见T细胞;还可见由CD31阳性的内皮细胞围绕而成的新生毛细血管结构,以及骨母细胞标记物OPN表达,上述标记物随病变程度加重而表达数量增加。心血管疾病危险因素,如吸烟史、高脂血症、高血压、冠心病,在重度病变中的发生率显著高于轻中度病变。结论 DCAVD的病理组织学特征与动脉粥样硬化具有相似之处,这些特征包括瓣膜内脂质、蛋白质和钙盐沉积,单核巨噬细胞浸润,新生毛细血管增生以及骨母细胞形成。

【关键词】 退行性钙化性瓣膜病;主动脉瓣膜;病理组织学分析

Histopathological analysis of senile degenerative calcific aortic valvular disease

YIN Tong, WANG Shiwen, GAO Lei, et al

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Department of Pathology, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To analyse the histopathological features of degenerative calcific aortic valvular disease (DCAVD).

Methods Histological and immunohistochemical studies were performed on 55 aortic valves. Cardiovascular related risk factors were recorded for each case. **Results** Significant thickening of the basal third of leaflet could be seen for each case of DCAVD. Thickening was characterized by the presence of intracellular and extracellular neutral lipids, protein and fine, stippled mineralization in subendothelial space on the aortic side of the leaflet and adjacent fibrous layer. Accumulation of the materials increased with the degree of lesions. Immunohistochemical studies showed that clustered mono-macrophages (anti-CD68), T lymphocytes (anti-CD3), neoformative capillaries surrounded by endothelial cells (anti-CD31), and osteoblasts (anti-OPN) could be seen both in mild to moderate lesions and in severe lesions of DCAVD. Control valves showed none of these abnormalities. Expression of above mentioned antibodies increased from mild to severe cases. Prevalence of smoking, hyperlipidemia, hypertension, and coronary heart disease in DCAVD with clinical aortic stenosis in severe DCAVD were significantly higher than those in mild to moderate DCAVD. **Conclusion** DCAVD is an active inflammatory process with some similarities (such as lipid deposition, macrophage and T-cell infiltration, neoformative capillary proliferation, osteoblast formation) to atherosclerosis.

【Key words】 calcific heart valvular disease; aortic valve; histopathology

临床流行病学研究发现,退行性钙化性瓣膜病与动脉粥样硬化之间存在相似的危险因素,并且可能与动脉粥样硬化一样,能够通过早期的药物干预

得到治疗。本研究的目的是通过检测尸检和外科手术获得的大体不同程度病变的主动脉瓣标本,分析人体退行性主动脉瓣膜病(degenerative calcific aortic valvular disease, DCAVD)不同时期病变的病理组织学特征,寻找 DCAVD 与动脉粥样硬化的相似之处。

1 材料与方法

1.1 对象 收集解放军总医院 2002 年 5 月至 2005 年 5 月期间,非心脏原因死亡的尸检和手术切除的

收稿日期:2005-08-22

基金项目:军队“十五”重点课题资助(项目编号:01Z034)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院老年心血管病研究所(尹彤、王士雯、高磊、李决、赵玉生);100037 北京市,中国医学科学院中国协和医科大学阜外心血管病医院病理科(王红月、刘蕾)

作者简介:尹彤,女,1973年6月生,江苏镇江市人,在读博士研究生,主治医师。E-mail: yintong1@163.com

不同程度主动脉瓣膜病变的标本共 55 例。为了确保瓣膜能够代表 DCAVD, 疾病排除标准包括排除冠心病、心内膜炎、主动脉二叶化畸形等, 同时排除影响全身钙磷的代谢性疾病。

1.2 方法 根据大体标本病变严重程度划分为正常、轻中度、重度。由于同一病例的三叶主动脉瓣膜病变程度基本一致, 取其中一叶为样本, 瓣膜取材方向为靠近瓣叶中央垂直通过瓣膜尖部、中部、基底部(包括瓣环), 瓣膜组织经连续切片后, 分别用于组织学和免疫组化分析。回顾与心血管危险因素有关的临床记录。HE 染色检测瓣叶各层厚度; Verhoeff-van Gieson (VvG) 染色检测弹力纤维的分布; 茜素红染色检测钙盐沉积; 油红 O 染色检测中性脂肪(6 例冰冻切片); Alcian blue-PAS 染色检测蛋白聚糖分布。免疫组化检测瓣膜内细胞成分, anti-CD68 单抗检测巨噬细胞, CD20 单抗识别 B 淋巴细胞, CD3 单抗识别 T 淋巴细胞, CD31 单抗识别血管内皮细胞。anti-osteopontin(骨桥蛋白, OPN) 单抗识别骨母细胞。

1.3 统计学方法 利用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理, 统计学意义建立在 $P < 0.05$, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。非连续变量之间的比较采用单因素 χ^2 检验; 等级资料之间比较采用秩和检验; 潜在的连续预测值以平均值表示, 平均值的比较采用单因素方差分析检验。

2 结果

2.1 病例的一般情况及临床资料 根据瓣膜大体病变程度分为无病变组($n=3$)、轻中度病变组($n=15$)、重度病变组($n=37$)。各组病例年龄、性别及心血管疾病相关危险因素的发生率见表 1。

表 1 心血管疾病危险因素与大体瓣膜病变的关系

心血管疾病危险因素	大体瓣膜病变程度		
	无病变 ($n=3$)	轻中度(无 临床狭窄) ($n=15$)	重度 (临床狭窄) ($n=37$)
年龄(平均值)	23-42(30)	60-94(79)	49-74(62)
性别(男/女)	2/1	12/3	27/10
吸烟史(%)	0	6.2	47.8*
高脂血症(%)	0	13.3	52.4*
高血压(%)	0	18.8	47.8*
糖尿病(%)	0	12.5	13.0
冠心病(%)	0	25.0	47.8*

注: 和轻中度人体疾病相比, * $P < 0.05$, χ^2 检验

2.2 瓣膜病变的病理组织学分析 不同程度瓣膜病变主要与瓣膜基底部增厚有关, 增厚性病变与瓣

膜主动脉面出现内皮下病变有关(HE 染色), 随着瓣膜大体病变程度加重, 增厚性病变越明显。

病变组织学特征表现为, 直接位于内皮下的弹力纤维发生移位和碎片化(VvG 染色), 病变位于瓣膜的主动脉面内皮细胞基底膜之下, 错位的正常弹力纤维之上, 其中可见各种物质沉积和细胞聚集, 病变同时使临近的纤维层增厚(图 1)。随着大体病变程度的加重, 内皮下和纤维层的厚度明显增加。海绵层、心室层和心室面的内皮层变化不显著。(表 2)

表 2 瓣膜病变部位各层组织厚度与大体瓣膜病变的关系($\bar{x} \pm s$)

瓣膜病变部位各 组织层厚度(mm)	大体瓣膜病变程度		
	无病变 ($n=3$)	轻中度(无 临床狭窄) ($n=15$)	重度 (临床狭窄) ($n=37$)
全层厚度	1.24 $\pm$ 0.31	3.47 $\pm$ 0.33*	5.36 $\pm$ 0.24**
主动脉面内皮 层+纤维层	0.85 $\pm$ 0.26	3.17 $\pm$ 0.21*	4.86 $\pm$ 0.12**
海绵层	0.23 $\pm$ 0.12	0.27 $\pm$ 0.15	0.25 $\pm$ 0.23
心室层+心室 面内皮层	0.11 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.10

注: 与无病变组比较, * $P < 0.05$, 单因素方差检验; 与轻中度病变组比较, ** $P < 0.05$, 单因素方差检验

茜素红染色示, 病灶部明显矿化只出现在重度病变中, 但显微镜下细胞外矿化十分常见, 能见于 14 例轻中度病变和所有重度病变, 表现为病变内和附近纤维层的增厚区内细条纹状的矿化颗粒, 且与脂质沉积有关(图 2), 大钙化结节主要见于重度病变, 钙化结节中除了含有矿化成分外, 同时含有中性脂肪。正常对照组瓣膜中为阴性。

油红 O 染色示, 广泛的细胞内和细胞外中性脂肪沉积见于轻中度和重度病变瓣膜中, 沉积区域主要分布在病变内皮下及附近纤维层, 脂质沉积方向与胶原纤维平行(图 3)。正常对照组瓣膜纤维层中的染色为阴性。

不同程度瓣膜病变区的纤维层内均可见 Alcian blue-PAS 阳性的蛋白物质存在。正常的主动脉瓣膜内, PAS 阳性的物质仅出现在直接位于瓣膜主动脉面和心室面的内皮下, 与基底膜的部位相一致。

在不同程度病变的主动脉瓣膜中, 单核细胞 CD68 免疫染色聚集分布(图 4), CD68 在泡沫细胞内的表达亦为阳性。巨噬细胞主要位于病变表面, 而钙化在病变基底部明显。正常瓣膜中, 单核细胞零星散在分布。各型病变中, 淋巴细胞均少见, 主要由

CD3 阳性的 T 淋巴细胞组成。正常瓣膜中未见淋巴细胞标志物表达。HE 染色示,不同程度病变瓣膜中,可见新生毛细血管,内皮细胞中 CD31 表达阳性(图 5)。新生毛细血管出现在浸润的炎症细胞附近。正常瓣膜中,仅在基底部有少量小血管分布。轻中度病变中,瓣膜主动脉面内皮下和纤维层内散在 OPN 阳性表达;重度病变中,纤维层钙化区内成片分布 OPN 表达阳性的细胞及细胞周围基质(图 6)。OPN 在正常瓣膜内无表达。

上述各种组织学病变特征与大体主动脉瓣膜病变之间的关系见表 3,各种组织学病变程度与大体主动脉瓣膜病变程度的关系见表 4。

表 3 各种组织学病变特征与不同程度大体主动脉瓣膜病变的关系

组织学病变特征	大体瓣膜病变程度	
	轻中度 (无临床狭窄) (n = 15)	重度 (临床狭窄) (n = 37)
钙盐沉积	14/15 (93.3%)	37/37 (100%)
脂质沉积*	2/2 (100%)	4/4 (100%)
蛋白物质沉积	15/15 (100%)	37/37 (100%)
单核细胞聚集	8/15 (53%)	23/37 (62.2%)
新生毛细血管增生	3/15 (20%)	17/37 (45.9%)
骨母细胞标志物表达	13/15 (86.7%)	37/37 (100%)

注:重度和轻中度大体疾病相比, $P>0.05$, χ^2 检验;* 由于仅获得 7 例新鲜主动脉瓣膜标本组织,故行油红 O 染色的例数少

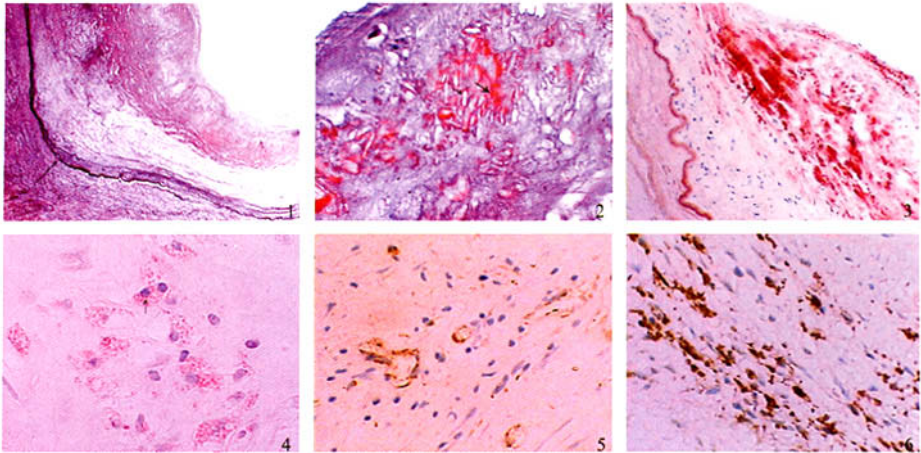


图 1 瓣膜内皮下弹性层移位和碎片化(箭头示;VvG 染色,×100)
图 2 橘红色钙盐沉积(粗箭头示)同一区域内可见胆固醇结晶(细箭头示;茜素红染色,×400)
图 3 鲜红的脂质沉积方向与纤维层内胶原纤维平行(箭头示;油红 O 染色,×100)
图 4 单核细胞在病变主动脉瓣膜纤维层内浸润(箭头示;CD68 免疫组化染色,×400)
图 5 管壁内皮细胞中 CD31 抗体的表达为阳性(CD31 免疫组化染色,×40)
图 6 OPN 在重度病变主动脉瓣膜纤维层内广泛表达(OPN 免疫组化染色,×400)

表 4 各种组织学病变程度与大体主动脉瓣膜病变程度的关系

组织学病变特征	大体瓣膜病变程度(例数)								P 值
	轻中度				重度				
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	
钙盐沉积	3	5	7	0	0	0	2	35	<0.0005
脂质沉积	0	2	0	0	0	0	3	1	0.046
蛋白质沉积	4	11	0	0	0	2	15	20	<0.005
单核细胞聚集	1	2	5	0	0	3	10	10	0.016
新生毛细血管增生	3	0	0	0	1	3	8	5	0.008
骨母细胞标志物表达	5	7	1	0	0	7	10	20	<0.0005

注:重度和轻中度大体疾病相比,P 值,秩和检验

3 讨论

本研究所选择的 55 例(3 例对照)不同大体病变程度的主动脉瓣膜中,各种组织学特征在轻中度病变与重度病变中的分布未见显著性差异,而重度大体病变组中,各种组织学病变特征的严重程度均高于轻中度病变组,因此本组病例能够反映 DCAVD 不同病变发展阶段的病理改变。

研究发现 DCAVD 在瓣膜内具有空间异质性,不同大体主动脉瓣膜病变主要发生在基底部,同时基底部增厚性病变与主动脉面的内皮下病变有关。瓣膜不同部位对钙化易损性的差异可能与主动脉瓣膜内皮细胞基因表型的空间异质性有关^[1]。

DCAVD 病变中可见到多种物质的沉积,其中不同病变瓣膜内脂质沉积方式并非单纯随龄变化所致,而是类似于动脉粥样硬化病变中脂质沉积的方式,在瓣膜病变内出现单核吞噬细胞源性泡沫细胞,以及出现与动脉粥样硬化有关的载脂蛋白成分的现象支持上述观点^[2]。另外,钙化和脂质在动脉粥样硬化中的密切关系同样见于 DCAVD 的病变中^[3-6]。除了脂质沉积外,本研究还发现在瓣膜病变区域的纤维层内,可见 PAS 阳性的蛋白质,该物质可能是由纤维层内增生的纤维母细胞产生的基质蛋白多糖成分,日前已知纤维基质蛋白(如基质金属蛋白酶)参与动脉粥样硬化的发病过程,纤维基质蛋白是否同样参与 DCAVD 的瓣膜重塑过程尚有待于进一步证实^[7,8]。

DCAVD 病变中炎症细胞浸润主要位于表面,而钙盐沉积则主要位于病变深层,说明随疾病发展,损害也是逐层发展的。病变瓣膜中巨噬细胞可能通过主动脉面内皮细胞进入内皮下间隙,并吞噬沉积的脂质,形成泡沫细胞,该过程类似于动脉粥样硬化的脂斑形成。有研究报道,DCAVD 中白介素-2 受体的表达升高,该受体的表达是 T 淋巴细胞被激活的证据^[9],因此,T 淋巴细胞可能也在 DCAVD 的发病过程中起重要作用。

病变内毛细血管增生是动脉粥样硬化和炎症相关瓣膜疾病的特点,Olto 等^[10]曾经对 DCAVD 早期病变的组织学特征进行研究,结果未发现血管成分。本研究则在不同阶段 DCAVD 病变中均发现新生薄壁毛细血管,这与最近 Chalajour 等^[11]和 Soini 等^[12]的研究发现相一致,提示血管生成可能与 DCAVD 的进展有关。

本研究还发现在大部分轻中度和所有重度瓣膜病变中,能够见到骨母细胞特异性标志物骨桥蛋白

(OPN)表达,随病变程度加重,OPN 表达水平升高,这一现象与动脉粥样硬化的晚期病变中血管壁内在原有的无定型钙盐沉积的基础上见成熟骨组织形成相似。另有研究发现,在临床狭窄的 DCAVD 病变中还可可见其它骨基质蛋白表达^[13]。因此,DCAVD 并非单纯被动的营养不良性钙化,而是由多种骨代谢相关因子参与的主动异位骨化过程。

本研究通过分析 DCAVD 不同程度病变的病理组织学特征,为钙化性瓣膜病是一类似于动脉粥样硬化的主动疾病过程的观点提供了组织学诊断依据,为今后的瓣膜病变的诊断和治疗提供了参考指标。

参考文献

- 1 Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, et al. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with site-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res*, 2005;96:792-799.
- 2 O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, et al. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 1996, 16: 523-532.
- 3 Martin BJ, Thomas S, Greenhill NS, et al. Isolation and purification of extracellular matrix vesicles from blood vessels. *Prep Biochem*. 1992;22:87-103.
- 4 Kim KM. Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc*, 1976, 35:156-162.
- 5 Kim KM, Valigorsky JM, Mergner WJ, et al. Aging changes in the human aortic valve in relation to dystrophic calcification. *Hum Pathol*, 1976,7:47-60.
- 6 Mohler ER, Chawla MK, Chang AW, et al. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis*, 1999,8:254-260.
- 7 Satta J, Oiva J, Salo T, et al. Evidence for an altered balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in calcific aortic stenosis. *Ann Thorac Surg*, 2003,76:681-688.
- 8 Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, et al. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol*, 2005, 14:80-87.
- 9 Olsson M, Dalgaard CJ, Haegerstrand A, et al. Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol*, 1994, 23:1162-1170.
- 10 Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. Characterization of the early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis: histologic and immunohistochemical studies. *Circulation*, 1994, 90:844-853.

- 11 Chalajour F, Treede H, Ebrahimnejad A, et al. Angiogenic activation of valvular endothelial cells in aortic valve stenosis. *Exp Cell Res*, 2004, 298:455-464.
- 12 Soini Y, Salo T, Satta J. Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol*, 2003, 34:756-763.
- 13 Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB, et al. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest*, 1997, 99: 996-1009.

·短篇论著·

脂蛋白(a)水平与冠状动脉病变程度的关系

肖坤明 刘玲 张志萍 赵水平 沈向前 赵延恕 方臻飞

日益增多的临床和基础研究支持脂蛋白(a)[Lp(a)]是冠心病的一个独立危险因素。但是,血清 Lp(a)水平与冠状动脉病变程度的关系尚存有争议。本研究旨在探讨血清 Lp(a)水平与冠状动脉病变程度的关系。

1 资料与方法

收集接受冠状动脉造影术的受试者 112 例。男 73 例,女 29 例,年龄(61 ± 9)岁。采用修正的 Gensini 评分系统进行定量分析冠状动脉病变程度,总积分为 0~32。按冠状动脉总积分 0.1~9、 ≥ 10 分为三组:(1)正常对照组 37 例;(2)轻度病变组 44 例;(3)重度病变组 41 例。排除急性心肌梗死急性期造影的病例,以及血管完全性闭塞后形成侧支循环但远端不能完全评价的病例。

酶法测定空腹血清 TG、TC,直接法测血清 HDL-C 和 LDL-C 浓度。免疫比浊法测定 Lp(a)水平。

所有数据输入数据库经 SPSS 统计软件包进行统计,采用双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

三组受试者的年龄、修正 Gensini 积分(178.4 ± 25.7 ;

215.3 ± 29.3 ; 391.3 ± 86.9 ; $P < 0.001$)和血清 Lp(a)水平(0 ; 5.2 ± 2.5 ; 12.2 ± 1.8 ; $P < 0.001$)按对照组、轻度组、重度组依次递增。其余临床指标均无统计学意义。

相关分析显示:修正的 Gensini 积分与年龄($r = 0.355$, $P = 0.000$)、血清 Lp(a)水平($r = 0.379$, $P = 0.000$)、尿酸水平($r = 0.206$, $P = 0.046$)显著相关。以修正的 Gensini 积分为因变量,进行多元线性逐步回归分析,发现年龄($\beta = 0.377$, $P = 0.000$)、血清 Lp(a)水平($\beta = 0.421$, $P = 0.000$)是修正的 Gensini 积分的独立相关因素,其余指标无显著相关性。

3 讨论

血脂紊乱是冠心病的独立危险因素。然而,升高的血浆/血清中的 Lp(a)水平与冠状动脉疾病严重程度的关系一直存有争议。本研究以修正的 Gensini 积分作为评价冠状动脉狭窄与病变严重程度的综合指标,积分越高的受试者血清 Lp(a)水平越高,支持 Lp(a)与冠状动脉病变严重程度密切相关。既往本科应用另一种冠状动脉评分系统对 74 例因胸痛而接受选择性冠脉造影的患者进行了统计,同样证实 Lp(a)水平随冠状动脉积分的增加而相应升高,但多因素回归分析未显示冠状动脉积分与 Lp(a)的相关性。本研究对较大样本进行了统计,证实除年龄外, Lp(a)水平对修正的 Gensini 积分有独立的贡献,支持 Lp(a)水平可以作为冠状动脉狭窄与病变严重程度的预测指标。Lp(a)与脂质沉积、血栓形成和炎症密切相关,后者是动脉粥样硬化发生、发展的重要机制。

收稿日期:2005-04-17

作者单位:410111 长沙市,中南大学湘雅二医院心内科(肖坤明 <进修生,现在津市监狱医院>,刘玲、赵水平、沈向前、赵延恕、方臻飞);津市监狱医院(张志萍)

作者简介:肖坤明,男,1969 年 12 月生,湖南省洞口县人,大专,主治医师,内科主任。Tel:13974257897