

室间隔缺损膜部瘤组织内细胞增殖和生存能力分析

孙 伟¹, 李名鹏¹, 缪利平¹, 吴延虎², 孔祥清^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院心内科, ²胸外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:通过对室间隔缺损合并的膜部瘤组织内细胞的增殖和存活能力进行组织学分析,了解膜部瘤这一特殊组织的病理学特性。方法:采用 HE 染色对假性和真性膜部瘤组织进行组织结构分析,采用 Ki67 和磷酸化 Akt(pAkt)免疫组织化学染色对膜部瘤组织细胞的增殖和存活能力进行分析。结果:HE 染色表明假性膜部瘤组织内细胞数量显著多于真性膜部瘤,但细胞外基质较少,结构比较疏松。Ki67 染色结果提示假性膜部瘤细胞增殖能力强于真性膜部瘤,而磷酸化的 Akt 表达仅见于假性膜部瘤组织内部分细胞,真性膜部瘤组织无表达。结论:假性膜部瘤组织具有较强的细胞增殖和存活能力,是一种处于活跃状态的组织。

[关键词] 膜周部室间隔缺损;室间隔膜部瘤;增殖;磷酸化 Akt

[中图分类号] R541.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)08-1057-04

Proliferation and survival analysis of aneurysms of membranous septum associated with perimembranous ventricular septal defect

SUN Wei¹, LI Ming-peng¹, MIAO Li-ping¹, WU Yan-hu², KONG Xiang-qing^{1*}

(¹Department of Cardiology, ²Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the pathological characteristics of aneurysms of membranous septum (AMS) associated with perimembranous ventricular septal defect by analyzing cell proliferation and survival. **Methods:** The structure of AMS was analyzed by HE staining. Immunohistochemical staining of Ki67 and phosphorylated Akt (pAkt) was performed to identify cell proliferation and survival in AMS. **Results:** HE staining showed that the number of cells in false AMS was more than that in true AMS, but the extracellular matrices of false AMS were less compact than those of true AMS. Much more Ki67 positive cells in false AMS suggested a more powerful proliferation than true AMS. pAkt staining was only found in endothelial and subendothelial cells in false AMS. **Conclusion:** False AMS demonstrates stronger ability of cellular proliferation and survival indicating it's an active tissue.

[Key words] perimembranous ventricular septal defect; aneurysm of membranous septum; proliferation; phosphorylated Akt

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(8): 1057-1060]

膜周部室间隔缺损(perimembranous ventricular septal defect, pmVSD)是临床最常见的先天性心脏病之一。由于发育及出生后代偿性修复等原因,pmVSD常常合并膜部瘤形成,有文献报道其发生率可达45%~86%^[1-3]。室间隔膜部瘤主要分为两种类型:①膜部室间隔向右侧心腔囊状突起,其上伴有破口,称为真性膜部瘤;②室间隔缺损伴发的膜部瘤,目前认为是由于三尖瓣及腱索长期受室间隔缺

损处高压血流冲击,纤维组织沉积粘连形成,称为假性膜部瘤^[4]。无论是真性膜部瘤还是假性膜部瘤,尤其是后者均是机体自我修复的一种表现,膜部瘤是室间隔缺损自愈的主要方式,但其发生的机制和组织学特性目前尚不清楚。本研究通过对两种膜部瘤的组织学进行研究,旨在发现其组织学上的一些特点,以利于更好地理解pmVSD的自愈机制,为寻找可能的干预手段提供线索。

1 对象和方法

1.1 对象

[基金项目] 江苏省科技厅社会发展项目(BE2011800)

*通讯作者, E-mail: Kongxq@njmu.edu.cn

2011年3月~12月共收治18例膜部室间隔缺损伴膜部瘤形成患者,男10例,女8例,年龄(11.5 ± 3.4)岁。所有患者均行室间隔缺损修补术,术中切取 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 左右膜部瘤组织。其中12例手术证实为假性膜部瘤,6例为真性膜部瘤。

1.2 方法

1.2.1 HE染色

离体的膜部瘤组织冰PBS漂洗后,立即用4%多聚甲醛 4°C 固定,24 h后常规石蜡包埋,进行连续切片(厚 $0.4\ \mu\text{m}$)后行HE染色(常规方法)。

1.2.2 免疫组织化学染色

免疫组化染色采用UltraSensitive™ S-P(兔)试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)完成,主要步骤如下:切片常规脱蜡水化,用柠檬酸盐抗原修复液高压法抗原修复,每张切片加 $50\ \mu\text{l}$ 过氧化物酶阻断液孵育10 min,每张切片加 $50\ \mu\text{l}$ 山羊血清封闭10 min,一抗[兔抗Ki67抗体(sc-15402,美国Santa Cruz公司);兔抗磷酸化Akt抗体(s473, #4060,美国Cell Signaling Technology公司)] 4°C 孵育过夜后,每张切片加 $50\ \mu\text{l}$ 生物素标记的二抗孵育10 min,每张切片加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液孵育10 min,DAB显色,酒精脱水,中性树脂封片,光镜下观察。

1.2.3 计数增殖细胞

采用Image Pro Plus6.0软件对增殖细胞进行计数,对每例患者的随机3张组织切片200倍放大视

野拍照,每张切片选取5个200倍视野图,统计其中Ki67阳性细胞数和细胞总数,并计算Ki67阳性细胞比例,应用该比例除以视野面积后得到单位面积中Ki67阳性细胞比例用于组间比较。

1.3 统计学方法

GraphPad Prism 5.0和SPSS17.0软件进行统计分析和图表制作,计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述。组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

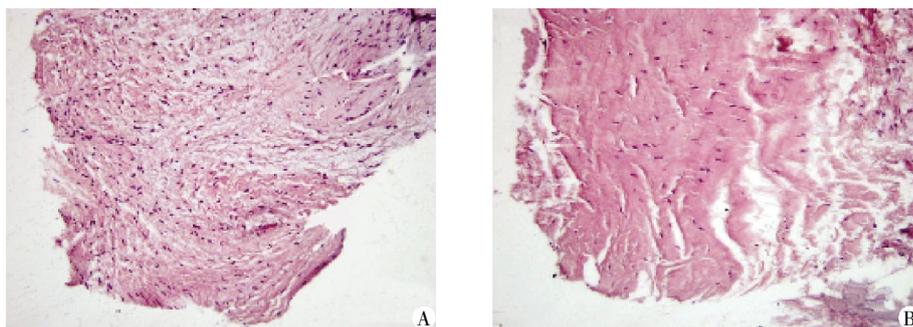
2 结果

2.1 真性和假性膜部瘤形态

心内探查见真性膜部瘤为膜部间隔突出呈囊袋状,缺损位于囊袋中间5例,位于囊袋根部1例。假性膜部瘤可见3种形态:①隔瓣与前瓣交界处纤维组织增生,形成一不规则膜状结构部分遮盖室间隔缺损2例;②隔瓣增厚呈不规则纤维瘤状增生并与室缺边缘粘连、不完全遮盖室缺3例;③隔瓣增生遮盖室缺形成一囊袋,上有1个或多个小孔与右心相通7例。

2.2 假性膜部瘤组织内细胞数显著多于真性膜部瘤

对假性膜部瘤和真性膜部瘤组织进行HE染色后发现,假性膜部瘤组织内细胞数量显著多于真性膜部瘤,而细胞外基质明显少于真性膜部瘤(图1)。假性膜部瘤组织整体结构较为疏松,而真性膜部瘤比较坚实。



A:假性膜部瘤细胞数目较多,细胞外基质成分少,组织较疏松;B:真性膜部瘤细胞数目较少,细胞外基质成分多,组织较致密。

图1 室间隔膜部瘤组织HE染色结果($\times 200$)

Figure 1 HE staining for aneurysms of membranous septum in ventricular septal defects($\times 200$)

2.3 假性膜部瘤和真性膜部瘤组织中均可见处于增殖状态的细胞

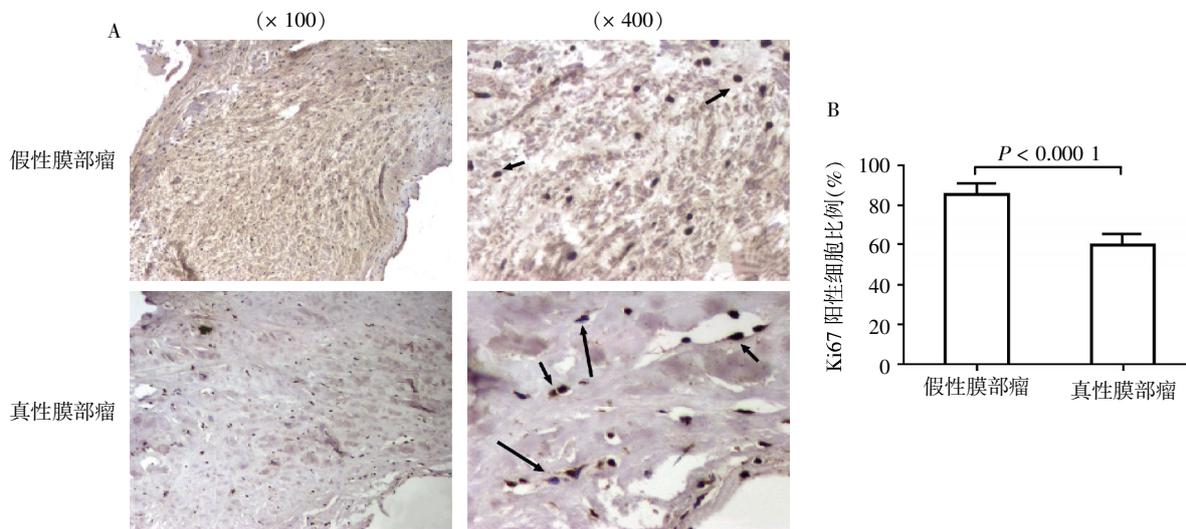
为了解膜部瘤组织内细胞增殖的状态,采用Ki67染色进行评估,结果显示:假性和真性膜部瘤组织中均有处于增殖状态的细胞,假性膜部瘤组织中几乎所有的细胞均为Ki67阳性细胞,而真性膜部

瘤组织中仅有部分细胞显示Ki67阳性(图2A),半定量分析表明假性膜部瘤组织Ki67阳性细胞比例为 0.85 ± 0.01 ($n = 12$),真性膜部瘤组织Ki67阳性细胞比例为 0.60 ± 0.02 ($n = 6$),两者比较差异有统计学意义($P < 0.0001$,图2B),提示假性膜部瘤的细胞增殖能力强于真性膜部瘤,处于更加活跃的状态。

2.4 磷酸化 Akt 仅见于假性膜部瘤组织

为了解膜部瘤组织内细胞的生存力,对其进行磷酸化 Akt 染色分析,结果显示:磷酸化Akt(即活化的 Akt)的表达仅见于假性膜部瘤组织中,真性

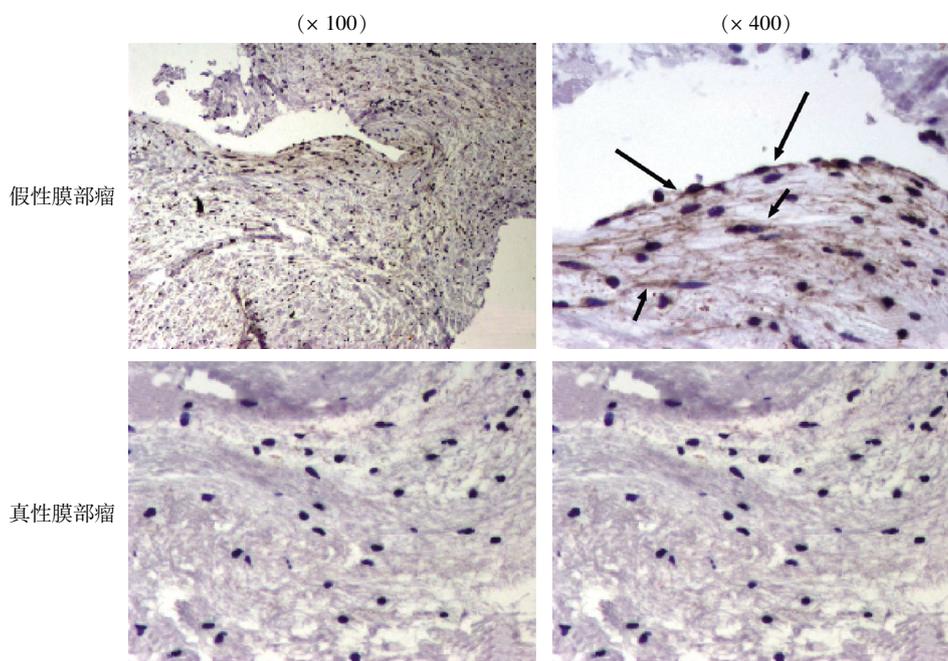
膜部瘤中未见明显表达。活化的 Akt 主要集中在假性膜部瘤瘤体弯折处内皮层及内皮下方(图 3),瘤体中央部分无显著表达,提示 Akt 活化可能与局部的血流动力学状态有关。



A:假性膜部瘤内细胞几乎均为 Ki67 染色阳性(短箭头所指);真性膜部瘤内部分细胞为 Ki67 染色阳性(短箭头所指),大多数细胞 Ki67 染色阴性(长箭头所指);B:半定量分析显示假性膜部瘤内 Ki67 阳性细胞比例高于真性膜部瘤。

图 2 膜部瘤组织细胞增殖情况分析

Figure 2 Proliferation assay of aneurysms of membranous septum



假性膜部瘤内可见磷酸化 Akt 阳性细胞,主要位于膜部瘤弯折处表层及表层下,内皮细胞(长箭头)和成纤维细胞(短箭头)均可见磷酸化 Akt 的表达。真性膜部瘤组织内未见到磷酸化 Akt 阳性细胞。

图 3 膜部瘤组织细胞 Akt 活性分析

Figure 3 Phosphorylated Akt analysis of aneurysms of membranous septum

3 讨论

伴有室间隔缺损的真性膜部瘤系出生后由于膜

部室间隔自然闭合过程延缓,其薄弱部分在左室高压下形成膜部瘤和穿孔。室间隔缺损伴发的膜部瘤更为常见,又称为“假性膜部瘤”,目前认为其主要由

三尖瓣隔瓣缘、腱索或周围组织在室间隔缺损左向右分流血液长期高压冲击下引起纤维组织增生,与室间隔缺损之间形成粘连而成。假性膜部瘤是机体的一种自我修复表现,膜部瘤的形成可以有效减少血液经缺损口的左向右分流量,使得较大的室间隔缺损分流变为较小量的血液分流,减轻心脏负荷,部分膜部瘤可以完全关闭室间隔缺损。另外,随着近年来室间隔缺损介入治疗的蓬勃发展,假性膜部瘤也使得原本只能接受手术修补的大型室间隔缺损获得行微创介入封堵治疗的机会^[5-6]。

室间隔缺损合并膜部瘤尤其是假性膜部瘤的发生率很高,但膜部瘤的组织学特点和分子机制尚不清楚,本研究首次对两种膜部瘤进行了组织学研究。首先,通过 HE 染色发现假性膜部瘤组织内细胞数较多,但细胞外基质成分明显少于真性膜部瘤,提示假性膜部瘤是一种相对不成熟的纤维性组织,其组织强度低于真性膜部瘤组织,这个结果为伴假性膜部瘤的室间隔缺损接受介入治疗时因瘤体支撑力不足而导致介入封堵失败的病例提供了组织学证据。如果能通过某些方法使得假性膜部瘤组织强度增加,那么将有可能提高介入封堵的成功率。对膜部瘤增殖性能分析显示,假性膜部瘤组织的细胞具有较强的增殖能力,而真性膜部瘤增殖力较差,提示假性膜部瘤是一种处于活跃状态能够不断增殖的组织体,在血流的不断冲击下可能不断增生,这种不断增殖的能力一方面可以使原有的较大的缺损口变小甚至闭合,但也可能产生一定的负面影响包括引起右室流出道梗阻和易并发感染性心内膜炎等^[7-10]。

活化的 Akt 是促进细胞生存和抗凋亡的重要因子。本研究中,真性膜部瘤表面和内部细胞未见明显磷酸化 Akt 表达,而假性膜部瘤表面的内皮细胞和内皮下间质细胞内均可见到明显的磷酸化 Akt 表达,提示假性膜部瘤部分细胞具有更强的生存和抗凋亡能力,活化的 Akt 主要表达在组织弯折处提示该处细胞可能通过活化 Akt 来增强高压血流冲击后的细胞生存能力。Chang 等^[11]报道,在 Akt 敲除的小鼠中室间隔缺损和房间隔缺损的发生率显著升高,提示 Akt 在间隔形成和闭合中具有重要的作用。结合本研究结果,推测真性膜部瘤组织缺乏有效的磷酸化 Akt 表达可能是难以闭合的原因之一,而假性膜部瘤组织能够持续表达有活性的 Akt 可能是许多假性膜部瘤能够在少年甚至青年时期最终完全闭合的原因之一。

本研究通过对室间隔膜部瘤组织的组织学研

究,首次分析了膜部瘤组织内细胞的增殖能力和生存能力,对研究室间隔膜部瘤形成机制和寻找促进室间隔缺损自愈或增加膜部瘤强度以利于介入治疗的方法进行了初步探索性研究。主要不足之处在于样本量较少,今后将扩大样本量来进一步论证研究结果。

[参考文献]

- [1] 刘璟,游晓华,赵仙先,等. 国产封堵器治疗先天性膜周部室间隔缺损的疗效评估 [J]. 中华心血管病杂志, 2010, 38(4): 321-325
- [2] Zuo J, Xie J, Yi W, et al. Results of transcatheter closure of perimembranous ventricular septal defect [J]. Am J Cardiol, 2010, 106(7): 1034-1037
- [3] 周蕾,许迪,孔祥清,等. 经胸超声心动图对室间隔缺损膜部瘤的分型及在介入治疗中的作用 [J]. 中国超声医学杂志, 2006, 22(4): 267-269
- [4] Ramaciotti C, Keren A, Silverman NH. Importance of (perimembranous) ventricular septal aneurysm in the natural history of isolated perimembranous ventricular septal defect [J]. Am J Cardiol, 1986, 57(4): 268-272
- [5] 周蕾,陆凤翔,许迪,等. 超声心动图在经导管膜周部室间隔缺损封堵围手术期中的应用 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2006, 26(1): 36-38
- [6] Bian C, Ma J, Wang J, et al. Perimembranous ventricular septal defect with aneurysm: two options for transcatheter closure [J]. Tex Heart Inst J, 2011, 38(5): 528-532
- [7] Yilmaz AT, Ozal E, Arslan M, et al. Aneurysm of the membranous septum in adult patients with perimembranous ventricular septal defect [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 1997, 11(2): 307-311
- [8] Wu MH, Chang CI, Wang JK, et al. Characterization of aneurysmal transformation in perimembranous ventricular septal defects: An adhered anterior leaflet of tricuspid valve predisposes to the development of left ventricular-to-right atrial shunt [J]. Int J Cardiol, 1994, 47(2): 117-125
- [9] Miyake T, Shinohara T, Nakamura Y, et al. Aneurysm of the ventricular membranous septum: Serial echocardiographic studies [J]. Pediatr Cardiol, 2004, 25(4): 385-389
- [10] Walpot J, Peerenboom P, van Wylick A, et al. Aneurysm of the membranous septum with ventricular septal defect and infective endocarditis [J]. Eur J Echocardiogr, 2004, 5(5): 391-393
- [11] Chang Z, Zhang Q, Feng Q, et al. Deletion of akt1 causes heart defects and abnormal cardiomyocyte proliferation [J]. Dev Biol, 2010, 347(2): 384-391

[收稿日期] 2012-03-08