

· 临床研究 ·

左室后壁厚度用于评估主动脉瓣狭窄患者瓣膜钙化情况的研究

罗 明,郑 蕊,孙浩亮,倪布清,邵永丰*

南京医科大学第一附属医院心脏大血管外科,江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**通过分析钙化性主动脉瓣疾病患者的左室后壁(left ventricle post wall, LVWP)厚度,评价患者瓣膜钙化的严重程度以及预后情况。**方法:**通过免疫组化染色、光密度半定量分析以及RT-PCR检测分析60例主动脉瓣钙化患者(分为轻、中、重主动脉瓣狭窄3组)的瓣膜组织钙化程度,比较各患者术前术后的射血分数(ejection fraction, EF)变化值,评估LVWP对判断有无手术指征以及预后的作用。**结果:**分析不同程度瓣膜狭窄组的LVWP,轻、中、重度瓣膜狭窄组两两对比,LVWP厚度依次增加,差异均有统计学意义。通过对瓣膜组织进行Von Kossa染色后半定量分析以及RT-PCR分析,LVWP轻、中、重度增厚组钙化程度依次加重,差异均有统计学意义。通过对患者手术前后EF差值分析,LVWP中度增厚患者的EF差值比LVWP轻度增厚患者大,差异有统计学意义。LVWP重度增厚患者的EF增加值与LVWP中度增高患者比较,差异无统计学意义。**结论:**LVWP可以用来预估主动脉瓣瓣膜的钙化程度,对于非主动脉瓣重度钙化患者,LVWP值越大,手术获益也越大。

[关键词] 钙化性主动脉瓣;左室后壁厚度;钙化程度;EF值

[中图分类号] R542.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)06-894-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20190620

Valve calcification were evaluated by left ventricular posterior wall thickness in patients with aortic stenosis

Luo Ming, Zheng Rui, Sun Haoliang, Ni Buqing, Shao Yongfeng*

Department of Cardiac and Aortic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to analyze the severity of left ventricular posterior wall (LVPW) in patients with calcific aortic valve disease, and to evaluate the severity of the lesion and prognosis. **Methods:** Immunohistochemical staining, semi-quantitative analysis of optical density and RT-PCR were used to detect the calcification degree of valvular tissue in 60 patients with aortic valve calcification, who were divided into mild, moderate and severe aortic stenosis groups. The changes of ejection fraction (EF) before and after operation were compared, and the role of left ventricle post wall (LVWP) in judging the indication of operation and prognosis was evaluated. **Results:** LVWP in different degree of stenosis group was analyzed, and LVWP in mild, moderate and severe stenosis group was increased in turn, the difference was statistically significant. Through the semi-quantitative analysis of Von Kossa staining of valve tissue and RT-PCR analysis, the calcification degree of LVPW mild, medium and severe thickening group increased in turn, and the difference was statistically significant. The EF difference before and after surgery of patients with LVPW medium thickening was more than that of patients with LVPW mild thickening, and the difference was statistically significant. There was no significant difference in the EF increase in patients with LVPW severe thickening and patients with LVPW medium thickening. **Conclusion:** LVPW can be used to estimate the approximate degree of aortic valve calcification. For patients with severe calcification of non-aortic valve, the greater the LVPW value, the greater the benefit of surgery.

[Key words] calcified aortic valve; left ventricular posterior wall thickness; calcification degree; EF value

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(06): 894-898]

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20151590)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yongfengshao30@hotmail.com

钙化性主动脉瓣疾病(calcified aortic valve disease,CAVD)是人群中常见的心脏病,在成人中,无论是有免疫因素的风湿性心脏瓣膜病,还是先天性二叶式主动脉瓣病变或退行性三叶式主动脉瓣病变,主动脉瓣狭窄都是CAVD中最常见的类型,会导致极严重的后果^[1-3]。随着人们生活条件的改善,以及平均寿命增加,退行性主动脉瓣病变已经取代风湿性主动脉瓣病变成为最常见的CAVD^[4]。狭窄形成以后,进行主动脉瓣置换手术是目前最佳的治疗手段。在主动脉瓣置换术前对于患者瓣膜狭窄程度的分级、心脏功能的评价以及预后估计是衡量是否有手术指征和预测手术收益的重要环节。尽管近年来指南对此做了较为具体的表述,这一环节目前仍然存在依赖医务工作者主观经验进行判断的现象,重症患者的手术指征和预后更加缺乏值得信任的客观检测依据。

二维超声心动图作为一种简单易行的无创手段能够比较准确地测量心脏各腔隙以及流入、流出道的情况^[5-6]。但是在心脏功能受损的患者中主动脉瓣跨瓣压差变小,通过主动脉瓣跨瓣压差评估主动脉瓣狭窄情况可能出现误差^[7-8]。本研究通过分析患者左室后壁(left ventricle post wall,LVWP)厚度评估LVWP对指导判断手术指征和预后的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

选取60例2013—2018年间在南京医科大学第一附属医院住院并行手术的主动脉瓣狭窄患者,其中男30例,女30例,年龄50~69(59.30±9.37)岁;根据二维超声心动图提示,将60例患者分为轻度、中度、重度主动脉瓣狭窄组。收集轻度、中度以及重度主动脉瓣狭窄组手术中的瓣膜各20例。每例瓣膜在术中切除后立即切分成三部分,一部分用10%多聚甲醛浸泡并石蜡包埋用于免疫组化染色等实验,一部分研磨匀浆后提取组织RNA用于PCR,另一部分保存备用。本研究经江苏省人民医院伦理委员会批准,所有相关患者都签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 PCR检测Runx2表达水平

使用miRNeasy Mini Kit试剂盒(Qiagen公司,美国)从人类瓣膜组织和猪的瓣膜间质细胞中提取RNA,用TaKaRa PrimeScript™ RT Master(TaKaRa公司,日本)试剂盒将其逆转录。使用TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ II(TaKaRa公司,日本)试剂盒和每

一个基因的引物(Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR引物,广州锐博生物公司)在ABI384孔PCR仪(7900HT Fast Real-Time PCR systems,ABI公司,美国)上进行PCR反应。

1.2.2 组织学染色方法

对石蜡包埋的切片进行Von Kossa染色,并进行半定量分析。其中Von Kossa染色使用试剂盒Von Kossa Kit(Polysciences公司,美国),并根据其说明检测钙化程度。最后使用Image-Pro Plus软件对免疫组化图片进行半定量分析。

1.2.3 计算射血分数(ejection fraction,EF)差值

EF值表示左心室的收缩功能,其数值可以用来判断心脏功能。用患者术后3个月心超的EF值减去术前首次EF值,得到EF差值,可以推测患者手术获益情况。

1.3 统计学方法

使用SPSS19.0统计软件,对各类数据检测正态性之后进行分析。其中性别、年龄、术前危险因素(高血压、高血脂、糖尿病、慢性肾病、吸烟史)为分类变量,年龄、LVWP测量值、Von Kossa染色后半定量分析的吸光度值、Runx2表达量、EF差值为数值变量。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析比较组间差异,再使用双尾 t 检验、皮尔逊相关检验等方法;对于分类变量资料采用例数与百分比表示,使用校正后的卡方分析法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳入患者的临床特征

二维超声心动图提示瓣膜轻度狭窄患者20例,瓣膜中度狭窄患者20例,瓣膜重度狭窄患者20例。高血压患者14例,轻、中、重瓣膜狭窄组分别有4、5、5例;高血脂患者13例,轻、中、重瓣膜狭窄组分别有5、4、4例;糖尿病患者10例,轻、中、重瓣膜狭窄组分别有4、3、3例;有吸烟史患者7例,轻、中、重瓣膜狭窄组分别有3、2、2例;无慢性肾病患者。3组患者性别、年龄、术前危险因素(高血压、高血脂、糖尿病、慢性肾病、吸烟史)等因素均无统计学差异(P 均 > 0.05)。

2.2 瓣膜轻度、中度、重度狭窄组LVWP测量值比较

瓣膜中度狭窄组LVWP厚度是轻度狭窄组的1.23倍,瓣膜重度狭窄组LVWP测量值是轻度狭窄组的1.20倍,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图1)。因此根据LVWP值分为轻度增厚组、中度增厚组、重度

增厚组。

2.3 LVWP轻度、中度、重度增厚组患者主动脉瓣钙化情况

对患者术中取下的主动脉瓣组织进行Von Kossa染色(图2)和半定量分析显示,LVWP中度增厚患者的钙化程度是轻度增厚组的1.67倍,差异有统计学意义($P < 0.05$),LVWP重度增厚组的钙化程度是LVWP中度增厚组的2.27倍,差异有统计学意义($P < 0.05$,图3)。且患者LVWP测量值与染色半定量分析所示的瓣膜钙化程度呈正相关关系($r=0.760, P < 0.05$,图4)。对患者术中取下的主动脉瓣组织进行RT-PCR分析结果显示,LVWP中度增厚患者的Runx2表达量是轻度增厚组的1.70倍,差异有统计学意义($P < 0.05$),LVWP重度增厚组的钙化程度是LVWP中度增厚组的2.40倍,差异有统计学意义($P < 0.05$,图5)。

2.4 LVWP轻、中、重度增厚患者手术恢复情况

LVWP中度增厚患者的EF差值是轻度增厚患者的3.64倍,差异有统计学意义($P < 0.05$,图6)。LVWP重度增厚患者的EF增加值与LVWP中度增厚患者比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

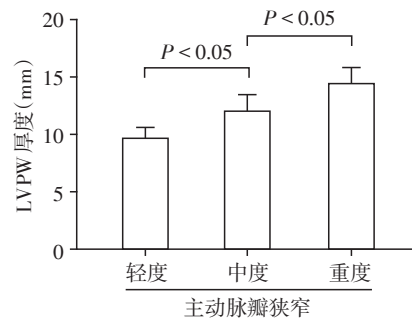


图1 主动脉瓣瓣膜轻度、中度、重度狭窄组的LVWP测量值比较

Figure 1 Comparison of LVWP in patients with mild, moderate and severe aortic valve stenosis

3 讨论

CAVD是临床上常见的心脏瓣膜病,最常见的类型主要分为退行性病变、风湿性病变以及先天性二叶式畸形。随着病情进展,主动脉瓣狭窄患者出现左室后负荷压力增大,心脏代偿性的收缩力增加,心肌逐渐增厚,当出现心功能失代偿时,心输出量降低,心脏逐渐扩大,最终导致心脏功能衰竭,严重影响患者的生活质量及生存时间^[9]。目前主动脉

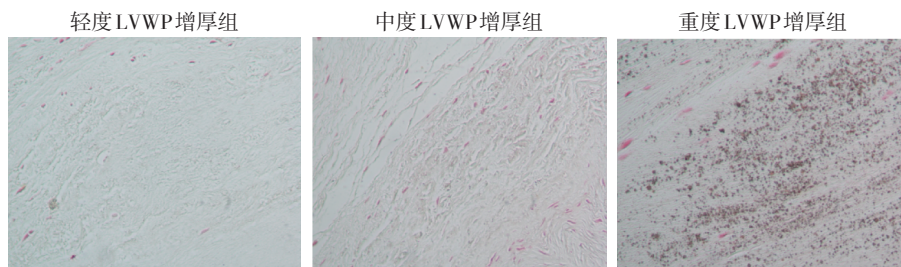


图2 Von Kossa染色下不同程度LVWP增厚组患者主动脉瓣钙化程度(×200)

Figure 2 Aortic valve calcification in groups with different LVWP thickening degrees under Von Kossa staining (×200)

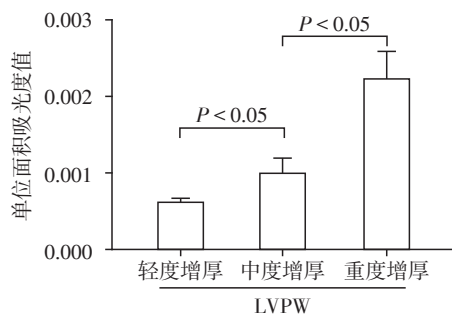


图3 不同程度LVWP增厚患者主动脉瓣Von kossa染色半定量分析的对比

Figure 3 Comparison of aortic valve in groups with different LVWP thickening degrees by semi-quantitative Von kossa staining

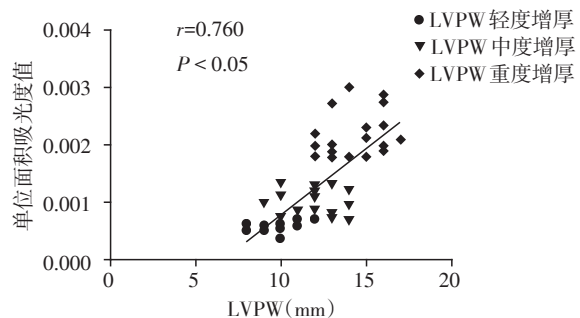


图4 患者LVWP测量值与染色半定量分析所示的钙化程度有相关性

Figure 4 LVWP of patients is associated with calcification degree detected by staining semi-quantitative analysis

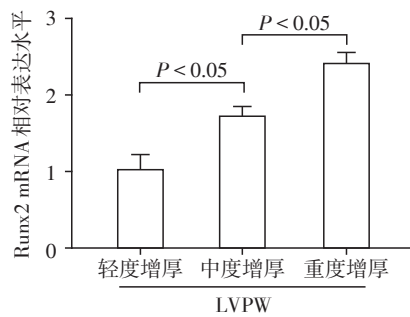


图5 不同程度LVWP增厚患者主动脉瓣中Runx2 mRNA表达量的比较

Figure 5 Comparison of Runx2 mRNA of aortic valve in patients with different LVWP thickening degrees

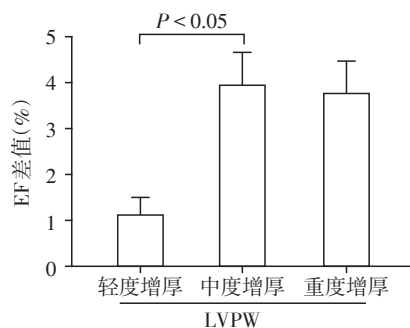


图6 不同程度LVWP增厚患者手术前后的EF差值比较

Figure 6 Comparison of EF changes before and after operation in patients with different LVWP thickening degrees

瓣狭窄的药物对患者没有明显受益,外科主动脉瓣置换手术仍是最主要也是最受益的治疗方式。在术前评估患者主动脉瓣狭窄情况及钙化情况对于术前准备及预后十分有意义^[10-12]。本研究先比较了二维超声心动图提示轻度狭窄、中度狭窄、重度狭窄患者的LVWP测量值,发现各组之间LVWP测量值均不等,且轻、中、重度狭窄组的LVWP均值依次增高,提示LVWP可以代表瓣膜狭窄程度,于是将患者重新分为LVWP轻度增厚组、LVWP中度增厚组、LVWP重度增厚组。

Runx2因子在血管及瓣膜钙化过程中起到十分重要的调节作用^[13],在正常状况下,Runx2因子一般不表达,但是在理化因素影响下其表达量升高,可以导致瓣膜间质细胞成骨化改变^[14]。Von Kossa染色能直观看出标本组织中的钙离子含量,评价瓣膜组织的钙化程度,本研究分析了LVWP轻度、中度、重度增厚组的钙化情况。对术中取下的瓣膜组织进行RT-PCR,发现LVWP中度增厚组中代表成骨活动的Runx2表达比LVWP轻度增厚组高,LVWP重

度增厚组Runx2表达比LVWP中度增厚组高。通过对手术标本的Von Kossa染色,发现LVWP中度增厚组的钙化情况比LVWP轻度增厚组严重,LVWP重度增厚组的钙化情况较LVWP中度增厚组严重。同时,借助ImageProplus软件对染色切片进行的半定量分析也提示同样结果。将60例患者的主动脉瓣组织石蜡切片的钙化染色半定量分析结果与各患者对应的LVWP测量值进行了皮尔逊相关性分析,发现LVWP测量值与主动脉瓣瓣膜钙化程度呈正相关关系,这提示LVWP可以用来预估主动脉瓣狭窄患者主动脉瓣瓣膜的钙化程度^[15-16]。

当心脏功能发展到失代偿阶段时,心脏收缩能力将会明显下降,而衡量心脏功能的重要指标左室射血分数将会下降^[14]。分析患者术后3个月EF与首次手术前EF的差值与LVWP的关系,发现LVWP中度增厚组EF差值比LVWP轻度增厚组大,而LVWP重度增厚组的EF差值与LVWP中度增厚组差异无统计学意义^[17-18]。这可能说明非重症患者,LVWP测量值提示了患者接受手术治疗后的受益程度,即LVWP越大,手术获益也越大。

然而本研究也注意到,对于LVWP中度增厚患者和LVWP重度增厚患者,其术后3个月的EF值提升程度几乎一样。这可能是由于LVWP重度增厚患者的心脏已经处于失代偿状态或失代偿的边缘,实际上错过了最佳手术时机,因而接受手术治疗之后难以获得比LVWP中度增厚患者更大的受益。

同时本研究也注意到二维超声心动图中的另一个指标室间隔厚度(interventricular septal thickness, IVS),它的测量值与绝大多数患者(53例)的LVWP测量值相等,这暗示IVS可能也是反映主动脉瓣狭窄患者瓣膜钙化情况和接受手术后获益情况的指标^[19-20]。

本研究将患者的术前临床指标(LVWP)与以患者手术标本为对象的实验室检测结果(钙化染色结果)相联系。将术前临床指标(首次心超的LVWP测量值)与术后临床指标(3个月后复测的EF值与首次心超EF值之差)相结合,挖掘出了LVWP这一常见心超指标新的临床意义。但受制于实验条件和入组原则,每组只纳入了20例患者,样本量不多,结果的可靠性也因此受到了影响。

主动脉瓣轻度、中度、重度狭窄患者的LVWP测量值依次增高,提示LVWP可以代表瓣膜狭窄程度。根据瓣膜狭窄程度将患者按LVWP值分为LVWP轻度增厚组、中度增厚组和重度增厚组之后,发现3组

的钙化情况依次加重,且LVWP测量值与主动脉瓣瓣膜钙化程度呈正相关关系。LVWP中度增厚组手术前后EF差值比LVWP轻度增厚组大,而LVWP重度增厚组的EF差值与LVWP中度增厚组比较差异无统计学意义。提示可以用LVWP预估主动脉瓣狭窄患者主动脉瓣瓣膜的钙化程度。对于非主动脉瓣重度钙化患者,LVWP值越大,手术获益也越大。

[参考文献]

- [1] Siu SC, Silversides CK. Bicuspid aortic valve disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(25): 2789-2800
- [2] Girdauskas E, Borger MA. Bicuspid aortic valve and associated aortopathy: an update [J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 25(4): 310-316
- [3] 李晓飞,孔祥清,唐立钧,等. 国人主动脉瓣狭窄主动脉根部解剖的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(11): 1589-1594
- [4] Clavel MA, Pibarot P, Dumesnil JG. Paradoxical low flow aortic valve stenosis: incidence, evaluation and clinical significance [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2014, 16(1): 431
- [5] Akintunde AA, Akinwusi PO, Familoni OB, et al. Effect of systemic hypertension on right ventricular morphology and function: an echocardiographic study [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2010, 21(5): 252-256
- [6] Toshima H, Koga Y, Uemura S, et al. Echocardiographic study on hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Jpn Heart J*, 1976, 17(3): 275-289
- [7] Clavel MA, Magne J, Pibarot P. Low-gradient aortic stenosis [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(34): 2645-2657
- [8] 郭文波,徐会圃,刘长梅. 脂蛋白相关磷脂酶A2、脂蛋白(a)活性水平与退行性心脏瓣膜病的相关性[J]. *临床心血管病杂志*, 2016, 32(4): 359-363
- [9] Henri C, Pierard LA, Lancellotti PA, et al. Exercise testing and stress imaging in valvular heart disease [J]. *Can J Cardiol*, 2014, 30(9): 1012-1026
- [10] Jang WG, Kim EJ, Kim DK, et al. BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2 - mediated Atf6 gene transcription [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(2): 905-915
- [11] Liang WC, Fu WM, Wang YB, et al. H19 activates Wnt signaling and promotes osteoblast differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20121
- [12] Hadji F, Boulanger MC, Guay S, et al. Altered DNA methylation of long noncoding RNA H19 in calcific aortic valve disease promotes mineralization by silencing NOTCH1 [J]. *Circulation*, 2016, 134(23): 1848-1862
- [13] Yang X, Meng X, Su X, et al. Bone morphogenic protein 2 induces Runx2 and osteopontin expression in human aortic valve interstitial cells: Role of Smad1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 138(4): 1008-1015
- [14] Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging [J]. *Eur Heart Cardiovasc Imaging*, 2015, 16(3): 233-270
- [15] Manabe K, Oki T, Fukuda N, et al. Transesophageal echocardiographic study on the mechanisms of mitral regurgitation in hypertrophic cardiomyopathy: comparison with sigmoid septum [J]. *J Cardiol*, 1995, 26(4): 233-241
- [16] Disegni E, Feinberg MS, Sheinowitz M, et al. Left-ventricular pseudohypertrophy in cardiac tamponade - an echocardiographic study in a canine model [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1993, 21(5): 1286-1294
- [17] Gumauskienė B, Krivickienė A, Jonkaitienė R, et al. Impact of left ventricular diastolic dysfunction and biomarkers on pulmonary hypertension in patients with severe aortic stenosis [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2018, 54(4): E63
- [18] Feng Y, Hemmeryckx B, Frederix L, et al. Monitoring reperfused myocardial infarction with delayed left ventricular systolic dysfunction in rabbits by longitudinal imaging [J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2018, 8(8): 754-769
- [19] 刘良华,何东明,利冬梅,等. 正常左室构型的汉族高血压患者室间隔基底部的改变情况及其临床意义[J]. *广西医学*, 2017, 39(3): 319-321
- [20] 高磊,杨颖,张宝妮,等. 室间隔基底段增厚的超声与临床特征[J]. *中华超声影像学杂志*, 2015, 24(5): 369-372

[收稿日期] 2019-01-08