

【DOI】 10.3969 / j. issn. 1671-6450. 2023. 12. 009

论著 • 临床

氧化应激指标、血管内皮损伤与慢性肾病患者 磷脂酰丝氨酸外翻的关系

贾英民, 张轶斐, 刘鹏, 李长新, 常静, 戴浩然, 刘伟敬, 刘宝利



基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82274489); 顺义区卫生健康发展科研专项项目(Wsjkfkzyx-2019-z-01)

作者单位: 101300 北京, 北京中医医院顺义医院肾内科(贾英民、刘鹏、常静、戴浩然、刘宝利), 病理科(李长新); 100700 北京中医药大学东直门医院肾内科(张轶斐、刘伟敬)

通信作者: 刘宝利, E-mail: liubaoli@bjzhongyi.com

【摘要】 目的 探讨不同阶段的慢性肾病(CKD)患者磷脂酰丝氨酸(PS)外翻与氧化应激水平、血管内皮损伤的相关性。方法 选取2019年1月—2021年12月在北京中医医院顺义医院收治的CKD 2~5期患者88例。根据CKD分期分为轻度(2~3期)20例、中度(4期)15例、重度(5期)53例3组,比较其临床资料,检测血液PS、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达,分析3组患者上述指标表达水平差异,并分析其中的相关性;另选取静脉血管标本40例,CKD5期患者行自体动静脉瘘(AVF)30例,肢体外伤手术正常10例,将血管内皮细胞进行免疫组化染色,观察超氧化物歧化酶1(SOD-1)、GPx、VEGF、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)在静脉内皮细胞内的表达情况。结果 3组CKD患者血清SCr、BUN、UA水平随病情加重而升高($F=61.316, 43.258, 5.044, P$ 均 <0.001);血清MDA、eNOS水平随病情加重而升高, SOD、GPx表达随病情加重而降低($F/P=6.984/0.030, 4.155/0.020, 14.937/0.001, 3.172/0.001$);血清VEGF、PS表达随病情加重而升高($F/P=29.871/0.001, 10.286/0.001$)。CKD5期患者PS、VEGF水平分别与SOD、GPx表达呈负相关($P<0.01$),与MDA、eNOS表达呈正相关($P<0.01$),PS暴露水平与VEGF表达呈正相关($P<0.01$)。受试者工作特征(ROC)曲线表明, SOD、GPx、MDA、eNOS、VEGF对PS外翻预测的曲线下面积为0.819、0.818、0.735、0.824、0.892。SOD-1、GPx、VEGF、VEGFR2在AVF术CKD患者的静脉组织中呈高表达。结论 氧化应激可加重患者血管内皮损伤与PS外翻,从而加重CKD 5期患者病情,血管内皮损伤指标对PS外翻具有预测价值,PS外翻有望成为CKD治疗的新靶点。

【关键词】 慢性肾病; 磷脂酰丝氨酸外翻; 氧化应激; 血管内皮损伤**【中图分类号】** R692**【文献标识码】** A

The relationship between oxidative stress indicators, vascular endothelial damage, and phosphatidylserine eversion in patients with chronic kidney disease Jia Yingmin*, Zhang Yifei, Liu Peng, Li Changxin, Chang Jing, Dai Haoran, Liu Weijing, Liu Baoli.* Department of Nephrology, Beijing Traditional Chinese Medicine Hospital Shunyi Hospital, Beijing 101300, China

Corresponding author: Liu Baoli, E-mail: liubaoli@bjzhongyi.com

Funding program: General Program of the National Natural Science Foundation of China (82274489); Shunyi District Health Development Research Special Project (Wsjkfkzyx-2019-z-01)

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between phosphatidylserine (PS) eversion and oxidative stress levels, as well as vascular endothelial damage in patients with chronic kidney disease (CKD) at different stages. **Methods** Select 88 patients with CKD in stages 2-5 who were admitted to Shunyi Hospital of Beijing Traditional Chinese Medicine Hospital from January 2019 to December 2021. According to the CKD staging, there were 20 cases of mild (2-3 stages), 15 cases of moderate (4 stages), and 53 cases of severe (5 stages) in three groups. Clinical data were compared, and the expression levels of blood PS, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPx), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured. The differences in the expression levels of the above indicators were analyzed among the three groups of patients, and analyze the correlation among them; Another 40

venous blood vessel specimens were selected, 30 CKD5 patients underwent autologous arteriovenous fistula (AVF), and 10 normal patients underwent limb trauma surgery. Immunohistochemical staining was performed on vascular endothelial cells to observe the expression of superoxide dismutase 1 (SOD-1), GPx, VEGF, and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) in venous endothelial cells. **Results** The serum levels of SCr, BUN, and UA in three groups of CKD patients increased with the worsening of the condition ($F=61.316, 43.258, 5.044, P<0.001$). The levels of serum MDA and eNOS increase with the aggravation of the condition, while the expressions of SOD and GPx decrease with the aggravation of the condition ($F/P=6.984/0.030, 4.155/0.020, 14.937/<0.001, 3.172/<0.001$). The expression of serum VEGF and PS increases with the aggravation of the disease ($F/P=29.871/<0.001, 10.286/<0.001$). The levels of PS and VEGF in CKD5 patients were negatively correlated with the expression of SOD and GPx ($P<0.01$), and positively correlated with the expression of MDA and eNOS ($P<0.01$). The exposure level of PS was positively correlated with the expression of VEGF ($P<0.01$). The receiver operating characteristic (ROC) curve shows that the areas under the curve predicted by SOD, GPx, MDA, eNOS, and VEGF for PS eversion are 0.819, 0.818, 0.735, 0.824, and 0.892. SOD-1, GPx, VEGF, and VEGFR2 are highly expressed in venous tissues of CKD patients undergoing AVF surgery. **Conclusion** Oxidative stress can exacerbate vascular endothelial injury and PS valgus in patients, thereby exacerbating the condition of CKD stage 5 patients. Vascular endothelial injury indicators have predictive value for PS valgus, and PS valgus is expected to become a new target for CKD treatment.

【Key words】 Chronic kidney disease; Phosphatidylserine exposure; Oxidative stress; Vascular endothelial injury

慢性肾病(chronic kidney diseases, CKD)是由于各种肾脏疾病导致自身肾功能不可逆转的下降,我国和世界范围内 CKD 的发病率逐年增加,已成为严重危害人类健康的全球性公共卫生问题。肾脏容易受到氧化还原失衡和氧化应激的影响。氧化应激在肾脏疾病进展中发挥着重要作用,与水钠潴留、肾血流量变化、蛋白尿、肾组织纤维化密切相关,大量研究表明,氧化应激水平升高可引起肾功能恶化,导致肾脏内皮细胞损伤。细胞磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)是一种主要位于内膜小叶中带负电荷的氨基磷脂,暴露在质膜外小叶上的 PS 可对各种刺激作出反应,或在囊泡生成过程中参与各种疾病的进展,与炎症反应、氧化应激和细胞凋亡密切相关。当疾病进展到 CKD 第 5 期时,此阶段由于肾功能的降低或缺失会出现体液潴留、贫血、骨矿物质代谢紊乱、血脂异常和蛋白质能量营养不良等并发症,又被称为终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD),临床中常需要依赖肾脏替代治疗以维持生命。目前我国大多数 ESRD 患者需要进行腹膜或血液透析(hemodialysis, HD)治疗,其中建立自体动静脉内瘘(native arteriovenous fistula, AVF)是 ESRD 患者进行长期血液透析的首选方式^[1-2]。CKD5 期患者血管内皮损伤对于 AVF 的建立、成熟和临床应用影响重大。研究发现^[3],氧化应激反应可加重血管内皮损伤,同时可观察到细胞 PS 外翻增加。因此,本研究探讨 CKD 患者中 PS 外翻、氧化应激与血管内皮损伤的表达,分析其相关性,有助于了解 CKD 患者病情程度并判断预后,对于血液透析患者则有利于减少 AVF 的临床并发症及延长 AVF 使用时间,报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 参照“肾脏病预后质量倡议”(KDOQI)和“改善全球肾脏病预后”(KDIGO)工作组制定的 CKD 指南的诊断标准^[4-5],选取 2019 年 1 月—2021 年 12 月在北京中医医院顺义医院门诊及病房诊断为 CKD 2~5 期患者 88 例。其中男 50 例,女 38 例,年龄 33~75(54.59±20.71 岁);原发病:糖尿病肾病 38 例(43.18%),慢性肾小球肾炎 19 例(21.59%),高血压肾病 19 例(21.59%),慢性肾盂肾炎、梗阻性肾病、缺血性肾病、心肾综合征、多囊肾、淀粉样变肾病各 2 例(各占 2.27%);根据估算的肾小球滤过率(eGFR)将其肾功能损伤的病情分为重、中、轻度 3 组,符合 CKD 5 期(重度)患者(eGFR<15 ml·min⁻¹·1.73m⁻²) 53 例、CKD 4 期(中度)患者(15<eGFR<30 ml·min⁻¹·1.73m⁻²) 15 例、CKD 2~3 期(轻度)患者(30<eGFR<60 ml·min⁻¹·1.73m⁻²) 20 例。另取静脉血管标本 40 例,其中男 24 例,女 16 例,年龄 32~74(55.17±18.63 岁),选取进行 AVF 手术重度患者 30 例,未伴有肾脏病的肢体外伤及肢体外科手术患者 10 例。本研究已得到医院伦理委员会批准(2019SYKY15-02),所有患者及家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例纳入及排除标准

1.2.1 纳入标准: (1) 血清组: ①符合慢性肾脏病诊断标准,CKD 分期 2~5 期患者; ②年龄在 18~75 岁。(2) AVF 手术组: ①符合慢性肾衰竭临床诊断标准; ②年龄在 18~75 岁; ③GFR<30 ml·min⁻¹·1.73m⁻², 决定选择 HD 治疗; ④eGFR<15 ml·min⁻¹·

1. 73m⁻²、血清肌酐 > 528 μmol/L 或糖尿病肾病患者 eGFR < 25 ml/(min · 1.73m²)、血清肌酐 > 352 μmol/L, 预计 6 个月内需进入 HD 治疗; ⑤尿毒症症状明显, 支持治疗难以控制者; ⑥ESRD 已经进入规律血液透析患者; ⑦血管条件符合动静脉内瘘手术条件者。

1.2.2 排除标准: (1) 心力衰竭未能控制; (2) 血管条件差, 中心静脉或近心端大静脉存在严重狭窄等; (3) 凝血功能严重异常; (4) 手术部位有感染及烧烫伤等; (5) 前臂 Allen 试验阳性; (6) 患者预期存活不超过 6 个月; (7) 其他不能配合手术者。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 血生化指标检测: 采集患者空腹外周静脉血 4 ml, 室温静置 30 min, 后 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清, 全自动生化仪检测血清肌酐(SCr)、尿素氮(BUN) 及尿酸(UA) 水平。

1.3.2 氧化应激指标检测: 上述血清, 运用酶联免疫吸附法(ELISA) 测定血清中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx) (购自北京聚合美生物科技有限公司), 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 等氧化应激反应指标。试验步骤严格按照酶联免疫吸附测定试剂盒(购自英国 abcam) 说明书步骤操作。

1.3.3 血液血管内皮功能检测: 上述血清运用酶联免疫吸附法(ELISA) 测定血管内皮细胞生长因子(VEGF) 和 PS 的表达。试验步骤严格按照酶联免疫吸附测定试剂盒(购自英国 abcam) 说明书步骤操作。

1.3.4 静脉血管内皮功能检测: 采集自体动静脉内瘘制作手术中所修剪的静脉血管和肢体外伤患者及肢体外科手术中所取得的静脉血管, 将这些静脉血管固定、石蜡包埋后进行免疫组化处理。小鼠抗人 VEGF、血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)、SOD-1、GPx-1/2 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, PV8000 染色试剂盒(内源性过氧化物酶阻断剂、超氧酶标山羊抗鼠/兔

IgG 聚合物、DAB 浓缩液、DAB 稀释液购自北京中杉金桥公司)。采用 PV-8000 通用型二步免疫组化法: 将蜡块切片, 72℃ 烤片, 常规脱蜡至水, 高压 EDTA 8.0 修复 2.5 min, PBS 清洗, 3% H₂O₂ 阻断 15 min, PBS 清洗, 加适量稀释的一抗(VEGF 1: 50、VEGFR2 1: 50、SOD-1 1: 50、GPx-1/2 1: 25), 37℃ 孵育 1 h, 加二抗 37℃ 孵育 20 min, DAB 显色约 3 min, 苏木素复染, 脱水透明, 中性树脂胶封片。以 PBS 代替一抗设立阴性对照, 以人 VEGF、VEGFR2、SOD-1、GPx-1/2 阳性的未伴有肾脏病肢体外伤及肢体外科手术患者为阳性对照。对 SOD-1、GPx、VEGF、VEGFR2 (购自北京聚合美生物) 表达进行检测, 以阳性细胞数量为观察指标, 对细胞的染色深浅程度及着色数量进行评估。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件分析数据。符合正态分布的计量数据 $\bar{x} \pm s$ 表示, 偏态分布的计量数据用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示, 组间比较根据是否正态分布采取多因素方差分析或多样本非参数秩和分析; 采用 Pearson 分析 PS 外翻水平与氧化应激因素和内皮细胞损伤之间的关联; 采用受试者工作特征曲线(ROC) 评估 PS 外翻与氧化应激及内皮损伤的预测效能, 获取曲线下面积(AUC) 并计算敏感度、特异度、准确率。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 CKD 患者年龄、病程和肾功能指标比较 在各项临床资料信息中, 3 组患者的年龄、病程和血清 SCr、BUN、UA 等随病情严重而升高, 且差异具有统计学意义(P < 0.01), 见表 1。

2.2 各组 CKD 患者血清氧化应激指标比较 3 组患者的 MDA、eNOS 水平随病情严重而升高, SOD、GPx 表达随病情进展而下降, 差异具有统计学意义(P < 0.01 或 0.05), 见表 2。

2.3 各组患者血清 VEGF、PS 外翻结果比较 3 组患者血清 VEGF、PS 随病情加重而升高, 组间差异具有统计学意义(P < 0.01), 见表 2。

表 1 3 组 CKD 患者一般资料及肾功能指标比较

Tab. 1 Comparison of general information and renal function indicators among three groups of CKD patients

项 目	轻度组(n = 20)	中度组(n = 15)	重度组(n = 53)	F/H 值	P 值
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	40.45 ± 13.92	51.80 ± 21.67	59.17 ± 12.928	19.025	<0.001
病程(年) #	2(0, 8.75)	3(2, 12)	12(6.5, 18)	22.513	<0.001
SCr($\bar{x} \pm s$, μmol/L)	81.35 ± 3.53	277.00 ± 11.52	591.62 ± 36.48	61.316	<0.001
BUN($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	7.32 ± 0.72	13.42 ± 1.07	21.12 ± 1.39	43.258	<0.001
UA($\bar{x} \pm s$, μmol/L)	367.80 ± 26.15	435.27 ± 30.43	485.32 ± 19.33	5.044	<0.010

注: * 因方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis 检验; # 为 $M(Q_1, Q_3)$ 。

2.4 AVF 组与正常对照组静脉组织中 SOD-1、GPx、VEGF、VEGFR2 的免疫组化染色表达比较 血管内皮细胞免疫组化染色后,细胞核染呈蓝色,胞膜和胞浆染根据染色强度呈黄色或棕褐色。通过光镜下观察阳性细胞着色数量及程度进行评判,在正常对照组中 SOD-1、GPx、VEGF、VEGFR2 均呈弱表达(见图 1);在进行 AVF 手术的 ESRD 患者中,SOD-1、GPx、VEGF、VEGFR2 表达点主要位于细胞浆,部分还定位于胞膜(见图 1),SOD-1、GPx、VEGF、VEGFR2 均呈高表达。

2.5 CKD-5 期患者氧化应激因素与 PS 外翻及血管内皮细胞损伤之间的线性回归分析 将血清标本中 CKD-5 期所测得的 PS 暴露水平与 MDA、SOD、GPx、

eNOS 水平进行多元线性回归分析,将 PS 暴露水平及 4 个氧化应激指标与 VEGF 表达水平进行单因素回归分析,结果表明 PS 暴露水平与 SOD、GPx 表达呈负相关($P < 0.01$),与 MDA、eNOS 表达呈正相关($P < 0.01$);VEGF 表达与 MDA、eNOS 表达呈正相关,与 SOD、GPx 表达呈负相关($P < 0.01$);PS 暴露水平与 VEGF 表达呈正相关($P < 0.01$),见表 3。

2.6 氧化应激指标与内皮细胞损伤对 PS 外翻的预测价值 以 PS 未外翻患者作为阴性样本,PS 外翻阳性患者作为阳性样本,绘制 ROC 曲线,结果表明 SOD、GPx、MDA、eNOS、VEGF 预测 PS 外翻的 AUC 分别为 0.819、0.818、0.735、0.824、0.892,见表 4、图 2。

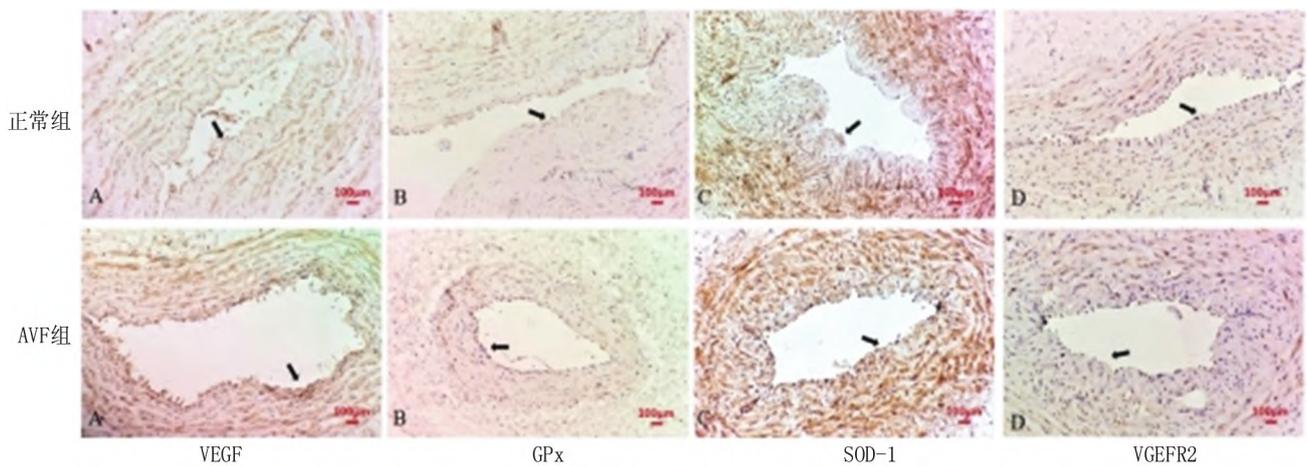


图 1 AVF 组与正常对照组静脉血管组织中 SOD-1、GPx、VEGFR2、VEGF 的免疫组化染色情况(LDP 法, ×200)

Fig. 1 Immunohistochemical staining of SOD-1, GPx, VEGFR2, and VEGF in venous vascular tissue of AVF group and normal control group (LDP method, × 200)

表 2 各组 CKD 患者氧化应激、PS 外翻和 VEGF 表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of oxidative stress, PS eversion, and VEGF expression among CKD patients in each group

项 目	轻度($n = 20$)	中度($n = 15$)	重度($n = 53$)	F 值	P 值
MDA(U/L)	0.66 ± 0.05	0.83 ± 0.22	1.13 ± 0.11	6.984	0.030
SOD(U/L)	3.96 ± 0.37	2.69 ± 0.63	2.06 ± 0.20	14.937	<0.001
GPx(U/L)	0.48 ± 0.04	0.40 ± 0.07	0.29 ± 0.03	3.172	<0.001
eNOS(U/ml)	43.48 ± 5.36	53.42 ± 8.96	64.02 ± 4.95	4.155	0.020
VEGF(µg/L)	9.60 ± 0.54	10.70 ± 0.46	15.20 ± 0.48	29.871	<0.001
PS(U/ml)	32.87 ± 1.51	38.56 ± 2.83	44.56 ± 0.90	10.286	<0.001

表 3 PS 外翻水平与氧化应激因素及血管内皮细胞损伤的相关性分析

Tab.3 Correlation analysis of PS eversion level with oxidative stress factors and vascular endothelial cell damage

指标	SOD		GPx		MDA		eNOS		VEGF	
	r 值	P 值								
PS	-0.93	<0.001	-0.95	<0.001	0.51	<0.001	0.80	<0.001	0.99	<0.001
VEGF	-0.92	<0.001	-0.94	<0.001	0.51	<0.001	0.84	<0.001		

表 4 SOD、GPx、MDA、eNOS、VEGF 预测 PS 外翻相关模型 AUC 比较

Tab. 4 Comparison of AUC prediction models for PS eversion related to SOD, GPx, MDA, eNOS, and VEGF

指标	截断值	AUC	95% CI	敏感度	特异度
SOD	2.60 U/L	0.819	0.708 ~ 0.930	0.657	0.670
GPx	0.38 U/L	0.818	0.706 ~ 0.929	0.643	0.684
MDA	0.70 U/L	0.735	0.596 ~ 0.875	0.631	0.608
eNOS	55.56 U/m	0.824	0.716 ~ 0.932	0.513	0.752
VEGF	9.83 μg/L	0.892	0.802 ~ 0.981	0.683	0.688

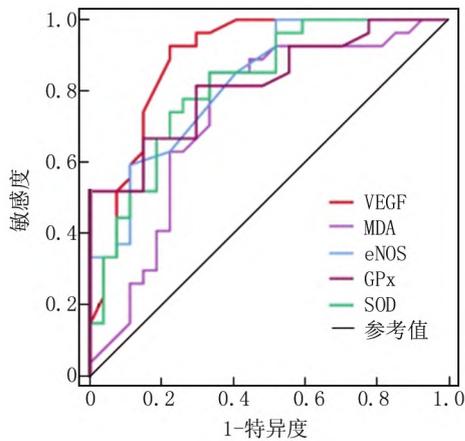


图 2 CKD 患者血清 SOD、GPx、MDA、eNOS、VEGF 预测 PS 外翻的 ROC 曲线

Fig. 2 ROC curve of serum SOD, GPx, MDA, eNOS, and VEGF predicting PS valgus in CKD patients

3 讨论

在我国 CKD 的发病率呈现持续上升趋势,约有 10.8% 成年人患有 CKD,其中每年约 1% 的患者进入 ESRD 阶段,需要通过肾脏替代治疗才能维持生命^[6-7]。研究表明^[8],氧化应激与肾小球滤过率呈负相关,进展到 ESRD 阶段的患者,其肾功能伴随着氧化应激状态的增强而恶化,其氧化应激的产生与慢性炎症反应增加,抗氧化能力减弱,晚期糖基化引起的肾小球稳态紊乱,透析治疗引起补体途径激活及中性粒细胞活化等因素有关。而氧化应激使活性氧(reactive oxygen species, ROS)聚集,可通过多条通路加剧肾脏炎症反应,促进细胞外基质(ECM)沉积,增加血管通透性,改变肾脏血流状态,引起小管上皮细胞凋亡,小管间质纤维化以及足细胞、系膜细胞、内皮细胞的损伤等病理改变,进而加重肾脏病情^[9]。CKD 患者的氧化应激状态又表现为多种氧化损伤标志物水平的增加以及抗氧化防御能力的平行降低。MDA 是脂质过氧化标志物之一,当自由基等氧化剂攻击脂质时可出现增

高。GPx、SOD 作为重要的抗氧化酶,可阻止羟自由基的产生并抵消脂质过氧化的毒性作用,当机体氧化应激水平增高时,二者表达下降^[10]。本研究同样发现,CKD 患者血清氧化应激水平随着病情程度的加重而显著增强,其中既包括过氧化产物 MDA 明显升高,还包括抗氧化的 SOD 和 GPx 水平降低。

在肾脏替代治疗中,AVF 被认为是最理想的永久性血液通路,故血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)与 ESRD 关系密切^[11]。VECs 由单层扁平细胞或多角形细胞构成,是位于血流与血管平滑肌细胞之间的屏障。血管作为高代谢率器官,VECs 具有调节血管张力、炎症反应修复、抗凝促纤等作用,可感应血流中氧气含量、剪切应力、渗透压和炎症反应激素等局部微环境的变化而发生改变。VECs 作为循环系统的重要组成部分,氧化应激可引起 VECs 功能障碍,研究表明^[12]接受替代治疗的患者中,心血管疾病是导致死亡的主要原因,占该类患者死亡人数的 40% 以上。eNOS 主要存在于内皮细胞中,具有降低 VECs 黏附性,调节血管张力的作用^[13],病理状态下,eNOS 结构解耦联并与氧分子相互作用生成超氧阴离子,引起 ROS 增多,使氧化应激增强并引发内皮功能障碍,二者可互相加重^[14]。VEGF 具有促进 VECs 增殖、增加血管通透性、刺激新生血管形成的作用,正常人中 VEGF 水平较低,而在透析患者中出现高表达。本研究同样得出 eNOS 与 VEGF 均可随着病情加重而增高的结论,表明终末期肾脏病患者内皮细胞功能紊乱,而 Pearson 相关性分析亦证实氧化应激增强则是引起血管内皮损伤的重要机制。

PS 由磷脂酰胆碱或磷脂酰乙醇胺通过 Ca^{2+} 依赖性碱基交换反应合成,其中预先存在的磷脂的极性头部基团被丝氨酸取代^[15]。PS 作为细胞质膜重要的磷脂成分之一,广泛存在于红细胞、血小板、内皮细胞等真核细胞当中^[16]。生理条件下,质膜中的 PS 在能量依赖机制作用下,通过 P4-ATP 酶(PS 翻转酶)的调节将 PS 从外质集中到细胞质内小叶中,而磷脂干扰酶则可将细胞膜内外的磷脂进行非特异性转运,二者共同维持磷脂的这种不对称分布^[17]。在细胞凋亡或胞内出现 ATP 供能不足、 Ca^{2+} 水平升高等病理条件时,细胞膜的这种不对称性发生了破坏,导致了质膜 PS 外翻^[18]。PS 外翻在细胞凋亡中优先作为吞噬细胞的识别信号^[19],又能作为引信信号成为趋化因子的适配器^[20],可以说 PS 外翻是凋亡细胞的普遍特征。研究表明^[21],PS 可作为细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)的靶标参与细胞凋亡,在凋亡过程中 Cyt c 从线粒体

上分离,并伴有细胞内电子传递的中断,从而使细胞凋亡常伴随着 ROS 的产生。现已证实^[21],由氧化剂诱导的细胞凋亡可导致不同类型的磷脂和 PS 氧化,可以说 PS 的氧化修饰是凋亡程序的一个组成部分^[22],所以在细胞凋亡过程中 PS 的氧化和外翻相互协作,均是细胞凋亡程序的内在特征,其中 PS 氧化先于 PS 外翻并促进 PS 外翻^[21],氧化的 PS 可增强巨噬细胞对 PS 外翻细胞的吞噬^[23-24]。本研究结果同样发现,SOD、GPx、MDA、eNOS 与 PS 外翻具有较强相关性,表明 CKD 中氧化应激增强可引起 PS 外翻。同时 PS 还是凝血启动的重要信号分子,血小板活化可引起 PS 外翻,PS 外翻加速了凝血因子 FX 激活和凝血酶生成,从而激活凝血级联反应^[25-26]。研究表明^[27-28],通过 PS 与 CXCL16/SRPSO 的相互作用,可促进红细胞表面的 PS 与内皮细胞黏附,结合在内皮上的红细胞可干扰微循环,阻碍正常血运,而外翻的红细胞 PS 可进一步与血小板结合,同样内皮细胞的 PS 外翻也可成为与白细胞结合位点,使凝血酶原复合物形成,从而进一步导致血栓、炎性反应等级联反应。此外,PS 还可通过膜微粒(membrane microparticles, MPs)表达,MPs 是在细胞活化和细胞凋亡时由内皮细胞和血细胞脱落而形成的膜囊泡。CKD 患者引起氧化应激介导的内皮细胞凋亡,导致内皮细胞微粒释放^[28],内皮微粒增多既增强 PS 暴露,还是内皮功能障碍的标志^[29],符合本研究得出的 PS 外翻与血管内皮细胞的损害具有较强正相关的结果。

综上所述,PS 外翻可损伤内皮细胞,加重细胞凋亡,并促进血栓形成和炎性反应等病理作用。CKD 患者普遍存在高氧化应激状态,过多的 ROS 聚集可损伤血管内皮细胞,增强 PS 外翻,对于 ESRD 患者,可影响其 AVF 功能,造成 AVF 血栓形成导致 AVF 失功,从而加重肾损害。因此,探讨氧化应激、血管内皮损伤与 PS 外翻相关性的研究,可为进一步延长 ESRD 患者 AVF 使用寿命、减少心血管事件、降低患者死亡率提供新的治疗思路。

(致谢:感谢中日友好医院李平教授对论文研究思路及修改方面提出的意见与建议)

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

贾英氏:设计研究方案,实施研究过程,分析试验数据、论文撰写、修改;张轶斐:分析实验数据,进行统计学分析,论文修改;刘鹏:设计研究方案、论文修改;李长新:病理资料分析;常静、戴浩然:临床资料整理;刘伟敬、刘宝利:提出研究思路,指导实施研究过程

参考文献

- [1] Lee HJ, Son YJ. Prevalence and associated factors of frailty and mortality in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis: A systematic review and meta-analysis [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(7): 3471. DOI: 10.3390/ijerph18073471.
- [2] Thurlow JS, Joshi M, Yan G, et al. Global epidemiology of end-stage kidney disease and disparities in kidney replacement therapy [J]. *American Journal of Nephrology*, 2021, 52(2): 98-107. DOI: 10.1159/000514550.
- [3] Favretto G, Cunha RS, Dalboni MA, et al. Endothelial microparticles in uremia: Biomarkers and potential therapeutic targets [J]. *Toxins*, 2019, 11(5): 267. DOI: 10.3390/toxins11050267.
- [4] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Diabetes Work Group. KDIGO2020 clinical practice guideline for diabetes management in chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2020, 98(4S): S1-S115. DOI: 10.1016/j.kint.2020.06.019.
- [5] Ikizle TA, Burrowes JD, Byhamgray LD, et al. KDOQI clinical practice guideline for nutrition in CKD: 2020 update [J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76(3Suppl): S1-107. DOI: 10.1053/j.ajkd.2020.05.006.
- [6] Ene-Iordache B, Perico N, Bikbov B, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk in six regions of the world (ISN-KDDC): A cross-sectional study [J]. *The Lancet Global Health*, 2016, 4(5): e307-e319. DOI: 10.1016/S2214-109X(16)00071-4.
- [7] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: A cross-sectional survey [J]. *The Lancet*, 2012, 379(9818): 815-822. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60033-6.
- [8] Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD [J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2006, 48(5): 752-760. DOI: 10.1053/j.ajkd.2006.08.015.
- [9] Wong TY, Cheung CMG, Larsen M, et al. Erratum: Diabetic retinopathy [J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2016, 2: 16012. DOI: 10.1038/nrdp.2016.12.
- [10] Guo CH, Chen PC, Hsu GSW, et al. Zinc supplementation alters plasma aluminum and selenium status of patients undergoing dialysis: A pilot study [J]. *Nutrients*, 2013, 5(4): 1456-1470. DOI: 10.3390/nu5041456.
- [11] Carracedo J, Buendía P, Merino A, et al. Cellular senescence determines endothelial cell damage induced by uremia [J]. *Experimental Gerontology*, 2013, 48(8): 766-773. DOI: 10.1016/j.exger.2013.04.004.
- [12] Poulianiti KP, Kaltsatou A, Mitrou GI, et al. Systemic redox imbalance in chronic kidney disease: A systematic review [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 8598253. DOI: 10.1155/2016/8598253.
- [13] Zanetti M, Gortan Cappellari G, Barbeta D, et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial dysfunction in chronic renal failure: Role of eNOS activation and of oxidative stress [J]. *Nutrients*, 2017, 9(8): 895. DOI: 10.3390/nu9080895.
- [14] Feng L, Ren J, Li Y, et al. Resveratrol protects against isoproterenol induced myocardial infarction in rats through VEGF-B/AMPK/

- eNOS/NO signalling pathway [J]. *Free Radical Research*, 2019, 53 (1) : 82-93. DOI: 10. 1080/10715762. 2018. 1554901.
- [15] Kim HY, Huang BX, Spector AA. Phosphatidylserine in the brain: Metabolism and function [J]. *Progress in Lipid Research*, 2014, 56: 1-8. DOI: 10. 1016/j. plipres. 2014. 06. 002.
- [16] Beattie G, Cohan C, Miraflor E, et al. Protective effect of phosphatidylserine blockade in sepsis induced organ dysfunction [J]. *Surgery*, 2019, 166(5) : 844-848. DOI: 10. 1016/j. surg. 2019. 05. 020.
- [17] Baldrige RD, Graham TR. Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(6) : E290-E298. DOI: 10. 1073/pnas. 1115725109.
- [18] Bissinger R, Bhuyan AAM, Qadri SM, et al. Oxidative stress, eryptosis and anemia: Apivotal mechanistic nexus in systemic diseases [J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286 (5) : 826-854. DOI: 10. 1111/febs. 14606.
- [19] Kaynak A, Davis HW, Kogan AB, et al. Phosphatidylserine: The unique dual-role biomarker for cancer imaging and therapy [J]. *Cancers*, 2022, 14(10) : 2536. DOI: 10. 3390/cancers14102536.
- [20] Pontejo SM, Murphy PM. Chemokines and phosphatidylserine: New binding partners for apoptotic cell clearance [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 943590. DOI: 10. 3389/fcell. 2022. 943590.
- [21] Kagan VE, Gleiss B, Tyurina YY, et al. A role for oxidative stress in apoptosis: Oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis [J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(1) : 487-499. DOI: 10. 4049/jimmunol. 169. 1. 487.
- [22] Maciel E, Neves BM, Martins J, et al. Oxidized phosphatidylserine mitigates LPS-triggered macrophage inflammatory status through modulation of JNK and NF- κ B signaling cascades [J]. *Cellular Signal-*
- ling, 2019, 61: 30-38. DOI: 10. 1016/j. cellsig. 2019. 04. 015.
- [23] Tyurin VA, Balasubramanian K, Winnica D, et al. Oxidatively modified phosphatidylserines on the surface of apoptotic cells are essential phagocytic 'eat-me' signals: Cleavage and inhibition of phagocytosis by Lp-PLA2 [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2014, 21 (5) : 825-835. DOI: 10. 1038/cdd. 2014. 1.
- [24] Shlomovitz I, Speir M, Gerlic M. Flipping the dogma-phosphatidylserine in non-apoptotic cell death [J]. *Cell Communication and Signaling*, 2019, 17(1) : 1-12. DOI: 10. 1186/s12964-019-0437-0.
- [25] Zhang Y, Meng H, Ma R, et al. Circulating microparticles, blood cells, and endothelium induce procoagulant activity in sepsis through phosphatidylserine exposure [J]. *Shock*, 2016, 45 (3) : 299-307. DOI: 10. 1097/SHK. 0000000000000509.
- [26] Wang Y, Zhang SU, Luo L, et al. Platelet-derived microparticles regulates thrombin generation via phosphatidylserine in abdominal sepsis [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(2) : 1051-1060. DOI: 10. 1002/jcp. 25959.
- [27] Lang E, Lang F. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death [C]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press, 2015, 39: 35-42. DOI: 10. 1016/j. semcdb. 2015. 01. 009.
- [28] Gao C, Xie R, Yu C, et al. Thrombotic role of blood and endothelial cells in uremia through phosphatidylserine exposure and microparticle release [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11) : e0142835. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0142835.
- [29] Faure V, Dou L, Sabatier F, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2006, 4(3) : 566-573. DOI: 10. 1111/j. 1538-7836. 2005. 01780. x.

(收稿日期: 2023 - 06 - 13)

(上接 1272 页)

- [17] 白碧慧, 陈余思, 宋本艳, 等. 老年 COPD 合并肺部感染患者血清 ANXA1、sCD14、HPT 水平变化及对预后的预测价值 [J]. *疑难病杂志*, 2021, 20(12) : 1192-1196. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2021. 12. 002.
- Bai BH, Chen YS, Song BY, et al. Changes of serum ANXA1, sCD14 and HPT levels in elderly patients with COPD complicated with pulmonary infection and their prognostic value [J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2021, 20(12) : 1192-1196. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6450. 2021. 12. 002.
- [18] 张德振, 史册, 韦安猛. 高压氧联合沙美特罗替卡松粉吸入剂对慢性阻塞性肺病稳定期患者肺功能及血清 COX-2、MMP-9 水平的影响 [J]. *中华航海医学与高血压医学杂志*, 2021, 28(3) : 326-329. DOI: 10. 3760/ema. j. cn311847-20201118-00427.
- Zhang DZ, Shi C, Wei AM. Effect of hyperbaric oxygen combined with salmetrolcasone powder inhalant on pulmonary function and serum COX-2 and MMP-9 levels in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chinese Journal of Maritime Medicine and High Pressure Medicine*, 2021, 28 (3) : 326-329. DOI: 10. 3760/ema. j. cn311847-20201118-00427.
- [19] 王亚林, 张静, 朱慕云. 肺低氧衰区比例及胸大肌参数评估老年慢性阻塞性肺疾病患者肺通气功能受损的临床研究 [J]. *中国全科医学*, 2022, 25 (27) : 3358-3364. DOI: 10. 12114/j. issn. 1007-9572. 2022. 0263.
- Wang YL, Zhang JL, Zhu MY. Clinical study on the proportion of lung areas and impaired lung ventilation in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *General Practice in China*, 2022, 25 (27) : 3358-3364. DOI: 10. 12114/j. issn. 1007-9572. 2022. 0263.
- [20] 张挺, 张超, 于波. 维兰特罗/乌美溴铵联合罗氟司特对 COPD 患者肺功能和 mMRC 评分的影响 [J]. *中南医学科学杂志*, 2022, 50(4) : 599-601. DOI: 10. 15972/j. cnki. 43-1509/r. 2022. 04. 034.
- Zhang T, Zhang C, Yu B. Effect of verrantro/ulmeide with roflumilast on lung function and mMRC score in COPD patients [J]. *Zhongnan Medical Science*, 2022, 50(4) : 599-601. DOI: 10. 15972/j. cnki. 43-1509/r. 2022. 04. 034.

(收稿日期: 2023 - 06 - 28)