

高压氧治疗对早期兔动静脉瘘模型中静脉血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响

谭涛 张矛* 李追 刘洪 王寒琛
(重庆医科大学附属第一医院血管外科, 重庆 400016)

摘要 该文探讨了高压氧治疗对早期兔动静脉瘘模型中静脉血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响。通过腺嘌呤诱导36只成年新西兰兔建立慢性肾衰模型, 然后将其随机分为3组(每组12只): 假手术组; 单纯动静脉瘘组; 高压氧治疗和动静脉瘘组。应用Masson染色检测静脉内膜增生和血管重塑的情况; 免疫组化染色和Western blot检测 α -SMA、PCNA、PDGF-BB、VEGF-A、TNF- α 和MMP-9表达情况; RT-PCR检测 α -SMA、PDGF-BB和VEGF-A表达水平。结果显示, 相较于假手术组, 单纯动静脉瘘组的静脉管壁弹力纤维明显增生, 中内膜增厚, 血管明显重塑。与单纯动静脉瘘组相比较, 高压氧治疗和动静脉瘘组的弹力纤维增生受到抑制, 以及相关的各目的蛋白和mRNA的表达水平下降。这说明, 动静脉瘘术后, 高压氧治疗可明显抑制动静脉瘘静脉血管平滑肌细胞的增殖和迁移, 改善血管重塑。

关键词 高压氧; 动静脉瘘; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 血管重塑

Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Proliferation and Migration of Venous Vascular Smooth Muscle in Early Rabbit Arteriovenous Fistula Model

Tan Tao, Zhang Mao*, Li Zhui, Liu Hong, Wang Hanchen

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of this study was to develop a rabbit model of arteriovenous fistula (AVF) and then use it to evaluate the effects of Hyperbaric oxygen (HBO) therapy on proliferation and migration of venous vascular smooth muscle cells in early stage. A total of 36 New Zealand rabbits were fed with adenine diet in order to establish a chronic renal failure model. The rabbits were randomly divided into three groups ($n=12$ for each group): the sham group underwent sham operation; the AVF alone group underwent fistulization, but did not receive HBOT therapy; the AVF+HBO group underwent fistulization and received HBO therapy. We used Masson staining to detect the vein intimal hyperplasia and vascular remodeling. The expression levels of α -SMA, PCNA, PDGF-BB, VEGF-A, TNF- α and MMP-9 were analyzed by Immunohistochemical staining and Western blot. The expression levels of α -SMA, PDGF-BB and VEGF-A were assessed by RT-PCR assay. Compared with the sham group, the elastic fibers of the venous wall increased significantly, the venous intima media became thicker, and the blood vessels remodeled significantly in the AVF alone group. Compared with the AVF alone group, the proliferation of the venous-wall elastic fibers were inhibited and the expression of related proteins and mRNAs were decreased

收稿日期: 2018-12-12 接受日期: 2019-01-28

*通讯作者。Tel: 023-89011232, E-mail: zbysz1118@126.com

Received: December 12, 2018 Accepted: January 28, 2019

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011232, E-mail: zbysz1118@126.com

网络出版时间: 2019-05-09 17:45:51

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190509.1745.018.html>

in the AVF+HBO group. Our study suggested that continuous HBO therapy following AVF could not only significantly inhibit the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in AVF-vein tissue, but also improve vascular remodeling.

Keywords hyperbaric oxygen; arteriovenous fistulization; vascular smooth muscle cells; cell proliferation; vascular remodeling

自体动静脉瘘(arteriovenous fistulization, AVF)是终末期肾衰患者的首选血液透析血管通路,因此成熟且功能正常的AVF对于患者来说是相当重要的^[1]。自体AVF建立后的两大主要早期并发症是最初的成熟失败(原发性无功能)和随后的静脉狭窄^[2],有研究显示,AVF术后2个月的失败率为17%^[3],更甚者高达46%^[4]。导致瘘管失败的确切病理原因尚不清楚,但其特征性病变是静脉近端-吻合口狭窄^[5],已有研究显示,AVF狭窄是由具有血管损伤后异常迁移和增殖的平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)组成的静脉新内膜增生(venous neointimal hyperplasia, VNH)引起,且 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)以及细胞因子和介质如血管内皮细胞生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)、血小板源性生长因子-BB(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等在内膜表达^[6-7]。虽然VNH发生、发展的分子机制是多因素的,但现有的研究表明,缺氧起着关键作用^[8]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是缺氧部分依赖转录因子,调控包括血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)在内的多种基因表达^[9-10]。已知PDGF-BB、VEGF-A是由内皮细胞旁分泌的引起血管平滑肌细胞增殖的促有丝分裂肽^[11-12];基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)是一种诱导型基质金属蛋白酶,能够降解IV型胶原蛋白和许多其他基质蛋白。缺氧条件下,上述目的蛋白的表达明显增加,参与静脉内膜增生和血管重塑^[12-14]。

HBO治疗被定义为患者在压力大于标准大气压(1.0 atmosphere absolute, ATA)的腔室内间歇吸入100%氧气。HBO治疗的主要策略是增加血液中的氧含量,改善血氧分压,改善血氧弥散,增加组织氧“有效扩散距离”,促进侧支循环的建立^[15]。然而,现

有的研究主要集中在动脉疾病^[16-17],而HBO对静脉疾病,特别是对早期AVF失功的影响研究甚少。我们课题组在之前的研究发现,HBO通过提高血氧分压,改善缺氧和下调HIF-1 α ,来减轻AVF静脉内膜增生,增加近端静脉血流量^[18]。

本研究的主要目的是进一步寻找HBO治疗可通过抑制PDGF-BB、VEGF-A和MMP-9表达,抑制平滑肌细胞的增殖,减轻血管重塑,从而延缓VNH发展的证据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

腺嘌呤购自上海源叶生物科技有限公司;10%水合氯醛购自上海恒远科技生物有限公司;显微器械包购自上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂;Masson染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;免疫组化试剂盒、驴抗山羊二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;BCA蛋白质浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制胶试剂盒、 β -actin一抗、山羊抗小鼠二抗购自上海碧云天生物技术有限公司;Trizol、PCR引物、TB Green Premix Ex Taq II kit购自日本TaKaRa公司; α -SMA一抗、PCNA一抗购自美国Novus公司;VEGF-A、MMP-9一抗购自英国Abcam公司;PDGF-BB一抗、TNF- α 一抗购自北京博奥森生物技术有限公司;Axio Imager A2倒置显微镜购置德国Carl Zeiss公司;Image-Pro plus6.0图像分析软件购自美国Media Cybernetics图像技术公司。

1.2 实验动物

36只成年新西兰兔(均重3.0 kg)由重庆医科大学动物实验中心提供。新西兰兔饲养在动物实验中心动物房内,间隔12 h循环光照,每日给予标准兔粮和饮水。此次动物实验方案获得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会的批准,审查批号:2015-42。每只家兔单次使用,手术后第28天确定为安乐死时间点。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 基于大多数AVF早期失功研究都建立在应用非慢性肾衰竭的AVF模型之上, 为了更好地模拟慢性肾衰竭(CRF)临床患者体内的复杂内环境, 此试验通过喂养家兔腺嘌呤诱导CRF模型。

将36只家兔随机分为3组: 假手术组(Sham), 其中12只CRF家兔行假手术不行HBO治疗; 单纯AVF组, 其中12只CRF家兔接受动静脉瘘手术, 但未接受进一步HBO治疗; AVF+HBO组, 其中12只CRF家兔进行动静脉瘘手术, 并用HBO治疗。在假手术组中的动物只接受了皮肤切口。

1.3.2 动物模型 CRF模型诱导方法参考文献[18]。成功诱导CRF后, 行左颈AVF内瘘术。用10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔麻醉家兔。沿左下颌角向左内侧锁骨做3 cm皮肤切口。静脉内注射肝素(200 U/kg), 暴露左颈总动脉和左颈总静脉的近端和远端区域并用两个血管夹钳夹。先用5-0丝线永久结扎左颈总动脉和左颈总静脉, 然后分别于结扎点远心侧离断左颈总动脉和结扎点近心侧离断左颈总静脉, 之后用9-0聚丙烯缝合线以端对端方式吻合动静脉。提示AVF吻合成功的表现是松开血管夹后颈静脉立即充盈, 可触及稳定的震颤和搏动(图1)。

将HBO治疗5天, 然后休息2天定义为1次治疗过程。进行4次治疗过程, 总共28天。第1次治疗开始于术后第1天, 每次有12只动物。在20 min内将高压舱加压至2.5 ATA。调节入口阀和排气阀以保持氧气压力(2.5 ATA)和浓度(97%~100%) 60 min, 然后在20 min内缓慢减压。

1.3.3 获取AVF静脉组织 在AVF建立后第28天, 使用过量戊巴比妥将家兔安乐死。安乐死后, 用生理盐水灌洗左颈总动脉和左颈总静脉, 获取AVF静脉端近瘘口1 cm组织。将收获的标本切成2段, 其中1段在液氮中冷冻用于蛋白质印迹(Western blot)和PCR分析, 另一段在4%多聚甲醛中固定用于免疫组织化学分析和组织学染色。

1.3.4 Masson染色 4%多聚甲醛中固定的静脉经石蜡包埋切片, 切片常规脱蜡至水; Mayer苏木素染色液滴染2 min, 稍水洗; 丽春红品红染色液染色5 min, 蒸馏水稍冲洗; 磷钼酸溶液处理5 min, 镜下观察其分化, 胶原纤维呈淡红色时倒掉磷钼酸; 苯胺蓝染液复染3 min, 倒掉染液; 1%冰醋酸冲洗切片, 至蓝色不再分化为止; 梯度乙醇快速脱水, 透明, 封片。

1.3.5 免疫组化染色 固定的静脉经石蜡包埋切片, 切片常规脱蜡至水, 0.01 mol/L枸橼酸钠缓冲液(pH6.0)微波抗原修复。在37 °C条件下3% H₂O₂封闭20 min, 磷酸盐缓冲液洗3次; 根据一抗来源使用驴血清或者山羊血清于37 °C封闭15 min; PCNA(1:200)、PDGF-BB(1:200)、VEGF-A(1:250)、TNF- α (1:200)和MMP-9(1:250)一抗于4 °C封闭过夜, PBS洗3次; 根据一抗来源滴加驴抗山羊二抗(1:200)或山羊抗小鼠二抗(1:200), 37 °C孵育15 min, PBS洗3次; 滴加辣根过氧化物酶标记的生物素10 min, PBS洗涤3次; DAB显色, 透明, 封片。 α -SMA的免疫组化染色用于评估静脉管壁平滑肌细胞的排列形态和数量情况; PCNA的免疫组化染色用于评估静脉血管中膜和内膜处细胞的增殖情况; PDGF-BB和VEGF-A的免疫组化染色用于评估静脉血管中膜和内膜处促细胞增殖细胞因子的表达; TNF- α 和MMP-9的免疫组化染色用于评估促平滑肌细胞迁移, 血管重塑的炎性细胞因子的表达。

1.3.6 Western blot分析 提取各组静脉组织中的总蛋白, 经浓度测定, 煮沸变性, 电泳, 电转后, 快速封闭液封闭10 min, 分别加入鼠一抗 α -SMA(1:1 000)、PCNA(1:1 000)、PDGF-BB(1:1 500)、VEGF-A(1:1 000)、TNF- α (1:2 000)、MMP-9(1:1 000)于4 °C过夜孵育, TBST洗3次, 加入山羊抗小鼠二抗(1:3 000), 37 °C孵育2 h, TBST洗3次, 超敏ECL显影, 使用Fusion-Capt软件分析目的蛋白条带灰度值。

1.3.7 RT-PCR分析 对于RNA制备, 用Trizol从液氮保存的静脉中提取总RNA。TB Green Premix Ex Taq II kit进行逆转录获取的cDNA, 用于每次PCR反应。用于扩增的引物设计如下, α -SMA上游引物: 5'-GCT GTC CCT CTA TGC CTC TG-3', 下游引物: 5'-TGG CTC TAA CAG TCC GCC TA-3'; VEGF-A上游引物: 5'-CGA GAC CTT GGT GGA CAT C-3', 下游引物: 5'-CTG CAT GGT GAC GTT GAA C-3'; PDGF-BB上游引物: 5'-GTT ATT AGA GGA CGA TGG T-3', 下游引物: 5'-CTG ATG GAT TGT GAT AGG A-3'; GAPDH上游引物: 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA-3', 下游引物: 5'-CAC AAT GCC GAA GTG GTC GT-3'。25 μ L总反应体系为: TB Green Premix 12.5 μ L; 上游引物和下游引物各1 μ L; cDNA 2 μ L; DEPC水8.5 μ L。PCR反应运行条件: 95 °C 30 s;

95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 39个循环; 95 °C 10 s; 65~95 °C 条件下检测溶解曲线。

1.3.8 Masson染色和免疫组化染色切片测量方法
Masson染色切片在Axio Imager A2显微镜下, 可在静脉管壁中观察到红染的平滑肌细胞, 蓝染的胶原纤维。对于图像分析, 从10×20放大倍数下拍摄的每个切片中均选取5个不同的位置(以顺时针方向间隔5°), 应用Image-Pro plus6.0图像分析软件测量内膜中膜厚度(intima-media thickness, IMT), 并取平均值^[19]。其中静脉IMT为内膜管腔侧距中膜外弹力膜之间的长度。

免疫组化染色切片, 在光学显微镜下, 可在VSMC的细胞质中观察到免疫组化阳性染色(黄色或棕黄色)。对于图像分析, 从10×40放大倍数下拍摄的每个切片中选择五个均匀染色和完全不重叠的轮廓; 所有图像的大小完全相同。使用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测定每个图像的积分光密度(IOD)值, 并计算平均值^[20]。以Sham组IOD值为参照, 计算相对平均积分光密度(relative average IOD)值。

1.3.9 数据统计 所有实验定量数据均表示为均数±标准差($\bar{x}\pm s$)。单因素方差分析用于3组间差异的比较, 成组 t 检验用于两组间差异的比较。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。所有实验至少重复3次。使用Image Pro Plus 6.0进行形态学结果测定分析, 使用SPSS软件22.0版本进行所有统计学分析。

2 结果

2.1 一般情况

经腺嘌呤喂养后新西兰兔活动和精神稍差, 食量和体重减少, 但无一例因饲喂腺嘌呤而死亡。行造瘘术的2组新西兰兔嘴唇均出现发绀, 但无一例因行造瘘术和HBO治疗而死亡。

2.2 HBO治疗减轻AVF静脉管壁平滑肌细胞增生导致的重塑

为了观察引起AVF静脉内膜增生和管壁重塑的主要组织成分, 我们对AVF静脉端行Masson染色。经Masson染色发现, 在AVF术后第4周, Sham组中红染的弹力纤维主要位于静脉管壁中膜; 单纯AVF组和HBO+AVF组管壁中内膜处红染的弹力纤维增生明显, 管壁重塑明显, 但单纯AVF组较HBO+AVF组更为明显($P<0.05$)。Sham组静脉段中内膜的平均厚度为(41.07±4.00) μm , 单纯AVF组的

平均厚度为(186.51±27.72) μm , HBO+AVF组的平均厚度为(99.09±2.44) μm , 组间存在显著差异($P<0.01$) (图2)。

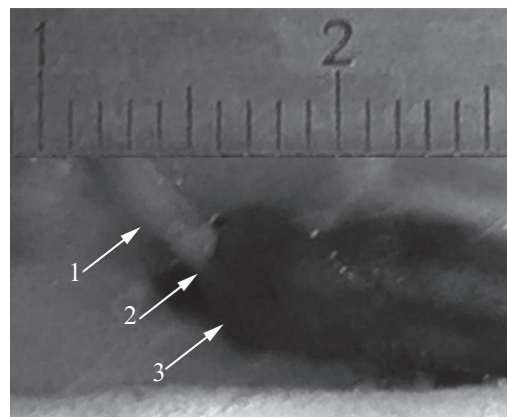
2.3 HBO治疗抑制AVF静脉管壁平滑肌细胞增殖、迁移

α -SMA是平滑肌细胞最重要的收缩和结构蛋白, 能够反映细胞生物学功能的活跃程度。PCNA与细胞分裂密切相关。PDGF-BB、VEGF-A是促进血管平滑肌增殖的有丝分裂肽。通过对AVF静脉端行免疫组化染色和Western blot分析发现, 单纯AVF组较Sham组 α -SMA、PCNA、PDGF-BB和VEGF-A表达明显增加($P<0.01$); 而在HBO治疗下, HBO+AVF组较单纯AVF组以上指标的表达出现下调($P<0.05$) (图3和图4)。

TNF- α 和MMP-9是炎症相关细胞因子, 与促进平滑肌细胞迁移, 血管壁的重塑有密切联系。通过对AVF静脉端行免疫组化染色和Western blot分析发现, 单纯AVF组较Sham组TNF- α 和MMP-9表达明显增加($P<0.01$); 而在HBO治疗下, HBO+AVF组较单纯AVF组二者的表达出现下调, 差异存在显著性($P<0.05$) (图5和图6)。

2.4 HBO治疗下调 α -SMA、PDGF-BB和VEGF-A mRNA的表达

为进一步确定HBO是否下调 α -SMA、PDGF-BB和VEGF-A mRNA的表达, 我们提取了各组组织的RNA, 以GAPDH作为内参, RT-PCR检测各组中 α -SMA、PDGF-BB和VEGF-A mRNA表达水平。结果表明, 单纯AVF组相较于Sham组 α -SMA、PDGF-

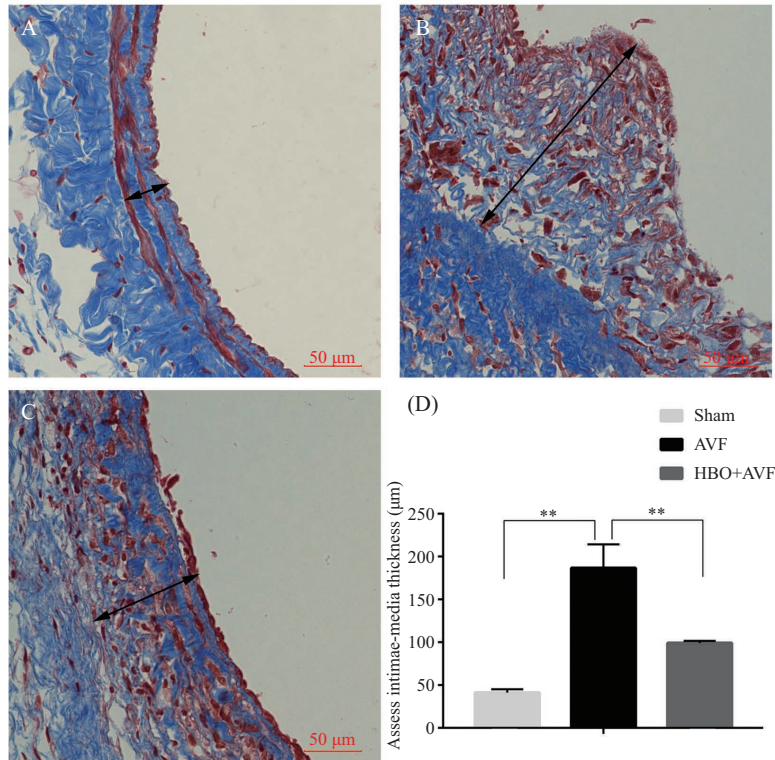


1: 颈动脉; 2: 动静脉瘘; 3: 颈静脉。

1: carotid artery; 2: AVF; 3: jugular vein.

图1 颈动脉-颈静脉动静脉瘘(AVF)的建立

Fig.1 Creation of carotid-jugular arteriovenous fistula (AVF)

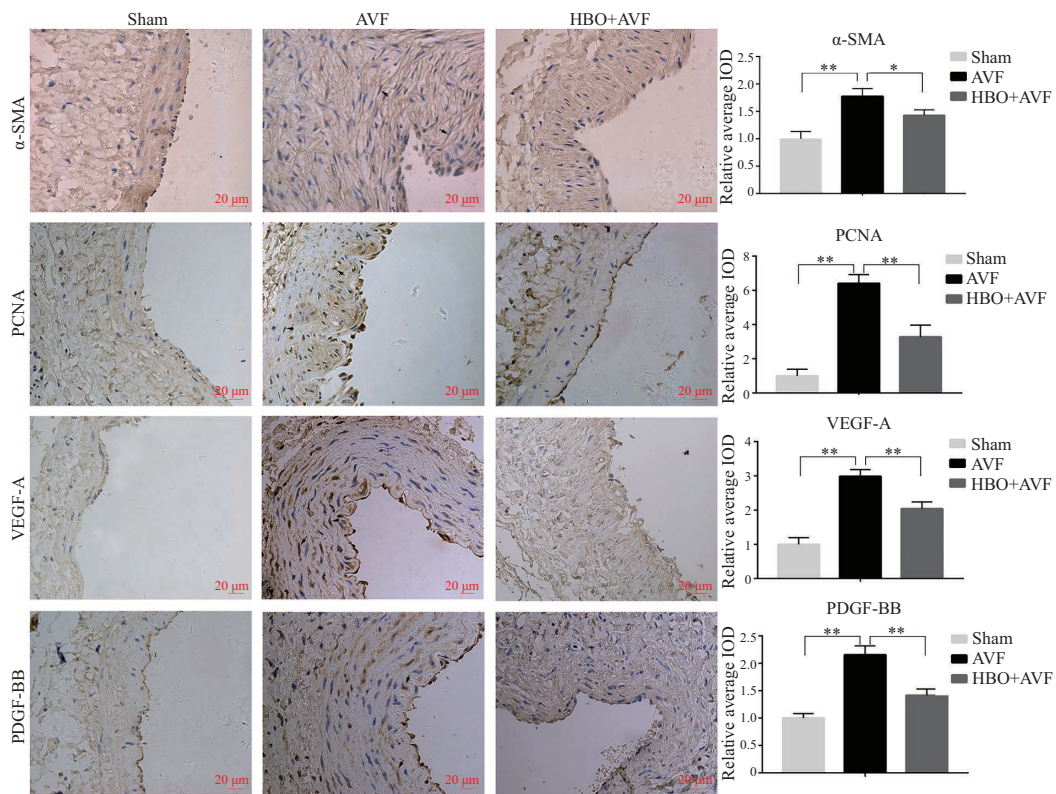


A: Sham组; B: AVF组; C: HBO+AVF组; D: 中内膜厚度统计分析图, ** $P < 0.01$ 。

A: Sham group; B: AVF group; C: HBO+AVF group; D: the statistical analysis of the results of intima-media thickness chart, ** $P < 0.01$.

图2 各组静脉弹力纤维Masson染色情况

Fig.2 Masson staining for elastic fibers of vein in each group



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图3 各组静脉中α-SMA、PCNA、VEGF-A和PDGF-BB的免疫组化染色情况

Fig.3 Immunohistochemical staining for the protein of α-SMA, PCNA, VEGF-A and PDGF-BB in each group

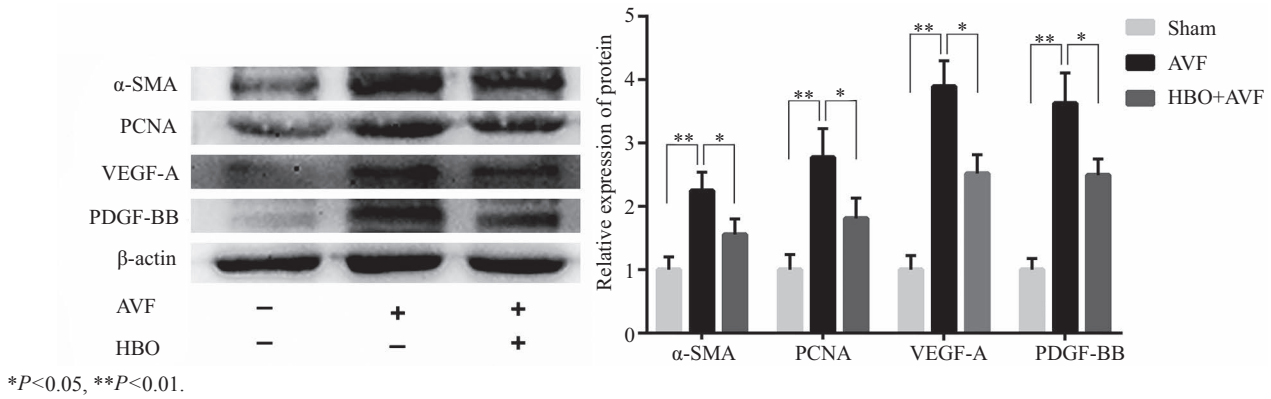


图4 各组静脉中 α -SMA、PCNA、VEGF-A和PDGF-BB的蛋白表达情况
Fig.4 The protein expressions of α -SMA, PCNA, VEGF-A and PDGF-BB in each group

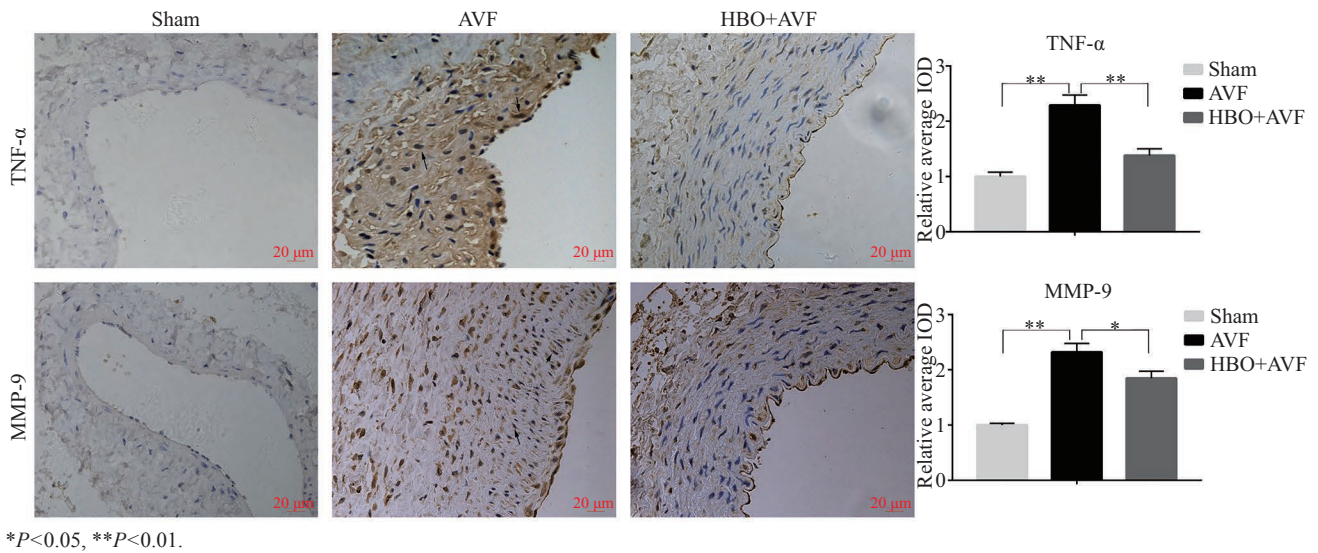


图5 各组静脉中TNF- α 和MMP-9的免疫组化染色情况
Fig.5 Immunohistochemical staining for the protein of TNF- α and MMP-9 in each group

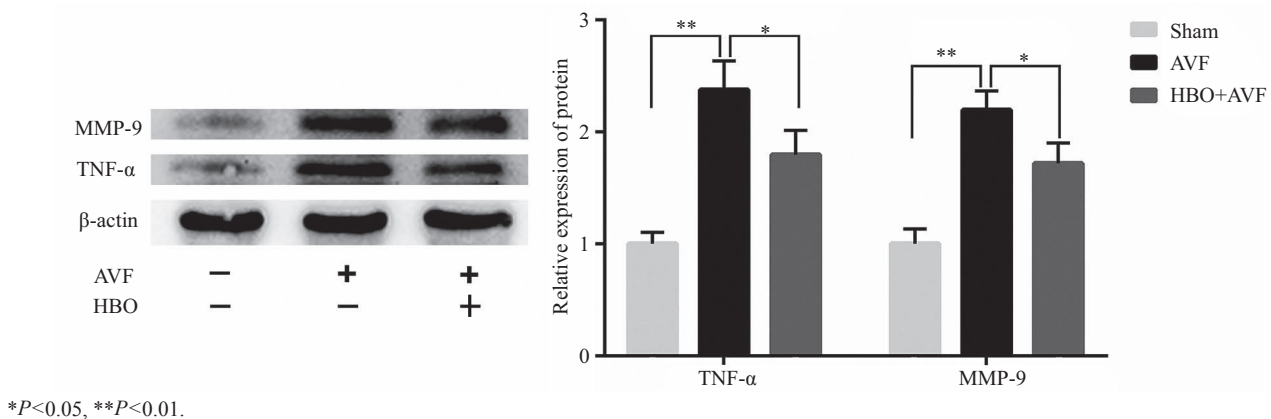
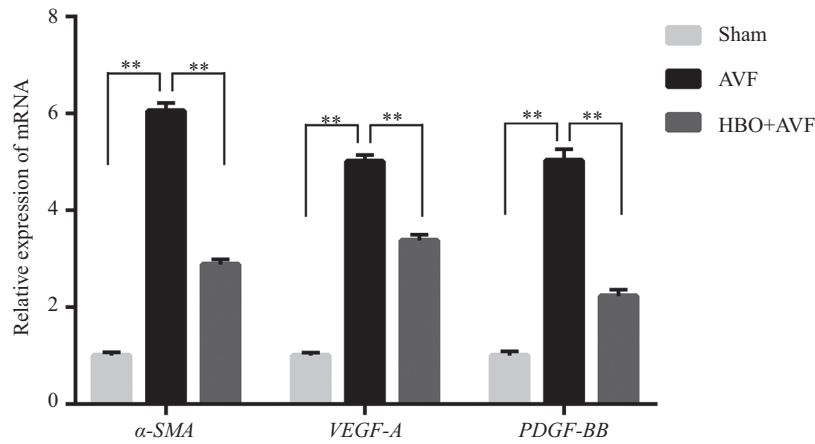


图6 各组静脉中TNF- α 和MMP-9的蛋白表达情况
Fig.6 The protein expressions of TNF- α and MMP-9 in each group

BB和VEGF-A mRNA表达明显升高($P < 0.05$); 而在 HBO治疗下, HBO+AVF组相较于单纯AVF组 α -SMA、PDGF-BB和VEGF-A mRNA表达出现下调, 差异存在

显著性($P < 0.05$)。这表明, 在HBO治疗下, HBO下调AVF静脉管壁 α -SMA、PDGF-BB和VEGF-A mRNA的表达(图7)。



** $P < 0.01$.

图7 各组静脉中 α -SMA, VEGF-A and PDGF-BB mRNA表达情况

Fig.7 The mRNA expressions of α -SMA, VEGF-A and PDGF-BB in each group

3 讨论

成熟且功能正常的自体AVF可作为ESRD患者的首选血管血液透析通路^[1]。然而,由于VNH引起的早期AVF失败,血流减少,甚至血栓形成和闭塞,使许多患者不能按照常规治疗方案进行透析治疗。尽管进行了三十多年的深入研究,但自体AVF早期失功仍然是一个主要的临床问题,并缺乏有效的预防策略。

在我们的研究中,相较于HBO+AVF组,单纯AVF组中平滑肌细胞明显增生,排列紊乱,并迁移至内膜,构成了VNH的主要细胞成分。这为我们之前的研究结果:在兔CRF模型中,HBO抑制VNH并增加AVF中的血流量^[18],提供了细胞理论基础,表明HBO通过抑制平滑肌细胞增殖,减轻VNH。

虽然静脉内膜增生发展的分子机制是多因素的,但现有的研究表明,缺氧在其中起着关键作用。而在缺氧条件下VEGF-A和PDGF-BB的分泌受到HIF-1 α 调控。我们课题组在之前的研究中已发现,在兔CRF模型中,HBO可提高血氧分压,改善缺氧,下调HIF-1 α 。在本研究中,VEGF-A和PDGF-BB的蛋白与mRNA表达水平,HBO+AVF组都较单纯AVF组下调($P < 0.05$),我们考虑VEGF-A和PDGF-BB的下调受到HIF-1 α 下调的作用。

有研究认为,ESRD与慢性炎症状态相关,而这种炎症状态可能在血管通路狭窄中起着重要作用^[21-22]。在我们的研究中,单纯AVF组静脉中炎性相关因子TNF- α 、MMP-9的表达水平明显升高,提示炎症状态存在。HBO+AVF组中二者的表达较单

纯AVF组下调($P < 0.05$),表明HBO治疗一定程度上减轻了炎症状态。

虽然本研究从兔AVF动物模型层面表明了HBO治疗可以改善AVF术后早期失功,但在接下来的研究中,还需进一步探讨HBO对人血管平滑肌细胞和人血管内皮细胞的作用。

总之,这项研究表明,HBO治疗通过抑制平滑肌细胞增殖和减轻炎症来延缓AVF近端静脉中VNH的发展,从而改善AVF早期失功。因此,HBO治疗有望成为预防AVF术后早期失功的有效手段。然而,HBO抑制平滑肌细胞增殖的信号通路还需要进一步研究。

参考文献 (References)

- Schmidli J, Widmer MK, Basile C, Donato G, Gallieni M, Gibbons CP, *et al*. Editor's choice-vascular access: 2018 clinical practice guidelines of the european society for vascular surgery (ESVS). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2018; 55(6): 757-818.
- Cheung AK, Imrey PB, Alpers CE, Robbin ML, Radeva M, Larive B, *et al*. Intimal hyperplasia, stenosis, and arteriovenous fistula maturation failure in the hemodialysis fistula maturation study. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(10): 3005-13.
- Woodside KJ, Bell S, Mukhopadhyay P, Repeck KJ, Robinson IT, Eckard AR, *et al*. Arteriovenous fistula maturation in prevalent hemodialysis patients in the United States: A national study. *Am J Kidney Dis* 2018; 71(6): 793-801.
- Allon M, Lockhart ME, Lilly RZ, Gallichio MH, Young CJ, Barker J, *et al*. Effect of preoperative sonographic mapping on vascular access outcomes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2001; 60(5): 2013-20.
- Allon M, Robbin ML, Young CJ, Deierhoi MH, Goodman J, Hanaway M, *et al*. Preoperative venous intimal hyperplasia, postoperative arteriovenous fistula stenosis, and clinical fistula

- outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8(10): 1750-5.
- 6 Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg* 1994; 81(9): 1254-69.
- 7 Janardhanan R, Yang B, Vohra P, Roy B, Withers S, Bhattacharya S, *et al.* Simvastatin reduces venous stenosis formation in a murine hemodialysis vascular access model. *Kidney Int* 2013; 84(2): 338-52.
- 8 Brahmabhatt A, Misra S. The biology of hemodialysis vascular access failure. *Semin Intervent Radiol* 2016; 33(1): 15-20.
- 9 Choudhry H, Harris AL. Advances in hypoxia-inducible factor biology. *Cell Metabolism* 2018; 27(2): 281-98.
- 10 Lim CS, Kiriakidis S, Sandison A, Paleolog EM, Davies AH. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. *J Vasc Surg* 2013; 58(1): 219-30.
- 11 Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, Maloney SP, Teso D, Paszkowiak JJ, *et al.* Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. *J Vasc Surg*, 2007; 45(Suppl A): A15-24.
- 12 Chanakira A, Dutta R, Charboneau R, Barke R, Santilli SM, Roy S. Hypoxia differentially regulates arterial and venous smooth muscle cell proliferation via PDGFR- β and VEGFR-2 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 302(5): H1173-84.
- 13 Misra S, Fu AA, Rajan DK, Juncos LA, McKusick MA, Bjarnason H, *et al.* Expression of hypoxia inducible factor-1 alpha, macrophage migration inhibition factor, matrix metalloproteinase-2 and -9, and their inhibitors in hemodialysis grafts and arteriovenous fistulas. *J Vasc Interv Radiol* 2008; 19(2 Pt 1): 252-9.
- 14 Misra S, Shergill U, Yang B, Janardhanan R, Misra KD. Increased expression of HIF-1alpha, VEGF-A and its receptors, MMP-2, TIMP-1, and ADAMTS-1 at the venous stenosis of arteriovenous fistula in a mouse model with renal insufficiency. *J Vasc Interv Radiol* 2010; 21(8): 1255-61.
- 15 Yan L, Liang T, Cheng O. Hyperbaric oxygen therapy in China. *Med Gas Res* 2015; 5(3): 1-6.
- 16 Li Y, Hao Y, Wang T, Wei L, Wang W, Liang Y, *et al.* The effect of hyperbaric oxygen therapy on myocardial perfusion after the implantation of drug-eluting stents. *Ann Clin Lab Sci* 2018; 48(2): 158-63.
- 17 Rits Y, Uzieblo M, Shanley CJ. Hyperbaric oxygen decreases intimal thickness and area after carotid artery balloon injury in a rat model. *Ann Vasc Surg* 2013; 27(6): 785-90.
- 18 Li Z, Li M, Li X, Zhang M, Zhao Y, Ren W, *et al.* Hyperbaric oxygen inhibits venous neointimal hyperplasia following arteriovenous fistulization. *Int J Mol Med* 2017; 39(5): 1299-306.
- 19 Duque J, Martinez L, Mesa A, Wei Y, Tabbara M, Salman L, *et al.* CD4(+) lymphocytes improve venous blood flow in experimental arteriovenous fistulae. *Surg Annu* 2015; 158(2): 529-36.
- 20 Chen S, Qin S, Wang M, Zhang S. Expression and significance of NELIN and SM22 α in varicose vein tissue. *Exp Ther Med* 2015; 9(3): 845-49.
- 21 Sezer S, Ozdemir FN, Arat Z, Turan M, Haberal M. Triad of malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in hemodialysis patients. *Nephron* 2002; 91(3): 456-62.
- 22 Kokubo T, Ishikawa N, Uchida H, Chasnoff SE, Xie X, Mathew S, *et al.* CKD accelerates development of neointimal hyperplasia in arteriovenous fistulas. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(6): 1236-45.