

不停跳心内直视手术对心肌细胞凋亡的影响

熊利华¹, 黄景彬², 魏益平¹, 李 佳¹, 祝曙光³, 华 平¹, 王铭辉¹, 张 华¹

(1. 中山大学附属第二医院心胸外科, 广东 广州 510120; 2. 广西医科大学第五附属医院//柳州市人民医院心胸外科, 广西 柳州 545001; 3. 香港大学心血管疾病研究所 香港)

摘 要: 【目的】评价不停跳体外循环心内直视手术对心肌细胞凋亡的影响和探讨其临床意义。【方法】不停跳心内直视手术患者 25 例(A 组), 不停跳心内直视手术患者 20 例(B 组), 取心肌组织作 TUNEL 细胞凋亡检测, 比较分析术前和术后心肌细胞凋亡率并参照围手术期肌钙蛋白 T(cTnT) 检测。【结果】两组患者均无低心输出量综合征的发生。心肌细胞凋亡指数 A 组(0.003 ± 0.002)和 B 组(0.004 ± 0.003)术前无明显差别(P > 0.05); 术后心肌细胞凋亡指数 A 组(0.012 ± 0.008, P < 0.001)和 B 组(0.006 ± 0.004, P < 0.001)均高于术前; A、B 两组术后心肌细胞凋亡指数差别有明显差别(P < 0.05)。围手术期 cTnT 水平 A 组在 CPB 末和术后 2 h 明显高于 B 组(P < 0.05)。【结论】本实验提示不停跳体外循环心内直视手术引起心肌细胞凋亡和心肌损害小于停跳手术。

关键词: 不停跳心脏手术; 心肌细胞; 细胞凋亡; 肌钙蛋白 T

中图分类号: R654.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2007)05-0562-03

Influence of Beating Open Heart Operation to Cardiomyocytes Apoptosis

XIONG Li-hua¹, HUANG Jing-bin², WEI Yi-ping¹, LI Jia¹, ZHU Shu-guang³, HUA Ping¹,
WANG Ming-hui¹, Zhang Hua¹

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, SUN Yat-sen Memorial Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery; Liuzhou People Hospital//The Fifth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545001, China; 3. Research Institute of Cardiovascular Disease University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract: 【Objective】To investigate cardiomyocytes apoptosis in beating heart surgery with extra-corporeal circulation and to evaluate its clinical value. 【Methods】Cardiomyocytes apoptosis were detected by TUNEL methods, perioperative cTnT level were record and compared between before and after the open heart surgery in the arrested heart surgery group 25 cases (Group A) and beating heart surgery group 20 cases (Group B). 【Results】There were no low-output syndrome in both two groups. Cardiomyocytes apoptosis index has no difference between Group A (0.003 ± 0.002) and Group B (0.004 ± 0.003) preoperatively (P > 0.05), the postoperative apoptosis index were significantly higher than those of preoperative in both Group A (0.012 ± 0.008, P < 0.001) and Group B (0.006 ± 0.004, P < 0.001). Postoperative apoptosis index in Group A was higher statistically significant (P < 0.05). Perioperative cTnT detection revealed a higher level in Group A than in Group B only at the point of CPB end and 2 hours after operation. 【Conclusion】These results suggested that beating heart surgery has less implication in cardiomyocytes apoptosis than the conventional arrested heart surgery.

Key words: beating heart surgery; cardiomyocyte; apoptosis; cTnT

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):562-564]

近年来, 浅低温不停跳心内直视手术在临床得到较为广泛的应用, 不阻断冠脉循环、不存在心肌缺血再灌注损伤是其主要优点^[1]。不停跳心内直

视手术对心肌炎症反应、心肌酶学和肌钙蛋白的影响已有相应报道^[2], 但在不停跳心内直视手术过程中, 对心肌细胞凋亡有无影响以及这一影响的

收稿日期: 2006-08-10

基金项目: 广东省自然科学基金(6021339)

作者简介: 熊利华(1955-), 男, 江西南昌人, 教授, 博士生导师, E-mail: Lihua211@hotmail.com

临床意义如何,尚无相关研究。本文通过观察不停跳组和停跳心组内直视手术病人体外循环前后心肌组织的心肌细胞凋亡情况和围手术期肌钙蛋白T(cTnT)水平变化,探讨不停跳心内直视手术对心肌细胞凋亡的影响及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

从2002年7月至2004年5月在本科行心脏手术的房室缺和单瓣置换术患者共45例,分停跳组(A组, Arrested group, n=25)和不停跳组(B组, Beating group, n=20)。两组病种相似,包括先天性心脏病,风湿性心脏病,感染性心内膜炎等。所有手术由同一医生主刀操作,在体外循环下进行。A组中男12例,女13例,年龄3~67(26.0±16)岁;体质量14.5~76.0(40.4±20.9)kg;CPB时间平均(101.8±69.5)min。B组中男11例,女9例,年龄6~45(24.7±10.2)岁;体质量19.0~74.0(46.6±14.8)kg;CPB时间平均(71.2±34.8)min;A、B两组上述临床指标和术前心功能之间的差异除CPB时间外均无统计学意义(P>0.05)。

1.2 TUNEL 染色方法

开胸后体外循环转机前及停止体外循环时用锋利手术刀在右心房同一部位切取右心耳心肌组织(0.5±0.5)cm²,用原位末端标记(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP nick end labeling, TUNEL)法检测心肌细胞凋亡。手术所得心肌标本立即用10%的福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,脱蜡与再水化,60℃加热5min,二甲苯漂洗,乙醇(100%, 95%, 90%, 80%, 70%)漂洗,蒸馏水漂洗。3% H₂O₂浸泡10min, PBS漂洗, 26

蛋白酶K液(20 μg/mL in 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4~8), 孵育25min。PBS漂洗2次。管1(酶溶液)50 μL加入管2(标记溶液)450 μL共500 μL,构成TUNEL反应液,放于冰上备用。阴性对照:加50 μL无末端转移酶的标记溶液。阳性对照:加DNA聚合酶I, Tris-HCl, pH 7.5, MgCl₂ 22 含DNA片段, 孵育10min, PBS漂洗2次。样品周边晾干。加50 μL TUNEL反应液到样品。加盖,在37℃黑暗湿化室孵育60min, PBS漂洗3次。样品周边晾干。加50 μL coverter-POD液(管3, 酶标抗体), 在37℃黑暗湿化室孵育30min, PBS漂洗3

次。加50 μL POD底物(DAB液, 0.03%)。PBS漂洗3次。脱水:乙醇(70%, 80%, 90%, 95%, 100%), 二甲苯漂洗, 样品周边晾干。加中性树脂, 封片, 镜检查。

1.3 心肌细胞凋亡指数检测

标本切片应用罗氏公司出品的原位细胞凋亡检测试剂盒原位DNA末端标记技术,采用全自动图像分析系统(日本JVC KY-F30B-3CCD彩色图象摄录输入仪,德国KONTRON IBAS 2.5全自动图象分析系统,德国ZEISS AXIOTRON研究型显微镜),每例玻片于高倍镜(10×40)下计数3个视野内的细胞总数和凋亡细胞数,计算凋亡指数(凋亡指数=发生凋亡的细胞核数/细胞核总数×100%)。

1.4 围手术期肌钙蛋白T的检测

每个病人分别于麻醉诱导后、CPB末、术后2h、6h、24h和48h取中心静脉血,标本于1h内3000 r/min离心5min,分离血清,用ELECSYS 2010全自动免疫分析仪和电化学发光法测cTnT,并测量同时点的红细胞压积(HCT)。为避免血液稀释的影响,所有测量值均用公式矫正到诱导后水平:矫正值=测得值×校正系数(CF)。CF=HCT₁/HCT₀×(1-HCT₁)/(1-HCT₀);HCT₀为麻醉诱导后患者的血细胞压积,HCT₁为标本采集时患者的血细胞压积。

1.5 统计学处理

数据用SPSS11.5软件包计算,手术前后凋亡指数用Paired-Samples t Test,围术期心肌钙蛋白T的变化用单因素方差分析和Post Hoc检验;=0.05。

2 结果

2.1 手术前后心肌细胞凋亡指数的变化

两组患者均无低心输出量综合征的发生,术后均顺利康复出院。TUNEL染色检测心肌凋亡细胞下呈现核固缩,浓染状(图1)。心肌细胞凋亡指数A组和B组术前差别无统计学意义,配对t检验示A、B两组术后心肌细胞凋亡指数均高于术前,差别均有统计学意义,A、B两组术后心肌细胞凋亡指数差别有统计学意义(表1)。

2.2 围手术期心肌钙蛋白T的变化

A组患者的血清cTnT水平在CPB末时和术

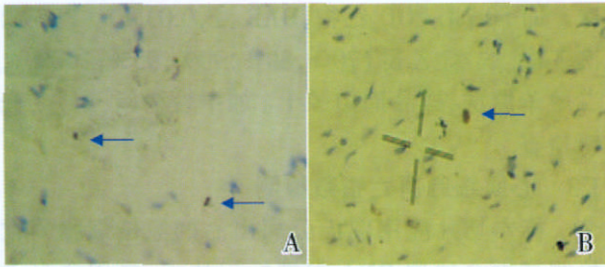


图 1 凋亡心肌细胞

Fig.1 Cardiomyocytes apoptosis($\times 200$)

Positive cells of apoptosis is that nucleus is dyed for brown (arrows); A: arrested group; B: beating group; \uparrow Shows some of the TUNEL positive cells

表 1 停跳组和不停跳组心肌细胞凋亡指数的比较

Table 1 Comparison of cardiomyocytes apoptosis index between arrested group and beating group

Group	AI-BO	AI-AO	t	P
A (n=25)	0.003 \pm 0.002	0.012 \pm 0.008	-5.512	< 0.001
B (n=20)	0.004 \pm 0.003	0.006 \pm 0.004	-5.427	< 0.001
t	-0.297	3.083		
P	>0.05	< 0.05		

AI-BO: apoptosis index before operation; AI-AO: apoptosis index after operation

后 2 h 两个时间点明显高于 B 组, 两者差别有统计学意义 (表 2), 其它时间点两组患者的血清 cTnT 水平差异无显著性。

表 2 A、B 组围手术期 cTnT 的表达

Table 2 Perioperative cTnT level in Group A and B (ng/mL)

Group	A	B	P
After induction	0.02 \pm 0.00	0.06 \pm 0.02	0.966
CPB end	8.03 \pm 7.98	1.37 \pm 1.45	0.001
2 h post- op	4.15 \pm 7.80	1.06 \pm 0.76	0.013
6 h post- op	1.93 \pm 1.96	0.86 \pm 0.55	0.383
24 h post- op	1.19 \pm 1.09	0.75 \pm 0.85	0.719
48 h post- op	0.67 \pm 0.54	0.63 \pm 0.82	0.971

post- op: post- operation

3 讨论

在正常心肌组织中已证实存在心肌细胞凋亡^[3]。体外循环引起的全身炎症反应综合症, 产生的大量炎症因子 (如 TNF、IL-6) 也可引起心肌细胞凋亡^[4,5]。由于用 TUNEL 法检测的是细胞凋亡的终末阶段, 我们手术中获取标本的时间窗仅限于约 2 h, 故测得的结果仅能反映某个时间段的心肌细胞

凋亡率, 这可能是我们的结果比其它研究结果偏低的原因。

缺血再灌注损伤可引起心肌细胞的凋亡。缺血再灌注损伤时, 氧自由基、细胞内钙超载、线粒体损伤, 可引起心肌细胞凋亡^[4,5]。有研究证实心肌细胞凋亡随着主动脉阻断的时间延长而增加^[6,7]。不停跳心脏手术由于不阻断冠脉循环, 不用心停搏液, 心脏在空搏状态下, 得到持续的氧合血灌注, 所以不存在无氧代谢和无缺血再灌注损伤, 因而对心肌细胞凋亡的影响较停跳心脏手术为轻。我们的研究结果表明, 不停跳组术后心肌细胞凋亡指数明显低于停跳组。

心肌细胞肌钙蛋白存在于横纹肌中, 包括 3 种亚单位 (cTnT、cTnI、cTnC)。有研究表明, cTnT 是心肌细胞损伤特异、灵敏的标志, 心肌细胞损伤时, 血清 cTnT 增高。本实验显示, B 组患者的血清 cTnT 水平在 CPB 末时和术后 2 h 两个时间点明显低于 A 组。这提示不停跳组较停跳组术后的心肌细胞损伤轻, 释放到血中的 cTnT 少, 不停跳心脏手术有更好的心肌保护作用。不停跳组和停跳组血清 cTnT 水平在术后 6 h、24 h、48 h 等时间点均无显著性差异, 可能是由于血清 cTnT 半衰期短代谢快及本组病例总体手术影响较为轻微的缘故。

心肌细胞凋亡对心肌收缩力有一定影响。单个细胞的死亡影响到周围顿抑心肌的滑动, 导致心肌收缩力不协调, 甚至严重的心功能障碍。Schmit^[5]等的研究发现, 心肌细胞凋亡指数与左室功能 (CI、PCWP) 与 PAP 呈很好的相关, 他认为心肌细胞凋亡是心脏术后心肌顿抑的重要机制。由于成人心肌细胞一旦死亡, 就无法再生, 而依靠心肌细胞肥大和心肌重构代偿其功能。如果其他的心肌细胞无法代偿, 即可出现临床症状。心功能差 (Ⅰ、Ⅱ级)、大心脏的病人, 其心功能代偿已处于临界状态, 如果心肌细胞数量再进一步减少, 会使心功能无法维持机体代谢的需要。此时, 保持心肌细胞数量的稳定可能更为重要。MASAKI 等^[7]报道, 不停跳心脏手术对心功能差 (Ⅰ、Ⅱ级)、大心脏病人的心肌保护效果较心脏停跳的心肌保护效果要好, 我们的研究结果也提示不停跳心脏手术由于不存在缺血再灌注损伤而提供了更好的心肌保护效果^[9]。我们分析可能是因为不停跳心脏手

(下转第 569 页 to page 569)

- locally advanced or metastatic pancreatic cancer. A randomized phase study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) and the Central European Cooperative Oncology Group (CECOG) [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (16 Suppl): 4010- 4012.
- [16] ROCHA LIMA CMS, ROTCHE R, JEFFERY M, et al. A randomized phase 3 study comparing efficacy and safety of gemcitabine (GEM) and irinotecan (I), to GEM alone in patients (pts) with locally advanced or metastatic pancreatic cancer who have not received prior systemic therapy [J]. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2003, 22: 1005- 1007.
- [17] KULKE M H, NIEDZWIECKI D, TEMPERO M A, et al. A randomized phase II study of gemcitabine/cisplatin, gemcitabine fixed dose rate infusion, gemcitabine/docetaxel, or gemcitabine/irinotecan in patients with metastatic pancreatic cancer (CALGB 89904) [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22 (14 Suppl): 4011- 4012.
- [18] YIP D, KARAPETIS C, STRICKLAND A, et al. Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer [DB]. Art. No.:CD002093. DOL: 10.1002/14651858. CD002093.pub2
- [19] LOUVET C, HINCKE A, LABIANCA R, et al. Increased survival using platinum analog combined with gemcitabine as compared to gemcitabine single agent in advanced pancreatic cancer (APC): Pooled analysis of two randomised trials, the GERCOR/GISCAD Intergroup Study and a German Multicenter Study [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24 (18 Suppl): 4003- 4008.
- [20] BOECK S, HINKE A, WILKOWSKI R, et al. Analysis of prognostic factors in patients with advanced pancreatic cancer: Subgroup analysis of a randomized phase III trial comparing single-agent gemcitabine to the gemcitabine plus cisplatin combination [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (16 Suppl):4105- 4110.
- [21] ROBERT F, OZOLS, ROY S, et al. Clinical cancer advances 2006: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening- a report from the American Society of Clinical Oncology [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(1):146- 162.
- [22] 郭双双, 王羽, 杨琼, 等. 吉西他滨联合 5FU 或卡培他滨与吉西他滨单药治疗晚期胰腺癌对比的 meta 分析 [J]. *循证医学*, 2006, 6(1):42- 47.

(编辑 刘清海)



(上接第 564 页 from page 564)

术中心肌细胞凋亡率较低, 心肌顿抑较轻所致。

减轻心肌的缺血再灌注损伤可减少心肌细胞凋亡^[10], 抑制细胞凋亡有助于抑制心力衰竭的发展和促进心功能恢复, 人们可以通过干预细胞死亡程序, 减少心肌细胞的凋亡, 保持心肌细胞数量的稳定, 从而保护心功能。抑制心肌细胞凋亡有可能成为治疗心血管疾病和心肌保护新的靶点^[11]。

参考文献:

- [1] ATHANASULEAS C, SILER W, BUCKBERG G, et al. Myocardial protection during surgical ventricular restoration [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, 29 (1): S231- S237.
- [2] QUANIERS J M, LERUTH J, ALBERT A, et al. Comparison of inflammatory responses after off-pump and on-pump coronary surgery using surface modifying additives circuit [J]. *Ann Thorac Surg*, 2006, 81(5): 1683- 1690.
- [3] COLUCCI W S. Apoptosis in the heart [J]. *New Engl J Med*, 1996, 335(16):1224- 1226.
- [4] FLISS H, GATTING D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium [J]. *Circ Rec*, 1996, 79(5): 949- 956.
- [5] SCHMITT J P, SCHRODER J, SCHUNKERT H. Role of apoptosis in myocardial stunning after open heart surgery[J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73(4):1229- 1235.
- [6] MALMBERG M, VAHASILTA T, SARASTE A, et al. Cardiomyocyte apoptosis and duration of aortic clamping in pig model of open heart surgery [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, 30(3): 480- 484.
- [7] 田素民, 李国营, 李洁, 等. 不同时段的心肌缺血后再灌注损伤与心肌细胞凋亡的实验研究 [J]. *解剖学研究*, 2003, 25(2): 97- 99.
- [8] KAPLON R J, PHAM S M, SALERNO T A. Beating-heart valvular surgery: a possible alternative for patients with severely compromised ventricular function[J]. *Card Surg*, 2002, 17(2):170- 172.
- [9] 熊利华, 苏艳玲, 华平, 等. 不停跳心内直视手术的临床研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25 (S1): 221- 223.
- [10] MASAKI M, IZUMI M, OSHIMA Y, et al. Smad1 protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury[J]. *Circulation*, 2005, 111(21):2752- 2759.
- [11] FU X C, WANG M W, LI S P, et al. Anti-apoptotic effect and the mechanism of orientin on ischaemic/reperfused myocardium[J]. *Asian Nat Prod Res*, 2006, 8 (3): 265- 272.

(编辑 徐杰)