

## 体外循环中心肌组织胞浆型磷脂酶 A<sub>2</sub>-γ 亚型激活与心肌细胞损伤关系的研究

吴晓云 匡凤梧 罗子国 邓兵 吴春 王兴勇

**【摘要】 目的** 探讨先天性心脏病室间隔缺损修补术后心肌组织胞浆型磷脂酶 A<sub>2</sub>-γ 亚型(cPLA<sub>2</sub>-γ)的激活与心肌细胞超微结构改变的关系。**方法** 取 12 例室间隔缺损手术患儿体外循环(CPB)前后右心耳处心肌组织,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定心肌组织 cPLA<sub>2</sub>-γ 基因表达水平;应用凝胶图像分析系统对 CPB 前后心肌组织 cPLA<sub>2</sub>-γ 基因表达强度进行半定量分析;通过透射电镜观察心肌细胞超微结构的改变。**结果** CPB 后心肌组织 cPLA<sub>2</sub>-γ 基因表达明显上调( $P < 0.05$ )。心肌组织超微结构的改变包括心肌细胞质膜下水肿,核异染色质边集、肌浆网扩张,线粒体代偿性增生并伴有中到重度内室肿胀、肌丝灶性溶解等。**结论** 体外循环后心肌组织 cPLA<sub>2</sub>-γ 激活可能导致了心肌细胞及细胞器膜完整性破坏、能量代谢及收缩功能障碍。

**【关键词】** 心肌细胞; 体外循环; 胞浆型磷脂酶 A<sub>2</sub>; 超微结构

**Study on the relationship between cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-γ activation and myocardial cell injury during cardiopulmonary bypass** WU Xiao-yun, KUANG Feng-wu, LUO Zi-guo, DENG Bing, WU Chun, WANG Xing-yong. PICU of Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>-γ (cPLA<sub>2</sub>-γ) activation and alteration of myocardial ultrastructure during cardiopulmonary bypass (CPB) in the operation of ventricular septal defect. **Methods** Myocardial tissues from the right atria of 12 patients undergone ventricular septal defect were collected before and after CPB, cPLA<sub>2</sub>-γ gene expression was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and analysis was carried out using gel image analysis software. Meanwhile, alteration of myocardial ultrastructure was observed under electron microscopy. **Results** cPLA<sub>2</sub>-γ gene expressions were statistically significant between two groups ( $P < 0.05$ ), and they were higher in patients after CPB than those prior to CPB. The alteration of myocardial ultrastructure after CPB included hypertrophy of nucleus, swelling under plasma membrane, chromatin margination and dilatation of smooth endocytotlasmic reticulum (SER) in myocardial cell, structures degeneration, hyperplasia of mitochondria as well as swelling, and myocardial fibre dissolve, etc. **Conclusion** Increased cPLA<sub>2</sub>-γ gene expression in myocardial tissue after CPB might play an important role in damage of membrane integrality, energy decompensation and myocardial contraction dysfunction.

**【Key words】** myocardial cell; cardiopulmonary bypass; cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>; ultrastructure

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)是实施心内直视术的先决条件,但 CPB 时众多炎性介质失控性释放触发全身炎症反应综合征(SIRS)是导致多器官功能不全甚至多器官功能衰竭(MOF)等术后并发症的主要病理生理基础。有学者提出 CPB 时体内磷脂酶(phospholipase, PL)的激活是机体由可逆性损害向不可逆发展的关键因素<sup>[1]</sup>。本研究中通过测定先天性心脏病术后心肌组织胞浆型磷脂酶 A<sub>2</sub>-γ 亚型(cPLA<sub>2</sub>-γ)基因表达水平的变化,以及高倍透射电镜观察心肌细胞超微结构改变的方法,探讨 cPLA<sub>2</sub>-γ 激活与心肌组织损伤的相互关系。

基金项目:重庆市科委科研基金资助项目(20015448)

作者单位:400014 重庆医科大学儿童医院 PICU

作者简介:吴晓云(1966-),女(汉族),重庆市人,博士研究生,副主任医师。

### 1 资料与方法

**1.1 病例及标本来源:**2003 年 9 月—2004 年 2 月本院住院室间隔缺损手术患儿 12 例,其中男 7 例,女 5 例;年龄 4 个月~9 岁,体重 4.5~25.0 kg,室间隔缺损直径 6~22 mm。所有患儿均为术前彩色多普勒超声心动图确诊并获得手术证实的典型病例。手术方式为低温 CPB 下室间隔缺损修补术,CPB 时间为 48~94 min,主动脉阻断时间为 27~62 min,预充液配制条件相同。CPB 前后分别于右心耳处取心肌组织约 200 mg,立即均分为 2 份,其中 1 份于 -70℃ 深低温保存备用,另 1 份予体积分数为 4% 的戊二醛固定,0℃ 冰箱保存备用。

**1.2 试剂与仪器:** Tripure RNA 提取剂、Oligod T<sub>18</sub>、RNA 酶、dNTP、Taq 酶、二乙基焦磷酸胺

(DEPC)水、莫洛尼鼠白血病病毒(M-MLV)逆转录酶、Marker puc 19 DNA/Mspl 等均购自美国 Promega 公司。CF15 高速冷冻离心机、H-600 透射电镜(Hitachi, 日本), PT-2000 聚合酶链反应(PCR)扩增仪(M J& PE, 美国), UV-200 紫外分光光度计(Shimadzu, 日本), Stockertsc 体外循环机(Germany)。

**1.3 引物设计及合成:** cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  及  $\beta$ -actin 引物序列设计、合成自上海生物工程有限公司, 引物序列如下: ① cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  基因扩增产物片段为 312 bp, 上游引物为 5'-TGTTGGATGCCGTCAC-GTA-3', 下游引物为 5'-TGGCTGCAAATATTGGGTA-3'。② 内参  $\beta$ -actin 基因扩增产物片段为 218 bp, 上游引物为 5'-CGCACCCTGGCATTGTCAT-3', 下游引物为 5'-TTCTCCTTGATGTCACGCAC-3'。

**1.4 心肌组织总 RNA 的提取:** 取备用心肌组织约 100 mg, 加入 1 ml RNA 提取液 Tripure, 碾磨匀浆, 匀浆液倒入 1.5 ml 离心管中, 按 200  $\mu$ l/ml 的 Tripure 加入氯仿, 室温下放置 15 min 后, 再于 4  $^{\circ}$ C 下以 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层水相; 按 0.5 ml/ml 的 Tripure 加入异丙醇混匀, -20  $^{\circ}$ C 放置 2~3 h; 离心 10 min, 弃上清, RNA 沉于管底; 按 1 ml/ml 的 Tripure 加入体积分数为 75% 的乙醇, 悬浮沉淀, 离心 5 min, 弃上清, 总 RNA 提取完成, 产物于 -20  $^{\circ}$ C 保存。

**1.5 cDNA 制备:** RNA 于 4  $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 55  $^{\circ}$ C 将离心管中白色 RNA 烤至无色透明; 加入相应体积的 DEPC 溶解 RNA。逆转录反应体系总体积为 20.5  $\mu$ l, 先在各管中加 DEPC 4  $\mu$ l、OligdT18 1  $\mu$ l、RNA 5  $\mu$ l, 加适量甘油, 65  $^{\circ}$ C 孵育 5~10 min; 再在各管中分别加入反应体系中剩余的成分 DEPC 3.3  $\mu$ l、5 $\times$  碳酸氢盐缓冲液(buffer) 4  $\mu$ l、4 $\times$ dNTP 2  $\mu$ l、RNA 酶抑制剂 0.2  $\mu$ l、M-MLV 反转录酶 1  $\mu$ l, 置 42  $^{\circ}$ C 反应 1 h, 完成 cDNA 制备, 产物于 -20  $^{\circ}$ C 保存。

**1.6 PCR 扩增:** 目标基因 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  及内参照  $\beta$ -actin 反应体系, 总体积均为 25.2  $\mu$ l, DEPC 15  $\mu$ l、10 $\times$ buffer 2.5  $\mu$ l、MgCl<sub>2</sub> 22.0  $\mu$ l、4 $\times$ dNTP 0.5  $\mu$ l、Tag 酶 0.2  $\mu$ l、cDNA 4  $\mu$ l、cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  (或  $\beta$ -actin) 上、下游引物各 0.5  $\mu$ l, 各管中加入上述反应体系, PCR 扩增仪扩增。反应参数为 94  $^{\circ}$ C 孵育 4 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 40 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共循环 35 次, 最后延伸 72  $^{\circ}$ C、7 min。

**1.7 电泳及条带分析:** 制备凝胶, 将扩增产物及参

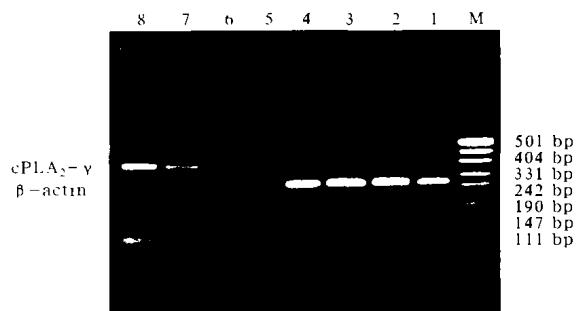
照标准(Marker)各 10  $\mu$ l 与 5  $\mu$ l 上样 buffer 混匀、点样, 120 mV 电泳至条带跑至凝胶 2/3 处。放入溴化乙锭(EB)染缸中染色 15 min, 紫外光下观察, 凝胶图像分析系统扫描扩增产物电泳条带的密度, 计算 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  的相对量以及 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  电泳条带密度/ $\beta$ -actin 电泳条带密度。

**1.8 电镜观察:** 取备用的心肌组织, 经体积分数为 1% 的锇酸双固定, 乙醇丙酮梯度脱水, 环氧树脂 618 包埋, 超薄切片, 醋酸双氢铀-枸橼酸铅(铀-铅)染色, 采用 H-600 透射电镜下观察心肌组织的超微结构。

**1.9 统计学方法:** 计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 采用 *t* 检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  mRNA 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)电泳结果(图 1):** 扩增产物的片段大小分别为 218 bp、312 bp, 产物条带清晰, 可见手术后 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  表达有显著增强。



M: Marker; 1: 标本 1 术前  $\beta$ -actin 条带; 2: 标本 2 术前  $\beta$ -actin 条带; 3: 标本 1 术后  $\beta$ -actin 条带; 4: 标本 2 术后  $\beta$ -actin 条带; 5: 标本 1 术前 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  条带; 6: 标本 2 术前 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  条带; 7: 标本 1 术后 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  条带; 8: 标本 2 术后 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  条带

图 1 CPB 前后心肌 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  和  $\beta$ -actin 基因扩增电泳结果

Figure 1 Electrophoretic results of cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  and  $\beta$ -actin gene RT-PCR from cDNA of human myocardial cells before and after CPB

**2.2 心肌组织 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  基因表达(图 2):** 对 12 例 CPB 前后心肌组织 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  基因表达强度进行半定量分析, 结果显示, CPB 前心肌 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  基因表达强度( $3.45\pm 1.97$ )与 CPB 后( $12.29\pm 3.01$ )比较差异有显著性( $P<0.05$ )。

**2.3 CPB 后心肌组织超微结构的改变(图 3~6):** 透射电镜观察到 CPB 后心肌组织超微结构的改变包括心肌细胞肌丝灶性溶解, Z 线断裂, Z 线物质堆积, 形成异常收缩带; 质膜下水分集聚及质膜破裂, 少数膜性细胞器退变, 可见髓样结构形成; 线粒体代偿性增生, 并伴有中到重度内室肿胀, 偶见膜破裂。

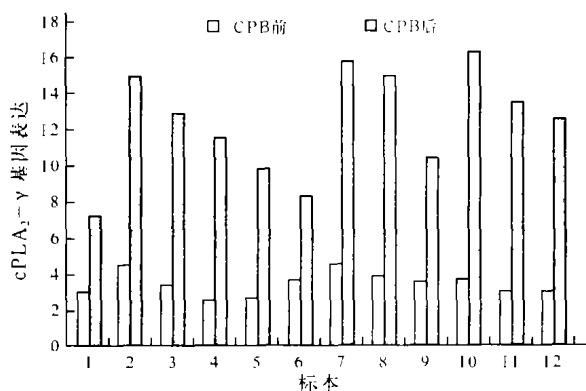


图 2 CPB 前后 cPLA<sub>2</sub>-γ 基因表达的变化

Figure 2 Changes of cPLA<sub>2</sub>-γ gene expression before and after CPB

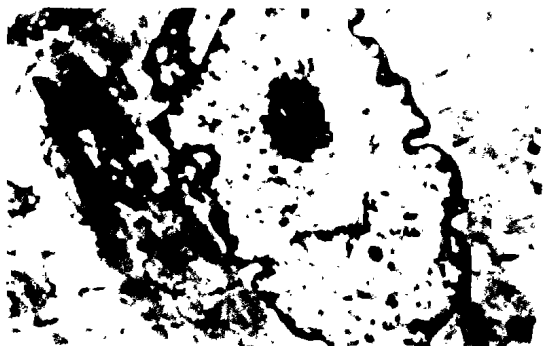


图 3 心肌细胞核肥大、质膜下水肿、髓样结构形成(铀-铅, × 8 000)

Figure 3 Hypertrophy of nucleus, swelling under plasma membrane, myelin figure in myocardial cell (uranyl acetate - lead citrate, × 8 000)



图 4 心肌细胞线粒体增生、内室肿胀(铀-铅, × 10 000)

Figure 4 Hyperplasia of mitochondria and swelling in myocardial cell (uranyl acetate - lead citrate, × 10 000)

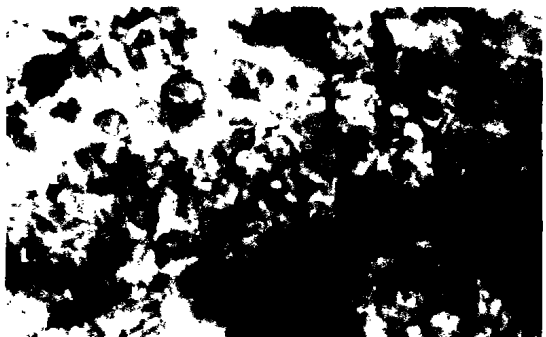


图 5 Z 线物质堆积形成异常收缩带(铀-铅, × 12 000)

Figure 5 Accumulate of Z line, abnormal contraction - band (uranyl acetate - lead citrate, × 12 000)

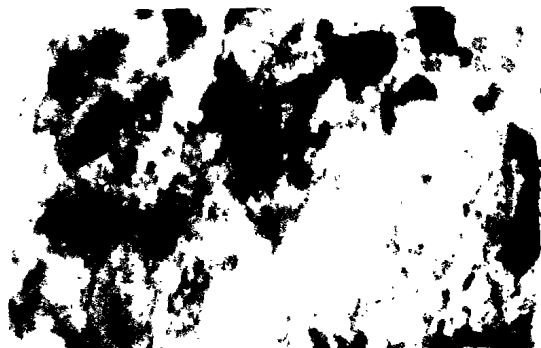


图 6 心肌细胞核异染色质边集、肌浆网扩张(铀-铅, × 12 000)

Figure 6 Chromatin margination and dilatation of SER in myocardial cell (uranyl acetate - lead citrate, × 12 000)

### 3 讨论

CPB 的临床应用开辟了心脏手术新纪元,但其非生理状态的血液循环、内毒素释放及缺血-再灌注损伤等因素可诱导补体活化、黏附分子表达、中性粒细胞激活及细胞因子释放,并进一步激活 PL<sup>[2]</sup>。PL 包括一系列参与磷脂代谢的酶家族,它存在于几乎所有有核细胞中,根据其对于磷脂水解部位的不同将其分为 PLA<sub>1</sub>、PLA<sub>2</sub>、PLC 及 PLD。PLA<sub>2</sub> 能催化膜磷脂甘油分子上的二位酰基水解生成一系列脂类炎症介质,是机体形成炎症反应的限速酶<sup>[3]</sup>。依据其存在部位、氨基酸序列及理化特性的差异又将其分为分泌型(sPLA<sub>2</sub>)、胞浆型(cPLA<sub>2</sub>)及非钙离子依赖型(gPLA<sub>2</sub>)。其中 cPLA<sub>2</sub> 是惟一能够选择性地催化膜磷脂甘油分子上的二位酰基水解生成血栓素 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)、前列腺素、血小板激活因子及白三烯等强效脂类炎症介质的酶,在触发瀑布式炎症级联反应及膜磷脂降解中起了重要作用。磷脂不仅是构成细胞膜和细胞器膜的主要物质基础,在调节细胞信号转导和离子泵的功能中也起着至关重要的作用,其代谢的失衡可引起膜结构的损伤和功能紊乱,使细胞变性、坏死,最终导致器官功能障碍甚至衰竭。

cPLA<sub>2</sub> 存在于胞浆中,含量相对稳定,不能分泌到细胞外,病理条件下通过 sPLA<sub>2</sub> 胞吐作用等信号途径的调节而激活。由于分子质量大小及所在染色体基因位点不同,cPLA<sub>2</sub> 又分为 cPLA<sub>2</sub>-α(85 ku)、cPLA<sub>2</sub>-β(114 ku)和 cPLA<sub>2</sub>-γ(61 ku)3 种亚型,其中 cPLA<sub>2</sub>-γ 在心肌组织中含量最高<sup>[4]</sup>。

本研究显示,CPB 后心肌组织中 cPLA<sub>2</sub>-γ 的基因表达水平有明显增强,同时通过透射电镜观察到心肌组织的超微结构改变,包括细胞膜破坏出现髓样结构,线粒体增生、肿胀、溶解,肌丝溶解断裂。提示 cPLA<sub>2</sub>-γ 激活可能在心肌细胞及细胞器膜完整性破坏,能量代谢及收缩功能障碍中扮演了重要

的角色,而糖皮质激素及蛋白酶抑制剂并不能阻断 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  的激活。这些因素最终可引起心肌水肿、顺应性降低,心功能减退,心肌收缩力、血压及心排量下降以及出现心律失常等。研究表明,众多炎症因子的失控性释放是 CPB 后引起器官功能不全的主要诱因,但其相互间的作用机制错综复杂,核心机制仍不明确,因此,糖皮质激素作为一种强有力的抗炎药物被临床广泛应用。Checchia 等<sup>[5]</sup>证实 CPB 前使用激素可抑制炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的释放,显著降低心肌损伤标志物心肌肌钙蛋白 I(cTnI)的浓度,具有心肌保护的作用。蛋白酶抑制剂(如抑肽酶)由于能够抑制纤维蛋白降解,减少炎症因子及激肽酶释放,削弱炎症反应,保护脏器功能,而在心脏外科手术中广泛应用<sup>[6,7]</sup>。此外,磷酸二酯酶抑制剂可明显减少术后低心排血量的发生<sup>[8]</sup>,亦有研究显示缺血预适应能减少氧自由基的产生和钙超载而起到保护心肌的作用<sup>[9]</sup>。虽然基础及临床进行了大量的研究和有益的尝试,但目前仍缺乏十分有效的防治手段。本组所有患儿 CPB 前预充液中均应用了大剂量的地塞米松及抑肽酶,但仍表现出广泛的心肌损害。本研究提示 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  激活可能在心肌细胞及细胞器膜完整性破坏、能量代谢及收缩功能障碍中扮演了重要的角色,而糖皮质激素及蛋白酶抑制剂并不能阻断 cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$  的激活。我们认为,cPLA<sub>2</sub> 能将损伤因素、炎症因子及器官功能障碍有机地联系起来,是该体系中至为重要的部分,为进一步开发及应用器官特

异性 PLA<sub>2</sub> 抑制剂提供了理论依据,PLA<sub>2</sub> 抑制剂的应用有望成为抑制 CPB 后炎症反应和器官功能障碍强有力的武器,以更有效地减少近期及远期并发症,提高手术成功率和改善术者的生活质量。

#### 参考文献:

- 1 张淑文,王超,阴赫宏,等.多器官功能障碍综合征诊断标准与病情严重度评分系统的多中心临床研究[J].中国危重病急救医学,2004,16:328-332.
- 2 Holmes J H,Connolly N C,Paul D L,et al. Magnitude of the inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its relation to adverse clinical outcomes[J]. Inflamm Res,2002,51:579-586.
- 3 Brown W J,Chambers K,Doody A. Phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) enzymes in membrane trafficking, mediators of membrane shape and function[J]. Traffic,2003,4:214-221.
- 4 Kathryn W,Song Chuanzheng,Ronald W,et al. A novel calcium independent phospholipase A<sub>2</sub>,cPLA<sub>2</sub>- $\gamma$ ,that is prenylated and contains homology to cPLA<sub>2</sub>[J]. J Biol Chem,1998,273:21926-21932.
- 5 Checchia A,Backer L,Bronick A,et al. Dexamethasone reduces postoperative troponin levels in children undergoing cardiopulmonary bypass[J]. Crit Care Med,2003,31:1742-1745.
- 6 Landis R C,Asimakopoulos G,Poullis M,et al. The antithrombotic and antiinflammatory mechanisms of action of aprotinin[J]. Ann Thorac Surg,2001,72:2169-2175.
- 7 王刚,陈婷婷,高长青.乌司他丁对创伤失血性休克兔肺损伤的保护作用[J].中国危重病急救医学,2005,17:36-38.
- 8 Timothy M,Andrew M,Thomas J,et al. Efficacy and safety of milrinone in preventing low cardiac output syndrome in infants and children after corrective surgery for congenital heart disease[J]. Circulation,2003,107:996-1002.
- 9 何斌,王志农,曾志勇,等.缺血预适应对再灌注性心肌超微结构损伤和细胞凋亡的保护作用[J].第二军医大学学报,2004,25:374-378.

(收稿日期:2005-01-24 修回日期:2005-03-15)

(本文编辑:李银平)

#### • 基层园地 •

### 失血性休克患者套管针静脉通路的快速建立法

孙芹 刘伟 商显英

【关键词】 休克,失血性; 静脉输液; 套管针

失血性休克患者由于失血过多,血管充盈度极差,皮肤湿冷无弹性,用套管针穿刺有一定难度。我们在临床上采用二次穿刺法,取得了比较满意的效果,成功 103 例,成功率较高,且简便易行,介绍如下。

作者单位:277606 山东省枣庄矿业集团滕南医院

作者简介:孙芹(1976-),女(汉族),山东省微山县人,护师。

采用常规方法用 5.5 号头皮针穿刺表浅静脉成功后不松开止血带,打开调节器让液体输入 10 ml 左右,从穿刺点到止血带间的浅静脉充盈,在此段静脉上常规用套管针穿刺。因为失血性休克的患者肘正中静脉压降低,所以二次穿刺选择的浅静脉压也降低,在不松开止血带的情况下亦可输入少量的液体,所以给二次穿刺创造了条件。在二次穿刺过程中,要求止血带结扎的距离距穿刺点 20 cm 以上,否则套管针穿刺时消毒

面积不够。在行二次穿刺时首选贵要静脉,因为贵要静脉起始于手背静脉网,经桡侧入肱静脉,易选择体位和穿刺部位。如果受外伤限制,可选择大隐静脉或头静脉,虽然经过二次穿刺才能建立套管针静脉通路,但避免了在选择静脉时耽误时间,为急救成功创造了条件。

(收稿日期:2004-11-16)

修回日期:2005-06-29)

(本文编辑:李银平)