

• 综述 •

细胞凋亡与心肺复苏后心肌功能障碍的研究进展

张明月(综述) 李春盛(审校)

【关键词】 细胞凋亡; 心肺复苏; 心肌功能障碍; 心肌顿抑; 缺血/再灌注损伤

心搏骤停因其具有严重的社会经济影响,一直以来是医学界的研究热点。随着复苏理论与技术的发展提高,对此类患者实施心肺复苏术(CPR)和高级生命支持后,其中有 20%~40% 的患者可以达到自主循环恢复(ROSC),但仍有高达 50%~70% 的 ROSC 患者在住院期间死亡^[1-2]。经常令临床医师们感到失望的是,据统计,院内或院外成功复苏患者的最终生存率仅 30% 左右^[3-5]。上述情况产生的主要原因是心搏骤停患者易罹患心搏骤停综合征中的两大特征性损害,即 CPR 后心肌功能障碍及 CPR 后脑损伤^[6],其中,CPR 后心肌功能障碍因其可诱发多器官功能障碍综合征(MODS)和导致复苏后早期高病死率而备受关注。自 1994 年 Gottlieb 等^[7]发现缺血/再灌注(I/R)兔心肌细胞存在凋亡以来,人们通过一系列研究证实了心肌细胞损伤过程中存在另一个更具治疗潜力的机制——细胞凋亡^[8-10],引发这一研究热潮的原因在于:细胞凋亡作为一种高级调控的心肌细胞死亡途径,可通过抑制其发生发展,达到预防 CPR 后不可逆性心肌细胞损伤的目的。近年来,通过细胞水平的进一步研究认为,心肌细胞的死亡方式主要有细胞坏死、细胞凋亡、细胞自噬 3 种形式^[11]。细胞凋亡因其特殊的基因调控性和路径稳定性,为心肌功能障碍发生机制的探讨和临床症状的治疗提供了崭新的研究前景和应用靶点。本文中以近年来国内外对 CPR 后心肌功能障碍和心肌细胞凋亡研究为基础,通过探讨二者之间的机制联系以及理论争议,期待为更好地认识和治疗 CPR 后心肌功能障碍提供参考和帮助。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.10.022

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972863);首都医学发展科研基金资助项目(2005-1006)

作者单位:100020 首都医科大学附属北京朝阳医院急诊科

通信作者:李春盛,Email:lcscyy@sohu.com

1 CPR 后心肌功能障碍的病理生理机制——心肌顿抑与 I/R 损伤

Laurent 等^[12]研究显示,对于院前心搏骤停存活患者,血流动力学不稳定性主要表现在入院给予血管活性药物后的 4~7 h 内,其特征性表现形式为低心排血量(CO)及正常或较低的循环灌注压。而在心搏骤停成功复苏 24 h 后,在保证持续给予足够剂量血管活性药物的前提下,患者的 CO 会迅速升高,72 h 左右几乎均能恢复至正常水平。这种血流动力学功能障碍的暂时性及对血管活性药物的良好反应性均提示,心搏骤停后心肌功能障碍主要表现为心肌顿抑现象,而非持续性的损伤或梗死。此外,Ruiz-Bailén 等^[13]进行的描述性研究显示,CPR 后 ROSC 的患者确实存在心肌顿抑现象,且部分患者的左室射血分数(LVEF)直到 CPR 后 3~6 个月才恢复至正常水平。心肌顿抑又称为缺血后心肌功能障碍,是指尽管冠状动脉(冠脉)的血流量已经恢复正常或接近正常以及心肌未受到器质性损伤,在积极再灌注治疗后仍持续存在的心肌机械性功能障碍^[14],其实质是 I/R 后亚致死性、可逆性心肌损伤的延迟恢复过程。国内外近年来的研究表明,心肌顿抑与氧自由基增多、钙超载、能量代谢障碍及微血管痉挛等机制有关。对于心肌顿抑的研究过去主要集中在心脏介入、溶栓治疗及心脏移植等领域,而关于 CPR 成功后心肌顿抑现象的发病机制国内外仍鲜有报道,有待于进一步开展研究和探讨。除心肌顿抑研究外,由于早期预测心肌病理变化的可靠方法有限,以及新干预法的确切性未能完全阐明,对心搏骤停复苏后状态现在仍存在很大的认识缺陷,故对于 CPR 心肌功能障碍机制的研究之路仍然任重道远^[15]。

2 CPR 后心肌是否存在细胞凋亡

探索心脏疾病的病理生理机制必然离不开对心肌细胞死亡方式的探讨,心肌细胞作为一类终末分化细胞,所受损

伤若超过其代偿范围便会产生不同程度的永久性死亡,对机体的循环代谢功能产生恶性影响,严重时甚至迅速危及患者生命。如前所述,心肌细胞的死亡目前认为存在 3 种方式,多年来,细胞坏死被视作心肌损伤的主要原因,但随着 20 世纪 90 年代中后期对心肌损伤机制的深入研究,已证明在鼠、兔及人的心脏 I/R 损伤中存在心肌细胞大量凋亡^[16-18],并且有研究显示,凋亡与坏死相比,对心肌梗死面积的决定作用可能更大^[19]。与其他心血管系统疾病的研究相比,CPR 后心肌功能障碍概念的提出相对较晚,国内外对于其细胞水平病理生理机制的研究均刚刚起步,Hammel 等^[20]于 2003 年通过新生羊羔的心搏骤停-CPR 模型,用原位末端标记技术(TUNEL 技术)等对凋亡相关基因和蛋白进行检测后证实,动物在施行 CPR 6 h 后,心肌细胞通过触发促进凋亡和抑制凋亡的调控机制启动了凋亡。李修江等^[21]通过小鼠窒息合并冰氯化钾停跳液心搏骤停-CPR 模型,在透射电镜下观察证实了心肌细胞凋亡的存在;江慧琳等^[22]运用犬的体外电击心室纤颤(室颤)-CPR 模型,通过 TUNEL 技术也间接发现了心肌细胞的凋亡现象。但有关实验均系中小型动物,目前尚无临床患者 CPR 后心肌细胞出现凋亡的相关报道。

3 细胞凋亡是否参与 CPR 后心肌功能障碍形成

3.1 支持证据:①时间同步性:在一项国外的心搏骤停后患者冠脉造影的病例分析研究中观察到,CPR 后心肌功能障碍的主要临床表现包括持续约 6 h 的 CO 下降、低血压及心律失常(主要为心动过速)^[12]。而在心肌 I/R 损伤的相关研究中发现,心肌再灌注治疗后细胞的凋亡过程主要经历再灌注早期长约数小时的起始阶段、中性粒细胞浸润的中期阶段、与心室重塑和心力衰竭相关且长达数周或数月的延迟阶段^[23]。可见心肌功能障碍与细胞凋亡的发生存在一定的时间同步性,凋亡很可能参与心肌细胞

的损伤进展。②组间差异性:Hammel等^[20]在新生羊羔复苏模型实验中分别对复苏组与非手术组动物的心肌细胞核采用 TUNEL 技术进行标记,得出两组的差异具有统计学意义($P=0.007$)。国内对大鼠及犬的 CPR 实验也有类似结果的报道^[21-22]。以上结果均进一步证明了 CPR 过程中心肌细胞的确存在凋亡,且凋亡方式可能参与了心肌功能障碍的发病机制。

3.2 质疑证据:为了明确 CPR 心肌 I/R 后是否存在细胞凋亡以及凋亡所起的作用,Song 等^[24]近期运用大鼠心搏骤停-CPR 模型进行了相关实验,结果显示,通过 TUNEL 技术标记的复苏组大鼠心肌细胞凋亡率与假手术组相比差异无统计学意义($P>0.05$),甚至出现了下列情况:尽管复苏组大鼠的心肌功能(通过射血分数、左室舒张压力等指标评价)较单纯前降支冠脉夹闭组大鼠明显恶化($P<0.01$),但前者的细胞凋亡率较后者明显降低($P<0.05$)。这一结果挑战了前人的研究结论,使 CPR 后心肌是否存在细胞凋亡这一问题变得更为复杂。但是笔者认为,由于受实验动物种类、复苏模型以及一系列实验条件的综合影响,出现上述争议是正常且有价值的,为了对该问题有更深入的认识,只有不断完善实验流程、尽量杜绝混杂因素的影响才可期待早日达到研究目的。

4 CPR 后心肌细胞凋亡涉及的通路

目前认为,心肌细胞的凋亡通路主要包括死亡受体通路及线粒体通路两条^[25]。死亡受体通路又称外部通路,主要包括两类死亡受体:死亡受体 FasL 等接受它们的同源配体结合后,与 Fas 相关的死亡区域蛋白(FADD)反应;肿瘤坏死因子(TNF)受体 1(TNFR1)与 TNFR 相关的死亡区域蛋白(TRADD)发生反应。上述两类信号通路在 FADD 与 TRADD 层面相遇,分别与促凋亡蛋白酶,即天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 前体(procaspase-8)结合形成死亡诱导信号复合体(DISC),此复合体的 procaspase-8 形成二聚体被激活后随即分离,将 caspase-3 激活后启动凋亡发生^[26],该通路中,caspase-3 的激活是启动凋亡的关键步骤。线粒体通路又称内部通路,其信号源与外部通路有所不同,主要包括细胞因子、毒素、辐射、缺氧、氧化应激、I/R 损伤以及 DNA 损伤

等。这些信号通过 Bcl-2 同源结构域 3(BH3)与 Bax 蛋白使线粒体膜间的细胞色素 C 释放至胞质中,与凋亡蛋白酶激活因子 1(Apaf-1)及脱氧三磷酸腺苷(dATP)结合后激活 caspase-9,继而亦通过激活下游的 caspase-3 启动凋亡发生^[27],该通路中,细胞色素 C 的释放是启动凋亡的关键步骤。两条凋亡通路的共同通路为下游 caspase-3 的激活,国内外对于 caspase-3 在心肌细胞凋亡中作用的研究较上游通路中的各类蛋白更为集中。Radhakrishnan 等^[28]在近期研究中运用小鼠室颤心搏骤停-CPR 模型,证实了发生左室舒缩功能障碍的同时伴随着心肌细胞胞质内细胞色素 C 水平增高,procaspase-9 及解离后片段减少,以及 caspase-3 片段增加,由此可以推测,在 CPR 后心肌功能障碍的发病机制中,细胞凋亡可能通过线粒体通路参与了一部分疾病进展。而另一条凋亡通路即死亡受体通路有无参与心肌功能障碍的发生,仍需开展相关实验进一步探讨。

5 CPR 后心肌细胞凋亡的治疗策略

目前国内外对 CPR 后心肌细胞凋亡机制的研究与治疗方案的探索几乎是同步的,其主要治疗措施包括特异性及非特异性两大类。

5.1 特异性治疗:抑制凋亡的特异性手段包括针对已知凋亡通路的某一位点,运用药物特异性阻断某类受体与配体的结合或某类蛋白的合成。目前,此类药物尚处于基础研究阶段,国外报道在 1 只成年鼠心室肌细胞的体外培养实验中发现,caspase-8 活性抑制剂能破坏 TNF- α 对线粒体释放细胞色素 C 的过程,从而抑制凋亡的发生^[29]。但近期报告的动物实验结果却让人遗憾,在 Radhakrishnan 等^[28]进行的另一个实验单元中,室颤发生前预防性给小鼠 caspase-3 抑制剂(Z 型天冬氨酸-谷氨酸-缬氨酸-天冬氨酸氨酯),除了使 caspase-3 的活性有所降低外,并没有使心肌功能障碍的状况得到改善。可见,特异性抑制凋亡发生发展的疗法还有待进一步研究,其疗效也需要更多的实验加以验证。

5.2 非特异性治疗:尽管在特异性凋亡抑制剂的研究方面仍存在诸多局限性,但国内外一些动物实验发现,下列药物对于抑制 CPR 后心肌细胞凋亡有一定疗效;Oka 等^[30]通过幼兔心搏骤停-CPR 模型发现,在动物 ROSC 6 h 后给予环

孢素 A 进行预处理,与对照组相比,模型心肌细胞线粒体内 Bax 移位、细胞色素 C 释放程度以及 TUNEL 技术标记的凋亡细胞数均较少(均 $P<0.05$),表明环孢素 A 对 CPR 后凋亡相关性心肌细胞线粒体损伤具有一定的保护作用。李修江等^[21]在另一研究中发现,生长激素可通过促进大鼠 CPR 后心肌细胞 Bcl-2 的表达抑制凋亡进展,可能对 CPR 后心肌具有保护作用。江慧琳等^[22]的实验结果显示,纳洛酮可降低犬 CPR 后心肌细胞的凋亡指数,其除了具有改善心肌 I/R 损伤的作用外,可能也有抑制心肌细胞早期凋亡的作用。且有研究称,对于经过急性 I/R 小鼠的心肌细胞,纳洛酮预处理可以抑制 TNF- α 的产生,并通过上调 Bcl-2 蛋白表达,抑制心肌细胞的凋亡,这从病理生理学角度也证明了纳洛酮对心肌具有保护作用^[31]。此外,中药对心肌损伤保护作用的研究目前方兴未艾,其中对参附注射液的研究相对集中在减轻糖尿病大鼠心肌 I/R 损伤^[32],改善组织灌注与氧代谢能力^[33]以及减轻窒息型大鼠 CPR 后心肌损伤方面的作用均有报道^[34]。参附注射液是由红参、附子的提取物制成的传统中药复方制剂,具有大补元气、回阳固脱等功效,已有研究证明其可减轻 I/R 细胞线粒体肿胀及心肌缺血程度,以降低组织 I/R 损伤程度,缩小心肌缺血范围^[35-36]。近年来对参附注射液在心肌细胞凋亡方面的研究也有一些发现。Wang 等^[37]在体外分离幼鼠心肌细胞实验中发现,与缺氧/复氧组相比,参附治疗组细胞 caspase-3 的活性降低且伴有 Bcl-2 蛋白表达增多,说明参附注射液可能通过上述分子机制对心肌细胞的凋亡产生抑制作用。石正蒙等^[38]在此基础上进行了实验技术改进,通过制备大鼠心搏骤停-CPR 模型亦发现,参附注射液可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达对心肌细胞凋亡的发生进行抑制。且李章平等^[34]研究表明,大剂量连续或多次应用参附注射液对减轻 CPR 后心肌损伤可能更加有利。除参附注射液外,近年来对抑制心肌细胞凋亡作用的研究还涉及到黄芪、当归等中药,也得到了有一些有价值的发现^[39-40]。但笔者认为,上述实验因存在体外环境与小型动物和人体生理之间的差异性,均具有一定的局限性,如果要更进一步了解传统中药对 CPR 后心肌功能

障碍的治疗潜力,需要更多的研究。

参考文献

[1] Nolan JP, Laver SR, Welch CA, et al. Outcome following admission to UK intensive care units after cardiac arrest; a secondary analysis of the ICNARC Case Mix Programme Database. *Anaesthesia*, 2007, 62: 1207-1216.

[2] Carr BG, Kahn JM, Merchant RM, et al. Inter-hospital variability in post-cardiac arrest mortality. *Resuscitation*, 2009, 80: 30-34.

[3] Nichol G, Thomas E, Callaway CW, et al. Regional variation in out-of-hospital cardiac arrest incidence and outcome. *JAMA*, 2008, 300: 1423-1431.

[4] Sandroni C, Nolan J, Cavallaro F, et al. In-hospital cardiac arrest: incidence, prognosis and possible measures to improve survival. *Intensive Care Med*, 2007, 33: 237-245.

[5] Nadkarni VM, Larkin GL, Peberdy MA, et al. First documented rhythm and clinical outcome from in-hospital cardiac arrest among children and adults. *JAMA*, 2006, 295: 50-57.

[6] Laver S, Farrow C, Turner D, et al. Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. *Intensive Care Med*, 2004, 30: 2126-2128.

[7] Gottlieb RA, Burlison KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 1994, 94: 1621-1628.

[8] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*, 1997, 336: 1131-1141.

[9] Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest*, 1999, 29: 380-386.

[10] Guerra S, Leri A, Wang X, et al. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res*, 1999, 85: 856-866.

[11] Dorn GW 2nd, Diwan A. The rationale for cardiomyocyte resuscitation in myocardial salvage. *J Mol Med*, 2008, 86: 1085-1095.

[12] Laurent I, Monchi M, Chiche JD, et al. Reversible myocardial dysfunction in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40: 2110-2116.

[13] Ruiz-Bailén M, Aguayo de Hoyos E, Ruiz-Navarro S, et al. Reversible

myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*, 2005, 66: 175-181.

[14] Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation*, 1990, 82: 723-738.

[15] 沈洪. 心搏骤停复苏后挑战的新对决. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 321-322.

[16] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 1996, 79: 949-956.

[17] Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*, 1997, 95: 320-323.

[18] Olivetti G, Quaini F, Sala R, et al. Acute myocardial infarction in human is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28: 2005-2016.

[19] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*, 1996, 74: 86-107.

[20] Hammel JM, Caldaroni CA, Van Natta TL, et al. Myocardial apoptosis after cardioplegic arrest in the neonatal lamb. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 125: 1268-1275.

[21] 李修江, 杨兴易, 赵良, 等. 生长激素对心肺复苏大鼠心肌损伤的保护作用. *中国急救医学*, 2003, 23: 829-831.

[22] 江蕙琳, 李燕屏, 陈晓辉, 等. 犬心肺复苏后心肌凋亡的变化及纳洛酮的干预作用. *岭南急诊医学杂志*, 2005, 10: 81-82.

[23] Borutaite V, Brown GC. Mitochondria in apoptosis of ischemic heart. *FEBS Lett*, 2003, 541: 1-5.

[24] Song F, Shan Y, Cappello F, et al. Apoptosis is not involved in the mechanism of myocardial dysfunction after resuscitation in a rat model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med*, 2010, 38: 1329-1334.

[25] Scarabelli TM, Knight R, Stephanou A, et al. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium. *Curr Probl Cardiol*, 2006, 31: 181-264.

[26] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death; critical control points. *Cell*, 2004, 116: 205-219.

[27] Crow MT, Mani K, Nam YJ, et al. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*,

2004, 95: 957-970.

[28] Radhakrishnan J, Ayoub IM, Gazmuri RJ. Activation of caspase-3 may not contribute to postresuscitation myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296: H1164-1174.

[29] Zhu J, Liu M, Kennedy RH, et al. TNF-alpha-induced impairment of mitochondrial integrity and apoptosis mediated by caspase-8 in adult ventricular myocytes. *Cytokine*, 2006, 34: 96-105.

[30] Oka N, Wang L, Mi W, et al. Inhibition of mitochondrial remodeling by cyclosporine A preserves myocardial performance in a neonatal rabbit model of cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 135: 585-593.

[31] 汤晓琴, 赵建洪, 张正义, 等. 纳洛酮对急性缺血/再灌注心肌细胞 Bcl-2 蛋白和肿瘤坏死因子- α 表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 430-432.

[32] 肖业达, 夏中元, 江梦. 参附注射液对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注期间磷脂酰肌醇 3 激酶表达的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16: 69-71.

[33] 殷文朋, 李春盛. 参附注射液对心源性休克大鼠血流动力学及氧代谢的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15: 20-23.

[34] 李章平, 陈寿权, 章杰, 等. 不同剂量参附注射液对窒息型大鼠心肺复苏后心肌保护作用的研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14: 162-165.

[35] 万彩虹, 董培青, 杨球, 等. 参附注射液对心脏直视术中心肌缺血/再灌注损伤的保护作用. *中华胸心血管外科杂志*, 2008, 24: 389-392.

[36] 尤华彦. 参附注射液对急诊 PCI 术后患者梗死面积及心功能的影响. *中国中医急症*, 2009, 18: 1441-1442.

[37] Wang YL, Wang CY, Zhang BJ, et al. Shenfu injection suppresses apoptosis by regulation of Bcl-2 and caspase-3 during hypoxia/reoxygenation in neonatal rat cardiomyocytes in vitro. *Mol Biol Rep*, 2009, 36: 365-370.

[38] 石正蒙, 顾桂国, 吴国楨, 等. 参附注射液对心肺复苏后大鼠心肌细胞保护作用的研究. *临床急诊杂志*, 2005, 6: 16-19.

[39] 冯津萍, 卢奕, 赵炳让, 等. 黄芪抑制家兔心肌缺血/再灌注时细胞凋亡的实验研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2001, 8: 13-15.

[40] 上官海娟, 徐江, 官洪山, 等. 当归对心肌梗死后心肌细胞凋亡和心室重构的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15: 39-44.

(收稿日期: 2010-05-01)

(本文编辑: 李银平)