

· 调查报告 ·

2012 年中国心脏外科和体外循环数据白皮书

朱德明

中国生物医学工程学会体外循环分会于 2012 年底向各地区委员和联络员发出调查 2012 年全国心脏外科体外循环及非体外循环手术数据的通知,至 2013 年 3 月,陆续回收了发出的调查表格。

1 调查表回馈情况

根据 2011 年上报数据的医院底单,学会总计追踪 775 家医院,收回表格 764 家医院,回馈率 98.58%。其中 18 个省市(包括香港特区)调查全覆盖,香港特区也是第一次向大陆学会提交了相关的数据。开展心脏手术的医院数量的变化包括部分新增单位和部分 2012 年没有进行过心脏手术的单位。

2 手术数量和病种例数及地区排名

2012 年 764 家医院上报总心脏手术总数是 204 988 例,其中体外循环下手术 160 575 例,占 78.33%。与 2011 年统计数比较,心脏手术数增加 17 092 例,增长了 9.1%;体外循环手术例数增加 9 850 例,增长了 6.5 %。先天性心脏病手术 84 439 例,较 2011 年增长了 5.3%,且占总心脏手术数的 41.2%,低于 2011 年的占比(后者为 42.7%),先天性心脏病手术例数排列的前三位省市是河南,北京和上海。大血管手术 8 300 例,占总心脏手术例数 4.0%,高于 2011 年占比(后者为 3.4%),排列大血管手术数量的前三位省市是北京,上海和湖北。

3 手术数量的区域分布

心脏手术数量排名前十的地区为:北京(27 538 例),河南(19 650 例),上海(16 099 例),广东(15 036 例),山东(13 199 例),湖北(11 665 例),江苏(8 908 例),湖南(7 579 例),陕西(6 997 例),四川(6 515 例)。

体外循环手术数量排名前十的地区为:北京(18 060 例),河南(15 787 例),广东(13 018 例),上海(12 887 例),湖北(10 539 例),山东(9 147 例),江苏(7 072 例),湖南(6 282 例),陕西(5 778 例),四川(5 643 例)。

在经济发达和人口底数大的省市心脏手术和体外循环手术量明显较大。地区医疗资源分布不匀造成患者流动趋势与医保新政实施促成患者当地留医的现象并存。

4 手术数量的单位排名

心脏手术数量排名前十的单位是:阜外医院(11 373 例),安贞医院(9 094 例),武汉亚心(4 776 例),广东心研所

(4 085 例),上海儿童医学中心(3 594 例),西京医院(3 548 例),湘雅二院(3 442 例),新桥医院(3 111 例),武汉协和(2 826 例),上海中山(2 657 例)。

体外循环手术数量排名前十的单位是:阜外心血管病医院(8 655 例),北京安贞医院(4 806 例),武汉亚心(4 468 例),广东心研所(3 690 例),上海儿童医学中心(3 021 例),西京医院(2 815 例),新桥医院(2 807 例),湘雅二院(2 754 例),武汉协和(2 653 例),上海中山(2 109 例)。与心脏手术数量比较,体外循环手术数的前十位略有变动。

5 各医院手术数量归队情况

764 家医院中心脏手术数超过 5 000 例/年的仅 2 家,3000~5000 例/年的有 6 家,1000~3000 例/年的 25 家,500~1000 例/年的 50 家,200~500 例/年的 99 家,50~200 例/年的 241 家,少于 50 例/年的 344 家。结果提示:每年手术例数少于 200 例的医院有 585 家,占总数的 76.6%。大多数医院患者数量较少,少数医院工作量过大,这很有可能存在或促成对患者治疗质量难以控制和医患矛盾增加的隐患。

6 体外膜肺氧合(ECMO)和辅助循环

2012 年,来自 764 家医院的数据提示,接受体外生命支持病例达到 1 137 例,其中 ECMO 患者 399 例,其他包括安装心室辅助装置(VAD),主动脉内球囊反搏(IABP)等患者 738 例。此仅仅是心外科方面(包括体外循环专业)反映的数字,尚没有包括危重医学等其他学科采用体外生命支持系统的病例。考虑到国际上心脏手术患者应用辅助循环帮助度过心肺衰竭的百分比,我国在这方面的病例数是远远低于国际平均数的。当然,不可能用手术质量高低来解释,政府和个人无力覆盖这部分昂贵的医疗费用是主要因素。积极和准确的把握时机进行辅助循环生命支持有可能抢救部分患者并减少死亡率。

7 儿童医院/妇幼保健院

全国有 33 家儿童医院/妇幼保健院进入调查所获数据中。总共心脏手术数量为 16 319 例,占全国先天性心脏病患者手术例数的 19.3%。显然,综合性医院承担了大部分的先天性心脏病患儿的治疗,或者说儿童医院在治疗先天性心脏病患儿方面还应该贡献更多力量。从先天性心脏病患者手术数量的增长变化上推测,随着产前检查的普及和对畸形胎儿的认知看,中国先天性心脏病的活产儿数量在今后必将遵循国际惯例呈下降趋势,加上介入治疗的发展,和成人心脏手术比较,小儿先天性心脏病手术治疗的发展后劲可能会趋缓。

· 专家论坛 ·

关于羟乙基淀粉体外循环应用安全性的思考

郭 震, 李 欣

[关键词]: 羟乙基淀粉; 人工胶体液; 血浆代用品

[中图分类号]: R654.1 [文献标识码]: A [文章编号]: 1672-1403(2013)04-0194-02

2013 年 6 月 14 日, 鉴于安全考虑, 欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA) 发布声明指出, 药品风险评估委员会 (Pharmacovigilance Risk Assessment Committee, PRAC) 建议将羟乙基淀粉 (hydroxyethyl starch, HES) 退市^[1]。之后的 6 月 24 日, 美国食品和药品管理局 (FDA) 在官网指出, 鉴于增加死亡率和出血风险并可能造成严重肾脏损伤的原因, 对 HES 发出黑框警告^[2-3]。而早在 1978 年, FDA 就因增加血黏度和影响凝血功能将明胶类血浆代用品从市场上撤销^[4]。这些事件的发生为血浆代用品的研发和临床使用蒙上了阴影。尤其是在当前天然胶体来源紧张, 价格昂贵, 且有血源性疾病传播风险的大背景下, 寻找理想的血浆代用品临床意义重大。

在血浆代用品的发展史中, 不同类型的胶体溶液为挽救人类的生命做出了巨大的贡献。从第一次世界大战, 第二次世界大战到越南战争, 从动物源性明胶、天然白蛋白、右旋糖酐到植物源性的 HES 在临危患者急救中扮演了重要的角色。然而在医学和科学技术突飞猛进的今天, 人们对血浆代用品的要求不仅仅局限在临危状态下对生命的急救, 而对它的安全性和效果提出了更高的要求。近百年来, 人工胶体不断推陈出新, 通过各种改良试图达到最佳的扩容效力和最小的副作用。

胶体溶液作为血浆代用品在临床中主要用于补充血容量, 维持有效循环血容量的稳定。而在体外循环中, 胶体溶液作为常规基础预充液, 主要用于弥补血液稀释导致的血浆蛋白浓度降低, 维持一定的胶体渗透压, 避免渗透压过低对机体的损伤。这种情况在低体重患者, 尤其是婴幼儿中显得格外重要。与危重症患者补充血容量不同的是, 体外循环是一个临时性急性血液稀释的过程, 患者并没有原发或持续的血容量丢失。所以在体外循环领域胶体液的选择上, 主要考虑胶体产品维持胶体渗透压的效果 (扩容效果) 和安全性, 而对它扩容持续时间 (半衰期和代谢速度) 的要求并不很高。

目前, 临床常用的胶体溶液由天然胶体和人工胶体两大类, 天然胶体主要指血浆和白蛋白, 由于来源有限, 价格昂贵, 且具有传染血源性疾病的可能, 不可能在体外循环中普遍使用, 仅限于在婴幼儿和严重低白蛋白血症的患者使用。人工胶体可以避免这些缺点, 在成人体外循环中普遍使用, 但其毒副作用不容忽视。

目前常见的胶体有右旋糖酐、明胶和羟乙基淀粉三大类。右旋糖酐作为第二代人造胶体于 20 世纪 40 年代应用于临床, 因其对凝血功能影响较大, 过敏反应发生率高且严重已较少在临床使用^[5-6]。明胶类胶体液属于第一代人造胶体, 出现于 20 世纪初, 是由动物的皮、骨、肌腱中的胶原经水解后提取的多肽类高分子聚合物, 早期因凝点高、黏度高副作用未能临床普及。随着科技的发展明胶液体逐渐成熟, 形成豚联明胶 (聚明胶肽) 和改良液体明胶 (琥珀酰明胶) 两大类, 并广泛应用于临床。明胶类液体分子量小, 清除彻底, 对肾功能影响较小, 但其可能传染动物源性疾病、过敏反应相对高发, 扩容效果有限且对凝血功能会有一定影响。明胶类液体曾在 1978 年因增加血黏度和对凝血功能的影响被 FDA 撤销。近年来, 随着 HES 类胶体液的日渐成熟, 临床应用逐年减少。

HES 出现于 70 年代, 属于第三代人造胶体, 是源自植物的一类由支链淀粉衍生出的复合物。它的扩容效能和时限以及副作用主要是由葡萄糖分子的羟乙基取代程度 (即取代级)、平均分子质量和葡萄糖 C2 与 C6 位上羟乙基基团的个数比 (C2/C6 比率) 决定。HES 的平均相对分子质量越大, 取代级和 C2/C6 比率越高, 在血管内的驻留时间就越长, 扩容强度越大。但相应也就越容易在人体内蓄积, 对凝血系统和肾功能的影响也越显著。经过第一代 (HES 480/0.7)、第二代 (HES 200/0.5) 到目前临床大规模使用的第三代 HES (HES 130/0.4) 的发展, 随着分子量、取代级的降低和 C2/C6 的优化, 与其他胶体液相比, 第三代 HES 既保证了扩容效果和时效的稳定, 同时也大幅降低了肾毒性和对凝血功能的影响。因此, 在临床得到广泛的使用, 并将使用范围扩展至婴幼儿, 成为目前最安全的水浆代用品。

自 2009 年, 液体治疗领域知名教授 Boldt 及其团队发表在《Anesthesia and Analgesia》上关于 HES 和白蛋白在体外循环中对脏器功能和炎症反应评价的论文被证实造假后, 其数十篇文章被证实存在造假行为, 这影响了多篇重要荟萃分析的结果及相关指南的变更^[7]。近来, 剔除了 Boldt 的文章后, 多项大样本荟萃分析、Cochrane Library 以及美国和欧洲的危重医学会认为 HES 在危重症患者中应用的结果并不优于晶体, 甚至在凝血和肾毒性方面有明显的副作用, 不建议使用 HES 或是明胶用于液体复苏治疗。2012 年, 三项重要的随机双盲对照研究 (6S、CRYSTMAS、CHEST 研究) 显示: 与晶体液相比, 在严重感染患者中, HES 并不优于晶体液, 甚

至增加死亡率和肾损伤^[8-10]。近三年来,包括 Cochrane Library 以及 JAMA 和 BMJ 在内的多项 Meta 分析也显示了相同的结果^[11-19]。另外在一项涉及需要体外循环心脏手术的 970 例患者和 18 个临床对照试验的 Meta 分析显示,HES 增加出血、出血导致的二次手术以及血制品的使用,且与 HES 的分子量和取代级无关^[20]。鉴于以上这些证据,2013 年 6 月 14 日,EMA 发布声明指出,PRAC 建议将羟乙基淀粉退市^[1]。10 天后,FDA 在综合分析了这些数据后对羟乙基淀粉发出黑框警告,给出了如下建议^[3]:① 不要给包括败血症和 ICU 患者在内的成人危重患者使用 HES。② 肾功能不全患者避免使用。③ 一旦出现肾损伤立即停用。④ 对于使用 HES 的患者均应持续监测肾功能至少 90 天。⑤ 需要体外循环的心脏手术患者应避免使用 HES。⑥ 一旦出现凝血功能障碍,应立即停用。此外,欧洲危重医学会和美国危重医学会在败血症等危重患者液体复苏时,不推荐使用 HES 或明胶类人工胶体,而将晶体液列为首选^[21]。

在一些权威杂志和欧美药品管理部门对 HES 安全性提出警示甚至建议退市的情况下,虽然我国目前官方还没有给出指导性意见,但这些结果应该引起临床医生的重视。虽然上述结果主要集中在危重医学领域,但在肾毒性和凝血功能等的安全性方面并不局限于危重病患者。尤其是在心脏直视手术的体外循环中,出血和急性肾损伤是心脏术后常见的并发症,胶体预充液的安全性不容忽视。在美国 FDA 给出的警示中,明确提出“需要体外循环的心脏手术患者应避免使用 HES”。但另一方面,与危重症患者扩容中晶体液和胶体液不同的是,在体外循环急性稀释中,胶体液的主要作用是维持胶渗压稳定,而不是扩容的需要,这在低体重患者中尤为重要。在天然胶体昂贵和匮乏的背景下,虽然人工胶体出现了这样的问题,但在体外循环领域,完全避免人工胶体的使用目前尚不可能。据此,笔者提出下面这些建议:① 密切关注欧洲、美国及中国的药品监管部门对人工胶体的评价及更新的强有力的循证医学证据的出现。以目前的证据尚不能完全否定 HES 甚至明胶在体外循环的使用。② 在上述循证医学证据的警示下,对于具有肾功能不全和凝血功能障碍倾向的患者应尽量避免或限制人工胶体的使用。③ 人工胶体的副作用都具有剂量依赖性,应尽量减少人工胶体用量,而通过天然胶体、超滤、利尿等手段维持胶渗压的稳定。④ HES 和明胶对凝血功能的影响机制尚不明确,有可能只针对某类患者存在影响,所以有必要进一步揭示凝血功能障碍的机制,从而针对不同类别患者,合理使用不同类型的人工胶体,使患者最大程度受益。

综上所述,对于 HES 事件,既不可盲从,也不可忽视,应该从临床和科学的角度慎重思考,合理利用胶体溶液。同时也说明在血浆代用品方面,广阔的前景与荆棘的道路并存。

参考文献:

- [1] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2013/06/WC500144446.pdf
- [2] <http://www.fda.gov/Biologics/Blood/Vaccines/Safety/Availability/ucm358271.htm#data>
- [3] <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm358349.htm>
- [4] No authors listed. List of drug products that have been withdrawn or removed from the market for reasons of safety or effectiveness—FDA. Proposed rule. [J]. Fed Regist, 1998, 63(195):54082-54089.
- [5] de Jonge, Levi. Effects of different plasma substitutes on blood coagulation: A comparative review [J]. Crit Care Med, 2001, 29(6):1261-1267.
- [6] Eriksson M, Saldeen T. Effect of dextran on plasma tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) during surgery [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 1995, 39(2):163-166.
- [7] Wise J. Boldt: the great pretender [J]. BM J, 2013, 346:f1738.
- [8] Perner A, Haase N, Guttormsen AB, et al. Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis [J]. N Engl J Med, 2012, 367(2):124-34.
- [9] Guidet B, Martinet O, Boulain T, et al. Assessment of hemodynamic efficacy and safety of 6% hydroxyethyl starch 130/0.4 vs. 0.9% NaCl fluid replacement in patients with severe sepsis: The CRYSTMAS study [J]. Crit Care, 2012, 16(3):R94.
- [10] Myburgh JA, Finfer S, Bellomo R, et al. Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care [J]. N Engl J Med, 2012, 367(20):1901-1911.
- [11] Dart AB, Mutter TC, Ruth CA, et al. Hydroxyethyl starch (HES) versus other fluid therapies: effects on kidney function [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2010, (1):CD007594.
- [12] Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2007, (4):CD000567.
- [13] Perel P, Roberts I, Ker K. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2013, 2:CD000567.
- [14] Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 6:CD000567.
- [15] Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, (3):CD000567.
- [16] Haase N, Perner A, Hennings LI, et al. Hydroxyethyl starch 130/0.38-0.45 versus crystalloid or albumin in patients with sepsis: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis [J]. BMJ, 2013, 346:f839.
- [17] Gattas DJ, Dan A, Myburgh J, et al. Fluid resuscitation with 6% hydroxyethyl starch (130/0.4 and 130/0.42) in acutely ill patients: systemic review of effects on mortality and treatment with renal replacement therapy [J]. Intensive Care Med, 2013,39(4):558-568.
- [18] Zarychanski R, Abou-Setta AM, Turgeon AF, et al. Association of hydroxyethyl starch administration with mortality and acute kidney injury in critically ill patients requiring volume resuscitation: a systemic review and meta-analysis [J]. JAMA, 2013, 309(7):678-688.
- [19] Patel A, Waheed U, Brett SJ. Randomised trials of 6% tetrastarch (hydroxyethyl starch 130/0.4 or 0.42) for severe sepsis reporting mortality: systematic review and meta-analysis [J]. Intensive Care Med, 2013, 39(5):811-822.
- [20] Navickis RJ, Haynes GR, Wilkes MM. Effect of hydroxyethyl starch on bleeding after cardiopulmonary bypass: a meta-analysis of randomized trials [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 144(1):223-230.
- [21] Reinhart K, Perner A, Sprung CL, et al. Consensus statement of the ESICM task force on colloid volume therapy in critically ill patients [J]. Intensive Care Med, 2012, 38(3):368-383.

(收稿日期:2013-07-22)

(修订日期:2013-08-10)

· 临床研究 ·

自体冷血停搏液对非紫绀型未成熟心肌 能量代谢的影响及意义

马 超,沈定荣,张 青,王元祥,彭 乐,赵春玉,孟保英,提运幸

[摘要]:目的 探讨自体冷血停搏液对非紫绀型未成熟心肌能量的影响及意义。**方法** 65 例先天性心脏病婴儿随机分为:异体冷血停搏液(A)组(n=32)和自体冷血停搏液(B)组(n=33),术前、术后即刻、术后 6 h、24 h 测左心室 Tei 指数、左心室射血分数(LVEF)及心指数(CI);主动脉阻断前和开放 30 min 取右心耳组织,检测 ATP、ADP 及能量储备(EC)。**结果** 术后即刻、6 h 与 24 h Tei 指数逐渐降低,各时间点 B 组较 A 组低,与 B 组的差异均有显著性($P<0.05$);LVEF 和 CI 逐渐升高, B 组各时间点较 A 组高,与 A 组的差异均有显著性($P<0.05$);主动脉开放 30 min 后,两组 ATP、ADP 和 EC 含量均显著降低($P<0.05$), B 组较 A 组高,差异有显著性($P<0.05$)。**结论** 非紫绀型未成熟心肌应用自体冷血停搏液比异体冷血停搏液能更好的保存心肌细胞能量,更有利于术后心脏功能的恢复。

[关键词]: 未成熟心肌;自体冷血停搏液;先天性心脏病;能量代谢

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2013)04-0196-04

Effects and significance of cold autologous blood cardioplegic solution on energy metabolism of immature and non-cyanosis congenital heart disease

Ma Chao, Shen Ding-rong, Zhang Qing, Wang Yuan-xiang, Peng Le, Zhao Chun-yu, Meng Bao-ying, Ti Yun-xing
Cardiovascular Center, Shenzhen Children's Hospital of Chinese Medical University, Shenzhen, Guangdong, 518026, China
Corresponding author: Ma Chao, Email:mcxsm@163.com

[Abstract]: Objective To study the effects and significance of cold autologous blood cardioplegic solution on energy substances of cardiocyte in infants with non-cyanotic congenital heart disease. **Methods** 65 infants with non-cyanotic congenital heart disease were randomly divided into cold xenogenous blood cardioplegic solution group (group A, n=32) and cold autologous blood cardioplegic solution group (group B, n=33). Left ventricular Tei index, left ventricular ejection fraction (LVEF) and heart index (CI) were detected before operation, immediately after operation, and at postoperative 6 h and 24 h. Tissue of right auricle was taken before the aortic was clamped and 30 minute after aortic clamping removal to measure the levels of ATP, ADP and energy reserve (EC) value. **Results** Tei index gradually reduced after operation and at postoperative 6 h and 24 h, and it was significantly lower ($P<0.05$) in group B than that in group A at each time point. While, LVEF and CI gradually raised, and were significantly higher ($P<0.05$) in group B than those in group A at each time point. 30 mins after aortic clamping removal, ATP, ADP and EC content reduced significantly ($P<0.05$) in the two groups, and those datas were significantly higher ($P<0.05$) in group B than in group A. **Conclusion** Compared with cold xenogenous blood cardioplegic solution, cold autologous blood cardioplegic solution can more effectively save energy of immature cardiocyte, and therefore is more beneficially for the recovery of patients' cardiac function after operation.

[Key words]: Immature cardiocyte; Cold autologous blood cardioplegic Solution; Congenital heart disease; Energy metabolism

婴儿的心肌发育尚未成熟,先天性心脏病的婴

儿在体外循环(extracorporeal circulation,ECC)阻断期间的缺血再灌注易导致心肌细胞能量缺乏,使心肌细胞发生能量代谢异常,导致心肌进一步受到损伤^[1-2],不利于术后心脏功能的恢复。本中心研制的自体冷血停搏液是取自于患儿主动脉根部血液制作,已在临床应用多年,取得了一定的临床效果^[3],但其

基金项目:深圳市科技计划项目(200902102)
作者单位:518026 深圳,广东省深圳市儿童医院心血管中心
通讯作者:马超,Email:mcxsm@163.com

对心脏保护的机制仍不明确^[4],本研究即从能量代谢的角度对心肌保护机制做初步的探讨,报道如下:

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2009 年 2 月至 2012 年 2 月在本中心行 ECC 术的非紫绀型先天性心脏病婴儿 65 例,经医院伦理委员会批准,依监护人知情同意的原则,按住院顺序用随机数字表法分为两组,即异体冷血停搏液组(A 组)(n=32)和自体冷血停搏液组(B 组)(n=33),两组基本资料(见表 1)。两组患儿均排除肝肾功能障碍、肿瘤等合并症;均经气管插管行静脉复合全身麻醉,ECC 中控制红细胞比容(Hct)在 0.25 左右,ECC 中均行常规超滤,由同一组医生和灌注师在中低温(25~30℃)下完成心内直视手术。

1.2 方法

1.2.1 心脏停搏液的配制方法 A 组:将预充血经氧合器氧合后与晶体停搏液按 4:1 比例混合配制成含血停搏液;B 组:ECC 开始前,经主动脉根部快速(30 s)抽取血液(10~15 ml/kg),按血液:晶体为 4:1 的比例制备自体冷血停搏液,保持主动脉收缩压大于等于 50 mm Hg,可经主动脉插管补充血容量以维持循环稳定。

1.2.2 灌注方法 两组灌注方法相同。停搏液均保持 4℃,升主动脉阻断后,由主动脉根部灌入,首次剂量 30 ml/kg,最初保持灌注压 40 mm Hg 左右,快速灌注至心肌电活动静止后减慢速度,降低灌注压至 30 mm Hg,维持 6 min;间隔 30 min 重复一次灌注,第二次剂量减半。

1.2.3 心肌取材及保存方法 分别在主动脉阻断前和主动脉开放 30 min 取 30 mg 左右右心耳心肌组织,迅速称重后投入液氮中,-80℃保存。

1.2.4 能量物质的检测 用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography,HPLC)检测心肌组织中 ATP、ADP 的含量及能量储备(EC)值[EC=(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)]。试剂盒购

自南京生物工程研究所,所用仪器为美国 Waters 公司 2695 型 HPLC 仪。基本步骤为:心肌组织复温后,加入 4℃ 1 ml 浓度为 0.42 mol/L 高氯酸研磨匀浆,4℃ 下 20 000 r/min 离心 15 min,取上清液用 KOH 调节 pH 值在 6.5~7.0 之间,重复离心后取上清液 20 μl 进行 HPLC 检测,流速为 1 ml/min,紫外线检测波长 254 nm,以峰高定值。

1.2.5 心脏功能指标的测定 术前和术后即刻、术后 6 h、24 h 使用 Acuson Sequoia 512 超声诊断仪(探头频率为 6.0 MHz)测量安静平卧状态下患儿的左心室 Tei 指数、左心室射血分数(LVEF)及心指数(CI)。其中 Tei 指数测量参见参考文献[3],即 Tei 指数=(左心室等容收缩时间+左心室等容舒张时间)/射血时间;Simpson 法检测相关数据,并计算:LVEF=(左心室舒张末容积-左心室收缩末容积/左心室舒张末容积)×100%。所有测量均记录 10 个心动周期并取其平均值,平均值由检测仪自动计算。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,所有数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间计量数据采用卡方检验,计数数据的均数比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

所有患儿均成功手术,顺利出院,无死亡病例,获得所有数据,全部纳入统计。

2.1 一般临床资料对比 两组患儿临床资料比较,均无显著性差异(*P* > 0.05),见表 1。

2.2 两组心功能和能量物质的检测结果及比较

2.2.1 心功能指标比较 术前两组的左心室 Tei 指数、LVEF 和 CI 没有显著性差异(*P* > 0.05);两组术后即刻、术后 6 h、24 h 左心室 Tei 指数逐渐降低,B 组与 A 组比较差异均有显著性(*P* < 0.05);CI 及 LVEF 逐渐升高,B 组与 A 组比较差异均有显著性(*P* < 0.05),见表 2。

2.2.2 能量物质比较 两组 ATP、ADP 和 EC 在主动脉阻断前没有显著性差异(*P* > 0.05),但在主动

表 1 两组患者临床资料的比较($\bar{n},\bar{x}\pm s$)

组别	例数	男/女	年龄(月)	体重(kg)	病种(VSD/其他)	心功能Ⅱ/Ⅲ/Ⅳ	阻断时间(min)	术后即刻 Hct(L/L)
A 组	32	16/16	7.11±2.36	6.1±2.25	24/8	10/19/3	76.07±17.65	0.33±0.01
B 组	33	18/15	7.02±2.14	6.2±2.40	24/9	9/20/4	75.63±18.34	0.33±0.02
χ^2/t		0.13	0.75	0.50	1.30	0.21	0.73	0.18
<i>P</i>		0.71	0.46	0.62	0.25	0.90	0.47	0.93

注:VSD:室间隔缺损。

表 2 两组各时间点左心室 Tei 指数、LVEF 及 CI 的比较(n, $\bar{x}\pm s$)

时间	组别	左室 Tei 指数	LVEF(%)	CI[L/(m ² ·min)]
术前	A 组(n=32)	0.51±0.07	53.71±7.89	2.91±0.31
	B 组(n=33)	0.51±0.06	54.13±8.04	2.94±0.27
	<i>t</i>	0.59	0.45	0.22
	<i>P</i> 值	0.56	0.65	0.83
术后即刻	A 组(n=32)	0.47±0.04	41.85±10.93	1.93±0.30
	B 组(n=33)	0.44±0.03	49.42±10.26	2.27±0.36
	<i>t</i>	3.60	2.07	3.12
	<i>P</i> 值	0.00	0.04	0.00
术后 6 h	A 组(n=32)	0.45±0.02	43.59±11.19	2.56±0.37
	B 组(n=33)	0.39±0.02	50.27±8.30	2.88±0.26
	<i>t</i>	11.44	2.05	3.33
	<i>P</i> 值	0.00	0.04	0.00
术后 24 h	A 组(n=32)	0.40±0.03	49.62±9.35	2.37±0.65
	B 组(n=33)	0.34±0.02	55.84±7.53	3.09±0.35
	<i>t</i>	9.01	2.22	2.71
	<i>P</i> 值	0.00	0.03	0.01

表 3 两组主动脉阻断前后能量物质的比较(n, $\bar{x}\pm s$)

时间	组别	ATP(μg/mg)	ADP(μg/mg)	EC
主动脉阻断前	A 组(n=32)	0.090±0.027	0.156±0.071	0.69±0.06
	B 组(n=33)	0.091±0.036	0.154±0.057	0.68±0.07
	<i>t</i> / <i>P</i> 值	0.60/0.55	0.67/0.50	1.23/0.22
主动脉开放 30 min	A 组(n=32)	0.041±0.019	0.067±0.028	0.31±0.23
	B 组(n=33)	0.062±0.022	0.089±0.031	0.45±0.26
	<i>t</i> / <i>P</i> 值	3.00/0.004	2.99/0.004	2.33/0.023

脉开放 30 min 后均较主动脉阻断前显著降低(*P* < 0.05), 且 B 组较 A 组高, 差异有显著性(*P* < 0.05), 见表 3。

3 讨 论

心肌保护是 ECC 术成功的关键。目前在婴儿 ECC 术中临床使用的心肌保护方法大多借鉴于成人。而与成年人相比, 婴幼儿心肌尚未发育成熟, 未成熟的心肌在心肌能量代谢与对缺血缺氧的耐受方面较成熟心肌有差异, 对缺血再灌注更加敏感。ECC 时应用心脏停搏液可以防止、避免和逆转心肌缺血和再灌注损伤^[5], 目前国内临床使用的婴儿心脏停搏液仍以传统的异体冷血停搏液为主。本研究通过对非紫绀型未成熟心肌能量代谢和心肌损伤的影响比较来探讨自体冷血心脏停搏液与异体冷血停搏液的差异。

本研究发现阻断前两组的能量代谢指标: ATP、ADP 和 EC 没有显著性差异(*P* > 0.05), 但在主动脉开放 30 min 后, 两组心肌组织的 ATP、ADP 和 EC 含量均显著降低, 表明主动脉开放后心肌出现了缺血再灌注损伤, 能量代谢受到影响; 但自体冷血停搏液组与异体冷血停搏液组相比, ATP、ADP 和 EC

含量的降低程度较小, 表明自体冷血停搏液组的能量物质含量高于异体冷血停搏液组, 自体冷血停搏液比异体冷血停搏液更能保存细胞的储备能量, 降低能量的消耗。能量是心肌细胞完成生理功能和维护心功能的重要基础, ECC 中由于灌注不足会影响组织细胞的氧化磷酸化作用, 减少能量的生成, 从而影响细胞膜上 ATP 依赖性离子通道的作用, 使大量的 Ca²⁺、Na⁺ 和水进入细胞内, 使细胞毒性水肿, 引起组织损伤^[6]; 同时心脏直视手术中冠脉血流阻断后, 缺血导致心肌组织中高能磷酸键快速的消耗, 此时葡萄糖酵解提供的少量 ATP 成为维持心肌细胞存活的唯一来源, 能量不足致使游离脂肪酸氧化增强, 能量持续衰竭时, 引起 Ca²⁺ 超载, 自由基生成增多, 进一步加重心肌的缺氧和细胞内酸中毒, 从而会加重心肌细胞的损伤, 最终导致细胞水肿、凋亡和坏死^[7]。能量缺乏是心肌缺血缺氧引起心功能异常的根本原因, 本研究发现术前心功能指标: Tei 指数、LVEF 及 CI 没有显著性差异; 术后即刻、6 h、24 h 左心室 Tei 指数逐渐降低, 各时间点自体冷血停搏液组较异体冷血停搏液组低, 与异体冷血停搏液组的差异均有显著性; LVEF 和 CI 逐渐升高, 自体冷血停搏液组各时间点较异体冷血停搏液组高, 差异均有显

· 临床研究 ·

自身血容量/预充量比值对婴幼儿体外循环
后毛细血管渗漏综合征的预测意义

刘 宇,王宏鑫,宋恒昌,石 云,董 英,孙 哲,王辉山

[摘要]:目的 探讨自身血容量/预充量比值(A/P)对低体重婴幼儿体外循环(CPB)后毛细血管渗漏综合征(CLS)的预测作用。**方法** 回顾分析了204例体重 ≤ 13 kg的行CPB心脏手术患儿的临床资料,通过受试者工作曲线(ROC)分析A/P比值预测术后CLS发生最佳临界值,并据此对2012年1月~2012年12月期间行CPB心脏手术的先天性心脏病患儿进行前瞻性队列研究,比较A/P比值对CLS发生的影响。**结果** 204例病例对照研究的患儿CPB术后CLS发生26例,发病率为12.75%,ROC曲线下面积0.757,根据ROC曲线选定1.285为最佳临界值。据此,将161名队列研究病例分为 ≤ 1.285 组和 >1.285 组,两组CLS的发病率分别为14.10%、2.41%,相对危险度(RR)为5.85。**结论** A/P比值对低体重婴幼儿CPB术后CLS的发生有较强的预测意义,A/P比值 ≤ 1.285 的患儿CPB心脏手术后易发生CLS。

[关键词]: 毛细血管渗漏综合征;体外循环;先天性心脏病

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2013)03-0200-04

Predict significance of the auto-blood volume/prime volume ratio on capillary leak syndrome after cardiopulmonary bypass in infants

Liu Yu, Wang Hong-xin, Song Heng-chang, Shi Yun, Dong Ying, Sun Zhe, Wang Hui-shan

Department of Cardiovascular Surgery, the general hospital of Shenyang military command,
Liaoning Shenyang 110016

Corresponding author: Wang Hui-shan, Email: huishanwang@hotmail.com

[Abstract]: Objective To evaluate the predict significance of the auto-blood volume/prime volume (A/P) ratio on capillary leak syndrome (CLS) after cardiopulmonary bypass (CPB) in low-weight infants. **Methods** Clinical data was retrospectively collected and analyzed from infants (weight ≤ 13 kg) underwent CPB in our hospital between October 2008 and February 2010. Receiver operating characteristic curve (ROC) was used to estimate optimal operating point (OOP). Then prospective cohort study was performed on clinical data from January 2012 to December 2012 to evaluate the effect of A/P ratio on morbidity of CLS. **Results** The morbidity of CLS in retrospective clinical data was 12.75%. Area under the curve of ROC was 0.757. Meanwhile, 1.285 was selected as OOP based on ROC. 161 infants underwent CPB were enrolled in prospective cohort study which were divided into A/P ratio ≤ 1.285 and >1.285 groups based on OOP. The morbidities of the two groups were 14.10% and 2.41% respectively. Furthermore, the relative risk (RR) was 5.85. **Conclusion** A/P ratio on the predict significance of CLS after CPB is powerful. The morbidity of CLS after CPB is higher when A/P ratio is less than 1.285.

[Key words]: Capillary leak syndrome; Cardiopulmonary bypass; Congenital heart disease

毛细血管渗漏综合征(capillary leak syndrome, CLS)是体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)心脏手术后较常见的并发症^[1]。低体重的婴幼儿(包括新生儿、小婴儿)由于血液与CPB非生理性材料

表面接触更多,使液体更容易透过毛细血管膜,因而更易发生CLS^[2]。笔者既往的研究发现^[3]:自身血容量/预充量(auto-blood volume/prime volume, A/P)比值是低体重婴幼儿CLS发生的独立危险因素,由于A/P比值术前可以获得,因此,可能对CLS的预防有一定的意义。为探讨A/P比值对CLS发生的预测意义,本文对两部分资料(来源于沈阳军区总医院心血管外科)进行了临床研究,现报告如下。

作者单位:110016 沈阳,沈阳军区总医院心血管外科[刘宇(第四军医大学博士研究生)、王宏鑫(辽宁医学院硕士研究生)、宋恒昌、石云、董英、孙哲、王辉山]

通讯作者:王辉山;Email:huishanwang@hotmail.com

1 资料与方法

1.1 病例资料 回顾 2008 年 10 月~2010 年 2 月行 CPB 心脏手术且体重≤13 kg 的患儿 204 例,其中男性 109 例,女性 95 例;年龄为 4 d~5 岁。按照 CLS 诊断标准将 204 例患儿分为 CLS 组和非 CLS 组。又将 2012 年 1 月~2012 年 12 日行 CPB 心脏手术且体重≤13 kg 的患儿 161 例建立前瞻性队列,根据选定的最佳临界值将队列研究病例分为低 A/P 组和高 A/P 组。

1.1.1 CLS 诊断标准 心脏术后早期发生的非心源性的全身水肿状态,胸膜渗出、腹水、体重增加超过 10%^[4]。其主要临床症状包括:全身皮肤和黏膜水肿、胸腔和腹腔大量渗液、少尿、低心排出量综合征、持续性低氧血症等。

1.1.2 A/P 比值的确定 A/P 比值即自身血容量与预充量的比值,可以反映自身血量与预充量之间的关系。自身血量根据患儿体重按照 80~85 ml/kg 计算,本研究病例体重均≤13 kg,根据氧合器的性能并结合临床经验,对于体重<8 kg、8~10 kg、>10~13 kg 的患儿分别选择相应的 CPB 管道和膜式氧合器,静态预充量分别约为 300 ml、570 ml、680 ml。据此计算出每个患儿的 A/P 比值。

1.2 CPB 方法 均采用相同的 CPB 方法。采用进口 Terumo System I 人工心肺机,Dideco901 或 902 型膜式氧合器和静脉血氧饱和度检测仪,Terumo 婴幼儿动脉过滤器和天津婴幼儿配套管路;预充液采用乳酸纳林格注射液,人血白蛋白 20 g,甲泼尼龙 20 mg/kg,乌司他丁 2 万 u/kg,部分库存红细胞悬液,肝素 10 mg,维持较小预充量(300~680 ml)。根据手术采用中度低温或深低温低流量 CPB 方法,术中常规使用 Terumo 血液超滤器维持红细胞比容(Hct)在 0.23~0.26,术毕改良超滤使 Hct>0.30。心肌保护采用阻断升主动脉后经升主动脉根部灌注 4:1 含血停搏液 15~20 ml/kg。

1.3 病例对照研究 比较两组年龄、性别、体重、CPB 时间、主动脉阻断时间、A/P 比值。绘制 A/P 比值对 CLS 发生的受试者工作曲线(receiver operating characteristic curve,ROC),计算曲线下面积,选定最佳临界值。

1.4 前瞻性队列研究 比较两组年龄、性别、体重、CPB 时间、主动脉阻断时间、CLS 发病率、死亡率。

1.5 统计处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学数据处理。计量资料以均数标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为

有显著性差异。

2 结果

2.1 病例对照研究结果 本组 204 例先天性心脏病患儿术后 26 例患儿发生 CLS,发生率 12.75%。单因素分析显示年龄、体重、CPB 时间、主动脉阻断时间、A/P 比值等具有统计学意义。见表 1。

表 1 204 例病例对照研究病例临床资料($\bar{x}\pm s$)		
影响因素	CLS 组(n=26)	非 CLS 组(n=178)
年龄(月)	12.59±11.21 *	23.34±13.42
男[例(%)]	16(61.5%)	93(52.2%)
女[例(%)]	10(39.5%)	85(47.8%)
体重(kg)	7.01±2.32 *	9.64±2.30
CPB 时间(min)	97.31±47.05 *	72.17±30.79
主动脉阻断时间(min)	51.50±33.43 *	37.83±20.39
A/P 比值	1.28±0.26 *	1.45±0.20

注:与非 CLS 组比较 * *P* < 0.05。

2.2 最佳分界 A/P 比值的确定 A/P 比值对 CLS 发生的 ROC 曲线见图 1。A/P 比值的 ROC 曲线下面积为 0.757,Youden 指数最大值为 0.47。选择 Youden 指数最大值时的 A/P 比值为最佳临界值分为>1.285 和≤1.285。此时 A/P 比值预测 CLS 发生的灵敏度为 89.3%,特异度为 57.7%。病例对照研究表明 A/P 比值与 CLS 发生成负相关,即比值越小,发生 CLS 的几率越大。

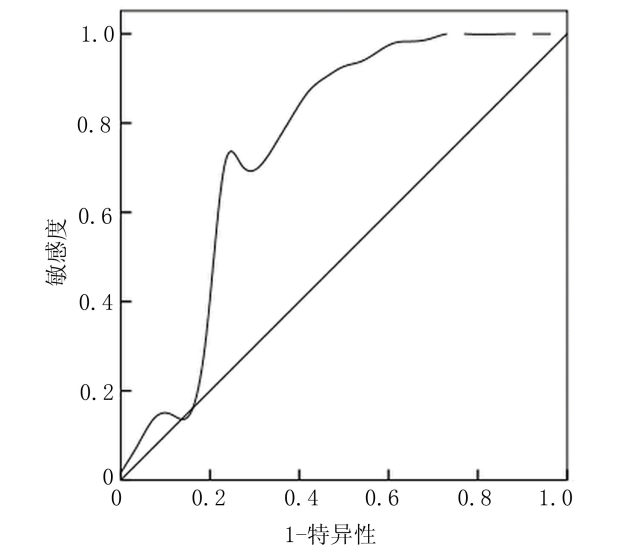


图 1 A/P 比值预测 CLS 发生的 ROC 曲线

2.3 前瞻性队列研究结果 前瞻性队列研究 161 例患儿术后 16 例发生 CLS, 发病率 9.94%。根据 A/P 比值的最佳临界值将患儿分为 >1.285 组和 ≤1.285 组。分析结果显示 A/P 比值 ≤1.285 组术后 ICU 时间、CLS 发病率、死亡率显著增加 ($P < 0.05$)。A/P 比值 <1.285 对 CLS 发生的相对危险度 (RR) 为 5.85。见表 2。

表 2 161 例前瞻性队列研究病例临床资料($\bar{x} \pm s$)

影响因素	>1.285 组	≤1.285 组
年龄 (m)	23.58±14.95	17.29±10.27 *
男 [例, (%)]	46 (55.4%)	45 (57.7%)
女 [例, (%)]	37 (44.6%)	33 (42.3%)
体重 (kg)	10.30±2.67	8.8±1.68 *
CPB 时间 (min)	69.12±38.10	69.32±30.46
主动脉阻断时间 (min)	37.16±25.14	37.27±20.38
呼吸机时间 (h)	47.33±87.83	54.89±76.76
ICU 时间 (d)	5.14±6.47	7.83±9.33 *
术后住院时间 (d)	13.48±5.57	16.04±9.94
CLS 发病率 [例, (%)]	2 (2.41%)	11 (14.10%) *
死亡率 [例, (%)]	2 (2.41%)	4 (5.13%) *

注: 与 >1.285 组比较 * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

由于婴幼儿本身血管及毛细血管发育尚未成熟, 在 CPB 的刺激下有更明显的补体激活, 导致液体更易通过毛细血管膜, 因此, CLS 的发病率在婴幼儿较高^[5]。目前, 国内的一些相关研究表明小儿 CPB 术后 CLS 的发病率为 6.13~16.78% 不等^[3,6-7], 导致发病率差异的主要原因在于不同研究的纳入标准不同。本研究分别对 2008 年 10 月~2010 年 2 月的病例对照资料与 2012 年 1 月~2012 年 12 月的队列研究资料进行分析, 结果发现 A/P 比值对低体重婴幼儿 CPB 术后 CLS 发生的有较强烈的预测意义。

3.1 最佳分界点的选择 有人认为 ROC 曲线下面积在 0.5~0.7 之间时预测价值较低, 在 0.7~0.9 之间时预测价值中等, 在 0.9 以上时预测价值较高^[8]。本研究中 A/P 比值的 ROC 曲线下面积为 0.757, 因此, 说明 A/P 比值对 CLS 的发生的预测价值中等。目前确定最佳分界点的方法主要有三种: ① 预先设定敏感度或特异度的取值; ② 同时使灵敏度和特异度达到最大; ③ 通过患病率和花费、收益等计算最佳临界值的斜率^[9]。本研究采用使灵敏度和特异度同时达到最大的一点为最佳分界点, 即 Youden 指

数最大的一点, 从而确定 A/P 比值为 1.285 作为最佳分界点。

3.2 前瞻性队列研究 本组 161 例患儿以 A/P 比值为 1.285 为分界点, ≤1.285 组 CLS 发病率显著高于 >1.285 组 (14.10%、2.41%), RR 为 5.85, 在 3.0~9.9 之间, 说明 A/P 比值 ≤1.285 与 CLS 发生有较强烈的关联^[10]。

3.3 CLS 的预防措施 CPB 术后 CLS 的病死率较高, 应该早期预防和治疗。本研究发现 A/P 比值对 CLS 发生具有中等的预测价值, 同时 A/P 比值 ≤1.285 与 CLS 发生有较强烈的关联。由于小儿 CPB 术后 CLS 发病率较高^[11], 因此, 对于婴幼儿, 特别是体重较低的婴幼儿, 术前应根据对 CLS 发生的风险进行评估, 对于 A/P 比值 ≤1.285 的患儿早期采取预防措施。其中, 减小预充量可以减少血液与异物接触, 从而减轻炎症反应和相关并发症, 是最有效、最直接的途径^[12]。另外, 提高 CPB 期间胶体渗透压以及应用新的 CPB 材料也是预防 CLS 发生的有效手段^[13-14]。

综上所述, 本研究通过病例对照研究筛选出 A/P 比值是 CPB 术后 CLS 发生的危险因素, 利用 ROC 曲线确定 A/P 比值预测 CLS 发生的最佳临界值, 将 A/P 比值 ≤1.285 作为影响 CLS 发生的暴露因素。而后进行前瞻性队列研究发现 A/P 比值 ≤1.285 与 CLS 发生有较强烈关联, RR 值为 5.85。因此, A/P 比值对低体重婴幼儿 CPB 术后 CLS 发生具有较强的预测价值, 其中 A/P 比值 ≤1.285 可以作为影响 CLS 发生的暴露因素。

参考文献:

[1] 冯正义, 龙村. 婴幼儿围体外循环期毛细血管渗漏综合征 [J]. 心血管病学进展, 2005, 26 (4) : 384-387.

[2] Weiss Y G, Merin G, Koganov E, *et al* . Postcardiopulmonary bypass hypoxemia: a prospective study on incidence, risk factors, and clinical significance [J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2000, 14 (5) : 506-513.

[3] 刘宇, 王辉山, 宋恒昌, 等. 低体重婴幼儿体外循环心脏术后毛细血管渗漏综合征的危险因素分析 [J]. 中国体外循环杂志, 2011 (3) : 156-159.

[4] Stiller B, Sonntag J, Dahnert I, *et al* . Capillary leak syndrome in children who undergo cardiopulmonary bypass: clinical outcome in comparison with complement activation and C1 inhibitor [J]. Intensive Care Med, 2001, 27 (1) : 193-200.

[5] Larson DF, Bowers M, Schechner HW. Neutrophil activation during cardiopulmonary bypass in paediatric and adult patients [J]. Perfusion, 1996, 11 (1) : 21-27. (转第 234 页)

· 临床研究 ·

常规超滤对婴幼儿体外循环血液流变学的影响

牛 伟, 张 红, 蔡回钧, 丁 珺

[摘要]:目的 评估体外循环(ECC)中超滤对婴幼儿血液流变学的影响。方法 选取需在 ECC 下行心内直视手术的患儿 26 例,分为无超滤组(W 组):在 ECC 中不行超滤;超滤组(C 组):复温至 33℃ 时开始超滤,超滤流量 10~15 ml/(kg·min),每组各 13 例。两组患儿分别于转流前(T1)、升主动脉阻断后 10 min(T2)、复温至 33℃ 时(T3)、停机时(T4)、术后 24 h(T5)和术后 36 h(T6)采动脉血检测血液流变学相关指标,同时记录 ECC 转流时间、阻断升主动脉时间、手术时间;术后随访各组患儿住院天数、ICU 停留天数、呼吸机辅助及撤离时间、输血总量、引流量、尿量的情况。结果 ① 两组患儿在升主动脉开放后心脏均自主复跳,围术期无死亡病例,均顺利出院。② 血液流变学变化:组内效应比较:ECC 开始后两组患儿血浆黏度、红细胞刚性指数(IR)、红细胞聚集指数(Agrbc)、红细胞变形指数(TK)、红细胞比容(Hct)、纤维蛋白原(Fib)总体呈下降趋势;超滤后 IR、Agrbc 比 T3 时明显升高($P<0.05$);血浆黏度、Fib 与 T3 比较差异无统计学意义($P>0.05$);超滤后各时间点 TK 无明显差异($P>0.05$);组间效应比较:血浆黏度、IR、Agrbc、TK、Fib 两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$);Hct 超滤后各时间点 C 组比 W 组明显升高($P<0.05$)。③ 术后随访情况:超滤组 ICU 停留天数、呼吸机辅助及撤离时间、引流量明显少于无超滤组($P<0.05$)。结论 ECC 中应用超滤可迅速提高 Hct,减少患儿术后的引流量,缩短患儿在 ICU 的停留时间、呼吸机辅助及撤离时间,有利于心、肺及全身各脏器功能的恢复。同时,超滤对婴幼儿 ECC 后的红细胞变形性无明显影响,对红细胞的聚集性可能有一定影响。

[关键词]: 体外循环;超滤;血液流变学;婴幼儿

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2013)04-0203-05

Effects of ultrafiltration on hemorheology in infants during extracorporeal circulation

Niu Wei, Zhang Hong, Cai Hui-jun, Ding Jun

Department of Anesthesiology of the Medical College Hospital of Zunyi, Zunyi 563000, China

Corresponding author: Zhang Hong, Email: hianzhang@tom.com

[Abstract]: Objective To evaluate the effects of ultrafiltration on hemorheology in infants during extracorporeal circulation (ECC). **Methods** 26 patients undergoing open-heart surgery with ECC were randomly divided into two groups: without-ultrafiltration group (W group, n=13) and conventional ultrafiltration (CUF) group (C group, n=13). In W group ultrafiltration didn't be used during ECC, while in C group CUF was started when the temperature rewarming to 33℃, and the flow rate of CUF was controlled to 10~15 ml/(kg·min). The arterial blood samples were repeatedly collected at the following time points: before ECC (T1), 10 min after the ascending aorta blocked (T2), on rewarming to 33℃ (T3), ECC termination (T4), 24 h (T5) and 36 h after operation (T6). The changes of relative indexes of the blood rheology and ECC time, aortic cross-clamping time, operative time were observed and detected. Meanwhile, the hospital days, ICU residence time, ventilation time, total blood transfusion volume, drainage volume, urine volume of patients followed up in each group were recorded. **Results** 1. The hearts of all infants in two groups resuscitated automatically after ascending aorta declamping. All patients recovered smoothly and were discharged without perioperative deaths. 2. Hemorheology: comparison within groups: after the beginning of ECC, the plasma viscosity, erythrocyte rigidity index (IR), erythrocyte aggregation index (Agrbc), erythrocyte deformation index (TK), hematocrit (Hct) and fibrinogen (Fib) overall had a downward trend in two groups; Compared with those at T3, the IR and Agrbc were significantly higher ($P<0.05$), while the plasma viscosity and Fib didn't have significant difference ($P>0.05$) after ultrafiltration; The TK of two groups at the time points after ultrafiltration

基金项目: 贵州省社发攻关项目资金资助(黔科合 SY20083030)

作者单位: 563000 遵义 遵义医学院附属医院麻醉科(牛 伟、张 红、蔡回钧、丁 珺);455000 安阳,安阳肿瘤医院麻醉科(牛 伟)

通讯作者: 张 红, Email: hianzhang@tom.com

had no significant difference than those at T1 ($P > 0.05$); Comparison between two groups: ultrafiltration had no significant effect on the plasma viscosity, IR, Agrbc, TK and Fib between two groups ($P > 0.05$); The Hct at different time points after ultrafiltration in C group were significantly higher than those in W group ($P < 0.05$). 3. Postoperative follow-up results: ICU days, ventilation time and drainage volume in C group were less than those in W group ($P < 0.05$). **Conclusion** Application of ultrafiltration in infants could rapidly increase the Hct levels during ECC, also could reduce postoperative edema of various organs, decrease the postoperative ICU days of patients, diminish postoperative complications and postoperative bleeding, and improve the recovery of the heart, lungs and other organs. At the same time, It has no significant effect on the red blood cell deformability, while might have some impact on the aggregation of red blood cells.

[Key words]: Extracorporeal circulation; Ultrafiltration; Hemorheology; Infant

体外循环(extracorporeal circulation, ECC)过程中的多种原因,均会使血液流变学发生明显变化^[1],而血液流变学与某些疾病的发生、发展密切相关^[2]。由于婴幼儿特殊的病理生理特点,其变化更为严重。本课题的目的是通过观察婴幼儿 ECC 中血液流变学指标的变化,来评估超滤对婴幼儿血液流变学的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 JISTRA HL-20 型人工心肺机(德国);Medtronic 膜式氧合器(MEDTRONIC 公司);中空纤维血液超滤器(东莞科威医疗器械有限公司);SOUTH 990-BZ 型自动血液黏度动态分析仪(贵州鹏达技术发展有限公司);Omeda 7100 型多功能麻醉呼吸机(美国)。

1.2 临床病例及分组 经本院伦理委员会同意,患儿家属术前均签署知情同意书。选 26 例在 ECC 下行心内直视手术的非紫绀型先天性心脏病患儿,术前 ASA I ~ II 级,心功能(NYHA) I ~ II 级;肝、肾、凝血功能正常,无药物过敏史。分为无超滤组(W 组)和超滤组(C 组),每组各 13 例。复杂的先心病、心脏肿瘤、二次心脏手术、严重肺动脉高压(PAP > 50 mmHg);肝素耐药;复跳困难(除颤 > 4 次或重新转机者)、停机困难及手术时间 > 5 h 者除外。一般资料见表 1。

1.3 麻醉与监测 患儿肌肉注射氯胺酮 $6 \sim 7$ mg/kg 入睡后入室,监测心电图、血压、指脉博氧饱和度。行动脉、中心静脉穿刺,监测有创动脉压、中心静脉压。麻醉诱导用咪达唑仑 $0.05 \sim 0.1$ mg/kg,依托咪酯脂肪乳 $0.2 \sim 0.3$ mg/kg、舒芬太尼 $0.5 \sim 1$ μ g/kg 和哌库溴铵 0.08 mg/kg 静脉缓慢注射后快速行气管插管,采用压力呼吸模式控制呼吸,压力控制在 $8 \sim 10$ cmH₂O,呼吸频率 $20 \sim 24$ 次/min,维持呼气末二氧化碳分压为 $35 \sim 50$ mm Hg;术中用微量注射泵持续静脉输注丙泊酚 $50 \sim 100$ μ g/(kg · min)、舒芬太尼 $0.5 \sim 1$ μ g/(kg · h),间断吸入 $1\% \sim 1.5\%$ 七氟

烷维持麻醉,哌库溴铵间断静注维持肌松。术中常规监测患儿鼻咽温、肛温和血气分析。

1.4 ECC 管理 用 6% 羟乙基淀粉(130/0.4)、新鲜冰冻血浆和浓缩红细胞预充管道。肝素化(肝素 3 mg/kg)后,常规建立 ECC。主动脉根部插入灌注针固定后连接心肌保护液灌注装置。采用浅低温高流量 ECC,灌注流量 $120 \sim 150$ ml/(kg · min),维持平均动脉压在 $30 \sim 50$ mm Hg,鼻咽温控制在 $30 \sim 32^\circ\text{C}$,转流中采用中度血液稀释,维持红细胞比容(Hct)在 $0.23 \sim 0.25$ 。心肌保护于升主动脉阻断时经主动脉根部灌注改良 St.Thomas 冷晶体停搏液 20 ml/kg,以后每 30 min 灌注首次量的一半,同时经吸引器将停搏液吸到体外。转流期间断行血气分析,以维持电解质、酸碱平衡。

1.5 超滤方法 W 组: ECC 中不进行超滤;C 组: ECC 前将超滤器入口端接动脉微栓过滤器出口旁路,出口端与静脉回流室相接,预充排气后旷置,于 ECC 复温至 33°C 时进行超滤,应用人工心肺机的副泵控制超滤器的超滤流量 $10 \sim 15$ ml/(kg · min)。超滤时适当提高灌注流量以补充超滤的分流量,保证重要组织和脏器的血流灌注,保持动脉血压的稳定。

1.6 标本采集 两组患儿分别于转流前(T1)、升主动脉阻断后 10 min(T2)、复温至 33°C 时(T3)、停机时(T4)、术后 24 h(T5)和术后 36 h(T6)采动脉血 5 ml,置入肝素钠抗凝管内,常温下 4 h 内送检,于温度(36.5 ± 1) $^\circ\text{C}$ 下用 SOUTH 990-BZ 型全自动血液黏度动态分析仪检测血液流变学相关指标;同时记录 ECC 转流时间、阻断升主动脉时间、手术时间及预充液成分和量;术后随访并记录患者的住院天数、ICU 天数、呼吸机辅助及撤离时间、输血量、引流量和尿量的情况。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本 t 检验或重复测量因素的方差分析。计数资料用率来表示,采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患儿临床资料比较 两组患儿在升主动脉开放后心脏均自动复跳,手术结束时顺利停机;两组在 ECC 转流、阻断升主动脉和手术时间均无明显差异($P>0.05$);患儿围术期无死亡病例,均顺利出院,见表 1。

2.2 两组患儿血液流变学变化 两组患儿时间点与超滤方法间无交互作用($P>0.05$)。两组患儿转流前血浆黏度、红细胞刚性指数(IR)、红细胞聚集指数(Agrbc)、红细胞变形指数(TK)、Hct、纤维蛋白原(Fib)比较无明显差异($P>0.05$);组内效应比

较;ECC 开始后两组患儿血浆粘度、IR、Agrbc、TK、Hct、Fib 总体呈下降趋势;超滤后,IR、Agrbc 比 T3 时明显升高($P<0.05$),术后 24 h、36 h 恢复并超过 T1($P<0.05$);超滤后各时间点 TK 无明显差异($P>0.05$);组间效应比较:血浆黏度、IR、Agrbc、TK、Fib 两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$);超滤后 Hct 各时间点 C 组比 W 组明显升高($P<0.05$),且术后 24 h、36 h 恢复并超过 T1($P<0.05$),见表 2。

2.3 两组患儿术后随访情况的比较 C 组 ICU 天数、呼吸机辅助及撤离时间、引流量均明显少于 W 组($P<0.01$);患儿住院天数、输血总量、ICU 尿量两组间比较无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 1 两组患儿临床资料及转机指标比较($n=13, \bar{x}\pm s$)

指 标	W 组	C 组	t 值	P 值
性 别(男/女)	8/5	7/6		0.15
ASD、VSD、PDA 及复合 [#]	4/5/4	4/6/3		6.92
年龄(岁)	2.91±1.26	2.72±1.52	0.35	0.73
体重(kg)	12.00±1.88	11.87±2.64	0.15	0.88
转流时间(min)	60.69±16.77	65.07±19.08	-0.06	0.53
升主动脉阻断时间(min)	32.69±15.18	32.21±15.47	0.08	0.93
回输机血量(ml)	430.77±125.06	296.43±102.78 [*]	3.06	0.00
手术时间(min)	168.46±29.43	168.67±22.48	0.03	0.98

注:与 W 组比较^{*} $P<0.05$;[#]同时合并 ASD、VSD、PDA 两者以上者,ASD:房间隔缺损,VSD:室间隔缺损,PDA:动脉导管未闭。

表 2 两组各时间点血液流变学比较($n=13, \bar{x}\pm s$)

指标	组别	T1	T2	T3	T4	T5	T6
血浆黏度 (mPa/s)	W 组	1.19±0.22	1.05±0.90	0.98±0.16 [#]	1.05±0.93 [#]	1.10±0.20	1.45±0.79 [*]
	C 组	1.24±0.49	1.21±0.37	1.07±0.13 [#]	1.04±0.14 [#]	1.28±0.27 [*]	1.30±0.21 [*]
IR	W 组	3.67±1.03	3.21±1.04 [#]	3.87±2.99	3.18±1.51	3.88±1.51 [#]	4.57±1.66 [#]
	C 组	3.89±1.56	2.75±1.17 [#]	3.64±1.26	4.22±1.24 [*]	4.25±1.23 ^{**}	4.43±1.87 ^{**}
TK	W 组	0.75±0.11	0.71±0.16 [#]	0.78±0.28	0.70±0.17	0.81±0.16	0.75±0.18
	C 组	0.74±0.20	0.61±0.50 [#]	0.75±0.14	0.80±0.13	0.75±0.22	0.77±0.14
Agrbc	W 组	2.27±0.14	2.20±0.32	2.18±0.26 [#]	2.29±0.38	2.41±0.21 [#]	2.47±0.23 [#]
	C 组	2.28±0.14	2.17±0.26	2.13±0.30 [#]	2.37±0.18 [*]	2.45±0.47 ^{**}	2.44±0.22 ^{**}
Hct(L/L)	W 组	0.37±0.04	0.26±0.01 [#]	0.30±0.02 [#]	0.31±0.11	0.33±0.05	0.40±0.01 [*]
	C 组	0.38±0.01	0.21±0.01 [#]	0.28±0.01 [#]	0.40±0.01 ^{* *}	0.42±0.02 ^{** *}	0.46±0.11 ^{** *}
Fib(g/l)	W 组	2.65±0.55	1.65±0.39 [#]	1.37±0.23 [#]	1.51±0.91 [#]	4.07±0.59 ^{**}	4.46±0.81 ^{**}
	C 组	2.65±0.68	1.47±0.71 [#]	1.35±0.44 [#]	1.33±0.54 [#]	4.06±0.53 ^{**}	4.91±1.51 ^{**}

注:组内各时间点与 T1 比较,[#] $P<0.05$,与 T3 比较,^{*} $P<0.05$;组间比较:^{*} $P<0.05$;1 mm Hg=0.133 kPa。

表 3 两组患儿术后随访情况比较($n=13, \bar{x}\pm s$)

指 标	W 组	C 组	t 值	P 值
住院天数(d)	19.30±6.04	18.21±6.12	0.48	0.63
ICU 天数(d)	4.92±0.64	3.39±0.61 [*]	0.45	0.00
呼吸机辅助时间(min)	346.54±107.23	239.39±47.69 [*]	3.50	0.00
呼吸机撤离时间(min)	385.38±114.01	287.00±61.81 [*]	2.89	0.01
ICU 的输血总量(ml)	192.31±138.21	183.33±192.42	0.14	0.89
引流量(ml)	356.31±55.62	247.73±51.74 [*]	5.35	0.00
ICU 尿量(ml)	2475.31±726.85	2239.73±927.55	0.74	0.46

注:与 W 组比较,^{*} $P<0.05$

3 讨论

ECC 是一个复杂的非生理过程,多种因素作用均对血液成分产生影响,使血液流变学发生明显变化^[3]。同时婴幼儿心、肺发育尚不成熟,组织间隙较为疏松,ECC 后易使多余的水分进入组织,导致组织、器官水肿,且由于肾功能尚未发育完善,水份不易排出体外,致使术后并发症增多,死亡率较高^[4-6]。超滤是模拟肾小球过滤的原理,利用跨膜压差,将血液中的水份和可溶性小分子物质与血管内成分和血浆蛋白分开并滤出^[7]。滤出液成分相当于原尿,主要是体内代谢产物如水、葡萄糖、尿素和炎症因子、氧自由基等小分子物质,蛋白质含量几乎为零^[8]。超滤能迅速提高 Hct 和蛋白质浓度,增加血液的携氧能力,保证机体各组织器官的氧供,提高血浆胶体渗透压,减轻组织间隙水肿,使患者术后血液动力学更趋平稳,肺部并发症减少^[9-13]。本试验 ECC 中应用超滤后,Hct 明显提高;术后随访,超滤组患儿 ICU 停留天数、呼吸机辅助及撤离时间、引流量均明显少于无超滤组,表明超滤有利于 ECC 后患儿的迅速恢复。

血液流变学是研究血液在不同生理、病理及力学状态下的流动性、凝固性、血细胞的变形性、聚集性和黏附性以及它们间的相互关系,血流与血管壁之间的作用以及这种变化的物质基础。红细胞是血液中主要的有形成分,对血液流变性的影响亦最大^[14]。红细胞的变形性和聚集性是其主变特性。红细胞的变形性是保障微循环正常灌注的必要条件,是微血管血液流变现象的重要基础^[15],临床上常用 IR、TK 作为主要的测定指标。红细胞聚集性增加,促使血液黏度增大,导致血流阻力增大,血流量减少,引起组织灌注不足;同时也是体内血栓形成的危险因素之一^[14]。Agrbc 是反映红细胞聚集程度的一个指标。本试验结果显示:ECC 开始后,两组患儿 IR、Agrbc 明显低于转流前,可能是由于应用麻醉药物后外周血管扩张,血流阻力降低和 ECC 后血液稀释所致;而红细胞聚集减少,对改善微循环有一定的好处。超滤后 IR 及 Agrbc 高于超滤前,与血液浓缩有关;但 Agrbc 增高的程度是否会增加血栓形成的危险或微循环障碍,还有待进一步的研究。两组间 TK 无明显变化,表明超滤对红细胞变形性的影响不大。

血浆作为红细胞悬浮液的介质,有一定的黏度,血浆黏度取决于血浆内高分子化合物的含量,通常,血浆黏度与 Fibrinogen 含量成正相关。血浆黏度、Hct 都是

影响全血黏度的决定因素,同时 Hct 和氧的运输有关;要达到红细胞氧的最大运输,需要两者合适的比例,即血液的适度稀释。本实验结果:ECC 血液稀释后两组患儿血浆黏度、Hct 及 Fibrinogen 明显降低;理论上说,低温 ECC 状态下 Hct 大于 0.3 可能降低微循环血流,因此通常将 Hct 控制在 0.3 以下^[4];但过度稀释,使 Hct 过低,又可导致氧供不足。因此,本实验患儿 Hct 维持在 0.23~0.25。有报道^[15]改良超滤后患者的血液有形成分增加;血红蛋白、Hct、红细胞计数、总血浆蛋白、Fibrinogen 及血小板计数等明显增高。本实验超滤后血浆黏度、Hct 明显高于超滤前,但 Fibrinogen 含量无明显变化,这与报道的不一致,可能与超滤的时机和方法不同有关。虽然两组患儿术后 24 h、36 h 血浆黏度、Hct 及 Fibrinogen 均恢复到转流前,但从术后随访的情况看,超滤组患儿在 ICU 的停留时间、呼吸机辅助、撤离时间及引流量明显少于无超滤组,因此,对患儿的恢复,超滤组更优于无超滤组。

综上所述,超滤可排除体内过多的水分,迅速提高 Hct,减少患儿的引流量,缩短患儿在 ICU 的停留时间、呼吸机辅助及撤离时间,有利于心、肺及全身各脏器功能的恢复。同时,超滤对婴幼儿 ECC 后的红细胞变形性无明显影响,可增加 Agrbc,对红细胞的聚集性可能有一定影响。

参考文献:

- [1] Lespron Robles MC. Systemic inflammatory response in Pediatric cardiac surgery [J]. Arch Cardiol Mex, 2006, 76(Suppl2):S92-99.
- [2] 秦任甲.临床血液流变学[M].北京:北京大学医学出版社,2006,6:45.
- [3] 刘瑞芳,邢家林,缪娜,等.小体质量婴幼儿体外循环管理策略及合理使用超滤的重要性[J].心肺血管病杂志,2009,28(2):100-103.
- [4] 龙村等.体外循环灌注技术[M].北京:人民出版社,2009,2:120.243.
- [5] 李姗姗,李佩,韩明,等.体外循环中超滤对瓣膜置换病人术后肺氧合功能的影响[J].贵州医药,2012,36(9):783-786.
- [6] 马丽娟,卢红光,高源,等.体外循环中平衡超滤对肾功能的影响[J].中国体外循环杂志,2011,10(3):88-89.
- [7] Choudhary SK, Talwar S, Airan B, et al. A simplified circuit of modified ultrafiltration [J]. Heart Lung Circ, 2007, 16(2):113-115.
- [8] 刘梅,彭莉,胡卫.超滤法在体外循环中的应用[J].中国胸心血管外科临床杂志,2007,22(2):143-144.
- [9] 曹亮,杨一峰,杨进福.体外循环术后 ARDS 的肺保护性通气治疗[J].中南大学学报(医学版),2007,32(6):1080-1084.

(转第 247 页)

· 临床研究 ·

HTK 液与含血停搏液用于瓣膜置换联合
房颤射频消融治疗患者术中心肌保护的研究

辛 梅, 赵 凯, 倪尔连, 刘 刚, 郭晓臣, 岳 琴, 魏晓红, 欧阳辉, 金振晓, 张近宝

[摘要]:目的 比较 HTK 液及含血心肌保护液对瓣膜置换合并房颤射频消融手术患者的心肌保护效果及其对临床预后的影响。**方法** 2011 年 7 月至 2012 年 2 月, 连续 36 例瓣膜病合并房颤拟行瓣膜置换(或成形)并同期行房颤射频消融治疗患者纳入本研究, 随机分为两组: HTK 液组采用 HTK 液作为心肌保护液, 单次灌注诱导心脏停搏; 含血停搏液组使用 1:4 含血心肌保护液, 在心肌缺血期间每隔 20 min 灌注一次。分别在术前(T1)、主动脉开放后 2 h(T2)、术后 24 h(T3)和术后 48 h(T4)采集血液检测血清肌钙蛋白 T(cTnT)、肌酸激酶(CK)、心肌型肌酸激酶同工酶(CKMB)、肌型肌酸激酶同工酶(CKMM)浓度, 同时记录患者围术期心律失常的发生率、术后机械通气及 ICU 停留时间、并发症发生情况及临床转归等数据。**结果** HTK 液组患者平均灌注量($1\,922.2 \pm 399.3$) ml; 含血停搏液组患者平均灌注(3.06 ± 0.72)次, 平均灌注量($2\,837.3 \pm 249.6$) ml, 两组患者心脏均停跳良好。两组患者血液中的 cTnT、CK、CKMB 和 CKMM 浓度在主动脉开放后 2 h 时均显著升高, 术后 24 h 时仍处于较高水平, 术后 48 h 时呈下降趋势。HTK 组血清 cTnT、CK、CKMB 和 CKMM 浓度在开放后 2 h、术后 24 h、术后 48 h 均显著低于含血停搏液组。HTK 组体外循环费用显著高于含血停搏液组($P < 0.05$); 随访期间两组患者生活质量评价无显著性差异。**结论** 瓣膜置换合并房颤外科治疗术中应用 HTK 液进行心肌保护, 围术期心肌损伤酶学指标较含血停搏液有所改善, 对术后恢复作用与含血停搏液相似。

[关键词]: 瓣膜置换; 心房纤颤; 射频消融; 心肌保护; HTK 液; 含血停搏液

[中图分类号]: R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:** 1672-1403(2013)04-0207-06

The cardio-protective effects of HTK solution and conventional blood cardioplegia in patients underwent valvular surgery combined with radio frequency atrial ablation: a randomized controlled study

Xin Mei, Zhao Kai, Ni Er-lian, Liu Gang, Wu Xiao-chen, Yue Qin, Wei Xiao-hong,

Ouyang Hui, Jin Zhen-xiao, Zhang Jin-bao

Department of Cardiothoracic Surgery, General Hospital of Chengdu Military Area, Chengdu 610083, China;

Department of Cardiac surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Zhang Jin-bao, Email: cpbchengzongxin@sina.cn;

Jin Zhen-xiao, Email: jinzx10262@aliyun.com

[Abstract]: Objective To compare the cardio-protective effects and clinical outcomes of HTK solution and conventional blood cardioplegia in patients underwent valvular surgery combined with radio frequency atrial ablation. **Methods** Thirty-six consecutive patients scheduled for valvular replacement or valvular plasty surgery combined with radio frequency atrial ablation between July 2011 and Feb 2012 in our department were included in this study. Patients were randomized into 2 groups: HTK group and conventional blood cardioplegia group. HTK group received single HTK solution antegrade perfusion for intraoperative myocardial protection, while conventional blood cardioplegia group received intermittent 1:4 blood-cardioplegia antegrade perfusion every 20 min for intraoperative myocardial protection. Serial blood samples were obtained for detecting serum concentrations of cardiac troponin T (cTnT), creatine kinase (CK), MB isoenzyme of creatine kinase (CKMB) and MM isoenzyme of creatine kinase (CKMM). Data of clinical outcomes, such as post-operative mortality, complications, the incidence of arrhythmia, time of mechanical ventilation and ICU stay,

作者单位: 610083 成都, 成都军区总医院心血管外科(辛梅、张近宝、倪尔连、刘刚、郭晓臣、岳琴、魏晓红、欧阳辉); 610083 成都, 成都军区总医院神经外科(赵凯); 710032 西安, 第四军医大学西京医院心血管外科(金振晓)

通讯作者: 张近宝, Email: cpbchengzongxin@sina.cn; 金振晓 Email: jinzx10262@aliyun.com

cost of cardiopulmonary bypass, early post-operative life quality, were also recorded. **Results** The volume of HTK solution used was $1\,922.2\pm399.3$ ml for single perfusion, the total volume of blood cardioplegia was $2\,837.3\pm249.6$ ml, and the frequency was 3.06 ± 0.72 . There was no death in both groups. The most popular complication was peri-operative arrhythmia, and its occurrence was similar in both groups. There were no significant differences according to post operative ventilation time, ICU time and early post operative life quality between the two groups. The cardiopulmonary bypass cost was significantly higher in HTK group, although the serial post-operative serum concentrations of cTnT, CK, CKMB, CKMM were significantly decreased in HTK patients compared with blood cardioplegia patients at their corresponding time points. **Conclusion** Compared with intermittent antegrade blood cardioplegia, intra-operative myocardial protection with single HTK solution perfusion is associated with decreased myocardial injury biochemical markers release, but has no significant influences on clinical outcomes in patients underwent valvular surgery combined with radiofrequency atrial ablation.

[Key words]: Valve replacement; Atrial fibrillation; Myocardial protection; Radiofrequency ablation; HTK; Blood cardioplegia

体外循环下开展瓣膜置换术及心房射频消融术是当前国内外治疗瓣膜病变合并房颤的常用方法。该手术比较复杂,心肌缺血时间相对较长,可能会增加心肌顿抑、心肌细胞凋亡或坏死的发生率,影响术后患者的顺利恢复。因此,良好的术中心肌保护是这些患者顺利康复的重要因素。目前,心脏手术过程中心肌保护技术主要是化学停搏和低温,即采用心脏停搏液诱导心脏停搏,同时降低心肌温度。常用的心肌保护液可以分为两类^[1]:一类以 St Thomas Hospital 液为代表模拟细胞外液成分,采用高钾离子浓度诱导心脏停搏。多数心脏中心以此为基础,加入氧合血制成含血心肌保护液用于临床心肌保护^[2]。对于手术时间较长的患者,需要在心肌缺血期间进行多次重复灌注,可导致心肌细胞水肿及高血钾等电解质紊乱情况,是围术期心脏功能抑制的重要原因之一。另一种心肌保护液模拟细胞内液,以低钠、无钙和一定浓度的钾离子诱导心脏停搏,这类心肌保护液以康斯特保护液(HTK 液)为代表。HTK 液缓冲能力强,在一定程度上可以减轻心肌细胞的水肿,灌注一次可使心脏安全耐受较长时间的缺血,常用于心脏移植的供心保存^[3]。在类似于同期进行瓣膜手术和房颤射频消融等需要较长时间心脏停搏的心脏手术中,采用价格较为低廉的常规含血心脏停搏液还是采用价格较高的 HTK 液进行心肌保护,目前还没有确定的结论。本院以瓣膜病变合并房颤的患者为研究对象,比较 HTK 液及常规含血心肌保护液的心肌保护效果,同时观察其对患者临床恢复和转归的影响,以期为这一问题的解答提供参考。

1 资料与方法

1.1 患者资料 本研究经医院伦理委员会批准。所有患者均签署书面知情同意书。2011 年 7 月至 2012 年 2 月,本中心连续 36 例瓣膜病变合并房颤,并拟在体外循环下行瓣膜置换和心房射频消融患者纳入本研究。根据计算机随机数列将患者随机分为

HTK 液组和含血停搏液组,适当调整使两组患者数量相等。纳入本研究但是未按照计划进行手术的患者排除,二次手术、合并严重高血压、2 型糖尿病和其它系统性疾病患者排除。患者的一般情况见表 1。

表 1 两组患者一般临床资料的比较 (n=18, $\bar{x}\pm SD$)

项目	HTK 液组	含血停搏液组	P 值
女/男(例)	10/8	10/8	1
年龄(岁)	55.0±12.9	51.0±11.5	0.23
体重(kg)	59.1±12.8	51.1±11.6	0.17
心胸比	0.75±0.11	0.72±0.17	0.58
左房左右径(mm)	54.0±12.0	53.7±11.4	0.36
左室左右径(mm)	49.9±7.3	49.0±8.1	0.44
EF 值(%)	38.4±3.5	39.6±2.1	0.38
心功能分级			0.33
Ⅲ	16	15	
Ⅳ	2	3	
诊断			>0.05
风湿性瓣膜病(例)	14	13	
退行性瓣膜病(例)	1	0	
先天性瓣膜病(例)	3	5	

1.2 麻醉、手术、体外循环及心肌保护方法 所有患者均通过桡动脉穿刺置管监测动脉压,经右锁骨下静脉穿刺置管,建立中心补液通路并监测中心静脉压,留置尿管。咪达唑仑(0.2~0.3 mg/kg)、丙泊酚(1~2 mg/kg)或依托咪酯(0.3 mg/kg)、芬太尼(20~30 μ g/kg)、维库溴铵(诱导剂量 0.1 mg/kg)等药物诱导和维持麻醉。胸骨正中切口,按照 3 mg/kg 肝素静脉推注进行全身肝素化。升主动脉和上下腔静脉分别插管建立体外循环,体外循环开始后,即全身降温,鼻咽温度达到 32℃后,阻断升主动脉,经主动脉根部顺行灌注心脏停搏液诱导心脏停搏。HTK 组灌注 4~8℃的 HTK 液,单次灌注剂量为 30 ml/kg,同时在冠状静脉窦放置吸引管,吸除排出液以避免 HTK 液进入血液循环。在心脏停跳前,HTK 液的灌注压力维持在 100 mm Hg,心脏停搏后,灌注压力降至 50 mm Hg,完成剩余液体的灌注。含血停

搏液组(晶体液配方:勃脉力 A 500 ml、10% KCl 10 ml、25% MgSO₄ 5 ml、5% NaHCO₃ 20 ml、20% 甘露醇 6.5 ml、2% 利多卡因 10 ml)灌注 4~8℃ 的含血停搏液,首次剂量为 20 ml/kg,此后每 20 min 灌注一次,剂量为 10 ml/kg。心肌保护液灌注完成后依次行房颤射频消融术(美国 AtriCure 双极射频消融系统)、左房折叠术、瓣膜成形术或瓣膜置换术。心脏停搏期间,鼻咽温度维持在 28~32℃。心内操作结束后,排出左心系统气体,开放升主动脉,恢复冠脉血液供应。心跳恢复后,逐渐复温并脱离体外循环。鱼精蛋白中和肝素,止血关胸后转入 ICU。

1.3 围术期监护及数据采集 术后 72 h 持续的心电监护以评估心律失常,心律失常包括室性早搏、室颤、传导阻滞等,在开放升主动脉和术后出现时,使用利多卡因或电击除颤予以纠治。分别在术前(T1)、主动脉开放后 2 h(T2)、术后 24 h(T3)和术后 48 h(T4)采集血液送本院临床检验科检测血清肌钙蛋白 T(cTnT)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CKMB、CKMM)浓度(Beckman Access 2 化学发光分析仪)。围术期心律失常的发生情况,呼吸辅助支持时间、ICU 滞留时间及术后生活质量等参数同时收集。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析,计数资料采用均数±标准差(mean±SD)表示,非正态分布资料转化成近似正态分布资料后进行检验。两组之间组间比较应用单因素方差分析,组内比较采用重复测量设计的方差分析。计

数资料组间比较应用 *t* 检验,等级资料进行秩和检验,*P* <0.05 表示统计学差异。

2 结果

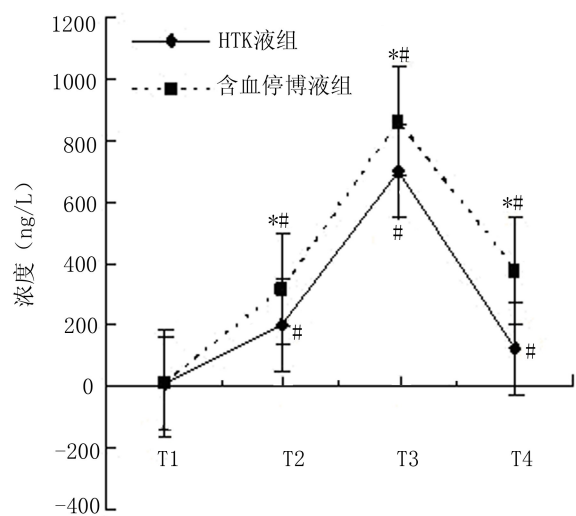
2.1 两组患者术中一般情况比较 HTK 液组无二次灌注,心脏停跳良好,持续时间长,术中心电活动;含血停搏液组停跳良好,阻断期间有轻微心电活动。详见表 2。

2.2 两组患者心肌酶学指标比较 两组患者血液中的 cTnT、CK、CKMB 和 CKMM 浓度在 T2 时均有升高,在 T3 时仍处于较高水平,T4 时均呈下降趋势,HTK 组下降更明显。与 T1 时比较,两组均有统计学差异(*P* <0.05);HTK 组中 cTnT、CK、CKMB 和 CKMM 浓度在 T2、T3、T4 时低于含血停搏液组,比较有统计学意义(*P* <0.05)。见图 1、2、3、4。

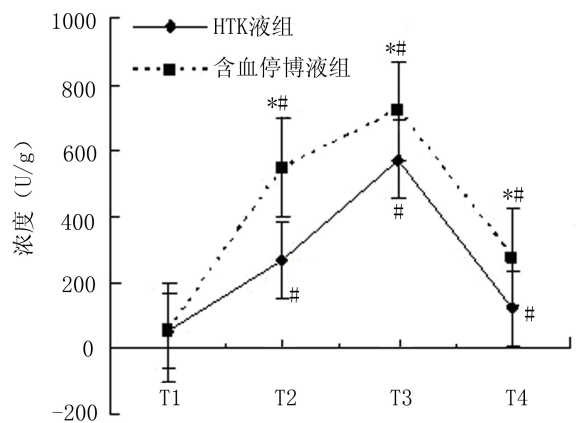
2.3 两组患者心律失常发生情况 升主动脉开放后,发生室性心动过速 1 例,一次性给予盐酸胺碘酮注射液 30 mg,随即以 10~20 μg/(kg·min)微量泵持续给入;发生 II-III 房室传导阻滞 2 例,均一次性给予 10 μg 异丙肾上腺素;术后发生窦性心动过缓 2 例,一次性给予阿托品 1 mg、654-2 10 mg,心律均恢复正常。含血停搏液组:升主动脉开放后,发生窦性心律不齐 2 例、心脏 III 度传导阻滞 1 例,均给予 10 μg 异丙肾上腺素予以纠治;术后发生窦性心动过速 1 例,一次性给予盐酸胺碘酮注射液 30 mg,随即以 10~20 μg/(kg·min)微量泵持续给入;发生室颤 1 例,一次性给予利多卡因 100 mg、肾上腺素 10 μg,

表 2 两组患者体外循环术中一般资料的比较(n=18, $\bar{x}\pm SD$)

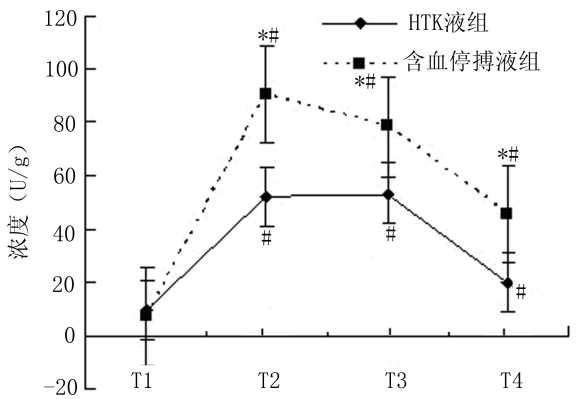
项目	HTK 组	含血停搏液组	P 值
手术方式			
二尖瓣置换(MVR)(例)	4	2	
主动脉瓣置换(AVR)(例)	2	3	
二尖瓣和主动脉瓣置换(DVR)(例)	6	6	
DVR+三尖瓣成形(TVP)(例)	6	7	
体外循环时间(min)	118.5±22.08	115.5±24.73	0.29
升主动脉阻断时间(min)	83.2±22.35	80.7±20.67	0.37
停搏液用量(ml)	1922.2±399.3	2837.3±249.6	0.007
灌注次数	1	3.06±0.72	0.018
总灌注时间(min)	7.44±0.78	8.27±0.54	0.032
体外循环中最低体温(℃)	30.8±1.4	31.0±0.8	0.46
体外循环中最低 Hct(L/L)	0.24±0.04	0.22±0.05	0.08
体外循环中尿量(ml)	655±170	610±140	0.29
复苏后心律失常(例)	3	3	
再灌注后自动复跳(例)	17	15	
停机后应用多巴胺(例)	18	18	
停机后应用肾上腺素(例)	15	17	
停机后窦性心律/房颤心律(例)	18/0	18/0	
停机后起搏心律/自主心律(例)	10/8	12/6	



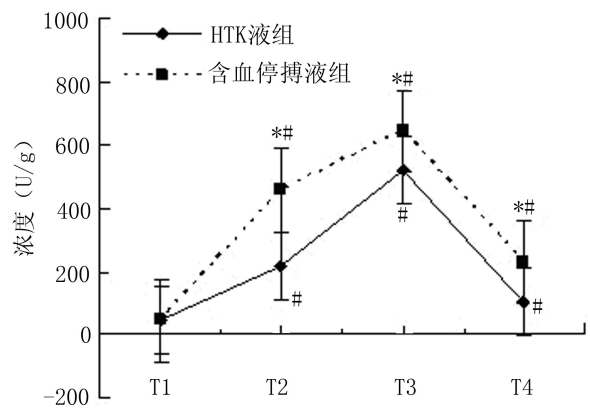
注：组间比较* $P < 0.05$ ；与T1比较# $P < 0.05$ 。
图1 两组患者围术期不同时点血浆 cTnT 变化



注：组间比较* $P < 0.05$ ；与T1比较# $P < 0.05$ 。
图2 两组患者围术期不同时点血浆 CK 变化



注：组间比较* $P < 0.05$ ；与T1比较# $P < 0.05$ 。
图3 两组患者围术期不同时点血浆 CKMB 变化



注：组间比较* $P < 0.05$ ；与T1比较# $P < 0.05$ 。
图4 两组患者围术期不同时点血浆 CKMB 变化

随后 2 例患者心律均恢复正常。见表 2、3。

2.4 两组患者临床转归 含血停搏液组 1 例患者在 ICU 动脉血二氧化碳分压 (PaCO_2) ≥ 50 mm Hg、氧分压 (PaO_2) ≤ 60 mm Hg, 诊断为呼吸衰竭, 行二次插管呼吸机辅助呼吸, 待呼吸功能有所改善后改面罩持续低流量吸氧, 联合药物治疗后呼吸衰竭改善; HTK 液组 1 例患者 ICU 24 h 尿量 < 400 ml、内生肌酐清除率 $10 \sim 25$ ml/min、血肌酐 $450 \sim 707$ $\mu\text{mol/L}$ 、水、电解质和酸碱平衡紊乱, 诊断为肾衰, 早期即行腹膜透析, 严格控制液体出入量, 及时纠正高钾及代谢性酸中毒, 患者肾衰 72 h 之内得以改善; HTK 液组 2 例、含血停搏液组 3 例患者术后在 ICU 出现持续低血压, 皮肤湿冷、苍白, 尿量显著减少 (< 20 ml/h), 肺毛细血管楔压 (pulmonary capillary wedge pressure, PCWP) ≥ 18 mm Hg, 低氧血症和代谢性酸中毒, 心肌酶谱持续性监测发现 cTnT、CKMB 呈持续性增高, 行床旁超声提示心肌收缩力差, 心脏射血功能低, 诊断为心衰, 适当补充血容量、联合应用正性肌力药物如多巴胺、去甲肾上腺素以维持收缩压 ≥ 90 mm Hg。其中 1 例患者采用肺动脉插管监测血流动力学, 使用主动脉内球囊反搏和心室机械辅助装置, 使用多巴胺基础上加用少量硝普钠。所有心衰患者治疗 4 d 后均有明显改善。术后两组患者均无死亡发生, 无永久起搏器安装现象。HTK 液组房颤复发率与含血停搏液组比较, 无显著性差异; 住院期间并发症发生情况, 两组比较无显著性差异; 呼吸辅助支持和 ICU 滞留时间 HTK 液组与含血停搏液组比较无显著差异。体外循环费用 HTK 液组高于含血停搏液组 ($P < 0.05$); 两组患者术后 3 个月复查心功能均恢复至 I ~ II 级; 平均随访时间比较, 两组无显著性差异; 术后回访: HTK 液组患者突发脑溢血

表 3 两组患者临床转归相关数据的比较 (n = 18, $\bar{x} \pm SD$)

项目	HTK 液组	含血停搏液组	P 值
术后心律失常情况(例)	2/18	2/18	
术后房颤复发情况(例)	2/18	3/18	
呼吸辅助时间(h)	40.32±4.09	39.75±5.63	0.27
ICU 滞留时间(d)	4.36±1.28	4.44±2.89	0.41
围术期死亡(例)	0	0	
住院期间并发症发生情况			
血红蛋白尿(例)	2	1	
呼吸衰竭(例)	0	1	
肾衰竭(例)	1	0	
心衰(例)	2	3	
体外循环费用(万元)	6.81±0.68	6.14±0.71	0.03
平均随访时间(月)	6.4±1.6	6.5±1.5	0.52
随访期间心律失常发生(例)	2	2	
随访期间房颤复发(例)	2	1	
随访期间死亡(例)	1	0	
随访期间生活质量评价*	62.5±4.5	64.5±3.0	0.36

注: * 为 CCQQ 的 SF-36 评分。

死亡 1 例,发生窦性心律不齐 1 例、心动过缓 1 例,房颤复发 2 例;含血停搏液组发生窦性心律不齐 2 例,房颤复发 1 例。随访期间两组患者发生的心律失常均未行任何干预措施即恢复窦性心律。两组患者生活质量评价比较无显著性差异。见表 3。

3 讨 论

房颤是一种临床上常见的心律失常,我国房颤的发生率约为 0.77%,而在重症瓣膜病患者中约 45%~60%合并房颤。房颤可引起中风、心衰等并发症,严重影响患者的生活质量。瓣膜病变合并房颤的患者一般病史长,长期容量负荷及压力负荷重,心脏扩大,心肌受损,心功能差,且大多合并其他疾病和重要脏器功能不全,使心血管手术风险增加,并发症增多。瓣膜手术时,辅以射频消融术和左房折叠术是治疗瓣膜病合并房颤最常用的手术方式^[4],相对于单纯的瓣膜置换手术,这种术式需要更长时间的心脏停搏,对术中的心肌保护提出更高的要求。选用合适的心肌保护策略是手术成功和患者顺利康复的关键之一。在获得良好心肌保护效果的同时,尽量降低患者的费用也是灌注师的职责所在。常规含血停搏液和 HTK 液都是临床上常用的心肌保护液,前者价格低廉,但是需要多次灌注,术中需要打断术者的手术操作以完成心肌保护操作。后者价格昂贵,但是术中仅需要单次灌注,无需中断术者操作,可以节约体外循环和手术时间,可能有利于患者恢复。但是这两种心肌保护液的心肌保护效果和对患者的临床转归的影响,孰优孰劣还存在争论。

早期的研究认为,与常用的 St Thomas 冷晶体心

肌保护液相比,HTK 液可以提供更好的心肌保护效果^[5-7],特别对于体外循环时间长的重症复杂病例,由于减少了类似 St.Thomas 液多次灌注对手术操作的影响,缩短了心肌缺血时间。Beyersdorf 等^[8]比较多次血灌和单次 HTK 液灌注对心脏低温室颤的影响,发现在冠状动脉旁路移植外科手术中运用 HTK 液作为心肌保护液,心肌保护效果更好。近年来的临床研究提示,HTK 液单次灌注心肌保护的效果可能并不优于其它细胞外液型心肌保护液多次灌注^[9],也有研究认为多次冷氧合血心肌保护液或者 St Thomas' Hospital 晶体液灌注的效果要优于 HTK 液单次灌注^[10-11]。对于胸部大血管手术的患者,HTK 液的心肌保护效果略好于冷血心肌保护液^[12]。对于瓣膜置换和其它相对复杂的成人心脏手术,HTK 液单次灌注的心肌保护效果与冷氧合血心肌保护液多次灌注的效果相当^[13-14]。本研究选择瓣膜置换同时行心房射频消融术进行研究,以期对临床心肌保护液的选择增加新的证据。

3.1 本研究中的体外循环时间、升主动脉阻断时间比较,HTK 液组均略短于含血停搏液组,但无统计学意义;体外循环术中 Hct、尿量、最低体温比较也无统计学意义;心肌保护液用量、灌注次数、灌注时间比较,HTK 液组均低于含血停搏液组;再灌注期间心律失常、再灌注后自动复跳、停机后血管正性肌力药物使用、停机后心律等情况比较,两组无显著性差异。本研究中实验组采用 HTK 液作为心肌保护液,仅需要单次灌注,术者操作不需要打断,可能会节约手术时间,减少含血停搏液多次灌注对手术操作的影响,缩短了心肌缺血的时间,有利于患者恢复。另外,手

术时间较长的患者心肌缺血期间进行的多次重复灌注,可导致心肌细胞水肿及血中钾离子浓度过高等电解质紊乱情况;HTK 液缓冲能力强,在一定程度上可以预防心肌细胞的水肿,灌注一次便可使心脏安全耐受较长时间的缺血,更有利于患者术后的临床转归。

3.2 本研究发现两组所有患者血液中的 cTnT、CK、CKMB 和 CKMM 浓度在 T2 时均有升高,在 T3 时仍处于较高水平,T4 时均呈下降趋势,HTK 液组下降更明显且浓度均低于含血停搏液组,表明心肌损伤程度相对较轻。可能机制为:在心肌发生缺血时,代谢出现紊乱,导致心肌细胞多种酶释放入血,尤以 cTnT、CK、CKMM 和 CKMB 的敏感性强。心肌损伤时,CK 增高可能缺乏特异性,而 CKMB 对心肌具有更高的敏感性,在心肌损伤后 4~8 h 内就会升高,2~3 d 内恢复正常。因此,同时检测 CK 和 CKMB 可以更好的反映心肌的损伤程度。cTnT 对诊断具有更强的特异性,血清中 CK 升高一般提示含有 CK 的组织细胞的通透性增强或组织细胞的破坏严重。

3.3 术后两组患者均无死亡,无永久起搏器安装。HTK 液组与含血停搏液组比较房颤复发率、住院期间并发症发生情况、呼吸辅助支持和 ICU 滞留时间等方面无显著差异。而体外循环费用比较 HTK 液组明显高于含血停搏液组。HTK 组与含血停搏液组在临床转归方面差异性不大,可能因素为:术中手术团队及术后 ICU 团队人员不同,临床管理方法存在差异,最终导致 HTK 液对心肌的保护作用效果削弱,影响手术患者的临床转归。另外,HTK 液的费用远远高于含血心肌保护液,导致患者最终的住院费用增高,增加患者的经济负担。虽然选用合适的心肌保护策略是手术成功和患者顺利康复的关键之一,但是,在获得良好心肌保护效果的同时,尽量降低患者的费用也是灌注师的职责所在。因此,HTK 液在临床中推广使用有一定的限制。

3.4 术后 3 个月复查心功能,两组患者均恢复至 I~II 级;平均随访时间比较,两组无显著性差异;术后回访发现:HTK 组死亡 1 例,发生窦性心律不齐 1 例、房颤复发 2 例、心动过缓 1 例;含血停搏液组发生窦性心律不齐 2 例、房颤复发 1 例;随访期间两组患者生活质量评价比较,无显著性差异。可能因素为:瓣膜病变合并房颤的患者机体功能受多个因素的影响,单纯的术中 HTK 液这种心肌保护液的使用并不能改变患者最终的转归。

综上所述,瓣膜置换合并房颤外科治疗术中应用 HTK 液进行心肌保护,围术期心肌损伤酶学指标较常规含血停搏液有所改善,对术后恢复作用与常

规含血停搏液相似。

参考文献:

- [1] Chambers DJ, Fallouh HB. Cardioplegia and cardiac surgery: pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 127(1):41-52.
- [2] Jacob S, Kallikourdis A, Sellke F, *et al*. Is blood cardioplegia superior to crystalloid cardioplegia [J]? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2008, 7(3):491-498.
- [3] Bellamy CA, Nicely B, Mattice BJ, *et al*. Comparative analysis of clinical efficacy and cost between University of Wisconsin solution and histidine-tryptophan-ketoglutarate [J]. *Prog Transplant*, 2008, 18(3):166-172.
- [4] Gillinow AM, Wolf RK. Surgical ablation of atrial fibrillation [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2005, 48(3):169-177.
- [5] Kober IM, Obermayr RP, Brüll T, *et al*. Comparison of the solutions of Bretschneider, St. Thomas' Hospital and the National Institutes of Health for cardioplegic protection during moderate hypothermic arrest [J]. *Eur Surg Res*, 1998, 30(4):243-251.
- [6] Marten K, Schmiedl A, Schnabel PA, *et al*. Structural protection of the myocardial capillary endothelium by different forms of cardiac arrest and subsequent global ischemia at 5 degrees C [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1999, 47(4):205-212.
- [7] Liu J, Feng Z, Zhao J, *et al*. The myocardial protection of HTK cardioplegic solution on the long-term ischemic period in pediatric heart surgery [J]. *ASAIO J*, 2008, 54(5):470-473.
- [8] Beyersdorf F, Krause E, Sarai K, *et al*. Clinical evaluation of hypothermic ventricular fibrillation, multi-dose blood cardioplegia, and single-dose Bretschneider cardioplegia in coronary surgery [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1990, 38(1):20-29.
- [9] Demmy TL, Molina JE, Ward HB, *et al*. Custodiol versus Plegisol: A phase 3 multicentre myocardial protection study [J]. *Int J Angiol*, 2008, 17(3):149-153.
- [10] Fannelop T, Dahle GO, Salminen PR, *et al*. Multidose cold oxygenated blood is superior to a single dose of Bretschneider HTK-cardioplegia in the pig [J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 87(4):1205-1213.
- [11] Aarsaether E, Stenberg TA, Jakobsen φ, *et al*. Mechanoenergetic function and troponin T release following cardioplegic arrest induced by St Thomas' and histidine-tryptophan-ketoglutarate cardioplegia—an experimental comparative study in pigs [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2009, 9(4):635-639.
- [12] Scarscia G, Guida P, Rotunno C, *et al*. Myocardial protection during aortic surgery: comparison between Bretschneider-HTK and cold blood cardioplegia [J]. *Perfusion*, 2011, 26(5):427-433.
- [13] Braathen B, Jeppsson A, Scherstén H, *et al*. One single dose of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution gives equally good myocardial protection in elective mitral valve surgery as repetitive cold blood cardioplegia: a prospective randomized study [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 141(4):995-1001.
- [14] Viana FF, Shi WY, Hayward PA, *et al*. Custodiol versus blood cardioplegia in complex cardiac operations: an Australian experience [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2013, 43(3):526-531.

(收稿日期:2013-06-06)

(修订日期:2013-07-20)

· 临床研究 ·

富血小板血浆分离与急性等容性血液稀释 血液保护效果的对比研究

王 中,薛玉良,王洪武,贾克刚,王试福,王大勇,郭 珊,曾圳宏,石 丽,李 楠,王志强

[摘要]:目的 比较富血小板血浆(PRP)分离与急性等容性血液稀释(ANH)对体外循环(ECC)冠状动脉旁路移植术(CABG)患者的血液保护效果。**方法** 选取 CABG 术患者 60 例,随机分为 ANH 组(A 组)和 PRP 分离(P 组)。A 组在麻醉诱导后经颈内静脉放血,放出的血液待 ECC 结束后回输入患者体内。P 组在麻醉诱导后使用血细胞回收机经颈内静脉采集自体全血行 PRPS,分离出的贫血小板血浆(PPP)和红细胞即刻回输入患者体内,PRP 待 ECC 结束后回输入患者体内。于麻醉诱导后即刻(T0)、ECC 开始前即刻(T1)、ECC 开始后 5 min(T2)、患者出手术室时(T3)和术后 24 h(T4)五个时间点抽取血标本,测定红细胞比容(Hct)和血小板计数(Plt),使用全血凝血和血小板功能分析仪测定 T1 和 T4 两个时间点的凝血速率(CR)和血小板功能(PF)。纪录两组的 ECC 时间、主动脉阻断时间、围术期 4%琥珀酰明胶用量、术后 24 h 内胸腔引量和血制品使用量。**结果** Hct 值:两组各时相与 T0 时相比,T1、T2 和 T3 均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但 P 组 T1 下降不明显($P>0.05$),T4 时相均升高至 T0 水平($P>0.05$)。两组间比较,P 组 T1 和 T2 时均高于 A 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Plt 值:两组各时相与 T0 比较均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。两组间比较,T0 和 T4 时无差异($P>0.05$),T1 和 T2 时 P 组低于 A 组($P<0.05$),T3 时 P 组显著高于 A 组($P<0.01$)。CR 和 PF:A 组 T3 时较 T0 时显著降低($P<0.01$);P 组 T3 时则恢复至 T0 水平($P>0.05$)。P 组术后 24 h 胸腔引量和红细胞输入量显著少于 A 组。**结论** PRPS 术后回输和 ANH 对 ECC 下 CABG 术患者具有相似的血液保护效果,但是前者可以在不减少围术期血红蛋白水平的基础上极大程度地对血小板数量和功能进行维持,因而具有更为有效的血液保护作用。

[关键词]: 富血小板血浆;急性等容性血液稀释;体外循环;冠状动脉旁路移植术

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2013)03-0213-04

Comparison of platelet-rich plasma sequestration and acute normovolemic hemodilution on blood preservation

Wang Zhong, Xue Yu-liang, Wang Hong-wu, Jia Ke-gang, Wang Shi-fu, Wang Da-yong,
Guo Shan, Zeng Zhen-hong, Shi Li, Li Nan, Wang Zhi-qiang

Department of Cardiopulmonary Bypass; Teda International Cardiovascular Hospital, Tianjin 300457, China

[Abstract]: Objective To compare blood preservation effects of platelet-rich plasma sequestration (PRPS) and acute normovolemic hemodilution (ANH) in patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) with extracorporeal circulation (ECC). **Methods** 60 consecutive patients who were to undergo an elective CABG with ECC were randomly divided into ANH (A) group and PRPS (P) group. In A group, blood removal was performed via right internal jugular after induction of anesthesia. The blood was reinfused to the patient after ECC. In P group, blood was removed via right internal jugular after induction of anesthesia and was separated into platelet-poor plasma (PPP), PRP and blood cell by a cell saver (electa, Sorin Group, Italy). PPP and blood cell were reinfused back to the patient immediately. PRP was reinfused after ECC. Hb and Plt were measured after induction (T0), before ECC (T1), 5 min after ECC onset (T2), after operation (T3) and 24 hours after operation (T4). Clot rate (CR) and platelet function (PF) were analyzed at T1 and T4 with Sonoclot analyzer (Sienco.® Inc, USA). ECC time, aortic cross-clamping time, volume of 4% gelatin, postoperative chest tube drainage and blood product requirements were recorded. **Results** In A group, Hct significantly decreased at T1, T2, and T3 than T0 ($P<0.05$ or $P<0.01$) and increased to the same value with T0 at T4 ($P>0.05$). Plt decreased at T1, T2, T3 and T4 ($P<0.05$ or $P<0.01$). In P group, compare with T0, Hct did not decrease at T1 ($P>0.05$), but

基金项目: 国家临床重点专科建设项目资助

作者单位: 300457 天津,泰达国际心血管病医院体外循环科(王 中、王试福、王大勇、郭 珊、曾圳宏、石丽、李 楠、王志强),麻醉科(薛玉良、王洪武),检验科(贾克刚)

was lower at T2 and T3 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and it increased to the same value with T0 at T4 ($P > 0.05$). Plt was lower at T1, T2, T3 and T4 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing Hct between P group and A group, there was no difference at T0, T3 and T4 ($P > 0.05$), but higher at T1 and T2 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in P group. There was no differences between two groups on Plt at T0 and T4 ($P > 0.05$). Plt were lower at T1 and T2 in P group than in A group ($P < 0.05$), and much higher at T3 in P group than in A group. In A group, CR and PF decreased significantly at T3 than at T0 ($P < 0.01$). In P group, CR and PF at T3 were same at T0 ($P > 0.05$). The 24-hour mediastinal drainage volume was lower significantly in P group than in A group, so was allogeneic red blood cell requirement. **Conclusion** PRPS and ANH have similar blood preservation effects in patients undergoing CABG with ECC. Whereas PRPS can preserve platelet function as much as possible without low Hb level. So PRPS has more effective blood preservation effect than ANH.

[Key words]: Platelet-rich plasma; Acute normovolemic hemodilution; Extracorporeal circulation; Coronary artery bypass grafting surgery

体外循环(extracorporeal circulation, ECC)引起的血小板数量减少和功能异常被认为是心脏术后凝血功能紊乱和非外科性出血的最常见原因,是造成围术期异体血液用量增加的重要因素^[1]。急性等容性血液稀释(acute normovolemic hemodilution, ANH)采用术前放血的方式,可使一部分血液免遭 ECC 损伤,常应用于心脏手术减少术中失血量,减少或避免异体血输注。但 ANH 的节血效能有限。富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)是把自体全血经过离心、分离而得到的血液制品。ECC 前进行 PRP 分离,并在 ECC 后将 PRP 回输,可有效避免 ECC 造成的血小板破坏,有望减少 ECC 心脏手术凝血功能紊乱的发生和异体血用量。笔者在 ECC 冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting surgery, CABG)中采用两种血液保护方法进行对比研究,以期获得最佳血液保护效果。

1 资料与方法

1.1 一般材料和分组 本研究已经本院伦理委员会批准,并与患者及家属签署知情同意书。选取择期 CABG 患者 60 例,随机分为 ANH 组(A 组)和 PRP 分离组(P 组),每组 30 例。ASA 分级 II 级或 III 级,年龄 40~65 岁,体重 50~76 kg。术前凝血功能、血液常规及肝肾功能未见异常,术前血红蛋白(Hb) > 120 g/L,红细胞比容(Hct) ≥ 0.36 。

1.2 麻醉和 ECC 方法 患者入室后开放静脉通道,监测 ECG、脉搏氧饱和度(SpO_2)、呼气末二氧化碳分压($P_{ET}CO_2$)、鼻咽温、有创动脉压和中心静脉压(CVP)。麻醉诱导:静脉注射咪达唑仑 0.05 mg/kg、依托咪酯 0.3 mg/kg、舒芬太尼 1 μ g/kg 和罗库溴铵 0.6 mg/kg 后行气管插管,麻醉维持:静脉输注异丙酚 3~5 mg/(kg·h)、舒芬太尼 0.5~1.0 μ g/(kg·h)、哌库溴铵 0.10~0.15 mg/(kg·h)及吸入 0.5%~1.0%异氟烷。患者手术结束出手术室前、术后 24 h 内维持 Hct ≥ 0.30 ,否则输入悬浮红细胞。

ECC 预充液为乳酸钠林格氏液 500 ml 和琥珀酰明胶 1 000 ml,预充液中加入氨甲环酸 10 mg/kg。肝素化剂量为 3 mg/kg,激活凝血时间(ACT)值大于 300 s 后进行 ECC 插管,均为右房-主动脉插管,转流前、转流中维持 ACT 值在 480 s 以上。采用全身浅低温(鼻咽温度最低 32℃),转中流量 2.2~2.4 L/($m^2 \cdot min$),转中 Hct 低于 0.21 则输入悬浮红细胞。术后 24 h 内若胸腔和纵隔引流量持续 3 h 超过 100 ml/h 或 1 h 超过 200 ml 时,则输注新鲜冰冻血浆。

1.3 血液保护方法 A 组在麻醉诱导后经颈内静脉放血,速度为 20~30 ml/min,根据患者体重和 Hct 数值计算放血量,使稀释后 Hct ≥ 80 g/L。放血同时输入琥珀酰明胶,以维持有效循环血量,保持动脉压和心率平稳。放出的血液储存于枸橼酸钠保存液采血袋内置于室温(22~24℃)妥善保存。ECC 结束鱼精蛋白中和肝素 10 min 后将放出的全血输入患者体内。P 组在麻醉诱导后使用血细胞回收机(cell saver, electa, Sorin Group, Italy)经颈内静脉采集自体全血行 PRP 分离,安装 55 ml 离心杯,放血速度控制在 50~100 ml/min,全血被分离为贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)、PRP 和红细胞三种成分,分离出的 PRP 置于室温妥善保存,PPP 和红细胞即刻输回患者体内,反复持续此操作直至给肝素。其余步骤同 A 组。两组患者均实施从切皮至关胸全程血液回收,ECC 结束后机器余血全部回输,并使用 500 ml 生理盐水冲洗 ECC 管路及氧合器,将冲洗液的血细胞进行回收。

1.4 观察指标和检测方法 两组患者分别于麻醉诱导后即刻(T0)、ECC 开始前即刻(T1)、ECC 开始后 5 min(T2)、患者出手术室时(T3)和术后 24 h(T4)五个时间点抽取血标本,测定红细胞比容(Hct)和血小板(Plt)计数,使用 Sonoclot[®]全血凝血和 Plt 功能(platelet function, PF)分析仪(Sienco. [®] Inc, USA)测定 T1 和 T3 两个时间点的凝血速率(clot rate, CR)和 PF。纪录两组的 ECC 时间、主动

脉阻断时间、围术期琥珀酰明胶用量、术后 24 h 内胸引量和血制品使用量。

1.5 统计分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,正态分布的计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组内比较采用重复测量数据的方差分析,组间比较采用单因素方差分析;偏态分布的计量资料以中位数(四分位数间距)[$M(Q)$]表示,组间比较采用秩和检验;计数资料比较采用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

两组患者一般资料及围术期各指标比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 两组患者一般资料及围术期指标比较($n=30,\bar{x}\pm s$)

项目	A 组	P 组
体表面积(m^2)	1.6±0.2	1.6±0.1
身高(cm)	170±10	174±8
性别(男/女)	11/19	12/18
年龄(岁)	48±8	47±11
体重(kg)	59±17	61±13
手术时间(min)	250±42	260±39
ECC 时间(min)	136±37	125±31
主动脉阻断时间(min)	63±12	63±10
最低鼻咽喉温度(℃)	32±2	31.8±3
搭桥支数(支)	4.1±0.9	4.2±0.7
肝素总剂量(mg)	177±51	183±39
鱼精蛋白总量(mg)	290±65	274±60

P 组分离的全血容量为($1\,085\pm115$)ml,分离出 PRP(135 ± 38)ml,采集用时(30 ± 10)min,琥珀酰明胶用量为(495 ± 65)ml。ANH 组采集全血容量为(615 ± 135)ml,放血时间(27 ± 8)min。琥珀酰明胶用量为(985 ± 180)ml。

两组 CR 和 PF A 组 T3 时点较 T0 时点显著降低($P<0.01$),P 组 T3 时点恢复至 T0 水平($P>0.05$)见表 2。

表 2 两组患者血小板功能比较($n=30,\bar{x}\pm s$)

项目	组别	T0	T3
CR(singal/min)	A 组	29±5	14.3±12.1 [*]
	P 组	28±3	22.4±13.6
PF	A 组	3.03±1.12	0.7±0.6 [*]
	P 组	3.05±0.15	2.23±1.0

注:组内比较^{*} $P<0.01$ 。

两组 Hct 值各时点与 T0 相比,T1、T2 和 T3 均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),T4 时恢复至 T0 水平($P>0.05$)。但 P 组 T1 时 Hct 下降不明显($P>0.05$)。两组间比较,T0、T3 和 T4 时点无差异($P>0.05$),T1 和 T2 时 P 组均高于 A 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。两组 Plt 值各时点与 T0 比较均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);两组间比较 T0 和 T4 时点无差异($P>0.05$),T1 和 T2 时 P 组低于 A 组($P<0.05$),T3 时 P 组显著高于 A 组($P<0.01$),见表 3。

P 组术后 24 h 胸腔引流量和红细胞输入量显著少于 A 组($P<0.01$),两组 ICU 滞留时间无差异($P>0.05$),见表 4。

表 3 两组患者各时间点 Hct 和 Plt 的比较($n=30,\bar{x}\pm s$)

项目	组别	T0	T1	T2	T3	T4
Hct(L/L)	A 组	0.41±0.06	0.33±0.04 [*]	0.22±0.05 ^{**}	0.32±0.05	0.39±0.04
	P 组	0.40±0.05	0.38±0.06 ^{##}	0.26±0.04 ^{**##}	0.33±0.06 [*]	0.40±0.06
Plt($\times 10^9/L$)	A 组	254±66	188±46 ^{**}	112±38 ^{**}	95±26 ^{**}	123±71 ^{**}
	P 组	235±64	103±28 ^{**#}	85±31 ^{**#}	136±28 ^{**##}	128±32 ^{**}

注:同组中,与 T0 比较^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;两组间比较[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表 4 两组患者术后胸引量、输血量、输血率和 ICU 停留时间比较($n=30,\bar{x}\pm s$)

组别	24 h 胸管引流量(ml)	24 h 红细胞输入量(u)	ICU 时间(h)
A 组	620±176(370~3210)	2.5(0~6)	68(44~227)
P 组	560±138(350~3100) [*]	1.5(0~5) [*]	67(43~216)

注:组间比较^{*} $P<0.01$ 。

3 讨论

近年来,心血管手术技术和 ECC 所应用的设备与耗材都得到明显改进,但术后出血仍是心血管手术面临的挑战之一,血源紧张加重了这种挑战的紧迫性,对血液保护措施的应用和研究是临床面临的重要课题。

目前临床上常用的血液保护措施有血源稀释、红细胞回收 (cell saver)、心肺机无血预充和纵膈引流血液回收等。

ANH 是得到广泛应用的一项血液保护技术,心脏直视手术时 ANH 是在全身肝素化前自体放血,同时输等量或超过放血量的血浆代用品维持循环稳定。在放血过程中如患者情况有变化,可立即给予肝素,在最短的时间内建立体外循环。肝素化前放的血中不含肝素,术后不会增加引流量,也避免了应用鱼精蛋白所引起的不良反应。同时,血液稀释后可使术中的绝对失血量减少。对 ECC 时间较长的心脏手术来说,可减少血液有形成分及血浆凝血因子的破坏。手术后立刻输入自体新鲜全血,增加血容量,同时补充凝血因子及血小板,有利于减少术后手术创面渗血,从而减少或避免术后使用异体血。很多研究已证实 ANH 具有显著的血液保护效果,可明显减少围术期的异体血制品用量^[2]。但 ANH 应用于 CABG 时受颇多限制,如术前有严重心功能减退或术前血红蛋白水平较低的患者,由于心肌氧供需之间的安全范围幅度变小,对这类患者不应该实施 ANH^[3]。ANH 容易造成血液过度稀释,机体不能代偿,组织的血流增加而实际氧供减少,容易造成器官的缺氧损伤^[4]。ANH 使 ECC 期间血红蛋白降低更明显,而 ECC 期间低血红蛋白是 ECC 后并发症发生的风险因素之一^[5]。

心脏直视术术后出血可能是多因素导致,ECC 的机械性损伤和血液与人工异物表面接触而触发的反应导致 Plt 激活,从而造成 Plt 数量减少、功能减退,被认为是心血管手术后出血增加的主要原因,此外,心脏手术期间低温以及肝素的应用亦可损害 Plt 功能,导致 Plt 功能减退^[6]。术前将患者 Plt 进行分离制备出 PRP 并在术后回输,能保持更好的凝血功能,具有较好的血液保护效果,其术后出血量减少的原因可能是以下两点:第一,PRP 中的 Plt 没有受到 ECC 的破坏,数量和功能均得以保存。第二,血浆凝血因子如纤维蛋白原、因子 V 和 VIII 在新鲜采集的 PRP 中均保持完整活性,而在 ECC 期间,这些物质也受到程度不同的破坏。

Sonoclot 凝血监测仪及 Plt 功能分析仪可以提供止血全程的精确资料^[7],它描述了血样在体外从纤维蛋白的形成,到纤维单体集聚以及从 Plt 发挥作用及血块收缩和纤维蛋白溶解的全过程。它不但反映凝血因子的状况,而且也反映 Plt 的数量及功能状态。

本研究结果显示,PRP 回输的患者术中凝血功能恢复较早,Plt 功能较强,术后引流量减少,异体红细胞和血浆输注率降低,说明 PRP 分离术后回输对 CABG 患者具有较好的血液保护作用,这与 Plt 在数量和功能两方面都受到保护有关。P 组一方面减少了 ECC 激活的 Plt 数量及释放的多种有害因子;另一方面还可增加术后具有正常功能的 Plt 数量。研究表明,与 Plt 数量相比,Plt 功能对于纠正围术期的凝血功能障碍具有更重要的临床意义^[8]。

综上所述,PRP 分离术后回输和 ANH 对 ECC 下 CABG 患者具有相似的血液保护作用,但是前者可以在不减少围术期血红蛋白水平的基础上极大程度地对 Plt 数量和功能进行维持,因而具有更为有效的血液保护作用。

参考文献:

- [1] Harker LA. Bleeding after cardiopulmonary bypass [J]. *N Engl J Med*, 1986, 314 (22): 1446-1448.
- [2] Oriani G, Pavesi M, Oriani A, *et al*. Acute normovolemic hemodilution [J]. *Transfus Apher Sci*, 2011, 45 (3): 269-274.
- [3] Buckberg G, Brazier J. Coronary blood flow and cardiac function during hemodilution, Intentional Hemodilution. [M]. Edited by Mesmer K, Schmid-Schonbein H. Basel, Karger, 1975, pp 173-183.
- [4] Kim J, Hwang J, Huh J, *et al*. Acute normovolemic hemodilution can aggravate neurological injury after spinal cord ischemia in rats. [J]. *Anesth Analg*, 2012, 114 (6): 1285-1291.
- [5] Murphy GS, Hessel EA 2nd, Groom RC. Optimal perfusion during cardiopulmonary bypass: an evidence-based approach [J]. *Anesth Analg*, 2009, 108 (5): 1394-1417.
- [6] Weber CF, Dietrich W, Spannaql M, *et al*. A Point-of-Care Assessment of the Effects of Desmopressin on Impaired Platelet Function Using Multiple Electrode Whole-Blood Aggregometry in Patients After Cardiac Surgery [J]. *Anesth Analg*, 2010, 110 (3): 702-707.
- [7] Ganter MT, Monn A, Tavakoli R, *et al*. Kaolin-based activated coagulation time measured by sonoclot in patients undergoing cardiopulmonary bypass [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2007, 21 (4): 524-528.
- [8] Harrison P. Platelet function analysis [J]. *Blood Rev*, 2005, 19 (2): 111-123.

(收稿日期: 2013-01-11)

(修订日期: 2013-02-01)

· 临床研究 ·

评价国产血液回收设备的自体血液回收效果

刘 凯, 马 剑, 赵明霞, 袁 媛, 李景文, 龙 村

[摘要]:目的 评价西京 XJ-12-05 型血液回收设备在心脏手术中对自体血液的回收效果。方法 68 例心脏手术患者, 根据血液回收设备的不同, 随机分为两组: XJ 组(西京 XJ-12-05 型)和 CS 组(美国血液 Cell saver 5⁺型), 每组 34 例。通过对常规及浓缩处理后血液的血红蛋白(Hb)含量、红细胞比容(Hct)水平、血液的流变学测定; 以及红细胞(RBC)的回收率、游离血红蛋白(FHb)、葡萄糖(Glu)、血尿素氮(BUN)、乳酸(Lac)清除率的测定, 来比较两种血液回收设备对自体血液的回收效果。结果 XJ 组 Hb 含量及 Hct 水平高于 CS 组($P < 0.05$), 而 RBC 回收率、FHb、Glu、BUN、Lac 清除率组间比较无显著统计学意义($P > 0.05$)。结论 XJ 组常规 RBC 浓缩能力高于 CS 组, 而浓缩处理能力组间比较无统计学差异, 其它各项观察指标组间比较无统计学差异。

[关键词]: 心脏手术; 自体血液回收设备

[中图分类号]: R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:** 1672-1403(2013)03-0217-03

The clinical study of the autologous blood salvage effects of Xijing XJ-12-05 type cell saver device during cardiac surgery

Liu Kai, Ma Jian, Zhao Ming-xia, Yuan Yuan, Li Jing-wen, Long Cun

Depment of Cardiopulmonary bypass Fuwai Hosp & Cardiovas Inst, Chinese Acad Med Sci, Peking Union Med College, Beijing 100037, China

Corresponding author: Long Cun, Email: fuwaicpb@mx.cei.gov.cn

[Abstract]: Objective To evaluate the autologous blood salvage effects of Xijing XJ-12-05 type cell saver device during cardiac surgery. **Methods** 68 patients were divided randomly into 2 groups according to the different cell saver devices: Group XJ (XJ-12-05, Xijing, n=34), Group CS (Cell saver 5⁺, USA, n=34). In order to compare the effects of autologous blood salvage between the two different cell saver devices, processed blood were analyzed for the content of hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), and the change of hemorheology, as well as the salvage rate of red blood cell (RBC) and the clearance rate of free hemoglobin (FHb), glucose (Glu), blood urea nitrogen (BUN) and lactate (Lac). **Results** The RBC concentration ability of Group XJ was better than Cell saver 5⁺. The concentration ability was same between the two kinds of cell saver device. **Conclusion** The RBC concentration ability of Group XJ is better than that of Group CS. The concentration ability is same between the two Groups. There are no significant differences among the other indexes.

[Key words]: Cardiac surgery; Cell saver

异体输血可导致免疫系统暂时性抑制, 感染风险增加^[1]; 异体输血越多, 引起感染和其他并发症的风险越大, 并可导致住院天数和死亡率增加^[2]。心脏手术患者术中出血较多, 利用自体血液回收设备回收失血, 然后浓缩、洗涤后输给患者, 可最大限度的降低异体输血的风险。国产 XJ-12-05 型与进口 Cell saver 5⁺型自体血液回收设备机理相同^[3], 本文旨在通过临床试验对比, 以评价国产自体血液回收设备的血液回收效果。

作者单位: 100037 北京, 中国医学科学院 中国协和医学院 心血管病研究所 阜外心血管病医院体外循环科

通讯作者: 龙 村; Email: fuwaicpb@mx.cei.gov.cn

1 资料与方法

1.1 患者资料 经阜外医院伦理委员会批准同意, 于 2012 年 9 月~2012 年 12 月, 选取 68 例心脏手术患者, 试验前均签署知情同意书, 随机分为两组 XJ 组和 CS 组, 每组 34 例。

1.1.1 入选标准 年龄 18~70 岁患者, 男女不限; 临床确诊需要进行心脏手术的患者; 已阅读了受试者须知, 同意并签署书面知情同意书。

1.1.2 排除标准 败血症患者; 血液被细菌严重污染和被心脏恶性肿瘤严重污染的病例; 患有精神疾病者; 入选前 4 周内曾参加过其它的临床试验者; 近期有酗酒史或器械滥用史者; 未填写知情同意书及

不能够准确叙述病情者。

1.2 实验器材及实验流程

1.2.1 实验器材 国产 XJ-12-05 自体血液回收机及一次性使用血细胞分离器(规格 125 ml),西安西京医疗用品有限公司;进口 Cell saver 5⁺型自体血液回收机及一次性使用血细胞分离器(规格 125 ml),美国血液技术公司。

1.2.2 实验流程 Cell Saver 组装完毕,200 ml 肝素生理盐水(肝素含量 25 IU/ml),冲洗吸引管路和贮血器。处理过程分为常规处理和浓缩处理,常规清洗参数调整:填充速度 300 ml/min;清洗速度 300 ml/min;清空速度 250 ml/min;离心速度 5 650 转/min;设定贮血器内液面至 800 ml 刻度开始自动清洗;清洗液选择生理盐水。浓缩清洗参数调整:填充速度设为 25 ml/min,其它参数不变。国产自体血回收机与此机同。

1.3 标本采集和检测 留取处理前、处理后和浓缩处理后血液样本各 10 ml,全自动血气分析仪(Nova biomedical Critical Care Xpress13, USA)测定处理前后血液的血红蛋白(Hb)、红细胞比容(Hct)、游离血红蛋白(FHb)、乳酸(Lac)含量,用于检测两种设备的红细胞浓缩能力和计算红细胞(RBC)回收率, FHb、葡萄糖(Glu)、尿素氮(BUN)和 Lac 清除率。用 R80 锥板式血液黏度检测仪(北京世帝科学仪器公司)检测常规及浓缩处理后血液样本的全血黏度、全血还原黏度、红细胞变形指标和聚集指数。

1.4 统计方法 用 SPP 16.0 软件进行资料处理和统计分析,结果用均数±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示,组间比较采用两个独立样本的 *t* 检验,组内比较采用配对 *t* 检验, *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料及术中情况 两组患者的性别、年

龄、身高、体重、手术时间无显著差异(*P* > 0.05);两组患者术中出血、处理及回收量无统计学差异(*P* > 0.05),见表 1。

2.2 处理前后血液的观察指标 处理后血液的 RBC 回收率、FHb、BUN、Glu、Lac 清除率组间比较无统计学差异(*P* > 0.05),见表 2。

2.3 处理后血液的流变学资料 常规处理后 XJ 组 Hct、Hb 高于 CS 组(*P* < 0.05),而浓缩处理后组间比较无统计学差异。血液的全血黏度,全血还原黏度、变形及聚集指数组间比较均无统计学差异,而组内比较,除全血还原黏度(高切)无统计学差异,余均有统计学差异(*P* < 0.05),表 3。

表 1 患者的一般情况及血液回收处理量(*n* = 34, $\bar{x}\pm s$)

项目	XJ 组	CS 组
男/女(例)	15/19	18/16
年龄(岁)	54.5±10.6	52.4±12.1
身高(cm)	162.6±8.3	159.4±9.8
体重(kg)	70.0±13.4	68.7±15.0
手术时间(min)	233.8±50.4	239.3±46.4
术中出血量(ml)	610.0±128.2	638.3±118.4
处理量(ml)	1897.3±667.8	1853.7±371.1
回收量(ml)	245.4±100.2	246.1±74.3

表 2 回收后血液的观察指标(*n* = 34, %, $\bar{x}\pm s$)

项目	XJ 组	CS 组
RBC 回收率	95.4± 3.6	95.6± 3.1
FHb 清除率	98.6± 1.3	97.9± 2.3
BUN 清除率	66.3±1.9	67.1±1.3
Glu 清除率	81.1±2.3	80.2±2.0
Lac 清除率	89.6± 2.3	90.5± 1.8

表 3 常规及浓缩处理后血液的流变学变化(*n* = 34, $\bar{x}\pm s$)

项目	XJ 组		CS 组	
	常规处理	浓缩处理	常规处理	浓缩处理
Hct(L/L)	0.404±0.06 ^{△*}	0.588±0.04	0.347±0.05 [*]	0.590±0.03
Hb(g/L)	13.4±2.0 ^{△*}	19.6±1.4	11.6±1.8 [*]	19.7±1.0
全血黏度 10 s ⁻¹ (mpa·s)	8.41±0.57 [*]	14.11± 0.72	8.37±0.66 [*]	15.14± 1.11
60 s ⁻¹ (mpa·s)	4.99±0.32 [*]	13.70± 1.03	4.78±0.40 [*]	13.12± 0.69
150 s ⁻¹ (mpa·s)	3.76±0.65 [*]	9.41± 1.03	3.73±0.55 [*]	8.99± 1.15
全血还原黏度(低切)	8.11±0.88 [*]	13.47± 1.12	7.99±0.78 [*]	13.59± 1.33
全血还原黏度(高切)	16.99±1.33	17.46± 1.29	17.01±1.26	18.98± 1.12
变形指数	1.00±0.07 [*]	0.57± 0.05	1.03±0.05 [*]	0.59± 0.04
聚集指数	3.19±0.18 [*]	12.99± 2.29	3.09±0.19 [*]	12.37± 2.01

注:与 CS 组常规处理后比较[△] *P* < 0.05;组内比较^{*} *P* < 0.05。

3 讨论

心脏手术中应用自体血液回收设备的主要目的是回收术中丢失的血液,处理后回输患者,从而避免或减少异体血的输入。因此,一种成功的自体血液回收设备必须具备以下要求:

3.1 最大限度的回收术中失血 本实验结果显示,两组设备的 RBC 回收率均大于 95%,常规处理后 Hb 含量及 Hct 水平均在正常范围内,且处理后 XJ 组的 Hb 含量及 Hct 水平高于 CS 组,而经浓缩处理后,二者无统计学差异。

3.2 回收、浓缩、洗涤过程中保持红细胞的结构和功能的完整 文献报道,在整个回收过程中,负压吸引、离心造成的机械剪切力等因素可能会影响红细胞的功能,导致 2,3-DPG 含量减少,变形能力降低,从而引起红细胞对氧的结合、释放能力减弱和微循环障碍^[4-5]。本实验结果显示,两组经常规处理后全血黏度、全血还原黏度、变形指数及聚集指数组间比较无显著统计学差异。浓缩处理是一种自体血液回收设备在同一离心速度下血液的最大浓缩能力,可显著提高 Hct 水平,但随着 Hct 水平的提高,全血黏度、全血还原黏度(低切)及聚集指数显著升高,变形指数显著降低,从而导致处理后血液的流变学发生改变,回输患者后可能红细胞不能通过正常的微循环,从而造成患者微循环障碍,因此,在自体血液回收过程中,应尽量避免过度浓缩导致 Hct 过高。

3.3 最大限度的清除有害物质 在自体血液回收过程中,术野中的微栓、脂肪颗粒、红细胞破坏产生 Fhb 及机体应激代谢产生的一些物质(如 Lac、BUN)被吸入储血罐,在洗涤过程中应将这些物质清除,以免回输后给患者机体造成损害。文献报道,自体血液回收装置可有效清除心脏手术过程中产生的细胞源性微粒^[6]。本实验结果显示,两组自体血液回收装置均可有效清除 Fhb、Glu、BUN、Lac,但是,在处理过程中,血液中的血小板、纤维蛋白原、血浆蛋白等成分大部分被清除。在出血较多的大血管手

术中,大量输入经洗涤处理后血液后可造成患者凝血机制发生障碍,术后患者呼吸系统并发症增加,住院时间延长,因此,术后应补充血浆、血小板及凝血因子等成分^[7]。

国产 XJ-12-05 型自体血液回收设备与美国 Cell saver 5⁺型自体血液回收设备机理相同,本次临床试验结果显示,二者的红细胞回收效率、常规及浓缩处理后血液流变学指标及清除有害物质的能力均无显著差异,且常规处理后的 Hct 水平 XJ 组高于 CS 组,因此,国产 XJ-12-05 型自体血液回收设备可安全应用于临床。

参考文献:

- [1] Leal-Noval SR, Rincón-Ferrari MD, García-Curiel A, *et al*. Transfusion of blood components and postoperative infection in patients undergoing cardiac surgery [J]. *Chest* 2001, 119(5): 1461-1468.
- [2] Vicent JL, Baron JF, Reinhart K, *et al*. Anemia and blood transfusion in critically ill patients [J]. *JAMA*, 2002, 288(12):1499-1507.
- [3] Dai B, Wang L, Djaiani G, *et al*. Continuous and discontinuous cell-washing autotransfusion systems [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2004, 18(2):210-217.
- [4] Gu YJ, Vermeijden WJ, de Vries AJ, *et al*. Influence of mechanical cell salvage on red blood cell aggregation, deformability, and 2,3-diphosphoglycerate in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass [J]. *Ann Thorac Surg*, 2008, 86(5):1570-1575.
- [5] 王小华, 吉冰阳, 张燕婉, 等. 评估体外循环过程中三种血液回收设备对红细胞功能的影响[J]. *中国体外循环杂志*, 2012, 10(1):16-19.
- [6] van den Goor JM, Nieuwland R, van Oeveren W, *et al*. Cell Saver device efficiently removes cell-derived microparticles during cardiac surgery [J]. *J Thorac Cardiovas Surg*, 2007, 134(3):798-799.
- [7] Posacioglu H, Apaydin AZ, Islamoglu F, *et al*. Adverse effects of cell saver in patients undergoing ruptured abdominal aortic aneurysm repair [J]. *Ann Vasc Surg*, 2002, 16(4):450-455.

(收稿日期:2013-01-28)

(修订日期:2013-02-17)

· 临床研究 ·

血栓弹力图评价不同预充液对血小板功能的影响

郑 林, 吴明营, 赵风华, 张燕搏, 齐弘炜

[摘要]:目的 应用血栓弹力图(TEG)评价体外循环(CPB)不同预充液对血小板功能的影响,为临床合理选用胶体预充液提供理论依据。方法 选取北京同仁医院 2010 年 7 月至 12 月 CPB 下心脏手术的患者 30 例。随机分为白蛋白组($n=10$)、盈源(6%羟乙基淀粉 200/0.5)组(200/0.6) ($n=10$)和万汶组(130/0.4) ($n=10$)。预充胶体:白蛋白组为白蛋白 20 g+万汶 500 ml,万汶组为万汶 1 500 ml,盈源组为盈源 1 500 ml。分别于肝素化前 10 min 及鱼精蛋白中和肝素 10 min 后采血,采用 TEG 及 Platelet Mapping™ 系统检测凝血和血小板功能,监测 TEG 常规指标(R 值、K 值、 α 角、MA 值),同时测定激活全血凝固时间(ACT)及血常规。结果 三组患者一般情况、肝素化前血红蛋白浓度、红细胞计数及血小板计数、CPB 时间、主动脉阻断时间差异不显著($P>0.05$)。CPB 后 TEG 参数(R 值、K 值、 α 角、MA 值等)变化明显,提示凝血功能异常。蛋白组关胸止血时间相比另外两组缩短。组内比较,各组鱼精蛋白中和后 R 值、K 值及 α 角与其肝素化前 10 min 相比均无显著差异($P>0.05$),但 MA 值及血小板抑制率却有显著差异($P<0.05$)。组间比较三组之间肝素化前 10 min ACT 值、TEG 参数值、鱼精蛋白中和后 R 值、K 值及 α 角差异不显著($P>0.05$),但 MA 值、血小板抑制率差异显著($P<0.05$)。结论 预充液添加蛋白对血小板功能影响较小,TEG 能够检测 CPB 后凝血功能的变化,其中 Platelet Mapping™ 参数能更为精确地反映血小板功能,是一种特异有效的床旁检测方法。

[关键词]: 血栓弹力图; 血小板功能; 体外循环; 预充液

[中图分类号]: R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:** 1672-1403(2013)03-0220-05

Evaluation of the effect of different cardiopulmonary bypass priming solution on platelet function using thromboelastography

Zheng Lin, Wu Ming-ying, Zhao Feng-hua, Zhang Yan-bo, Qi Hong-wei

PICU, Pediatric Cardiac Center, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100037, China

Corresponding author: Zhang Yan-bo, Email: yanbozhang@gmail.com

[Abstract]: Objective To evaluate the effect of different cardiopulmonary bypass (CPB) priming solution on platelet function using thromboelastography (TEG) and Platelet Mapping™ system. **Methods** Between July 2010 and December 2010, 30 consecutive patients received open heart surgery with CPB and volunteered for the experiment in TongRen hospital. Patients were randomly divided into albumin group ($n=10$), Ying Yuan (200/0.6) group ($n=10$) and Voluven (130/0.4) group ($n=10$). Albumin group got 20 g albumin and Voluven 500 ml for colloid filling, and Voluven group got for 1500 ml Voluven colloid filling, Ying Yuan group got for filling colloid 1500 ml. Coagulation function and platelet function were studied with TEG and Platelet Mapping assay. TEG conventional index included R value, K value, alpha horn and MA value, also activated clotting time (ACT) and blood routine analysis were analysed at 10 minutes before heparinization and 10 mins after protamine. **Results** The general condition, hemoglobin before heparinization, red blood cell count, platelet count, CPB time and aorta cross clamping time of patients had no significantly differences between three groups ($P>0.05$). After CPB, TEG parameters (R value, K value, alpha horn, MA value, etc.) indicating a marked change coagulant function abnormality. Sternal hemostasis and closure time in protein group shortened compared to the other two groups. Compared with those at 10 min before heparinization, after protamine, the R value, K value and alpha horns of patients in three groups had no significant difference ($P>0.05$), while MA value and platelet inhibition rate had significant differences ($P<0.05$). Meanwhile, in the three groups, ACT and TEG parameter value at 10 min before haperinize and R value, K value and alpha Angle after protamine of all patients had no significant difference ($P>0.05$), while the MA value and platelet inhibition rate had significant difference ($P<0.05$).

作者单位: 100037 北京, 中国医学科学院, 北京协和医学院, 阜外心血管病医院小儿心脏中心 PICU (郑 林、张燕搏); 100176 北京, 首都医科大学附属北京同仁医院心血管中心心外科 (吴明营、齐弘炜), 体外循环科 (赵风华)

通讯作者: 张燕搏, Email: yanbozhang@gmail.com

Conclusion Priming solution with protein has less influence on platelet function. TEG and Platelet Mapping are able to diagnose early coagulation dysfunction after CPB. Platelet Mapping is more sensitive to evaluate the platelet function at bedside.

[Key words]: Thromboelastography; Platelet function; Cardiopulmonary bypass; Priming solution

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)技术的日趋成熟推动了心脏外科发展并减少了术后并发症,但 CPB 相关的血小板功能障碍导致术后出血仍无法避免。血小板数量急剧下降及功能受损是导致 CPB 心脏外科手术后非外科出血的重要原因^[1]。原因包括 CPB 材料的质量、血液稀释、血液破坏等方面,预充液成分也是一个重要因素。血小板功能检测方法的改进有助于早期诊断凝血障碍并提供有效的治疗方案,减少术后出血及相关并发症^[2]。我院常规的胶体预充液为 6%羟乙基淀粉(130/0.4),而有学者研究表明预充液添加蛋白对凝血功能影响较小^[3]。因此,研究 CPB 中不同预充液对血小板功能的影响并探讨有效监测方法在基础研究及临床工作中意义重大。本研究用血栓弹力图及血小板图评价不同 CPB 预充液对术后血小板功能的影响,为临床工作提供资料。

1 资料与方法

1.1 病例选择及分组 选择从 2010 年 7 月到 12 月在同仁医院行 CPB 下心脏手术成人患者 30 例。(男 18 例,女 12 例)。其中二尖瓣置换手术 10 例,主动脉瓣置换手术 4 例,冠状动脉旁路移植术 16 例。年龄(55.5 ± 9.5)岁;体重(64.7 ± 12.0)kg。入选患者术前 7~10 d 停用阿司匹林及氯比格雷,无凝血系统疾病,肝、肾功能无异常。随机分为白蛋白组($n=10$)、盈源(6%羟乙基淀粉 200/0.5)组($n=10$)和万汶(羟乙基淀粉 130/0.4)组($n=10$)。预充方案:晶体液各组均为乳酸林格氏液 1 500 ml,胶体液白蛋白组:白蛋白 20 g+万汶 500 ml;万汶组:万汶 1 500 ml;盈源组:盈源 1 500 ml。红细胞比容(Hct)维持在 0.20~0.30 之间,灌注流量 1.8~2.8 L/(min $\cdot$ m²)。

1.2 病例基本数据及标本采集 基本数据包括:年龄、体重、体表面积、手术方式、手术时间、CPB 时间、主动脉阻断时间、关胸止血时间、影响凝血功能药物应用。分别于肝素化前 10 min 及鱼精蛋白中和肝素 10 min 后采血,采用 TEG 及 Platelet MappingTM系统检测凝血和血小板功能,监测 TEG 常规指标(R 值、K 值、 α 角、MA 值),同时测定激活全血凝固时间(ACT)及血常规。

1.3 TEG 检测方法 ① 用普通针管抽静脉血,再

向肝素管和枸橼酸钠管分别加入 3.0 ml 和 2.7 ml 血样,2 h 内检测。从枸橼酸钠管中抽 1 ml 血样加入到高岭土试剂管,从中取 360 μ l 加入普通杯中,之后加入 20 μ l 氯化钙,测定常规 TEG 参数;② 取 TEG Platelet Mapping 试剂盒,分别复温激活剂 A、ADP 激活剂及花生四烯酸(AA)激活剂;分别于第 2、3、4 通道普通杯中加入 A 试剂 10 μ l,之后分别于第 3、4 通道中加入 ADP 激活剂及 AA 激活剂;分别于各杯中加入肝素化的血样并混匀;③ 用 TEG 分别检测 MA_{FIBRIN}、MA_{ADP} 及 MA_{AA},应用 Platelet Mapping 软件分别计算 ADP 受体激活剂及 AA 受体激活剂所致的血小板聚集率及血小板抑制率(INH_{ADP}、INH_{AA})。

1.4 TEG 检测指标及意义 常规参数包括:R 值、K 值、 α 角及最大振幅(MA)。反应时间(R):即血样开始检测到初始血凝块形成所需时间,该时间在凝血因子缺乏或(和)抗凝剂存在时延长,高凝状态时缩短。K 值:即初始血凝块形成至血凝块达到某一强度(振幅为 20 mm)所需时间。 α 角:从血凝块形成点至描记图最大曲线弧度作切线与水平线的夹角,反映血凝块形成的速率。MA,反映血凝块最大强度或硬度,主要取决于血小板的质和量^[4]。血小板抑制率:在常规 TEG 检测过程中加入不同的试剂(肝素、ADP 激活剂及 AA 活剂),经改良后可分别测出不同血小板受体激动剂对血小板聚集发挥的作用^[5],计算出 ADP 受体激活剂及 AA 受体激活剂所致的血小板聚集率及血小板抑制率(INH_{ADP}、INH_{AA})^[6],评估血小板功能。

1.5 统计学方法 计算 TEG 各参数术前术后的变化,分别以 ΔR 、 ΔK 、 $\Delta \alpha$ 、 ΔMA 、 ΔINH_{ADP} 及 ΔINH_{AA} 表示。使用 SPSS 11.5 软件包进行统计分析,测定值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组肝素化前与鱼精中和后比较用 t 检验,三组间比较用单因素方差分析 F 检验,若三组总体均数不全相同,再行 q 检验进一步推断任两个总体均数是否相同,以 $P < 0.05$ 为统计学显著性检验标准。

2 结果

2.1 三组患者基本数据比较 三组患者一般情况、肝素化前血红蛋白(Hb)浓度、红细胞计数(RBC)及血小板计数(Plt)、CPB 时间、阻断时间、停机时血气

BE 值差异不显著 ($P>0.05$), 蛋白组分别与另外两组比较关胸止血时间缩短 ($P<0.05$), 见表 1, 盈源组和万汶组两组间比较没有统计学差异 ($P>0.05$)。术后无二次开胸止血及死亡病例。

2.2 三组患者 ACT、TEG 及血常规比较 肝素化前三组患者 R 值较正常值增大, ACT 值、K 值、 α 值、MA 值及血常规各项指标均在正常参考范围之内, 且组间比较无显著差异 ($P>0.05$)。三组患者鱼精蛋白中和后与肝素化前比较, ACT 值、R 值、K 值及

α 值无显著差异 ($P>0.05$), 然而 MA 值及 INH 值差异显著 ($P<0.05$)。鱼精蛋白中和后, 蛋白组相比于另两组, MA 值增大, INH 值减小且有显著差异 ($P<0.05$)。详见表 2。

2.3 三组肝素化前及鱼精蛋白中和后 TEG 参数的变化 分别以 Δ ACT、 Δ R 及 Δ K 等表示。三组患者 Δ ACT、 Δ R、 Δ K 及 $\Delta\alpha$ 无显著差异, Δ MA、 Δ INH_{ADP} 及 Δ INH_{AA} 有显著差异, 详见表 3。

表 1 三组患者基本数据比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

项目	蛋白组	万汶组	盈源组
男/女(例)	8/2	9/1	7/3
年龄(岁)	60.2±7.1	61.3±7.5	62.4±8.7
体重(kg)	71.1±11.0	67.3±4.6	69.5±5.4
CPB 时间(min)	103.1±20.3	111.0±20.9	115.0±30.0
阻断时间(min)	73.1±10.8	76.0±10.2	75.0±12.0
血气 BE 值	1.2±0.3	2.3±0.2	2.0±0.8
术前 RBC($\times 10^{12}/L$)	4.2±0.5	4.3±0.6	4.0±0.3
术前 Hb(g/L)	132.0±17.0	131.0±14.0	121.0±11.0
术前 Plt($\times 10^9/L$)	203.1±40.7	211.0±60.6	215.0±90.0
术前 APTT(s)	27.3±6.4	27.3±4.2	26.8±3.3
关胸止血时间(min)	66.3±20.8	75.6±21.9 [*]	80.1±28.7 [*]

注:与蛋白组比较^{*} $P<0.05$,APTT:部分凝血活酶时间。

表 2 三组患者 ACT、TEG 及血常规比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

参数	蛋白组		万汶组		盈源组	
	肝素化前	鱼精中和后	肝素化前	鱼精中和后	肝素化前	鱼精中和后
ACT(s)	128.3±11.6	139.9±23.0	133.2±18.2	141.8±12.5	128.3±11.6	139.9±23.0
R 值(min)	12.6±6.2	11.6±4.9	11.6±4.3	16.8±5.4	12.6±6.2	11.6±4.9
K 值(min)	4.1±2.8	4.7±1.1	4.5±2.2	5.7±1.8	4.1±2.8	4.7±1.1
α 值(deg)	46.7±11.3	44.4±8.1	44.7±15.1	42.6±9.7	46.7±11.3	44.4±8.1
MA 值(mm)	57.3±10.1	50.1±8.0	55.1±10.6	46.9±7.7 ^{*△}	57.3±10.1	45.4±9.3 ^{#△}
INH _{ADP} 值(%)	29.4±17.5	60.7±19.1	24.1±16.9	67.9±20.1 ^{*△}	29.4±17.5	65.8±19.1 ^{#△}
INH _{AA} 值(%)	15.7±11.3	24.8±18.4	19.2±14.2	33.2±16.3	15.7±11.3	30.8±18.4 [#]
RBC($\times 10^{12}/L$)	4.0±0.3	3.0±0.3	4.2±0.5	2.9±0.4	4.0±0.3	3.0±0.3
Hct(L/L)	0.36±0.03	0.31±0.02	0.38±0.04	0.29±0.03	0.36±0.03	0.31±0.02
Hb(g/L)	129±11	94±10	132±17	84±11	129±11	94±10
Plt($\times 10^9/L$)	215.0±90.0	145.6±53.3	203.1±40.7	104.4±20.3	215.0±90.0	145.6±53.3

注:各组鱼精中和后与肝素化前比较^{*} $P<0.01$,[#] $P<0.05$;鱼精蛋白中和后,与蛋白组比较[△] $P<0.05$ 。

表 3 三组患者肝素化前、鱼精蛋白中和后 TEG 参数变化的比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

项目	蛋白组	万汶组	盈源组
Δ ACT	-11.20±19.20	-8.90±12.30	-8.70±13.70
Δ R	-4.02±5.39	-6.14±9.61	-5.24±8.94
Δ K	-0.98±1.67	-2.23±4.52	-1.73±3.01
$\Delta\alpha$	1.79±1.35	3.68±1.75	3.74±1.74
Δ MA	5.24±3.25	7.88±5.67 [*]	8.28±4.35 [*]
Δ INH _{ADP}	-34.90±28.40	-38.70±38.10 [*]	-40.70±34.90 [*]
Δ INH _{AA}	-17.90±13.30	-23.60±22.80 [*]	-25.40±23.10 [*]

注:与蛋白组相比^{*} $P<0.05$ 。

3 讨论

CPB 中合理的血液稀释,可以降低血液黏稠度,改善血液流变性,减少血液破坏及围术期异体输血量。但是血液稀释引起的血小板功能和数量下降可导致术后出血。Plt $>60\times 10^9/L$ 、体内凝血因子不低于正常的 30%,才能保持正常的凝血功能^[8]。在 CPB 心脏直视手术中,预充液胶体量及其它成分的选择一般为经验性选用,但不同胶体预充液对凝血功能和血小板功能影响,各家报道不一^[9]。临床研究发现,预充胶体液较晶体液不良反应小。但胶体液同样会引起血液稀释,降低血液中凝血因子的浓度、减少 Plt,导致凝血功能的损害^[10]。

有学者对不同 CPB 预充下的红细胞进行了形态学研究,检测结果显示红细胞在 5% 人血白蛋白和 4% 琥珀酰明胶注射液,血液破坏程度轻于羟乙基淀粉组。血浆蛋白附着于红细胞表面有助于修复细胞膜的损伤。这种保护作用有赖于带负电的血浆蛋白与红细胞膜的可逆性结合。血浆中起这种作用的主要是白蛋白。在生理 pH 下,白蛋白分子表面带有较多的负电荷,使它可依靠静电引力与带正电荷的物质结合。血浆中白蛋白的含量远比球蛋白多,亲水作用又比球蛋白大,这使血浆中的白蛋白对细胞膜起了胶体保护的稳定作用^[11]。琥珀酰明胶是一种带负电的多肽物质。琥珀酰明胶组溶血程度低,可能是其与血浆蛋白一样与红细胞膜可逆性结合,从而保护红细胞在机械应力下减少损伤^[7]。羟乙基淀粉保护作用不佳的原因可能由于羟乙基淀粉是从玉米淀粉合成的高分子量支链淀粉,为电中性分子,不易与红细胞膜结合,也不能够修复损伤的红细胞膜^[12]。此外,有研究提示在白蛋白、羟乙基淀粉和明胶这三种胶体预充液中,人血白蛋白和琥珀酰明胶对凝血功能的影响相对较小,而羟乙基淀粉的影响相对较大,且机体在术后短期内处于相对高凝状态^[13]。

值得注意的是,上述研究结果主要所采用的方法是细胞形态学及常规凝血检测,并未对 Plt 功能进行特意检测。TEG 是 Plt 功能检测的先进方法,也是更特意有效的方法,而 Plt 功能检测方法的改进有助于早期诊断凝血障碍并提供有效的治疗方案,减少术后出血及相关并发症^[14]。因此,应用 TEG 研究 CPB 中不同预充液对 Plt 功能的影响,在临床工作中意义重大。

本研究结果显示,万汶组和盈源组相比 Plt 功能参数变化无显著性差异,说明两种羟乙基淀粉对 Plt

功能影响差异不大,而蛋白组 Plt 功能参数相比万汶组和盈源组,MA 值较大,INH 值较小,且存在显著性差异,表明预充液添加蛋白对 Plt 功能影响较小。与文献报道的白蛋白预充较羟乙基淀粉对凝血功能的影响小的说法相符。预充万汶相比盈源对 Plt 参数变化无统计学意义,但万汶组 MA 值较盈源组 MA 值大,INH 值较小,说明随着羟乙基淀粉分子量增大,对凝血功能的影响也会有所增大。

TEG 能提供从血凝块开始形成到出现纤溶的连续的、定量的信息,完整地监测到血凝块形成及稳定的全过程,能直接反映患者的凝血功能。本组患者 CPB 后 TEG 各项参数变化显著,且均不在正常参考范围之内,可能与 CPB 导致凝血因子、纤维蛋白原及 Plt 功能受损有关。其中,R 值及 K 值的变化与术中凝血因子的损耗、血液稀释及肝素中和不足等因素相关,与纤维蛋白原的形成关系密切,主要反映体液凝血的过程。另外,TEG 参数 MA 值下降与 Plt 计数减少及功能受损有关,与血凝块的形成及稳定关系密切,主要反映细胞凝血的过程。虽然 R 值及 K 值在 CPB 前后差异不显著,但 MA 值差异显著,进一步提示 Plt 功能受损是 CPB 相关异常出血的重要原因,并表明 MA 值可以更敏感地反映 CPB 相关凝血功能障碍^[15]。

本研究中 CPB 后 Plt 抑制率显著增大,提示 Plt 抑制率可以反映术后 Plt 功能受损。目前,CPB 术后 Plt 功能受损及治疗已备受关注,但是缺乏临床实际可行的检测手段。Plt 抑制率排除了肝素及纤维蛋白原对 Plt 功能的影响,可以作为反映 Plt 功能的特异性定量指标。此外,不同激活剂介导的抑制率不同也提示 CPB 过程中 Plt 受体均受损。因此,Plt 图可能为 CPB 中 Plt 受体损伤的相关研究提供一种新的临床科研方法。

参考文献:

- [1] Frankel TL, Stamou SC, Lowery RC, *et al*. Risk factors for hemorrhage-related reexploration and blood transfusion after conventional versus coronary revascularization without cardiopulmonary bypass[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005, 27(3):494-500.
- [2] Craft RM, Chavez JJ, Bresee SJ, *et al*. A novel modification of the Thrombelastograph assay, isolating platelet function, correlates with optical platelet aggregation [J]. *J Lab Clin Med*, 2004,143(5): 301-309.
- [3] Hobson AR, Agarwala RA, Swallow RA, *et al*. Thrombelastography: current clinical applications and its potential role in interventional cardiology [J]. *Platelets*, 2006,17(8):509-518.

· 临床研究 ·

体外循环过程中吸入七氟烷对婴幼儿心脏术后恢复过程影响的随机对照临床研究

熊红燕, 辛渭川, 雷兰萍, 金振晓

[摘要]:目的 观察体外循环过程中吸入七氟烷对婴幼儿心脏手术后恢复过程及术后血清肌钙蛋白 I (cTnI) 含量的影响。**方法** 90 例拟在体外循环下行根治手术的先天性心脏病患儿纳入本随机对照研究, 随机分为七氟烷组 (45 例) 和对照组 (45 例), 七氟烷组在体外循环开始后通过氧合器吸入 2% 七氟烷, 体外循环结束前停止吸入。对照组只给予空氧混合气。体外循环前后记录患儿血压, 术后 5 个时间点 (返回 ICU 即刻、ICU 3 h、ICU 6 h、ICU 12 h 和 ICU 24 h) 取血样检测 cTnI 含量。术后恢复过程中其它参数如动脉血乳酸含量、血糖含量、呼吸机辅助呼吸时间、ICU 24 h 尿量、ICU 时间、术后正性肌力药物使用情况、术后住院时间、死亡和并发症发生情况同时记录。**结果** 两组患儿术前、术中各项参数无显著差异。七氟烷组患儿体外循环后动脉舒张压显著高于对照组 ($P=0.028$)。七氟烷组术后死亡 1 例, 对照组术后因呼吸功能不全二次插管 2 例。七氟烷组呼吸机辅助呼吸时间显著低于对照组 ($P=0.0064$)。术后 ICU 时间、术后住院时间、术后 24 h 内 5 个时间点血清 cTnI 含量、血乳酸含量和血糖含量两组比较无显著差异。**结论** 体外循环中吸入 2% 七氟烷在一定程度上有利于改善婴幼儿心脏手术后的恢复, 对术后 cTnI 的血清含量无显著影响。

[关键词]: 婴幼儿; 体外循环; 七氟烷; 肌钙蛋白 I

[中图分类号]: R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:** 1672-1403(2013)04-0224-07

Effect of sevoflurane inhalation during cardiopulmonary bypass on post-operative courses of pediatric patients undergoing cardiac surgery: a randomized controlled clinical trial

Xiong Hong-yan, Xin Wei-chuan, Lei Lan-ping, Jin Zhen-xiao
Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Corresponding author: Jin Zhen-xiao, Email: jinzx10262@aliyun.com

[Abstract]: Objective To investigate the effect of sevoflurane inhalation during cardiopulmonary bypass (CPB) on post-operative courses and serum cardiac troponin I (cTnI) concentrations in pediatric patients undergoing cardiac surgery. **Methods** Ninety patients undergoing congenital heart defects repair with CPB were investigated in this prospective randomized controlled study. They were randomized into two groups: sevoflurane group, who received 2% sevoflurane during CPB through oxygenator, and control group, who received only air-oxygen mixture. Arterial blood pressures were recorded before and immediately after CPB. The cTnI was measured five times during the first 24 h following admission to the pediatric intensive care unit (ICU). Other variables measured included arterial blood lactate, glucose, and fluid balance, use of inotropic drugs, ventilator hours, ICU days and post-operative hospital days. **Results** The pre and intra operative parameters were comparable between the two groups. There was a slightly but statistically significant increase of arterial diastolic pressure in sevoflurane group immediately after CPB compared with control patients (47.0 ± 9.2 mmHg vs 43.1 ± 9.3 mmHg, $P=0.028$). There was one death in sevoflurane group due to cardiac arrest, and two patients in control group committed re-intubation due to respiratory dysfunction. The post operative ventilation time (in mean [95% confidence interval]) was shorter in sevoflurane group than that in control group (24.9 [18.7, 31.1] h vs 38.8 [25.7, 51.9] h, $P=0.0064$). The post operative ICU time, hospital days and serial serum cTnI concentrations, blood lactate and glucose content had no significantly difference between the two groups. **Conclusion** Inhalation of 2% sevoflurane during CPB is helpful to the recovery of pediatric patients undergoing cardiac surgery, but has no significant effect on the post operative cTnI release.

[Key words]: Pediatric; Cardiopulmonary bypass; Sevoflurane; Cardiac troponin I

基金项目: 陕西省攻关计划项目 (2012SF2-21-1, 2012K15-02-01)
作者单位: 710032 西安, 第四军医大学第一附属医院心血管外科 (熊红燕、雷兰萍、金振晓); 710003 西安, 西安市中心医院胸心外科 (熊红燕、辛渭川)
通讯作者: : 金振晓, Email: jinzx10262@aliyun.com

吸入麻醉剂的抗心肌缺血/再灌注损伤作用在成人心脏手术过程中已经进行了大量的深入的研究。但是吸入麻醉剂对小婴儿和婴幼儿心脏手术围术期临床转归的影响研究甚少, Malagon 等^[1]的研究表明, 与丙泊酚比较, 七氟烷维持麻醉并不能显著降低婴幼儿心脏手术后肌钙蛋白(cardiac troponin, cTn)T 的释放量。cTnI 是心肌梗死的特异性血清标志物^[2], 也是婴幼儿心肌损伤的可靠标志物^[3], 其血清含量较 cTnT 高, 对于心肌损伤的诊断较 cTnT 更敏感。本研究在婴幼儿体外循环过程中全程应用 2% 七氟烷, 以血清 cTnI 含量为心肌损伤的主要指标, 观察七氟烷对婴幼儿心脏手术围术期的心肌保护效应和临床转归的影响。

1 病例与方法

1.1 病例纳入与分组 获得医院伦理委员会和患儿家长的同意后, 连续 90 例拟在体外循环心脏停搏下行心脏畸形根治手术的患儿纳入本随机对照前瞻性临床研究。纳入标准: 体重低于 10 kg; 排除标准: 术前合并肺炎、严重心衰、呼吸衰竭需要机械辅助呼吸、心内畸形合并主动脉弓部畸形需深低温停循环下进行手术、合并其它系统疾病、术前 7 天内使用糖皮质激素、术中转为非体外循环或不停跳姑息手术、患儿监护人要求退出研究、研究中出现其它意外情况被迫终止研究的。患儿按照计算机生成随机数表随机分配到七氟烷组 and 对照组, 每组 45 例。

1.2 麻醉方法 麻醉前用药为阿托品 0.02 mg/kg 和咪唑安定 0.5 mg/kg, 麻醉诱导前 30 min 给予。麻醉诱导方案为七氟烷吸入+苏芬太尼(1 mg/kg, i.v.)+潘克罗尼(0.2 mg/kg, i.v.)。麻醉维持采用下列两种方法之一: 咪唑安定[0.2 mg/(kg·h)]持续静脉注射或者 2% 七氟烷(雅培, 美国)经氧合器(CAPIOX® RX05 Baby RX™, 泰尔茂, 日本)持续吸入。所有患儿同时进行苏芬太尼[2 mg/(kg·h)]持续静脉注射。麻醉诱导后采用空氧混合气机械通气, 体外循环开始后机械通气停止。

1.3 体外循环与围术期监护数据采集 全身肝素化(3 mg/kg)及体外循环插管后即开始体外循环, 动脉流量为 150~200 ml/(kg·min)。根据患儿体重不同, 预充量在 370~750 ml 之间, 预充液成分包括醋酸盐缓冲液、甘露醇、红细胞、血浆和肝素。体外循环期间的体温维持在鼻咽温度 28℃ 左右。所有患儿在体外循环结束后进行改良超滤。患儿转入 ICU 后于返回 ICU 即刻、ICU 3 h、6 h、12 h 和 24 h 等 5 个时间点抽取血样(0.5 ml), 送临床检验科检

测 cTnI 含量(Beckman Coulter Inc. Fullerton, 美国)。动脉血葡萄糖和乳酸含量采用血气分析仪(ABL800 睿智, 雷度公司, 丹麦)检测。同时记录 48 h 内液体平衡、患儿机械通气时间、血管活性药物用量。为了量化正性肌力药物用量, 正性肌力药物指数(inotrope score, IC)采用以下公式计算: IC = 多巴胺×1 + 米力农×15 + 肾上腺素×100^[1-2, 4-6]。

1.4 统计学分析 回顾性分析 15 例患儿的资料, 其术后 cTnI 水平(SD)是 56.8(27.2) ng/ml。如果以组间差异为 15 ng/ml, $\alpha = 0.05$, 可信限 80% 进行样本量分析表明需要 86 例患儿。正态分布数据用均数±标准差表示, 采用 ANOVA 和 Bonferroni 校正的 post-hoc 分析, 非正态分布数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)和 95% 可信限表示, 采用 Mann Whitney 检验进行比较。cTnI 血清浓度数据为非正态分布, 先经过对数转换, 然后采用重复测量的 ANOVA 检验及 Bonferroni's 校正。计数资料采用卡方检验分析。正态分布数据变量间的相关性分析采用 Pearson 检验, 非正态分布变量间的相关性分析采用 Spearman 检验, $P < 0.05$ 认为相差具有显著性。

2 结果

2.1 两组术前和术中临床参数比较 两组患儿在性别、年龄、体重、紫绀、麻醉后动脉氧分压、手术类型、体外循环时间、升主动脉阻断时间、心室切口、心肌保护液用量和灌注次数、体外循环中红细胞比容、超滤量、尿量等多项参数均没有显著差异, 见表 1。

2.2 两组术后各项临床参数比较 术后两组患儿返回 ICU 后均行机械辅助呼吸, 总体机械通气时间在七氟烷组显著低于对照组($P = 0.0064$), 术后 24 h 尿量、引流量、各时间点正性肌力药物指数、血清乳酸含量、葡萄糖浓度、ICU 监护时间、术后住院时间、围术期用量均无显著差异。对照组有 2 例患儿因呼吸功能不全进行了二次插管呼吸机辅助呼吸, 但是没有围术期死亡; 七氟烷组有 1 例患儿于术后第 8 天误吸, 心跳骤停, 心肺复苏, 并行二次插管呼吸机辅助呼吸, 于术后第 10 天死亡。见表 2。

2.3 两组体外循环前后血压变化比较 两组患儿在体外循环前血压参数没有差异; 体外循环后, 七氟烷组患者动脉舒张压较对照组显著升高($P = 0.028$), 而收缩压和平均压较对照组没有显著变化, 见表 3。

2.4 两组术后血清 cTnI 含量比较 两组患儿返回 ICU 即刻血清 cTnI 含量均显著升高, ICU 3 h 时达到最高值, 随后逐渐下降, 到 ICU 24 h 仍然处于较

表 1 两组患儿术前基本参数比较 (n=45, $\bar{x}\pm s$)

项目	对照组	七氟烷组	P 值
年龄(月)	8.1±5.8	7.6±7.4	0.729
男/女(例)	30/24	28/26	NS
体重(kg)	6.5±1.6	6.5±1.9	0.978
是/否紫绀型先天性心脏病(例)	12/33	10/35	NS
麻醉后动脉血氧分压(mm Hg)	241±118	251±94	0.625
手术类型(例)			
室间隔缺损	30	32	NS
室间隔缺损+右室流出道狭窄	2	1	
法乐四联症	7	7	NS
房室管畸形	2	2	
房间隔缺损	1	2	
全肺静脉异位连接	3	1	
体外循环时间(min)	86.3±37.1	83.4±49.9	0.735
升主动脉阻断时间(min)	46.6±19.3	46.8±26.4	0.957
是/否右心室切口(例)	9/36	8/37	NS
心肌保护液用量(ml)	236±91	242±88	0.730
心肌保护液灌注次数	1.4±0.6	1.3±0.5	0.357
体外循环中最低鼻咽温(℃)	27.1±2.3	27.5±2.7	0.445
术前 Het(L/L)	0.348±0.045	0.346±0.038	0.862
CPB 中最低 Het(L/L)	0.252±0.031	0.256±0.025	0.523
术后 Het(L/L)	0.339±0.037	0.349±0.038	0.163
超滤量(ml)	385±85	379±110	0.766
体外循环中尿量(ml)	23.7±26.6	24.5±21.6	0.856

表 2 两组患儿术后临床参数比较 (n=45, $\bar{x}\pm s$ 或×95%可信区间)

项目	对照组	七氟烷组	P 值
术后机械通气时间(h)	38.8 [25.7, 51.9]	24.9 [18.7, 31.1]	0.0064
ICU 24 h 尿量(ml)	518±142	506±141	0.665
ICU 24 h 引流量(ml)	44.8±25.9	53.9±34.3	0.123
ICU 时间(d)	5.37 [4.18, 6.56]	3.89 [3.38, 4.40]	0.1119
术后住院时间(d)	12.0±5.5	10.6±2.4	0.087
死亡(例)	0	1	NS
二次插管(例)	2	1	NS
正性肌力药物指数			
ICU 0 h	5.6±4.0	5.6±3.7	0.911
3 h	5.1±4.1	5.4±4.8	0.747
6 h	5.0±4.0	5.4±8.7	0.744
12 h	4.2±3.8	4.9±8.1	0.607
24 h	3.8±3.9	3.3±2.9	0.496
48 h	2.8±3.0	2.8±3.0	0.916
血乳酸含量(mmol/L)			
ICU 0 h	3.0±1.6	3.0±1.9	0.918
3 h	2.3±1.8	2.4±2.5	0.798
6 h	1.9±1.0	2.3±2.0	0.173
12 h	1.7±1.0	1.7±1.9	0.479
24 h	1.3±0.6	1.5±1.8	0.603
48 h	1.0±0.4	1.2±1.9	0.293
血糖含量(mmol/L)			
ICU 0 h	161±51	154±40	0.433
3 h	173±73	152±37	0.164
6 h	153±61	153±52	0.944
12 h	138±35	145±49	0.411
24 h	127±34	122±35	0.499
48 h	112±28	109±21	0.622
输血量			
悬浮红细胞(U)	2.3±0.7	2.3±1.2	0.924
血浆(ml)	291±102	274±161	0.514

表 3 两组患儿体外循环前后血压变化比较 (n = 45, $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	七氟烷组	P 值
体外循环前			
收缩压 (mm Hg)	98.6±13.3	101.1±16.6	0.383
舒张压 (mm Hg)	57.0±10.8	58.5±12.4	0.510
平均压 (mm Hg)	72.7±12.6	75.0±14.0	0.374
体外循环后			
收缩压 (mm Hg)	73.7±15.7	75.6±14.0	0.503
舒张压 (mm Hg)	43.1±9.3	47.0±9.2	0.028
平均压 (mm Hg)	54.8±11.6	58.1±11.2	0.129

表 4 不同时间点两组患儿术后血清 cTnI 含量 (μg/L) 及曲线下面积 [μg/(L·h)] 比较 [n = 45, X (95% 可信限)]

项目	对照组	七氟烷组	P 值
ICU 0 h	48.94 [29.21, 68.27]	35.45 [25.79, 45.11]	>0.05
ICU 3 h	53.47 [34.52, 72.41]	46.10 [32.81, 59.38]	>0.05
ICU 6 h	34.61 [25.76, 43.47]	34.14 [24.64, 43.64]	>0.05
ICU 12 h	29.84 [21.80, 37.89]	26.73 [19.89, 33.57]	>0.05
ICU 24 h	20.33 [14.70, 25.95]	15.67 [11.98, 13.96]	>0.05
AUC	728.9 [524.6, 933.2]	638.9 [479.5, 798.3]	0.475

注: AUC: 曲线下面积。

高水平。但是两组患儿血清 cTnI 含量在对应时间点比较,均无显著差异。两组患儿血清 cTnI 浓度随时间变化的曲线下面积数据仍然为非正态分布,经过对数转换后成为正态分布数据,非配对随机数据 *t* 检验显示仍然无显著差异,见表 4。单变量相关性分析表明 ICU 3 h 时 cTnI 血清含量与是否使用七氟烷及术前紫绀情况无显著相关性,但是与术中采用右心室切口有相关性 [*r* = 0.30 (0.10, 0.48), *P* = 0.0018]。紫绀患儿 ICU 3 h 时 cTnI 血清含量为 61.89 (32.54, 91.24) μg/L,与非紫绀患儿 45.97 (33.77, 58.17) μg/L 比较无显著差异 (*P* = 0.178)。采用右心室切口患儿 ICU 3 h 时 cTnI 血清含量为 73.39 (42.42, 112.4) μg/L 显著高于未采用右心室切口的患儿 43.45 (31.90, 55.00) μg/L (*P* = 0.002)。

3 讨 论

先天性心脏病患儿进行心脏畸形矫治手术过程中,通常会经历一定时间的心肌缺血。动物实验研究表明吸入麻醉剂^[7]、吗啡和其它阿片类药物可以模拟缺血预处理的心肌保护作用^[8],也被称为麻醉预处理。但是,缺血预处理现象在婴幼儿心肌上是否也存在还缺乏证据。有学者认为,相比较于成人心肌,婴幼儿心肌对于体外循环心脏手术过程中心肌缺血的耐受能力较强^[9]。但是近来的研究表明,婴幼儿心肌对缺氧和心脏停搏液带来的损伤更加敏感^[10]。而且,紫绀型患儿的心肌在体外循环开始后还要暴露在高氧环境下,这相当于再灌注损伤。多

数临床研究表明,与以咪唑安定和丙泊酚为基础的全静脉麻醉相比,心脏手术过程中应用吸入麻醉剂能改善心脏手术患者的恢复过程^[11-12]。吸入麻醉剂可以降低心脏手术患者的围术期死亡率已经写入 2011 年发表的专家共识^[13]。

3.1 体外循环过程中全程吸入 2%七氟烷对患儿的心肌保护效应 缺血预处理在儿童人群中还没有广泛研究。对大鼠的研究表明,刚刚出生的大鼠并不具有经典的缺血预处理现象,1 周后,缺血预处理才对心脏收缩功能的恢复有促进作用^[14]。Baker 等在未缺氧的未成熟离体兔心上可以诱导出缺血预处理现象^[15],同时他们也发现,出生后处于慢性缺氧状态的未成熟兔心上不能诱导出预处理现象,即使增加预处理次数也不行。动物实验提示^[16],怀孕大鼠暴露在慢性间断缺氧环境下,新生大鼠立即进行缺血预处理过程,单独进行孕期操作或者生后操作都不能增强其对随后缺氧的耐受性,但是联合应用这两种方法却具有增强对缺氧耐受性的作用。

吸入麻醉剂可以改善顿抑心肌收缩功能的恢复。七氟烷可以模拟预处理效应,改善离体豚鼠心脏缺血后收缩功能^[17]。七氟烷可以缩小犬的心肌梗死范围,降低预处理效应的时间阈值^[18-19],其心肌保护作用不依赖于冠脉血流量的变化和心脏做功的降低。七氟烷除了具有预处理作用,还具有抗再灌注损伤作用,此作用可能归功于其自由基清除能力和抑制缺血后中性粒细胞黏附作用^[20]。

cTn 的血清含量被认为是心肌损伤的最好的血

清标志物^[21],无论是在敏感性还是特异性上都优于磷酸肌酸激酶(CKMB)、乳酸脱氢酶(LDH)等曾经常用的心肌损伤标志物。cTn 复合体包括 3 个成分,即 cTnT、cTnI 和 cTnC,由于 cTnC 在骨骼肌中也有表达,因此不具有心脏特异性^[22],cTnT 和 cTnI 就成为临床诊断心肌损伤的主要指标,这两者都常用于先心病患儿术后心肌损伤程度的监测^[1,4-6,23]。相关研究表明,监测 cTnT 的抗体与骨骼肌肌钙蛋白有交叉反应^[24],而 cTnI 则无论在新生儿期还是在其它已知的病理情况下,均未见在心脏之外的其它组织中表达^[25],因此,cTnI 具有更好的特异性。本研究检测到的患儿术后 cTnI 浓度与有的报道类似^[26-28],与其它研究者报道的结果有差异^[29],这可能反映了不同的患者群以及不同的心肌保护策略导致的术后 cTnI 释放量不同,更主要的原因可能是不同研究采用的 cTnI 检测系统不同导致的 cTnI 绝对值差异较大^[30]。因此,比较不同研究者报道的 cTnI 血清水平的绝对值来判断某种心肌保护效果优于或者劣于另外一种心肌保护策略似乎不可行。

体外循环对紫绀型患儿的作用类似于再灌注损伤。Allen^[31]在体外循环开始 10 min 后采集紫绀型和非紫绀型患儿的心肌样本,测定抗氧化能力,发现紫绀型患儿心肌组织快速氧合后,内源性组织抗氧化剂迅速耗竭。笔者的研究采用单因素分析表明,紫绀对术后 cTnI 的释放量没有影响,但是总体上紫绀患儿术后 cTnI 释放量高于非紫绀型患儿。本研究还发现,与术后 cTnI 峰值相关的因素主要是右心室切口,这与笔者之前的研究结果相同^[5]。

本研究提示体外循环过程中全程应用 2% 七氟烷对婴幼儿心脏手术后 cTnI 的释放量没有显著影响。如果儿童也具有缺血预处理效应,本研究中七氟烷似乎没有表现出其在成人身上具有的预处理效果。

3.2 体外循环过程中全程吸入 2% 七氟烷对患儿术中血流动力学的影响 动物研究表明,七氟烷抑制小鼠心脏功能,2% 的七氟烷显著降低心输出量和左室射血分数,左室舒张末和收缩末容积^[32]。对体外循环下心脏手术的患者研究表明^[33],体外循环过程中吸入 1%~2% 的七氟烷有助于维持低温体外循环术中患者体循环阻力的稳定,而不用吸入麻醉剂的患者容易出现体循环阻力逐渐升高。Ueda 等^[34]发现体外循环过程中使用七氟烷调控灌注压与氯普鲁马嗪相比更安全,更容易维持足够的体外循环阻力,停止体外循环后使用的去甲肾上腺素更少。Rodig 等^[35]发现体外循环中吸入 1.5MAC 的七氟烷

可以显著降低体循环阻力,同时患者血液中儿茶酚胺含量也显著下降。这些研究结果表明,体外循环中吸入七氟烷对体循环阻力有明显的调节作用,其效果与剂量相关。但是,这些研究的对象都是成年患者,对婴幼儿体循环阻力的影响还未见报道。笔者的研究发现,体外循环结束后,七氟烷组患儿动脉舒张压较对照组有显著升高,尽管升高的幅度只有不足 4 mm Hg。本研究没有对整个体外循环过程中患儿体循环阻力进行计算和测量,是否吸入七氟烷有助于保护体外循环后患儿的血管反应性,进而有助于患儿的恢复(如本研究发现的术后七氟烷组机械辅助呼吸时间缩短),还需要深入研究。

3.3 体外循环过程中全程吸入 2% 七氟烷对患儿术后恢复的影响 迄今为止,虽然有许多研究发现,吸入麻醉剂可以降低围术期心肌损伤血清标志物的水平^[29,36-40]。也有很多研究在未检测到心肌损伤血清标志物水平降低的情况下,仍然有助于改善患者的术后恢复,如 Piriou 等^[41]对冠状动脉旁路移植术患者于体外循环前吸入七氟烷(1MAC)进行预处理,结果对 cTnI 释放量没有影响,对心肌组织中保护性信号转导途径蛋白含量没有影响,但是术后预处理组患者低心脏指数发生率低于对照组。De Hert 等^[11]也发现,吸入七氟烷虽然不能降低冠状动脉旁路移植术后 cTnT 的释放量,但是可以显著降低术后住院时间和术后 1 年内死亡率。也正是因为这些研究结果,吸入麻醉剂可以降低心脏手术患者的围术期死亡率已经成为专家共识^[13]。本研究发现,体外循环中全程吸入 2% 七氟烷虽然没有显著降低术后 cTnI 的释放量,但是仍然可以改善患儿的术后恢复,表现为显著缩短术后机械辅助呼吸的时间,其中具体的机制仍然需要深入研究。

4 结 论

婴幼儿心脏手术体外循环过程中吸入 2% 七氟烷麻醉,可以改善患儿的术后恢复过程,但是不能降低心肌损伤标志物 cTnI 的释放量。

参考文献:

- [1] Malagon I, Hogenbirk K, van Pelt J, *et al.* Effect of three different anaesthetic agents on the postoperative production of cardiac troponin T in paediatric cardiac surgery [J]. *Br J Anaesth*, 2005, 94(6):805-809.
- [2] Kemp M, Donovan J, Higham H, *et al.* Biochemical markers of myocardial injury [J]. *Br J Anaesth*. 2004, 93(1):63-73.
- [3] Immer FF, Stocker F, Seiler AM, *et al.* Troponin-T; improved diagnostic assessment of myocardial damage in childhood [J].

- Acta Paediatr, 1997, 86(12):1321-1327.
- [4] Liu Y, Zhang SL, Duan WX, *et al*. The myocardial protective effects of a moderate-potassium blood cardioplegia in pediatric cardiac surgery: a randomized controlled trial [J]. Ann Thorac Surg, 2012, 94(4):1295-1301.
- [5] Jin Z, Duan W, Chen M, *et al*. The myocardial protective effects of adenosine pretreatment in children undergoing cardiac surgery: a randomized controlled clinical trial [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2011, 39(5):e90-96.
- [6] Jin ZX, Zhang SL, Wang XM, *et al*. The myocardial protective effects of a moderate-potassium adenosine-lidocaine cardioplegia in pediatric cardiac surgery [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 136(6):1450-1455.
- [7] Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, *et al*. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits [J]. Anesthesiology, 1997, 87(5):1182-1190.
- [8] Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(8):2187-2195.
- [9] Hammon JW Jr. Myocardial protection in the immature heart [J]. Ann Thorac Surg, 1995, 60(3):839-842.
- [10] Taggart DP, Hadjnikolas L, Wong K, *et al*. Vulnerability of paediatric myocardium to cardiac surgery [J]. Heart, 1996, 76(3):214-217.
- [11] De Hert S, Vlasselaers D, Barbé R, *et al*. A comparison of volatile and non volatile agents for cardioprotection during on-pump coronary surgery [J]. Anaesthesia, 2009, 64(9):953-960.
- [12] Landoni G, Bignami E, Oliviero F, *et al*. Halogenated anaesthetics and cardiac protection in cardiac and non-cardiac anaesthesia [J]. Ann Card Anaesth, 2009, 12(1):4-9.
- [13] Landoni G, Augoustides JG, Guarracino F, *et al*. Mortality reduction in cardiac anesthesia and intensive care: results of the first International Consensus Conference [J]. HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth, 2011, 3(1):9-19.
- [14] Awad WI, Shattock MJ, Chambers DJ. Ischemic preconditioning in immature myocardium [J]. Circulation, 1998, 98(19 Suppl):II206-1213.
- [15] Baker JE, Holman P, Gross GJ. Preconditioning in immature rabbit hearts: role of K_{ATP} channels [J]. Circulation, 1999, 99(9):1249-1254.
- [16] Ostádalová I, Ostádal B, Jarkovská D, *et al*. Ischemic preconditioning in chronically hypoxic neonatal rat heart [J]. Pediatr Res, 2002, 52(4):561-567.
- [17] Novalija E, Fujita S, Kampine JP, *et al*. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts [J]. Anesthesiology, 1999, 91(3):701-712.
- [18] Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, *et al*. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs [J]. Anesthesiology, 1999, 91(5):1437-1446.
- [19] Hara T, Tomiyasu S, Sungsam C, *et al*. Sevoflurane protects stunned myocardium through activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels [J]. Anesth Analg, 2001, 92(5):1139-1145.
- [20] Heindl B, Reichle FM, Zahler S, *et al*. Sevoflurane and isoflurane protect the reperfused guinea pig heart by reducing postischemic adhesion of polymorphonuclear neutrophils [J]. Anesthesiology, 1999, 91(2):521-530.
- [21] Jaffe AS. Troponin--past, present, and future [J]. Curr Probl Cardiol, 2012, 37(6):209-228.
- [22] Parmacek MS, Solaro RJ. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2004, 47(3):159-176.
- [23] Chen Y, Liu J, Li S, *et al*. Which is the better option during neonatal cardiopulmonary bypass: HTK solution or cold blood cardioplegia [J]? ASAIO J, 2013, 59(1):69-74.
- [24] Jaffe AS, Vasile VC, Milone M, *et al*. Diseased skeletal muscle: a noncardiac source of increased circulating concentrations of cardiac troponin T [J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(17):1819-1824.
- [25] Thygesen K, Mair J, Katus H, *et al*. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care [J]. Eur Heart J, 2010, 31(18):2197-2204.
- [26] Montgomery VL, Sullivan JE, Buchino JJ. Prognostic value of pre- and postoperative cardiac troponin I measurement in children having cardiac surgery [J]. Pediatr Dev Pathol, 2000, 3(1):53-60.
- [27] Ma J, Li XH, Yan ZX, *et al*. Effect of myocardial protection during beating heart surgery with right sub-ailiary approach [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(2):150-152.
- [28] Carmona F, Manso PH, Vicente WV, *et al*. Risk stratification in neonates and infants submitted to cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a multimarker approach combining inflammatory mediators, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and troponin I [J]. Cytokine, 2008, 42(3):317-324.
- [29] De Hert SG, Van der Linden PJ, *et al*. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration [J]. Anesthesiology, 2004, 101(2):299-310.
- [30] Pretorius CJ, Wilgen U, Ungerer JP. Serial cardiac troponin differences measured on four contemporary analyzers: relative differences, actual differences and reference change values compared [J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(21-22):1786-1791.
- [31] Allen BS, Rahman S, Ilbawi MN, *et al*. Detrimental effects of cardiopulmonary bypass in cyanotic infants: preventing the reoxygenation injury [J]. Ann Thorac Surg, 1997, 64(5):1381-1388.

· 临床研究 ·

吗啡后处理对胸腔镜下二尖瓣置换术患者的心肌保护作用

冯 燕,张 蕾,邵勇平,张秀静,陈 敏,赵 静,陈 涛,冯建宇,曹 轶

[摘要]:目的 研究吗啡后处理对胸腔镜下二尖瓣置换术患者的心肌保护作用及其机制。方法 选择择期行胸腔镜下二尖瓣置换术患者 50 例,随机分成对照组(C 组)和吗啡后处理组(M 组)。于主动脉开放前 3 min 和开放即刻,C 组分别给予舒芬太尼 0.05 μg/kg, M 组分别给予吗啡 0.05 mg/kg。检测切皮前、主动脉开放后 30 min、3 h、6 h、24 h 等 5 个时间点的心肌钙蛋白 I(cTnI)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、白细胞介素(IL)-6、IL-10 的血清浓度,观察并记录呼吸机应用时间、ICU 病房驻留时间、术后住院时间、心脏自动复跳率、多巴胺使用率。结果 两组患者的呼吸机使用时间、ICU 停留时间、术后住院时间、自动复跳率、多巴胺使用率差别均无统计学意义($P>0.05$)。在主动脉开放后各时点,M 组 cTnI、MDA、IL-6 浓度均明显低于 C 组($P<0.05$),M 组 IL-10 浓度明显高于 C 组($P<0.05$)。在主动脉开放后 3 h、6 h M 组 SOD 浓度明显高于 C 组($P<0.05$)。结论 对胸腔镜下二尖瓣置换术患者,吗啡后处理有一定的心肌保护作用,其机制可能与减轻氧自由基损伤和抑制炎症反应有关。

[关键词]: 吗啡;后处理;胸腔镜;二尖瓣置换;心肌保护
[中图分类号]:R654.1 [文献标识码]: A [文章编号]:1672-1403(2013)04-0230-05

Myocardial protective effects of morphine postconditioning in patients undergoing mitral valve replacement surgery with thoracoscope

Feng Yan, Zhang Lei, Shao Yong-ping, Zhang Xiu-jing, Chen Min, Zhao Jing, Chen Tao, Feng Jian-yu, Cao Yi

Department of Anesthesiology, The Fourth Hospital of Xi'an, Xi'an 710004, China

Corresponding author: Feng Yan, Email: fengyanmazui@hotmail.com
Cao Yi, Email: 2388675182@qq.com.

[Abstract]: Objective To investigate the myocardial protection effects and its mechanism of morphine postconditioning in patients undergoing mitral valve replacement surgery with thoracoscope. Methods Fifty patients scheduled for mitral valve replacement with thoracoscope were randomized into 2 groups: control group (C group), and morphine postconditioning group (M group). Three minutes before and immediately after aortic clamping removal, sufentanil (0.05 ug/kg) was given to patients in C group and morphine (0.05 mg/kg) was given to patients in M group. Plasma concentrations of cardiac troponin I (cTnI), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) were measured before skin incision, 0.5 h, 3 h, 6 h, and 24 h after aortic clamping removal. The rate of spontaneous cardiac rhythm resume, mechanical ventilation time, ICU stay, post-operative hospital stay, dosage of dopamine of all patients were compared. Results There was no statistics difference between the two groups as to mechanical ventilation time, ICU stay, post-operative hospital stay, spontaneous cardiac rhythm recovering rate ($P>0.05$). The doses of dopamine of M group was significantly higher than that of C group ($P<0.05$). The serum cTnI, MDA, IL-6 concentrations of M group were significantly lower than that of C group ($P<0.05$). The serum IL-10 concentrations of M group were significantly higher than that of C group at all the time points measured after aortic clamping removal ($P<0.05$). 3 h and 6 h

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划(2013K12-02-08)
作者单位: 710004 西安,西安市第四医院麻醉科(冯 燕、张 蕾、邵勇平);100842 北京,总后勤部司令部管理保障局机关第一门诊部(张秀静);710032 西安,第四军医大学第一附属医院麻醉科(陈 敏、赵 静);710032 西安,第四军医大学第一附属医院心血管外科(陈 涛、冯建宇);710032 西安,第四军医大学第一附属医院数字化与病案管理科(曹 轶)
通讯作者: 冯 燕,Email: fengyanmazui@hotmail.com
曹 轶,Email: 2388675182@qq.com

after aortic clamping removal, the serum SOD concentrations of M group were significantly higher than that of C groups, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** Morphine postconditioning has some myocardial protective effect in patients undergoing mitral valve replacement surgery with thoracoscope, its mechanism may involve reduction of oxygen free radical species and inflammatory responses.

[**Key words**]: Morphine; Postconditioning; Thoracoscope; Mitral valve replacement; Myocardial protection

随着微创心脏外科的发展,胸腔镜心脏手术的适应证越来越广,与传统开胸心脏手术相比,其创伤小、失血少、恢复快且符合美容要求^[1],而被越来越多的人所接受。吗啡作为临床上较早使用的非选择性阿片受体激动剂。广泛应用于麻醉、镇痛、急性心肌梗死、急性左心衰的治疗等,有研究证实吗啡预处理能减轻缺血再灌注损伤^[2]。而药物后处理不必提前准确预测心脏发生的缺血性伤害,简单易行、安全可控,应用空间更广,但吗啡后处理对胸腔镜下二尖瓣置换术患者的心肌保护作用尚不清楚,故本研究拟观察吗啡后处理对胸腔镜下二尖瓣置换术患者的心肌保护作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择择期行体外循环下胸腔镜二尖瓣置换术患者 50 例(男 11 例,女 39 例),年龄 41~62 岁,体重 48~69 kg,射血分数 $>45\%$,ASA II~III 级。随机分成:对照组(C)和吗啡后处理组(M)两组,每组 25 例。排除既往有心脏手术史、感染性心内膜炎所致瓣膜病、合并严重肝、肾功能不全、二次转机、术后 24 h 内死亡者。

1.2 方法

1.2.1 麻醉方法 所有患者采用静脉复合全麻,常规行桡动脉及颈内静脉穿刺置管测压。C 组于主动脉开放前 3 min 和开放即刻,分别给予舒芬太尼 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$; M 组于主动脉开放前 3 min 和开放即刻分别给予吗啡 0.05 mg/kg。麻醉诱导:用面罩吸氧,静脉注射咪达唑仑 0.03~0.05 mg/kg、舒芬太尼 0.5~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、依托咪酯 0.1~0.2 mg/kg、维库溴铵 0.1 mg/kg,面罩加压给氧去氮 3 min 后,待肌肉松弛后喉镜明视下经口置入左双腔气管导管,听诊并调整位置,直到导管定位满意后固定。接 Ohmeda 麻醉机控制呼吸,根据手术操作过程选择双肺或单肺通气。根据体重设置呼吸参数,调节氧浓度为 50%,吸呼比 1:2。双肺通气潮气量为 6~8 ml/kg,呼吸频率 10~12 次/min;单肺通气时 4~6 ml/kg,呼吸频率 15~20 次/min。根据血气分析结果调整,呼气末二氧化碳分压($P_{\text{ET}}\text{CO}_2$)维持在 35~45 mm Hg 之间。脑电双频指数(BIS)值维持在 40~60 之间。麻醉维持:分别于切皮前及体外循环开始即刻,间断静

脉注射舒芬太尼 5~7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、咪达唑仑 0.1 mg/kg、维库溴铵 0.05 mg/kg。术中根据血流动力学、BIS 值调整之后追加药量,舒芬太尼总量控制在 12~15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、咪达唑仑总量控制在 0.3~0.4 mg/kg,维库溴铵每 30~50 min 追加一次,每次 0.05 mg/kg。

1.2.2 体外循环及手术方法 两组患者的体外循环由同一组灌注师完成,均采用 Stockert 人工心肺机,Maquet 膜式氧合器及 Terumo 超滤。采用右侧股动脉插灌注管、股静脉插双极引流管建立体外循环,预充液采用醋酸钠林格液 500 ml、羟乙基淀粉(130/0.4)1 500 ml、5%碳酸氢钠 100 ml、10%甘露醇 2.5 ml/kg、肝素 60 mg、地塞米松 1 mg/kg(最多 50 mg)、25%硫酸镁 10 ml、红细胞悬液等,按稀释后患者红细胞比容(Hct)维持在 0.2~0.3,晶体/胶体比例维持在 0.4~0.6:1。转流前以 400 U/kg 肝素抗凝,维持全血激活凝血时间(ACT)长于 480 s,术中采用浅低温(28~32 $^{\circ}\text{C}$)。采用 1:4 冷血高钾停搏液按 10~20 ml/kg 顺灌,每间隔 30 min 再次灌注首量的一半。高钾停搏液的配方:每 500 ml 生理盐水中含有 2%利多卡因 10 ml、10%氯化钾 20 ml、5%碳酸氢钠 20 ml、25%硫酸镁 4 ml。气血比为 0.8~1.0。维持平均动脉压 50~80 mm Hg。瓣膜置换后复温至 37 $^{\circ}\text{C}$ 。转流过程中监测血气,随时调整。

患者取平卧位,并将其右侧肩胛下垫高 15~30 度,右上肢悬吊于头架上。在右侧胸壁上作 3 个小孔,其中两个为操作孔,另一个为胸腔镜插入孔。经房间隔暴露二尖瓣,切除病变瓣膜组织,采用间断褥式缝合方式置换二尖瓣。心内操作结束后经房间隔放置左心引流管,连接至左心吸引泵管,待心脏复跳后拔出再与主动脉根部冷灌管相连起排气作用。充分进行后并行,双腔气管插管更换为单腔管,达到体外循环停止标准后停机^[3]。

1.3 围术期临床数据的采集 连续监测左上肢有创桡动脉压、心率(HR)、心电图(ECG)、氧饱和度(SpO_2)、 $P_{\text{ET}}\text{CO}_2$ 、中心静脉压(CVP)、尿量、体温(肛温和鼻咽温)、动脉血气分析、BIS 值。观察并记录患者的体外循环时间、主动脉阻断时间、呼吸机应用时间、ICU 病房驻留时间、术后住院时间、心脏自动复跳率、多巴胺用量。

1.4 血液标本采集与检测 分别于切皮前、主动脉开放后 30 min、3 h、6 h、24 h 采集血样置于血清分离胶促凝采血管中,立即轻轻倒置试管 5 次混匀标本,放置 4 h 后,以 3 000 r/min 离心 10 min 后取出上清液,存放于-80℃低温冰箱中保存待测。ELISA 试剂盒(蓝图生物科技有限公司,福州)正常参考值范围为:肌钙蛋白 I(cTnI,0~8 μg/L)、超氧化物歧化酶(SOD,0~200 U/ml)、丙二醛(MDA,0~8 μmol/L)、白介素(IL)-6(0~48 ng/L)、IL-10(0~40 ng/L)。采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清中 cTnI、SOD、MDA、IL-6、IL-10 的浓度。

1.5 统计学分析 数据采用 SPSS 17.0 软件处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据采用重复测量的方差分析,组间比较采用 *t* 检验。计数资料比较采用卡方检验。*P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者一般资料 两组患者的性别比例、年龄、体重、体表面积、左室射血分数(LVEF)均无统计学差异(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 两组患者术前一般资料比较(n=25, $\bar{x}\pm s$)		
项目	C 组	M 组
男/女(例)	5/20	6/19
年龄(岁)	43.0±7.2	45.7±6.6
体重(kg)	53.4±9.9	56.5±10.1
体表面积(m ²)	1.63±0.19	1.64±0.20
LVEF(%)	53.6±8.6	53.4±7.6

2.2 两组患者临床指标 所有入选患者未出现心肌梗塞、死亡等严重并发症,均顺利出院。两组患者的体外循环时间、主动脉阻闭时间、呼吸机使用时间、ICU 停留时间、术后住院时间、自动复跳率、多巴胺使

用率,差别均无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 2。

2.3 两组患者血清指标的变化

2.3.1 血清 cTnI 浓度的变化 组内比较:主动脉开放后两组患者 cTnI 浓度迅速升高,均于主动脉开放后 3 h 达峰,而后下降。与切皮前比,两组患者主动脉开放后各时点的 cTnI 浓度均显著升高(*P* < 0.05)。组间比较:在切皮前,两组 cTnI 浓度差异无统计学意义(*P* > 0.05)。在主动脉开放后 30 min~6 h,M 组 cTnI 浓度均明显低于 C 组(*P* < 0.05)。见表 3。

2.3.2 血清 MDA 浓度的变化 组内比较:主动脉开放后两组患者 MDA 浓度迅速升高,均于主动脉开放后 3 h 达峰,而后下降。与切皮前比,两组患者主动脉开放后各时点的 MDA 浓度均显著升高(*P* < 0.05)。组间比较:在切皮前,两组 MDA 浓度差异无统计学意义(*P* > 0.05)。在主动脉开放后 30 min~24 h,M 组 MDA 浓度明显低于 C 组(*P* < 0.05)。见表 3。

2.3.3 血清 SOD 浓度的变化 组内比较:主动脉开放后两组患者 SOD 浓度迅速降低,于主动脉开放后 3 h 达低谷,而后上升。与切皮前比,两组患者主动脉开放后各时点的 SOD 浓度均显著降低(*P* < 0.05)。组间比较:在切皮前、主动脉开放后 30 min、24 h 两组 SOD 浓度差异无统计学意义(*P* > 0.05)。在主动脉开放后 3 h 和 6 h,M 组 SOD 浓度明显高于 C 组(*P* < 0.05)。见表 3。

2.3.4 血清 IL-6 浓度的变化 组内比较:主动脉开放后两组患者血清 IL-6 浓度迅速升高,均于主动脉开放后 3 h 达峰,而后下降。与切皮前比,两组患者主动脉开放后各时点的 IL-6 浓度均显著升高(*P* < 0.05)。组间比较:在切皮前,两组 IL-6 浓度差异无统计学意义(*P* > 0.05)。在主动脉开放后 30 min~24 h,M 组 IL-6 浓度明显低于 C 组(*P* < 0.05)。见表 3。

2.3.5 血清 IL-10 浓度的变化 组内比较:主动

表 2 两组患者围术期临床资料比较(n=25, $\bar{x}\pm s$)		
项目	C 组	M 组
体外循环时间(min)	128.67±28.94	131.06±29.10
阻闭时间(min)	52.17±8.04	53.46±13.73
呼吸机使用时间(h)	17.62±6.53	16.93±6.07
ICU 停留时间(d)	7.40±2.52	7.35±1.95
术后住院时间(d)	2.32±0.37	2.29±0.37
自动复跳例数/总例数	12/25	16/25
是/否使用多巴胺(例数/总例数)	9/25	7/25

表 3 两组患者围术期血清 cTnI、MDA、SOD、IL-6、IL-10 的浓度变化 (n=25, $\bar{x}\pm s$)

项目	组别	切皮前	主动脉开放后			
			30 min	3 h	6 h	24 h
cTnI($\mu\text{g/L}$)	C 组	1.07 $\pm$ 0.16	5.01 $\pm$ 0.72 [#]	35.42 $\pm$ 4.14 [#]	18.63 $\pm$ 1.36 [#]	4.76 $\pm$ 0.89 [#]
	M 组	1.07 $\pm$ 0.23	3.84 $\pm$ 0.69 ^{#*}	27.48 $\pm$ 3.27 ^{#*}	15.94 $\pm$ 1.26 ^{#*}	2.95 $\pm$ 0.76 ^{#*}
MDA($\mu\text{mol/L}$)	C 组	2.65 $\pm$ 0.22	6.06 $\pm$ 0.47 [#]	16.92 $\pm$ 1.34 [#]	11.59 $\pm$ 0.63 [#]	7.64 $\pm$ 0.72 [#]
	M 组	2.61 $\pm$ 0.19	5.78 $\pm$ 0.51 ^{#*}	15.21 $\pm$ 1.51 ^{#*}	10.12 $\pm$ 0.95 ^{#*}	6.48 $\pm$ 0.60 ^{#*}
SOD(U/ml)	C 组	105.21 $\pm$ 4.46	70.66 $\pm$ 5.85 [#]	22.83 $\pm$ 3.67 [#]	45.90 $\pm$ 4.85 [#]	81.31 $\pm$ 5.47 [#]
	M 组	107.67 $\pm$ 4.87	70.56 $\pm$ 5.91 [#]	27.98 $\pm$ 3.69 ^{#*}	54.07 $\pm$ 6.02 ^{#*}	83.60 $\pm$ 5.64 [#]
IL-6(ng/L)	C 组	8.43 $\pm$ 0.95	26.46 $\pm$ 4.12 [#]	120.30 $\pm$ 6.89 [#]	57.35 $\pm$ 4.76 [#]	22.16 $\pm$ 2.32 [#]
	M 组	8.87 $\pm$ 0.83	17.81 $\pm$ 3.83 ^{#*}	97.54 $\pm$ 10.68 ^{#*}	46.83 $\pm$ 5.31 ^{#*}	16.76 $\pm$ 1.23 ^{#*}
IL-10(ng/L)	C 组	28.13 $\pm$ 0.69	39.23 $\pm$ 5.67 [#]	140.47 $\pm$ 24.32 [#]	76.21 $\pm$ 6.02 [#]	34.04 $\pm$ 4.98 [#]
	M 组	27.61 $\pm$ 1.85	55.32 $\pm$ 7.43 ^{#*}	174.01 $\pm$ 26.99 ^{#*}	94.88 $\pm$ 9.56 ^{#*}	47.73 $\pm$ 5.01 ^{#*}

注:与切皮前比较,[#]*P*<0.05;与 C 组比较,^{*}*P*<0.05。

脉开放后两组患者血清 IL-10 浓度迅速升高,均于主动脉开放后 3 h 达峰,而后下降。与切皮前比,两组患者主动脉开放后各时点的 IL-10 浓度均显著升高(*P*<0.05)。组间比较:在切皮前,两组 IL-10 浓度差异无统计学意义(*P*>0.05)。在主动脉开放后 30 min~24 h,M 组 IL-10 浓度明显高于 C 组(*P*<0.05)。见表 3。

3 讨 论

胸腔镜心脏手术在我国微创心脏外科中迅速发展,接受胸腔镜心脏手术的患者日益增加。但由于腔镜手术操作空间的限制,体外循环转流时间和手术时间较长,有研究指出比常规心内直视下转流时间长 25%^[4],增加了心肌保护的难度。故加强对该类手术患者的心肌保护有更重要的现实意义。与以往研究的传统开胸心脏手术不同,本研究选择了胸腔镜下二尖瓣置换术的患者作为心肌缺血再灌注损伤的模型。

参考文献^[5-6]及临床麻醉中阿片药物的使用剂量,本研究选择吗啡后处理的剂量总共为 0.1 mg/kg。为了保证再灌注时吗啡有较高的血药浓度,本研究选择了主动脉开放前 3 min 和主动脉开放即刻分别向储血器推注吗啡 0.05 mg/kg。

cTnI 是一种唯一存在于心肌中的收缩蛋白,具有心肌特异性。cTnI 检测心肌损害的特异性(100%)和灵敏性(96%)均较高^[7]。目前,cTnI 被认为是当前诊断心肌损伤的金标准,是临床上最常用的评估围术期心肌损伤的指标,故本研究也采用了血清 cTnI 来评估心肌保护作用。研究结果显示主动脉开放后吗啡后处理组的 cTnI 浓度均明显低于

对照组,说明吗啡后处理可以降低心肌缺血再灌注损伤导致的 cTnI 释放,减少心肌损伤,有心肌保护作用。

SOD 是机体内一种重要的自由基清除剂,具有很强的抗氧化作用。它能保护细胞不受有害氧自由基的攻击,防止自由基氧化而造成的机体损害。MDA 是氧自由基诱发生物膜中的多不饱和脂肪酸过氧化的代谢产物。MDA 的高低可作为判断生物膜过氧化损伤程度的指标之一,也可以间接反应氧自由基的浓度。本研究将 SOD 的降低和 MDA 的升高结合起来分析,更有助于判断氧自由基导致心肌细胞的损伤程度。结果显示:主动脉开放后吗啡后处理组 SOD 的浓度明显高于对照组,MDA 的浓度明显低于对照组。表明吗啡后处理可在一定程度上减轻心肌缺血再灌注对 SOD 活性的抑制,促进 SOD 活性的恢复,加强氧自由基的清除,减轻脂质过氧化反应,减轻心肌损伤,增强心肌保护作用。

IL-6 是围术期反映炎症反应的最主要细胞因子。它能促进炎症因子的进一步释放。它的升高与体外循环后心功能不全有关,是反映组织损伤的早期和敏感指标^[8]。IL-10 具有免疫抑制活性,是重要的抗炎因子。目前认为评价机体免疫功能状态最有价值的指标是血浆 IL-10 浓度及单核细胞的功能^[9]。IL-10 的释放增加代表着限制炎症反应的内在性反应,抗炎因子的大量增加说明了人体也在尽可能地限制过激的炎症反应^[10]。本研究同时检测血浆中 IL-6 与 IL-10 的水平变化,可以较好的反映全身炎症反应的平衡状态。Murphy 等^[11]发现在体外循环中给予吗啡比芬太尼有更好的心肌保护作用,且能更好的减轻体外循环引起的全身炎症反应。

本研究结果显示:主动脉开放后两组 IL-6 和 IL-10 均同时升高,而后下降。表明了体外循环同步诱发了机体的促炎性与抗炎性应答。但主动脉开放后,吗啡后处理组 IL-6 的浓度明显低于对照组,IL-10 的浓度明显高于对照组,表明吗啡可一定程度减轻炎症反应,从而减轻心肌损伤,增强心肌保护作用。

本研究显示吗啡后处理组呼吸机使用时间、ICU 停留时间、术后住院时间、自动复跳率、多巴胺使用率等临床指标均无统计学差异($P > 0.05$),这可能和样本量较小有关,也可能和主管医生的习惯、呼吸机的数量有关。未见吗啡后处理组呼吸机使用时间延长,也说明小剂量的吗啡并不延长拔管时间。

综上所述,吗啡后处理对胸腔镜下二尖瓣置换术患者有一定的心肌保护作用。其机制可能与减轻氧自由基损伤和抑制炎症反应有关。而且使用 0.1 mg/kg 的吗啡后处理,简单、易行,安全性高,有一定的临床意义。

参考文献:

- [1] 周和平,孙国成,陈涛,等. 全胸腔镜下二尖瓣置换的体外循环管理[J]. 中国体外循环杂志,2011,9(4):209-210.
- [2] 李洪,肖颖彬,杨天德,等. 吗啡预处理对成年大鼠心肌细胞缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 临床麻醉学杂志,2005,21(8):546.
- [3] 黑飞龙. 体外循环教程[M]. 北京:人民卫生出版社,2011. 357-361.

- [4] Aklog L, Adams DH, Couper GS, *et al*. Technique and results of direct-access minimally invasive mitral valve surgery: a paradigm for the future [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(5):705-715.
- [5] 李洪,杨天德,吴悦维,等. 吗啡复合七氟醚预处理对体外循环冠脉搭桥患者术中的心肌保护作用[J]. 重庆医学,2009,38(15):1873-1875.
- [6] MiKi T, Cohen MV, Downey JM. Opioid receptor contributes to ischemic precondition through protein kinase C activation rabbits [J]. Mol Cell Biochem, 1998, 186(1-2):3-12.
- [7] Mair J, Larue C, Mair P, *et al*. Use of cardiac troponin I to diagnose perioperative myocardial infarction in coronary artery bypass grafting [J]. Clin Chem, 1994, 40(11 Pt 1):2066-2070.
- [8] Stoney WS. Evolution of cardiopulmonary bypass [J]. Circulation, 2009, 119(6):2844-2853.
- [9] 刘建东,王刚,陈婷婷,等. 乌司他丁对心脏瓣膜置换术患者炎性因子的影响[J]. 中国体外循环杂志,2009,7(1):12-15.
- [10] Evans BJ, Haskard DO, Finch JR, *et al*. The inflammatory effect of cardiopulmonary bypass on leukocyte extravasation in vivo [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 135(5):999-1006.
- [11] Murphy GS, Szokol JW, Marymont JH, *et al*. The effects of morphine and fentanyl on the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in patients undergoing elective coronary artery bypass graft surgery [J]. Anesth Analg, 2007, 104(6):1334-1342.

(收稿日期:2013-09-06)

(修订日期:2013-09-23)

(上接第 202 页)

- [6] 郝晓斌,郑世营,张旭光. 小儿体外循环术后毛细血管渗漏综合征的危险因素分析[J]. 中国现代医生,2009,47(16):12-13, 22.
- [7] 刘成军,刘露,许峰,等. 小儿先天性心脏病体外循环术后毛细血管渗漏综合征的影响因素[J]. 中国实用儿科杂志,2006,21(10):753-755.
- [8] 宋花玲,贺佳,黄品贤,等. ROC 曲线下面积估计的参数法与非参数法的应用研究[J]. 第二军医大学学报,2006,27(7):726-728.
- [9] 陈卫中,潘晓平,宋兴勃,等. ROC 曲线中最佳工作点的选择[J]. 中国卫生统计,2006,23(2):157-158.
- [10] 李立明. 流行病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008.71.
- [11] Abrahamov D, Erez E, Tamariz M, *et al*. Plasma vascular endothelial growth factor level is a predictor of the severity of postoperative capillary leak syndrome in neonates undergoing cardiopulmonary bypass [J]. Pediatr Surg Int, 2002, 18(1):

54-59.

- [12] Miyaji K, Kohira S, Miyamoto T, *et al*. Pediatric cardiac surgery without homologous blood transfusion, using a miniaturized bypass system in infants with lower body weight [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 134(2):284-289.
- [13] Loeffelbein F, Zirell U, Benk C, *et al*. High colloid oncotic pressure priming of cardiopulmonary bypass in neonates and infants: implications on haemofiltration, weight gain and renal function [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2008, 34(3):648-652.
- [14] Arens J, Schnoering H, Pfennig M, *et al*. The Aachen MiniHLM—a miniaturized heart-lung machine for neonates with an integrated rotary blood pump [J]. Artif Organs, 2010, 34(9):707-713.

(收稿日期:2013-03-18)

(修订日期:2013-05-07)

· 临床研究 ·

乌司他丁自体血冷心脏停搏液 对体外循环未成熟心肌保护作用的研究

孟保英, 王元祥, 潘晓兰, 张 青, 提运幸, 沈定荣, 彭 乐, 马 超

[摘要]:目的 探讨含乌司他丁自体血冷心脏停搏液对体外循环下未成熟心肌的保护作用。方法 年龄 ≤ 10 个月行体外循环室间隔缺损修补术患儿 58 例, 随机分成含乌司他丁的自体血冷心脏停搏液组(A 组)、自体冷血心脏停搏液组(B 组)。分别于体外循环前 5 min 及主动脉开放后 10 min 检测心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的水平, 比较术中心脏复跳时间及复跳率, 正性肌力药物评分情况。结果 主动脉开放 10 min 时 B 组 SOD 低于 A 组($P < 0.01$), MDA 高于 A 组($P < 0.01$)。A 组心脏自动复跳时间及正性肌力药物评分均明显低于 B 组($P < 0.05$)。结论 含乌司他丁自体血冷心脏停搏液对体外循环心脏直视手术中未成熟心肌有保护作用。

[关键词]: 先天性心脏病; 乌司他丁; 未成熟心肌; 心肌保护

[中图分类号]: R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:** 1672-1403(2013)03-0235-03

Effects of cold self-blood cardioplegia with ulinastatin on immature myocardial protect in infant after opening cardiac operation under cardiopulmonary bypass

Meng Bao-ying, Wang Yuan-xiang, Pan Xiao-lan, Zhang Qing, Ti Yun-xing, Shen Ding-rong, Peng Le, Ma Chao

Cardiovascular Center, Shenzhen Children's Hospital of Chinese Medical University, Shenzhen, Guangdong, 518026, China

Corresponding author: Zhang Qing, Email: szmengbaoying@163.com

[Abstract]: Objective To observe the effect of cold self-blood cardioplegia with ulinastatin on immature myocardial protect in infant after opening cardiac operation with cardiopulmonary bypass (CPB). **Methods** 58 infantile patients underwent repairing of ventricular septal defect (VSD) with CPB were randomized into two groups. The 29 cases in group A were given cold self-blood cardioplegia with ulinastatin. The 29 cases in group B were given cold self-blood cardioplegia. The levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in myocardial tissue were examined at five minutes before CPB and 10 minutes after aortic clamping removal. The cardiac automatic recovery times and the inotropic score were documented during operation. **Results** At 10 minutes after aortic clamping removal, the levels of SOD in myocardial tissue in two groups were significantly decreased, and it was significant lower in group B than that in group A ($P < 0.05$), while the levels of MDA were significantly increased, and it was significant higher in group B than that in group A ($P < 0.05$). The cardiac automatic recovery time was shorter and the inotropic score was lower in group A compared with that in group B ($P < 0.05$). **Conclusion** The cold self-blood cardioplegia with ulinastatin is useful to the immature myocardial protection in infant underwent opening cardiac operation with CPB.

[Key words]: Congenital heart disease; Ulinastatin; Myocardial protection; Immature myocardial

早期手术是根治先天性心脏病(congenital heart disease, CHD)、降低死亡率的唯一有效措施, 但心肌保护不够完善仍是婴幼儿心脏术后心功能不全及住院病死率较高的主要原因, 因此, 寻求与未成熟心肌生理功能相适应的保护措施, 是国内外心脏外科

关注的焦点。深圳市儿童医院心脏中心使用含乌司他丁(Ulinastatin, UST)的自体血冷心脏停搏液, 以期减轻心肌损伤, 并取得一定临床成效。

1 资料与方法

1.1 病例选择 经医院伦理委员会讨论通过, 并经监护人知情同意, 2012 年 1 月到 2013 年 1 月在本院收治的行体外循环室间隔缺损修补术患儿 58 例

基金项目: 深圳市科技计划资助项目(201002115)

作者单位: 518026 深圳, 深圳市儿童医院心血管中心

进入本研究,其中男 31 例,女 27 例;年龄 2~8 (4.5±0.2)m;体重 3.5~10 (5.3±0.3) kg。随机分为含 UST 自体血冷心脏停搏液组(A 组:n=29,男 16 例,女 13 例)及自体血冷心脏停搏液组(B 组,n=29,男 15 例,女 14 例)。术前将所有患儿按照标准进行心功能分级^[1],两组患儿术前心功能分级无显著性差异。术前无肝肾功能异常、肺炎等合并症,末梢血象正常。

1.2 心脏停搏液制备 所有患儿主动脉阻断后注入含血心脏停搏液,剂量均为 30 ml/kg,其中血液:晶体 4:1(晶体配方为 0.9%氯化钠 105 ml,5%葡萄糖 105 ml,10%氯化钾 15.5 ml,5%碳酸氢钠 15 ml,25%硫酸镁 2.5 ml)。A 组晶体停搏液中加入注射用 UST 5 000 U/kg,(5 U/支,产品批号 021208024,广东天普生化医药股份有限公司,生产日期 2012 年 8 月 24),经主动脉根部按血液:晶体 4:1 比例快速抽取血液,K⁺浓度 20 mmol/L,抽血时间约 30~50 s,保持动脉收缩压≥40 mm Hg,停搏液制备完毕后,经主动脉插管补充血容量以维持循环稳定,并将配制的心脏停搏液浸入冰屑液中制成 4℃冷停搏液备用。B 组:停搏液抽取及制备均与 A 组相同,但不含 UST。

1.3 体外循环及心脏停搏液灌注方法 主动脉阻断后,A 组使用含 UST 自体血冷心脏停搏液、B 组使用自体血冷心脏停搏液于主动脉根部灌注。手术由同一组医生、麻醉师、体外循环师合作完成。采用 JOSTRA 人工心肺机,POLYSTAN 膜式氧合器,全血预充,体外循环采用浅、中低温(25~32℃),红细胞比容(Hct)0.25~0.30。并行循环降温,阻断升主动脉,不同组别分别经主动脉根部灌注相应的心脏停搏液,剂量均为 30 ml/kg,灌注压力 30 mm Hg。体外循环结束时进行改良超滤。

1.4 心肌标本采集 分别在体外循环前 5 min 及主动脉开放 10 min 取右心耳 50~60 mg,无菌生理盐水冲洗,称量后立即入液氮中速冻,并移入-80℃冰箱保存。

1.5 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定 取出冷冻保存的心肌组织, SOD 采用 WST-1 法测定试剂盒检测,MDA 采用 MDA 测定试剂盒检测(试剂盒均由南京建成科技有限公司提供)并严格按照说明书检测。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理。结果数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据组内及组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为有统计

学差异。

2 结 果

2.1 所有患儿体外循环时间 45~83 (59.5±5.3) min,主动脉阻断时间 25~45 (33.2±4.1) min。主动脉开放后心脏均自动复跳,术后无死亡。

2.2 两组患儿临床资料比较 A 组主动脉开放后至心脏复跳转为窦性节律时间(复跳时间)较 B 组缩短,具有统计学差异(*P* < 0.05),A 组术后机械通气时间较 B 组缩短,有统计学差异(*P* < 0.05),A 组正性肌力药物评分(inotropicscore, IS)低于 B 组,有统计学差异(*P* < 0.05),见表 1。

表 1 两组患儿临床情况(n = 29, $\bar{x}\pm s$)

项目	A 组	B 组
年龄(m)	4.4±0.2	4.6±0.1
体重(kg)	5.2±0.2	5.3±0.3
主动脉阻断时间(min)	34.1±3.2	32.2±4.4
体外循环时间(min)	60.8±7.6	58.5±6.3
复跳时间(s)	35.1±3.7	45.3±5.2 [#]
室颤发生率(%)	0(0%)	0(0%)
IS [*]	2.5±0.2	3.8±0.3 [#]
术后机械通气时间(h)	7.5±2.1	9.5±1.7 [#]
监护室滞留时间(d)	2.1±1.1	2.3±1.2
住院时间(d)	7.2±1.9	7.5±1.7

注:IS=多巴胺(×1)+多巴酚丁胺(×1)+氨力农(×1)+米力农(×10)+肾上腺素(×100);与 A 组比较[#]*P* < 0.05。

2.3 两组不同时点心肌 SOD 活力及 MDA 含量比较 体外循环前 5 min 两组心肌 SOD 活力及 MDA 含量比较无统计学差异(*P* > 0.05);主动脉开放 10 min 两组心肌 SOD 活力较体外循环前 5 min 明显减低,且 B 组心肌 SOD 活力较 A 组明显减低,有统计学差异(*P* < 0.05)。主动脉开放 10 min 两组心肌 MDA 含量较体外循环前 5 min 明显增加,且 B 组心肌 MDA 含量较 A 组明显增加,有统计学差异(*P* < 0.05),见表 2。

2.4 术后随访 A、B 组术后均存活,术后随访 1 个月至 1 年,心功能均无统计学差别。

3 讨 论

目前常用的心脏停搏液种类较多,对未成熟心肌的保护效果差异显著,本中心自 2005 年采用自体血冷心脏停搏液,目前已证实其优于康斯特保护液(HTK 液)及常规血冷心脏停搏液,但是仍存在心脏直视手术后不同程度的心肌细胞损伤^[2-4]。笔者近年来采用 UST 及自体血配制心脏停搏液,进行心内直视手术灌注停跳,并取得良好的临床效果。

表 2 两组心肌 SOD、MDA 比较(n=29, $\bar{x}\pm s$)

时间	SOD(U/L)		MDA(mmol/L)	
	A 组	B 组	A 组	B 组
体外循环前 5 min	69.2±4.5	68.4±3.6	0.85±0.1	0.84±0.1
主动脉开放后 10 min	57.6±2.3	40.1±3.1 [#]	2.1±0.1	3.5±0.2 [#]

注:与 A 组比较[#]*P* <0.05。

UST 是在人类尿液中发现的一种典型的 Kuniz 型的蛋白酶抑制剂,对酶的抑制具有广谱性、同时性和放大性;其代谢产物也具有很强的水解酶抑制作用,可抑制炎性介质的释放及蛋白酶的活性。在临床上 UST 目前已广泛应用于体外循环、围手术期、烧伤、休克、重症胰腺炎、急性重症创伤、全身炎症反应综合征及多器官功能障碍综合征等急危重症、外科手术及其他相关领域^[5-6]。研究表明 UST 对于降低炎性介质白细胞介素 6 和白细胞介素 8 有明显作用,对于消除自由基、防止心脏直视手术中心肌再灌注损伤有明显作用^[7-8]。

生理状态下,心肌细胞内存在一定量的氧自由基,但氧自由基的生成与清除达到平衡状态,不会造成组织损伤。当组织细胞缺血、缺氧时,氧自由基清除系统功能降低,生成系统活性增强,组织恢复血液和氧供时,便产生大量的氧自由基,以各种方式造成细胞急性或慢性损伤^[9]。近年来研究表明氧自由基可以引起细胞膜脂质过氧化,形成大量降解产物 MDA,使得正常的膜结构受到破坏,通透性增高;直接攻击核酸,使 DNA、RNA 交链断裂;抑制前列环素合成酶,激活血小板环化酶,生成大量的血栓素 A2;使肌浆网钙依赖性 ATP 失活,肌浆网摄钙能力下降,肌浆内钙离子浓度升高,兴奋收缩偶联受损等,引起心肌损伤^[10]。SOD 可以清除体内的氧自由基,因此,SOD 的高低可以反应机体清除氧自由基的能力,而 MDA 水平可以间接反应细胞受氧自由基攻击的损伤程度。由于心内直视手术机体处于一种非生理状态,主动脉阻断、灌注停搏液后,心肌处于缺血、停搏状态。主动脉再次开放后,随着冠状动脉再次通血,心脏复跳,造成了心肌缺血再灌注损伤,在此过程中产生的氧自由基是造成心肌损伤的主要因素,可导致心肌代谢障碍为主的病理生理改变,心脏复跳后心肌收缩功能降低和心脏电活动异常。

本研究采用含 UST 自体血冷停搏液及自体血冷停搏液进行心内直视手术灌注停跳,结果表明,含 UST 的 A 组心肌 IS 及心脏复跳时间均低于 B 组;虽然主动脉开放 10 min 两组心肌 SOD 活力、MDA 含量分别较体外循环前 5 min 明显减低和增高,但含 UST

的 A 组明显地较 B 组的 SOD 活力高、MDA 含量低。由此可见,含 UST 的自体血冷心脏停搏液可能在一定程度上能够减轻体外循环下心肌组织 MDA 含量及 SOD 活力的下降,因此,可能减轻心肌细胞缺血再灌注损伤,消除氧自由,减轻心肌损伤,从而保护心肌细胞功能。笔者认为在婴儿体外循环直视手术中使用含 UST 的自体血冷心脏停搏液可能利于未成熟心肌保护,减轻心肌损伤,利于术后心功能恢复,对未成熟心肌保护效果优于自体血冷心脏停搏液。

参考文献:

[1] 胡亚美,江载芳. 诸福棠,实用儿科学[M]. 第 7 版,北京,人民卫生出版社. 2008 年,1514.

[2] 沈定荣,王涛,张青,等. 自体冷血心脏停搏液对未成熟心肌细胞三磷酸腺苷及二磷酸腺苷的影响[J]. 中国体外循环杂志,2010,8(4):215-218.

[3] 张青,孟保英,彭乐,等. 自体冷血停跳液对未成熟心肌保护机制的研究[J]. 临床心血管病杂志,2009,25(4)269-271.

[4] 张青,孟保英,彭乐,等. 自体冷血停跳液对婴幼儿心肌保护机制的研究[J]. 中国当代儿科杂志,2009,11(8):638-640.

[5] 仲吉英,杨承祥,肖平. 乌司他丁在体外循环心脏手术中对细胞免疫功能的影响[J]. 第四军医大学学报,2007,28(1):51-53.

[6] Ito K, Mizutani A, Kira S, *et al* . Effect of Ulinastatin a human urinary trypsin inhibitor on the oleic acid-induced acute lung injury in rats via the inhibition of activated leukocytes [J]. Injury, 2005,36(3):387-394.

[7] Masuda T, Sato K, Noda C, *et al* . Protective effect of urinary trypsin inhibitor on myocardial mitochondria during hemorrhagic shock and reperfusion [J]. Crit Care Med,2003,31(7):1987-1992.

[8] Sugita T, Watarida S, Katsuyama K, *et al* .Effect of a human urinary protease inhibitor (Ulinastatin) on respiratory function in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass [J]. J Cardiovasc Surg(Torino), 2002,43(4):437-440.

[9] Ruiz-Gines JA, Lopez-Ongil S, Gonzalez-Rubio M, *et al* . Reactive oxygen species induce proliferation of ovine aortic endothelial cells [J]. Cardiovasc Pharmacol, 2000,35(1):109-113.

[10] Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, *et al* . Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury [J]. Int J Cardiol, 2002,86(1):41-59.

(收稿日期: 2013-05-03)

(修订日期:2013-06-13)

· 基础研究 ·

乌司他丁对外源性过氧化氢介导内皮细胞损伤的保护作用

雷兰萍,魏毅君,熊红燕,杨 阳,陈 涛,金振晓

[摘要]:目的 研究乌司他丁对外源性过氧化氢介导的内皮细胞损伤的保护作用。方法 体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)培养液中加入外源性过氧化氢(250 μmol/L)制作内皮细胞损伤模型,加入不同浓度的乌司他丁(100、500、1 500、3 000和5 000 U/ml),MTT法检测内皮细胞存活率,同时检测培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性、一氧化氮含量和弹性蛋白酶活性,并测定内皮细胞黏附能力。结果 外源性过氧化氢可以显著降低内皮细胞存活率,同时培养液中LDH活性显著升高、一氧化氮含量显著降低、弹性蛋白酶活性显著升高,内皮细胞黏附能力下降。乌司他丁虽然可以在一定程度上抑制细胞培养液中弹性蛋白酶活性的升高,但是对细胞存活率、LDH的释放、一氧化氮的释放、细胞黏附能力均无明显改善作用。结论 本研究采用的乌司他丁剂量对外源性过氧化氢介导的内皮细胞损伤无明显保护效果。

[关键词]: 乌司他丁;内皮细胞;过氧化氢;弹性蛋白酶

[中图分类号]:R654.1 [文献标识码]: A [文章编号]:1672-1403(2013)04-0238-04

The protective effects of ulinastatin against exogenous H₂O₂-induced vascular endothelial cells injury

Lei Lan-ping, Wei Yi-jun, Xiong Hong-yan, Yang Yang, Chen Tao, Jin Zhen-xiao.

Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Jin Zhen-xiao. Email: jinzx10262@aliyun.com

[Abstract]: Objective To investigate the protective effect of ulinastatin on exogenous H₂O₂-induced vascular endothelial cells injury. Methods In vitro H₂O₂ mediated endothelial cell injury model was established by adding H₂O₂(250 μmol/L) into the Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) culture system. Serial concentrations (100, 500, 1 500, 3 000 and 5 000 U/ml) of ulinastatin were added to the culture system. Cellular viability was determined with MTT assay; lactate dehydrogenase (LDH) content, NO content and elastase activity in the culture medium were examined. Cellular adhesive ability was also measured. Results The co-culture process of H₂O₂ and HUVECs significantly decreased the viability and adhesive ability of HUVECs, decreased the NO content and increased the LDH and elastase content in the culture medium. Ulinastatin inhibited the changes of medium elastase contents at some level, but had no significant effects on cellular viability and adhesive ability. It had no significant effects on the medium content of LDH, NO either. Conclusion Ulinastatin, in the dose used in this study, has no significant protective effects on H₂O₂ mediated endothelial cell injury.

[Key words]: Ulinastatin; Endothelial cell; H₂O₂; Elastase.

血管内皮细胞介于血液与组织间,发挥着屏障作用,同时具有多种生理功能,对维持内环境的稳定起着积极作用。内皮功能异常是Ⅱ型糖尿病患者

血管并发症的始发因素^[1]。氧化应激是糖尿病患者血管内皮功能异常的重要原因^[2]。抗氧化治疗对于预防和治疗糖尿病性血管病变具有重要的临床意义^[3]。内皮细胞氧化应激过程中,会出现溶酶体膜不稳定和溶酶体内蛋白酶的释放,是氧化应激造成内皮细胞损伤的重要机制。采用适当措施稳定溶酶体膜并对抗这些蛋白酶对细胞内结构和细胞膜结构的溶解破坏作用是对抗氧化应激损伤的重要方法。目前,临床上最常用的蛋白酶抑制剂是乌司他丁,乌司他丁是一种从正常男性尿液中提取的蛋白

基金项目: 陕西省攻关计划项目(2012SF2-21-1,2012K15-02-01);天普研究基金项目(01201104)
作者单位: 710032 西安,第四军医大学第一附属医院心血管外科(雷兰萍、段维勋、杨 阳、陈 涛、金振晓);721004 宝鸡,解放军第三医院神经外科(魏毅君);710003 西安,西安市中心医院胸心外科(熊红燕)
通讯作者: 金振晓,Email:jinzx10262@aliyun.com

酶抑制剂,常用于对抗过度炎症反应引起的各种组织损伤^[4]。本研究的主要目的是观察乌司他丁是否能在体外抑制过氧化氢介导的内皮细胞损伤,并初步探讨其对内皮细胞的保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 试剂、细胞与仪器 重组人肿瘤坏死因子 α (rhTNF- α) (R&D 公司,美国),干扰素 γ (IFN- γ) (R&D 公司,美国),乌司他丁(广州天普药业公司)。人脐静脉内皮细胞株由第四军医大学第一附属医院心血管外科实验室提供,小牛血清(杭州四季青公司),DMEM 低糖培养液(Hyclone,美国),胰蛋白酶(Sigma,美国),MTT(Sigma 公司),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所),弹性蛋白酶活性的检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),DMSO(Sigma,美国),细胞裂解液(碧云天,上海)。弹性蛋白酶细胞荧光探针 AAPV Elastase CellProbe™ Reagent(Beckman 公司,美国)。CO₂ 细胞培养箱(Forma,美国),酶标仪(Biotech,美国),超净工作台(苏州净化设备仪器厂),倒置显微镜(Olympus,日本),低速离心机(赛特湘仪,湖南)。

1.2 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的培养、准备与实验分组 HUVECs 用含 10% 小牛血清的 DMEM 细胞培养液在 37℃,5%CO₂ 培养箱内培养 2~3 d。待细胞融合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化。镜下观察到细胞收缩变圆时弃去消化液,加入培养液以终止胰蛋白酶的作用。用滴管吹打壁上的细胞,使其完全脱落并分离。根据实验需要按 2×10^5 /ml 接种于 96 孔培养板中。待细胞融合后,换用无血清的 DMEM 培养液培养 24 h,使细胞同步化,然后即可进行分组实验。过氧化氢浓度为 250 μ mol/L,实验分为 7 组:对照组,H₂O₂ 损伤组,H₂O₂+乌司他丁保护组(乌司他丁浓度分别为 100、500、1 500、3 000 和 5 000 U/ml)。对照组,HUVECs 在 DMEM 中孵育 4 h;H₂O₂ 损伤组,HUVECs 在含有 H₂O₂ 的 DMEM 中孵育 4 h;H₂O₂+乌司他丁保护组,HUVECs 在含有 H₂O₂ 和不同浓度乌司他丁的 DMEM 中孵育 4 h。孵育完成后,收集培养液用于其它检测。

1.3 MTT 法检测不同浓度乌司他丁对过氧化氢介导 HUVECs 损伤后细胞存活率的影响 加入 DMEM 培养液(100 μ l)和含 0.5% MTT 的培养液(10 μ l),37℃,5%CO₂ 培养箱内孵育 4 h 后,弃培养液,加入 100 μ l 的 DMSO 原液,振荡 10 min,待结晶完全溶解后,同时用酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光值(OD 值),实验重复 3 次。

1.4 培养液中 LDH 含量的测定 LDH 试剂盒购至南京建成生物工程研究所,按照试剂盒说明书对上述收集到的培养液进行 LDH 含量检测。实验重复 3 次。

1.5 培养液中一氧化氮(NO)含量的测定 以 Griess 法测定细胞培养液中 NO 含量^[5]。方法简述如下:100 μ l 细胞培养液与 100 μ l 的 Griess 试剂(1%磺胺溶于 2.5%磷酸与等体积的 0.1%萘乙二胺盐酸盐混合液)在室温下反应 10 min,在酶标仪上于 540 nm 测定吸光度。根据 NaNO₂ 的标准曲线,计算出细胞培养液中 NO 的含量。实验重复 3 次。

1.6 培养液中弹性蛋白酶活性的检测 培养液中中性粒细胞弹性蛋白酶活性采用显色性底物方法检测,弹性蛋白酶将其特异性底物 N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide 分解后,释放出 p-nitroanilide,即可在分光光度计测定其含量。方法简述如下:培养上清液 400 g 离心 10 min 后,加入含有显色底物和 NaCl(0.5 M)的 Tris-HCl(0.1 mM)缓冲液,37℃孵育 10 min,0.1 M NaOH 终止反应,弹性蛋白酶消化底物释放出的 p-nitroanilide 的含量在 405 nm 波长分光光度计下检测。以损伤组的平均 OD 值为 1,其它各组培养液中弹性蛋白酶的活性表示为 1 的倍数。实验重复 3 次。

1.7 黏附实验测定细胞黏附能力 实验方法参照文献报道^[6],具体为:细胞种于 50 ml 培养瓶中,各组细胞处理 4 h 后,PBS 洗 3 遍,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,离心、重悬后,每组细胞计数 5×10^5 /ml,种于 96 孔板,每组 8 个复孔。接种 0.5 h 后弃去培养液,加入 DMEM 培养液(100 μ l)和含 0.5% MTT 的培养基(10 μ l),37℃、5%CO₂ 培养箱内孵育 4 h,倒置显微镜拍照,不同观察者对同一视野的细胞计数。实验重复 3 次。

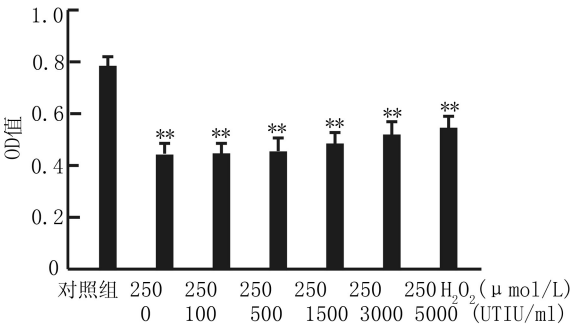
1.8 细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量测定 参照文献报道^[7],ROS 可以将非荧光的 2',7'-DCFH-DA 转化能发出荧光的 DCFH。内皮细胞接种在黑色 96 孔板中,进行分组处理后,PBS(pH 7.4)洗涤然后加入含有 DCFH-DA(20 μ M)的 PBS,37℃孵育 2 h。孵育结束后,FLX 800 型微孔板荧光检测仪(Biotech Instruments Inc.,USA)检测荧光(波长 530 nm)强度,激发光波长为 485 nm。无细胞微孔为本底值。以对照孔的平均荧光强度为 100,结果表示为对照孔荧光强度的百分比。

1.9 统计学分析 统计学处理应用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析,所有实验数据均以均数 $\pm$ 标准差(mean SD)表示,采用 Mann-Whitney 检验进行组

间比较, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结 果

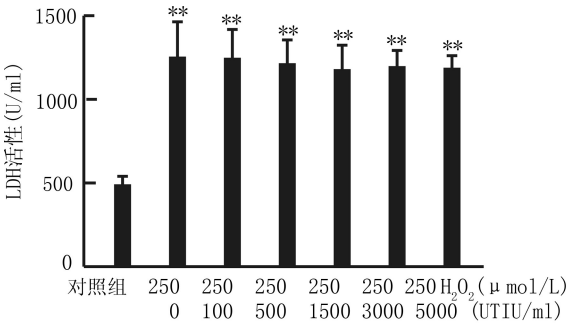
2.1 MTT 法检测乌司他丁对 H_2O_2 致 HUVECs 损伤的保护 H_2O_2 可以显著降低内皮细胞存活率,而本研究采用的乌司他丁剂量都没有显著提高内皮细胞存活率。见图 1。



注:与对照组比较 ** $P < 0.01$ 。

图 1 MTT 法检测不同处理组内皮细胞存活率比较

2.2 培养液中 LDH 含量 各组细胞处理后检测培养液中的 LDH 含量与单纯 DMEM 孵育组相比,过氧化氢与 HUVECs 共孵育可引起培养液中 LDH 含量的显著升高。本研究采用的乌司他丁剂量均未能显著抑制过氧化氢与 HUVECs 共孵育引起的培养液中 LDH 的升高。见图 2。



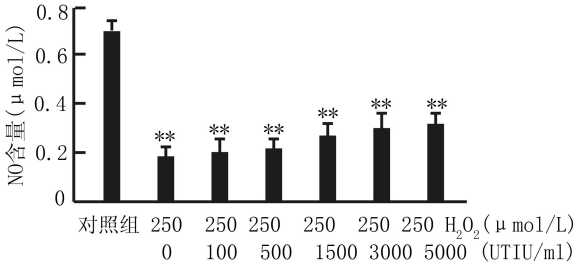
注:与对照组比较 ** $P < 0.01$ 。

图 2 不同处理组内皮细胞培养液中 LDH 含量比较

2.3 培养液中 NO 含量的检测 各组细胞处理后检测培养液中的 NO 含量,与单纯 DMEM 孵育组相比,过氧化氢与 HUVECs 共孵育可以引起培养液中 NO 含量的显著下降。本研究采用的乌司他丁剂量均未能显著抑制过氧化氢与 HUVECs 共孵育引起的培养液中 NO 含量下降。见图 3。

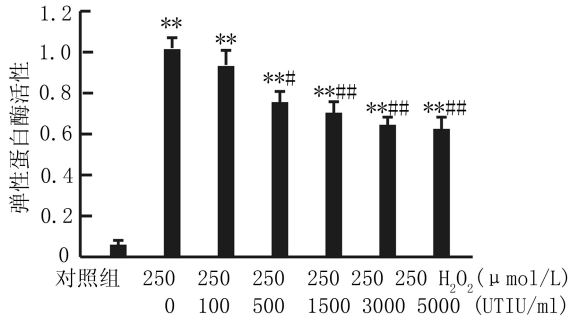
2.4 培养液中弹性蛋白酶活性的检测 各组细胞处理后检测培养液中的弹性蛋白酶的活性,对照组

HUVECs 的培养液中几乎检测不到弹性蛋白酶的活性,过氧化氢与 HUVECs 共孵育可以引起培养液中弹性蛋白酶活性显著升高。超过 3 000 U/ml 的乌司他丁可有效抑制过氧化氢与 HUVECs 共孵育引起的培养液中弹性蛋白酶活性。见图 4。



注:与对照组比较 ** $P < 0.01$ 。

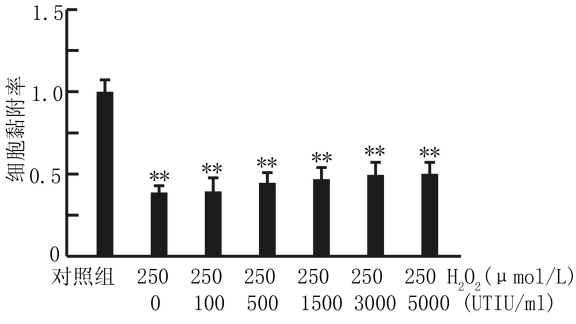
图 3 不同处理组内皮细胞培养液中 NO 含量比较



注:与对照组比较 ** $P < 0.01$;
与损伤组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 不同处理组内皮细胞培养液中弹性蛋白酶活性比较

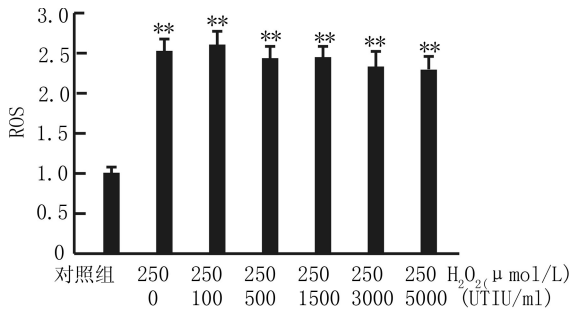
2.5 黏附实验测定细胞黏附能力 各组细胞处理后黏附 0.5 h 后细胞计数统计学分析,见图 5,结果表明 H_2O_2 可以有效降低内皮细胞黏附能力,而不同浓度乌司他丁均未能显著增加内皮细胞黏附能力。



注:与对照组比较 ** $P < 0.01$ 。

图 5 不同处理组内皮细胞黏附能力的比较

2.6 细胞内活性氧含量测定 各组细胞处理后检测细胞内活性氧物质含量,以对照组 HUVECs 中 ROS 含量为 100,过氧化氢与 HUVECs 共孵育可以引起细胞内 ROS 含量显著升高。本研究采用的乌司他丁剂量未能有效抑制过氧化氢与 HUVECs 共孵育引起的细胞内 ROS 含量的升高。见图 6。



注:与对照组比较 ** $P < 0.01$ 。

图 6 不同处理组内皮细胞内 ROS 含量的比较

3 讨论

H₂O₂ 能很容易地穿透细胞膜自由进入细胞,在细胞核内的 H₂O₂ 可转变成具有高活性羟自由基,从而造成 DNA 链断裂,导致细胞损伤^[8]。LDH 是细胞损伤后释放到细胞外的细胞内容物,其在细胞外的活力反映细胞损伤的程度^[9]。本实验中 H₂O₂ 损伤组 HUVECs 培养液中 LDH 含量明显升高,这表明 H₂O₂ 能引起内皮细胞损伤,同时抑制细胞的增殖代偿能力。内皮细胞的黏附能力也是血管内皮损伤后修复能力的体现,本研究结果提示过氧化氢处理可以显著降低培养内皮细胞的黏附能力,表明循环血液中氧化应激水平的升高确实可以对内皮的损伤修复能力造成损害。内皮细胞内活性氧含量反映了细胞内氧化应激的水平,而细胞培养液中弹性蛋白酶的含量反映的是内皮细胞损伤后,溶酶体释放的细胞溶解酶的释放量。NO 是由内皮细胞合成的血管活性物质,它具有舒张血管平滑肌,抑制异常增殖和炎症反应,以及抑制血小板聚集等作用^[10]。内皮源性 NO 对心血管系统具有广泛而明确的调控作用,维持正常的 NO 水平,对心血管保护作用具有重要的意义。II 型糖尿病患者常有血管内皮功能异常,内皮源性 NO 表达减少^[5]。

本实验中不同剂量的乌司他丁虽然在一定程度上降低了细胞培养液中弹性蛋白酶的活性,但是不

能对抗外源性 H₂O₂ 损伤造成的内皮细胞存活率下降,也不能抑制内皮细胞 LDH 的释放,不能抑制内皮细胞内活性氧物质的升高,不能改善外源性过氧化氢损伤后内皮细胞的黏附能力及提高培养液中的 NO 含量,提示乌司他丁对这种外源性过氧化氢造成的内皮细胞损伤没有明显的保护作用。

参考文献:

- [1] Petrofsky JS. The effect of type-2-diabetes-related vascular endothelial dysfunction on skin physiology and activities of daily living [J]. J Diabetes Sci Technol, 2011, 5(3):657-667.
- [2] Yang H, Jin X, Kei Lam CW, *et al*. Oxidative stress and diabetes mellitus [J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(11):1773-1182.
- [3] Drummond GR, Selemidis S, Griending KK, *et al*. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(6):453-471.
- [4] Ogawa M, Nishibe S, Mori T, *et al*. Effect of human urinary trypsin inhibitor on granulocyte elastase activity [J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1987, 55(2):271-274.
- [5] Craigie SM, Chen K, Pei Y, *et al*. NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation [J]. Circulation, 2011, 124(6):731-740.
- [6] Huang PH, Chen YH, Chen YL, *et al*. Vascular endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in patients with cardiac syndrome X [J]. Heart, 2007, 93(12):1064-1070.
- [7] Liu HT, Li WM, Xu G, *et al*. Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells [J]. Pharmacol Res, 2009, 59(3):167-175.
- [8] Jiang J, Zou J, Zhu L, *et al*. Degradation of methylene blue with H₂O₂ activated by peroxidase-like Fe₃O₄ magnetic nanoparticles [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2011, 11(6):4793-4799.
- [9] Giordano G, Hong S, Faustman EM, *et al*. Measurements of Cell Death in Neuronal and Glial Cells [J]. Methods Mol Biol, 2011, 758:171-178.
- [10] Huang PH, Chen JS, Tsai HY, *et al*. Globular adiponectin improves high glucose-suppressed endothelial progenitor cell function through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 51(1):109-119.

(收稿日期:2013-07-15)

(修订日期:2013-07-26)

· 基础研究 ·

乌司他丁对中性粒细胞介导的
内皮细胞损伤的抑制作用

魏毅君,段维勋,熊红燕,雷兰萍,杨阳,陈涛,金振晓

[摘要]:目的 研究乌司他丁对中性粒细胞介导的内皮细胞损伤的抑制作用及其机制。**方法** 体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)通过肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和干扰素- γ (IFN- γ)孵育后活化,正常人血液分离的中性粒细胞经 TNF- α 孵育后激活,活化的 HUVECs 与激活的中性粒细胞共孵育建立中性粒细胞介导的内皮细胞损伤体外模型。共孵育体系中加入不同浓度的乌司他丁(100、500、1 500、3 000 和 5 000 U/ml),MTT 法检测内皮细胞存活率,同时检测培养液中乳酸脱氢酶活性(LDH)、一氧化氮(NO)含量和弹性蛋白酶活性。中性粒细胞与 TNF- α 及不同浓度的乌司他丁共孵育后,流式细胞仪检测细胞内弹性蛋白酶活性。**结果** 激活的中性粒细胞与活化的 HUVECs 共孵育可以显著降低内皮细胞存活率,同时培养液中 LDH 活性显著升高、NO 含量显著降低、弹性蛋白酶活性显著升高,乌司他丁可以剂量依赖性对抗上述变化。同时,乌司他丁可以剂量依赖性降低 TNF- α 激活的中性粒细胞内弹性蛋白酶的活性。**结论** 乌司他丁对中性粒细胞介导的内皮细胞损伤的抑制作用具有剂量依赖性,其机制与乌司他丁抑制中性粒细胞内及释放到细胞外的弹性蛋白酶的活性有关。

[关键词]: 乌司他丁;内皮细胞;中性粒细胞;弹性蛋白酶

[中图分类号]: R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:** 1672-1403(2013)04-0242-06

Inhibitory effect of ulinastatin on neutrophil mediated endothelial cell injury

Wei Yi-jun, Duan Wei-xun, Xiong Hong-yan, Lei Lan-ping, Yang Yang, Chen Tao, Jin Zhen-xiao

Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University,
Shaan'xi Xi'an 710032, China

Corresponding author: Jin Zhen-xiao, Email: jinzx10262@aliyun.com

[Abstract]: Objective To investigate the inhibitory effect of ulinastatin on neutrophil mediated endothelial cell injury and its underlying mechanisms. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were activated with TNF- α and IFN- γ in vitro. Neutrophil cells obtained from health people were separated and primed with TNF- α . In vitro neutrophil mediated endothelial cell injury model was established by activated HUVECs and primed neutrophil co-culture, serial concentrations (100, 500, 1500, 3000 and 5000 U/ml) of ulinastatin were added to the co-culture system. Cellular viability was determined with MTT assay, lactate dehydrogenase (LDH) content, NO content and elastase activity in the culture medium were examined. Meanwhile, serial concentrations of ulinastatin were added to TNF- α primed neutrophil cells, and the intracellular elastase activity was measured with a flow cytometer. **Results** The co-culture process of primed neutrophil and activated HUVECs significantly decreased the viability of HUVECs, decreased the NO content and increased the LDH and elastase content in the culture medium. Ulinastatin inhibited these changes in a dose dependent manner when added in the co-culture system. Furthermore, TNF- α alone could activate the neutrophil and increased the intracellular elastase activity, and ulinastatin could decrease the intracellular elastase activity in a dose dependent manner. **Conclusion** Ulinastatin can dose-dependently inhibit the neutrophil mediated endothelial cell injury in an ex vivo model, this inhibitory effect is associated with the ability of ulinastatin decreasing the intracellular and extracellular elastase activity.

[Key words]: Ulinastatin; Endothelial cell; Neutrophil; Elastase

基金项目: 陕西省攻关计划项目(2012SF2-21-1,2012K15-02-01);天普研究基金项目(01201104)

作者单位: 721004 宝鸡,解放军第三医院神经外科(魏毅君),710032 西安,第四军医大学第一附属医院心血管外科(魏毅君,段维勋,雷兰萍,杨阳,陈涛,金振晓),710003 西安,西安市中心医院胸心外科(熊红燕)

通讯作者: 金振晓,Email:jinzx10262@aliyun.com

人类中性粒细胞内含有许多蛋白酶,这些蛋白酶产生的蛋白溶解作用是中性粒细胞吞噬和消灭病原微生物的主要机制,因此,在抗感染机制中具有重要作用。但是,如果这些蛋白酶从中性粒细胞中不受限制地释放出来,也会对细胞外基质和其它自身细胞造成损伤^[1]。丝氨酸蛋白酶是哺乳动物体内

种类最多的一类蛋白酶,其中弹性蛋白酶以激活形式储存在中性粒细胞的嗜天青颗粒中,在细胞外基质的降解过程中发挥着尤其重要的作用。弹性蛋白酶在中性粒细胞介导的内皮细胞损伤中也具有重要作用,是炎症反应引起血管损伤的重要基础^[2]。近年来,多种弹性蛋白酶抑制剂在实验室中分离出来^[3-5],有的已经用于临床抗炎症反应性疾病的治疗,有的还处于实验室研究阶段。目前,临床上最常用的蛋白酶抑制剂是乌司他丁,乌司他丁是一种从正常男性尿液中提取的蛋白酶抑制剂,常用于对抗过度炎症反应引起的各种组织损伤,可以有效抑制中性粒细胞分泌的弹性蛋白酶和胰蛋白酶的活性^[6]。本研究的主要目的是观察乌司他丁是否能在体外抑制中性粒细胞介导的内皮细胞损伤,并初步探讨其对内皮细胞的保护作用与其对弹性蛋白酶活性的抑制作用之间的关系。

1 材料与方法

1.1 试剂、细胞与仪器 重组人肿瘤坏死因子 α (rhTNF- α) (R&D 公司,美国),干扰素 γ (IFN- γ) (R&D 公司,美国),乌司他丁(广州天普药业公司)。人脐静脉内皮细胞株由第四军医大学第一附属医院心血管外科实验室提供,小牛血清(杭州四季青公司),DMEM 低糖培养液(Hyclone,美国),胰蛋白酶(Sigma,美国),MTT(Sigma 公司),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所),弹性蛋白酶活性的检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),DMSO(Sigma,美国),细胞裂解液(碧云天,上海)。弹性蛋白酶细胞荧光探针 AAPV Elastase CellProbe™ Reagent(Beckman 公司,美国)。流式细胞仪(Becton Dickinson 公司,美国),CO₂ 细胞培养箱(Forma,美国),酶标仪(Biotech,美国),超净工作台(苏州净化设备仪器厂),倒置显微镜(Olympus,日本),低速离心机(赛特湘仪,湖南)。

1.2 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的培养和中性粒细胞的制备 HUVECs 用含 10% 小牛血清的 DMEM 细胞培养液在 37℃,5%CO₂ 培养箱内培养 2~3 d。待细胞融合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化。镜下观察到细胞收缩变圆时弃去消化液,加入培养液以终止胰蛋白酶的作用。用滴管吹打壁上的细胞,使其完全脱落并分离。根据实验需要按 2×10^5 /ml 接种于 96 孔培养板中。待细胞融合后,换用无血清的 DMEM 培养液培养 24 h,使细胞同步化,然后即可进行分组实验。

肝素化全血采自自愿者,中性粒细胞的分离采

用邹常春方法^[7]简述如下:将肝素抗凝血 3 ml,置于特制的细长试管,2 000 r/min 离心 10 min。血液分为淡黄色血浆层和白色的白细胞层以及红细胞层,分别吸取血浆和白细胞,置于洁净试管中。在离心管中依次加入 1 ml 1.090 g/ml Percoll 和 1 ml 1.077g/ml Percoll,再将 1~2 ml 白细胞悬液缓缓铺在 Percoll 液密度梯度溶液上,2 000 r/min 离心 15 min。吸取第 2 和第 3 层之间的细胞层,用自体血浆洗涤 2 次,加入适量 DMEM 培养液孵育 10 min,瑞氏-吉姆萨染色法和台盼蓝染色法检验细胞的纯度和存活率均在 97% 以上。

1.3 MTT 法检测不同浓度乌司他丁对中性粒细胞介导 HUVECs 损伤后细胞存活率的影响 中性粒细胞介导内皮细胞损伤需要内皮细胞和中性粒细胞处于激活状态^[8-9]。

1.3.1 内皮细胞的激活 采用 TNF- α (100 ng/ml) 和 IFN- γ (100 ng/ml) 共同孵育 12 h 获得,采用 DMEM 培养基洗涤 4 次后,进行实验。

1.3.2 中性粒细胞的激活 正常健康人血液一般采用 TNF- α (10 ng/ml) 孵育 5 min 获得,DMEM 培养基洗涤 4 次后,制成 2.0×10^6 /ml 的细胞悬液,进行实验,每孔加入中性粒细胞 1×10^4 ,37℃,5%CO₂ 孵育 12 h,观察中性粒细胞对内皮细胞的损伤作用。

1.3.3 实验分组 共分为 10 组,每组 8 个复孔。对照组 1: HUVECs 不进行活化处理,DMEM 孵育 12 h;对照组 2: HUVECs 进行活化处理,DMEM 孵育 12 h;对照组 3: HUVECs 不进行活化处理,加入未活化中性粒细胞孵育 12 h;对照组 4: HUVECs 进行活化处理,加入未活化中性粒细胞孵育 12 h;损伤组: HUVECs 进行活化处理,加入活化中性粒细胞孵育 12 h;乌司他丁保护组(分为 5 组):乌司他丁的剂量分别为 100、500、1 500、3 000 和 5 000 U/ml, HUVECs 进行活化处理,加入活化中性粒细胞,同时加入相应剂量的乌司他丁,孵育 12 h。孵育完成后,收集培养液用于其它检测。加入 DMEM 培养液(100 μ l)和含 0.5% MTT 的培养液(10 μ l),37℃,5%CO₂ 培养箱内孵育 4 h 后,弃培养液,加入 100 μ l 的 DMSO 原液,振荡 10 min,待结晶完全溶解后,同时用酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光值(OD 值),实验重复 3 次。

1.4 培养液中 LDH、NO 含量和弹性蛋白酶活性的测定

1.4.1 LDH 试剂盒 购至南京建成生物工程研究所,按照试剂盒说明书对上述收集到的培养液进行 LDH 含量检测。实验重复 3 次。

1.4.2 以 Griess 法测定细胞培养液中 NO 含量^[10]。方法简述如下:100 μ l 细胞培养液与 100 μ l 的 Griess 试剂(1%磺胺溶于 2.5%磷酸与等体积的 0.1%萘乙二胺盐酸盐混合液)在室温下反应 10 min,在酶标仪上于 540 nm 测定吸光度。根据 NaNO₂ 的标准曲线,计算出细胞培养液中 NO 的含量。实验重复 3 次。

1.4.3 中性粒细胞弹性蛋白酶活性采用显色性底物方法检测,弹性蛋白酶将其特异性底物 N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide 分解后,释放出 p-nitroanilide,即可在分光光度计测定其含量^[11]。方法简述如下:培养上清液 400 g 离心 10 min 后,加入含有显色底物和 NaCl (0.5M) 的 Tris-HCl(0.1 mM)缓冲液,37℃ 孵育 10 min,0.1M NaOH 终止反应,弹性蛋白酶消化底物释放出的 p-nitroanilide 的含量在 405 nm 波长分光光度计下检测。以损伤组的平均 OD 值为 1,其它各组培养液中弹性蛋白酶的活性表示为 1 的倍数。实验重复 3 次。

1.4.4 流式细胞仪测定中性粒细胞内弹性蛋白酶活性 中性粒细胞采用 TNF- α 活化 5 min,PBS 洗涤后,分为 6 组,对照组和乌司他丁 100、500、1 500、3 000 和 5 000U/ml 组,每组 6 个样本。37℃ 下 DMEM 培养液孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次,重新悬浮在 PBS 中,调整细胞密度为 3×10^6 /ml,加入弹性蛋白酶细胞荧光探针,37℃ 下孵育 10 min。荧光探针转入细胞后,与细胞中的弹性蛋白酶发生反应,释放出荧光物质 rhodamine 110。设定流式细胞仪门控参数为中性粒细胞群,细胞内弹性蛋白酶含量以通过 FL1 滤光镜的荧光强度判定。数据由 CellQuest (Becton Dickinson)软件采集。

1.5 统计学分析 统计学处理应用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析,所有实验数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm SD$)表示,采用 Mann-Whitney 检验进行组间比较, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 乌司他丁对中性粒细胞介导的内皮细胞损伤的保护作用 MTT 法检测与单纯 DMEM 孵育组相比,仅仅采用 TNF- α 和 IFN- γ 活化 HUVECs、未活化的 HUVECs 与激活的或者未激活的中性粒细胞共孵育,活化的 HUVECs 与未激活的中性粒细胞共孵育,都不能引起显著的内皮细胞存活率下降,只有激活的中性粒细胞与活化的 HUVECs 共孵育可以引起显著的内皮细胞存活率下降。乌司他丁对激活中性粒细胞介导的活化内皮细胞的损伤的保护作用

具有剂量依赖性,1 500 U/ml 以上的乌司他丁可以产生显著的保护效应,见图 1。

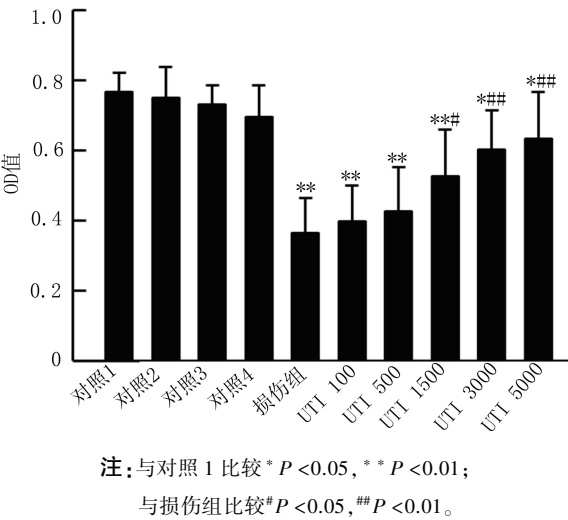


图 1 MTT 法检测不同处理组内皮细胞存活率比较

2.2 LDH 含量 各组细胞处理后检测培养液中的 LDH 含量,与单纯 DMEM 孵育组相比,仅仅采用 TNF- α 和 IFN- γ 活化 HUVECs、未活化的 HUVECs 与激活的或者未激活的中性粒细胞共孵育,活化的 HUVECs 与未激活的中性粒细胞共孵育,都不能引起培养液中 LDH 含量显著上升,只有激活的中性粒细胞与活化的 HUVECs 共孵育可以引起培养液中 LDH 含量的显著升高。500 U/ml 的乌司他丁即可有效抑制激活中性粒细胞与活化 HUVECs 共孵育引起的培养液中 LDH 的升高,且乌司他丁的抑制效果具有剂量依赖性,见图 2。

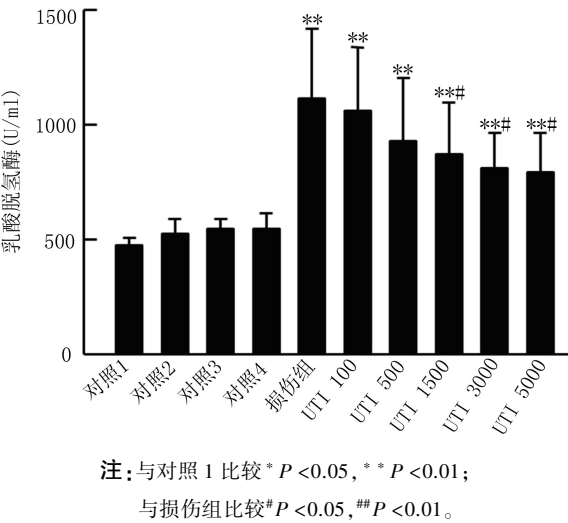
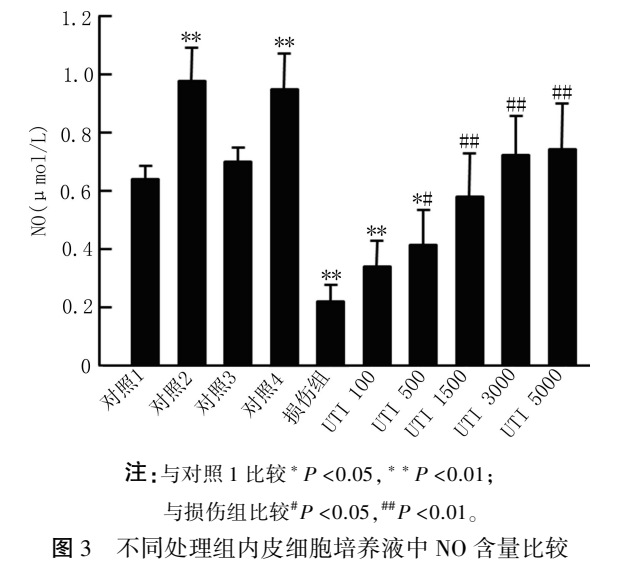


图 2 不同处理组内皮细胞培养液中 LDH 含量比较

2.3 NO 含量 各组细胞处理后检测培养液中的

NO 含量,与单纯 DMEM 孵育组相比,未活化的 HU-VECs 与激活的或者未激活的中性粒细胞共孵育不能显著降低培养液中的 NO 含量,而采用 TNF- α 和 IFN- γ 活化 HUVECs,及活化的 HUVECs 与未激活的中性粒细胞共孵育,都能引起培养液中 NO 含量显著升高,激活的中性粒细胞与活化的 HUVECs 共孵育可以引起培养液中 NO 含量的显著下降。500 U/ml 的乌司他丁即可有效抑制激活中性粒细胞与活化 HUVECs 共孵育引起的培养液中 NO 含量下降,且乌司他丁的抑制效果具有剂量依赖性,见图 3。



2.4 弹性蛋白酶活性 各组细胞处理后检测培养液中的弹性蛋白酶的活性,与单纯 DMEM 孵育组和活化 HUVECs 组的培养液中几乎检测不到弹性蛋白酶的活性,未活化的 HUVECs 与激活的或者未激活的中性粒细胞共孵育培养液中含有很少的弹性蛋白酶活性,激活中性粒细胞与活化的 HUVECs 共孵育可以引起培养液中弹性蛋白酶活性显著升高。500 U/ml 的乌司他丁即可有效抑制激活中性粒细胞与活化 HUVECs 共孵育引起的培养液中弹性蛋白酶活性,且乌司他丁的抑制效果具有剂量依赖性,见图 4。

2.5 流式细胞仪检测 TNF- α 激活中性粒细胞内弹性蛋白酶活性 为了检测不同剂量乌司他丁对 TNF- α 激活中性粒细胞内弹性蛋白酶活性的影响,100 ~5 000 U/ml 的乌司他丁加入到 TNF- α 激活中性粒细胞悬液中孵育 1 h 后,采用流式细胞仪检测细胞内弹性蛋白酶的活性,显示为各组细胞的荧光密度。结果显示,乌司他丁可以剂量依赖性降低激活中性粒细胞中弹性蛋白酶的活性,见图 5。

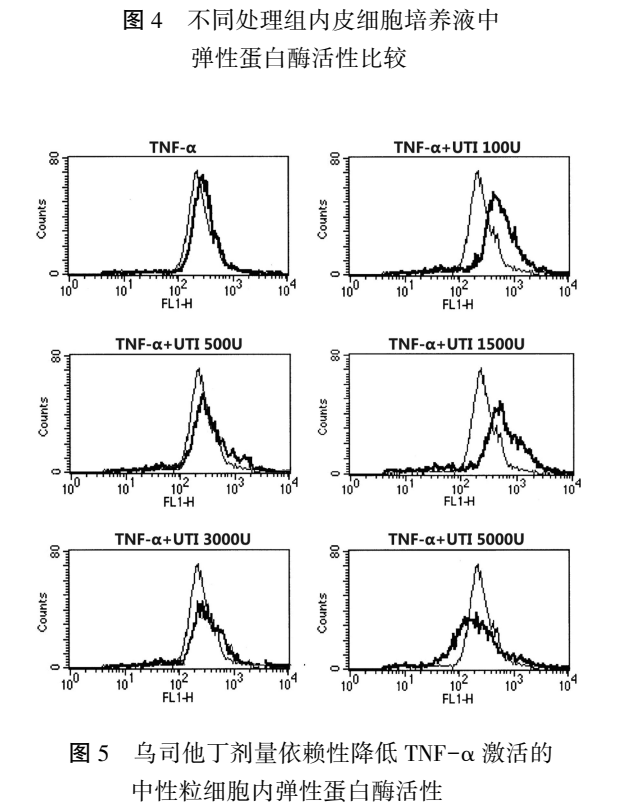
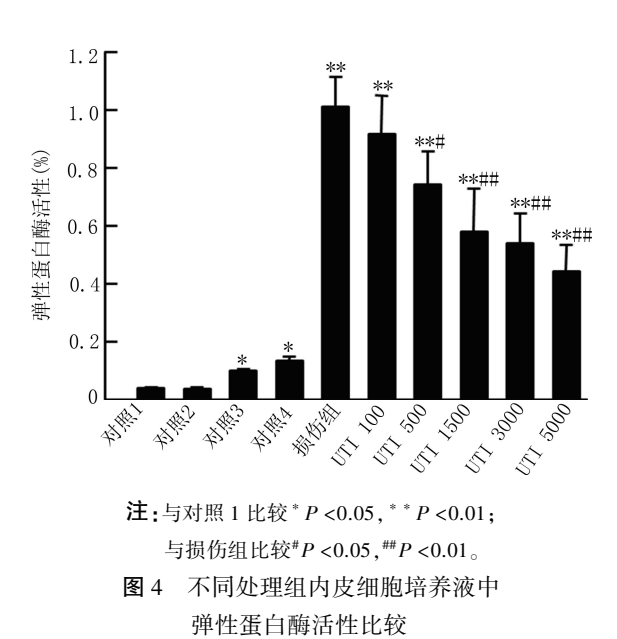


图 5 乌司他丁剂量依赖性降低 TNF- α 激活的中性粒细胞内弹性蛋白酶活性

3 讨论

人类中性粒细胞是多种炎症反应性疾病,如风湿病、成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、脏器缺血再灌注损伤等病理过程中,造成组织损伤的主要效应成分^[12]。内皮细胞在这些疾病的发生和发展过程中是最初的也是最重要的靶细胞,因为中性粒细胞要发挥其损伤作用,必须首先作用于内皮细胞。系统性炎症反应综合征,ARDS 和多脏器衰竭的发生发展过程中都有激活中性粒细胞介导内皮细胞损伤的发生^[13-14],中性粒细胞中释放出的活性氧物质和蛋

白酶协同作用,造成内皮损伤^[15-16]。目前已经有多种丝氨酸蛋白酶抑制剂用于临床胰腺炎、DIC 和心血管疾病的治疗^[17-20]。到目前为止,乌司他丁是其中临床应用最多,而且研究最深入的一种蛋白酶抑制剂。过去有研究表明乌司他丁可以抑制中性粒细胞介导的牛颈动脉内皮细胞和 HUVECs 损伤^[21-22],但是对于其具体机制的探索还不够深入,特别是乌司他丁对中性粒细胞弹性蛋白酶的抑制在这个过程中的作用还不完全清楚。

本研究提示乌司他丁在体外实验中可以抑制中性粒细胞介导的内皮细胞损伤,这种作用可能是通过乌司他丁对中性粒细胞弹性蛋白酶活性的抑制实现的。本研究的结果表明,乌司他丁不但对释放到细胞外的弹性蛋白酶活性有抑制作用,而且对激活的中性粒细胞内的弹性蛋白酶具有抑制作用。乌司他丁是否具有抑制中性粒细胞释放弹性蛋白酶的作用,本研究的结果还不能证实,而且本研究的结果并不能排除乌司他丁通过其它途径发挥其抗损伤效应。有研究表明,乌司他丁也可以抑制白细胞介素-1(IL-1)和 TNF- α 介导的内皮细胞-中性粒细胞黏附^[23],以及 TNF- α 诱导的内皮细胞上细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达^[24]。所以乌司他丁抑制中性粒细胞介导的内皮损伤还可能是通过抑制中性粒细胞-内皮细胞黏附来实现。

人体中有多种内源性的蛋白酶抑制剂,其中 $\alpha 1$ 蛋白酶抑制剂($\alpha 1$ -protease inhibitor, A1PI)可以与弹性蛋白酶形成复合物,从而抑制游离弹性蛋白酶的活性^[1,12]。但是,激活的中性粒细胞会释放出活性氧物质,能够将 A1PI 氧化灭活。在生理状态下,弹性蛋白酶与 A1PI 处于平衡状态,在病理情况下,异常激活的中性粒细胞会打破这种平衡,弹性蛋白酶释放出来并出现不可控制的酶学消化作用^[1,12],从而造成组织损伤。据报道,乌司他丁可以降低中性粒细胞释放活性氧物质^[25],因此,乌司他丁的保护效果可能部分来源于对内源性蛋白酶抑制剂 A1PI 的保护作用。但是,一旦中性粒细胞与内皮细胞或者细胞外基质黏附,A1PI 就不能扩散到黏附紧密的区域,弹性蛋白酶引起的组织消化和破坏进程就会加速^[1,12]。外源性的蛋白酶抑制剂,如乌司他丁,也不太可能弥散进入黏附紧密的区域并使弹性蛋白酶失活。本研究显示,乌司他丁通过直接作用于中性粒细胞而抑制其细胞内弹性蛋白酶的活性,说明即使中性粒细胞和内皮细胞发生了黏附,乌司他丁也可以抑制中性粒细胞产生和释放活化的弹性蛋白酶,对内皮细胞产生保护作用。

有研究表明,乌司他丁可以抑制心肺复苏患者循环中中性粒细胞释放弹性蛋白酶^[26]。乌司他丁还可以通过其胰蛋白酶抑制功能区对细胞膜的作用,抑制中性粒细胞钙离子的内流^[27-28],进而抑制已经激活的中性粒细胞的功能,但是本研究并没有对这种机制进行探索。多种细胞上均有乌司他丁受体^[29],外源性乌司他丁可以被培养细胞通过内吞途径内化到细胞内^[30],因此,中性粒细胞可能也会摄取乌司他丁,从而发挥其抑制乌司他丁释放弹性蛋白酶的作用。

总之,本研究采用体外实验模型对乌司他丁抑制中性粒细胞介导的内皮损伤机制进行了初步探索,表明乌司他丁即可能通过抑制中性粒细胞分泌到细胞外弹性蛋白酶活性,也可能通过抑制中性粒细胞内的弹性蛋白酶活性发挥其保护作用。提示,临床上使用乌司他丁对于多种中性粒细胞参与的炎症反应性疾病如系统性炎症反应综合征,ARDS 等多种疾病具有一定的治疗作用。

参考文献:

- [1] Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis [J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 65(2):137-150.
- [2] Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, *et al*. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase [J]. *J Clin Invest*, 1986, 77(4):1233-1243.
- [3] Leßig J, Reibetanz U, Schonberg M, *et al*. Efficient inhibition of human leukocytic elastase by means of $\alpha 1$ -antitrypsin/peptide complexes [J]. *Cytometry A*, 2013, 83(5):461-471.
- [4] Wan H, Lee KS, Kim BY, *et al*. A spider (*Araneus ventricosus*) chymotrypsin inhibitor that acts as an elastase inhibitor and a microbial serine protease inhibitor [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2013, 165(1):36-41.
- [5] Wagsater D, Johansson D, Fontaine V, *et al*. Serine protease inhibitor A3 in atherosclerosis and aneurysm disease [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(2):288-294.
- [6] Ogawa M, Nishibe S, Mori T, *et al*. Effect of human urinary trypsin inhibitor on granulocyte elastase activity [J]. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1987, 55(2):271-274.
- [7] 邹常春. 全血中性粒细胞分离方法的改进研究[J]. *实验与检验医学*, 2009, 27(4):337-338.
- [8] Bratt J, Palmblad J. Cytokine-induced neutrophil-mediated injury of human endothelial cells [J]. *J Immunol*, 1997, 159(2):912-918.
- [9] von Asmuth EJ, Leeuwenberg JF, van der Linden CJ, *et al*. Tumour necrosis factor- α induces neutrophil-mediated injury of cultured human endothelial cells [J]. *Scand J Immunol*, 1991, 34(2):197-206.
- [10] 杨阳,段维勤,金振晓,等. 姜黄素对血管内皮细胞过氧化氢损伤的保护作用及其机制研究 [J]. *中国体外循环杂志*

- 志, 2011, 9(4):239-242.
- [11] Hagio T, Nakao S, Matsuoka H, *et al.* Inhibition of neutrophil elastase activity attenuates complement-mediated lung injury in the hamster [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 426(1-2):131-138.
- [12] Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils [J]. *N Engl J Med*, 1989, 320(6):365-376.
- [13] Chen X, Christou NV. Relative contribution of endothelial cell and polymorphonuclear neutrophil activation in their interactions in systemic inflammatory response syndrome [J]. *Arch Surg*, 1996, 131(11):1148-1153.
- [14] Gildea TR. Pulmonary disease in small-vessel vasculitis [J]. *Cleve Clin J Med*, 2012, 79 Suppl 3:S27-30.
- [15] Varani J, Ginsburg I, Schuger L, *et al.* Endothelial cell killing by neutrophils. Synergistic interaction of oxygen products and proteases [J]. *Am J Pathol*, 1989, 135(3):435-438.
- [16] Ward PA, Varani J. Mechanisms of neutrophil-mediated killing of endothelial cells [J]. *J Leukoc Biol*, 1990, 48(1):97-102.
- [17] Ohwada M, Watanabe N, Maeda M, *et al.* New endoscopic treatment for chronic pancreatitis, using contrast media containing ulinastatin and prednisolone [J]. *J Gastroenterol*, 1997, 32(2):216-221.
- [18] Taenaka N, Shimada Y, Hirata T, *et al.* Gabexate mesilate (FOY) therapy of disseminated intravascular coagulation due to sepsis [J]. *Crit Care Med*, 1983, 11(9):735-738.
- [19] Jang IK, Brown DF, Giugliano RP, *et al.* A multicenter, randomized study of argatroban versus heparin as adjunct to tissue plasminogen activator (TPA) in acute myocardial infarction: myocardial infarction with novastan and TPA (MINT) study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1999, 33(7):1879-1885.
- [20] Lewis EC. Expanding the clinical indications for $\alpha(1)$ -antitrypsin therapy [J]. *Mol Med*, 2012, 18:957-970.
- [21] Fujita H, Morita I, Ishikawa K, *et al.* The synergistic effect of elastase and hydrogen peroxide on vascular endothelial cell injury is due to the production of hydroxylradical in the endothelial cells [J]. *J Atheroscler Thromb*, 1996, 3(1):32-38.
- [22] Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, *et al.* Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury [J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 69(2):241-247.
- [23] Okumura Y, Inoue H, Fujiyama Y, *et al.* Effects of serine protease inhibitors on accumulation of polymorphonuclear leukocytes in the lung induced by acute pancreatitis in rats [J]. *J Gastroenterol*, 1995, 30(3):379-386.
- [24] Aosasa S, Ono S, Seki S, *et al.* Inhibitory effect of protease inhibitor on endothelial cell activation [J]. *J Surg Res*, 1998, 80(2):182-187.
- [25] Ito K, Mizutani A, Kira S, *et al.* Effect of Ulinastatin, a human urinary trypsin inhibitor, on the oleic acid-induced acute lung injury in rats via the inhibition of activated leukocytes [J]. *Injury*, 2005, 36(3):387-394.
- [26] Xu CE, Zou CW, Zhang MY, *et al.* Effects of high-dose ulinastatin on inflammatory response and pulmonary function in patients with type-a aortic dissection after cardiopulmonary bypass under deep hypothermic circulatory arrest [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2013, 27(3):479-484.
- [27] Rui M, Duan YY, Zhang XH, *et al.* Urinary trypsin inhibitor attenuates seawater-induced acute lung injury by influencing the activities of nuclear factor- κ B and its related inflammatory mediators [J]. *Respiration*, 2012, 83(4):335-343.
- [28] Hemmer CJ, Vogt A, Unverricht M, *et al.* Malaria and bacterial sepsis: similar mechanisms of endothelial apoptosis and its prevention in vitro [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(9):2562-2568.
- [29] Kobayashi H, Gotoh J, Fujie M, *et al.* Characterization of the cellular binding site for the urinary trypsin inhibitor [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(32):20642-20647.
- [30] Yamasaki F, Shinkawa T, Watanabe M, *et al.* Uptake of human urinary trypsin inhibitor by the kidney epithelial cell line, LLC-PK1 [J]. *Pflügers Arch*, 1996, 433(1-2):9-15.
- (收稿日期: 2013-06-04)
(修订日期: 2013-07-15)

(上接第 206 页)

- [10] 马黎明, 褚衍林, 乔衍礼, 等. 改良超滤联合平衡超滤对婴幼儿体外循环术后补体和炎性介质的血浆含量和肺功能影响 [J]. *中国体外循环杂志*, 2010, 8(3):142-144.
- [11] 陈国锋, 尚幼楠, 杨斌, 等. 改良血液超滤在婴幼儿体外循环中的应用 [J]. *中国现代药物应用*, 2011, 5(8):77-78.
- [12] Shepherd J, Jones J, Frampton GK, *et al.* Intravenous magnesium sulphate and sotalol for prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a systematic review and economic evaluation [J]. *Health Technol Assess*, 2008, 12(28):90-95.
- [13] Pu J, Zhang C, Quan X, *et al.* Effects of potassium aspartate and magnesium on ventricular arrhythmia in ischemia-reperfusion rabbit heart [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2008, 28(5):517-519.
- [14] 张翼. 实用血液流变学 [M]. 桂林: 广西师范大学出版社, 2009, 9-11.
- [15] Huang H, Yao T, Wang W, *et al.* Continuous ultrafiltration attenuate the pulmonary injury that follows open heart surgery with Cardiopulmonary-bypass [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 76(1):136-140.
- (收稿日期: 2013-07-08)
(修订日期: 2013-07-22)

· 基础研究 ·

钙蛋白酶抑制剂 MDL28170 减轻大鼠缺血再灌注心肌损伤

顾晓明,武 峰,张建英,王跃民,李 娟,张淑苗,杨 敏,周京军,高 峰

[摘要]:目的 我们前期的结果表明,钙蛋白酶抑制剂 MDL28170 对离体灌注心脏可产生保护作用,本实验评价 MDL28170 对在体缺血再灌注心肌的保护作用。**方法** 建立急性缺血 40 min、再灌注 2 h 的大鼠心肌损伤模型;缺血前 5 min 静脉推注 MDL28170(3 mg/kg b.w.),再灌注结束后 TTC 染色测量心肌梗死面积,原位末端标记法检测细胞凋亡指数,比色法检测血清 LDH 和组织 casapase 3 活化的水平。**结果** 与对照组相比,缺血再灌注心肌出现明显的梗死灶、血清 LDH 水平升高;MDL28170 处理可显著缩小梗死面积,降低 LDH 水平。细胞凋亡结果显示,缺血再灌注心肌凋亡指数与 casapase 3 活性显著增加,而 MDL28170 显著逆转二者的变化。MDL28170 对正常心肌未产生明显的坏死或凋亡作用。**结论** MDL28170 对在体缺血再灌注心肌具有保护作用;抑制钙蛋白酶激活可能是一种行之有效的**心肌保护方法。

[关键词]: 钙蛋白酶;心肌缺血再灌注;心肌凋亡;心肌保护

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2013)04-0248-04

The calpains inhibitor MDL28170 protects heart against ischemia/reperfusion injury in rats

Gu Xiao-ming, Wu Feng, Zhang Jian-ying, Wang Yue-min, Li Juan, Zhang Shu-miao, Yang Min, Zhou Jing-jun, Gao Feng
Department of Physiology, Institute of Basic Medicine, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Shaanxi Xi'an 710032, China
Corresponding author: Zhou Jing-jun, Email: jjzhou@fmmu.edu.cn

[Abstract]: Objective Our previous studies demonstrated that MDL28170, an inhibitor of calpains, produced protective effects in the isolated heart. This study was to evaluate the effects of MDL28170 on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. **Methods** The rat hearts were subjected to 40 min ischemia/2 h reperfusion. MDL28170 was given i.v. 5 min before ischemia at a dose of 3 mg/kg b.w. bolus. The infarcts were measured by TTC staining, the apoptotic index was evaluated by TUNEL staining, and the level of plasma lactate dehydrogenase (LDH) and myocardial caspase 3 activities were determined by colorimetric assay kit. **Results** Compared with the normal, the hearts in ischemia/reperfusion group exhibited increased infarct size, and enhanced plasma LDH activities. More importantly, MDL28170 significantly attenuated these effects induced by ischemia/reperfusion. In addition, the data of TUNEL staining and caspase 3 activities revealed that there was an increase of cell apoptosis in ischemia/reperfusion group, which was also blocked by MDL28170. The last but not the least, MDL28170 had no effects on myocardial infarcts and apoptosis in the normal. **Conclusion** These results provide evidence that MDL28170 protects heart against ischemia/reperfusion injury in vivo. It also suggests that inhibiting activation of calpains is an effective strategy for myocardial protection.

[Key words]: Heart; Ischemia/reperfusion; Myocardial apoptosis; Myocardial protection

随着冠脉溶栓术、经皮冠状动脉腔内成形术、心脏外科体外循环等技术的推广应用,心肌缺血再灌注损伤成为阻碍患者获得最佳疗效的瓶颈问题,因而缺血心肌保护的研究一直是心血管研究领域的重点。N-苄氧羰基-缬氨酸-苯丙氨酸(Benzyloxycarbonyl-Val-Phe-H, MDL28170)是针对钙蛋白酶(calpain)研发的肽类化合物^[1],其膜通透性高,笔者和他人在离体心脏灌流的实验中发现,MDL28170 能够抑制钙激

基金项目: 国家自然科学基金(81100082, 31371181)
作者单位: 710032 西安,第四军医大学基础部生理学教研室(顾晓明、张建英、王跃民、李 娟、张淑苗、杨 敏、周京军、高 峰);710032 西安,第四军医大学西京医院心血管内科(武 峰)
通讯作者: 周京军, Email: jjzhou@fmmu.edu.cn

活的中性蛋白水解酶(calcium-activated neutral protease, CANP)活性,进而减少细胞骨架分子胞衬蛋白(α -fodrin)降解、改善钠泵活性,最终改善钙超载、缺血再灌注后心功能、提高心肌存活率^[2-4]。本实验旨在观察 MDL28170 对在体缺血再灌注心肌损伤的影响,以进一步明确其保护效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料 清洁级 Sprague-Dawley 雄性大鼠,250~300 g,由第四军医大学动物实验中心提供。MDL28170 购自 Tocris 公司, TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 细胞凋亡原位检测试剂盒购自 Roche 公司,氯化三苯基四氮唑(TTC)、伊文思蓝(Evans blue)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)购自 Sigma 公司, caspase 3 活性检测试剂盒购自 EMD Millipore 公司, LDH 活性检测试剂盒购自南京建成生物技术公司。

1.2 大鼠在体心脏缺血再灌注模型制备 依据实验室常规操作规范^[5],3%戊巴比妥钠(30 mg/kg, ip)麻醉大鼠,仰卧位固定。肝素化后行颈静脉插管用于给药,针状电极插入左下肢连续监测标准 II 导联心电图。分离气管并插管后立即正压人工呼吸(呼吸频率 50 次/分,流量 20 ml/kg),从左侧第 3、4 肋间打开胸腔、暴露心脏,剪破心包膜,在肺动脉圆锥左缘平左心耳根下缘 2 mm 冠状动脉处进针,用 5/0 无损伤缝合线穿过心肌层,以备结扎冠状动脉左前降支,引起缺血用。实验中夹闭动脉 40 min,引起心肌缺血,解除结扎、再灌注 2 h 制备缺血再灌注心肌损伤模型。以心电图 ST 段抬高、T 波高耸标志心肌缺血的存在;以抬高的 ST 段下降, T 波逐渐恢复以确定再灌注的成功。

1.3 实验分组 实验随机分为 4 组,处理如下:①对照组(CON 组),进行开胸、冠状动脉左前降支挂线等操作,不阻断冠脉血流;② MDL28170 对照组(MDL-C 组),在开胸、冠状动脉左前降支挂线等操作后,5 min 内完成颈静脉单次推注 MDL28170(3.0 mg/kg),不阻断冠脉血流;③ 缺血再灌注组(IR 组),行左冠状动脉前降支夹闭 40 min,解除夹闭(再灌注)2 h;④ MDL28170 处理组(MDL 组),缺血前 5 min,颈静脉快速推注 MDL28170(3.0 mg/kg),之后 40 min 缺血、2 h 再灌注处理。

1.4 心肌梗死面积测量 实验结束后,各组夹闭冠状动脉,从颈动脉注入 3%伊文思蓝 2 ml;1 min 后摘取心脏,去除非心脏组织,左右心耳,4℃生理盐水冲洗心脏,滤纸吸去水分后置于-20℃冻存 2 h;之后与心脏纵轴垂直切成 1 mm 的均匀薄片,浸入

1%氯化三苯基四氮唑(TTC)的磷酸盐缓冲液中(pH 7.4),37℃孵育 15 min;最后用 4%福尔马林固定 24 h。根据颜色不同区分各区域,蓝色为非缺血区,红色为缺血区(Area at Risk, AAR);苍白色为梗死区(Infarct Size, IS)。数码相机采样染色的心脏切片。使用 OPTIMAS 软件(NIH)测量相关区域面积,用缺血区占左室的面积比值(AAR/LV)反映缺血范围,用梗死区占缺血区的面积比值(IS/AAR)反映心肌死亡程度。

1.5 乳酸脱氢酶(LDH)活性测定 实验结束后获取动物血清。依据 LDH 催化乳酸生成丙酮酸,丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙,后者在碱性溶液中呈色的原理,比色法检测 LDH 活性^[6]。简要步骤为:按照南京建成生物技术公司提供的试剂盒要求,在待测样品中加入基质缓冲液与辅酶 I,37℃孵育 15 min,之后加入 2,4-二硝基苯肼,酶标仪 450 nm 处读取吸光值。实验结果以对照组为 1,取实验组吸光值与对照组的比值代表各组 LDH 的相对活性。

1.6 TUNEL 染色 常规方法,石蜡包埋组织,制备 3 μ m 切片,依次脱蜡、至水;依据原位末端标记法(TUNEL)原理,按照罗氏公司提供的试剂盒要求进行标本处理^[5]。之后,4,6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)复染细胞核;用配置有 FV10-ASW 软件的激光共聚焦显微镜(Olympus, FV1000)系统采集图像,每张玻片上随机选择 4 个区域,正常细胞核为蓝色荧光,凋亡细胞的细胞核呈绿色荧光;计算每 100 个细胞中的阳性细胞数,用百分比来反映凋亡指数(apoptotic index)。

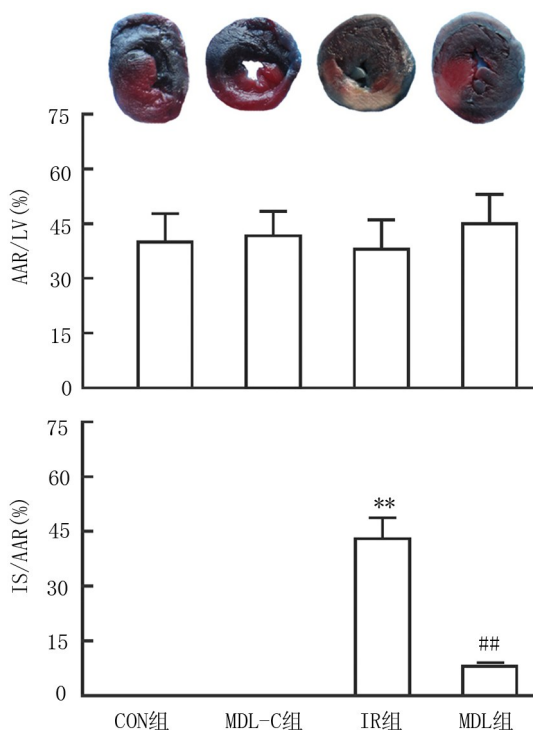
1.7 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase 3)活性测定 再灌注 2 h 后剪取缺血区心肌组织 80 mg,荧光比色法检测 caspase 3 活性^[5]。简要过程为:采用 EMD Millipore 公司提供的试剂匀浆组织,离心取上清即获得检测样品,37℃下与显色底物 Ac-DEVD-pNA 孵育 2 h,405 nm 读取荧光值,以对照组荧光值为 1,将处理组荧光值除以对照组,所获比值表示 caspase 3 的相对活性。实验中同时设立 10 μ M AC-DEVD-CHO(caspase 3 抑制剂)处理的对照组,以确认结果的特异性。

1.8 统计学处理 实验数据用均数 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示,应用 Graphpad Prism 4.0 统计软件进行分析,多组间差异显著性检验采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较用 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

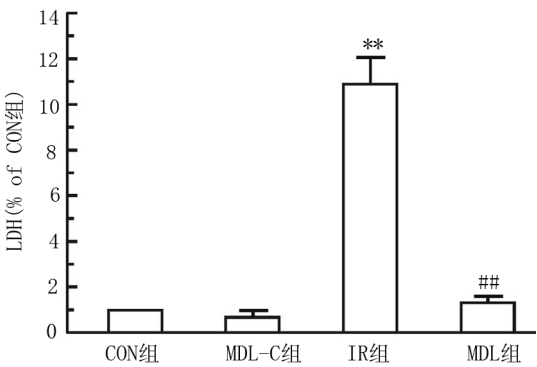
2.1 MDL28170 对缺血再灌注后心肌坏死的影响

各组间 AAR/LV 的比值无明显差异(图 1),说明各组的结扎部位相同,具有可比性。与 CON 组相比,IR 组左心室出现明显的梗死灶,MDL28170 处理显著缩小梗死面积(图 1)。与心肌梗死面积结果相一致,IR 组大鼠血清 LDH 活性显著增加,MDL28170 则显著降低酶的活性(图 2)。这些结果表明,MDL28170 具有减少细胞坏死,提高心肌抗缺血再灌注损伤能力的作用。另外,MDL-C 组与 CON 组的 TTC 染色和血清 LDH 水平不存在显著差异,提示 MDL28170 对正常心肌的存活无明显影响。



注:与 CON 组比 ** $P < 0.01$;与 IR 组比 ## $P < 0.01$ 。

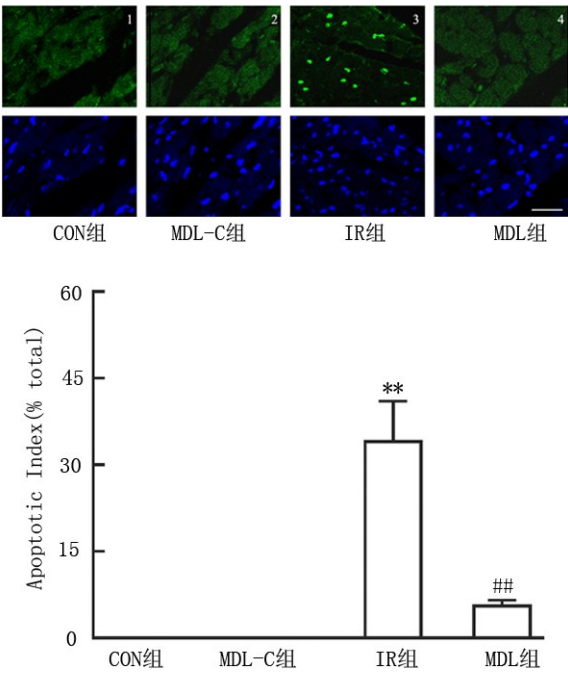
图 1 心脏组织切片的伊文思蓝与 TTC 双重染色(上)以及缺血范围(中)和梗死区(下)



注:与 CON 组比 ** $P < 0.01$;与 IR 组比 ## $P < 0.01$ 。

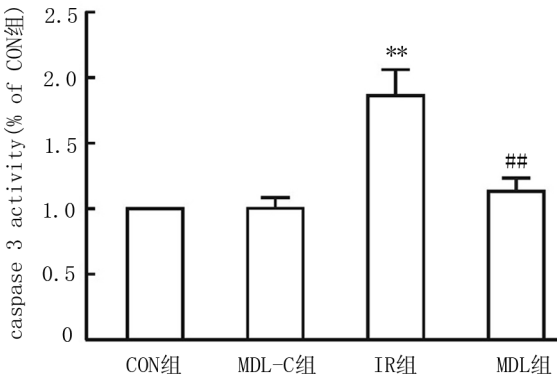
图 2 MDL28170 降低缺血再灌注大鼠血清 LDH 水平

2.2 MDL28170 对缺血再灌注心肌凋亡的影响 与对照组相比,缺血再灌注组心肌组织切片可见大量 TUNEL 染色阳性细胞,caspase 3 的活性显著增加;给予 MDL28170 显著减少细胞凋亡指数,抑制 caspase 3 活化(图 3、4),表明 MDL28170 具有抗细胞凋亡作用。此外,凋亡指数和 caspase 3 的统计结果表明,MDL-C 组与 CON 组间不存在显著差异(图 3、4)。



注:与 CON 组比 ** $P < 0.01$;与 IR 组比 ## $P < 0.01$ 。

图 3 MDL28170 减少缺血再灌注心肌凋亡指数



注:与 CON 组比 ** $P < 0.01$;与 IR 组比 ## $P < 0.01$ 。

图 4 MDL28170 减弱缺血再灌注心肌 Caspase 3 活性

3 讨论

离体器官研究发现,MDL28170 可显著抑制钙蛋白酶活性,改善缺血再灌注后心功能,提高组织存

活率。本实验在整体动物观察到,MDL28170 可显著缩小缺血再灌注后心肌梗死面积,降低血清 LDH 水平,减少细胞凋亡指数,减弱 caspase 3 活化,表明 MDL28170 是一种有效的心肌保护药物,提示抑制钙蛋白酶活性是防治缺血再灌注损伤的重要途径。

钙蛋白酶是一类钙激活的中性蛋白水解酶。目前发现,这一家族有 1~15 种亚型^[7],其中 CANP4 与其它分子结构不同,其作为小亚单位与 CANP1 和 2 构成的二聚体即是经典的 μ -和 m-型。分子结构研究表明,位于催化结构域内的半胱氨酸残基具有亲核性,是酶活性的核心部位。因此,钙蛋白酶又称半胱氨酸蛋白酶。钙蛋白酶在心脏、骨骼肌、肾脏等多种组织表达,心肌主要存在 μ -和 m-型^[8]。由于攻击亲核性基团是 MDL28170 的作用机制,MDL28170 并不能选择性作用于某一种钙蛋白酶,因此,有必要研发不同种类钙蛋白酶的选择性抑制剂,以进一步阐明各自的作用。

再灌注早期是心肌保护性干预的重要时间窗,本实验只评价了缺血前给药的心肌保护作用,因此,有必要观察再灌注早期给予 MDL28170 的心肌保护效果,以进一步明确其心肌保护作用。

总之,本实验在整体动物水平观察到 MDL28170 提高缺血再灌注后心肌存活率,同时也提示,抑制钙蛋白酶激活可能是一种行之有效的心肌保护方法。MDL28170 对心功能、自由基产生等方面的作用还需进行更多的实验研究。

参考文献:

- [1] Donkor IO. A survey of calpain inhibitors [J]. *Curr Med Chem*, 2000, 7(12):1171-1188.
- [2] Bi SH, Jin ZX, Zhang JY, *et al*. The calpain inhibitor MDL 28170 protects against Ca^{2+} paradox in rat hearts [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(4):385-392.
- [3] Singh RB, Dhalla NS. Ischemia-reperfusion-induced changes in sarcolemmal Na^+/K^+ -ATPase are due to the activation of calpain in the heart [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3):388-397.
- [4] Hernando V, Insete J, Sartorio CL, *et al*. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49(2):271-279.
- [5] Xing W, Yan W, Fu F, *et al*. Insulin inhibits myocardial ischemia-induced apoptosis and alleviates chronic adverse changes in post-ischemic cardiac structure and function [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(9):1050-1060.
- [6] 宋德坤, 罗正曜, 蔡悦林, 等. 氧自由基与肺损伤——II、钨及别嘌呤醇对油酸所致大鼠离体肺损伤的影响 [J]. *湖南医科大学学报*, 1990, 15(1):19-23.
- [7] Smith MA, Schnellmann RG. Calpains, mitochondria, and apoptosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96(1):32-37.
- [8] Galvez AS, Diwan A, Odley AM, *et al*. Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis [J]. *Circ Res*, 2007, 100(7):1071-1078.

(收稿日期:2013-10-10)

(修订日期:2013-10-23)

(上接第 223 页)

- [4] 任艺虹,盖鲁粤,杨庭树,等.改良血栓弹力图法和流式细胞测定技术对血小板活性抑制程度的比较 [J].*中华心血管病杂志*,2007,35(4):366-367.
- [5] 李克峰,安裕文,冯亚平,等.不同胶体预充液对心肺转流术中患者凝血功能的影响 [J].*贵阳医学院学报*,2004,04(9):4-5.
- [6] Despotis GJ, Goodnough LT. Management approaches to platelet-related microvascular bleeding in cardi thoracic surgery [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(3):20-32.
- [7] Kameneva MV, Repko BM, Krasik EF, *et al*. Polyethylene glycol additives reduce hemolysis in red blood cell suspensions exposed to mechanical stress [J]. *ASAIO J*, 2003, 49(5):537-542.
- [8] Gammerer U, Dietrich W, Rampf T, *et al*. The predictive value of modified computerized thromboelastography and platelet function analysis for postoperative blood loss in routine cardiac surgery [J]. *Anesth Analg*, 2003, 96(1):51-57.
- [9] Shore-Lesserson L, Manspeizer HE, DePerio M, *et al*. Thromboelastography-guided transfusion algorithm reduces transfusions in complex cardiac surgery [J]. *Anesth Analg*, 1999, 88(2):312-319.
- [10] Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thromboelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using rachi-donic acid stimulation [J].*J Am Coll Cardiol*, 2005,46(5):1705-1709.
- [11] 王仕刚,倪虹,龚庆成.用血栓弹力图评价体外循环中凝血功能的改变 [J].*中华胸心血管外科杂志*,2003,19(5):272-274.
- [12] Despotis GJ, Goodnough LT. Management approaches to platelet-related microvascular bleeding in cardi thoracic surgery [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(3):20-32.
- [13] Menajovsky LB. Heparin-induced thrombocytopenia: clinical manifestations and management strategies [J]. *Am J Med*, 2005,118:21S-30S.
- [14] Kouerinis IA, El-Ali M, Theakos N, *et al*. Can thromboelastography predict which patients with heparin-induced thrombocytopenia may suffer thrombotic complications of type II [J]? *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007,32(3):544-546.
- [15] Hobson AR, Petley GW, Dawkins KD, *et al*. A novel fifteen minute test for assessment of individual time-dependent clotting responses to aspirin and clopidogrel using modified thromboelastography [J]. *Platelets*, 2007,18(7):497-505.

(收稿日期:2012-07-06)

(修订日期:2013-02-21)

· 基础研究 ·

非去极化心脏停搏液短时常温保存对猪冠状动脉内皮依赖性舒张功能的影响

陈蒙蒙,黑飞龙,吴 蓓,王世磊,秦春妮,杨胜男,王 晨,龙 村

[摘要]:目的 探讨短时常温(1 h,37℃)条件下,非去极化心脏停搏液(NDP)对猪冠脉内皮源性超极化因子(EDHF)介导的血管舒张功能的影响。**方法** 根据保存液的不同,将血管环分成四组,分别为对照(CON)组、St.Thomas(ST)组、HTK组、NDP组。采用器官槽法,将血管环分别置于 Krebs-Hensleit(KH)液、ST液、HTK液、NDP液中,37℃条件下保存1 h,加入一氧化氮合酶阻滞剂 N-硝基-L-精氨酸(L-NNA)和环加氧酶阻滞剂(Indomethacin),记录由前列腺素 F2α(U46619)及缓激肽(Bradykinin)引起的血管收缩和舒张反应。**结果** NDP组中EDHF介导的内皮依赖性血管舒张百分比最大,为(74.79±6.40)%,其余依次为HTK组(51.32±21.92)%、CON组(24.03±8.01)%、ST组(16.20±6.39)%。**结论** 短时常温(1 h,37℃)条件下,NDP液对冠脉内皮的舒张功能具有保护作用,且优于HTK组、CON组和ST组。

[关键词]: 血管环;保存液;内皮源性超极化因子

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2013)04-0252-05

The protective effect of non-depolarizing solution on the endothelium-related relaxation of porcine coronary arteries under normal temperature

Chen Meng-meng, Hei Fei-long, Wu Bei, Wang Shi-lei, Qin Chun-ni, Yang Sheng-nan, Wang Chen, Long Cun

Department of CPB, State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Disease, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, People's Republic of China

Corresponding author: Hei Fei-long, Email: heifeilong@126.com

[Abstract]: Objective The present study was designed to evaluate the protective effect of non-depolarizing solution (NDP) on the endothelium-derived hyperpolarizing factor(EDHF)-mediated relaxation of porcine coronary arteries after rings were incubated with NDP solution at 37℃ for 1 hour. **Methods** Due to different preservation solutions used in different groups, the rings were divided into four groups: control (CON) group, St.Thomas (ST) group, Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) group and NDP group. Rings from porcine coronary arteries were studied in the organ chamber. After equilibration, the rings were incubated with Krebs-Helenseit solution in CON group, St.Thomas solution in ST group, HTK solution in HTK group, non-depolarizing solution in NDP group at 37℃ for 1 hour. Then Pre-contraction tone induced by prostaglandin F2α (U46619) and endothelium-dependent relaxation tone induced by bradykinin was measured in the presence of indomethacin and L-NNA. **Results** After incubation with different solutions at 37℃ for 1 hour, the EDHF-mediated relaxation induced by bradykinin was much higher in the NDP group 74.79%±6.40% than in the HTK group 51.32%±21.92%, CON group 24.03%±8.01% and ST group 16.20%±6.39%. **Conclusion** NDP solution provides superior endothelium protective effect compared with ST and HTK solution under normal temperature.

[Key words]: Vascular rings; Preservation solutions; Endothelium-derived hyperpolarizing factor

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972866)

北京市自然科学基金资助项目(7102131)

作者单位: 100037 北京,北京协和医学院,中国医学科学院,国家心血管病中心,阜外心血管病医院,心血管疾病国家重点实验室,体外循环科

通讯作者: 黑飞龙,Email: heifeilong@126.com

在冠脉循环系统中,内皮具有多种生理功能,尤其在调节血管张力方面发挥着关键的作用^[1]。内皮主要通过释放内皮源性舒张因子调节血管张力,包括一氧化氮(nitric oxide,NO),前列环素(prosta-cyclin,PGI₂)和内皮源性超极化因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor,EDHF)^[2]。研究发现

临床广泛应用的高钾去极化停搏液严重损害血管内皮的舒张功能,主要影响 EDHF 介导的血管内皮依赖性舒张功能^[3]。为了改善冠脉血管内皮的保护效果,课题组对原有停搏液进行改进,引入了“静息停搏”和“血管保护”的理念,设计出一种新型的“非去极化心脏停搏液 (non - depolarizing solution, NDP)”。本研究应用一氧化氮合酶阻断剂 L-NNA 和环加氧酶阻断剂 Indomethacin 分别阻断 NO 和 PGI₂ 的作用,旨在探讨短时常温 (1 h, 37℃) 保存条件下,NDP 液对猪冠状动脉内皮 EDHF 介导的舒张功能的保护效果。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 PowerLab 八通道高速记录主机 (澳大利亚 ADInstruments 公司),桥式放大器 (澳大利亚 ADInstruments 公司),离体组织灌流装置 (澳大利亚 ADInstruments 公司),高精度张力传感器 (澳大利亚 ADInstruments 公司),恒温循环水浴 (英国 TECHNE 公司)。

1.1 实验试剂 一氧化氮合酶阻断剂 N-硝基-L-精氨酸 (L-NNA, 美国 sigma 公司),环加氧酶阻断剂 吲哚美辛 (Indomethacin, 美国 sigma 公司),前列腺素 F2α (U46619, 美国 Cayman 公司),缓激肽 (Bradykinin, 美国 sigma 公司)。

1.3 溶液配制 Krebs-Hensleit (KH) 液 (mmol/L): NaCl 118.5, KCl 4.75, MgSO₄ 1.19, KH₂PO₄ 1.18, NaHCO₃ 25.0, CaCl₂ 1.4, 葡萄糖 11.0, pH 7.4。St. Thomas (ST) 液 (mmol/L): NaCl 110, KCl 16, CaCl 1.2, NaHCO₃ 25, pH 7.8。Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) 液 (mmol/L): NaCl 15, KCl 9, MgCl₂ · 6H₂O 4, 甘露醇 30, L-组氨酸 180, 组氨酸盐酸 18, 色氨酸 2, α-酮戊二酸钾盐 1, pH 7.3。NDP 液 (mmol/L): NaCl 15, KCl 5, MgCl₂ · 6H₂O 4, L-组氨酸 180, 组氨酸盐酸 18, 色氨酸 2, α-酮戊二酸 1, 棉子糖 30, 谷光甘肽 3, 腺甘 0.2, 利多卡因 0.5, 尼可地尔 0.01, pH 7.4。

1.4 实验对象 猪心, 600~800 g。

1.5 实验分组及模型建立 根据保存液的不同实验分为四组,分别为对照 (CON) 组、ST 组、HTK 组、NDP 组。于附近的屠宰场获取新鲜猪心,置于 4℃ 冷 KH 液中迅速带回实验室。分离冠脉的左前降支,取中下 1/3 段截取成若干段 2.2~2.8 mm,长度 5 mm 左右的血管环。保证每次实验中,四种不同保存液组的血管环来自同一猪心冠脉左前降支,每组样本量 (n = 8) 相同。将血管环悬挂在一对三角形不锈钢丝上,置于盛有 37℃、经 95% O₂ + 5% CO₂ 混

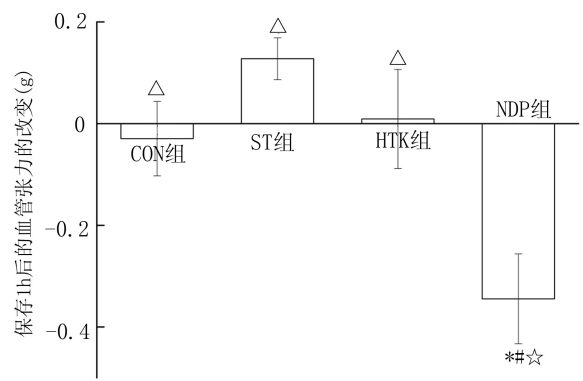
合气体饱和的 KH 液的玻璃浴槽中固定。缓慢调节血管环的静息张力,使其在 2.5 g 左右达到平衡。平衡 1 h 后,将血管环分别浸泡于 37℃ 的 KH 液、ST 液、HTK 液、NDP 液,保存 1 h。保存时间到后,用 37℃ KH 液更换不同保存液,平衡 30 min,加入 7 μmol/L Indomethacin 和 300 μmol/L L-NNA,水浴 30 min 后,加入 30 nmol/L U46619 收缩血管,20 min 左右达到平台,依次加入终浓度为 10⁻¹⁰ mol/L、10^{-9.5} mol/L、10⁻⁹ mol/L、10^{-8.5} mol/L、10⁻⁸ mol/L、10^{-7.5} mol/L、10⁻⁷ mol/L、10^{-6.5} mol/L、10⁻⁶ mol/L 的 Bradykinin 舒张血管,每个浓度点之间的时间间隔为 2 min,在每个浓度点测定血管张力。

1.6 观察指标 37℃ 条件下平衡 1 h 后,各组血管环静息张力 (g);各组保存 1 h 后的血管张力及变化幅度 (g);加入阻断剂 Indomethacin 和 L-NNA 30 min 后血管张力的改变 (g);各组加入 U46619 后血管的收缩幅度;不同浓度 Bradykinin 引起的 EDHF 介导的内皮依赖性舒张百分比 (占 U46619 收缩幅度的百分比)。

1.7 统计学方法 使用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析,数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用随机区组设计方差分析对数据进行统计分析,各组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。所有计量数据检验前均经方差齐性和正态分布检验,以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同的停跳液保存 1 h 后血管静息张力的改变 平衡期各组血管环静息张力无显著差异。37℃ 保存 1 h 后,CON 组、HTK 组静息张力几乎没有改变,ST 组静息张力有所增加,NDP 组静息张力显著下降,见图 1。



注: *、#、☆、△分别表示与 CON 组、ST 组、HTK 组、NDP 组相比, P < 0.05。

图 1 各组保存 1 h 后静息张力改变

2.2 加入阻断剂后血管张力的改变 各组加入阻断剂 Indomethacin 和 L-NNA 30 min 后血管静息张力均有所增加,与 ST 组、HTK 组相比,NDP 组张力变化幅度明显减小,见图 2。

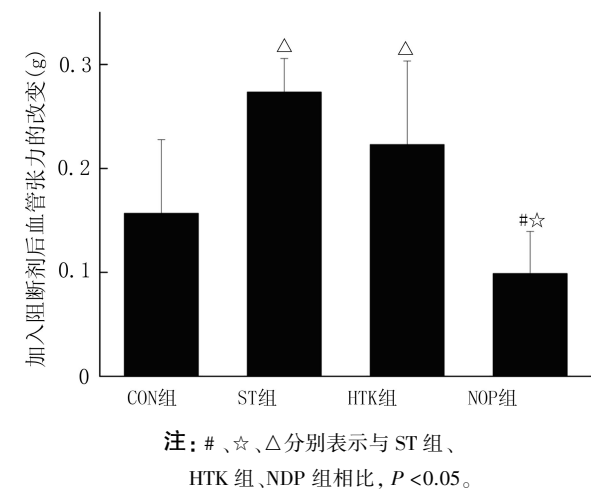


图 2 各组加入阻断剂 Indomethacin 和 L-NNA 30 min 后静息张力改变

2.3 加入 U46619 收缩血管,记录最大血管收缩张力 不同的停搏液组中加入收缩剂 U46619 后,血管环的张力均明显增加,但各组比较无显著统计学差异,见图 3。

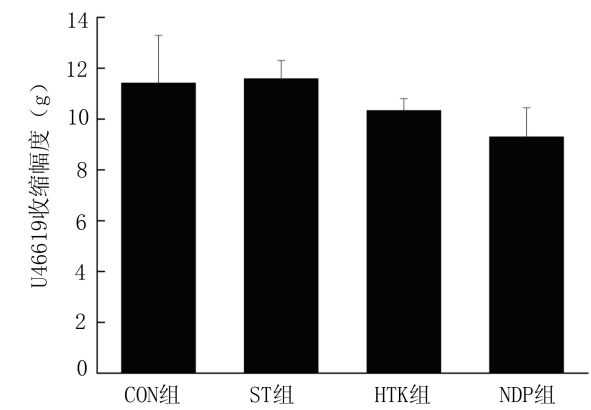
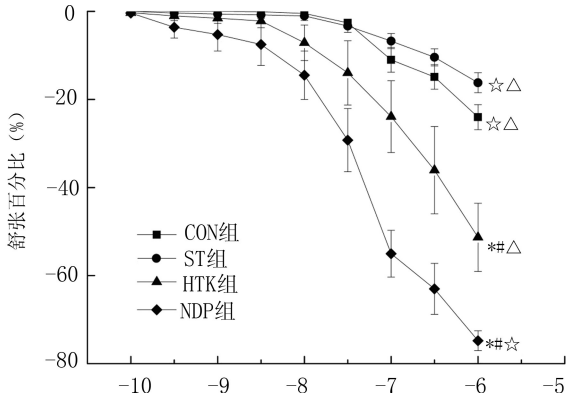


图 3 各组加入血管收缩剂 U46619 后血管张力的改变

2.4 Bradykinin 介导的内皮依赖性血管舒张作用 在各组不同的停搏液中,依次加入 $10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L 浓度的 Bradykinin,随 Bradykinin 浓度的增大,血管舒张幅度也逐渐增大,其中 NDP 组中 Bradykinin 引起的 EDHF 介导的内皮依赖性血管舒张百分比最大,其次分别为 HTK 组、CON 组、ST 组,见图 4。



注: *、#、☆、△分别表示与 CON 组、ST 组、HTK 组、NDP 组相比, $P < 0.05$ 。
图 4 不同浓度 Bradykinin 引起的 EDHF 介导的内皮依赖性血管舒张百分比

3 讨论

近年来很多研究提示传统的高钾停搏液会损害冠脉血管内皮的功能^[3-5],而内皮的完整性对维持正常的心功能至关重要^[6-7],因此,研究不同心脏停搏液对血管内皮的保护作用非常重要。内皮主要释放三种内皮源性舒张因子,包括 NO, PGI₂ 和 EDHF, EDHF 在冠脉血管张力的调节中发挥着重要的作用,尤其是当 NO 和 PGI₂ 的作用受损时,EDHF 的作用会代偿性增强,从而维持血管张力的稳定。本研究应用阻断剂 Indomethacin 和 L-NNA 分别阻断 PGI₂ 和 NO 的作用,主要探讨新型非去极化心脏停搏液,即 NDP 液对 EDHF 介导的血管内皮依赖性舒张作用的影响。

不同的心脏保存液成分对血管的静息张力会产生不同的影响。本研究中,血管环在常温保存 1 h 后,CON 组和 HTK 组血管张力变化不大,而 ST 组血管环的静息张力明显增高,升高幅度为 (0.1276 ± 0.0412) g, NDP 组的血管静息张力明显下降,下降幅度为 (0.3445 ± 0.0884) g。加入阻断剂 Indomethacin 和 L-NNA 后,发现各组血管环静息张力均有所增加,其中 ST 组血管张力增加的幅度最大,为 (0.2734 ± 0.0914) g,而 NDP 组血管张力增加的幅度最小,为 (0.0987 ± 0.1146) g。以上结果均提示 ST 液会引起冠脉血管的收缩,与 Dong 等的研究结果结果相一致^[8],而 NDP 液能够较好地维持血管张力的稳定。

不同作用原理的保存液对血管的收缩和舒张功能的影响也不相同。先使用 U46619 对血管环进行收缩,各组血管环收缩幅度无显著性差异。随后,依

次加入不同浓度 ($10^{-10} \sim 10^{-6}$ mol/L) Bradykinin。随着 Bradykinin 浓度的增加, EDHF 介导的血管内皮依赖性舒张百分比逐渐增大, 其中 NDP 组和 HTK 组血管舒张百分比明显升高, 而 ST 组、CON 组随 Bradykinin 浓度的升高, 血管的内皮依赖性舒张反应性相对下降, 且 ST 组低于 CON 组, 提示短时常温 (1 h, 37°C) 保存时, NDP 液和 HTK 液能够较好地保护血管的舒张功能, 而 ST 液对 EDHF 介导的血管内皮依赖性舒张功能具有损害作用, 其中主要是高浓度钾离子的作用^[8]。

本研究的结果显示, 不同停搏液对血管静息张力以及 EDHF 介导的血管内皮依赖性舒张功能的影响不同, 这可能与各种停搏液的成分不同有关。与 CON 组、HTK 组、NDP 组相比, ST 组中血管静息张力明显增加, EDHF 介导的血管内皮依赖性舒张作用明显受损。多项研究证实传统高钾停搏液损害血管内皮功能, 尤其是损害 EDHF 介导的内皮依赖性舒张作用, 原因主要体现在如下两方面^[3-5]: 首先, EDHF 通过使细胞膜电位超极化发挥作用, 而高浓度 K^+ 使平滑肌细胞膜电位去极化, 抑制了 EDHF 介导的舒张作用; 其次, EDHF 通过开放 K^+ 通道使平滑肌细胞膜电位超极化, 尤其是 Ca^{2+} 离子激活的 K^+ 通道和 ATP 敏感性 K^+ 通道, 而高浓度 K^+ 会对这些 K^+ 通道产生抑制作用。

与 CON 组、ST 组相比, HTK 组对血管静息张力的影响较小, 也能较好地保护 EDHF 介导的内皮依赖性血管舒张作用。Pizzicannella 等^[9]应用免疫组织化学方法和超微结构分析证明, 与生理盐水相比, HTK 液对内皮细胞具有更好的保护效果。HTK 液对血管内皮功能有较好的保护效果, 可能与其成分特点相关^[10-11]; K^+ 浓度为 9 mmol/L, 稍高于 K^+ 的生理浓度, 对血管内皮的影响较小; 细胞外低钠可以减轻内皮细胞水肿, 微钙有利于保护血管的舒张功能; 组氨酸/组氨酸盐缓冲系统能够减轻缺血期间的细胞酸中毒。

NDP 液为非去极化型心脏停搏液, K^+ 浓度为 5 mmol/L, 低于 ST 液和 HTK 液, 处于 K^+ 的生理浓度范围之内。与其它三组相比, NDP 组能够轻微降低血管静息张力, 不引起血管的收缩反应, 并且其保护 EDHF 介导的内皮依赖性血管舒张功能的效果最优。分析 NDP 液组成, 其血管保护作用优于其它三组的主要原因是: 腺苷、利多卡因和尼可地尔可将细胞膜电位钳制在静息电位水平, 抑制了电压依赖性 Ca^{2+} 通道的开放, 减少了钙内流和细胞内储存钙释放, 从而能够有效维持血管的静息张力, 保护血管内

皮舒张功能。其中, 腺苷通过与腺苷受体结合激活 ATP 敏感性 K^+ 通道发挥心血管保护作用^[12], Jakobsen 等^[13]应用腺苷取代停搏液中高浓度 K^+ , 发现腺苷能够保护 EDHF 介导的内皮依赖性舒张作用; Dong 等^[14]研究证明尼可地尔能够改善停搏液对血管内皮的保护效果, 保护 EDHF 介导的内皮依赖性舒张作用, 可能机制为其开放 ATP 敏感性 K^+ 通道, 使平滑肌细胞膜电位超极化, 与 EDHF 的作用协同, 从而保护了 EDHF 介导的内皮依赖性舒张作用。

实验结果表明, 短时常温 (1 h, 37°C) 保存后, NDP 液具有良好的血管内皮保护效果, 其作用明显优于 CON 组、ST 组和 HTK 组。NDP 液可使平滑肌细胞膜电位超极化, 促进 EDHF 的释放, 保护了 EDHF 介导的血管内皮依赖性舒张功能。此外, 组氨酸缓冲系统、抗氧化剂谷胱甘肽、非渗透物质棉子糖的加入, 进一步增强了血管保护效果。NDP 液血管保护的特点弥补了传统高钾停搏液损害血管内皮功能的不足, 更符合理想心脏停搏液的特点, 既满足了心脏外科手术的要求, 又极大程度地改善了心脏的保护效果。但目前 NDP 液的研究还处于基础研究阶段, 还需要进一步的临床研究证实, 从而为 NDP 液的临床应用奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update [J]. Clin Sci (Lond), 2009, 117(4): 139-155.
- [2] He GW. Endothelial function related to vascular tone in cardiac surgery [J]. Heart Lung Circ, 2005, 14(1): 13-18.
- [3] Yang Q, Zhang RZ, Yim AP, *et al.* Release of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in porcine coronary arteries exposed to hyperkalemia: effect of nicorandil [J]. Ann Thorac Surg, 2005, 79(6): 2065-2071.
- [4] He GW, Yang CQ, Graier WF, *et al.* Hyperkalemia alters EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in coronary arteries [J]. Am J Physiol, 1996, 271(2 Pt 2): H760-767.
- [5] Long C, Li W, Lin DM, *et al.* Effect of potassium-channel openers on the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries stored in cold hyperkalemic solution [J]. J Extra Corpor Technol, 2002, 34(2): 125-129.
- [6] Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, *et al.* Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(16): 1455-1469.
- [7] Brutsaert DL, Franssen P, Andries LJ, *et al.* Cardiac endothelium and myocardial function [J]. Cardiovasc Res, 1998, 38(2): 281-290.
- [8] Dong YY, Wu M, Yim AP, *et al.* Hypoxia-reoxygenation, St. Thomas cardioplegic solution, and nicorandil on endothelium-derived hyperpolarizing factor in coronary microarteries [J].

- Ann Thorac Surg, 2005, 80(5): 1803-1811.
- [9] Pizzicannella J, Rabozzi R, Trubiani O, *et al*. HTK solution helps to preserve endothelial integrity of saphenous vein: an immunohistochemical and ultrastructural analysis [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2011, 25(1): 93-99.
- [10] 李桂芬,王仕刚,胡强,等. 康斯特保护液对未成熟心肌保护效果的临床观察[J]. 中国体外循环杂志, 2006, 4(1): 9-11.
- [11] Liu J, Feng Z, Zhao J, *et al*. The myocardial protection of HTK cardioplegic solution on the long-term ischemic period in pediatric heart surgery [J]. ASAIO J, 2008, 54(5): 470-473.
- [12] Peart JN, Headrick JP. Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways [J]. Pharmacol Ther, 2007, 114(2): 208-221.
- [13] Jakobsen O, Stenberg TA, Losvik O, *et al*. Adenosine instead of supranormal potassium in cardioplegic solution preserves endothelium-derived hyperpolarization factor-dependent vasodilation [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2008, 33(1): 18-24.
- [14] Dong YY, Wu M, Yim AP, *et al*. Hypoxia-reoxygenation, St. Thomas cardioplegic solution, and nicorandil on endothelium-derived hyperpolarizing factor in coronary microarteries [J]. Ann Thorac Surg, 2005, 80(5): 1803-1811.
- (收稿日期: 2013-08-01)
(修订日期: 2013-08-29)
-
- (上接第 229 页)
- [32] Gentry-Smetana S, Redford D, Moore D, *et al*. Direct effects of volatile anesthetics on cardiac function [J]. Perfusion, 2008, 23(1): 43-47.
- [33] Rodig G, Keyl C, Wiesner G, *et al*. Effects of sevoflurane and isoflurane on systemic vascular resistance: use of cardiopulmonary bypass as a study model [J]. Br J Anaesth, 1996, 76(1): 9-12.
- [34] Ueda T, Mizuguchi K, Tsuji T, *et al*. Regulation of perfusion pressure during cardiopulmonary bypass using sevoflurane [J]. Int J Artif Organs, 2001, 24(1): 30-33.
- [35] Rodig G, Keyl C, Kaluza M, *et al*. Effects of rapid increases of desflurane and sevoflurane to concentrations of 1.5 MAC on systemic vascular resistance and catecholamine response during cardiopulmonary bypass [J]. Anesthesiology, 1997, 87(4): 801-807.
- [36] Bein B, Renner J, Caliebe D, *et al*. The effects of interrupted or continuous administration of sevoflurane on preconditioning before cardio-pulmonary bypass in coronary artery surgery: comparison with continuous propofol [J]. Anaesthesia, 2008, 63(10): 1046-1055.
- [37] Hellstrom J, Owall A, Bergstrom J, *et al*. Cardiac outcome after sevoflurane versus propofol sedation following coronary bypass surgery: a pilot study [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2011, 55(4): 460-467.
- [38] Cromheecke S, Pepermans V, Hendrickx E, *et al*. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing aortic valve replacement with cardiopulmonary bypass [J]. Anesth Analg, 2006, 103(2): 289-296.
- [39] De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, *et al*. Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass [J]. Anesthesiology, 2004, 101(1): 9-20.
- [40] Julier K, da Silva R, Garcia C, *et al*. Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study [J]. Anesthesiology, 2003, 98(6): 1315-1327.
- [41] Piriou V, Mantz J, Goldfarb G, *et al*. Sevoflurane preconditioning at 1 MAC only provides limited protection in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a randomized bi-centre trial [J]. Br J Anaesth, 2007, 99(5): 624-631.
- (收稿日期: 2013-06-17)
(修订日期: 2013-07-16)