文章编号:1000-5404(2008)01-0027-04

论著

Survivin 在先天性心脏病肺动脉高压发生机制中的作用

唐旭东,肖颖彬,周建国,郝 嘉 (第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心,重庆 400037)

摘 要:目的 研究抗凋亡因子存活素(survivin)在左向右分流性先天性心脏病肺动脉高压的致病过程中的作用和凋亡因素的作用机制。方法 应用免疫组化及原位缺口末端 DNA 标记技术,检测肺组织细胞凋亡情况。用免疫组化及 Western blot 检测凋亡相关蛋白 survivin、bcl-2 和 bax 的表达。结果 中、重度肺动脉高压患者肺组织血管的结构发生明显改建;先天性心脏病肺组织都有凋亡的细胞,但中、重度肺动脉高压患者凋亡细胞明显减少。Survivin、bcl-2 在中、重度肺动脉高压组中表达强度明显增高,而 bax 表达明显减少。Survivin 与凋亡及肺血管组织结构重构有明显的相关性。结论 在左向右分流血流作用下,Survivin 等基因表达发生变化,使肺组织细胞凋亡减少,造成细胞堆积,参与肺血管结构改建,是肺动脉高压形成机制之一。

关键词:存活素;先天性心脏病;肺动脉高压;细胞凋亡
中图法分类号:R363;R541.1;R543.202 文献标识码:A

Role of survivin in pulmonary hypertension of congenital heart disease

TANG Xu-dong, XIAO Ying-bin, ZHOU Jian-guo, HAO Jia (Cardiovascular Surgery Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the role of survivin in the incidence of pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease (CHD) of left-to-right shunt. Methods Forty-nine cases were divided into 4 groups according to mean pulmonary artery pressure (mPAP), that is, non-hypertension group, mild hypertension group, medium hypertension group, and severe hypertension group. Their lung tissue samples were collected during heart surgery. TUNEL technique and immunohistochemical analysis were respectively used to detect nuclear DNA fragment of apoptotic cells and the expression of survivin, bcl-2 and bax. Western blotting also was conducted to detect survivin expression. Results The pulmonary wall of CHD patients with medium or severe pulmonary hypertension became significant incrassate. The apoptotic index and expression level of bax were significantly decreased but surviving and bcl-2 expressions were significantly increased in CHD with medium or severe pulmonary hypertension. Survivin expression was significant correlation with percentage media wall thickness and apoptotic index. Conclusion Apoptosis associated with survivin plays an important role in pulmonary artery remodeling after pulmonary hypertension of CHD.

Key words: survivin; congenital heart disease; pulmonary hypertension; apoptosis

在左向右分流先天性心脏病(congenital heart disease,CHD)肺动脉高压(pulmonary hypertension,PH)形成的过程中,肺动脉血流量及血流速度改变所致的血流剪切力、缺氧等因素引起肺血管痉挛、肺血管异常生长和改建而产生肺动脉高压[1]。为探讨凋亡机制在 CHD PH 的形成中的意义,我们对 CHD PH 患者的肺组织内存活素(survivin)、bcl-2 和 bax 基因表达及细胞凋亡情况进行了研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2006 年 9 – 11 月手术治疗 49 例室间隔缺损患者,根据术中测定平均肺动脉压力(mean pulmonary artery pressure, mPAP),将患者分为 4 组。即无 PH 组(mPAP < 20 mmHg、Ⅰ);轻度 PH 组(20 < mPAP < 30 mmHg、Ⅱ);中度 PH 组(30 < mPAP < 50 mmHg、Ⅲ);重度 PH 组(mPAP > 50 mmHg、Ⅳ)。轻度 PH 患者缺乏症状及体征。重度 PH 患者术前均有反复呼吸

基金项目:国家自然科学基金(30600507)
Supported by the National Natural Science Foundation of china(30600507)
作者简介:唐旭东,男,四川省成都市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肺动脉高压发病机制方面的研究,发表论文 7 篇。电话:15982132810,E-mail:txd196951@sohu.com
通信作者:肖颖彬,电话:(023)68755607
郝 嘉,E-mail:haojia2004@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-04-19 修回日期:2007-10-18

道感染,5 例有肺炎、心力衰竭史,3 例有运动口唇发绀。见表 1。患者术前给予前列腺素 E_1 治疗以降低肺血管阻力,静脉应用抗生素,控制肺感染。49 例均在中低温体外循环下行心脏畸形矫治术。患者术后均应用多巴胺 5 ~ 10 μg · kg^{-1} · min^{-1},中重度 PH 患者术后常规使用前列腺素 E_1 2 ~ 5 μg · kg^{-1} · min^{-1}、硝普钠 0.5 ~ 5 μg · kg^{-1} · min^{-1}。本组 49 例经综合治疗均痊愈出院。4 例出现并发症,如肺不张、低心排综合征、低氧血症、出血等。术后随访无晚期死亡。

表 1 先天性心脏病肺动脉高压患者临床资料

组别	例数	mPAP(mmHg)	年龄(岁)	明显症状	肺血明显增加	ECG 改变	心胸比率	缺损直径(mm)	PO_2(%)	心功能(>3)	辅助呼吸(h)	PGE1(d)	多巴胺(h)	并发症
Ⅰ	16	15.38 ± 2.37	6.14 ± 3.75	0	0	1	0.42 ± 0.07	8.84 ± 2.37	93.62 ± 4.57	0	11.26 ± 4.74	0	16.67 ± 6.31	0
Ⅱ	11	26.51 ± 3.94	7.49 ± 3.88	0	1	2	0.46 ± 0.06	10.22 ± 3.31	92.77 ± 5.38	0	12.37 ± 5.29	0	18.46 ± 5.77	0
Ⅲ	12	41.62 ± 7.83^{a}	6.25 ± 4.21	6^{a}	6^{a}	7^{a}	0.58 ± 0.06^{a}	12.76 ± 3.52^{a}	82.94 ± 7.46^{a}	7^{a}	17.41 ± 6.73^{a}	2.15 ± 0.61^{a}	27.68 ± 6.56^{a}	1
Ⅳ	10	68.47 ± 13.76^{ab}	7.93 ± 4.61	10^{ab}	10^{ab}	10^{ab}	0.69 ± 0.11^{ab}	14.58 ± 3.41^{ab}	71.76 ± 9.57^{ab}	8^{a}	26.65 ± 7.86^{ab}	6.85 ± 4.33^{ab}	36.94 ± 8.74^{ab}	3^{ab}

a:$P < 0.05$,与Ⅰ、Ⅱ组比较;b:$P < 0.05$,与Ⅲ组比较

1.2 标本采集

肺组织在心脏畸形矫治手术同时取出(术前经患者家属同意并签字)。立即固定做石蜡切片和低温保存。

1.3 标本的检测

1.3.1 肺动脉的形态学观察 每个病例的肺组织经 HE 染色并取 4 张切片,在 400 倍视野下随机找出 10 个肺小动脉,在显微标尺下观察肺动脉管壁厚度占肺动脉外径的百分比(percentage media wall thickness,MT%),MT% = [(外径 - 内径) / 外径] × 100 %。

1.3.2 凋亡的检测 采用细胞凋亡原位缺口末端 DNA 碎片标记技术(TUNEL)。采用中山公司的凋亡检测试剂盒,按说明书方法进行操作。可以在显微镜下观察到凋亡的细胞核呈紫蓝色。计算 5 个高倍视野(×400)中凋亡之阳性细胞核数及其与总细胞核数的比值,即凋亡指数(apoptotic index,AI),求其均值。

1.3.3 免疫组织化学分析 survivin、bcl-2 和 bax 的表达 应用晶美公司的免疫组化试剂盒,按说明书操作。表达阳性的细胞浆有棕黄色颗粒。阳性细胞的计量通过两种相对独立的方法进行,每个标本取 4 张切片,每张切片在 400 倍显微镜下顺序找 10 个视野,按每个视野中血管壁细胞中阳性细胞所占的百分数分为 5 级并给予打分:0 分,阳性细胞≤5%;1 分,阳性细胞在 5% ~25%;2 分,25% ~50%;3 分,50% ~75%;4 分,阳性细胞≥75%。其中 0 分按阴性处理。同时按相应抗原的染色强度打分:1 分,染色较弱;2 分,中等强度;3 分,染色强。阳性表达率与表达强度的乘积就是该标本的表达权重。

1.3.4 Survivin Western blot 分析 100 mg 肺组织提取总蛋白,考马斯亮蓝法进行蛋白定量。与 2 × 样品缓冲液混合后,煮沸 5 min。将样品(50 μg/lane)在 10% 的 SDS 一聚丙烯凝胶中进行电泳 4 h 后,转印至硝基纤维素膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,分别加入鼠抗人 survivin 抗体(稀释浓度为 1∶200)常温下过夜。用 TTBS 洗 2 次后分别加入兔抗小鼠抗体(稀释浓度为 1∶500)作用 2 h,AKP 法显色,FluorChem V2.0 Stand Alone 成像分析仪照相并定量。

1.4 统计学方法

实验数据用 SPSS 10.0 进行单因素方差分析或 χ^2 检验,参数间进行直线相关分析。

2 结果

2.1 重构形态学观察结果

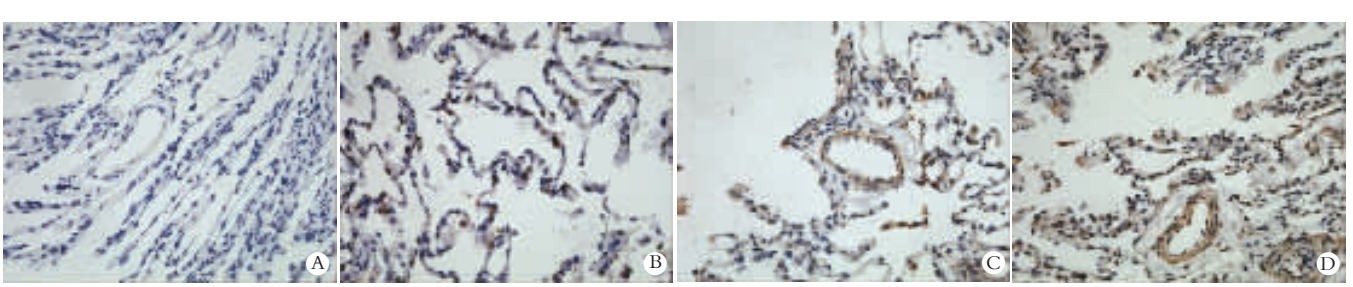
无或轻度 PH 组肺组织及中小动脉壁无明显变化。重度 PH 组肺组织及中小动脉壁增厚明显,出现血管壁平滑肌细胞肥大增生、动脉内膜细胞增生和胶原物质堆积性改变,管腔狭窄明显。中、重度 PH 组与无或轻度 PH 组相比肺动脉管壁厚度占肺动脉外径的比值(MT%),统计学分析差异均有显著性($P < 0.05$)。

2.2 凋亡指数

各组肺内均存在一定比例的凋亡细胞。重、中度 PH 组肺内凋亡细胞明显减少。中、重度 PH 组与无或轻度 PH 组相比凋亡率统计学分析差异均有显著性($P < 0.05$)。见表 2。

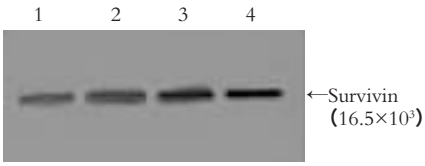
2.3 Survivin 免疫组织化学染色及 Western blot 分析

Survivin 阳性染色为细胞质内棕黄色颗粒,微血管内皮细胞表达较平滑肌细胞明显。无或轻度 PH 组 survivin 表达很少(图 1A、图 1B)。中、重度 PH 组与对无或轻度 PH 组相比表达明显增加(图 1C、图 1D),统计学分析差异均有显著性($P < 0.05$)。Western blot 分析结果也显示 survivin 在中、重度 PH 组的表达比无或轻度 PH 组明显增加(图 2)。



A:无 PH 组;B:轻度 PH 组;C:中度 PH 组;D:重度 PH 组

图 1 各组肺内 Survivin 的表达 (S-P ×400)



1：无 PH 组；2：轻度 PH 组；3：中度 PH 组；4：重度 PH 组

图 2　Survivin Western blot 分析结果

2.4　bcl-2 和 bax 免疫组织化学染色

bcl-2 抗原阳性染色为细胞质内棕黄色颗粒，在细胞质中多呈不同程度的弥散状分布，少数呈团块状或颗粒状。无或轻度 PH 组 bcl-2 表达少，中、重度 PH 组与对无或轻度 PH 组相比表达明显增加，统计学分析差异均有显著性（$P<0.05$）。bax 染色组中细胞质显示棕黄色颗粒者为蛋白阳性，主要位于部分核膜、细胞质内，中、重度 PH 组与对无或轻度 PH 组相比表达明显减少，统计学分析差异均有显著性（$P<0.05$）。见表 2。

统计分析显示 survivin、bcl-2 与凋亡负相关（$r=-0.876$、$r=-0.661$，$P<0.05$）；bax 与凋亡正相关（$r=0.614$，$P<0.05$）。Survivin（Western blot）与 MT% 正相关（$r=0.73$，$P<0.05$）。

表 2　先天性心脏病肺动脉高压患者各指标的变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	MT(%)	AI(%)	Survivin(IH)	Survivin(WB)	bcl-2	bax
Ⅰ	39.4 ± 15.7^{ab}	44.7 ± 11.3^{ab}	0.87 ± 0.03^{ab}	$3\,617\pm506^{ab}$	1.24 ± 0.62^{ab}	4.06 ± 1.54^{ab}
Ⅱ	42.9 ± 13.8^{ab}	42.9 ± 13.4^{ab}	0.92 ± 0.04^{ab}	$3\,881\pm796^{ab}$	1.37 ± 0.59^{ab}	4.17 ± 1.61^{ab}
Ⅲ	61.5 ± 9.4^{b}	16.6 ± 7.33^{b}	3.72 ± 1.58^{b}	8408 ± 1420^{b}	2.78 ± 0.89^{b}	1.59 ± 0.68^{b}
Ⅳ	79.1 ± 12.7	9.8 ± 6.1	6.59 ± 2.63	11837 ± 1550	4.91 ± 1.57	1.22 ± 0.51

a：$P<0.05$，与Ⅲ组比较；b：$P<0.05$，与Ⅳ组比较

3　讨论

本实验以先天性心脏病室间隔缺损合并 PH 为代表研究 survivin 及凋亡机制在 CHD 合并 PH 患者肺血管结构改建中的作用机制。进一步证实了肺血管床的改建是一种细胞过剩性疾病，Survivin 不仅参与其中并扮演重要角色；CHD 患者肺血管组织细胞凋亡减少作为一种致病因素与增殖因素共同作用造成细胞过度堆积而参与肺血管结构改建的形成[2]。

肺动脉高压是左向右分流先天性心脏病最常见的并发症之一，肺动脉高压的形成也严重影响左向右分流性 CDH 的预后。PH 早期为流量型压力升高，后期为阻力型压力升高，肺血管结构重构是后期肺动脉高压主要的病理改变。凋亡是肺血管结构重构的重要发病机制[3]。

左向右分流对肺血管细胞凋亡的影响机制十分复杂，可能涉及多种凋亡相关因子。Survivin 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子[4]，但人们并不清楚 survivin 是否参与了 CHD 合并 PH 患者肺血管结构及肺动脉高压的发生，目前也鲜有相关的报道。本研究表明：中、重度 PH 组 survivin、bcl-2 表达明显增加，与对无或轻度 PH 组相比统计学分析差异均有显著性；而 bax 表达明显减少；Survivin、bcl-2 与凋亡负相关（$r=-0.876$、-0.661，$P<0.05$）；bax 与凋亡正相关（$r=0.614$，$P<0.05$）；Survivin（Western blot）与 MT% 正相关（$r=0.73$，$P<0.05$）。这就提示 survivin 与肺动脉高压发病有密切关系。值得注意的是，Survivin 具有多种生物学功效，它不仅是参与细胞凋亡的关键蛋白之一，而且促进细胞增殖和分裂，它既是细胞增殖的关键性因子，又是影响细胞有丝分裂，为细胞有丝分裂后期所必需，是一种具有双重作用的蛋白质[4,5]。它也参与血管生成。在正常的毛细血管内皮中，很难检测出 survivin，但在静止态的内皮细胞进入增殖状态后它的表达明显增加，例如，在刚形成的肉芽组织内皮中它的表达就有大幅度增高[6]。因此，本研究显示在中、重度 PH 组 survivin 表达的上调不仅提示凋亡的减少，而且可能也表明内皮细胞、平滑肌细胞的激活增殖。正是推测到 survivin 与肺动脉高压的关系，McMurtry 等[7] 以 survivin 作为肺动脉高压基因治疗的靶点，结果显示：Survivin 只在有肺动脉高压的患者或大鼠的肺组织中表达，抑制 survivin，不仅降低肺血管阻力、减轻右室及肺血管中膜肥厚，而且诱导平滑肌细胞凋亡并减少其增殖。这些结果都均明确表明 Survivin 对于肺血管重构及肺动脉高压发生的重要意义。

先天性心脏病左向右分流产生的高肺血流所导致的致病因素主要有高血流剪切力、缺氧、炎症等。本实验中 survivin 的表达上调是否是这些因素的直接结果目前还不清楚。有研究显示，高血流剪切力所产生的肺微血管内皮细胞凋亡抵抗与 survivin 表达增加是相关的[8]：血小板诱导生长因子是高血流剪切力的感受器，高血流剪切力引起的血小板诱导生长因子表达上调对 survivin 的表达有正反馈作用[9,10]。这不仅说明 survivin 表达受血流剪切力的影响，也提示 survivin 与左向右分流先天性心脏病肺动脉高压的关系。

Survivin 对凋亡的抑制作用较明确，但不同的是 survivin 抑制细胞凋亡的机制十分复杂，可能存在多种途径[4,6]：①抑制凋亡信号转导的上游通路：Survivin 可抑制细胞色素 c 从线粒体释放，阻断 caspase 活化，从而在上游阻断凋亡信号的传导。②抑制下游的效应 caspase 活化：Survivin 能与 caspase-3 和 caspase-7 结合并抑制其活化，从而阻断了多种因子如 Fas 等所诱导细胞凋亡的发生。③促进 IAP 家族其他成员的功能：Survivin 不仅能直接对凋亡产生抑制作用，而且还具有上调其他 IAP 成员的作用，Survivin 能与 IAP 分子抑制物次级线粒体衍生 caspase 活化因子结合，解除其对其他 IAP 成员的抑制作用，从而增强了 X 染色体连锁的

凋亡蛋白剂等其他IAP分子对凋亡的抑制作用,间接发挥抗凋亡作用。但在先天性心脏病肺动脉高压的发病中,Survivin对凋亡抑制的机制目前仍不清楚,有待于进一步的研究。

bcl-2和bax是两类功能相反的基因,如bc1-2抑制细胞凋亡,而bax促进细胞凋亡。二者的比例决定了细胞在受到凋亡信号刺激时是否发生凋亡。这种比例的变化部分是由于特定的蛋白质间竞争的二聚化作用。正如本实验结果所显示的一样,既往的研究已经明确表明bcl-2、bax与肺动脉高压的发病是密切相关的[2,3]。但它们是否与survivin存在相互作用关系还不得而知。因此,左向右分流先天性心脏病患者肺动脉在血流剪切力、缺氧等因素作用下,多种基因的表达发生变化,细胞凋亡现象减少,细胞堆积,参与肺血管结构改建,是肺动脉高压的形成机制之一。但这样的复杂过程所涉及的信号传导通路及其调控因素却有待于进一步的研究[11]。

参考文献:

[1] Mandegar M, Fung Y C, Huang W, *et al*. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension[J]. Microvasc Res, 2004, 68(2): 75-103.

[2] Humbert M, Morrell N W, Archer S L, *et al*. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(12 Suppl S): 13S-24S.

[3] Gurbanov E, Xiao S L. The key role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2006, 30(3): 499-507.

[4] Sah N K, Khan Z, Khan G J, *et al*. Structural, functional and therapeutic biology of survivin[J]. Cancer Lett, 2006, 244(2): 164-171.

[5] Lens S M, Vader G, Medema R H. The case for Survivin as mitotic regulator[J]. Curr Opin Cell Biol, 2006, 18(6): 616-622.

[6] Conte M S, Altieri D C. Survivin regulation of vascular injury[J]. Trends Cardiovasc Med, 2006, 16(4): 114-117.

[7] McMurtry M S, Archer S L, Altieri D C, *et al*. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension[J]. J Clin Invest, 2005, 115(6): 1479-1491.

[8] Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee J D, *et al*. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells[J]. FASEB J, 2005, 19(9): 1178-1180.

[9] Blanc-Brude O P, Yu J, Simosa H, *et al*. Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury[J]. Nat Med, 2002, 8(3): 987-994.

[10] Wang G J, Sui X X, Simosa H F, *et al*. Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(10): 2081-2087.

[11] Levy M, Maurey C, Celermajer D S, *et al*. Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(7): 803-810.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)01-0030-01

心脏外伤急诊体外循环冠状动脉搭桥1例

顾 强,陈柏成,程 伟,郝 嘉,肖颖彬 (第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心,重庆 400037)

患者,男,26岁,因左前胸部刀砍伤后出现失血性休克后急送当地医院,入院查体患者面色苍白,意识模糊,呼吸浅快,约30次/min,血压70/50 mmHg,脉搏细速,心率140次/min,胸骨中下1/3处可见一横行大小约30 cm大小伤口,胸骨横断,伤口深达胸腔。心电图:窦性心动过速;ST段抬高。床旁胸片提示:右侧胸腔积液。急诊心脏超声提示:心包积液。入院诊断:胸部外伤、失血性休克、肺损伤、双侧开放性气胸、心脏裂伤、急性心脏压塞可能。急诊全身麻醉下行开胸探查术,就原伤口第6肋间胸部前外侧切口进入胸腔,术中见胸骨中下1/3横断,右侧6、7、8、9肋骨骨折,右侧胸膜破裂,胸腔内约3 500 ml不凝血,双侧胸廓内动脉断裂,左下肺可见一大小约2 cm大小裂口,心包探查见心包内约有300 ml不凝鲜血,心脏前壁可见一大小约11.5 cm大小伤口,范围自右室前壁至左室侧壁,跨越室间沟,横断冠状动脉左前降支,心脏裂口未穿透室壁,外院因医疗条件原因,行心脏裂伤间断缝合术,4号线间断褥式缝合心脏裂口,修补肺损伤,结扎胸廓内动脉,因不具备急诊冠状动脉搭桥手术条件,暂时给予结扎冠状动脉前降支。术后给予补充循环血量后,患者血压升至107/56 mmHg,但心电监护提示心率128次/min,心电图Ⅱ导联ST明显抬高,心肌缺血明显。术后10 h急送我院,入院时患者麻醉仍未醒,呼吸26次/min,血压约87/60 mmHg,脉搏细速,心率125次/min,心电图:窦性心动过速,胸部Ⅱ导联ST抬高,心脏超声提示:心脏瓣膜未见异常,室间隔正常。急诊行体外循环下冠状动脉搭桥及心脏外伤修补手术。胸部正中切口,体外循环建立后,先行修补心脏前壁11.5 cm切口,室缺线垫片针褥式缝合心脏伤口,解除结扎冠状动脉前降支,用微创探子检查,见横断远端前降支通畅,无血栓,将大隐静脉与前降支远端行端侧吻合,打孔器在

(下转38页)

作者简介:顾 强,男,安徽省蚌埠市人,硕士研究生,医师,主要从事心脏机械瓣膜置换术后抗凝方面的研究。电话:(023)62059387,E-mail:oldwall_gu@hotmail.com

收稿日期:2007-09-26;修回日期:2007-11-15