文章编号:1000-5404(2009)23-2351-04

论著

自噬体在紫绀型先天性心脏病患儿心肌中的表达

洪 毅,蹇 朝,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)

摘 要:目的 检测紫绀型先天性心脏病患儿心肌细胞中自噬体的表达,探讨细胞自噬作用在心肌慢性缺氧适应中的意义。**方法** 入选行手术矫治的先天性心脏病患儿18例,其中紫绀型先天性心脏病患儿10例,非紫绀型先天性心脏病患儿8例。取手术中切除的右室流出道心肌组织作为标本,采用透射电镜技术观察心肌细胞超微结构的改变,应用Western blot检测自噬体特异性标志物LC3-Ⅱ的表达情况。**结果** 紫绀组患儿术前血氧饱和度明显低于非紫绀组($P<0.01$);紫绀组患儿心肌细线粒体数量增多、排列紊乱,内质网肿胀,可见典型自噬体形成;与非紫绀组相比,紫绀组患儿LC3-Ⅱ蛋白表达显著增高($P<0.01$)。**结论** 紫绀型先天性心脏病患儿心肌细胞自噬作用增强,可能参与慢性缺氧条件下心肌细胞的适应性调节。

关键词: 紫绀型先天性心脏病;自噬体;LC3-Ⅱ;心肌慢性缺氧适应
中图法分类号: R322.11; R329.25; R725.411 **文献标识码:** A

Upregulated autophagy in myocardium of infants with cyanotic congenital heart defects

HONG Yi, JIAN Zhao, XIAO Ying-bin (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective In the heart, autophagy is important for the turnover of organelles at low basal levels under normal conditions, but is upregulated in response to stresses such as ischemia/reperfusion and in cardiovascular diseases such as heart failure. It can prevent the heart from injury under stress conditions. This study was designed to test the hypothesis that autophagy would be upregulated in the myocardium of children with cyanotic congenital cardiac defects. **Methods** Eighteen children with cyanotic ($n=10$) or acyanotic cardiac defects ($n=8$) who were admitted in our hospital from October 2008 to April 2009 and received surgical treatment were investigated. Samples from the right ventricular myocardium taken immediately after aortic clamping were morphologically studied with transmission electron microscopy for the ultrastructure. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC-3) was detected by Western blot analysis in the obtained samples. **Results** Children with cyanotic cardiac defects had higher oxyhemoglobin saturation before operation than those with acyanotic cardiac defects. Electron microscopy showed that the former group had more mitochondria, disordered arrangement, swollen endoplasmic reticulum and typical autophagosomes in the myocardial cytosol. LC3-II were significantly elevated in patients with cyanotic compared with those with acyanotic congenital cardiac defects ($P<0.01$). **Conclusion** Chronic hypoxemia is associated with the induction of autophagy. Thus, up-regulated autophagy might particularly participate in myocardial adaption to chronic hypoxia in children with cyanotic congenital cardiac defects.

Key words: cyanotic congenital heart defects; autophagosome; microtubule-associated protein 1 light chain3 (LC-3); myocardial adaptation; chronic hypoxia

细胞自噬是细胞内重要的自体降解途径,参与细胞质成分如长寿蛋白和细胞器等的回收和再循环。在营养缺乏时,细胞自噬是促进细胞生存的重要保护性机制之一[1]。近年来研究表明,细胞自噬能通过清除细胞内蛋白和细胞器,减少细胞器如线粒体数量,稳定内质网功能等途径发挥生理或病理生理作用[2]。在正常心肌细胞中,细胞自噬参与降解细胞器使其数量维持在适当水平;在心肌肥厚、心功能不全等疾病状态

作者简介:洪 毅,男,上海市人,博士研究生,医师,主要从事心肌慢性损害机制及防护方面的研究。电话:(023)68774607,E-mail:txz0163@163.com
通信作者:肖颖彬,E-mail:xiaoyb@vip.sina.com
收稿日期:2009-09-15;修回日期:2009-10-19

下,细胞自噬参与心肌重构,影响着疾病的发生、发展和转归[3,4]。紫绀型先天性心脏病患者因为慢性系统性缺氧,心肌细胞的超微结构会发生改变,如线粒体生物合成增加致线粒体数量增多,肌节排列紊乱等[5]。这些结构的变化是细胞适应低氧应激状态所必需,细胞自噬理应在这一过程中发挥重要作用。本研究拟通过观察慢性缺氧心肌细胞中自噬体的表达,进而探讨细胞自噬作用在心肌慢性缺氧适应中的意义。

1 资料与方法

1.1 资料与分组

本研究纳入2008年10月至2009年4月在我科行手术治疗的先天性心脏病患儿18例,其中男性7例,女性11例,年龄(12.6±2.8)岁。患儿入院后经我院经验丰富的心脏彩超技师复查的心脏多普勒彩超为主要诊断标准,并结合常温环境不吸氧1 h以上所测四肢血氧饱和度,确定一下分组标准:非紫绀组,平均血氧饱和度 > 95%且四肢血氧饱和度差异≤2%,临床诊断为室间隔缺损合并右室流出道狭窄,术中行室间隔缺损修补术同时行右室流出道疏通术;紫绀组,平均血氧饱和度 < 85%且四肢血氧饱和度差异 ≤2%,临床诊断为法洛四联症或室间隔缺损合并肺动脉闭锁Ⅰ型或Ⅱ型,术中需要行右室流出道疏通术。最终纳入紫绀组10例,纳入非紫绀组8例,所有患儿入院后病史、查体和实验室检查排除心脏合并畸形、先天愚型及其他系统病变。入组患儿临床资料见表1。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 在常规麻醉、开胸建立体外循环,取手术中切除的右室流出道心肌组织作为标本,并将其分为两部分:一部分立即放入液氮中储存,用于Western blot检测LC3-Ⅰ和LC3-Ⅱ的表达;另一部分即放入戊二醛溶液中固定,用于透射电镜检查心肌细胞超微结构的改变和自噬体的形成。

1.2.2 超微结构的观察和分析 留取手术中切除的肥厚右室流出道心肌组织,迅速切成体积1 mm^3以下的小块,浸入2.5%戊二醛固定,PBS漂洗后用1%锇酸固定2 h,丙酮梯度脱水,环氧树脂618包埋后半薄切片定位,超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,TECNAI10电子显微镜观察并照相。定性观察肌原纤维、线粒体、细胞核等超微结构变化。每例超薄切片标本随机摄片6张(20 000倍),观察心肌超微结构的改变和细胞自噬体的形成。

1.2.3 Western blot 在液氮中取出冻存的心肌组织,取100 mg剪碎后溶解于自制的RIPA蛋白提取液中,匀浆机匀浆至肉眼见无明显颗粒状肌肉组织,冰上静置30 min,4 ℃低温离心机中以12 000 r/min离心15 min,取上清液用BCA法测定蛋白质浓度。各标本取等量蛋白质样品于95 ℃加热5 min后,加入15% SDS-PAGE凝胶中电泳,将蛋白质从SDS-PAGE凝胶转移到聚二氟乙烯滤膜上,在牛血清白蛋白缓冲液中封闭1 h。随后,加入兔抗人LC3多克隆抗体(购于Cell Signaling, USA),置4 ℃摇床过夜,以GAPDH为内参。再加入山羊抗兔IgG 37 ℃孵育1 h,化学发光试剂显色,X线片感光显影,测定目的条带LC3-Ⅰ和LC3-Ⅱ条带灰度值。将LC3-Ⅱ条带灰度值与LC3-Ⅰ条带灰度值的比值记作LC3转化率。

1.3 统计学分析

数值均以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 透射电镜对心肌细胞超微结构的观察

紫绀组和非紫绀组患者心肌细胞典型超微结构见图1。非紫绀型先天性心脏病患儿心肌细胞中肌丝、肌节排列规律,未见肌丝溶解,线粒体较为丰富,排列规则,嵴间隙未见水肿及结构破坏,见图1A;紫绀型先天性心脏病患儿心肌中线粒体明显增多,形态不规则,排列紊乱,线粒体嵴间隙扩张,局部可见溶酶体,见图1B;并可见典型自噬体特征性的双层膜样结构,同时可见内质网水肿扩张。见图1C。

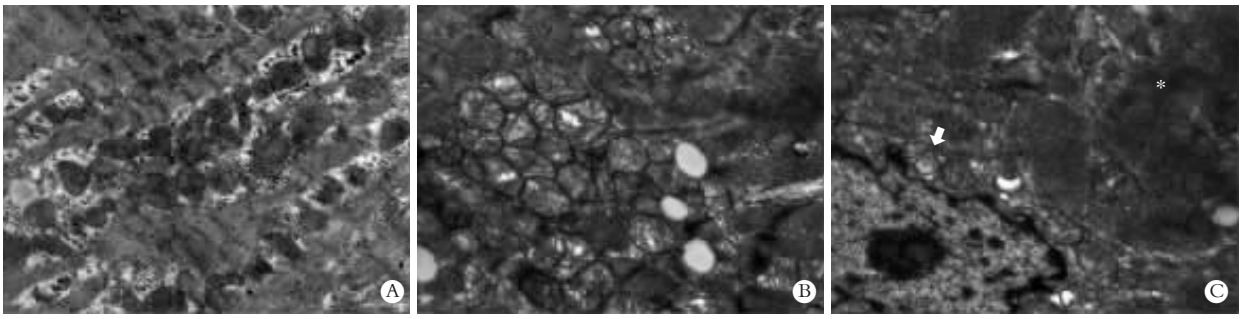
2.2 心肌组织中LC3-Ⅱ和LC3-Ⅰ蛋白表达的检测

LC3-Ⅱ和LC3-Ⅰ蛋白特异性条带见图2。与非紫绀组(0.32±0.05)相比,紫绀型先天性心脏病患儿心肌细胞中LC3-Ⅱ和LC3-Ⅰ蛋白含量的比值显著升高(1.05±0.13),($P<0.01$)。

表1 紫绀组和非紫绀组患儿临床资料

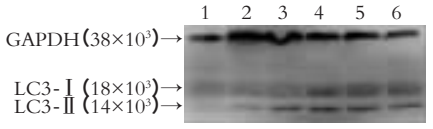
组别	性别(女/男)	手术时年龄(月,$\bar{x}\pm s$)	手术时体质量(kg,$\bar{x}\pm s$)	术前血氧饱和度(%,$\bar{x}\pm s$)	血红蛋白(g/dl,$\bar{x}\pm s$)	射血分数(%,$\bar{x}\pm s$)
非紫绀组	5/3	15.6±4.1	8.5±1.4	96.5±1.5	12.3±2.4	68±4.0
紫绀组	6/4	10.1±3.2	7.6±1.3	81.5±2.5[a]	14.7±1.5[a]	62±2.5

a: $P<0.05$,与非紫绀组比较



A:非紫绀型组;B:紫绀型组;C:紫绀组自噬体双特征性结构 ↑:双层膜样结构;*:内质网

图1 非紫绀型和紫绀型先天性心脏病患儿心肌超微结构观察 (EM×20 000)



1~3:非紫绀组;4~6:紫绀组

图 2　非紫绀组和紫绀组 LC3-Ⅱ和 LC3-Ⅰ蛋白表达

3　讨论

自噬是细胞通过双层膜包裹待降解物形成自噬体(autophagosome),然后运送到溶酶体形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物,以实现细胞自身的代谢需要和细胞器的更新。根据底物进入溶酶体内的途径不同可将自噬分为 3 种类型:微自噬、巨自噬和分子伴侣介导的自噬。巨自噬即为通常所指的自噬[6]。目前,参与细胞自噬调控的基因被统一命名为 *Atg*(autophagy related gene,自噬相关基因)。到目前为止,大多数被证实的 *Atg* 都是参与调控自噬体形成的关键因子。自噬体的形成是细胞自噬的关键,而在自噬体形成过程中,*Atg*8[又被称为 LC3(microtubule-associated protein 1 light chain3,微管相关蛋白 1 轻链 3)]与磷脂酰乙醇胺的结合,使可溶性的 LC3(LC3-Ⅰ)向自噬泡相关形式(LC3-Ⅱ)的转化,被认为是吞噬体形成的关键环节[7],因此,LC3-Ⅱ对 LC3-Ⅰ比值的升高是细胞自噬增强的标志之一,同时,透射电镜下观察到自噬体特征性的双层膜样结构是检测细胞自噬作用的常用方法[8]。

在本研究中,我们通过电子显微镜观察到慢性缺氧心肌细胞中自噬体的存在,进一步研究证实了 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ比值的升高,而在非缺氧的对照组中未观察到类似的变化。这些结果表明,在慢性缺氧条件下,心肌细胞自噬作用增强,细胞自噬可能在心肌慢性缺氧适应中发挥重要作用。在慢性缺氧时心肌细胞内自噬作用增强的可能机制中,缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)稳定性增加[9],进而诱导 BNIP 和 BNIPL 的表达增强,竞争性的释放出促细胞自噬的关键因子 Beclin1,促进细胞自噬作用的增强[10]。另外,慢性缺氧时,心肌细胞内腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)活性增加[11]。AMPK 能够抑制哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)的活性。当能量充足时,mTOR 能够磷酸化 *Atg*13,抑制细胞自噬。缺氧诱导 AMPK 活化进而对 mTOR 的抑制有助于 *Atg*13 的去磷酸化和 *Atg*1 的活化,诱导细胞自噬[12]。但是,慢性缺氧时心肌细胞自噬增强的确切机制尚有待于进一步深入的研究。

慢性系统性缺氧是紫绀型先心病共同的病理生理过程。心肌慢性缺氧适应是心肌细胞在缺氧条件下存活和生长的关键。但是,心肌慢性缺氧适应的确切机制尚不清楚。同时,紫绀型先天性心脏病经过手术矫治后血液氧供可能恢复正常,缺氧复氧过程以及手术时缺血再灌注对心肌细胞的损伤已受到越来越多的关注,被认为是改善先天性心脏病手术时心肌保护的可能靶点。既往在心血管疾病中的研究表明,细胞自噬既能发挥保护作用,也可能是引起细胞凋亡的重要原因。如在营养缺乏时,细胞自噬是促进心肌细胞存活的重要机制,但是在缺血再灌注过程中,细胞自噬发挥着复杂的作用,在缺血过程中,适度的细胞自噬是促进细胞存活的重要机制,但是再灌注时,过度活化的细胞自噬则参与促进心肌细胞的凋亡,加重再灌注损伤[13]。慢性缺氧时,细胞自噬增强,其在心肌细胞中的作用尚不能明确是有益或是有害。一方面,这与缺氧时间、缺氧程度等有关,急性缺氧和慢性缺氧是细胞自噬的活化程度有显著差异;另一方面,细胞自噬的作用可能与上游的激活因素相关,如 AMPK 激活后可能主要发挥保护作用,而由于 Beclin1 表达增强所致细胞自噬增强则可能对细胞产生损害作用[14]。在既往研究中发现,慢性缺氧心肌细胞中,线粒体生物合成增强,线粒体数目增多,这是新急慢性缺氧适应的重要机制,但同时也导致各种形态不规则线粒体出现和大量功能受损的线粒体在心肌细胞中堆积[5]。在心肌细胞中,线粒体总体积和细胞总体积的比值需维持在一定范围内,才能保证心肌细胞的收缩力,线粒体数量过多就可能会负性的影响心肌细胞的收缩力。为了维持心肌细胞内线粒体数量在适当范围内,需要细胞自噬来清除细胞内功能不全的线粒体,以保证高效能线粒体的功能并控制线粒体数量以维持心肌细胞功能和收缩力相协调,因此,线粒体的自噬已成为当前心血管领域研究的又一热点[15]。另外,研究在慢性缺氧心肌细胞超微结构时发现,经历慢性缺氧的心肌细胞内质网肿胀明显,这可能与慢性缺氧致细胞内蛋白质正确折叠发生障碍,导致内质网应激的表现之一。细胞自噬被认为是内质网应激重要的调节方式之一[16]。总之,细胞自噬可能通过多种方式参与心肌慢性缺氧适应:调节线粒体功能、控制线粒体数量;缓解内质网应激等。同时,细胞自噬还在缺氧复氧、缺血再灌注过程中发挥重要作用。

近来,细胞自噬在心肌细胞中的作用受到越来越多的关注。因此,进一步研究细胞自噬在心肌细胞慢性缺氧中的作用和确切机制,阐释细胞自噬增强的调控机制,对于进一步改善复杂先天性心脏病外科治疗中的心肌保护策略进而改善临床治疗现状有重要意义。

参考文献:

[1] Maiuri M C, Zalckvar E, Kimchi A, *et al*. Self-eating and self-killing:

crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(9): 741-752.
[2] Nishida K, Kyoi S, Yamaguchi O, *et al*. The role of autophagy in the heart[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 31-38.
[3] Martinet W, Knaapen M W, Kockx M M, *et al*. Autophagy in cardiovascular disease[J]. Trends Mol Med, 2007, 13(11): 482-491.
[4] Gustafsson A B, Gottlieb R A. Autophagy in ischemic heart disease[J]. Circ Res, 2009, 104(2): 150-158.
[5] 肖 娟, 肖颖彬, 陈 林, 等. 发绀型先天性心脏病心肌线粒体生物合成观察[J]. 重庆医学, 2008, 37(9): 962-964.
[6] Yang Y P, Liang Z Q, Gu Z L, *et al*. Molecular mechanism and regulation of autophagy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(12): 1421-1434.
[7] Ferraro E, Cecconi F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells[J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 462(2): 210-219.
[8] Kaushik S, Cuervo A M. Methods to monitor chaperone-mediated autophagy[J]. Methods Enzymol, 2009, 452:297-324.
[9] 蹇 朝, 马瑞彦, 王 咏, 等. 缺氧诱导因子-1α在紫绀型先心病患儿心肌中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(12): 1189-1192.
[10] Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, *et al*. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(10): 2570-2581.
[11] Baron S J, Li J, Russell R R 3rd, *et al*. Dual mechanisms regulating AMPK kinase action in the ischemic heart[J]. Circ Res, 2005, 96(3): 337-345.
[12] Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, *et al*. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease[J]. Nat Genet, 2004, 36(6): 585-595.
[13] Takagi H, Matsui Y, Sadoshima J. The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart[J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(9):1373-1381.
[14] Matsui Y, Takagi H, Qu X, *et al*. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy[J]. Circ Res, 2007, 100(6): 914-922.
[15] Semenza G L. Mitochondrial autophagy: life and breath of the cell[J]. Autophagy, 2008, 4(4):534-536.
[16] Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(9): 1576-1582.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)23-2354-01

1例安装临时起搏器引起急性心包填塞的抢救护理

汪洋玉,杨继红 （中国人民解放军总医院南楼心血管一科,北京 100853）

老年患者合并严重缓慢性心律失常,外科手术前安置临时起搏器,能够扩大手术适应症,提高麻醉及手术安全性,使患者能够安全度过围手术期[1]。急性心包填塞是由于冠脉破裂、心肌穿孔等原因造成的心包腔内积液致使心脏收缩舒张严重受阻,心排血量急剧下降导致休克甚至死亡的急症[2]。我科于2009年2月7日收治1例颈动脉狭窄患者,在行颈动脉支架植入术前安装临时起搏器,术后拔除起搏电极引起急性心包填塞,抢救成功,现报告如下。

1 病例资料

患者,男性,87岁,主因发作性晕厥8个月,于2009年2月入院。入院诊断:左侧颈内动脉狭窄,既往有高血压、冠心病、心律失常,完全性左束支传导阻滞、贲门癌术后病史,拟行左颈动脉支架植入术。因既往行贲门癌手术中心率减慢至40次/min,阿托品反应差。为预防本次手术中出现意外,拟术前植入临时起搏器。患者于2009年2月18日在导管室X线透视下经股静脉行6F双极临时起搏器植入术,设置起搏心律60次/min,起搏阈值0.5 V,感知度5 mV,起搏良好。随即行左侧颈内动脉支架植入术。术中顺利,1 h后手术结束。术后在X线透视下,拔除临时起搏电极。患者出现血压进行性下降,心率加快,面色苍白,出冷汗。X线透视提示有心包积液,考虑起搏器电极穿破心肌,拔除电极后出现心包填塞。给予升压药物治疗无效。立即行剑突下心包穿刺,用6F猪尾造影导管抽吸心包内不凝血后血压回升至90/50 mmHg。但X线透视及心脏超声显示,暂停抽吸后心包积液增长较快。考虑患者术前口服抗凝药,术中使用肝素,给予鱼精蛋白注射液、维生素K_1、立止血静推,快速补液。由于猪尾导管抽吸不畅,2 min后心尖部心包穿刺成功,用双腔中心静脉置管,多次抽出心包积液,前后共500 ml,全部用于自体血回输。血压波动在40~130/40~80 mmHg之间,心率波动在98~140次/min。经紧急会诊,决定在导管室为患者行开胸心肌穿孔修补术。给予全麻,导尿。在发生心包填塞90 min后,缝合右心室心尖部破口,出血停止。血压波动在110~120/60~80 mmHg,心律80~90次/min。右心室表面缝合临时心脏起搏导线备用,放置一根纵膈引流管,未缝合心包,逐层关胸。术毕将患者送入外科重症监护室。2 d后拔除气管插管,3 d后拔除纵膈引流管,6 d后转至外科普通病房,3个月后康复出院。

2 护理措施

①术前准备。临时起搏器植入,手术虽小但仍有引起严重并发症的可能,术前护士应做好充分心理准备和物质准备。除常规抢救用物外,还应准备:胸穿包, 单双腔中心静脉管, 导尿

（下转2366页）

作者简介:汪洋玉,女,辽宁省清源县人,护师,主要从事老年心血管介入护理方面的研究。电话:(010)68255822

收稿日期:2009-05-11;修回日期:2009-06-12