论著

文章编号:1000-5404(2013)12-1284-04

体外循环冠脉旁路术和双瓣替换术围术期血浆循环DNA变化及意义

黄 晶,肖颖彬 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心)

[摘要] **目的** 研究体外循环(cardiopulmonary bypass,CPB)下心内直视手术患者围术期血浆循环DNA(circulating cell-free DNA, cf-DNA)浓度变化及手术前后肝、肾功能和心肌功能的变化及其临床意义。**方法** 收集2012年9月至12月在本院心血管外科CPB下行心内直视手术的住院患者25例(男性13例,女性12例),冠状动脉粥样硬化性心脏病患者13例[行冠状动脉搭桥手术(coronary artery bypass graft,CABG),即CABG组];风湿性二尖瓣及主动脉瓣狭窄关闭不全患者12例[行二尖瓣及主动脉瓣双置换术(double valve replacement,DVR),即DVR组]。采集患者静脉血为标本,对肝肾功及心肌酶谱进行检测,并采用荧光定量PCR对血浆中cf-DNA进行相对定量检测。**结果** CABG组和DVR组在术中cfDNA含量都随转流时间延长而增高,转流完毕时达到最高,术后48 h内逐步下降,但仍高于转流前。CABG组术后血浆cfDNA随时间下降比DVR组显著($P<0.05$)。CABG组和DVR组术后24 h血浆cf-DNA变化与患者总胆红素及尿素氮的变化显著相关($P<0.01$)。**结论** 血浆cf-DNA在监测体外循环下患者机体受损程度以及预测肝肾并发症及预后方面可能具有重要意义。

[关键词] 体外循环;血浆cf-DNA;围术期

[中图法分类号] R446.9;R619;R654.1 [文献标志码] A

Perioperative changes of plasma circulating cell-free DNA in patients with coronary artery bypass graft and double valve replacement under cardiopulmonary bypass

Huang Jing, Xiao Yingbin (Center of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To examine the changes of the concentration of plasma circulating cell-free DNA (cf-DNA) during cardiopulmonary bypass (CPB) open-heart surgery, and the changes of hepatic function, renal function and myocardial enzymes before and after operation, and to explore the significance. **Methods** Twenty-five patients admitted in our hospital from September 2012 to December 2012 were enrolled. Thirteen patients with coronary artery disease underwent coronary artery bypass graft (CABG) were enrolled as a CABG group and 12 patients with rheumatic heart disease underwent double valve replacement (DVR) were enrolled as a DVR group. Venous blood was collected for the determination of hepatic function, renal function and myocardial enzymes, and plasma cf-DNA was detected by fluorescent semi-quantitative PCR. **Results** The concentration of plasma cf-DNA was elevated significantly during CPB in both groups, it peaked at the end of CPB, and decreased along with time extending. However, the concentration of plasma cf-DNA at 48 h after operation was still higher than that before CPB. The decrease of plasma cf-DNA in the CABG group was significantly faster than that in the DVR group ($P<0.05$). The changes of plasma cf-DNA before and after operation were significantly correlated with total bilirubin and urea nitrogen ($P<0.01$). **Conclusion** Plasma cf-DNA can monitor the injury of patients during CPB, and may be a valuable marker for the diagnosis and prediction of CPB complications.

[**Key words**] cardio pulmonary bypass; circulating nucleic acid; perioperative period

Supported by the Major Clinical High-tech Project of PLA(2010GXJS069). Corresponding author: Xiao Yingbin, Tel: 86-23-68755607, E-mail: xiaoyb@vip.sina.com

体外循环(cardiopulmonary bypass,CPB)下心内直视手术是目前外科治疗许多心脏疾病的主要技术手段,然而非自体循环会给患者带来许多并发症。医学文献中有很多研究旨在评估、预防和治疗CPB围术期

[基金项目] 军队重大临床高新技术(2010GXJS069)

[通信作者] 肖颖彬,电话:(023)68755607,E-mail:xiaoyb@vip.sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130329.1016.001.html(2013-03-29)

肝肾功能及心功能不全[1],但目前还没有很好的预测术后并发症或可能产生预后不良的检测指标。血浆cf-DNA是一种重要的与细胞死亡相关的指标,可以用来预测临床上许多疾病的预后,如冠心病患者的不良心血管事件[2]。血浆中游离DNA水平的高低与创伤的程度[3]和感染性疾病[4]的严重程度相关,高水平的cf-DNA预示着临床上的高病死率。许多研究表明,包括肿瘤[5-7]、感染性疾病、产前疾病、急性冠脉综合征[8]、炎症和创伤等各种疾病的患者血液cf-DNA存在量和性质的改变[9]。本研究通过对体外循环下冠状动脉搭桥手术(coronary artery bypass graft, CABG)和二尖瓣及主动脉瓣双置换术(double valve replacement, DVR)手术患者围术期血浆循环DNA(circulating cell-free DNA, cf-DNA)进行相对定量,以及患者CPB手术前后肝肾功及心梗标志物检测,旨在探讨CPB下围术期患者血浆cf-DNA变化的临床意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究入组患者为2012年9-12月于新桥医院心血管外科25例CPB下心内直视手术住院患者。纳入标准:心功能Ⅱ~Ⅳ级,择期在CPB下行心内直视手术患者。排除标准:合并有严重的肝肾功能不全和凝血障碍、恶性肿瘤、妊娠等。告知患者研究内容及过程,并签署知情同意书。本研究受第三军医大学新桥医院伦理委员会的批准。

共纳入25例患者(冠状动脉粥样硬化性心脏病患者13例、风湿性二尖瓣及主动脉瓣狭窄闭锁不全患者12例)。患者按手术方式不同分为2组,冠状动脉搭桥术组(coronary artery bypass graft, CABG)13例患者年龄(54.23±13.10)岁,体质指数(23.38±2.28),CPB时间(136.92±20.87)min。主动脉瓣和二尖瓣双置换组(double valve replacement, DVR)年龄(43.42±6.34)岁,体质指数(21.08±2.24),CPB时间(140.33±17.73)min 12例患者,组内采取自身对照,即术中及术后各时间点血浆cf-DNA含量变化与术前进行对比。手术均在气管插管全静脉复合麻醉进行,经胸骨正中切口入胸,常规建立体外循环。

1.2 引物设计

选取看家基因GAPDH作为血浆cf-DNA水平改变的评价指标,针对其基因组序列设计上下游引物:gapdhF01, 5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′, gapdhR01, 5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′,产物片段大小为210 bp。

1.3 标本采集

患者CPB术前、主动脉插管后转机前、转机1 h、转机2 h、转流结束时、术后24 h(与术后肝肾功能检查相同标本)、48 h静脉血各2 mL。EDTA抗凝,3 000 r/min离心10 min,吸取上清于1.5 mL离心管中,16 000 r/min离心10 min,吸取上层无细胞血浆200 μL。上述操作过程在标本采集后2 h内完成。

1.4 血浆cf-DNA的提取和检测

使用Tiangen公司微量样品基因组DNA提取试剂盒对血浆cf-DNA进行提取,提取方法按试剂盒说明书进行。ABI 7500定量PCR仪对血浆标本中cf-DNA进行相对定量,每个样本重复3次。反应体系如下:总体积25 μL: 2.5×Real Master-Mix与20×SYBR solution混合液:11.25 μL, GAPDH上下游引物:各1 μL, 血浆cf-DNA模板:2 μL,加超纯水至25 μL。反应条件:95 ℃预变性5 min,95 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,共35个循环,在72 ℃测定荧光值。由于体外循环期间血液稀释的影响,所得数据需按以下公式进行矫正:矫正值=实测值×术前红细胞压积/实测红细胞压积。

1.5 实验室检查

采取患者术前、术后24 h静脉血标本使用全自动生化分析仪检验ALT、AST、总胆红素、尿素氮、肌酐、尿酸、CK-MB、肌红蛋白和肌钙蛋白Ⅰ指标。

1.6 统计学分析

血浆cf-DNA结果采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$表示,所有数据采用统计软件SPSS 18.0分析,正态分布的计量资料采用$\bar{x}\pm s$表示,非正态分布的计量资料采用中位数(25%分位数,75%分位数)表示。CABG组和DVR组围术期组间不同时间点cf-DNA量比较采用独立样本Wilcoxon检验。组内转流各时间点与转流前、术后24 h与转流完毕、术后24 h与术后48 h、手术前后肝肾功及心肌酶谱变化比较采用配对样本的Wilcoxon检验。手术前后肝肾功、心肌酶谱与cf-DNA变化的相关性采用Spearman秩相关分析。

2 结果

2.1 2组患者围术期情况

CABG组平均年龄及体质指数均高于DVR组(P值分别为$P=0.016$, $P=0.018$),CABG组和DVR组之间转流时间无统计学差异($P=0.065$)。CABG组和DVR组近期均未出现死亡病例,DVR组术后出现2例肝功能不全,CABG组近期无并发症发生。

2.2 2组患者围术期血浆cf-DNA相对定量变化

从表1可以看出,转流完毕血浆cf-DNA相对值显著高于转流前($P<0.01$),术后24 h血浆cf-DNA相对值显著低于转流完毕值($P<0.01$),血浆cf-DNA的含量从转流开始逐渐增高,至转流结束达到峰值,术后随时间降低,但仍高于转流前。CABG组和DVR组在CPB手术中血浆cf-DNA相对定量变化没有统计学差异($P>0.05$),而血浆cf-DNA在术后24 h和48 h的变化有统计学意义($P<0.05$,表1)。

2.3 2组患者手术前后肝、肾功能及心梗标志物变化

与术前相比,CABG组及DVR组的CK-MB、总胆红素及尿素氮都有显著增高($P<0.01$)。CABG组及DVR组肌红蛋白及肌钙蛋白Ⅰ均有变化($P<0.01$, $P<0.05$),2组的ALT值都无明显变化($P>0.05$,表2)。

2.4 2组患者术后24 h肝、肾功与心梗标志物变化以及血浆cf-DNA的相关性分析

CABG组及DVR组患者术后24 h总胆红素变化都与血浆cf-DNA变化显著正相关($P<0.01$),CABG组患者的尿素氮与血浆cf-DNA量的变化相关($P<0.01$),而DVR组患者术后血浆cf-DNA也跟ALT和尿素氮指标相关($P<0.05$,表3)。

表1 2组患者不同转流时间血浆 cf-DNA 相对定量($2^{-\triangle\triangle Ct}$)的变化 [中位数(25%分位数,75%分位数)]

组别	n	开胸后转流前	转流1 h	转流2 h	转流完毕	术后24 h	术后48 h
CABG 组	13	1.31(1.10,1.48)	2.49(2.18,2.72)[b]	3.76(3.61,3.95)[b]	4.66(4.03,3.95)[bc]	2.25(1.99,2.37)[a]	1.67(1.39,1.79)[a]
DVR 组	12	1.54(1.31,1.75)	2.66(2.40,3.07)	3.71(3.24,4.10)	4.57(4.16,4.78)	2.67(2.44,2.89)	2.07(1.88,2.35)

a:$P<0.05$,与 DVR 组比较;b:$P<0.01$,与开胸后转流前比较;c:$P<0.01$,与转流完毕比较

表2 2组患者手术前后肝、肾功能及心梗标志物变化 [中位数(25%分位数,75%分位数)]

组别	n		肝功能			肾功能		
			ALT	AST	总胆红素	尿素氮	肌酐	尿酸
CABG 组	13	术前	25.00(20.50,50.00)	23.00(18.50,44.00)	12.10(9.75,18.10)	5.75(5.07,6.87)	72.10(63.35,80.40)	364.00(336.50,389.00)
		术后	23.00(16.50,41.00)	44.00(33.50,53.00)[a]	24.60(16.40,33.95)[b]	9.32(6.84,11.34)[b]	83.70(66.10,105.75)[a]	432.00(342.00,463.00)
DVR 组	12	术前	19.00(14.50,29.50)	21.00(19.00,25.00)	16.90(13.35,25.02)	5.95(5.23,7.45)	59.45(50.65,66.30)	313.50(231.00,355.75)
		术后	25.50(14.25,47.25)	79.50(70.25,95.00)[b]	42.25(26.52,49.45)[b]	10.54(7.48,10.54)[b]	68.35(59.00,81.62)	328.50(282.50,399.25)[a]

组别	n		心梗标志物		
			CK-MB	肌红蛋白	肌钙蛋白 I
CABG 组	13	术前	1.00(1.00,1.00)	32.60(27.35,54.50)	0.05(0.05,0.05)
		术后	7.80(5.05,13.10)[b]	353.00(230.50,483.25)[b]	1.12(0.37,1.48)[b]
DVR 组	12	术前	1.00(1.00,1.00)	45.50(31.45,48.40)	0.05(0.05,0.05)
		术后	25.65(18.18,37.68)[b]	395.50(243.75,500.00)[a]	2.90(2.08,4.24)[a]

a: $P<0.05$,b:$P<0.01$,与术前比较

表3 2组患者术后24 h 肝、肾功、心梗标志物与血浆 cf-DNA 的相关性分析

组别	n		肝功能			肾功能			心梗标志物		
			ALT	AST	总胆红素	尿素氮	肌酐	尿酸	CK-MB	肌红蛋白	肌钙蛋白 I
CABG 组	13	r	−0.138	0.017	0.725[b]	0.484	0.379	0.170	0.165	0.112	0.280
		P	0.654	0.957	0.005	0.094	0.201	0.578	0.590	0.729	0.379
DVR 组	12	r	0.599[a]	−0.294	0.846[b]	0.622[a]	0.573	−0.063	−0.231	0.153	0
		P	0.040	0.353	0.001	0.031	0.051	0.846	0.470	0.635	1

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与血浆 cf-DNA 比较

3 讨论

血浆 cf-DNA 主要来源是细胞程序性死亡或急性损伤后释放的片段。文献[10]报道了 cf-DNA 在部分疾病中的变化及其应用:在烧伤患者血浆中 cf-DNA 的变化与烧伤面积相关并用以烧伤程度的评估; 同时 cf-DNA 用于反映颅脑损伤严重程度[3, 11];还可以用于感染患者死亡发生率的预测以及风险评估[12]。本研究发现 CABG 组和 DVR 组的术中血浆 cf-DNA 含量都随着转流时间的延长而增高,组间比较没有差异,说明 CPB 术中 cf-DNA 量的变化受转流时间的影响,随转流时间增加细胞破坏后释放到血液中的 cf-DNA 增多。因此术中 cf-DNA 的变化有望作为 CPB 心内直视手术中反映机体受损的程度指标。

CABG 组和 DVR 组术后 0 ~ 48 h 血浆 cf-DNA 都呈显著下降,可能是因为患者处于恢复阶段,机体逐渐清除 cf-DNA。另外,DVR 组出现了 2 例术后肝功能不全的患者,其术后 24 h 的 cf-DNA 值较高,且下降趋势较其他患者缓慢。因此,我们认为可以将 cf-DNA 作为一项用于患者术后并发症预测的生物标志物。

CPB 下两种手术方式都对肝功能损害不明显,总胆红素的升高考虑是体外转流对红细胞的破坏而导致。CABG 组和 DVR 组患者术后 cf-DNA 含量变化都与总胆红素和尿素氮变化呈正相关,由于 CPB 的转流时间越长,被破坏的红细胞越多,因此释放到血液中的胆红素也多。而随转流时间的延长,患者血液损失的也多,导致术后患者血容量不足,从而引起肾前性氮质血症和血尿素氮的升高。

近年来, cf-DNA 的检测技术日趋完善,应用十分广泛[13]。而 CPB 下缺血再灌注导致心肌损伤、术中出现的栓塞、凝血功能的影响以及术后各种脏器功能不全甚至衰竭,因此监测患者围术期的 cf-DNA 变化,对于改进转流及手术方式,降低 CPB 对机体的损伤,促进和评估术后脏器损伤的恢复程度,改善术后治疗及护理,减少并发症的产生具有重要应用价值。

参考文献:

[1] Welsby I J, Bennett-Guerrero E, Atwell D, *et al*. The association of complication type with mortality and prolonged stay after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass [J]. Anesth Analg, 2002, 94(5): 1072 – 1078.

[2] Federici C, Botto N, Manfredi S, *et al*. Relation of increased chromosomal damage to future adverse cardiac events in patients with known coronary ar-

tery disease[J]. Am J Cardiol, 2008, 102(10): 1296-1300.
[3] Campello-Yurgel V, Ikuta N, Brondani-da-Rocha A, *et al*. Role of plasma DNA as a predictive marker of fatal outcome following severe head injury in males[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(7): 1172-1181.
[4] Cossarizza A, Pinti M, Nasi M, *et al*. Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation [J]. Mitochondrion, 2011, 11(5): 750-755.
[5] Leon S A, Shapiro B, Sklaroff D M, *et al*. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. Cancer Res, 1977, 37(3): 646-650.
[6] Tong Y K, Lo Y M. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids[J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1/2): 187-196.
[7] Agostini M, Enzo M V, Bedin C, *et al*. Circulating cell-free DNA: a promising marker of regional lymphonode metastasis in breast cancer patients [J]. Cancer Biomark, 2012, 11(2/3): 89-98.
[8] Cui M, Fan M, Jing R, *et al*. Cell-Free Circulating DNA: A New Biomarker for the Acute Coronary Syndrome[J]. Cardiology, 2013, 124(2): 76-84.
[9] Rainer T H, Lam N Y. Circulating nucleic acids and critical illness [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1075: 271-277.
[10] Fox A, Gal S, Fisher N, *et al*. Quantification of circulating cell-free plasma DNA and endothelial gene RNA in patients with burns and relation to acute thermal injury[J]. Burns, 2008, 34(6): 809-816.
[11] 徐运强, 高虹, 赵召霞, 等. 血浆循环DNA水平与颅脑损伤严重程度的关系[J]. 河北医药, 2012, 34(8): 1151-1152.
[12] Rhodes A, Wort S J, Thomas H, *et al*. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients[J]. Crit Care, 2006, 10(2): R60.
[13] Jing R R, Wang H M, Cui M, *et al*. A sensitive method to quantify human cell-free circulating DNA in blood: relevance to myocardial infarction screening[J]. Clin Biochem, 2011, 44(13): 1074-1079.

(**收稿**:2013-03-19;**修回**:2013-03-26)
(编辑 王 红)

(上接1278页)

2 结果

随访时间12~32个月,平均18个月。X线片检查示,28例患者骨折均愈合。骨折愈合时间为(15.5±2.3)周,1例发生内翻畸形。1例于治疗后9个月发生肱骨头缺血性坏死,行半肩置换术。末次随访时肩关节中度疼痛3例,无或轻度疼痛25例。Neer评分测试患者对治疗效果评价:15例非常满意,10例满意,3例不满意(满意率89.2%)。Constant-Murley评分为26~95(61±19)分。

3 讨论

65岁以上老年人多存在骨质疏松,肱骨近端具有其独特之处:①骨折极易粉碎,造成复杂骨折。②有别于中青年患者的是老年患者肱骨近端骨折多由间接暴力所致。③老年患者常伴有多种基础疾病,有些甚至为手术麻醉禁忌。这些因素均给骨科医生对患者的治疗带来严重阻碍。肱骨近端骨折治疗目标是:尽量减少骨组织周围血运破坏,防止骨折不愈合和肱骨头缺血性坏死的发生;恢复肱骨近端的正常解剖关系;减少肩关节的疼痛与粘连,最大程度保护肩关节功能[4]。因此对老年性肱骨近端骨折的治疗方案选择应全面考虑,除了考虑肱骨近端的血运、软组织完整、骨折移位情况,还应全面衡量患者的全身情况、内科并发症、骨质疏松程度、软组织的完整性、功能恢复等多方面因素。

肱骨近端骨折的治疗,尤其是老年性肱骨近端复杂性骨折的治疗,目前仍没有形成公认的治疗模式。樊嵘等[5]采用非手术及手术治疗肱骨近端骨折,结果发现:手术组与非手术组肩关节功能Constant评分比较无显著性差异,认为:手术与非手术治疗老年肱骨近端三、四部分骨折疗效相似,对手术风险高、日常活动要求低或拒绝手术治疗的老年患者可选择非手术治疗。Lanting等[6]对1985-2004年期间成人肱骨近端骨折治疗性文章的系统性回顾,认为目前研究尚不能对手术疗法和非手术疗法优劣得出一致性结论。

对于本组非手术治疗患者,我们在外固定早期注意多次摄X线片复查,评估骨折端移位情况,以避免因石膏外固定引起的严重骨折移位。治疗后指导患者早期进行功能锻炼。获得了满意率89.2%的临床疗效。我们认为这与保守治疗最大程度保护了内侧铰链区、肩袖等肩关节周围组织结构完整性和血供有着密切联系,另外肩关节的部分活动度还可以通过肩胛骨及锁骨等代偿。因此,我们认为:对于关节功能要求不高、内科并发症重的老年患者,可以选择非手术治疗,治疗后完全能满足其基本生活要求。

参考文献:

[1] Roux A, Decroocq L, El-Batti S, *et al*. Epidemiology of proximal humerus fractures managed in a trauma center[J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2012, 98(6): 715-719.
[2] van-den-Broek C M, van-den-Besselaar M, Coenen J M, *et al*. Displaced proximal humeral fractures: intramedullary nailing versus conservative treatment[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2007, 127(6): 459-463.
[3] Kollig E, Kutscha-Lissberg F, Roetman B, *et al*. Complex fractures of the humeral head: which long-term results can be expected? [J]. Zentralbl Chir, 2003, 128(2): 111-118.
[4] Gallo R A, Zeiders G J, Altman G T. Two-incision technique for treatment of complex proximal humerus fractures[J]. J OrthopTrauma, 2005, 19(10): 734-740.
[5] 樊嵘, 冯彦华, 王诗波, 等. 手术与非手术治疗老年肱骨近端复杂骨折疗效比较[J]. 中国修复重建外科杂志, 2012, 26(9): 1029-1032.
[6] Lanting B, MacDermid J, Drosdowech D, *et al*. Proximal humeral fractures: a systematic review of treatment modalities[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2008, 17(1): 42-54.

(**收稿**:2012-11-12;**修回**:2012-12-28)
(编辑 王 红)