DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.053
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

文章编号:1000-5404(2001)03-0361-03

论著

体外循环对血浆血栓调节蛋白、内皮素-1和一氧化氮的影响

陈力勇,葛衡江,刘怀琼 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所麻醉科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨体外循环(CPB)对血管内皮细胞(VEC)的损伤及血浆ET-1/NO平衡的影响。方法 40例心血管择期手术病人,在全麻中低温CPB下手术。分为先心病Ⅰ组(n=20)和心脏瓣膜病Ⅱ组(n=20)。于术前至术后3 d共7个点采血,测定血浆TM、ET-1和NO的变化。结果 两组病人血浆TM在CPB期间和术后1 d均显著增高(P<0.05和P<0.01),手术结束时达最高,Ⅰ组为(4.88±1.12)ng/ml,Ⅱ组为(8.34±1.84)ng/ml,于术后3 d恢复至术前水平(P>0.05);两组病人CPB后ET-1都非常显著增高(P<0.01),Ⅰ组手术结束时达最高为(129.04±22.29)pg/ml,Ⅱ组停CPB时达最高为(156.62±29.66)pg/ml,两组至3 d仍高于术前水平(P<0.05);而两组NO无显著变化(P>0.05)。结论 在心血管CPB手术中,CPB可导致机体急性全身性VEC损伤,这种损伤可持续24~48 h,大约72 h恢复;CPB可致血浆ET-1/NO平衡失调。

关键词:血管内皮细胞;血栓调节蛋;内皮素-1;一氧化氮;体外循环;心血管手术
中图法分类号:R331.1;R654.1 文献标识码:A

Effect of cardiopulmonary bypass on plasma thrombomodulin, endothelin-1 and nitric oxide levels *in vivo*

CHEN Li-yong, GE Heng-jiang, LIU Huai-qiong (Department of Anesthesiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of cardiopulmonary bypass (CPB) on vascular endothelial cell injury and plasma endothelin-1 and nitric oxide equilibrium in patients undergoing cardiovascular operation with CPB. Methods A total of 20 patients with congenital heart disease (Group Ⅰ) and 20 with valvular problem (group Ⅱ) were operated on under CPB respectively. Blood samples were collected from central vein before skin incision, before CPB, 30 min after CPB, at the end of CPB, and end of operation, the first morning and third morning after operation. The levels of plasma thrombomodulin(TM), endothelin-1(ET-1) and nitric oxide(NO) were measured. Results The plasma TM level was significantly elevated during CPB (P<0.01, P<0.05) and 1 d after operation, reached its peak as (4.88±1.12) ng/ml in Group Ⅰ and (8.34±1.84) ng/ml in group Ⅱ at the end of surgery and came back to the level as before operation. The plasma level of ET-1 was also increased significantly after CPB and reached peak as (129.04±22.29) in Group Ⅰ and (156.62±29.66) in Group Ⅱ at the end of operation. And the level was still higher than before operation in 2 groups 3 d after operation. No change was found on the level of NO in 2 groups. Conclusion CPB may cause extensive acute endothelial cells damage for about 24—48 h and recovered about 72 h and it may also cause an imbalance of ET-1 and NO.

Key words: vascular endothelial cell; thrombomodulin; endothelin-1; nitric oxide; cardiopulmonary bypass; cardiovascular operation

血管内皮细胞(Vascular endothelial cells VEC)不仅是机体的重要屏障和半透膜,而且还是重要的代谢和内分泌系统的细胞,具有重要而广泛的生物学功能。在心血管体外循环手术中,VEC的损伤/活化是急性血管痉挛、凝血功能失调、全身炎症反应和缺血-再灌注损伤的一个关键环节[1,2]。本实验通过对VEC损伤的标志物血浆血栓调节蛋白(Thrombomodulin, TM)、以及血浆内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)和一氧化氮(Nitric oxide, NO)的动态观察,探讨体外循环(Cardiopulmonary bypass, CPB)对VEC的损伤及ET-1/NO平衡的影响。

1 材料与方法

1.1 观察对象

40例心血管择期手术病人。分为2组:先天性心脏病组(Ⅰ组),20例,男9例、女11例,其中室间隔缺损修补术13例,房间隔缺损修补术7例,年龄(14.3±7.8)岁,体重(30.2±9.64)kg,心功能均为Ⅰ~Ⅱ级,CPB时间(60.5±20.4)min,升主动脉阻断时间(31.6±17.5)min。心脏瓣膜病组(Ⅱ组),20例,男10例、女10例,其中二尖瓣膜替换术15例,主动脉瓣替换术3例,二尖瓣和主动脉瓣联合替换术2例,心功能为Ⅰ~Ⅱ级13例、Ⅲ~Ⅳ7例,CPB时间(92.5±31.2)min,升主动脉阻断时间(60.8±27.3)min。在全麻中低温CPB下手术。

1.2 标本采集及处理

标本采集为:术前、转流前、转流后30 min、停转流、手术结束、术后1 d和术后3 d共7个点。采血2 ml经抗凝离心后,取血浆测TM、NO;血2 ml加入10%EDTA二钠30 μl和抑肽酶40 μl,离心后取血浆测ET-1。

1.3 TM浓度测定

TM试剂盒,用自动酶联免疫检测仪,通过酶联免疫吸附双抗体夹心法测定。

1.4 ET-1浓度测定

ET-1试剂盒,用γ放射免疫计数器测ET-1的含量。

1.5 NO含量测定

NO试剂盒,利用硝酸还原酶特异性将NO_3^-还原为NO_2^-,

作者简介:陈力勇(1962—),男,硕士,主治医师,讲师,主要从事心胸外科手术麻醉临床方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68757707
收稿日期:2000-09-15;修回日期:2001-02-06

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用分光光度计测定其浓度,间接反应血浆NO含量。

1.6 测定值校正

稀释后物质含量校正值＝实测值× 术前HCT/取样时HCT。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 TM的变化

两组变化趋势一致,CPB 30 min至术后1 d均增高,与术前相比CPB 30 min时有显著性差异($P<0.05$),停转流、手术结束和术后1 d有非常显著性差异($P<0.01$),但转流前无显著性差异($P>0.05$)。术后3 d恢复到术前水平。组间比较,Ⅱ组TM水平持续高于Ⅰ组,术前到术后1 d均差异非常显著($P<0.01$),术后3 d差异显著($P<0.05$),见表1。

2.2 ET-1的变化

两组CPB后ET-1都增高。Ⅰ组术前与CPB 30 min至术后1 d相比差异非常显著,与转流前相比差异不显著,与术后3 d相比差异显著。Ⅱ组术前与CPB 30 min至术后1 d相比差异非常显著,与转流前和术后3 d相比差异显著。Ⅱ组一直高于Ⅰ组。两组术前、转流前、术后1 d和术后3 d差异显著($P<0.05$),CPB 30 min和停CPB差异非常显著($P<0.01$),见表2。

表1 TM的变化(ρ_B/ ng·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of plasma TM(ρ_B/ ng·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

	n	Before operation	Pre-CPB	CPB for 30 min	End of CPB	End of operation	1 d after operation	3 d after operation
Ⅰ	20	2.59±0.48	2.63±0.39	3.14±0.77*	3.69±0.68**	4.88±1.12**	3.69±1.06**	2.78±0.75
Ⅱ	20	3.72±0.67##	3.68±0.84##	5.69±1.54*##	7.76±1.46**##	8.34±1.84**##	5.81±1.57**##	3.78±1.24#

* $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* before operation; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* Ⅰ

表2 ET-1的变化(ρ_B/ pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Chnages of plasma ET-1(ρ_B/ pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

	n	Before operation	Pre-CPB	CPB for 30 min	End of CPB	End of operation	1 d after operation	3 d after operation
Ⅰ	20	57.51±13.91	61.46±11.90	102.21±21.69**	116.34±24.37**	129.04±22.29**	97.13±24.57**	65.68±12.57*
Ⅱ	20	63.31±11.77#	69.64±15.67*#	134.17±23.60**##	156.62±29.66**##	144.60±28.24**#	109.51±20.92**#	74.73±21.16*#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* before operation; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* Ⅰ

2.3 血浆NO的变化

两组组内不同时相点数据虽然有升高或降低趋势,但 t 检验均无显著性差异。两组转流前和术后1 d相比差异显著($P<0.05$),其余时相点相比差异不显著($P>0.05$),见表3。

表3 血浆NO的变化(C_B/μmol·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Changes of plasma NO(C_B/μmol·L^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

	n	Before operation	Pre-CPB	CPB for 30 min	End of CPB	End of operation	1 d after operation	3 d after operation
Ⅰ	20	59.61±13.27	56.02±11.25	55.90±10.61	57.86±11.45	64.70±12.45	63.79±11.28	57.97±10.02
Ⅱ	20	62.18±9.46	61.41±8.25#	57.81±9.32	58.11±8.20	69.35±15.31	72.85±13.98#	65.45±13.01

#: $P<0.05$ *vs* Ⅰ

3 讨论

3.1 CPB对VEC的损伤

TM是细胞表面的凝血酶受体,本质为跨膜糖蛋白,主要表达于内皮细胞的膜表面,在血小板、单核细胞和中性白细胞上也有少量表达。Ishii[3]发现在体外,用白细胞介素-1或凝血酶激活VEC不能诱导TM释放,只有当细胞有形态学损伤时,TM才从VEC表面蛋白水解释放。在体内VEC损伤时,TM从VEC表面脱落入血引起血浆TM水平增加,血浆TM的浓度增加是VEC损伤的可靠标志物[4]。实验表明,CPB 30 min时TM水平增高,此后到术后1 d非常显著性升高,术后3 d才恢复至术前水平,两组病人变化趋势一致,这提示在CPB手术中,CPB可导致机体急性全身性VEC损伤/活化;在CPB停止后机体VEC可由于CPB启动的继发性损伤因素持续作用一段时间(24～48 h),大约72 h恢复。Ⅱ组病人CPB期间至术后1 d TM均高于Ⅰ组,提示Ⅱ组病人CPB所致的急性全身EC损伤的程度比Ⅰ组大,可能与Ⅱ组病人CPB时间和升主动脉阻断时间长相关。而Ⅱ组病人术前血浆TM就高于Ⅰ组,这与Ⅱ组病人心功能较差、长期瘀血和年龄因素相关。另外,VEC上的TM是维持血管表面抗凝特性的重要成分,VEC上TM的存在和蛋白C的完整性是凝血-纤溶之间平衡所必须的[5]。由于CPB致EC表面TM脱落释放入血,而伴随CPB增加的细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)、IL、脂多糖(PLS)又下调EC的TM表达,使EC膜表面TM数量减少,这可导致EC表面抗凝特性丧失。

3.2 CPB致VEC分泌内皮素-1和NO平衡失调

正常血管张力的维持有赖于血管收缩物质和血管舒张物质之间的平衡。生理状态下,ET-1主要由VEC合成和释放,其合成和释放很低,呈连续式释放,主要作用在于维持血管系统的基础张力。本实验结果显示:两组血浆ET-1水平在CPB期间及术后1 d非常显著增加($P<0.01$),至术后3 d还高于术前水平($P<0.05$),提示CPB可致VEC合成和分泌ET-1增加。Ⅱ

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

组比Ⅰ组血浆 ET-1 在术前、转流前、术后 1 d 和术后 3 d 显著性增高, CPB 30 min 和停 CPB 期间非常显著性增高, 血浆 TM 已提示Ⅱ组病人 CPB 所致的 VEC 损伤的程度比Ⅰ组大, Ⅱ组血浆 ET-1 一直高于Ⅰ组也反映了这一点。在心血管 CPB 手术中, 伴随着 CPB 的启动, 许多与 CPB 相关的因素如非搏动血流、缺血-再灌注、血凝血酶和内毒素水平增高以及炎症递质的大量表达, 均可导致全身 VEC 急性损伤/活化, 从而上调 VEC 的 ET-1 基因的表达, 使血浆 ET-1 水平增高[6]。EC 表达内皮细胞型 NO 合酶(eNOS), 其合成和释放的 NO 通过激活血管平滑肌细胞 GTP 转变为 cGMP, 发挥强有力的松弛血管效应。VEC 损伤/活化可下调 eNOS 的基因表达, 使 NO 合成减少[1]; 而 CPB 所致的炎症递质和内毒素可引起可诱导型 NO 合酶(iNOS)表达, 使 NO 的释放增加[7]。本实验结果显示: 两组病人 CPB 围术期血浆 NO 水平无明显变化。而Ⅱ组血浆 NO 除转流前和术后 1 d 比Ⅰ组显著性增高($P<0.05$)外, 其余时相点相比无显著性差异。其原因可能与 eNOS 表达下调和 iNOS 的激活程度不平衡相关。动物实验显示: 心肌缺血-再灌注对 VEC 的损伤, 减少 NO 的合成和释放, 并且增加 ET-1 合成和释放, 导致冠状血管的内皮细胞依赖舒缩功能之 ET-1/NO 平衡失调[8], 在再灌注过程中, 用 L-Arg 或 NO 供体能有效地减轻与缺血-再灌注相关的内皮细胞和心肌细胞损伤[9]。Beghetti[10]报道 CPB 导致病人呼出气体中 NO 水平下降, 这可能是继发于肺 VEC 损伤/活化导致 NO 合成下降所致。在心血管 CPB 手术中, 阻断升主动脉将不可避免出现心肌缺血-再灌注损伤, 推测在复跳后早期可能存在 EC 损伤所致的 NO 合成和分泌下降的情况。本实验在复跳后早期时相点也未见血浆 NO 水平下降。这可能表明血浆NO 水平可能不能准确反映心、肺器官NO 水平的变化。两组病人 CPB 围术期血浆 ET-1 和 NO 的变化趋势一致, 均表现为血浆 ET-1 增加而 NO 无明显变化, 这提示 CPB 可致 ET-1/NO 平衡失调。内皮细胞依赖舒缩血管物质和扩血管物质的比例失调可能是导致 CPB 术后早期急性血管痉挛的重要原因[6], 尤其在心脏可引起术后心肌细胞缺血, 导致心功能不全; 在肺可引起肺血管阻力增高, 导致肺动脉高压, 从而增加并发症和死亡率。因此, 在心血管 CPB 手术中, 采取保护内皮细胞的治疗措施具有重要的意义。

参考文献:

[1] Boyle E M Jr, Verrier E D, Spiess B D. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the procoagulant response[J]. Ann Thorac Surg, 1996, 62(5): 1 549—1 557.

[2] Boyle E M Jr, Pohlman T H, Johnon M C, *et al*. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflmmatory response[J]. Ann Thorac Surg, 1997, 63(1): 277—284.

[3] Ishii H, Uchiyama H, Kazama M. Soluble Thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells[J]. Thrombo Haemost, 1991, 65(6): 618—623.

[4] Takahashi H, Ito S, Hanano M, *et al*. Circulating thrombomodulin as a novel endothelial cell marker: comparison of its behavior with von Willebrand factor and tissue-type plasminogen activator[J]. Am J Hematol, 1992, 41(1): 32—39.

[5] Cicala C, Cirino G. Lingkage beyween inflammation and coagulation: an update on the molecular basis of the crosstalk[J]. Life Sciences, 1998, 62(20): 1 817—1 824.

[6] Sellke F W, Boyle E M Js, Verrier E D. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the pathophysiology of vasomotor dysfunction[J]. Ann Thorac Surg, 1996, 62(4): 1 222—1 228.

[7] Jansen N J, Van Oeveren W, Gu Y J, *et al*. Endotoxin release and tumor necrosis factor formation during cardopulmanary bypass[J]. Ann Thorac Surg, 1992, 54(4): 744—748.

[8] Argano V, Galinanes M, Edmondson S, *et al*. Effects of cardioplegia on vascular function and the "no reflow" phenomenon after ischemia and reperfusion: studies in the isolated blood perfused rat heart[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996, 111(2): 432—442.

[9] Zhar U, Schwalb H, Borman J B, *et al*. Cardioprotective effect of L-arginine in myocardial ischemia and reperfusion in an isolated working rat heart model[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 39(3): 321—329.

[10] Beghetti M, Silkoff P E, Caramori M, *et al*. Decreased exhaled nitric oxide may be a marker of cardiopulmonary bypass-induced injury[J]. Ann Thorac Surg, 1998, 66(2): 532—534.

(编辑　冯崇英)

(上接 360 页)

3　讨论

MTT 为线粒体脱氢酶的作用底物, 活细胞能将其还原为不溶于水的结晶体 formazon, 此结晶体在被 DMSO 溶解后呈紫色, 在 540 nm 处有最大吸收峰, 通过 A_{540} 可以定量反应出存活细胞数[2]。本实验显示在 X 射线照射剂量低于 6 Gy 时, MTT 法和克隆计数法所测细胞存活分数无显著性差别, 说明二者在一定范围内可以相互替代; 在 10 Gy 时 MTT 法所测结果偏高, 可能与 MTT 法的敏感程度有关。本实验结果提示, 当受试组吸光值极低时($A_{540}<0.15$), 不易准确测出更低的吸光值, 从而表现出较大误差(结果未示)。由于 2 Gy 照射时的细胞存在分数通常代表细胞的内在放射敏感性[3], 我们认为, MTT 法可用于细胞放射敏感性检测, 而且具有方便、迅速、重复性好等优点, 此外, 我们按文献[1]所推荐方法, 先在 96 孔板中培养数天后进行 X 线照射, 然后再继续培养 5 d 后进 MTT 检测, 不如本实验步骤所得结果准确。

关键词: 放射敏感性; MTT 法; 克隆计数法
中图法分类号: R446; R814.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安分公司, 1996. 148—149.

[2] 王仁生, 解荷芝, 金一尊. 用 MTT 法研究两种放射增敏剂对细胞的毒性作用[J]. 上海医科大学学报, 1997, 24(2): 135—136.

[3] Lambin P, Malaise E P, Joiner M C. Might intrinsic radioresistance of human tumor cells be induced by radiation[J]? Int J Radiat Biol, 1996, 69(3): 279—290.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net