

基础与实验研究

探讨组蛋白乙酰化酶对心脏发育基因 NKX2.5 的动态调控作用

彭昌, 罗孝美, 谢新星, 刘颖, 马一翔, 田杰

摘要

目的: 探讨小鼠心脏发育过程中组蛋白乙酰化酶 p300 和 p300/CBP 辅助因子 (PCAF) 对心脏发育基因 NKX2.5 的动态调控作用, 为进一步明确心脏发育的调控机制提供新的理论基础。

方法: 收集胚胎 14.5 d、16.5 d 及新生 0.5 d 和 7 d 的正常 C57BL/6 小鼠心脏, 实验分为 4 组: 胚胎 14.5 d 组 ($n=10$)、胚胎 16.5 d 组 ($n=10$)、新生 0.5 d 组 ($n=5$)、新生 7 d 组 ($n=3$)。采用染色质免疫共沉淀技术, 运用抗 p300、PCAF、组蛋白 H3K9ac 抗体沉淀与其相结合的脱氧核糖核酸 (DNA) 片段, 实时荧光定量聚合酶链反应扩增抗体所富集的 DNA 片段来检测 NKX2.5 启动子区域 p300 和 PCAF 结合水平及 H3K9ac 乙酰化水平。此外, 运用逆转录聚合酶链反应检测 NKX2.5 基因信使核糖核酸 (mRNA) 表达水平。

结果: p300 和 PCAF 结合水平在心脏发育的不同阶段均具有时序性: p300 的结合水平在胚胎 16.5 d 组 (0.063 ± 0.021)、新生 0.5 d 组 (0.019 ± 0.008)、新生 7 d 组 (0.011 ± 0.003) 均低于胚胎 14.5 d 组 (0.231 ± 0.033), 且新生 0.5 d 组和新生 7 d 组均低于胚胎 16.5 d 组, 差异均有统计学意义 (P 均 <0.05); PCAF 结合水平在胚胎 16.5 d 组 (0.063 ± 0.021)、新生 0.5 d 组 (0.019 ± 0.008)、新生 7 d 组 (0.011 ± 0.003) 均低于胚胎 14.5 d 组 (0.185 ± 0.023), 差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。H3K9ac 乙酰化水平及 NKX2.5 基因 mRNA 表达水平在心脏发育的不同阶段均具有时序性: H3K9ac 乙酰化水平在胚胎 16.5 d 组 (0.098 ± 0.014)、新生 0.5 d 组 (0.074 ± 0.010)、新生 7 d 组 (0.045 ± 0.014) 均低于胚胎 14.5 d 组 (0.119 ± 0.020), 且新生 7 d 组低于胚胎 16.5 d 组, 差异均有统计学意义 (P 均 <0.05); NKX2.5 基因 mRNA 表达水平在胚胎 16.5 d 组 (0.701 ± 0.181)、新生 0.5 d 组 (0.502 ± 0.159)、新生 7 d 组 (0.529 ± 0.131) 均低于胚胎 14.5 d 组 (1.000 ± 0.130), 差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。

结论: 组蛋白乙酰化酶 p300 和 PCAF 动态调控 NKX2.5 启动子区域 H3K9ac 乙酰化水平, 且在小鼠心脏发育过程中 NKX2.5 mRNA 呈现动态表达。

关键词 组蛋白乙酰化酶; 心脏发育; 表观遗传学; 动态调控

Dynamic Regulation of Histone Acetylase on Cardiac Development Gene NKX2.5 During Cardio-genesis in Fetal Mice

PENG Chang, LUO Xiao-mei, XIE Xin-xing, LIU Ying, MA Yi-xiang, TIAN Jie.

Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi (563000), Guizhou, China

Corresponding Author: PENG Chang, Email: pengchang_2006@126.com

Abstract

Objective: To explore the dynamic regulation of histone acetylases p300 and p300/CBP associated factor (PCAF) on cardiac development gene NKX2.5 during cardio-genesis and to provide the new theoretical basis to clarify the regulatory mechanism for cardio-genesis in fetal mice.

Methods: Our research included 4 groups of cardiac tissues: Embryo (EB) 14.5 days group, $n=10$, EB 16.5 days group, $n=10$ and Neonatal 0.5 day group, $n=5$, Neonatal 7 days group, $n=3$. Immunoprecipitation was performed in myocardial tissues using anti-p300, anti-PCAF and anti-H3K9ac antibodies to retrieve p300, PCAF and H3K9ac binding DNA, the specific DNA sequences were amplified by real-time PCR to detect and the binding levels of p300, PCAF and the acetylation level of H3K9ac

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81270234); 重庆市科委重点实验室专项经费资助项目

作者单位: 563000 贵州省遵义市, 遵义医学院附属医院 儿内科 (彭昌、谢新星、刘颖、马一翔); 遵义医学院生理学教研室 (罗孝美); 重庆医科大学附属儿童医院 (田杰)

作者简介: 彭昌 副主任医师 博士 研究方向: 心脏发育及心血管疾病 Email: pengchang_2006@126.com 通讯作者: 彭昌

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614 (2015) 10-1008-05 doi:10.3969/j.issn.1000-3614.2015.10.020

in NKX2.5 promoter sequence. In addition, the mRNA expression of NKX2.5 was examined by RT-PCR.

Results: The binding levels of p300 and PCAF had the timing consequence at different stage of cardio-genesis. The binding level of p300 in EB 16.5 days group (0.063 ± 0.021), Neonatal 0.5 day group (0.019 ± 0.008), Neonatal 7 days group (0.011 ± 0.003) were all lower than that in EB 14.5 days group (0.231 ± 0.033), and in Neonatal 0.5 day group and Neonatal 7 days group were lower than EB 16.5 days group, all $P < 0.05$. The binding level of PCAF in EB 16.5 days group (0.063 ± 0.021), Neonatal 0.5 day group (0.019 ± 0.008), Neonatal 7 days group (0.011 ± 0.003) were all lower than that in EB 14.5 days group (0.185 ± 0.023), all $P < 0.05$. The H3K9ac acetylation level and NKX2.5 mRNA expression level had the timing consequence at different stage of cardio-genesis. H3K9ac acetylation level in EB 16.5 days group (0.098 ± 0.014), Neonatal 0.5 day group (0.074 ± 0.010), Neonatal 7 days group (0.045 ± 0.014) were all lower than that in EB 14.5 days group (0.119 ± 0.020), and in Neonatal 7 days group was lower than EB 16.5 days group, all $P < 0.05$. The NKX2.5 mRNA expression level in EB 16.5 days group (0.701 ± 0.181), Neonatal 0.5 day group (0.502 ± 0.159), Neonatal 7 days group (0.529 ± 0.13) were all lower than that in EB 14.5 days group (1.000 ± 0.130), all $P < 0.05$.

Conclusion: Histone acetylases p300 and PCAF may dynamically regulate H3K9ac acetylation in NKX2.5 promoter sequence, and the mRNA of NKX2.5 was dynamically expressed during cardio-genesis in experimental fetal mice.

Key words Histone acetylase; Cardio-development; Epigenetics; Dynamic regulation

(Chinese Circulation Journal, 2015,30:1008.)

先天性心脏病是我国人口出生缺陷的首位原因,严重影响着我国人口的总体健康水平^[1,2]。心脏发育是一个及其复杂而精细的过程,受到遗传和环境的双重影响,任何微小的变化均会导致心脏发育异常^[3]。因此,深入探讨心脏发育过程中的关键调控因素,能更好地为防治先天性心脏病提供新的干预措施。现已明确心脏发育基因 NKX2.5 与先天性心脏病关系十分密切^[4]。本研究通过探讨心脏发育基因 NKX2.5 在心脏发育过程中几个关键时间点表达水平的变化,同时从表观遗传学的全新角度探讨组蛋白乙酰化酶 p300 和 p300/CBP 辅助因子(PCAF)对 NKX2.5 基因表达的调控作用,为进一步揭示心脏发育的调控机制提供新的证据。

1 材料与方法

实验动物:健康成年无特定病原体级 C57BL/6 小鼠由重庆医科大学动物中心提供(2013-08-17),按雌:雄 = 2:1 比例合笼交配,次晨发现阴栓的雌鼠胎龄计为 0.5 d,计算孕鼠妊娠天数。

分组及心脏标本制备:实验分为 4 组:胚胎 14.5 d 组、胚胎 16.5 d 组、新生 0.5 d 组、新生 7 d 组。胚胎 14.5 d 组和胚胎 16.5 d 组每组各取 10 只胎鼠心脏(约 30 mg 心脏组织)为一个样品量,新生 0.5 d 组取 5 只新生鼠心脏(约 30 mg 心脏组织)为一个样品量,新生 7 d 组取 3 只新生鼠心脏(约 30 mg 心脏组织)为一个样品量。心脏标本制备:分

别取胚胎 14.5 d 和胚胎 16.5 d 的孕鼠,二氧化碳麻醉处死,75%酒精消毒皮肤并剖腹,从孕鼠子宫分离胚胎,预冷 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(磷酸氢二钠和磷酸二氢钠配置, pH 7.4)冲洗后,在解剖显微镜下小心剖开胎鼠胸腔,分离心脏。取新生 0.5 d 和 7 d 小鼠,按上述方法分离心脏。将完整的心脏放入预冷磷酸缓冲液中清洗后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

主要试剂及仪器:染色质免疫共沉淀(ChIP)试剂盒(Merck Millipore,德国),ChIP 级抗 p300 抗体、抗 PCAF 抗体、抗 H3K9ac 抗体(abcam,英国),核糖核酸(RNA)提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),SYB GREEN 荧光定量聚合酶链反应试剂盒(北京天根生物技术有限公司),逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司),超声破碎仪(Diagenode,比利时),实时荧光定量多聚酶链反应(Real-Time PCR)仪(Bio-Rad,CFX96,美国)。

染色质免疫共沉淀:分别取胚胎 14.5 d、胚胎 16.5 d、新生 0.5 d、新生 7 d 小鼠心脏组织各 30 mg,预冷磷酸缓冲液清洗后加入终浓度为 1% 的甲醛交联。超声切割 DNA 至 200~1000 bp 之间。分别加入 ChIP 级抗 p300、PCAF、H3K9ac 抗体 4 °C 摇床过夜沉淀脱氧核糖核酸(DNA)和蛋白质复合物,65 °C 水浴逆转交联 6~8 h,纯化和回收 DNA 片段。用核酸蛋白测定仪测定 A260 nm/A280 nm 比值,以确定 ChIP 产物 DNA 的纯度和浓度,于 -20 °C 保存备用。

ChIP-Real-Time PCR 引物序列和退火温

度: 选取 NKX2.5 基因外显子 5' 端前 1000 bp 序列, 设计特异性引物。引物用 Primer Premier 5.0 软件设计, 由大连宝生物公司合成。将 NKX2.5 基因产物进行梯度稀释, 运用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪扩增, 做出标准曲线, 得到 R² 值和扩增效率。引物序列: NKX2.5 (F) 5'-AGGATGGATTGAAAGCCAGAAGA-3', NKX2.5 (R) 5'-CTTTGAGTGTGTCTGGCTGGGA-3', 产物大小: 153 bp。反应条件: 预变性: 95℃ 3 min, 变性: 95℃ 5 s, 退火: 59℃ 15 s, 延伸: 68℃ 20 s, 45 个循环。数据用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪自带基于 pfafl 原理的相对定量数据分析软件分析。将各组样品加入抗 p300、PCAF、H3K9ac 抗体沉淀的 DNA 用针对 NKX2.5 基因启动子区域设计的引物扩增后的数值与超声切割后未加抗体的 DNA 样品(即 Input 对照)用上述引物扩增后的数值的比值即分别表示 p300、PCAF 在 NKX2.5 基因启动子区域的结合水平及组蛋白 H3K9ac 的乙酰化水平。

RNA 的提取及逆转录: 选取胎鼠及新生鼠的心脏组织, 运用总 RNA 提取试剂盒提取心脏组织的总 RNA, 将提取的 RNA 运用逆转录试剂盒逆转录为互补脱氧核糖核酸(cDNA)来检测小鼠心脏核心转录因子 NKX2.5 的信使核糖核酸(mRNA)表达水平。RNA 提取及逆转录均严格按照试剂盒操作说明进行, 逆转录后的 cDNA 放入 -20℃ 保存备用。

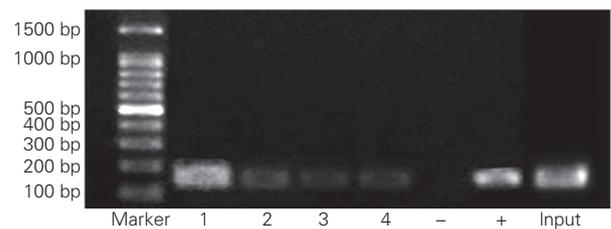
Real-Time PCR 引物序列和退火温度: 针对 NKX2.5 基因 CDS 核心编码区设计特异性引物, 引物用 Primer Premier 5.0 软件设计, 由大连宝生物公司合成。将 NKX2.5 基因产物进行梯度稀释, 运用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪扩增, 做出标准曲线, 得到 R² 值和扩增效率。引物序列: NKX2.5 (F) 5'-CTCACACCCACGCCTTCTC-3', NKX2.5 (R) 5'-AGTAG GCCTCGGGCTTGAAG-3', 产物大小: 148 bp。反应条件: 预变性: 95℃ 30 s, 变性: 95℃ 5 s, 退火延伸: 59℃ 30 s, 39 个循环。选取 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参。引物序列: β-actin (F) 5'-CCTTTATCGGTATGGAGTCTGCG-3', β-actin (R) 5'-CCTGACATGACGTTGTTGGCA-3', 产物大小: 104 bp。反应条件: 预变性: 95℃ 30 s, 变性: 95℃ 5 s, 退火延伸: 59℃ 30 s, 39 个循环。数据用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪自带基于 pfafl 原理的相对定量数据分析软件分析。

统计学处理: 应用 SPSS 19.0 统计软件进行统

计学分析。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较进行单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

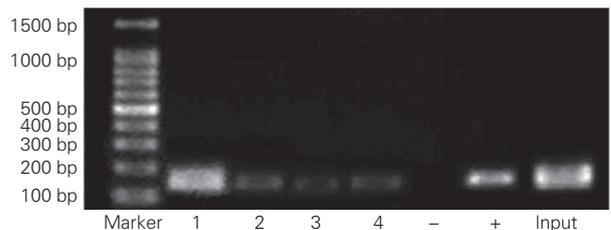
2 结果

组蛋白乙酰化酶 p300 和 PCAF 对 NKX2.5 基因启动子区域的动态调控(图 1、2, 表 1): p300 和 PCAF 结合水平在心脏发育的不同阶段均具有时序性。PCAF 结合水平在胚胎 16.5 d 组、新生 0.5 d 组、新生 7 d 组均低于胚胎 14.5 d 组, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。p300 的结合水平在胚胎 16.5 d 组、新生 0.5 d 组、新生 7 d 组均低于胚胎 14.5 d 组(P 均 < 0.05), 且新生 0.5 d 组和新生 7 d 组低于胚胎 16.5 d 组, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。



注: 1: 胚胎 14.5 d 组 (n=10); 2: 胚胎 16.5 d 组 (n=10); 3: 新生 0.5 d 组 (n=5), 4: 新生 7 d 组 (n=3); -: 阴性对照(正常鼠 IgG 免疫沉淀后的 DNA 片段扩增); +: 阳性对照(RNA 多聚酶 II 免疫沉淀后的 DNA 片段扩增); Input: 超声切割后未加抗体的 DNA 片段扩增

图 1 四组胎鼠心脏组织 p300 结合水平电泳图



注: 同图 1

图 2 四组胎鼠心脏组织 p300/CBP 辅助因子结合水平电泳图

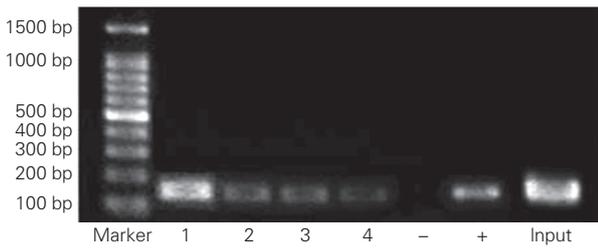
表 1 四组胎鼠心脏组织 p300、PCAF 结合水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	胚胎 14.5 d 组 (n=10)	胚胎 16.5 d 组 (n=10)	新生 0.5 d 组 (n=5)	新生 7 d 组 (n=3)
p300 结合水平	0.231 ± 0.033	0.063 ± 0.021*	0.019 ± 0.008* [△]	0.011 ± 0.003 [△]
PCAF 结合水平	0.185 ± 0.023	0.063 ± 0.021*	0.019 ± 0.008*	0.011 ± 0.003*

注: PCAF: p300/CBP 辅助因子。与胚胎 14.5 d 组比 * $P < 0.05$; 与胚胎 16.5 d 组比[△] $P < 0.05$

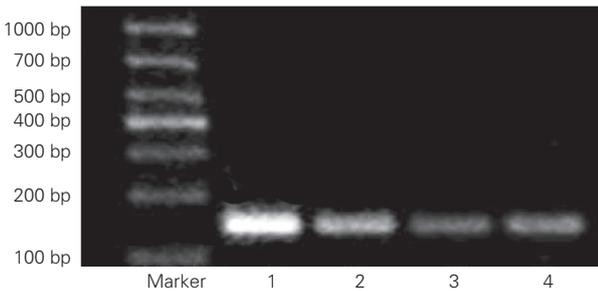
NKX2.5 基因启动子区域的 H3K9ac 乙酰化水平及 NKX2.5 基因 mRNA 表达水平(图 3、4, 表 2):

H3K9ac 乙酰化水平及 NKX2.5 基因 mRNA 表达水平在心脏发育的不同阶段均具有时序性。H3K9ac 乙酰化水平在胚胎 16.5 d 组、新生 0.5 d 组、新生 7 d 组均低于胚胎 14.5 d 组 (P 均 <0.05), 且新生 7 d 组低于胚胎 16.5 d 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。NKX2.5 基因 mRNA 表达水平在胚胎 16.5 d 组、新生 0.5 d 组、新生 7 d 组均低于胚胎 14.5 d 组, 差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。



注: 同图 1

图 3 四组胎鼠心脏组织 H3K9ac 乙酰化水平电泳图



注: 同图 1

图 4 四组胎鼠心脏组织 NKX2.5 基因信使核糖核酸表达水平电泳图

表 2 四组胎鼠心脏组织 H3K9ac 乙酰化水平及 NKX2.5 基因 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	胚胎 14.5 d 组 (n=10)	胚胎 16.5 d 组 (n=10)	新生 0.5 d 组 (n=5)	新生 7 d 组 (n=3)
H3K9ac 乙酰化水平	0.119 ± 0.020	0.098 ± 0.014 [*]	0.074 ± 0.010 [*]	0.045 ± 0.014 [△]
NKX2.5 基因 mRNA 表达水平	1.000 ± 0.130	0.701 ± 0.181 [*]	0.502 ± 0.159 [*]	0.529 ± 0.131 [*]

注: mRNA: 信使核糖核酸。与胚胎 14.5 d 组比^{*} $P<0.05$; 与胚胎 16.5 d 组比[△] $P<0.05$

3 讨论

先天性心脏病是人类出生缺陷的首位原因, 我国每年有近 15 万的先天性心脏病患儿出生, 随着女性对酒精、毒品、烟叶等物质滥用的增加, 该病的发病率还在逐年上升, 严重影响了儿童健康。心脏发育基因的顺序激活与正常表达是构建完美心脏的生物学基础。遗传和环境以及二者的相互作用都参与了心脏发育的调控, 任何微小的变化都可能会导

致心脏发育异常^[5]。但人类对正常心脏结构发育的相关调控因素仍知之甚少。因此, 深入探讨心脏的发育规律及其相关调控因素具有十分重要的意义。心脏的发育除受到遗传的影响, 还受到表观遗传的调控, 表观遗传调控主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰(乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等)。研究发现, 心脏发育基因 GATA4 转录后受到组蛋白乙酰化、甲基化及磷酸化等共价修饰^[6]。我们前期研究已证实心脏发育基因 GATA4 和 MEF2C 受到组蛋白乙酰化调控^[7, 8]。研究发现 NKX2.5 等位基因低表达出现右室双出口畸形, 该基因完全缺失则会出现流出道狭窄^[9, 10], 该基因突变与先天性房间隔缺损关系密切^[11, 12]。由此可知该基因在心脏发育过程中具有重要作用。研究证实心脏发育基因 NKX2.5 的共价修饰受到组蛋白乙酰化调控^[13]。但哪些组蛋白乙酰化酶参与了调控该基因的表达以及该基因在心脏发育中的表达规律目前仍不十分清楚。

组蛋白乙酰化酶 p300 和 PCAF 作为翻译后修饰的关键酶被看作是基因表达的激活子或沉默子^[14]。基因的转录活化状态通常与其启动子区域组蛋白乙酰化水平息息相关, 组蛋白乙酰化酶可以通过调控相关基因启动子区域组蛋白乙酰化水平来开启或沉默基因表达。小鼠心脏发育过程与人类心脏发育及其相似。因此, 本研究选取正常 C57BL/6 小鼠心脏发育的几个关键时期作为研究时间点, 来探讨小鼠心脏发育过程中心脏发育基因 NKX2.5 乙酰化修饰是否受到组蛋白乙酰化酶 p300 和 PCAF 的调控以及这些组蛋白乙酰化酶的调控是否具有了一定的时序性, 同时分析 NKX2.5 基因启动子区域组蛋白 H3K9ac 乙酰化水平及其 mRNA 表达水平的变化规律, 从表观遗传学的全新角度探讨心脏发育基因 NKX2.5 表达的组蛋白乙酰化调控作用, 为进一步揭示表观遗传修饰在心脏发育异常中的作用以及为早期防治先天性心脏病提供新的理论依据。

实验结果发现小鼠心脏发育的几个关键时间点 NKX2.5 基因的组蛋白乙酰化修饰水平均不相同, 乙酰化水平高丰度表达是在胚胎 14.5 d, 随着心脏发育成熟, 乙酰化状态逐渐下调, 至出生时呈现明显低表达, 出生前后 NKX2.5 基因启动子区域组蛋白 H3K9ac 乙酰化水平具有显著差异。这提示分娩应激可能会对胎鼠心脏发育基因 NKX2.5 组蛋白乙酰化修饰状态产生重要影响。此外, 本研究还

进一步揭示表观遗传修饰在心脏发育异常中的作用以及为早期防治先天性心脏病提供新的理论依据。

发现, NKX2.5 基因 mRNA 表达水平在心脏发育早期呈高丰度表达, 随着心脏发育成熟逐渐降低, 且与组蛋白 H3K9ac 乙酰化水平变化趋势基本一致, 表明组蛋白 H3K9ac 的乙酰化修饰状态可能是影响 NKX2.5 基因表达水平的关键因素之一, 与相关报道相一致^[15]。但是多种组蛋白乙酰化酶均可能参与其乙酰化修饰, 因此, 进一步明确哪些组蛋白乙酰化酶参与 NKX2.5 基因启动子区域的乙酰化修饰将更有利于为该基因组蛋白乙酰化调控提供精确的干预靶点。心脏表达的组蛋白乙酰化酶主要包括 p300、PCAF、SRC1、CBP、GCN5 等^[16]。这些组蛋白乙酰化酶均参与了胚胎发育和其他一些疾病的病理生理过程。如 p300 作为一个激活子可以活化 GATA4 基因的表达。但哪些组蛋白乙酰化酶参与了 NKX2.5 基因的组蛋白乙酰化修饰仍不十分清楚。因此, 本研究运用染色质免疫共沉淀来探讨组蛋白乙酰化酶 p300 和 PCAF 对心脏发育基因 NKX2.5 启动子区域组蛋白乙酰化修饰的调控作用, 同时明确 p300 和 PCAF 调控是否也具有动态修饰规律。实验结果表明组蛋白乙酰化酶 p300 和 PCAF 均参与了 NKX2.5 基因启动子区域组蛋白乙酰化修饰, 且修饰水平具有一定的时序性。在小鼠心脏发育胚胎 14.5 d, p300 和 PCAF 在 NKX2.5 基因启动子区域表达量较多, 且随着心脏发育成熟, 其表达量逐渐降低, 至出生后维持低表达。重要的是 p300 和 PCAF 在 NKX2.5 基因启动子区域表达量的变化趋势与组蛋白 H3K9ac 乙酰化水平基本相一致。这提示组蛋白乙酰化酶 p300 和 PCAF 是介导心脏发育基因 NKX2.5 表达的关键调控因子之一。但是 p300 和 PCAF 之间是否具有协同作用以及是否还有其他相关因素参与调控 NKX2.5 的表达仍需进一步研究证实。

总之, 心脏发育相关基因的表达具有一定的时空性。因此, 全面了解心脏发育相关基因在心脏发育不同时期的表达规律及其具体调控机制, 才能从真正意义上实现对先天性心脏病的防治, 减少该病的发生。同时也为进一步的基因治疗先天性心脏病提供全新思路。

参考文献

- [1] van der Linde D, Konings EE, Slager MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58: 2241-2247.
- [2] He Y, Wang J, Gu X, et al. Application of spatio-temporal image correlation technology in the diagnosis of fetal cardiac abnormalities. *Exp Ther Med*, 2013, 5: 1637-1642.
- [3] Huang JB, Liu YL, Sun PW, et al. Molecular mechanisms of congenital heart disease. *Cardiovasc Pathol*, 2010, 19: e183-193.
- [4] 李金, 唐燕华. NKX2-5 与先天性心脏病发病关系的研究进展. *中国循环杂志*, 2014, 29: 1061-1063.
- [5] Vecoli C, Pulignani S, Foffa I, et al. Congenital heart disease: the crossroads of genetics, epigenetics and environment. *Curr Genomics*, 2014, 15: 390-399.
- [6] 俞立玮, 桂永浩. Gata4 转录后蛋白共价修饰. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14: 800-803.
- [7] Peng C, Zhu J, Sun HC, et al. Inhibition of Histone H3K9 Acetylation by Anacardic Acid Can Correct the Over-Expression of Gata4 in the Hearts of Fetal Mice Exposed to Alcohol during Pregnancy. *PLoS ONE*, 2014, 9: e104135.
- [8] 彭昌, 张维华, 潘博, 等. 组蛋白乙酰化酶对心脏发育核心转录因子 Mef2c 的动态调控作用. *中国当代儿科杂志*, 2014, 16: 418-423.
- [9] Qin X, Xing Q, Ma L, et al. Genetic analysis of an enhancer of the NKX2-5 gene in ventricular septal defects. *Gene*, 2012, 508: 106-109.
- [10] Granados-Riveron JT, Pope M, Bu'lock FA, et al. Combined mutation screening of NKX2-5, GATA4, and TBX5 in congenital heart disease: multiple heterozygosity and novel mutations. *Congenit Heart Dis*, 2012, 7: 151-159.
- [11] Amodio V, Tevy MF, Traina C, et al. Transactivation in *Drosophila* of human enhancers by human transcription factors involved in congenital heart diseases. *Dev Dyn*, 2012, 241: 190-199.
- [12] 韩增强, 唐胤, 陈彧, 等. 81 例单纯性先天性心脏病患者 NKX2.5 基因突变筛查及关联研究. *中国循环杂志*, 2011, 26: 461-464.
- [13] Pan B, Zhu J, Lv T, et al. Alcohol consumption during gestation causes histone3 lysine9 hyperacetylation and an alternation of expression of heart development-related genes in mice. *Alcohol Clin Exp Res*, 2014, 38: 2396-2402.
- [14] Sadoul K, Boyault C, Pabion M, et al. Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie*, 2008, 90: 306-312.
- [15] 杨雪芳, 田杰, 陈国珍, 等. 小鼠胚胎心脏发育过程中组蛋白乙酰化酶亚型 p300 调控心脏特异转录因子的动态表达. *重庆医科大学学报*, 2010, 35: 961-965.
- [16] Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, 2007, 26: 5310-5318.

(收稿日期: 2015-01-24)

(编辑: 王宝茹)

难忘病例

谈医学生涯中部分难忘病例(四十九)

陈在嘉

病例 91 急性前壁、下壁心肌梗死, 散步时发病, 起病即为心室颤动

患者, 男性, 52 岁。患者于 1984-03-30 与老伴推着孙女小年在马路旁散步, 约 3:30 pm 突然从左侧摔倒, 无抽搐、大小便失禁, 当时脸色紫绀, 呼唤不应。发现无呼吸, 正值一辆空的急救车路过, 即召唤停下, 旁边有一公共汽车站有几个小伙子在候车, 主动协助将患者抬上急救车。呼吸、心跳完全停止, 在车上医生一直行胸外心脏按压。约 7 分钟到达我院急诊室, 为 3:40 pm。

到达时无呼吸、心跳。血压测不到, 心电图是一直线。立即心外按压, 随即出现心室颤动。置入气管插管, 接好麻醉剂呼吸。立即非同步直流电除颤。从 3:40 pm 至 3:58 pm, 用 300~350 瓦秒, 共除颤 7 次。同时予用去甲肾上腺素 0.5 mg, 肾上腺素 1 mg, 阿托品 0.5 mg 和去甲肾上腺素; 异丙基肾上腺素、阿托品心内注射各 1 次, 溴苄胺 250 mg 心内注射 1 次, 利多卡因 50 mg, 4.2% 碳酸氢钠 100 ml 静脉推注, 利多卡因静脉点滴维持。4:07 pm 恢复自主呼吸, 脉搏 104 次/min, 呼吸 21 次/min, 但血压测不到。心电图示多源性室性心动过速, 持续利多卡因静脉点滴。静脉予用可拉明 0.375 两次, 多巴胺 20 mg 加入滴器小壶, 并静滴维持。4:35 pm 恢复窦性心律, 血压升至 80/70 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)。5:07 pm 心电图示频发室性早搏呈二联律, 后又转为多源性室性心动过速, 经 3 次静脉推注利多卡因 50 mg, 使心律转为窦性节律, 血压上升至 180~190/110~120 mmHg。将多巴胺稀释, 血压降至 120~130/84~90 mmHg, 升压药不能停, 滴器小壶内间断加参脉液, 维持血压正常。血气分析: pH 7.372, PaCO₂ 30.4 mmHg, PaO₂ 306.5 mmHg, HCO₃⁻ 8.9 meq/L, BE -6.8 meq/L, SO₂ 98.8%。(麻醉机吸氧时), 呈代谢性酸中毒, 继续根据血气分析结果给碳酸氢钠。白细胞 16.20 × 10⁹/L, 中性粒细胞 82%, 予以

抗生素预防感染。急诊查心电图 V₂₋₄ 导联 ST 段抬高, II、III、aVF 导联深 Q 波, 为急性前壁、下壁心肌梗死。患者仍处于昏迷状态, 因脑缺血时间过长, 一阵阵躁动。当夜一直在急诊室抢救。患者的侄子是著名的相声演员, 夜间在旁陪伴, 见医护人员救死扶伤很是辛苦, 感叹说:“我原拟写讽刺医护人员的段子, 现在看法改变了, 要写颂扬的作品”。患者出院后他写了颂扬医护人员的文章刊载于北京晚报上, 此是后话。

于 1984-03-31 10:00 am 收入冠心病监护病房。

既往吸烟史 25 年, 20 支/d, 饮酒多年, 每次 1~2 两, 每周 2~3 次。否认高血压, 糖尿病。3 年前患“气管炎, 肺气肿”。近 3~4 年来劳累后出现胸前区闷痛, 持续十余分钟, 间断含服硝酸甘油。曾诊为“冠状动脉供血不足”。

入病房查体: 仍处于朦胧状态, 唤之有反应。体温 38℃, 心律齐, 心率 90 次/min, 无器质性杂音。两肺呼吸音粗, 未闻湿性啰音, 生理反射存在。4:45 pm 插入 Swan Ganz 漂浮导管, 观察肺动脉舒张压, 心排血量, 以便调节液体输入量。7:00 pm 神志清楚, 但有时答非所问。自主呼吸平稳, 血压 100/80 mmHg, 心率 85 次/min, 拔出气管插管, 肺部无干湿啰音。

实验室检查: 血常规: 血红蛋白 116 g/L, 红细胞 3.78 × 10¹²/L, 白细胞 11.80 × 10⁹/L, 中性粒细胞 79%, 淋巴细胞 21%。尿常规: 蛋白(±), 糖(-), 白细胞 6~7/hp, 红细胞 0~2/hp。便常规正常。血天冬氨酸转氨酶 391 μg 丙酮酸/ml, 谷丙酸转氨酶 472 μg 丙酮酸/ml, 肝炎伴随抗原(-), 血 K⁺ 4.1 mmol/L, Na⁺ 144.0 mmol/L, CL⁻ 103.4 mmol/L。血糖 5.55 mmol/L, 总胆固醇 5.75 mmol/L, 尿素氮 7.91 mmol/L, 二氧化碳结合力 34.61 mmol/L。

入院后第 2 天开始用肝素 1 周, 后改用华法林抗凝。抗菌药物预防感染, 盐酸美西律片预防心律

失常。因有时有室性早搏，换用胺碘酮，室性早搏消失，血压、心律、呼吸平稳。一直予用细胞色素 C，辅酶 A，三磷酸腺苷，吡拉西坦片，维生素 B、维生素 C 等药，情况日见好转。一周转普通病区，两周时除记忆力稍差外神智已接近正常。

6 周查 X 线心脏相：肺纹理大致正常，主动脉结较宽，心腰平直，各房室不大，心胸比率 0.49，记波无异常。超声心动图：主动脉及左房径略偏宽，室间隔厚度在正常上限至轻度增厚，左室下壁运动弱，回声偏强，余无发现。左心室功能检查（ ^{113}m In-输铁蛋白）：静态左心射血分数为 0.61，在正常范围。心电图 II、III、aVF 导联 Q 波仍较深，ST 段回等电位线，T 波低平。V₁ 为 QS 型，V₂ 呈 rS 型，V₃₋₄ 均为 RS 型，ST 回等电位线，T 波由倒置回到低平，符合急性心肌梗死衍变。

患者无不适，血压 110/70 mmHg，心律齐，心率 70~80 次/分。肺清朗，下肢不肿。于 1984-06-02 出院带药，硝苯地平 5 mg Tid，胺碘酮 0.1 Bid。

出院后情况好，一直服用硝酸异山梨酯、硝苯地平、盐酸美西律片、复方丹参。1988-05-21 出差去山西途中，旅途辛劳及开会紧张，为预防心绞痛发作，自含硝酸甘油 2 片，几秒钟感头晕，随即意识丧失，半分钟自行恢复，当地医生检查未发现异常，10 天后回京在我院检查为急性心内膜下壁梗死（第 2 次梗死），无并发症，住院 18 天后出院。除原用的药外加服阿司匹林和抗栓丸，出院后情况平稳。1991-09-22 因劳累后胸痛频繁发作，2~3 次/d，最长持续半小时，休息亦可发作。1984-09-28 上午

骑车两站路，背痛呈压榨样，伴出汗，含硝酸甘油 3 次方缓解。下午疼痛持续始来本院急诊。1991-09-29 入院诊断急性前壁心内膜下梗死（第 3 次梗死），住院 22 天出院。服药同上次出院。1991-11-18 夜间睡眠中突然憋醒，呼吸困难，伴大汗，无心前区疼痛。含硝酸甘油不见效，测血压 165/130 mmHg。含硝苯地平 10 mg，喘憋稍缓解，送我院急诊，诊为急性左心衰竭，心电图 V₁₋₅ 导联 ST 段抬高，血清酶尚在正常范围，诊为急性前壁心肌梗死（第 4 次梗死）。发病第 4 天排便时摔倒，神志不清，抽搐，为心室颤动，除颤 20 余次，药物，临时起搏，抢救不成功，1991-11-22 死亡。

患者第 1 次在路上发病，幸运的是正好有一辆路过的急救车，约在发病 3 分钟后实施了心脏按压，心脑得以恢复。如无院外抢救，即使心跳恢复，脑缺氧过长也成植物人。在公众中培养急救知识，能当场实施心外按压等的初步措施，对挽救猝死患者至关重要。救治后又活了 7 年多，按现代二级预防及治疗可能延长患者生命更长，开展冠状动脉介入治疗或旁路移植术后治疗手段会更多。患者最后一次住院时发生心室颤动，未能急救成功，所不同的是第 1 次为原发性心室颤动，院外已开始抢救，后 1 次是在发生 4 次心肌梗死，并发急性左心衰竭后继发性心室颤动，虽然在医院，治疗效果差，心脏未能恢复窦性心律，心电起搏刺激仅有心电信号，心脏无收缩功能，抢救未成功。

（收稿日期：2015-01-08）

（编辑：许菁）

综述

冠状动脉旁路移植术后并发肺炎的研究进展

林丽珠* 综述, 敖虎山 审校

摘要 冠状动脉旁路移植术(CABG)目前已成为常规的心脏外科手术之一,全球每年超过一百万冠状动脉粥样硬化性心脏病(CAD)患者接受CABG。但这类患者在接受CABG后极易诱发肺部并发症,如肺炎、肺不张和胸腔积液^[1]。这不仅延长了患者的住院时间,增加了国家或个人的财政负担,并且使患者的死亡危险因素增加。本文就CABG后并发肺炎可能的危险因素分析和预防处理措施作一综述。

关键词 冠状动脉旁路移植术;肺炎

1 冠状动脉旁路移植术(CABG)后并发肺炎的发生率

Kinlin等^[2]对17143例CABG术后患者进行研究,除去由于误吸引起的肺炎外,有361例患者发生肺炎,发生率为2.11%。Shih等^[3]对20896例CABG术后患者进行研究,共有644例患者发生了肺炎,发生率为3.1%。LaPar等^[4]观察的55167例CABG术后患者肺炎的发生率是3.70%。在不排除一些引起肺炎的明显的诱因的情况下,肺炎的总体发生率是比较高的。Vogel等^[5]则对87318例CABG术后患者发生感染的几率按照延期手术时间的长短进行分类:延期0天的感染发生率是5.73%(肺炎发生率在2.10%~2.20%之间);延期1天的感染发生率是6.68%(肺炎发生率在2.70%~2.80%之间);延期2~5天的感染发生率是9.33%(肺炎发生率在3.20%~3.30%之间);延期6~10天的感染发生率迅速上升至18.24%(肺炎发生率在6.70%~6.80%之间)。

2 CABG术后肺炎的诊断标准

CABG术后肺炎属于医院获得性肺炎(HAP)中的一种,即患者入院时不存在,也不处于潜伏期,而于入院48h后在医院内发生的肺炎,HAP中有80%左右是由于呼吸机引起的肺炎,也就是呼吸机相关性肺炎(VAP)。CABG术后患者容易发生VAP(3.2%~8.3%),但是由于CABG术后患者一致性的临床体征,如发热、白细胞增多和难以解释的异常胸部X线检查结果,导致对于CABG术后患者这一类特殊人群的VAP的诊断并不容易^[6]。目前临床医生对于CABG术后肺炎的诊断主要是根据典型的临床症状和体征,如咳嗽、咳痰、体温 $>38.3^{\circ}\text{C}$ 、白细胞增多等,并且符合下列检查中的一项:术后48h胸部X线检查发现术前并不存在的新的肺部炎症浸润灶;痰或气管支气管分泌物培养阳性;拔管困难^[2,7,8]。但也有某些专家将疾病控制中心(CDC)中关于肺炎的诊断标准应用于CABG术后患者肺炎的诊断^[6,9],最终的结论是专家们认为CDC严格的诊断标准将心脏手术后一些正常的反应误认为是肺炎发生的一个诊断指标,从而导致肺炎的假阳性率

提高了。CABG术后患者是一个特殊的群体,经过体外循环后白细胞激活,术后白细胞计数增多、发热、呼吸道分泌物增多和异常的胸部X线检查结果也可以发生于正常患者^[6]。因此CDC的诊断标准不能常规用于CABG术后患者,只适合于临床医生对于肺炎诊断存在困难的情况下参考使用。对于CABG术后肺炎的诊断,临床上并没有一个统一的标准,是否应该将CDC里的诊断标准重新修改以制定出适合CABG术后患者肺炎的诊断仍有待探讨。

3 CABG术后患者发生肺炎的围手术期危险因素

体重指数(BMI):大多数学者的观点认为肥胖是导致感染的一个重要的因素,因为肥胖影响人体的免疫系统,改变了抗菌药物的药代动力学和机体对病毒的反应性^[10]。Montazerqhaem等^[11]的研究中发现 $\text{BMI}>30\text{ kg/m}^2$ 这一组患者中有5.3%的患者发生了肺炎,而 $\text{BMI}<20\text{ kg/m}^2$ 这一组患者中无一例发生肺炎。Kayani等^[7]也认为 $\text{BMI}>30\text{ kg/m}^2$ 增加术后感染的发生率。但是Kinlin等^[2]的研究中发现 $\text{BMI}<18.5\text{ kg/m}^2$ 也使CABG术后发生肺炎的危险性增加。产生这样的分歧,不仅与学者研究侧重点和选取的样本量不同有很大的关系,而且低体重患者本身存在一定程度的营养不良或是可能合并其他慢性消化性疾病,从而增加术后肺炎发生率。

吸烟:吸烟危害健康是不争的医学结论,吸烟增加术后肺部感染,将吸烟列为CABG术后肺炎发生的一个独立危险因素,这在很多文献中均有报道^[2,12,13]。Saxena等^[8]将21486例施行CABG手术患者的吸烟状态分为三组进行研究分析,无吸烟组7023例、戒烟组11183例、吸烟组3290例,三组肺炎的发生率依次是3.2%、4.5%、7.0%,吸烟组CABG术后肺炎的发生率远远高于其他两组,吸烟是肺炎发生的一个独立危险因素。孙海宁等^[14]通过研究发现吸烟组与不吸烟组比较术后肺部并发症发生率高(3.2% vs 1.6%),呼吸机辅助时间增加(8h vs 6h),

种族:种族影响CABG术后并发症,这在种族歧视国家

作者单位:535099 广西省,广西医科大学第十附属医院 广西钦州市第一人民医院 麻醉一区(林丽珠);阜外医院 麻醉科(敖虎山)
作者简介:林丽珠 主治医师 硕士研究生 主要从事心血管手术麻醉研究 Email:wyb4950lgr@163.com *阜外医院麻醉科进修医师
通讯作者:敖虎山 Email:aohushan@sina.com

中图分类号:R54 文献标识码:A 文章编号:1000-3614(2015)10-01015-03 doi:10.3969/j.issn.1000-3614.2015.10.022

显得极其重要,受歧视的种族生活条件、文化素养和医疗条件均是有限的。Vogel 等^[5]在一篇关于延迟择期手术对术后感染并发症的影响中明确指出黑人和西班牙裔美国人与白人相比,更加容易被延迟手术治疗,随着手术日期的延长,术后肺炎的发生率也就明显增加。Michael 等^[15]等经过研究分析得出这样的结论:非洲裔美国人比白人术后更容易并发肺部并发症。种族问题并不是适合所有地区,这在特定的国家特定的历史背景条件下才能作为 CABG 术后肺炎发生的独立危险因素。

其他危险因素:其他相关因素包括年龄、性别、糖尿病、高血压、机械通气时间等。Kinlin 等^[2]在研究中明确列出了 CABG 术后发生肺炎的 13 个独立危险因素: BMI <18.5 kg/m²、吸烟史、生活水平低下、癌症病史、慢性阻塞性肺疾病、加拿大心血管学会评分 ≥ 3 分、选取乳内动脉作为移植血管、急诊手术、血清肌酐水平 >1.2 mg/dl、经皮冠状动脉成形术后、输血、术前使用万古霉素、机械通气时间超过 1 天。另有一组研究结果表明高龄、男性、BMI >30 kg/m²、糖尿病、外周血管病、术前肾功能不全、不稳定性心绞痛、急诊手术、主动脉阻断时间 >80 min 是 CABG 术后感染的危险因素^[7]。年龄大于 70 岁、咳嗽咳痰、糖尿病史、吸烟史(直至术前 8 周)也是导致 CABG 术后发生肺部并发症的独立危险因素^[12]。高血压病史、血管外科手术后、急诊手术、术后房颤、术中和术后使用正性肌力药物的种类、重症监护病房(ICU)监测期间输注新鲜冰冻血浆、在 ICU 停留的时间均是 CABG 术后发生肺炎的独立危险因素^[16]。甚至因为术中中转体外循环和低血清蛋白血症患者增加术后机械通气时间,由此推断出术中中转体外循环和低血清蛋白血症患者是 CABG 术后肺炎发生的一个间接的独立危险因素^[11, 17]。另外术后疼痛也是一个极其危险因素,特别是心脏手术患者,因为疼痛限制了患者进行有力的咳嗽和咳痰,导致分泌物沉积于肺部,进而发展为肺部感染和肺不张^[18]。急诊手术因为术前准备不充分,是大家公认的危险因素。另有一些特殊的危险因素值得我们继续探索研究,如主动脉阻断时间、ICU 停留时间、新鲜冰冻血浆的输注量、术中术后正性肌力药物的应用等。

4 CABG 术后肺炎的防治

术前戒烟和呼吸肌训练:吸烟是影响 CABG 术后肺部并发症,尤其是肺炎发生的一个重要因素,虽然吸烟并不是进行手术麻醉的禁忌证,但仍应该鼓励患者术前至少戒烟 6 周^[8]。有研究表明吸烟组特别是未戒烟患者术后早期肺部并发症发生率明显增加,呼吸机辅助通气时间明显延长,术前戒烟 1 个月以上的患者,肺部并发症发生率明显下降,戒烟有助于缩短呼吸机使用时间,减少 CABG 术后早期肺部并发症的发生^[19]。术前进行吸气肌训练,可预防 CABG 术后患者肺泡萎陷,改善患者的肺功能,提高手术耐受性,减少术后肺部并发症的发生率^[20, 21]。

术后呼吸理疗:呼吸理疗被广泛的用于预防肺部并发症的发生,常用的呼吸理疗方式是刺激性肺活量测定法(IS)和呼气相气道正压法(EPAP)^[1],这两种呼吸理疗方式有利于肺的膨胀和促进萎缩的肺小泡再度膨胀,预防和减少肺部并发症的发生。Haeffener 等^[22]将 IS+EPAP 用于 CABG 术后患者的一项临床对比观察中,并在 1 周和 1 个月后进行最大吸气压和肺功能检查,6 min 步行试验和胸部 X 线检查,发现

IS+EPAP 的呼吸理疗方式能明显改善肺功能和提高 6 min 步行距离,减少术后肺部并发症的发生。Ferreira 等^[1]则进行了更加长期的追踪调查,同样是将 IS+EPAP 用于 CABG 术后患者,8 个月后进行呼吸肌强度、功能性能力评估、肺功能检查、生活质量和体力活动水平的对比,结果显示 IS+EPAP 组在呼吸困难程度、6 min 步行距离和生活质量方面明显优于对照组。CABG 术后患者使用 IS+EPAP 的呼吸理疗方式,其效果对于短期和长期来说都是有利的,只是两位学者选择的病例数过少,还需要更大样本的随机对照研究。气管拔管后,预防性使用经鼻持续气道正压通气(nCPAP)的方式,也称为自主呼吸下的呼气末正压,在自主呼吸的情况下,通过鼻罩增加胸腔内的正压来对抗吸气负压,防止气道塌陷,保持上呼吸道开放,能够明显改善心脏手术后动脉氧合,减少肺部并发症的发生率^[23, 24]。

药物:术前使用他汀类降血脂药物,可以明显降低 CABG 术后感染的发生率,降低肺炎的发生率和肺炎的严重程度^[25, 26],可能是由于他汀类药物的免疫调节作用,抑制了炎症的级联反应^[6]。他汀类药物具有免疫调节作用,抗炎,抗氧化和抗细胞凋亡等多重效应,虽然其在降低 CABG 术后肺炎和败血症方面在统计学上并没有显示出明显差异,但是它能够明显改善肺炎和脓毒血症患者的预后和转归^[7, 27, 28]。围手术期预防性应用相对广谱、杀菌活性强、安全及价廉的抗生素,可以明显减少术后感染的发生^[29]。采用合适的麻醉性镇痛药或患者自控镇痛方式消除和减轻 CABG 术后患者的疼痛,可以改善患者呼吸幅度,保持肺泡膨胀,促进患者咳嗽咳痰,有助于防止肺不张和肺部感染^[30-32]。

降低炎症反应:术前使用他汀类药物抑制炎症的级联反应,术中使用白细胞过滤器去除白细胞等等均能够明显降低体外循环后的炎症反应。有研究结果表明白细胞过滤器通过机械阻滞和吸附的原理优先去除有活性的白细胞^[33-35],降低体外循环后全身性炎症反应,减少抗炎因子的释放,从而减轻炎症因子对肺部的损伤。虽然白细胞过滤器的使用并不能降低 CABG 术后肺炎的发生率和死亡率,不能缩短住院时间,但是能够降低氧合指数(PaO₂/FiO₂)的下降程度,并能在术后 24 小时逐渐改善肺的氧合,较快脱离呼吸机^[33]。

CABG 术后肺炎的发生增加患者的死亡率,增加住院费用,但对于其发生的危险因素和防治还有待进一步研究。如何通过早期综合预防肺炎的发生,提高肺炎的诊断率,分析诱发因素,个体化治疗是目前研究的重点。

参考文献

- [1] Ferreira GM, Haeffener MP, Barreto SS, et al. Incentive spirometry with expiratory positive airway pressure brings benefits after myocardial revascularization. *Arg Bras Cardiol*, 2010, 94: 230-235.
- [2] Kinlin LM, Kirchner C, Zhang H, et al. Derivation and validation of a clinical predictor rule for nosocomial pneumonia after coronary artery bypass graft surgery. *Clin Infect Dis*, 2010, 50: 493-501.
- [3] Shih T, Zhang M, Kommareddi M, et al. Center-level variation in infection rates after coronary artery bypass grafting. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2014, 7: 567-573.
- [4] LaPar DJ, Crosby IK, Rich JB, et al. A contemporary cost analysis of postoperative morbidity after coronary artery bypass grafting with and without concomitant aortic valve replacement to improve patient

- quality and cost-effective care. *Ann Thorac Surg*, 2013, 96: 1621-1627.
- [5] Vogel TR, Dombrovskiy VY, Lowry SF. In-hospital delay of elective surgery for high volume procedure: the impact on infectious complications. *J Am Coll Surg*, 2010, 211: 784-790.
- [6] Baqhbhan M, Paknejad O, Yousefshahi F, et al. Hospital-acquired pneumonia in patients undergoing coronary artery bypass graft; comparison of the center for disease control clinical criteria with physicians' judgment. *Anesth Pain Med*, 2014, 4: e20733.
- [7] Kayani WT, Bandedali SJ, Lee VV, et al. Association between statins and infections after coronary artery bypass grafting. *Inter J Cardiol*, 2013, 168: 117-120.
- [8] Saxena A, Shan L, Reid C, et al. Impact of smoking status on early and late outcomes after isolated coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiol*, 2013, 61: 336-341.
- [9] Flier S, Concepcion AN, Versteeg D, et al. Monocyte hyporesponsiveness and Toll-like receptor expression profiles in coronary artery bypass grafting and its clinical implications for postoperative inflammatory response and pneumonia. *Eur J Anaesthesiol*, 2014, 31: 1-12.
- [10] Genoni G, Prodam F, Marolda A, et al. Obesity and infection: two sides of one coin. *Eur J Pediatr*, 2014, 173: 25-32.
- [11] Montazerqhaem H, Safaie N, Samiei Nezhad V. Body mass index or serum albumin levels: which is further prognostic following cardiac surgery? *J Cardiovasc Thorac Res*, 2014, 6: 123-126.
- [12] Hulzebos EH, Van Meeteren NL, De Bie RA, et al. Prediction of postoperative pulmonary coronary artery bypass graft surgery. *Phys Ther*, 2003, 83: 8-16.
- [13] Al-Sarraf N, Thalib L, Hughes A, et al. Effect of smoking on short-term outcome of patients undergoing Coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Surg*, 2008, 86: 517-23.
- [14] 孙海宁, 胡盛寿, 赵舟, 等. 吸烟及戒烟对冠状动脉旁路移植术后早期结果的影响. *中国循环杂志*, 2011, 26: 89-92.
- [15] Michael Smith J, Soneson EA, Woods SE, et al. Coronary artery bypass graft surgery outcomes among African-Americans and Caucasian patients. *Inter J Surg*, 2006, 4: 212-216.
- [16] Falaqas ME, Rosmarakis ES, Rellos K, et al. Microbiologically documented nosocomial infections after coronary after bypass surgery without cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006, 132: 481-490.
- [17] 刘曦, 陈或, 赵舟, 等. 非体外循环冠状动脉旁路移植术中转体外循环的预后、原因及危险因素分析. *中国循环杂志*, 2014, 29: 879-883.
- [18] Smetana GW. Preoperative pulmonary evaluation: identifying and reducing risks for pulmonary complications. *Cleve Clin J Med*, 2006, 73(Suppl 1): S36-41.
- [19] Sun HN, Hu SS, Zheng Z, et al. Impact of smoking and smoking cessation on long-term outcome of patients after coronary artery bypass grafting. *chin J of Cardiol*, 2011, 39: 825-829.
- [20] Hulzebos EH, Helders PJ, Favié NJ, et al. Preoperative intensive inspiratory muscle training to prevent postoperative pulmonary complications in high-risk patients undergoing CABG surgery: a randomized clinical trial. *J Am Med Assoc*, 2006, 296: 1851-1857.
- [21] Snowdon D, Haines TP, Skinner EH. Preoperative intervention reduces postoperative pulmonary complications but not length of stay in cardiac surgical patients: a systematic review. *J Physiother*, 2014, 60: 66-77.
- [22] Haeflener MP, Ferreira GM, Barreto SS, et al. Incentive spirometry with expiratory positive airway pressure reduces pulmonary complications, improves pulmonary function and 6-minute walk distance In patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Am Heart J*, 2008, 156: 900. e1-900. e8.
- [23] Zarbock A, Mueller E, Netzer S, et al. Prophylactic nasal continuous positive airway pressure following cardiac surgery protects from postoperative pulmonary complications: a prospective, randomized, controlled trial in 500 patients. *Chest*, 2009, 135: 1252-1259.
- [24] Hillis LD, Smith PK, Anderson JL, et al. 2011 ACCF/AHA guideline for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation*, 2011, 124: e652-735.
- [25] Myles PR, Hubbard RB, McKeever TM, et al. Risk of community-acquired pneumonia and the use of statins, ace inhibitors and gastric acid suppressants: a population-based case-control study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2009, 18: 269-275.
- [26] Novack V, MacFadyen J, Malhotra A, et al. The effect of rosuvastatin on incident pneumonia: results results from the JUPITER trial. *CMAJ*, 2012, 184: E367-372.
- [27] Chalmers JD, Singanayagam A, Murray MP, et al. Prior statin use is associated with improved outcomes in community-acquired pneumonia. *Am J Med*, 2008, 121: 1002-1007.
- [28] Musher DM. New modalities in treating pneumococcal pneumonia. *Hosp Pract(1995)*, 2011, 39: 89-96.
- [29] Rostami M, Mirmohammadsadeghi M, Zohrenia H. Evaluating the frequency of postoperative fever in patients with coronary artery bypass surgery. *ARYA Atheroscler*, 2011, 7: 119-123.
- [30] Lahtinen P, Kokki H, Hynynen M. Pain after cardiac surgery: a prospective cohort study of 1-year incidence and intensity. *Anesthesiology*, 2006, 105: 794-800.
- [31] Taillefer MC, Carrier M, B é lisle S, et al. Prevalence, characteristics, and predictors of chronic nonanginal postoperative pain after a cardiac operation: a cross-sectional study. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006, 131: 1274-1280.
- [32] Gust R, Pecher S, Gust A, et al. Effect of patient-controlled analgesia on pulmonary complications after coronary artery bypass grafting. *Crit Care Med*, 1999, 27: 2218-2223.
- [33] Rubino AS, Serraino GF, Marsico R, et al. Leukocyte filtration improves pulmonary function and reduces the need for postoperative non-invasive ventilation. *Int J Artif Organs*, 2012, 35: 679-688.
- [34] Onorati F, Santini F, Mariscalco G, et al. Leukocyte filtration ameliorates the inflammatory response in patients with mild to moderate lung dysfunction. *Ann Thorac Surg*, 2011, 92: 111-121.
- [35] Warren O, Alexiou C, Massey R, et al. The effects of various leukocyte filtration strategies in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007, 31: 665-676.

(收稿日期: 2015-03-30)

(编辑: 常文静)

综述

微小核糖核酸在急性心肌梗死诊断和治疗中作用的研究进展

唐宇宁、彭瑜综述, 张钰审校

摘要 近年来, 随着分子生物学研究方法的飞速发展, 急性心肌梗死(AMI)的机制研究在分子生物学水平取得了长足的进展。研究发现, 微小核糖核酸(miRNA)表达异常在 AMI 发病过程中发挥了重要作用, 并可能是 AMI 早期诊断的标志物以及潜在的治疗靶点。本文将重点介绍几种与 AMI 发病关系密切的 miRNA, 并将近年来 miRNA 作为 AMI 诊断标志物和治疗靶点的研究进展做一综述。

关键词 微小核糖核酸; 标志物; 急性心肌梗死

微小核糖核酸(miRNA)是一类大小为 19~25 个碱基的内源性非编码小 RNA 分子, 研究表明编码蛋白的基因总数不到 3 万个, 而非编码 RNA 基因约占整个人类基因组的 98%, 其中编码的 miRNA 超过 1 000 种, 负责调控哺乳类动物编码基因的 30%^[1]。探讨 miRNA 在人类疾病中作用的研究始于白血病, 其后对肿瘤、糖尿病以及免疫系统疾病均有研究。近年来, miRNA 在心血管领域尤其是对急性心肌梗死(AMI)调控作用的研究取得了很大进展^[2,3]。

1 微小核糖核酸在急性心肌梗死发病机制中的作用

miR-1 和 miR-133 主要通过调节细胞凋亡来影响 AMI 发病过程中心肌细胞的存亡。多项研究表明, 这两种 miRNA 在 AMI 发生后短期内即持续显著升高。miR-1 是一类肌细胞特异性 miRNA, 过度表达时可通过抑制下游增殖相关靶基因如 RasGAP、Cdk9 和 Rheb 的表达, 进而抑制心室肌细胞增殖。Xu 等^[4]在氧化应激诱导的 H9c2 大鼠心室肌细胞中发现, miR-1 促凋亡而 miR-133 抑制凋亡。miR-1 的靶点为热休克蛋白(HSP)60 和 HSP70 基因的 3' 非翻译区, 它能降低 HSP60 和 HSP70 蛋白水平, 但不改变其转录; miR-133 在整个 Caspase-9 基因序列中可能有多个靶位点, 在蛋白和信使核糖核酸(mRNA)水平都能抑制 Caspase-9 的表达, 这可能是细胞调节凋亡与存活的机制之一。研究显示, 当心肌细胞处于促凋亡(如缺血和氧化应激)环境时, miR-1 水平会病理性地升高。

miR-499、miR-208a 和 miR-208b 在不稳定性心绞痛和 AMI 发生时也显著增高。miR-499 是由 β -肌球蛋白重链基因 Myh7b 的 19 内含子编码的。基因敲除研究显示, miR-499 和另一个心肌 miRNA——miR-208b 功能相似, 都通过激活缓慢肌纤维基因和抑制快速肌纤维基因来调节肌球蛋白的表达, 且两者均受 miR-208a 的调节^[5]。转基因过表达研究发现, miR-499 能通过靶向调节亲肥大磷酸酶来发挥心肌保护作用^[6], 也能调节早期应激反应基因而使心脏功能障碍^[7], 因此, miR-499 在心脏中的功能和它的调节基因表达的后果, 目前还不清楚。人类肌肉富含 miR-1、miR-

133a 和 miR-499, 而 miR-208 为心肌特异表达的 miRNA, 且在激素调节的心肌生长中起重要作用。miR-208 来自于心肌特异 α -主要组织相容性复合体(MHC)基因 mRNA 前体的第 27 个内含子。因此, 位于内含子中的 miRNA 与其宿主基因由于来源于同一个转录本而有着相似的表达谱。研究者通过基因芯片分析心脏条件性 miR-208 敲除小鼠模型后发现, miR-208 可能通过抑制正常心脏中不表达的快骨骼肌收缩蛋白基因来维持心肌细胞的收缩表型。进一步研究显示, 在应激状态下, miR-208 通过抑制靶基因甲状腺素受体相关蛋白 1 的表达从而调控心肌肥厚、纤维化以及 β -MHC 的表达。因此, α -MHC 不仅仅只是心肌收缩蛋白, 它还包括一个能够调控激素刺激的心肌生长和基因表达的 miRNA。

作为 miRNA 中的一员, Let-7g 能够调节转化生长因子- β (TGF- β)来对内皮细胞发挥保护性作用, 同时可以抑制内皮细胞和平滑肌细胞摄取氧化型低密度脂蛋白, 进而抑制动脉粥样硬化(AS)的发展。在体外实验中, Let-7g 能抑制内皮细胞炎症, 并通过下调 TGF- β 来抑制纤溶酶原激活抑制剂-1(PAI-1)的表达, 同时可增加同源基因的表达来降低内皮细胞的敏感性; 在活体内, 给高血脂的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠注射 Let-7g 抑制剂会增加 TGF- β 诱导的基因(包括 PAI-1 基因)在血管内的表达, 增强巨噬细胞在颈动脉的渗透性, 并导致颈动脉内膜中层增厚; 腔隙性卒中患者的血清 Let-7g 低水平与血浆 PAI-1 高水平有关。由此推论, Let-7g 可能是内皮细胞炎症的关键内生抑制剂, 当缺乏 Let-7g 时, 内皮细胞获得促炎性表型, 引发血管损伤并激活血小板^[8]。

2 微小核糖核酸在急性心肌梗死诊断中的作用

血清 miRNA 被认为是一种理想的诊断标记物, 因其与血浆中的囊泡、高密度脂蛋白胆固醇、Ago2 蛋白以及核仁磷酸蛋白 1 等形成复合物, 或存在于凋亡小体中而十分稳定, 能承受住反复的冻结—融解循环, 并能抵抗核糖核酸酶的降解^[9], 且血浆中 miRNA 水平不受临床相关因素的影响, 如年龄、性别、体重指数、肾功能、收缩压以及白细胞计数等。此外, 血清 miRNA 具备标志物的大多数特点: 无创检测、高敏感度

和特异度、病变早期即可检测到、随病变程度有时间的改变、半衰期长且检测迅速等。

Liebetrau 等^[10]对肥厚型梗阻性心肌病患者采用经冠状动脉的室间隔肥厚消融术,得到了冠状动脉闭塞后循环中特定 miRNA 的出现时间。在冠状动脉闭塞后仅仅 15 min, miR-1 和 miR-133 浓度就开始上升,且在 74 min 达到平台期,这可能为非 ST 段抬高型心肌梗死(NSTEMI)的早期识别作出贡献。Wang 等^[11]用反转录-多聚酶链式反应检测了 AMI 患者在发作 24 h 和 6 d 后的全血和血浆中 miR-133 和 miR-328 水平,发现这两种 miRNA 在 AMI 患者血浆中的水平均显著高于正常对照组人群。另一研究发现,STEMI 患者体内 miR-1、miR-133a、miR-133b 和 miR-499-5p 会迅速上调,其中 miR-133a 最显著,与对照组相比升高了 140 倍^[12]。有研究表明,miR-133a 在 STEMI 患者体内浓度升高与大面积心肌梗死、心肌再灌注损伤以及心肌挽救减少有关^[13]。miR-1、miR-133a 和 miR-133b 升高和达峰时间与心肌肌钙蛋白 I 同步,miR-499-5p 则稍微滞后,在发病第 5 d 时 miR-1、miR-133a、miR-133b、miR-499-5p 和 miR-375 都恢复到正常水平,而 miR-122 直至第 30 d 仍未恢复^[14]。

miR-1、miR-133a 和 miR-208a 能在 AMI 发生 4 h 内持续性升高,在心肌肌钙蛋白 T 前达到高峰,先于传统标志物。miR-208a 尤其适合作为标志物,因为它是心脏特异的,在健康人群和非 AMI 患者血浆中为阴性,而在 AMI 患者中检出率高达 90.9%,而 miR-1、miR-133a、miR-133b、miR-208b 和 miR-499 在不稳定性心绞痛和 AMI 患者中均可检测到。在冠状动脉闭塞 1 h 后,miR-208a 即显著升高并可检出^[15]。因此,miR-208a 对 AMI 的诊断具有较高的敏感性和特异性。此外,有研究者比较了 NSTEMI 老年患者和急性心力衰竭但不伴有 AMI 的老年患者血浆中 miRNA 水平,结果发现,NSTEMI 患者血浆中 miR-1、miR-21 和 miR-133a 显著高于正常对照人群,且 miR-21 和 miR-499-5p 水平显著高于急性心力衰竭组,其诊断的精确性高于高敏心肌肌钙蛋白 T。

Vogel 等^[16]研究了全基因组 miRNA 的动力学改变,发现有多种 miRNA 可能是 AMI 的标志物,提示我们或可用一组 miRNA 来作为 AMI 诊断标志物,如联合检测 miR-1、miR-133a、miR-133b 和 miR-208a,以提高准确性。未来需要更多的研究来确定哪些 miRNA 在早期诊断方面可优于肌钙蛋白,尤其是在肌钙蛋白边界性升高、心电图改变和症状不典型的患者,以及 AMI 的排除诊断。然而,miRNA 的靶作用具有多效性,它的特异性到底能否优于高敏心肌肌钙蛋白,目前还未可知。用外周血 miRNA 作诊断标志物还有许多问题亟待解决,如抗凝药和抗血小板药物对 miRNA 的干扰;此外,miRNA 在血清、血浆和全血中均稳定存在,但在 RNA 分离和多聚酶链式反应定量分析中会逐渐减少,有学者认为血清可能是最适样本,因为血清可以避免白细胞导致的偏倚;另一个重要的问题是,miRNA 的检测技术需要标准化,有研究用 miR-17 来标化样本^[12],然而另有研究表明 miR-17 在急性冠状动脉综合征患者体内也有升高^[17],且已知 miR-17-92 簇受局部缺血和炎症因子的调节,因此 miR-17 用于标化的准确性也有待商榷。此外,多聚酶链式反应技术也是限制 miRNA 应用的一个

重要方面,miRNA 序列的扩增依靠寡核苷酸,然而扩增时如果滴定不当可能导致伪影,数字多聚酶链式反应能相对提高 miRNA 定量的精确度。最后,以目前的技术水平,miRNA 的分离以及随后的反转录-多聚酶链式反应定量仍需大量时间,要使 miRNA 广泛用于临床,需迅速有效得出结果,即最好能在床旁检测。

关于 miRNA 能否作为 AMI 的预后指标,目前知之甚少。有研究检测了 AMI 患者的 6 种肌肉中富集的 miRNA,发现与稳定性心绞痛患者相比,AMI 患者的 miR-1、miR-133a 和 miR-208b 水平显著升高;单因素分析揭示,miR-133a 和 miR-208b 水平与死亡风险显著相关^[18]。但是,经高敏心肌肌钙蛋白 T 调整后并未发现独立的预后意义。

3 微小核糖核酸在急性心肌梗死治疗中的作用

心脏 miRNA 能够影响细胞死亡、心肌电生理功能、心肌原始细胞增殖和分化、血管生成以及细胞外基质成分,因此,针对 miRNA 的治疗能够为改变 AMI 的病理生理过程提供机会。以 miRNA 为靶点设计药物,补充表达下调的 miRNA 或抑制过多表达的 miRNA,将可能有效阻止 AS 的进展,同时也为 AMI 治疗带来新希望。如前文中提到的,既然 Let-7g 能抑制内皮细胞炎症,Let-7g 类似物很可能对 AS 发挥治疗作用。此外,在载脂蛋白 E 敲除的小鼠体内,miR-181b 能抑制炎症和 AS,miR-146 也可抑制内皮炎症激活,故而补充 miR-181b 或 miR-146 也可能起到抑制 AS 的作用。miR-1 促凋亡而 miR-133 抑制凋亡,这提示 miR-1 和 miR-133 的相对水平比绝对水平更重要:升高 miR-1 和(或)降低 miR-133 水平有利于细胞凋亡,减少 miR-1 和(或)增高 miR-133 水平有利于存活^[4],调节 miR-1 与 miR-133 的相对水平,也可起到提高心肌细胞存活率的作用。

miRNA 在治疗方面的探索主要通过过表达和抑制途径,使用病毒载体生产 miRNA 以及寡核苷酸 miRNA 类似物的研究仍在进行。与之相比,用反转录方法来抑制基因表达的研究更为成熟:通过化学修饰作用,提高 miRNA 拮抗剂(反义寡核苷酸)与 miRNA 的亲合力,并获得核酸酶抵抗性、蛋白结合能力(硫代磷酸酯主链连接)和细胞摄取能力(2'-O-甲基-胆固醇-共轭)。锁核酸是 8 个或 15 个碱基的反义分子,具有 2' 修饰的糖基(2'-氟和 2'-O-甲基乙基),使其对靶序列的亲合力明显升高。但有报道提出,锁核酸能诱导补体级联反应、激活固有免疫并有肝毒性^[19]。

由于 miRNA 靶作用的多效性,它们对人体的调节作用是不可预估的,还有诸如 miRNA 类似物的精确调节、根据不同个体危险因素的 miRNA 拮抗剂的生产等多个问题并未解决,对其进一步研究将丰富我们对心血管生理和疾病的认识,并推动和拓展心血管疾病的治疗思路和方法。

4 小结与展望

miRNA 在 AMI 发生过程中发挥重要作用,但尚需更多研究来深入探讨 miRNA 的作用范围、对 miRNA 活性的干预措施的安全性,以及这些基础研究在具体疾病中的实际应用价值。同时,由于目前临床研究所纳入研究样本量过小,很可能产生偏倚,故需要更多更大样本量的临床研究来鉴别多样化的 miRNA 在心血管疾病中的特异表达,为 AMI 的诊断和预后提供理想的分子标志物,并探索如何通过调节 miRNA 水平来达到治疗的目的。

参考文献

- [1] 陆永光, 李浪. 微小核糖核酸与冠心病关系的研究进展. 中国循环杂志, 2010, 25: 484-486.
- [2] Kukreja RC, Yin C, Salloum FN. MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection. *Mol Pharmacol*, 2011, 80: 558-564.
- [3] 李忠佑, 陈红. 循环微小核糖核酸在急性冠状动脉综合征中的应用与进展. 中国循环杂志, 2015, 30: 190-192.
- [4] Xu C, Lu Y, Pan Z, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci*, 2007, 120: 3045-3052.
- [5] van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*, 2009, 17: 662-673.
- [6] Wang JX, Jiao JQ, Li Q, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*, 2011, 17: 71-78.
- [7] Shieh JT, Huang Y, Gilmore J, et al. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS One*, 2011, 6: e19481.
- [8] Liao YC, Wang YS, Guo YC, et al. Let-7g improves multiple endothelial functions through targeting transforming growth factor-beta and SIRT-1 signaling. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63: 1685-1694.
- [9] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 10513-10518.
- [10] Liebetrau C, Möllmann H, Dörr O, et al. Release kinetics of circulating muscle-enriched microRNAs in patients undergoing transcatheter ablation of septal hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62: 992-998.
- [11] Wang R, Li N, Zhang Y, et al. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction. *Intern Med*, 2011, 50: 1789-1795.
- [12] D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2010, 31: 2765-2773.
- [13] Eitel I, Adams V, Dieterich P, et al. Relation of circulating microRNA-133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J*, 2012, 164: 706-714.
- [14] D'Alessandra Y, Pompilio G, Capogrossi MC. MicroRNAs and myocardial infarction. *Curr Opin Cardiol*, 2012, 27: 228-235.
- [15] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010, 3: 499-506.
- [16] Vogel B, Keller A, Frese KS, et al. Refining diagnostic microRNA signatures by whole-mirnome kinetic analysis in acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 2013, 59: 410-418.
- [17] Kuwabara Y, Ono K, Horie T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate the existence of myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, 4: 446-454.
- [18] Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51: 872-875.
- [19] Condorelli G, Latronico MV, Cavarretta E. MicroRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63: 2177-2187.

(收稿日期: 2015-04-07)

(编辑: 朱柳媛)

综述

瓣膜内皮细胞在钙化性主动脉瓣疾病发病过程中的作用研究现状

刘汉凝、孙骋*综述, 郑哲审校

摘要 心脏瓣膜病是一类重要的心脏疾病, 其发病病因近半个世纪发生了很大的变化。目前退行性瓣膜病的发病率逐渐升高, 钙化性主动脉瓣疾病是退行性瓣膜病的最重要的表现之一。瓣膜内皮是瓣膜组织中直接接触血流的细胞, 在瓣膜疾病的发病过程中扮演重要的角色。血流剪切力作用于瓣膜内皮细胞, 使其形态、基因表达发生相应地变化, 导致瓣膜内皮细胞发生上皮-间质转换, 成为具有增殖能力的瓣膜间质细胞, 或者使瓣膜内皮细胞的旁分泌机制发生变化, 影响瓣膜间质细胞的功能, 从而导致瓣膜病的发生。

关键词 钙化性主动脉瓣疾病; 血流剪切力; 瓣膜内皮细胞; 上皮-间质转换; 旁分泌

心脏瓣膜病是一类常见的心脏疾病, 主要表现为心脏瓣膜的狭窄或关闭不全以及由此引起的血流动力学改变而造成的心脏、肺血管等器官的病变。在美国, 瓣膜性心脏病的患病率达 2.5%^[1]。瓣膜性心脏病主要包括先天性瓣膜病和获得性瓣膜病(成人瓣膜病)。成人瓣膜病根据病因不同, 主要分为风湿性瓣膜病和退行性瓣膜病。流行病学研究表明, 上世纪 50 年代以前, 在全球范围内成人瓣膜病以风湿性瓣膜病为主; 50 年代以后, 成人瓣膜病的病因出现了明显的地区差异^[2]。在发达国家, 随着卫生条件的改善和抗生素的广泛应用, 风湿性瓣膜病的数量逐渐减少, 而退行性瓣膜病成为成人瓣膜病的主要病因。有调查显示, 欧洲地区的瓣膜病患者中, 有 63% 是退行性瓣膜病, 22% 是风湿性瓣膜病^[3]。在发展中国家, 风湿性瓣膜病发病率仍然较高。在亚洲地区, 每年约有 35~50 万人死于风湿性瓣膜病^[4]。据《中国心血管病报告 2012》, 我国风湿性心脏病患者数量高达 250 万人^[5]。而随着人口老龄化的加剧和生活及卫生条件的进一步改善, 发展中国家尤其是我国成人瓣膜病的主要病因也逐步由风湿性转为退行性。

退行性瓣膜病是一类由于结缔组织形态变化引起瓣膜结构改变, 进而导致瓣膜及其附属结构正常功能受损的非感染性瓣膜疾病, 主要表现为主动脉瓣的增厚和钙化。过去认为, 退行性瓣膜病是一种与年龄相关的退行性病变, 近年来, 越来越多的研究表明, 退行性主动脉瓣疾病是一个主动的病理生理过程, 包括慢性炎症、脂质沉积以及钙化等一系列的改变^[6]。所以, 近年来更倾向于将“退行性主动脉瓣疾病”称为“钙化性主动脉瓣疾病”。国内学者报道目前我国老年人群中, 瓣膜钙化的超声检出率为 8.1%~48.5%^[7-9]。一项对社区老年人钙化性瓣膜病五年的纵向研究结果表明, 2011 年 60 岁以上老年人钙化性瓣膜病为 15.6%, 较 2005 年的 13.4% 有明显上升^[10]。目前, 瓣膜病的治疗主要依赖于外科修复和置换, 治疗成本高, 由此带来的社会经济负担大。探索瓣膜病的发

病机制, 进一步寻求对因治疗策略已经成为瓣膜病防治研究的热点。

心脏瓣膜组织由瓣膜内皮细胞(VECs)和瓣膜间质细胞(VICs)以及细胞外基质组成。VECs 是覆盖在瓣膜表面的单层内皮细胞, 通过调节渗透、炎症以及防止血栓形成保护瓣膜内部的组织结构^[11]。VECs 在瓣膜表面, 能够直接接触到血液, 循环中的血流动力学以及血液的生化改变能够直接作用于 VECs, 外界的种种变化通过 VECs 感受并引起相应的变化, 这样的过程可能在钙化性主动脉瓣疾病的发生、发展过程中起到重要的作用^[12]。

1 血流动力学变化对主动脉瓣内皮细胞的影响

首先, 从组织学的角度来讲, 主动脉瓣组织的结构本身是对血流动力学的一种主动的适应。主动脉瓣的细胞外基质可以分为三层, 分别是位于主动脉侧的纤维层、位于左心室侧的弹力蛋白层和二者之间的疏松层。三层的分布以及组织结构很好地适应了血流动力学的需要。在收缩期, 血流由左心室流向主动脉, 血流的剪切力作用于主动脉瓣的心室侧, 心室侧的弹力蛋白被拉伸, 而主动脉侧的纤维收缩, 使主动脉侧皱缩, 瓣膜开放; 而在舒张期, 心室侧的血流剪切力减弱, 血液作用于主动脉侧, 心室侧弹力蛋白回缩, 主动脉侧的纤维回复, 主动脉瓣关闭。在整个过程中, 位于中间的疏松层起到对血液剪切力以及其引起的瓣膜相对运动的缓冲作用, 并且其内的亲水性的氨基聚糖能够稳定地吸收水分, 保证瓣膜组织能够抵抗渗透压而不会肿胀^[13]。

而从另一方面, 血流动力学也作用于主动脉瓣组织, 使其被动地适应血流动力学变化。受血流动力学影响最明显的是瓣膜内皮细胞。

首先, 血流引起的剪切力是实现瓣膜内皮细胞功能重要刺激。内皮细胞对血流剪切力的敏感性表现在许多方面, 其中最直接的是形态学的变化。在血管中, 内皮细胞能够顺着血流方向延长平行排列, 而在血流分叉处, 内皮细胞却表现

基金项目: 北京协和医学院博士生创新基金(2013-1002-47)

作者单位: 100037 北京市, 北京协和医学院 中国医学科学院 国家心血管病中心 阜外医院 心外科

作者简介: 刘汉凝 博士研究生 主要从事心血管外科的基础与临床研究 Email: fuwailhn@hotmail.com 通讯作者: 郑哲 Email: zhengzhe@fuwai.com

*为共同第一作者

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614(2015)10-1021-03 doi:10.3969/j.issn.1000-3614.2015.10.024