

## · 临床研究 ·

## 体外循环对先天性心脏病婴幼儿循环内皮祖细胞影响

任建立,姚建民,刘晋萍,程伟伟,赵向东,陆 龙,刘 静,武书玲,郑 睿

**[摘要]:目的** 通过测量围术期先天性心脏病患儿重复内皮祖细胞(EPCs)数量,明确体外循环(ECC)对循环 EPCs 的影响。**方法** 2010 年 7 月到 2010 年 12 月外科治疗先天性心脏病伴肺动脉高压患儿 40 例,分为非 ECC 组和 ECC 组,每组 20 例。非 ECC 组在非 ECC 下行胸部小切口直视封堵和动脉导管未闭结扎术; ECC 组在经典 ECC 下行各种心脏畸形矫正手术。两组患者分别于麻醉前(T1)、手术后即刻(T2)、术后 4 h(T3)、24 h(T4)、72 h(T5)抽取患儿桡动脉血,通过流式细胞仪测定外周血中 EPCs 数量。分析 ECC 对循环 EPCs 的影响。**结果** 两组患儿 T1 时间 EPCs 无显著差异( $P > 0.05$ );在 T3 时间点 ECC 组患儿循环 EPCs 数高于非 ECC 组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );术后 T2、T4、T5 时间点 ECC 组循环 EPCs 数均低于非 ECC 组和 T1 时间 EPCs 数,结果有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** ECC 可以导致术后循环 EPCs 水平的降低。

**[关键词]:** 体外循环;内皮祖细胞;先天性心脏病;婴幼儿

**[中图分类号]:**R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2012)02-0095-05

## Effect of extracorporeal circulation on circulating endothelial progenitor cells in infants with congenital heart disease

Ren Jian-li, Yao Jian-min, Liu Jin-ping, Cheng Wei-wei, Zhao Xiang-dong, Lu Long, Liu Jing, Wu Shu-ling, Zheng Rui

Department of Cardiovascular Surgery, General Hospital of Beijing military District, Beijing, 100700, China

Corresponding author: Yao Jian-min, Email: jimyao@vip.sina.com;

Liu Jin-ping, Email: jinpingfw@hotmail.com

**[Abstract]: Objective** This study was focus to observe the influence of extracorporeal circulation (ECC) on circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in infants with congenital heart disease by measuring the EPCs amount. **Methods** Between July 2010 and December 2010, 40 infants with congenital heart disease and pulmonary arterial hypertension were divided into ECC group and off-pump group. In off-pump group, 20 cases received ligation of patent ductus arteriosus and closure of atrial septal defect without cardiopulmonary bypass. In ECC group, 20 cases had open heart operations with cardiopulmonary bypass. The amount of circulating EPCs counted by flow cytometer at anesthesia completion (T1), the end of surgery (T2), 4 h (T3), 24 h (T4) and 72 h (T5) after operations. The relation of ECC and EPCs amount was analyzed. **Results** The amount of circulating EPCs in the two groups had no statistically significant differences at T1 ( $P > 0.05$ ). The amount of circulating EPCs in ECC group was significantly higher than that in off-pump group at T3 ( $P < 0.01$ ). The amount of circulating EPCs at T2, T4, T5 in ECC group was significantly lower than that at T1 and those time points in off-pump group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The levels of circulating EPCs reduce after ECC.

**[Key words]:** Extracorporeal circulation; Endothelial progenitor cells; Congenital heart disease; Infants

体外循环(extracorporeal circulation, ECC)是心脏直视手术中常用的一种心肺功能替代技术。但 ECC 是非生理状态的血液循环,不可避免对心肺血

管及组织造成不同程度的损伤。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是内皮细胞的前体细胞,主要存在于骨髓中,在炎症、缺血、肿瘤等病理状态下可从骨髓中动员入外周血液中,到达病变部位,分化为内皮细胞,修复组织和血管损伤。因此,本研究通过测量 ECC 手术围术期循环 EPCs 数,明确 ECC 对循环 EPCs 的影响。

作者单位:100700 北京,北京军区总医院心肺血管病一区(任建立、姚建民、程伟伟、赵向东、陆 龙、刘 静、武书玲、郑 睿);100037 北京,中国医学科学院北京协和医学院阜外心血管病医院体外循环科(刘晋萍)

通讯作者:姚建民,Email:jimyao@vip.sina.com;

刘晋萍,Email:jinpingfw@hotmail.com

## 1 资料与方法

### 1.1 实验对象纳入、排除标准及一般资料

**1.1.1 纳入标准** ①患儿为左向右分流的先天性心脏病,年龄 < 3 岁。②伴中度以上肺动脉高压(肺动脉收缩压/体动脉收缩压  $\geq 0.45$ ),患儿肺动脉压力均经术前超声评估。③患者符合手术适应证,经家属签署知情同意手术。

**1.1.2 排除标准** ①患儿为紫绀性心脏病,手术时间过长 > 180 min,手术时间过短 < 30 min。②一周内有中、重度感染发生。③伴有血液系统疾病或严重心、肝、肾功能不全疾病。④患有恶性肿瘤及全身免疫性疾病者。

**1.1.3 临床资料和分组** 2010 年 7 月到 2010 年 12 月,外科治疗先天性心脏病伴中重度肺动脉高压患儿 40 例,分为非 ECC 组和 ECC 组,每组各 20 例, ECC 手术患儿 20 例,在低温 ECC 下进行的各种心脏畸形矫正手术。男 11 例,女 9 例;年龄 2 ~ 32 (10.6  $\pm$  10.5) 个月;身高 55 ~ 94 (68.6  $\pm$  23.7) cm;体重 3.5 ~ 15.3 (7.6  $\pm$  3.5) kg;肺动脉压力 (57.3  $\pm$  9.1) mm Hg;单纯室间隔缺损 (VSD) 6 例, VSD + 房间隔缺损 (ASD) 4 例, VSD + 三尖瓣关闭不全 (TI) 2 例, VSD + ASD + TI 3 例, VSD + 动脉导管未闭 (PDA) 2 例, VSD + 右室双出口 (DORV) + 肺动脉瓣关闭不全 (PI) 1 例, VSD + 大动脉转位 (TGA) 1 例, VSD + DORV + TI + TGA + 二尖瓣关闭不全 (MI) 1 例。非 ECC 手术患儿 20 例,在非 ECC 下行胸部小切口介入封堵和动脉导管未闭结扎术。男 12 例,女 8 例;年龄 4 ~ 34 (12.4  $\pm$  11.8) 个月;身高 60 ~ 104 (76.2  $\pm$  27.4) cm;体重 5.0 ~ 17.3 (8.4  $\pm$  4.3) kg,肺动脉压力 (52.4  $\pm$  6.3) mm Hg。ASD 13 例, PDA 7 例。

### 1.2 手术方法

**1.2.1 ECC 装置及预充** Stockert 5 型人工心肺机, Dideco 901、902 型膜式氧合器, Jostra 血液超滤器, 婴儿型循环管道, 停搏液为 St. Thomas 液, 预充液由红细胞悬液、勃脉力 A (Plasmalyte - A)、20% 人血白蛋白、5% 碳酸氢钠、10% 葡萄糖酸钙、速尿 (5 ~ 10 mg) 等组成。

**1.2.2 ECC 手术** 患儿均采用静脉吸入复合麻醉, 气管插管。于右侧颈内静脉放置双腔深静脉导管, 右侧桡动脉测压。患儿取仰卧位, 消毒铺巾后, 行胸部正中切口, 常规插管建立 ECC 并转流, 待鼻咽温降至 32℃ 后阻断升主动脉, 于升主动脉根部灌注改良 St. Thomas 液, 心脏停跳后行心内畸形矫治

术 (VSD 和 ASD 补片修补或直接缝合术, DORV 心室内隧道修复术, TGA 大动脉转换术等), 常规关胸, 安置心包、纵隔引流管, 术毕转至重症监护室。

**1.2.3 非 ECC 手术** 麻醉方法同 ECC 手术。①动脉导管结扎手术: 行左胸后外侧切口第四肋间进胸, 切开纵膈胸膜, 显露动脉导管, 双 10 号丝线结扎动脉导管, 缝合胸膜, 安放胸腔引流, 关闭胸腔, 术毕转至重症监护室。②经胸小切口房间隔缺损封堵术: 于右侧胸骨旁第四肋间行 3 ~ 5 cm 切口入胸腔, 剪开心包并悬吊于胸壁上, 暴露右心房, 用 5 - 0 号涤纶线在右房外侧壁行荷包缝合, 直径约 7 ~ 9 mm; 在荷包中央穿刺入右心房, 在食管超声引导下将推送导管经右心房和房间隔缺损送入左心房, 经推送导管送入合适型号的 ASD 封堵器。反复推拉闭合器确认无移位, 经食管超声显示无血液穿隔分流后, 释放闭合器, 退出推送导管, 结扎荷包缝线, 缝合心包切口, 关闭胸腔, 术毕转至重症监护室。

### 1.3 观察指标和方法

**1.3.1 观察指标** ①两组于患儿麻醉后 (T1)、术毕 (T2)、手术结束后 4 h (T3)、24 h (T4)、72 h (T5) 抽取桡动脉血查 EPCs 数及血气。通过流式细胞仪测定外周血中 EPCs 数量。观察循环 EPCs 变化。②记录患者术后呼吸机使用时间, ICU 停留时间, 观察术后并发症, 分析 EPCs 与 ECC 时间之间的关系。

**1.3.2 循环 EPCs 水平检测** 目前比较公认的是, 将具有 CD34 +、CD133 + (AC133 +)、VEGFR - 2 + 等表面标志的细胞认为是 EPCs。本实验采用 CD34、CD133 标记, 以 CD34、CD133 双阳性为 EPCs。具体步骤如下: ①分别于各时间点取血于 EDTA - K2 抗凝管中, 轻轻摇匀以充分抗凝。保存于 2 ~ 8℃ 环境中, 12 h 内送检。②样品染色: 取 2 支流式管, 每管加入 300  $\mu$ l 全血, 分为同型对照管和 CD34 + CD133 检测管。同型对照管加入同型对照抗体, 检测管加入 5  $\mu$ l 的 CD34 - APC 抗体, 7  $\mu$ l CD133 - PE 抗体。加入 FcR 阻断剂, 充分混匀, 室温避光 15 min。③每管加入 2 ml 的溶血素 (1X), 混匀, 室温避光 10 min。1 500 转/min, 离心 5 min, 弃上清。若溶血不充分, 可再加 0.5 ml 的溶血素 (1X), 重复本步骤。④每管加入 2 ml 的 PBS, 1 500 转/min, 离心 5 min, 弃上清。⑤每管加入 0.5 ml 的 PBS, 4 h 内上机检测。如不能上机加入 1% 的多聚甲醛, 24 h 内上机。⑥采用 FACSCalibur 流式细胞仪以 Cell Quest 软件进行分析。在前向角和侧向角散射光双参数点图上对单个核细胞群设窗, 计数 20

万单个核细胞中 CD34、CD133 双阳性细胞的数量,表示外周血的循环 EPCs 水平。

**1.4 统计学处理** 统计分析应用 SPSS 16.0 软件处理,各数据采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用 *t* 检验,方差不齐用 *t'* 检验。 $P < 0.05$  为有统计学意义,计数资料采用行  $\chi^2$  列表的  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组患者一般资料** 两组患者性别、年龄、体重、身高、手术时间 [(110.8 ± 47.7) min vs (89.1 ± 33.9) min] 差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.2 术后两组患儿外周 EPCs 变化** ① ECC 组患儿各时间点外周血中每 20 万单个核细胞中循环 EPCs 数如表 1。两组患儿 T1 时间的循环 EPCs 无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 在 T3 时间 ECC 组患儿循环 EPCs 数高于非 ECC 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 术后 T2、T4、T5 时间点 ECC 组循环 EPCs 均低于非 ECC 组和 T1 时间的循环 EPCs 数, 结果有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。非 ECC 手术组, 术前及术后循环中 EPCs 量波动不大, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。② ECC 术后循环 EPCs 数量的变化趋势: 在 ECC 结束时、术后 4 h 及术后 24 h 波动较大, 呈现出手术中循环 EPCs 水平快速降低, 术后到术后 4 h 又快速升高, 术后 4 h 到 24 h 循环 EPCs 数第 2 次快速降低, 而 24 h 后循环 EPCs 数缓慢上升, 但一直维持在较低水平。③ ECC 时间与术后循环 EPCs 数量的相关性分析: 以 ECC 时间为自变量, T2 时的循环 EPCs 数为因变量行相关分析。结果表明 ECC 时间与 T2 时的循环 EPCs 数呈负相关, ( $r = -0.69$ ,  $P < 0.01$ ) 见表 1。

**2.3 患者术后肺部相关并发症情况** ① 两组患者

均无手术死亡。ECC 组 1 例合并重度肺动脉高压的患儿, 术后发生呼吸窘迫综合征 (ARDS), 给予吸痰、体疗和呼吸机治疗后治愈, 两组间结果无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。② ECC 术后, 患儿均有不同程度发热, 一般集中在术后 4 ~ 12 h。ECC 组患儿发生术后发热率 (17/20) 明显高于非 ECC 组患儿 (7/20), 结果有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。③ 术后呼吸机使用时间及 ICU 住院时间, ECC 患儿明显长于非 ECC 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

## 3 讨论

1953 年 Gibbon<sup>[1]</sup> 等成功应用 ECC 修补 1 例房间隔缺损患者, 使得心内直视手术成为可能。经历近 60 年的发展, 已被广泛应用于各种心脏及大血管直视手术中。ECC 为心脏手术提供了良好的手术视野和无血环境, 并维持了其它组织器官的血流供应, 但 ECC 不同于生理循环, 并且选择性的阻断了心肺血流, ECC 后缺血与再灌注引起的心肺损伤仍然是婴幼儿特别是合并中重度肺动脉高压患儿常见的并发症之一, 同时 ECC 也给脑、肝、肾等器官带来了不同程度的损伤。近年来发现当组织器官受损后, EPCs 在缺血、损伤、应激等内源性因素及药物等外源性因素作用下, 从骨髓中动员后释放入体循环中, 在各种趋化因子作用下, 逐步募集在缺血或损伤部位, 分化为成熟的内皮细胞, 参与受损部位的血管发生和血管生成<sup>[2]</sup>。

目前发现 EPCs 与心、肺、脑、肝、肾等组织器官损伤后愈合密切相关。研究发现冠心病患者循环 EPCs 数量, 可以预测心血管病事件的预后, 冠状动脉多支病变患者 EPCs 明显低于单支病变患者及无冠心病患者<sup>[3-5]</sup>。而给予心肌缺血小鼠体内移植 EPCs, 发现可以减少心肌梗死面积, 保护心功能<sup>[6-7]</sup>。

表 1 各时间点循环 EPCs 数变化 (个/20 万单个核细胞,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	T1	T2	T3	T4	T5
非 ECC 组	61.30 ± 17.87	62.15 ± 17.08	63.95 ± 19.00	58.20 ± 17.17	59.50 ± 18.32
ECC 组	62.05 ± 19.24	37.50 ± 15.08	124.40 ± 44.04	18.60 ± 11.70	31.80 ± 13.45
<i>P</i> 值	>0.5	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 2 两组患者术后相关监测指标 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	术后发热 (例)	ARDS (例)	呼吸机使用时间 (h)	ICU 时间 (h)
非 ECC 组	7/20	0/20	3.46 ± 1.87	13.63 ± 6.39
ECC 组	17/20	1/20	12.68 ± 4.23	30.84 ± 11.84
<i>P</i> 值	<0.01	>0.05	<0.01	<0.01

在肺急性肺损伤方面,循环中 EPCs 培养后集落数高的患者病情改善明显<sup>[8]</sup>。而且,通过给予急性肺损伤模型动物移植 EPCs 可以明显减轻肺组织损伤,通过抑制 EPCs 动员可导致肺组织纤维化修复<sup>[9-10]</sup>。用野百合碱诱导鼠 PAH,3 周后移植转染了人 eNOS 基因的 EPCs,结果发现移植 2 周后能逆转第 3 周已经形成的肺部病变,恢复毛细血管灌注,降低肺微小动脉的肌化及右心室收缩期压力,完全阻断野百合碱处理引起的死亡<sup>[11]</sup>。在脑组织损伤方面研究显示,EPCs 具有减轻缺血性及缺血再灌注等造成的脑组织损伤<sup>[12-14]</sup>。给予大脑中动脉阻塞处理的小鼠移植 EPCs 可以减轻缺血急性期大脑损伤,促进血管生成及再生,达到脑损伤组织修复作用<sup>[15]</sup>。而在肾缺血性损伤方面,EPCs 能够募集至缺血肾组织,减轻肾缺血性损伤及缺血导致的尿酸升高。<sup>[16-18]</sup>

可见循环中高水平的 EPCs 有益于 ECC 术后各脏器的恢复。本研究显示除术后 4 小时 EPCs 数量短时间升高外,术后循环 EPCs 数大部分时间维持在较低水平。相关性分析表明 ECC 结束时循环的 EPCs 数量与 ECC 时间呈负相关、说明 ECC 导致了术后循环 EPCs 水平的降低,ECC 时间是影响术后循环 EPCs 降低的重要因素。各时间点循环 EPCs 的变化原因主要为:T2 降低:①ECC 使 EPCs 大量破坏,如:泵和管道的机械破坏。②ECC 预充液稀释了外周血的 EPCs。③低温导致骨髓释放合成 EPCs 减少等。T3 升高:可能是由于心肺缺血再灌注损伤和 ECC 引起的全身炎症反应释放大量炎症趋化因子[血管生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质细胞衍生因子-1(Stromalcell-derived factor-1, SDF-1)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)等],这些趋化因子促使骨髓释放 EPCs 进入外周血液<sup>[19-20]</sup>。相关研究也证实循环 EPCs 数量和 VEGF、SDF-1 成正相关<sup>[21-23]</sup>。T4、T5 时间循环 EPCs 降低则可能与 EPCs 聚集至受损器官参与损伤修复有关。

从 ECC 后 EPCs 的总体变化趋势及术后 EPCs 数与 ECC 之间的关系可以看出,ECC 导致了循环 EPCs 的降低,ECC 时间是影响 EPCs 降低的重要因素。这不利于 ECC 术后各器官损伤修复,因此,ECC 术后通过各种手段提高循环 EPCs 数,可能为 ECC 术后各种并发症的治疗提供一种新的方法。

## 参考文献:

- [1] GIBBON JH Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery [J]. *Minn Med*, 1954, 37(3):171-185.
- [2] Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, *et al.* Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 58(2):478-486.
- [3] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(10):999-1007.
- [4] Kunz GA, Liang G, Cuculi F, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity [J]. *Am Heart J*, 2006, 152(1):190-195.
- [5] Wojakowski W, Tendera M. Mobilization of bone marrow-derived progenitor cells in acute coronary syndromes [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005, 43(4):229-232.
- [6] Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, *et al.* Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia [J]. *Circulation*, 2001, 103(5):634-637.
- [7] Ott I, Keller U, Knoedler M, *et al.* Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction [J]. *FASEB J*, 2005, 19(8):992-994.
- [8] Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, *et al.* Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(7):854-860.
- [9] Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, *et al.* Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury [J]. *J Immunol*, 2004, 172(2):1266-1272.
- [10] Lam CF, Liu YC, Hsu JK, *et al.* Autologous transplantation of endothelial progenitor cells attenuates acute lung injury in rabbits [J]. *Anesthesiology*, 2008, 108(3):392-401.
- [11] Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, *et al.* Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease [J]. *Circ Res*, 2005, 96(4):442-450.
- [12] Ohta T, Kikuta K, Imamura H, *et al.* Administration of ex vivo-expanded bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Neurosurgery*, 2006, 59(3):679-686; discussion 679-86.
- [13] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, *et al.* Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* [J]. 2004, 114(3):330-338.
- [14] Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, *et al.* Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(13):3444-3453.