

卵圆孔未闭封堵术在少量右向左分流患者中的临床疗效评价

曹月诚 姜海英 石秋林 王金星 王小祥 陈登峰

(衡水市人民医院心外科, 河北 衡水 053000)

【摘要】目的 探讨伴有少量右向左分流(RLS)的卵圆孔未闭(PFO)行经导管封堵术的临床疗效、安全性及预后。**方法** 本研究选取 2015 年 7 月—2017 年 12 月衡水市人民医院心外科行 PFO 封堵术的患者共 30 例,其中伴有少量 RLS 者 11 例(A1 组),伴有中到大量 RLS 者 19 例(A2 组);选取同期行药物治疗的 PFO 患者 30 例为对照组(B 组)。对比分析了各组卒中复发率、手术组的手术成功率及预后等指标。**结果** 经导管封堵少量 RLS 组与中到大量 RLS 组术后均无残余分流,手术成功率 84.6%,与药物治疗相比,少量 RLS 组行 PFO 封堵术可取得与伴有中到大量 RLS 组同样的临床疗效,均可降低卒中复发率。**结论** 伴有少量 RLS 的 PFO 患者亦可考虑行 PFO 封堵术,但该结果需进一步的前瞻性研究证实。

【关键词】 卵圆孔未闭;右向左分流;经导管封堵术;卒中

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2019.07.024

Clinical Evaluation of Patent Foramen Ovale Closure in Slight Right-to-left Shunt Patients

CAO Yuecheng, XIAN Haiying, SHI Qiulin, WANG Jinxing, WANG Xiaoxiang, CHEN Dengfeng

(Department of Cardiac Surgery, People's Hospital of Hengshui City, Hengshui 053000, Hebei, China)

【Abstract】Objective To investigate the clinical efficacy, safety and prognosis of transcatheter patent foramen ovale (PFO) closure for a slight right-to-left shunt (RLS). **Methods** A total of 30 patients who underwent PFO occlusion from July 2015 to December 2017 in Hengshui People's Hospital were selected, including 11 patients with a small amount of RLS (A1 group) and 19 patients with moderate to large RLS (A2 group). 30 patients with PFO who were treated with drugs at the same time were selected as control group (group B). The recurrence rate of stroke, the success rate of operation and prognosis in each group were compared and analyzed. **Results** There was no residual shunt in transcatheter closure of small amount of RLS group and medium and large amount of RLS group, and the success rate of operation was 84.6%. Compared with drug therapy, PFO occlusion in a small amount of RLS group could achieve the same clinical effect as that of medium and large amount of RLS group, and significantly reduce the recurrence rate of stroke. **Conclusion** PFO occlusion should also be considered for PFO patients with a small amount of RLS. However, further prospective studies are needed.

【Key words】 Patent foramen ovale; Right-to-left shunt; Transcatheter closure; Stroke

卵圆孔是胚胎时期心房原发间隔和继发间隔的一个生理性通道,绝大多数人在出生后 1 周岁内闭合,若超过 3 周岁仍未闭合,则称之为卵圆孔未闭(patent foramen ovale, PFO)。一般认为,大约 25% 的成年人存在 PFO^[1]。国内外很多研究均证实 PFO 与反常栓塞有关,而反常栓塞可以引起多种临床表现,如:隐匿

性缺血性卒中、偏头痛、不明原因的头晕和晕厥、短暂性脑缺血发作(transient ischemic attack, TIA)等^[2]。PFO 封堵的中国专家共识^[3]与一些国外研究均指出伴有中到大量右向左分流(right-to-left shunt, RLS)的 PFO 患者才适用于试行 PFO 封堵以降低患者反常栓塞的复发概率。而伴有少量 RLS 的 PFO 患者行 PFO

基金项目:衡水市科技计划项目(2016014086Z)

通讯作者:陈登峰, E-mail: cdfcyc2016kt@163.com

封堵术的必要性及临床疗效仍存在争议。因此,作者评估了在本院行经导管封堵术治疗伴少量 RLS 的 PFO 患者手术成功率、安全性及术后临床疗效,同时进一步证实 PFO 封堵术与应用抗血小板聚集药物治疗对防治反常栓塞事件的疗效评价。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2015 年 7 月—2017 年 12 月衡水市人民医院心外科行 PFO 封堵术的患者共 30 例为 A 组。其中伴有少量 RLS(I 级)患者 11 例(A1 组),伴有中到大量 RLS(Ⅱ、Ⅲ级)患者 19 例(A2 组);选取同期行药物保守治疗的 PFO 患者 30 例为对照组(B 组),药物治疗组给予口服拜阿司匹林 100 mg/d 治疗。所有患者术前均完善头颅 MRI、脑动脉 CT 血管成像(CTA)、肺动脉 CTA、心电图、超声心动图、血常规、血生化等相关检查及化验,查无明显手术禁忌证。

入选标准:(1)经胸超声心动图声学造影(transthoracic encocardiography, TTE)或经食管超声心动图检查证实存在 PFO 伴有 RLS;(2)右心声学造影提示存在 RLS;(3)此次住院及院前发生过因反常栓塞导致的脑卒中/反复偏头痛/TIA 等心脑血管事件。

排除标准:(1)年龄>60 岁;(2)心电图提示阵发性心房颤动者;(3)肺动脉 CTA 提示存在肺动静脉瘘者;(4)可以找到其他明显脑栓塞的原因者(如伴有严重动脉粥样硬化、血管炎等);(5)因其他系统性疾病存在抗血小板聚集禁忌证者;(6)存在 PFO 封堵禁忌证者。

1.2 RLS 分级

所有患者均进行超声心动图检查+右心声学造影检查,具体操作流程如下:(1)激活生理盐水制备:于患者左肘正中静脉留置静脉通路,连接三通管,将两支注射器(20 mL)相连,将生理盐水、空气、血液在两支注射器之间来回推注(1 mL 空气+1 mL 患者自体血+8 mL 生理盐水混合),使之充分混合后存于 1 支注射器,其为激活生理盐水。(2)患者取左侧卧位,连接心电图,经胸超声仪器(PHILIPS EPIQ 7C)探头下显示心尖四腔切面,指导患者做有效的 Valsalva 动作,将制备好的激活生理盐水于左侧肘正中静脉“弹丸式”注射。观察静息状态下、右心显影后及 Valsalva 动作停止后左心有无微泡显影及显影的量,记录右心显影时间,留取动态图。

量化 RLS 分级标准,0 级:左心腔内没有微泡;I 级:左心腔内 1~10 个微泡/帧,为少量;Ⅱ级:左心腔

内 11~30 个微泡/帧,为中量;Ⅲ级:左心腔内可见>30 个微泡/帧,或左心腔几乎充满微泡,为大量^[3]。

1.3 PFO 封堵术

局麻下穿刺右股静脉,置入 6 F 下肢静脉鞘,送入 5 F 端侧孔导管行右心导管检查,经股静脉途径置入 PFO 封堵伞,术中行经胸超声心动图检查了解封堵伞位置、残余分流情况及与二、三尖瓣瓣膜关系。确认无残余分流、不影响瓣膜开闭,再完全释放封堵器同时撤出输送系统,再次经超声确认无残余分流,未影响到瓣膜开闭视为手术成功。术后 1 周内均行心电图、X 射线胸片及 TTE 检查评价临床疗效。

术后第一天给予低分子肝素钙 4 100 U 抗凝(每 12 h 一次),同时开始口服阿司匹林 100 mg/d 和硫酸氯吡格雷 75 mg/d 双联抗血小板聚集治疗 3 个月,3 个月后继续单服阿司匹林 100 mg/d 治疗 3 个月。

1.4 围手术期主要观察指标及术后随访

观察术中及术后 1 周内指标:手术操作时间,成功率、并发症情况(Ⅲ°房室传导阻滞、心包压塞)、术后残余分流情况、术后卒中等反常栓塞事件发生率,以及观察随访过程中主要终点事件及次要终点事件的发生率。

所有患者于术后第 1、3、6、12 个月在门诊随访,询问病史(有无脑卒中、偏头痛、TIA 等反常栓塞事件复发),行常规心电图、胸部 X 射线片、经胸超声心动图检查,第 1、6 个月均行经胸超声心动图声学造影检查明确有无残余分流,1 年后以电话随访为主。主要终点事件:卒中、偏头痛、TIA 等反常栓塞事件。次要终点事件:新发心房颤动、心肌梗死、出血(消化道出血、经期明显延长)、死亡(不明原因)等。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以例(%)表示,组间比较采用卡方检验(χ^2)或校正 χ^2 检验,或 Fisher 精确概率法。用 Kaplan-Meier 曲线(log rank 法)比较 3 组间的无缺血时间生存率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入选患者的一般情况

经导管封堵组(A 组)与药物治疗组(B 组)患者年龄、性别、高血压史、糖尿病史、冠心病史、吸烟史、偏头痛史、TIA 史、心脏四腔内径及心功能、RLS 分流级别等均无统计学差异(表 1)。同样的结果也见于 A1 和 A2 组间上述指标的比较(表 2)。

表 1 两组 PFO 患者基本临床资料比较

	药物组 ($n=30$)	手术组 ($n=30$)	t 或 χ^2	P
年龄(岁)	41.0 ± 7.3	39.4 ± 7.9	0.866	0.390
性别(男/女)	11/19	13/17	0.278	0.598
吸烟(%)	10(33.3)	9(30.0)	0.077	0.781
高血压(%)	7(23.3)	4(13.3)	1.002	0.317
冠心病(%)	5(16.7)	7(23.3)	0.417	0.519
糖尿病(%)	2(6.7)	3(10.0)	0.000	1.000
TIA(%)	3(10.0)	5(16.7)	0.144	0.704
偏头痛(n,%)	12(40.0)	15(50.0)	0.606	0.436
右房内径(mm)	24.3 ± 3.9	25.1 ± 4.5	-0.702	0.486
左房内径(mm)	24.5 ± 3.8	25.4 ± 4.9	-0.761	0.450
右室内径(mm)	25.4 ± 3.2	26.1 ± 3.7	-0.594	0.555
左室内径(mm)	42.9 ± 3.6	44.0 ± 4.4	-1.085	0.282
射血分数(%)	65.3 ± 3.7	64.4 ± 4.6	0.798	0.428
RLS 分级(I级)(%)	18(60.0)	11(36.7)	3.270	0.071

注:表中数据描述形式为 $\bar{x} \pm s$ 或例(%); $P < 0.05$ 。

表 2 A1 和 A2 组 PFO 患者基本临床资料比较

	手术组		t 或 χ^2	P
	A1 组 ($n=11$)	A2 组 ($n=19$)		
年龄(岁)	41.2 ± 6.2	38.2 ± 8.1	1.011	0.321
性别(男/女)	5/6	8/11		1.000 [△]
吸烟(%)	5(45.5)	4(21.1)		0.225 [△]
高血压(%)	1(9.1)	3(15.8)		1.000 [△]
冠心病(%)	4(36.4)	3(15.8)		0.372 [△]
糖尿病(%)	1(9.1)	2(10.5)		1.000 [△]
TIA(%)	1(9.1)	4(21.1)		0.626 [△]
偏头痛(n,%)	4(36.4)	10(52.6)		0.466 [△]
右房内径(mm)	24.1 ± 3.7	25.6 ± 4.9	-0.862	0.396
左房内径(mm)	23.9 ± 3.8	26.2 ± 5.4	-1.249	0.222
右室内径(mm)	24.9 ± 3.6	26.6 ± 3.8	-1.197	0.241
左室内径(mm)	43.2 ± 3.5	44.5 ± 4.9	-0.764	0.452
射血分数(%)	65.1 ± 4.3	64.0 ± 4.9	0.586	0.562

注:表中数据描述形式为 $\bar{x} \pm s$ 或例(%); $P < 0.05$;[△]为确切概率法 P 值。

2.2 经导管封堵组手术成功率、安全性及术后并发症

经导管封堵组中,A1 组有 2 例因反复尝试后导丝仍无法通过卵圆孔,放弃封堵,手术成功率为 84.6% (11/13),手术未成功者不纳入研究对象;A2 组手术成功率 100%,术后第 2 天有 1 例发生一过性Ⅲ°房室传导阻滞,自行恢复。A1 组手术时间较 A2 组的 PFO 患者手术时间延长,有统计学差异[(64.6 ± 17.2) min vs (47.3 ± 11.8) min, $t = 3.27$, $P = 0.003$]。手术组患者术中及术后 1 周均无残余分流、心包压塞、卒中等事件的发生。

2.3 随访

术后随访 1 ~ 12 个月,A1 组与 A2 组反常栓塞等事件的发生率比较无统计学差异;与 B 组相比,反常栓塞事件的发生率明显降低,两组之间次要终点事件的发生率无统计学差异;其中,A1 组与 B 组相比,主要终点事件(卒中、偏头痛、TIA 等)有统计学差异,次要终点事件,包括新发心房颤动、心肌梗死、出血(消化道出血、经期明显延长)、死亡等事件无统计学差异,见表 3。A 组、B 组、A1 组三组间无缺血事件(卒中、TIA、死亡),生存率比较差异无统计学意义(Kaplan-Meier 曲线, $P = 0.123$, $\chi^2 = 4.189$),见图 1。

表 3 术后随访临床资料比较

	药物组 (n = 30)	手术组 (n = 30)	A1	A2	t 或 χ^2	P
随访时间(月)	11.5 ± 1.9	11.7 ± 1.1			-0.777	0.44
主要终点(n, %)	15(46.7)	5(16.7)			7.5	0.006*
卒中	4	1	0	1		
偏头痛	5	2	0	2		
TIA	6	2	1	1		
合计			1(9.1)	4(21.1)		0.626 Δ
	15(46.7)		1(9.1)		4.072	0.044*
次要终点(n, %)	2	5(33.3)			0.144	0.704
新发心房颤动	1	4				
心肌梗死	0	0				
出血	0	0				
死亡		1				

注:表中数据描述形式为 $\bar{x} \pm s$ 或例(%);* $P < 0.05$; Δ 为确切概率法 P 值。

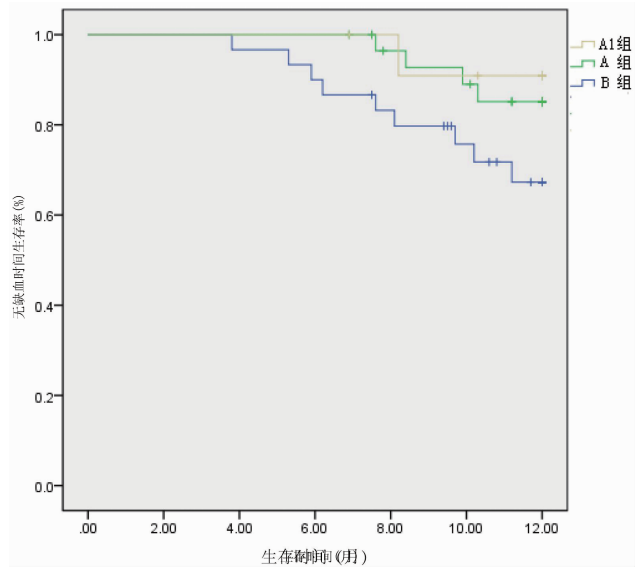


图 1 无缺血事件患者生存率的 Kaplan-Meier 曲线

3 讨论

既往认为,PFO 作为常见先天性心脏病的一种,它的存在不会对血流动力学产生影响,因此它不需要特殊处理。近年来,国内外许多学者研究证实,大约 25% 的成年人存在 PFO,在正常情况下,左房压略高于右房压,此时卵圆孔大多处于关闭状态,当此类人群存在慢性(如:慢性阻塞性肺疾病者)或短暂性(如:睡眠呼吸暂停综合征者、情绪激动或做 Valsalva 动作时)的右房压升高的因素,导致右房压高于左房压,则可能出现房间隔水平的 RLS,此时存在于静脉系统的各类微栓子、5-羟色胺等血管活性物质,通过未闭的卵圆孔,越过肺循环,直接进入左心系统到达体循环,引起动脉系统的反常栓塞,继而导致隐匿性脑卒中、偏头

痛、TIA 发作、非阻塞性心肌梗死、不明原因头晕,甚至晕厥等心脑血管事件的发生^[4-5]。

随着介入技术的飞速发展,PFO 封堵术已发展成为一项手术成功率极高、术后并发症少的相对成熟的手术。国内外多项研究结果证实 PFO 封堵术对于治疗伴有反常栓塞的隐匿性缺血性卒中患者其效果明显优于应用药物保守治疗^[6-7]。在此研究中,笔者也观察到 PFO 封堵术较药物治疗降低了主要终点事件(卒中、偏头痛、TIA 等)的发生率,未明显影响到次要终点事件的发生。然而,许多专家学者认为,只有伴有中到大量的 RLS 患者适用于行 PFO 封堵^[8-9]。笔者通过临床病例的观察、分析发现,伴有少量 RLS 的 PFO 患者(经食管超声心动图检查证实存在 RLS 且检查过程中左心腔内发现 1~10 个微泡/帧),行经皮封堵术的手术操作成功率较伴有中到大量 RLS 患者略低,手术操作的时间略延长,但二者术后主要终点事件的发生差异无统计学意义,这在既往相关研究中也观察到类似的疗效^[10]。对于此类少量分流的患者,笔者通常经桡动脉/股动脉置入猪尾导管至主动脉根部标记主动脉窦底,经股静脉应用超滑导丝将多功能血管造影导管(MPA-2 导管)置入上腔静脉,X 射线透视下左前斜 45°缓慢下拉 MPA-2 导管,当导管滑过主动脉丘时,继续缓慢下拉,此时多可见导管“跳跃”进入卵圆窝,在此区域应用超滑导丝反复探卵圆孔右房面开口,多可成功;如卵圆孔左房面开口极小,不易通过,可将超滑导丝翻转,以超滑导丝硬头加强 MPA-2 导管支撑力,当导丝缓慢“爬行”进入左房至肺静脉,经输送装置置入 PFO 封堵伞,经胸超声确认后释放封

堵伞。同时,笔者的研究结果显示,伴有少量 RLS 的 PFO 患者行封堵术后主要终点事件低于药物治疗组,具有统计学差异,提示对少量 RLS 的 PFO 患者行封堵术在降低脑血管事件的发生率上效果可能优于药物治疗。有文献报道,随着医学影像技术的发展,超声检查清晰显示活体心脏 PFO 处骑跨的长血栓。笔者认为,少量的 RLS 患者有可能是由于 PFO 本身孔道比较狭长细小,亦有可能是因孔道内存在骑跨血栓导致孔道变得细小^[11]。对于因骑跨血栓导致右心声学造影检查出现少量 RLS 的 PFO 患者,应该积极行 PFO 封堵,但术中操作应注意预先给予较大剂量的抗凝剂以防止骑跨血栓脱落导致术中急性栓塞等不良事件的发生。

由于本研究纳入的病例数量较少,增大样本量是否会导致研究数据的变化,特别是伴有少量 RLS 的 PFO 患者行 PFO 封堵术与药物保守治疗组的差异性是否会缩小,有待商榷,需要进一步收集更多的相关病例进行验证,这也是本研究的局限性所在。

综上所述,笔者认为,对于存在 RLS 分流的 PFO 患者,PFO 封堵术治疗反常栓塞的临床疗效优于药物治疗。即使仅存在少量 RLS,在征得患者及家属同意后,也可行 PFO 封堵术,因其手术操作安全性高、并发症发生率低,且术后复发反常栓塞事件的概率明显降低,具有较明显的临床意义。这一观点尚需多中心的临床观察研究进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(12): 1890-1900.
- [2] 黄浩佳,胡海波. 经导管卵圆孔未闭封堵术后残余分流影响因素及研究现状分析[J]. 心血管病学进展,2017,38(3):243-246.
- [3] 中华医学会心血管内科分会,中国医师协会心血管内科分会. 卵圆孔未闭预防性封堵术中国专家共识[J]. 中国循环杂志,2017,32(3):209-2014.
- [4] 赵龙,郭俊晓,王坚,等. 卵圆孔未闭经导管封堵术 22 例临床分析[J]. 中国药物与临床,2017,17(1):91-92.
- [5] 张云,曾智. 卵圆孔未闭封堵治疗预防脑卒中的再认识[J]. 心血管病学进展,2014, 35(3):275-278.
- [6] Carroll JD, Saver JL, Thaler DE, et al. Closure of patent foramen ovale versus medical therapy after cryptogenic stroke [J]. N Engl J Med, 2013, 368(12): 1092-1100.
- [7] Diener HC, Gerloff C, Thaler DE, et al. Closure of patent foramen ovale and cryptogenic stroke: unresolved issues[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2018, 18(12):92.
- [8] Pristipino C, Anzola GP, Ballerini L, et al. Management of patients with patent foramen ovale and cryptogenic stroke:a collaborative, multidisciplinary, position paper: executive summary [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2013, 82(1): 122-129.
- [9] Farb A, Ibrahim NG, Zuckerman BD. Patent foramen ovale after cryptogenic stroke-assessing the evidence for closure[J]. N Engl J Med, 2017, 377(11): 1006-1009.
- [10] Meier B, Kalesan B, Mattle HP, et al. Percutaneous closure of patent foramen ovale in cryptogenic embolism [J]. N Engl J Med, 2013, 368(12): 1083-1091.
- [11] Brogno D, Lancaster G, Rosenbaum M. Embolus interruptus[J]. N Engl J Med, 1994, 330(5): 1761-1762.

收稿日期:2019-06-27

投稿须知

本刊既往审稿发现以下常见投稿错误,请投稿之前注意检查。(1)中英文标题需简洁。(2)中文摘要累赘,不能说明目的;英文摘要写得不好或极差;关键词最少 3 个。(3)缺少前言,或前言不能提纲挈领。(4)主体内容或罗列试验或逻辑混乱或总结演绎不够。(5)论著中缺少诊断标准、纳入及排除标准;论著中缺少详细研究过程;论著讨论未能结合研究结果展开。(6)本刊论著要求写明研究的优点及缺点。(7)本刊参考文献有固定格式,请按本刊固定格式书写。(8)部分作者稿件中存在标点符号在中英文状态下错误的情况,需要修正。

《心血管病学进展》编辑部

利拉鲁肽通过促进自噬减轻去氧肾上腺素诱导的原代大鼠心肌肥厚

吉家钗¹ 陈娟¹ 符策岗²

(1. 中南大学湘雅医学院附属海口市人民医院全科医学科, 海南 海口 570208; 2. 上海市第六人民医院-海口市骨科与糖尿病医院骨科, 海南 海口 570000)

【摘要】目的 探究利拉鲁肽(liraglutide)对去氧肾上腺素(phenylephrine, PE)诱导的原代大鼠心肌肥厚的影响。**方法** 原代大鼠心肌随机分成4组:对照组、利拉鲁肽组、PE组、PE+利拉鲁肽组。对照组原代大鼠心肌细胞接受2 μ L 二甲基亚砷刺激48 h;利拉鲁肽组接受1 μ M 利拉鲁肽刺激48 h;PE组接受50 μ M PE刺激48 h;PE+利拉鲁肽组接受1 μ M 利拉鲁肽联合50 μ M PE刺激48 h。通过Western Blot检测有关信号通路变化;qPCR检测心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、 α -肌球蛋白重链(α -MHC)和 β -肌球蛋白重链(β -MHC)的变化;通过免疫荧光染色检测原代大鼠心肌细胞表面积变化。**结果** 接受不同刺激48 h后,PE组相对于对照组ANP、BNP和 β -MHC的mRNA水平明显升高(P 值均 <0.001), α -MHC的mRNA水平显著降低($P<0.001$),自噬明显增强($P<0.01$),原代大鼠心肌细胞表面积显著增加($P<0.05$);PE+利拉鲁肽组ANP、BNP和 β -MHC的mRNA水平明显低于PE组($P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$), α -MHC的mRNA水平显著高于PE组($P<0.05$),自噬水平显著高于PE组($P<0.001$),原代大鼠心肌细胞表面积明显小于PE组($P<0.05$)。**结论** 利拉鲁肽能明显减轻PE诱导的原代大鼠心肌细胞肥厚,可能成为治疗病理性心肌肥厚的新药物。

【关键词】 利拉鲁肽;心肌肥厚;自噬

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2019.07.025

Liraglutide Protects against Hypertrophy Induced by Phenylephrine in Neonatal Rat Cardiac Myocytes via Promoting Autophagy Flux

Ji Jiachai¹, CHEN Juan¹, FU Cegang²

(1. General Medicine Department of Haikou People's Hospital, Xiangya Medical College, Central South University, Haikou 570208, Hainan, China; 2. Department of Orthopedics, Orthopedics and Diabetes Hospital in Haikou, Shanghai Sixth People's Hospital, Haikou 570000, Hainan, China)

【Abstract】Objective To study the effects of liraglutide on hypertrophy induced by phenylephrine (PE) in neonatal rat cardiac myocytes (NRCMs). **Methods** The NRCMs were divided into 4 groups: sham group (2 μ L DMSO for 48 h), liraglutide group (1 μ M liraglutide for 48 h), PE group (50 μ M PE for 48 h), and PE + liraglutide group (50 μ M PE combined with 1 μ M liraglutide for 48 h). The Western Blot was performed to detect the changes of signaling. The qPCR was used to assess the mRNA levels of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), α -MHC and β -MHC. The area of the NRCMs was measured by immunofluorescence in 4 groups after different treatments for 48 h. **Results** Following the different stimulations, the mRNA levels of ANP, BNP and β -MHC significantly increased in PE group compared with sham group, accompanied by an apparently lower α -MHC while the autophagy levels and the areas of NRCMs were obviously increased. Comparing with PE group, the mRNA levels of ANP, BNP and β -MHC were distinctly decreased in PE + liraglutide group with a much higher mRNA level of α -MHC. The autophagy levels were notably augmented in PE + liraglutide group compared with PE group, but the areas of NRCMs were reduced. **Conclusion** The liraglutide can mitigate the hypertrophy induced by PE in NRCMs and become a potential new drug for treating the pathological hypertrophy.

【Key words】 Liraglutide; Hypertrophy; Autophagy

心血管疾病仍然是导致死亡的主要病因^[1],在面對压力负荷增加、急性损伤、收缩功能受损等病理性刺激时,心肌细胞会改变其结构以满足机体需要的最低心排量^[2]。持续的压力负荷会导致心肌细胞肥厚,表现为心肌细胞肥大、左室肥厚、细胞外基质大量胶原纤维沉积^[3]。当病理性刺激持续存在时,心肌肥厚不能克服压力负荷,心排量不能满足机体需要从而导致心力衰竭。心力衰竭发病的具体机制尚不明确,可能与肠道微生物、microRNA 有关^[4-5]。当发展到心力衰竭终末阶段时,除了心脏移植,尚无有效药物逆转心肌重构,因此如何有效逆转心肌肥厚成为临床上预防心力衰竭的重要方法。

利拉鲁肽(liraglutide)是一种胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like protein-1, GLP-1) 类似物^[6], GLP-1 由肠道 L 细胞分泌,可以刺激胰岛 β -细胞合成分泌胰岛素抑制胰高血糖素分泌,同时还可以促进胰岛 β -细胞增殖^[7-8]。利拉鲁肽作为一种 GLP-1 类似物,其具有激活 GLP-1 受体的作用,已被证明在多种疾病中发挥作用,包括 2 型糖尿病、多囊卵巢综合征、非酒精性脂肪肝等^[9-11]。目前,利拉鲁肽在临床上得到广泛应用,多项大规模临床随机对照试验均证明,利拉鲁肽能对糖尿病患者控制血糖的同时降低心血管疾病发病风险^[12-14]。但利拉鲁肽发挥心血管保护作用的具体机制,以及在病理性心肌肥厚中的作用与机制尚不明确。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

出生 1~3 d 的 SD 大鼠鼠婴,购自浙江大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂

利拉鲁肽(MCE, HY-P0014),去氧肾上腺素(phenylephrine, PE) (Sigma, BP284), DMEM/F-12 培养基(GIBCO, 12634-010),胎牛血清(GIBCO, 10099-141-FBS), 0.25% 胰酶(GIBCO, 25200114), 双抗(GIBCO, 15240062), P-AMPK α 抗体(CST, 2535T), AMPK α 抗体(CST, 5831T), GAPDH 抗体(Proteintech, 1E6D9), LC3B 抗体(Abcam, ab222776), P-mTOR 抗体(CST, 5536T), mTOR 抗体(CST, 2972S), P-ULK1 抗体(CST, 14202T), ULK1 抗体(CST, 8054S), α -ACTIN 抗体(Abcam, ab124964), 羊抗兔荧光二抗 Alexa Fluor488 (Thermo, A-11008), 羊抗鼠二抗(Jackson, 115-005-205), 羊抗兔二抗(Jackson, 111-005-003), DAPI (Invitrogen, S36939), Trizol (Invitrogen, 15596026), 反转录试剂盒(Roche,

04896866001), LightCycler 480 SYBR Green 1 Master Mix (Roche, 04707516001)。

1.1.3 主要仪器

电泳仪及 ChemiDoc™ 成像仪器均购自 Bio-Rad, LightCycler 480 (Roche), PCR 仪(ESCO, AERIS-MB), CO₂ 细胞培养箱(SANYO, MCO-15AC), 荧光显微镜(上海光学仪器厂, FR-2L/DYF-600)。

1.2 方法

1.2.1 原代大鼠心肌细胞分离与培养

原代大鼠心肌细胞分离参照赵勇等^[15]提供的方法,培养基为含有 20% FBS 的 DMEM/F-12,按 1:100 比例加入双抗。细胞培养于含有 5% CO₂, 37 °C 恒温培养箱中。

1.2.2 原代大鼠心肌细胞分组及处理

将分离好的原代大鼠心肌细胞随机分成 4 组(对照组、利拉鲁肽组、PE 组、PE + 利拉鲁肽组),细胞密度一致,细胞状态良好,用于 Western Blot 和 qPCR 的原代大鼠心肌细胞铺于 6 孔板中,用于免疫荧光的原代大鼠心肌细胞铺于 24 孔板中的爬片上。使用二甲基亚砜(DMSO)配制 50 mM 的 PE, 1 mM 的利拉鲁肽, 50 mM 的 PE 与 1 mM 利拉鲁肽的混合液。原代大鼠心肌细胞从分离后培养 48 h 待细胞状态良好,心肌细胞收缩节律较稳定时在对照组加入 2 μ L DMSO,在利拉鲁肽组加入 2 μ L 含有 50 mM PE 的 DMSO 溶液,在 PE 组加入 2 μ L 含有 1 mM 利拉鲁肽的 DMSO 溶液,在 PE + 利拉鲁肽组加入 2 μ L 含有 50 mM 的 PE 与 1 mM 利拉鲁肽的 DMSO 溶液,刺激 48 h 后分别按照后续描述的方法收取原代大鼠心肌细胞。

1.2.3 Western Blot 检测自噬信号通路

将 6 孔板中的原代大鼠心肌细胞加入 100 μ L 细胞裂解液(1% Triton X-100、1% deoxycholate, 0.1% 十二烷基硫酸钠、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂),使用细胞刮将细胞刮下来后冰上裂解 30 min、12 000 r/min 4 °C 离心 15 min,取上清进行蛋白浓度定量,将蛋白终浓度定在 2 000~2 500 ng/ μ L,加入相应体积蛋白上样缓冲液(碧云天, P0015F)后,72 °C 水浴 10 min,期间上下颠倒混匀 5~10 次。每孔上样总蛋白 25 μ g, 65 V 电泳 40 min 后, 85 V 电泳 80 min,湿法转膜 250 mA 80 min 于 PVDF 膜(碧云天, FFP19), 5% 脱脂牛奶室温封闭 60 min, PBST 洗 3 次, 5 min/次, 一抗 1:1 000 稀释后 4 °C 孵育过夜。次日使用 PBST 洗条带 3 次, 5 min/次后,按 1:5 000 比例稀释二抗于 5% 脱脂牛奶中室温孵育 60 min, PBST 最后洗 5 次, 5 min/次完毕后,在 ChemiDoc™ 成像仪器下显影。

1.2.4 qPCR 检测心肌肥厚相关 mRNA 水平变化

在 6 孔板中每孔加入 1 mL 的 Trizol 室温静置 10 min 后将 Trizol 移入 1.5 mL Rnase Free 的 EP 管, 经过三氯甲烷抽提、异丙醇沉淀和 75% 酒精漂洗后, 取

2 μ g RNA 按照 Roche 反转录试剂盒提供的方法进行逆转录, 将反转录好的 cDNA 稀释 4 倍后进行 qPCR 定量检测有关 mRNA 水平变化, 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

引物名称	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
ANP	ATACAGTGGGTGTCCAACA	CGAGAGCACCTCCATCTCTC
BNP	GGAAATGGCTCAGAGACAGC	CGATCCGGTCTATCTTCTGC
α -MHC	CTGGGCAAATCCAACAACCTT	TCTTGCTCCTTTGCCTTGA
β -MHC	TGCAGCAGTTCTTCAACCAC	TCCAGGCTTCTGGAAGTTGT

注: ANP: 心房钠肽; BNP: 脑钠肽; α -MHC: α -肌球蛋白重链; β -MHC: β -肌球蛋白重链。

1.2.5 免疫荧光检测原代大鼠心肌细胞面积

将 24 孔板中的培养基吸干后每孔加入 200 μ L 4% 多聚甲醛固定液(碧云天, P0099), 室温静置 15 min。PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 0.5% Triton X-100 室温通透 5 min。PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 吸水纸吸干 PBS 后加入 8% 山羊血清室温封闭 60 min, 吸水纸吸干封闭液后每张爬片加入 50 μ L 按 1:100 稀释的 α -ACTIN 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 浸洗爬片 3 次, 每次 3 min, 吸水纸吸干爬片上多余液体后滴加稀释好的荧光二抗, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min。PBST 洗 3 次, 每次 3 min, 滴加 DAPI 避光孵育 5 min 后使用 PBST 洗 4 次, 每次 5 min, 在荧光显微镜下观察, 采集图像。使用 Image Pro Plus 6.0 软件进行心肌细胞横截面面积

计算(每组取 50~100 个心肌细胞)。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 计量数据使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较使用 *t* 检验, 多组比较使用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 利拉鲁肽减轻 PE 诱导的心肌肥厚

PE 刺激 48 h 后, 与对照组相比, 原代大鼠心肌细胞的表面积显著增大, 差异具有统计学意义(*P* = 0.02)。PE + 利拉鲁肽组原代大鼠心肌细胞的表面积明显小于 PE 组, 差异具有统计学意义(*P* = 0.04), 利拉鲁肽能明显减轻由 PE 诱导的原代大鼠心肌肥厚(图 1)。

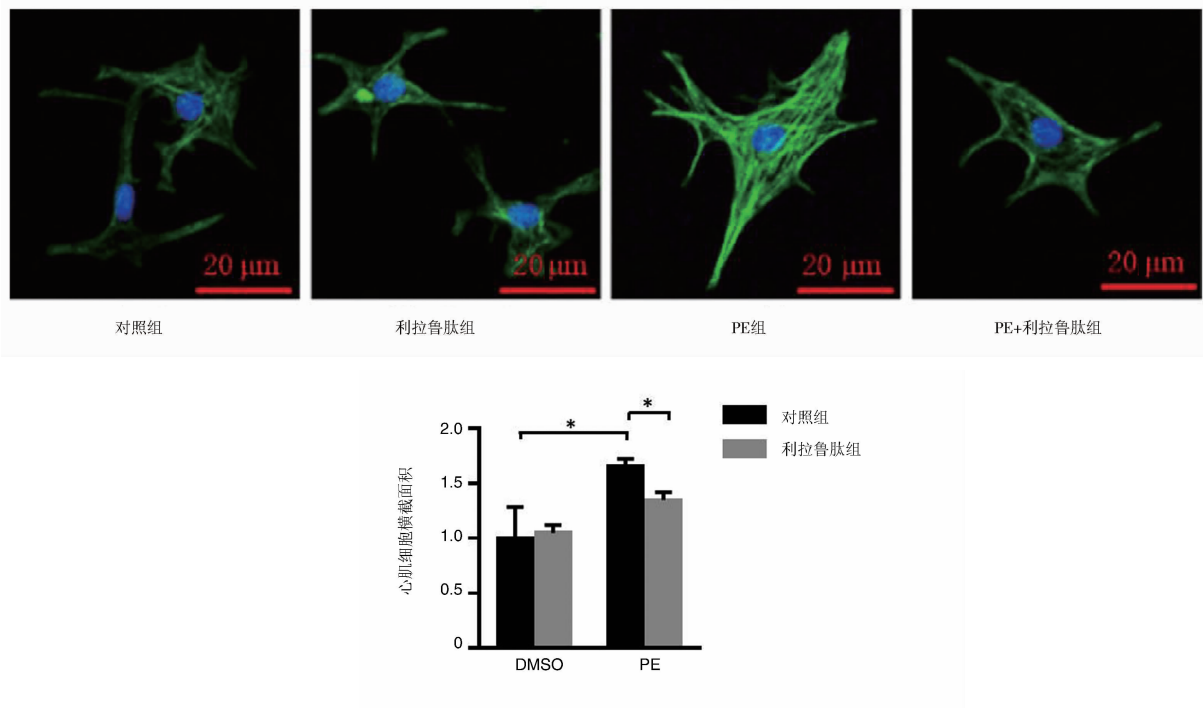


图 1 各组原代大鼠心肌细胞典型免疫荧光图

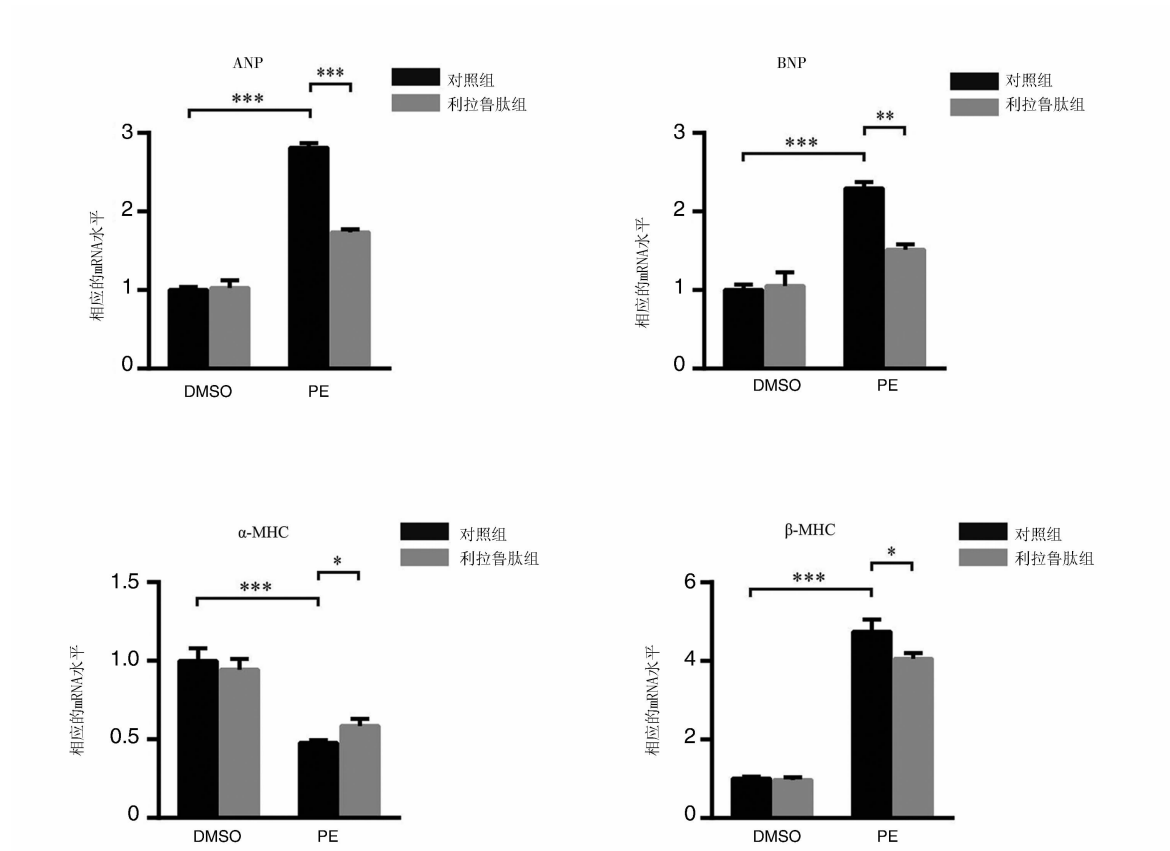
2.2 利拉鲁肽降低心肌肥厚标志物 mRNA 表达

与对照组相比,使用 PE 刺激后,ANP、BNP 和 β -MHC 明显升高, α -MHC 显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.001$)。与 PE 组相比,PE + 利拉鲁肽组 ANP、BNP 和 β -MHC 水平均明显下降($P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), α -MHC 水平明显升高($P < 0.05$) (图

2)。利拉鲁肽能促进 β -MHC 向 α -MHC 转化。

2.3 利拉鲁肽通过激活 AMPK 信号通路增强自噬流

使用 PE 刺激原代大鼠心肌细胞 48 h 后,自噬明显增强,PE 联合利拉鲁肽使自噬进一步增强。AMPK 信号通路激活,下游 ULK1 磷酸化水平明显增加,自噬流 LC3B 明显增强,提示自噬参与此病理生理过程(图 3)。



注:“*”表示 $P < 0.05$;“**”表示 $P < 0.01$;“***”表示 $P < 0.001$ 。

图2 相关 mRNA 水平变化

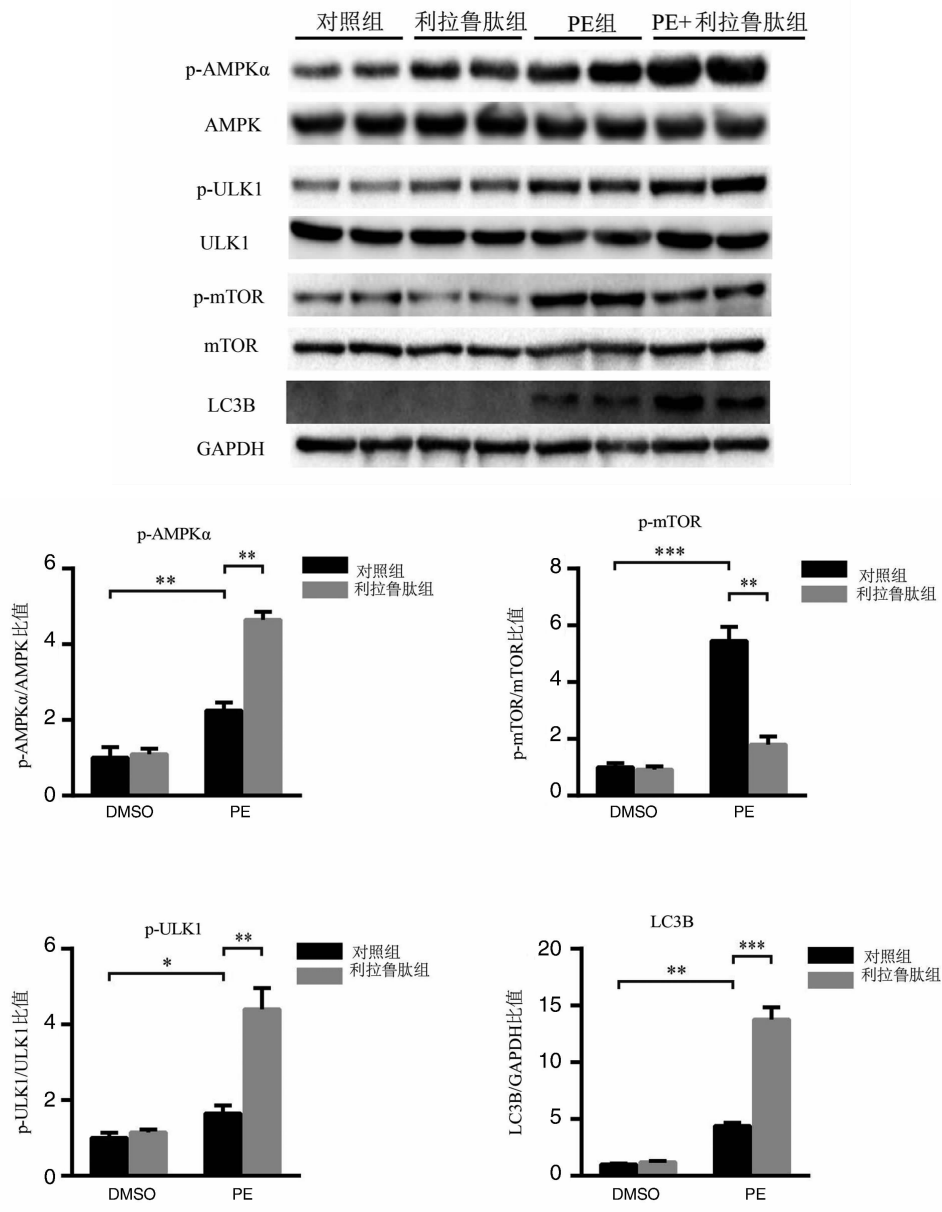
3 讨论

本研究发现,在终浓度为 50 μ M 的 PE 刺激 48 h 后,利拉鲁肽可以明显减轻心肌肥大,降低 ANP、BNP 等心肌肥厚标志物水平,增加 α -MHC mRNA 水平,减轻由 PE 引起的 mTOR 活化,利拉鲁肽可以通过激活 GLP-1 受体来活化 AMPK 信号通路,AMPK 活化后可以磷酸化 mTOR 的 Raptor 位点和 TSC2 抑制 mTOR 活性, mTOR 活性受抑制后,ULK1 间接被 AMPK 激活^[16],此外 AMPK 还可以直接磷酸化 ULK1 从而启动自噬^[17]。自噬流 LC3B 在利拉鲁肽刺激下进一步增强,表明利拉鲁肽可以增强自噬,自噬增强后,分解心肌细胞内容物产生可以进行能量代谢的小分子,增加 ATP 合成,增强心肌细胞收缩力,因此代偿性心肌肥大得到改善。

利拉鲁肽能明显降低 2 型糖尿病患者心血管事件的发生率,改善患者的生存生活质量^[18]。但是利拉鲁肽通过何种机制降低糖尿病患者的心血管事件发生率目前尚无定论。本研究发现利拉鲁肽促进自噬来减轻 PE 诱导的心肌肥厚,这可以解释利拉鲁肽发挥心血管保护作用的机制,但利拉鲁肽激活 GLP-1 受体后具体如何激活 AMPK 信号通路以及是否存在其他相互作用还需要进一步研究。利拉鲁肽能显著增强自噬,但是长期服用利拉鲁肽导致自噬持续性增强是否对心肌细胞造成损伤还有待探索。Margulies 等^[19]的一项临床随机试验发现利拉鲁肽并不能改善失代偿性心力衰竭患者的心功能。这可能与临床随机试验的患者纳入标准有关,在心力衰竭早期,例如心肌

肥厚阶段,利拉鲁肽能通过激活 AMPK 等信号通路增强心肌细胞收缩力,心脏泵血能力增强,使机体处于代偿阶段。当心力衰竭进入终末期时,利拉鲁肽即使能激活 AMPK 等信号通路,但代偿性增强的自噬并不能产生足够的收缩力满足心脏的泵血需要,因此在终末期心力衰竭,利拉鲁肽并不能使患者受益。

利拉鲁肽作为治疗糖尿病的新型药物,其疗效确切、副作用少,得到了广泛的应用,其心血管收益对糖尿病并发心血管疾病的患者具有重要意义。研究利拉鲁肽对心血管收益的具体分子机制可以指导临床用药,避免重复使用分子机制相似的药物,减轻患者及社会医疗负担,同时可以减少药物的不良反应。



注:“*”表示 $P < 0.05$;“**”表示 $P < 0.01$;“***”表示 $P < 0.001$ 。

图3 利拉鲁肽通过激活 AMPK 信号通路增强自噬

参考文献

- [1] Mayhew AJ, de Souza RJ, Meyre D, et al. A systematic review and meta-analysis of nut consumption and incident risk of CVD and all-cause mortality [J]. *Br J Nutr*, 2016, 115(2):212-225.
- [2] Lieu M, Koch WJ. GRK2 and GRK5 as therapeutic targets and their role in maladaptive and pathological cardiac hypertrophy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(3):201-214.
- [3] Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure; signaling pathways and novel therapeutic targets [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(9):1401-1438.

- [4] 郭锦涛, 孟庆姝. 肠道菌群失调在心力衰竭中的作用研究进展[J]. 心血管病学进展, 2018, 39(4): 619-622.
- [5] 郭美姿. MicroRNAs 介导的代谢调节与心力衰竭相关的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2018, 39(6): 966-969.
- [6] Greig SL, Scott LJ. Insulin degludec/liraglutide: a review in type 2 diabetes [J]. *Drugs*, 2015, 75(13): 1523-1534.
- [7] Nauck M. Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2016, 18(3): 203-216.
- [8] Hwang JJ, Yun S, Moon MJ, et al. Molecular evolution of GPCRs: GLP1/GLP1 receptors [J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 52(3): T15-T27.
- [9] Lamos EM, Malek R, Davis SN. GLP-1 receptor agonists in the treatment of polycystic ovary syndrome [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2017, 10(4): 401-408.
- [10] McGuire DK, Marx N, Johansen OE, et al. FDA guidance on antihyperglycemic therapies for type 2 diabetes: one decade later [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2019, 21(5): 1073-1078.
- [11] Petit JM, Verges B. GLP-1 receptor agonists in NAFLD [J]. *Diabetes Metab*, 2017, 43(Suppl 1): 2S-28S.
- [12] Buse JB. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(18): 1798-1799.
- [13] Arturi F, Succurro E, Miceli S, et al. Liraglutide improves cardiac function in patients with type 2 diabetes and chronic heart failure [J]. *Endocrine*, 2017, 57(3): 464-473.
- [14] Kumarathurai P, Anholm C, Nielsen OW, et al. Effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide on systolic function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes: a randomized double-blind placebo-controlled crossover study [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15(1): 105.
- [15] 赵勇, 刘晓伟, 林治宇, 等. 新生 SD 大鼠心肌细胞的原代培养[J]. 黑龙江医药科学, 2017, 40(6): 1-2.
- [16] Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(1): 2-11.
- [17] Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, et al. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 548.
- [18] Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(4): 311-322.
- [19] Margulies KB, Hernandez AF, Redfield MM, et al. Effects of liraglutide on clinical stability among patients with advanced heart failure and reduced ejection fraction: a randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2016, 316(5): 500-508.

收稿日期: 2019-02-16

本刊增加论著栏目的启事

本刊 2019 年起新增论著栏目, 论著投稿注意事项如下。

1. 论著文章 5 000 字以内(包括摘要、图表及参考文献); 论著采用结构式摘要(含目的、方法、结果、结论), 摘要篇幅以 200~400 个汉字符为宜, 并有完整的英文摘要(含文题、作者、单位、摘要、关键词); 关键词以 3~8 个为宜; 论著引用参考文献要求达到 20 条以上。

2. 论文如属国家自然科学基金项目或省、部级以上重点攻关课题、其他科研基金资助的项目, 请在文稿首页脚注“【基金项目】×××科研资助项目(编号)”, 如获专利请注明专利号。本刊对重大研究成果、国家自然科学基金、卫生部科研基金、省科技厅项目, 将优先发表。

3. 本刊已全部实行网上投稿, 请通过(心血管病学进展)杂志的稿件远程处理系统投稿(登录 <http://xxgbxzz.paperopen.com> 后, 点击“作者投稿”, 在“作者投稿管理平台”中投稿)。网上投稿成功后还需报送以下材料: (1) 稿件处理费 50 元(可通过手机银行转账)。(2) 推荐信(可发电子版): 来稿需经作者单位审核, 并附单位推荐信。推荐信应注明对稿件的审评意见以及无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等项, 并加盖公章。如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。(3) 若此项研究为基金项目者, 需附基金批文复印件(可发电子版)。

《心血管病学进展》编辑部