

## 临床细胞生物学

# 体外循环患儿中性粒细胞自噬水平的变化及其对细胞存活的影响

易寒 杨陶波 宋娟 王小燕 肖宗懿 王寿勇\*

(重庆医科大学附属儿童医院麻醉科; 儿童发育疾病研究教育部重点实验室; 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心(重庆); 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地; 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

**摘要** 为研究室间隔缺损修补术患儿体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)前后中性粒细胞自噬水平的变化, 及其对细胞存活率的影响, 该研究以择期行CPB下室间隔缺损修补术的患儿12例为CPB组, 超声引导下室间隔缺损外科微创封堵术患儿12例为对照(N-CPB组)。分别采集T0(麻醉诱导后)、T1(CPB后/封堵器置入成功后)血液标本5 mL, 分离中性粒细胞, 用Western blot检测自噬相关蛋白Beclin-1、LC3-II的表达。结果显示, 与T0相比, CPB组T1时中性粒细胞Beclin-1、LC3-II表达明显升高( $P < 0.05$ ), 而N-CPB组无明显变化; 另以择期行CPB下室间隔缺损修补术的患儿6例为对象, 于T0、T1时采集血液标本5 mL, 分离中性粒细胞, 分为对照组和3-MA(自噬抑制剂)组, 分别于0、1、2、4、8 h经锥虫蓝染色检测存活率。结果显示, 与T0比较, 来自T1的中性粒细胞存活率在0、1 h时显著升高( $P < 0.05$ ); 加入抑制剂三甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)后, T0和T1来源的中性粒细胞存活率均迅速降低( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 3-MA组2、4、8 h时存活率显著降低( $P < 0.05$ )。该研究表明, CPB使室间隔缺损修补术患儿中性粒细胞自噬水平升高, 细胞存活时间延长, 抑制自噬能缩短细胞存活时间。

**关键词** 体外循环; 中性粒细胞; 自噬; 存活率

## The Effects of Cardiopulmonary Bypass on Autophagy Level and Survival Rate of Neutrophil in Children

YI Han, YANG Taobo, SONG Juan, WANG Xiaoyan, XIAO Zongyi, WANG Shouyong\*

(Department of Anesthesiology, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; National Clinical Research Center for Child Health and Disorders (Chongqing); China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

**Abstract** The aim of this paper was to study the effects on neutrophil autophagy level and survival rate of neutrophil induced by CPB (cardiopulmonary bypass) in children undergoing open heart surgery of VSD (ventricular

收稿日期: 2019-08-06

接受日期: 2019-09-20

重庆市卫生计生委医学科研项目(批准号: 2015MSXMO40)和国家自然科学基金(批准号: 30700785)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-63632143, E-mail: saulwang@126.com

Received: August 6, 2019

Accepted: September 20, 2019

This work was supported by the Project of Chongqing Medical and Health Program Medical Research Commission (Grant No.2015MSXMO40) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30700785)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-63632143, E-mail: saulwang@126.com

网络出版时间: 2020-01-06 17:08:17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20200106.1708.016.html>

septal defect) repair. 12 children scheduled to receive VSD repair under cardiopulmonary bypass and 12 children scheduled to receive minimally invasive closure of VSD under ultrasound guidance were recruitment into CPB group and N-CPB group, respectively. 5 mL of blood was sampled and the neutrophils were isolated with density gradient centrifugation method for each of the children at time point of T0 (after induction of anesthesia) and T1 (after CPB/post occluder placement). The autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3-II of neutrophil were detected by Western blot. The result shows that the Beclin-1 and LC3-II expression levels were increased at T1 when compared with T0 in CPB group ( $P<0.05$ ), but there were no significant changes in N-CPB group. After that, other 6 children scheduled to receive VSD repair under cardiopulmonary bypass were enrolled, and the blood was sampled at before and after CPB (T0 and T1), and the neutrophil were isolated similar to the former. Each neutrophil sample was divide into 2 parts, one go into control group and another go into 3-MA (3-methyladenine, autophagy inhibitor) group. The neutrophil survival rate was observed with trypan blue staining at 0, 1, 2, 4, and 8 h. Subsequently, the neutrophil survival rate of T1 was significant increased at 0 h and 1 h when compared with T0 ( $P<0.05$ ). In the 3-MA group, the survival rate of neutrophil was decreased rapidly at 1, 2, 4, and 8 h when compared with 0 h ( $P<0.05$ ). When compared with control group, the neutrophil survival rate in 3-MA group were significant decreased at 2, 4 and 8 h ( $P<0.05$ ). The present investigation implicated that cardiopulmonary bypass can increase the autophagy level and survival rate of neutrophil in children undergoing open heart surgery of VSD repair, and inhibiting the autophagy level induces rapid death of neutrophil after CPB.

**Keywords** cardiopulmonary bypass; neutrophils, autophagy; survival rate

在体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)下心内直视手术中,中性粒细胞的激活、渗出和浸润,是CPB导致全身性炎症反应综合征和急性肺损伤等并发症的关键因素<sup>[1-2]</sup>。研究表明,CPB后中性粒细胞凋亡水平降低,存活时间延长<sup>[3]</sup>。自噬(autophagy)是细胞在内外环境应激条件下的一种自适应性代谢行为,不同条件下的自噬行为,可能对细胞存活产生有利或有害的后果<sup>[4]</sup>。CPB下中性粒细胞存活时间的改变,是否伴随自噬水平的变化及其作用,尚不明确。本研究拟以CPB下行室间隔缺损修补术患儿为对象来对此进行初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

主要仪器包括:高速台式冷冻离心机、超净工作台、二氧化碳培养箱(Thermo Scientific, 美国),凝胶电泳仪、凝胶电转仪、凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国),Countstar Medical医学细胞计数仪、Countstar细胞计数板(睿钰生物科技有限公司, 中国)。

实验试剂包括: DextranT-500、锥虫蓝染液(索莱宝科技有限公司, 北京),人淋巴细胞分离液(达科为生物技术有限公司, 北京),全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(凯基生物技术股份有限

公司, 江苏),快速封闭液、化学发光HRP底物ECL显影液(碧云天生物技术有限公司, 上海),兔抗人Beclin-1、LC3-II多克隆抗体(Affinity公司),山羊抗兔 $\beta$ -actin多克隆I抗体、山羊抗兔II抗(Proteintech公司),胎牛血清、RMPI-1640培养基(Gibco公司, 美国),3-MA(Apexbio公司, 美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 病例选择、分组及标本采集 实验一:体外循环患儿中性粒细胞自噬水平的变化。择期行体外循环下心脏室间隔缺损修补术的患儿12例为实验组(CPB组,  $n=12$ ),同期行超声引导下外科微创室间隔缺损封堵术患儿12例为对照组(N-CPB组,  $n=12$ ),所有患儿均为初次接受心脏手术者。样本量预估采用G-power3.1.9.4进行,采用配对 $t$ 检验,单尾,效应量为0.6,把握度为0.85,检验水准 $\alpha=0.05$ ,按10%扩大预估样本量以防数据脱落。两组患儿均采用如下排除标准:(1)正处于上呼吸道感染期;(2)正在接受免疫抑制剂治疗;(3)有严重心功能不全,心功能III级及以上;(4)有其他重要脏器功能不全。两组患儿分别于T0(麻醉诱导后)和T1(CPB结束后;N-CPB组为封堵器置入成功后)经中心静脉采集血液标本5 mL,分离中性粒细胞并检测其自噬相关蛋白Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3-II(microtubule-associated protein

light chain 3-II, LC3-II)表达水平。

实验二: 自噬水平的变化对中性粒细胞存活的影响。在实验一组间结果差异存在统计学意义的情况下, 另选取择期行体外循环下心脏室间隔缺损修补术的患儿6例为研究对象, 于T0(麻醉诱导后)和T1(CPB结束后)经中心静脉采集血液标本5 mL, 分离中性粒细胞, 分为对照组(C组)和3-MA组(抑制剂组), 检测自噬抑制剂3-MA对中性粒细胞存活水平的影响。

本研究获得重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准, 并经中国临床试验中心注册, 注册号为: ChiCTR1800018670, 入选患儿家属术前均出具书面同意书。

1.2.2 麻醉方法 所有患儿麻醉方案一致, 麻醉诱导采用0.05 mg/kg咪达唑仑、2 μg/kg舒芬太尼、0.2 mg/kg顺苯磺酸阿曲库铵、2.5 mg/kg丙泊酚, 静脉注射, 气管插管后采用Detax-Ohmeda S/5麻醉机(GE公司, 美国)控制呼吸, 调节通气参数使呼吸末二氧化碳分压(PetCO<sub>2</sub>)维持于35 mmHg~45 mmHg。麻醉维持期间持续静脉泵入舒芬太尼2~3 μg/(kg·h)和顺苯磺酸阿曲库铵0.2 mg/(kg·h)。麻醉手术期间持续监测肛温、鼻咽温、中心静脉压和有创动脉血压。

1.2.3 CPB方法 采用本单位常规方法<sup>[5]</sup>: 经正中劈开胸骨, 切除胸腺及部分心包, 显露心脏及大血管。分别行上下腔静脉及升主动脉插管, 建立体外循环。肝素化剂量为400 IU/kg, 转流前要求全血激活凝血时间大于480 s, 必要时追加给予肝素100 IU/kg。主动脉阻断后经根部灌注预冷心脏停搏液, 采用中低温体外循环, 维持鼻咽温28~32 °C, 采用STOCK-ERT-SC型人工心肺机(德国)转流, 灌注流量维持于120~150 mL/(kg·min)。主动脉阻断期间维持平均动脉压于35~45 mmHg, 血压过高或过低时, 采用梳理循环管道、适当调整灌注流量和给予血管活性药物等措施处理。血气管理采用α稳态, 维持全血pH值于7.35~7.45, 动脉血CO<sub>2</sub>分压于30~40 mmHg。心内手术操作结束后逐渐复温, 排气并仔细缝合心脏切口, 同时给予5~10 μg/(kg·min)多巴胺、0.5 μg/(kg·min)米力农持续泵注, 回输部分机血, 维持Hct于25%~35%, 血红蛋白浓度在90~120 g/L。按照1.2:1.0的比例用鱼精蛋白中和肝素, 撤除体外循环。手术结束患儿送ICU监护治疗。

1.2.4 VSD外科微创封堵方法 采用本单位常规

方法<sup>[5]</sup>: 取胸骨下端切口, 上至乳头水平, 下至剑突, 锯开胸骨后切开、悬吊心包, 给予100 IU/kg肝素钠。在保持心脏正常搏动状态下用4/0 Prolene线带垫在右心室表面行褥式缝合, 经右心室穿刺依次植入导丝、扩张器和鞘管, 食道超声(transesophageal echocardiography, TEE)引导鞘管经VSD进入左心室。经鞘管通道送入封堵器, 在TEE引导下释放封堵器, 超声检查显示无移位、残余分流和瓣膜反流, 心电图排除传导阻滞后退推出推送螺杆和鞘管, 放置心包引流管后结束手术, 患儿送ICU监护治疗。

1.2.5 中性粒细胞分离提纯 将采集的血液标本转移到15 mL离心管内, 加入2.5 mL 6% Dextran溶液上下颠倒混匀。静置35 min后分为两层, 取上层液体备用。另取离心管加入2.5 mL淋巴细胞分离液, 将前述上层液体小心叠加于淋巴细胞分离液之上, 600 ×g离心25 min, 保留最底层沉淀, 用1 mL PBS重悬, 加入5倍体积的红细胞裂解液, 吹打混匀, 裂解5 min。600 ×g离心5 min, 弃上层红色液体, 用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基重悬细胞。

1.2.6 Western blot检测中性粒细胞Beclin-1、LC3-II蛋白表达水平 提取中性粒细胞全蛋白, BCA法定量, 煮沸5 min变性。以20 μg蛋白上样行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 然后在250 mA、60 min条件下转PVDF膜, TBST洗涤4次, 每次5 min。采用快速封闭液室温封闭15 min后, 加入特异性一抗, 4 °C孵育过夜, TBST洗膜4次, 每次5 min; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育1 h, TBST洗涤4次, 每次5 min。以β-actin为内参照, ECL曝光显影, 结果采用Bio-Rad Quantity One软件进行分析。

1.2.7 中性粒细胞的培养与存活率检测 实验二中采集于CPB前后的新鲜血液标本分离提纯中性粒细胞, 用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基重悬, 按3×10<sup>6</sup>个/mL接种于24孔板。对照组不给予特殊处理, 3-MA组实验开始时加入3-MA至终浓度为5 mmol/L, 各组平行常温孵育, 分别于0、1、2、4、8 h充分混匀细胞后, 取出20 μL细胞悬液经锥虫蓝染色后采用Countstar Medical医学细胞计数仪进行存活率检测。

1.2.8 统计学分析 采用IBM SPSS 22.0软件进行统计学分析, Graph Pad prism 7.0绘图。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 自噬相关蛋白表达水平组内比较采用配对样本 $t$ 检验, 组间比较采用独立样本



表1 患者一般情况  
Table 1 The clinical characteristic of the patient

一般情况 Clinical characteristic	CPB组(n=12) N-CPB group (n=12)	CPB组(n=12) CPB group (n=12)
Sex (male/female)	7/5	6/6
Age /months	28.42±5.36	27.33±5.69
Weight /kg	11.59±1.09	10.90±1.32
Red blood cell /10 <sup>12</sup> ·L	4.56±0.31	4.56±0.47
White blood cell /10 <sup>9</sup> ·L	7.46±1.31	7.36±0.94
Time of aortic cross-clamping /min	—	37.04±5.83
Duration of CPB /min	—	87.50±12.47
Duration of surgical /min	113.33±15.59	132.83±10.35

“—”表示N-CPB组无主动脉阻断时间、无CPB过程。

“—” means without cardiopulmonary bypass and aortic cross-clamping in N-CPB group.

*t*检验;中性粒细胞存活率随时间的变化情况采用重复测量方差分析,组内不同时间点的两两比较采用Bonferroni法,组间及组内亚组间比较采用配对样本*t*检验;偏态分资料用中位数表示,采用秩和检验;构成比资料采用卡方检验;以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料及麻醉手术经过

患者一般资料情况见表1,两组患儿性别比例、年龄、体质重、术前红细胞计数、白细胞计数等比较,组间差异无统计学意义。所有患儿手术均顺利进行,术中循环功能稳定,无不良事件发生。术后恢复良好,未发生严重并发症,均按计划顺利出院。

### 2.2 中性粒细胞自噬相关蛋白Beclin-1和LC3-II表达水平的改变

与T0比较,T1时CPB组中性粒细胞Beclin-1和LC3-II表达水平升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但N-CPB组差异不明显;与N-CPB组比较,T0时组间中性粒细胞Beclin-1和LC3-II表达水平差异不明显,但T1时CPB组二者表达均升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )(图1)。

### 2.3 自噬活性改变对中性粒细胞存活率的影响

与0 h比较,对照组中性粒细胞在0~8 h存活率无明显改变,3-MA组1、2、4、8 h时中性粒细胞存活率逐渐降低( $P<0.05$ ),至8 h时,下降平均幅度分别达到61.9%、75.2%;与对照组比较,3-MA组T0(CPB前)来源的细胞0、1 h时存活率无明显差异,但2、4、8 h时中性粒细胞存活率均明显降低( $P<0.05$ )。3-MA组T1(CPB后)来源的细胞0 h时存活率无明显差异,

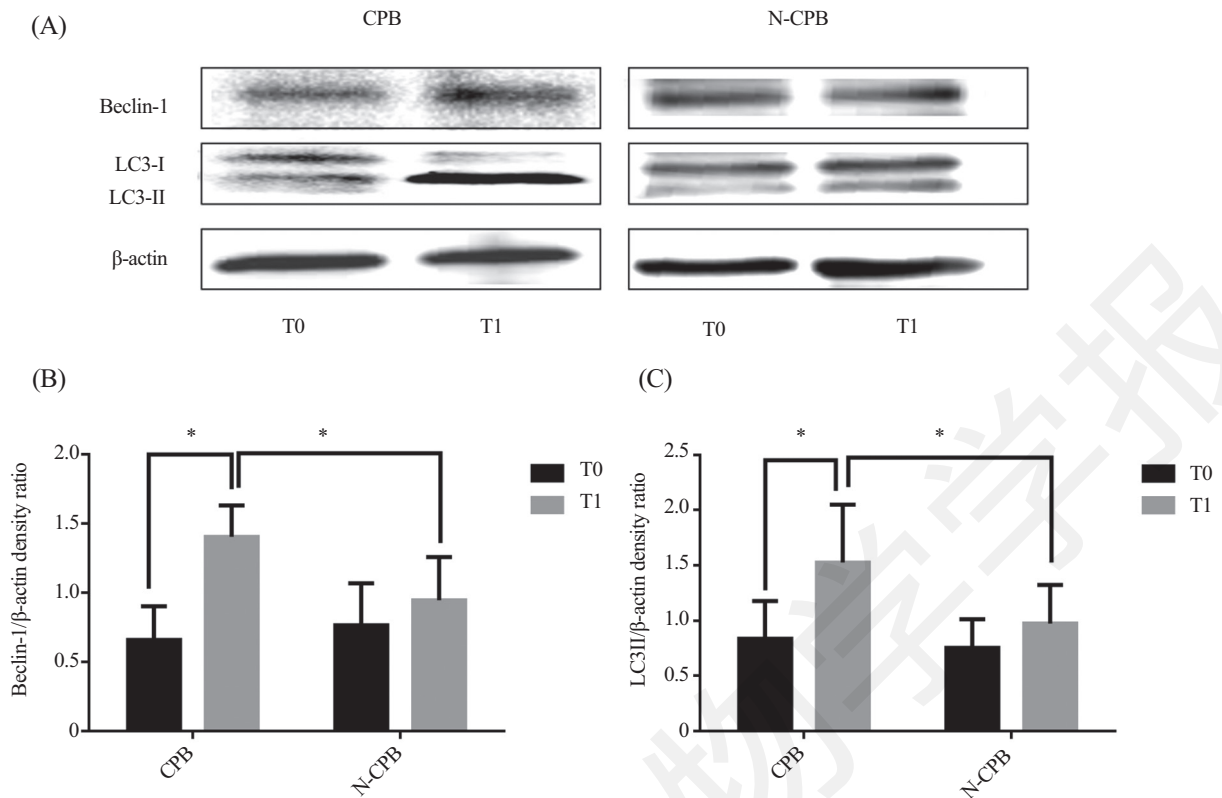
但1、2、4、8 h时中性粒细胞存活率均明显降低( $P<0.05$ );与T0(CPB前)比较,T1(CPB后)来源的中性粒细胞于0、1 h时存活率升高( $P<0.05$ ),2、4、8 h时组间差异均不明显(表2和图2)。

## 3 讨论

本研究发现,体外循环后患儿中性粒细胞自噬相关蛋白Beclin-1和LC3-II表达水平升高,提示体外循环可引起中性粒细胞自噬活性增强;在培养基中加入自噬抑制剂3-MA后,中性粒细胞存活率随时间延长而迅速降低,进一步提示,体外循环所致的自噬活性增强,有利于中性粒细胞存活。

研究表明,体外循环可通过上调*Bcl-2*和下调*Fas*基因表达,增强细胞抗凋亡水平而导致中性粒细胞存活能力增强<sup>[6]</sup>。在细胞适应内外环境变化的调节活动中,自噬是真核生物普遍存在的高度保守的另一种重要机制<sup>[7]</sup>,它可清除细胞内受损的蛋白质、细胞器或入侵病原体,通过溶酶体途径降解并回收利用氨基酸、脂肪酸等物质,以应对不利环境,维持细胞存活<sup>[8]</sup>。但在不同情形的环境变化中,自噬被过度诱导也可能加剧或直接导致细胞死亡<sup>[9]</sup>。体外循环作为一种严重的非生理刺激,对中性粒细胞自噬水平如何影响及其后果,尚未见报道。

LC3是目前公认的自噬标记物<sup>[10]</sup>,LC3蛋白被细胞合成后,首先被自噬相关基因4(*autophagy-related gene 4*, *ATG-4*)蛋白剪去羧基端,暴露甘氨酸残基,形成位于胞质的LC3-I。在自噬激活后,LC3-I会被多个其他ATG蛋白修饰形成LC3-II,并与磷脂酰乙醇胺共价结合定位于自噬体膜上。因此,LC3-II的表达水平可提示是否存在自噬及其活性高低<sup>[11]</sup>。本



A: Western blot检测结果; B: 半定量分析Beclin-1表达水平; C: 半定量分析LC3-II表达水平。\* $P < 0.05$ ; T0: 体外循环前; T1: 体外循环后。

A: Western blot analysis of Beclin-1 and LC3-II protein expression; B: semi-quantitative analysis of Beclin-1 levels; C: semi-quantitative analysis of LC3-II levels; \* $P < 0.05$ ; T0: before cardiopulmonary bypass; T1: after cardiopulmonary bypass.

图1 体外循环对中性粒细胞自噬相关蛋白表达水平的影响

Fig.1 Effects of cardiopulmonary bypass on autophagy related protein expression levels of neutrophils

表2 3-MA对中性粒细胞存活率的影响

Table 2 Effects of 3-MA on the survival rate of neutrophils

组别 Group	对照组 Control group		MA组 3-MA group	
	T0	T1	T0	T1
0 h	0.83±0.06	0.94±0.02 <sup>▲</sup>	0.86±0.03	0.95±0.01 <sup>▲</sup>
1 h	0.80±0.08	0.90±0.02 <sup>▲</sup>	0.67±0.10*	0.80±0.06* <sup>▲</sup>
2 h	0.79±0.10	0.86±0.04	0.57±0.11* <sup>#</sup>	0.60±0.10* <sup>#</sup>
4 h	0.71±0.16	0.76±0.11	0.41±0.13* <sup>#</sup>	0.38±0.14* <sup>#</sup>
8 h	0.68±0.17	0.72±0.11	0.25±0.08* <sup>#</sup>	0.19±0.15* <sup>#</sup>

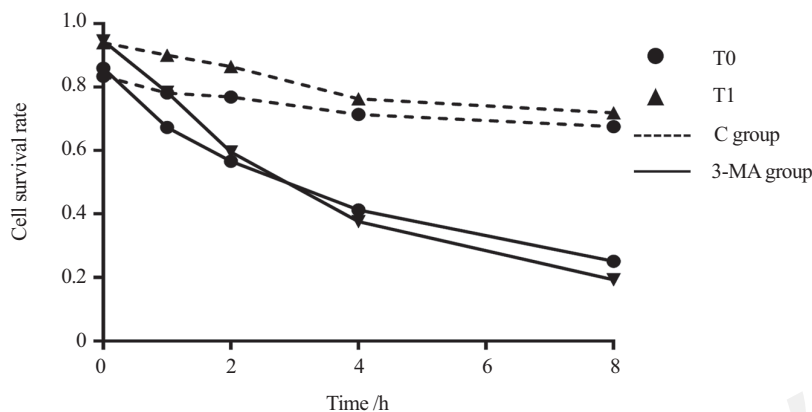
\* $P < 0.05$ , 与0 h比较; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>▲</sup> $P < 0.05$ , 与T0比较。 T0: 体外循环前; T1: 体外循环后。

\* $P < 0.05$  compared with 0h; <sup>#</sup> $P < 0.05$  compared with the control group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  compared with T0. T0: before cardiopulmonary bypass; T1: after cardiopulmonary bypass.

研究中, 体外循环组中性粒细胞LC3-II的表达水平明显升高, 提示体外循环可能激活了中性粒细胞自噬。

但是, 仅有LC3-II的堆积并不能确定自噬处于持续激活状态, 它也有可能代表了LC3-II代谢通路的阻塞<sup>[12]</sup>。磷酸肌醇3激酶(PI3K)复合体的形成是自噬信号刺激后细胞自噬早期的一个重要环节,

Beclin-1为PI3K复合体提供基本骨架, 聚集胞内自体吞噬所需的Vps-34、Vps-15、ATG-14(autophagy related 14)样蛋白、抗紫外线照射相关蛋白等重要成分, 对自噬泡的延伸和其他相关蛋白的招募至关重要<sup>[13]</sup>。本研究中, 处于自噬活动相对上游的Beclin-1和自噬成熟标志的LC3-II在体外循环后均出现明显升高, 可以基本证实体外循环后中性粒细胞自噬流



T0: 体外循环前; T1: 体外循环后; C group: 对照组; 3-MA group: 3-MA组。

T0: before cardiopulmonary bypass; T1: after cardiopulmonary bypass; C group: control group; 3-MA group: 3-MA group.

图2 3-MA对CPB前后中性粒细胞存活率影响的时间曲线

Fig.2 Time curve of the effect of 3-MA on the survival rate of neutrophils before and after CPB

的存在。

生理状态下一定程度的自噬活性,可以清除衰老、损伤的蛋白和细胞器,并对相关物质进行重复利用,有利于维持细胞的自我更新和活力,但过度自噬则可能引起细胞死亡<sup>[14]</sup>。本研究中,随着培养时间的延长,细胞的存活率有逐渐降低的趋势,这反应了中性粒细胞作为一种终末细胞的生理规律。在0和1 h时,T1(体外循环后)来源的中性粒细胞存活率高于T0(体外循环前),结合体外循环后自噬相关蛋白Beclin-1和LC3-II表达水平升高,提示体外循环导致的自噬活性增强可能有助于中性粒细胞的存活。3-MA是一种特异性的自噬抑制剂,它选择性作用于Vps34和PI3K $\gamma$ ,抑制自噬体早期形成<sup>[15]</sup>。加入自噬抑制剂3-MA后,T1(体外循环后)来源的中性粒细胞存活率随时间延长而迅速降低,且自体外培养1 h起就显著低于对照组,表明抑制自噬可促使细胞死亡,逆向证明体外循环所引起的自噬活性增强,有利于细胞存活。加入自噬抑制剂3-MA后,T0(体外循环前)来源的中性粒细胞存活率随时间延长也迅速降低,自体外培养2 h起显著低于对照组,提示体外循环前中性粒细胞存在基础的自噬活性,且与维持细胞更新和存活有关。在3-MA处理后8 h时,无论T0还是T1来源的中性粒细胞,存活率均保持同等的低水平,表明本研究中中性粒细胞自噬活性获得了完全的抑制。

一方面,鉴于中性粒细胞在CPB导致的全身性炎症反应综合征和急性肺损伤等并发症中的关键作用已经得到证实<sup>[1-2]</sup>,那么自噬活性增强所导致的中

性粒细胞存活时间延长,有可能使CPB效应放大或延续。抑制临床条件下的自噬活性增强,有可能对CPB患者具有潜在利益。但另一方面,中性粒细胞一旦激活,缺乏可靠回收机制,最终将死亡。而释放出所含各种蛋白水解酶类,其是组织损伤的关键环节。CPB引起的中性粒细胞自噬活性增强及死亡延缓,也可能是一种细胞自稳机制,导致中性粒细胞相关蛋白酶更有控制的释放,从而可能对CPB相关全身炎症反应综合征和急性肺损伤等并发症具有限制作用。无论如何,本研究发现的中性粒细胞自噬活性增强,对临床CPB患者的潜在价值,尚需进一步研究才能确定。

临床上针对不同的心脏疾病类型,所需体外循环时间长短差异很大,且相应的体温控制、失血输血以及药物处置也与本研究所选择的室间隔缺损修补患儿存在显著差异,因此更长时间和更复杂的体外循环处理是否会导致自噬活性增强,以及其对中性粒细胞存活产生何种影响,本研究无法作出判断。此外,外周血中性粒细胞是一种终末细胞,通过电镜或双标荧光自噬流监测等更复杂的实验手段来获取更直接的自噬激活或抑制证据存在困难,这是本研究中不得不面对的一项固有缺陷。

总之,本研究发现,体外循环可以引起室间隔缺损修补术患儿中性粒细胞自噬活性增强,且这种增强作用与体外循环后中性粒细胞存活能力增强有关。体外循环通过增强自噬活性而提升中性粒细胞存活能力,是否与抗凋亡活性增强之间存在交叉对话,是否与体外循环所致的全身炎症反应和组织损

伤之间存在关联, 其是否能成为防治体外循环相关并发症的潜在靶点, 尚不清楚。

### 参考文献 (References)

- 1 Gessler P, Pfenninger J, Pfammatter JP, Carrel T, Dahinden C. Inflammatory response of neutrophil granulocytes and monocytes after cardiopulmonary bypass in pediatric cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2002; 28(12): 1786-91.
- 2 Partrick DA, Moore EE, Fullerton DA, Jr BC, Meldrum DR, Siliman CC. Cardiopulmonary bypass renders patients at risk for multiple organ failure via early neutrophil priming and late neutrophil disability. *J Surg Res* 1999; 86(1): 42-9.
- 3 赵志勇, 高永谦, 闫志军, 冯光兴, 何荣海, 于新江. 中性粒细胞凋亡延迟及细胞因子释放在体外循环全身炎症反应中的作用. *河北医药*(Zhao Zhiyong, Gao Yongqian, Yan Zhijun, Feng Guangxing, He Ronghai, Yu Xinjiang. Influence and significance of neutrophil apoptosis and cytokines on systemic inflammatory reaction to cardiopulmonary bypass. *Hebei Medical Journal* 2008; 30(6): 745-7.
- 4 Pliyev BK, Menshikov M. Differential effects of the autophagy inhibitors 3-methyladenine and chloroquine on spontaneous and TNF- $\alpha$ -induced neutrophil apoptosis. *Apoptosis* 2012; 17(10): 1050-65.
- 5 彭艳华, 涂然, 杨陶波, 王寿勇. 体外循环血浆对类中性粒细胞趋化和CXCR4表达的影响. *中国细胞生物学学报*(Peng Yanhua, Tu Ran, Yang Taobo, Wang Shouyong. Effects of plasma extracted from cardiopulmonary bypass on the chemotaxis and CXCR4 expression in neutrophil-like cells. *Chinese Journal of Cell Biology* 2018; 40(3): 341-8.
- 6 赵砾丽, 李建立, 武懿, 刘晓明, 杜彦茹, 闫志军. 体外循环对小儿中性粒细胞凋亡及其调控蛋白的影响. *中国体外循环杂志* (Zhao Yanli, Li Jianli, Wu Yi, Liu Xiaoming, Du Yanru, Yan Zhijun. Effects of extracorporeal circulation on polymorphonuclear neutrophil apoptosis and related protein in pediatric. *Chinese Journal of Extracorporeal Circulation*) 2008; 6(1): 5-7.
- 7 Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1): 27-42.
- 8 He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Rev Gene* 2009; 43: 67-93.
- 9 Fang Y, Tan J, Zhang Q. Signaling pathways and mechanisms of hypoxia-induced autophagy in the animal cells. *Cell Biol Int* 2015; 39(8): 891-8.
- 10 Klionsky DJ, Abdalla FC, Hagai A, Abraham RT, Abraham AA, Khosrow A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, 3rd ed. San Francisco: Autophagy, 2016: 1-222.
- 11 Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(12): 2503-18.
- 12 Isei T, Naoko MI, Takashi U, Eiki K. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 2005; 1(2): 84-91.
- 13 Qian D, Zhenlong W, Lei W, Liandong Z, Xiaolong X, Ziming W, *et al.* Lower mRNA and protein expression levels of LC3 and beclin1, markers of autophagy, were correlated with progression of renal clear cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43(12): 1261-8.
- 14 Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005; 2(12 Suppl): 1542-52.
- 15 Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(3): 761-71.