

人胃癌 HGC-27 细胞中过表达生物钟蛋白 CRY1 对细胞内 cAMP 生成的抑制作用

黄钱武 徐蕾

【摘要】 目的 建立稳定过表达生物钟蛋白 CRY1 的人胃癌细胞系,并检测 CRY1 过表达对细胞内 cAMP 生成造成的影响。**方法** 克隆 CRY1 基因,构建出过表达 CRY1 基因的慢病毒穿梭质粒。制备并浓缩过表达 CRY1 的慢病毒颗粒,用其感染人胃癌 HGC-27 细胞,筛选获得稳定过表达 CRY1 的细胞系。对过表达 CRY1 的细胞及未过表达的对照组细胞给予异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)刺激,检测两组细胞内 cAMP 含量的变化的差异。**结果** 成功构建过表达生物钟蛋白 CRY1 的人胃癌细胞系。Real-Time RT-PCR 结果显示,相对于对照组,过表达组细胞内 CRY1 mRNA 表达量高出约 64 倍。Western blotting 结果显示,相对于对照组,过表达组细胞内 CRY1 蛋白表达量高出近 4 倍。在受到 ISO 刺激后,过表达组细胞的 cAMP 的生成量相对于对照组明显较少。**结论** 在人胃癌 HGC-27 细胞中过表达生物钟蛋白 CRY1,显著抑制了 ISO 刺激下细胞内 cAMP 的生成。

【关键词】 人胃癌 HGC-27 细胞; CRY1; cAMP

[中图分类号]R437.71 [文献标识码]A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.16.000

Inhibition of cellular cAMP production in human gastric HGC-27 cells by over expressing the circadian protein CRY1 HUANG Qian-wu. School of preclinical medicine, Wannan Medical College, Wuhu, Anhui, 241002, China.

【Abstract】 Objective To establish a human gastric cancer cell line with the circadian protein CRY1 being stably over expressed, and to determine the effect of CRY1 over expression on cellular cAMP production. **Methods** The CRY1 gene was cloned, and lentiviral transfer plasmid encoding the CRY1 gene was constructed. The lentiviral particles that over expressing CRY1 were prepared and concentrated, which were used to infect the human gastric cancer HGC-27 cells. The cell line with CRY1 being stably over expressed was obtained by screening. The CRY1 over expressed cells and the control cells were treated with isoproterenol (ISO), and the changes of the cellular cAMP levels were detected. **Results** The human gastric cancer cell line with CRY1 being stably over expressed was successfully established. The results of Real-Time RT-PCR showed that the level of CRY1 mRNA in the over expression group was about 64 times higher than that in the control group. Western blotting results showed that the level of CRY1 protein in the over expressing group was about four times higher than that in the control group. After the treatment of ISO, the cAMP production in the over expressing group was significantly lower than that in the control group. **Conclusions** Over expressing of CRY1 in the human gastric cancer HGC-27 cells significantly inhibited the ISO-stimulated cellular cAMP production.

【Key words】 Human gastric cancer HGC-27 cells; CRY1; cAMP

人体的昼夜节律是人体生理的一个基本属性,人体各种生理过程包括体温、能量代谢、激素分泌和睡眠等都存在昼夜节律,而昼夜节律受到人体内生物钟的调控^[1]。流行病学研究表明,生物钟的紊乱会使人患癌症的风险大大增加,也会影响肿瘤患者的预后^[2]。人隐色素 1(CRY1, cryptochrome1)是光修复酶的同源物,但生物学功能与光修复酶不同,CRY1不具有修复 DNA 上紫外损伤的能力,在哺乳动物体内主要扮演着生物钟蛋白的角色。越来越多的研究表明,生物钟蛋白 CRY1 与肿瘤之间有着很重要的关系。已发现 CRY1 大量在视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)组织中表达。在对小鼠的研究中发现,在 SCN 被手术破坏的小鼠皮下种植的肿瘤,其生长比在正常小鼠皮下种植的肿瘤快^[3]。研究表明,CRY1 敲除后会使细胞内抗有丝分裂激酶 Wee1 表达量上调,但是在辐射环境中,CRY1 敲除的小鼠和正常的小鼠相比患肿瘤概率并无明显差异^[4]。抑癌基因 P53 基因突变的小鼠,其患肿瘤的风险比正常小鼠明显增高;但进一步敲除 CRY1,反而会降低小鼠患肿瘤的风险,并延长其寿命 1.5 倍^[5]。由

此可见,CRY1 不仅可以调节生物钟,还可以参与体内许多其他生物学功能,其在肿瘤的发生、发展和预后中也可能起到了一定的作用。为了探索 CRY1 在胃癌细胞的增殖中的作用,我们构建了 CRY1 稳定过表达的人胃癌 HGC-27 细胞系,检测了 CRY1 基因和蛋白表达变化,并对其可能作用的信号通路如 cAMP 通路做了初步探索。

一、材料与方法

1.质粒、菌株、细胞株:慢病毒三质粒包装系统质粒由森灵质粒平台购买,分别是:过表达穿梭质粒:pCDH-ECMV-MCS-3×FLAG-EF1α-ZsGreen1-T2A-Puro,辅助质粒:psPAX2、pMD2.G。感受态 DH5α 菌种由本实验室保存。人胃癌 HGC-27 细胞、人胚肾 293T 细胞均由本实验室保存。

2.试剂:RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA Marker、胰蛋白酶、BCA 蛋白浓度试剂、HRP 标记二抗均购自碧云天生物科技有限公司。RPMI-1640 培养基、非必需氨基酸(NEAA)购自 Gibco 公司。胎牛血清购自于四季青公司。蛋白预染 Maker 购自于 Thermofisher 公司。CRY1 单克隆抗

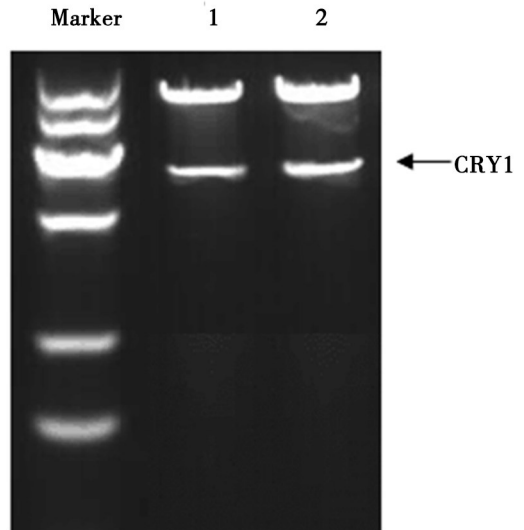
体购自于 Santa Cruz 公司, GAPDH 抗体购自于博士德公司。Trizol 购自 Invitrogen 公司。

3. 方法: (1) CRY1 过表达载体的构建: 从培养的 HGC-27 细胞中提取总 RNA, 所提 RNA 经过检测后符合逆转录要求, 进行逆转录 cDNA 的合成。将逆转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR, 获得含目的基因 CRY1 全长的产物。产物通过琼脂糖凝胶电泳, 使用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化。将目的基因 CRY1 的扩增产物和 pCDH-ECMV-MCS-3×FLAG-EF1 α -ZsGreen1-T2A-Puro 质粒同时用 BamH1 和 Xho1 内切酶进行双酶切。酶切所得产物再次使用琼脂糖凝胶电泳。通过胶回收试剂盒对酶切产物进行胶回收后, 使用 T4 连接酶连接。将连接产物转化到 DH5 α 感受态, 37 °C 过夜培养后, 挑出单菌落于 100 ml LB 中扩大培养。待菌液 OD 值达到 1.0 时, 取菌液送测序公司测序。并将成功构建的穿梭质粒命名为 pCDH-CRY1 质粒。(2) 过表达 CRY1 慢病毒载体的制备: 共转染 pCDH-CRY1、psPAX2、pMD2.G 质粒至对数期状态的 293T 细胞中。因穿梭质粒中同时可表达绿色荧光蛋白 (GFP), 所以在实验过程中可通过荧光显微镜观察转染效率。分两次收集 48 h 内细胞上清, 用 0.45 μ m 过滤器过滤上清液于 40 ml 超速离心管中, 浓缩至需要的病毒浓缩体积, 分装后 -80 °C 保存。(3) CRY1 过表达 HGC-27 细胞株的感染及筛选: 将 HGC-27 细胞用含 10% 的胎牛血清的 RPMI-1640 培养基进行培养, 待细胞密度生长至 50% ~ 60% 时, 加入过表达 CRY1 的慢病毒颗粒感染。待细胞可以稳定传代, 用嘌呤霉素筛选的阳性克隆, 培养 5 代后鉴定细胞内 CRY1 的表达, 获得 CRY1 稳定过表达的细胞系, 作为 CRY1 过表达组。同样的实验条件下, 我们还构建了感染空载慢病毒的细胞系, 作为实验的对照组。(4) RT-PCR 检测 CRY1 的 mRNA 的表达: 收集 CRY1 过表达组与对照组细胞, 以 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计测量 RNA 浓度, 并使用琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性。以基因特异性引物进行 PCR 扩增, 以 β -actin 基因作内参, 进行 Real Time PCR 检测 CRY1 的 mRNA 表达量。CRY1 引物序列: sense: 5' - GCATCAACAGGTGGCGATTT - 3'; antisense: 5' - TAGCTGCGTCTCGTTCCCTTT-3'。 β -actin 引物序列: sense: 5' - CAAGGTCATCCATGA - CAACTTTG - 3'; antisense: 5' - GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'。(5) 细胞内 cAMP 含量的检测: 使用美国 BD 公司 cAMP 检测试剂盒, 按操作步骤进行检测。待细胞密度至 70% ~ 80% 时, 对细胞进行处理, 处理完后, 使用 lysisbuffer 将细胞重悬。反复冻融细胞 5~6 次, 使细胞完全裂解。在 ELISA 反应 96 孔板中, 按照说明书要求依次加入 Primary Antibody Solution、cAMP conjugate、样品、substratesolution、stopsolution。孵育两小时后, 通过酶标仪 450 nm 的光检测吸光度, 对照标准品浓度, 计算出样品的 cAMP 浓度。(6) 蛋白免疫印迹法 (Western Blotting): 待细胞密度生长到 70% ~ 80% 时, 吸去培养基, 用预冷的 PBS 清洗。使用 RIPA 裂解液裂解细胞, 离心后分装, 通过 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 通过半干法转移至 PVDF 膜上。使用 CRY1 抗体及对照 GAPDH 抗体孵育, 清洗后使用 HRP 标记的二抗孵育, 使用化学发光法检测样品信号。

4. 统计学处理: 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计量数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同处理组之间差异的比较用独立样本 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, 图中以 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 表示。

二、结果

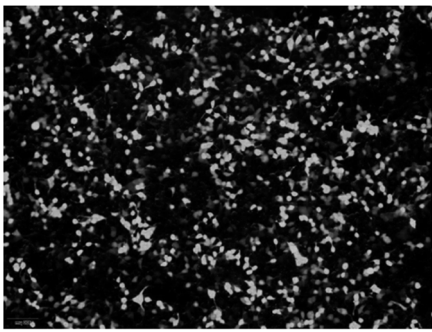
1. 构建慢病毒 CRY1 过表达穿梭质粒: 从 HGC-27 细胞中提取总 RNA, 逆转录成 cDNA 后, 通过 PCR 扩增 CRY1 基因, 将基因片段酶切后插入穿梭质粒, 获得 CRY1 过表达穿梭质粒。所得质粒通过 BamH1 和 Xho1 内切酶进行双酶切鉴定, 发现在 1700bp 处有明显的基因片段 (见图 1)。对通过双酶切鉴定的质粒进行测序, 测序结果通过序列比对验证, 发现克隆基因的序列完全正确, 无突变和缺失。并将成功构建的质粒命名为 pCDH-CRY1。



1 号、2 号泳道均为挑取单菌落后, 经过扩大培养, 提取质粒通过 BamH1 和 Xho1 内切酶进行双酶切验证结果。均在正确位置 (~1700bp) 发现目的条带

图 1 双酶切实验鉴定慢病毒 CRY1 过表达穿梭质粒

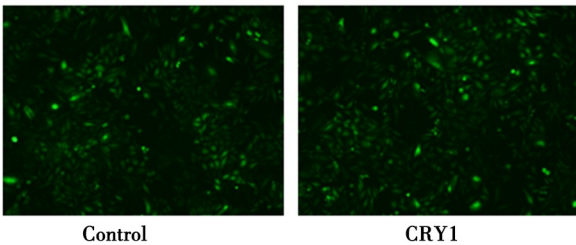
2. 过表达 CRY1 慢病毒颗粒的制备: 将穿梭质粒 pCDH-CRY1 与两个辅助质粒 psPAX2、pMD2.G 按照 5 : 4 : 1 的比例转染进对数期的 293T 细胞内, 6 h 后换入新鲜培养液。因穿梭质粒同时可表达 GFP 蛋白, 所以在实验过程中可通过荧光显微镜观察转染效率。三质粒共转染 12 h 后, 在 400 nm 激发光下观察 293T 细胞内由 GFP 蛋白发出荧光, 发现绝大部分细胞中都具有荧光, 证明质粒转染效率 > 90% (见图 2)。转染后 48 h 内, 分两次收集细胞上清, 浓缩至需要的病毒浓缩体积, 获得过表达 CRY1 慢病毒颗粒。



穿梭质粒和辅助质粒共转入 293T 细胞 12 h 后,在荧光显微镜下通过 400 nm 激发光检测 GFP 蛋白的荧光(100×)

图 2 通过荧光显微镜检测慢病毒穿梭质粒的转染效率

3.慢病毒颗粒对 HGC-27 细胞的感染及稳定细胞系的制备:使用过表达 CRY1 慢病毒颗粒及空载慢病毒颗粒感染 HGC-27 细胞 48 h 后,荧光显微镜下均可见 GFP 绿色荧光,感染 72 h 后,绿色荧光强度加强。用含有嘌呤霉素的培养基传代培养,最初细胞死亡较多,待传代 3 代以后,细胞几乎无死亡,则表明剩余的细胞均是含有嘌呤霉素抗性的细胞,可稳定表达 GFP 蛋白(见图 3)。



慢病毒颗粒感染 HGC-27 细胞后,通过嘌呤霉素筛选传代后,细胞在荧光显微镜下通过 400 nm 激发光检测,可见细胞中 GFP 蛋白发出绿色荧光(100×)

图 3 荧光显微镜检测慢病毒颗粒对 HGC-27 细胞的感染

4.检测稳定过表达 CRY1 的人胃癌细胞系中 CRY1 mRNA 的表达水平:将筛选出成功感染过表达 CRY1 慢病毒颗粒的细胞(过表达组)以及对对照组细胞培养至细胞密度为 80%左右,提取细胞总 RNA,逆转录后进行 Real Time PCR 实验,检测细胞中 CRY1 mRNA 水平。通过与对照组比较,过表达组细胞 CRY1 mRNA 水平是对照组的 64 倍,差异具有明显的统计学意义($P < 0.001$,见图 4)。

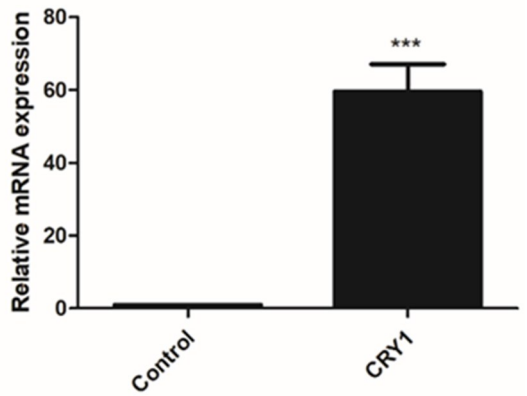
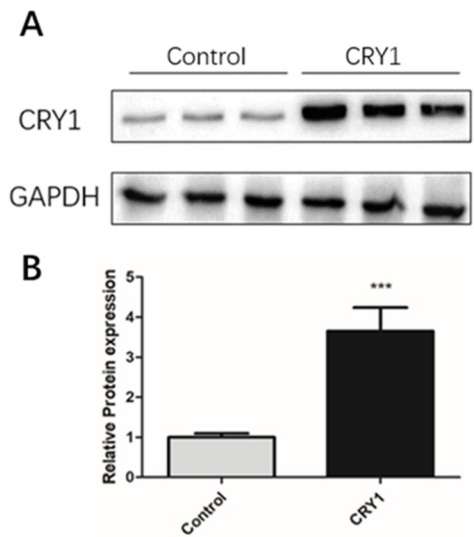


图 4 CRY1 过表达组与对照组细胞中 CRY1 mRNA 相对表达量

5.检测稳定过表达 CRY1 的人胃癌细胞系中 CRY1 蛋白的表达水平:将筛选出成功感染过表达 CRY1 慢病毒颗粒的细胞(过表达组)以及对对照组细胞培养至细胞密度为 80%左右,并提取总蛋白。通过 Western blotting 检测细胞内 CRY1 蛋白表达量。结果显示,CRY1 过表达组细胞中 CRY1 蛋白的表达量是对照组的近 4 倍,差异具有显著的统计学意义($P < 0.001$,见图 5)。



A 图为 Western Blot 检测 CRY1 过表达组与 Control 组 HGC-27 细胞中 CRY1 蛋白相对表达量,B 图为 Western Blot 结果统计图

图 5 CRY1 过表达组细胞与对照组细胞中 CRY1 蛋白的表达量

6.稳定过表达 CRY1 的人胃癌细胞系给予 ISO 刺激后 cAMP 变化情况:正常培养条件下,CRY1 过表达组细胞和对照组细胞给予等量 ISO 或 DMSO 处理,使用 cAMP ELISA 检测试剂盒检测细胞内 cAMP 含量。结果表明,DMSO 处理的两组细胞内 cAMP 的含量都无明显变化。对照组细胞受 ISO 刺激后,细胞内 cAMP 含量有明显升高;而与对照组相比,CRY1 过表达组细胞中内 cAMP 的生成受到明显抑制,二者差异具有统计学意义($P < 0.01$,见图 6)。

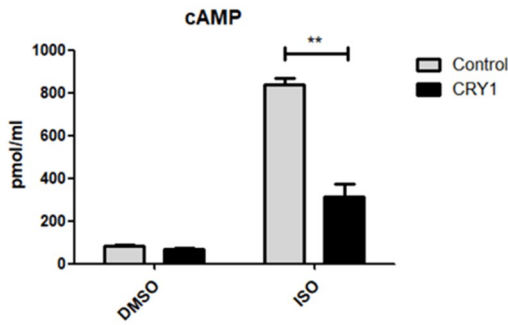


图 6 CRY1 过表达组细胞与对照组细胞中受 ISO 刺激后细胞内 cAMP 生成的变化

讨论 胃癌是人类常见的恶性肿瘤之一,据国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)公布的最新统计结果显示,胃癌是全世界第四大恶性肿瘤^[6]。CRY1 作为一种生物钟蛋白,其表达异常与一些肿瘤的发生、发展和预后可能有直接或间接关系。对于慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)的临床研究显示,CRY1 高表达的患者较低表达的患者无进展生存期显著缩短,提示 CRY1 可以作为慢性淋巴细胞白血病疾病进展和预后标志^[7]。对于结直肠癌的研究也表明,肿瘤组织中 CRY1 多为高表达,其表达水平与淋巴结转移和肿瘤 TNM 分期具有显著相关性。临床随访发现 CRY1 高表达与结直肠癌患者无病生存期和总生存期减少相关^[8]。但另一项临床研究却显示,CRY1 在结直肠癌肿瘤组织和癌旁组织中的表达差异没有统计学意义,CRY1 高表达患者与低表达患者的生存率差异也没有统计学意义^[9]。还有报道指出,CRY1 和 PER2 可在肿瘤细胞中抑制低氧诱导的血管内皮生长因子的转录,可能起到抗肿瘤血管生成的作用^[10]。而在 CRY1/CRY2 双敲除小鼠的组织和细胞中,促炎细胞因子的表达持续增高,这可能导致慢性炎症疾病甚至肿瘤^[11]。

cAMP 是最早发现的细胞内的第二信使^[12]。cAMP 可以通过 PKA 依赖性或非依赖性方式,影响许多细胞功能,如代谢、基因表达、离子通道激活、细胞增殖、分化、凋亡等,并被认为是与癌症有着非常重要的相关性^[13]。此外,cAMP 信号传导与其他细胞内信号传导途径相互作用,包括细胞因子和 Ras-Raf-Erk 途径等^[14]。值得注意的是,这些信号传导途径在肿瘤的发生发展中也发挥着重要作用,并且信号传导途径的组合阻断被认为是治疗癌症的有效策略^[15]。研究表明,刺激 cAMP 生成的腺苷酸环化酶激动剂可以有显著的抗肿瘤活性^[16]。一些 cAMP 类似物也具有明显的抗肿瘤活性,如 8-Cl-cAMP、8-PIP-cAMP、8-HA-cAMP 都在肿瘤细胞中表现出了明显的抗增殖作用。其中 PKA 选择性的 cAMP 类似物的抗增殖作用与生长阻滞有关,而 8-Cl-cAMP 则与促凋亡作用相关^[17]。

本实验通过慢病毒为载体,成功构建出稳定过表达 CRY1 的人胃癌细胞系。此工作为研究在 CRY1 过表达的情况下,胃癌细胞的增殖、迁移,以及一些抗肿瘤药的细胞功能实验提供了良好的模型。此外,我们通过常用的 β 受体激动剂 ISO 处理人胃癌 HGC-27 细胞,发现可以使细胞内产生大量的 cAMP。初步研究表明,这种处理对 HGC-27 细胞的增

殖、迁移和侵袭都有着明显的抑制作用。然而在本研究中发现,在 CRY1 稳定过表达的细胞系中,ISO 处理刺激细胞内产生 cAMP 的能力受到明显抑制,同时也能部分减弱 ISO 造成的对细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。深入分析该现象,本研究推测 CRY1 在肿瘤细胞中的过表达,有可能使肿瘤细胞获得对一些刺激 cAMP 生成的抗肿瘤药物的耐药性。此推测是否成立,以及其相关的临床意义,还需要作进一步的深入研究。

参 考 文 献

- [1] Kondratov RV, Gorbacheva VY, Antoch MP. The role of mammalian circadian proteins in normal physiology and genotoxic stress responses[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2007, 78: 173-216.
- [2] Mormont MC, Levi F. Circadian - system alterations during cancer processes; a review[J]. *Int J Cancer*, 1997, 70(2): 241-247.
- [3] Filipski E, King VM, Li X, et al. Host circadian clock as a control point in tumor progression[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(9): 690-697.
- [4] Gauger MA, Sancar A. Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(15): 6828-6834.
- [5] Ozturk N, Lee JH, Gaddameedhi S, et al. Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(8): 2841-2846.
- [6] Lim CH, Kim SW, Kim WC, et al. Anemia after gastrectomy for early gastric cancer: long-term follow-up observational study[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(42): 6114-6119.
- [7] Lewintre EJ, Martfn CR, Ballesteros CG, et al. Cryptochrome - 1 expression; a new prognostic marker in B-cell chronic lymphocytic leukemia[J]. *Haematologica*, 2009, 94(2): 280-284.
- [8] Yu H, Meng X, Wu J, et al. Cryptochrome 1 overexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61679.
- [9] Oshima T, Takenoshita S, Akaike M, et al. Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(5): 1439-1446.
- [10] Koyanagi S, Kuramoto Y, Nakagawa H, et al. A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7277-7283.
- [11] Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, et al. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(31): 12662-12667.
- [12] Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles[J]. *J Biol Chem*, 1958, 232(2): 1077-1091.
- [13] Gancedo JM. Biological roles of cAMP; variations on a theme in the different kingdoms of life[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2013, 88(3): 645-668.
- [14] Follin - Arbelet V, Torgersen ML, Naderi EH, et al. Death of multiple myeloma cells induced by cAMP - signaling involves downregulation of Mcl-1 via the JAK/STAT pathway[J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(2): 323-331.
- [15] Awada A, Aftimos PG. Targeted therapies of solid cancers; new options, new challenges[J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(3): 296-304.
- [16] Murray F, Insel PA. Targeting cAMP in chronic lymphocytic leukemia; a pathway - dependent approach for the treatment of leukemia and lymphoma[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17(8): 937-949.
- [17] Bergantin LB. Diabetes and cancer: Debating the link through Ca⁽²⁺⁾/cAMP signalling[J]. *Cancer Lett*, 2019, 448: 128-131.

(收稿日期:2019-03-12)

(本文编辑:郭俊杰)

作者单位:241002 安徽芜湖,皖南医学院基础医学院

基金项目:安徽省自然科学基金项目(1708085MH188)

通信作者:徐蕾,Email:hsuley@ustc.edu

小儿法洛四联症矫治术后急性肾损伤危险因素分析

高婕 崔海丽 孙超 闫玉荣 张全意 晏馥霞

【摘要】 目的 回顾性分析体外循环下行矫治手术的法洛四联症患儿临床资料,分析法洛四联症矫治术后急性肾损伤(AKI)的围术期危险因素。**方法** 通过分析我院2016年1月—2018年12月在本院行法洛氏四联症矫治术的908例患儿的临床数据,按照RIFLE标准定义急性肾损伤及损伤的程度,将患儿分为非急性肾损伤组(非AKI组)和急性肾损伤组(AKI组,包括风险期、损伤期、衰竭期),比较两组患儿围术期的各项临床指标,计算法洛四联症患儿完全矫治术后急性肾损伤的发生率,并通过Logistic回归分析找出急性肾损伤的围术期危险因素。**结果** 共入选826例患儿,其中非AKI组710(86.0%)例,AKI组116(14.0%)例。术后损伤期患儿32例(27.6%),衰竭期14例(12.1%),其中8例(6.9%)患儿术后行透析治疗。多因素Logistic回归分析结果表明患儿术中造影剂(OR=2.564,95%CI=1.258-5.229, $P=0.010$)、术后使用去甲肾上腺素(OR=7.466,95%CI=1.914-29.118, $P=0.004$)及使用红细胞(OR=1.297,95%CI=1.063~1.581, $P=0.010$)是小儿法洛四联症矫治术后发生AKI的独立危险因素。**结论** 法洛四联症矫治术后急性肾损伤的发生率为14.0%,其中处于损伤期和衰竭期的发生率为39.7%。患儿术中造影剂、术后使用去甲肾上腺素及使用红细胞是法洛四联症完全矫治术后发生急性肾损伤的独立危险因素。

【关键词】 法洛四联症; 小儿; 体外循环; 急性肾损伤

[中图分类号]R [文献标识码]A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.16.000

Analysis on risk factors for acute kidney injury after pediatric correction of tetralogy of fallot GAO-Jie.

Department of anesthesiology, affiliated hospital of Binzhou Medical University, Binzhou, Shandong, 256603, China.

【Abstract】 Objective The clinical data of children, received total correction of tetralogy of fallot under extracorporeal circulation, was analyzed retrospectively. And analyze the perioperative risk factors of acute kidney injury after pediatric correction of tetralogy of fallot.**Methods** Clinical data of 908 cases of children, those who underwent correction of tetralogy of fallot in our hospital during January 2016 and December 2018, was analyzed. According to the occurrence of acute kidney injury defined by consensus RIFLE criteria, they were divided into 2 groups, the group of acute kidney injury (AKI group, including Risk, Injury, Failure,) and the group of non-acute kidney injury (none AKI group). The perioperative clinical indexes of the two groups were compared, and calculate the occurrence of AKI in children received correction of tetralogy of fallot. Logistic regression was used to identify the risk factors for acute kidney injury after total correction of tetralogy of Fallot surgery.**Results** A total of 826 patients were enrolled, of which 710(86.0%)patients in non-acute kidney group and 116(14.0%)patients in acute kidney group. 32 patients were in postoperative injury period(27.6%)and 14 were in failure period(12.1%), and 8(6.9%)required dialysis. Multiple logistic regression showed that intraoperative using contrast medium (OR=2.564,95%CI=1.258~5.229, $P=0.010$), postoperative using norepinephrine (OR=7.466,95%CI=1.914~29.118, $P=0.004$)and using red blood cells (OR=1.297,95%CI=1.063~1.581, $P=0.010$)were independent risk factors for acute kidney injury after pediatric correction of tetralogy of Fallot.**Conclusions** The rate of acute kidney injury after pediatric correction of tetralogy of Fallot is 14.0%,including 39.7% in injury or failure period. Independent risk factors for acute kidney injury in pediatric patients undergoing correction of tetralogy of Fallot are intraoperative using contrast medium, postoperative using norepinephrine and using red blood cells.

【Key words】 Tetralogy of Fallot; Children; Cardiopulmonary bypass; Acute kidney injury

急性肾损伤(acute kidney injury,AKI)是小儿体外循环下行心脏手术后常见的并发症之一。据报道小儿心脏手术后急性肾损伤的发生率高^[1-2],在新生儿中可高达62%^[3]。其发生可能与年龄、体重、体外循环时间、炎症及术中缺血再灌注损伤等因素有关^[4-5]。急性肾损伤与患儿术后ICU停留时间、住院时间及术后病死率有相关性^[6-9]。法洛四联症是常见的小儿复杂先天性心脏病之一。以往针对法洛四联症患儿行矫治术后急性肾损伤的报道较少。现回顾本院最近3年

(2016年1月—2018年12月),行法洛四联症矫治术患儿的临床数据,探讨法洛四联症矫治术后AKI的发生率,找出AKI发生的独立危险因素。

一、资料与方法

1.一般资料:回顾性分析2016年1月—2018年12月在本院行法洛氏四联症矫治术的908例患儿的临床数据,按照RIFLE标准定义急性肾损伤及损伤的程度,将患儿分为非急性肾损伤组(非AKI组)和急性肾损伤组(AKI组)两组。(1)