

论著

文章编号:1000-5404(2012)05-0396-05

超声微泡介导 H-FABP 基因改善慢性心衰大鼠的心功能

童欣,刘地川,吴泓权,蔡敏 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院心内科)

[摘要] **目的** 研究超声靶向破坏微泡(ultrasound targeted microbubble destruction,UTMD)技术转染 H-FABP 基因对心肌梗死后心功能的影响。**方法** 通过结扎成年雄性 Wistar 大鼠 46 只,体质量(220±20)g,冠状动脉前降支建立心肌梗死模型。于心肌梗死 8 周后,将存活的 31 只心衰大鼠随机分为 4 组:①H-FABP+超声+微泡组(H-FABP+US/MB 组, $n=8$),用超声破坏携 H-FABP 基因微泡转染大鼠心肌;②超声+微泡组(US/MB 组, $n=8$),用超声破坏不含基因的微泡;③H-FABP+生理盐水组(H-FABP+NS 组, $n=8$),由颈静脉输入含基因的生理盐水;④单纯手术组(SA 组, $n=7$),仅由颈静脉输入生理盐水;⑤假手术组(SS 组, $n=6$)。基因转染 14 d 后测定各组大鼠心功能,Western blot 检测左心室非梗死区 H-FABP 表达,ELISA 法检测静脉血及非梗死区心肌游离脂肪酸(FFA)含量,硫代巴比妥酸反应物(TBARS)法检测非梗死区心肌组织脂质过氧化水平,免疫组织化学法检测非梗死区心肌诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达。**结果** 心肌梗死大鼠各组与假手术组比较心功能明显下降($P<0.05$),H-FABP 表达明显下降($P<0.05$),静脉血及心肌 FFA 含量明显升高($P<0.05$),丙二醛(MDA)水平明显升高($P<0.05$),iNOS 表达明显升高($P<0.05$)。H-FABP+超声+微泡组与心肌梗死大鼠中的另外 3 组比较心功能明显改善($P<0.05$),H-FABP 表达升高($P<0.05$),心肌 FFA 含量降低($P<0.05$),MDA 水平降低($P<0.05$),iNOS 表达受抑制($P<0.05$)。**结论** 超声微泡介导的 H-FABP 转染可改善大鼠慢性心衰时心功能。可能与通过提高 H-FABP 表达、降低心肌 FFA 含量、改善心肌氧化应激水平、进而抑制 iNOS 的表达有关。

[关键词] 超声;微泡;脂肪酸结合蛋白;心力衰竭;游离脂肪酸

[中图分类号] R541.610.5;R445.1;R459.9

[文献标志码] A

Ultrasound microbubble-mediated heart fatty acid binding protein in treatment of chronic heart failure rats

Tong Xin, Liu Dichuan, Wu Hongquan, Cai Min (Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of heart fatty acid binding protein (H-FABP) transfected by ultrasound targeted microbubble destruction (UTMD) technology on cardiac function after post-infarction. **Methods** Myocardial infarction (MI) was induced in Wistar male rats ($n=46$, 220±20 g) by ligating the left anterior descending coronary artery. After 8 weeks, the 31 surviving rats with heart failure were randomly divided into 4 groups, H-FABP+ultrasound+microbubble group (H-FABP+US/MB group, $n=8$, ultrasound-targeted destruction microbubble loaded with H-FABP gene was transfected to rat heart), ultrasound+microbubble group (US/MB group, $n=8$, ultrasonic destruction of microbubbles loaded without gene), H-FABP+normal saline group (H-FABP+NS group, $n=8$, normal saline containing gene were infused from jugular vein), surgery alone group (SA group, $n=7$, only normal saline were infused from jugular vein), and sham-operation group (SS group, $n=6$). In 14 d after transfection, the cardiac function of all the rats were measured, H-FABP expression in non-infarct region of left ventricular was detected by Western blotting, free fatty acid (FFA) content of venous blood and non-infarct region myocardium were detected by ELISA, lipid peroxidation in non-infarct region of left ventricular was detected by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method, and the iNOS expression in non-infarct region of left ventricular was detected by immunohistochemical assay. **Results** Compared with sham-operation group, left ventricular ejection fraction (LVEF) and the H-FABP expression were decreased significantly ($P<0.05$), free fatty acid content and malondialdehyde (MDA) level and the iNOS expression were obviously increased ($P<0.05$) in the MI groups. Compared with US/MB, H-FABP+NS and SA groups, LVEF and the H-FABP expression were apparently increased

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30670870)

[通信作者] 刘地川,电话:(023)63693702,E-mail:LDC670220@163.com

($P < 0.05$), free fatty acid content of myocardium and MDA level were obviously decreased ($P < 0.05$) and the iNOS expression was markedly inhibited ($P < 0.05$) in H-FABP + US/MB group. **Conclusion** Ultrasound microbubble-mediated H-FABP transfection improves cardiac function *via* upregulating H-FABP, reducing myocardial FFA, ameliorating myocardial oxidative stress and inhibiting iNOS expression.

[**Key words**] ultrasound; microbubble; fatty acid-binding protein; heart failure; free fatty acid

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30670870). Corresponding author: Liu Dichuan, Tel: 86-23-63693702, E-mail: LDC670220@163.com

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是绝大多数心脏病发展的终末阶段,目前临床主要应用如血管紧张素转换酶抑制剂、 β 受体阻滞剂等对其预后进行干预,但效果仍不理想。已有很多学者针对心衰发生、发展过程中的关键靶点进行基因干预,并取得了有效的成果^[1]。

脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding protein, FABP)是一种细胞质内非酶蛋白,相对分子质量为 $14 \times 10^3 \sim 15 \times 10^3$,由 126 ~ 134 个氨基酸构成。目前已发现 9 种亚型,心脏型脂肪酸结合蛋白(Heart FABP, H-FABP)是其中一种,占心脏全部可溶性蛋白的 4% ~ 8%^[2]。在细胞内,FABP 结合游离脂肪酸,增加脂肪酸溶解度,促进其从细胞膜到脂肪酸氧化位点(线粒体、过氧化物酶体)、酯化位点的转运。除此之外,还有重要的心肌保护作用。Srimani 等^[2]发现脂肪酸结合蛋白能改善缺血再灌注心脏的心肌功能。Chen 等^[3]还发现在心梗后心衰新西兰白兔,左室射血分数与 H-FABP 水平成显著正相关。因此,我们推测 H-FABP 极有可能对改善 CHF 发挥重要作用。

超声靶向破坏微泡(ultrasound targeted microbubble destruction, UTMD)是一种非侵入性、组织特异性、可重复的基因转染技术,可有效实现质粒载体的体内转染^[4]。本实验旨在利用超声微泡造影剂介导 H-FABP 基因转染心衰大鼠的心肌,观察其对心功能的影响,并探讨其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材料和仪器

成年雄性 Wistar 大鼠 46 只,体质量(220 ± 20)g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。pcDNA3.1-H-FABP 质粒由上海捷瑞生物工程有限公司构建;无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;小鼠抗大鼠 Cardiac FABP 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体,兔抗大鼠 iNOS 多克隆抗体,即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒,DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;大鼠游离脂肪酸(FFA)酶联免疫检测试剂盒购自美国 R&D 公司;TBARS 硫代巴比妥酸反应物测试盒购自美国 BioAssay Systems 公司;HX-200 动物呼吸机(成都

泰盟科技有限公司);Vivid7 型多普勒超声仪(探头频率 10 MHz,GE 公司);Philips IE33 型超声诊断仪;ELx800 阅读型自动微孔板仪。

1.2 心衰模型的复制^[5]

取 40 只大鼠,10%水合氯醛 0.3 ml/kg 腹腔麻醉,颈、胸部脱毛,气管插管,呼吸机辅助呼吸,于左胸骨旁开胸暴露心脏,在肺动脉圆锥与左心耳交界处下方 3 mm 处用 6-0 丝线结扎左冠脉前降支,前壁局部心肌颜色由鲜红变为暗红,心电图 ST 段持续抬高为建模成功标志。另 6 只大鼠于相同部位只穿线不结扎,作为假手术组(sham surgery,SS)。术后腹腔注射青霉素 4×10^4 U/只 $\times 3$ d 抗感染。

1.3 载 pcDNA3.1-H-FABP 基因超声微泡的制备

取含有 pcDNA3.1-H-FABP 质粒的甘油菌于 LB 培养基中大量扩增,收集菌液按照质粒大提试剂盒说明书提取质粒,ELx800 阅读型自动微孔板仪测定质粒含量。将二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)5 mg、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)2 mg、司盘 60(Span60)1 mg、甘油 50 μ l、H-FABP 基因 2 mg 和一定量 PBS 混合后置于 1 个 1.5 ml 内含全氟丙烷的管形瓶,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,然后将管形瓶振荡 40 s,PBS 冲洗,即可制成载基因的脂质超声微泡^[6]。

1.4 实验分组及处理

结扎左冠脉前降支 8 周后,共计 9 只大鼠死亡(死亡原因考虑术后急性左心衰、恶性心律失常、感染),假手术组无大鼠死亡,将剩余存活的 31 只心梗大鼠随机分为 4 组:①H-FABP + 超声 + 微泡组(H-FABP + US/MB 组, $n = 8$),②超声 + 微泡组(US/MB 组, $n = 8$),③H-FABP + 生理盐水组(H-FABP + NS 组, $n = 8$),④单纯手术组(SA 组, $n = 7$)。H-FABP + US/MB 组经颈静脉注入载基因微泡 2 ml,用二维超声监控心肌显影,使用 S5-1 探头,启用二次谐波模式使发射频率和接收频率分别为 1.6 MHz 和 3.2 MHz,将机械指数调至 1.3,深度为 4 cm,采用心电触发,每 4 ~ 8 个心动周期触发 1 次,至造影剂显影消失。US/MB 组经颈静脉注入不含基因的微泡 2 ml,采用上述相同超声参数。H-FABP + NS 组由颈静脉输入含基因的等量生理盐水。SA 组仅由颈静脉输入等量生理盐水。SS 组大鼠不做任何处理作为对照。

1.5 超声心动图检测心功能及标本采集

基因转染 14 d 后,10%水合氯醛 0.3 ml/kg 腹腔麻醉大鼠,胸部备皮,仰卧位固定于操作台用 Vivid 7 型多普勒超声仪(探头频率 10 MHz)检测各组大鼠心功能。二维超声切面上显示左室长轴,用 M 型超声分别测量左室舒张末期内径(LVEDD),左室收缩末期内径(LVEDS),射血分数(EF%)。心

功能检测完毕后,下腔静脉采血,断颈处死大鼠后开胸取出心脏,生理盐水反复冲洗,去除血管组织、心房、右室及左室梗死后纤维化区域,剩余左室非梗死心肌一部分行石蜡切片,另一部分液氮保存备用,采集血液 3 000 r/min 离心 25 min 吸取上清液 -20 °C 保存备用。

1.6 Western blot 检测 H-FABP 表达

取 100 mg 冻存心肌组织加入 1 ml 裂解液冰浴匀浆,4 °C 离心机 12 000 ×g 离心 15 min,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,每组取等量蛋白样品经 10% SDS-PAGE 转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗(小鼠抗大鼠 Cardiac FABP 单克隆抗体 1:1 000)4 °C 孵育过夜,β-actin(1:200)作为内参,二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG)室温孵育 1 h,ECL 显色,凝胶成像系统扫描后用 Quantity One 4.6.2 图像分析软件进行半定量分析,计算 H-FABP 与 β-actin 灰度比值作为相对表达量。

1.7 ELISA 法检测血及心肌 FFA 含量

取约 220 mg 心肌组织置于冰冷的匀浆器中,加入一定量 PBS 充分匀浆,3 000 r/min 离心 25 min 仔细收集上清液与保存的血浆上清液按大鼠游离脂肪酸 ELISA 试剂盒说明书步骤检测 FFA 含量。

1.8 TBARS 法检测心肌组织脂质过氧化水平

取约 20 mg 心肌组织加入 200 μl 冰冷的 PBS,200 W 超声粉碎 20 s,10% TCA 沉淀蛋白,14 000 r/min 离心 5 min,吸取上清,按照 TBARS 硫代巴比妥酸反应物测试盒说明书步骤检测样品 MDA 含量。

1.9 免疫组织化学法检测 iNOS 表达水平

取左室心肌石蜡切片常规脱蜡至水,抗原修复,3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,5% BSA 37 °C 封闭 30 min,滴加抗大鼠 iNOS (1:100) 4 °C 过夜;滴加生物素标记二抗 37 °C 孵育 30 min,滴加 SABC 37 °C 孵育 30 min,DAB 显色,苏木精复染、脱水、封片。Image-Pro Plus 6.0 软件分析阳性细胞积分光密度值(IOD)。

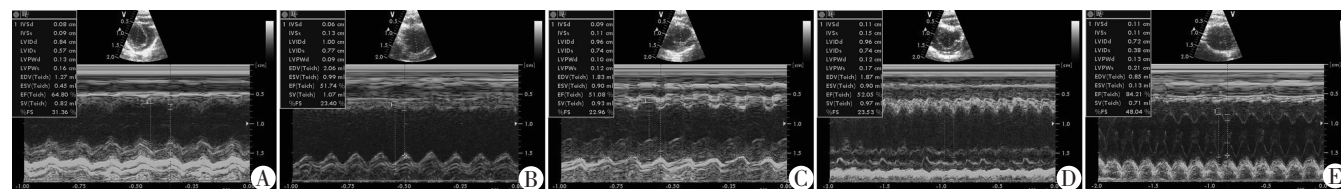
1.10 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件分析处理数据,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能检查结果

基因转染后 14 d,实验各组与假手术组比较射血分数明显下降($P < 0.05$),左室收缩末期内径明显增大($P < 0.05$);H-FABP + US/MB 组与 US/MB 组、H-FABP + NS 组、SA 组相比 EF 明显提高($P < 0.05$),左室收缩末期内径、左室舒张末期内径明显缩小($P < 0.05$),见表 1、图 1。



A: H-FABP + US/MB 组; B: US/MB 组; C: H-FABP + NS 组; D: SA 组; E: SS 组

图 1 各组大鼠左室长轴切面 M 型超声心动表现

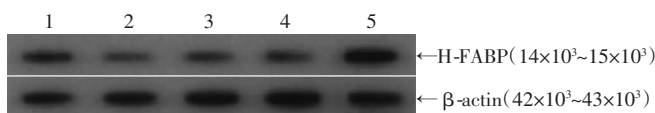
表 1 H-FABP 转染两周后各组大鼠心脏超声检查结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	左室舒张末期 内径(mm)	左室收缩末期 内径(mm)	射血分数(%)
H-FABP + US/MB 组	8	7.52 ± 0.75	5.34 ± 0.49 ^a	64.38 ± 3.24 ^a
US/MB 组	8	9.42 ± 0.74 ^{ab}	8.06 ± 0.57 ^{ab}	49.56 ± 5.95 ^{ab}
H-FABP + NS 组	8	9.98 ± 1.10 ^{ab}	8.02 ± 0.65 ^{ab}	48.21 ± 5.93 ^{ab}
SA 组	7	9.76 ± 1.76 ^{ab}	8.06 ± 0.61 ^{ab}	48.10 ± 6.59 ^{ab}
SS 组	6	7.38 ± 0.61	3.72 ± 0.13	84.99 ± 4.21

a: $P < 0.05$, 与 SS 组比较; b: $P < 0.05$, 与 H-FABP + US/MB 组比较

2.2 各组大鼠心肌 H-FABP 表达

各组大鼠心肌 H-FABP 相对表达量分别为: H-FABP + US/MB 组(0.83 ± 0.07); US/MB 组(0.47 ± 0.08); H-FABP + NS 组(0.45 ± 0.05); SA 组(0.48 ± 0.02); SA 组(1.15 ± 0.13)。实验各组与假手术组比较心肌组织 H-FABP 表达明显降低($P < 0.05$),而 H-FABP + US/MB 组明显提高了 H-FABP 表达水平($P < 0.05$),H-FABP + NS 组与 US/MB、SA 组相比则无统计学意义,见图 2。



1: H-FABP + US/MB 组; 2: US/MB 组; 3: H-FABP + NS 组; 4: SA 组; 5: SS 组

图 2 Western blot 检测各组大鼠心肌组织 H-FABP 表达

2.3 各组大鼠血及心肌 FFA 含量

由表 2 可见, H-FABP + US/MB 组、US/MB 组、H-FABP + NS 组、SA 组血及心肌组织中 FFA 水平比 SS 组明显升高($P < 0.05$),H-FABP + US/MB 组心肌组织中 FFA 含量比 US/MB 组、H-FABP + NS 组、SA 组明显降低($P < 0.05$),但仍然高于 SS 组。

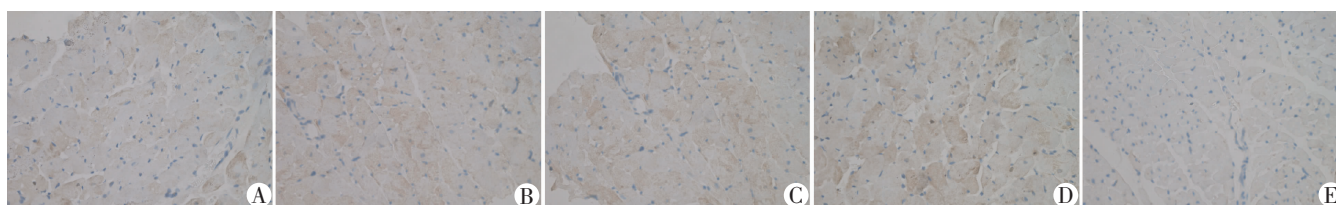
表 2 H-FABP 转染两周后各组大鼠血及心肌 FFA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血 FFA (nmol/ml)	心肌 FFA (nmol/g)
H-FABP + US/MB 组	8	283.62 ± 22.69 ^a	66.87 ± 6.02 ^a
US/MB 组	8	279.54 ± 23.59 ^a	85.34 ± 6.60 ^{ab}
H-FABP + NS 组	8	287.74 ± 27.61 ^a	82.80 ± 6.35 ^{ab}
SA 组	7	278.53 ± 22.49 ^a	83.70 ± 6.45 ^{ab}
SS 组	6	208.89 ± 24.10	46.36 ± 8.24

a: $P < 0.05$, 与 SS 组比较; b: $P < 0.05$, 与 H-FABP + US/MB 组比较

2.4 各组大鼠心肌 MDA 水平

各组大鼠心肌 MDA 含量分别为: H-FABP + US/MB 组(0.51 ± 0.06) μmol/g; US/MB 组(0.77 ± 0.07) μmol/g; H-FABP + NS 组(0.76 ± 0.08) μmol/g; SA 组(0.78 ± 0.05) μmol/g; SA 组(0.34 ± 0.05) μmol/g。实验各组与假手术组比较心肌组



A: H-FABP + US/MB 组; B: US/MB 组; C: H-FABP + NS 组; D: SA 组; E: SS 组

图3 各组大鼠心肌 iNOS 表达 (SABC ×400)

织 MDA 水平明显升高 ($P < 0.05$), H-FABP + US/MB 组心肌组织中 MDA 含量比 US/MB 组、H-FABP + NS 组、SA 组明显降低 ($P < 0.05$), 但仍然高于 SS 组。

2.5 各组大鼠心肌 iNOS 表达情况

SS 组中 iNOS 几乎无表达, US/MB 组、H-FABP + NS 组、SA 组中 iNOS 表达与 SS 组比较明显升高 ($P < 0.05$), H-FABP + US/MB 组中 iNOS 表达与 US/MB 组、H-FABP + NS 组、SA 组比较明显降低 ($P < 0.05$), 结果见图 3。

3 讨论

近年来的研究发现, 超声微泡除了可以作为超声诊断的辅助工具, 还能作为一种新型的基因和药物载体。声孔效应和空化效应是其主要的机制^[7]。本实验中, H-FABP + US/MB 组 H-FABP 表达明显高于其余各心衰组大鼠 ($P < 0.05$), 证明通过 UTMD 有效的实现了 H-FABP 基因的心肌内转染, 并且提高了心脏射血分数。但 Vancraeynest 等^[8] 研究发现, UTMD 本身会造成心脏短暂性的左室功能障碍、微血管破裂、红细胞外渗, 但这些不利影响随着时间的推移能自行恢复。Chen 等^[9] 使用机械指数 1.6 的超声强度破坏微泡, 仅引起轻度肌钙蛋白 T 升高, 而未出现左室功能障碍或心肌损伤的病理证据。本实验中, 无心衰大鼠在接受超声微泡破裂干预时及转染后 14 d 内出现死亡。并且, 接受超声辐照两周后超声 + 微泡组与单纯手术组相比, 心功能并未进一步恶化。因此, 我们认为采用机械指数 1.3 的超声强度辐照心脏, 在本实验中具有较高的安全性。

FABP 能在病理状态下与细胞内聚集的脂肪酸及其衍生物相结合, 加速其在亚细胞位点间的交换, 保持胞浆内 FFA 浓度维持在低水平, 防止双亲性脂肪酸分子对细胞膜结构的损害。CHF 时, 交感神经系统激活, 儿茶酚胺大量释放, 加速脂肪组织分解, 导致循环 FFA 水平增高, 同时心肌脂肪酸摄取增多^[10], 脂肪酸氧化率降低^[11], FFA 在心肌细胞内聚集。这种高浓度的 FFA, 能产生“去垢样”作用, 损害细胞膜完整性, 改变离子通道状态, 诱导细胞凋亡等, 这无疑对心衰的进一步恶化产生重要作用。我们发现在心衰时 H-FABP 表达明显下调, 与 Heather 等^[12] 研究结果一致, 这必然使心肌因缺乏 H-FABP 对 FFA 的缓冲作用而更易遭

受 FFA 的损害。本实验利用超声微泡技术向心肌转染含 H-FABP 基因的表达质粒, 增加 H-FABP 表达, 有效地降低了心肌内 FFA 含量。

另外, H-FABP 能有效地清除心肌细胞内的 $O_2^{\cdot -}$ 、 OH^{\cdot} 、 $OCl^{\cdot -}$ 等氧自由基^[13], 氧化应激干预治疗有利于防止心衰的发展^[14]。在 CHF 时心肌活性氧 (ROS) 产生增加, 大量 ROS 能促进心肌细胞肥大, 诱导心肌细胞凋亡^[14], 并且导致脂质过氧化反应。测定脂质过氧化程度, 能较好地反应机体氧化应激水平。本实验采用 TBARS 法测定脂质过氧化产物 (主要是丙二醛), 发现各心衰组非梗死区心肌 MDA 水平明显升高 ($P < 0.05$), 表明 CHF 时脂质过氧化反应增强。在 H-FABP + US/MB 组中 MDA 水平低于其余心衰各组 ($P < 0.05$), 再次证实随着 H-FABP 表达增多, 势必成为 ROS 攻击的靶点, 从而清除 ROS, 减少了脂质过氧化反应的发生, 起到保护心肌细胞的作用。

有研究显示, 在心衰患者的心肌中, iNOS 的表达水平显著增高^[15]。iNOS 可催化 L-精氨酸合成过量的 NO, 与 $O_2^{\cdot -}$ 反应生成一种强氧化剂——(ONOO⁻)。ONOO⁻ 可造成组织损伤, 参与 CHF 的发病^[16]。高水平的 FFA 还可造成细胞内神经酰胺水平升高, 进一步诱导 iNOS 的表达上调^[17]; 另外, 大量 ROS 可以激活 NF- κ B, 启动 iNOS 的转录^[18]。本实验中, 在 H-FABP + US/MB 组, 随着 H-FABP 表达升高, iNOS 表达下调 ($P < 0.05$), 我们认为这与 H-FABP 降低了心肌细胞内 FFA 及氧化应激水平有一定相关性。从另一方面来看, H-FABP 清除 ROS, 也减少了 NO 与 $O_2^{\cdot -}$ 反应生成毒性 ONOO⁻ 的机会。

本实验还存在超声参数优化和质粒载体表达时间较短的问题, 如能提高目的基因持续表达时间及表达的量, 以及进一步揭示 H-FABP 在心衰时的相关作用机制, 相信 H-FABP 会在心血管疾病方面有更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Vinge L E, Raake P W, Koch W J. Gene therapy in heart failure[J]. *Circ Res*, 2008, 102(12): 1458 - 1470.
- [2] Srimani B N, Engelman R M, Jones R, et al. Protective role of intracoronary fatty acid binding protein in ischemic and reperfused myocardium[J]. *Circ Res*, 1990, 66(6): 1535 - 1543.

[3] Chen C Y, Hsu H C, Lee B C, *et al.* Exercise training improves cardiac function in infarcted rabbits: involvement of autophagic function and fatty acid utilization[J]. *Eur J Heart Fail*, 2010, 12(4): 323-330.

[4] Fujii H, Li S H, Wu J, *et al.* Repeated and targeted transfer of angiogenic plasmids into the infarcted rat heart via ultrasound targeted microbubble destruction enhances cardiac repair[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(16): 2075-2084.

[5] 田颖, 王江, 李振魁, 等. 大鼠心肌梗死后心力衰竭模型的建立和评估[J]. *心脏杂志*, 2006, 18(4): 404-406.

[6] Li X, Wang Z, Ran H, *et al.* Experimental research on therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor directed by ultrasound-targeted microbubble destruction in rats[J]. *J Ultrasound Med*, 2008, 27(3): 453-460.

[7] Newman C M, Bettinger T. Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(6): 465-475.

[8] Vaneraeynest D, Havaux X, Pouleur A C, *et al.* Myocardial delivery of colloid nanoparticles using ultrasound-targeted microbubble destruction[J]. *Eur Heart J*, 2006, 27(2): 237-245.

[9] Chen S, Kroll M H, Shohet R V, *et al.* Bioeffects of myocardial contrast microbubble destruction by echocardiography [J]. *Echocardiography*, 2002, 19(6): 495-500.

[10] Taylor M, Wallhaus T R, Degrado T R, *et al.* An evaluation of myocardial fatty acid and glucose uptake using PET with [18F]fluoro-6-thia-heptadecanoic acid and [18F]FDG in patients with congestive heart failure[J]. *J Nucl Med*, 2001, 42(1): 55-62.

[11] Lopaschuk G D, Ussher J R, Folmes C D, *et al.* Myocardial fatty acid metabolism in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(1): 207-258.

[12] Heather L C, Cole M A, Lygate C A, *et al.* Fatty acid transporter levels and palmitate oxidation rate correlate with ejection fraction in the infarcted rat heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(3): 430-437.

[13] Jones R M, Prasad M R, Das D K. Modulation of fatty acid-binding capacity of heart fatty acid-binding protein by oxygen-derived free radicals[J]. *Mol Cell Biochem*, 1990, 98(1/2): 161-166.

[14] Tsutsui H, Ide T, Kinugawa S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9/10): 1737-1744.

[15] Zhang P, Xu X, Hu X, *et al.* Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure[J]. *Circ Res*, 2007, 100(7): 1089-1098.

[16] Giordano F J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 500-508.

[17] 柯柳, 余叶蓉, 张玄娥, 等. 高游离脂肪酸血症对心肌结构与功能的影响及其机制[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2009, 40(1): 24-28.

[18] Csiszar A, Wang M, Lakatta E G, *et al.* Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB[J]. *J Appl Physiol*, 2008, 105(4): 1333-1341.

(收稿:2011-11-10;修回:2011-12-12)

(编辑 梁嘉)

(上接 395 页)

表1 2组治疗不同时间血沉、CRP、DAS评分下降值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ESR (mm/h)			CRP (mg/L)			DAS28 评分		
	2周	4周	8周	2周	4周	8周	2周	4周	8周
研究组	7.6 ± 2.8	13.5 ± 5.3	19.2 ± 7.1	8.7 ± 3.4	14.6 ± 5.2	19.3 ± 8.3	2.30 ± 0.40	3.23 ± 0.45	3.95 ± 0.52
对照组	5.5 ± 2.7	9.1 ± 4.9	12.9 ± 6.5	6.1 ± 3.2	10.1 ± 4.8	11.2 ± 7.9	2.07 ± 0.30	2.69 ± 0.38	3.30 ± 0.46
P	P > 0.05	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05

3 讨论

类风湿关节炎是一种主要侵犯关节滑膜的慢性炎症性疾病, 目前认为 RA 慢性炎症诱导细胞成分和滑膜内基因的表达发生改变, 导致滑膜的过度增殖以及软骨、骨和韧带等关节结构遭到破坏^[2]。故治疗类风湿关节炎并阻止关节破坏关键是及早控制炎症反应。在类风湿关节炎研究中, 而 IL-1 在 RA 的发病机制中是滑膜炎反应的关键性细胞因子, 故理论上抑制 IL-1 的生成即可减轻类风湿关节炎的炎症反应。目前已有价格昂贵的 IL-1 受体拮抗剂应用于临床并取得显著的治疗效果。

双醋瑞因是一种口服的 IL-1 抑制剂, 其不良反应主要为腹泻。来氟米特是一种目前广泛应用于治疗类风湿关节炎药物, 其不良反应主要为血液系统损伤, 肝功能损伤等。有研究应用双醋瑞因联合来氟米特及甲氨蝶呤治疗难治性类风湿关节炎有效^[5]。而本研究应用双醋瑞因联合来氟米特治疗类风湿关节炎, 观察 8 周, 结果显示双醋瑞因加用来氟米特组较单用来氟米特组血沉, CRP, 患者关节肿胀, 疼痛数目以及 DAS 评分明显减低, 具有统计学意义。相对于应用生物制剂来说, 双醋瑞因联合来氟米特治疗类风湿关节炎控制急性炎症是一种经济,

有效地治疗方案。由于本研究时间较短, 不能对应用双醋瑞因联合来氟米特治疗类风湿关节炎患者关节破坏能否减轻做出判断, 有待进一步研究。

参考文献:

[1] Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 356-361.

[2] 蒋明, David Y U, 林孝义, 等. 中华风湿病学[M]. 北京: 华夏出版社, 2004: 697-827.

[3] Martel-Pelletier J, Mineau F, Jolicoeur F C, *et al.* *In vitro* effects of diacerhein and rhein on interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes [J]. *J Rheumatol*, 1998, 25(4): 753-762.

[4] 菲尔斯坦. 凯利风湿病学[M]. 粟占国, 唐福林, 译. 北京: 北京大学医学出版社, 2010: 1188-1189.

[5] 李燕, 于学军, 胡俊平, 等. 双醋瑞因联合来氟米特与甲氨蝶呤治疗难治性类风湿关节炎的临床研究[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(17): 3381-3383, 3385.

(收稿:2011-09-07;修回:2011-11-17)

(编辑 吴培红)