

# 增龄对退行性瓣膜病患者血清中免疫炎症因子表达的影响

于智勇 陈月云

**【摘要】** 目的:研究老年退行性心脏瓣膜病(SDHVD)患者血清中免疫炎症因子的增龄性变化,探讨退行性瓣膜病的发病机制。 方法:根据彩色超声多普勒检查结果,将所有 SDHVD 患者按年龄分为 60~70 岁组、70~80 岁组、>80 岁组,同时选择 60 岁以上无瓣膜钙化患者为对照组。应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测入选者血清肌球蛋白重链(MHC)、干扰素调节因子-4(IRF-4)、热休克蛋白 70(HSP70)、热休克蛋白 22(HSP22)mRNA 的表达,应用放射免疫法测定各组患者血清肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)的含量。 结果:SDHVD 患者血清中 MHC mRNA、IRF-4 mRNA 水平随年龄的增加而减少,与年龄呈负相关( $r = -0.49, -0.51, P < 0.05$ )。HSP70 mRNA、HSP22 mRNA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平随年龄的增加而增加,与年龄呈正相关( $r = 0.50, 0.44, 0.40, 0.39, 0.65, P < 0.05$ )。 结论:免疫炎症因子参与了退行性心脏瓣膜病的发展,其表达随着年龄的增长而具有相应的变化。

**【关键词】** 老年退行性心脏瓣膜病;增龄;免疫炎症因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.01.018

**Effect of aging on serum levels of expressed immunoinflammatory factors in patients with senile degenerative heart valvular disease** YU Zhi-yong, CHEN Yue-yun. *Department of Geriatrics, the Affiliated Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Anhui 241001, China*

**【Abstract】 Objective:** To investigate the effect of aging on the expressions of immunoinflammatory factors in patients with senile degenerative heart valvular disease and further to explore the pathogenesis of degenerative valvular disease (SDHVD). **Methods:** According to the results of color Doppler ultrasound, all patients with senile degenerative heart valvular disease were divided into three groups, namely the 60~70 age group ( $n = 24$ ), 70~80 age group ( $n = 28$ ) and >80 years old group ( $n = 22$ ). Patients without valvular calcification who were more than 60 years old were selected as control group ( $n = 25$ ). All serum samples were tested with RT-PCR for each expression level of myosin heavy chain (MHC), interferon regulatory factor-4 (IRF-4), heat shock protein 70 (HSP70) and heat shock protein 22 (HSP22) mRNA. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) were measured by radioimmunoassay (RIA). **Results:** In SDHVD patients, serum MHC mRNA and IRF-4 mRNA contents decreased with age, and negatively correlated with age ( $r = -0.49, -0.51$ , both  $P < 0.05$ ). HSP70 mRNA, HSP22 mRNA, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 levels increased with age, positively correlated with age ( $r = 0.50, 0.44, 0.40, 0.39, 0.65$ , all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Immunoinflammatory factors are involved in the pathogenesis of senile degenerative heart valvular disease, and their expressions correlate with increasing age.

**【Key words】** Senile degenerative heart valvular disease; Aging; Immunoinflammatory factor

老年退行性心脏瓣膜病(SDHVD)在西方国家

整体人群中的发病率达 2.5%, >75 岁人群高达 13%<sup>[1]</sup>。随着我国老龄化社会的形成,SDHVD 患者也逐渐增多,大多数患者需行心瓣膜置换术治疗。尽管 SDHVD 的发生随年龄的增长而增加,但它的发生并不是一种单纯的退行性病变,年龄并不是引起这些病变的唯一因素。瓣膜钙化与动脉粥

基金项目:安徽省卫生厅科研基金(09C237)

作者单位:241001 芜湖市,皖南医学院附属弋矶山医院老年医学内科

通信作者:陈月云, Email: chen Yueyun@sohu.com

样硬化的发生发展有相似的过程,其病变过程包括脂质沉积、巨噬细胞和 T 淋巴细胞浸润以及细胞基底膜的断裂破坏。本实验拟从免疫炎症因子随着增龄的变化方面探讨 SDHVD 的发病机制。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

经彩色多普勒超声心动图检查选择 2009 年 10 月至 2011 年 5 月 SDHVD 住院患者 74 例,按年龄分为 60~70 岁组( $n=24$ ),平均年龄( $66.36 \pm 6.5$ )岁、70~80 岁组( $n=28$ ),平均年龄( $76.3 \pm 5.53$ )岁; $>80$  岁组( $n=22$ ),平均年龄( $86.28 \pm 6.15$ )岁,其中男性 41 例,女性 33 例。单纯老年主动脉瓣钙化 35 例,单纯老年性二尖瓣钙化 19 例,主动脉瓣钙化合并二尖瓣钙化 20 例。同时选择 60 岁以上无瓣膜钙化患者为对照组( $n=25$ ),年龄 62~89 岁,平均年龄( $74.5 \pm 8.2$ )岁,男性 14 例,女性 11 例。

### 1.2 诊断标准

SDHVD 诊断标准:(1)主动脉瓣钙化是指主动脉瓣回声增强、瓣叶僵硬,且瓣膜厚度 $>3$  mm 或瓣环回声明显增强;(2)二尖瓣钙化是指瓣环或二尖瓣与左室后壁间呈斑块状强回声,二尖瓣回声增强,厚度 $>3$  mm,也包括腱索和乳头肌局限性增厚、回声增强;(3)三尖瓣和肺动脉瓣钙化是指瓣膜回声增强、增厚或有钙化点<sup>[2]</sup>。并排除风湿性、病毒性、乳头肌功能不全、腱索断裂以及感染性心内膜炎等原因所致的瓣膜病变,并且无先天性结缔组织异常和钙磷代谢异常的疾病或病史。

### 1.3 血清免疫炎症因子的测定

清晨空腹采集静脉血,离心分离血清, $-70^{\circ}\text{C}$ 保存,采用放射免疫分析法测定各组患者血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)- $1\beta$ 、IL-6 的含量。

### 1.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

取肝素抗凝血样 2 ml,采用 Trizol 一步法提取总 RNA,逆转录成 cDNA。

血清肌球蛋白重链(MHC)引物序列为:上游 5'-GTGCGACAA CACTTATGAAA-3',下游 5'-AAACAGCCGTCCTGAGAT-3',扩增产物长度 317 bp。

干扰素调节因子-4(IRF4)引物序列为:上游 5'-TGAGCGAGGGCATAAATACAG-3',下游 5'-CTTCACGCACCATTCAGACAG-3',扩增产物长度 307 bp。

热休克蛋白(HSP)22 引物序列为:上游 5'-CCTTCTCCTGCCACTACCC-3',下游 5'-TGCCA GACACCTCCACGT-3',扩增产物长度 351 bp。

HSP 70 引物序列为:上游 5'-CACCACC TACTCCGACAACCA-3',下游 5'-GCCCCTAATC TACCTCCTCAATG-3',扩增产物长度 647 bp。

GAPDH 引物序列为:上游 5'-ACCA CAGTCCATGCCATCAC-3',下游 5'-TCCACCA CCCTGTTGCTGTA-3',产物长度 452 bp。

RT 反应:取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA 作为模板,oligo-dT 作引物, $65^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,迅速置于冰上 2 min。逆转录体系中,逆转录酶为 AMV,反应体系为 10  $\mu\text{l}$ ,后瞬时离心,PCR 仪上反应混合物于  $37^{\circ}\text{C}$  温育 60 min 后,升温至  $70^{\circ}\text{C}$  加热 15 min 使逆转录酶灭活。立即转入冰浴中冷却 5 min。反应产物立即扩增或 $-20^{\circ}\text{C}$ 冻存。PCR 反应:将 RT 产物加入 PCR 反应体系中, $94^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min,然后按  $94^{\circ}\text{C}$  1 min、 $55^{\circ}\text{C}$  30 s、 $72^{\circ}\text{C}$  30 s 循环 30 次, $72^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。PCR 产物进行电泳或冻存。

### 1.5 PCR 产物电泳分析

配制 1% 琼脂糖凝胶,加入终浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的溴化乙锭(EB);取 5  $\mu\text{l}$  PCR 终产物及 DNA marker,以  $1 \times \text{TAE}$  为缓冲液,电压 80V,电泳 20 min,采用 Tanon 凝胶成像与分析系统 Image System Ver 4.0 测定扩增产物条带平均光密度值。以目的基因 mRNA 与 GAPDH mRNA 的比值表示,进行半定量比较。

### 1.6 统计学分析

用 SPSS12.0 统计软件进行分析。组间比较采用  $t$  检验,相关性研究:采用直线相关分析。以  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 各组患者基础资料比较

SDHVD 各组与对照组在性别,合并高血压、冠心病、糖尿病方面相比无明显差异( $P > 0.05$ )。

### 2.2 各组检测指标比较

SDHVD 患者 MHC mRNA、IRF-4 mRNA 含量随年龄的增加而减少,HSP70 mRNA、HSP22 mRNA、TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$ 、IL-6 水平随年龄的增加而增加(见表 1)。对各年龄组免疫炎症因子含量与年龄进行回归分析,相关系数分别为( $r = -0.49$ 、 $-0.51$ 、 $0.50$ 、 $0.44$ 、 $0.40$ 、 $0.39$ 、 $0.65$ , $P < 0.05$ )。

表 1 各组检测指标比较

观察指标	对照组	60~70 岁组	70~80 岁组	>80 岁组
MHC mRNA	0.79 ± 0.14	0.51 ± 0.12 <sup>(2)</sup>	0.38 ± 0.06 <sup>(2)(3)</sup>	0.21 ± 0.03 <sup>(2)(3)(4)</sup>
IRF-4 mRNA	0.84 ± 0.11	0.57 ± 0.07 <sup>(2)</sup>	0.45 ± 0.10 <sup>(2)</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>(2)(3)(4)</sup>
HSP70 mRNA	0.21 ± 0.17	0.45 ± 0.23 <sup>(1)</sup>	0.61 ± 0.13 <sup>(2)</sup>	0.87 ± 0.14 <sup>(2)(3)(4)</sup>
HSP22 mRNA	0.22 ± 0.13	0.50 ± 0.11 <sup>(1)</sup>	0.68 ± 0.09 <sup>(2)</sup>	0.83 ± 0.15 <sup>(2)(3)(4)</sup>
TNF-α(pmol/L)	9.07 ± 2.15	12.39 ± 2.75 <sup>(2)</sup>	14.92 ± 1.94 <sup>(2)(3)</sup>	16.09 ± 2.27 <sup>(2)(3)</sup>
IL-1β(μg/L)	0.19 ± 0.07	0.24 ± 0.09 <sup>(1)</sup>	0.25 ± 0.08 <sup>(2)</sup>	0.28 ± 0.09 <sup>(2)</sup>
IL-6 (ng/L)	91.01 ± 12.91	110.15 ± 13.40 <sup>(2)</sup>	121.21 ± 14.25 <sup>(2)(3)</sup>	135.14 ± 16.40 <sup>(2)(3)(4)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup>*P*<0.05,<sup>(2)</sup>*P*<0.01;与 60~70 岁组比较,<sup>(3)</sup>*P*<0.01;与 70~80 岁组比较,<sup>(4)</sup>*P*<0.01

3 讨论

SDHVD 同动脉粥样硬化一样,也是一种炎症反应过程,有炎症细胞参与<sup>[3]</sup>。肌球蛋白是将储存在 ATP 中的化学能转化为机械能的分子马达,与信号传导、肌肉收缩、趋化性迁移和细胞形状的改变等有关<sup>[4]</sup>。老年人外周血单核细胞肌球蛋白减少,可能影响到免疫细胞的许多功能<sup>[5]</sup>,最终导致免疫功能低下。干扰素调节因子家族是能对干扰素的基因表达进行调控的一类转录因子,参与炎症反应、细胞周期和细胞凋亡等生物学过程。随着年龄增长,淋巴细胞中 IRF-4 减少时,巨噬细胞就会过多地释放前炎症因子<sup>[6]</sup>,进一步造成细胞的损伤,导致心肌组织自身免疫反应。

HSP70 可提高细胞对各种损伤因子的耐受能力,起到保护细胞结构和功能的作用。HSP70 与单核细胞膜有高度亲和力,当 HSP70 作用于单核细胞时,细胞内的钙离子快速外流,并激活核因子以及促使致炎因子如 TNF-α、IL-1β、IL-6 上调<sup>[7]</sup>。HSP22 具有丝/苏氨酸激酶(Akt)活性,是一种磷蛋白。HSP22 可激活心肌蛋白酶(AMPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)通路、蛋白激酶 C(PKC)等抗凋亡、细胞保护、预适应和代谢刺激等存活通路,保护缺血损伤心肌<sup>[8]</sup>。

TNF-α、IL-1β、IL-6 是动脉粥样硬化斑块中常见的炎症标志物,均可介导免疫和参与炎症反应,TNF-α 可直接损伤血管内皮细胞,免疫黏附,微血栓形成,以及激活多形核粒细胞产生多种活性物质,导致组织器官损伤<sup>[9]</sup>。IL-6 是一种多功能的细胞因子,其在血管内皮细胞、平滑肌细胞、单核细胞等均可产生,进而在动脉粥样硬化及其他炎症反应中发挥作用,IL-6 的大量释放对患者是一个危险信

号。IL-1β 是由单核-巨噬细胞分泌的一种多肽,能独立调节心血管功能,在体外可引起心肌细胞肥大、促进成纤维细胞增殖、降低心肌收缩力、增强 TNF-α 对靶器官的损伤,从而在心血管疾病的病理过程中发挥重要作用。

本研究中 SDHVD 患者 MHC mRNA、IRF-4 mRNA 水平随年龄的增加而减少,HSP70 mRNA、HSP22 mRNA、TNF-α、IL-1β、IL-6 含量随年龄增长而增加。对 MHC mRNA、IRF-4 mRNA、HSP70 mRNA、HSP22 mRNA、TNF-α、IL-1β、IL-6 含量与年龄进行回归分析,相关系数分别为 - 0.49、- 0.51、0.50、0.44、0.40、0.39、0.65。说明 SDHVD 与免疫炎症反应有关,且年龄是重要因素。

参 考 文 献

[ 1 ] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics-2011 uPdate; a rePort from the American Heart Association[J]. Circulation,2011,123(4):e18-e209.

[ 2 ] Boon A,Cherix E,Lodder J,et al. Cardiac valve calcification: characteristics of patients with calcification of the mitral annulus or aortic valve[J]. Heart,1999,78(5):472-474.

[ 3 ] Mohler ER 3rd,Gannon F,Reynolds C,et al. Bone formation and inflammation in cardiac valves[J]. Circulation, 2001, 103(11):1522-1528.

[ 4 ] Takashima S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction [J]. Circ J, 2009, 73(2): 208-213.

[ 5 ] Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006,103(10):3681-3686.

[ 6 ] Honma K, Udono H, Kohno T, et al. Interferon regulatory factor 4 negatively regulates the production of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 ( 44 ): 16001-16006.

- [7] Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, et al. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells[J]. J Virol, 2005, 79(8):4557-4567.
- [8] Danan IJ, Rashed ER, Depre C, et al. Therapeutic potential of H11 kinase for the ischemic heart[J]. Cardiovasc Drug Rev, 2007, 25(1):14-29.

- [9] Xu L, Ren B, Li M, et al. Ulinastatin suppresses systemic inflammatory response following lung ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Trans Plant Proc, 2008, 40(5):1310-1311.

(收稿:2011-05-23 修回:2011-08-23)

(本文编辑:丁媛媛)

## • 病例报告 •

# 经皮导管介入治疗主动脉窦瘤破入右心房 2 例

周建华 袁战军 黄建波 热 娜 单文军

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.01.019

主动脉窦瘤(sinus aortic aneurysm)破裂,又称为瓦氏窦瘤破裂,是一种罕见的先天性畸形,约为先天性心脏病的 0.31%~3.56%<sup>[1]</sup>。主动脉窦瘤破裂后,原低压的心腔突然承受很高的压力和容量负荷,如不及时治疗,可出现心力衰竭至危及生命,现将我院成功经导管介入封堵主动脉窦瘤 2 例报告如下:

### 1 病例资料

例 1 女性,维吾尔族,41 岁,因活动时心慌、胸闷、气短 3 月,加重 1 周入院。患者 3 月前因提重物时突然出现心前区疼痛、胸闷,约半小时症状减轻,未在意。随后间歇性胸闷、气短,尤其活动时明显。在当地医院查心脏超声诊断:“主动脉窦瘤破裂”转我院治疗。查体:血压 128/54 mmHg,心率 92 次/分,周围血管征不明显,心前区可触及震颤,心界叩诊向左下扩大,心尖位于左第 6 肋间隙锁骨中线外 2 cm,胸骨左缘 3~4 肋间可闻及 4/6 级粗糙连续性杂音。心电图检查:窦性心律。胸片:两肺血增多,心影轻度增大,两侧胸腔少量积液。心脏超声检查示:左心室、左心房、右心房、右心室舒张末径分别为 50 mm、38 mm、42 mm、27 mm,右心系统扩大,证实右冠窦破入右心房,遂在局麻下行主动脉窦瘤介入封堵术。

例 2 男性,哈萨克族,12 岁,突然胸闷、气短 8 d,腹胀伴双下肢水肿 6 d 入院。患者 8 d 前无明显诱因突然出现心前区疼痛、胸闷,气短 2 d 后出现腹胀、双下肢水肿、体重增加。在当地医院查心脏 B 超诊断为:无冠窦瘤破入右心房转我院治疗。查体:血压 119/76 mmHg,心率 106 次/分,周围血管征不明显,颈静脉怒张伴搏动,两肺泡呼吸音清,未闻及干湿性罗音,胸骨左缘第 4 肋间心前区可触及震颤,心界叩诊向左下扩大,心尖位于左第 6 肋间隙锁骨中线外 1 cm,胸骨左缘 3~4 肋间可闻及 4/6 级粗糙连续性杂音。肝位于右

肋下 4 cm,质软,腹部移动性浊音阳性。心电图检查:窦性心动过速。胸片:两肺血增多,心影轻度增大,两侧胸腔少量积液。超声检查示:无冠窦瘤破入右心房,心包少量积液,腹腔大量积液。在静脉复合麻醉下行主动脉窦瘤介入封堵术。

### 2 操作方法

术前常规行血常规、凝血功能、肝功能、肾功能、乙肝抗体,艾滋病抗体检查、胸片、心电图、心脏超声。在局麻下穿刺右股动、静脉,置入 6 F 动脉鞘,静脉注入普通肝素(100 U/kg),先进行右心导管检查,测量右心房、右心室压力,随后猪尾导管行升主动脉造影,观察主动脉窦瘤大小和形态、破口位置和大小、与右冠状动脉开口距离、主动脉瓣有无反流,左心室造影,了解是否合并室间隔缺损。按先天性心脏病室间隔缺损的方法,建立右股动脉-升主动脉-主动脉窦瘤破口-右心房-下腔静脉-右股静脉轨道,沿导丝经股静脉送入 8F 输送鞘管,选用动脉导管未闭封堵器比破口大 1~2 mm 的原则<sup>[2]</sup>,例 1 破口约 7 mm,例 2 破口 8 mm,2 例均选用北京华医圣杰公司提供的 12/14 mm 封堵器,在升主动脉打开封堵器远端伞面,缓慢拉向破口处,释放其余封堵器,B 超及升主动脉造影示封堵位置正常,主动脉瓣及右冠状动脉无影响时,释放封堵器,重复进行右心导管检查,拔出鞘管,加压包扎。

### 3 结果

2 例患者均介入封堵治疗成功。封堵前升主动脉造影示右冠状窦底部有一破口,造影剂自主动脉右冠窦喷入右心房(见图 1);经 12/14 mm 封堵器成功封堵,造影时右冠窦向右心房的分流消失(见图 2),右冠脉开口及主动脉窦无影响。右心导管检查,右心房和右心室压力较封堵前明显下降。术后第二天复查心脏超声,右心房及右心室均较介入术前明显缩小。胸片:两肺血恢复正常,心影缩小。例 2 术后 24 h 尿量为 3200 ml,低血钾导致尖端扭转型室性心动过速,经补钾等治疗后恢复正常,5 d 后水肿完全消失,腹水消退,肝脏大小恢复正常。