

N-3 多不饱和脂肪酸的抗炎效应对 C57BL/6-PD-1^{-/-} 基因敲除小鼠心房电重构的影响

付国强 曹义战 仲月霞 田小溪 王伯良

【摘要】 目的:观察 N-3 多不饱和脂肪酸(PUFAs)饲养对 C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠体内炎症和心房电重构的影响。 方法:观察和比较 C57BL/6、PD-1^{-/-} 和 PUFAs 组小鼠的血清炎症细胞因子表达水平和心房有效不应期。 结果:与 C57BL/6 组小鼠相比,PD-1^{-/-} 组小鼠血清白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、肿瘤坏死因子(TNF)和 γ 干扰素(IFN- γ)水平明显升高,同时 PD-1^{-/-} 小鼠右心耳、右房低侧壁、右房高侧壁、右房游离壁心房肌有效不应期明显缩短;PUFAs 组小鼠血清炎症细胞因子水平较 C57BL/6 小鼠组大部分仍升高,但升高趋势较 PD-1^{-/-} 组得到一定程度的遏制,PUFAs 组心房有效不应期和 C57BL/6 组相比无统计学差异。与 PD-1^{-/-} 组相比,PUFAs 组血清炎症细胞因子水平均明显降低,心房有效不应期明显延长。 结论:PD-1 基因敲除后 C57BL/6 小鼠体内炎症细胞因子水平明显升高,并出现心房有效不应期缩短,N-3 多不饱和脂肪酸饲养能够遏制这种变化趋势。

【关键词】 PD-1 基因敲除;炎症细胞因子;心房电重构;心房颤动;N-3 多不饱和脂肪酸
doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2016.04.013

N-3 polyunsaturated fatty acids prevents atrial electrical remodeling by inhibiting inflammation in C57BL/6-PD-1^{-/-} mice FU Guoqiang, CAO Yizhan, ZHONG Yuexia, TIAN Xiaoxi, WANG Boliang. Department of Emergency, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, ShanXi 710038, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of dietary N-3 polyunsaturated fatty acids on the inflammation and atrial electrical remodeling in C57BL/6-PD-1^{-/-} mice. **Methods:** The expression of inflammatory cytokines and the atrial effective refractory periods (AERPs) in C57BL/6, PD-1^{-/-} and PUFA groups were observed and compared. **Results:** The interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, tumor necrosis factor(TNF) and γ -interferon (IFN- γ) were significantly increased in PD-1^{-/-} group compared with C57BL/6 group; meanwhile, the PD-1^{-/-} mice group appeared significantly shorter AERPs in the right atrial appendage, low lateral wall, high lateral wall and free wall of right atrium compared with C57BL/6 group. Most of the inflammatory cytokines in PUFAs group mice still rose compared with C57BL/6 mice, but the rising trend had a certain degree of containment compared with PD-1^{-/-} mice; at the same time the AERPs in PUFAs mice had no statistical difference compared with C57BL/6 mice. The PUFA group demonstrated significantly lower inflammatory cytokine level and longer AERPs compared with PD-1^{-/-} group. **Conclusion:** Our findings strongly support that the inflammatory cytokines levels increase significantly in PD-1^{-/-} mice, at the same time PD-1^{-/-} mice appear significantly shorter AERPs, dietary anti-inflammation drug N-3 PUFA supplementation can curb this trend.

【Key words】 PD-1 deficiency; Inflammatory cytokines; Atrial electricity remodeling; Atrial fibrillation; N-3 polyunsaturated fatty acids

基金项目:国家自然科学基金(81070161)

作者单位:710038 西安,第四军医大学唐都医院急诊科

通信作者:王伯良,Email:wliang@fmmu.edu.cn

心房颤动(房颤)是临床最常见的心律失常,流行病学研究发现,房颤在普通人群中的发病率约为 2%,在 80 岁以上人群中的发病率超过 9%^[1]。房颤患者脑卒中、心力衰竭及全因死亡率均明显升高^[2]。近年来的流行病学和病例对照研究均提示,炎症可能是房颤的致病因素^[3],但具体机制不明确。心房的电重构能够通过多种机制使心房内易于形成多发折返环,是房颤发生的病理生理机制之一^[4]。

程序性死亡因子-1(programmed death-1, PD-1)是 T 细胞表面的 CD28 家族重要的负性共刺激因子,PD-1 基因的缺失可以增强 T 细胞活性,提高体内的炎症水平^[5]。研究发现,PD-1 基因敲除小鼠心脏局部有大量的炎症细胞浸润^[6],甚至出现致死性心肌炎^[7]。

研究表明,在饲料中添加 N-3 多不饱和脂肪酸能够降低实验动物体内系统性炎症水平^[8]。在本研究中,我们对比观察 C57BL/6 小鼠、C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠和 N-3 多不饱和脂肪酸饲养的 C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠血清炎症细胞因子的表达,检测 3 组小鼠心房肌有效不应期的改变,探讨炎症及抗炎治疗对心房电重构的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠由日本京都大学的 Tasuku Honjo 教授赠送,该模型主要用于研究炎症及免疫机制在疾病中的作用。实验分为 3 组:C57BL/6 小鼠组、C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠组(PD-1^{-/-}组)和 N-3 多不饱和脂肪酸饲养的 C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠组(PUFAs 组),每组 20 只,均为雄性,6~8 周龄。实验前均饲养于第四军医大学基础部神经生物教研室 SPF 级实验动物中心。实验开始前 4 周,PUFAs 组小鼠的饲料添加二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸,5 mg/d。

1.2 实验方法

1.2.1 血清不饱和脂肪酸水平检测 通过气相色谱法检测血清不饱和脂肪酸^[9]。摘眼球法获取实验动物血液约 2 mL,800 转/min 离心 5 min,吸取血清 100 μ L,加入无水甲醇-苯-氢氧化钠,混匀后静置 20 min,再加入 0.5 mmol/L 甲醇-盐酸 1 mL,充分混匀,4500 转/min 离心 15 min,取环己烷层,得到甲酯化的脂肪酸。应用日本岛津公司 GC/MS-QP2010 气相色谱仪对脂肪酸甲酯化产物进行分析,测定血清 N-3 多不饱和脂肪酸水平。

1.2.2 流式细胞仪微球芯片捕获技术检测炎症细胞因子表达 应用鼠 Th1/Th2/TH17 细胞因子检测

试剂盒(BD Bioscience)同时检测 7 种细胞因子即白细胞介素(IL)-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、肿瘤坏死因子(TNF)和 γ 干扰素(IFN- γ)。该试剂盒可以检测出血清中 pg 级别的炎症细胞因子。其原理是先将不同捕获抗体包被在不同荧光强度的微球上形成捕获微球,然后和待测样品溶液混合,微球上的特异性抗体与血清中相应的抗原或蛋白结合,再加入荧光标记的检测抗体,形成“三明治”夹心复合物,在流式细胞仪上进行检测,通过微球上不同的荧光强度来区分细胞因子。

摘眼球法取实验动物血约 1 mL,800 转/min 离心 5 min,吸取血清 50 μ L 和 PE 标记的检测抗体和捕获微球在避光和室温条件下共孵育 2 h,缓冲液清洗未结合的抗体,重悬于 250 μ L 缓冲液中上机检测。选择获取模式,分辨率为 1024;设获取细胞数为 R1 门内 10000 个,保证每一种细胞因子的捕获微球都能获取大约 300 个;获取数据时流速为中速。在本研究中微球上的荧光强度在氩激光器激活下于 650 nm 达到峰值,在 BD FACScalibur 流式细胞仪通过 FL4 检测。PE 荧光标记的血清样本荧光强度在 FL2 检测。

严格按照试剂盒使用说明中的步骤制备标准品,通过专用的分析软件,获取炎症细胞因子标准曲线,用于量化分析检测样品中每一种细胞因子,本研究中定标后标准曲线的相关系数(R^2)均 >0.99 。

1.2.3 心房肌有效不应期检测 按参考文献^[10]的方法检测小鼠心房肌有效不应期。各组小鼠均通过腹腔内注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉。麻醉完成后给予气管插管和呼吸机辅助呼吸,在右侧第 4 肋间隙开胸,将自制电极依次放置在右心房的心耳(RAA)、高侧壁(HRA)、低侧壁(HLA)和游离壁(ARA)。在机械通气过程中,动脉血气 pH 值调整在 7.35~7.45。

心房有效不应期的检测在 100 ms 周期进行,每 6 次 S1 刺激后附加一次额外刺激 S2,最初的额外刺激偶联间期设定在 30 ms,偶联间期设定为每 6 次刺激递增 5 ms,直到额外的刺激导致一次心房捕获。然后将额外刺激周期减少 5 ms 后,再每次递增 1 ms,直至再次发生心房捕获,将没有导致心房捕获的最长的 S1S2 间期确定为心房有效不应期。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 统计软件对资料进行分析,实验数据比较应用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为学意义差异。

2 结果

2.1 血清不饱和脂肪酸相对浓度的变化

与 C57BL/6 组比较,血清不饱和脂肪酸相对浓度在 PD-1^{-/-} 组未见明显升高($P>0.05$),经过 4 周 N-3 多不饱和脂肪酸喂养后,PUFAs 组血清不饱和脂肪酸相对浓度较 PD-1^{-/-} 组和 C57BL/6 组均明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

2.2 炎性细胞因子

与 C57BL/6 组相比,血清炎性细胞因子在 PD-1^{-/-} 组明显升高($P<0.05$),PUFAs 组血清炎性细胞因子与 C57BL/6 组相比,IL-2 无统计学差异($P>0.05$),其余炎性细胞因子仍明显升高($P<0.05$),但幅度降低。与 PD-1^{-/-} 组相比,PUFAs 组的各种细胞因子水平均明显降低($P<0.05$),见表 2。

表 2 3 组小鼠血清炎性细胞因子水平比较/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

炎性细胞因子	C57BL/6 组	PD-1 ^{-/-} 组	PUFAs 组
IL-10	210.8 ± 58.16	1220.28 ± 287.56 ⁽¹⁾	830.36 ± 191.38 ⁽³⁾⁽⁵⁾
IL-6	36.75 ± 7.15	159.87 ± 40.98 ⁽¹⁾	118.67 ± 28.76 ⁽³⁾⁽⁵⁾
IL-2	2.81 ± 0.62	3.89 ± 1.08 ⁽²⁾	3.02 ± 0.68 ⁽⁴⁾
IL-4	3.13 ± 0.34	7.21 ± 1.06 ⁽¹⁾	6.12 ± 0.91 ⁽³⁾⁽⁵⁾
IFN- γ	5.22 ± 1.19	21.9 ± 4.69 ⁽¹⁾	17.25 ± 3.46 ⁽³⁾⁽⁵⁾
TNF	24.12 ± 4.18	37.27 ± 7.98 ⁽¹⁾	29.85 ± 5.87 ⁽³⁾⁽⁵⁾
IL-17A	8.11 ± 1.72	41.98 ± 8.62 ⁽¹⁾	32.13 ± 7.01 ⁽³⁾⁽⁵⁾

注:与 C57BL/6 组比较, ⁽¹⁾ $P<0.01$, ⁽²⁾ $P<0.05$;与 PD-1^{-/-} 组比较, ⁽³⁾ $P<0.01$, ⁽⁴⁾ $P<0.05$;与 C57BL/6 组比较, ⁽⁵⁾ $P<0.05$

表 3 3 组小鼠心房有效不应期比较/ms

AERPs	C57BL/6 组	PD-1 ^{-/-} 组	PUFAs 组
RAA	43.52 ± 1.79	41.78 ± 1.69 ⁽²⁾	43.29 ± 1.49 ⁽³⁾
LRA	43.96 ± 1.78	41.36 ± 1.39 ⁽¹⁾	42.83 ± 1.58 ⁽³⁾
HRA	43.32 ± 1.53	41.58 ± 1.42 ⁽²⁾	42.96 ± 1.41 ⁽³⁾
ARA	42.98 ± 1.39	41.02 ± 1.32 ⁽¹⁾	42.38 ± 1.31 ⁽³⁾

注:与 C57BL/6 组比较, ⁽¹⁾ $P<0.01$, ⁽²⁾ $P<0.05$;与 PD-1^{-/-} 组比较, ⁽³⁾ $P<0.05$

3 讨论

炎症参与了心房电重构,炎性细胞因子导致心脏局部组织炎症反应,使心房肌细胞出现变性、坏死、凋亡,促进心房肌纤维化及瘢痕形成。心肌纤维化及心肌疤痕形成被认为是心房机电生理的非均一性和各向异性增加及传导速度减慢的病理学基础^[11]。临床观察发现,心脏外科手术后伴随的炎症状态能够影响心房组织的电结构,且炎症程度与心房电传导的不均一性、房颤的维持时间呈正相关^[12]。在这一过程中,炎性细胞因子发挥着重要作用,过度表达的肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 能够下调连接蛋白 40^[13]、Kv4. 2、

2.3 心房有效不应期检测

检测了右心耳(RAA)、右房低侧壁(LRA)、右房高侧壁(HRA)、右房游离壁(ARA)的心房有效不应期(AERPs),PD-1^{-/-} 小鼠组心房有效不应期均较 C57BL/6 组缩短,而 PUFAs 组这一趋势得到明显遏制,相比 PD-1^{-/-} 组明显延长($P<0.05$),与 C57BL/6 组对比无统计学差异($P>0.05$),见表 3。

表 1 3 组小鼠血清中不同不饱和脂肪酸成分的变化/%

脂肪酸	C57BL/6 组	PD-1 ^{-/-} 组	PUFAs 组
N-3 PUFAs	5.7 ± 0.7	5.8 ± 0.8	8.1 ± 0.9 ⁽¹⁾⁽²⁾
EPA + DHA	3.1 ± 0.6	3.2 ± 0.6	5.7 ± 1.1 ⁽¹⁾⁽²⁾

注: N-3 PUFAs 为 N-3 多不饱和脂肪酸, EPA 为二十碳五烯酸, DHA 为二十二碳六烯酸。与 PD-1^{-/-} 组比较, ⁽¹⁾ $P<0.01$; 与 C57BL/6 组比较, ⁽²⁾ $P<0.01$

Kv4. 3、Kv1. 5 和 KChIP-2 离子通道的表达^[14-15],下调连接蛋白 40 可降低心脏传导,使房性心律失常的易感性增加。而钾离子通道相关蛋白生成的减少能够减低相应的钾电流活动,降低心房有效不应期。

PD-1 是属于 CD28 家族的负性共刺激因子,它可以诱导表达于 CD8⁺ 和 CD4⁺ T 细胞、自然杀伤细胞、B 细胞以及活化的单核细胞。PD-1 基因敲除后会引发 T 细胞易于激活,从而提高机体炎症水平^[16]。本研究中,尽管 3 组实验动物生活环境相同,但环境中的病原体(细菌、病毒等)能够更大幅度地激活 PD-1^{-/-} 组小鼠体内的炎性过程,使其血清中出现了高水平的细胞因子。

研究表明 N-3 多不饱和脂肪酸预处理可以减少 TNF- α 及 IL-10 的生成^[17-18],在培养基中额外添加 N-3 多不饱和脂肪酸能够明显减少 IL-6^[19]、IL-1 β ^[20]、IL-8^[21] 的生成。本实验 PUFAs 组小鼠炎性细胞因子水平降低,再次证明不饱和脂肪酸的抗炎作用。

心房电重构引起的电生理变化是房颤发生和维持的电生理基础^[22]。心房有效不应期的缩短和有效

不应期离散度的增加能够促进心房多发折返环生成,从而使得房颤易于发生^[23]。本实验发现,和 C57BL/6 组相比,PD-1^{-/-} 组小鼠血清炎性细胞因子升高,心房有效不应期缩短。通过在饲料中添加 N-3 多不饱和脂肪酸,PUFAs 组小鼠血清炎性细胞因子升高趋势得到明显遏制,同时心房有效不应期缩短趋势也明显降低。由于心房电重构和房颤发病易感性的密切关系,我们推断 N-3 多不饱和脂肪酸能够通过其抗炎效应遏制炎性细胞因子生成,影响心房电重构,具有一定的预防和治疗房颤的作用。

参 考 文 献

- [1] Page RL. Clinical practice: newly diagnosed atrial fibrillation [J]. N Engl J Med, 2004, 351(23): 2408-2416.
- [2] 熊丹群, 陈治松, 徐文俊. 心房颤动与左心室纤维化[J]. 国际心血管病杂志, 2014, 41(3): 140-142.
- [3] 吴辉程, 海旭, 丁家望, 等. 心房颤动的炎症机制研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(4): 196-202.
- [4] Jalife J. Mechanisms of persistent atrial fibrillation [J]. Curr Opin Cardiol, 2014, 29(1): 20-27.
- [5] 周园红, 沈雪莲, 刘朝奇, 等. PD-1/PD-L1 在脓毒症发生发展过程中的作用研究[J]. 生命科学, 2014, 26(4): 419-422.
- [6] Giancchetti E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity[J]. Autoimmun Rev, 2013, 12(11): 1091-1100.
- [7] Wang J, Okazaki IM, Yoshida T, et al. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice [J]. Int Immunol, 2010, 22(6): 443-452.
- [8] Zhang Z, Zhang C, Wang H, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids prevents atrial fibrillation by inhibiting inflammation in a canine sterile pericarditis model[J]. Int J Cardiol, 2011, 153(1): 14-20.
- [9] 张中, 单守勤, 郑强荪, 等. N-3 多聚不饱和脂肪酸抑制氧化应激途径对犬无菌性心包炎所致房颤的影响[J]. 第二军医大学学报, 2014, 35(10): 1066-1072.
- [10] Etzion Y, Mor M, Shalev A, et al. New insights into the atrial electrophysiology of rodents using a novel modality: the miniature-bipolar hook electrode[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(4): H1460-1409.
- [11] Chen PS, Turker I. Epicardial adipose tissue and neural mechanisms of atrial fibrillation [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2012, 5(4): 618-620.
- [12] Ishii Y, Schuessler RB, Gaynor SL, et al. Inflammation of atrium after cardiac surgery is associated with inhomogeneity of atrial conduction and atrial fibrillation [J]. Circulation, 2005, 111(22): 2881-2888.
- [13] Sawaya SE, Rajawat YS, Rami TG. Downregulation of connexin 40 and increased prevalence of atrial arrhythmias in transgenic mice with cardiac-restricted overexpression of tumor necrosis factor[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(3): H1561-1567.
- [14] Kawada H, Niwano S, Niwano H, et al. Tumor necrosis factor-alpha downregulates the voltage gated outward K⁺ current in cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible cause of electrical remodeling in diseased hearts[J]. Circ J, 2006, 70(5): 605-609.
- [15] Petkova-Kirova PS, Gursoy E, Mehdi H, et al. Electrical remodeling of cardiac myocytes from mice with heart failure due to the overexpression of tumor necrosis factor-alpha[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(5): 2098-2107.
- [16] Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, et al. Role of the PD-1 pathway in the immune response[J]. Am J Transplant, 2012, 12(10): 2575-2587.
- [17] Babcock TA, Novak T, Ong E, et al. Modulation of lipopolysaccharide-stimulated macrophage tumor necrosis factor-alpha production by omega-3 fatty acid is associated with differential cyclooxygenase-2 protein expression and is independent of interleukin-10[J]. J Surg Res, 2002, 107(1): 135-139.
- [18] Novak TE, Babcock TA, Jho DH, et al. NF-kappa B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(1): L84-89.
- [19] Khalfoun B, Thibault F, Watier H, et al. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6[J]. Adv Exp Med Biol, 1997, 400B: 589-597.
- [20] Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases[J]. Am J Clin Nutr, 2006, 83(6): 1505S-1519S.
- [21] Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, et al. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men [J]. Lipids, 1999, 34(4): 317-324.
- [22] Lau CP, Tse HF, Siu CW, et al. Atrial electrical and structural remodeling: implications for racial differences in atrial fibrillation [J]. Cardiovasc Electrophysiol, 2012, 23(Suppl 1): s36-40.
- [23] Sharma D, Li G, Xu G, et al. atrial remodeling in atrial fibrillation and some related microRNAs [J]. Cardiology, 2011, 120(2): 111-121.

(收稿: 2015-11-30 修回: 2016-05-18)

(本文编辑: 丁媛媛)