

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01066

· 论 著 ·

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

张 中¹, 单守勤¹, 郑强荪², 赵晋波³, 阎春草¹, 石 桦¹, 孔令媛^{1*}

1. 济南军区青岛第一疗养院, 青岛 266071
2. 第四军医大学唐都医院心血管内科, 西安 710038
3. 第四军医大学唐都医院胸外科, 西安 710038
4. 济南军区联勤部卫生部保健办, 济南 250022

[摘要] **目的** 采用犬无菌性心包炎模型检验 n-3 多聚不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)对房颤的影响及其对心房内氧化应激状态的影响。**方法** 20 只犬随机分为对照组和 PUFAs 组, 分别行开胸造无菌性心包炎模型。PUFAs 组实验开始前 4 周给予 PUFAs 2 g/d, 术前和术后第 2 天分别测量心房各项电生理学指标(AF 的诱导性和持续性指标、心房有效不应期、房内传导时间), 并采用蛋白质印迹法检测心房组织中 3-硝基酪氨酸水平。**结果** 术前两组间心房各项电生理学指标间差异无统计学意义。术后第 2 天与对照组相比, PUFAs 组房颤可诱导性 $[(11.0 \pm 7.4)\% \text{ vs } (28.0 \pm 10.3)\%, P < 0.001]$ 和持续性[房颤时程中位数: $1\ 105(655.8 \sim 1\ 406.5) \text{ s vs } 2\ 516.5(1\ 187 \sim 3\ 361) \text{ s}, P < 0.05]$ 降低, 并且心房有效不应期延长 $[(133.4 \pm 4.1) \text{ ms vs } (129.8 \pm 4.3) \text{ ms}, P < 0.05]$, 房内传导时间缩短 $[(46.6 \pm 4.4) \text{ ms vs } (51.9 \pm 4.8) \text{ ms}, P < 0.05]$, 心房组织 3-硝基酪氨酸水平降低 $(P < 0.000\ 1)$ 。**结论** PUFAs 可以降低术后房颤的发生危险, 其对氧化应激反应的抑制作用可能是其作用于房颤的机制之一。

[关键词] 心房颤动; n-3 多聚不饱和脂肪酸; 氧化性应激; 心包炎

[中图分类号] R 542.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)10-1066-07

N-3 polyunsaturated fatty acids prevents sterile pericarditis-induced atrial fibrillation by inhibiting oxidative stress in canine

ZHANG Zhong¹, SHAN Shou-qin¹, ZHENG Qiang-sun², ZHAO Jin-bo³, YAN Chun-cao¹, SHI Hua¹, KONG Ling-yuan^{1*}

1. The First Sanatorium of Qingdao, PLA Jinan Military Area Command, Qingdao 266071, Shandong, China
2. Department of Cardiovasology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China
3. Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China
4. The Health Care Room, Health Sector, Joint Service Department of PLA Jinan Military Area Command, Jinan 250022, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To study the anti-arrhythmic and anti-oxidative stress effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in a canine sterile pericarditis model. **Methods** A total of 20 dogs were randomly assigned to two groups; a control group (10 dogs) and a PUFAs treatment group (10 dogs), with sterile pericarditis created by open-chest operation in both groups. PUFAs was administered orally (2 g/d) 4 weeks before the operation until the end of the study. The inducibility and maintenance of atrial fibrillation (AF), atrial effective refractory period (AERPs), and intra-atrial conduction time were determined before and 2 days after the operation. And the level of 3-nitrotyrosine in the atrial tissue was determined by Western blotting analysis. **Results** The electrophysiology parameters were similar between the two groups. On day 2 after operation, the PUFAs group compared with the control group had a significantly lower AF inducibility $[(11.0 \pm 7.4)\% \text{ vs } [28.0 \pm 10.3)\%, P < 0.001]$ and maintenance (median AF duration: $1\ 105 [655.8-1\ 406.5] \text{ s vs } 2\ 516.5 [1\ 187-3\ 361] \text{ s}, P < 0.05)$, a significantly longer AERP $[(133.4 \pm 4.1) \text{ ms vs } [129.8 \pm 4.3) \text{ ms}, P < 0.05)$, and a significantly shorter intra-atrial

[收稿日期] 2014-02-19 **[接受日期]** 2014-06-26

[基金项目] 青岛市市南区公共领域科技支撑项目(2012-5-026-YY). Supported by Science and Technology Supporting Program on Public Sphere of Shinan District, Qingdao (2012-5-026-YY).

[作者简介] 张 中, 博士, 主治医师. E-mail: azhong75@aliyun.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0531-21671855, E-mail: konglingyuan88@sina.com.cn

conduction time ($[46.6 \pm 4.4]$ vs $[51.9 \pm 4.8]$ ms, $P < 0.05$). Western blotting analysis showed that 3-nitrotyrosine level in the atrial tissue of PUFAs group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.0001$). **Conclusion** Dietary PUFAs supplementation can reduce the risk of AF after operation, and its anti-oxidative stress effect might be one of the mechanisms.

[Key words] atrial fibrillation; n-3 polyunsaturated fatty acids; oxidative stress; pericarditis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(10):1066-1072]

心房颤动(房颤)是临床上最常见的心律失常之一,其发病机制目前尚不清楚,现在较为公认的有多重子波折返学说、肺静脉肌袖起源学说以及转子驱动学说(Roter)等。一些研究发现,心脏手术后房颤发病率明显增高,提示手术后炎症和氧化应激与房颤的发生密切相关^[1]。大量临床和动物研究表明,膳食中的 n-3 多聚不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 对一般人群心血管事件具有显著的保护作用,其中包括减少总体死亡风险、冠心病死亡风险以及心肌梗死后猝死的风险,而且还可以降低卒中风险。GISSI-Prevenzione 试验^[2] 纳入超过 11 324 例近期发生急性心肌梗死 (AMI) 的患者,研究显示每日摄入 1 g n-3 PUFAs 持续 3.5 年,总体病死率(包括冠心病及其他原因导致的病死率)将减少 20%,心血管病死率减少 30%,猝死发生率下降 45%。Schrepf 等^[3] 和 Mozaffarian 等^[4] 研究发现 PUFAs 具有抗心律失常作用,对心室颤动(室颤)、猝死有很好疗效,但其对房颤有何影响目前并无定论。PUFAs 具有很好的抗炎抗氧化作用,而这些作用是否能够对房颤的发生发展起到抑制作用,目前国内外尚未见报道。本研究采用犬无菌性心包炎模型来观察 PUFAs 对房颤及对心房内氧化应激的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 普通健康成年杂种犬 22 只,雌雄不限,雌性 9 只,雄性 13 只,体质量 17~22 kg,购于第四军医大学实验动物管理中心,饲养温度 20℃,湿度 50%,12 h 光照,充足食水。

1.2 仪器和试剂 n-3 PUFAs(德国 Omacor, Solvay Pharmaceuticals GmbH 公司),64 导联电生理记录仪(河南华南医电科技有限公司),Medtronic 5329 型程序刺激仪(美国美敦力公司),片状标测起搏电极(自制,河南华南医电科技有限公司协助),3-硝基酪氨酸抗体(美国 Sigma 公司),蛋白质印迹检测试剂盒(美国 Pierce 公司),GAPDH 一抗和蛋白

质印迹二抗(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.3 实验分组 采用随机数字法将犬分为:PUFAs 组($n=11$),在正常饮食中加入 n-3 PUFAs 2 g/d;对照组($n=11$),给予正常饮食,并严格控制以确保其饮食中不含任何不饱和脂肪酸。两组均饲养 4 周。

1.4 术前准备及手术操作 实验犬经戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 肌注麻醉后,气管插管,呼吸机机械通气。股动脉穿刺,抽血 10 mL,离心取上清, -80℃ 保存。生理盐水 500 mL 缓慢静滴补液。64 导联电生理记录仪连续记录体表心电图,股动脉插管监测动脉血压。右侧第 4 肋间切口,打开胸腔,暴露心包膜。沿房室沟向上剪开心包,暴露右心房、右心耳。分别于高右房(HRA)、低右房(LRA)、右房游离壁(ARA)、右心耳(RAA)处缝制自制双极刺激标测电极,行基线电生理学检查。

1.5 电生理学检查

1.5.1 心房有效不应期(AERP)和心房内传导时间(CT)的测定 首先在 HRA、LRA、ARA、RAA 等 4 个位置以 S_1S_1 400、300、200 ms 周长起搏 30 s,使之达到稳态,起搏电压 2 倍于舒张期阈值。分别以(1) S_1S_1 400 ms, S_1S_2 120 ms;(2) S_1S_1 300 ms, S_1S_2 100 ms;(3) S_1S_1 200 ms, S_1S_2 80 ms; $S_1 : S_2 = 8 : 1$, 3.5 V, 10 ms 步长于心外膜递增刺激 HRA、LRA、ARA、RAA 等部位,直至出现心房夺获,然后以夺获周长减去 10 ms 作为 S_2 起搏,以 2 ms 步长递增刺激,直至心房再次夺获。AERP 定义为心房再次夺获前的最长 S_1S_2 配对间期。RAA 起搏时,RAA 起搏信号和 HRA、LRA、ARA 起搏信号的时间差值定义为 CT。

1.5.2 房颤诱发性和维持性的检测 测量 AERP 和 CT 之后,分别在 HRA、LRA、ARA 和 RAA 处给予 Burst 刺激(10 V, 频率 10 Hz, 脉冲宽度 10 ms, 10 s, 重复 10 次)诱发房颤。将出现不规则的快速房性心律失常、A-A 间期 < 150 ms、持续时间 > 1 min 定义为房颤发作。房颤评价有如下 2 个指标:房颤

易感性,以在 AERP 测量期间由单一额外刺激诱发房颤发作(至少 1 次)的犬百分比、Burst 诱发出房颤发作的百分比表示。房颤维持性,以每条犬房颤持续时间以及房颤持续时间超过 10 min(至少 1 次)的犬百分比表示。如果房颤发作时程 > 15 min,即给予双极除颤器除颤,5 min 后再行刺激。

1.6 无菌性心包炎模型制作 电刺激结束后,用含地塞米松和氨苄青霉素混合冲洗液进行胸腔冲洗,于心包内均匀播撒无菌滑石粉^[5],关胸前,逐层关胸,经皮下隧道将电极导线引至胸外。

1.7 手术后电生理学检查及标本采集 于术后第 2 天再次麻醉,气管插管,呼吸机通气。股动脉穿刺抽血 10 mL,离心取上清,-80℃ 保存。连续记录体表心电图、血压。开胸后再次行电生理学检查(同前)。行电生理检查后,处死犬,快速取左右心房组织,切成 10 mm×5 mm 大小,-80℃ 保存。

1.8 血浆脂肪酸浓度检测 取血清 500 μL 于试管中,加入无水甲醇-苯-氢氧化钠(CH₃OH-C₆H₆-NaOH),混匀后静置 20 min,再加入 0.5 mol/L 甲醇-盐酸(CH₃OH-HCl) 1 mL,充分混匀,4 500×g 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 n-3 PUFAs 含量。

1.9 蛋白质印迹检测 3-硝基酪氨酸蛋白水平 提取组织总蛋白,将组织块置于 2 mL 玻璃匀浆器中,加 200 mL 裂解液(含 PMSF),重复匀浆。30 min 后,将裂解液移至 1.5 mL 离心管中,4℃ 9 180×g

离心 5 min,取上清-20℃ 保存。Bradford 法测定蛋白含量。SDS-PAGE 电泳,转膜,TBS+8% 牛奶封闭液室温封闭 PVDF 膜,4℃ 过夜。用 TBS 稀释兔抗 3-硝基酪氨酸多克隆抗体(1:2 000)或小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(1:2 000),4℃ 孵育过夜。洗膜 3 次,用 TBS 稀释与一抗相应的抗兔/小鼠二抗,洗膜 4 次,ECL 化学发光法显色,X 线曝光显影,凝胶成像分析系统分析结果。阴性对照组来自 3 只心包炎假手术的犬心房组织。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布资料以中位数(上、下四分位数)表示,计量资料组内比较采用配对 *t* 检验,组间采用两样本 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验,非正态分布数据采用 Mann-Whitney 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 动物一般情况 2 只犬在术中、术后死亡,20 只完成实验。术后第 2 天打开心包发现所有犬均出现不同程度的胸腔积液、心包粘连。

2.2 血液中 n-3 PUFAs 相对浓度的变化 如表 1 所示,在基线水平,PUFAs 组和对照组血浆中 n-3 PUFAs 的相对浓度差异无统计学意义。经过 4 周 n-3 PUFAs 饲养后,PUFAs 组血浆中 n-3 PUFAs 的相对浓度较基线水平显著增加,其中 n-3 PUFAs 相对浓度增加 36.2%,EPA+DHA 浓度增加 81.2%,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 血浆中不同磷脂成分的变化

Tab 1 Changes of different phospholipid compositions in the plasma

n=10, $\bar{x} \pm s$, %

Fatty acids	Control group		PUFAs group	
	Baseline	4 weeks after feeding	Baseline	4 weeks after feeding
n-3 PUFAs	5.5±0.8	5.6±0.8	5.6±0.7	7.6±0.6*
n-6 PUFAs	41.9±2.0	41.6±1.8	41.2±2.3	37.3±1.8*
EPA+DHA	3.15±0.8	3.2±0.7	3.0±0.7	5.5±0.8*

PUFAs: Polyunsaturated fatty acids; EPA: Eicosapentaenoic acid; DHA: Docosahexaenoic acid. * $P < 0.05$ vs baseline level without feeding

2.3 n-3 PUFAs 对无菌性心包炎电生理学的影响

2.3.1 房颤诱导性和持续性 造模前两组在测量 AERPs 过程中,无犬诱发出房颤发作;但在造模术后第 2 天,对照组有 70% 的犬在测量 AERPs 过程中(单次额外刺激)诱发出房颤发作,PUFAs 组仅有

10% 诱发出房颤($P < 0.05$)。PUFAs 组在术后第 2 天 Burst 诱发出房颤发作的百分比[(11.0±7.4)%]较对照组同期[(28.0±10.3)%]降低($P < 0.05$)。两组造模后房颤持续时间均较造模前延长,但与对照组相比,PUFAs 组心包炎造模前后房颤持

续时间均缩短(均 $P < 0.05$)。在心包炎造模前, 两组均不能诱发持续时间 > 10 min 的房颤, 但造模后两组均有持续时间 > 10 min 的房颤发作, 且 PUFAs 组此种房颤发作比率较对照组降低 (20% vs 70%, $P < 0.05$)。具体数据见表 2。

2.3.2 AERP 和 CT 造模术前两组 AERP 和 CT

差异均无统计学意义。术后第 2 天, 两组 AERP 均较术前缩短 ($P < 0.05, P < 0.01$), 但 PUFAs 组缩短程度较对照组明显减轻 ($P < 0.05, P < 0.01$); 对照组中术后第 2 天 CT 较术前延长 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而 PUFAs 组术前、术后无显著变化, 术后 PUFAs 组 CT 较对照组缩短 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 房颤易感性和房颤维持性变化

Tab 2 Inducibility and maintenance changes of atrial fibrillation (AF)

$n=10$

Index	Control group		PUFAs group	
	Before SP	After SP	Before SP	After SP
Inducibility				
AERP-induced AF ^a n (%)	0(0)	7(70)*	0(0)	1(10)▲
Attempts leading to AF ^b (%), $\bar{x} \pm s$	5.0 ± 7.1	28.0 ± 10.3*	2.0 ± 4.2	11.0 ± 7.4*▲
Maintenance				
Duration of AF, t/s , Median (Q1-Q3)	1 310(767.3-2 761.5)	2 516.5(1 187-3 361)*	577(250.5-875.3)△	1 105(655.8-1 406.5)*▲
Dogs with AF > 10 min n (%)	0(0)	7(70)*	0(0)	2(20)▲

PUFAs: Polyunsaturated fatty acids; AERP: Atrial effective refractory period; SP: Sterile pericarditis. ^a: Percentage of dogs with at least one AF episode lasting > 1 min after a single extra-stimulus; ^b: Percentage of burst attempts leading to AF episodes lasting > 1 min. * $P < 0.05$ vs the same group before SP; △ $P < 0.05$ vs control group before SP; ▲ $P < 0.05$ vs control group after SP

表 3 无菌性心包炎术前和术后的电生理学参数比较

Tab 3 Comparison of electrophysiological parameters before and after operation for sterile pericarditis

$n=10, t/ms, \bar{x} \pm s$

Index	Location	S ₁ S ₁ t/ms (BCL)	Control group		PUFAs group	
			Before SP	After SP	Before SP	After SP
AERPs	RAA	200	134.0 ± 4.3	124.6 ± 4.0△△	133.8 ± 3.3	128.6 ± 3.5*△△
		300	143.9 ± 4.8	129.5 ± 5.5△△	143.6 ± 5.9	137.8 ± 4.8**△
		400	152.4 ± 4.2	135.4 ± 5.4△△	151.0 ± 5.8	141.4 ± 6.6*△△
	LRA	200	125.6 ± 4.4	113.8 ± 4.3△△	122.4 ± 3.2	117.8 ± 3.3*△
		300	133.4 ± 11.9	122.2 ± 6.3△△	132.0 ± 4.9	128.0 ± 3.3*△
		400	139.6 ± 8.8	129.8 ± 4.3△△	137.8 ± 3.5	133.4 ± 4.1*△
	HRA	200	127.0 ± 5.8	111.8 ± 7.3△△	127.4 ± 3.5	121.0 ± 8.6*△
		300	131.6 ± 7.8	122.6 ± 3.5△△	132.3 ± 4.3	126.6 ± 4.6*△△
		400	138.4 ± 9.6	128.0 ± 4.3△	138.4 ± 5.9	133.0 ± 4.8*△
ARA	200	128.0 ± 6.3	115.2 ± 4.2△△	127.8 ± 6.0	121.2 ± 6.4*△	
	300	136.8 ± 8.4	122.0 ± 10.3△△	139.0 ± 6.0	133.4 ± 5.9**△	
	400	142.6 ± 10.3	130.0 ± 7.5△	143.8 ± 6.3	137.4 ± 6.7*△△	
Intra-atrial CT	RAA-LRA	200	43.4 ± 2.8	51.9 ± 4.8△△	44.6 ± 5.4	46.6 ± 4.4*
		300	44.6 ± 4.6	50.8 ± 4.6△△	45.8 ± 4.5	46.0 ± 4.2*
		400	45.2 ± 4.8	51.0 ± 4.3△△	44.6 ± 5.2	47.0 ± 3.4*
	RAA-HRA	200	33.0 ± 3.2	41.2 ± 4.2△△	34.0 ± 3.3	36.0 ± 4.6*
		300	35.0 ± 5.0	42.0 ± 5.0△△	35.5 ± 4.5	36.8 ± 4.8*
		400	36.0 ± 5.4	43.2 ± 4.8△	37.0 ± 4.8	38.4 ± 4.4*
	RAA-ARA	200	26.2 ± 5.5	32.6 ± 5.2△	26.8 ± 4.2	27.4 ± 5.0*
		300	25.4 ± 4.6	32.6 ± 4.4△△	27.2 ± 4.7	28.0 ± 4.2*
		400	25.6 ± 4.3	33.0 ± 5.0△△	26.4 ± 3.5	28.0 ± 4.0*

PUFAs: Polyunsaturated fatty acids; BCL: Basic cycle length; AERP: Atrial effective refractory period; CT: Conduction time; RAA: Right atrial appendage; LRA: Low lateral right atrium; HRA: High lateral right atrium; ARA: Anterior right atrium. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs before SP

2.4 n-3 PUFAs 对心房 3-硝基酪氨酸水平的影响 与假手术组相比,对照和 PUFAs 组心房组织内 3-硝基酪氨酸含量均增加 ($P < 0.05$),但 PUFAs 组心房组织内 3-硝基酪氨酸表达低于对照组 ($P < 0.05$)。具体见图 1。

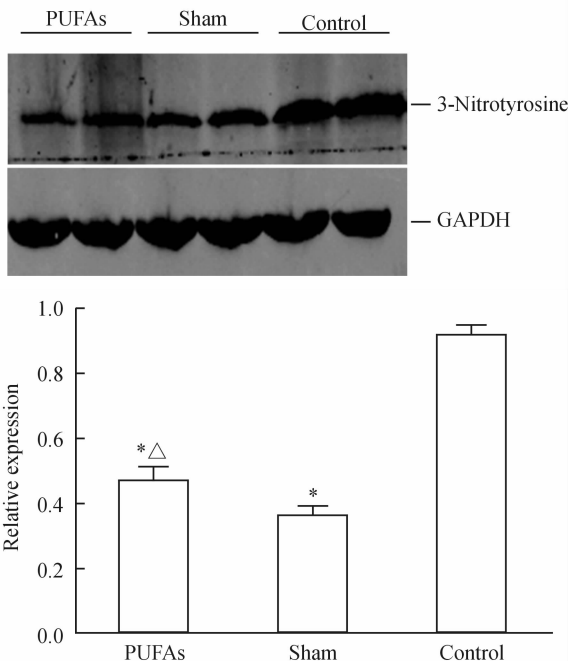


图 1 心房组织中 3-硝基酪氨酸含量变化

Fig 1 Change of 3-nitrotyrosine levels in atrial tissue

PUFAs; Polyunsaturated fatty acids. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs sham group

3 讨论

随着年龄的增长,心房系统性炎症增加,血浆抗氧化能力逐渐下降,炎症和氧化应激相互作用,患者发生房颤的危险随之增高。氧化应激是指机体内促氧化与抗氧化失衡时,过度氧化导致的细胞损伤。在体内发挥氧化应激损伤的最重要氧化剂是活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)及其在级联反应中产生的过氧化亚硝基(ONOO^-)。

Mihm 等^[6]对行迷宫术治疗的慢性房颤患者 RAA 进行活检,首次发现慢性房颤患者的心房肌存在着确实的氧化应激损伤,这种损伤被羟自由基($\text{HO}\cdot$)和过氧化亚硝基盐(ONOO^-)介导,分别导致蛋白被羧化和产生硝基酪氨酸。此外,氧化应激会导致房颤患者发生一些结构和功能蛋白的改变,影响心房肌的能量代谢、电生理学特征和机械力学性能,从而影响心房重塑。Carnes 等^[7]利用快速心房起搏犬动物模型,发现快速起搏组心房组织中的

维生素 C(VitC)含量降低,而氧化应激导致的硝化蛋白含量增加以及伴随的 AERP 缩短,使犬动物模型出现心房电重构,给予具有抗氧化和催化 ONOO^- 分解作用的 VitC 可减轻 AERP 的缩短,抑制心房早期的电重构。随后他们研究了 VitC 对冠状动脉旁路移植术(CABG)术后房颤的影响,43 例患者给予 VitC 首剂负荷量 2 g/d,随后每天 500 mg 直至术后第 5 天,结果显示接受 VitC 治疗的患者术后房颤发生率为 16.3%,而对照组为 34.9%。该研究结果进一步被 Korantzopoulos 等^[8]所证实。他们将 44 例持续性房颤患者于心脏电复律后随机分为口服 VitC 组和对照组,随访 7 d,口服 VitC 组的房颤复发率为 4.5%,对照组为 36.3%。

此外,由于心肌兴奋-收缩偶联过程中的关键性元件都对氧化应激比较敏感,有理由相信氧化应激在钙超载诱发的心房重构中发挥核心作用^[9]。Kim 等^[10]对 26 例行迷宫术的永久性房颤患者 RAA 进行转录水平的研究,通过基因芯片对已知的 1 152 个基因进行分析,结果发现 5 个与活性氧(ROS)产生相关的基因表达上调和 2 个具有抗氧化作用的基因表达下调,提示促氧化和抗氧化基因的表达失衡可导致氧化应激的发生和 ROS 的增加,从而促进房颤的发生。

n-3 PUFAs 分子中含有很多双键,因此其对氧化反应很敏感,具有一定的抗氧化能力。有研究发现,给予 3.1~8.4 g/d EPA+DHA 能够减少人类中性粒细胞 30%~55% 的 ROS 产生^[11-12],给予 6 g/d EPA+DHA 可以显著降低人类单核细胞过氧化氢产生^[13]。Richard 等^[14]发现,在主动脉内皮细胞培养液中加入 n-3 PUFAs 能显著降低 ROS 产生,推测 n-3 PUFAs 具有独立的清除自由基的作用。还有一些研究发现 n-3 PUFAs 能够显著降低手术后房颤的发生。Calò 等^[15]将 160 例行 CABG 术患者随机分为 2 组,PUFAs 组 [$n = 71$, 女性 11 例, (66.2±8.0)岁]和对照组 [$n = 81$, 女性 13 例, (64.9±9.1)岁],PUFAs 组在术前 5 d 给予 PUFAs 2 g/d,结果显示:PUFAs 组术后房颤率为 15.2%,对照组为 33.3%,与对照组相比 PUFAs 组术后房颤发生率下降了 54.4% ($P = 0.013$)。Marsiscalco 等^[16]和 Castillo 等^[17]在最近的实验中也证实了这一发现。

术后氧化应激会促进房颤的发作、维持, 而 n-3 PUFAs 具有抗氧化应激特性, 但是否可通过 n-3 PUFAs 的抗氧化应激特性来影响房颤发生, 目前国内尚无可相关报道。我们的研究发现, 给予犬 n-3 PUFAs 喂食 4 周, 犬血液中 n-3 PUFAs 的相对浓度明显增加; 术后第 2 天 PUFAs 组 AERPs 缩短程度较对照组减轻, CT 也较对照组缩短; PUFAs 组房颤可诱导性和维持性均较对照组降低。根据 Moe 等^[18]的多重子波学说, PUFAs 组心房波长较长, 子波数量少, 不利于房颤的发生和维持。

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和超氧阴离子 ($O_2^- \cdot$) 反应产生 ONOO⁻, 其氧化作用于细胞磷脂、蛋白、DNA, 导致细胞坏死或凋亡。ONOO⁻ 的一个独特的作用是使蛋白结合或游离的酪氨酸残基硝基化, 从而形成 3-硝基酪氨酸。因此 3-硝基酪氨酸可作为一个稳定的体内 ONOO⁻ 生物指示剂。通过测量 3-硝基酪氨酸, 可以了解活体内氧化应激水平。实验中我们发现心房组织 3-硝基酪氨酸含量在对照组增加, 反映出无菌性心包炎后心房组织内氧化应激水平较术前升高, 而 PUFAs 组 3-硝基酪氨酸含量增加不明显。提示 n-3 PUFAs 能够对抗无菌性心包炎导致的 ONOO⁻ 升高, 发挥其抗氧化应激作用。结合 PUFAs 组房颤可诱导性和维持性实验结果, 我们推测 n-3 PUFAs 抗氧化应激作用可能也是其抗房颤效应的机制之一。

尽管我们发现 n-3 PUFAs 能够降低心房组织中氧化应激水平, 但未对其具体机制进行探讨。既往研究表明, n-3 PUFAs 抑制氧化应激水平的可能机制如下: (1) 抑制脂蛋白的氧化, 通过抑制低密度脂蛋白 (LDL) 被氧化成为 ROS 之一的氧化性 LDL (ox-LDL), 减少 ROS 产生。(2) 抑制 NF- κ B 激活减轻体内氧化应激损伤。ROS 诱导的还原反应可以使胞质内 NF- κ B 的抑制性亚单位 I κ B 磷酸化, 进而激活 NF- κ B。NF- κ B 结合于基因启动子区域, 对控制细胞因子、趋化因子、生长因子、黏附因子及急性期反应蛋白的基因表达是必需的。n-3 PUFAs 可以通过信号途径或直接作用于调控基因表达过程的核转录因子 NF- κ B。EPA 和 DHA 作为 n-3 PUFAs 的主要成分, 能对抗 NF- κ B 抑制性亚单位 I κ B 的磷酸化, 进而抑制脂多糖 (LPS) 诱导的 NF- κ B 活化和 COX-2 的表达^[19]。(3) 通过信号途径或直接

作用于过氧化物酶体增殖活化受体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPAR) 减少体内炎症反应和由炎症反应诱导的氧化应激。PPARs 作为核因子受体对炎症相关基因表达调控起关键作用。PPARs 不仅存在于肝脏和脂肪组织, 还存在于炎性细胞, 能作用于许多细胞反应, 如细胞循环、增殖、炎症、凋亡。PPARs 大多通过配体依赖的方式调节基因表达, PPAR α 能被 PUFAs 激活, AA 来源的 LTB₄ 也可作为其配体, PPAR γ 能选择性地被 PUFAs 激活, 调节脂质代谢及各种类型的细胞反应, 从而发挥抗炎抗氧化应激作用^[20-21]。(4) 抑制 NAD(P)H 活性, 进而影响 ROS 生产。DHA 能够抑制 IL-1 α 诱导的 ROS 产生, 其机制在于 DHA 的 15-LOX-1 产物能够抑制内皮细胞 p47phox 的膜转位, 抑制 NAD(P)H 活性, 进而影响 ROS 生产, 并且这种作用独立于 ERK1/2 抑制机制^[22]。

综上所述, 在本实验中我们首次发现 n-3 PUFAs 能够减轻心房组织中氧化应激反应。结合 PUFAs 组房颤可诱导性和维持性实验结果, 可推测 PUFAs 通过抗氧化作用发挥其抗房颤效应。本研究为 PUFAs 在心脏手术后房颤并发症的预防和治疗中的意义和价值提供了有力的证据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 盛 力, 李 悦, 李为民. 氧化应激与心房颤动时的心房结构重构[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2007, 21: 459-461.
- [2] Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. [J]. Lancet, 1999, 354: 447-455.
- [3] Schrepf R, Limmert T, Claus Weber P, Theisen K, Sellmayer A. Immediate effects of n-3 fatty acid infusion on the induction of sustained ventricular tachycardia[J]. Lancet, 2004, 363: 1441-1442.
- [4] Mozaffarian D, Lemaitre R N, Kuller L H, Burke G L, Tracy R P, Siscovick D S; Cardiovascular Health Study. Cardiac benefits of fish consumption may depend on

- the type of fish meal consumed: the Cardiovascular Health Study[J]. *Circulation*,2003,107:1372-1377.
- [5] Pagé P L, Plumb V J, Okumura K, Waldo A L. A new animal model of atrial flutter[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1986,8:872-879.
- [6] Mihm M J, Yu F, Carnes C A, Reiser P J, McCarthy P M, van Wagoner D R, et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation[J]. *Circulation*,2001,104: 174-180.
- [7] Carnes C A, Chung M K, Nakayama T, Nakayama H, Baliga R S, Piao S, et al. Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation[J]. *Circ Res*,2001,89:E32-E38.
- [8] Korantzopoulos P, Kolettis T M, Kountouris E, Dimitroula V, Karanikis P, Pappa E, et al. Oral vitamin C administration reduces early recurrence rates after electrical cardioversion of persistent atrial fibrillation and attenuates associated inflammation[J]. *Int J Cardiol*,2005,102:321-326.
- [9] Dhalla N S, Temsah R M, Netticadan D. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. *J Hypertens*, 2000,18:655-673.
- [10] Kim Y H, Lim D S, Lee J H, Shim W J, Ro Y M, Park G H, et al. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans[J]. *Exp Mol Med*,2003,35:336-349.
- [11] Varming K, Schmidt E B, Svaneborg N, Møller J M, Lervang H H, Grunnet N et al. The effect of n-3 fatty acids on neutrophil chemiluminescence[J]. *Scand J Clin Lab Invest*,1995,55:47-52.
- [12] Thompson P J, Misso N L, Passarelli M, Phillips M J. The effect of eicosapentaenoic acid consumption on human neutrophil chemiluminescence[J]. *Lipids*, 1991, 26:1223-1226.
- [13] Fisher M, Levine P H, Weiner B H, Johnson M H, Doyle E M, Ellis P A, et al. Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched preparation of leukocytes[J]. *Am J Clin Nutr*,1990,51: 804-808.
- [14] Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visioli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants[J]. *Pharmacol Res*,2008,57: 451-455.
- [15] Calò L, Bianconi L, Colivicchi F, Lamberti F, Loricchio M L, de Ruvo E, et al. N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial[J]. *J Am Coll Cardiol*,2005,45:1723-1728.
- [16] Mariscalco G, Sarzi Braga S, Banach M, Borsani P, Bruno V D, Napoleone M, et al. Preoperative n-3 polyunsaturated fatty acids are associated with a decrease in the incidence of early atrial fibrillation following cardiac surgery[J]. *Angiology*,2010,61: 643-650.
- [17] Castillo R, Rodrigo R, Perez F, Cereceda M, Asenjo R, Zamorano J, et al. Antioxidant therapy reduces oxidative and inflammatory tissue damage in patients subjected to cardiac surgery with extracorporeal circulation[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*,2011,108:256-262.
- [18] Moe G K, Rheinboldt W C, Abildskov J A. A computer model of atrial fibrillation[J]. *Am Heart J*,1964,67: 200-220.
- [19] Lee J Y, Plakidas A, Lee W H, Heikkinen A, Chamugam P, Bray G, et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids[J]. *J Lipid Res*,2003,44:479-486.
- [20] Khan S A, Vanden Heuvel J P. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review) [J]. *J Nutr Biochem*,2003,14: 554-567.
- [21] Jump D B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids[J]. *J Biol Chem*,2002,277:8755-8758.
- [22] Massaro M, Habib A, Lubrano L, Del Turco S, Lazzarini G, Bourcier T, et al. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP(H) oxidase and PKC epsilon inhibition[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103: 15184-15189.