

HSP27 对 Hcy 诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用及其机制研究

赵艳红, 刘涛[△]

(商丘医学高等专科学校人体解剖学教研室, 河南商丘 476100)

[摘要] **目的** 研究热休克蛋白 27(HSP27)对同型半胱氨酸(Hcy)诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用及其机制。**方法** 培养人脐静脉内皮细胞,采用 MTT 法检测 Hcy 对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)存活率的影响;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒及流式细胞术检测 Hcy 及 HSP27 对细胞凋亡的影响;设计实验,采用总一氧化氮检测试剂盒(硝酸还原酶法)检测细胞培养液中 NO 水平、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)活性氧(ROS)检测试剂盒及流式细胞术检测细胞内 ROS 来研究可能的保护机制。**结果** HUVECs 与不同浓度的 Hcy 作用后,0 mmol/L 组存活率均值为 97.33%,Hcy 0.2 mmol/L 组存活率均值为 95.17%,Hcy 0.4 mmol/L 组存活率均值为 90.72%,Hcy 0.6 mmol/L 组存活率均值为 78.29%,Hcy 0.8 mmol/L 组存活率均值为 63.65%,Hcy 1.0 mmol/L 组存活率均值为 41.51%。0 mmol/L 组与 Hcy 0.2 mmol/L 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Hcy 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 组存活率均低于 0 mmol/L 组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。HSP27 浓度越高,细胞的存活率越高,呈浓度依赖性,HSP27 对 HUVECs 损伤具有保护作用。Hcy 能够诱发内皮细胞凋亡,而 HSP27 能显著抑制这种凋亡,表明 HSP27 能减少 Hcy 对内皮细胞的损害。HSP27 能抑制 Hcy 引起 NO 的减少和抑制 Hcy 诱导 ROS 的产生。**结论** HSP27 通过影响 NO 表达和调节细胞内 ROS 水平保护 Hcy 诱导的受损内皮细胞。

[关键词] 热休克蛋白质类;动脉粥样硬化;同型半胱氨酸;血管内皮细胞;保护机制

[中图分类号] R322.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)07-0893-03

Protective effect of HSP27 on Hcy induced vascular endothelial cell injury and its mechanism

ZHAO Yanhong, LIU Tao[△]

(Teaching and Researching Section of Human Anatomy, Shangqiu Medical College, Shangqiu, Henan 476100, China)

[Abstract] **Objective** To study the protective effect of heat shock protein 27(HSP27)on homocysteine(Hcy)induced vascular endothelial cell injury and its mechanism. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) were cultured. The influence of Hcy on the survival rate of HUVECs was detected by MTT method;the Annexin V FITC apoptosis detection kit and flow cytometry were used to detect the influence of Hcy and HSP27 on cellular apoptosis;the experiment design adopted the total nitric oxide detection kit(nitrate reductase method) for detecting the NO level in cell culture fluid,the DCFH DA reactive oxygen species (ROS) detection kit and flow cytometry were used to detect intracellular ROS to research possible protection mechanism. **Results** After action of HUVECs with different concentrations of Hcy,the mean values of survival rates in the 0 mmol/L,0.2 mmol/L,0.4 mmol/L,0.6 mmol/L,0.8 mmol/L and 1.0 mmol/L groups were 97.33%,95.17%,90.72%,78.29%,63.65% and 41.51% respectively. The difference between the 0 mmol/L group and 0.2 mmol/L group had no statistical significance($P>0.05$); the survival rate in the Hcy 0.4,0.6,0.8,1.0 mmol/L groups was lower than that in the 0 mmol/L group,the difference was statistically significant($P<0.05$). The cellular survival rate was negatively correlated with the Hcy concentration. The higher the HSP27 concentration,the higher the cellular survival rate,showing the concentration dependence. HSP27 had a protective effect on HUVECs damage. Hcy could induce apoptosis of endothelial cells,while HSP27 could significantly inhibit apoptosis,indicating that HSP27 could reduce the damage of Hcy on endothelial cells. HSP27 could inhibit the NO decrease caused by Hcy and inhibited the production of Hcy induced ROS. **Conclusion** HSP27 protects Hcy induced injured endothelial cells by influencing NO expression and regulating intracellular ROS level.

[Key words] heat-shock proteins;atherosclerosis;homocysteine;vascular endothelial cell;protection mechanism

目前,内皮功能障碍是发生动脉粥样硬化的早期事件。经研究发现,它与动脉粥样斑块的进展有重要关系^[1-2]。而内皮细胞受损时,会破坏血稳态,导致血栓形成、脂质积累,最终形成粥样斑块,因此早期控制内皮功能是防治冠心病的关键。目前已经公认,高同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化发生和发展的独立危险因素^[3]。血浆中同型半胱氨酸(Hcy)升高会造成内皮细胞功能障碍,引起血管舒张功能异常,导致内皮细胞丧失抗血栓形成的作用,引起血小板黏附聚集,进而引发早期动

脉粥样硬化。热休克蛋白 27(HSP27)参与细胞凋亡、炎症和动脉壁的稳态维持等多种过程。有研究发现,HSP27 在抗心肌缺血损伤、细胞凋亡及抗炎性反应中都有一定作用,还可调控平滑肌细胞的增殖迁移、稳定细胞骨架、抗凋亡^[4]。LEE 等^[5]研究发现,HSP27 在动脉粥样硬化有着不可忽视的作用,且血清中 HSP27 水平和动脉粥样硬化程度呈负相关。HSP27 有可能作为预防和诊断动脉粥样硬化的新靶点。本研究通过实验探讨 HSP27 对 Hcy 诱导血管内皮细胞损伤的保护作用,

并对 HSP27 相关保护机制进行分析。

1 资料与方法

1.1 实验仪器及耗材

1.1.1 主要仪器 二氧化碳培养箱 Heracell150i(美国 Thermo Scientific);超净工作台(中国苏净安泰);CH20-BIM 倒置光学显微镜(日本 Olympus);IX71 荧光显微镜(日本 Olympus);离心机(美国 Thermo Scientific);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson);电热恒温水箱(中国上海精宏实验设备);电子分析天平(德国 Sartorius);恒温磁力搅拌器(中国江苏荣华仪器制造)。

1.1.2 主要试剂 细胞培养 DMEM(美国 Gibco);MTT 细胞活性试剂(美国 Invitrogen);细胞培养胎牛血清(FBS,美国 Coring);AnnexinV/PI 凋亡检测试剂盒(中国南京凯基);Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen);总一氧化氮检测试剂盒(碧云天公司);DCHP 活性氧检测试剂盒(碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)培养及鉴定 无菌收集健康新生儿脐带,磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗静脉腔后灌注 0.1%胶原酶消化 30 min,含 10%血清的 DMEM 培养基终止消化,消化液 1 500 r/min 离心 8 min 后加入培养液重悬细胞,放入 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养。待细胞贴壁并 85%融合后,用 0.05%胰酶消化传代,继续培养。每 2 天进行一次细胞传代,同时更换培养液。取对数生长期的第 3~5 代用于实验。

1.2.2 HUVECs 存活率检测 培养后的 HUVECs,经 0.5%胰酶充分消化后接种于 96 孔板,10 000 个/孔,放入 37 °C,5% CO₂ 培养箱,培养 24 h。按照实验分组在孔板上加入不同浓度药品,每个浓度设 6 个复孔,同时设立阴性对照孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 15 μL 的 5 g/L 的 MTT 溶液,孵育 4 h 后,弃上清液,立即加入 100 μL DMSO,充分振荡 15 min,采用酶标仪波长 490 nm 测定各孔吸光度(A)值。HUVEC 增殖率(%)=(实验组 A 值-对照组 A 值)/对照组 A 值×100%。Hcy 组:分别加入 Hcy 使终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L。Hcy+HSP27 组:每孔分别加入 Hcy 使终浓度为 0.8 mmol/L,并分别加入 HSP27,使终浓度为 0、2、4、6、8、10 μg/L。

1.2.3 细胞凋亡检测 培养后的 HUVECs,经 0.5%胰酶充分消化后接种于 96 孔板,10 000 个/孔,放入 37 °C,5% CO₂ 培养箱。HSP27+Hcy 组给予终浓度 0.8 mmol/L 的 Hcy 培养 12 h 后,将培养液更换为含有浓度为 10 μg/L 的 HSP27,继续培养 24 h。Hcy 组给予终浓度 0.8 mmol/L 的 Hcy 后培养 12 h 后,将培养液更换为正常培养基,继续培养 24 h。空白组使用正常培养基。收集各组细胞于 EP 管中,1 800 r/min 离心 5 min。用 PBS 对细胞清洗 2 次,再次 1 800 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入 200 nL 结合液重悬细胞;加入 2.5 μL Annexin V-FITC,充分混匀后于室温下避光反应 10 min。加入 5 μL 碘化丙啶(PI)染色液,混匀后室温避光反应 5 min,进行流式细胞仪检测。

1.2.4 细胞培养液中 NO 水平检测 培养后的 HUVECs,经 0.5%胰酶充分消化后接种于 96 孔板,10 000 个/孔,放入 37 °C 5% CO₂ 培养箱,培养 24 h。HSP27+Hcy 组更换为含有浓度为 0.8 mmol/L 的 Hcy 及 10 μg/L 的 HSP27 的培养基后继续培养 24 h。Hcy 组更换为含有浓度为 0.8 mmol/L 的

Hcy 的培养基后继续培养 24 h。空白组使用正常培养基,每组 6 个复孔。分别收集各组细胞培养液,离心取上清液备用。按照总一氧化氮检测试剂盒(硝酸还原酶法)说明书进行检测,计算样品中的 NO 浓度。

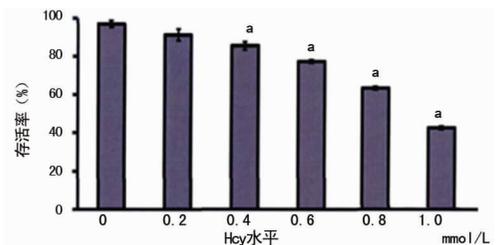
1.2.5 细胞内活性氧(ROS)检测 培养后的 HUVECs,经 0.5%胰酶充分消化后接种于 96 孔板,10 000 个/孔,放入 37 °C,5% CO₂ 培养箱,培养 12 h。HSP27+Hcy 组更换为含有浓度为 0.8 mmol/L 的 Hcy 及 10 μg/L HSP27 的培养基后继续培养 24 h。Hcy 组更换为含有浓度为 0.8 mmol/L Hcy 的培养基后继续培养 24 h。空白组使用正常培养基。每组 6 个复孔。按照试剂盒说明书进行如下操作:按照 1:1 000 用 DMEM 培养液稀释 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA),终浓度为 10 μmol/L。分别收集各组细胞于 EP 管中,1 800 r/min 离心 5 min;弃上清液,加入约 1 mL DMEM 培养液悬浮细胞,再次离心后吸除上清液;于 37 °C 避光条件下加入 500 μL 的 DCFH-DA 染液,反应 20 min 后 1 800 r/min 离心 5 min,采用无血清 DMEM 培养液洗涤 2 次;加入 500 μL 的 DMEM 培养液悬浮细胞,进行流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各实验组间均值比较采用 ANOVA 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

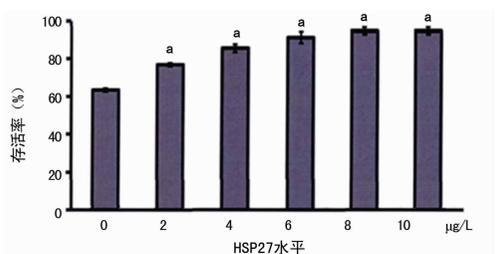
2.1 HUVECs 生存率

2.1.1 Hcy 对 HUVECs 存活率的影响 HUVECs 与不同浓度的 Hcy 作用后,0 mmol/L 存活率均值为 97.33%,Hcy 0.2 mmol/L 组存活率均值为 95.17%,Hcy 0.4 mmol/L 组存活率均值为 90.72%,Hcy 0.6 mmol/L 组存活率均值为 78.29%,Hcy 0.8 mmol/L 组存活率均值为 63.65%,Hcy 1.0 mmol/L 组存活率均值为 41.51%。0 mmol/L 组与 Hcy 0.2 mmol/L 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);Hcy 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 组存活率均低于 0 mmol/L,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),见图 1。



^a: $P < 0.05$, 与 Hcy 0 mmol/L 比较

图 1 Hcy 对 HUVECs 存活率的影响

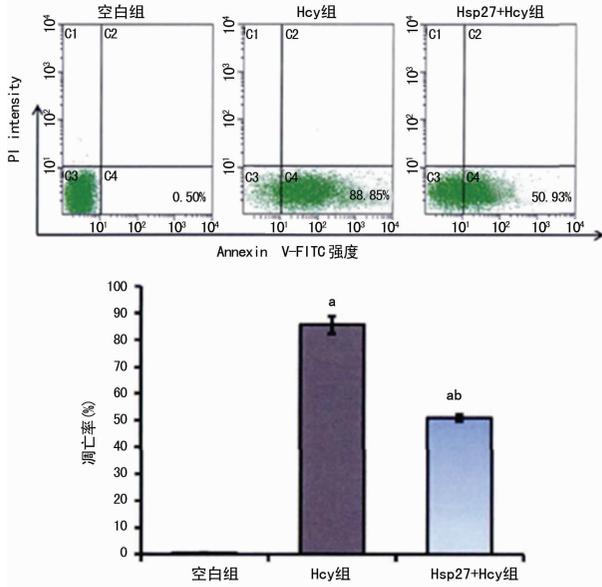


^a: $P < 0.05$, 与 HSP27 0 μg/L 比较

图 2 HSP27 对 HUVECs 损伤的保护

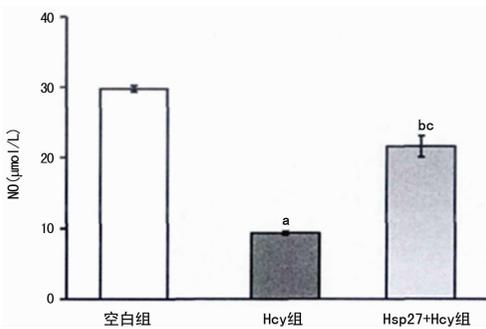
2.1.2 HSP27 对 HUVECs 存活率的影响 取 Hcy 0.8

mmol/L 时不同浓度的 HSP27 与 HUVECs 相互作用,加入不同浓度 HSP27 组的内皮细胞存活率较 0 $\mu\text{g/L}$ 组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。



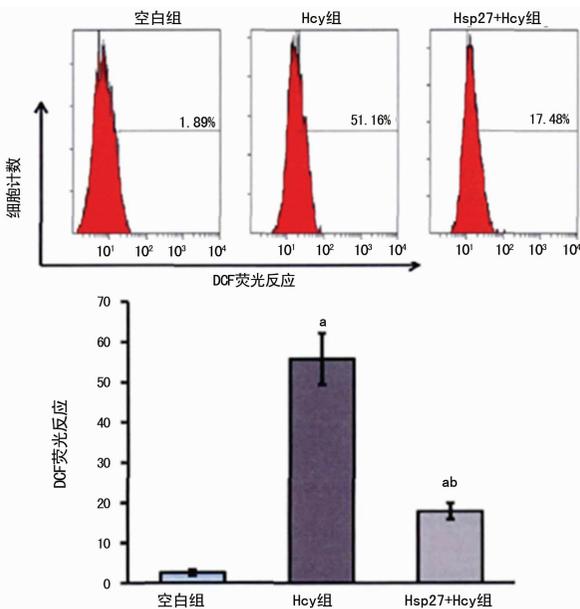
^a: $P < 0.05$, 与空白组比较; ^b: $P < 0.05$ 与 Hcy 组比较

图 3 HSP27 对 Hcy 诱导的 HUVECs 凋亡的影响



^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与空白组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 Hcy 组比较

图 4 HSP27 对 Hcy 刺激 HUVECs 的 NO 水平的影响



^a: $P < 0.01$, 与空白组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 Hcy 组比较

图 5 HSP27 对 Hcy 诱导的 HUVECs 产生 ROS 的影响

2.2 HUVECs 凋亡情况 空白组细胞凋亡率为 0.5%, Hcy 组细胞凋亡率为 88.85%, 明显高于空白组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Hsp27+Hcy 组细胞凋亡率为 50.93%, 低于 Hcy 组且高于空白组, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见图 3。

2.3 NO 水平 空白组 NO 水平 29.37 $\mu\text{mol/L}$ 明显低于 Hcy 组 NO 水平 8.94 $\mu\text{mol/L}$, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 空白组 NO 水平 29.37 $\mu\text{mol/L}$ 高于 Hsp27+Hcy 组 NO 水平 22.18 $\mu\text{mol/L}$, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Hcy 组 NO 水平 8.94 $\mu\text{mol/L}$ 低于 Hsp27+Hcy 组 NO 水平 22.18 $\mu\text{mol/L}$, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 4。

2.4 对 Hcy 诱导 HUVECs 产生 ROS 的影响 通过 DCF 的荧光反应程度来反映 ROS 的产生水平。空白组 ROS 水平最低, Hsp27+Hcy 组次之, Hcy 组 ROS 水平最高; Hcy 组 ROS 水平明显高于空白组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); Hsp27+Hcy 组高于空白组且低于 Hcy 组, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$), 见图 5。

3 讨论

动脉粥样硬化是由于脂质代谢异常和慢性炎症反应所引起的动脉管壁病变。近年来,“内皮损伤反应学说”受到了广泛关注^[6]。越来越多的证据显示,内皮细胞功能障碍是动脉粥样硬化与心血管疾病发展之间的一个重要病理生理环节^[7]。在本研究中,联合应用 Annexin V 与 PI 可区分凋亡早期、晚期及坏死细胞的原理,发现 Hcy 能够减少内皮细胞的生存率,且随着 Hcy 浓度增高,内皮细胞的生存率越低,与 Hcy 浓度呈负相关。血浆 Hcy 水平升高是动脉粥样硬化发生与发展的独立危险因素。斑块中细胞持续凋亡会引起长期慢性炎症反应,加快斑块破裂及促进血栓形成。目前已有一些关于 Hcy 相关性的内皮细胞功能障碍的研究^[3,8]。本研究结果显示,随着 Hcy 浓度的增加,细胞生存率逐渐降低,高浓度 Hcy 可有明显的内皮细胞生长抑制作用, Hcy 能够抑制内皮细胞生存,呈剂量依赖。

目前多数研究认为 Hcy 导致的内皮功能障碍是动脉粥样硬化的重要机制^[2,4,9]。本研究发现, Hcy 能够导致内皮细胞产生 NO 减少,还能诱导 ROS 的产生。NO 是内皮细胞维持血管扩张的主要调节因子,而血管内皮在生成 NO 过程中出现异常,使 NO 生成减少,导致内皮功能障碍,是动脉粥样硬化的前奏^[10]。AJITH^[11] 研究发现,内皮细胞生成的减少及氧化应激反应增强导致的 NO 损失都会导致 NO 生物利用率下降。内皮功能障碍时,通过趋化因子、黏附分子及一系列的反应,影响 NO 生成。而有研究发现,动脉粥样硬化病变细胞中死亡相关蛋白激酶表达增加,会增加动脉壁不稳定性,更容易吸收低密度脂蛋白^[12]。已有研究证实,死亡相关蛋白激酶参与 Hcy 诱导的内皮细胞凋亡过程^[13]。而 HSP27 并不影响死亡相关蛋白激酶表达,考虑死亡相关蛋白激酶处于 HSP27 的调控上游。NO 产生减少可作为内皮功能障碍的一个指标。本研究结果显示, HSP27 浓度越高,细胞的存活率越高,呈浓度依赖性, HSP27 对 HUVECs 损伤具有保护作用;同时采用总一氧化氮检测试剂盒对细胞培养液中 NO 水平进行检测,发现 Hcy 刺激 HUVECs 会抑制 NO 的合成或释放;加入 HSP27 后能减弱 Hcy 对内皮细胞的影响,从而改善内皮功能。还有研究发现, HSP27 具有分子伴侣作用,它通过与转录因子作用,在转录水平进行调控,降低 Hcy 对内皮细胞功能的影响^[14]。

ROS 能够增强细胞氧化应激,促进炎症介质释放、低密度脂蛋白氧化,破坏凝血功能平衡等。据报道,氧化应激在内皮功能障碍发生机制中起着重要作用^[15]。ROS 的内源性衍生物主要由线粒体产生,当 ROS 过量时可造成广泛性氧化损伤,导致细胞功能丧失,甚至凋亡。ROS 是细胞内信号传递者,在引起细胞凋亡中起重要作用。本研究采用 DCFH-DA 活性氧检测试剂盒进行细胞内 ROS 定量检测。通过流式细胞仪检测 DCF 的荧光强度就能知道细胞内 ROS 的水平。本研究证实, Hcy 能够诱导 ROS 产生,引起内皮细胞功能障碍,是早期血管出现动脉粥样硬化的关键。HSP27 被作为细胞保护者,已有研究证实它能够通过多个作用靶点发挥抗氧化应激和抗细胞凋亡的作用:(1)稳定线粒体膜功能;(2)改善细胞呼吸,减少 ROS 生成;(3)提高细胞内还原能力;(4)激活 Mt,促进细胞生存。LIN 等^[16]为进一步研究 HSP27 在 Hcy 处理过的内皮细胞中的表达情况,通过质粒构建了 HSP27 高表达的内皮细胞系,证实了而 HSP27 表达增加能够抑制 Hcy 引起的内皮细胞损伤和凋亡。由此可见,减少内源性 ROS 产生,稳定线粒体膜电位,是 HSP27 对抗 Hcy 引起的内皮损伤的重要机制之一。

综上所述,HSP27 通过影响 NO 表达和调节细胞内 ROS 水平保护 Hcy 诱导的受损伤的内皮细胞,这些作用提示 HSP27 可能是预防和治疗动脉粥样硬化的新靶点。

参考文献

- [1] 孙永辉,位庚,贾振华,等. 同型半胱氨酸对大鼠心肌微血管内皮细胞线粒体功能的影响及通心络的保护作用[J]. 中国老年学,2017,37(18):1-6.
- [2] PELIKANT-MALECKA I, SIELICKA A, KANIEWSKA E, et al. Endothelial toxicity of unusual nucleotide metabolites[J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(4): 818-822.
- [3] 朱琳,王彦军,俞天虹,等. 红景天苷通过抑制内质网应激减少高同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. 中国动脉硬化杂志,2015,23(1):5-10.
- [4] 俞天虹,朱琳,赵蓉,等. 腺苷酸蛋白激酶活化在红景天苷抑制同型半胱氨酸诱导的人脐静脉内皮细胞内质网应激中的作用[J]. 中华中医药学刊,2017,16(10):2558-2562.
- [5] LEE S W, CHO J M, CHO H J, et al. Expression levels of heat shock protein 27 and cellular FLICE-like inhibitory protein in prostate cancer correlate with Gleason score sum and pathologic stage[J]. *Korean J Urol*, 2015, 56(7):

505-514.

- [6] MARTÍNEZ-LAORDEN E, ALMELA P, MILANÉS MV, et al. Expression of heat shock protein 27 and troponin T and troponin I after naloxone-precipitated morphine withdrawal [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 766(21): 142-150.
- [7] 纪昕,岳晓乐,赵丹丹,等. 同型半胱氨酸与动脉粥样硬化患者血管内皮细胞损伤相关性[J]. 标记免疫分析与临床,2017,24(1):73-76.
- [8] 季政,郭航远,池菊芳,等. 同型半胱氨酸对大鼠血管内皮细胞 MMP-2 表达的影响和黄酒、红葡萄酒的逆转效应及其机制[J]. 西安交通大学学报(医学版),2013,34(3): 313-319.
- [9] 韩磊,王玮瑶,于洪泉,等. 内质网应激途径介导同型半胱氨酸致血管内皮细胞凋亡的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志,2014,31(1):92-94.
- [10] 位庚,刘红利,李红蓉,等. 通心络对同型半胱氨酸诱导大鼠心肌微血管内皮细胞损伤的干预作用及氧化应激机制研究[J]. 中国循环杂志,2016,31(9):908-912.
- [11] AJITH T A. Homocysteine in ocular diseases [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 450(2): 316-321.
- [12] 郝宝顺,刘雪莲,刘勇,等. 瑞舒伐他汀对同型半胱氨酸损伤人脐静脉内皮细胞血管细胞间黏附分子-1 表达的影响 [J]. 广东医学,2015,36(11):1646-1648.
- [13] 陈洪娜,唐文照,闫志晖,等. Diplacone 对同型半胱氨酸致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2017,25(7):666-670.
- [14] 杨绍兵,蔡庆,王凯,等. 不同浓度同型半胱氨酸对内皮细胞 TRPV1 蛋白表达的影响 [J]. 宁夏医科大学学报,2017,39(4):399-402.
- [15] 庞柳英,陈英,王宁,等. 芪参益气滴丸对原发性高血压并高同型半胱氨酸血症患者基质金属蛋白酶 9 及血管内皮细胞功能的影响 [J]. 实用心脑血管病杂志,2017,16(5):153-155.
- [16] LIN A C, LIAO C W, LIN S W, et al. Canine heat shock protein 27 promotes proliferation, migration, and doxorubicin resistance in the canine cell line DTK-F [J]. *Vet J*, 2015, 205(2): 254-262.

(收稿日期:2017-06-26 修回日期:2017-09-06)

(上接第 891 页)

- [17] YANG T Y, CHANG G C, HSU S L, et al. Effect of folic acid and vitamin B12 on pemetrexed antifolate chemotherapy in nutrient lung cancer cells [J]. *Biomed Res Int*, 2013 (2013): 389046.
- [18] FARBER S, FARBER S. Some observations on the effect of folic acid antagonists on acute leukemia and other forms of incurable cancer. *Blood*. 1949;4(2):160-167 [J]. *Blood*, 2016, 127(3): 271.
- [19] GUARIENTO A H, FURTADO K S, DE CONTI A, et

al. Transcriptomic responses provide a new mechanistic basis for the chemopreventive effects of folic acid and tributyrin in rat liver carcinogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(1): 7-18.

- [20] MATTESON E L, LOWE V J, PRENDERGAST F G, et al. Assessment of disease activity in rheumatoid arthritis using a novel folate targeted radiopharmaceutical Folatecan [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2009, 27(2): 253-259.

(收稿日期:2017-06-21 修回日期:2017-08-29)