

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.007

不同剂量瑞舒伐他汀对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及 caspase-3 的影响^{*}

谢亚芹¹,李秀芬²,赵娟^{1△},崔海鹏¹,李颖¹,刘凯¹
(1.承德医学院病理生理学教研室,河北承德 067000;2.承德医学院附属医院妇科,河北承德 067000)

[摘要] **目的** 探讨不同剂量瑞舒伐他汀对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)大鼠心肌细胞凋亡的影响。**方法** Wistar大鼠 40 只分为假手术(sham)组、MIRI 组、MIRI+瑞舒伐他汀低剂量(MIRI+Ros-L)组、MIRI+瑞舒伐他汀高剂量(MIRI+Ros-H)组,采用结扎冠状动脉左前降支法建立 MIRI 模型,观察大鼠血流动力学参数及心肌细胞超微结构;免疫组织化学法和 RT-PCR 法分别检测心肌组织半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)蛋白和 mRNA 表达。**结果** 与 sham 组比较,MIRI 组、MIRI+Ros-L 组、MIRI+Ros-H 组大鼠左心室舒张末压(LVEDP)、caspase-3 蛋白及 mRNA 表达均升高($P<0.05$),左心室内压最大上升和下降速率($\pm dp/dtmax$)降低($P<0.05$);与 MIRI 组比较,MIRI+Ros-L 组、MIRI+Ros-H 组大鼠 LVEDP、caspase-3 蛋白及 mRNA 表达均降低($P<0.05$), $\pm dp/dtmax$ 升高($P<0.05$),且 MIRI+Ros-H 组较 MIRI+Ros-L 组改变更为明显($P<0.05$)。**结论** 高剂量瑞舒伐他汀预处理可有效抑制 MIRI 引起的心肌细胞凋亡。**[关键词]** 瑞舒伐他汀;再灌注损伤;超微结构;细胞凋亡;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3**[中图分类号]** R541.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)01-0027-04

Effects of rosuvastatin in different doses on myocardial cell apoptosis and caspase-3 expression in rats with myocardial ischemia reperfusion injury^{*}

XIE Yaqin¹,LI Xiufen²,ZHAO Juan^{1△},CUI Haipeng¹,LI Ying¹,LIU Kai¹
(1. Department of Pathophysiology, Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China;
2. Department of Gynaecology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of rosuvastatin in different doses on myocardial cell apoptosis and caspase-3 expression in rats with myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI). **Methods** 40 Wistar rats were divided into the sham group, the MIRI group, the low-dose rosuvastatin pretreatment group (the MIRI+Ros-L group) and the high-dose rosuvastatin pretreatment group (the MIRI+Ros-H group). The model of MIRI was established by ligating levo-anterior descending branch of coronary artery. Hemodynamic parameters and the ultrastructure of myocardial cells were detected. Immunohistochemical staining and RT-PCR were used to assess protein and mRNA expression of caspase-3 in myocardium. **Results** As compared with the sham group, the levels of left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), protein and mRNA expression of caspase-3 increased in the MIRI group, the MIRI+ROS-L group, the MIRI+ROS-H group ($P<0.05$) while $\pm dp/dtmax$ left ventricle pressure decreased ($P<0.05$). As compared with the MIRI group, the levels of LVEDP, caspase-3 protein and mRNA expression were decreased in the MIRI+ROS-L group, the MIRI+ROS-H group ($P<0.05$) while $\pm dp/dtmax$ increased ($P<0.05$). And the effect was more obvious in the MIRI+ROS-H group than the MIRI+Ros-L group ($P<0.05$). **Conclusion** High-dose rosuvastatin pretreatment can effectively inhibit the myocardial cell apoptosis induced by myocardial ischemia reperfusion injury. **[Key words]** rosuvastatin; reperfusion injury; morphological structure; apoptosis; caspase 3

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)是急性心肌梗死致死、致残的主要病因,因此减轻 MIRI 是一种治疗缺血性心脏病的重要手段。瑞舒伐他汀在降低血脂、改善动脉粥样硬化同时具有抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡及调节免疫反应等功能^[1-2]。然而其对 MIRI 的保护作用是

^{*} 基金项目:河北省卫生和计划生育委员会医学科学研究课题(20170231);河北省高校重点学科建设项目(冀教高[2013]4 号);河北省青年拔尖人才项目;河北省教育厅优秀青年基金项目(YQ2013005)。 作者简介:谢亚芹(1983—),讲师,硕士,主要从事心力衰竭发病机制及治疗研究。 △ 通信作者,E-mail:zhaojuan811015@sina.com。

否呈剂量依赖性,需进一步研究。本研究通过观察不同剂量瑞舒伐他汀预处理对 MIRI 大鼠心肌细胞的超微结构及心肌细胞凋亡的影响,进一步探讨瑞舒伐他汀对于 MIRI 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 瑞舒伐他汀(10 mg)购自阿斯利康制药有限公司;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)兔抗多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;SP 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术公司合成。

1.2 实验动物 健康成年清洁级雄性 Wistar 大鼠 40 只,体质量(220 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号 SCXK(京)-2016-0011,生产合格证 11400700127208。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及 MIRI 模型建立 将 40 只大鼠适应性喂养 1 周后,分为假手术(Sham)组、MIRI 组、MIRI+瑞舒伐他汀低剂量(MIRI+Ros-L)组、MIRI+瑞舒伐他汀高剂量(MIRI+Ros-H)组,每组 10 只。MIRI+Ros-L 组、MIRI+Ros-H 组于造模前第 7 天开始,分别每天空腹给予瑞舒伐他汀 5、20 mg/kg(生理盐水溶解)灌胃 1 次,Sham 组及 MIRI 组给予同体积生理盐水。采用结扎冠状动脉左前降支的方式建立 MIRI 模型。2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,连接小动物呼吸机辅助通气,连接心电图记录 II 导联心电图。沿胸骨左缘开胸,暴露心脏,在左心耳下 2~3 mm 处用穿有圆形空心塑料套管的医用缝线结扎,使套管压迫动脉造成冠状动脉血流阻断。血流阻断成功标准:以阻断的动脉远端心肌出现苍白,心电图 ST 段抬高作为冠状动脉血流阻断成功的判断标准。心肌缺血 30 min 后,将结扎线剪开,再灌注 120 min,再灌注中观察心脏表面颜色转红,ST 段下降为再灌注成功。Sham 组只穿线不结扎冠状动脉。

1.3.2 血流动力学测定 采用 BL-420 多媒体生物信号记录仪进行血流动力学测定,再灌注后经右颈总动脉逆行插管至左心室,记录血流动力学参数包括左心室舒张末压(LVEDP),左心室内压最大上升和下降速率($\pm dp/dt_{max}$)等。

1.3.3 心肌组织超微结构的观察 再灌注结束后,迅速剪下心脏,取 1 mm^3 大小的左心室心肌数块经 10% 锇酸溶液固定后,按电镜常规技术进行脱水、包埋处理,采用乙酸钠与枸橼酸铅进行双重染色,在透射电镜下观察心肌细胞超微结构的改变。

1.3.4 免疫组织化学法检测 caspase-3 蛋白的表达 按照试剂盒操作说明书采用免疫组织化学法进

行检测。I 抗 caspase-3 多克隆抗体稀释浓度为 1:100。采用 MiVnt 图像分析系统在 200 倍显微镜下对免疫阳性结果进行半定量分析,以免疫阳性产物面积与视野面积的比值表示该抗原的相对表达水平。每只动物任选 3 张切片,每张切片选取 4 个视野,取平均值。

1.3.5 RT-PCR 法检测 caspase-3 mRNA 水平 caspase-3 上游引物 5'-TCC ACG AGC AGA GTC AAA-3',下游引物 5'-TTC AAC AAG CCA ACC AAG-3'(扩增产物 208 bp); β -肌动蛋白(β -actin)上游引物 5'-GAG AGG GAA ATC GTG CG-3',下游引物 5'-CAT CTG CTG GAA GGT GGA CA-3'(扩增产物 452 bp)。取大鼠缺血处心肌组织 100 mg,按照说明书提取组织总 RNA 进行反转录。PCR 扩增后进行电泳。采用 Quantity One-v4.6.2 软件对结果进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血流动力学参数的比较 与 Sham 组比较,MIRI 组大鼠 LVEDP 明显升高, $\pm dp/dt_{max}$ 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 MIRI 组比较,MIRI+Ros-L 组、MIRI+Ros-H 组大鼠 LVEDP 明显下降, $\pm dp/dt_{max}$ 明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$),MIRI+Ros-H 组以上变化较 MIRI+Ros-L 组更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

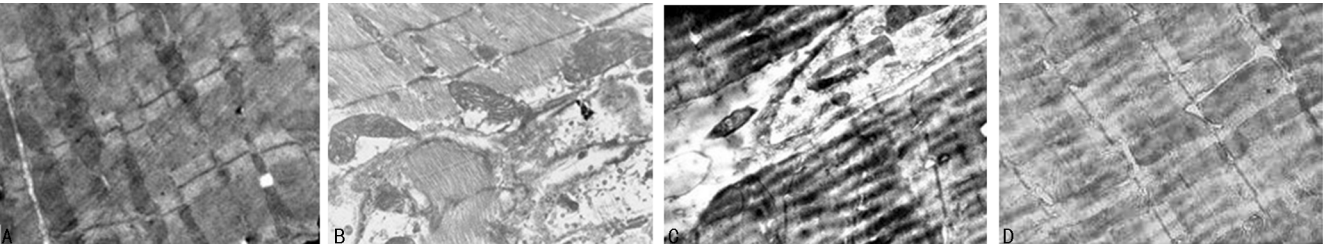
2.2 各组大鼠心肌细胞的超微结构的比较 Sham 组心肌纤维排列整齐,肌小节结构完整,线粒体膜连续完整,线粒体嵴呈平行排列。MIRI 组心肌细胞出现明显肿胀,肌膜出现断裂甚至缺损,肌丝出现断裂或溶解,线粒体肿胀、部分膜破裂,有部分线粒体嵴出现溶解、消失,甚至呈现空泡化,细胞核肿胀,染色质边集、凝聚。MIRI+Ros-L 组和 MIRI+Ros-H 组心肌细胞损伤较 MIRI 组减轻,肌纤维略显规则,心肌线粒体形态结构改变较 MIRI 组明显减轻。与 MIRI+Ros-L 组比较,MIRI+Ros-H 组线粒体肿胀及心肌细胞的损伤减轻更明显,见图 1。

2.3 各组大鼠心肌组织 caspase-3 蛋白表达的比较 caspase-3 免疫阳性产物为棕黄色细颗粒,沉积于心肌细胞质中。与 Sham 组比较,MIRI 组大鼠心肌组织 caspase-3 蛋白表达明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 MIRI 组比较,MIRI+Ros-L 组、MIRI+Ros-H 组大鼠心肌组织 caspase-3 蛋白表达出现降低($P < 0.05$),其中 MIRI+Ros-H 组降低更为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2、表 2。

表 1 各组大鼠血流动力学参数比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

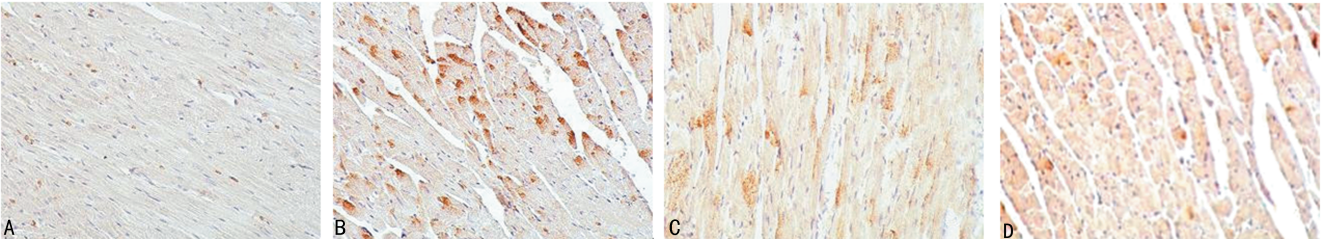
组别	LVEDP(mm Hg)	+dp/dtmax (mm Hg/s)	-dp/dtmax (mm Hg/s)
Sham 组	4.88±0.44	4 662.85±219.99	3 778.08±110.18
MIRI 组	12.53±0.65 ^a	3 426.65±111.46 ^a	2 491.16±99.20 ^a
MIRI+Ros-L 组	8.69±1.29 ^{ab}	3 860.46±100.31 ^{ab}	3 200.28±130.75 ^{ab}
MIRI+Ros-H 组	6.74±0.49 ^{abc}	4 191.13±100.37 ^{abc}	3 521.28±175.24 ^{abc}

^a:*P*<0.05,与 Sham 组比较;^b:*P*<0.05,与 MIRI 组比较;^c:*P*<0.05,与 MIRI+Ros-L 组比较



A:Sham 组;B:MIRI 组;C:MIRI+Ros-L 组;D:MIRI+Ros-H 组

图 1 各组大鼠左心室心肌组织的超微结构比较(×20 000)



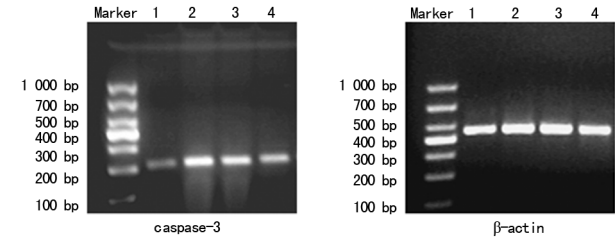
A:Sham 组;B:MIRI 组;C:MIRI+Ros-L 组;D:MIRI+Ros-H 组

图 2 免疫组织化学染色检测各组大鼠左心室心肌组织 caspase-3 蛋白表达(×200)

表 2 各组大鼠左心室心肌组织 caspase-3 蛋白及 mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	caspase-3 蛋白	caspase-3 mRNA
Sham 组	0.096±0.017	0.117±0.009
MIRI 组	0.861±0.077 ^a	0.543±0.043 ^a
MIRI+Ros-L 组	0.518±0.035 ^{ab}	0.321±0.037 ^{ab}
MIRI+Ros-H 组	0.397±0.058 ^{abc}	0.245±0.015 ^{abc}

^a:*P*<0.05,与 Sham 组比较;^b:*P*<0.05,与 MIRI 组比较;^c:*P*<0.05,与 MIRI+Ros-L 组比较



1:Sham 组;2:MIRI 组;3:MIRI+Ros-L 组;4:MIRI+Ros-H 组

图 3 RT-PCR 检测各组大鼠左心室心肌组织 caspase-3 mRNA 表达

2.4 各组大鼠心肌组织 caspase-3 mRNA 表达的比较 与 Sham 组比较,MIRI 组大鼠心肌组织 caspase-3 mRNA 表达明显增高,差异有统计学意义 (*P*<0.05);与 MIRI 组比较,MIRI+Ros-L 组、MIRI+

Ros-H 组 caspase-3 mRNA 表达出现减少 (*P*<0.05),其中 MIRI+Ros-H 组减少更为明显,差异有统计学意义 (*P*<0.05),见图 3、表 2。

3 讨 论

近年来研究表明,MIRI 引起的心肌损伤是一个多途径、多信号通路参与的复杂病理过程,其中心肌细胞过氧化造成大量氧自由基的堆积,心肌细胞的凋亡及自噬、钙超载、能量代谢障碍等病理过程均造成心肌进一步的损伤^[3-5]。其中心肌细胞凋亡是心肌组织学损害的最终发病环节,是导致心肌纤维化、心室重塑、心律失常及心力衰竭发生的重要因素^[6-7]。因此,能否有效地减少心肌细胞的凋亡是衡量 MIRI 预后的关键。本研究通过透射电镜观察大鼠出现 MIRI 后心肌细胞的超微结构,发现 MIRI 组心肌细胞出现线粒体的损伤,细胞核的肿胀等细胞凋亡的迹象。通过血流动力学检测发现心肌再灌注后大鼠心室功能出现了恶化,提示 MIRI 后出现的心肌细胞的凋亡可能是导致心室功能下降的重要因素之一。

心肌细胞凋亡是一种受基因调控的主动的程序化的细胞死亡方式,是由 caspase 家族成员介导的蛋白酶级联反应过程,其中 caspase-3 是凋亡过程中的关键执行蛋白^[8]。细胞凋亡发生时,促凋亡基因释放增加,促进细胞色素 C 进入线粒体激活 caspase-9,进

而活化 caspase-3,活化的 caspase-3 可通过激活核因子、DNA 裂解酶等途径引起细胞内多种蛋白酶复合体破坏,最终诱导细胞凋亡的发生^[9-10],因此减少 caspase-3 的表达对于抑制缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡,改善心室功能具有重要意义。

瑞舒伐他汀可通过抑制甲基戊酸的生成,进而抑制胆固醇的合成,达到降低血脂的作用^[11-12]。近年来大量研究表明,他汀类药物在降低血脂的同时还具有抗氧化、抗炎性因子等作用^[13],能够保护血管内皮,减少心脑血管事件的发生^[14-15]。本研究表明,瑞舒伐他汀能够明显抑制大鼠 MIRI 过程中出现的心肌细胞凋亡,并且其剂量增加,抑制作用愈发显著。同时通过对细胞凋亡关键基因 caspase-3 蛋白和 mRNA 进行检测,发现瑞舒伐他汀能够明显抑制 caspase-3 的表达,并且其抑制作用与用药剂量有关。因此,在对缺血性心脏疾病进行血流再灌注之前,使用高剂量瑞舒伐他汀预处理可更有效抑制 MIRI 引起的心肌细胞凋亡,发挥心肌的保护作用。

参考文献

- [1] KELLE I, AKKOC H, UYAR E, et al. The combined effect of rosuvastatin and ischemic pre- or post-conditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19 (13): 2468-2476.
- [2] OESTERLE A, LAUFS U, LIAO J K. Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system [J]. *Circ Res*, 2017, 120(1): 229-243.
- [3] 吴晓燕, 苗琳, 郑蕊, 等. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2016, 32(11): 1043-1045.
- [4] 李强, 陈海燕, 胡厚祥, 等. 美托洛尔对小鼠心肌缺血再灌注损伤的保护机制研究 [J]. *重庆医学*, 2016, 45(3): 317-319.
- [5] LAKOTA J. Molecular mechanism of ischemia-reperfusion injury after myocardial infarction and its possible targeted treatment [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 29(220): 571-572.
- [6] HEUSCH G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning [J]. *Circ Res*, 2015, 116(4): 674-699.
- [7] ZHU L, WEI T, GAO J, et al. The cardioprotective effect of salidroside against myocardial ischemia reperfusion injury in rats by inhibiting apoptosis and inflammation [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(11): 1433-1443.
- [8] 赵殿臣, 宫丽鸿, 肖福龙. 稳斑汤含药血清对巨噬细胞泡沫化凋亡相关蛋白 Bax, Bcl2 和 caspase3 表达的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(6): 1309-1312.
- [9] LIU X, TAN W, YANG F, et al. Shengmai injection reduces apoptosis and enhances angiogenesis after myocardial ischaemia and reperfusion injury in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104(8): 629-636.
- [10] 王羽, 刘明洁, 付瑶, 等. 苏格木勒-3 汤对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌梗死后 caspase-3/9 表达的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2017, 33(5): 390-392.
- [11] 韩庆, 沈德良, 王勃, 等. 瑞舒伐他汀抑制血管平滑肌细胞表型转化的机制研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(3): 27-33.
- [12] CHOU R, DANA T, BLAZINA I, et al. Statins for prevention of cardiovascular disease in adults: evidence report and systematic review for the US preventive services task force [J]. *JAMA*, 2016, 316(19): 2008-2024.
- [13] 吴萃荣, 王湛. 瑞舒伐他汀与阿托伐他汀对急性心肌梗死患者 PCI 术后左室重构及近期预后影响的比较 [J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(3): 470-472.
- [14] TOUSOULIS D, PSARROS C, DEMOSTHENOUS M, et al. Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease: the emerging role of statins [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(23): 2491-2502.
- [15] ZHANG J Y, LIU B, WANG Y N, et al. Effect of rosuvastatin on OX40L and PPAR- γ expression in human umbilical vein endothelial cells and atherosclerotic cerebral infarction patients [J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 52(2): 261-268.

(收稿日期: 2018-06-16 修回日期: 2018-08-26)