

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.004

瑞舒伐他汀对兔急性心肌梗死后心肌重构的作用及功能影响的机制研究*

武鑫玲¹, 姜娟²

(1. 郑州人民医院心血管内科, 郑州 450053; 2. 北京大学人民医院老年医学科, 北京 100044)

[摘要] **目的** 研究瑞舒伐他汀对兔急性心肌梗死(AMI)后心肌重构的作用及功能影响的机制。

方法 选择 80 只大白兔建立 AMI 模型, 将存活的 69 只大白兔分为对照组(MI 组, $n=20$)、瑞伐他汀组(R 组, $n=22$)、假手术组(S 组, $n=27$)。S 组仅穿线不结扎冠状动脉, R 组灌胃给予瑞舒伐他汀钙, MI 组建立 AMI 后不予任何操作, 观察各组心脏超声心动图情况, 比较各组心肌梗死面积、细胞凋亡率、心肌梗死边缘区 Caspase-3、p-p38 蛋白和 p38 的表达。**结果** 3 组间超声心动图指标比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与 S 组相比, MI 组与 R 组的左心房直径(LAD)、左心室舒张末期内径(LVDd)和左心室收缩末期内径(LVDs)均显著增加, 同时左心室射血分数(LVEF)和左心室短轴缩短率(LVFS)降低($P<0.05$); R 组 LAD、LVDd 和 LVDs 与 MI 组比较差异无统计学意义($P>0.05$), LVEF 和 LVFS 高于 MI 组($P<0.05$)。S 组心肌梗死面积为 0, MI 组与 R 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。MI 组 $[(24.42\pm 2.52)\%]$ 和 R 组 $[(9.31\pm 0.31)\%]$ 凋亡指数(AI)显著高于 S 组 $[(2.65\pm 0.32)\%]$ ($P<0.05$), R 组 AI 较 MI 组显著降低($P<0.05$); R 组及 MI 组心肌梗死边缘区 Caspase-3 表达较 S 组明显升高, 而 R 组较 MI 组显著降低($P<0.05$); MI 组、R 组、S 组 p38 表达均未见明显差异, MI 组和 R 组 p-p38 表达较 S 组明显升高, 而 R 组较 MI 组显著降低($P<0.05$)。**结论** 瑞舒伐他汀可以使 AMI 大白兔的心脏功能显著改善, 可能通过抑制 p38 的磷酸化, 抑制 Caspase-3 活化, 抑制心肌细胞凋亡, 改善心室重构。

[关键词] 心肌梗死; 心室重构; 基质金属蛋白酶类; 转化生长因子 $\beta 1$; 瑞舒伐他汀**[中图分类号]** R542.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1635-04

Function and mechanism of rosuvastatin on myocardial remodeling in rabbits with acute myocardial infarction*

WU Xinling¹, JIANG Juan²

(1. Department of Vasculocardiology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450053, China;

2. Department of Geriatric Medicine, People's Hospital of Peking University, Beijing 100044, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the effect of rosuvastatin on myocardial remodeling in rabbits with acute myocardial infarction and its pathogenetic mechanism.

Methods 80 healthy rabbits were established for AMI model by left anterior descending coronary artery. The survived 69 rabbits were divided into three groups: the control group (group MI, $n=20$), the rosuvastatin group (group R, $n=22$) and the sham group (group S, $n=27$). Only threading with no ligation at coronary artery was conducted in group S. The rabbits in group R were given rosuvastatin calcium. Group MI didn't receive any operations. Cardiac echocardiography was adopted by using color doppler ultrasonography. Comparisons in area of myocardial infarction, apoptosis index (AI), expression of Caspase-3 p-p38 protein and p-p38 in marginal, were made between groups.

Results There were significant difference between related indexes of echocardiogram in the three groups ($P<0.05$). Compared with group S, left atrial diameter (LAD), left ventricular diastolic diameter (LVDd) and left ventricular systolic diameter (LVDs) all increased significantly with the reduction of LVEF and LVFS in group MI and R ($P<0.05$). There was no significant difference in LVDs, LVDd and LAD between group R and MI ($P>0.05$) and LVEF and LVFS were higher than those in group MI ($P<0.05$). The area of myocardial infarction in group S was 0, and there was no significant difference between group MI and R ($P>0.05$). The AI in group MI $[(24.42\pm 2.52)\%]$ and R $[(9.31\pm 0.31)\%]$ was significantly higher than that in group S $[(2.65\pm 0.32)\%]$ ($P<0.05$). AI in group R was significantly lower than that in group MI ($P<0.05$). Caspase-3 expression in the marginal area of myocardial infarction in group R and MI was significantly higher

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81471203)。 作者简介: 武鑫玲(1981-), 主治医师, 硕士, 主要从事冠心病、心力衰竭、高脂血症、高血压等心内科常见病多发病的诊治工作。

than that in group S, while that in group R was significantly lower than that in group MI ($P < 0.05$). P38 expression in group MI, R and S was not significantly different. P-p38 expression in group MI and R was significantly higher than that in group S, while that in group R was significantly lower than that in group MI ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosuvastatin can significantly improve the cardiac function of AMI rabbits. It may the phosphorylation of p38, the activation of Caspase-3 and the apoptosis of cardiac myocytes, and improve ventricular remodeling.

[Key words] myocardial infarction; ventricular remodeling; matrix metalloproteinases; transforming growth factor beta1; rosuvastatin

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是心内科常见疾病之一, 预后较差, 具有较高的病死率, 给人们的健康带来严重威胁。AMI 是由于心脏的供血血管发生急性闭塞, 影响相应的心肌组织的血供而导致短时间内出现缺血、缺氧, 甚至发生坏死^[1]。传统观点认为, AMI 时心肌组织的损伤为不可逆。而最近研究表明, 哺乳动物的心肌细胞在 AMI 时仍未退出细胞周期, 因此仍具有再生能力^[2-3]。患者的心脏功能在 AMI 发生早期受到调节会发生心肌重构。他汀类药物是目前临床降脂、降压的常用药物。研究显示, 他汀类药物有助于改善心肌重构。瑞舒伐他汀是一种他汀类药物, 具有稳定冠状动脉粥样硬化斑块、抗炎、维持内环境稳定, 从而发挥调节细胞增殖, 保护心肌细胞的作用^[4-5]。本研究通过 AMI 大白兔模型的建立, 观察他汀类药物对兔 AMI 后心肌重构的作用, 并探索其中的作用机制, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂 HPSonos 5500 超声诊断系统 (美国 HP 公司), 美国 ABI9700RT-PCR 扩增仪 (美国 Thermo 公司); 瑞舒伐他汀 (阿斯利康制药有限公司, 批准文号 H20110563), 基质金属蛋白 (MMP)-2、-9、-10, 骨膜蛋白 (Perionstin 蛋白) 及转化生长因子 (TGF)- β 1 兔多克隆抗体 (美国 BD 公司)。

1.1.2 实验动物 大白兔, 雄性, 18 个月龄, 体质量 (2.41 ± 0.11) kg, 合格证号 [SCXK (苏) 2007-0008], 适应性饲养 1 周, 室温, 湿度 45%~70%, 自由进食饮水。

1.2 方法

1.2.1 造模与给药方法 首先麻醉兔, 于腹腔注射 20% 乌拉坦 (0.4 mL/kg), 固定兔子仰卧于手术台上, 将颈部及胸部被毛剪除, 将颈部皮肤纵形剪开 1.5~2.0 cm, 对于皮下组织及肌肉进行分离, 使气管及其上甲状腺腺体显露; 钝性分离气管并带线, 将丝线提起, 于气管环之间将气管剪开半周, 行气管插管; 对呼吸参数, 包括呼吸频率、吸呼比及潮气量进行调整; 胸骨左缘 3 mm 将胸部皮肤纵形剪开约 4 cm, 对皮下、胸大肌与前锯肌进行钝性分离, 对胸大肌及前锯肌进

行缝合、牵开, 使肋骨及肋间肌显露, 将肋间肌于第 3 肋间逐步剪开, 使胸膜显露, 于呼气时刺破胸膜进入胸腔; 撑开肋骨, 显露心脏; 探查确定左心耳, 结扎冠状动脉左前降支近端, 13 mm 针 Prolene 线缝扎, 出针, 打结, 探查无出血后关胸, 将一根吸引管留置于胸腔内, 缝合肋间对术野进行消毒; 对合胸大肌与前锯肌并缝合, 将胸腔积气积液用针筒抽吸, 将吸引管拔出; 兔子苏醒后, 拔管, 对气道血块及分泌物进行清理, 气管切口以 Prolene 线一针缝合, 碘伏消毒术野, 对合肌肉及皮下, 缝合颈部切口。手术后 24 h 内 11 只大白兔死亡。将存活的 69 只兔子分为 3 组: 心肌梗死对照组 (MI 组, $n = 20$)、瑞伐他汀组 (R 组, $n = 22$)、假手术组 (S 组, $n = 27$)。S 组并不在冠状动脉处结扎仅穿线; R 组兔子灌胃给予 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 瑞舒伐他汀钙, 每日 1 次, 灌胃处理 4 周; MI 组建立 AMI 后不予任何操作。

1.2.2 超声心动图检查 干预结束使用 HP Sonos 5500 超声诊断系统 (频率 12 MHz) 对 3 组大白兔进行超声心动图检查。检测指标包括左心室射血分数 (LVEF)、左心房直径 (LAD)、左心室舒张末期内径 (LVDd)、左心室收缩末期内径 (LVDs)、左心室短轴缩短率 (LVFS) 等。

1.2.3 左心室梗死面积计算 将左心室切片置于 1% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 中染色 30 min, 蒸馏水冲洗后, 心肌梗死区未着色显示灰白色, 非梗死区经过染色后显示深红色。采用 ImagePro Plus 软件 (version 6.0) 计算梗死面积和左心室总面积, 以梗死面积/左心室总面积表示梗死面积的大小。

1.2.4 检测细胞凋亡率 常规 TUNEL 法, 由福建迈新生物技术开发有限公司提供试剂盒, 检测心肌组织中的凋亡细胞。光镜观察细胞核棕色为阳性, 凋亡指数 (AI) = 视野凋亡数/视野内细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 检测心肌梗死边缘区 Caspase-3 的表达 将心肌组织用机械法剪碎, 过滤并制成单细胞悬液, 将 5 mL 单细胞悬液加入试管中, 常规离心后去上清液, 加入 100 μL 固定液后混匀, 静置 15 min。加 4 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS), 常规离心, 去上清液, 加入 100 μL 裂解液, 室温静置入 5 min。加 5 μL 美国 Santa Cruz

表 1 3 组大白兔超声心动图指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVEF(%)	LAD(mm)	LVDd(mm)	LVDs(mm)	LVFS(%)
S 组	27	77.62±8.93	3.12±1.02	5.32±1.43	3.09±1.19	43.82±5.72
MI 组	20	53.92±6.39 ^a	4.42±1.28 ^a	7.28±2.10 ^a	5.56±1.65 ^a	24.92±4.02 ^a
R 组	22	57.83±6.03 ^{ab}	4.10±1.19 ^a	6.78±2.21 ^a	5.24±2.18 ^a	28.24±3.93 ^{ab}
F		16.390	4.983	4.173	3.982	11.973
P		<0.001	<0.001	0.007	0.012	<0.001

^a: $P<0.05$,与 S 组相比;^b: $P<0.05$,与 MI 组相比

Biotechnology 的 Caspase-3 抗体,混匀,避光静置 15 min。加 4 mL PBS,离心,去上清液,加 PBS 0.5~1.0 mL。使用日本 BD FACSCanto™ II 流式细胞仪检测。

1.2.6 检测 p-p38 蛋白和 p38 常规方法提取样品蛋白,标化后聚丙烯酰胺凝胶电泳;转膜后,以 5% 的脱脂牛奶 1:200 稀释兔单抗 p-p38 抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology)、兔单抗 p38 抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology),1:1000 稀释兔多抗 actin 抗体(武汉博士德公司);置摇床 4℃ 孵育过夜;将辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠、兔二抗用 5% 脱脂牛奶 1:200 稀释,常温摇床上孵育聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜),之后于凝胶成像系统曝光。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 F 检验,组内多重比较采用 LSD-t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大白兔超声心动图指标比较 3 组间超声心动图指标比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与 S 组相比,MI 组与 R 组的 LAD、LVDd 和 LVDs 均显著增加,同时 LVEF 和 LVFS 降低($P<0.05$);R 组 LAD、LVDd 和 LVDs 与 MI 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),LVEF 和 LVFS 高于 MI 组($P<0.05$),见表 1。

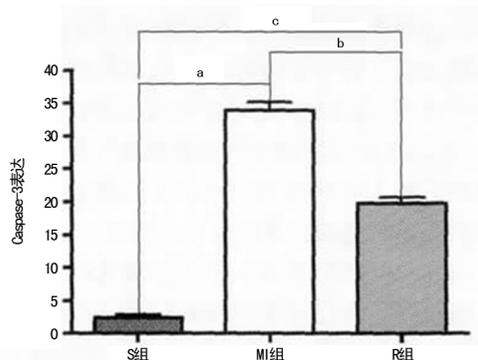
2.2 3 组大白兔心肌梗死面积比较 S 组心肌梗死面积为 0,MI 组(37.92±4.29)%与 R 组(36.71±3.98)%间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 瑞伐他汀对兔子心肌梗死边缘区细胞凋亡的影响 MI 组[(24.42±2.52)%]和 R 组[(9.31±0.31)%]凋亡指数(AI)显著高于 S 组[(2.65±0.32)%]($P<0.05$),R 组 AI 较 MI 组显著降低($P<0.05$)。

2.4 不同组心肌梗死边缘区 Caspase-3 的表达情况 R 组及 MI 组心肌梗死边缘区 Caspase-3 表达较 S 组明显升高,而 R 组较 MI 组显著降低($P<0.05$),见图 1。

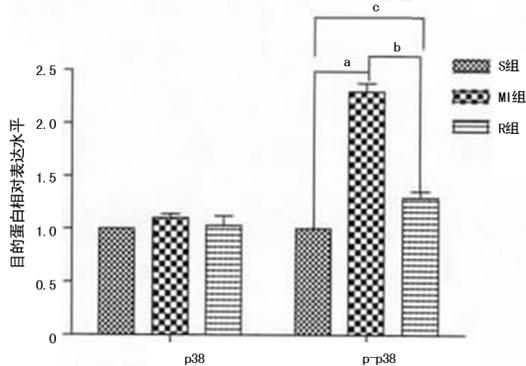
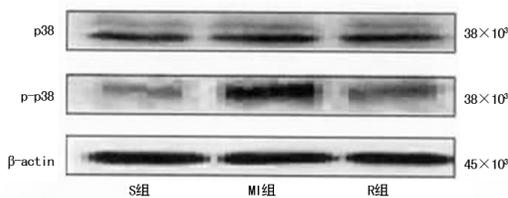
2.5 不同组心肌梗死边缘区相关蛋白表达情况 MI 组、R 组、S 组 p38 表达均未见明显差异,MI 组和 R

组 p-p38 表达较 S 组显著升高,而 R 组较 MI 组显著降低($P<0.05$),见图 2。



^a: $P<0.05$,MI 组与 S 组比较;^b: $P<0.05$,R 组与 MI 组比较;^c: $P<0.05$,R 组与 S 组比较

图 1 各组心肌梗死边缘区 Caspase-3 的表达



A: Western blot 法检测兔心肌梗死边缘区 p38、p-p38 的表达;B: 半定量分析;^a: $P<0.05$,S 组与 MI 组比较;^b: $P<0.05$,R 组与 MI 组比较;^c: $P<0.05$,R 组与 S 组比较

图 2 各组兔心肌梗死边缘区 p38、p-p38 的表达

3 讨论

AMI 后心肌细胞受损,导致心室肥厚、扩张,心肌收缩力下降,心肌纤维化增加,最终导致心力衰竭,给患者带来严重后果^[6-7]。本研究中建立 AMI 大白兔模型,以探究 AMI 的发病机制,以及可能存在的病理变化。

本研究在对兔子模型进行不同干预 4 周后行超声心动图检测,结果显示,与 S 组相比,MI 组与 R 组的 LAD、LVDd 和 LVDs 均显著增加,同时 LVEF 和 LVFS 降低($P < 0.05$),说明大白兔在心肌梗死后出现心脏扩大、左心室收缩功能不全。另外,R 组 LAD、LVDd 和 LVDs 与 MI 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),LVEF 和 LVFS 高于 MI 组($P < 0.05$),提示瑞舒伐他汀能增强心肌梗死大白兔的左心功能。但 MI 组与 R 组间的心肌梗死面积比较并未见显著差异($P > 0.05$),提示瑞舒伐他汀并不能达到显著地减少心肌梗死面积的目的。

心室重构是心肌细胞凋亡所引起,有研究发现,心肌梗死大鼠除梗死区外,梗死边缘区及非梗死区亦可检出细胞死亡,而这是引起左心室重塑和晚期心功能不全的重要因素^[8-9]。本研究结果显示,R 组心肌细胞 AI 较 MI 组显著降低($P < 0.05$),提示瑞舒伐他汀治疗能减少心肌细胞凋亡,可能通过抑制心肌凋亡,而使心功能改善。

目前认为他汀类药物可能通过抑制心肌凋亡而使心功能改善,分析其抑制心肌细胞凋亡可能的作用机制^[10-12]:(1)通过抗氧化作用抑制心肌凋亡;(2)通过调控丝氨酸-苏氨酸激酶和磷脂酰肌醇-3 激酶,下调 Caspase-3 活性。Caspase-3 在细胞的凋亡中起关键作用,是凋亡途径中的执行者。p38 属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族中的一个主要成员,研究发现,大鼠心肌梗死后,p38 并未增高,但 p-p38 在心肌梗死后 7 d 时升高 2 倍以上,p-p38 能激活凋亡程序中最后的执行者 Caspase-3 的活性,使凋亡通路启动,活化的 Caspase-3 又能导致蛋白酶级联切割放大,最终使细胞发生凋亡^[13-15]。本研究中,R 组 p-p38、Caspase-3 的表达低于 MI 组,推测瑞舒伐他汀可能通过抑制 p38 的磷酸化,抑制 Caspase-3 活化,从而抑制心肌细胞凋亡,改善心功能。结果表明瑞舒伐他汀能抑制心肌凋亡、改善心功能,但无法逆转已梗死的心肌组织,提示已坏死的心肌组织无法通过药物恢复正常功能。因此,早期对 AMI 患者使用保护心肌细胞药,避免梗死进一步加重是改善患者预后、提高生存率的重点。

综上所述,瑞舒伐他汀可以使 AMI 大白兔的心脏功能显著改善,可能通过抑制 p38 的磷酸化,抑制 Caspase-3 活化,抑制心肌细胞凋亡,改善心室重构。

参考文献

[1] 孙涛,万大国,宋恒良,等.瑞舒伐他汀对大鼠急性心肌梗

死后梗死组织 miR-126 的表达及血管再生的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2013,35(5):640-643.

- [2] LI Y J, HU S D, MA G S, et al. Acute myocardial infarction induced functional cardiomyocytes to re-enter the cell cycle[J]. Am J Transl Res, 2013, 5(3):327-335.
- [3] 陈翀昊,王广燕,苏衡.瑞舒伐他汀与阿托伐他汀对早发冠心病急性心肌梗死患者的近期疗效[J]. 中国临床药理学杂志,2013,29(2):126-128.
- [4] 张斌,汤建民,杨蕾,等.瑞舒伐他汀联合厄贝沙坦对大鼠心肌梗厚性重构的影响[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(3):534-538,543.
- [5] 吴春涛,马士新.瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌重构的作用及其机制[J]. 中国循证心血管医学杂志,2016,8(5):560-563.
- [6] 许振坤,姚朱华,王佩显,等.氟伐他汀联合普罗布考对急性冠脉综合征患者血脂及血清 hs-CRP 水平的影响[J]. 天津医药,2012,40(6):560-562.
- [7] 李冠.瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌组织中蛋白表达的影响研究[J]. 现代药物与临床,2015,30(5):514-517.
- [8] KOENIG W. High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: From improved risk prediction to risk-guided therapy[J]. Int J Cardiol, 2013, 168(6):5126-5134.
- [9] 张娟,崔天祥,李莉.心肌梗死后大鼠 periostin 蛋白表达量与瑞舒伐他汀干预作用研究[J]. 中国实用医药,2013,8(15):4-6.
- [10] 宋占春,白静慧,汪琦,等.瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的拮抗作用及可能机制[J]. 中华医学杂志,2015,95(45):3695-3700.
- [11] 谭文婷,彭葳锐,唐芬,等.重组人脑钠尿肽对心力衰竭大鼠心肌重构及缝隙连接蛋白 43 表达的影响[J]. 山东医药,2017,57(33):9-11.
- [12] 续茜桥,徐晓宇,石秀锦,等.药物转运体基因多态性与不同他汀类药物调脂效果及不良反应的相关性[J]. 中国药房,2017,28(32):4596-4600.
- [13] 黄永亮,李恩,汪涛.瑞舒伐他汀对心肌梗死后大鼠心肌组织中 α -SMA、TGF- β 1 表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2015,35(2):232-236.
- [14] 王士凯,褚亚丽,徐娟娟,等.氟伐他汀对心肌梗死大鼠心室重构及 MMP-9、MMP-10 表达的影响[J]. 中国动脉硬化化杂志,2014,22(9):917-920.
- [15] 魏嵩昀.阿托伐他汀对不稳定型心绞痛患者高敏 C 反应蛋白和基质金属蛋白酶-9 的影响[J]. 天津医药,2013,41(1):59-60.

(收稿日期:2018-08-18 修回日期:2018-11-23)