

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.27.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 27-0010-05

瑞舒伐他汀对心肌缺血再灌注损伤大鼠 心肌凋亡及相关基因表达的影响*

谢亚芹¹, 李浩², 赵娟¹, 孟凡星¹, 崔海鹏¹, 李瑞香¹

(1. 承德医学院 病理生理学教研室, 河北 承德 067000; 2. 河北省承德市中心血站, 河北 承德 067000)

摘要:目的 探讨瑞舒伐他汀对心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 大鼠心肌细胞凋亡及相关基因表达的影响。**方法** 雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组 (Sham 组)、心肌缺血再灌注组 (MIRI 组)、心肌缺血再灌注 + 瑞舒伐他汀组 (MIRI+R 组), 每组 10 只。复制大鼠 MIRI 模型, 观察各组大鼠左心室舒张末压 (LVEDP), 左心室内压最大上升和下降速率 ($\pm dp/dt_{max}$); 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法检测大鼠左心室心肌细胞的凋亡指数; 免疫组织化学染色检测左心室心肌组织凋亡相关基因 (Bcl-2、Bax) 蛋白表达, RT-PCR 法检测 Bcl-2、Bax mRNA 表达。**结果** MIRI 组与 Sham 组比较, 大鼠 LVEDP、心肌细胞凋亡指数 (AI)、Bax 蛋白及 mRNA 的表达升高 ($P < 0.05$), $\pm dp/dt_{max}$ 、Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达、Bcl-2/Bax 比值下降 ($P < 0.05$); 与 MIRI 组比较, MIRI+R 组大鼠 LVEDP、AI、Bax 蛋白及 mRNA 的表达降低 ($P < 0.05$), $\pm dp/dt_{max}$ 、Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达、Bcl-2/Bax 比值升高 ($P < 0.05$)。**结论** 瑞舒伐他汀可降低心肌缺血再灌注损伤引起的心肌细胞凋亡, 具有良好的心肌保护作用。

关键词: 瑞舒伐他汀; 心肌缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; 凋亡相关基因

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

Effect of Rosuvastatin on myocardial cell apoptosis in rat model of myocardial ischemia reperfusion injury*

Ya-qin Xie¹, Hao Li², Juan Zhao¹, Fan-xing Meng¹, Hai-peng Cui¹, Rui-xiang Li¹

(1. Department of Pathophysiology, Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China;
2. Chengde Central Blood Stations, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Rosuvastatin on myocardial cell apoptosis and apoptosis-associated genes expression in rat model of myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI). **Methods** MIRI model was constructed based on standard procedure. Rat in Sham group received all procedures except for myocardial infarction and reperfusion. Rosuvastatin was administrated in treatment group. Hemodynamic parameters including LVEDP and $\pm dp/dt_{max}$ were recorded. Cellular apoptotic index (AI) of left ventricular was measured by TUNEL staining. Apoptotic related Bcl-2 and Bax were measured by Immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** Rats in MIRI group experienced increased levels of LVEDP, AI and Bax and decreased levels of $\pm dp/dt_{max}$ and Bcl-2 when compared with Sham group ($P < 0.05$). All the mentioned alteration of apoptotic status were reversed by treatment of Rosuvastatin in MIRI+R group compared with MIRI group ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosuvastatin exerts myocardial protection through downregulation of cell apoptosis in rat model of myocardial ischemia reperfusion injury.

Keywords: Rosuvastatin; myocardial ischemia reperfusion injury; apoptosis; apoptosis-associated genes

收稿日期: 2017-10-19

* 基金项目: 河北省卫生计生委医学科学研究课题 (No: 20170231); 河北省高校重点学科建设项目 (No: 冀教高 [2013]4 号)
[通信作者] 赵娟, E-mail: zhaojuan811015@sina.com

近年来研究表明, 瑞舒伐他汀除具有降脂作用之外, 还可以通过改善血管内皮功能, 抑制炎症反应的发生, 抵抗氧化应激等方面发挥循环系统保护作用, 降低心血管疾病的发病率及病死率^[1-2]。然而瑞舒伐他汀在心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 中保护机制目前尚不明确。本研究通过观察大鼠 MIRI 过程中缺血心肌组织细胞凋亡的变化, 选择瑞舒伐他汀作为保护剂, 分析其对心肌细胞凋亡及相关调节基因表达的影响, 为临床药物应用提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与试剂

6 周龄雄性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 (290 ± 20) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物生产许可证号: SCXK (京)-2016-0011, 生产合格证: 11400700127208。

瑞舒伐他汀钙片 (10 mg) 购自江苏省无锡市阿斯利康制药有限公司, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 细胞凋亡检测试剂盒购自美国罗氏 (Roche) 公司, B 淋巴细胞瘤 2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤 2 基因相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 兔抗多克隆抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司, 免疫组织化学 (简称免疫组化) 染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组及给药 将 30 只大鼠随机分为 3 组: 假手术组 (Sham 组)、心肌缺血再灌注组 (MIRI 组)、心肌缺血再灌注 + 瑞舒伐他汀组 (MIRI+R 组), 每组 10 只。于造模前第 7 天开始, MIRI+R 组给予瑞舒伐他汀 5 mg/kg 灌胃, 同时 Sham 组及 MIRI 组给予同体积生理盐水灌胃, 均为每日 1 次。

1.2.2 复制大鼠 MIRI 模型 参照文献^[3-4]复制 MIRI 模型。大鼠采用 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 连接小动物呼吸机进行辅助通气, 调节呼吸机参数: 呼吸频率 70 ~ 80 次/min, 吸呼比 1 : 1.5, 潮气量 5 ~ 6 ml/kg。沿胸骨左缘开胸, 在左心耳下 2 ~ 3 mm 处将左冠状动脉前降支结扎, 阻断冠脉血流。

血流阻断成功的标准: 以缺血动脉远端心肌表现为苍白, 心电图 (采用 BL-420 多媒体生物信号记录仪测量) 呈现 ST 段上抬, QRS 波幅增大, T 波高耸或倒置作为血流阻断成功的标准。冠脉血流阻断 30 min 后, 将结扎线剪开, 进行 120 min 的再灌注。Sham 组只穿线不结扎。

1.2.3 血流动力学参数检测 经再灌注后由右颈总动脉进行逆行插管直至左心室, 导管另一端接压力换能器输入 BL-420 多媒体生物信号记录仪系统, 记录左心室舒张末压 (left ventricular end diastolic pressure, LVEDP), 左心室内压最大上升和下降速率 (± dp/dtmax) 等血流动力学参数。

1.2.4 标本制备 再灌注完成后快速留取左心室梗死部位标本, 放入 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规脱水、透明、浸蜡和包埋用于病理学检测; 另取部分梗死部位心肌迅速投入液氮中保存, 用于 RT-PCR 检测。

1.2.5 TUNEL 原位检测细胞凋亡 将石蜡切片常规脱蜡至水处理后, 按照试剂盒说明书操作进行染色。凋亡指数 (apoptotic index, AI): 以 TUNEL 阳性细胞数量与同一视野心肌细胞总数的比值作为左心室心肌细胞凋亡指数。

1.2.6 免疫组化检测左心室心肌组织 Bcl-2、Bax 蛋白水平 I 抗 (Bcl-2、Bax 多克隆抗体), 稀释浓度均为 1 : 100。采用 MiVnt 图像分析系统半定量分析对结果进行分析, 在 200 倍显微镜下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含量。

1.2.7 RT-PCR 检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 水平 准确称取心肌组织 100 mg, 按 Trizol 说明书提取组织总 RNA, 经 RNA 浓度和纯度测定后, 进行逆转录。按试剂盒说明书操作。Bax 引物序列: 正向 5'-TTTCATCCAGGATCGAGCAG-3', 反向 5'-CAAAGT AGAAGAGGGCAACCAC-3'; Bcl-2 引物序列: 正向 5'-GACGAGAAGTGCTATTGGT-3', 反向 5'-TCAGGCTGG AAGGAGAAGAT-3'; β-肌动蛋白 (β-actin) 引物序列: 正向 5'-GAGAGGGAAATCGTGCG-3', 反向 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3'。Bax、Bcl-2、β-actin 扩增产物大小分别为 263、205 及 452 bp。采用 Quantity One-v4.6.2 软件进行定量分析, 以 β-actin 为内参照, 目的基因表达水平以其吸光度 (A) 与内参照 β-actin A 的比值表示。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以

均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瑞舒伐他汀对 MIRI 大鼠血流动力学参数的影响

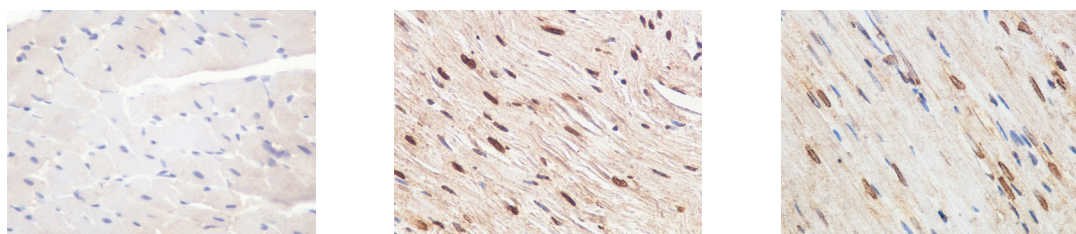
各组大鼠血流动力学参数变化, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Sham 组与 MIRI 组 LVEDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MIRI 组大鼠 LVEDP 水平升高、 $\pm dp/dt_{max}$ 水平下降。

MIRI 组与 MIRI+R 组 LVEDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MIRI+R 组大鼠 LVEDP 水平降低、 $\pm dp/dt_{max}$ 水平升高。见表 1。

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

组别	LVEDP/mmHg	+dp/dt _{max} / (mmHg/s)	-dp/dt _{max} / (mmHg/s)	AI
Sham 组	4.76 \pm 0.95	4 755.46 \pm 214.51	3 729.44 \pm 277.52	0.080 \pm 0.012
MIRI 组	15.64 \pm 2.05 ¹⁾	3 806.86 \pm 161.97 ¹⁾	2 721.71 \pm 223.25 ¹⁾	0.366 \pm 0.036 ¹⁾
MIRI+R 组	9.78 \pm 0.48 ²⁾	4 300.93 \pm 247.39 ²⁾	3 350.22 \pm 195.57 ²⁾	0.243 \pm 0.024 ²⁾
F 值	49.736	15.181	14.121	90.628
P 值	0.000	0.004	0.005	0.000

注: 1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 MIRI 组比较, $P < 0.05$



A : Sham 组

B : MIRI 组

C : MIRI+R 组

图 1 瑞舒伐他汀对 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡的影响 (TUNEL \times 400)

MIRI 组与 MIRI+R 组 Bcl-2、Bax 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MIRI+R 组 Bax 蛋白表达下降, Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值升高。见表 2。

2.4 心肌组织 Bcl-2、Bax mRNA 表达结果

各组大鼠 Bcl-2、Bax mRNA 表达及 Bcl-2/Bax 比值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Sham 组与 MIRI 组 Bcl-2、Bax mRNA 表达及 Bcl-2/Bax 比值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MIRI 组 Bax mRNA 表达升高, Bcl-2 mRNA 表达及 Bcl-2/Bax 比值降低。

MIRI 组与 MIRI+R 组 Bcl-2、Bax mRNA 表达及

2.2 心肌细胞凋亡检测结果

各组大鼠心肌细胞 AI 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Sham 组与 MIRI 组 AI 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MIRI 组心肌细胞凋亡增高; MIRI 组与 MIRI+R 组 AI 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MIRI+R 组心肌细胞凋亡降低。见表 1 和图 1。

2.3 心肌组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达结果

各组大鼠 Bcl-2、Bax 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Sham 组与 MIRI 组 Bcl-2、Bax 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MIRI 组 Bax 蛋白表达升高, Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值降低。

表 2 各组大鼠左心室心肌组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	Bcl-2/Bax
Sham 组	0.085 \pm 0.011	0.025 \pm 0.006	3.492 \pm 0.323
MIRI 组	0.034 \pm 0.012 ¹⁾	0.088 \pm 0.010 ¹⁾	0.394 \pm 0.150 ¹⁾
MIRI+R 组	0.065 \pm 0.014 ²⁾	0.059 \pm 0.008 ²⁾	1.101 \pm 0.168 ²⁾
F 值	12.683	45.265	152.936
P 值	0.007	0.000	0.000

注: 1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 MIRI 组比较, $P < 0.05$

Bcl-2/Bax 比值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MIRI+R 组 Bax mRNA 表达下降, Bcl-2 mRNA 表达及 Bcl-2/Bax 比值升高。见表 3 和图 2。

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

组别	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA	Bcl-2/Bax
Sham 组	0.455 ± 0.064	0.220 ± 0.026	2.087 ± 0.380
MIRI 组	0.111 ± 0.019 ¹⁾	0.660 ± 0.079 ¹⁾	0.168 ± 0.238 ¹⁾
MIRI+R 组	0.228 ± 0.035 ²⁾	0.450 ± 0.045 ²⁾	0.511 ± 0.105 ²⁾
F 值	81.456	80.178	100.502
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 MIRI 组比较, $P < 0.05$

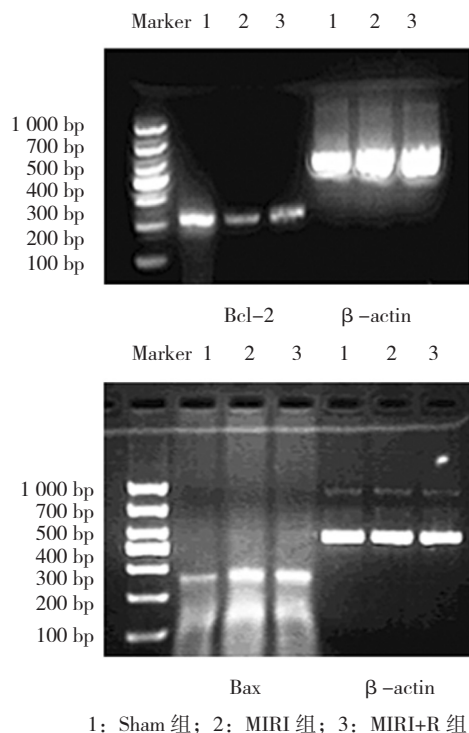


图 2 瑞舒伐他汀对 MIRI 大鼠心肌组织 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响

3 讨论

急性心肌梗死等缺血性心脏病目前在临床主要采用的溶栓、介入以及搭桥手术等手段进行治疗, 能够尽快恢复缺血心肌的血流, 减少心肌梗死范围, 然而研究发现心肌缺血再灌注后, 伴随着活性氧的产生、中性粒细胞被活化等改变, 最终可导致炎症的出现、心肌细胞的损伤甚至细胞凋亡的发生^[5-6]。因此

认为心肌细胞凋亡与 MIRI 密切相关, 是 MIRI 过程中的标志事件^[7]。如何降低心肌凋亡细胞的数目, 保护心肌细胞结构和功能, 减小梗死周边危险区的面积已成为近年来心血管领域研究的热点^[8]。MIRI 心肌细胞凋亡的发生机制十分复杂, 其过程需要多种凋亡相关基因共同调控得以完成, 其中 Bcl-2 和 Bax 被认为是一组重要的细胞凋亡调控基因^[9]。Bax 可以促进细胞凋亡, 而 Bcl-2 则是抑制细胞凋亡的基因, 凋亡细胞内两者的平衡状态直接影响细胞凋亡的调控。因此, Bcl-2 和 Bax 两者在细胞中的含量和功能间的平衡是细胞在受到凋亡刺激后细胞死亡或存活的重要机制^[10]。本研究中血流动力学参数显示, MIRI 组 LVEDP 水平增高, +dp/dtmax 与 -dp/dtmax 则降低, 表明心肌发生缺血再灌注过程中出现了心功能的恶化。TUNEL 细胞凋亡检测结果显示, 在 MIRI 组 AI 增高, 并且凋亡相关基因 Bax 表达升高, Bcl-2 表达及 Bcl-2/Bax 比值降低, 提示在心肌细胞凋亡可能是造成 MIRI 的重要机制之一, 且相关的凋亡基因 Bcl-2、Bax 参与了该凋亡的调控过程。

他汀类药物作为应用最为普遍的调脂药物, 已成为治疗高脂血症及防治动脉粥样硬化性疾病的基石。其作用机制主要通过与 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 竞争性结合酶的活性部位从而阻碍 HMG-CoA 还原酶的作用, 阻断甲羟戊酸的代谢途径, 最终抑制甲羟戊酸的合成。目前发现他汀类药物不仅具有降低血脂、改善动脉粥样硬化等作用, 还可以发挥抗炎、改善血管内皮细胞的功能、抗氧化应激、抑制心肌肥厚等多种功能^[11]。研究发现瑞舒伐他汀可减轻 MIRI 过程中引起的心肌损伤, 保护心室功能^[12]。本研究结果显示, 给予瑞舒伐他汀预处理后, 心肌缺血再灌注的大鼠心功能明显好转, 心肌细胞 AI 降低, 促凋亡基因 Bax mRNA 表达降低, 而抑凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达增加, 提示瑞舒伐他汀对再灌注损伤心肌的保护作用, 而对心肌细胞凋亡的抑制作用可能是其发挥作用的机制之一。然而 MIRI 的发病机制十分复杂, 其中涉及诸多信号传导通路及内源性、外源性因子, 因此瑞舒伐他汀对于 MIRI 心肌的保护机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] KURIAN G A, RAJAGOPAL R, VEDANTHAM S, et al. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016 (12):

- 1-14.
- [2] WU N, LI W, LV Y, et al. Cardioprotective effects of low-dose combination therapy with rosuvastatin and fasudil in the isolated rat heart[J]. *Pharmazie*, 2014, 69(9): 704-708.
- [3] QU D, HAN J, REN H, et al. Cardioprotective effects of astragalosin against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart[J]. *Oxid Med Longev*, 2016(2016): 210-211.
- [4] 李建辉, 侯晓敏, 王慧慈, 等. 异丙酚联合贝那普利预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(8): 12-16.
- [5] 范鹤馨, 张志强. 葛花总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注动物损伤模型的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(12): 119-125.
- [6] ZENG M, WEI X, WU Z, et al. Reactive oxygen species contribute to simulated ischemia/reperfusion-induced autophagic cell death in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20(6): 1017-1023.
- [7] 韩平, 冯俊, 陈华文. 丹参酮 II A 对大鼠心肌缺血再灌注后细胞凋亡的机制研究[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(10): 1844-1846.
- [8] 刘永平, 魏来, 陈文雁, 等. PPAR γ 1 基因转染对缺血再灌注心肌细胞凋亡的作用和影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(9): 25-29.
- [9] CHEN C, HU L X, DONG T, et al. Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia-reperfusion induced injury in rats[J]. *Life Sci*, 2013, 93(7): 265-270.
- [10] LIANG T, ZHANG Y, YIN S, et al. Cardio-protecteffect of qiliqiangxin capsule on left ventricular remodeling, dysfunction and apoptosis in heart failure rats after chronic myocardial infarction[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(5): 2047-2058.
- [11] MASON R P, CORBALAN J J, JACOB R F, et al. Atorvastatin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure, nitrooxidative stress and rantes levels in hypertensive rats with diabetes[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2015, 66(1): 65-72.
- [12] 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.

(王荣兵 编辑)