

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

李 冠

襄阳市中心医院, 湖北 襄阳 441021

摘 要: **目的** 探讨瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌组织蛋白表达的影响。**方法** 选取雌性健康 SD 大鼠, 通过结扎左冠状动脉前降支建立急性心肌梗死模型 54 只, 随机分为瑞舒伐他汀 10、6 mg/kg 组和模型组各 18 只, 另选择 18 只作为假手术组。瑞舒伐他汀组根据临床常用剂量分别采用瑞舒伐他汀按照 10、6 mg/kg 剂量溶于蒸馏水中 ig 给药, 模型组、假手术组均采用等量生理盐水 ig 给药, 1 次/d, 持续 4 周。采用免疫组化法检测大鼠心肌组织中 Periostin、调控机制核因子 κ B (NF- κ B)、白细胞介素-6 (IL-6) 蛋白的表达差异, 采用 RT-PCR 技术检测转化生长因子 (TGF- β 1)、Periostin、NF- κ B 及 IL-6 的 mRNA 表达差异, 比较各组大鼠的胶原容积分数 (CVF)。**结果** 与模型组比较, 瑞舒伐他汀 10、6 mg/kg 组大鼠 Periostin 蛋白灰度值以及 NF- κ B、IL-6 蛋白阳性表达指数 (PI) 均显著下降 ($P < 0.05$); Periostin、NF- κ B、IL-6 及 TGF- β 1 mRNA 表达均显著下降 ($P < 0.05$); CVF 灰度值均显著下降 ($P < 0.05$)。**结论** 瑞舒伐他汀可通过调节急性心肌梗死大鼠心肌组织中 Periostin、NF- κ B、IL-6、TGF- β 1 mRNA 及蛋白的表达来改善心肌重构。

关键词: 瑞舒伐他汀; 急性心肌梗死; 大鼠; 蛋白表达

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)05-0514-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.05.008

Effects of rosuvastatin on protein expression in myocardial tissue of rats with acute myocardial infarction

LI Guan

Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441021, China

Abstract: Objective To investigate rosuvastatin on protein expression in myocardial tissue of rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Female SD rats were selected and established the rat model of AMI by ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD). Fifty-four qualified rats were randomly divided into rosuvastatin groups with dosages of 10 & 6 mg/kg and the model group. And another 18 rats with Sham operations were selected into the control group. Rats in rosuvastatin groups were ig administered with rosuvastatin (adding into distilled water) with dosages of 10 and 6 mg/kg according to clinical common dosages, but the other Sham and model groups were ig administered with 0.9% saline solution. The treatment were adopted once daily, and lasted for 4 weeks. Protein expression difference of Periostin, nuclear factor κ B (NF- κ B), and interleukin -6 (IL-6) in myocardial tissue of rats were detected by immunohistochemistry method, expression of Periostin, NF- κ B, IL-6, and TGF- β 1 mRNA were detected by RT-PCR, and collagen volume fraction (CVF) of rats in each group were compared. **Results** Compared with model group, Periostin value and positive index (PI) of NF- κ B, and IL-6 in rosuvastatin groups were obviously decreased ($P < 0.05$), and expressions of Periostin, NF- κ B, IL-6, and TGF- β 1 mRNA were obviously decreased ($P < 0.05$), and CVF value was also significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Rosuvastatin can regulate protein expressions or mRNA expressions of Periostin, NF- κ B, IL-6, and TGF- β 1 to improve cardiac remodeling of rats with AMI.

Key words: rosuvastatin; acute myocardial infarction; rat; protein expression

急性心肌梗死与冠状脉急性、持续性缺血、缺氧诱发的心肌细胞凋亡有关。发病时患者梗死心肌呈凝固性坏死, 病灶区伴充血、水肿以及炎性细胞

浸润症状。急性期结束后, 梗死心肌将被纤维组织代替, 诱发心室增大、心肌代偿性肥厚, 并影响心脏收缩、舒张能力, 最终导致心律失常或心力衰竭,

收稿日期: 2015-03-03

作者简介: 李 冠 (1966—), 男, 湖北襄阳人, 主管药师, 毕业于华中科技大学同济医学院药学专业, 主要研究方向为药理学。

Tel: 13986319319 E-mail: g00402@126.com

危及患者生命^[1]。瑞舒伐他汀是临床常用的急性心肌梗死治疗药物,可有效降低患者梗死、动脉血管再造风险,但其作用机制临床尚无统一结论^[2]。为此本研究选取健康雌性SD大鼠,对大鼠进行结扎左冠状动脉前降支(LAD)造模,并进行瑞舒伐他汀的治疗。

1 材料与方法

1.1 仪器与药品

HX-100 E 小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司); ASB 240 U 生物信号采集分析系统(成都邀生电子有限公司); 美国 Applied Biosystems PCR 扩增仪; DYY-6 C 电泳仪(北京市六一仪器厂); 日本 Olympus BX41 显微镜。

瑞舒伐他汀钙片(阿斯利康制药有限公司); 水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司); 调控机制核因子 κ B (NF- κ B)、白细胞介素-6 (IL-6)、Periostin、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 兔多克隆抗体 (Santa Cruz 公司); PCR 引物(北京赛百盛基因技术有限公司); 苏木素染液及 DAB 显色试剂盒(上海易利生物科技有限公司)。

1.2 实验动物及分组

雌性健康 SD 大鼠购自吉林大学基础医学院动物实验中心,动物许可证号 SCXK-(吉)-2007-0003,均为 8 周龄,体质量 250~300 g,平均(264±18) g。选取 SD 大鼠,通过结扎左冠状动脉前降支(LAD)建立急性心肌梗死大鼠模型 54 只,编号后采用随机数字表法分为瑞舒伐他汀 10、6 mg/kg 组和模型组各 18 只,另选择 18 只作为假手术组。

1.3 造模及给药方法

对大鼠进行水合氯醛腹腔麻醉,固定于操作台,经气管插管后连接动物呼吸机。清除第三、四根肋骨区域皮毛,常规消毒,于左侧平行肋骨做 2~3 cm 切口,逐步分离皮下组织,打开胸腔,选用镊子撕开心包,于左心耳下缘及肺动脉前降支结扎,待心脏局部颜色苍白后,放回胸腔,检测心电图变化情况,如 aVL 导联 ST 段弓背抬高 0.2 mV 以上即可表明造模成功。关闭胸腔,逐步缝合肌肉、皮肤组织,待大鼠恢复自主呼吸后去除插管,给予大鼠常规抗感染治疗。假手术组仅行肺动脉前降支穿线操作,不结扎。造模成功后,观察 24 h,瑞舒伐他汀组根据临床常用剂量分别采用瑞舒伐他汀按照 10、6 mg/kg 剂量溶于蒸馏水中 ig 给药,模型组、假手术组均采用等量生理盐水 ig 给药,1 次/d,持续 4 周。

1.4 免疫组化染色方法

治疗 4 周后颈椎脱位法处死大鼠,取出心脏,冲洗,沿结扎轴线将心脏剖开,取部分非梗死组织固定,常规切片,并 HE 染色。其余标本置于液氮中保存待用。将切片脱蜡,滴入甲醛-双氧水室温孵化 20 min,冲洗,微波修复,滴入山羊血清封闭, NF- κ B、IL-6、Periostin 兔多克隆抗体一抗,置于 4℃温箱内过夜,洗涤,滴入生物素二抗, DAB 显色,脱水,透明,封片,镜检。

1.5 RT-PCR 检测方法

采用 RT-PCR 技术检测转化生长因子(TGF- β 1)、Periostin、NF- κ B 及 IL-6 的 mRNA 表达:根据北京赛百盛基因技术有限公司合成的引物序列。将心脏组织剪碎,置于液氮中研磨,加入 Trizol 溶为液体,置于 EP 管内,加入 0.3 mL 氯仿,振荡,离心,去上清,置入扩增仪内,PCR 反应,共 35 个循环,将产物电泳,成像,并选用计算机分析结果。

1.6 指标评价标准

胶原容积分数(CVF)的检测采用 Masson 染色法,将切面脱蜡至水改良 Masson 染色将胶原然呈绿色,心肌染色呈红色,在×400 倍光镜下随机选取 5 个视野观察,采用 BDIS 1.6 V 图像处理系统进行分析。

$$CVF = \text{胶原面积} / \text{总面积}$$

免疫组化染色方法的结果判定: Periostin 定位于胞质,免疫组化染色法阳性产物呈黄色或棕褐色,各组照片采用采用 BDIS 1.6 V 图像处理系统进行分析,随机选取 5 各点进行测量,求取平均值,阳性产物强度采用图像处理系统灰度值表示。NF- κ B 蛋白定位与细胞核、IL-6 蛋白定位与细胞浆进行免疫组化染色,在×400 倍光镜下随机选取 10 个视野观察并进行阳性细胞计数,计算 NF- κ B 蛋白、IL-6 蛋白的阳性表达指数(PI)。

$$PI = \text{阳性细胞数} / \text{视野所有细胞数}$$

1.7 统计学分析

统计分析在 SPSS 17.0 中进行。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组间比较采用单因素方差分析、组间两两比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 大鼠的心肌组织中 Periostin、NF- κ B、IL-6 蛋白表达情况

模型组大鼠的 Periostin 蛋白灰度值以及

NF- κ B、IL-6 蛋白 PI 与假手术组比较差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较, 瑞舒伐他汀 10、6 mg/kg 组大鼠 Periostin 蛋白灰度值以及 NF- κ B、IL-6 蛋白 PI 均显著下降 ($P<0.05$)。结果见表 1。

2.2 大鼠的心肌 Periostin、NF- κ B、IL-6 及 TGF- β 1 mRNA 表达情况

模型组大鼠的 Periostin、NF- κ B、IL-6 及 TGF- β 1 mRNA 表达与假手术组比较差异均具有

统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较, 瑞舒伐他汀 10、6 mg/kg 组大鼠 Periostin、NF- κ B、IL-6 及 TGF- β 1 mRNA 表达均显著下降 ($P<0.05$)。结果见表 2。

2.3 大鼠的心肌 CVF 值测定

模型组大鼠的 CVF 灰度值与假手术组比较差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较, 瑞舒伐他汀 10、6 mg/kg 组大鼠 CVF 灰度值均显著下降 ($P<0.05$)。结果见表 3。

表 1 大鼠心肌组织中 Periostin、NF- κ B、IL-6 蛋白表达差异 ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

Table 1 Protein expression difference of Periostin, NF- κ B, and IL-6 in myocardial tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Periostin 蛋白 (灰度值)	NF- κ B 蛋白 PI	IL-6 蛋白 PI
假手术	—	105.94 $\pm$ 7.18	0.061 $\pm$ 0.012	0.015 $\pm$ 0.011
模型	—	154.76 $\pm$ 8.15*	0.531 $\pm$ 0.042*	0.542 $\pm$ 0.044*
瑞舒伐他汀	6	134.31 $\pm$ 7.53 [#]	0.296 $\pm$ 0.047 [#]	0.308 $\pm$ 0.041 [#]
	10	122.65 $\pm$ 6.93 [#]	0.237 $\pm$ 0.036 [#]	0.268 $\pm$ 0.037 [#]

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs Sham group; [#] $P<0.05$ vs model group

表 2 大鼠的心肌 Periostin、NF- κ B、IL-6、TGF- β 1 mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

Table 2 Expression of Periostin, NF- κ B, IL-6, and TGF- β 1 mRNA in myocardial tissue of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Periostin mRNA	NF- κ B mRNA	IL-6 mRNA	TGF- β 1 mRNA
假手术	—	0.097 $\pm$ 0.019	0.114 $\pm$ 0.016	0.085 $\pm$ 0.018	0.127 $\pm$ 0.041
模型	—	0.436 $\pm$ 0.028*	0.627 $\pm$ 0.052*	0.564 $\pm$ 0.046*	0.518 $\pm$ 0.057*
瑞舒伐他汀	6	0.381 $\pm$ 0.026 [#]	0.421 $\pm$ 0.029 [#]	0.463 $\pm$ 0.033 [#]	0.451 $\pm$ 0.037 [#]
	10	0.351 $\pm$ 0.024 [#]	0.311 $\pm$ 0.026 [#]	0.265 $\pm$ 0.030 [#]	0.368 $\pm$ 0.033 [#]

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs Sham group; [#] $P<0.05$ vs model group

表 3 大鼠的心肌 CVF 值的测定 ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

Table 3 Determination of CVF values ($\bar{x} \pm s$, $n=18$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CVF (灰度值)
假手术	—	10.18 $\pm$ 4.37
模型	—	47.86 $\pm$ 7.19*
瑞舒伐他汀	6	41.36 $\pm$ 5.73 [#]
	10	36.17 $\pm$ 5.22 [#]

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs Sham group; [#] $P<0.05$ vs model group

3 讨论

心肌梗死后梗死面积与心肌细胞凋亡程度呈正相关, 有研究证实, 凋亡心肌细胞是坏死心肌细胞的几何倍数, 部分凋亡心肌细胞可逐步坏死。而心肌细胞凋亡的影响因素为: 缺血、缺氧带来的能量不足, 机械负荷过重, 氧自由基损伤以及炎性因子

损伤等。心肌纤维化是心肌梗死重要的病理改变之一, 也是心室重构的重要节点, 该病理改变涉及多种细胞因子, 包括炎症因子、细胞生长因子等。IL-6 是单核巨噬细胞、血管内皮细胞、纤维母细胞以及淋巴细胞等生成的一种致炎因子, 是生物体炎症反应、免疫应答的重要参与因子^[3]。IL-6 参与炎症损伤的全过程, 可刺激细胞间黏附分子的表达, 并可刺激细胞生长、增殖, 加速细胞急性期蛋白合成。IL-6 还可通过影响心肌细胞的收缩性, 加速心肌细胞凋亡以及间质纤维化等作用心肌重塑, 最终参与心力衰竭的发生、发展^[4]。NF- κ B 是细胞信号传递的重要因子, 是免疫、炎症、应激、机体防疫、组织损伤、凋亡等多种反应的参与因子。在感染、损伤刺激下, 上游信号将诱使 NF- κ B 活化, 而活化的 NF- κ B 将启动多种基因的转录, 如炎症因子, 这

将加速炎症因子的表达,而炎症因子又可进一步刺激 NF- κ B 活化,两者形成爆发式的连锁反应,最终诱使局部组织炎症反应,导致组织坏死^[5]。Periostin 蛋白是成纤维细胞合成的一种细胞外基质蛋白,健康成人心肌内无表达,但心肌损伤时可高表达。Periostin 可与胶原蛋白、粘连蛋白等共同参与生理或病理性纤维化改变。Periostin 蛋白还可调节血管生长,并以此促进动脉粥样硬化斑块的生长,加速斑块的破碎,进而参与冠心病的发生、发展^[6]。TGF- β 1 是调节细胞生殖、分化的重要物质,其对间充质起源的细胞具有刺激作用,但对上皮及神经外胚层细胞具有抑制作用。有研究显示,TGF- β 1 可与 Periostin 蛋白共同参与病毒性心肌炎患者心肌纤维化发生、发展,导致患者心肌重构^[7]。心肌梗死发生后,组织纤维增生属于一种病理保护机制,增生过度时可加剧心室重塑过程,造成心脏舒缩功能障碍。CVF 的结果可反映心脏在不同条件下产生的这种适应性或/和代偿性生理、病理变化,提示心肌纤维是否有过度增生的现象。

瑞舒伐他汀是一种 HMG-CoA 还原酶抑制剂,可竞争性抑制细胞内胆固醇合成过程中限速酶的活性,即可抑制胆固醇的合成,胆固醇合成量降低将导致细胞表面低密度脂蛋白(LDL)受体上调,血浆 LDL 代谢加快^[8]。瑞舒伐他汀还可抑制极低密度蛋白的生成,在高胆固醇血症治疗工作中具有极高疗效^[9]。临床研究发现,对急性冠脉综合征患者进行大剂量瑞舒伐他汀治疗后,患者一级终点(心肌梗死、心绞痛、死亡等)发生率下降 20%左右,卒中发生率也显著下降^[10]。本研究,对心肌梗死造模大鼠进行瑞舒伐他汀治疗后发现,模型组大鼠的 Periostin、NF- κ B、IL-6 及 TGF- β 1 mRNA 表达与假手术组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,瑞舒伐他汀 10、6 mg/kg 组大鼠 Periostin、NF- κ B、IL-6 及 TGF- β 1 mRNA 表达均显著下降($P < 0.05$)。结果表明瑞舒伐他汀可通过调节大鼠 Periostin、NF- κ B、IL-6、TGF- β 1 等因子的表达水平来抑制心肌纤维化,改善大鼠心肌重构。

综上所述,瑞舒伐他汀是一种有效的心肌梗死

防治药物,可有效改善大鼠心肌梗死症状,并可调节心肌组织中 Periostin、NF- κ B、IL-6、TGF- β 1 mRNA 及蛋白的表达。

参考文献

- [1] 陈昊,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.
- [2] 石蕊,姜铁民,赵季红,等.不同他汀类药物治疗早发冠心病急性心肌梗死患者近期临床随访研究[J].中国全科医学,2012,15(23):2619-2622.
- [3] 邹筱冬,吴同果,崔进,等.早期强化瑞舒伐他汀治疗对急性冠状动脉综合征患者经皮冠状动脉介入术后心肾功能的影响[J].广西医学,2014,36(6):760-763.
- [4] 张国天,陈永生.瑞舒伐他汀干预前后急性冠状动脉综合征患者血清白细胞介素 17 的变化及意义[J].中华老年心脑血管病杂志,2014,16(9):935-937.
- [5] Ballantyne C M, Pitt B, Loscalzo J, et al. Alteration of relation of atherogenic lipoprotein cholesterol to apolipoprotein B by intensive statin therapy in patients with acute coronary syndrome (from the Limiting Undertreatment of lipids in ACS with Rosuvastatin [LUNAR] Trial) [J]. *Am J Cardiol*, 2013, 111(4): 506-509.
- [6] 张北玉,刘灿君,孙爽,等.瑞舒伐他汀早期干预治疗对急性心肌梗死患者行急诊经皮冠状动脉介入治疗中冠状动脉血流的影响[J].中国循环杂志,2013,28(4):270-273.
- [7] 刘寓,王娟,杨均.瑞舒伐他汀短期干预对急性冠状动脉综合征患者高敏 C 反应蛋白及血管性血友病因子和内皮依赖性血管功能的影响[J].中国医药,2011,6(3):268-270.
- [8] Otagiri K, Tsutsui H, Kumazaki S, et al. Early intervention with rosuvastatin decreases the lipid components of the plaque in acute coronary syndrome: analysis using integrated backscatter IVUS (ELAN study) [J]. *Circ J*, 2011, 75(3): 633-641.
- [9] 晋群,庄颖珠,张吉新,等.IL-17 在急性冠状动脉综合征的变化及瑞舒伐他汀的干预作用[J].中国急救医学,2012,32(3):250-254.
- [10] 李书国,邓娟娟,朱慧铭,等.瑞舒伐他汀强化治疗对急性冠脉综合征血运重建术后血脂及 C 反应蛋白的影响[J].心血管康复医学杂志,2011,20(4):377-380.