

阿托伐他汀对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响

余 慧, 秦永文*

第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433

[摘要] **目的** 建立大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型, 观察阿托伐他汀预处理对心肌缺血再灌注损伤的保护作用, 并探讨其可能的作用机制。 **方法** 将 36 只健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术(S)组、缺血再灌注(I/R)组和阿托伐他汀干预(AT+I/R)组, 每组 12 只。采用冠状动脉左前降支结扎法制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。通过 Evans 蓝和四氮唑(TTC)染色评估各组大鼠心肌梗死面积; 采用放射免疫法测定大鼠缺血未梗死区心肌组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)含量及总超氧化物歧化酶(TSOD)活性; 采用比色法测定一氧化氮(NO)含量及总一氧化氮合酶(NOS)、诱导型 NOS(iNOS)活性。 **结果** AT+I/R 组心肌梗死区与缺血区(缺血未梗死区+梗死区)面积比值低于 I/R 组 $[(29.4 \pm 8.4)\% \text{ vs } (57.7 \pm 6.5)\%, P < 0.001]$; AT+I/R 组梗死面积与左室面积的比值也低于 I/R 组 $[(15.9 \pm 5.6)\% \text{ vs } (29.0 \pm 8.9)\%, P < 0.05]$ 。AT+I/R 组及 I/R 组左室非梗死区域心肌 TNF- α 、MDA、MPO、NO 含量及 NOS、iNOS 活性均高于 S 组 ($P < 0.05$), 而 TSOD 活性则低于 S 组 ($P < 0.05$); 与 I/R 组比较, AT+I/R 组心肌 TNF- α 、MDA、MPO、NO 含量及 NOS、iNOS 活性均降低 ($P < 0.05$), TSOD 含量升高 ($P < 0.05$)。 **结论** 阿托伐他汀对缺血再灌注损伤心肌具有保护作用, 机制可能与其降低炎症反应、激活抗氧化反应、提高机体清除氧自由基能力有关, 且 iNOS 在其中的作用值得重视。

[关键词] 阿托伐他汀; 再灌注损伤; 肿瘤坏死因子 α ; 一氧化氮合酶

[中图分类号] R 542.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)10-1070-04

Protective effect of atorvastatin against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

YU Hui, QIN Yong-wen*

Department of the Cardiovasculology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the protective effect of atorvastatin against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats and to discuss the possible mechanism. **Methods** Thirty-six healthy male Sprague-Dawley rats were evenly randomized into three groups: sham-operated (S) group, ischemia-reperfusion (I/R) group, and atorvastatin pretreatment (AT+I/R) group. The myocardial ischemia-reperfusion model was established by ligating the left anterior descending of coronary artery. The infarcted area was evaluated by Evans blue and triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The contents of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), malondialdehyde (MDA), and myeloperoxidase (MPO) and total superoxide dismutase (TSOD) activity in the non-infarcted myocardial tissues were measured by radioimmunoassay; the levels of nitric oxide (NO) and the activities of nitric oxide synthase (NOS) and inducible NOS (iNOS) were detected by colorimetric method. **Results** The ratio of the infarcted area to the ischemia area (ischemia but non-infarcted area+infarcted area) and the ratio of the infarcted area to the left ventricular area in group AT+I/R were both significantly lower than those in group I/R ($[29.4 \pm 8.4)\% \text{ vs } [57.7 \pm 6.5)\%, P < 0.001$; $[15.9 \pm 5.6)\% \text{ vs } [29.0 \pm 8.9)\%, P < 0.05$). The levels of TNF- α , MDA, MPO and NO, the activities of NOS and iNOS were significantly higher and the TSOD activity was significantly lower in the non-infarcted myocardial tissues of group AT+I/R and group I/R compared with those in group S ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , MDA, MPO and NO, and the activities of NOS and iNOS were significantly decreased ($P < 0.05$) and the TSOD activity was significantly increased ($P < 0.05$) in group AT+I/R as compared to those in group I/R. **Conclusion** Atorvastatin can protect myocardium from ischemia-reperfusion injury, which might be related to suppression of the inflammatory reaction, activation of the anti-oxidant reaction and improvement of oxygen free radical scavenging; the role of iNOS deserves special attention.

[Key words] atorvastatin; reperfusion injury; tumor necrosis factor alpha; nitric oxide synthase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(10):1070-1073]

[收稿日期] 2012-06-13 **[接受日期]** 2012-07-25

[作者简介] 余 慧, 硕士, 住院医师, E-mail: hfqiliang@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-56678208, E-mail: qyw2009@163.com

心肌缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是指在发生心肌梗死后血管再疏通时,病变范围内的心肌出现包括线粒体损伤、氧自由基大量生成、钙离子大量内流产生细胞内钙超载等在内的一系列损伤,进一步导致心肌细胞水肿、线粒体肿胀、微循环灌注障碍并引起心肌无复流,直接影响心肌重塑和患者长期预后。他汀类药物是目前用于心血管疾病的一类重要药物,它是3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,可通过阻断体内胆固醇的合成来调节血脂水平。近年来,基础和临床研究均关注于他汀类药物降脂以外的心血管保护作用,即具有降低炎症反应、稳定斑块、改善血管内皮细胞功能、抑制血小板凝集的作用^[1-2]。目前已证实他汀类药物可通过抑制炎症因子合成而减轻心肌IRI,但其在抑制氧化反应及调控一氧化氮(NO)生成方面的作用机制尚未完全阐明。本研究通过建立大鼠心肌IRI模型,观察经胃灌注阿托伐他汀预处理后大鼠非梗死区心肌组织中炎症和氧化反应程度,以及自由基生成和一氧化氮合酶(NOS)活性改变情况,以探讨阿托伐他汀对大鼠心肌IRI防治作用及可能的机制,为今后实验研究及临床用药提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 阿托伐他汀钙(立普妥)为赛诺菲安万特制药公司产品(规格:10 mg/片,批号:1037032);Evans蓝和四氮唑(TTC)购自上海生工生物工程技术有限公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)、总超氧化物歧化酶(TSOD)检测试剂盒,NOS及诱导型NOS(iNOS)活力测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;国产TDL80-2B型离心机(上海安亭科学仪器厂),电泳凝胶成像仪Syngene(GBOX)、蛋白成像仪Odyssey(美国LI-COR公司),DT2000图像分析软件(南京东图数码科技有限公司)。

1.2 实验分组及给药方法 成年清洁级健康SD雄性大鼠(第二军医大学实验动物中心提供)36只,6~7周龄,体质量220~250 g。将实验动物随机分成3组:假手术(S)组、缺血再灌注(I/R)组、阿托伐他汀干预(AT+I/R)组,各12只。其中,AT+I/R组在标准饲养方法的基础上,于术前5 d开始以含阿托伐他汀钙10 mg/(kg·d)的2 ml生理盐水灌胃,1次/d,术前30 min再次灌胃,而S组及I/R组每天给予等体积不含药物的生理盐水灌胃。术前禁食12 h。

1.3 I/R大鼠模型制备 腹腔注射氯胺酮2 ml/kg麻醉大鼠,四肢及头部固定于木板上,经气管插管,接人工呼吸机,手术中途大鼠苏醒挣扎时接通乙醚麻

醉。自大鼠左胸第3、4肋间开胸,充分游离后暴露主动脉和心脏左室前壁,在肺动脉圆锥和左心耳交界处略靠近左心耳下方2 mm处分离左冠状动脉前降支(LAD),S组只开胸分离血管但不结扎;AT+I/R组及I/R组大鼠在分离LAD后用5号医用缝合线穿圆形塑料套管结扎LAD,可观察到心前壁跳动明显减缓、组织呈暗红色。以心电图I导联和aVL导联立即弓背向上抬高为手术成功标志。缝合肌肉及表皮,脱离呼吸机。计时30 min后重新开胸并剪开取出套管,松开结扎线,使血管恢复畅通,再灌注3 h。

1.4 心肌梗死面积评估 大鼠经30 min缺血和3 h再灌注后,再度开胸,将原结扎线收紧,以10 g/L的Evans蓝3 ml经心尖部注入心腔。迅速自结扎线以上1~2 mm处剪下心脏并用生理盐水洗净血液,剪除左右心耳及残留大血管后将大鼠心脏结扎线以下的部分沿长轴方向切成环形薄片5片,厚度为2 mm,浸入0.5 mg/ml的TTC磷酸缓冲液中,37℃孵育20~30 min。此时,可明显看到心肌组织中呈现3种颜色:蓝色为Evans蓝染色部分,表示未缺血的正常组织;红色为TTC染色部分,表示心肌缺血但非梗死组织;灰白色为未被TTC染色部分,表示缺血且梗死组织。拍照后通过图像分析系统统计3部分的面积。以标本缺血区(缺血未梗死区+梗死区)与整个左室心肌面积的比值来评价各组手术之间的平行性,标本缺血区面积与整个心肌面积的比值>30%,表明模型建立成功。

1.5 大鼠左室非梗死区心肌组织TNF- α 、MDA、MPO、NO含量以及TSOD、NOS、iNOS活性检测 取结扎线以下大鼠左室心尖部缺血未梗死区域心肌组织,每20 mg组织加入150 μ l裂解液,与生理盐水混合后研磨匀浆,4℃15 000 \times g离心5 min,取上清液,采用放射免疫法检测TNF- α 、MDA、MPO含量及TSOD活性,严格按试剂盒说明书操作;采用比色法分别测定NO含量、总NOS及iNOS活性,按试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学处理 运用SPSS 11.0处理软件,实验数据(计量资料)用 $\bar{x}\pm s$ 表示,以单因素方差分析(ANOVA)比较组间差异,如差异有统计学意义,进一步用LSD法两两比较。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 大鼠左室梗死面积分析比较 AT+I/R组和I/R组大鼠标本缺血区(缺血未梗死区+梗死区)面积与整个心肌面积的比值均>30%,表明24只大鼠均建模成功。经过Evans蓝和TTC染色,S组大鼠正常心肌染成蓝色;而AT+I/R组和I/R组大鼠缺血心肌染

成浅红色,梗死心肌区域未见染色,为灰白色(图1)。AT+I/R组和I/R组比较,缺血区(缺血未梗死区+梗死区)与整个心肌面积的比值差异无统计学意义[(47.4%±8.8)% vs (47.2±11.6)% , $P=0.950$]; AT+I/R组梗死区与缺血区(梗死区+缺血未梗死区)的比值较I/R组明显降低[(29.4±8.4)% vs

(57.7±6.5)% , $P<0.001$]; AT+I/R组梗死区与左室面积的比值较I/R组也明显降低[(15.9±5.6)% vs (29.0±8.9)% , $P=0.012$]。提示在心肌IRI过程中,阿托伐他汀或许并不能显著改变心肌缺血的面积,但在一定程度上可以缩小心肌完全梗死区域的范围,减轻再灌注造成的损害。

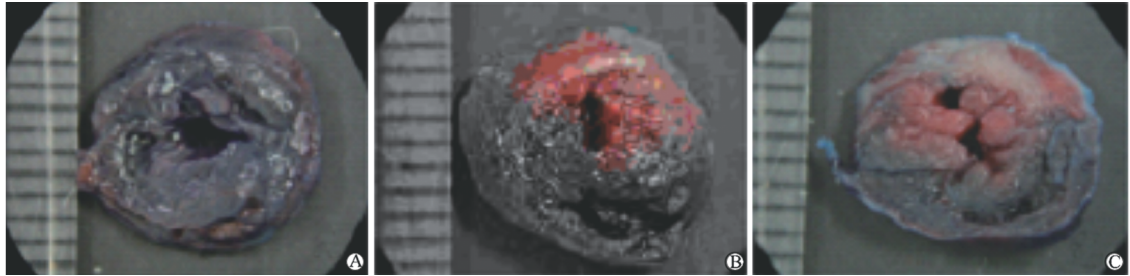


图1 各组大鼠左心室心肌 Evans 蓝和 TTC 染色

Fig 1 Evans blue and triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining of rat myocardial tissues in rat left ventricle in different groups

A: The sham-operated (S) group; B: The atorvastatin (AT)+ischemia-reperfusion(I/R) group; C: The I/R group. The blue area: The normal myocardial tissues; The red area: Ischemia but non-infarcted area; The pale area: The infarcted area

2.2 各组大鼠非梗死区心肌组织 TNF- α 、MDA、MPO 含量及 TSOD 活性的比较 结果见表1。与S组比较,AT+I/R组和I/R组缺血非梗死区心肌组织中炎症反应程度指标 TNF- α 、MPO 及氧自由基指标 MDA 水平均明显升高($P<0.05$),而抗氧化指标 TSOD 活性明显降低($P<0.05$);与I/R组比较,

AT+I/R组中 TNF- α 、MPO 及 MDA 水平均明显降低($P<0.05$),而 TSOD 活性升高($P<0.05$)。提示阿托伐他汀可能通过抑制炎症反应介质生成、降低炎症反应,并激活抗氧化反应、提高机体清除氧自由基能力的方式来对 IRI 的心肌起到保护作用。

表1 各组大鼠非梗死区心肌组织 TNF- α 、MDA、MPO 含量及 TSOD 活性变化

Tab 1 Detection of TNF- α ,MDA,MPO levels and TSOD activity in non-infarcted area of rat myocardial tissues in different groups

$n=12, \bar{x}\pm s, z_B/(U \cdot \text{mg}^{-1})$

| Group | TNF- α | MDA | MPO | TSOD |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| S | 19.39±1.92 | 6.12±1.56 | 4.08±1.07 | 27.12±3.01 |
| I/R | 40.45±2.34* | 14.29±2.87* | 16.57±2.23* | 16.47±1.88* |
| AT+I/R | 31.68±2.07* Δ | 10.58±1.63* Δ | 11.46±1.46* Δ | 21.86±2.13* Δ |

S: The sham-operated group; I/R: Ischemia-reperfusion group; AT+I/R: Atorvastatin pretreatment group; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha; TSOD: Total superoxide dismutase; MDA: Malondialdehyde; MPO: Myeloperoxidase. * $P<0.05$ vs group S; $\Delta P<0.05$ vs group I/R

2.3 缺血再灌注后大鼠心肌组织 NO 含量及 NOS,iNOS 活性比较 与S组比较,AT+I/R组和I/R组的NO含量及NOS,iNOS活性均明显升高($P<0.05$);但AT+I/R组的NO含量及NOS,iNOS的活性均较I/R组明显降低($P<0.05$,表2)。

3 讨论

随着对急性心血管事件发生机制研究的不断深入,炎症反应及氧化应激在急性心梗后心肌IRI过程中发挥的重要作用越来越受到人们的重视^[3]。细胞因子 TNF- α 被认为是缺血再灌注的重要炎症调

控因子,与内皮功能失调有直接相关性^[4],并可诱导炎症细胞局部黏附、聚集、活化^[5]。MPO 是中性粒细胞特异酶,反映中性粒细胞浸润和激活程度,在炎症反应中起到重要作用^[6]。MDA 为氧自由基在脂质过氧化反应过程中形成的脂质过氧化物,其含量的多少可间接反映出机体内脂质过氧化的程度,而 TSOD 则是体内的一种抗氧自由基酶,能够清除超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 等,可作为细胞抗氧化程度的标志^[7]。本实验结果显示,心肌缺血再灌注后,缺血但未梗死区心肌组织中 TNF- α 、MPO 及 MDA 含量均明显增高,TSOD 活性降低;但在阿托伐他汀干预

处理后 TSOD 活性升高, 而 TNF- α 、MPO 及 MDA 的含量均有不同程度的降低, 提示阿托伐他汀在 IRI 过程中具有抗炎、抗氧化的作用并提高了机体清除氧自由基的能力, 由此可能减轻中性粒细胞或内皮细胞所产生的活性氧对心肌细胞的直接损伤效应。

表 2 各组大鼠非梗死区心肌组织 NO 含量及 NOS、iNOS 活性的比较

Tab 2 Detection of NO level, NOS and iNOS activity in non-infarcted area of rat myocardial tissues in different groups
 $n=12, \bar{x} \pm s$

| Group | NO $m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1})$ | NOS $z_B/(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ | iNOS $z_B/(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ |
|--------|--|--|---|
| S | 37.12 \pm 3.68 | 3.12 \pm 0.42 | 1.06 \pm 0.35 |
| I/R | 91.28 \pm 6.57* | 9.58 \pm 0.51* | 3.89 \pm 0.57* |
| AT+I/R | 74.21 \pm 4.82* Δ | 5.42 \pm 0.46* Δ | 1.91 \pm 0.42* Δ |

S: The sham-operated group; I/R: Ischemia-reperfusion group; AT+I/R: Atorvastatin pretreatment group; NO: Nitric oxide; NOS: Nitric oxide synthase; iNOS: Inducible nitric oxide synthase.
* $P < 0.05$ vs group S; $\Delta P < 0.05$ vs group I/R

内源性 NO 是 L-精氨酸和分子氧在 NOS 催化作用下合成的多功能小分子气体, 能调节机体器官缺血后炎症反应过程, 对组织具有保护和损伤双重效应, 即在心肌 IRI 早期, 适当低浓度的 NO 可与超氧阴离子 $O_2^{\cdot -}$ 反应生成低毒性的自由基, 减轻其对组织的损伤; 但高浓度的 NO 则与 $O_2^{\cdot -}$ 结合形成过强氧化物亚硝基阴离子 ($ONOO^-$), 加重对心肌细胞的损伤^[4,8]。NO 合成过程中的关键酶 NOS 具有 3 种亚型, 分别为神经型 NOS (nNOS)、内皮型 NOS (eNOS) 以及 iNOS。生理情况下, 胞质内钙离子浓度升高、钙调蛋白的活化可激活 eNOS, 并按需催化生成、脉冲式释放维持生理活性的低水平的 NO, 介导血管舒张, 抑制血小板聚集和炎性细胞黏附、脂质过氧化等过程; 而病理情况如细胞因子或内毒素刺激下细胞可释放大量 NO, 直接引起细胞毒作用及过氧化反应, 导致组织损伤^[9]。本研究结果显示, 在 IRI 情况下 NO 的生成明显增加, 提示其可能参与心肌细胞毒作用, 而阿托伐他汀处理后 NO 含量下降, 但仍高于正常水平。其机制可能为通过激活 PI3K/ERK/p-Akt 信号通路而提高 eNOS 的活性^[10-11], 而 eNOS 的表达增加可促进 NO 的生成^[11]。目前, 国内外实验研究主要集中在阿托伐他汀上调 eNOS 表达的作用方面, 对 iNOS 的影响及变化作用研究却不多。有学者指出, IRI 过程中心肌组织在 TNF- α 、IL-1 β 及 IFN- γ 等细胞因子的刺激下可上调 iNOS 的表达而促进 NO 大量合成, 进而通过脂质过氧化促进细胞损伤^[12], 但仍有待进一

步证实。本研究结果显示, 在缺血再灌注过程中 NOS 及 iNOS 活性均明显升高, 而阿托伐他汀预处理后两者则明显降低, 提示 NO 的生成并非完全与 eNOS 相关, 与 iNOS 的表达可能也有密切关联, 阿托伐他汀在通过各种信号通路活化 eNOS 的同时亦可下调 iNOS 活性而降低 NO 生成、减轻心肌损伤程度。因此我们推测, 在 IRI 过程中 NOS 的变化与其产生的类型密切相关, 并且 eNOS 与 iNOS 的表达是相互拮抗的; 即在 IRI 时表现为 eNOS 表达的下降和 iNOS 表达的升高, 共同影响并介导血管舒缩和内皮功能的失调。这为进一步研究阿托伐他汀通过调控 NOS 活性及 NO 合成保护 IRI 心肌的机制提供了新的研究理论。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Vaughan C J, Gotto A M Jr, Basson C T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35: 1-10.
- [2] Alber H F, Frick M, Sussenbacher A, Dorler J, Dichtl W, Stocker E M, et al. Effect of atorvastatin on peripheral endothelial function and systemic inflammatory markers in patients with stable coronary artery disease [J]. Wien Med Wochenschr, 2007, 157: 73-78.
- [3] Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis [J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4: 110-115.
- [4] Zhang C H, Wu J X, Xu X B, Potter B J, Gao X. Direct relationship between levels of TNF- α expression and endothelial dysfunction in reperfusion injury [J]. Basic Res Cardiol, 2010, 105: 453-464.
- [5] Bramos D, Ikonomidis I, Tsirikos N, Kottis G, Kostopoulou V, Pamboucas C, et al. The association of coronary flow changes and inflammatory indices to ischaemia-reperfusion microvascular damage and left ventricular remodelling [J]. Basic Res Cardiol, 2008, 103: 345-355.
- [6] 杜坚宗, 董碧蓉. 阿托伐他汀预防大鼠肺缺血再灌注损伤的实验研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2007, 38: 1043-1045.
- [7] Tanner F C, van der Loo B, Shaw S, Greutert H, Bachschmid M M, Berrozpe M, et al. Inactivity of nitric oxide synthase gene in the atherosclerotic human carotid artery [J]. Basic Res Cardiol, 2007, 102: 308-317.
- [8] Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction [J]. Basic Res Cardiol, 2008, 103: 398-406.
- [9] Ying L, Hofseth L J. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer [J]. Cancer Res, 2007, 67: 1407-1410.
- [10] Yang X M, Proctor J B, Cui L, Krieg T, Downey J M, Cohen M V. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways [J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44: 1103-1110.
- [11] Prakash P, Khanna V, Singh V, Jyoti A, Jain M, Keshari R S, et al. Atorvastatin protects against ischemia-reperfusion injury in fructose-induced insulin resistant rats [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2011, 25: 285-297.
- [12] Rainer S, Malte K, Gerd H. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61: 402-413.

[本文编辑] 魏学丽, 邓晓群