

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2006)14-12-1016-04

不同剂量阿托伐他汀干预对兔急性心肌梗死细胞凋亡的影响

夏 勇, 刘 军, 李东野, 陈清枝

(徐州医学院附属医院内科, 江苏省徐州市 221002)

[关键词] 内科学; 阿托伐他汀; 心肌梗死, 急性; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax

[摘要] 目的 探讨不同剂量阿托伐他汀提早干预治疗对兔急性心肌梗死细胞凋亡的影响。方法 24只新西兰兔随机分为3组: 对照组动物不予药物干预; 低剂量组动物按体重给予0.5 mg/(kg·d)阿托伐他汀; 高剂量组动物按体重给予5 mg/(kg·d)阿托伐他汀。药物干预3天后制作急性心肌梗死模型, 检测心肌梗死及其边缘区细胞凋亡率并观察心肌Bax与Bcl-2表达。结果 梗死区及边缘区高剂量组细胞凋亡率明显低于对照组和低剂量组(梗死区为16%±5%比23%±7%和22%±5%, $P < 0.01$; 边缘区为15%±5%比26%±6%和25%±6%, $P < 0.01$)。④梗死区及边缘区高剂量组Bcl-2表达高于对照组及低剂量组(梗死区为60±9比45±7和52±12, $P < 0.01$; 边缘区为61±13比48±9和52±11, $P < 0.05$)。对照组与低剂量组无显著差异; ④三组Bax表达均较高, 组间无显著差异(梗死区为61±9比62±77和67±7, $P > 0.05$; 边缘区为57±6比59±10和60±8, $P > 0.05$)。Pearson线性相关分析梗死区与边缘区心肌细胞凋亡率与相应区域Bcl-2表达呈明显负相关(梗死区 $r = -0.672$, $P < 0.01$; 边缘区 $r = -0.735$, $P < 0.01$)、与Bax表达无明显相关(梗死区 $r = 0.133$, $P = 0.559$; 边缘区 $r = 0.177$, $P = 0.409$)。结论 高剂量阿托伐他汀降低梗死区及其边缘区心肌细胞凋亡率, 可能与Bcl-2表达增加有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect of Early Atorvastatin Therapy on Cardiomyocyte Apoptosis and its Primary Mechanisms in Rabbit's Acute Myocardial Infarction

XIA Yong, LIU Jun, LI Dong-Ye, and CHEN Qing-Zhi

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 210002, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Acute Myocardial Infarction; Apoptosis; Bcl-2; Bax

[ABSTRACT] Aim To investigate the effects of different doses of atorvastatin on cardiomyocyte apoptosis and primary mechanisms in acute myocardial infarction(AMI). Methods Twenty-four New Zealand rabbits were randomly separated into three groups: the control group treated without lipid-lowering drugs, 0.5 mg/(kg·d) and 5 mg/(kg·d) atorvastatin groups with 3 days of treatments. Then, the model of AMI was established by coronary-occluded method, and six hours later, cardiomyocyte apoptotic rate and the expression of Bax and Bcl-2 were detected. Results ①Compared with control and 0.5 mg/(kg·d) atorvastatin groups, the apoptotic rate of infarcted and border zone in 5 mg/(kg·d) atorvastatin group significantly lowered (16%±5% vs 23%±7% and 22%±5%, $P < 0.01$; 15%±5% vs 26%±6% and 25%±6%, $P < 0.01$; respectively). The content of Bax had no changes in every group(61±9 vs 62±77 and 67±7, $P > 0.05$; 57±6 vs 59±10 and 60±8, $P > 0.05$), while that of Bcl-2 was evidently increased in 5 mg/(kg·d) atorvastatin group than the control group and 0.5 mg/(kg·d) atorvastatin group in infarcted and border zone(60±9 vs 45±7 and 52±12, $P < 0.01$; 61±13 vs 48±9 and 52±11, $P < 0.05$). 20. Correlation analysis indicated that there was a negative correlation between the rate of cardiomyocytes apoptosis and Bcl-2 expression ($r = -0.672$, $P < 0.01$; $r = -0.735$, $P < 0.01$), while there were no relation between the apoptotic rate and Bax ($r = 0.133$, $P = 0.559$; $r = 0.177$, $P = 0.409$) by Pearson correlation analysis. Conclusions Early intensive atorvastatin intervention may decrease cardiomyocyte apoptosis. Atorvastatin may be through pro-expression of Bcl-2 to resist apoptosis. Early intensive atorvastatin treatment may yield more significant benefits in AMI.

研究发现, 亲脂性他汀类药物可诱导血管平滑肌细胞凋亡^[1], 但对心肌细胞凋亡影响的文献有限, 且其对培养的心肌细胞有诱导或抑制凋亡两种不同结果的报道^[2,3]。他汀类药物是否影响在体心肌细

胞凋亡更少见报道。3天短程他汀类药物干预可产生抗血栓形成、抗炎和改善血管内皮功能等效应^[4], 但短程他汀类药物干预对急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)心肌细胞凋亡是否有影响尚不清楚, AMI患者早期强化他汀类药物干预更大获益是否与此有联系亦未知。本研究旨在观察不同剂量阿托伐他汀治疗3天对兔AMI模型早期心肌细胞凋亡的影响及初步机制, 探讨AMI早期应用他汀类药物的必要性。

[收稿日期] 2005-10-31 [修回日期] 2006-12-12

[基金项目] 江苏省社会发展基金资助项目(BS2002009)

[作者简介] 夏勇, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为介入心脏病学, E-mail为xiayongphd@yahoo.com.cn。刘军, 硕士研究生。李东野, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师。

1 材料与方法

1.1 药物和主要试剂

阿托伐他汀(商品名“立普妥”)由辉瑞制药有限公司提供。Bax 多克隆抗体、Bcl-2 多克隆抗体试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司。碘化丙啶购自美国 Sigma 公司。

1.2 动物急性心肌梗死模型的建立与分组

健康新西兰家兔均购于徐州医学院实验动物中心,共 24 只,体重 2.4 ± 0.3 kg, 4~6 月龄,雌雄不限。按随机数字表法分为 3 组(每组 8 只): ①对照组体重 2.36 ± 0.44 kg, 不予药物干预; ②低剂量组体重 2.41 ± 0.42 kg, 0.5 mg/(kg·d) 阿托伐他汀灌胃; ③高剂量组体重 2.43 ± 0.40 kg, 5 mg/(kg·d) 阿托伐他汀灌胃。三组动物除药物外均统一喂食相同饲料 3 d 后,即药物干预 3 d 后都以冠状动脉结扎法建立制作 AMI 模型。3% 硫喷妥钠耳缘静脉行全身麻醉,开胸暴露心脏,在左室支上中 1/3 交界处双重结扎,后逐层关胸缝合。6 h 后处死动物。

1.3 检测方法

取梗死区及梗死边缘区各一块标本作流式细胞仪检测。先用眼科剪尽快剪碎组织块,将剪碎组织块用电动匀浆器(美国 Glas-Col 公司)机械分散法将心肌组织制成单细胞悬液,加入 PI 工作液,染色 30 min 送检。经流式细胞仪(美国 BD 公司)检测软件分析后自动计算出细胞凋亡率。免疫组织化学检测梗死区及梗死边缘区心肌 Bax、Bcl-2 表达,在 200 倍镜下用图像分析系统检测 5 个视野的灰度值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件包进行统计。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行正态性及方差齐性检验,正态分布数据组内比较采用 t 检验,组间比较采用单因素方差分析;各因素间相关关系采用 Pearson 线性相关分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡

流式细胞仪检测心肌细胞凋亡的结果见表 1。可见无论是梗死区或梗死边缘区,高阿托伐他汀组心肌细胞凋亡率均显著低于对照组及低阿托伐他汀组($P < 0.01$)。低阿托伐他汀组与对照组无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 免疫组织化学结果

免疫组织化学可见 Bcl-2 表达于心肌细胞胞浆(图 1),不论在梗死区或边缘区,在对照组表达均较

少;高阿托伐他汀组表达高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$;表 2),而低阿托伐他汀组的表达略高于对照组,但没有统计学意义。Bax 亦表达于心肌细胞胞浆(图 2),且不论在梗死区及边缘区,均有较多表达;药物干预组与对照组表达量无明显差异。

表 1. 各组心肌细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

| 分 组 | 梗死区 | 边缘区 |
|------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组 | 23% \pm 7% | 26% \pm 6% |
| 低剂量组 | 22% \pm 5% ^a | 25% \pm 6% ^a |
| 高剂量组 | 16% \pm 5% ^{cd} | 15% \pm 5% ^{cd} |

a 为 $P > 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; f 为 $P < 0.01$, 与低剂量组比较。

表 2. 各组心肌细胞 Bax、Bcl-2 表达结果(灰度值, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

| 分 组 | Bcl-2 | | Bax | |
|------|-------------------------|--------------------------|------------|-------------|
| | 梗死区 | 边缘区 | 梗死区 | 边缘区 |
| 对照组 | 45 \pm 7 | 48 \pm 9 | 67 \pm 7 | 60 \pm 8 |
| 低剂量组 | 52 \pm 12 | 52 \pm 11 | 62 \pm 7 | 59 \pm 10 |
| 高剂量组 | 60 \pm 9 ^c | 61 \pm 13 ^b | 61 \pm 9 | 57 \pm 6 |

b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 相关分析

Pearson 线性相关分析发现梗死区及边缘区细胞凋亡率与相应区域 Bcl-2 表达呈负相关(梗死区 $r = -0.672$, $P < 0.01$; 边缘区 $r = -0.735$, $P < 0.01$); 梗死区与边缘区心肌细胞凋亡率与心肌组织 Bax 表达无明显相关关系(梗死区 $r = 0.133$, $P = 0.559$; 边缘区 $r = 0.177$, $P = 0.409$)。

3 讨论

急性心肌梗死(AMI)的心肌细胞死亡形式包括坏死和凋亡;心肌细胞凋亡不仅导致 AMI 急性期心肌细胞大量丢失、加剧心功能恶化,而且与以后心室重构、心功能衰竭发生有密切关系^[5]。本研究发现,AMI 时心肌细胞存在明显的凋亡现象,而且家兔冠状动脉结扎 6 h 后即有较高的凋亡峰,提示 AMI 早期就发生心肌细胞凋亡,因此及早干预显得必要。

在不同增殖模型中证实,他汀类药物对血管平滑肌细胞增殖有明显抑制作用,且这一作用与血清胆固醇无关^[1]。然而,目前有关他汀类药物对心肌细胞凋亡影响的研究十分有限。Tanaka 等观察到阿托伐他汀能阻断 PKC 抑制剂诱导培养的大鼠心肌

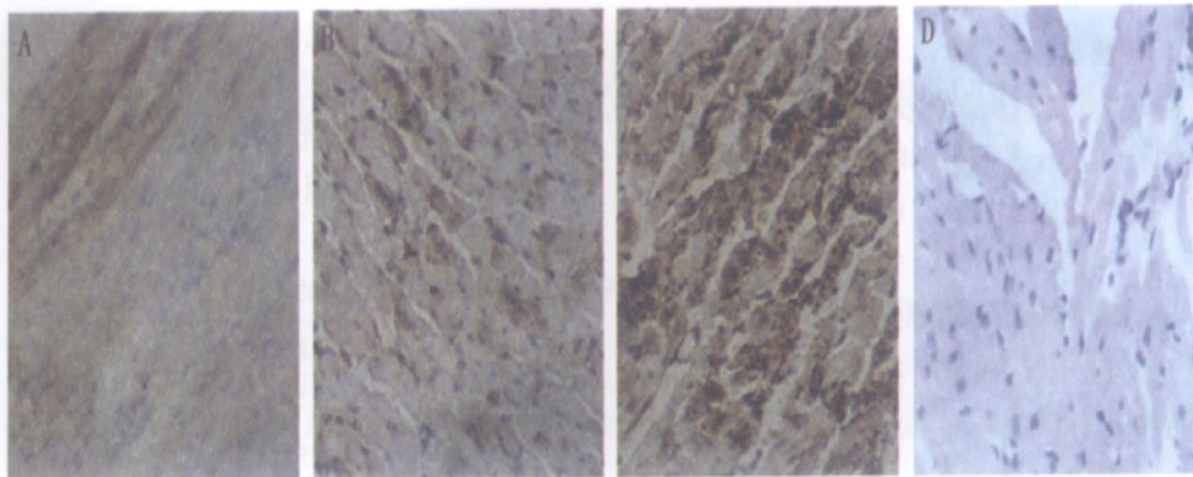


图 1. 心肌中 Bcl-2 表达(×400) A 为对照组, B 为低剂量组, C 为高剂量组, D 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

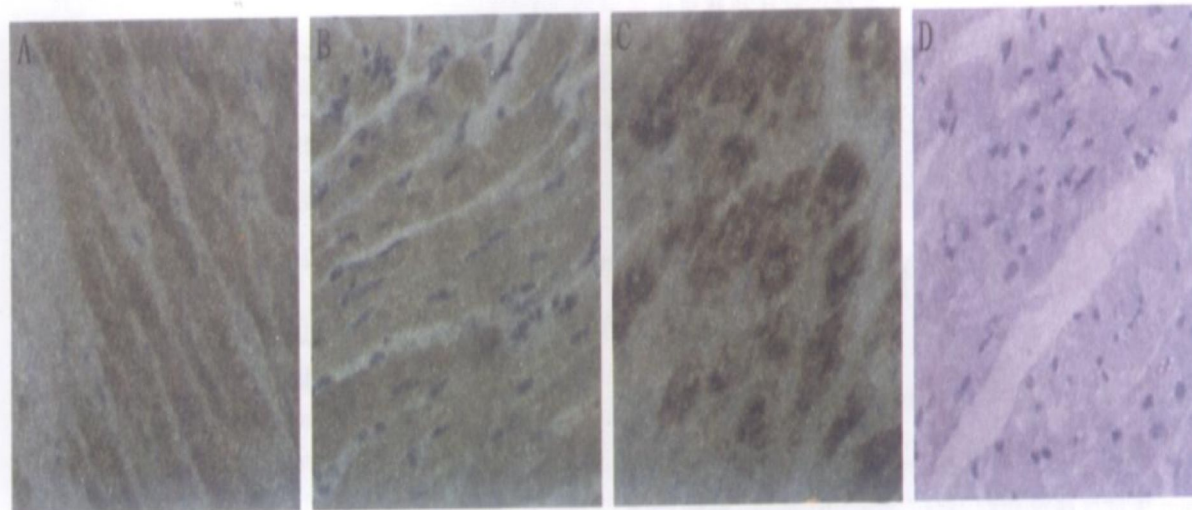


图 2. 心肌组织 Bax 表达(×400) A 为对照组, B 为低剂量组, C 为高剂量组, D 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

细胞凋亡^[2]。Ogata 等^[3]比较氟伐他汀与普伐他汀对培养鼠心肌细胞增殖影响,发现氟伐他汀呈时间及剂量依赖性诱导心肌细胞凋亡,普伐他汀则无此作用。本实验发现,5 mg/(kg·d)阿托伐他汀能减轻梗死区及梗死边缘区心肌细胞凋亡,而 0.5 mg/(kg·d)阿托伐他汀无明显影响。细胞凋亡是由细胞内的凋亡相关基因直接控制,外部因素可通过信号转导通路影响这些基因的表达,从而实现对细胞凋亡的调控。研究表明,与 AMI 时心肌细胞凋亡发生相关的主要基因有 Bcl-2 基因家族(包括 Bax、Bcl-2 等)、Fas 等^[6]。本实验发现不论在梗死区或梗死边缘区,药物干预组较对照组 Bcl-2 表达增高,尤其高剂量组显著增加。Bcl-2 表达增高而心肌细胞凋亡率降低,因此可推测阿托伐他汀可能是通过促进 Bcl-2 表达增高而减少心肌细胞凋亡,但阿托伐他汀通过何种机制促进 Bcl-2 表达有待进一步研究。Bax 表达于细胞浆,不论在药物干预组或对照组的梗死区

或边缘区, Bax 均呈中强表达,提示 Bax 参与了心肌细胞凋亡的发生。但药物干预与 Bax 表达变化无明显相关,提示阿托伐他汀对 Bax 表达无明显影响。

大规模临床试验证实他汀类药物降低冠心病病死率、致残率, PROVE-IT 研究^[7]证实阿托伐他汀强化降脂在 30 d 即可使患者获益,这难以用已存在的动脉粥样硬化斑块消退或预防病程的进展来解释,提示他汀类药物可能存在调脂以外的包括对细胞增殖、氧化过程、炎症、凝血和血管运动活性影响等其他多向性效应。而近来系列研究发现短程他汀类药物干预即有明显调脂外效应。Correia 等^[8]用阿托伐他汀治疗 5d 就产生明显的改善血管内皮功能、降低 CRP 水平抗炎作用。李江等^[9]报道普伐他汀治疗 3d 明显降低 AMI 患者血浆 CD40L、MMP-9、CRP 水平,并独立于降脂作用之外。朱建华等在早期用不同剂量的辛伐他汀治疗急性冠状动脉综合征 3 d,发现大剂量可明显降低 hs-CRP、血浆同型半胱氨酸水

平,改善内皮功能,从而有利于动脉粥样硬化斑块的稳定性^[10]。

本实验通过 3 d 短程高剂量阿托伐他汀干预较明显减少 AMI 心肌细胞凋亡率,支持他汀类药物短程干预即可以获益。但值得注意的是,小剂量阿托伐他汀对心肌细胞凋亡无明显影响,间接提示强化他汀类药物治疗剂量是早期获益的先决条件。这与大规模临床试验 AMI 后早期强化他汀调脂治疗可更大获益趋向相一致。这为 AMI 治疗早期使用他汀类药物强化治疗提供了有力证据。

[参考文献]

- [1] Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan, Z-Q, Hansson, G. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2003, **169** (3): 251-258.
- [2] Tanaka K, Honda M, Takahatake T. Anti-apoptotic effect of atorvastatin, a 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, on cardiac myocytes through protein kinase C activation [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, **31** (4): 360-364.
- [3] Ogata Y, Takahashi M, Takeuchi K, Ueno S, Mano H, Ookawara S, et al. Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: a possible mechanism of statin attenuated cardiac hypertrophy [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, **40** (8): 907-915.
- [4] Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, et al. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients [J]. *Circulation*, 2005, **111** (5): 412-419.
- [5] Baldi A, Abbate A, Bussani R, Giuseppe P, Rosetta M, Anna A. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34** (2): 165-174.
- [6] McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol*, 2004, **286** (11): H 1 923-935.
- [7] Topol EJ. Intensive statin therapy - A sea change in cardiovascular prevention [J]. *N Engl J Med*, 2004, **350** (12): 1 562-564.
- [8] Correia LC, Spruito AC, Lima JC, Magalhães LP, Passos LCS, Argemiro RMS, et al. Anti-inflammatory effect of atorvastatin (80mg) in unstable angina pectoris and non-Q-wave acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiol*, 2003, **92** (3): 298-301.
- [9] 李江, 赵水平, 彭道泉, 许竹梅, 胡敏. 急性心肌梗死早期普伐他汀对血浆 CD40L、金属蛋白酶 9 及 C 反应蛋白的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2003, **31** (3): 165-168.
- [10] 朱建华, 邱立红, 张必祺, 孙坚. 不同剂量辛伐他汀治疗对急性冠状动脉综合征几种炎症因子的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (11): 972-976.

(此文编辑 胡必利)