

## 氟伐他汀对急性心肌梗死大鼠基质金属蛋白酶 9 表达的影响

常 纯<sup>1</sup>, 马 兰<sup>1</sup>, 王旭红<sup>2</sup>

(哈尔滨医科大学 1 附属第二医院老年病科, 2 附属第一医院心内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086)

[关键词] 氟伐他汀; 急性心肌梗死; 心室重构; 基质金属蛋白酶 9

[摘要] 目的 观察氟伐他汀对急性心肌梗死大鼠基质金属蛋白酶 9 表达的影响, 以探讨他汀类药物改善急性心肌梗死后左心室重构的机制。方法 选用雄性 Wistar 大鼠 47 只, 随机分为心肌梗死组、心肌梗死用药组、假手术组和假手术用药组, 结扎大鼠冠状动脉前降支建立心肌梗死模型, 术后心肌梗死用药组及假手术用药组饲喂他汀 10 mg/(kg·d), 心肌梗死组和假手术组不给予任何处理和干预。4 周后测左心室血流动力学参数、左心室重量指数及基质金属蛋白酶 9 含量。结果 术后基质金属蛋白酶 9 含量和左心室舒张末压在假手术组和假手术用药组均较低, 且组间无明显差别 ( $P > 0.05$ ), 在心肌梗死组和心肌梗死用药组均高于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 而在心肌梗死组又高于心肌梗死用药组 ( $P < 0.05$ )。与假手术组比较, 心肌梗死组和心肌梗死用药组大鼠左心室收缩压、左心室压最大上升速率及左心室压最大下降速率均明显下降 ( $P < 0.05$ ), 且心肌梗死组较心肌梗死用药组下降更明显 ( $P < 0.05$ )。各组左心室重量指数无明显差别 ( $P > 0.05$ )。结论 氟伐他汀能抑制基质金属蛋白酶 9 的表达, 从而阻止大鼠心肌梗死后心室重构, 改善心脏功能。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effect of Fluvastatin on Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Rats with Acute Myocardial Infarction

CHANG Chun<sup>1</sup>, MA Lan<sup>1</sup>, and WANG XuHong<sup>2</sup>

(1 Department of Geriatrics, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University; 2 Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086 China)

[KEY WORDS] Fluvastatin; Acute Myocardial Infarction; Ventricular Remodeling; Matrix Metalloproteinase-9

[ABSTRACT] **Aim** To observe the influence of fluvastatin on expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in rats with acute myocardial infarction (AMI) and to investigate the mechanism of statin on improving left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. **Methods** 47 healthy male Wistar rats were randomly divided into AMI group, AMI+ fluvastatin group, the sham-operated group (sham) and the sham-operated+ fluvastatin group. AMI was established by ligation of the anterior descending coronary artery in rats. Fluvastatin was fed to AMI+ fluvastatin group and sham+ fluvastatin group by 10 mg/(kg·d) for 4 weeks while the AMI group and the sham group left untreated. Then the hemodynamic parameters and mass index of left ventricular and the expression of matrix metalloproteinase-9 were detected.

**Results** The expression of matrix metalloproteinase-9 and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) were low in the sham-operated group and the sham-operated+ fluvastatin group, and there were no significant difference ( $P > 0.05$ ). Compared with the sham, the production of matrix metalloproteinase-9 and left ventricular end-diastolic pressure were all increased in the AMI group and AMI+ fluvastatin group ( $P < 0.05$ ), and these indexes were increased significantly in the AMI group than those in the AMI+ fluvastatin group ( $P < 0.05$ ). Compared with the sham-operated group and the sham-operated+ fluvastatin group, left ventricular systolic pressure (LVSP) and the maximal rate of rise and fall ( $\pm dp/dt_{max}$ ) of left ventricular pressure in the AMI group and AMI+ fluvastatin group were all decreased ( $P < 0.05$ ), moreover these indexes decreased significantly in AMI group than those in AMI+ fluvastatin group ( $P < 0.05$ ). The mass index of the left ventricular in each group showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** Fluvastatin can inhibit the expression of matrix metalloproteinase-9 to prevent ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats and improve cardiac function.

[收稿日期] 2008-10-29 [修回日期] 2009-02-01

[基金项目] 黑龙江省攻关课题 (GC04C30106)

[作者简介] 常纯, 硕士研究生, 主要研究方向为老年心血管病防治, E-mail 为 changchun571@163.com。通讯作者马兰, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为老年心血管病防治, E-mail 为 malan571@163.com。王旭红, 硕士研究生, 主要研究方向为冠心病的防治。

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 后左心室重构是临床上常见的进行性发展的病理生理过程, 是反映心肌梗死后心功能的敏感指标, 也是最终决定心肌梗死患者疾病与生命转归的重要因素。急性心肌梗死后的左心室重构是指梗死区的心肌发生扩张、变薄而膨出, 非梗死区心肌反应

性增厚,心肌节段变长,使左心室进行性扩张和左心室功能进行性下降。微观上,心室重构是由于一系列复杂的分子和细胞机制导致的心肌结构、功能和表型的变化,包括心肌细胞肥大、凋亡、胚胎基因和蛋白的再表达、心肌细胞间质合成和降解失衡等<sup>[1]</sup>。近年来研究发现,他汀类药物即羟甲基戊二酰辅酶A抑制剂具有调脂外多重保护作用<sup>[2-7]</sup>,包括改善及逆转心室重构作用<sup>[8-10]</sup>,但其作用机制尚不明确。本研究选用氟伐他汀喂饲心肌梗死大鼠,采用免疫组织化学法测定梗死区及其边缘心肌基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)含量,观察MMP-9在心肌梗死后左心室重构中的变化及其氟伐他汀的干预作用,从而探讨心肌梗死后左心室重构发生的机制,为临床预防和逆转心肌梗死后心室重构提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

MMP-9小鼠抗大鼠单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;氟伐他汀(来适可)由诺华制药有限公司提供。HX-300动物呼吸机;多道生理信号采集处理系统(RM 6240B型);电子天平;OLYMPUS BOX60显微摄像系统;MotiMed 60数码医学图像分析系统。

### 1.2 动物模型的建立及分组

雄性Wistar大鼠47只,体重200~250g由哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供,随机分为心肌梗死组( $n=9$ )、心肌梗死用药组( $n=11$ )、假手术组( $n=13$ )及假手术用药组( $n=14$ )。大鼠急性心肌梗死模型建立方法:用10%水合氯醛( $0.3\text{ mL/kg}$ )麻醉动物后,气管插管连接小动物呼吸机,在左侧第4、5肋间逐层打开胸腔、心包,暴露心脏,用5-0丝线结扎冠状动脉左前降支近端(左心耳和肺动脉圆锥之间,距主动脉根部2~3mm),结扎后局部心室前壁变白,心电图肢体 $\text{II}$ 导联ST段明显抬高,假手术组只穿线不结扎,逐层关闭胸腔。术后心肌梗死用药组和假手术用药组饲氟伐他汀 $[10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$ ,心肌梗死组和假手术组不给予任何处理和干预。观察大鼠饮水量及体重变化而调整药量,术后4周检测各种相关指标。

### 1.3 血流动力学参数测定

10%水合氯醛( $0.3\text{ mL/kg}$ )腹腔麻醉大鼠,正中切开颈部皮肤,钝性分离皮下组织及肌层,右胸锁乳突肌内侧分离右颈总动脉约10mm,将游离的

颈总动脉远端结扎,近端用动脉夹夹闭,靠远心端结扎线处用眼科剪向心方向呈 $45^\circ$ 在颈动脉上剪一“V”形小口(约为管径的 $1/3$ 或 $1/2$ ),用弯形眼科镊挑起血管切口边缘,向心插入与压力换能器连接并充满肝素盐水的PE-50管约2.5cm。用线将血管和插管结扎,去掉动脉夹,打开三通阀。稳定约10min后将导管轻轻送入左心室,同时在计算机屏幕上看到血压波幅突然下降,脉压差明显加大的心室压力波形,经多导生理记录仪测量左心室舒张期末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室压最大上升速率( $+dp/dt_{\max}$ )及左心室压最大下降速率( $-dp/dt_{\max}$ )。

### 1.4 左心室重量指数的测定

4周后大鼠称量体重,测血流动力学参数完毕后处死,取出心脏,用冰生理盐水洗净,滤纸吸干后沿房室环剪去心房及右室,用电子天平称取左心室(包括室间隔)重量,计算左心室重量指数。

### 1.5 组织形态学观察

垂直大鼠心脏长轴做心室短轴切片,厚约3mm,置4%多聚甲醛固定12h后石蜡包埋。切取5 $\mu\text{m}$ 横截切面,苏木精-伊红染色后制成病理切片,显微镜下观察组织形态学变化。

### 1.6 免疫组织化学法检测基质金属蛋白酶9

将包埋的大鼠心肌组织蜡块制成5 $\mu\text{m}$ 厚的切片,按试剂盒说明书进行免疫组织化学染色,阴性对照为用PBS取代一抗。将免疫组织化学切片图像经Olympus BX60显微摄像系统摄像,以200倍视野输入MotiMed 60数码医学图像分析系统(麦克奥迪图像技术有限公司),选择免疫组织化学图像自动分析模块对图像进行分析,每张切片随机选5个视野,测定MMP-9阳性面密度。

### 1.7 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件包进行统计学处理,连续变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多个样本均数比较采用方差分析,多个样本均数间两两比较采用 $q$ 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氟伐他汀对血流动力学的影响

与假手术组和假手术用药组比较,心肌梗死组和心肌梗死用药组大鼠LVSP、 $+dp/dt_{\max}$ 及 $-dp/dt_{\max}$ 均显著下降( $P<0.05$ ),但心肌梗死用药组显著高于心肌梗死组( $P<0.05$ ),而假手术组与假手

术用药组间无明显差别 ( $P > 0.05$ )。心肌梗死组和心肌梗死用药组 LVEDP 显著高于假手术组和假手术用药组 ( $P < 0.05$ ), 但心肌梗死用药组显著低于

心肌梗死组 ( $P < 0.05$ ), 而假手术组与假手术用药组间无明显差别 ( $P > 0.05$  表 1)。

表 1 各组大鼠血流动力学参数比较 (mmHg)

分 组	<i>n</i>	LVSP	LVEDP	+ dp/dt <sub>max</sub>	- dp/dt <sub>max</sub>
假手术组	13	156.50 ± 10.35	23.97 ± 1.28	6190.79 ± 247.70	5448.25 ± 178.82
假手术用药组	14	157.42 ± 10.41	23.48 ± 1.03	6281.75 ± 415.25	5647.66 ± 265.14
心肌梗死组	9	117.85 ± 7.22 <sup>a</sup>	32.08 ± 1.10 <sup>a</sup>	4321.15 ± 430.81 <sup>a</sup>	3608.05 ± 200.39 <sup>a</sup>
心肌梗死用药组	11	142.20 ± 5.64 <sup>ab</sup>	28.99 ± 0.71 <sup>ab</sup>	5487.60 ± 233.08 <sup>ab</sup>	4526.48 ± 338.58 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$  与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$  与心肌梗死组比较。

## 2.2 各组大鼠左心室重量指数的变化

术后 4 周, 四组大鼠体重差异无显著性, 且左心室重量指数也无明显差别 ( $P > 0.05$  表 2)。

表 2 各组大鼠体重、左心室重量及左心室重量指数变化

分 组	<i>n</i>	体重 (g)	左心室 重量 (mg)	左心室重量 指数 (mg/g)
假手术组	13	326.54 ± 14.52	656.42 ± 60.60	2.01 ± 0.13
假手术用药组	14	326.36 ± 15.56	658.33 ± 62.03	2.02 ± 0.17
心肌梗死组	9	322.78 ± 13.68	668.75 ± 63.99	2.07 ± 0.15
心肌梗死用药组	11	332.64 ± 16.26	686.27 ± 64.91	2.06 ± 0.16

## 2.3 组织形态学改变

与假手术组和假手术用药组比较, 心肌梗死组和心肌梗死用药组梗死区心肌细胞数量减少、结构紊乱, 有大量炎性细胞浸润, 间质纤维化显著, 非梗

死区心肌细胞代偿性肥大增殖。与心肌梗死组比较, 心肌梗死用药组心肌细胞变性坏死明显减轻, 炎性细胞浸润减少, 间质纤维化减轻, 非梗死区心肌细胞代偿性肥大增殖较心肌梗死组低。

## 2.4 氟伐他汀对非梗死区基质金属蛋白酶 9 表达的影响

MMP-9 在心肌细胞胞质中被染成棕黄色颗粒。假手术组和假手术用药组均散在表达棕黄色颗粒, 染色较浅; 而心肌梗死组棕黄色颗粒布满胞质, 染色较深, 阳性表达细胞融合成片; 心肌梗死用药组表达阳性细胞数及染色深度介于上述两种表达之间 (图 1)。术后 4 周, 心肌梗死组和心肌梗死用药组非梗死区心肌 MMP-9 含量明显高于假手术组和假手术用药组 ( $P < 0.05$ ), 且心肌梗死用药组显著低于心肌梗死组 ( $P < 0.05$ ), 而假手术组与假手术用药组间无明显差别 ( $P > 0.05$  表 3)。

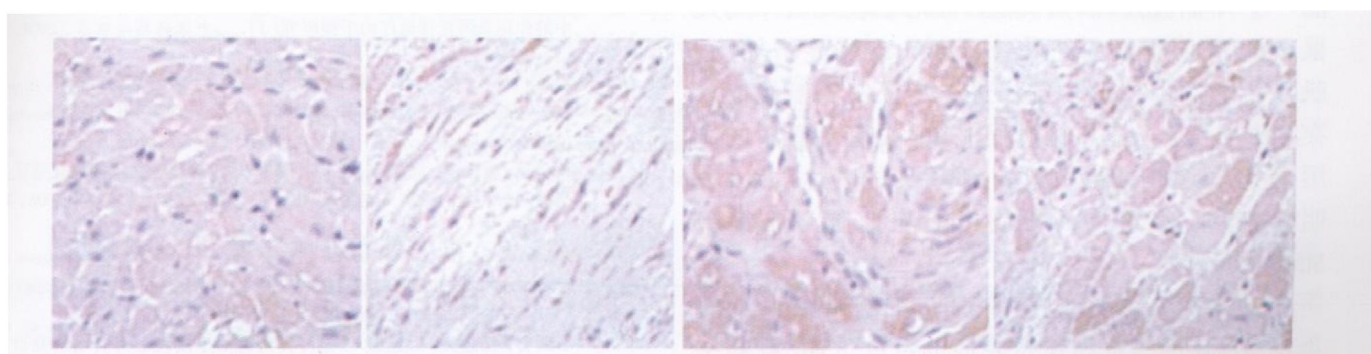


图 1 基质金属蛋白酶 9 在大鼠心肌细胞胞质中的表达 (200 ×) 从左至右分别为假手术组、假手术用药组、心肌梗死组及心肌梗死用药组。

## 3 讨论

急性心肌梗死后心室重构过程曾被归因于心肌细胞的凋亡、坏死、肥大与延展等内在改变, 但目前观点认为细胞外基质合成与降解失衡也起重要的作

用, 即左心室重构包括心肌细胞形态、结构及数量分布的改变, 细胞外基质含量、种类分布的改变以及心肌实质、间质比例失衡和心室形状的变化<sup>[11]</sup>。目前研究认为急性心肌梗死后胶原代谢活跃是心肌梗死后心肌肥厚、心功能下降的主要因素之一。MMP 是

表 3 各组大鼠基质金属蛋白酶 9 面密度

分 组	n	MMP-9 面密度
假手术组	13	0.2155 ± 0.0762
假手术用药组	14	0.2337 ± 0.0672
心肌梗死组	9	0.5758 ± 0.0471 <sup>a</sup>
心肌梗死用药组	11	0.4075 ± 0.0420 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$  与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$  与心肌梗死组比较。

一组存在于心肌间质的锌依赖蛋白酶系, 正常情况下主要以无活性状态存在, 启动后可分解胶原纤维, 改变组织的形态结构, 是降解细胞外基质成分的最主要酶系<sup>[12]</sup>。动物实验表明, MMP 在心肌梗死早期即开始激活, 且在心肌梗死后心室重构期间 MMP-9 活性和表达均显著增高, 从而降解细胞外基质, 解离整联蛋白, 产生修复性的纤维化<sup>[13-14]</sup>。MMP-9 属于 MMP 中的明胶酶, 降解Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原及副纤维蛋白、弹性蛋白等<sup>[15-17]</sup>。本研究发现, 心肌梗死后非梗死区 MMP-9 表达明显增加, LVSP + dp/dmax 及 - dp/dmax 均显著下降, LV-EDP 显著升高, 进一步证实了 MMP-9 参与梗死后心室重构的病理过程<sup>[18]</sup>。

尽管在梗死后早期肥厚可能对降低局部心肌壁应激、维持心输出量和外周灌注有益, 但病理性的肥厚促进梗死相关心室发展成衰竭<sup>[19]</sup>, 而且心肌间质重塑不仅减弱心室舒张功能, 还增加心肌细胞间距离, 妨碍电兴奋传导, 导致心肌梗死后心脏易于发生心律失常。已有研究证实, 他汀类药物能减轻容量及压力负荷, 逆转心肌肥厚、纤维化, 改善心功能<sup>[20]</sup>。本研究发现, 氟伐他汀使心肌梗死后 4 周大鼠 LVEDP 降低, LVSP 及  $\pm dp/dmax$  明显增加, 心肌肥大和心肌纤维化减轻, 进一步证实了氟伐他汀在心肌梗死后心室重构过程中和心功能改善中的作用, 且氟伐他汀可明显减少 MMP-9 的表达水平, 表明它逆转心室重构的机制可能与抑制心肌细胞 MMP 激活有关。

综上所述, 氟伐他汀可能通过抑制 MMP-9 而减少胶原网络的分解破坏及胶原的过度沉积, 有利于预防和逆转心室重构, 保护心脏结构及功能, 相对延缓心力衰竭的发生<sup>[21]</sup>。本研究使我们对氟伐他汀的非调血脂性作用的机制有了进一步的认识, 将为他汀类药物的临床应用提供更为广阔的前景。

## [参考文献]

- [1] 张 荷, 沈璐华, 庄海舟, 等. 辛伐他汀对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌氧化负荷和心室重构的影响 [J]. 心脏杂志, 2008, 20 (3): 284-290
- [2] 刘时武, 丁世芳. 他汀类药物的非调脂作用 [J]. 华南国防医学杂志, 2008, 22 (2): 63-65
- [3] 刘英明, 费宇行, 杨 晔. 他汀类药物在慢性心力衰竭中的应用前景 [J]. 心血管康复医学杂志, 2008, 17 (1): 86-89
- [4] 许富康, 郭航远, 邢杨波. 他汀类药物治疗扩张型心肌病心力衰竭的临床依据和可能机制的研究进展 [J]. 中国全科医学, 2008, 11 (2B): 320-322
- [5] 李妮妮, 张玉东. 他汀类药物在慢性心力衰竭患者中的应用现状 [J]. 中国心血管病研究, 2008, 6 (5): 394-396
- [6] Pasquale S, Sally MK. Do statins reduce blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials [J]. *Hypertension*, 2007, 49 (4): 792-798
- [7] Link A, Ayadhi T, Bohm M, et al. Rapid immunomodulation by rosuvastatin in patients with acute coronary syndrome [J]. *Eur Heart J*, 2006, 27 (24): 2945-2955
- [8] 张国天, 秦志平, 刘宗芳. 阿托伐他汀对心肌梗死大鼠心室重构的影响 [J]. 实用诊断与治疗杂志, 2007, 1 (21): 37-39
- [9] 安丽萍, 傅世英, 吴 双. 阿托伐他汀对慢性心力衰竭大鼠左心室重构和功能的影响及可能的机制 [J]. 中国地方病学杂志, 2006, 2 (25): 156-159
- [10] 谭安雄, 李金成, 粟顺善, 等. 阿托伐他汀改善自发性高血压大鼠心室重构的机制 [J]. 中华高血压杂志, 2007, 15 (6): 497-500
- [11] Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83 (2): 456-460
- [12] 郭文安, 杜心清. 基质金属蛋白酶及其抑制物表达平衡失调与心肌梗塞后心室重塑 [J]. 心血管康复医学杂志, 2007, 3 (16): 302-305
- [13] Higo S, Uematsu M, Yamagishi M, et al. Elevation of plasma matrix metalloproteinase-9 in the culprit coronary artery in patients with acute myocardial infarction: Clinical evidence from distal protection [J]. *Circ J*, 2005, 69 (10): 1180-1185
- [14] 王 琦, 柳 兢, 妖凤臣. 替米沙坦对心肌梗死大鼠心室重构基质金属蛋白酶表达水平的影响 [J]. 山西医药杂志, 2007, 36 (3): 406-409
- [15] 张美燕, 郑 兴. 基质金属蛋白酶-9 在心血管疾病中的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2007, 1 (28): 88-91
- [16] 李 征, 李茹香, 武新民, 等. MMP-9 与 TGF- $\beta$ 1 在高血压血管重构中的作用及阿托伐他汀的干预研究 [J]. 中国药物与临床, 2008, 8 (2): 113-115
- [17] Zhang GG, Zhang SD. Effect of simvastatin on cardiac fibrosis in patients with essential hypertension [J]. *Journal of Central South University (Medical Sciences)*, 2005, 30 (3): 280-282
- [18] 章义利, 戴凌燕, 周秀云, 等. 阿托伐他汀对鼠动脉粥样硬化基质金属蛋白酶和蛋白激酶 C 的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (1): 29-32
- [19] Hosokawa S, Hiasa Y, Tomokane T, et al. The effects of atorvastatin on coronary endothelial function in patients with recent myocardial infarction [J]. *Clin Cardiol*, 2006, 29 (8): 257-262
- [20] 丁跃有, 任建英, 顾逸敏. 他汀类药物治疗慢性心力衰竭研究进展 [J]. 中国循环杂志, 2006, 3 (21): 237-239
- [21] Folkeringa RJ, Van Kraaij DJ. Statins associated with reduced mortality in patients admitted for congestive heart failure [J]. *J Card Fail*, 2006, 12 (2): 134-138

(此文编辑 文玉珊)