

[文章编号] 1007-3949(2009)17-11-0907-05

• 实验研究 •

瑞舒伐他汀对大鼠冠状动脉微栓塞后心肌局部炎症反应及左心室功能的影响

傅发源, 张飞龙, 陈良龙

(福建医科大学附属协和医院内科, 福建省福州市 350001)

[关键词] 瑞舒伐他汀; 冠状动脉微栓塞; 炎症反应; 左心室功能

[摘要] 目的 探讨围手术期瑞舒伐他汀干预对冠状动脉微栓塞后心肌局部炎症反应及左心室功能的影响。方法 雄性 SD 大鼠 48 只, 随机分为对照组、微栓塞组、瑞舒伐他汀低剂量组 [0.5 mg/(kg·d)] 和高剂量组 [3.0 mg/(kg·d)], 每组分为术后 3 天、28 天两个观察时间点, 每时间点 6 只, 瑞舒伐他汀干预的时间从术前 7 天到术后 7 天。术后 3 天, 检测炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 10 的表达, 观察心肌组织病理变化; 术后 28 天, 检测心肌组织胶原纤维含量的变化, 观察左心室功能改变。结果 与微栓塞组比较, 瑞舒伐他汀高剂量组能明显抑制心肌细胞肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 表达, 增加白细胞介素 10 表达; 同时减少心肌组织微梗死灶数量, 减轻炎症细胞浸润, 减少心肌胶原纤维增生, 并改善左心室功能。而低剂量组则不能。结论 围手术期高剂量瑞舒伐他汀干预能抑制大鼠冠状动脉微栓塞后心肌局部炎症反应, 减轻心脏重塑, 并改善左心室功能。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Rosuvastatin on Myocardial Inflammation and Left Ventricular Dysfunction After Coronary Microembolization in Rats

FU Fa-Yuan, ZHANG Fei-Long and CHEN Liang-Long

(Department of Cardiology, the Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China)

[KEY WORDS] Rosuvastatin; Coronary Microembolization; Inflammation; Left Ventricular Function

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect of rosuvastatin on myocardial inflammation and left ventricular dysfunction after coronary microembolization (CME). **Methods** 48 male SD rats were randomized into control group, CME group, low-dose rosuvastatin group [0.5 mg/(kg·d)] and high-dose rosuvastatin group [3.0 mg/(kg·d)] respectively. Rosuvastatin was fed from pre- to post-CME for two weeks. At 3 days post-CME, the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-10 (IL-10) in myocardium was assayed by ELISA, immunostaining and pathological changes were detected by HE staining. At 28 day post-CME, collagen deposition was detected by Masson staining and cardiac function was assessed by echocardiography. **Results** The levels of TNF- α and IL-1 β were lower and IL-10 was higher in high-dose rosuvastatin group compared with CME group. High-dose but not low-dose rosuvastatin also reduced inflammatory cell infiltration and collagen deposition in infarct zone, decreased LVEDD, LVESD and increased LVEF, LVFS. **Conclusion** In rats with CME, perioperative therapy with high-dose rosuvastatin prevents cardiac remodeling and dysfunction. This benefit may be partly derived from reducing myocardial inflammation.

冠状动脉微栓塞是急性冠状动脉综合征及冠状动脉介入治疗中常见的临床事件, 资料显示, 冠状动脉介入术后梗死相关动脉开通且 TIMI 血流达 3 级的患者中, 仍有 30% ~ 50% 心肌组织水平的血供并未完全恢复^[1]。自发性或治疗性斑块破裂的同时, 常有富含血小板、脂质结晶的微小斑块脱落, 阻塞心肌血管床, 伴随心肌局部明显的炎症反应, 导致

大量心肌细胞丢失, 引发心脏重塑, 心功能受损, 造成患者不良的预后和更高的死亡率^[2], 目前还没有理想的治疗方法。冠状动脉微栓塞后灶性坏死心肌局部的炎症反应是导致心功能下降的主要原因^[3], 寻找抑制心肌局部炎症反应的有效方法成为防止心肌重塑的一种途径。近年来许多大规模的临床实验证实, 他汀类药物除了降脂的功效, 还有独立于降脂之外抑制组织炎症反应的益处^[4]。询证医学表明, 围手术期负荷量他汀干预能使得接受经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous transluminal coronary intervention, PCI) 的患者获益^[5,6], 而他汀是否能有效的抑制冠状动脉微栓塞后心肌局部的炎症反应, 改善心功能却未有报道。本实验室通过注射自体微血栓

[收稿日期] 2009-09-15 [修回日期] 2009-11-05

[基金项目] 福建省卫生厅青年基金课题 (2004-1-17)

[作者简介] 傅发源, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为冠状动脉微栓塞的诊治, Email 为 fufayuan@hotmail.com。张飞龙, 博士, 主治医师, 主要从事冠状动脉微栓塞的基础研究。通讯作者陈良龙, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的诊断与治疗, Email 为 lianglongcher@126.com。

的方法,已经建立了大鼠冠状动脉微栓塞模型^[7,8],在此基础上,探讨瑞舒伐他汀干预对冠状动脉微栓塞后心肌局部炎症反应及心功能的影响,为临床应用他汀治疗冠状动脉微栓塞提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

瑞舒伐他汀(阿斯利康公司),羊抗大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)抗体、羊抗大鼠白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)抗体、羊抗大鼠白细胞介素 10 (interleukin- 10 , IL- 10)抗体(R & D公司),IL- 1β 、IL- 10 、TNF- α ELISA检测试剂盒(R & D公司),即用型免疫组织化学超敏SP试剂盒、DAB、AEC显色剂、Masson试剂盒(福州迈新公司),TKR-20℃小动物呼吸机(江西省特力麻醉呼吸设备公司),GE SYSTEM (b)超声心动图仪及5 MHz多平面经食道超声探头(美国GE公司),MAGE PRO 4.0显微镜结合计算机显微图像分析系统(日本Olympus公司)。

1.2 实验动物及分组

清洁级健康雄性SD大鼠48只,体重230~250 g由福建医科大学实验动物中心提供,实验动物及实验步骤符合国家实验动物管理条例。实验动物随机分为对照组、微栓塞组、瑞舒伐他汀小剂量组[0.5 mg/(kg·d)]和瑞舒伐他汀大剂量组[3.0 mg/(kg·d)],每组12只,每组分为术后3天、28天两个观察时间点,每时间点6只。

1.3 模型复制及给药

本实验室利用自体微血栓已成功构建稳定、重复性好的大鼠冠状动脉微栓塞模型^[7],具体步骤如下:冠状动脉微栓塞组大鼠术前36 h以10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉后,股静脉取血1 mL,于37℃温箱内形成血凝块,匀浆器研碎血凝块后用38 μ m筛孔过筛,显微镜下8~38 μ m微血栓累计约(3~3.8) $\times 10^{12}$ 个/g术前制成微血栓混悬液备用。次日手术区消毒,以10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉,气管插管,呼吸机辅助呼吸,沿心脏长轴开胸暴露心脏,分离主动脉,以微量注射器从前降支中段偏下方约1 mm处垂直刺入左心室腔,夹闭主动脉根部同时自左心室腔内注入自体微血栓混悬液0.3 mL(含微血栓颗粒5 mg),约5 s后松开血管夹,局部止血,逐层关胸后使动物复苏。对照组左室腔注入0.3 mL PBS,术后腹腔注射40万单位青霉素 $\times 3$ 天抗感染。瑞舒伐他汀小剂量组术前7

天起灌胃给予瑞舒伐他汀0.5 mg/kg(生理盐水溶解),每天一次,持续至术后7天;瑞舒伐他汀大剂量组则给予3.0 mg/kg,余同小剂量组;对照组及微栓塞组给予等量生理盐水灌胃。于各观察时间点超声检测及留取血液标本保存后处死大鼠,将心脏分为乳头肌水平段及心尖部二部分,行常规石蜡包埋保存。

1.4 ELISA法检测血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 10 的浓度

术后3天,各组大鼠血液标本,以1 kr/min离心20 min,分离血清,置-80℃冰箱中备用。按说明书制作标准曲线,采用ELISA法检测血清TNF- α 、IL- 1β 、IL- 10 的浓度。

1.5 免疫组织化学染色检测心肌组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 10 蛋白的表达

术后3天,上述大鼠石蜡切片常规脱蜡至水,微波抗原修复(柠檬酸缓冲液, pH = 6.0),1% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶10 min,并根据SP免疫组化试剂盒说明书依次加入羊抗大鼠TNF- α 抗体、羊抗大鼠IL- 1β 抗体、羊抗大鼠IL- 10 抗体(1:100稀释),4℃孵育过夜,AEC或DAB显色,苏木素复染,Cleamount封片后显微镜下400倍视野下观察。步骤中不加一抗代以PBS者作为阴性对照。结果判定:胞浆内出现红色颗粒(AEC显色)的细胞为TNF- α 、IL- 1β 阳性表达;胞浆内出现棕褐色颗粒(DAB显色)的细胞为IL- 10 阳性表达。

1.6 HE染色观察心肌病理学变化

术后3天,上述大鼠石蜡切片HE染色,显微镜200倍视野下观察大鼠心肌病理学改变。

1.7 心肌组织胶原纤维含量的变化

术后28天,石蜡切片,常规脱蜡至水,Masson复合染色液染色5 min,0.25%醋酸水溶液稍洗,5%磷钨酸染色5~10 min,0.25%醋酸水溶液浸洗2次,苯胺蓝染色液染色5 min,0.25%醋酸水洗2次,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固后显微镜400倍视野下观察。结果判定:胶原纤维呈蓝色,心肌细胞呈红色。

1.8 超声心动图仪检测左心室功能

术后28天,动物予腹腔注射复合麻醉后,剔除胸部体毛,取仰卧位,应用超声心动图仪及5 MHz多平面经食道超声探头进行体表经胸M型及二维超声心动图检查,二维超声扫描角度为15~20°、深度为2~3 cm,以使帧数至少达到200 Hz,调整多平面经食道超声探头声束方向,取得腱索水平左心室短轴切面图像,应用M型超声心动图连续测量3

个不同心动周期左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic dimension, LVESD)、舒张末期内径 (left ventricular end-diastole dimension, LVEDD)、左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 及左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening LVFS), 取平均值。

1.9 统计学分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 10 的浓度变化

与对照组比较, 微栓塞组 TNF- α 、IL- 1β 浓度均明显升高 ($P < 0.05$); 与微栓塞组比较, 瑞舒伐他汀低剂量组血清 TNF- α 、IL- 1β 浓度未见明显降低 ($P > 0.05$), 但高剂量组则下降明显 ($P < 0.05$ 表 1)。与对照组比较, 微栓塞组血清 IL-10 浓度差异无显著性 ($P > 0.05$); 与微栓塞组比较, 瑞舒伐他汀低剂量组血清 IL-10 浓度未见明显增加 ($P > 0.05$), 高剂量组 IL-10 浓度升高明显 ($P < 0.05$ 表 1)。

表 1. 冠状动脉微栓塞后血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 10 的浓度变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	TNF- α	IL- 1β	IL-10
对照组	2.25 \pm 0.45	6.14 \pm 1.70	4.25 \pm 0.71
微栓塞组	17.61 \pm 0.72 ^a	71.22 \pm 6.97 ^a	4.59 \pm 0.65
瑞舒伐他汀低剂量组	16.91 \pm 0.69	60.62 \pm 4.06	4.50 \pm 0.82
瑞舒伐他汀高剂量组	10.44 \pm 0.63 ^b	33.44 \pm 2.45 ^b	30.67 \pm 2.71 ^b

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与微栓塞组比较。

2.2 心肌组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素 10 蛋白表达

免疫组织化学染色显示, 对照组心肌细胞弱或无表达 TNF- α 、IL- 1β ; 微栓塞组在微梗灶内残留的和周边区缺血的心肌细胞出现强表达, 在部分非微梗区心肌细胞也出现少量阳性表达; 与微栓塞组比较, 瑞舒伐他汀低剂量组 TNF- α 、IL- 1β 蛋白的表达未见减弱, 但高剂量组二者的表达均有不同程度减轻。对照组心肌细胞 IL-10 弱或无表达, 微栓塞组 IL-10 表达未见增加; 与微栓塞组比较, 瑞舒伐他汀低剂量组 IL-10 蛋白的表达未见增强, 高剂量组的表达则明显增加 (图 1)。

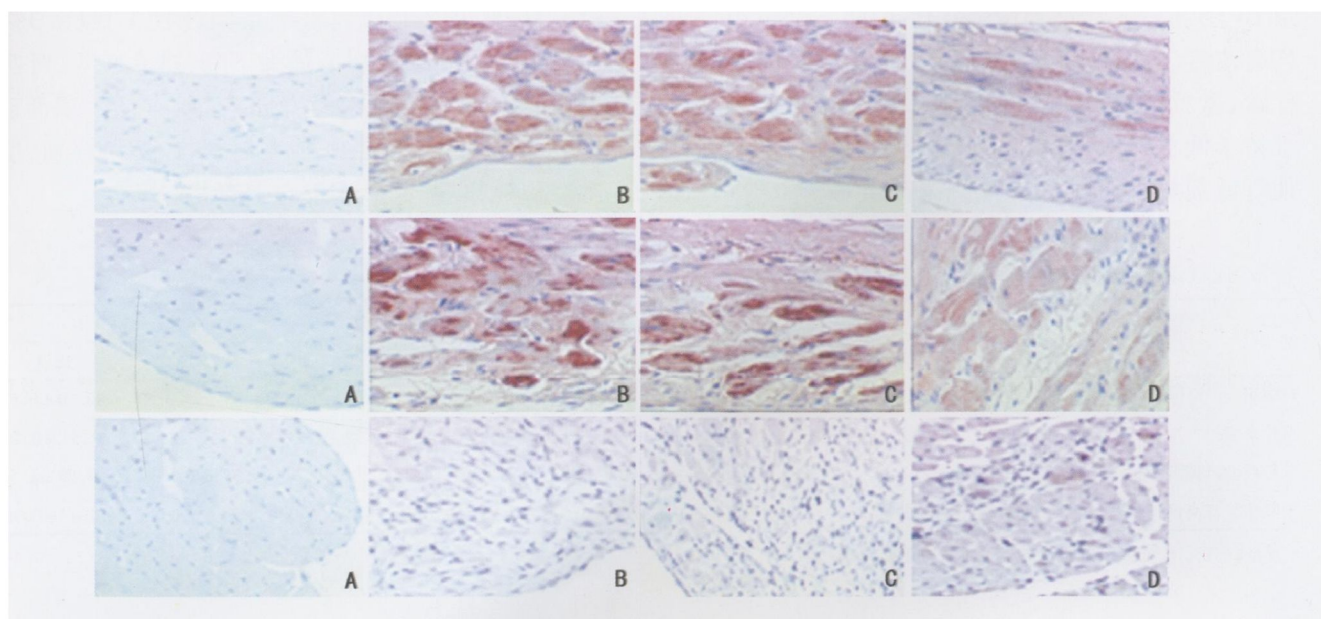


图 1. 术后 3 天心肌组织肿瘤坏死因子 α (上图)、白细胞介素 1β (中图)、白细胞介素 10 (下图) 蛋白表达 ($\times 400$) A 为对照组, B 为微栓塞组, C 为瑞舒伐他汀低剂量组, D 为瑞舒伐他汀高剂量组。

2.3 心肌组织病理学变化

术后 3 天对照组心肌细胞排列整齐、间质无水肿, 无心肌细胞坏死; 微栓塞组心肌内点状分布的坏

死灶形成, 多位于心内膜下, 周围炎症细胞浸润明显增多; 瑞舒伐他汀低剂量组心肌组织病理变化与微栓塞组相似, 而高剂量组心肌组织微梗死灶数量减

少, 梗死范围减小, 炎症细胞浸润明显减轻(图 2)。

2 4 心肌组织胶原纤维含量的变化

术后 28天对照组组心肌组织间隙可见极少量胶原纤维作为心肌纤维附着骨架; 微栓塞组梗死区

内大量胶原纤维增生, 其间可见极少残存心肌细胞, 呈灶性分布于心内膜区; 瑞舒伐他汀低剂量组胶原纤维增生情况基本与微栓塞组相似, 而高剂量组则明显较少(图 2)。

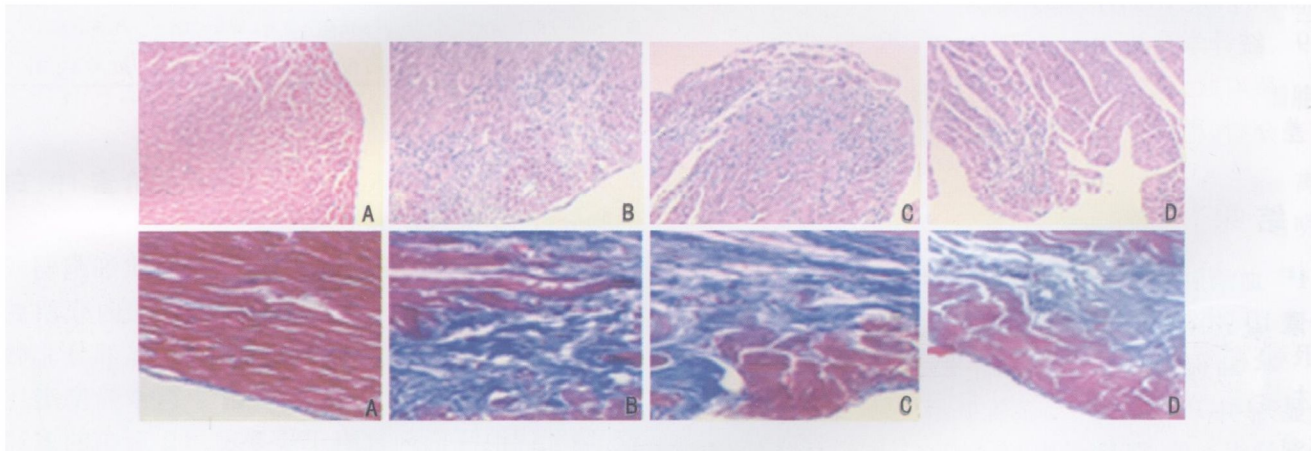


图 2 术后 3天心肌组织病理学改变(上图, ×200)及术后 28天心肌组织胶原纤维含量的变化(下图, ×400) A为对照组, B为微栓塞组, C为瑞舒伐他汀低剂量组, D为瑞舒伐他汀高剂量组。

2 5 心脏的重塑

术后 3天与对照组比较, 微栓塞组 LVEDD无明显增大 ($P > 0.05$), 而 LVESD 增加, LVFS、LVEF 降低 ($P < 0.05$); 与微栓塞组比较, 瑞舒伐他汀低剂量组 LVFS、LVEF 无增加 ($P > 0.05$), 而高剂量组二者均有改善 ($P < 0.05$)。术后 28天与同时期对照组比较, 微栓塞组 LVEDD、LVESD 增大, LVFS、LVEF 维持于低水平 ($P < 0.05$); 与微栓塞组比较, 瑞舒伐他汀低剂量组上述各指标仍未改善 ($P > 0.05$), 而

高剂量组 LVEDD、LVESD 缩小 ($P < 0.05$), LVFS、LVEF 增加 ($P < 0.05$; 表 2)。

2 6 大鼠存活情况

对照组 12只大鼠全部存活; 微栓塞组死亡 2只 (16.7%), 瑞舒伐他汀低剂量组死亡 1只 (8.3%), 两组存活大鼠均出现活动力下降, 进食减少, 呼吸困难; 瑞舒伐他汀高剂量组全部存活, 存活大鼠活动力有所增强, 食欲增加; 死亡大鼠尸检, 双肺淤血、胸腔血性积液, 表明可能死于心力衰竭。

表 2 冠状动脉微栓塞后超声心功能指标改变 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	LVEDD(mm)		LVESD(mm)		LVFS(%)		LVEF(%)	
	3天	28天	3天	28天	3天	28天	3天	28天
对照组	52.17 ± 0.15	52.19 ± 0.14	27.33 ± 0.11	27.00 ± 0.15	47.59 ± 0.11	48.23 ± 0.12	85.56 ± 0.59	86.10 ± 0.52
微栓塞组	52.25 ± 0.10	60.83 ± 0.12 ^a	39.67 ± 0.20 ^a	44.17 ± 0.38 ^a	24.43 ± 0.07 ^a	27.37 ± 0.25 ^a	56.72 ± 0.49 ^a	62.51 ± 0.14 ^a
瑞舒伐他汀低剂量组	52.23 ± 0.18	60.67 ± 0.15	40.17 ± 0.13	43.67 ± 0.43	23.21 ± 0.86	27.98 ± 0.32	54.62 ± 0.22	63.29 ± 0.58
瑞舒伐他汀高剂量组	52.23 ± 0.07	57.83 ± 0.75 ^b	35.67 ± 0.18 ^b	38.66 ± 0.16 ^b	31.83 ± 0.76 ^b	33.14 ± 0.30 ^b	68.26 ± 0.20 ^b	70.07 ± 0.78 ^b

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与微栓塞组比较。

3 讨论

冠状动脉粥样斑块破裂是急性冠状动脉综合征及冠状动脉介入治疗过程中的关键事件, 冠状动脉主枝的开通并不意味着心肌组织水平血供的恢复, 冠状动脉微栓塞的发生意味着患者不良的预后和更高的死亡率。因此, 如何减少冠状动脉微栓塞的发生, 改善心脏收缩功能, 降低死亡率具有重要的临床意义。

研究发现, 心外膜血管狭窄引起的心室收缩功能下降与血管狭窄引起的缺血范围是相匹配的^[9], 而微栓塞引起的收缩功能降低与冠状动脉灌注并不匹配, 是一种灌注收缩不匹配^[10]。炎症反应可能是心功能受损的关键因素。近年来研究发现, 他汀类药物除了降脂外, 还有独立于降脂之外抑制组织炎症反应的益处^[11]。ARMYDA-1 研究显示, 术前服用 7 天的阿托伐他汀能显著减少 PCI 术后心肌的损

伤,降低术后心肌梗死的发生率,并证实这种保护作用与降低术后炎症因子细胞间黏附因子-1(ICAM-1)和E选择素水平有关^[5]。ARMYDA-3研究表明,术前服用7天的阿托伐他汀能显著减少心脏手术的患者术后发生房颤的风险,进一步分析显示术后的房颤发生率与阿托伐他汀降低血浆C反应蛋白(CRP)水平密切相关。此外,已有许多研究证实长期服用他汀类药物能有效的降低血浆炎症因子的含量,进而改善心衰患者的心功能^[12]。但他汀在冠状动脉微栓塞领域的应用却未见报道。与其他他汀药物比较,瑞舒伐他汀具有更强效应及更好的安全性和耐受性。由于冠状动脉微栓塞后炎症高峰期通常是在1周内时间,因此我们设想将瑞舒伐他汀干预的时间从术前7天持续至术后7天,以使整个围手术期间都能保证它充分的起效,达到抑制炎症的目的。本研究的结果显示,冠状动脉微栓塞发生后,高剂量(3 mg/kg)的瑞舒伐他汀而非低剂量(0.5 mg/kg)能下调急性期促炎因子TNF- α 、IL-1 β 的表达,上调抑炎因子IL-10的表达,减少微梗死灶周边炎症细胞的浸润,减轻心肌局部炎症反应。

进一步的研究发现,低剂量(0.5 mg/kg)瑞舒伐他汀围手术期的干预对减轻大鼠冠状动脉微栓塞后心脏重塑,改善心功能无效;而高剂量(3 mg/kg)瑞舒伐他汀的干预能明显减轻心脏重塑,增强心肌收缩能力,大鼠心功能的改善与其能抑制冠状动脉微栓塞后心肌局部炎症反应的趋势是一致的,提示高剂量(3 mg/kg)瑞舒伐他汀能通过有效的抑制冠状动脉微栓塞后心肌局部的炎症反应,进而改善左心室的收缩功能。因此,瑞舒伐他汀可能是治疗冠状动脉微栓塞的一种有效的选择,当然距离临床的

应用仍需要进一步循证医学的证据。

[参考文献]

- [1] Gibson CM, Pride YB, Buros JL, et al. Relation of hyperemic epicardial flow to outcomes among patients with ST-segment elevation myocardial infarction receiving fibrinolytic therapy [J]. *Am J Cardiol* 2008; **101** (9): 1232-238
- [2] Lee KW, Norell MS. Management of no-reflow complicating reperfusion therapy [J]. *Acute Card Care* 2008; **10** (1): 5-14
- [3] Arras M, Strasser R, Mohri M, et al. Tumor necrosis factor- α is expressed by monocytes/macrophages following cardiac microembolization and is antagonized by cyclosporine [J]. *Basic Res Cardiol* 1998; **93** (2): 97-107
- [4] Liao JK. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol [J]. *Am J Cardiol* 2005; **96** (5): 24-33
- [5] Mood GR, Bavy AA, Roukoz H, et al. Meta-analysis of the role of statin therapy in reducing myocardial infarction following elective percutaneous coronary intervention [J]. *Am J Cardiol* 2007; **100** (6): 919-923
- [6] Shroff GR, Orlandi Q. Letter by Shroff and Orlandi regarding article "Randomized trial of atorvastatin for reduction of postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery: results of the ARMYDA-3 (Atorvastatin for Reduction of Myocardial Dysrhythmia After Cardiac Surgery) study" [J]. *Circulation* 2006; **114** (14): 1455-461
- [7] 李淑梅,孙旭东,孙伏清,等. 大鼠冠状动脉微栓塞后细胞间黏附分子1在心肌中的表达及意义 [J]. *中华老年医学杂志*, 2007, **26** (4): 285-288
- [8] 傅发源,李淑梅,陈良龙,等. 通心络对大鼠冠状动脉微栓塞后心肌间质重塑及左心室功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (11): 861-864
- [9] Ross Jr. Myocardial perfusion contraction matching [J]. *Circulation*, 1991; **83** (3): 1076-083
- [10] Dorge H, Neumann T, Behrends M, et al. Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction: role of inflammation [J]. *Am J Physiol Heart Circ* 2000; **279** (6): 2587-592
- [11] 谷文萍,肖慧,李伟,等. 阿托伐他汀钙对实验性脑缺血再灌注后炎症反应的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (1): 40-42
- [12] Suzuki G, Iyer V, Cinato T, et al. Pravastatin improves function in hibernating myocardium by mobilizing CD133⁺ and cKit⁺ bone marrow progenitor cells and promoting myocytes to reenter the growth phase of the cardiac cell cycle [J]. *Circ Res* 2009; **104** (2): 255-264

(此文编辑 李玲玲)