

阿托伐他汀后处理对 GK 大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

程振东^{1,2}, 吴灵振^{1,2}, 郭进建^{1,2,3}, 赵子文^{1,2}, 祝雪丽³, 蔡平^{1,2}, 陈良龙^{1,2}

(1. 福建医科大学协和临床医学院心血管内科, 2. 福建省冠心病研究所, 3. 福建省人民医院心血管内科, 福建省福州市 350001)

[关键词] 阿托伐他汀; 心肌; 缺血再灌注损伤; 2 型糖尿病

[摘要] **目的** 探讨不同剂量阿托伐他汀后处理对 GK 大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制。**方法** 将 70 只 GK 大鼠随机分为 7 组($n=10$ 只): 假手术组、缺血再灌注组(I/R 组)、不同剂量(0.1、0.5、1 及 2 mg/kg)阿托伐他汀后处理组及阿托伐他汀后处理 + LY294002 组。TTC 染色测定心肌梗死面积, 电镜观察心肌细胞超微结构变化及 Western blot 测定心肌组织磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、总 Akt(t-Akt)的蛋白表达。**结果** 阿托伐他汀后处理组心肌梗死面积低于 I/R 组, 心肌线粒体超微结构损伤轻于 I/R 组, Akt 磷酸化水平高于 I/R 组, 其中 1 mg/kg 和 2 mg/kg 阿托伐他汀后处理组较显著。PI3K 特异性抑制剂 LY294002 可消除这种作用。**结论** 阿托伐他汀后处理对 GK 大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用, 这可能与 PI3K/Akt 通路的激活有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effect of Atorvastatin Postconditioning on Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in GK Rat

CHENG Zhen-Dong^{1,2}, WU Lin-Zhen^{1,2}, GUO Jin-Jian^{1,2,3}, ZHAO Zi-Wen^{1,2}, ZHU Xue-Li³, CAI Ping^{1,2}, and CHEN Liang-Long^{1,2}

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China; 2. Institute of Coronary Heart Disease of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350001, China; 3. Department of Cardiology, Fujian People's Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Myocardium; Ischemia-reperfusion Injury; Type 2 Diabetes

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of different dosage of atorvastatin postconditioning and its mechanisms on myocardial ischemia-reperfusion injury in GK rat. **Methods** Seventy GK rats were randomly divided into seven groups ($n=10$ each): sham group, ischemia-reperfusion injury (I/R) group, different dosage of atorvastatin (0.1, 0.5, 1 and 2 mg/kg) postconditioning group, atorvastatin + LY294002. Myocardial infarct size (IS), ultrastructural change and myocardial expression of phosphorylated Akt/totalAkt were determined. **Results** Myocardial infarct size and ultrastructural damages were all reduced, myocardial Akt phosphorylation was significantly increased, and Akt was significantly activated in atorvastatin postconditioning group compared with I/R group. The effects were significant at 1 mg/kg and 2 mg/kg atorvastatin postconditioning group, and were significantly attenuated by PI3K inhibitor LY294002. **Conclusion** Atorvastatin postconditioning could dose-dependently alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury in this type 2 diabetic model, which may probably be associated with the increase of the activating PI3K/Akt signaling pathway in the myocardium.

缺血性心脏病是冠状动脉疾病的终点事件, 并且是其导致死亡的主要原因^[1,2]。心肌梗死后开通梗死相关动脉, 使冠状动脉得到了再灌注, 虽然减少了总的死亡率, 但会产生缺血再灌注损伤。有研究发现, 在再灌注的早期给药, 可以减少心肌缺血

再灌注损伤, 即药物后处理。迄今应用于药物后处理的药物包括他汀类药物^[3]、缓激肽、金雀异黄素^[4]及异氟烷^[5]、转化生长因子 $\beta 1$ ^[6]等。其中, Wolfrum 等^[7]对在体大鼠心肌缺血再灌注模型的研究发现, 再灌注前 3 min 静脉注射辛伐他汀, 能够明

[收稿日期] 2011-11-07

[作者简介] 程振东, 硕士研究生, 研究方向为冠心病、心肌缺血再灌注损伤。通信作者蔡平, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病、心肌缺血再灌注损伤, E-mail 为 pingcai2011@yahoo.com.cn。陈良龙, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病、介入心脏病学、先天性心脏病、心血管超声医学, E-mail 为 lianglongchen@126.com。

显减少心肌梗死面积,机制是激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路。然而,在临床中,大多数的冠心病患者都合并有 2 型糖尿病,在这类患者中,他汀药物后处理的保护效应是否仍然存在,值得进一步研究。因此,本研究选用 2 型糖尿病大鼠模型,来探讨不同剂量的阿托伐他汀是否可以减轻急性期心肌再灌注损伤,并探讨其相应机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性、清洁 GK 级大鼠 70 只,体重 280 ~ 350 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 设备及试剂

EM208 型透射电子显微镜 (Philips);TKR-200C 小动物呼吸机 (江西特力麻醉呼吸设备公司);DM-SO、氯化三苯基四氮唑 (TTC)、伊文思蓝及 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 (美国 Sigma 公司);阿托伐他汀 (辉瑞制药有限公司);氯胺酮 (福建古田药业有限公司);大鼠 p-Akt 抗体及大鼠 Akt 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司)。

1.3 GK 大鼠心肌缺血再灌注模型的建立

参照文献[8,9]报道的方法稍加改进,使用氯胺酮 120 mg/kg 腹腔注射,麻醉大鼠。颈部正中纵向切一切口,钝性分离皮下喉部肌肉,暴露器官,气管插管,接呼吸机,潮气量 1.0 mL/100 g 体重,频率 45 ~ 60 次/分,呼吸比为 1.5:1。胸前手术区去毛,胸骨左缘第 4 肋间开胸,钝性分离胸大肌,分离第 4 肋间肌,以眼睑撑开器撑开固定,剥开心包,暴露心脏,在动脉圆锥与左心耳之间,隐约可见心肌层下面细小、透亮、粉红左前降支 (LAD)。无创小圆针 7-0 丝线在 LAD 处进针,采用打活结法,结扎 LAD,造成缺血 40 min 后,松开丝线恢复冠状动脉血流,使冠状动脉再通,形成再灌注,再灌注时间为 180 min。

1.4 分组及给药方法

GK 大鼠共 70 只,进行编号按抽签法随机分为 7 组,每组 10 只:假手术组只穿线不结扎左前降支;其余 6 组予心肌缺血 40 min,再灌注 180 min 处理,缺血再灌注组 (I/R 组) 不予其他处理;不同剂量 (0.1、0.5、1 及 2 mg/kg) 阿托伐他汀后处理组再灌注前 3 min 颈外静脉缓慢推注不同剂量阿托伐他汀 (用 10% DMSO 溶解);阿托伐他汀后处理 + LY294002 组,再灌注前 15 min 经颈外静脉缓慢推注 LY294002 (0.3 mg/kg),再灌注前 3 min 颈外静脉缓慢推注 2 mg/kg 阿托伐他汀,以上均参考文献

[8,10] 中的给药方法。

1.5 标本制备

于再灌注 180 min 后,每组随机抽取 3 只大鼠,取心尖部组织作 Western blot 检测。各组剩余 7 只大鼠再灌注 180 min 后结扎左冠状动脉,经颈外静脉注射 0.1% 伊文思蓝及 10% KCl 处死大鼠,速取心脏,切取缺血中心区小块组织 (1 mm × 1 mm × 1 mm) 用于电镜观察,除心尖端外心脏平行房室沟,切成 1 ~ 2 mm 厚薄片 5 块,用于心肌梗死面积测定。

1.6 心肌缺血及梗死面积测定

将心脏薄片置 1% TTC 溶液,36.5℃ 孵育 10 ~ 15 min,10% 甲醛溶液固定 48 h,数码相机拍摄朝心尖切面,灰白色为坏死心肌,浅红色为缺血存活心肌,蓝色为正常心肌。使用 Image J 软件测定,以每个心脏总梗死区面积 (AN) 占总危险区面积 (坏死区及缺血存活区之和,ARR) 的百分比表示梗死面积 (AN/AAR);以总危险区面积占左心室面积 (LV) 的百分比表示危险区面积 (AAR/LV)。

1.7 透射电子显微镜观察心肌超微结构

采用 Flameng 法^[11]使用 Philips EM208 型透射电子显微镜观察心肌超微结构,每例标本随机拍摄 5 个不同视野,每个视野随机选择 20 个线粒体 (共 100 个),按照以下方法进行分级,分别记为 0-4 分:0 级 (0 分) 为线粒体超微结构正常 (颗粒完好);1 级 (1 分) 为线粒体轻度肿胀,线粒体嵴和基质超微结构正常,基质颗粒缺失;2 级 (2 分) 为线粒体中度肿胀,基质透明,线粒体嵴没有破坏;3 级 (3 分) 为线粒体严重肿胀,线粒体嵴断裂 (可见灶性凝集,凝块大小不一);4 级 (4 分) 为线粒体严重肿胀,线粒体嵴完全断裂,线粒体内外膜完整性丧失。

1.8 Western blot 检测磷酸化 Akt 及总 Akt 蛋白表达

对 7 个样品进行蛋白提取并用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,各取 20 μg 蛋白样品,加入等体积的 2 × SDS 上样缓冲液,混匀,置 100℃ 水浴中加热 5 min,上样于 4% 梯度预制胶上,稳压 90 V 电泳,20 min 后稳压 100 V,电泳至溴酚蓝到凝胶底部。采用半干法时,按照电流 1.2 mA/cm² 膜面积,恒流转膜;0.45 μm 孔径 NC 膜,转膜时间 1 h。转膜后用丽春红染色试剂对膜染色。将膜浸没在 5% 脱脂奶粉 (TBST 溶解,pH7.5) 中室温轻摇 1 h。用 Western blot 封闭液 II 稀释一抗,室温孵育 30 min,放 4℃ 过夜。TBST 洗膜 7 次,每次 5 min。用 Western blot 封

闭液Ⅱ稀释二抗,羊抗大鼠-HRP 1:10000,室温轻摇 40 min。TBST 洗膜 7 次,每次 5 min。8 cm×6 cm 大小的膜用 1 mL ECL 反应 3 min,曝光 1 min,显影 2 min,定影。X 线片置于凝胶成像系统中扫描,分析,计算各个条带的灰度值。

1.9 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的两组均数间比较采用 *t* 检验,非正态分布的资料两两比较采用 Mann Whitney U 检验。多组均数及组间两两比较分别以单因素方差分析和最小显著差异法 (LSD),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌缺血及梗死面积比较

假手术组未见缺血及梗死区,其余各组间危险

区面积 (AAR/LV) 差异无统计学意义。梗死面积 (AN/AAR) 在假手术组显著低于 I/R 组 ($P < 0.05$),在 0.1、0.5、1 和 2 mg/kg 阿托伐他汀后处理组显著低于 I/R 组及阿托伐他汀后处理 + LY294002 组 ($P < 0.05$;表 1)。

2.2 心肌细胞超微结构改变

假手术组大鼠心肌细胞超微结构正常,其余各组有不同程度损伤。I/R 组、阿托伐他汀后处理 + LY294002 组心肌线粒体损伤以 3~4 级为主,0.1 mg/kg 阿托伐他汀后处理组和 0.5 mg/kg 阿托伐他汀后处理组损伤以 2~3 级为主,1 mg/kg 阿托伐他汀后处理组和 2 mg/kg 阿托伐他汀后处理组损伤程度以 1~2 级为主。假手术组 Flameng 评分显著低于 I/R 组 ($P < 0.05$),0.1、0.5、1 和 2 mg/kg 阿托伐他汀后处理组 Flameng 评分显著低于 I/R 组及阿托伐他汀后处理 + LY294002 组 ($P < 0.05$;表 1 和图 1)。

表 1. 各组大鼠心肌危险区面积、梗死面积及 Flameng 评分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1. Comparison of myocardial risk area, infarct size and Flameng score of rats in each group

分 组	AAR/LV	AN/AAR	Flameng 评分
假手术组	/	0% ± 0%	0.00 ± 0.00
I/R 组	42.3% ± 2.2%	73.8% ± 1.7%	3.07 ± 0.66
0.1 mg/kg 阿托伐他汀后处理组	43.6% ± 2.2%	68.9% ± 1.6% ^a	2.78 ± 0.59 ^a
0.5 mg/kg 阿托伐他汀后处理组	43.9% ± 1.1%	65.8% ± 2.3% ^a	2.57 ± 0.59 ^a
1 mg/kg 阿托伐他汀后处理组	44.1% ± 2.5%	56.7% ± 2.2% ^a	1.41 ± 0.60 ^a
2 mg/kg 阿托伐他汀后处理组	43.4% ± 1.5%	50.2% ± 1.2% ^a	1.29 ± 0.56 ^a
阿托伐他汀后处理 + LY294002 组	44.2% ± 1.9%	72.1% ± 1.2% ^b	3.18 ± 0.48 ^b

a 为 $P < 0.05$,与 I/R 组比较;b 为 $P < 0.05$,与不同剂量阿托伐他汀后处理组比较。

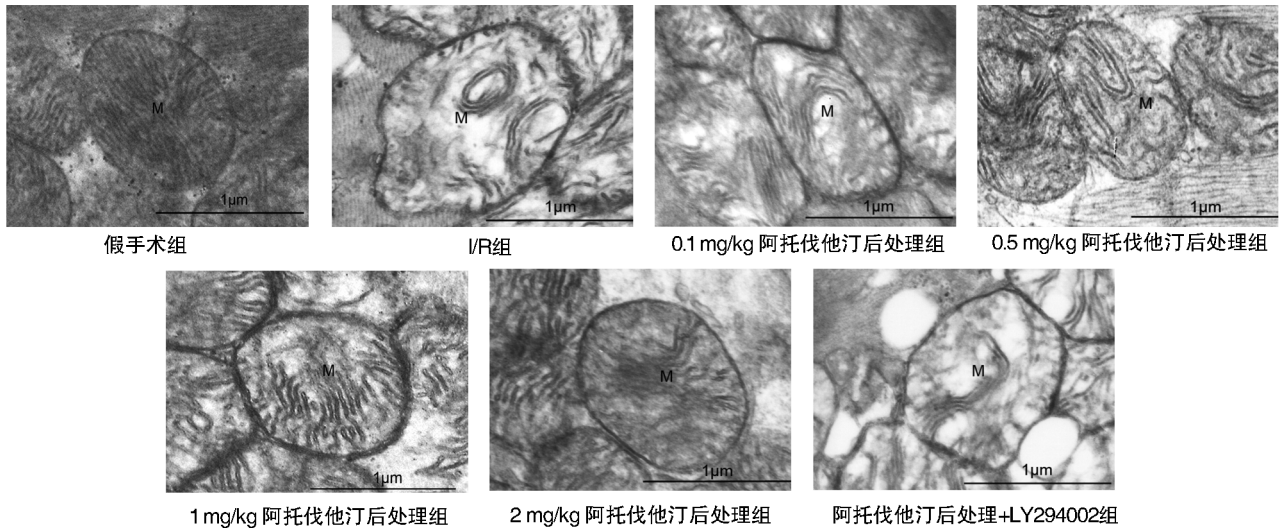


图 1. GK 大鼠心肌细胞超微结构
Figure 1. Myocardial ultrastructure of GK rat

2.3 心肌组织磷酸化 Akt 和总 Akt 蛋白表达

各组间心肌组织总 Akt(t-Akt)蛋白表达差异无统计学意义。0.1、0.5、1 及 2 mg/kg 阿托伐他汀后

处理组磷酸化 Akt(p-Akt)蛋白表达高于 I/R 组及阿托伐他汀后处理 + LY294002 组($P < 0.05$;图 2)。

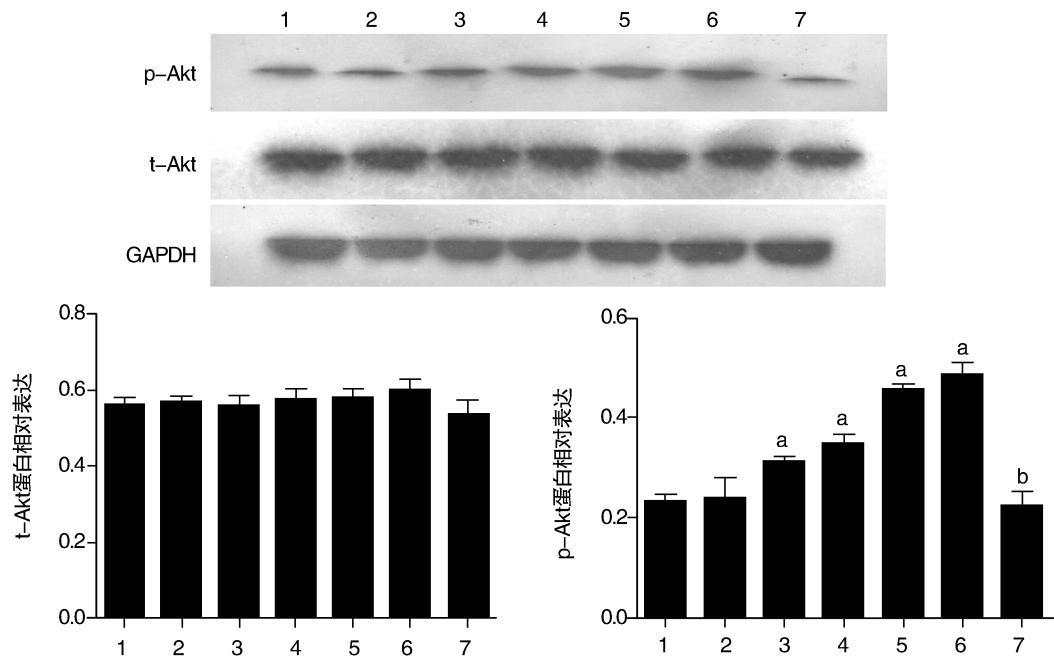


图 2. 各组大鼠心肌组织 p-Akt 和 t-Akt 蛋白表达 ($n = 3$) 1 为假手术组,2 为 I/R 组,3-6 为 0.1、0.5、1 及 2 mg/kg 阿托伐他汀后处理组,7 为阿托伐他汀后处理 + LY294002 组。a 为 $P < 0.05$,与 I/R 组比较;b 为 $P < 0.05$,与不同剂量阿托伐他汀后处理组比较。

Figure 2. Protein expression of p-Akt and t-Akt in rat myocardial tissue in each group

3 讨论

他汀类药物为 HMG-CoA 还原酶抑制剂,其除了调脂作用外,还有改善内皮细胞、抗炎、稳定斑块、抗细胞凋亡等多效性^[12,13]。多项研究^[7,14-16]显示,无论是慢性的他汀预处理还是急性他汀后处理,都可减轻心肌缺血再灌注损伤。本研究发现,阿托伐他汀静脉注射,可以减轻 2 型糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤,并且这种保护效应可能与激活 PI3K/Akt 通路有关。

本研究首先探讨了亲脂性的阿托伐他汀是否可以减轻急性期的缺血再灌注损伤。和以前的急性治疗缺血再灌注损伤的实验不同,我们选择了有自发性遗传的 2 型糖尿病动物 GK 大鼠模型进行研究。研究发现,阿托伐他汀后处理组心肌梗死面积小于 I/R 组,心肌线粒体超微结构损伤轻于 I/R 组,Akt 磷酸化水平高于 I/R 组,其中 1 mg/kg 和 2 mg/kg 阿托伐他汀后处理组较显著。PI3K 特异性抑制剂 LY294002 可完全消除阿托伐他汀后处理对再灌注心肌的保护作用以及 Akt 的磷酸化水平。

我们进一步探讨了阿托伐他汀减轻缺血再灌

注损伤的机制。PI3K/Akt 通路是再灌注损伤挽救激酶(RISK)信号通路之一,该通路的激活可减轻凋亡和调节糖原合成以及葡萄糖转运^[17]。Bell 等^[18]报道提出在离体心肌缺血再灌注时给予阿托伐他汀,PI3K/Akt 通路被迅速激活,同时 Akt 和 eNOS 的磷酸化程度明显增加,这种保护作用可被 PI3K 抑制剂渥曼青霉素拮抗,说明 PI3K/Akt 信号通路在减轻心肌缺血再灌注损伤中的关键作用。我们的实验结果进一步证实了此观点,阿托伐他汀在再灌注的前 3 min 静脉注射给药可激活 PI3K/Akt 信号通路,Western blot 检测结果显示阿托伐他汀增加了 p-Akt 的表达,且与阿托伐他汀的剂量相关,这种作用能被 PI3K 抑制剂 LY294002 拮抗。

有研究指出 2 型糖尿病的胰岛素抵抗导致 PI3K 活性降低,抑制了 PI3K/Akt 信号通路的激活,进而导致了缺血后处理在糖尿病心肌的保护作用降低^[19]。然而,药物后处理在糖尿病心肌的保护作用是否存在仍有很大争议:有显著保护作用?保护作用受到削弱?还是没有保护作用?尚无定论。蔡炜等^[9]报道瑞舒伐他汀后处理对糖尿病心肌有保护作用,但不显著,不如瑞舒伐他汀后处理联合

缺血后处理的保护作用强。本研究则显示阿托伐他汀后处理对糖尿病心肌的保护作用与剂量相关,理想剂量的阿托伐他汀是有保护作用的。不同的动物缺血再灌注模型、干预方法学以及干预的药物,可能导致了我們和其他动物实验结果的差异。

我们的实验结果显示,在糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤发生的早期,阿托伐他汀静脉给药是一个有前景的治疗策略。然而,更大剂量的阿托伐他汀是否有更好的保护效益、他汀静脉制剂给药的最佳时间窗以及其他他汀类药物后处理是否有相同的保护作用,仍需进一步实验探索,这样,他汀类药物静脉制剂才能更好的运用于临床。

[参考文献]

- [1] Topol EJ. Current status and future prospects for acute myocardial infarction therapy [J]. *Circulation*, 2003, 108 (16 Suppl 1): III6-13.
- [2] Liao JK. Secondary prevention of stroke and transient ischemic attack: is more platelet inhibition the answer [J]. *Circulation*, 2007, 115: 1 615-621.
- [3] Efthymiou CA, Mocanu MM, Yellon DM. Atorvastatin and myocardial reperfusion injury: new pleiotropic effect implicating multiple prosurvival signaling [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 45 (3): 247-252.
- [4] Tissier R, Waintraub X, Couvreur N, et al. Pharmacological postconditioning with the phytoestrogen genistein [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42 (1): 79-87.
- [5] Krolkowski JG, Weihrauch D, Bienengraeber M, et al. Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane -induced cardioprotection during early reperfusion in vivo [J]. *Can J Anaesth*, 2006, 53 (2): 174-182.
- [6] Baxter GF, Mocanu MM, Brar BK, et al. Cardioprotective effects of transforming growth factor-beta1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001, 38 (6): 930-939.
- [7] Wolfrum S, Dendorfer A, Schutt M. Simvastatin acutely reduces myocardial reperfusion injury in vivo by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, 44 (3): 348-355.
- [8] Hawat G, Benderdour M, Rousseau G, et al. Connexin 43 mimetic peptide Gap26 confers protection to intact heart against myocardial ischemia injury [J]. *Pflugers Arch*, 2010, 460 (3): 583-592.
- [9] 蔡炜, 吴黎明, 陈良龙, 等. 瑞舒伐他汀后处理联合缺

血后处理减轻 2 型糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. *中华心血管病杂志*, 2010, 38 (9): 814-818.

- [10] Berger C, Xia F, Maurer MH, et al. Neuroprotection by pravastatin in acute ischemic stroke in rats [J]. *Brain Res Rev*, 2008, 58 (1): 48-56.
- [11] Flameng W, Borgers M, Daenen W, et al. Ultrastructural and cytochemical correlates of myocardial protection by cardiac hypothermia in man [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1980, 79: 413-424.
- [12] Hasegawa H, Yamamoto R, Takano H, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors prevent the development of cardiac hypertrophy and heart failure in rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35 (8): 953-960.
- [13] Merla R, Daher IN, Ye Y, et al. Pretreatment with statins may reduce cardiovascular morbidity and mortality after elective surgery and percutaneous coronary intervention: clinical evidence and possible underlying mechanisms [J]. *Am Heart J*, 2007, 154 (2): 391-402.
- [14] Sanada S, Asanuma H, Minamino T, et al. Optimal windows of statin use for immediate infarct-limitation: 5'-nucleotidase as another downstream molecule of phosphatidylinositol 3-kinase [J]. *Circulation*, 2004, 110 (15): 2 143-149.
- [15] Briguori C, Colombo A, Airolidi F, et al. Statin administration before percutaneous coronary intervention: impact on periprocedural myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2004, 25 (20): 1 822-828.
- [16] 戴淑华, 蒋学俊, 李建军. 氟伐他汀对正常血脂兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13 (2): 183-185.
- [17] Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61 (3): 448-460.
- [18] Bell RM, Yellon DM. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41 (3): 508-515.
- [19] Derek J, Hausenloy, Andy Tsang, et al. Postconditioning dose not protect the diabetic heart [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2006, 40 (15): 920-1 015.

(此文编辑 文玉珊)