

氟伐他汀对正常血脂兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用

戴淑华¹, 蒋学俊¹, 李建军²

(1. 武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060; 2. 阜外心血管病医院, 北京市 100037)

[关键词] 病理学与病理生理学; 氟伐他汀对心肌缺血再灌注损伤的保护作用; 伊文氏蓝染色法; 缺血再灌注; 氟伐他汀; 诱导型一氧化氮合酶; 乳酸脱氢酶

[摘要] 目的 观察氟伐他汀对正常血脂兔的心肌缺血再灌注损伤有无保护作用及其可能原因。方法 将 24 只标准饲养的日本大耳白兔随机分为假手术组、缺血再灌注组和氟伐他汀组, 氟伐他汀组在行缺血再灌注术前给予氟伐他汀 10 mg/(kg·d) 干预一周。建立心肌缺血再灌注模型, 监测血流动力学变化; 检测乳酸脱氢酶和肌酸激酶活性; 以 Evans 蓝和 TTC 双重染色方法测量心肌梗死面积。取局部梗死区及对应部位心肌检测诱导型一氧化氮合酶活性的表达。结果 与缺血再灌注组比较, 氟伐他汀组心肌梗死面积、乳酸脱氢酶 1 及肌酸激酶活性均显著减小 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$); 缺血即刻始氟伐他汀组各时间点较缺血再灌注组左心室舒张末压减小 ($P < 0.05$), 左室内压变化最大速率 ($\pm dp/dt_{\max}$) 增大 ($P < 0.05$); 缺血再灌注组及氟伐他汀组总一氧化氮合酶活性均显著高于假手术组 ($P < 0.05$), 缺血再灌注组诱导型一氧化氮合酶活性与总一氧化氮合酶活性比值显著大于假手术组和氟伐他汀组 ($P < 0.01$)。结论 氟伐他汀可以保护正常血脂兔的心肌缺血再灌注损伤, 其机制可能部分与调节一氧化氮合酶活性的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effect of Fluvastatin on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury

DAI Shu-Hua¹, JIANG Xue-Jun¹, and LI Jian-Jun²

(1. Department of Cardiology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060; 2. Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Beijing 100037, China)

[KEY WORDS] Ischemia Reperfusion; Fluvastatin; Induced Nitric Oxide Synthase; Lactate Dehydrogenase; Creatine Kinase; Left Ventricular End-Diastolic Volume

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of fluvastatin on ischemia reperfusion myocardium in normocholesterolemic rabbit. **Methods** 24 rabbits were divided into three groups randomly and myocardial ischemia reperfusion model in rabbit was made. Rabbits were subjected to 45 min of regional myocardial ischemia and 3 h of reperfusion. 10 mg/(kg·d) fluvastatin were oral administered for one week. Dynamic index of myocardial function was recorded and analyzed. Serum activity of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected. Infarcted sizes in heart were determined by dual staining with Evans-blue and TTC. The activity of induced nitric oxide synthase (iNOS) and total nitric oxide synthase (tNOS) were detected in ischemic myocardium. **Results** In comparison with control group, all indexes related to injury, namely left ventricular end-diastolic volume (LVEDP), $\pm dp/dt_{\max}$, MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB), LDH-1 and the ratio of myocardial necrosis area, show injury attenuation in fluvastatin group. Increase of activity ratio iNOS/tNOS due to ischemia reperfusion is reduced significantly in fluvastatin group compared with control group (0.25 ± 0.10 vs 0.61 ± 0.13 , $P < 0.01$).

Conclusion Fluvastatin can attenuate myocardial ischemia reperfusion injury in rabbit. Its protective effect may be associated not only with up-regulation of tNOS but also with modulation of iNOS in myocardium.

心肌缺血再灌注损伤是指遭受一定时间缺血的心肌组织, 恢复血流后损伤程度反而加剧, 引起结构破坏和功能障碍的加重。缺血再灌注损伤广泛存在, 在心脑血管疾病的高危人群及患者中经常会有血栓栓塞一过性发生, 很多没有自觉症状。他汀类药物作为降脂药而被发现, 但大规模临床试验发现

它们在临床上的疗效远非降脂所能解释, 它们对心脑血管疾病的预防和治疗作用不完全依赖于调节血脂。本实验采用正常血脂家兔制作在体心肌缺血再灌注模型, 观察氟伐他汀对心肌损伤有无保护作用并探讨其与一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性变化的关系。

[收稿日期] 2004-06-01

[修回日期] 2004-01-12

[作者简介] 戴淑华, 硕士研究生, 主要从事冠心病发病机制的研究及临床工作, E-mail 为 joyoasis66@163.com。蒋学俊, 博士, 副主任医师, 主要从事冠心病及心律失常的基础研究及临床工作。李建军, 留美博士后, 主任医师, 主要从事冠心病的发病机制及其治疗的基础研究及临床工作。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及仪器

RM-6280 多道生理记录和分析处理系统, UV2002 紫外分光光度计, NOS 分型检测试剂盒(南

京建成), 氟伐他汀由诺华公司提供。

1.2 实验动物及分组

健康雄性大白兔(合格证号 0030004) 24 只, 标准饮食饲养, 体重 2~2.5 kg, 随机分为假手术组、缺血再灌注组和氟伐他汀组。所有动物均自由饮食, 氟伐他汀组以氟伐他汀 10 mg/(kg·d) 溶于生理盐水灌胃, 连续一周后行在体缺血再灌注术。

1.3 动物模型制备

耳缘静脉注射 30 g/L 戊巴比妥钠(1 mL/kg) 麻醉, 颈部正中切口, 气管插管, 分离右颈动脉, 插管至左心室内压。沿左侧距胸骨左缘 5 mm 处剪断第 3、4 肋骨, 实施无气胸开胸, 暴露心脏。5 号缝合线在距左冠状动脉前降支起始部 2 mm 处穿过。用套管套线后以止血嵌夹闭, 再灌注时松开套管, 恢复冠状动脉血流, 根据心电图 ST 的改变及心肌颜色变暗判断心肌的缺血情况。行气管插管, 分离左侧颈总动脉, 将心导管经颈总动脉插入左心室, 导管与压力传感器相通, 信号输入 MPA-V 型多道生物信号分析及微机系统处理, 分别于缺血前、缺血即刻、缺血 45 min、再灌注 30 min 及 2 h 测量左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室舒张末压(left ventricular end-diastolic volume, LVEDP)、心率、左心室压最大变化速率($\pm dp/dt_{\max}$) 等血流动力学指标。所有操作在室温 30℃ 左右进行。

1.4 血液生物化学指标检测

再灌注 2 h 后所有动物均由颈动脉抽取动脉血 1 mL, 3000 r/min 离心 10 min, 提取上清, 检验肌酸激酶(creatine kinase, CK) 和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 的活性。

1.5 心肌梗死范围测量

再灌注 2 h 后, 再次阻断冠状动脉血流, 从颈动脉注入 10 g/L Evans 蓝 5 mL, 取下心脏, 迅速分离未被蓝染的心肌组织(缺血区), 称重; 随后将其垂直于纵轴连续切为 2~3 mm 的薄片, 放入 1% TTC 37℃ 染色 15 min, 再放入甲醛溶液中过夜以增强颜色对比; 分离染色后的灰白色组织和深红色组织, 并分别称重, 计算坏死组织占缺血组织的百分比。

1.6 心肌组织一氧化氮合酶活性检测

再灌注 2 h 后取缺血区及假手术组相应部位心肌组织 200 mg 左右, 制成组织匀浆, 按照试剂盒说明测量并计算总 NOS(total NOS, tNOS) 活性和诱导型 NOS(induced NOS, iNOS) 活性。

1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 t 检验, 多组间比较用方差分析, 多组间两两比较用 SNK

方法分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学指标

缺血前三组血流动力学指标无显著性差异。与假手术组比较, 缺血再灌注组和氟伐他汀组 LVEDP 在缺血即刻开始增大, $\pm dp/dt_{\max}$ 在缺血即刻开始明显下降, 在缺血即刻及以后各时间点氟伐他汀组 LVEDP 均较缺血再灌注组明显减小($P < 0.05$), $\pm dp/dt_{\max}$ 明显增大($P < 0.05$), $\pm dp/dt_{\max}$ 在缺血 2 h 差异最明显(表 1 和表 2, Table 1 and 2)。

表 1. 三组缺血不同时间点左心室舒张末压的变化

Table 1. Changes of LVEDP with time duration in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, mmHg)

分 组	缺血前	缺血即刻	缺血 45 min	再灌注 2 h
假手术组	6.17 \pm 0.27	6.17 \pm 0.25	6.18 \pm 0.12	6.18 \pm 0.11
缺血再灌注组	6.13 \pm 0.31	1.52 \pm 0.41	1.72 \pm 1.11	1.21 \pm 0.9
氟伐他汀组	6.21 \pm 0.6	7.58 \pm 2.0 ^a	8.21 \pm 2.8 ^a	8.31 \pm 1.7 ^a

a: $P < 0.05$, 与缺血再灌注组比较。

表 2. 三组缺血不同时间点左心室内压变化最大速率的变化

Table 2. Changes of $\pm dp/dt_{\max}$ with time duration in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, mmHg/s)

分 组	缺血前	缺血即刻	缺血 45 min	再灌注 2 h
假手术组	+ 5703 \pm 488	+ 5711 \pm 502	+ 5711 \pm 303	+ 5711 \pm 303
	- 3535 \pm 435	- 3721 \pm 428	- 3721 \pm 403	- 3721 \pm 403
缺血再灌注组	+ 5698 \pm 556	+ 3121 \pm 567	+ 3324 \pm 579	+ 3339 \pm 537
	- 3424 \pm 526	- 2785 \pm 328	- 2131 \pm 312	- 1962 \pm 215
氟伐他汀组	+ 5739 \pm 516	+ 4890 \pm 203 ^a	+ 4910 \pm 703 ^a	+ 4918 \pm 553 ^a
	- 3922 \pm 631	- 3620 \pm 682 ^a	- 3369 \pm 461 ^a	- 3320 \pm 632 ^a

a: $P < 0.05$, 与缺血再灌注组比较。

2.2 血液生物化学指标变化

再灌注 2 h 后缺血再灌注组和氟伐他汀组 LDH-1、CK 和 CK-MB 与假手术组比较显著升高($P < 0.01$); 氟伐他汀组 LDH-1、CK、CK-MB 与缺血再灌注组比较明显下降($P < 0.05$), 见表 3(Table 3)。

表 3. 血清心肌酶的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, u/L)

Table 3. Compare of serum activity of myocardial enzymes

分 组	LDH	LDH-1	CK	CK-MB
假手术组	195 \pm 34	57 \pm 18	136 \pm 20	122 \pm 16
缺血再灌注组	227 \pm 26	98 \pm 7 ^b	2018 \pm 138 ^b	1289 \pm 116 ^b
氟伐他汀组	212 \pm 29	67 \pm 11 ^{ac}	1128 \pm 113 ^{ac}	602 \pm 127 ^{ac}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与假手术组比较; c: $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较。

2.3 心肌梗死面积

与缺血再灌注组比较, 氟伐他汀组坏死区显著减小($P < 0.01$), 梗死率(坏死区占缺血区重量百分比)显著降低($P < 0.01$), 见表 4(Table 4)。

表 4. 梗死面积的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 4. Comparison of myocardium infarct size

分 组	缺血区重量 (mg)	坏死区重量 (mg)	梗死率
缺血再灌注组	1057 ± 191	385 ± 65	35% ± 4%
氟伐他汀组	1036 ± 73	303 ± 43 ^a	29% ± 3% ^a

a: $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较。

2.4 心肌组织一氧化氮合酶活性

再灌注 2 h 后, 缺血再灌注组 iNOS/tNOS 活性比值与假手术组比较差异有显著性($P < 0.01$), 氟伐他汀组与缺血再灌注组比较显著减小($P < 0.01$), 与假手术组比较无统计学差异(表 5, Table 5)。

表 5. 一氧化氮合酶活性比较

Table 5. Comparison of NOS activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	tNOS	iNOS	iNOS/tNOS
假手术组	1.08 ± 0.07	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.08
缺血再灌注组	1.28 ± 0.10	0.92 ± 0.12	0.61 ± 0.13 ^a
氟伐他汀组	1.25 ± 0.15	0.43 ± 0.08	0.25 ± 0.10 ^b

a: $P < 0.01$, 与假手术组比较; b: $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较。

3 讨论

缺血再灌注损伤不仅广泛存在于脏器移植、体外循环及冠状动脉再通术后, 在心血管疾病的高危人群中还可能经常发生没有自觉症状的缺血再灌注损伤。已有研究证实对正常血脂的心脑血管疾病患者, 他汀类药物可以显著改善生活质量, 降低并发症的发生。开发该类调脂作用之外的临床应用潜能已经不是新话题, 这方面的研究也初现成果, 如他汀类药物能抑制内膜增生, 改善透析并发症, 减轻缺血再灌注损伤等等。有报道, 他汀类药物可减轻缺血导致的肾功能损害, 改善肾的缺血再灌注损伤^[1,2]; 缩小正常血脂小鼠的脑梗死面积^[3]; 降低猪心肌缺血再灌注心率失常的发生率^[4], 其机制尚未完全明了。

本研究选用兔模型是由于兔可以在胸膜外暴露心脏的同时能维持自主呼吸, 因而对心功能的影响较小。本实验中缺血再灌注组和氟伐他汀组 LVEDP 较假手术组显著增大, $\pm dp/dt_{\max}$ 显著下降, 表明左

心舒张功能降低; 而氟伐他汀组上述指标的变化幅度较缺血再灌注组明显减小($P < 0.05$), 表明氟伐他汀组左心功能保持较好。血清心肌酶 CK、LDH 尤其是 CK-MB、LDH-1 是能间接反应心肌坏死的轻重, 本实验缺血再灌注手术组 CK、CK-MB、LDH-1 较假手术组显著增加, 应证手术成功, 同时氟伐他汀组上述血清心肌酶含量与缺血再灌注组比较显著减小, 表明处理组心肌坏死程度较轻。双重染色测量心肌梗死面积结果也证实氟伐他汀预处理能显著缩小心肌梗死范围。

一氧化氮和 NOS 与缺血再灌注损伤的关系众说纷纭, 目前大多数观点认为与一氧化氮的分泌方式有关^[5]。研究认为他汀通过上调内皮型 NOS 保护肾组织的缺血再灌注损伤^[2]。laufs 等^[6]发现辛伐他汀和洛伐他汀可使内皮型 NOS mRNA 的半衰期由 13 h 延长至 38 h。但是他汀类药物对 iNOS 的影响研究较少。有研究认为巨噬细胞与心肌细胞等的 iNOS 催化分泌一氧化氮立即与氧反应生成氧自由基, 并且一氧化氮可直接作用于心肌组织, 对心肌组织具有毒性作用^[7]。朱玉同等^[8]研究发现 iNOS 的表达变化与缺血再灌注损伤过程完全一致, 本研究中缺血再灌注组 iNOS 活性比假手术组显著增高与此相符。我们的研究初步提示降低 iNOS 的表达与氟伐他汀保护心肌缺血再灌注损伤相关, 然而究竟他汀类药物是否直接在分子水平上对 iNOS 和内皮型 NOS 有不同向的调节作用还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Gueler F, Rong S, Park JK, Fiebeler A, Menne J, Elger M, Luft F. Postischemic acute renal failure is reduced by short-term statin treatment in a rat model. *J Am Soc Nephrol*, 2002, **13** (9): 2 288-298

[2] Yokota N, Donnell M, Daniels F, Burne M, Keane W, Rabb H. Protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor on experimental renal ischemiareperfusion injury. *Am J Nephrol*, 2003, **23** (1): 13-17

[3] Gertz K, Laufs U, Lindauer U, Nickenig G, Bohm M, Dimagli U. Withdrawal of statin treatment abrogates stroke protection in mice. *Stroke*, 2003, **34** (2): 551-557

[4] Lazar HL, Bao Y, Zhang Y, Bernard SA. Pretreatment with statins enhances myocardial protection during coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, **125** (5): 1 037-042

[5] 钟慈生, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学. 上海: 上海医科大学出版社, 1997; 16

[6] Laufs U, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase blocks hypoxia-mediated downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 31 725-729

[7] Becker BF, Kupatt C, Massoudy P, Zahler S. Reactive oxygen species and nitric oxide in myocardial ischemia and reperfusion. *Z Kardiol*, 2000, **89** (Suppl): IX/88-91

[8] 朱同玉, 欧阳嘉慧, 柯嘉敏, 张永康, 王国民. 肾脏缺血再灌注损伤后一氧化氮合酶的变化. 复旦学报(医学版), 2004, **31** (3): 221-224

(此文编辑 文玉珊)