

陈志松,喻卓,曾永利. 瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌基质金属蛋白及炎症因子的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 66-71.

Chen ZS, Yu Z, Zeng YL. Effects of rosuvastatin on myocardial matrix metalloproteinases and inflammatory factors in rats with acute myocardial infarction[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 66-71.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.02.0011

瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌基质金属蛋白及炎症因子的影响

陈志松,喻卓,曾永利*

(昆明医科大学第一附属医院心血管内科二病区,昆明 650032)

【摘要】 目的 观察瑞舒伐他汀治疗急性心肌梗死(AMI)大鼠心肌组织中基质金属蛋白酶 MMPs、TIMP2 和炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的变化。**方法** 选取健康 SD 大鼠通过结扎冠状动脉左前降支建立 AMI 模型。分为 4 组,对照组(仅穿线并不在冠状动脉处结扎, $n=10$);急性心肌梗死组($n=14$);瑞舒伐他汀组($n=13$);AMI 建模后采用瑞舒伐他汀($10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)治疗;氯沙坦组($n=11$);AMI 建模后采用氯沙坦钾治疗($5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)。分别采用免疫组化法、RT-qPCR 检测大鼠 AMI 建模后心肌组织基质金属蛋白酶 mmp2、mmp9 及抑制物 TIMP2 的表达水平,采用 Western blot 检测心肌组织中 mmp2、mmp9 及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 蛋白变化。**结果** 免疫组化和 RT-qPCR 检测结果显示:与 AMI 组相比,瑞舒伐他汀组及氯沙坦组大鼠心肌 mmp2、mmp9 蛋白及 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$);Western blot 检测结果:与对照组相比,AMI 组大鼠 mmp9、mmp2、TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达水均明显升高($P<0.05$);而与 AMI 组相比,瑞舒伐他汀组、氯沙坦组大鼠心肌中 mmp2、mmp9、TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达水平均下降($P<0.05$)。**结论** 大鼠 AMI 建模后心肌发生纤维化因子 mmp2、mmp9 及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 升高,而瑞舒伐他汀可通过抑制心肌纤维化,降低炎症因子表达,在一定程度上对心功能起到改善作用。

【关键词】 瑞舒伐他汀;急性心肌梗死;大鼠;基质金属蛋白;炎症因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 02-0066-06

Effects of rosuvastatin on myocardial matrix metalloproteinases and inflammatory factors in rats with acute myocardial infarction

CHEN Zhisong, YU Zhuo, ZENG Yongli *

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

【Abstract】 Objective To observe the changes of matrix metalloproteinases (MMPs), TIMP2, and inflammatory factors TNF- α and IL-1 β in the myocardium of rats with acute myocardial infarction (AMI) treated with rosuvastatin. **Methods** Healthy SD rats were selected to establish an AMI model by ligation of the left anterior descending coronary artery. They were divided into four groups: a control group (isolation of anterior descending branch without ligation, $n=10$); an acute myocardial infarction group (AMI modeling group); a rosuvastatin group ($n=13$, AMI treated with rosuvastatin at $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ after modeling); and a losartan group ($n=11$, AMI treated with losartan potassium at $5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ after modeling). Immunohistochemical staining and RT-qPCR were used to determine the expression levels of MMP2, MMP9, and

[基金项目] 云南省科技计划项目(2015FB037)。

[作者简介] 陈志松(1978—),主治医师,E-mail: hxinyue6688@163.com

[通信作者] 曾永利(1975—),主治医师,硕士,主要从事心血管疾病方向的研究。E-mail: logoshes@sina.com

inhibitor TIMP2 in rat cardiac tissues after AMI modeling. Western blotting was used to determine the changes of MMP2, MMP9, TNF- α , and IL-1 β in myocardium. **Results** The results of immunohistochemical and RT-qPCR analyses showed that, compared with those in the AMI group, the MMP2 and MMP9 protein/mRNA expression levels in rat myocardium in the rosuvastatin and losartan groups were decreased ($P < 0.05$). Regarding the western blotting results, compared with that in the control group, the expressions of MMP9, MMP2, TNF- α , and IL-1 β proteins in the AMI group were significantly increased ($P < 0.05$). Moreover, compared with those in the AMI group, the expression levels of MMP2, MMP9, TNF- α , and IL-1 β in the myocardium of the rosuvastatin and losartan groups were decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Myocardial fibrosis factors and inflammatory factors are increased after AMI modeling in rats. Rosuvastatin can improve the cardiac function to some extent by inhibiting myocardial fibrosis and reducing the expression of inflammatory factors.

[Keywords] rosuvastatin; acute myocardial infarction; rat; matrix metalloproteinase; inflammatory factor

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是常见的心内科疾病之一,也是导致心衰的重要原因,这种疾病对人们的健康状况造成了严重威胁^[1]。报告显示,我国 AMI 发病率及死亡率都较高,每年大约有 50 万的新发 AMI 患者,其发病率呈上升趋势^[2],且有年轻化方向发展。发生 AMI 的病理基础主要是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS),而脂代谢、炎症反应在 AS 形成过程中起到重要作用。研究显示,他汀类药物保护心肌细胞、降低 AMI 的发生率、改善心肌重构^[3]。瑞舒伐他汀作为目前最新的他汀类药物能降低动脉粥样硬化,逆转动脉粥样斑块以及能够有效降低血脂等指标,并且能降低心血管疾病发生率、死亡率^[4]。本研究探讨瑞舒伐他汀对 AMI 大鼠心肌外基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 和基质金属蛋白酶组织抑制剂 2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMP2) 以及炎症因子蛋白的影响。报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择体重 180~200 g 的 SPF 级成年雄性 SD 近交系大鼠 60 只。动物许可证号:[SCXK(云)2015-0015]。实验单位使用许可证编号:[SYXK(云)2015-0023];适应性喂养 7 d。建立 AMI 大鼠模型:通过对大鼠冠状动脉左前降支进行结扎,将术后 24 h 存活的大鼠用心电图检验确诊存在心肌梗死,其中有 38 只大鼠建模成功。实验分组:(1)对照组 (2)AMI 组:不用药物治疗。(3)氯沙坦组:建模后给予氯沙坦钾 5 mg/(kg·d) 治疗。(4)瑞舒伐他汀组:给与建模后大鼠瑞舒伐他汀 10 mg/(kg·d) 治疗。本实验严格按照 3R 原则进行,且遵守医院动物伦理委员会规则(福利伦理审查编号 2018-1-1-5)。

1.2 主要试剂与仪器

美国 ABI9700RT-PCR 扩增仪;PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成;瑞舒伐他汀钙片(商品名:可定,购自阿斯利康制药有限公司,国药准字 J20090092);基质金属蛋白 MMP-2、MMP-9、TIMP2、TNF- α 、IL-1 β 蛋白兔多克隆抗体购自美国 BD 公司;MMP2、MMP9 引物均由北京博大泰克生物基因技术有限责任公司合成;逆转录试剂购自日本 TaKaRa 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 造模与给药方法

构建 AMI 模型:大鼠麻醉后,固定在手术台上,沿左侧第 4 肋间剪开皮肤,分离肌肉组织暴露胸腔,在左冠状动脉前降支进行结扎,逐层关闭胸腔并进行常规消毒处理,将术后 24 h 存活的大鼠用心电图检验确诊存在心肌梗死;假手术组大鼠仅于左冠状动脉前降支穿线而不作结扎。

1.3.2 心肌组织标本采集

干预后将所有大鼠均经断头法处死,迅速开胸,摘取心脏,以生理盐水冲洗血液,采集梗死边缘区心肌组织,置于福尔马林溶液中固定 245 h,常规制作石蜡切片,厚度 4 μ m。

1.3.3 免疫组化检测大鼠心肌 MMP2、MMP9 蛋白表达

采用免疫组化 SP 法。取大鼠心肌组织标本,经 4% 多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,4 μ m 厚切片。切片常规脱蜡、水化,置于 pH 6.0 的枸橼酸盐缓冲液中微波加热修复, H₂O₂ 封闭,滴加适量稀释的大鼠 MMP2、MMP9 抗体, 37℃ 2 h, PBS 冲洗 8 min 共 3 次,加入二抗 (1:200), 37℃ 孵育 1 h, PBS 冲洗 8 min 共 3 次, DAB 显色 37℃ 20 min, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察。阳性反应呈棕色。

1.3.4 RT-qPCR 检测大鼠心肌 MMP2、MMP9 mRNA 表达水平

分别取各组大鼠心肌组织 30 mg,按总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒说明书分别提取各组总 RNA 及逆转录合成 cDNA 模板,取 2 μ L cDNA 用于 RT-PCR 反应。GAPDH 作为内参,上游引物: 5'-AGAGGATACCCCAAGCCACT-3'; 下游引物: 5'-ACAGAACAATAGGCACAAACG-3';MMP2 上游引物: 5'-TCAGTCGATCACTAGCGTCAAT-3';下游引物: 5'-CTAACTTCTCCCCACAGGGA -3'。MMP9 上游引物: 5'-GCCGTCTACTC CTCCCCGTG T-3';下游引物: 5'-GTCTCTCTCCTACCCTCTGG-3'。RT-qPCR 反应条件:预变性 94℃ 30 s,变性 95℃ 15 s,退火 60℃ 30 s,40 个循环,独立实验重复 3 次。用系统软件进行结果分析:样品的相对表达用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1. 3. 5 免疫印迹分析

经 BCA 法蛋白定量后上样,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质:制备 5%浓缩胶及 12%的分离胶。电泳:调解电压至 80 V、90 min 后转为 100 V 至溴酚蓝跑至距分离胶底部 0.5 cm 时停止。转膜:280 mA 恒流 1 h,结束后关闭电源取出 PVDF 膜,在丽春红染液中浸泡 10 min,如有条带显现说明转膜成功,采用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液封闭 1.5 h。加一抗、 β -actin (1 : 2000),4℃ 冰箱过夜。加二抗 37℃2 h,结束后用 TBST 漂洗 10 min $\times$ 3 次,后显影。用 Quantity One 软件对蛋白质条带进行分析,测定其吸光度值。目的蛋白的相对表达强度=目的蛋白的吸光度值/ β -actin 的吸光度值。

1. 4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析,计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2. 1 免疫组化检测大鼠心肌 MMP2、MMP9 蛋白表达

分析大鼠急性心肌梗死建模后 14 d 心肌免疫组化染色结果,AMI 大鼠 MMP2、MMP9 染色面积与对照组相比有差异 ($P<0.01$);瑞舒伐他汀组和氯沙坦组的 MMP2、MMP9 染色面积与 AMI 组比较有差异 ($P<0.05$),与对照组比较有差异 ($P<0.05$)。(图 1、2)

2. 2 RT-qPCR 检测大鼠心肌 MMP2、MMP9 mRNA 表达水平

观察建模后 14 d 大鼠,结果显示 AMI 组大鼠的 MMP2 mRNA 相对表达量与对照组相比明显增加

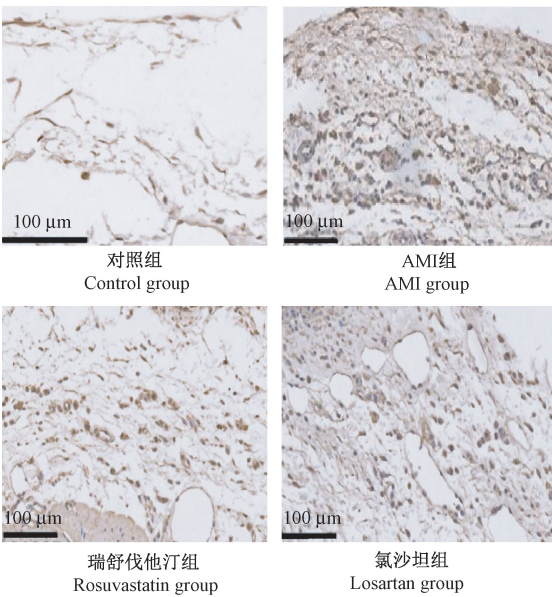


图 1 急性心肌梗死大鼠心肌 MMP2 免疫组化($\times 200$)

Figure 1 MMP2 expression in the myocardium of rats with acute myocardial infarction (immunohistochemical staining)

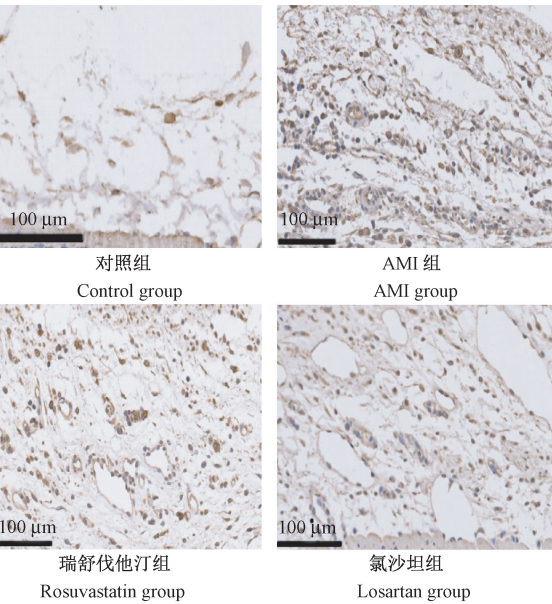


图 2 急性心肌梗死大鼠心肌 MMP9 免疫组化($\times 200$)

Figure 2 MMP9 expression in the myocardium of rats with acute myocardial infarction (immunohistochemical staining)

($P<0.01$);而用药后大鼠的 MMP2 mRNA 的相对表达量(瑞舒伐他汀组,氯沙坦组)与 AMI 组相比明显下降,两者有显著性差异 ($P<0.05$);同时,AMI 组大鼠的 MMP9 mRNA 相对表达量与对照组相比明显增加 ($P<0.01$);而用药后大鼠的 MMP9 mRNA 的相对表达量(瑞舒伐他汀组,氯沙坦组)与 AMI 组相比明显下降 ($P<0.05$)。(表 1)

表 1 各组大鼠 MMP2、MMP9 mRNA 相对表达量比较
Table 1 Comparison of the relative expression of MMP2 and MMP9 mRNA in each group

	对照组 Control group	AMI 组 AMI group	瑞舒伐他汀组 Rosuvastatin group	氯沙坦组 Losartan group
MMP2 mRNA	1.04±0.10	6.13±1.55 [*]	2.94±1.09 [#]	1.83±0.40 [#]
MMP9 mRNA	1.06±0.213	1.47±0.11 ^Δ	0.25±0.08 [#]	0.57±0.14 [#]

注：与对照组比较，^Δ*P*<0.05，^{*}*P*<0.01；与 AMI 组比较，[#]*P*<0.01。
Note. Compared with the control group, ^Δ*P*<0.05, ^{*}*P*<0.01. Compared with group AMI group, [#]*P*<0.01.

2.3 Western blot 结果

与对照组相比较,AMI 组 TIMP2 蛋白表达水平明显下降(*P*<0.05),但瑞舒伐他汀组、氯沙坦组与 AMI 组相比,TIMP2 蛋白表达水平均上升(*P*<0.05);与对照组相比,AMI 组大鼠 MMP9、MMP2、TNF-α、IL-1β 蛋白表达水平均升高(*P*<0.05);而与 AMI 组相比,瑞舒伐他汀组、氯沙坦组大鼠心肌中 MMP2、MMP9、TNF-α、IL-1β 蛋白表达水平均下降(*P*<0.05),瑞舒伐他汀组、氯沙坦组之间无差别(*P*>0.05)。详见图 3、4。

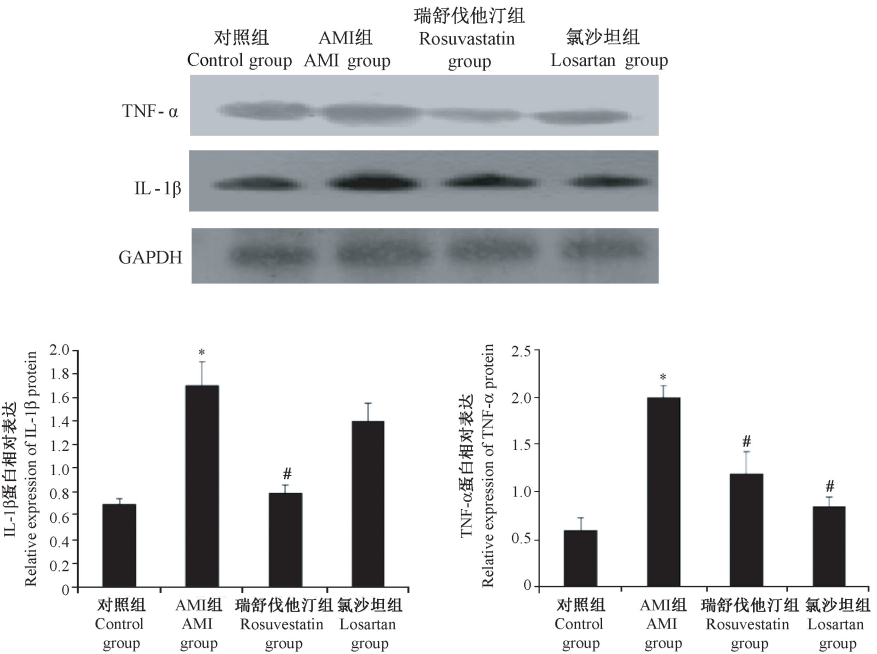
3 讨论

在临床上,急性心肌梗死是常见的病症,其发病率不断升高且有年轻化趋势^[5],这给患者健康带来严重危害。文献报道,心梗后心力衰竭的主要病理原因是心肌细胞凋亡和胶原纤维增生^[6]。现有的治疗方法能够部分改善患者预后,但对心肌细胞

无促进再生作用,有些治疗甚至会促进心肌细胞凋亡及心室重构^[7]。因此,为改善急性心肌梗死患者预后而阻止心肌细胞凋亡有着重要意义。

本实验采用开胸结扎冠状动脉左前降支的方法建立 AMI 大鼠模型,此方法具有成熟、成功率高等特点,一般用于观察研究急性心肌梗死的病理变化^[8]。此次实验模型成功率为 76%,失败模型主要由于技术不熟练、操作不规范等造成。

基质金属蛋白(MMPs)主要由巨噬细胞分泌的对锌离子依赖内肽酶,能够对多种胶原纤维和细胞外基质产生降解作用,使心肌细胞受损,梗死区域增大^[8]。MMP-2 和 MMP-9 属于 MMPs 家族中重要成员能降解胶原和基底膜成分,导致重构心肌胶原网络,而 TIMPs 能抑制其活性。动物模型实验结果发现:心肌中 MMPs 的表达水平随着心脏功能障碍的发展逐渐增加,同时会使细胞外基质成分、结构改变^[9]。国外文献报道,心肌重塑与 MMP-9、

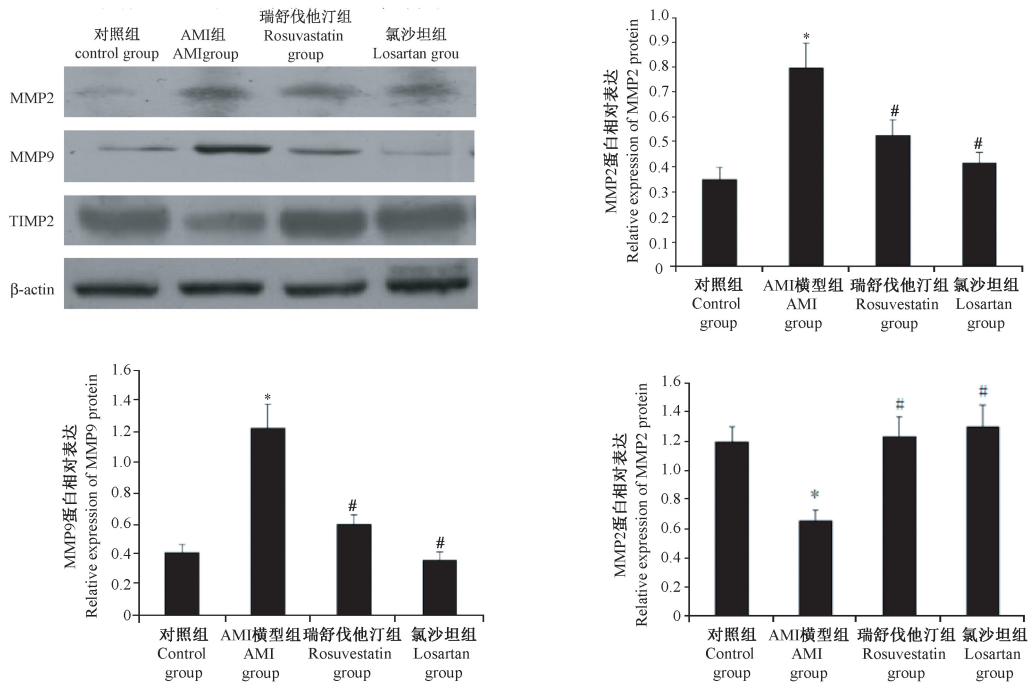


注：与对照组相比，^{*}*P*<0.01；与 AMI 组相比，[#]*P*<0.05。

图 3 大鼠建模后心肌 TNF-α、IL-1β 蛋白表达水平变化

Note. Compared with the control group, ^{*}*P*<0.01. Compared with the AMI group, [#]*P*<0.05.

Figure 3 Changes of TNF-α and IL-1β protein expression in rat myocardium after modeling



注:与对照组相比,* $P<0.01$;与AMI组相比,# $P<0.05$ 。

图4 大鼠建模后心肌 MMP2、MMP9、TIMP2 蛋白表达水平变化

Note. Compared with the control group, * $P<0.01$. Compared with the AMI group# $P<0.05$.

Figure 4 Changes of MMP2, MMP9, and TIMP2 protein expression in rat myocardium after modeling

MMP-2关系密切^[10]。本试验中免疫组化和 Western blot 结果表明:与对照组相比,AMI 组大鼠心肌组织中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达量明显增加,同时 Western blot 检测 AMI 组心肌中 TIMP2 蛋白表达量下降;与 AMI 组相比,瑞舒伐他汀组和氯沙坦组心肌 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平下降,而 TIMP2 蛋白表达水平上升;RT-qPCR 检测结果表明,AMI 组大鼠心肌组织中 MMP-2 mRNA 比对照组增加($P<0.05$),但与 AMI 组相比,应用瑞舒伐他汀及氯沙坦治疗后 MMP-2 mRNA 降低($P<0.05$);与对照组相比,AMI 大鼠心肌组织中 MMP-9 mRNA 增加($P<0.05$),但应用瑞舒伐他汀及氯沙坦治疗后 MMP-9 mRNA 降低,与 AMI 组相比有差异($P<0.01$),这表明瑞舒伐他汀和氯沙坦能够明确抑制心肌中 MMPs。

他汀类药物是 HMG-CoA 还原酶抑制剂,具有抗炎、抑制心肌纤维化、降脂、抗氧化等作用^[8]。瑞舒伐他汀也属于 HMG-CoA 还原酶抑制剂能够竞争性抑制胆固醇合成关键酶,并且加速低密度脂蛋白代谢,降低其密度,从而改善心脏功能^[11]。据文献报道,瑞舒伐他汀能够通过抑制巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶从而减轻心肌纤维化,减少胶原沉积达到

改善心肌重构和心脏功能的目的^[9,12]。实验结果说明瑞舒伐他汀能够调节 MMPs 和 TIMP2 的表达,达到改善心肌重构以及心功能作用。

对 AMI 的病理研究发现,炎症反应是主要的发病机制之一,其主要标志物为 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 等^[13]。单核巨噬细胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 等共同诱导心肌细胞凋亡^[14]。TNF- α 与急性期炎症反应联系紧密,且能够加强 IL-1 β 、IL-6 表达^[15]。本实验中建立 AMI 大鼠模型会促使心肌细胞大量坏死,同时大量释放炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 等。Western blot 检测结果:与对照组相比,AMI 组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达水平明显增加($P<0.05$),这说明炎症反应参与 AMI 的病理过程。AMI 大鼠服用瑞舒伐他汀及氯沙坦治疗后治疗 14 d 后,与 AMI 组大鼠相比心肌中 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达量明显下降($P<0.05$),说明瑞舒伐他汀及氯沙坦具有对抗急性心肌梗死大鼠炎症反应的多样化作用。有体外研究证明,他汀类药物能够通过减少粘附分子数量和炎症因子起到抗炎作用,这和本研究结果基本一致^[16]。

综上所述,瑞舒伐他汀对 AMI 大鼠心脏功能改善有明显作用,通过调节 MMPs、TIMP2 表达改善

AMI 大鼠的心肌重构,同时瑞舒伐他汀能够抑制炎症反应,减少对炎症因子对心肌的毒害作用,表明他汀还具有抗炎的多效性作用。

参考文献:

- [1] 朱尧,夏伟,刘激激,等.中医药论治急性心肌梗死的研究进展[J].中国中医急症,2015,24(6): 1029-1032.
- [2] 梁欣,杨蓉,苏斐,等.早期康复对急性心肌梗死经急诊介入治疗后患者的疗效观察[J].河北医科大学学报,2014(12): 1462-1463.
- [3] 王士凯,褚亚丽,徐娟娟,等.氟伐他汀对心肌梗死大鼠心室重构及 MMP-9、MMP-10 表达的影响[J].中国动脉硬化杂志,2014,22(9):917-20.
- [4] 陈懿,徐世鄂.瑞舒伐他汀和阿托伐他汀对冠心病患者的调脂作用 and 安全性比较[J].中国老年学杂志,2014(9):2389-2390.
- [5] 高宁,王晋军.青年急性心肌梗死危险因素的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(5): 565-567
- [6] Ye Y, Birnbaum GD, Perez-Polo JR, et al. Ticagrelor protects the heart against reperfusion injury and improves remodeling after myocardial infarction[J]. Arterioscl Throm Vas, 2015, 35(8): 1805-1814.
- [7] Zaid Iskandar M, Lang CC. Sacubitril and valsartan fixed combination to reduce heart failure events in post-acute myocardial infarction patients[J]. Drugs Today, 2017, 53(10): 545-551.
- [8] 孙涛,万大国,宋恒良,等.瑞舒伐他汀对大鼠急性心肌梗死后梗死组织 miR-126 的表达及血管再生的影响[J]. 郑州大

学学报(医学版),2013,(5):640-643.

- [9] 岳文伟,张歆,陈博,等.阿利吉仑对急性心肌梗死大鼠心肌组织重构的影响[J].医药导报,2014,33(2):167-172.
- [10] Kitaoka H, Kubo T, Okawa M, et al. Plasma metalloproteinase levels and left ventricular remodeling in hypertrophic cardiomyopathy in patients with an identical mutation[J]. J Cardiol, 2011, 58(3):261-265.
- [11] Chitose T, Sugiyama S, Sakamoto K, et al. Effect of a hydrophilic and a hydrophobic statin on cardiac salvage after ST-elevated acute myocardial infarction - a pilot study[J]. Atherosclerosis, 2014, 237(1): 251-258.
- [12] Koenig W. High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy[J]. Int J Cardiol, 2013; 168(6): 5126-5134.
- [13] 邹吉丽,尹照萍,张利群,等.大鼠心肌缺血再灌注早期心肌及血清中 IL-6、TNF- α 的表达[J].中国医科大学学报,2013,42(9):830-833.
- [14] 赵桂峰,黄欣玮,吴丽玉.基于 NF- κ B 通路的参芍胶囊保护大鼠心肌缺血再灌注损伤的机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(12):145-150.
- [15] 吴松,李佳,洪亚群,等.电针内关穴对心肌肥厚模型大鼠 TNF- α 和 IL-1 β 的影响[J].中华中医药杂志,2012,27(9):2287-2289.
- [16] Tousoulis D, Psarros C, Demosthenous M, et al. Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease: the emerging role of statins[J]. J Am Coll Cardiol. 2014, 63(23):2491-2502.

[收稿日期] 2018-07-30