

• 基础研究 •

阿托伐他汀抑制大鼠心肌肥大的实验研究

叶平 盛莉 张钺 王兆君 张秀锦

【摘要】 目的 通过体外心肌细胞培养和在体动物实验方法,观察阿托伐他汀对大鼠心肌肥大的抑制作用,以及对心肌中炎性细胞因子的影响,探讨该类药物影响心肌肥大可能涉及的作用机制。方法 体外原代培养新生大鼠的心肌细胞,以血管紧张素Ⅱ刺激建立心肌肥大模型,给予不同浓度的阿托伐他汀处理。采用 RT-PCR 法检测脑钠素(BNP)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)和白细胞介素 1 β (IL-1 β) mRNA 的表达,并以 ^3H -亮氨酸掺入测定心肌细胞蛋白合成速率。在体实验中通过不完全结扎大鼠的腹主动脉,使压力过度负荷增加造成左心室肥厚,以阿托伐他汀治疗 4 周,RT-PCR 检测 IL-1 β ,心调素-1(CT-1)的表达,并观察心脏的病理学改变。结果 心肌细胞肥大模型出现后,心肌细胞的 BNP、MMP9 和 IL-1 β mRNA 的表达以及蛋白合成速率增加。经不同浓度的阿托伐他汀处理后,这些变化得以减轻。阿托伐他汀抑制压力负荷升高引起的左心室心肌 BNP, IL-1 β ,CT-1 的 mRNA 表达的增加,并减轻大鼠心脏重/体重比值、左心室壁厚度和心肌细胞平均直径的增加。结论 阿托伐他汀可能通过抗炎作用抑制大鼠心肌肥大,对防治以心肌肥厚为特征的心血管疾病可能有一定的应用前景。

【关键词】 3-羟-3-甲戊二酰辅酶 A 还原酶;细胞因子;心肌肥厚

Atorvastatin inhibits myocardial hypertrophy of rats *in vitro* and *in vivo*

YE Ping, SHENG Li, ZHANG Cheng, et al

Second Department of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of atorvastatin on myocardial hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. Methods Angiotensin II was used to establish hypertrophy of cardiac myocytes and atorvastatin at various dosages was applied to these myocytes *in vitro*. Cytokines and brain natriuretic peptide(BNP) mRNA expression was evaluated by RT-PCR, and the rate of protein synthesis in cardiac myocytes was measured by ^3H -leucine incorporation. Left ventricular hypertrophy was induced by incomplete ligation of abdominal aorta of rats and atorvastatin ($5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) was administrated one week prior to the operation until 4 weeks after the operation. Cytokine mRNA expression in left ventricle was measured by RT-PCR and left ventricular wall thickness and myocyte diameter were determined by pathological method. Results Atorvastatin inhibited interleukin-1 β , matrix metalloproteinase 9 and BNP mRNA expression, as well as ^3H -leucine incorporation in neonatal rat cardiac myocytes induced by angiotensin II in a dose-dependent manner *in vitro*. Furthermore, atorvastatin reduced the mRNA expression of BNP, interleukin-1 β and cardiotropin-1, and inhibited the pressure overload-induced increase in the ratio of heart weight to body weight, left ventricular wall thickness and myocyte diameter of rats *in vivo*. Conclusions Atorvastatin inhibits myocardial hypertrophy of rats *in vitro* and *in vivo*, and may have clinical prospect in prevention and treatment of cardiovascular diseases characterized by myocardial hypertrophy.

【Key words】 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; cytokines; myocardial hypertrophy

收稿日期:2005-12-27

基金项目:受自然科学基金资助(编号:30270551),军队十五面上项目(编号:02M012)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院老年心血管二科(叶平、盛莉、张钺、张秀锦);100037 北京市,海军总医院心内科(王兆君)

作者简介:叶平,女,1953年12月生,浙江省杭州市人,医学博士,教授,主任医师,科主任, Tel:010-66939635, E-mail: yeping@sina.com

他汀类药物是 3-羟-3-甲戊二酰辅酶 A(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA)还原酶抑制剂,能够通过抑制 HMG-CoA 还原酶的活性来抑制胆固醇的合成,从而发挥降低血胆固醇的作用。除此之外,近年的研究还发现这类药物有降脂以外的许多作用,例如:抗炎作用,稳定动脉粥样硬化斑

块,保护血管内皮等。因各种原因引起的心肌肥厚与多种心血管疾病发展过程有关,是心肌缺血、心律失常和心性猝死的独立危险因素。业已证明,心肌肥厚发展过程中炎性细胞因子发挥了重要作用,但关于他汀类药物对心肌细胞炎性因子表达和心肌肥厚的作用国内报道较少。本研究在体内外实验研究中观察阿托伐他汀对心肌肥厚的影响,以探讨阿托伐他汀在治疗心肌肥厚中的作用及其可能涉及的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂 SD 大鼠由解放军总医院实验动物中心提供。高糖 DMEM 干粉培养基、新生小牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司;血管紧张素 II (Ang II) 购自 Sigma 公司;RT-PCR 试剂盒、DNA Marker DL2000 购自 TaKaRa 公司; ³H-亮氨酸购自北京原子高科技术应用股份有限公司。阿托伐他汀由辉瑞制药有限公司提供。

1.2 引物 引物由北京赛百胜生物工程公司合成(表 1)。

1.3 心肌细胞原代培养及模型建立 无菌条件下开胸取出 SD 乳鼠(2~4d)心脏,剪碎至 1~3 mm³ 大小,以 0.08% 的胰蛋白酶消化 5 min 左右,10% 牛血清培养液终止消化,反复数次,直至碎片完全消化。将细胞沉淀以培养液悬浮,悬液收集于 50 ml 培养瓶中,差速贴壁 60 min 后,吸取未贴壁细胞至新培养瓶(板)中。心肌细胞在 5% CO₂、37℃ 条件下培养 48 h,然后无血清培养 24 h,在以 Ang II (1 μmol / L) 诱导心肌细胞肥大前 60 min 分别加入不同浓度的阿托伐他汀(0, 0.1, 1, 10 μmol / L),然

后继续培养 48 h。

1.4 心肌细胞 ³H-亮氨酸的掺入测定 以台盼兰染色计数活细胞,用 10% 牛血清培养液调整心肌细胞至 5×10⁸ cell/L,接种于 12 孔板,1.5 ml/孔,各孔分别加入不同处理因子和 37 kBq ³H-亮氨酸。48 h 后沉淀蛋白,收集沉淀物到玻璃纤维滤膜上。烘干滤膜,放入闪烁瓶中,加入闪烁液 3 ml,用 LS-6500 液体闪烁计数器进行掺入量的测定,反映了心肌细胞的蛋白合成速率。

1.5 大鼠左室肥厚模型的建立及分组 雄性 SD 大鼠 24 只(体重 180~200 g),分为 3 组: A 组和 B 组为左心室肥厚组,经 10 % 水合氯醛(0.3ml/kg)腹腔麻醉后行剑突下正中切口,于双侧肾动脉分支近心端处将腹主动脉与直径为 0.6mm 的钢丝结扎在一起后,然后抽出钢丝,缝合切口,术后存活 4 周。C 组为对照组。A 组于手术前 1 周起用灌胃器经口给予阿托伐他汀(每天 5mg/kg 体重),直至术后 4 周;B 组在同样的时间灌 0.9 % 生理盐水直至术后 4 周。C 组既不手术也不灌药与其他两组在相同的环境下饲养相同的时间。处死动物前称体重,处死后取心脏称重,计算心脏重/体重比值。

1.6 病理学检测 将甲醛固定的心脏组织做成石蜡切片,经 HE 染色后拍照,用 Image-Pro Plus 图象分析软件测量左心室的前壁,侧壁,后壁和室间隔的厚度,计算左室壁平均厚度。在显微镜下放大 40 倍后再拍照,每张切片随机选取 10 个视野,每个视野选 10 个心肌细胞,用 Image-Pro Plus 软件测每个心肌细胞的直径,取其平均值。体外培养的心肌细胞同样随机选取 100 个细胞,测定直径,取其平均值。

表 1 用于 RT-PCR 的引物序列

基 因		引物序列	产物大小 (bp)
BNP	正义链	5'-TTTTCCTTAATCTGTCGCCG-3'	387
	反义链	5'-AGAGCTGGGGAAGAAGAGC-3'	
MMP9	正义链	5'-CCCTGCGTATTTCCATTTCATC-3'	300
	反义链	5'-ACCCCACTTCTTGTTCAGCGTC-3'	
IL-1β	正义链	5'-TTCTTTTCCTTCATCTTTGAAGAAG-3'	318
	反义链	5'-TCCATCTTCTTCTTTGGGTATTGTT-3'	
CT-1	正义链	5'-TCTATGGCGAGTGGGTGAGC-3'	340
	反义链	5'-AGCAAGCAAGCAAAGAAAGA-3'	
GAPDH	正义链	5'-GTACCTGCTCAGAACACCGG-3'	196
	反义链	5'-CCTCTGGGCTGTAGATGCTG-3'	

1.7 RT-PCR 测定体外培养的乳鼠心肌细胞的脑钠素(brain natriuritic peptide, BNP),白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β),基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP9)mRNA 的表达,大鼠左室心肌 BNP,IL-1 β ,心调理素(cardiotropin-1,CT-1)的 mRNA 表达。以 TRIzol 试剂一步法提取细胞总 RNA。经 DU-640 核酸分析仪检测纯度及浓度后,严格按照 RT-PCR 试剂盒说明书操作。所用引物见表 1。BNP 和 GAPDH 的扩增条件为:95℃ 预变性 5min;95℃ 45 s,48℃ 1 min,72℃ 1 min,28 次循环;MMP9 的条件为 95℃ 45 s,54℃ 1 min,72℃ 1 min,28 次循环;IL-1 β 和 CT-1 的扩增以 94℃ 45s,55℃ 45s, 72℃ 90s,30 次循环;PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下凝胶成像分析系统记录结果,待测基因 mRNA 相对表达量以其扩增带光密度值与相应内参照扩增带光密度值的比值表示。

1.8 统计方法 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。用 SPSS 统计软件,以 One-way ANOVA 分析各组别之间的差异,组间比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 阿托伐他汀对心肌细胞表面积的影响 与正

常心肌细胞相比,Ang II 诱导的心肌细胞的表面积显著增加;阿托伐他汀在终浓度为 10 μ mol/L 时可明显逆转此改变,而作为溶剂的 DMSO 对 Ang II 诱导的心肌细胞面积增加无逆转作用($P>0.05$,图 1)。阿托伐他汀对正常心肌细胞的表面积无影响(结果未给出)。

2.2 阿托伐他汀抑制肥大心肌细胞³H-亮氨酸的掺入 与正常心肌细胞相比,Ang II 诱导的心肌细胞³H-亮氨酸掺入量明显增加,阿托伐他汀抑制³H-亮氨酸掺入,且呈一定的剂量依赖性,但对正常心肌细胞并无影响($P>0.05$,图 2)。DMSO 对 Ang II 诱导的心肌细胞的³H-亮氨酸掺入无影响($P>0.05$)。

2.3 阿托伐他汀抑制压力过度负荷性左心室肥厚 腹主动脉缩窄造成压力过度负荷(B 组)4 周后,大鼠心脏重/体重值,左心室壁平均厚度,心肌细胞平均直径较对照组(C 组)有明显增加,而腹主动脉缩窄并应用阿托伐他汀治疗的 A 组的上述指标较 B 组有显著改善(表 2)。

2.4 阿托伐他汀抑制大鼠心肌细胞因子的表达 体外心肌细胞培养显示,与正常心肌细胞相比,AngII 刺激的心肌细胞肥大特征性基因 BNP mRNA 表达明显

表 2 各组大鼠心脏的病理学指标

组别	心脏重/体重 (mg/g)	左心室壁平 均厚度(mm)	心肌细胞平均 直径(μ m)
A 组	4.20 $\pm$ 0.11*#	3.21 $\pm$ 0.35*#	10.31 $\pm$ 1.71 #
B 组	4.77 $\pm$ 0.25*	3.76 $\pm$ 0.37*	11.61 $\pm$ 1.34 *
C 组	3.62 $\pm$ 0.33	2.75 $\pm$ 0.41	9.11 $\pm$ 1.35

注:与 C 组比较,* $P<0.05$,A 组与 B 组比较,# $P<0.05$

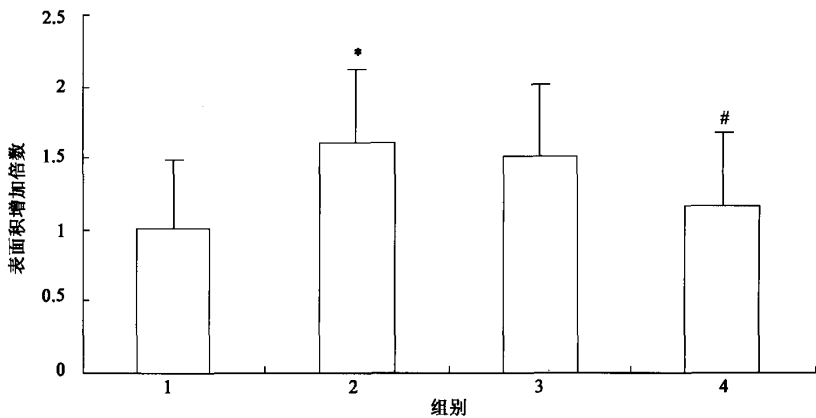


图 1 阿托伐他汀对体外培养大鼠的心肌细胞表面积的影响

1:正常组,2:Ang II 模型组,3:Ang II + DMSO,4:Ang II + 阿托伐他汀(10 μ mol/L);与正常组比,* $P<0.01$;与模型组比,# $P<0.01$

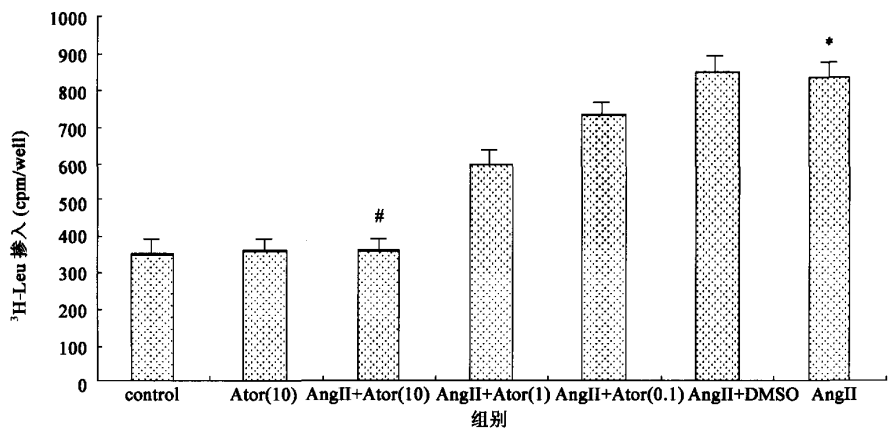


图 2 各组体外培养心肌细胞的³H-亮氨酸掺入

³H-Leu 为³H-亮氨酸; Ator(0.1)、Ator(1)、Ator(10)均为不同浓度的阿托伐他汀(单位:ml/L); 与正常组相比, * $P<0.01$; 与模型组比较, [#] $P<0.01$

增加,并且 MMP9 和 IL-1 β mRNA 表达也明显增加,阿托伐他汀抑制其表达。DMSO 对模型组的心肌细胞上述基因的 mRNA 表达无影响($P>0.05$, 图 3)。阿托伐他汀对正常心肌细胞的上述 mRNA 表达并无影响(结果未给出)。

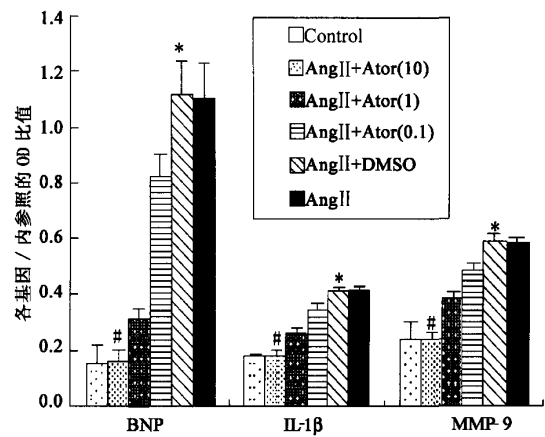


图 3 阿托伐他汀对心肌细胞 BNP、IL-1 β 及 MMP-9 的 mRNA 表达的影响

各指标 mRNA 的 OD 比值分别是各指标与内参照 GAPDH 电泳条带光密度比值;与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [#] $P<0.01$

在体试验,C 组大鼠的左心室心肌中未检出 IL-1 β ,CT-1 和 BNP 的 mRNA 表达,而左心室肥厚的 B 组大鼠的心肌中 IL-1 β ,CT-1 以及 BNP 的 mRNA 有显著表达,应用阿托伐他汀治疗的 A 组大鼠心肌中上述基因的表达较 B 组明显降低($P<0.05$, 图 4)。

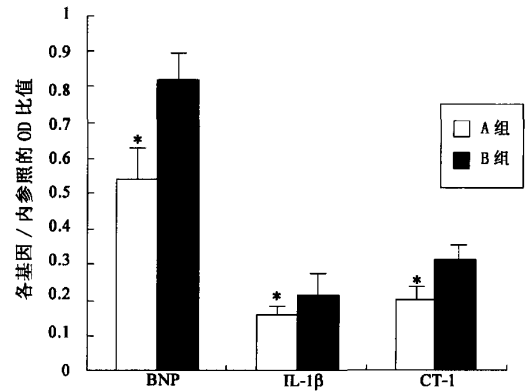


图 4 阿托伐他汀对左室肥厚大鼠心肌 BNP、IL-1 β 及 CT-1 的 mRNA 的表达的影响
与 B 组比较, * $P<0.01$

3 讨论

心肌肥厚是心脏对机械负荷及神经体液因子改变的代偿性反应,可见于高血压病、心肌梗死、心脏瓣膜疾病等多种心血管疾病。临床研究表明,心肌肥厚不仅是心衰前的一种适应性反应,而且是发生心肌缺血、心律失常和猝死的独立危险因素。本实验研究显示,阿托伐他汀作为一种有效的降脂药,可在体外能够抑制 Ang II 诱发的新生大鼠心肌细胞肥大,并且在大鼠压力过度负荷性左心室肥厚模型中减轻左心室肥厚的程度,提示阿托伐他汀对心血管疾病,特别是对左心室肥厚有潜在的保护作用。

研究发现,炎症与心肌肥厚的发生和发展过程密切相关。氯化钠敏感型 Dahl 大鼠喂高氯化钠的饲料引起血压升高,当形成左心室肥厚时,心肌中炎

性细胞因子 IL-1 β , CT-1 的 mRNA 和蛋白质的表达增加^[1,2], 当发展为心力衰竭时其表达进一步增加, 而且与心脏重/体重比值呈正相关。IL-1 β 在体外能够诱导心肌细胞肥大, 使心肌肥厚的标志基因 BNP 表达增加^[3]。CT-1 可以通过调节 Ang II 的表达引起心肌细胞肥大^[4]。MMPs 是一组能特异地降解细胞外基质成分的锌依赖的酶家族。成熟的左心室心肌细胞在左室重构的过程中加速合成和分泌 MMPs^[5]。炎性因子通过自分泌的形式在心脏局部产生明显浓度变化, 因而决定了它们在心肌肥厚的发生发展中起到重要的直接作用。

本文采用体外心肌细胞培养和在体动物实验建立心肌肥大模型, 观察到 MMP9、IL-1 β 和 CT-1 等炎性细胞因子, 以及心肌肥厚的标志基因 BNP 的 mRNA 在心肌细胞的表达显著升高, 经阿托伐他汀治疗后, 多种炎性因子以及 BNP 的 mRNA 表达明显降低, 且与阿托伐他汀抑制体外心肌细胞肥大和压力过度负荷性左室壁增厚的程度相一致, 提示阿托伐他汀在转录水平抑制炎性细胞因子的表达, 其具有的抗炎作用可能是阿托伐他汀抑制心肌肥厚的机制之一。

阿托伐他汀作为 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 通过抑制 HMG-CoA 还原酶的活性, 抑制胆固醇的合成, 从而发挥有效的降脂作用。最近陆续出现有关他汀类药物与炎性细胞因子及心肌肥厚方面的报道, Ogata 等^[6]在体外实验发现: 氟伐他汀可以抑制 IL-1 β 诱导的心肌肥大。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B), 转录信号转导和激活因子 (signal transducers and activation of transcription, STAT) 和活化蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 是调节炎症反应的重要转录因子, 调控多种炎性细胞因子的基因表达, 在心梗后左室重塑过程中发挥重要作用^[7]。Dechend 等^[8]的研究发现: 他汀类药物通过降低 NF- κ B, AP-1 等转录因子的转录调控活性, 抑制炎性细胞因子的表达, 同时还可以降低高血压大鼠的血压, 缓解心肌肥厚, 降低死亡率。

目前他汀类药物在临床上主要用于治疗高胆固醇血症, 延缓动脉粥样硬化斑块的进展, 有关抑制炎症反应对动脉粥样硬化的影响的研究近年来进展很快, 但是关于他汀类药物对左心室肥厚影响的研究报道并不多。近年的研究还发现, 他汀类药物有可能用于心力衰竭的治疗。小规模临床研究显示, 扩张性心肌病患者服用辛伐他汀, 能够降低患者血清中 IL-6, TNF- α 等炎性细胞因子和 BNP 的浓度, 改善心脏功能, 减轻心力衰竭症状^[9]。较大规模的临床回顾性分析表明, 严重的慢性心功能不全患者

(LVEF < 40%) 服用他汀类药物, 心血管性死亡的发生率低于未服用他汀类者^[10]。因此, 研究他汀类对慢性心力衰竭的有益作用已成为心血管病研究领域中的新热点, 本研究的发现为他汀类的新用途提供了有益的实验资料。但是, 他汀类药物对左心室重塑和心力衰竭的作用, 可能涉及的机制及其临床价值还有待于深入研究。

参考文献

- 1 Shioi T, Matsumori A, Kihara Y, et al. Increased expression of interleukin-1 β and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload. *Circ Res*, 1997, 81:664-671.
- 2 Takimoto Y, Aoyama T, Iwanaga Y, et al. Increased expression of cardiotrophin-1 during ventricular remodeling in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282:H896-H901.
- 3 Harada E, Nakagawa O, Yoshimura M, et al. Effects of interleukin-1 β on cardiac hypertrophy and production of natriuretic peptides in rat cardiocyte culture. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31:1997-2006.
- 4 Fukuzawa J, Booz GW, Hunt RA, et al. Cardiotrophin-1 increases angiotensinogen mRNA in rat cardiac myocytes through STAT 3. *Hypertension*, 2000, 35:1191-1196.
- 5 Sakata Y, Yamamoto K, Mano T, et al. Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats. *Circulation*, 2004, 109: 2143-2149.
- 6 Ogata Y, Takahashi M, Takeuchi K, et al. Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: A possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 40:907-915.
- 7 Frantz S, Fraccarollo D, Wagner H, et al. Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. *Cardiovasc Res*, 2003, 57:749-756.
- 8 Dechend R, Fiebeler A, Park JK, et al. Amelioration of angiotensin II-induced cardiac injury by a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor. *Circulation*, 2001, 104:576-581.
- 9 Node K, Fujita M, Kitakaze M, et al. Short-term statin therapy improves cardiac function and symptoms in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 2003, 108:839-843.
- 10 Mczaffarian D, Nye R, Lovy WC. Statin therapy is associated with lower mortality among patients with severe heart failure. *Am J Cardiol*, 2004, 93:1124-1129.