

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.04.009

强化他汀对大鼠心肌梗死后血小板活化及炎症的影响^{*}

唐显军,钟艺华,南映瑜[△]
(重庆市肿瘤研究所内科 400030)

摘要:目的 探讨强化他汀对大鼠心肌梗死后 24 h 血小板活化及炎症因子的影响。方法 70 只 SD 大鼠分为 SHAM 组、心肌梗死对照组、常规剂量组、强化他汀组、混合剂量组,每组 14 只。予以手术开胸结扎大鼠心脏左冠状动脉前降支制备心肌梗死动物模型(SHAM 组只穿线不结扎)。术前常规剂量组、混合剂量组分别予以小剂量阿托伐他汀($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃 2 周;强化他汀组、混合剂量组术前 12 h 给予单剂阿托伐他汀 50 mg/kg 灌胃;各组大鼠于术后 24 h 采血检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)、血小板活化因子-1(PAC-1)、CD62p。结果 术后 24 h 急性炎症因子 TNF- α 、hs-CRP 水平心肌梗死对照组显著高于 SHAM 组,血小板活化表面标志物 PAC-1、CD62p 亦显著性高于 SHAM 组($P<0.05$);强化他汀组炎症因子水平,血小板活化标志物显著低于心肌梗死对照组($P<0.05$);强化他汀组与混合剂量组比较,在炎症因子,血小板活化标志物水平差异无统计学意义($P>0.05$);常规剂量他汀组在心肌梗死大鼠术后短期与心肌梗死对照组比较炎症因子,血小板活化标志物水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 术前使用强化阿托伐他汀能显著降低心肌梗死大鼠术后急性炎症反应,抑制血小板活化。

关键词:心肌梗死;血小板活化;强化他汀;炎症因子
中图分类号:R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8348(2015)04-0459-03

Effect of intensive statin on platelet activity and inflammation factors in rat with myocardial infarction^{*}
Tang Xianjun, Zhong Yihua, Nan Yingyu[△]
(Department of Internal Medicine, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective To explore the effect of intensive statin on platelet activity and inflammation factors 24 h after rat myocardial infarction. Methods Seventy Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups ($n=14$): Sham-operated group (SHAM group); AMI group (control group), general group; intensive statin therapy group; general and intensive statin therapy group; established AMI rat model by ligation of left anterior descending branch of coronary artery. The general group, general and intensive statin therapy group was fed atorvastatin by $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ with distilled water 2 mL by intragastric gavage daily for two weeks. The intensive statin therapy group, general and intensive statin therapy group was fed atorvastatin by 50 mg/kg with distilled water 2 mL by intragastric gavage 12 h before surgery. Serum PAC-1, CD62p, TNF- α , hs-CRP was measured at the time of 24 h of postoperation. Results TNF- α , hs-CRP, PAC-1 and CD62p levels in control group were significantly higher than the SHAM group and intensive statin group 24 h after the LADS were ligated ($P<0.05$); and the factors of intensive statin group were significantly lower than that of control group ($P<0.05$). There was no significant difference between the intensive statin group and general-intensive group in the concentration of serum TNF, hs-CRP and the relative expression of PAC-1 and CD62p ($P>0.05$); and there was no significant difference between normal group and control group in all the four factors ($P>0.05$). Conclusion Intensive statin therapy before acute myocardial infarction could decrease the level of inflammation factors and inhibit platelet activity postoperation.

Key words: myocardial infarction; platelet activation; intensive statin; inflammation factors

血小板的聚集活化及炎症介质的释放在急性冠状动脉综合征(ACS),尤其是它的急性心血管事件心肌梗死中占重要的作用。他汀类药物的常规应用通过降低血脂水平,稳定斑块使这一类人群获益。近来有研究发现,他汀类药物的使用可减少静脉血栓栓塞^[1],而高脂血症本身并不是静脉血栓栓塞的危险因素,进一步的研究发现高脂血症患者循环血中血小板的活性有明显的增高,通过他汀降低血小板活性可减少血栓栓塞事件的发生,此为他汀类药物多效性中抗血小板机制。炎症反应贯穿于动脉粥样硬化,超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)是肝细胞分泌的一种急性时相性蛋白,是常见的非特异性促炎介质,是急性冠状动脉综合征的独立危险因素^[2]。TNF- α 是由单核巨

噬细胞分泌的一种促炎介质,在调节炎症和免疫反应中起核心作用。因此,调节血清 hs-CRP、TNF- α 等炎症介质的水平可能是目前治疗急性冠脉综合征的新途径^[3]。他汀类药物有独立于降脂作用以外的抗炎作用,即在降脂作用尚未显现时,他汀类的抗炎效应已经发生。故本研究就强化他汀对心肌梗死术后短期血小板活化及炎症因子的影响做一初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 单克隆抗体 FITC-PAC1、PE-CD62p、PerCP-CD61 及相应二抗 FITC-IgM、PE-IgG1 购自美国 BD Pharmingen 公司;hs-CRP 试剂盒购自美国 Beckman 公司;TNF- α 试剂盒购自美国 R&D 公司。

^{*} 基金项目:重庆市自然科学基金计划项目(cstc2011jjA1541)。 作者简介:唐显军(1975—),主治医师,硕士,主要从事心血管内科研究。
[△] 通讯作者,E-mail:Nanxi221@sina.com。

1.2 用药及分组 将 70 只健康雄性 SD 大鼠, 体质量 250~300 g, 分为 5 组, 每组 14 只, 分别为(1)假手术组(SHAM 组): 开胸后只穿线, 不结扎。(2)心肌梗死对照组: 结扎左冠状动脉前降支(见后)。(3)常规剂量组: 予以阿托伐他汀 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹干预 14 d 后, 于第 15 天造 AMI 模型。(4)强化他汀组: 于造模前 12 h 予以阿托伐他汀 50 mg/kg 灌胃后次日造模。(5)阿托伐他汀常规小剂量+术前强化组(混合剂量组): 予以阿托伐他汀 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃干预 13 d, 于第 14 天(术前 12 h)予以阿托伐他汀 50 mg/kg 强化, 于第 15 天造模。以上阿托伐他汀均溶于 2 mL 蒸馏水中灌胃, 假手术组、心肌梗死对照组术前给予蒸馏水 2 mL 灌胃。

1.3 心肌梗死大鼠模型的建立 腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉, 整个胸部祛毛, 气管切开及气管插管后, 左正中旁切开皮肤开胸, 结扎左冠状动脉前降支。以心电图肢导联 ST 段弓背向上抬高持续 0.5 h 以上作为梗死模型复制成功的标志。

1.4 标本采集 分别于造模后 24 h, 予颈静脉采血法^[4]; 双人操作, 不麻醉大鼠, 手法固定, 予小儿头皮针接 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹空针先用针头沿胸前正中线约第 4 肋骨水平右旁开刺入向颈静脉方向进针, 接近颈静脉时, 助手轻抽注射器呈负压, 再以 30°~40°角向颈静脉刺入, 有血液自动流入注射器内筒, 说明针尖已在颈静脉内, 此时固定好人鼠, 勿使注射器针头移动, 颈静脉采血 1.5 mL 收集注入非抗凝管中离心取血清冻存测 hs-CRP、TNF-α, 换针筒后再抽 1 mL 血沿试管壁缓慢注入含 0.1 mL 的 3.8% 枸橼酸钠的试管中, 轻轻混匀。从中吸 5 μL 全血分别加入对照管和实验管, 对照管管中加入 FITC-IgM、PE-IgG1 及 PerCP-CD61 单抗各 20 μL, 在实验管中分别加入 FITC-PAC1、PE-CD62p 及 PerCP-CD61 单抗各 20 μL。室温避光放置 20 min 后, 用 1% PFA 250 μL 固定 10 min, 1 h 之内完成样品制备并上机检测。流式细胞仪用 FACS Calibur(美国 BD Pharmingen 公司)进行测试, 激发光为氩离子激光器, 488 nm 单谱线, 输出功率为 15 mw。对每个实验样品检测 10 000 个血小板。hs-CRP 采用免疫透射比浊法测定, TNF-α 采用酶联免疫吸附法测定, 严格按照说明书操作。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料以率表示, 组间比较采取 χ^2 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血小板活化标志物比较 与 SHAM 组比较, 心肌梗死对照组术后 24 h CD62p 和血小板活化因子-1(PAC-1)的表达明显增高, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。强化他汀组血小板活化标志物 CD62p 和血小板活化因子-1(PAC-1)显著低于心肌梗死对照组, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠术后 24 h 血小板活化标志物 CD62p、PAC-1 相对表达量($\bar{x} \pm s, \%$)			
组别	<i>n</i>	CD62p	PAC-1
SHAM 组	14	5.78 ± 0.84	11.23 ± 2.45
心肌梗死对照组	14	18.23 ± 4.63 ^a	33.12 ± 6.74 ^a
强化他汀组	14	10.37 ± 3.27 ^b	19.56 ± 3.26 ^b
常规剂量组	14	14.86 ± 4.31	26.62 ± 4.58
混合剂量组	14	9.24 ± 3.14	17.84 ± 3.17

^a: *P* < 0.05, 与 SHAM 组比较; ^b: *P* < 0.05, 与心肌梗死对照组比较。

2.2 血浆炎症因子比较 与 SHAM 比较, 心肌梗死对照组术后 24 h TNF-α 和 hs-CRP 的浓度明显增高, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。强化他汀组炎症因子 TNF-α、hs-CRP 的浓度显著低于心肌梗死对照组, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 各组大鼠术后 24 h 血浆炎症因子 TNF-α、hs-CRP 浓度($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	TNF-α(ng/L)	hs-CRP(mg/L)
SHAM 组	14	102.36 ± 42.79	4.12 ± 0.93
心肌梗死对照组	14	277.87 ± 89.31 ^a	10.87 ± 2.15 ^a
强化他汀组	14	165.74 ± 53.72 ^b	6.13 ± 1.76 ^b
常规剂量组	14	213.48 ± 78.63	8.91 ± 2.02
混合剂量组	14	131.19 ± 49.17	5.92 ± 1.39

^a: *P* < 0.05, 与 SHAM 组比较; ^b: *P* < 0.05, 与心肌梗死对照组比较。

强化他汀组与混合剂量组相比较, 炎症因子、血小板活化标志物水平差异无统计学意义(*P* > 0.05), 常规剂量组在心肌梗死大鼠术后与心肌梗死对照组比较, 差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1、2。

3 讨 论

CD62p、PAC-1 是血小板活化的表面标志物, 生理状况下, 血小板不表达或少量表达, 在病理或物理刺激作用下, 血小板活化, 血小板膜糖蛋白分子的种类、数量和构型发生显著变化, CD62p 暴露于血小板膜表面, GP II b/III a 在活化时几乎全部表达在膜表面^[5-6]。CD62p 的表达可以在活化血小板表面持续下去, 并不会被血浆蛋白质所掩盖^[7]。CD62p 通过介导血小板和血管内皮细胞与单核细胞、嗜中性粒细胞间的相互黏附, 导致细胞大量聚集, 在炎症和栓塞中起着很重要的作用^[8]。

影响血小板活化的因素很多, 比如麻醉、手术, 血小板易受到抗凝剂和离体时间的影响, 血小板活化后其聚集性会增加, 并且会发生形状的改变。要避免任何可能导致血小板意外激活的因素, 必须尽可能做到顺利采集标本, 及时送检, 改进抗凝剂使用方法^[9]。本研究采用颈静脉采血, 手法固定, 不麻醉大鼠, 以及血样固定后 1 h 内上机检测均为最大程度降低人为的, 体外对血小板的活化。PAC-1 在血小板表面的表达量可以精确地反映早期阶段血小板的活化^[10], CD62p 的升高可作为血栓性疾病病情监测和评价血栓前状态的有效指标。本研究发现: 心肌梗死对照组与 SHAM 组比较, 术后 24 h 血小板活化表面标志物 PAC-1、CD62p 显著性增高; 强化他汀组血小板活化标志物显著低于心肌梗死对照组; 强化他汀组与混合剂量组相比较, 血小板活化标志物水平差异无统计学意义(*P* > 0.05); 常规剂量他汀在心肌梗死大鼠术后短期与心肌梗死对照组比较, 差异无统计学意义(*P* > 0.05)。本实验表明急性心肌梗死术后血小板发生显著活化, 而术前强化他汀可以抑制术后血小板的这种活化, 从而降低进一步血栓事件的发生, 而达到有效保护心肌的目的。而低剂量的他汀药物持续给药在本研究中未观察到它在急性心肌梗死术后短期产生的活化抗血小板的有益作用, 本研究差异无统计学意义(*P* > 0.05)。至于持续低剂量联合术前一次性负荷剂量的他汀药物是否可以在心肌梗死术后产生比术前单次负荷剂量更强的抑制血小板活化作用, 本研究只是在实验结果中看到这种趋势, 但差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

急性冠状动脉综合征的发生与机体炎症反应激活有关,早期应用大剂量阿托伐他汀能快速降低血清炎症因子水平,从而改善机体的炎症状态,有助于冠状动脉病变斑块的稳定,从而有可能影响急性冠状动脉综合征患者的转归^[11]。有临床研究显示强化他汀治疗不稳定型心绞痛具有较好的临床效果及安全性,能明显降低血清 hs-CRP、TNF- α 水平,具有良好心血管保护作用^[12],急性炎症反应在此过程中起了关键性作用。强化他汀缘于它迅速起效的多效性,服用 3 h 后即可改善内皮功能,24 h 内改善冠状动脉循环,降低炎症因子水平^[13]。本研究发现,心肌梗死对照组与 SHAM 组比较术后 24 h 急性炎症因子 TNF- α 、hs-CRP 水平明显升高,强化他汀组炎症因子水平显著低于心肌梗死对照组;强化他汀组与混合剂量组相比较,炎症因子水平差异无统计学意义($P>0.05$),常规剂量组在心肌梗死大鼠术后短期与心肌梗死对照组比较差异亦无统计学意义($P>0.05$)。说明心肌梗死手术迅速激活大鼠体内炎症介质的释放,而术前强化他汀可以抑制术后大鼠体内炎症因子水平,通过改善机体的炎症状态,影响心血管病变的转归而起到有益作用。而低剂量他汀持续给药在本研究中未显示出他汀多效性的抗炎效应。

综上所述,术前强化阿托伐他汀能显著降低心肌梗死大鼠术后 24 h 急性炎症反应,抑制血小板活化,而炎症和血小板活化的关系,以及他汀多效性的起效及持续时间等问题尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, et al. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(18):1851-1861.
- [2] Andrie RP, Bauriedel G, Braun P, et al. Increased expression of C-reactive protein and tissue factor in acute coronary syndrome lesions: Correlation with serum C-reactive protein, angiographic findings, and modification by statins[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(1):135-143.
- [3] Nozue T, Yamamoto S, Tohyama S, et al. Treatment with statin on atheroma regression evaluated by intravascular ultrasound with Virtual Histology (TRUTH Study): rationale and design[J]. *Circ J*, 2009, 73(2):352-355.

(上接第 458 页)

- Breast Cancer Res Treat, 2012, 136(2):407-417.
- [10] Liu Z, Bandyopadhyay A, Nichols RW, et al. Blockade of autocrine TGF- β signaling inhibits stem cell phenotype, survival, and metastasis of murine breast cancer cells[J]. *J Stem Cell Res Ther*, 2012, 2(1):1-8.
- [11] Abrahama MB, Fritz P, Mcc LM, et al. Prevalence of CD44⁺/CD24⁻/low cells in breast cancer May not be associated with clinical outcome but May favor distant metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 11(3):1154-1159.
- [12] Dalla Pozza E, Lerda C, Costanzo C, et al. Targeting gemcitabine containing liposomes to CD44 expressing pancreatic adenocarcinoma cells causes an increase in the antitumoral activity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(5):1396-1404.

- [4] 车兆义, 邹悦, 宋清斌. 大鼠实验中几种常用的采血方法探讨[J]. *局解手术学杂志*, 2008(2):84-85.
- [5] Kolandaivelu K, Bhatt DL. Antiplatelet therapy in coronary heart disease prevention[J]. *Cardiol Clin*, 2011, 29(1):71-85.
- [6] Sharma G, Berger JS. Platelet activity and cardiovascular risk in apparently healthy individuals: a review of the data[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2011, 32(2):201-208.
- [7] 丁芳林, 李卓成, 庄义浩. 急性心肌梗死患者 PTCA 术后再灌注损伤及细胞黏附分子的表达研究[J]. *重庆医学*, 2011, 40(30):3048-3050.
- [8] Rodes-Cabau J, Tardif JC, Cossette M, et al. Acute effects of statin therapy on coronary atherosclerosis following an acute coronary syndrome[J]. *Am J Cardiol*, 2009, 104(6):750-757.
- [9] 金春明, 苏咏梅, 刘广勤. 不同离体时间和抗凝剂浓度对血小板激活的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(9):811-814.
- [10] Rosencher J, Zuily S, Varenne O, et al. Acute myocardial infarction secondary to platelet apheresis in a 57-year healthy donor[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 150(3):e119-120.
- [11] Tawfik MK, Ghattas MH, Abo-Elmatty DM, et al. Atorvastatin restores the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators in rats with acute myocardial infarction[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2010, 14(6):499-506.
- [12] 宋少鹏. 瑞舒伐他汀对不稳定型心绞痛患者血清细胞因子和心肌缺血的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2009, 30(2):189-192.
- [13] Wang X, Lin Y, Luo N, et al. Short-term intensive atorvastatin therapy improves endothelial function partly via attenuating perivascular adipose tissue inflammation through 5-lipoxygenase pathway in hyperlipidemic rabbits[J]. *Chin Med J Engl*, 2014, 127(16):2953-2959.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-11-19)

- [13] Kim HS, Yoo SY, Kim KT, et al. Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5(8):754-761.
- [14] Han M, Liu M, Wang Y, et al. Re-expression of miR-21 contributes to migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell characteristics in MCF-7 cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 363(1/2):427-436.
- [15] Yeh CT, Wu AT, Chang PM, et al. Trifluoperazine, an antipsychotic agent, inhibits cancer stem cell growth and overcomes drug resistance of lung cancer[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186(11):1180-1188.

(收稿日期:2014-08-10 修回日期:2014-10-12)