

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.13.005

瑞舒伐他汀对大鼠缺血心肌嗜铬粒蛋白 A 和 MR-proADM 表达的影响^{*}

孙慎杰¹, 吴小鹏¹, 宋恒良¹, 李贵琦¹, 张 娟¹, 万大国¹, 段温泉¹, 朱 沙²
(1. 郑州大学第二附属医院心内科 450014; 2. 郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室 450001)

[摘要] **目的** 研究瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠缺血心肌嗜铬粒蛋白 A(CGA)和肾上腺髓质素原中间片段(MR-proADM)表达的影响。**方法** 采用冠状动脉结扎术建立 30 只急性心肌梗死大鼠模型,分成对照组($n=15$)和治疗组($n=15$),以 15 只正常大鼠作为空白组,其中治疗组接受瑞舒伐他汀治疗。分别在手术治疗后 3、7 d 和 14 d 取 5 只大鼠的心肌组织。采用荧光定量 PCR 检测组织内 CGA 和 MR-proADM mRNA 转录量,采用 Western blot 检测组织内 CGA 和 MR-proADM 的表达量。**结果** 治疗后第 7 天和第 14 天治疗组 CGA 和 MR-proADM mRNA 和蛋白表达量与空白组差异无统计学意义($P>0.05$),对照组 CGA 和 MR-proADM mRNA 和蛋白表达量均显著高于治疗组和空白组($P<0.05$)。**结论** 瑞舒伐他汀可有效降低急性心肌梗死大鼠心肌组织内 CGA 和 MR-proADM mRNA 转录和蛋白表达。

[关键词] 心肌梗死;嗜铬粒蛋白 A;肾上腺髓质素原中间片段;瑞舒伐他汀

[中图分类号] R542.2+2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)13-1741-03

Effect of rosuvastatin on expression of chromogranin A and original middle segment of MR-proADM in ischemia myocardial tissue of rats with acute myocardial infarction

Sun Shenjie¹, Wu Xiaopeng¹, Song Hengliang¹, Li Guiqi¹, Zhang Juan¹, Wan Daguo¹, Duan Wenquan¹, Zhu Sha²
(1. Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China; 2. Teaching and Research Section of Microbiology and Immunology, College of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the effect of rosuvastatin on the expression of chromogranin A and the original middle segment of MR-proADM in ischemia myocardial tissue of rats with acute myocardial infarction, and to investigate its mechanism. **Methods** The rat model with acute myocardial infarction was established with the coronary artery ligation. 30 model rats were divided into control group ($n=15$) and the treatment group ($n=15$), with 15 normal rats as the blank group. The treatment group received the rosuvastatin treatment. On 3, 7, 14 d after treatment, the myocardial tissues of 5 rats were taken. The fluorescence quantitative PCR was performed to detect chromogranin A and adrenomedullin original middle fragment of MR-proADM mRNA transcription, and Western blot was used to measure the expression of chromogranin A and adrenomedullin original middle segment of MR-proADM. **Results** On 7, 14 d after treatment, CGA and MR-proADM mRNA and protein expression had no statistically significant difference between the treatment group and the blank group ($P>0.05$), CGA and MR-proADM mRNA and protein expression of the control group were significantly higher than those of the treatment group and the blank group ($P<0.05$). **Conclusion** Rosuvastatin can effectively decrease the expression of chromogranin A, MR-proADM mRNA transcription and protein expression in the myocardial infarcted rats.

[Key words] myocardial infarction; chromogranin A; proadrenomedullin intermediate fragments; rosuvastatin

心肌梗死是临床死亡率较高的心血管疾病,瑞舒伐他汀主要用于治疗冠心病^[1]、心绞痛^[2],对心肌梗死的治疗也有报道^[3]。为了明确瑞舒伐他汀治疗心肌梗死的临床效果,本文拟分析瑞舒伐他汀是否具有通过改变心肌梗死缺血心肌组织内嗜铬粒蛋白 A(chromogranin A, CGA)和肾上腺髓质素原中间片段(MR-proADM)表达的作用,以初步探讨瑞舒伐他汀新的药用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物

选用健康雄性 SD 大鼠 15 只,鼠龄 15~16 月,分笼饲养。大鼠体质量(614.9 ± 46.8)g,体温(38.1 ± 0.6)℃,呼吸频率每分钟(71.4 ± 4.8)次,心率每分钟(391.1 ± 29.4)次,收缩压(134.8 ± 17.5)mm Hg,舒张压(91.7 ± 12.0)mm Hg,平均动脉压(106.0 ± 12.6)mm Hg。

1.2 模型建立

10%水合氯醛 0.35 mL/100 g 经腹腔注射麻醉,然后将大鼠卧于手术台上,沿颈部中线切开皮肤,分离组织暴露气管,用 7 号注射针头作为插管以 45°斜进针从甲状软骨下缘轻轻水平插入约 0.7~1.5 cm 斜面朝上。固定好,气管插管,呼吸比为 1:2,呼吸频率每分钟 90 次,潮气量 14 mL/kg。关闭呼吸机,四肢接心电图机记录术前心电图以验证是否具有先天性变异。完毕打开呼吸机。心前区域剃毛,在心脏搏动最明显处,第三肋间隙水平开胸,皮肤切口约 1.5~2.0 cm,逐层钝性分离肌肉至胸膜。剪开胸膜,用眼科开睑器撑开肋间肌切口,以无菌棉球向下压迫左肺以保护肺脏剪开心包,用无菌棉拭子推开左心耳。在左心耳下距主动脉根部 2~3 mm 处,用 6-0 线穿过一小束心肌,并结扎。(1)结扎后左室壁变苍白,并

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81041102)。 作者简介:孙慎杰(1979—),硕士,主治医师,主要从事心血管疾病的介入治疗。

出现室壁运动减弱。(2)术中结扎成功标识:心电监护见Ⅱ导联大鼠于结扎冠状动脉后 QRS 波峰降低,J 点上移,ST 段明显抬高,证明心肌缺血存在心肌梗死。然后加大通气量,充分使肺复张,并清理胸腔。逐层关胸,断开呼吸机,清理呼吸道(拔出气管插管后应注意将大鼠舌头外提,防止舌根后坠出现缺氧窒息)并观察大鼠呼吸,以浅快呼吸,频率以每分钟 30~40 次为宜,术后单笼饲养。

1.3 分组和治疗 30 只大鼠模型分成对照组($n=15$)和治疗组($n=15$),以 15 只正常大鼠作为空白组。对照组采用生理盐水灌胃 1 周。治疗组通过灌胃,按照 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 瑞舒伐他汀进行治疗,共治疗 1 周。空白组为健康大鼠,不进行任何处理。分别在手术治疗后 3、7 d 和 14 d 取 5 只大鼠心肌组织。

1.4 荧光定量 PCR 取出不同时间(通氧前,缺氧 8 h,通氧 3 h,通氧 6 h 和通氧 9 h)各组 3 个孔的细胞,胰酶消化细胞,用 PBS 洗脱, $400\times\text{g}$ 或 $1\,700\text{ rpm}$ 离心 5 min,去上清液,收集的细胞。使用 TRIzol Reagent 试剂盒抽提细胞的总 mRNA,并用 DEPC 水定量至 $5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。使用 PrimeScript® One Step RT-PCR Kit 将总 mRNA 拟转录成 cDNA,并定量。特异性引物为:GAPDH-F 5'-TGG TGA AGG TCG GTG TGA AC-3', GAPDH-R 5'-GCT CCG GAA GAT GGT GAT GG-3';CGA F 5'-TGG TTC AGT GCT TCG GCC AC-3';CGA R 5'-CCA GCA GTG AGG TTT CCA TG-3';MR-proADM F: 5'-GCC TTT CCT ACT ACC ATT CCC-3', MR-proADM R: 5'-CATCTTATTCCTTTCCCTTCG-3';均为上海生工合成。以 GAPDH 为内参,使用 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒和伯乐 IQ5 PCR 系统扩增 cDNA 中的组织因子基因片段和 GAPDH 基因片段,反应条件设置为:95 ℃ 变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。计算每个样品 TF 和 GAPDH 的 ΔCt ,并采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法计算每个样品中 TF 的 mRNA 转录倍数。

1.5 Western blot 取出不同时间(治疗后 3、7 d 和 14 d)缺血心肌组织,按照体积重量比(V/W)=5 加入一定量的缓冲溶液(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 20 g/mL aprotinin, 20 g/mL leupeptin, 10 g/mL pepstatin A 和 150 mM benzamidine),然后用组织破碎机破碎组织,破碎后 $12\,000\text{ rpm}$ 离心 20 min 后取上清液进行电泳。使用 5% 浓缩胶和 15% 分离胶进行电泳分离,并使用电转将蛋白转至 PVDF 膜上。10% 牛奶封闭 PVDF 膜 1 h,37 ℃ 孵育一抗 1 h[CGA 抗体(ab85554),Anti-proANP(ab126881)],PBST 清洗 3 次,每次 5 min,然后用 37 ℃ 孵育二抗稀释液,并用 PBST 清洗 3 次,每次 5 min。最后用 ECL+plus™ Western blotting system kit (Amersham, 美国)配置显光液,然后使用 3490 Photo Gel Imaging Systems (Epson, 日本)拍照并记录,并用 Image Pro Plus 软件分析每个蛋白与 GAPDH 的相对量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计数资料用率表示,采用卡方检验,计量资料用采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 荧光定量 PCR 结果 应用荧光定量 PCR 检测各组大鼠心肌组织内 CGA(图 1a)和 MR-proADM(图 1b)mRNA 转录

量,结果见图 1。治疗后第 7 天和第 14 天治疗组 CGA 和 MR-proADM mRNA 与空白组差异无统计学意义,对照组 CGA 和 MR-proADM mRNA 均显著高于治疗组和空白组。说明心肌梗死大鼠心肌组织内 CGA 和 MR-proADM mRNA 转录量会升高,瑞舒伐他汀可有效降低心肌组织内 CGA 和 MR-proADM mRNA 转录量。

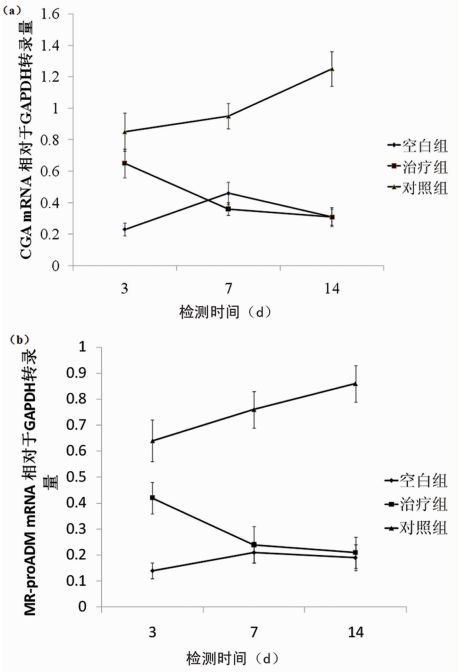


图 1 CGA 和 MR-proADM 荧光定量 PCR 结果

2.2 Western blot 结果 应用 Western blot 检测各组大鼠心肌组织内 CGA(图 2a)和 MR-proADM(图 2b)蛋白表达量,结果见图 2。治疗后第 7 天和第 14 天治疗组 CGA 和 MR-proADM 蛋白表达量与空白组差异无统计学意义,对照组 CGA 和 MR-proADM 蛋白表达量均显著高于治疗组和空白组。说明心肌梗死大鼠心肌组织内 Chromogranin A 和 MR-proADM 蛋白表达量会升高,瑞舒伐他汀可有效降低心肌组织内 Chromogranin A 和 MR-proADM mRNA 蛋白表达量。

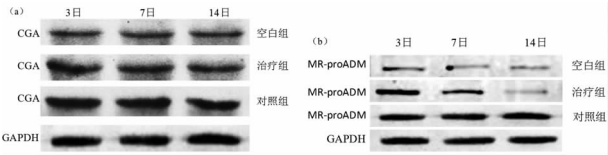


图 2 CGA 和 MR-proADM 蛋白表达量

3 讨 论

本文通过冠状动脉结扎术作急性心肌梗死大鼠模型,分析瑞舒伐他汀对心肌梗死大鼠缺血心肌组织内 CGA 和 MR-proADM 表达的影响。结果发现,治疗后第 7 天和第 14 天治疗组 CGA 和 MR-proADM mRNA 和蛋白表达量与空白组比较差异无统计学意义($P>0.05$),对照组 CGA 和 MR-proADM mRNA 和蛋白表达量均显著高于治疗组和空白组($P<0.05$)。因此,心肌梗死大鼠心肌组织内 CGA 和 MR-proADM mRNA 和蛋白表达量会升高,瑞舒伐他汀可有效降低心肌组织内 CGA 和 MR-proADM mRNA 转录和蛋白表达。所以选择研究心肌组织 CGA 和 MR-proADM 与瑞舒伐

他汀之间的关系,一方面是有大量研究报道 CGA 和 MR-proADM 与心血管疾病相关,另一方面可初步探讨瑞舒伐他汀除改变机体低密度脂蛋白(LDL)和极低密度脂蛋白(VLDL)的比例来发挥治疗心血管疾病的作用外的性的药理机制。CGA 是分布于神经内分泌系统的一类神经肽类物质^[4],在高尔基网膜上选择性调节靶肽激素和神经递质聚集,并促进高尔基网的通透性,并参与 Ca^{2+} 及儿茶酚胺代谢,已经报道与心血管疾病有相关性^[5-6]。MR-proADM 是一种急性心肌梗死患者预后标志分子,该分支的检测可以有效地评价心肌梗死进展及治疗后预后情况^[7-8]。瑞舒伐他汀目前已经应用于临床,主要适应证为冠心病^[9]、高胆固醇血症^[10]、血脂异常^[11-14]等心血管疾病,该药物是一种选择性 HMG-CoA 还原酶抑制剂,其药理作用是通过增加肝细胞表面 LDL 受体而促进肝脏对 LDL 的吸收,并且通过抑制 HMG-CoA 还原酶而抑制 VLDL 的合成,进行改变机体 LDL 和 VLDL 的比例来发挥治疗心血管疾病的作用。本文可初步得出瑞舒伐他汀可用于治疗心肌梗死,并且可能是通过降低心肌组织内 CGA 和 MR-proADM mRNA 转录和蛋白表达来发挥作用。

虽然本文已经明确了瑞舒伐他汀可有效降低心肌组织内 CGA 和 MR-proADM mRNA 转录和蛋白表达,但瑞舒伐他汀与 CGA 和 MR-proADM 的直接相关性还不能下结论,需要通过在细胞水平进一步去验证,并且通过过表达 CGA 和 MR-proADM 来评价是否可逆转瑞舒伐他汀的作用,以及明确 CGA 和 MR-proADM 相互关系,以进一步深入探讨瑞舒伐他汀治疗心肌梗死的新的药理机制。

参考文献

- [1] Pinheiro LF, Franca CN, Izar MC, et al. Pharmacokinetic interactions between clopidogrel and rosuvastatin; effects on vascular protection in subjects with coronary heart disease[J]. Int J Cardiol, 2012, 158(1): 125-129.
- [2] Kim JW, Yun KH, Kim EK, et al. Effect of high dose rosuvastatin loading before primary percutaneous coronary intervention on infarct size in patients with ST-segment elevation myocardial infarction[J]. Korean Circ J, 2014, 44(2): 76-81.
- [3] Ko YG, Won H, Shin DH, et al. Efficacy of early intensive rosuvastatin therapy in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention (ROSEMARY Study)[J]. Am

- J Cardiol, 2014, 114(1): 29-35.
- [4] Goetze JP, Alehagen U, Flyvbjerg A, et al. Chromogranin a as a biomarker in cardiovascular disease[J]. Biomark Med, 2014, 8(1): 133-140.
- [5] Krauss DJ, Amin M, Stone B, et al. Chromogranin A staining as a prognostic variable in newly diagnosed Gleason score 7-10 prostate cancer treated with definitive radiotherapy[J]. Prostate, 2014, 74(5): 520-527.
- [6] Giovinazzo F, Schimmack S, Svejda B, et al. Chromogranin a and its fragments as regulators of small intestinal neuroendocrine neoplasm proliferation[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81111.
- [7] 屈晓旋, 齐永芬. 肾上腺髓质素前体中间片段——急性心肌梗死患者预后标志分子[J]. 生理科学进展, 2008, 38(3): 246.
- [8] Miller L, Chartrand S, Koenig M, et al. Left heart disease: a frequent cause of early pulmonary hypertension in systemic sclerosis, unrelated to elevated NT-proBNP levels or overt cardiac fibrosis but associated with increased levels of MR-proANP and MR-proADM; retrospective analysis of a French Canadian cohort[J]. Scand J Rheumatol, 2014, 43(4): 314-323.
- [9] 殷宇刚, 王滨. 瑞舒伐他汀对冠状动脉支架植入术后再狭窄以及血脂和炎症因子的影响[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(2): 227-228.
- [10] 瑞舒伐他汀中国注册临床研究协作组. 瑞舒伐他汀治疗中国高胆固醇血症患者疗效和安全性的随机双盲多中心对照研究[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(3): 207-211.
- [11] 谭绍云. 瑞舒伐他汀与阿托伐他汀对 ACI 并高脂血症、CAS 患者血脂及 CAS 斑块的疗效比较[J]. 山东医药, 2014, 54(21): 55-57.
- [12] 许官学, 石蓓, 盛瑾, 等. 改良大鼠急性心肌梗死模型的制备方法[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(14): 3367-3370.
- [13] 张云, 王阶, 郭丽丽, 等. 活血安心方减轻急性心肌梗死大鼠心肌过氧化损伤的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(10): 1356-1360.
- [14] 张新梅, 胡允兆, 陈样新, 等. 急性心肌梗死住院死亡危险因素分析[J]. 广东医学, 2013, 34(2): 260-263.

(收稿日期: 2014-12-08 修回日期: 2015-02-16)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号: ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。