

阿托伐他汀对高胆固醇兔心肌线粒体能量代谢的影响

曲润波¹, 鹿育萨², 龚飞宇¹

(1. 山西医科大学第二医院, 山西省太原市 030001; 2. 山西医学科学院山西大医院, 山西省太原市 030001)

[关键词] 高胆固醇血症; 心肌线粒体; 氧化磷酸化; 阿托伐他汀

[摘要] **目的** 探讨阿托伐他汀对高胆固醇血症兔心肌能量代谢的干预作用。**方法** 24 只健康雄性新西兰兔随机分成正常对照组、高胆固醇组和阿托伐他汀组(予高胆固醇饮食并给与阿托伐他汀处理)。喂养 6 周后, 经兔耳缘静脉取空腹血标本测血清总胆固醇的浓度; 取心肌组织, 电镜观察心肌及线粒体超微结构改变; 用高效液相色谱法测心肌线粒体 ATP 和辅酶 Q₁₀ 含量; 用紫外分光光度法测线粒体呼吸链复合物 II、IV 的活性。**结果** 高胆固醇组心肌纤维排列紊乱, 部分断裂、溶解, 线粒体肿胀, 嵴紊乱、模糊, 与正常对照组比较, 线粒体呼吸链复合物 II、IV 活性下降, 线粒体 ATP、辅酶 Q₁₀ 含量减少($P < 0.01$); 阿托伐他汀组与高胆固醇组比较, 呼吸链复合物 II、IV 活性升高($P < 0.01$), 线粒体 ATP、辅酶 Q₁₀ 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 阿托伐他汀可减轻高胆固醇血症导致的心肌及线粒体结构损伤, 升高线粒体内膜呼吸链复合物 II、IV 活性, 进而改善线粒体氧化磷酸化能力。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Atorvastatin on Myocardial Energy Metabolism in Rabbits with Hypercholesterolemia

QU Run-Bo¹, LU Yu-Sa², and GONG Fei-Yu¹

(1. Department of Cardiology, the Second Hospital of Shanxi Medical University; 2. Shanxi Large Hospital, Shanxi Medical Science Academy, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Hypercholesterolemia; Myocardial Mitochondria; Oxidative Phosphorylation; Atorvastatin

[ABSTRACT] **Aim** To observe the intervention of atorvastatin on myocardial energy metabolism in rabbits with hypercholesterolemia. **Methods** Twenty-four male New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: control group, cholesterol group, atorvastatin treated group fed with cholesterol. After feeding for 6 weeks, the empty stomach blood preparation through ear marginal vein were collected, the levels of serum total cholesterol were determined; the myocardium was taken to observe its ultrastructures by electron microscopy; High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to measure myocardial mitochondria ATP and CoQ₁₀; Ultraviolet spectrophotometry was used to measure the activities of SDH and CCO. **Results** In cholesterol group there were myocardial fibers derangement, part of the fracture, dissolution, mitochondria swelling, crest disturbance, fuzzy, and Comparing with control group, the activities of SDH and CCO were significantly decreased, the content of myocardial mitochondria ATP and CoQ₁₀ was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with cholesterol group, the activities of SDH and CCO in atorvastatin treated group were increased ($P < 0.01$), and comparing the content of myocardial mitochondria ATP and CoQ₁₀, there was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Atorvastatin may reduce structure damage of myocardial mitochondrial cause by hypercholesterolemia, increase the activities of SDH and CCO, thereby improve the oxidative phosphorylation capacity of mitochondrial.

高胆固醇血症作为动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和冠心病(coronary heart disease, CHD)的独立危险因素^[1-3], 一直是国内外研究的重点。目前,

关于高胆固醇血症对心血管系统影响的研究主要集中在其对血管内皮功能、血管炎症性损伤、血液流变学、心脏电生理等方面, 而关于高胆固醇血症对

[收稿日期] 2011-11-18

[基金项目] 山西省回国留学人员科研资助项目(2010-59)

[作者简介] 曲润波, 硕士研究生, E-mail 为 449154568@qq.com. 通讯作者鹿育萨, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压与心脑血管疾病, E-mail 为 lystysx@126.com. 龚飞宇, 硕士研究生, E-mail 为 834110874@qq.com.

心肌能量代谢影响的相关报道比较少见。目前,他汀类药物是临床上用于降低胆固醇和抗动脉粥样硬化的重要一线药物^[4]。自1994年第一项应用他汀类药物治疗冠心病的临床试验即北欧辛伐他汀生存研究(4S)以来,已有大量临床试验^[5-7]证明长期使用他汀类药物可预防冠状动脉疾病的发生,减少心血管事件发生率,具有降脂外的心脏保护作用。本研究参考相关文献^[8,9]通过高脂饮食建立高胆固醇血症模型,观察高胆固醇状态下兔心肌及线粒体超微结构改变,探讨他汀类药物对心肌超微结构损伤和心肌能量代谢的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24只健康2月龄雄性新西兰白兔,体重 2.0 ± 0.2 kg,购自山西省农业科学院畜牧兽医研究所实验兔场。

1.2 药物及试剂

阿托伐他汀(立普妥)购自辉瑞制药有限公司(批号054610K)。胆固醇购自成都科龙化工试剂厂(批号20100408)。线粒体提取试剂盒购自生工生物工程有限公司(编号BSP051)。线粒体呼吸链复合物II、IV试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司(编号GMS5008v. A、GMS50010v. A)。总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)试剂盒购自南京建成生物工程有限公司。无水乙醇购自天津四友精细化学品有限公司,甲醇、异丙醇、正己烷购自天津大茂化学试剂公司。

1.3 仪器

LD5-2A型低速离心机(北京医用离心机厂);721E紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司);JEM-1011透射电镜(日本电子仪器公司)。岛津LC-10AD型色谱仪;迪马C18色谱柱(250×4.6 mm, 5 μ m)。

1.4 实验分组与给药方法

24只健康雄性新西兰白兔,采用单笼饲养,自由饮水。适应性喂养1周后进入实验。采用随机数字法将动物分为3组:①正常对照组:给予普通颗粒兔饲料(100 g/d);②高胆固醇组:每日清晨给予高胆固醇饲料(1%胆固醇+99%普通颗粒兔饲料);③阿托伐他汀组:每日清晨饲喂混有药物的饲料(1%胆固醇、2.5 mg/kg阿托伐他汀混合少许萝卜

丝,待兔进食完后再给予普通饲料)。不限制饮水,共饲养6周。每2周测量全部兔体重1次,观察兔的活动、进食及皮毛状态。

1.5 血脂检测

于6周末,在清醒状态下经兔耳缘静脉取空腹血标本,离心(3000 r/min, 10 min),留取血清-20℃冻存,在日本日立7160全自动生化分析仪上测定TC、TG、LDLC的浓度。

1.6 心肌及线粒体标本的采集

第6周末,20%乌拉坦5 mg/kg处死动物,快速切取一块心尖部心肌组织,其中1 mm×1 mm×1 mm大小的组织置于固定液中,用于制作电镜切片以观察心肌及线粒体结构改变,其余心肌组织即刻于-70℃冰箱中冻存用于提取线粒体。2%戊二醛固定,常规电镜样品制备,环氧树脂618包埋,超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅双染色,JEM-1011透射电镜观察。心肌线粒体的分离按照试剂盒操作步骤进行,并用考马斯亮蓝染色法进行蛋白质定量。

1.7 线粒体ATP和辅酶Q₁₀含量及呼吸链复合物II、IV活性测定

线粒体呼吸链复合物II、IV活性按照试剂盒说明书用紫外分光光度法测定。心肌线粒体ATP、辅酶Q₁₀含量用高效液相色谱法测定,色谱条件分别为:迪马C18色谱柱(5 μ m, 250 mm×4.6 mm)流动相为50 mmol/L磷酸盐(150 mmol/L KH₂PO₄, 150 mmol/L KCl, pH 6.0),流速1 mL/min,紫外检测波长254 nm,柱温25℃,样品进样体积20 μ L,实验采用外标法测定;迪马C18色谱柱(5 μ m, 250 mm×4.6 mm)流动相为甲醇:异丙醇:无水乙醇(15:40:45),流速1 mL/min,紫外检测波长275 nm,柱温35℃,样品进样体积20 μ L,实验采用外标法测定。

1.8 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件处理数据。数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物死亡情况

实验第2周,高胆固醇组中1只兔死于腹泻。

2.2 血脂水平

各组兔喂养胆固醇之前血清TC、TG、LDLC浓度均正常,三组间差异无显著性($P > 0.05$);6周后高胆固醇组兔血清TC、TG、LDLC浓度升高,与正常对照组比较差异有显著性($P < 0.01$),而阿托伐他

汀组兔血清 TC、TG、LDLC 浓度较喂养前亦升高,但与高胆固醇组比较显著下降($P < 0.01$;表 1)。根据动物模型判定标准^[10]:兔血清 TC < 3 mmol/L 为正常, > 10 mmol/L 为高胆固醇血症,可见本实验模型复制成功。

表 1. 血脂检测结果 (mmol/L)

Table 1. The levels of serum lipid

| 分 组 | 时 间 | TC | TG | LDLC |
|--------|-----|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | 0 周 | 1.15 ± 0.08 | 0.83 ± 0.05 | 0.47 ± 0.21 |
| | 6 周 | 1.75 ± 0.16 | 0.87 ± 0.03 | 0.45 ± 0.21 |
| 高胆固醇组 | 0 周 | 1.17 ± 0.02 | 0.80 ± 0.03 | 0.51 ± 0.14 |
| | 6 周 | 13.74 ± 1.73 ^a | 3.24 ± 1.83 ^a | 10.07 ± 0.20 ^a |
| 阿托伐他汀组 | 0 周 | 1.16 ± 0.05 | 0.85 ± 0.10 | 0.39 ± 0.09 |
| | 6 周 | 2.28 ± 0.20 ^b | 1.64 ± 0.54 ^b | 1.37 ± 0.29 ^b |

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与高胆固醇组比较。

2.3 心肌及线粒体透射电镜结果

电镜下可见正常对照组心肌纤维排列规整,线粒体形态正常,嵴密集,嵴膜清晰;高胆固醇组心肌纤维排列紊乱,可见部分肌原纤维断裂、溶解,线粒体明显肿胀,嵴紊乱、模糊,数量减少。阿托伐他汀组心肌纤维排列整齐,可见闰盘,线粒体稍肿胀(图 1)。

2.4 线粒体呼吸链复合物 II、IV 活性

与正常对照组相比,高胆固醇组和阿托伐他汀组线粒体呼吸链复合物 II、IV 活性明显下降($P < 0.01$);与高胆固醇组相比,阿托伐他汀组复合物 II、IV 活性明显升高($P < 0.01$;表 2)。

2.5 线粒体 ATP 和辅酶 Q₁₀ 含量

与正常对照组相比,高胆固醇组和阿托伐他汀组 ATP、辅酶 Q₁₀ 含量明显减少($P < 0.01$);但阿托伐他汀组与高胆固醇组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$;表 2)。

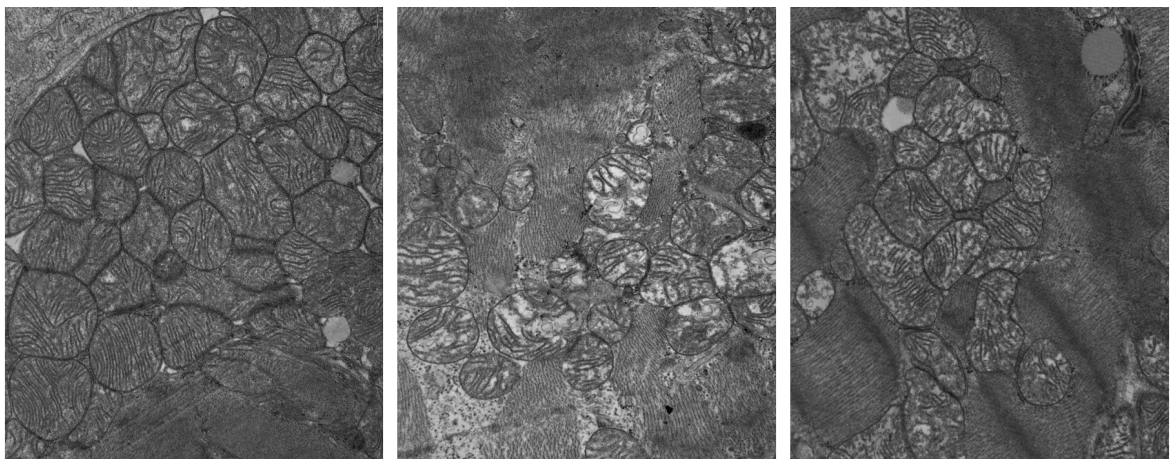


图 1. 线粒体电镜结果 ($\times 25000$) 左为正常对照组,中为高胆固醇组,右为阿托伐他汀组。

Figure 1. Myocardial mitochondria ultrastructures by electron microscopy

表 2. 线粒体呼吸链复合物 II、IV 活性及 ATP 和辅酶 Q₁₀ 含量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The activities of SDH and CCO, content of ATP and CoQ₁₀ in myocardial mitochondria

| 分 组 | n | 复合物 II 活性 (mmolDCPIP/min \times g) | 复合物 IV 活性 (mmolDCPIP/min \times g) | ATP 含量 (mg/L) | 辅酶 Q ₁₀ 含量 (mg/L) |
|--------|---|---|---|--------------------------|------------------------------|
| 正常对照组 | 8 | 12.95 ± 0.99 | 6.65 ± 0.95 | 0.44 ± 0.06 | 0.25 ± 0.04 |
| 高胆固醇组 | 7 | 5.39 ± 0.53 ^a | 1.89 ± 0.26 ^a | 0.17 ± 0.05 ^a | 0.09 ± 0.02 ^a |
| 阿托伐他汀组 | 8 | 9.12 ± 1.19 ^{ab} | 4.61 ± 0.52 ^{ab} | 0.16 ± 0.04 ^a | 0.07 ± 0.02 ^a |

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与高胆固醇组比较。

3 讨 论

近年来,人们越来越重视心肌能量代谢在缺血性心肌病发生、发展中的作用^[11,12]。大量研究资料

表明,90% 以上的缺血性心脏病是由于冠状动脉粥样硬化引起的,而高胆固醇血症是动脉硬化形成的物质基础。2010 年完成的第四次中国居民营养与健康现状调查结果显示,我国成人高胆固醇血症患

病率为 2.9%,按 2010 年我国人口的数量和结构,估算目前我国高胆固醇血症总患病人数已达 0.4 亿,我国面临高胆固醇血症的严峻形势。目前,他汀类药物是临床上用于降低胆固醇和抗动脉粥样硬化的重要一线药物。因此研究阿托伐他汀对高胆固醇血症心肌能量代谢的影响具有重要的临床意义。

正常情况下,心肌细胞通过线粒体有氧化产生高能磷酸化合物 ATP 来维持正常机械活动即心功能。心肌富含线粒体,约占细胞总数的 25% ~ 35%,线粒体是心肌产能中枢。其中氧化磷酸化系统是线粒体合成 ATP 的关键部位,由 5 个复合物组成,即 NADH₂ 泛醌还原酶(复合物 I)、琥珀酸-泛醌还原酶(复合物 II)、泛醌-细胞色素 C 还原酶(复合物 III)、细胞色素 C 氧化酶(复合物 IV)和 ATP 合成酶(复合物 V)。

胆固醇合成过程中,以葡萄糖、氨基酸及脂肪酸在线粒体内的分解代谢产物乙酰辅酶 A (CoA) 为合成原料,3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶使乙酰 CoA 合成的 HMG-CoA 还原成甲羟戊酸,此为胆固醇合成过程中的限速环节。他汀类药物是 HMG-CoA 还原酶抑制剂,此类药物通过竞争性抑制内源性胆固醇合成限速(HMG-CoA)还原酶,阻断细胞内甲羟戊酸(MVA)代谢途径,使细胞内胆固醇合成减少,从而反馈到细胞膜表面(主要为肝细胞),LDL 受体数量增加使血清胆固醇清除增加,水平降低。他汀类药物还可抑制肝脏合成脂蛋白 B2100,从而减少富含甘油三酯脂蛋白分泌和合成,通过上述机制,最终使血清 TC 水平下降,TG 水平也有一定程度降低^[13]。

本研究通过高脂饮食饲养法建立高胆固醇血症模型,观察阿托伐他汀对高胆固醇兔心肌线粒体能量代谢的影响。电镜检查结果显示:高胆固醇组表现为心肌纤维排列紊乱,部分肌原纤维断裂、溶解,线粒体肿胀,嵴紊乱、模糊,数量减少;阿托伐他汀组心肌纤维排列整齐,可见闰盘,线粒体稍肿胀。紫外分光光度法显示:与高胆固醇组相比,阿托伐他汀组复合物 II、IV 活性明显升高。证实阿托伐他汀可以抑制高胆固醇血症导致的心肌线粒体结构损伤,同时改善由于线粒体结构损伤引起的复合物活性下降,上述结果可能与阿托伐他汀类抗氧化作用有关。有研究表明,他汀类不但可以抑制 LDL 氧化,还可以减少巨噬细胞摄取 LDL 的能力^[14]。其他作者相继证实他汀类药物可抑制巨噬细胞产生超氧阴离子,减少氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的

生成,抑制巨噬细胞表达清道夫受体及组织因子,减少 ox-LDL 的摄取^[15,16],从而减轻 ox-LDL 导致的线粒体氧化损伤。

阿托伐他汀通过抑制 HMG-CoA 还原酶来抑制 HMG-CoA 转变为甲羟戊酸,后者是合成胆固醇和辅酶 Q₁₀(CoQ₁₀)的共同前体,因此他汀类药物在抑制胆固醇合成的同时也抑制 CoQ₁₀ 的生成^[17,18],可能对心功能的改善产生负面影响。本研究发现,与正常对照组相比,高胆固醇组 ATP、辅酶 Q₁₀ 含量明显减少,阿托伐他汀组与高胆固醇组相比,差异无统计学意义。证实高胆固醇减少心肌线粒体 CoQ₁₀ 及 ATP 生成,阿托伐他汀改善胆固醇对能量代谢的影响不明显,可能与阿托伐他汀抑制胆固醇合成的同时也抑制 CoQ₁₀ 的生成有关。

本研究初步证实了高胆固醇血症可导致心肌超微结构改变及线粒体能量代谢障碍,阿托伐他汀可减轻高胆固醇血症导致的心肌线粒体结构损伤,升高线粒体内膜呼吸链复合物 II、IV 活性,进而改善线粒体氧化磷酸化能力,具体机制有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Austin MA. Epidemiology of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease[J]. Am J Cardiol, 1999, 83: 166.
- [2] Kelm M. The L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension[J]. Curr Hypertens Rep, 2003, 5(1): 80-86.
- [3] Ikonen E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease[J]. Physiol Rev, 2006, 86(4): 1 237-261.
- [4] Haider DG, Baghestanian M. HMG-CoA-reductase inhibitors/statins: an improval for patients suffering from peripheral vascular disease[J]. Aus J Cardiol, 2004, 11(3): 84-89.
- [5] Vasa M, Fichtlscher S, Alder K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease [J]. Circulation, 2001, 103(24): 2 885.
- [6] Bell RM, Yellon DM. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(3): 508.
- [7] Steinberg D, Glass CK, Witztum JL, et al. Evidence mandating earlier and more aggressivet reatment of hypercholesterolemia[J]. Circulation, 2008, 118(6): 672-677.
- [8] Anathanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, et al. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the far nesoid X receptor/bile acid receptor[J]. Biol

- Chem, 2001, 276(31): 28 857-865.
- [9] 崇爱国, 刘伏元, 许明生, 等. 兔动脉粥样硬化形成过程中血管平滑肌层肉碱棕榈酰转移酶 mRNA 表达下调 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15: 618-621.
- [10] 苏敬东, 李世俊, 赵浩亮. 咖啡因预防家兔胆囊结石形成的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 1994, 11(1): 27-28.
- [11] Wolff AA, Rotmensch HH, Stanley WC, et al. Metabolic approaches to the treatment of ischemic heart disease: the clinicians' perspective [J]. Heart Fail Rev, 2002, 7(2): 187-203.
- [12] Lopaschuk GD. Optimizing cardiac energy metabolism: how can fatty acid and carbohydrate metabolism be manipulated [J]. Coron Artery Dis, 2001, 12: 8-11.
- [13] Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Pravastatin or atorvastatin evaluation and infection therapy thrombolysis in myocardial infarction 22 investigators intensive, versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes [J]. N Engl J Med, 2004, 350(15): 1 495-504.
- [14] Bellosta S, Via D, Canavesi M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18(11): 1 671-678.
- [15] Li D, Chen H, Romeo F, et al. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1 [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 302(2): 601-605.
- [16] Li DY, Chen HJ, Mehta JL. Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation [J]. Cardiovasc Res, 2001, 52(1): 130-135.
- [17] Colquhoun DM, Jackson R, Walters M, et al. Effects of simvastatin on blood lipids, vitamin E, coenzyme Q₁₀ levels and left ventricular function in humans [J]. Eur J Clin Invest, 2005, 35(4): 251-258.
- [18] Rosenfeldt F, Marasco S, Lyon W, et al. Coenzyme Q₁₀ therapy before cardiac surgery improves mitochondrial function and in vitro contractility of myocardial tissue [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 129(1): 25-32.
- (此文编辑 许雪梅)