论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1353-03

替米沙坦与福辛普利对心肌梗死后大鼠心脏血管紧张素转换酶2的影响

王 玺,成小凤,陈 明
(重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察替米沙坦与福辛普利对心肌梗死后大鼠心脏血管紧张素转换酶2(Angiotensin-convertion enzyme 2,ACE2)的影响。方法:结扎大鼠冠状动脉左前降支制作急性心肌梗死模型;将45只SD大鼠随机分为假手术组,心肌梗死组,替米沙坦组,福辛普利组,替米沙坦与福辛普利联用组;手术前后各用药2周;免疫组化检测梗死后2周ACE2蛋白表达;RT-PCR检测梗死后2周ACE2 mRNA表达。结果:心肌梗死后2周ACE2蛋白表达显著增加,替米沙坦,福辛普利组ACE2蛋白的表达进一步增加,联合用药组蛋白表达水平低于单药组)。心肌梗死后2周ACE2 mRNA未见明显增加,替米沙坦组ACE2 mRNA表达显著增加,福辛普利组和联用药组ACE2 mRNA表达未见明显增加。结论:替米沙坦,福辛普利均能增加心肌梗死后大鼠心脏ACE2的表达,联合用药不比单用更能增加ACE2的表达。

【关键词】心肌梗死;替米沙坦;福辛普利;ACE2
【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-26

Effect of telmisartan and fosinopril on the expression of angiotensin-convertion enzyme 2 in cardiomyocyte after myocardial infarction

WANG Xi, et al
(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of telmisartan and fosinopril on the expression of angiotensin-convertion enzyms 2 (ACE2) in cardiomyocyte after myocardial infarction. *Methods*: Animal model of acute myocardial infarction were established by ligating the left anterior descending coronary artery of rats. Vehicle, telmisartan, fosinopril, or both drugs combined were given to rats by intubation feeding, from 2 weeks before coronary artery ligation to 2 weeks there after. ACE2 protein expression of myocardium were semi-quantified by SP immunohistochemistry. ACE2mRNA were measured by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-RCR). *Results*: Compare with sham operated group, ACE2 protein increased significantly in infarction group, but not the ACE2 mRNA. telmisartan and fosinopril therapy caused a significant increase in ACE2 protein compare to infarction group, but only telmisartan caused a significant increase in ACE2 mRNA though all therapied groups showed higher ACE2 mRNA expression. *Conclusion*: Both telmisartan and fosinopril induced increases in cardiac ACE2 exprssion, whereas the combination of these two drugs do not associated with higher ACE2 expression.

【Key words】 Myocardial infarction; Telmisartan; Fosinopril; ACE2

肾素-血管紧张素-醛固酮系统(Renin-angiotensin-aldosterone system,RAAS) 过度激活是心肌梗死后血流动力学紊乱、心脏重构的重要原因,并最终导致心力衰竭。基础及临床实验均证实RAAS阻断剂在病理状态下对心脏起保护作用。血管紧张素转换酶2(Angiotensin-convertion enzyme 2,ACE2)是新发现的血管紧张素转换酶(Angiotensin-convertion enzyme,ACE)同系物,可抑制氧化应激,炎症反应,保护心脏功能[1,2]。研究发现 ACE2 与血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ,Ang Ⅱ)在表达上相互影响[3,4],血管紧张素Ⅱ受体1拮抗剂(Angiotensin Ⅱ receptor 1 blocker,ARB)和血管紧张素转换酶抑制剂(Angiotensin converting enzyme inhibitor,ACEI)拮抗Ang Ⅱ,能否影响心肌梗死后ACE2的表达尚不清楚。在肾脏病中,ARB与ACEI联用比单用更能保护肾功能;在心脏疾病中,两药联用是否比单用更有利。尚有争议,需要更多实验依据。本实验观察替米沙坦与福新普利对

作者介绍:王 玺(1982-),女,住院医师,硕士,研究方向:冠心病、心力衰竭。
通讯作者:陈 明,男,教授,E-mail: chenmingcq@126.com。

心肌梗死后心脏ACE2蛋白及基因表达的影响，比较两药联用是否比单用更能影响ACE2的表达。

1 对象与研究

1.1 研究对象

SD雄性大鼠，体重180~200 g，购于中国人民解放军第三军医大学大坪医院动物科学实验中心。

1.2 主要试剂及材料

ACE2抗体（Santa Cruz公司）；SP免疫试剂盒（北京中杉生物技术公司）；病理影象多媒体图文操作系统（GD-8型 成都金盘电子科大多媒体技术有限公司）；总RNA抽提试剂盒（Trizol试剂盒）（上海华舜生物工程有限公司有限公司）；RT-PCR试剂盒（Takara公司）；ACE2引物及内参基因引物设计及合成（上海博亚生物技术有限公司），引物序列ACE2：上游引物5'-CAGAATGCGACCATCAAGCG-3'，下游引物5'-CTGGCTCAGTCAGCATGGAG-3'，目的片断：734 bp，β肌动蛋白（β-actin）：上游引物5'-GTCAGAAGGACTCCTACGTG-3'，下游引物5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAATC-3'，目的片断：825bp；PCR仪（ennendorf Mastercycler德国）；紫外分光光度仪（Bio-RAD美国）；全自动凝胶成像系统（Bio-RAD 美国）；替米沙坦（上海勃林格殷格翰药业）；福新普利（上海施贵宝）。

1.3 实验设计与分组

本实验分为假手术组（C），心肌梗死组（M），替米沙坦组（T），福新普利组（F），联用药组（T+F），每组9只。用药组结扎冠脉前2周分别管饲法给予替米沙坦1 mg/(kg·d)，福新普利10 mg/(kg·d)，替米沙坦1 mg/(kg·d)和福新普利10 mg/(kg·d)，至结扎后2周。手术后2周所有大鼠取心脏，4℃预冷的DEPC处理的生理盐水漂洗，切去右心及左房，仅保留左室，部分剪碎放入液氮保存，用于RT-PCR，部分浸泡于10%多聚甲醛液固定24 h后组织块常规脱水、石蜡包埋、切片，用于免疫组化。

1.4 ACE2蛋白表达

用SP免疫组织化学方法染色检测。每个标本取4张切片，每个切片取5个视野计算平均光密度值。

1.5 ACE2 mRNA检测

取左室心肌组织100 mg，用Trizol试剂盒抽提总RNA，各RNA样本A_{260}/A_{280}的比值在1.8~1.97之间，取5 μg总RNA用RT-PCR试剂盒作逆转录和扩增反应。ACE2反应条件：94℃ 3 min 首次循环，94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，共32个循环，结束前72℃ 10 min，4℃ 5 min。内参反应条件：94℃ 3 min 首次循环，94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，共28个循环，结束前72℃10 min，4℃ 5 min。PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳，用全自动凝胶成像分析系统对凝胶成像，用ImageMaster Totall Lab V1.11分析电泳条带灰度积分，以β-actin的灰度积分作为标准校正。以ACE2PCR产物相对量=ACE2电泳条带灰度积分/β-actin电泳条带灰度积分进行半定量分析。

1.6 统计学方法

资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，数据采用SPSS11.5软件处理，各组间采用方差分析和q检验，以$P<0.05$为有统计学意义。

2 结 果

2.1 心肌梗死后2周各组ACE2蛋白表达变化

心肌梗死组ACE2蛋白表达显著高于假手术组，替米沙坦，福辛普利及联用药组表达进一步增加，见表1。（ACE2蛋白平均光密度=阳性积分光密度/管壁面积）

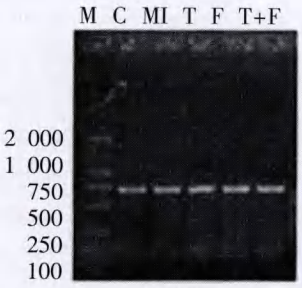
表1 心肌梗死后14 d各组心肌ACE2蛋白表达

分组	光密度值（OD/μm²）
Sham	0.005 3±0.001 4■●▲◆
AMI	0.017 4±0.003 9★●▲◆
Telmisartan	0.036 5±0.009 9★■▲◆
Fosinopril	0.029 5±0.004 1★■●
Combination	0.027 4±0.004 6★■●

注：★$P<0.05$ 与假手术组；■$P<0.05$ 与梗死组；●$P<0.05$ 与替米沙坦组；▲$P<0.05$ 与福辛普利组；◆$P<0.05$ 与联用药组

2.2 心肌梗死后2周各组ACE2mRNA表达变化

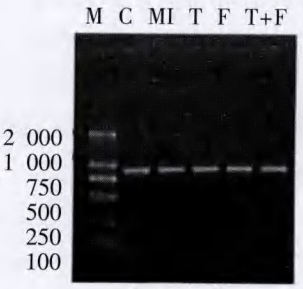
心肌梗死后2周心肌梗死组ACE2mRNA未见明显增加，替米沙坦组ACE2mRNA表达显著增加，福辛普利和联用药组ACE2mRNA表达亦增加，但差异没有显著性。见图1、2及表2。



ACE2

M. maker；C. 假手术组；MI. 心肌梗死组；T. 替米沙坦组；F. 福辛普利组；T+F.联合用药组

图1 ACE2mRNA 表达



beta-actin

M. maker；C. 假手术组；MI. 心肌梗死组；T. 替米沙坦组；F. 福辛普利组；T+F. 联合用药组

图2 beta-actin mRNA 表达

表2 心肌梗死后14 d各组心肌ACE2 mRNA表达

分组	光密度比值(ACE2/belta-actin)
Sham	0.67±0.06
AMI	0.68±0.05
Telmisartan	0.88±0.15 *■◆
Fosinopril	0.79±0.08
Combination	0.72±0.11

注：*P<0.05 与假手术组相比较；■P<0.05 与梗死组相比较；◆P<0.05 与 联用药组相比较

3 讨 论

RAAS系统过度，持续激活是心肌梗死后血流动力学紊乱、心脏重构的重要原因，并最终导致心力衰竭。ACE2是ACE的同系物，在心脏高表达，能分解Ang Ⅱ生成血管紧张素(1~7)(Angiotensin1~7,Ang1~7)[1]。研究发现ACE2基因敲除的小鼠心脏收缩功能显著下降[3]，血浆和心脏Ang Ⅱ水平明显增加，氧化应激和炎症反应亦增加[2]，而ACE,ACE2双基因敲除的小鼠表现出正常心功能[3]。因此目前认为ACE2与RAAS系统可相互影响，对心功能起保护作用。本实验观察到心肌梗死后14 d大鼠心脏ACE2 mRNA没有增加，但是ACE2蛋白表达显著增加，基因表达水平与蛋白质表达不平行。Carlos M.Ferrario等在研究RAAS阻断剂对高血压大鼠心脏ACE2表达的影响时亦发现ACEI与ARB联用时ACE2mRNA不增高，但是ACE2蛋白活性增高，其机制不明[6]。已有的研究发现心肌梗死后第3 d梗死区ACE2mRNA开始显著增高，而远离梗死区在第28 d才见到显著增加[5]，本实验检测ACE2mRNA时没有区分梗死区与非梗死区，这也可能是本实验在心肌梗死后14 d没有见到ACE2mRNA有显著增高的原因，延长观察时间可能会见到ACE2mRNA增加。心肌梗死后ACE2蛋白表达增加说明心肌梗死不仅激活RAAS，亦激活了ACE2-Ang(1~7)通路。

目前ACEI被推荐用于心肌梗死患者，而关于ARB对心肌梗死患者预后的影响还有争议[7]。基础研究发现RAAS阻断剂能抑制心肌细胞肥大，纤维化及凋亡，抑制心肌细胞亚细胞重构[8]和电重构[9]，对心脏起到保护作用，而其中机制复杂，目前仍未完全明了，要比较ACEI与ARB的优劣需要更多的临床及基础研究依据。本实验发现替米沙坦显著增加心肌梗死后心脏ACE2mRNA，福辛普利与联用药组ACE2mRNA亦增加，但未达统计学显著性，3个用药组ACE2蛋白表达均显著增加，说明RAAS通路激活可能抑制ACE2的表达，在Tallant EA等人的实验中就发现Ang Ⅱ会下调体外培养的心肌细胞和心脏成纤维细胞ACE2的表达[4]。替米沙坦，福辛普利阻断Ang Ⅱ对Ang Ⅱ受体1(Angiotensin Ⅱreceptor 1,AT1)的作用，这可能是两药增加心肌梗死后大鼠ACE2表达的机制。在本实验的3个用药组中，替米沙坦组ACE2m RNA和蛋白表达都显著高于另两组，在Carlos M. Ferrario等的研究中，氯沙坦增加ACE2基因表达和蛋白活性，而赖诺普利仅增加ACE2基因表达，不增加蛋白活性，其结果与本实验部分一致。由此看来ARB对ACE2的影响似乎强于ACEI，可能因为ARB较ACEI更全面地阻断Ang Ⅱ对AT1的作用，另外Ang1~7主要通过ACE分解代谢，应用ACEI后Ang1~7分解减少，可能对ACE2产生反馈抑制，从而抵消了部分ACEI增高ACE2的作用，但目前尚没有实验证实Ang1~7确能抑制ACE2的表达，因此关于ARB于ACEI影响ACE2表达的机制还需要更深入的研究。

ARB与ACEI联用能更全面阻断RAAS，理论上两药联用应具有更强的保护作用，临床试验发现两药联用较单用更能保护肾功能，而在心脏，各试验结论却不一致，造成这样结果的机制目前还不清楚。在本实验中替米沙坦与福辛普利联用组ACE2蛋白和基因的表达均低于单用药组，这与Carlos M.Ferrario等的研究结果一致，他们发现在高血压大鼠模型，赖诺普利与氯沙坦联用不比单药更能增加ACE2蛋白活性，联用药组ACE2基因表达水平与安慰剂组相同。在肾脏Ferrario CM等[10]也得到类似的结果，在高血压大鼠，赖诺普利与氯沙坦单用增加ACE2蛋白活性，联用没有这样的作用。由此推断ARB与ACEI单用可能比联用更能增加ACE2的基因表达和(或)蛋白活性，因此ARB与ACEI联用虽然更全面阻断了Ang Ⅱ-AT1，但RAAS系统成份复杂，影响因素众多，就现有的依据尚不能得出联合用药优于单独用药。

本实验观察到替米沙坦与福辛普利增加心肌梗死后ACE2基因和蛋白表达，这可能是其心脏保护的又一新机制，但目前关于阻断RAAS后ACE2表达增加的具体机制还不清楚，ACE2对心脏的保护作用也还需要更深入研究。

论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1356-03

斑蝥酸钠抑制人肝癌$HepG_2$细胞增殖及其机制的研究

高 伟,郑 军

(重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨斑蝥酸钠对肝癌$HepG_2$细胞增殖的作用及其机制。方法:肝癌$HepG_2$细胞在不同浓度斑蝥酸钠干预后分别采用MTT法、流式细胞术、免疫细胞化学法、比色法等检测细胞增殖抑制率、细胞周期变化、Survivin蛋白表达和Caspase-3活性。结果:斑蝥素能明显抑制肝癌$HepG_2$细胞增殖。药物干预后,细胞出现G2/M期阻滞,Survivin蛋白表达抑制,Caspase-3活性增强。结论:斑蝥酸钠可能通过其G2/M期特异性阻滞,下调Survivin表达和激活Caspase-3来抑制$HepG_2$细胞增殖。

【关键词】斑蝥酸钠;肝癌细胞;Survivin;Caspase-3

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-28

Inhibitory effect of disodium cantharidinate on human hepatoma cell line $HepG_2$ and its molecular mechanisms

GAO Wei, et al

(*Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To observe the inhibitory effect of disodium cantharidinate on human hepatoma cell line $HepG_2$ and investigate its possible mechanisms. *Methods*:$HepG_2$ cells were treated with different concentration of disodium cantharidinate,The inhibiton of cell proliferation,cell cycle distribution,expression of Survivin and activity of Caspase-3 were respectively evaluated by MTT assay,flow cytometry,immunocytochemistry,and chromatometry. *Results*:Disodium cantharidinate could inhibit the proliferation of $HepG_2$ cells. The IC50 at 24,48,72 h after intervention were 2.41±0.48,0.72±0.08,and 0.39±0.04 ug/ml,The cells of G2/M phase and activity of Caspase-3 were increased.the expression respectively of Survivin were inhibited after the intervention of disodium cantharidinate. *Conclusion*:The inhibitory effect of disodium cantharidinate on $HepG_2$ cells may be mediated by the block of cell cycle,enhancement of Caspase-3,and inhibition of Survivin.

【Key words】 Disodium cantharidinate;Hepatic carcinoma cell;Survivin;Caspase-3

作者介绍:高 伟(1979-),男,硕士,研究方向:肝癌的基因与生物治疗。

通讯作者:郑 军,男,副教授,E-mail:zhengjun@163.net。

参 考 文 献

[1] Oudit G Y,Crackower M A,Backx PH,et al. The role of ACE2 in cardiovascular physiology [J]. Trends in Cardiovascular Medicine,2003,13(3):93-101.

[2] Oudit G Y,Kassiri Z,Patel M P,et al. Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice[J]. Cardiovasc Res,2007,75(1):29-39.

[3] Crackower M A,Sarao R,Oudit G Y,et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function[J]. Nature,2002,417(6):822-828.

[4] Tallant E A,Chappell M C,Ferrario CM,et al. ACE2 expression in cardiac cells:angiotensin II downregulates ace2 in myocytes and cardiac fibroblasts[J]. Hypertension,2004,44(4):538.

[5] Burrell L M,Risvanis J,Kubota E,et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans[J]. European Heart Journal,2005,26(4):369-375.

[6] Ferrario C M,Jessup J,Chappell M C,et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2[J]. Circulation,2005,111(5):2605-2610.

[7] Lee V C,Rhew D C,Dylan M,et al. Meta-analysis: Angiotensin-receptor blockers in chronic heart failure and high-risk acute myocardial infarction[J]. Ann Intern Med,2004,141(9):693-704.

[8] Dhalla N S,Dent M R,Tappia PS,et al. Subcellular remodeling as a viable target for the treatment of congestive heart failure [J]. J cardiovasc Pharmacol Therapeut,2006,11(1):31-45.

[9] Zhang C T,Yasuno S J,Kuwahara K C,et al. Blockade of angiotensin Ⅱ type 1 receptor improves the arrhythmia morbidity in mice with left ventricular hypertrophy[J]. Cir J,2006,70(3):335-341.

[10] Ferrario C M,Jessup J,Gallagher P E,et al. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors[J]. Kidney Int,2005,68(5):2189-2196.

(责任编辑:关蕴良)