维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)05-0493-04

缬沙坦对超负荷大鼠心肌细胞凋亡、ASK1 的影响

邱 敏[1],马康华[2],龙明智[1],谭 晓[1],王迪斌[1]

(1.南京医科大学第二附属医院心内科,江苏 南京 210011;2.重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨压力超负荷模型下血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)受体拮抗剂缬沙坦对凋亡信号调节激酶(ASK1)介导心肌肥厚信号通路的影响。方法:复制腹主动脉缩窄高血压大鼠模型,TUNEL 法检测心肌细胞凋亡,免疫印迹和免疫组化法检测心肌 ASK1 蛋白含量并测定左室质量指数。结果:缬沙坦组左心室质量指数、心肌细胞凋亡指数、ASK1 表达均显著低于高血压组($P<0.05$)。结论:AngⅡ参与激活压力负荷下 ASK1 通路,缬沙坦能干预 ASK1 介导通路并抑制心肌细胞凋亡从而预防心肌肥厚。

【关键词】心肌肥厚;凋亡信号调节激酶;凋亡;血管紧张素Ⅱ;缬沙坦

【中国图书分类法分类号】R54 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-18

Effects of Valsartan on cardiomyocyte apoptosis and ASK1 protein expression in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats

QIU Min, et al

(*Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Nanjing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine the effects of Valsartan on cardiomyocyte apoptosis and apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-dependent signal pathway in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Methods*: The hypertensive model was established by abdominal aortic constriction. 24 wistar rats were randomized into three groups, banding group, banding and Valsartan administration group, sham-operated group. Six weeks later, cardiomyocyte apoptosis was measured by TUNEL, ASK1 protein expression was measured by western blot and immunohistochemistry. *Results*: The left ventricular mass index, apoptosis index and ASK1 protein content all significantly decreased in Valsartan group, as compared with banding group ($P<0.05$). *Conclusion*: AngⅡ is involved in promoting the activation of ASK1-dependent signal pathway in pressure-overload model.

【Key words】Myocardial hypertrophy; ASK1; Apoptosis; AngⅡ; Valsartan

心肌肥厚是高血压的重要靶器官损害表现之一,是发生心血管疾病的重要危险因素,在高血压及高血压并发症的发病和干预中具有重要意义。近来研究表明,高血压心肌肥厚不仅表现为心肌细胞的肥大和间质纤维化,而且伴有心肌细胞的凋亡和相关基因表达异常,后者在心衰时特别明显。血管紧张素Ⅱ1 型受体(AT1R)拮抗剂(ARB)能够在预防心肌肥厚的同时有效抑制心肌细胞的过度凋亡,尽管如此,高血压心肌肥厚的细胞学变化及 ARB 的干预机理尚未完全明了。

本实验通过观察 AT1R 拮抗剂缬沙坦干预腹主动脉缩窄超负荷大鼠肥厚左心室中细胞增殖和细胞凋亡及凋亡信号调节激酶(ASK1)蛋白表达的影响,以探讨高血压左室肥厚的细胞学基础及缬沙坦防治高血压左室肥厚的作用机理。

作者介绍:邱 敏(1979-),女,住院医师,硕士,主要研究方向:高血压心肌肥厚机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

考马斯亮兰蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,SP-9001 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术有限公司,兔抗大鼠 ASK1 多克隆抗体购自 santa cruz 公司,细胞凋亡检测试剂盒、蛋白酶 K 购自美国罗氏公司。

1.2 高血压模型复制

SD 大鼠 24 只雌雄不限,体重 200~250g,购自重庆医科大学实验动物中心,随机分为三组高血压组、高血压缬沙坦干预组和对照组。腹主动脉缩窄高血压模型的构建参照饶曼人等[1]介绍的方法,术前禁食 12h,10%水合氯醛(按 0.5ml/100g 体重给麻醉药量)行腹腔注射麻醉,左上腹切口,使腹主动脉充分暴露,在左肾动脉上方 0.3cm 处将 7 号针头沿主动脉方向与分离的腹主动脉一起结扎,小心拔除针头,造成腹主动脉环行缩窄约 60%。假手术组 8 只仅分离腹主动脉不结扎作为对照组。逐层关腹缝合,术后连续三天腹腔内注射青

维普资讯 http://www.cqvip.com

霉素 20 万 U 预防感染。常规饮水照明。缬沙坦干预组于术后第一天起每天给予缬沙坦（40mg/(kg·d)）溶于自来水中灌胃，高血压组每天以等量自来水灌胃，持续 6 周取材。

1.3 指标检测

术后 6 周动物禁食 12h，自由饮水，10%水合氯醛(0.5ml/100g)腹腔注射麻醉后立即将充满肝素的大鼠动脉插管插入右侧颈总动脉，经换能器连接多导生理记录仪，动物稳定 30min 后描记平均动脉血压。迅速开胸取出心脏，冰生理盐水洗净，滤纸吸干，沿房室沟剪掉两心房，剪掉主肺动脉，紧贴室间隔右侧剪下右心室游离壁，将剩余部分用电子天平称重为左心室质量，取左心室质量除以体重即相应的左心室质量指数。沿左心室最宽处垂直于长轴将其分为两部分，一部分放入 10%中性福尔马林固定 24h 后，常规脱水透明石蜡包埋、切片备用，余下经液氮速冻后-80℃冰箱保存，用于 ASK1 蛋白免疫印迹。所有标本制作条件完全相同以避免人工误差。

1.3.1 心肌细胞凋亡检测 用改良的末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的脱氧三磷酸尿苷缺口末端标记法(TUNEL 法)原位标记心肌凋亡细胞核中的脱氧核糖核苷酸片段 3'OH 末端显示心肌凋亡细胞的存在，按罗氏凋亡检测试剂盒实验步骤操作，正常心肌细胞核呈蓝色，凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。半定量分析，在 10×20 高倍镜下计出细胞总数及阳性细胞数，算出凋亡指数=凋亡阳性细胞核数目/总细胞核数目，每张切片取 5 个视野求均值。

1.3.2 免疫组化法检测 ASK1 蛋白表达 按照即用型 SP-9001 免疫组化染色试剂盒实验步骤操作。胞浆染有棕黄色颗粒者为阳性，使用 Image-pro plus 5.0 专业分析软件对免疫组化切片进行图象分析，图象分析采用指标为阳性表达区平均光密度与面积比乘积，每张切片采集 8 个视野取其均值作为统计分析数据。

1.3.3 免疫印迹法分析 ASK1 蛋白表达 称取约 200mg 组织在冰浴下研碎后加入 1.0ml 蛋白裂解液（其组成为：50mmol/L Tris-Hcl，pH 7.4；1%NP-40；0.25%脱氧胆酸钠；150mmol/L Nacl；1mmol/L EGTA；1mmol/L PMSF；1mmol/L Na_3VO_4；1mmol/L NaF；1μg/ml aprotinin；1μg/ml leupeptin）孵育 30min，组织匀浆后 4℃离心机以 12000g/min 离心 20min，留取上清弃沉淀，上清即所含要测定的胞浆蛋白。按考马斯亮兰法测定蛋白质量浓度，使蛋白质浓度调至 200mg/l，聚丙烯酰胺变性凝胶分离蛋白（上样量为 50μg 总蛋白），电转膜法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上，脱脂奶粉封闭 1.5h，分别加一抗（工作浓度 1:150）4℃孵育过夜，辣根过氧化物酶标记二抗（工作浓度 1:1500）室温孵育 1h，DAB 显色，以凝胶成像系统扫描，Quantity One 1-D 5.4.1 图象分析软件分析图片，总的光密度值作为衡量 ASK1 相对含量的指标，实验重复 3 次。

1.4 统计学处理

所有数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用 t 检验，用 SAS8.0 统计软件进行分析，$P\leq0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 解剖学和血流动力学

高血压组与对照组相比左心室质量指数、平均动脉压显著升高，缬沙坦能明显抑制上述指标的升高。结果见表 1。

表 1 缬沙坦对左心室质量指数和平均动脉压的影响（n=8，$x\pm s$）

	高血压组	缬沙坦组	对照组
左心室质量指数	2.4998±0.0887	2.185±0.0647*	1.9512±0.0442*
平均动脉压	182.97±8.1071	150.7±7.0534*	123.953±7.2746*

* 均与高血压组相比 P<0.01

2.2 心肌细胞凋亡指数

缬沙坦能明显抑制术后心肌细胞的凋亡，结果见图 1（三组大鼠心肌组织切片 TUNEL 染色结果见图 2、图 3、图 4）。TUNEL 染色（×200），高血压组心

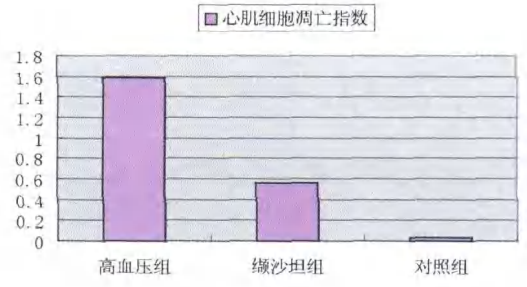


图 1 缬沙坦对心肌细胞凋亡的影响



图 2 TUNEL 染色（×200），高血压组心肌可见大量凋亡细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 3 TUNEL 染色(×200),对照组未见心肌细胞凋亡



图 4 TUNEL 染色(×200),缬沙坦组凋亡细胞明显减少

肌可见大量凋亡细胞

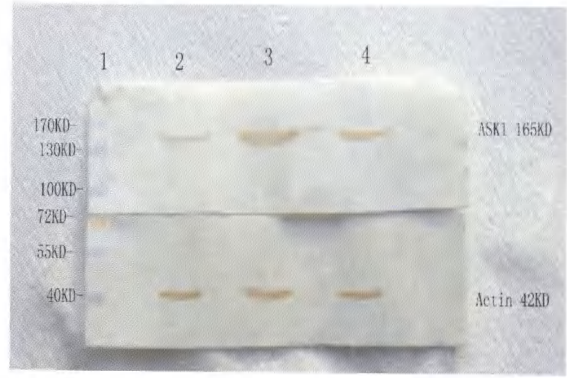
2.3 ASK1 蛋白表达

免疫组化结果显示高血压组 ASK1 呈强阳性表达,胞浆内充满深棕黄色颗粒,缬沙坦组表达明显减少,对照组微量表达(三组大鼠心肌组织切片免疫组化染色结果见图 6、7、8)。免疫印迹结果显示与对照组相比高血压组 ASK1 含量增加了 3.2 倍,而缬沙坦组与对照组相比无明显差异。两种方法检测结果相符。见表 2,图 5。

表 2 缬沙坦对 ASK1 蛋白含量的影响(n=8,$\bar{x}\pm s$)

	高血压组	缬沙坦组	对照组
平均光密度 * 面积比	2052.8 ± 349.53	878.44 ± 215.95*	352 ± 260.1*

* 均与高血压组相比 P<0.01



1. 蛋白 maker;2. 对照组;3. 高血压组;4. 缬沙坦组

图 5 缬沙坦对 ASK1 蛋白含量的影响(免疫印迹结果)

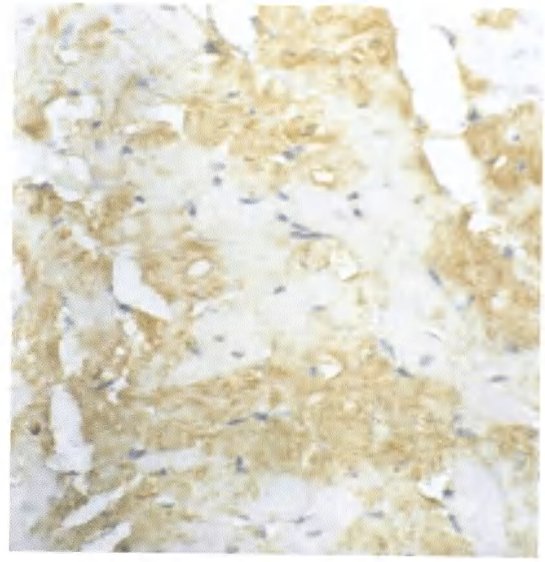


图 6 免疫组化(×200),高血压组 ASK1 强阳性表达

3 讨 论

细胞凋亡是一种具有生理性、选择性的程序性死亡,在许多组织的细胞生长、结构调控中起重要作用。目前已得到肯定心肌细胞凋亡是高血压左室肥厚形成以及心肌肥厚向心力衰竭转化的重要病理生理学基础之一。Teiger 等[2]在压力过载引起的心肌肥厚大鼠模型中触发了心肌细胞的凋亡。国内学

维普资讯 http://www.cqvip.com

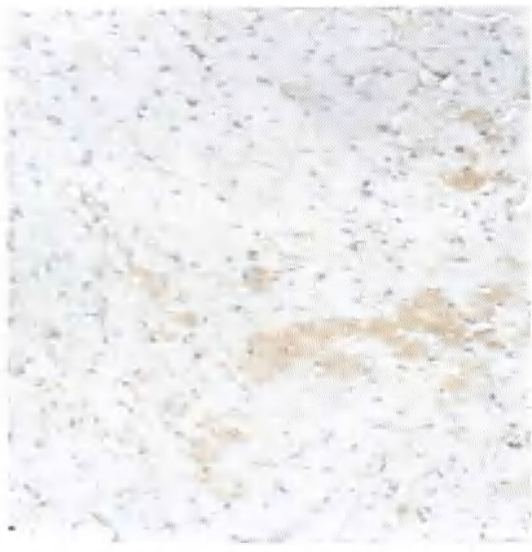


图 7 免疫组化(×200),缬沙坦组 ASK1 阳性表达



图 8 免疫组化(×200),对照组 ASK1 微量表达

者陈卫东等人[3]实验提示心肌细胞和毛细血管内皮细胞的过度凋亡,而纤维细胞的凋亡不足导致 SHR 心肌细胞和间质细胞的生长失衡,最终发生高血压病理性心肌肥厚。

ASK1(也叫 MAPKKK5)是 MAPKKK 家族成员之一,是由 Wang 等[4]分离出来的第 6 个 MAPKKK,有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)的上游激酶,最初是作为凋亡诱导激酶被发现的, 参与细胞的生长、分化和形态改变,近年来研究发现它与心肌肥厚的发生也存在密切关系。Osamu 等[5]将 ASK1 基因敲除小鼠与正常小鼠比较,在左冠状动脉结扎心肌梗塞和胸主动脉缩窄后负荷过载模型中,心脏结构和功能正常,仅有轻微的心肌间和血管周围组织纤维化,同时凋亡的心肌细胞数量明显减少,说明在心肌梗塞和后负荷过载条件下,ASK1 信号途径可能在介导心肌细胞凋亡和调节左室重塑中起着重要作用。很多肥大刺激 Ang Ⅱ、TNF、ROS、机械牵张等都可通过 ASK1 诱发心肌细胞的凋亡, 已知的 ASK1 诱导凋亡的机制主要有: 压力激活蛋白激酶(JNK、p38) 的活化, 细胞色素 C 从线立体的释放, Caspase 通路的激活,细胞核的碎裂以及与 Fas 结合蛋白 Daxx 的交互作用等[6]。一方面细胞凋亡本身可导致修复性的纤维化,另一方面心肌细胞凋亡导致有效收缩功能单位进行性丧失,存活心肌细胞的代偿性功能增强,当超过一定限度失代偿后,即会引起存活心肌细胞的适应性不良肥大及细胞外基质的沉积 和反应性间质纤维化。随着肥厚程度的进展, 心肌细胞凋亡的增加使心肌细胞数量减少,心肌整体收缩力下降,纤维化的增加又使左室的顺应性下降, 心肌收缩力不能发挥其应有的射血效应,于是形成恶性循环,终至不可逆的终末阶段。

在慢性心脏压力负荷异常条件下,心肌组织肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活尤其是 Ang Ⅱ 浓度增高是心肌细胞凋亡与心肌纤维化发生的主要机制,Ang Ⅱ 的主要心血管生物效应由 AT1R 介导,AT1R 拮抗剂可完全阻断心肌细胞源性凋亡[7,8]。Yasuhiro 等[9]通过实验证实 Ang Ⅱ 通过 AT1R 激活 ASK1 从而诱导心肌肥厚纤维化、心肌细胞凋亡以及冠状动脉重塑,这是第一次提供在体实验证据证明在 Ang Ⅱ 的致心肌肥厚效应中,AT1R 介导的 ASK1 的活化起着关键作用。本实验中,AT1R 拮抗剂缬沙坦能明显抑制高血压大鼠心肌组织中心肌细胞凋亡和 ASK1 的表达同时预防心室肥厚、改善心功能,与以往的研究结果相符。

心肌肥厚的胞内信号转导通路是一个复杂的调节网络,对肥大信号通路的调控及肥大信号对核内基因表达的调控是当前该领域的热点课题。Hirotani 等[10]已把 ASK1 作为调节心肌肥厚的新的信号通路, 设计选择抑制 ASK1 的药物来抑制和逆转心肌肥厚、改善心功能、保护靶器官具有一定前景。

(通讯作者: 马康华, 重庆医科大学附属第一医院心内科,副教授,电话:(023)89012911)

参 考 文 献

[1] 徐叔云、卞如濂、陈 修.药理实验方法学[M].第 3 版,北京:人民

(下转第 510 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Y= -0.00161+0.1053X。

2.4.2 各组的浓度值比较结果　如表 6 所示。

由表 6 所示，与溶媒组比较，哌仑西平组和小剂量组的酚红分泌浓度无差异，NH_4Cl 组的 2,3,4h 酚红分泌浓度均明显多于溶媒组，苯环喹溴铵大剂量组的 1,2h 的酚红分泌浓度明显少于溶媒组，中剂量组 2h 的酚红分泌浓度明显少于溶媒组。提示苯环喹溴铵对小鼠气管分泌有一定的抑制作用。

2.5　苯环喹溴铵对小鼠肠蠕动的抑制作用

结果如表 7 所示，苯环喹溴铵能明显降低小鼠的小肠蠕动，与空白溶媒组有显著差异（$P<0.01$）。

3　讨　论

苯环喹溴铵为一新型抗胆碱药物，本研究室的主要药效学的实验表明，其对变应性鼻炎的各种症状都有一定的改善作用。一般药理研究可作为新药毒性评价的先导，所以本实验就从一般药理学角度出发结合 M 受体在全身的分布特点，观察不同剂量苯环喹溴铵对正常动物心血管、呼吸、神经、胃肠几大系统和腺体分泌的影响。实验结果显示，苯环喹溴铵对犬的呼吸系统和心血管系统无明显影响；对小鼠的中枢神经系统短时内有一定的抑制作用，但休息 8h 后可恢复；能明显减少小鼠的支气管分泌和降低小鼠的肠蠕动。

据李新[7]等人的报道，现今按分子生物学的分类，共有 5 种 M 受体亚型：脑组织中 5 种亚型均存在，但 M2 含量甚少；心肌细胞中主要存在 M1 和 M2 两种亚型，其中 M2 与心肌收缩有关，M1 则可导致心率下降；支气管平滑肌和小肠平滑肌以及一些外分泌腺均含有 M2 和 M3 两种受体。所以由上述实验结果苯环喹溴铵对中枢的抑制作用可能与其能通过血脑屏障，作用于中枢的 M 受体有关，但具体的亚型尚不清楚；其对心血管系统无明显影响，说明其可能未作用于 M1 和 M2 受体；而对腺体和小肠的作用，使我们推测苯环喹溴铵可能主要是作用于 M3 受体。

综上所述，可以看出苯环喹溴铵的选择性较同类抗胆碱药阿托品为高，毒副作用较小，安全性较高，值得进一步开发并应用于临床。

参　考　文　献

[1] Kubo N,Minami T,Hori Y,et al.Enhanced parasympathetic nerve activities in experimentally-induced nasal hypersensitivity[J]. Acta Otolaryngol Suppl,1989;463:14-20.

[2] Mehle ME.Are nasal steroids safe [J].Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg,2003;11:201-205.

[3] 张　罗,周　兵,韩德民.变应性鼻炎研究进展(二):药物治疗[J].耳鼻咽喉—头颈外科,2003;12,10(6):368-373.

[4] 周远大,陈　康,何海霞,等.野马追一般药理作用实验研究[J].中国药房,2005;16(2):94-96.

[5] 徐叔云，主编. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002.1359.

[6] 徐叔云，主编.药理实验方法学[M].北京：人民卫生出版社，2002.1313.

[7] 李　新.M 受体的研究进展[J].国外医学分册,2001;28(1):26-28.

(上接第 496 页)

卫生出版社,2002.1028-1029.

[2] Teiger E,Than VD,Richard L,et al.Apoptosis in pressure overload-induced heard hypertrophy in the rat[J].J Clin Invest,1996;97(12):2891-2897.

[3] 陈卫兵,蒲　红,秦永文,等.自发性高血压大鼠左心室重构中的细胞凋亡[J].中国动脉硬化杂志,2001;9(4):289-293.

[4] Wang XS,Diener K,Jannuzzi D,et al.Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase[J].J Biol Chem,1996;271:31607-31611.

[5] Yamaguchi O,Higuchi Y,Hirotani S,et al.Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling[J].PNAS,2003;100(26):15883-15888.

[6] Steve J,Charette HL,Landry J,et al.A kinase-independent function of ASK1 in caspase-independent cell death [J].J Biol Chem,2001;276(39):36071-36074.

[7] Liu JJ,Peng LM,Bradley CJ,et al. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblases [J].Cardiovascular res,2000;45:729-735.

[8] Gustafsson AB,Gottlieb RA.Mechanisms of apoptosis in the heart[J].J Clin Immunol,2003;23(6):447-459.

[9] Izumiya Y,Kim S,Izumi Y,et al.Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin Ⅱ-induced cardiac hypertrophy and remodeling[J].Circ Res,2003;93:874.

[10] Hirotani S,Otsu K,Nishida K,et al.Involvement of nuclear factor-[kappa]B and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. Circulation,2002;105:509-515.