维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0820 - 04

福辛普利和缬沙坦对大鼠缺血再灌注模型心肌细胞凋亡的影响

王 建[1],陈 明[2],唐显军[2]

(1. 成都市第六人民医院心内科,成都 610051 ;2. 重庆医科大学临床学院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察福辛普利和缬沙坦对大鼠缺血再灌注模型心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bcl - 2、Bax 表达的影响。方法:SD 大鼠随机分为四组:假手术组、缺血再灌注组、福辛普利组和缬沙坦组。分别于实验终点采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡,免疫组织化学方法检测心肌组织 Bcl - 2、Bax 蛋白表达。结果:心肌细胞凋亡数目随再灌注时间延长而增加,以缺血 30min 再灌注 48 小时最高(247.2 ± 25.9),与缺血 30min 再灌注 4h 比较有显著性差异($P < 0.01$)。福辛普利组与缬沙坦组心肌细胞凋亡数、心肌组织中 Bax 蛋白表达均低于缺血再灌注组($P < 0.05$)。结论:心肌缺血再灌注过程中心肌细胞凋亡、心肌组织中 Bax 蛋白表达是个动态的变化,福辛普利与缬沙坦减少心肌细胞凋亡的数量,其抑制作用可能与部分下调 Bax 蛋白表达有关。

【关键词】心肌缺血;再灌注损伤;细胞凋亡;Bax

【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 03 - 30

Effects of Fosinopril and Valsartan on cardiomyocyte apoptosis in experimental myocardial Ischemia - reperfusion rats model

WANG Jian, et al

(*Department of Cardiology, the Sixth People's Hospital of Chengdu*)

【Abstract】Objective: To test the effect of fosinopril and valsartan on cardiomyocte apoptosis and expression of Bcl - 2 and Bax in myocardium of ischemia - reperfusion (I - R) rat model. Methods: SD rats were randomly divided into four groups as follows: Sham - operation group、Ischemia - reperfusion group、Fosinopril group and Valsartan group. The TdT - mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method was used to detect apoptotic myocytes in different groups. Bcl - 2 and Bax expression in myocardium were analyzed by immunohistochemical technique. Results: The number of apoptotic cardiomytocytes in Ischemia 30min - reperfusion 48 hours group were significantly more (247.2 ± 25.9), than those in Ischemia 30min - reperfusion 4 hours group ($P < 0.01$). The number of apoptotic myocytes in Fosinopril group and Valsartan group was less than that of Ischemia - reperfusion group ($P < 0.05$). The expression of Bax in myocardium was significantly decreased in Fosinopril group and Valsartan group. Conclusion: Ischemia - reperfusion injury could induce myocardial apoptosis, in association with increased expression of Bcl - 2 and Bax. Valsartan could decrease cardiomyocyte apoptosis in the rat hearts after Ischemia - reperfusion, and this decrease was possibly mediated by downregulation of Bax gene expression.

【Key words】Myocardial ischemia; Reperfusion injury; Apoptosis; Bax

近年来,发现心肌局部存在一个独立的肾素血管紧张素系统,血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ)不仅影响血流动力学,对细胞的增殖与凋亡也有调节作用,研究显示 AngⅡ引起的一系列生物学效应主要是通过激活血管紧张素Ⅱ 1 型受体(Angiotensin Ⅱ type 1 receptor, AT_1)而实现[1,2]。本研究观察血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting - enzyme Inhibitor ,ACEI)福辛普利和 AT_1 受体拮抗剂缬沙坦对大鼠缺血再灌注模型心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bax、Bcl - 2 表达的影响,以探讨 AngⅡ与心肌缺血再灌注损伤的关系。

作者介绍:王 建(1977 -),男,硕士,主要研究方向:冠心病的防治。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 实验动物与主要试剂

健康雄性 SD 大鼠,体重为 220 ± 50g。由四川省医学科学院动物中心提供。福辛普利由上海百时美施贵宝制药有限公司提供,缬沙坦由北京诺华制药有限公司提供。TUNEL 试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品,Bcl-2、Bax 鼠单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,免疫组化染色 SP 试剂盒购自北京中山公司。

1.2 大鼠心肌缺血再灌注模型制备及分组

SD 大鼠经戊巴比妥钠 30mg/kg 腹腔注射麻醉后,气管插管,呼吸机辅助呼吸。开胸暴露心脏,于左冠状动脉下 2~3mm 处穿线结扎左前降支,在结扎线中埋置松解线。假手术组即仅穿线而未结扎冠状动脉者。78 只大鼠随机分成:1、假手术组(6 只),以生理盐水(NS)4ml·/(kg·d)灌胃,1 次/天,连续四周后行假手术;2、心肌缺血再灌注组(24 只),以上述方法生理盐水灌胃四周后,分别行心肌缺血 30min,再灌注 4h,24h,48h,72h;3、福辛普利组(24 只),以福辛普利 5mg/(kg·d)溶于 NS 中灌胃四周后,分别相应行心肌缺血 30min,再灌注 4h,24h,48h,72h;4、缬沙坦组(24 只),以缬沙坦 10mg/(kg·d)溶于 NS 中灌胃四周后,分别相应行心肌缺血 30min,再灌注 4h,24h,48h,72h。各组术后分别在再灌后 4h,24h,48h,72h 处死动物取材。

1.3 心肌组织石蜡切片

取左心室游离壁中部心室肌,立即置于 4% 多聚甲醛(pH 7.4)中固定 24h(4℃),随后放入 75% 乙醇中,再进行常规石蜡包埋,并作心脏横断切片(5um),分别作细胞凋亡染色和免疫组化 SP 染色,光镜下观察细胞形态学变化。

1.4 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

采用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL 法)检测心肌细胞凋亡。操作步骤如下:(1)石蜡切片脱蜡至水。(2)蛋白激酶 K 消化 15min 。(3)0.01mol/L PBS 冲洗。(4)过氧化氢阻断 60min。(5)0.01 mol/L PBS 冲洗。(6)加 TUNEL 反应液 37℃ 反应 60min。(7)0.01mol/L PBS 冲洗。(8)DAB/H_2O_2 显色。(9)苏木素复染。(10)脱水、透明、封片。最后用光学显微镜 ×400 观察每个视野中凋亡细胞数目(棕色核为阳性凋亡细胞),每组随机数 100 个视野取其均值作为本组的代表值。

1.5 心肌组织 Bax,Bcl-2 免疫组织化学染色

采用 S-P 法免疫组化染色技术。心肌组织石蜡切片常规二甲苯脱蜡及梯度乙醇入水后,分别以 Bcl-2、Bax 鼠单克隆抗体为一抗进行免疫组织化学染色,方法参照 SP 试剂盒说明书。DAB 显色,苏木素复染,封片镜检。光学显微镜下计数 100 个高倍视野中 Bcl-2 和 Bax 阳性心肌细胞数目,求其均值。分析 Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性染色细胞指数(Positive expression index ,PEI)。PEI(%)=阳性细胞数/视野细胞总数 ×100。

1.6 统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有显著性。采用 SPSS10.0 软件处理。

2 结果

2.1 心肌组织中细胞凋亡指数的改变

假手术组未见明显的心肌凋亡阳性细胞;心肌缺血再灌注后心肌凋亡细胞数明显增加,以缺血再灌注 48h 最为明显,见图 1;与缺血再灌注组相比



图 1 缺血再灌注 48h 的心肌细胞凋亡(TUNEL ×100)



图 2 缬沙坦组 $I_{30min}R_{48h}$ 心肌凋亡细胞数(TUNEL ×100)



图 3 福辛普利组 $I_{30min}R_{48h}$ 心肌凋亡细胞数(TUNEL ×100)

较,缬沙坦组心肌凋亡细胞数也明显减少,见图 2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

福辛普利组心肌凋亡细胞数下降,见图 3。

2.2 心肌组织中 Bcl-2 与 Bax 蛋白阳性染色细胞的数量

假手术组仅见极少数散在的 Bcl-2 蛋白阳性染色细胞,可见轻度的 Bax 蛋白阳性表达;心肌缺血再灌注组 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达较假手术组明显增加($P<0.01$)。缬沙坦组 Bax 蛋白阳性表达显著低于心肌缺血再灌注组($P<0.05$),见表 1。而其 Bcl-2 蛋白阳性表达指数未见明显变化,见表 2。表明心肌细胞凋亡的机制可能与缺血再灌注诱导心肌细胞表达 Bax 和 Bcl-2 有关,缬沙坦可抑制心肌细胞表达 Bax,而心肌组织 Bcl-2 的表达,缬沙坦组与缺血再灌注组相比无显著性差异($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠心肌组织 Bax 蛋白阳性染色细胞指数的变化

Bax 阳性染色指数(%)	$I_{30min}R_{4h}$	$I_{30min}R_{24h}$	$I_{30min}R_{48h}$	$I_{30min}R_{72h}$
缺血再灌注组	17.7±4.2	38.1±7.3	29.3±6.5	23.8±4.6
缬沙坦组	11.5±3.1◆	28.9±4.7◆	18.3±2.4◆	15.3±2.9◆
福辛普利组	10.5±2.3◆	29.5±6.3◆	19.6±3.8◆	16.4±4.4◆

◆$P<0.05$ 与心肌缺血再灌注组相比

表 2 各组大鼠心肌组织 Bcl-2 蛋白阳性染色细胞指数的变化

Bcl-2 阳性染色指数(%)	$I_{30min}R_{4h}$	$I_{30min}R_{24h}$	$I_{30min}R_{48h}$	$I_{30min}R_{72h}$
假手术组	——	2.4±0.3	——	——
缺血再灌注组	9.2±2.6	25.3±5.2■▲	16.8±2.9▲	13.1±3.1▲
缬沙坦组	7.1±2.5	22.7±5.4■▲	13.3±6.2▲	11.4±5.1▲
福辛普利组	8.2±2.9	23.4±4.9■▲	14.5±5.3▲	12.9±3.5▲

■$P<0.05$ 与假手术组相比　▲$P<0.05$ 与 $I_{30min}R_{4h}$ 组相比

3 讨 论

ACE 抑制剂和 AT1 拮抗剂是目前临床心血管疾病应用较为主要的药物之一。ACE 抑制剂不能完全阻断过度激活的 RAAS 系统,ACE 抑制剂只可阻断经 ACE 途径产生的 AngⅡ,而在心肌组织中除 ACE 途径外尚有糜蛋白酶途径可产生 AngⅡ,心肌局部的 AngⅡ近 50% ~60% 源于糜蛋白酶途径产生[3]。AT_1 拮抗剂是在受体水平阻断 AngⅡ与 AT_1R 的结合,它不受 AngⅡ来源途径的影响,使用 AT_1 拮抗剂后,由于负反馈机制心肌局部 AngⅡ升高,AT2 蛋白表达增强[4]。

近年的研究表明,细胞凋亡作为细胞死亡的方式之一,参与了心肌缺血再灌注损伤的病理生理过程[5,6]。心肌细胞凋亡是造成急性心肌缺血再灌注损伤的形式之一。

我们的实验表明福辛普利与缬沙坦都可以减少缺血再灌注过程中心肌细胞凋亡的数目。与未干预的缺血再灌注组比较,缬沙坦组与福辛普利组自缺血 30min 再灌注 4h 开始就显著抑制了心肌细胞凋亡。这两种药物抑制缺血再灌注心肌细胞凋亡的作用机理,我们可以考虑有以下可能:(1)缬沙坦可部分阻断 AngⅡ的生物学作用。(2)阻断 AT_1 受体后可激活 AT_2,通过缓激肽、NO、蛋白激酶 C 等途径介导 这种保护作用[7,8]。(3)AT_1 拮抗剂减轻细胞内液体潴留,特别是细胞内 Ca^{2+} 产生增加。AT_1 拮抗剂可抑制 Na^+/H^+ 交换,改善心脏功能障碍[9]。福辛普利可通过(1)增加心脏内源型缓激肽,维护细胞内 Na^+ 浓度的稳定[10,11]。(2)抑制 ACE 途径产生的 AngⅡ,从而减少心肌细胞凋亡。不过福辛普利不能抑制经糜蛋白酶途径的 AngⅡ的产生。

本研究还从分子生物学方面探讨了福辛普利与缬沙坦降低心肌细胞凋亡水平的作用机制。有研究提示在离体心肌缺血再灌注模型发现,心肌细胞凋亡前蛋白 Bax、Caspase-3、P_{53} 基因水平上调,而抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 下调以及 Bax/Bcl-2 比值升高。AT1 拮抗剂降低凋亡指数,抑制心肌细胞凋亡[12]。本研究表明福辛普利与缬沙坦二者均可下调 Bax 蛋白表达,对 Bcl-2 蛋白表达无显著影响。Bcl-2/Bax 比值是决定细胞是否发生凋亡的重要因素。我们观察到心肌缺血再灌注后二者比值下降,而两种药物均不同程度下调 Bax 蛋白表达,致 Bcl-2/Bax 比值升高,增强了细胞的抗凋亡能力,可见福辛普利与缬沙坦抑制心肌细胞凋亡作用可能部分与其下调 Bax 蛋白表达有关,提示下调心肌细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞 Bax 蛋白表达有可能成为探索心肌保护措施的新途径。

参 考 文 献

[1] Ju HS, Chen SC. Activation of renin - angiotenisn system in isolated rat heart during ischemia and reperfusion [J]. J Mol Cell Caridol, 1993; 25(s):S57, 158.

[2] Yang B, Li D. Myocardial angiotensin Ⅱ receptor expression and ischemia - reperfusion injury [J]. Vasc Med, 1998; 3(2):121.

[3] Liao Y, Husain A. The chymase angiotensin sytem in human: biochemistry, molecular biology and potential role in cardiovascular diseases [J]. Can J Cardiol,1995; 11(s):13F.

[4] Moudgil R, Musat - Marcu S, Xu Y, et al. Increased AT2R protein expression but not increased apoptosis during cardioprotection induced by AT1R blockade [J]. Can J Cardiol 2002; 18(10):1107.

[5] Schulz R, Heusch G. AT1 - receptor blockade in experimental myocardial ischemia/reperfusion [J]. Clin Nephrol, 2003; 60 Suppl 1:S67.

[6] 刘兴德, 陈运贞. 蛋白激酶 C 和蛋白酪氨酸激酶活性对缺血再灌注心肌细胞凋亡影响的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2000; 25(1):20 - 22.

[7] Jugdutt BI. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia - reperfusion[J]. Heart Fail Rev,2002; 7(4):391.

[8] Schulz R, Heusch G. AT1 - receptor blockade in experimental myocardial ischemia/reperfusion [J]. Clin Nephrol, 2003; 60 (s):s67.

[9] Skolnick RL, Litmin SE, Barry WH, et al. Effect of ANG Ⅱ on PHi, [Ca^{2+}] i, and contraction in rabbit ventricular myocytes from infracted hearts [J]. Am - J - Physiol,1998; 275(5Pt 2):H1788.

[10] Whang J, Ramasamy R, Dizon JM, et al. Enalaprilat attenuates ischemic rises in intracellular sodium in the isolated rat heart via the bradykinin receptor [J]. J Cardiovasc Magn Reson,2001; 3(1):27.

[11] Schreiber JA, Broudy EP, Hassen AH. Inhibitors of bradykinin - inactivating enzymes decrease myocardial ischemia/reperfusion injury following 3 and 7 days of reperfusion [J]. J Pharmacol Exp Ther,2001; 298(3):970.

[12] Moudgil R, Menon V, Xu Y, et al. postischemic apoptosis and functional recovery after angiotensin Ⅱ type 1 receptor blockade in in isolated working rat hearts [J]. J - Hypertens, 2001; 19(6):1121.