

• 研究报告 •

西拉普利和缬沙坦对大鼠心肌梗死后心脏间质胶原代谢及心肌血管紧张素 mRNA 表达的影响

张世妹 孙根义 刘志勇 任谦 毛用敏

【关键词】 心肌梗死； 胶原代谢； 血管紧张素 II； 血管紧张素转换酶抑制剂

心肌纤维化是心室重构过程中的重要方面。肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活是心肌间质纤维化发生的主要病理机制,血管紧张素 I (Ang I) 作为肾素-血管紧张素系统(RAS)的效应分子,在心室重构过程中发挥关键作用。Ang II 主要通过与其特异性受体结合来发挥生理和病理效应,血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和选择性 I 型血管紧张素(AT1)受体拮抗剂(ARB)从不同水平抑制 RAS。本研究通过对大鼠心肌梗死后心肌组织 AT1、AT2 受体和 I、III 型胶原 mRNA 表达变化的研究,探讨心肌局部 Ang II 受体表达在心肌梗死后的变化及其与心脏间质重构的关系,并观察 ACEI、ARB 对 Ang II 受体表达的影响及对心脏间质重构的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型: 16 周雄性 Wistar 大鼠,体重 270~350 g,购于中国医学科学院实验动物研究所。按照随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、ACEI 组、ARB 组及联合用药组,每组 8 只。开胸行左前降支动脉结扎制备大鼠心肌梗死模型;假手术组仅在冠状动脉(冠脉)下穿线而不结扎。ACEI 组给予西拉普利 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃;ARB 组给予缬沙坦 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,联合用药组给予西拉普利 0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹和

缬沙坦 15 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃;假手术组和模型组给予等量生理盐水灌胃。2 周后处死大鼠,取左室梗死区和非梗死区心肌组织,液氮冷冻,-70℃保存。

1.2 引物: AT1 受体上游引物 5'-GTA GCC AAA GTC ACC TGC AT-3',下游引物 5'-TCA GGC AAT TGT TAA AAT AAG CTA T-3',长度 462 bp; AT2 受体上游引物 5'-ACC TGC ATG AGT GTT GAT AGG-3',下游引物 5'-CAG GTC AAT GAC TGC TAT AAC TTC A-3',长度 485 bp; I 型胶原上游引物 5'-CCC TGA AGT CAG CTG CAT-3',下游引物 5'-ATA TTC TTC TGG GCA GAA-3',长度 193 bp; III 型胶原上游引物 5'-CCA CCC TGA ACT CAA GAG TGG-3',下游引物 5'-CCA TCC TCT AGA ACT GTG TAA GTG-3',长度 447 bp; 内参还原型辅酶 I (GAPDH)上游引物 5'-AGT CCA TGC CAT CAC TGC CAC-3',下游引物 5'-TGG GAG TTG CTG TTG AAG TCA C-3',长度 342 bp。

1.3 总 RNA 的提取: 按总 RNA 抽提纯化试剂盒(上海生工 UNIQ-10 柱式)说明书操作。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR): 按逆转录试剂盒(美国 BMI 公司)说明书操作,将 RNA 转录为 cDNA。取 3 μl

逆转录产物为模板,加入 10× Buffer 2.5 μl,20 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μl,5 U/μl Taq DNA 多聚酶 0.25 μl,加入双蒸水至总体积 25 μl,混匀后用石蜡油封盖;反应参数为 95℃ 5 min 预变性,接 35 个循环的 95℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 1 min,然后 72℃ 7 min 充分延伸,4℃ 30 min。反应结束后取 PCR 产物 6 μl,用琼脂糖凝胶电泳,在紫外线激发下拍照,胶片采用 Gel-Pro 3.1 凝胶成像系统分析,以特异 DNA 带灰度值与内参灰度值之比作为该 mRNA 表达的相对水平。

1.5 统计学分析: 采用 SPSS 11.0 统计分析软件,指标用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 I、III 型胶原 mRNA 表达(表 1): ACEI、ARB 和联合用药组心肌梗死区和非梗死区 I、III 型胶原 mRNA 表达均较模型组明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);3 组间比较差异无统计学意义。

2.2 AT1、AT2 受体 mRNA 表达(表 1): 与模型组比较,ACEI、ARB 和联合用药组心肌梗死区和非梗死区 AT1 受体 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);ACEI 组梗死区和非梗死区 AT2 受体 mRNA 表达差异无统计学意义。

表 1 各组大鼠 I、III 型胶原及 AT1、AT2 受体 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	I 型胶原		III 型胶原		AT1 受体		AT2 受体	
	梗死区	非梗死区	梗死区	非梗死区	梗死区	非梗死区	梗死区	非梗死区
假手术组	0.815±0.109	0.815±0.109	0.581±0.138	0.581±0.138	0.273±0.096	0.278±0.096	0.384±0.143	0.384±0.143
模型组	1.514±0.363 ^b	1.021±0.189 ^b	1.149±0.115 ^b	0.836±0.084 ^b	0.849±0.155 ^b	0.555±0.098 ^b	1.069±0.224 ^b	0.632±0.184 ^{ef}
ACEI 组	1.117±0.169 ^{bd}	0.790±0.094 ^{df}	0.998±0.072 ^{bc}	0.675±0.180 ^{cf}	0.692±0.110 ^{bc}	0.407±0.108 ^{cef}	0.913±0.227 ^b	0.588±0.146 ^{ef}
ARB 组	1.243±0.125 ^{bc}	0.884±0.078 ^{cf}	0.960±0.140 ^{bd}	0.698±0.131 ^{cf}	0.632±0.141 ^{bd}	0.394±0.119 ^{adf}	1.480±0.323 ^{bd}	0.838±0.234 ^{bed}
联合用药组	1.188±0.130 ^{bd}	0.882±0.136 ^{cf}	0.987±0.216 ^{bc}	0.695±0.119 ^{cf}	0.696±0.150 ^{bc}	0.405±0.144 ^{cef}	1.340±0.200 ^{bc}	0.837±0.248 ^{bed}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与本组梗死区比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$

基金项目:天津市医药卫生科研基金资助项目(02KY26)

作者单位:300100 天津南开医院内科(张世妹);天津胸科医院(孙根义,刘志勇,任谦,毛用敏)

作者简介:张世妹(1974-),女(汉族),天津市人,医学硕士,主治医师。

义(P 均 >0.05);ARB组和联合用药组梗死区和非梗死区AT2受体mRNA表达明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

AT1受体属于G蛋白耦联受体家族成员,具有7个跨膜区域及与G蛋白耦联的羧基末端,是Ang II生物效应的主要介导受体。Ang II的许多生物学作用都是通过AT1受体介导的,包括诱导心肌生长的早期分子信号表达,促进蛋白质合成,促细胞生长,致心肌纤维化的发生等^[1]。AT2受体为一独特的含363个氨基酸的蛋白质,也具有G蛋白耦联受体家族的结构特点,AT2受体的作用与AT1受体相反,有促尿钠排泄和抑制细胞分化,具有抗生长、抗心肌肥厚、抑制心肌纤维化等作用^[2]。心肌梗死后,循环和心肌局部的Ang II上升,Ang II和AT1受体结合后,使G蛋白激活,一方面活化磷脂酶C(PLC)加速磷脂酰肌醇(PIG3)的水解,生成三磷酸肌醇(IP3)和二酯酰甘油(DG),刺激储存Ca²⁺的释放;另一方面通过蛋白激酶的级联放大激活丝裂素活化蛋白激酶(MAPK),MAPK进入细胞核内促进许多原癌基因(c-fos、c-jun、c-myc)的表达,引起心肌细胞的肥大和成纤维细胞(FBC)的分裂增殖,胶原合成增加,促进纤维化的进程。Tharaux等^[3]研究显示,Ang II与AT1结合调控胶原的合成是通过MAPK/细胞外信号调节激酶(ERK)途径起作用,传导通路有:Ang II+AT1受体→MAPK/ERK活性增强→c-fos增加、活素蛋白-1(AP-1)增加→转化生长因子-β(TGF-β)增加→胶原增生。除了促进胶原的合成,AT1受体还可通过影响金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)的表达抑制胶原的分解。而AT2通过与G蛋白耦联途径和(或)丝氨酸/苏氨酸通路使ERK失活,从而产生生长抑制、细胞凋亡、血管扩张等与AT1拮抗的效应。AT1和AT2受体的相互拮抗作用可能是维持Ang II作用平衡,保持血压稳定、水、电解质平衡,调节细胞代谢和组织重构的重要途径。

缬沙坦作为一种特异性、竞争性的AT1受体拮抗剂,通过与AT1受体跨膜区内的氨基酸相互作用,并占据其螺旋状空间而阻止Ang II与AT1受体的结合。本实验中可见,ARB组AT1受体mRNA的表达较模型组明显降低,而

AT2受体mRNA的表达较模型组明显升高,表明AT1受体拮抗剂的心血管保护效应并不是单纯依赖AT1受体阻断的作用,而是通过对两型受体表达的不同调节而达到抑制心室重构的目的。当AT1受体被拮抗时,血浆中反馈性升高的肾素和血管紧张素刺激了AT2受体表达,AT2/AT1受体比例上调,Ang II更多的与AT2受体结合,增强了AT2介导的良性心血管效应,抑制心肌肥大,纤维母细胞增殖,胶原蛋白合成,减轻心室重构,改善心脏功能。AT2活性增加引起激肽和一氧化氮(NO)生成是AT1受体阻断时心血管保护效应可能的介质途径或补充^[4-5]。激动AT2受体可诱发局部激肽释放酶-激肽系统的激活和促使缓激肽的释放,缓激肽通过与β₂受体结合,释放NO、前列腺素等生物活性物质而发挥效应。这也可能是临床上一些患者服用选择性AT1受体拮抗剂出现干咳的原因。

在本实验中,实验大鼠心肌梗死后24 h内给予ACEI治疗,2周后发现梗死区和非梗死区AT1受体mRNA的表达均较模型组相应区域表达降低,表明ACEI可以抑制AT1受体mRNA表达,而梗死区和非梗死区AT2受体mRNA的表达与模型组比较差异无统计学意义,说明ACEI不影响AT2受体mRNA表达,ACEI对AT1、AT2受体mRNA表达的调节机制尚需进一步研究。虽然ACEI并不影响AT2受体mRNA的表达,但由于它降低了AT1受体的表达,AT2/AT1受体比例仍相对升高,而Ang II的净效应依赖于AT1/AT2受体的比例,因此,推测ACEI的心血管保护效应一部分可能与上调AT2/AT1受体比例有关,ACEI的心血管保护效应机制除可抑制RAS,还与抑制缓激肽降解及升高Ang-(1-7)有关^[6-8]。

Ang II的净效应依赖于AT2/AT1的比例^[9],虽然ACEI和ARB对AT1、AT2两型受体表达的影响不相同,但均能相对或绝对上调AT2/AT1受体的比例,Ang II更多的与AT2受体结合,发挥AT2的心血管保护作用,减低梗死区和非梗死区I型和III型胶原mRNA的表达,减少胶原的沉积,抑制心肌间质的重构,AT2/AT1受体比例的上调可能是ACEI和ARB抑制心室重构的重要机制之一。本研究示两药联用抑制心肌

重构、改善心肌纤维化的作用与单独用药相似,长期应用是否会显示出联合应用的优越性需进一步观察。

参考文献

- [1] Oishi Y, Ozono R, Yano Y, et al. Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling [J]. *Hypertension*, 2003, 41(3 Pt 2):814-818.
- [2] Widdop R E, Jones E S, Hannan R E. Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype [J]? *Br J Pharmacol*, 2003, 140(5):809-824.
- [3] Tharaux P L, Chatziantoniou C, Fakhouri F, et al. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ERK kinase pathway [J]. *Hypertension*, 2000, 36(3):330-336.
- [4] Liu Y H, Yang X P, Sharov V G, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rat with heart failure: role of kinins and angiotensin II type 2 receptors [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(8):1926-1935.
- [5] Kurisu S, Ozono R, Oshima T, et al. Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis [J]. *Hypertension*, 2003, 41(1):99-107.
- [6] Yang X P, Liu Y H, Mehta D, et al. Diminished cardioprotective response to inhibition of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor in B(2) kinin receptor gene knockout mice [J]. *Circ Res*, 2001, 88(10):1072-1079.
- [7] Sallant E A, Lu X, Weiss R B, Chappell M C, Ferrario C M. Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor [J]. *Hypertension*, 1997, 29:388-393.
- [8] 何建桂, 黄艺仪, 马虹, 等. 血管紧张素-(1-7)对压力负荷增高大鼠心肌胶原网络重塑的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(9):523-526.
- [9] van Kesteren C A, van Heuqtun H A, Lamers J M, et al. Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(8):2147-2157.

(收稿日期:2007-12-25)

(本文编辑:李银平)