

[文章编号] 1007-3949(2002)10-03-0217-04

•实验研究•

卡托普利对动脉粥样硬化家兔内皮素和血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 的影响及其与原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ 和 $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ 的相关关系

董晓雁, 张桂清, 方向明, 郑民安, 胡继军, 林桂珍, 蒋 雯

(武汉市第三医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[主题词] 动脉粥样硬化; 内皮素; 血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$; 原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$; 原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$; 卡托普利

[摘要] 为探讨卡托普利对动脉粥样硬化家兔内皮素和血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 的影响及其与原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ 和 $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA 表达的相关性。将 53 只日本大耳白兔随机分为对照组、胆固醇组及高、中、低剂量的卡托普利加胆固醇组。采用放射免疫法及原位逆转录聚合酶链反应技术分别测定不同实验阶段的内皮素及血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 水平及原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ 和 $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA 阳性检出数。结果发现, (1)胆固醇组内皮素水平显著性增高, 随病程进展一直与血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 呈显著正相关 ($r = 0.9011, P < 0.01$; $r = 0.8275, P < 0.05$); 高剂量卡托普利加胆固醇组内皮素和血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 水平较胆固醇组显著降低, 中等剂量卡托普利加胆固醇组和低剂量卡托普利加胆固醇组与胆固醇组比较无显著性差异。(2)胆固醇组的主动脉内膜增厚, 原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ 和 $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA 的表达增高, 高剂量卡托普利加胆固醇组主动脉内膜增殖减轻, 原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ 和 $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA 阳性信号亦显著性减少。(3)各组内皮素与原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ 和 $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA 的阳性检出数呈显著正相关。结果提示, 内皮素与血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 、原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ 和 $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ 在动脉粥样硬化的形成和发展中始终呈显著正相关关系, 而且只有高剂量的卡托普利才能有效地阻止动脉粥样硬化的发展。

[中图分类号] R961

[文献标识码] A

Effect of Captopril on Endothelin and Angiotensin $\text{\textcircled{E}}$ and Their Relationship to Proto-Oncogene $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ and $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ in Atherosclerotic Rabbits

DONG Xiao-Yan, ZHANG Gui-Qing, FANG Xiang-Ming, ZHENG Min-An, HU Ji-Jun, LIN Gui-Zhen, and JIANG Wen

(Department of Cardiology, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, China)

[MeSH] Atherosclerosis; Endothelin; Angiotensin $\text{\textcircled{E}}$; Proto-Oncogene Protein $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$; Proto-Oncogene Protein $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$; Captopril

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of captopril on endothelin (ET) and angiotensin $\text{\textcircled{E}}$ (Ang $\text{\textcircled{E}}$) and their relationship to proto-oncogene in atherosclerotic rabbits. **Methods** 53 male Japan white rabbits were assigned randomly to the control group, cholesterol food (CF) group and high dose (HD), middle dose (MD), low dose (LD) captopril plus cholesterol food group (Cap group), which were fed for 12 weeks. Levels of ET and Ang $\text{\textcircled{E}}$ were determined by radioimmunoassay and expression of proto-oncogene $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ and $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA were observed by in situ reverse transcription PCR (ISRT-PCR) technique. **Results** (1) Levels of ET and Ang $\text{\textcircled{E}}$ were significantly increased in CF group; There were positive significantly correlation between the change of ET and Ang $\text{\textcircled{E}}$ in different experiment stage. Levels of ET and Ang $\text{\textcircled{E}}$ were significantly decreased in HD-Cap group. (2) Positive sign of proto-oncogene $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ and $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA are remarkably increased in proliferated intima, positive sign of proto-oncogene $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ and $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA are remarkably decreased in HD-Cap group. (3) There were positive significantly correlation between the change of ET and expression of proto-oncogene $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ or $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA ($r = 0.9263, P < 0.01$; $r = 0.8541, P < 0.01$). **Conclusion** The level of ET varied closely with change of Ang $\text{\textcircled{E}}$ and expression of proto-oncogene $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ and $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ mRNA. Furthermore, only captopril of high dose may have therapeutic applications to prevent atherosclerotic development effectively.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的主要病理特征是动脉壁平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)大

量增殖。近年研究已发现内皮素和血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ (angiotensin $\text{\textcircled{E}}$, Ang $\text{\textcircled{E}}$)在促进血管平滑肌细胞(vascular SMC, VSMC)增殖中起着重要作用^[1],原癌基因的过度表达也与As的发生发展密切相关^[2]。本文主要通过了解在As形成的不同时期,内皮素与Ang $\text{\textcircled{E}}$ 及原癌基因 $\text{\textcircled{c}}\text{-myc}$ 和 $\text{\textcircled{c}}\text{-fos}$ 的相关关系来进一步探讨As形成与发展的机制及不同剂量的卡托普利在抑制As中的作用。

[收稿日期] 2001-09-17 [修回日期] 2002-04-13

[基金项目] 武汉市卫生局科研基金资助。

[作者简介] 董晓雁,华中科技大学同济医学院协和医院心血管研究所博士研究生,主任医师,心内科主任。张桂清,华中科技大学同济医学院协和医院心血管研究所博士研究生,副主任医师,现在洛阳市中心医院工作。方向明,武汉大学人民医院博士研究生,副主任医师,现在武汉市第三医院内科实验室工作。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

3~4月龄雄性大耳白兔54只,体重2.0~2.5 kg,随机分为三大组:对照组8只;胆固醇组16只;胆固醇+卡托普利组30只,此组又按照卡托普利的不同剂量分为高剂量卡托普利组8只,中等剂量卡托普利组14只,低剂量卡托普利组8只,共五小组。

1.2 饲养及给药方式

对照组每日二次喂给基本饲料(30 g/(kg·d));胆固醇组每日晨间给予高脂饲料(1.5%胆固醇颗粒与猪油2 g);高中低剂量卡托普利组分别按卡托普利120 mg/(kg·d)、60 mg/(kg·d)及30 mg/(kg·d)于晨间空腹时通过鼻饲管注入,再喂给与胆固醇组同量的高脂饲料,饲养6~12周,饮水不限。

1.3 内皮素与血管紧张素 Ang II 的测定

1.3.1 内皮素测定 取实验前(0周)、实验中(6周末)、实验后(12周末)静脉血5 mL,全血标置10% EDTA 100 μL 和抑肽酶100 IU试管中,离心3 000 r/min 10 min,取血浆2 mL,置-30 $^{\circ}\text{C}$ 保存,经C18柱层析提取,75%乙腈3 mL(含0.1%三氟醋酸)洗脱,吹干后溶于0.1 mol/L、pH 7.4 PBS中。内皮素放免盒由解放军总医院长城免疫技术研究所提供,测定步骤严格按说明书进行。用FmJ-182型 Θ 计数器计数每分钟放射活性,血浆内皮素含量以ng/L表示。

1.3.2 血管紧张素 Ang II 测定 Ang II 放射免疫盒由北京北方免疫试剂研究所提供,严格按说明书步骤进行测定。 Ang II 含量以ng/L表示。

1.4 原癌基因 $c-myc$ 和 $c-fos$ mRNA表达检测

原癌基因 $c-myc$ 和 $c-fos$ mRNA的表达检测采用原位逆转录聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术。引物由美国PE公司391A型DNA合成仪合成, $c-myc$ 的引物序列为5'-CCACAAGGAAG-GACTATCCAGC-3', 5'-TTGTGCTCATCTGCTTGAACGG-3'; $c-fos$ 的引物序列为5'-AGCTAGCAGAT-ACGCTCCAA-3', 5'-CGACCTTCTACGACGA TGCC-3'。实验所用AMV逆转录酶、TaqDNA酶、dNTPs和DNase为Promega公司产品, Bio-11-dUTP、AV-AP和NBT/BCIP购自华美生物工程公司。原位DNA扩增仪SD型为美国Techne公司产品。

1.4.1 标本预处理 将胸主动脉常规石蜡切片(厚5 μm),经脱蜡入水,然后用20 mg/L蛋白酶K 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化10 min,4%多聚甲醛固定15 min,以Dnase (1 mL/L)于37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中消化过夜。

1.4.2 逆转录 反应体积20 μL ,含10 mmol/L

Tris HCl (pH 8.3)、KCl 50 mmol/L、 MgCl_2^{2+} 4 mmol/L、dNTPs 1.0 mmol/L、引物1 $\mu\text{mol/L}$ 、Rnasin 2 μL 、AMV逆转录酶15 u,逆转录条件为42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。

1.4.3 聚合酶链反应 反应体积30 μL ,含10 mmol/L Tris HCl (pH 8.3) 50 mmol/L, KCl 4.5 mmol/L, MgCl_2^{2+} 引物1和2各1 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 0.2 mmol/L,其中1/10 dITP由Bio-11-dUTP取代, Taq酶1.5 μL ,加盖硅化盖玻片,指甲油密封。热循环条件:首先94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,之后按94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共25个循环后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。

1.4.4 显示 3% BSA封闭30 min后,加AV-AP 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应20 min,用NBT/BCIP显色30 min,核固红复染后封片镜检,未见蓝色为阴性,蓝色为阳性。

1.5 统计学处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均值比较用 t 检验,不同指标间进行直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组内皮素与血管紧张素 Ang II 的含量及部分相关性分析

从表1(Table 1)可见,各组内皮素与 Ang II 的含量在实验前(0周)均无呈显著性差异,实验中(6周)、实验后(12周)胆固醇组的内皮素与 Ang II 的水平均显著性增高,分别与对照组比较差异有显著性或极显著性统计学意义($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),且12周与6周的内皮素和 Ang II 水平的比较也有显著性差异。胆固醇组内皮素随病程发展与 Ang II 一直呈正相关关系,相关系数在6周与12周分别为 $r = 0.9011$ ($P < 0.01$)和 $r = 0.8274$ ($P < 0.05$)。高剂量卡托普利组的内皮素和 Ang II 与胆固醇组的比较呈显著性降低,与对照组比较差异无显著性;中等剂量卡托普利组与低剂量卡托普利组虽较胆固醇组中的内皮素和 Ang II 的水平降低,但无显著性差异,而与对照组比较均呈显著性增高。

2.2 主动脉粥样病变中原癌基因 $c-myc$ 和 $c-fos$ mRNA的表达

原位逆转录PCR技术检测得到的主动脉壁原癌基因 $c-myc$ 和 $c-fos$ mRNA的阳性表达信号见图1(Figure 1)。可见对照组内膜无增生,未见 $c-myc$ 和 $c-fos$ mRNA阳性表达信号(图1A, Figure 1A)。胆固醇组内膜明显增厚,在新生内膜中可见原癌基因 $c-myc$ 和 $c-fos$ mRNA的蓝色(此图中为黑色)阳性信号明显增多(图1B, Figure 1B)。高浓度卡托普利干预

组内膜增厚明显减少, 原癌基因 $c\text{-myc}$ 和 $c\text{-fos}$ mRNA 阳性信号亦显著性减少(图 1C, Figure 1C)。

表 1. 各组内皮素与血管紧张素 II 浓度的变化.

Table 1. The changes of concentrations of ET and Ang II in five groups ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	ET (ng/L)			Ang II (ng/L)		
		0 week	6 weeks	12 weeks	0 week	6 weeks	12 weeks
Control	8	58.4 ± 22.6	61.5 ± 21.3	67.1 ± 27.0	38.5 ± 10.8	32.2 ± 11.3	51.2 ± 31.3
CF	15	60.2 ± 13.9	109.4 ± 41.7 ^a	147.8 ± 26.9 ^{b,c}	36.9 ± 14.4	81.3 ± 41.2 ^a	149.2 ± 61.7 ^{b,c}
HD-Cap	8	57.9 ± 31.6	73.6 ± 27.1 ^c	89.0 ± 41.2 ^d	40.2 ± 18.6	49.5 ± 32.5 ^c	63.6 ± 29.3 ^d
MD-Cap	14	62.3 ± 28.2	113.0 ± 31.7 ^a	117.0 ± 47.3	39.3 ± 16.2	62.5 ± 37.4 ^a	149.1 ± 38.9 ^a
LD-Cap	8	58.6 ± 29.4	126.0 ± 21.4 ^a	121.9 ± 49.5	38.7 ± 18.9	65.6 ± 41.2 ^a	127.5 ± 40.3 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group. c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with cholesterol food group; e: $P < 0.05$, compared with 6 weeks of the same group.

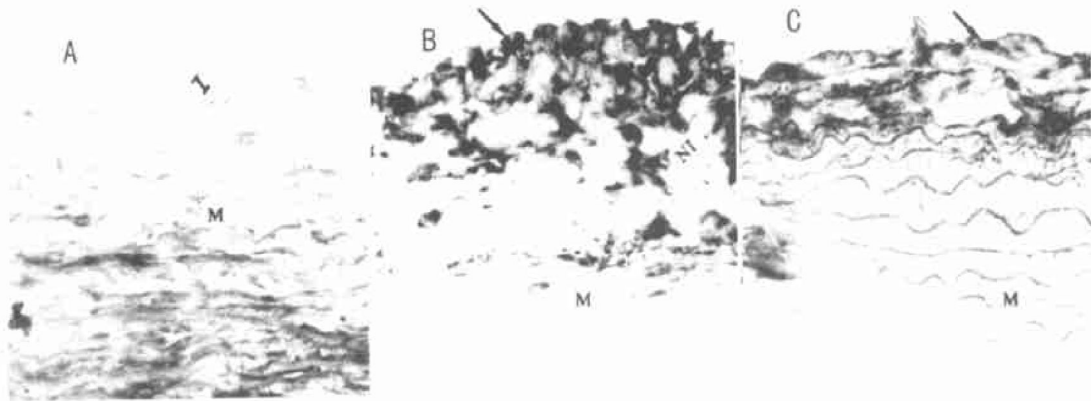


图 1. 原位逆转录 PCR 技术检测主动脉壁原癌基因 $c\text{-myc}$ 和 $c\text{-fos}$ mRNA 的阳性表达信号.

Figure 1. The signals of positive expression of proto-oncogene $c\text{-myc}$ and $c\text{-fos}$ mRNA are detected by reverse transcription PCR in situ in wall of aorta. A is control group; and B is cholesterol food group; and C is high dose captopril group; and I is tunica intima; and NI is neogenetic tunica intima; and M is tunica media in Figure 1. $\times 20$

2.3 各组内皮素与原癌基因 $c\text{-myc}$ 和 $c\text{-fos}$ mRNA 阳性检出数的相关关系

胆固醇组的原癌基因 $c\text{-myc}$ 和 $c\text{-fos}$ mRNA 阳性检出数增高, 与对照组比较呈显著性差异, 内皮素与 $c\text{-myc}$ 和 $c\text{-fos}$ 的表达率呈显著性正相关关系。应用高剂量卡托普利后, 内皮素水平显著下降, 原癌基因 $c\text{-myc}$ 和 $c\text{-fos}$ mRNA 阳性检出数亦显著减少; 中等剂量卡托普利组、低剂量卡托普利组的内皮素水平不降低, 原癌基因 $c\text{-myc}$ 和 $c\text{-fos}$ mRNA 阳性检出数也不降低(表 2, Table 2)。

3 讨论

研究发现, 血管内皮细胞不仅是全身血管内膜的屏障结构, 而且是重要的内分泌器官, 可产生多种生长因子及细胞因子参与平滑肌细胞的增殖, 其中

表 2. 各组内皮素与原癌基因 $c\text{-myc}$ 和 $c\text{-fos}$ mRNA 阳性检出数的相关关系

Table 2. Correlation between ET and positive expression of proto-oncogene $c\text{-myc}$ and $c\text{-fos}$ mRNA in different groups.

Groups	total n	Positive of $c\text{-myc}$			Positive of $c\text{-fos}$		
		n	rate	r	n	rate	r
Control	8	1	12.5%	0.8184 ^e	1	12.5%	0.8074 ^e
CF	15	13	86.7% ^b	0.9263 ^f	12	75% ^b	0.8541 ^f
HD-Cap	8	3	37.5% ^c	0.9420 ^f	3	37.5% ^c	0.8977 ^f
MD-Cap	14	7	50.0% ^a	0.8336 ^e	8	57.1% ^a	0.7958 ^e
LD-Cap	8	5	62.5% ^a	0.8978 ^f	6	75% ^b	0.7799 ^e

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with cholesterol food group; e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$.

内皮素(ET)与血管紧张素 Ang II 是迄今已知作用最强的血管收缩肽,内皮素不仅收缩血管作用比 Ang II 强10倍^[2,3],而且还是强有丝分裂剂,具有促生长作用,促进动脉粥样硬化的形成与发展^[4]。本文发现,胆固醇组的内皮素与 Ang II 均较对照组显著性增高($P < 0.01$, $P < 0.05$),而且内皮素与 Ang II 水平随病程的进展呈显著性正相关关系, Ang II 促进血管内皮细胞分泌内皮素-1,后者又反过来促进血管内皮细胞生成 Ang II 二者相互协同,促进血管平滑肌细胞(VSMC)增殖,细胞外间质增加。由于内皮素与 Ang II 呈正相关关系, Ang II 作为一种自分泌生长因子不仅能直接诱导原癌基因 $c-myc$ 与 fos 的mRNA基因表达,使血管平滑肌细胞与细胞外间质增生,近年的研究还发现,它至少还通过两种途径影响内皮功能,一是 Ang II 可抑制NO的生成和(或)释放;二是 Ang II 也可通过刺激巨噬细胞脂质过氧化增加LDL的氧化,促进氧化的LDL沉积内皮,使内皮细胞产生内皮素1增加,NO减少。卡托普利作为血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI),可通过减少 Ang II 的生成及缓激肽的降解,增加NO的合成以抑制其促血管壁细胞增殖作用及其抗自由基的损伤,保护血管内膜,增加血管内皮抗氧化防护机制^[5-7]。已有作者报道卡托普利能改善用致动脉粥样硬化食物喂养的兔子的内皮依赖性血管舒缩功能,并证实血管紧张素转换酶抑制剂能防止高脂喂养的动物形成明显的动脉粥样硬化^[8]。逆转内皮功能障碍的临床试验(TREND)^[9]证实Quinapril(40 mg/d,服用6个月)可改善冠心病人的内皮功能。Chobanian等^[10]认为,卡托普利抗As的这种抑制作用与药物的剂量有关。本实验应用不同剂量的卡托普利提示,中等剂量卡托普利组与低剂量卡托普利组的内皮素、 Ang II 的增高程度虽低于胆固醇组的内皮素、 Ang II 的增高幅度,但其差异均无显著性,原癌基因 $c-myc$ 和 fos

的表达也无显著性降低;而高剂量卡托普利组随病程进展,内皮素与 Ang II 均显著低于胆固醇组($P < 0.05$, $P < 0.01$);随内皮素水平的降低, $c-myc$ 与 fos 原癌基因的检出率也随之降低,呈显著性正相关关系,提示只有高剂量的卡托普利才能有效地发挥其作用。有实验报道,内皮素只是引起短暂的 $c-myc$ 和 $c-fos$ mRNA的表达增加,而本实验提示内皮素随整个病程发展均与 Ang II 呈正相关,而且只有采用高剂量才能真正起到阻止动脉粥样硬化发展的作用,并且是安全的,为临床应用于动脉粥样硬化的防治提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Pepine CJ, Zahradka PA, Seward L, et al. Endothelial function as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. *Am J Cardiol*, 1997, **79** (5A): 3-8
- [2] Hayes WC, Webb DJ. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin Sci*, 1993, **84** (5): 485
- [3] McMurray JG, Schwartz RS, Edwards WD, et al. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation*, 1992, **84** (4): 1 379-385
- [4] Hyanes WS, Webb DJ. Endothelium dependent modulation of responses to endothelin in human veins. *Clin Sci*, 1993, **84** (4): 427
- [5] 王向宇, 吴可贵, 晋学庆, 等. 自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞异常增殖和自身肾素-血管紧张素系统的关系. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (3): 212-216
- [6] Vaughan DE, Pfeffer MA, Menapace FJ, et al. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. *Clin Invest*, 1995, **95**: 995
- [7] Finger J, Muller RKM, Kuhn H, et al. Mechanism of inhibition of neointimal formation by the angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1 945-950
- [8] 陈良华, 陆国平, 吴春芳, 等. 卡托普利对家兔动脉粥样硬化内皮依赖性舒张反应的影响. *高血压杂志*, 1999, **7** (1): 76-78
- [9] Mancini GB, Henry GC, Macaya C, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trialing Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation*, 1996, **94**: 258-265
- [10] Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, et al. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe Heritable Hyperlipemic Rabbit. *Hypertension*, 1990, **15** (3): 327-331

(此文编辑 胡必利)