

伊贝沙坦对自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡及相关基因 Bax、Bcl-2 和 P53 表达的影响

余泽洪, 邹 祎, 陈林祥, 王晋明¹

(江门市人民医院心内科, 广东省江门市 529051; 1. 武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 病理学与病理生理学; 自发性高血压大鼠; 细胞凋亡; 伊贝沙坦; 癌基因 Bax; Bcl-2; P53

[摘要] 为探讨血管紧张素 1 型受体拮抗剂伊贝沙坦对自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡的影响, 同时检测凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 和 P53 蛋白表达的变化。选用 13 周龄自发性高血压大鼠 20 只, 随机分为 2 组: 伊贝沙坦组大鼠服用伊贝沙坦[50 mg/(kg·d)], 另一组大鼠不用药物作为高血压对照(自发性高血压大鼠组), 另设同源正常血压大鼠 10 只作为正常对照(WKY 组)。共观察 15 周, 每两周测血压和体重一次, 实验结束时称左心室重量。应用原位标记检测技术观察高血压大鼠左心室心肌细胞凋亡的变化, 并用免疫组织化学 SP 法检测凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 和 P53 的蛋白表达。结果发现, (1) 实验终结时, 伊贝沙坦组血压明显低于自发性高血压大鼠组(128 ± 5 mm Hg 比 193 ± 8 mm Hg, $P < 0.01$), 略高于 WKY 组(121 ± 6 mm Hg), 但无统计学差异($P > 0.05$)。 (2) 自发性高血压大鼠组凋亡指数明显高于 WKY 组(1.59 ± 0.38 比 0.33 ± 0.11 , $P < 0.01$); Bax 蛋白表达指数明显高于 WKY 组(1.76 ± 0.31 比 0.59 ± 0.11 , $P < 0.01$); Bcl-2 蛋白表达无明显差异(0.88 ± 0.26 比 0.82 ± 0.19), Bcl-2/Bax 比率亦明显低于 WKY 组(0.53 ± 0.17 比 1.41 ± 0.34 , $P < 0.01$)。 (3) 伊贝沙坦组心肌细胞凋亡指数低于自发性高血压大鼠组(0.56 ± 0.17 比 1.59 ± 0.38 , $P < 0.01$); Bax 蛋白表达下降(0.84 ± 0.23 比 1.76 ± 0.31 , $P < 0.01$); Bcl-2 蛋白表达无明显变化(0.92 ± 0.28 比 0.88 ± 0.26 , $P > 0.05$); Bcl-2/Bax 比率上升(1.12 ± 0.35 比 0.53 ± 0.17 , $P < 0.01$)。而三组 P53 蛋白均未见阳性表达。此结果提示, 自发性高血压大鼠的心肌细胞凋亡增加与 Bax 过表达有关, 血管紧张素 AT_1 型受体拮抗剂能抑制心肌细胞凋亡和 Bax 蛋白的过表达。血管紧张素 AT_1 可能通过血管紧张素 AT_1 型受体刺激 bax 基因过表达而促发心肌细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Investigation of the Effect of Ibesartan on Cardiomyocytes Apoptosis and the Expression of Regulating Oncogene Bax, and Bcl-2, and P53 in Spontaneous Hypertensive Rats

YU Zhe-Hong¹, ZOU Yi¹, CHEN Lin-Xiang¹, and WANG Jin-Ming²

(1. Department of Cardiology, Jiangmen People's Hospital, Jiangmen 529051; 2. Department of Cardiology, The Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[KEY WORDS] Spontaneous Hypertensive Rats; Apoptosis; Ibesartan; Oncogene, Bax; Oncogene, Bcl-2; Oncogene, P53

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of the angiotensin AT_1 type 1 (AT_1) receptor antagonist irbesartan on cardiomyocytes apoptosis in spontaneous hypertensive rats (SHR), and gain insight into the regulation of cardiac apoptosis. **Methods** Twenty 13 weeks old SHR were randomly divide into two groups: SHR positive control group, irbesartan treating group [50 mg/(kg·d)], ten normotensive Wistar-Kyoto rats were acted as normal control group. Monitoring blood pressure of rats periodically. After 15 weeks, putting all rats to death, measuring heart weight, then we investigated the changes of cardiomyocytes, apoptosis using in situ TDT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The expression of Bcl-2, Bax and P53 was assessed by immunohistochemical detection. **Results** Compared with WKY, untreated SHR exhibited increased apoptosis (1.59 ± 0.38 vs 0.33 ± 0.11 , $P < 0.01$) increased Bax (1.76 ± 0.31 vs 0.59 ± 0.11 , $P < 0.01$) and similar Bcl-2 (0.88 ± 0.26 vs 0.82 ± 0.19 , $P > 0.05$). The Bcl-2/Bax ratio was lower in untreated SHR than in WKY (0.53 ± 0.17 vs 1.41 ± 0.34 , $P < 0.01$). The chronic administration of irbesartan was associated with the the normalization of apoptosis (0.56 ± 0.17 vs 1.59 ± 0.38 , $P < 0.01$), Bax expression (0.84 ± 0.23 vs 1.76 ± 0.31 , $P < 0.01$) and the Bcl-2/Bax ratio (1.12 ± 0.35 vs 0.53 ± 0.17 , $P < 0.01$). No changes in the expression of Bcl-2 were observed in these rats after treatment (0.92 ± 0.28 vs 0.88 ± 0.26 , $P > 0.05$). **Conclusion** Chronic blockade of AT_1 receptors prevents Bax overexpression and normalizes apoptosis in the left ventricle of SHR independently of its hemodynamic effect. AT_1 blocker may prevented apoptosis by acting through a receptor mechanism involving the AT_1 receptor, and may participate in the stimulation of Bax protein, which in turn renders cardiomyocytes more susceptible to apoptosis.

[收稿日期] 2004-02-07

[修回日期] 2004-07-12

[作者简介] 余泽洪, 副主任医师, 副教授, 心内科主任。邹祎, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事高血压病的基础和临床研究。陈林祥, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 心血管病研究所所长。王晋明, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。

在自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rats, SHR)^[1]和高血压病人^[2]中左心室肥厚时心肌细胞的数量减少,其机制一直未明。最近陆续有报道在SHR左心室肥厚^[3]和心力衰竭^[4]时左心室心肌细胞凋亡增加,这可能是心肌细胞数量进行性减少的重要原因。心肌细胞凋亡由一系列基因调控,其中促调基因Bax和抑调基因Bcl-2被认为是非常重要的成员,Bcl-2/Bax的比率决定了细胞对刺激的敏感性。为此,本实验检测SHR左心室心肌细胞的凋亡、凋亡相关基因Bcl-2、Bax和P53在左心室的表达,以及血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)1型受体拮抗剂伊贝沙坦的影响,探讨心肌细胞凋亡的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用13周龄的SHR 20只(由北京阜外心血管病医院动物室提供)随机分为2组,即SHR组和伊贝沙坦组。雌雄各半,2组间性别、体重、血压无差别。另选13周龄同源WKY大鼠(Wistar-Kyoto rats) 10只(雌雄各半)作为正常对照组(WKY组)。所有大鼠均由武汉大学人民医院动物室专人饲养。饲养条件为温度20~25℃,湿度50%~60%,由标准饲料及自来水喂养。

1.2 给药方法

伊贝沙坦组以伊贝沙坦(商品名安博维,由杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司惠赠)50 mg/(kg·d)溶入特制饮水器中。药物浓度根据每日饮水量和体重调整。连续用药15周。其余两组饮水中不加药物。

1.3 血压测量

用RBP-1型大鼠尾压心率测量仪(中日友好临床医学研究所)测量尾动脉收缩压。第1周(用药前)、第2周(用药一周)各测压一次,以后每隔2周测一次血压,直到实验结束。

1.4 左心室重量的测定

用药15周(第16周)后处死大鼠,迅速开胸取出心脏,去除心房、大血管和心包组织,沿室间隔分离左心室(包括室间隔)。用冰冷生理盐水充分灌洗,滤纸吸干,称左心室重量。左心室重量与体重的比值为左心室重量指数。

1.5 心肌细胞凋亡检测

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24 h(4℃),常规石蜡包

埋,并作心脏横断切片(片厚5 μm),应用改良的末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的带荧光的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)原位标记心肌细胞核中的DNA片段(POD购自德国宝灵曼公司),以DAB染色,苏木素复染,以不加TdT酶者作为阴性对照。光镜下正常心肌细胞核呈蓝色,而凋亡心肌细胞核呈棕黄色。

1.6 凋亡的心肌细胞半定量分析

每只大鼠观察5张切片,每张切片计数5个高倍视野(400×)中凋亡细胞数和细胞总数,将凋亡细胞数与总细胞数的比值×100即为凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.7 凋亡相关基因Bcl-2、Bax和P53的表达检测

切片脱蜡入水后阻断内源性POD,修复抗原,以S-P免疫组织化学法检测蛋白表达(SP试剂盒包括封闭用正常血清工作液、生物素标记的二抗工作液和辣根酶标记链霉卵白素工作液,购自北京中山生物技术有限公司)。均以DAB显色。胞膜、核膜或胞浆中有棕褐色颗粒者为Bcl-2蛋白阳性细胞和Bax蛋白阳性细胞。胞核呈棕色为P53蛋白阳性细胞。切片于光镜下200倍放大,经图象分析仪随机选择10个视野检测阳性染色平均吸光度、阳性细胞百分比。蛋白表达指数^[5](protein expression index, PEI)=平均吸光度×阳性细胞百分比×100。

1.8 统计学处理

采用SPSS10.0进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用方差分析。 $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 血压与心肌肥厚

实验开始时,SHR组和伊贝沙坦组收缩压明显高于WKY组。随着实验进程,SHR组血压一直保持较高水平,而伊贝沙坦组逐渐下降至与WKY组相近水平(表1, Table 1)。至第16周,SHR组收缩压明显高于伊贝沙坦组和WKY组($P < 0.01$),伊贝沙坦组与WKY组无明显差别。而在伊贝沙坦组,有3只收缩压高于WKY组上限,有7只在WKY组收缩压范围内。实验结束时伊贝沙坦组与WKY组在左心室重量与左心室重量指数相近,而明显低于SHR组($P < 0.01$)(表2, Table 2)。

2.2 左心室心肌细胞的凋亡

自发性高血压大鼠(SHR)组左心室心肌细胞凋亡指数明显高于WKY组(表3, Table 3, $P < 0.01$)。

凋亡的心肌细胞主要位于心内膜及中层。伊贝沙坦组凋亡指数明显较 SHR 组减少 ($P < 0.01$), 在伊贝沙坦组中, 血压仍较高 (> 140 mm Hg) 的 3 只大鼠与 7 只血压降至正常 (< 140 mm Hg) 的大鼠的凋亡指数未见明显差异 (0.54 ± 0.19 比 0.57 ± 0.22 , $P > 0.05$)。

表 1. 实验过程中三组大鼠血压比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The comparison of systolic blood pressure in the 3 groups of rats during the experimental period

时间	WKY 组	SHR 组	伊贝沙坦组
1 周	110 \pm 13	150 \pm 8	155 \pm 12
2 周	120 \pm 11	160 \pm 10	152 \pm 14
4 周	118 \pm 9	175 \pm 9	147 \pm 8
6 周	123 \pm 11	185 \pm 11	135 \pm 13
8 周	120 \pm 10	200 \pm 14	136 \pm 7
10 周	124 \pm 8	195 \pm 7	132 \pm 16
12 周	122 \pm 15	192 \pm 11	130 \pm 13
14 周	122 \pm 13	195 \pm 12	128 \pm 12
16 周	121 \pm 6	193 \pm 8	128 \pm 5

表 2. 实验结束时三组大鼠体重、血压、左心室重量、左心室重量指数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2. comparison of body weight, SBP, left ventricular weight, left ventricular weight index in the 3 groups of rats

参数	WKY 组	SHR 组	伊贝沙坦组
体重	262 \pm 30	268 \pm 30	266 \pm 32
收缩压 (mm Hg)	121 \pm 6	193 \pm 8 ^{ab}	128 \pm 5
左心室重量(g)	0.63 \pm 0.14	0.86 \pm 0.15 ^{ab}	0.69 \pm 0.18
左心室重量指数($\times 10^{-3}$)	2.44 \pm 0.48	3.56 \pm 0.38 ^{ab}	2.68 \pm 0.43

a: $P < 0.01$, 与 WKY 组比较; b: $P < 0.01$, 与伊贝沙坦组比较。

2.3 三组大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 与 P53 蛋白表达

实验结束时, 三组大鼠心肌细胞三种蛋白的表达见表 3(Table 3)。可见 SHR 组 Bcl-2 的蛋白表达指数与 WKY 组和伊贝沙坦组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。SHR 组 Bax 表达量明显高于 WKY 组 ($P < 0.01$), 而伊贝沙坦组 Bax 的蛋白表达指数高于 WKY 组 ($P < 0.05$)。但明显低于 SHR 组 ($P < 0.01$)。SHR 组 Bcl-2 与 Bax 比值明显低于 WKY 组 ($P < 0.01$), 伊贝沙坦组 Bcl-2 与 Bax 比值明显高于 SHR 组 ($P < 0.01$)。而在 WKY 组与伊贝沙坦组无明显差异 ($P > 0.05$)。这表明 SHR 左心室对凋亡刺激易感性增加, 而伊贝沙坦则可抑制这种异常。

表 3. 三组大鼠凋亡指数、蛋白表达指数和 Bcl-2 与 Bax 比值的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3. comparison of apoptotic index, The expression index of Bcl-2, Bax and P53 in the 3 groups of rats

参 数	WKY 组	SHR 组	伊贝沙坦组
凋亡指数	0.33 \pm 0.11	1.59 \pm 0.38 ^b	0.56 \pm 0.17 ^{ad}
Bax 的 PEI	0.59 \pm 0.11	1.76 \pm 0.31 ^b	0.84 \pm 0.23 ^{ad}
Bcl-2 的 PEI	0.82 \pm 0.19	0.88 \pm 0.26	0.92 \pm 0.28
Bcl-2 与 Bax 比值	1.41 \pm 0.34	0.53 \pm 0.17 ^b	1.12 \pm 0.35 ^d

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 WKY 组比较; d: $P < 0.01$, 与 SHR 组比较。

3 讨 论

以前的研究^[6]证实 SHR 肥厚的左心室心肌细胞凋亡增加, 且与局部血管紧张素转化酶活性呈正相关, 应用血管紧张素转化酶抑制剂类药后能抑制心肌细胞凋亡。提示 SHR 心肌细胞凋亡可能与 Ang Ⅱ有关。本研究应用 Ang Ⅱ型受体拮抗剂伊贝沙坦长期治疗, 观察 SHR 心肌细胞凋亡的变化。发现 SHR 组凋亡的心肌细胞明显增多, 而伊贝沙坦可以抑制心肌细胞的凋亡。SHR 心肌细胞的凋亡增多是否由于压力超负荷所致? Diez 等^[6]报道 SHR 心肌细胞凋亡与血压无关。本实验也发现即使在伊贝沙坦治疗后血压仍较高的大鼠其凋亡指数亦恢复正常。尽管血流动力学因素不能完全排除, 但在心肌细胞凋亡过程中可能有其他机制发挥更重要的作用。

本实验检测了凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 和 P53 蛋白表达。业已知道, Bcl-2 和 Bax 蛋白是调整细胞凋亡的 Bcl-2 家族中的重要成员。Bax 蛋白可促进细胞凋亡, 而 Bcl-2 蛋白可阻抑细胞凋亡, Bcl 与 Bax 比值决定了细胞对凋亡刺激的敏感性和细胞生存与死亡的趋势^[7]。我们在实验中发现, 与 WKY 组比较, SHR 组心肌细胞的 Bax 蛋白表达明显增加, 而 Bcl-2 蛋白表达类似, 故 Bcl 与 Bax 比值下降。这表明 SHR 左心室心肌细胞对凋亡刺激敏感。由于 P53 被证明是 Bcl-2 和 Bax 基因转录的调控因子, 所以我们同时也检测了 P53 的蛋白表达, 但三组均未见阳性表达。虽然 P53 在胚胎期和出生后早期阶段的心肌细胞呈高表达, 但我们在成年大鼠的心肌细胞中未检测到 P53 的阳性表达。到目前为止, 尚无文献用免疫组织化学方法在压力超负荷导致的心肌细胞死亡过程中检测到 P53 表达的报道^[8], 这与本实验是相符的。而且, 由 P53 调控的凋亡 Bax 蛋白表达

增高, Bcl-2 蛋白表达减少。而在我们的实验中, Bcl-2 蛋白表达在 SHR 组和 WKY 组未见明显变化, 所以我们认为 SHR 心肌细胞的凋亡可能通过非 P53 依赖途径来调控的。

除了 P53 外, 还有其他因子也可能促进细胞凋亡, 如肿瘤坏死因子 α ^[9]、c-myc、野生型 P53 活化片段 1(WAF-1)^[4] 和 Fas/Apo-1^[10]。Li 等^[4] 近来发现在 SHR 心肌细胞凋亡的同时, WAF-1 表达增加, 而 Bcl-2 表达无明显变化, 是否由于 WAF-1 高表达导致 SHR bax 基因的过表达, 从而促进凋亡尚需进一步研究。

另一可能机制是 Ang Ⅱ刺激 Bax 的过表达而促发 SHR 的心肌细胞凋亡。因为 Ang Ⅱ型(Ang Ⅱ type 1, AT1)受体拮抗剂伊贝沙坦能抑制 Bax 的过表达和凋亡表明心肌细胞凋亡可能与 Ang Ⅱ有关。目前知道 SHR 心肌的 Ang Ⅱ浓度和受体密度高于 WKY 大鼠, 故凋亡增加。用 AT1 受体拮抗剂治疗后, 尽管心肌 Ang Ⅱ浓度升高, 由于介导心肌细胞凋亡的 AT1 受体被阻滞^[9], 故凋亡反而减少。由于在我们的实验中 Bax 的蛋白表达指数与心肌细胞凋亡指数相平行, 所以我们推测 Ang Ⅱ激发 Bax 过表达而促进心肌细胞凋亡。

我们在实验中还发现 SHR 组与 WKY 组比较, Bcl-2 蛋白表达指数无统计学差异。这与 Li 等^[4] 的报道是一致的。由于 Bcl-2 蛋白可保护各种类型细胞免于凋亡, 随着 SHR 肥厚的左心室心肌细胞凋亡的增加, 若并不伴随 Bcl-2 蛋白代偿性的增加, 凋亡将得以持续, 从而心肌细胞数量进行性减少, 心肌有效收缩单位丧失, 导致心脏收缩功能失调, 甚至向心力衰竭方向转化。我们研究的另一发现是伊贝沙坦的长期治疗能降低心肌细胞对凋亡刺激的易感性, 抑制心肌细胞凋亡。同时, 伊贝沙坦亦能有效逆转左心室肥厚。已有资料表明凋亡作为一种细胞死亡形式, 伴随着间质反应性和修复性纤维化^[11], 加剧心脏重塑的形成。所以抑制细胞凋亡将有助于减轻心脏重塑。Hamet 等^[3] 曾提出药物治疗高血压不仅可使靶器官的细胞生长正常化, 而且可干预心肌细胞的凋亡。文献[5]报道, 用血管紧张素转化酶抑制

剂类治疗 SHR 能调整左心室的增殖和凋亡, 我们的实验也支持这一设想。AT1 受体拮抗剂和血管紧张素转化酶抑制剂类药物对左心室肥厚及心力衰竭的有益作用部分原因是否由于这些药物能抑制 Ang Ⅱ触发的心肌细胞凋亡还需进一步研究^[12]。这一问题若得以证实将为临床治疗开拓新思路。我们可以使用能抑制 Ang Ⅱ形成或阻断 AT1 受体的药物如血管紧张素转化酶抑制剂类、AT1 受体拮抗剂, 甚至通过基因治疗阻断凋亡通路, 从而改善高血压患者的预后。

[参考文献]

- [1] Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*, 1995, **91** (1): 161-170
- [2] Olivetti G, Melissari M, Balbi T, Quaini F, Cigola E, Sonnenblick EH, et al. Myocyte cellular hypertrophy is responsible for ventricular remodeling in the hypertrophied heart of middle aged individuals in the absence of cardiac failure. *Cardiovasc Res*, 1994, **28** (8): 1 199-208
- [3] Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, et al. Apoptosis in target organs in hypertension. *Hypertension*, 1995, **26** (4): 642-648
- [4] Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*, 1997, **272** (5 Pt 2): H2 313-319
- [5] 赵明中, 高承梅, 张宇阳, 汪家瑞. 通心络胶囊对缺血再灌注心肌细胞凋亡及相关基因蛋白表达的影响. *中华心血管病杂志*, 2000, **28** (3): 206
- [6] Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, et al. Cardior myocyte apoptosis and cardiac angiotensin converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1997, **30** (5): 1 029-034
- [7] Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*, 1996, **94** (7): 1 506-512
- [8] Cheng W, Li B, Kajstura J, Li P, Wolin MS, Sonnenblick EH, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest*, 1995, **96** (5): 2 247-259
- [9] Dalla Libera L, Ravara B, Angelini A, Rossini K, Sandri M, Thiene G, et al. Beneficial effects on skeletal muscles of the angiotensin II type 1 receptor blocker irbesartan in experimental heart failure. *Circulation*, 2001, **103** (17): 2 195-200
- [10] Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, 1993, **74** (5): 777-779
- [11] Diez J, Fortuno MA, Ravassa S. Apoptosis in hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*, 1998, **13** (5): 317-325
- [12] 邹 玮, 王晋明, 吴 钢, 张庆华, 朱中生. 伊贝沙坦和咪唑普利逆转自发性高血压大鼠心肌肥厚中细胞凋亡的变化. *中华老年医学杂志*, 2003, **22** (8): 481-485

(此文编辑 胡必利)