

替米沙坦和血管紧张素 Ang II 调节胸主动脉血管紧张素转化酶 2 的表达

孙江文¹, 姚巧玲^{2,3}, 马虹⁴, 郭瑞鲜², 王礼春⁴, 何建桂⁴, 王立军⁴, 冯鉴强², 廖新学⁴

(1. 华南理工大学医院, 广东省广州市 510641; 2. 中山大学中山医学院生理学教研室, 广东省广州市 510080; 3. 新疆医科大学基础医学院生理学教研室, 新疆乌鲁木齐市 830054; 4. 中山大学附属第一医院心内科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 生理学; 血管紧张素转化酶 2; 替米沙坦; 血管紧张素 Ang II ; 胸主动脉平滑肌细胞

[摘要] 目的 探讨替米沙坦和血管紧张素 Ang II 对乳鼠胸主动脉平滑肌血管紧张素转化酶 2 表达的影响。方法 应用蛋白免疫印迹法检测血管紧张素转化酶 2 蛋白的表达, 以逆转录聚合酶链反应法检测血管紧张素转化酶 2 mRNA 表达。结果 在 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内, 替米沙坦呈浓度依赖性上调血管紧张素转化酶 2 蛋白的表达, 在 0~24 h 时间内, 10^{-6} mol/L 替米沙坦呈时间依赖性促进血管紧张素转化酶 2 的蛋白表达, 并促进血管紧张素转化酶 2 mRNA 的表达; 在 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内, 血管紧张素 Ang II 呈浓度依赖性下调血管紧张素转化酶 2 蛋白的表达; 10^{-6} mol/L 替米沙坦能明显地拮抗 10^{-6} mol/L 血管紧张素 Ang II 对血管紧张素转化酶 2 蛋白和 mRNA 表达的抑制作用。结论 替米沙坦能促进胸主动脉平滑肌血管紧张素转化酶 2 蛋白和 mRNA 的表达, 并能明显拮抗血管紧张素 Ang II 对血管紧张素转化酶 2 蛋白和 mRNA 表达的抑制作用。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

Effect of Telmisartan and Angiotensin Ang II on the Expression of Angiotensin Converting Enzyme-2 in Thoracic Aortic Smooth Muscle Cells

SUN Jiang-Wen, YAO Qiao-Ling, MA Hong, GUO Rui-Xian, WANG Li-Chun, HE Jian-Gui, WANG Li-Jun, FENG Jian-Qiang, and LIAO Xin-Xue

(Hospital of South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

[KEY WORDS] Angiotensin Converting Enzyme-2; Telmisartan; Angiotensin Ang II ; Thoracic Aortic Smooth Muscle Cells

[ABSTRACT] **Aim** To explore effects of telmisartan and angiotensin Ang II on expression of angiotensin converting enzyme-2 (ACE-2) in thoracic aortic smooth muscle cells (A10 cells). **Methods** The expression of ACE-2 protein was tested by Western blotting analysis and the expression of ACE-2 mRNA was determined with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. **Results** Telmisartan at the concentration from 10^{-8} to 10^{-5} mol/L dose-dependently enhanced the expression of ACE-2 protein; within 0 to 24 h, 10^{-6} mol/L telmisartan increased ACE-2 protein expression in a time-dependent manner. Moreover, telmisartan at 10^{-6} mol/L upregulated the expression of ACE-2 mRNA. Ang II at 10^{-8} to 10^{-5} mol/L downregulated the expression of ACE-2 protein in a dose-dependent manner. Telmisartan at 10^{-6} mol/L obviously blocked the inhibition of 10^{-6} mol/L Ang II on the expression of ACE-2 protein and ACE-2 mRNA respectively. **Conclusion** Telmisartan not only up-regulates the expression of both ACE-2 protein and ACE-2 mRNA in A10 cells, but also antagonizes the inhibition of Ang II on the expression of both ACE-2 protein and ACE-2 mRNA.

血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme-2, ACE-2) 是肾素血管紧张素系统的新成员, 其结构与血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 虽然部分相似, 但功能特性却不相同。ACE-2 能水解血管紧张素 iv (angiotensin iv, Ang iv) 为血管紧张素 1-9 及水解血管紧张素 Ang II (angiotensin Ang II)

Ang II 为血管紧张素 1-7^[1]。血管紧张素 1-7 具有扩张血管、利钠利尿、降血压及抗血管增生等拮抗 Ang II 的作用^[2]。近年, ACE-2 及其酶产物血管紧张素 1-7 在防治高血压病中的作用日益受到重视。在实验性高血压模型中, ACE-2 mRNA 水平与血压密切相关。随着高血压的发展, 自发性高血压大鼠肾脏 ACE-2 的表达下调, 含量减少^[3]。缺失 ACE-2 基因的小鼠对 Ang II 的升压反应增大^[4], 血浆 Ang II 水平升高^[5], 提示 ACE-2 对 Ang II 的升压反应具有重要的调节作用。

替米沙坦是一种新型、长效、高选择性的 Ang II 1 型受体 (AT1) 拮抗剂, 除了对高血压和慢性心力衰

[收稿日期] 2008-05-29 [修回日期] 2008-07-01

[基金项目] 广东省自然科学基金 (500166); 广东省科技计划项目 (2004B30601016)

[作者简介] 孙江文, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事心血管基础与临床研究, E-mail 为 JWen66@scut.edu.cn。通讯作者廖新学, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心血管基础与临床研究, E-mail 为 liaoxinx@mail.sysu.edu.cn。姚巧玲, 博士研究生, 讲师, 主要从事神经生理、心血管生理研究。

竭有良好的治疗作用外,还能增加血管壁的顺应性,降低血管僵硬性^[4]。近年,王立军等^[5]观察到替米沙坦能上调原代培养的人脐静脉内皮细胞 ACE-2 的表达,提示替米沙坦可通过上调 ACE-2 表达而发挥降血压的作用。然而,替米沙坦对大动脉平滑肌 ACE-2 表达是否有作用,迄今未明。本研究旨在探讨替米沙坦和 Ang Ⅱ对乳鼠胸主动脉平滑肌 ACE-2 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

乳鼠胸主动脉平滑肌细胞(A10)购自 ACTT,替米沙坦和 Ang Ⅱ购自 Sigma 公司,兔抗大鼠 ACE-2 抗体购自 Santa Cruz 公司,山羊抗兔多克隆抗体(多抗)购自 CST 公司,DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及青霉素和链霉素购自 Gibco 公司。细胞蛋白抽提液、BCA 蛋白定量试剂盒和 Trizol 液购自 Pierce 公司,免疫组织化学试剂盒购自博士德公司。96 孔板、24 孔细胞培养皿、60 mm² 培养皿及 25 cm² 培养瓶购自美国 Corning 公司,CO₂ 培养箱购自德国 Heraeus 公司,倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司,酶标仪购自美国 BIO-TEK 公司,梯度 PCR 仪购自德国 Biometra 公司,数字凝胶图像分析仪购自美国 Alpha 公司。

1.2 实验分组

对照组仅用 DMEM 培养基;替米沙坦和 Ang Ⅱ不同浓度组的终浓度分别为 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ 和 10⁻⁵ mol/L,各组均与 A10 细胞孵育 24 h;替米沙坦不同时间组的终浓度为 10⁻⁶ mol/L,分别与 A10 孵育 3、6、12 及 24 h;混合刺激组先加入 Ang Ⅱ1 h,再加入替米沙坦,继续孵育 24 h,终浓度均为 10⁻⁶ mol/L。

1.3 免疫印迹法检测血管紧张素转化酶 2 蛋白的表达

将细胞接种在 60 mm² 培养皿上,培养 24 h 后分别设替米沙坦和 Ang Ⅱ不同浓度组、混合刺激组及替米沙坦不同时间组;培养 24 h 后加入蛋白裂解液,冰上孵育 30 min,收集并离心,取上清;BCA 法定量不同组的蛋白量;每组取 30 μg 蛋白质加入 5×十二烷基硫酸钠(SDS)缓冲液中,加热至 95℃,持续 5 min 使蛋白质变性,用体积分数为 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行分离,转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用质量分数为 5% 的脱脂奶粉室温下封闭 1 h,然后加入按 1:500 稀释的一抗(兔抗大鼠 ACE-2 单抗),4℃培育过夜,用含体积分数 0 及

1% 的吐温 20 的 Tris 缓冲液(TBST)洗 3 次,加入按 1:1 000 稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG),室温培育 1 h, TBST 洗 3 次,每次 5 min。用化学发光法检测并在 Gene Genome 成像仪内曝光成像,各实验组之间进行半定量分析和比较。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测血管紧张素转化酶 2 mRNA 的表达

将细胞接种在 60 mm² 培养皿上,培养 24 h 后分别设替米沙坦和 Ang Ⅱ单用组及混合刺激组。继续培养 24 h 用 Trizol 抽提总 RNA, -70℃保存备用。所得 RNA 吸光度值(A₂₆₀/A₂₈₀) 在 1.9~2.0,表明其纯度能满足实验要求。将 RNA 逆转录生成的 cDNA 作为模板进行扩增。ACE-2 上游引物 5'-TCA GCC TTG TTG CTG TTG CTA G-3', 下游引物 5'-TTC TCC TCC GTA ATG TTG GTG TT-3', 目的产物的扩增片段为 154 bp。β-actin 上游引物 5'-CGT TGA CAT CCG TAA AGA CC-3', 下游引物 5'-GGA AGG TGG ACA GTG AGG C-3', 目的产物的扩增片段为 191 bp。二者的 PCR 反应条件均为:94℃变性 50 s→55℃退火 50 s→72℃延伸 1 min。循环 30 次,最后延伸 10 min。取 10 μL 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,用凝胶图像分析仪扫描分析各条带,并测定其吸光度值,以恒量表达的 β-actin mRNA 为内参照进行校正,各组 ACE-2 mRNA 的相对表达水平用 ACE-2/β-actin 表示。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间比较进行方差齐性检验和单因素方差分析,药物的时间和浓度依赖性进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 替米沙坦对血管紧张素转化酶 2 蛋白表达的影响

在基础状态下,乳鼠胸主动脉平滑肌能表达一定量的 ACE-2。在终浓度为 10⁻⁸~10⁻⁵ mol/L 范围内,随着浓度的增加,替米沙坦呈浓度依赖性促进 ACE-2 蛋白的表达($r = 0.92, P < 0.05$);与对照组比较,替米沙坦分别使 ACE-2 蛋白表达量增加 1.75 倍、2.39 倍、2.52 倍和 2.59 倍($P < 0.05$;表 1 和图 1)。10⁻⁶ mol/L 替米沙坦作用 3、6、12 和 24 h 范围内,替米沙坦呈时间依赖性促进 ACE-2 蛋白的表达($r = 0.97, P < 0.01$);与对照组相比,替米沙坦分别使 ACE-2 蛋白表达量增加 1.03 倍、1.46 倍、1.75 倍

和 2.15 倍 ($P < 0.05$; 表 2 和图 1)。

表 1. 不同浓度替米沙坦对血管紧张素转化酶 2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

替米沙坦浓度 (mol/L)	ACE-2 蛋白
0	0.71 \pm 0.13
10^{-8}	1.24 \pm 0.29
10^{-7}	1.70 \pm 0.10
10^{-6}	1.79 \pm 0.22
10^{-5}	1.84 \pm 0.10

表 2. 替米沙坦作用不同时间对血管紧张素转化酶 2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

时间	ACE-2 蛋白
0	0.59 \pm 0.13
3 h	0.61 \pm 0.031
6 h	0.86 \pm 0.09
12 h	1.03 \pm 0.14
24 h	1.27 \pm 0.14

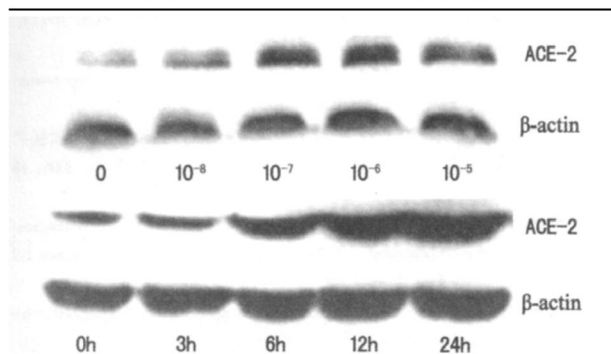


图 1. 替米沙坦影响血管紧张素转化酶 2 蛋白表达的电泳图
上图为不同浓度(单位: mol/L), 下图为不同时间。

2.2 血管紧张素 Ⅱ对血管紧张素转化酶 2 蛋白表达的影响

在终浓度为 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 范围内, 随着浓度的增加, Ang Ⅱ呈浓度依赖性下调 ACE-2 蛋白的表达 ($r = -0.95$, $P < 0.05$); 与对照组比较, Ang Ⅱ分别使 ACE-2 蛋白表达量减少至对照组的 56.3%、54.7%、39.1% 和 15.6% ($P < 0.05$; 表 3 和图 2)。

2.3 替米沙坦和血管紧张素 Ⅱ对血管紧张素转化酶 2 mRNA 及蛋白表达的影响

在基础状态下, 乳鼠胸主动脉平滑肌表达一定量的 ACE-2 mRNA 和蛋白。 10^{-6} mol/L 替米沙坦作用胸主动脉平滑肌 24 h 后, ACE-2 mRNA 和蛋白的表达量显著增多 ($P < 0.01$)。 10^{-6} mol/L Ang Ⅱ作用

胸主动脉平滑肌 24 h 后, ACE-2 mRNA 和蛋白的表达明显减小 ($P < 0.05$); 10^{-6} mol/L 替米沙坦和 10^{-6} mol/L Ang Ⅱ共同作用胸主动脉平滑肌 24 h 后, 替米沙坦能明显拮抗 Ang Ⅱ对 ACE-2 mRNA 和蛋白表达的抑制作用 ($P < 0.01$; 表 4 和图 3)。

表 3. 不同浓度血管紧张素 Ⅱ对血管紧张素转化酶 2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Ang Ⅱ浓度 (mol/L)	ACE-2 蛋白
0	0.64 \pm 0.05
10^{-8}	0.36 \pm 0.05
10^{-7}	0.35 \pm 0.02
10^{-6}	0.25 \pm 0.05
10^{-5}	0.10 \pm 0.02

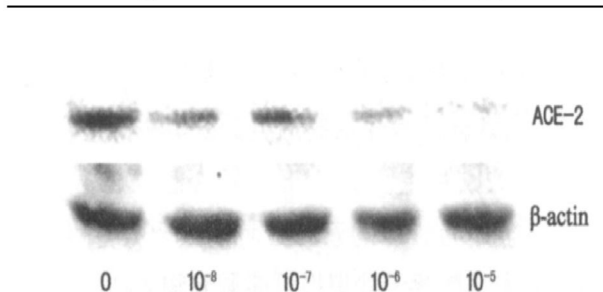


图 2. 不同浓度(单位: mol/L) 血管紧张素 Ⅱ影响血管紧张素转化酶 2 蛋白表达的电泳图

表 4. 替米沙坦和血管紧张素 Ⅱ对血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	ACE-2 mRNA	ACE-2 蛋白
对照组	0.38 \pm 0.05	0.68 \pm 0.08
Ang Ⅱ	0.19 \pm 0.04	0.30 \pm 0.05
替米沙坦	1.04 \pm 0.20	1.44 \pm 0.08
替米沙坦 + Ang Ⅱ	0.79 \pm 0.02	0.86 \pm 0.09

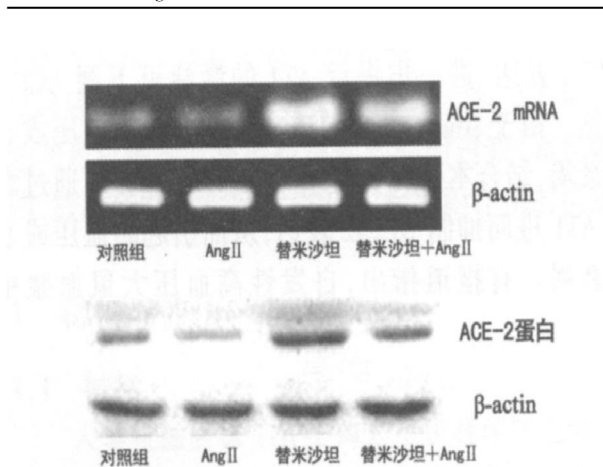


图 3. 替米沙坦和血管紧张素 Ⅱ影响血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白表达的电泳图

3 讨论

尽管 ACE-2 首次被报道时,其只在人的心脏、肾及睾丸组织表达^[6],但近年的研究发现,ACE-2 也存在于子宫胎盘复合体、骨髓、胃肠道、大脑和肺^[7]。许昌声等^[8]报道自发性高血压大鼠和正常 WKY 大鼠的胸主动脉存在 ACE-2 表达。本研究在正常乳鼠胸主动脉平滑肌也检测到一定量的 ACE-2 蛋白表达和 ACE-2 mRNA 表达,进一步证实了以前的实验结果^[7]。

替米沙坦是一种新型的 AT1 阻断剂。替米沙坦通过抑制 AT1,降低总外周血管阻力,增加血管壁的顺应性,降低血管僵硬性,从而对心血管系统发挥重要的保护作用。有报道指出,替米沙坦能有效地抑制高血压大鼠心肌 AT1 的表达而逆转心室重构^[9]。近年,AT1 阻断剂对被认为是高血压基因疗法的新颖靶点 ACE-2 的作用受到高度重视。Igase 等^[10]证实,选择性 AT1 阻断剂奥美沙坦能促进自发性高血压大鼠胸主动脉 ACE-2 和 Ang1-7 的表达。由于替米沙坦与 AT1 的亲合力明显高于奥美沙坦,所以本研究推断替米沙坦极可能调制胸主动脉平滑肌 ACE-2 的表达。本研究结果发现,替米沙坦在一定的浓度范围内($10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L)和一定的时间(3~24 h)呈浓度依赖性及时间依赖性促进乳鼠胸主动脉平滑肌 ACE-2 蛋白表达,并能促进 ACE-2 mRNA 的表达,进一步阐明 AT1 阻断剂对 ACE-2 表达的上调作用,即 AT1 阻断剂不仅可上调高血压大鼠胸主动脉 ACE-2 的表达,也能增加正常乳鼠胸主动脉平滑肌 ACE-2 的表达。Agata 等^[11]也报道奥美沙坦能明显地上调自发性高血压大鼠心肌 ACE-2 表达,这可能是其产生降压作用的重要机制之一。

另一方面,Ang Ⅱ在一定的浓度范围内($10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L)呈浓度依赖性抑制胸主动脉平滑肌 ACE-2 表达,进一步提示 AT1 的激活可下调 ACE-2 表达。由于 Ang Ⅱ过度激活 AT1 可引起高血压或心力衰竭,结合本研究实验结果,提示 Ang Ⅱ可通过激活 AT1 进而抑制 ACE-2 表达,从而引起高血压或心力衰竭。有报道指出,自发性高血压大鼠血浆中

Ang Ⅱ水平明显增高,ACE-2 mRNA 表达水平显著降低^[8],这与本研究的推断相一致。

值得注意的是,本研究证实,当替米沙坦与 Ang Ⅱ共同作用于胸主动脉平滑肌时,替米沙坦可明显拮抗 Ang Ⅱ对 ACE-2 蛋白表达和 ACE-2 mRNA 表达的抑制作用,进一步提示替米沙坦的降压作用可能不完全依赖对 AT1 的阻断作用,还可能通过促进 ACE-2 表达及拮抗 Ang Ⅱ对 ACE-2 表达的抑制作用这些途径来产生降压及心血管保护作用,但其有关机制尚待今后进一步探讨。

综上所述,替米沙坦不但能促进乳鼠胸主动脉平滑肌 ACE-2 蛋白表达及 ACE-2 mRNA 表达,还能拮抗 Ang Ⅱ对 ACE-2 表达的抑制作用,为阐明替米沙坦的作用提供了新颖的实验依据。

[参考文献]

- [1] Katovich MJ, Grobe JL, Huenkelman M, et al. Angiotensin converting enzyme 2 as a novel target for gene therapy for hypertension [J]. *Exp Physiol*, 2005, **90** (3): 299-305.
- [2] 齐峰,王先梅,杨丽霞,等. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素Ⅱ诱导心脏成纤维细胞增殖和胶原合成的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (5): 361-364.
- [3] Tikellis C, Cooper ME, Biakowski K, et al. Developmental expression of ACE-2 in the SHR kidney: A role in pre-tension [J]? *Kidney Int*, 2006, **70** (1): 8-10.
- [4] Sharpe M, Jarvis B, Goa KL. Telmisartan: a review of its use in hypertension [J]. *Drugs*, 2001, **61** (10): 1501-529.
- [5] 王立军,马虹,廖新学,等. 替米沙坦对人血管内皮细胞血管紧张素转化酶2表达的调节作用研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, **18** (4): 224-228.
- [6] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE-2) converts angiotensin IV to angiotensin 1-9 [J]. *Circ Res*, 2000, **87**: E1-E9.
- [7] Hamer D. Quantitative mRNA expression profiling of ACE-2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme [J]. *FEBS Lett*, 2002, **532** (1-2): 107-110.
- [8] 许昌声,翁智远,王华军,等. SHR、WKY 大鼠心、肾及胸主动脉 ACE、ACE-2 表达的差异与高血压的关系[J]. *中国比较医学杂志*, 2006, **16** (7): 402-407.
- [9] 宋碧辉,余江恒. 替米沙坦对高血压大鼠心室重构及 AT1R 表达的影响[J]. *基层医学论坛*, 2007, **11** (5): 387-389.
- [10] Igase M, Strawn WB, Gallagher PE, et al. Angiotensin Ⅱ/AT1 receptors regulate ACE-2 and angiotensin (1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **289**: H1013-H1019.
- [11] Agata J, Ura N, Yoshida H, et al. Olmesartan is an angiotensin Ⅱ receptor blocker with an inhibitory effect on angiotensin converting enzyme [J]. *Hypertens Res*, 2006, **29** (11): 865-873.

(此文编辑 文玉珊)