

[文章编号] 1007-3949(2011)19-06-0509-05

• 实验研究 •

替米沙坦对缺血再灌注兔心肌细胞凋亡的影响

曾晓聪, 李醒三, 文 宏

(广西医科大学附属第一医院心内科, 广西壮族自治区南宁市 530021)

[关键词] 缺血再灌注; 细胞凋亡; 替米沙坦; 过氧化体增殖物激活型受体 γ

[摘要] 目的 探讨替米沙坦对缺血再灌注兔心肌细胞凋亡的影响。方法 48只雄性新西兰大白兔随机分为6组:假手术组、缺血再灌注模型组、GW 9662组、替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组、坎地沙坦组,每组 8只。灌胃给药 2周,假手术组左前降支近端穿线但不结扎,其余 5组予 60 min缺血,360 min再灌注。采用放射免疫法检测心肌血管紧张素 ① 含量,双波长荧光分光光度法测定心肌细胞内游离钙浓度,免疫印迹法测定过氧化体增殖物激活型受体 γ 蛋白的表达,透射电镜和末端标记法检测心肌细胞凋亡。结果 缺血再灌注模型组、GW 9662组、替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组及坎地沙坦组心肌血管紧张素 ① 含量均较假手术组明显增高 ($P < 0.01$)。替米沙坦组过氧化体增殖物激活型受体 γ 蛋白的表达明显高于其余各组 ($P < 0.01$)。电镜显示,替米沙坦、替米沙坦 + GW 9662及坎地沙坦抑制心肌缺血再灌注诱导的心肌细胞凋亡的特征性形态学改变如核染色质浓缩边集,出现凋亡小体等。与缺血再灌注模型组比较,替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组和坎地沙坦组心肌细胞游离钙浓度、凋亡指数均明显降低 ($P < 0.01$);替米沙坦组凋亡指数显著低于替米沙坦 + GW 9662组和坎地沙坦组 ($P < 0.01$)。结论 替米沙坦通过阻断血管紧张素 ① 1型受体降低细胞内钙浓度,并通过上调过氧化体增殖物激活型受体 γ 的表达,抑制兔缺血再灌注心肌细胞凋亡而发挥心肌保护效应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Telmisartan on Rabbit Apoptotic Cardiomyocytes Underwent Ischemia Reperfusion Injury

ZENG Xiao-Cong, LI Xing-San, and WEN Hong

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

[KEY WORDS] Ischemia/Reperfusion, Apoptosis, Telmisartan, Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of telmisartan on rabbit apoptotic cardiomyocytes underwent ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** 48 Healthy male New Zealand white rabbits were randomly divided into six groups ($n = 8$): sham operation group, I/R model group, GW 9662 group, telmisartan group, telmisartan + GW 9662 group, candesartan group. After intragastric administration for 2 weeks, the left anterior descending (LAD) coronary artery was occluded for 60 minutes followed by 360 minutes reperfusion to induce ischemia/reperfusion injury. The concentration of angiotensin ① in myocardium was analyzed by radioimmunoassay and the intracellular free calcium concentration was measured by dual wavelength fluorophotometry. Then, protein expression of peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ) was detected by Western blot. In addition, apoptosis was detected by transmission electron microscope and by TUNEL staining. **Results** Compared with sham operation group, the concentration of angiotensin ① in myocardium was significantly increased in I/R model group, GW 9662 group, telmisartan group, telmisartan + GW 9662 group, and candesartan group ($P < 0.01$). And the expression of PPAR γ was higher in telmisartan group than that in other groups ($P < 0.01$). Interestingly, telmisartan, telmisartan + GW 9662 and candesartan inhibited the morphological chan-

[收稿日期] 2010-12-28

[基金项目] 广西科学基金资助(桂科基 0575069)

[作者简介] 曾晓聪, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病缺血再灌注的基础及临床, E-mail为 doudou_ban@126.com。通讯作者李醒三, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心肌缺血再灌注损伤, E-mail为 aban829@163.com。文宏, 博士, 主治医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail为 wenhong120@163.com。

ges of apoptotic cardiomyocytes which was induced by myocardial ischemia/reperfusion by condensing chromatin clumps against the nuclear envelope and presentation of apoptotic body. When compared with I/R model group, the intracellular free calcium concentration and apoptosis index were significantly reduced in telmisartan group, telmisartan+GW9662 group and candesartan group ($P < 0.01$). Among them, apoptosis index was lowest in telmisartan group ($P < 0.01$).

Conclusion Telmisartan could reduce myocardial apoptosis by blocking the angiotensin II receptor and up-regulating the expression of PPAR γ in the rabbit I/R model.

溶栓或经皮冠状动脉介入治疗有效地改善了ST段抬高型心肌梗死患者的预后,但再灌注治疗的本身也会造成心肌损伤。心肌细胞凋亡是缺血再灌注(I/R)损伤心肌中表现较早、较主要的细胞死亡形式,同时也是决定心肌梗死面积的重要因素。近年来,血管紧张素 II 型受体阻滞剂(ARB)在I/R损伤中的作用受到关注,ARB可减轻氧化损伤、舒张冠状动脉血管、缩小梗死面积,保护I/R损伤心肌^[1-2]。替米沙坦亲脂性较其它ARB更强,因此更容易进入组织,而且具有ARB和过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ)激动剂的双重机制^[3]。本研究旨在观察替米沙坦对I/R兔心肌细胞凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要药品和试剂

替米沙坦(美卡素)由上海勃林格殷格翰药业有限公司广州分公司提供;坎地沙坦由天津武田药品有限公司提供;PPAR γ 特异性拮抗剂GW9662、钙荧光指示剂Fura-2/AM为Sigma公司产品;血管紧张素 II (Ang II)放射免疫分析试剂盒购自北京北方生物技术研究所;TUNEL试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司;兔抗人 β -actin多克隆抗体、兔抗人PPAR γ 多克隆抗体、羊抗兔二抗及ECL显影剂购自美国Santa Cruz公司。

1.2 动物分组及模型制备

48只雄性新西兰大白兔,随机分为6组,每组8只。分别为假手术组、模型组、GW9662组[0.5 mg/(kg·d)],替米沙坦组[5 mg/(kg·d)],替米沙坦[5 mg/(kg·d)]+GW9662组[0.5 mg/(kg·d)],坎地沙坦组[5 mg/(kg·d)]。假手术组、模型组每日5 mL生理盐水灌胃1次;GW9662组、替米沙坦组、替米沙坦+GW9662组、坎地沙坦组药物溶于5 mL生理盐水,每日灌胃给药1次。2周后,假手术组左前降支只穿线不结扎,观察420 min,其余各组左前降支结扎60 min,再灌注360 min。

1.3 心肌组织血管紧张素 II 含量测定

实验终点取左心室心肌组织0.5 g加入

0.86%冰生理盐水5 mL,机器匀浆后制备成10%心肌匀浆液,取制备好的匀浆液使用低温低速离心机3000 r/min,4℃离心15 min,取上清液贮存于-20℃冰箱。考马斯亮蓝法测定心肌组织上清液蛋白含量,GC-1200 γ 放射免疫计数器放射免疫法测定心肌组织上清液Ang II 含量。

1.4 心肌细胞内游离钙浓度测定

取约0.6 cm×0.6 cm×0.3 cm左心室心肌组织一块, Ca^{2+} 型胶原酶消化并收集心肌细胞,台盼蓝排斥实验检查细胞存活率在95%以上,并调整细胞数为 10^6 /L。细胞悬液加入Fura-2/AM(终浓度为5 μ mol/L),应用RF-5301PC荧光分光光度计检测。发射波长为500 nm,激发波长为300~400 nm,扫描,340 nm处有荧光峰,表明Fura-2/AM已负载入细胞,然后以340 nm作激发波,观察细胞静息状态下的荧光值(F)。加入10% Triton-X100 100 μ L测Fmax,加入0.5 mmol/L EGTA 100 μ L测Fmin,按以下公式计算心肌细胞内游离钙浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$): $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$, $K_d = 224$ nmol/L。

1.5 免疫印迹法测定PPAR γ 蛋白

取左心室心尖部心肌组织,液氮冻存。提取总蛋白并按Pierce BCA蛋白定量试剂盒说明书操作,取50 μ g细胞溶解液蛋白在80 g/L的SDS聚丙烯酰胺凝胶上电泳后,冰上恒压100 V电转1 h,蛋白转至PVDF膜上,加入1:200稀释的兔抗人PPAR γ 抗体,4℃过夜。TBST漂洗后加入1:400生物素化的羊抗兔二抗,室温下摇床杂交1 h。TBST漂洗后以ECL化学发光底物系统放射自显影。以相同方法测定内参照 β -actin的表达。通过Bio-rad gel doc2000图像分析系统分析结果,PPAR γ 的表达水平以PPAR γ 灰度值与 β -actin灰度值的相对值表示。

1.6 透射电子显微镜观察凋亡心肌细胞

取再灌注区约1 mm³心肌组织,经2.5%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,乙醇系列脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重染色,日立H-500型透射电子显微镜观察凋亡心肌细胞。

1.7 TUNEL法检测凋亡心肌细胞

取再灌注区心肌组织,冰生理盐水洗净后,10%中性福尔马林溶液中固定12h,常规石蜡包埋。根据TUNEL检测试剂盒说明按步骤依次进行检测。每张切片随机选取5个视野($\times 400$),DMR+Q550病理图像分析仪计数凋亡阳性细胞,以凋亡指数(AI)反映各组心肌细胞凋亡情况。

1.8 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对于正态分布、样本之间方差齐的数据,采用单因素方差分析,不符合正态分布、样本之间方差不齐的数据则采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织血管紧张素 Ang^{II} 含量

与假手术组比较,模型组、GW 9662组、替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组及坎地沙坦组心肌 Ang^{II} 含量明显升高($P < 0.01$;表1)。

2.2 心肌细胞游离钙浓度

与假手术组比较,模型组、GW 9662组、替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组及坎地沙坦组心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组和坎地沙坦组心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显降低($P < 0.01$;表1)。

2.3 过氧化体增殖物激活型受体 γ 蛋白的表达

替米沙坦组PPAR γ 蛋白的表达明显高于其余各组($P < 0.01$);假手术组、模型组、GW 9662组、替米沙坦 + GW 9662组及坎地沙坦组各组间两两比较无统计学差异($P > 0.05$,图1和表1)。

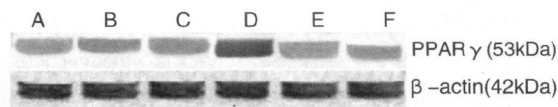


图1. 各组PPAR γ 蛋白表达水平 A为假手术组, B为模型组, C为GW 9662组, D为替米沙坦组, E为替米沙坦 + GW 9662组, F为坎地沙坦组。

Figure 1. PPAR γ mRNA expression in various groups

2.4 凋亡心肌细胞

透射电镜下,假手术组心肌细胞核常染色质和异染色质均匀分布于细胞核中,核膜完整,核仁清晰可见;模型组细胞核染色质凝集呈致密的团块状,明显往核膜下聚集、边集,形成典型凋亡表现—出现凋亡小体;GW 9662组细胞核染色质凝集呈致密的团块状,明显往核膜下聚集、边集,形成典型凋亡表现—新月状边集染色质;替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组及坎地沙坦组细胞核变小,核染色质开始出现边集浓聚,但程度较轻,未观察到凋亡小体及新月状边集染色质(图2)。

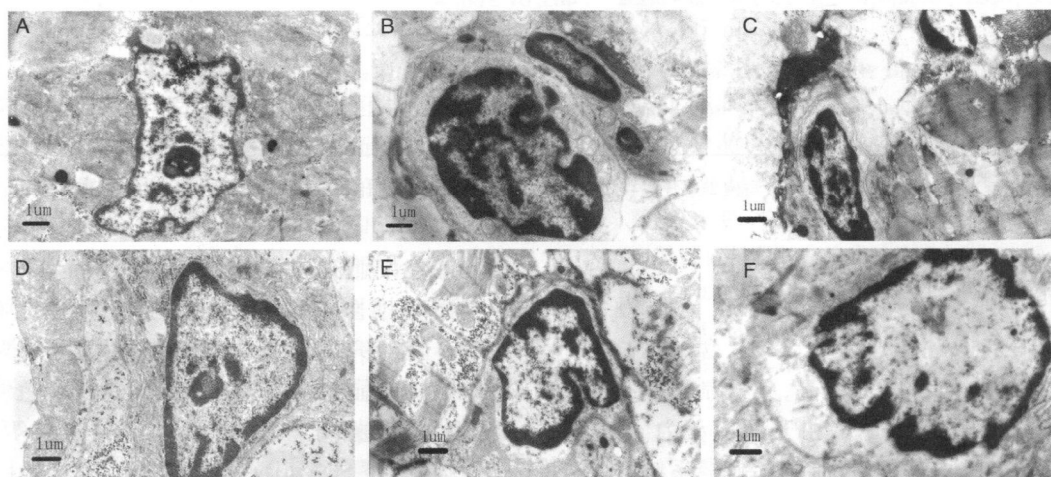


图2 透射电镜观察心肌细胞凋亡($\times 7700$) A为假手术组, B为模型组, C为GW 9662组, D为替米沙坦组, E为替米沙坦 + GW 9662组, F为坎地沙坦组。

Figure 2. The cardiomyocytic apoptosis were observed with electron microscopy in various groups

2.5 心肌细胞凋亡指数比较

光镜下,正常心肌细胞核呈蓝色,凋亡阳性细胞的胞核呈深浅不一的棕褐色;假手术组基本无凋亡

细胞;与假手术组比较,模型组、GW 9662组、替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组和坎地沙坦组细胞凋亡指数(AI)明显增高($P < 0.01$);与模型组比较,替

米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组和坎地沙坦组 AI 明显降低 ($P < 0.01$); 替米沙坦组 AI 显著低于替米

沙坦 + GW 9662组和坎地沙坦组 ($P < 0.01$; 表 1 和图 3)。

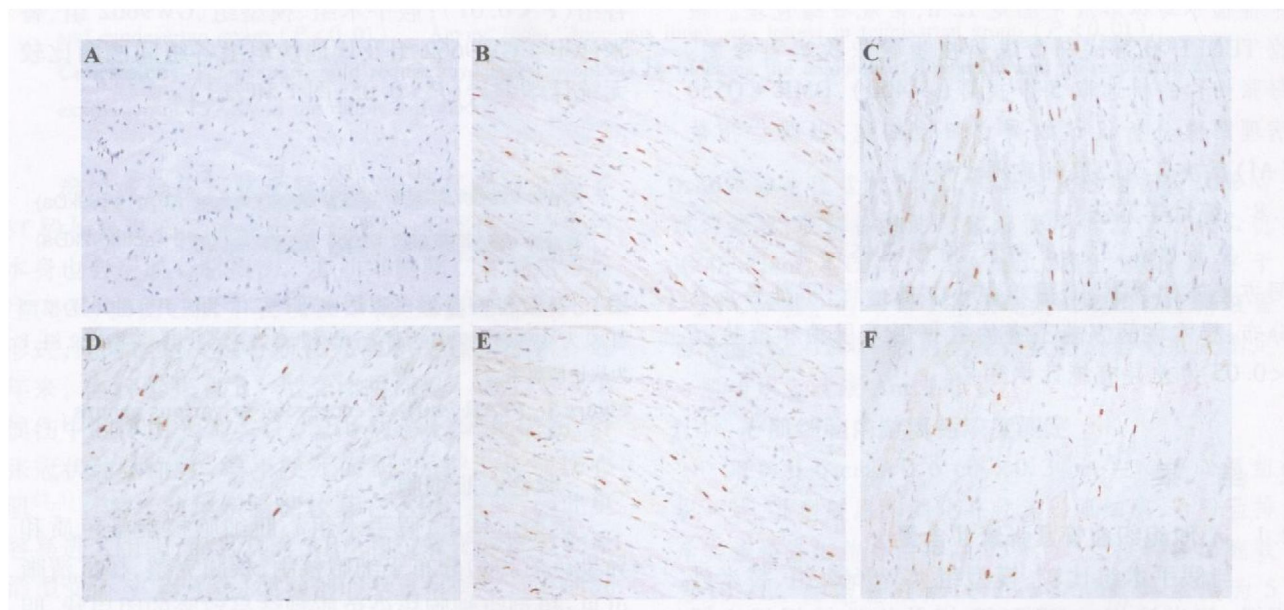


图 3. TUNEL 法检测凋亡心肌细胞 ($\times 400$) A 为假手术组, B 为模型组, C 为 GW 9662 组, D 为替米沙坦组, E 为替米沙坦 + GW 9662 组, F 为坎地沙坦组。

Figure 3. The cardiomyocytic apoptosis were detected with TUNEL method in various groups

表 1. 各组心肌 Ang II 含量、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、PPAR γ 蛋白表达及 AI 的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Comparison of Ang II concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, PPAR γ protein expression and AI in various groups

分 组	Ang II (ng/g)	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/L)	PPAR γ 蛋白	AI
假手术组	151.79 \pm 20.11	173.33 \pm 26.91	0.54 \pm 0.06	1.25% \pm 1.04%
模型组	220.84 \pm 36.96 ^a	465.01 \pm 60.44 ^a	0.57 \pm 0.05	18.38% \pm 2.62% ^a
GW 9662 组	226.05 \pm 19.15 ^a	452.41 \pm 34.52 ^{ac}	0.51 \pm 0.08 ^c	18.75% \pm 2.71% ^{ac}
替米沙坦组	235.23 \pm 32.87 ^a	338.94 \pm 37.21 ^{ab}	0.87 \pm 0.06 ^{ab}	10.25% \pm 1.58% ^{ab}
替米沙坦 + GW 9662 组	227.23 \pm 26.45 ^a	346.59 \pm 34.66 ^{ab}	0.56 \pm 0.11 ^c	14.88% \pm 2.10% ^{abc}
坎地沙坦组	214.83 \pm 39.48 ^a	349.94 \pm 36.59 ^{ab}	0.54 \pm 0.07 ^c	13.88% \pm 2.64% ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.01$, 与替米沙坦组比较。

3 讨 论

本研究中, I/R 可引起心肌 Ang II 含量增高, 并导致心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显升高, 其机制可能是: 冠状动脉的阻断和再灌注损伤, 由于血流动力学改变和应激效应, 心肌局部肾素-血管紧张素系统激活, 最终致心肌组织 Ang II 明显升高^[4-5]。由于 Ang II 生成增多, 通过作用于血管紧张素 AT_1 型受体 (AT R), 一方面使 Ca^{2+} 通过 L 型 Ca^{2+} 通道的内流增加; 另一方面引起胞内 Ca^{2+} 的释放, 最终导致胞内 Ca^{2+} 超载, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[6]。

大量研究证实, 细胞凋亡是细胞死亡的一种重要形式, 是由基因控制的、有序化的主动死亡过程,

即程序性细胞死亡^[7]。心肌 I/R 引起 Ca^{2+} 内流和氧自由基增多, 最终可导致心肌细胞的坏死及凋亡^[8]。本研究使用透射电镜在模型组、GW 9662 组中观察到明显的细胞凋亡现象, 如核染色质明显边集、新月状边集于核膜处、凋亡小体形成等, 而在替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662 组和坎地沙坦组中可以观察到染色质的浓聚、边集, 但程度较轻, 且未能观察到如新月状边集染色质或凋亡小体这些典型的细胞凋亡表现。这提示了 ARB 可以抑制心肌细胞凋亡, 因此染色质的浓聚、边集程度减轻。由于 ARB 致凋亡细胞减少, 电镜难以在替米沙坦组、替米沙坦 + GW 9662 组及坎地沙坦组中观察到典型的细胞凋亡形态。本研究使用 TUNEL 法观察到替米

沙坦组、替米沙坦 + GW 9662组和坎地沙坦组均可抑制细胞凋亡,且替米沙坦组较替米沙坦 + GW 9662组、坎地沙坦组更明显地抑制 I/R 心肌细胞凋亡。可能原因是: 心肌 I/R 过程中心肌组织 Ang^{II} 升高。 Ang^{II} 作用于 AT_1R , 使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高并激活钙依赖性内源核酸内切酶, 引起 DNA 片断化、细胞皱缩并形成凋亡小体, 最终导致细胞凋亡加剧^[9]。ARB 通过阻断 AT_1R , 降低心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度, 抑制细胞内 Ca^{2+} 超载, 减少心肌细胞凋亡。这可能是 ARB 抑制心肌细胞凋亡的重要机制。④ $\text{PPAR}\gamma$ 属于 G 型核受体超家族成员, 主要分布于脂肪细胞, 在血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和单核细胞上也有表达。本研究证实替米沙坦可以上调 $\text{PPAR}\gamma$ 的表达。GW 9662 是 $\text{PPAR}\gamma$ 特异性、高亲和力 and 不可逆性结合拮抗剂, 由于 GW 9662 不可逆占据 $\text{PPAR}\gamma$ 结合位点, 使 $\text{PPAR}\gamma$ 激动剂无法与之有效结合产生 $\text{PPAR}\gamma$ 激活作用, 因此 GW 9662 能充分拮抗外源性和内源性 $\text{PPAR}\gamma$ 激动剂的作用。然而, GW 9662 并不独立改变 $\text{PPAR}\gamma$ 活性, 如不影响介导的 $\text{PPAR}\gamma$ 基因转录等^[10]。但是, 我们的研究中替米沙坦 + GW 9662 组 $\text{PPAR}\gamma$ 的表达较替米沙坦组明显降低, 推测在心肌 I/R 模型中使用替米沙坦、GW 9662 对 $\text{PPAR}\gamma$ 的影响比我们想像中要复杂得多。在心肌 I/R 这一特殊的病理生理过程中, 替米沙坦和 GW 9662 的联用可能共同影响了 $\text{PPAR}\gamma$ 基因转录及蛋白表达, 因此最终未能观察到 $\text{PPAR}\gamma$ 表达上调。近年研究发现 $\text{PPAR}\gamma$ 激活能够抑制 I/R 所诱导的心肌细胞凋亡, 保护心肌^[11], 并有研究提示, $\text{PPAR}\gamma$ 激活所产生的抗凋亡效应可能与促进蛋白激酶 B (Akt) 再磷酸化有关^[12]。本研究中, 替米沙坦组凋亡心肌细胞较替米沙坦 + GW 9662 组和坎地沙坦组明显减少, 说明由于替米沙坦具有独立于血管紧张素-醛固酮系统阻断的 $\text{PPAR}\gamma$ 激活机制^[13], 所以较坎地沙坦更为显著抑制心肌细胞凋亡, 而替米沙坦通过上调并激活 $\text{PPAR}\gamma$ 抑制心肌细胞凋亡的这一效应可被 GW 9662 所拮抗。因此, 除了 ARB 经典的 AT_1R 阻断效应外, 替米沙坦还可能通过上调并激活 $\text{PPAR}\gamma$ 抑制 I/R 所诱导的心肌细胞凋亡, 保护心肌。

[参考文献]

- [1] Jugdutt BI, Menon V. AT_1 receptor blockade limits myocardial injury and upregulates AT_2 receptors during reperfusion myocardial infarction [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004; 260 (1-2): 111-118
- [2] Jugdutt BI, Menon V. Valsartan-induced cardioprotection involves angiotensin AT_2 receptor upregulation in dog and rat models of in vivo reperfusion myocardial infarction [J]. *J Card Fail* 2004; 10 (1): 74-82
- [3] Ikejima H, Manishi T, Tsujikawa H, et al. Effects of telmisartan, a unique angiotensin receptor blocker with selective peroxisome proliferator-activated receptor- γ modulating activity, on nitric oxide bioavailability and atherosclerotic change [J]. *J Hypertens* 2008; 26 (5): 964-972
- [4] Noda K, Sasaguri M, Ideishi M, et al. Role of locally formed angiotensin AT_2 and bradykinin in the reduction of myocardial infarct size in dogs [J]. *Cardiovasc Res* 1993; 27 (2): 334-340
- [5] Hollenberg NK. Implications of species difference for clinical investigation studies on the renin-angiotensin system [J]. *Hypertension* 2000; 35 (1 Pt 2): 150-154
- [6] 杨天骄, 马业新, 肖建民, 等. 氯沙坦对心肌再灌注时早期后除极抑制作用的实验研究 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2002; 31 (5): 530-533
- [7] Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes [J]. *J Clin Invest* 1994; 94 (4): 1621-628
- [8] 丁汝跃, 夏勇, 李东野. 卡托普利和螺内酯合用对家兔心肌缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; 17 (7): 27-30
- [9] Kossmehl P, Kurth E, Faramarzi S, et al. Mechanisms of apoptosis after ischemia and reperfusion: Role of the renin-angiotensin system [J]. *Apoptosis* 2006; 11 (3): 347-358
- [10] Leesonitz LM, Parks DJ, Bledsoe RK, et al. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW 9662 [J]. *Biochemistry* 2002; 41 (21): 6640-650
- [11] 曹泽玲, 叶平, 龙超良, 等. 吡格列酮对缺血再灌注心肌细胞凋亡影响的实验研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2005; 33 (7): 648-652
- [12] Kilter H, Wemer M, Roggia C, et al. The $\text{PPAR}\gamma$ agonist rosiglitazone facilitates Akt rephosphorylation and inhibits apoptosis in cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation [J]. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11 (11): 1060-067
- [13] Emsberger P, Koletsky RJ. Metabolic actions of angiotensin receptor antagonists: $\text{PPAR}\gamma$ agonist actions or a class effect [J]? *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7 (2): 140-145

(此文编辑 文玉珊)