

· 基础研究 ·

ET_A 受体拮抗剂 BQ123 对心肌梗死局部心肌组织中 ET-1 和 ET 受体分布的影响

幸志强 丁春平 邱志宏 易祥武 刘芳

【摘要】 目的 探讨在急性心肌梗死(AMI)时,使用内皮素受体 A 拮抗剂(ET_A 受体拮抗剂)后对局部心肌组织 ET-1 和 ET 受体分布的影响。方法 将 22 只兔随机分为 4 组,1 周实验组($n=6$)和 1 周对照组($n=5$),4 周实验组($n=6$)和 4 周对照组($n=5$),结扎左冠状动脉前降支建立 AMI 模型。实验组每天静脉滴注 ET_A 受体拮抗剂 BQ123,对照组每天使用等量生理盐水作相同处理,分别于 1 周和 4 周后取出心脏。采用免疫组化染色和图像分析法检测 1 周和 4 周各组动物左心室非梗死区、梗死边缘区和梗死中心区心肌组织的中 ET-1 和 ET 受体的分布。结果 免疫组化染色和图像分析结果显示:各实验组 ET-1 和 ET 受体的分布均明显少于各自对照组相应部位($P < 0.05$)。结论 AMI 后,使用 ET_A 受体拮抗剂能减轻局部心肌组织 ET-1 和 ET 受体的上调程度。

【关键词】 内皮素;内皮素受体拮抗剂;急性心肌梗死;免疫组化

Effect of endothelin-A receptor antagonist BQ123 on the distribution of ET-1 and ET receptor in local myocardium after AMI

XING Zhiqiang, DING Chunping, QIU Zhihong, et al

Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Yichun College, Yichun, Jiangxi, 336000, China

【Abstract】 Objective To elucidate whether the distribution of ET-1 and ET receptor (ETR) in local myocardium is different after application of ET_A receptor antagonists during acute myocardial infarction (AMI). Methods Twenty-two rabbits were randomly divided into 4 groups: 1 week experimental group ($n=6$) and control group ($n=5$); 4 weeks experimental group ($n=6$) and control group ($n=5$). The models of myocardial infarction were induced in all animals by ligating the beginning of left ventricular anterior descending coronary arteries. All the animals in experimental groups were treated with intravenous infusion of ET_A receptor antagonist BQ123, and those in control groups were treated by the same way with equal volume of 0.9% NaCl solution. The animals were sacrificed after 1 and 4 weeks respectively, and the hearts were removed. ET-1-like-immunoreactivity (ET-1-ir) and ETR-like-immunoreactivity (ETR-ir) in left ventricular non-infarcted region (LVN), left ventricular myocardial infarcted border region (LVMIB) and left ventricular myocardial infarcted central region (LVMIC) were examined by immunohistochemistry and image analysis method. Results The upregulated levels of ET-1 and ETR expression in each experimental group were significantly lower than its control group respectively. Conclusions Treatment with ET_A receptor antagonist BQ123 during AMI could reduce the upregulation of ET-1 and ETR expression.

【Key words】 endothelin; endothelin receptor antagonist; acute myocardial infarction; immunohistochemistry

内皮素(endothelin, ET)是日本学者首先从猪的主动脉内皮细胞中分离纯化的一种小分子生物活性多肽^[1],是目前发现的最强烈的缩血管物质,分 ET-1、ET-2 和 ET-3 三种亚型,均由 21 个氨基酸残基组成,其中 ET-1 的生物学效应最强^[2]。ET 通过自

分泌与旁分泌的方式,以局部激素的形式释放后,与 ET 受体结合而发挥其生物学效应。ET 受体分为三型:在人类主要为 ET_A 型受体和 ET_B 型受体,在非哺乳动物的细胞中还可能存在 ET_C 型受体。在人体心脏中以 ET_A 受体为主,并且 ET_A 受体与 ET-1 亲和性最高、作用力最强。而 ET_A 受体拮抗剂可拮抗 ET-1 与 ET_A 受体结合。近年来利用 ET_A 受体拮抗剂治疗心肌梗死受到广泛关注,大量实验证实,特异性 ET_A

收稿日期:2005-01-18

作者单位:336000 江西宜春,宜春学院第一附属医院心内科

作者简介:幸志强,男,1961 年 2 月生,江西宜春人,医学学士,教授,

副院长, Tel:13707959236

万方数据

受体拮抗剂能缩小急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)的梗死面积,以及改善心肌梗死后的左室重构来发挥对心脏的保护作用。然而,由于 ET-1 对心脏的生理和病理生理功能还未完全明了,ET_A受体拮抗剂对心脏的保护作用除了直接拮抗 ET-1 与 ET_A受体结合之外,是否还可对梗死局部心肌组织中 ET-1 与 ET 受体的分布产生影响而发挥其保护作用,目前还不清楚。本文拟对兔心肌梗死后使用选择性 ET_A受体拮抗剂 BQ123 对梗死局部心肌组织中 ET-1 与 ET 受体分布的影响作一探讨,为其对心脏的保护作用提供更多的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 新西兰兔,年龄 110~130 d,平均 122.8 d,雌雄不限,体重 2.5~3.5 kg,平均 2.8 kg,由宜春学院动物科提供。

1.2 试剂和仪器 ET_A受体拮抗剂 BQ123,美国 ALEXIS 公司生产,产品编号 155-004-P005。ET-1 免疫组化染色试剂盒,天津灏洋生物技术有限公司生产,产品编号 TSP2003。ET 受体免疫组化染色试剂盒,天津灏洋生物技术有限公司生产,产品编号 TSP2003。Mias-2000 图像分析系统,四川大学图像所研制。

1.3 动物心肌梗死模型的建立及分组 将 22 只兔随机分为 4 个组,1 周实验组($n=6$)和 1 周对照组($n=5$),4 周实验组($n=6$)和 4 周对照组($n=5$)。所有动物在禁食 12 h,禁饮 2 h 后,按 3%戊巴比妥钠 1 ml/kg 从耳缘静脉缓慢推注,处于麻醉状态后固定于手术台上。在自主呼吸下,选择胸骨中线为切口,剪开胸骨暴露心脏(术中未破胸膜),分离左冠状动脉前降支,以无创针带 2-0 锦纶单丝线穿过左前降支根部,稳定 10 min 后行双重结扎,梗死标志为:左心室前降支供血区明显发绀、收缩明显减弱。如无此改变则再次结扎血管,以确保结扎成功。观察 20 min 后如未出现心律失常则关闭胸腔,逐层缝合肌肉和皮肤,术后静注青霉素钠抗感染 3 d。实验组均在冠脉结扎前 15 min 开始从耳缘静脉滴注 BQ123,按 75 μ g/kg 的剂量溶于 150 ml 的生理盐水中每天静滴 5 h,按实验分组分别用 1 周和 4 周。对照组分别用等量生理盐水作同样处理。1 周和 4 周后按上述手术方法再次开胸暴露心脏,从左心房注射氯化钾溶液使心脏停跳,取出心脏后迅速剪去左、右心房及右心室,用滤纸吸干左心室。然后从左室非梗死区、梗死边缘区及梗死中心区各取组织 1 块放入 10%中性甲醛溶液(即 4%

甲醛,也即 10%福尔马林)中固定。

1.4 免疫组化染色及图像分析 免疫组化染色操作按试剂盒说明书进行,行 ET-1 和 ET 受体免疫组化染色后各组免疫组化切片应用 mias-2000 图像分析系统对阳性反应产物进行半定量检测分析。每张切片在 400 倍放大下,随机选 10 个位点测量 ET-1 或者 ET 受体免疫组化染色灰度值,然后取其平均值。灰度值从 0 到 255 共分为 256 个等级,灰度值越小表示免疫组化染色越深,抗原物质含量越高,反之则否。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.0 统计软件包用单因素方差分析及两两比较、成组设计两样本均数比较的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

ET-1 和 ET 受体阴性对照片未见特异性染色(图 1A,1B)。

2.1 ET-1 免疫组化染色结果 1 周对照组左室梗死中心区心肌细胞 ET-1 呈阳性染色(图 2),梗死边缘区和非梗死区心肌细胞染色深度明显变浅呈弱阳性染色。1 周实验组梗死中心区呈弱阳性染色,梗死边缘区及非梗死区呈弱阳性。4 周对照组梗死中心区心肌细胞染色明显浅于 1 周对照组呈阳性染色,梗死边缘区及非梗死区心肌细胞呈弱阳性或阳性染色。4 周实验组梗死中心区心肌细胞呈弱阳性或阳性染色,梗死边缘区及非梗死区呈弱阳性染色。

2.2 ET 受体免疫组化染色结果 1 周对照组受累心肌各部位 ET 受体均呈阳性染色(图 3),1 周实验组受累心肌各部位均呈弱阳性染色。4 周对照组和 4 周实验组心肌各部位呈弱阳性染色。

2.3 图像分析及统计学处理

2.3.1 ET-1 免疫产物的灰度值(GL)比较 见表 1。与非梗死区和梗死边缘区相比,各组 GL 均以梗死中心区最低($P < 0.01$),非梗死区和梗死边缘区均无明显差别($P > 0.05$);各实验组梗死中心区 GL 明显高于各自对照组梗死中心区($P < 0.01$),其余两个部位也高于对照组相应部位($P < 0.05$)。这些提示梗死中心区 ET-1 分布最多,ET_A受体拮抗剂可抑制局部心肌组织中 ET-1 的上调。

2.3.2 各组心肌细胞 ET 受体免疫组化染色的 GL 见表 2。各实验组和对照组 GL 均以梗死边缘区最低($P < 0.05$),梗死中心区和非梗死区均无明显差别($P > 0.05$)。各实验组 3 个部位 GL 均高于对

照组相应部位(均为 $P < 0.05$)。提示梗死边缘区 肌组织中 ET 受体的上调。
ET 受体分布最多,而 ET_A 受体拮抗剂可抑制局部心

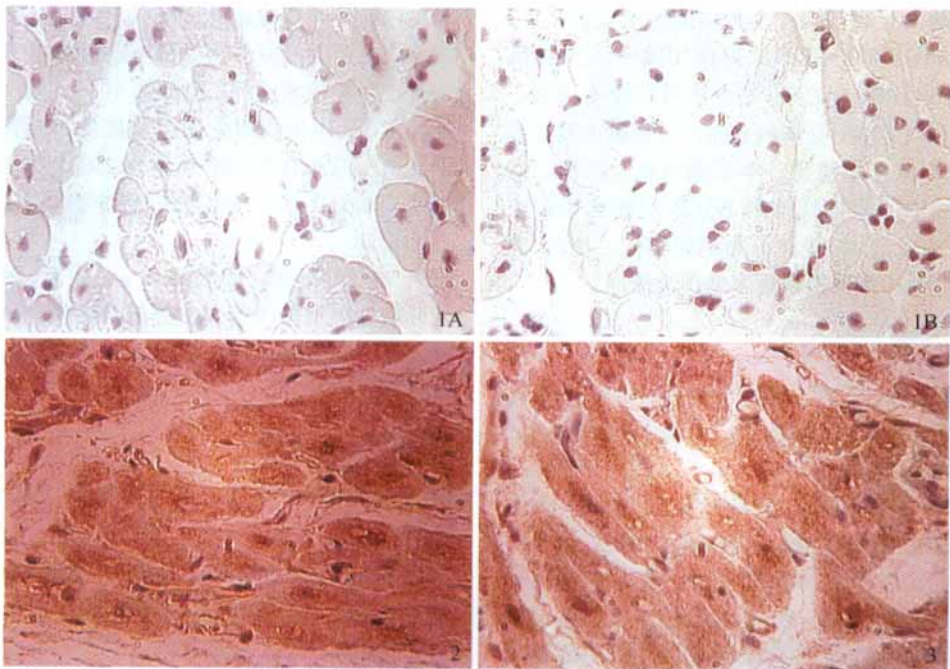


图 1A 非梗死区心肌 ET 受体阴性对照片图(免疫组化染色, ×400)
图 1B 非梗死区心肌 ET-1 阴性对照片图(免疫组化染色, ×400)
图 2 梗死边缘区心肌细胞 ET-1 呈阳性反应(免疫组化染色, ×400)
图 3 梗死边缘区心肌细胞 ET 受体呈阳性反应(免疫组化染色, ×400)

表 1 实验组与对照组左室各部位心肌内 ET-1 免疫产物灰度值(GL)的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	GL		
		LVN	LVMIB	LVMIC
1 周对照组	5	166.55 ± 7.18 [☆]	164.14 ± 6.47 [★]	140.07 ± 4.56 ^{☆☆}
1 周实验组	6	182.74 ± 8.25 [△]	178.40 ± 6.89	166.75 ± 9.93 ^{*△}
4 周对照组	5	182.41 ± 6.06 ^{△△}	184.66 ± 6.03 [△]	170.68 ± 3.36 ^{*△△}
4 周实验组	6	192.73 ± 8.25 [△]	192.69 ± 8.96	181.71 ± 5.50 ^{*△}

注:LVN = 左心室非梗死区,LVMIB = 左心室梗死边缘区,LVMIC = 左心室梗死中心区;与 LVN 相比,* $P < 0.05$,[☆] $P < 0.01$;与 LVMIB 相比,[△] $P < 0.05$,[☆] $P < 0.01$;各对照组与各自实验组相比,[△] $P < 0.05$,[★] $P < 0.01$

表 2 实验组与对照组左室各部位心肌内 ET 受体免疫产物灰度值(GL)的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	GL		
		LVN	LVMIB	LVMIC
1 周对照组	5	179.86 ± 8.35 ^{☆☆}	164.71 ± 6.99 ^{*△}	180.24 ± 8.02 ^{△△}
1 周实验组	6	191.55 ± 7.73 [△]	174.59 ± 7.12 [*]	192.86 ± 4.60 [△]
4 周对照组	5	189.20 ± 3.10 ^{△☆}	177.88 ± 6.28 ^{☆☆}	188.62 ± 6.29 ^{☆☆}
4 周实验组	6	207.70 ± 6.73 [△]	195.33 ± 5.39 [*]	205.74 ± 9.04 [△]

注:LVN,LVMIB,LVMIC 同表 1 注。与 LVN 相比,* $P < 0.05$,[☆] $P < 0.01$;与 LVMIB 相比,[△] $P < 0.05$,[☆] $P < 0.01$;各对照组与各自实验组相比,[△] $P < 0.05$,[★] $P < 0.01$

3 讨论

ET 可以在多种细胞中产生,如心肌细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞等,AMI 时缺血、缺氧的心肌细胞是最重要的合成部位^[3]。ET-1 的合成、释放受多种因素的影响。心肌缺血、缺氧是刺激 ET-1 大量合成、释放的最主要因素之一^[3,4];血液的高凝状态、儿茶酚胺的大量释放以及局部组织自发再血管化都可引起 ET 的合成和释放增多^[5,6];AMI 时,血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)和醛固酮释放增多也可刺激心肌细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞合成、释放 ET-1 增加^[7]。大量实验表明,AMI 时,心肌组织缺血、缺氧,以及交感神经兴奋使儿茶酚胺分泌增多,血浆及局部心肌组织 ET-1 水平明显增高、表达增强^[3,4,8]。ET 受体数量和亲和力也受 ET 水平增高、缺血及缺氧等多种因素的调节,表现有上调和下调的现象,有证据表明,缺血心脏的 ET_A 受体表达在 ET-1 升高时不但不下调,反而有升高的趋势^[3,8]。然而本实验发现 AMI 后使用 ET_A 受体拮抗剂 BQ123 能减轻梗死局部心肌组织 ET-1 和 ET 受体的上调程度。

免疫组化结果显示,AMI 后局部心肌组织 ET-1 和 ET 受体均明显上调,ET-1 和 ET 受体升高以梗死中心区最为显著,这进一步表明局部心肌组织 ET-1 的升高主要由心肌细胞的缺血、缺氧所致,这些结果和以往报道是一致的^[3,8,9]。使用 ET_A 受体拮抗剂 BQ123 以后,各实验组局部心肌组织 ET-1 和 ET 受体的水平均低于各自对照组,显示 ET_A 受体拮抗剂 BQ123 能减轻心肌 ET-1 和 ET 受体的上调程度。ET_A 受体拮抗剂抑制局部心肌 ET-1 上调,一方面可能是通过干扰 ET_A 受体介导的自分泌正反馈机制来完成的;另一方面,使用 ET_A 受体拮抗剂后对心功能及其它血流动力学因素的有益改善也对抑制 ET-1 上调起到了辅助作用^[10]。同时我们也观察到 1 周对照组梗死中心区心肌细胞 ET-1 染色明显高于 4 周对照组,可能与 AMI 后 ET-1 升高产生的负反馈机制有关^[3];也可能和 AMI 后心钠素(ANP)分泌增多^[3],ANP 能明显抑制心肌细胞分泌 ET-1 有关^[11,12]。尽管心肌中 ET 受体的分布和表达机制目前还不清楚,但本实验结果所显示的 ET-1 和 ET 受体的分布特点强烈提示心肌中 ET_A 受体介导的信号转导机制在 AMI 的病理生理中起着显著的促进作用。ET_A 受体拮抗剂 BQ123 抑制心肌梗死局部心肌组织

ET-1 和 ET 受体的上调而发挥对心脏的保护作用。

急性心肌梗死后使用 ET_A 受体拮抗剂除了直接拮抗 ET-1 与 ET_A 受体结合而发挥其对心肌的保护作用外,还能减轻心肌梗死局部心肌组织 ET-1 和 ET 受体的上调程度,从而减少 ET-1 和 ET_A 受体的结合,发挥其保护作用。

参考文献

- 1 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, 31: 411.
- 2 Benigni A. Endothelin antagonists in renal disease. *Kidney Int*, 2000, 57: 1778.
- 3 Tonnessen T, Christensen G, Oie E, et al. Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats. *Cardiovasc Res*, 1997, 33: 601-610.
- 4 Tonnessen T, Giaid A, Saleh D, et al. Increased *in vivo* expression and production of endothelin-1 by porcine cardiomyocytes subjected to ischemia. *Circ Res*, 1995, 76: 767-772.
- 5 Stewart DJ. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1991, 18: 38.
- 6 Tsuji S. Plasma endothelin levels during myocardial ischemia and reperfusion. *Life Sci*, 1991, 48: 1745.
- 7 Ito H, Hirata Y, Adachi S, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 1993, 92: 398-403.
- 8 Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, et al. Endogenous endothelin-1 participate in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. *Circulation*, 1996, 93: 1214-1222.
- 9 Picard P, Smith PJ W, Monge JC, et al. Coordinated upregulation of the cardiac endothelin system in a rat model of heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, 31 (Suppl. 1): S294-S297.
- 10 吴立玲,主编. 心血管病理生理学. 北京:北京医科大学出版社,2000. 23.
- 11 Saijonmaa O, Ristimäki A, Fyhrquist F. Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 173: 514-520.
- 12 Hu RM, Levin ER, Pedram A, et al. Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the Creceptor. *J Biol Chem*, 1992, 267: 17384-17389.