

雷米普利对病毒性心肌炎后心肌细胞凋亡水平的影响

颜雯 张怡清 张焕基 廖欢 钟文清 杨美兰

【摘要】 目的:探讨雷米普利对病毒性心肌炎后心肌细胞凋亡水平的影响。

方法:采用 CVB3 感染 BALB/c 乳鼠原代心肌细胞,构建病毒性心肌炎模型。将细胞分为空白组、模型组、血管紧张素 II (Ang II) 组、Ang II + 雷米普利组和雷米普利组。空白组正常培养心肌细胞 72 h。其余 4 组以 CVB3 100 PFU/cell 的比例感染心肌细胞 48 h,构建病毒性心肌细胞模型,模型组于培养液中加入 PBS,Ang II 组于培养液中加入终浓度为 100 nmol/L 的 Ang II,Ang II + 雷米普利组于培养液中加入终浓度为 100 nmol/L 的 Ang II 和 1 μ mol/L 的雷米普利,雷米普利组于培养液中加入终浓度为 1 μ mol/L 的雷米普利。培养 24 h 后,磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶 (Annexin V/PI) 法检测细胞凋亡水平,Western blot 法检测凋亡蛋白 caspase-3 的表达水平。 **结果:**与空白组相比,模型组和 Ang II 组细胞的凋亡率和 caspase-3 的蛋白表达水平均显著升高 (P 均 < 0.01);与模型组相比,雷米普利组细胞的凋亡率和 caspase-3 的蛋白表达水平均显著降低 (P 均 < 0.01);与 Ang II 组相比,Ang II + 雷米普利组细胞的凋亡率和 caspase-3 的蛋白表达水平均显著降低 (P 均 < 0.01)。 **结论:**雷米普利能降低病毒性心肌炎引起的细胞凋亡,其作用可能与 Ang II 有关。

【关键词】 雷米普利;病毒性心肌炎;心肌细胞;凋亡

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.05.008

Effects of ramipril on myocardial cell apoptosis after viral myocarditis YAN Wen¹, ZHANG Yiqing², ZHANG Huanji¹, LIAO Huan¹, ZHONG Wenqing¹, YANG Meilan¹. 1. The Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong 518033; 2. The Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong 518000, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of ramipril on myocardial cell apoptosis after viral myocarditis. **Methods:** After extracting the primary cardiomyocytes of BALB/c sucking mice, CVB3 virus was infected for construction of viral cardiomyocyte model. The cardiomyocytes were divided into five groups: blank group, model group, Ang II group, Ang II + ramipril group, and ramipril group. In the blank group, myocardium was cultured in normal with 72 h. The other four groups were infected with 100 PFU/cell CVB3 for 48 h, the model group added PBS to the culture medium, the Ang II group added Ang II with a final concentration of 100 nmol/L in the culture solution, the Ang II + ramipril group added Ang II with a final concentration of 100 nmol/L and ramipril with a final concentration of 1 μ mol/L in the culture medium, while the ramipril group added ramipril with a final concentration of 1 μ mol/L to culture medium. After 24 h culture, the cells were collected. Flow cytometry Annexin V/PI was used to detect the apoptosis level. Western blot was used to detect the caspase-3 protein level. **Results:** The rate of cardiomyocyte apoptosis and the expression of casepase-3 protein in

基金项目:深圳市科创委资助项目(JCYJ20170818162010186)

作者单位:518033 深圳,中山大学附属第八医院(颜雯,张焕基,廖欢,钟文清,杨美兰);518000 深圳,中山大学附属第七医院(张怡清)

model group and Ang II group significantly increased compared with the blank group (all $P < 0.01$), which significantly decreased in ramipril group compared with the model group (all $P < 0.01$) and in Ang II + ramipril group compared with the Ang II group (all $P < 0.01$). **Conclusions:** Ramipril can reduce the apoptosis induced by viral myocarditis. The process may be related with Ang II.

[Key words] Ramipril; Viral myocarditis; Myocardial cell; Apoptosis

病毒性心肌炎是病毒侵犯心脏引起的心肌实质或间质局限性或弥漫性病变,以柯萨奇 B 组 3 型病毒(CVB3)最为常见,好发于儿童和青少年,病情轻重不一。病毒感染机体后通过自身基因的表达,激活宿主细胞凋亡相关基因 caspase,诱导细胞凋亡^[1]。雷米普利是一种含羧基的血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI),在临床上常用于心肌梗死后心力衰竭。本研究采用 CVB3 感染 BALB/c 乳鼠的原代心肌细胞,制作病毒性心肌炎模型,探讨雷米普利是否可通过抑制心肌细胞凋亡对病毒性心肌炎产生一定疗效。

1 资料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

CVB3 病毒液由中山大学微生物学教研室提供,无特定病原(SPF)级 BALB/c 乳鼠购自斯莱克公司,兔抗鼠 caspase-3 抗体购自 Abcam 公司,山羊抗兔 HRP 二抗购自 Proteintech 公司,蛋白提取试剂盒购自凯基生物,凋亡检测试剂盒购自 Solarbio 公司。

1.2 原代心肌细胞的提取及处理

将分离的 BALB/c 乳鼠心脏置于细胞培养皿中,PBS 反复冲洗,加入 0.1% II 型胶原酶与 0.1% 胰蛋白酶的混合液,37℃消化 30 min,1 000 g 离心 5 min 后去上清,通过 2 h 差速贴壁法去除成纤维细胞。将得到的心肌细胞接种于培养瓶中,每隔 2 d 换液 1 次,待细胞培养至密度为 90%左右时,将细胞接种于 6 孔板中。实验分为空白组、模型组、血管紧张素 II (Ang II)组、Ang II + 雷米普利组和雷米普利组。空白组正常培养心肌细胞 72 h。其余 4 组以 CVB3 100 PFU/cell 的比例感染心肌细胞 48 h,构建病毒性心肌炎细胞模型,模型组于培养液中加入 PBS; Ang II 组于培养液中加入终浓度为 100 nmol/L 的 Ang II; Ang II + 雷米普利组于培养液中加入终浓度为 100 nmol/L 的 Ang II 和 1 μmol/L 的雷米普利;雷米普利组于培养液中加入终浓度为 1 μmol/L 的雷米普利。培养 24 h 后,收集细胞备用。

1.3 磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶(Annexin V/PI)法检测细胞凋亡水平

收集各组细胞,调节细胞浓度为 10^6 /mL,分别加入 10 μL FITC-Annexin V 和 10 μL PI,混匀,室

温下避光放置 15 min,流式细胞仪检测。每份样本收集 1×10^5 个细胞,采用 FlowJo 软件对凋亡细胞比例进行分析。

1.4 Western blot 法检测凋亡蛋白 caspase-3 的表达水平

收集各组细胞,提取细胞总蛋白。蛋白定量后,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,5%脱脂奶粉封闭后,加入 caspase-3 一抗 4℃孵育过夜,二抗室温下孵育 1 h,加入 ECL 发光液于化学凝胶成像分析仪上检测蛋白表达情况。用 Image Pro Plus 软件对图片中灰度值进行分析处理。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 对数据进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

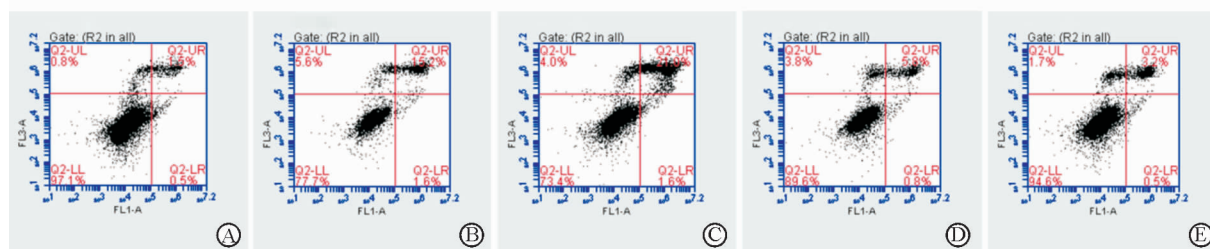
2 结果

2.1 各组心肌细胞凋亡水平的比较

流式细胞仪检测结果如图 1 所示,横坐标表示细胞的 Annexin V 荧光强度,纵坐标表示细胞的 PI 荧光强度,左下象限为活细胞,右下象限为凋亡早期细胞,右上象限为凋亡晚期细胞或者坏死细胞。与空白组 ($1.63\% \pm 0.15\%$) 相比,模型组 ($16.57\% \pm 1.52\%$) 和 Ang II 组 ($21.33\% \pm 1.53\%$) 细胞的凋亡率均显著升高(P 均 < 0.01);与模型组相比,雷米普利组 ($3.87\% \pm 0.65\%$) 细胞的凋亡率显著降低($P < 0.01$);与 Ang II 组比较,Ang II + 雷米普利组 ($5.97\% \pm 0.86\%$) 细胞的凋亡率显著降低($P < 0.01$)。

2.2 各组心肌细胞凋亡蛋白 caspase-3 表达水平的比较

以 β-actin 为内参,通过 Western blot 法检测凋亡蛋白 caspase-3 的相对表达水平,见图 2。与空白组 (0.45 ± 0.06) 相比,模型组 (0.67 ± 0.08) 和 Ang II 组 (0.87 ± 0.10) 细胞 caspase-3 的蛋白表达水平均显著升高(P 均 < 0.01);与模型组相比,雷米普利组 (0.56 ± 0.06) 细胞 caspase-3 的蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$);与 Ang II 组相比,Ang II + 雷米普利组 (0.69 ± 0.07) 细胞 caspase-3 的蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。



A 为空白组;B 为模型组;C 为 Ang II 组;D 为 Ang II + 雷米普利组;E 为雷米普利组

图 1 流式细胞仪检测不同组别心肌细胞的凋亡情况

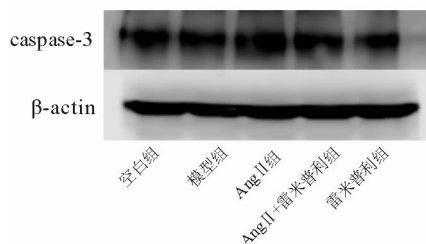


图 2 不同组别心肌细胞 caspase-3 蛋白表达水平

3 讨论

病毒性心肌炎是由病毒感染引起的心肌炎性反应。当病毒感染心肌细胞后,血管紧张素转换酶(ACE)增多并聚集在坏死心肌周围,将血管紧张素Ⅰ(Ang Ⅰ)转化为 Ang Ⅱ,Ang Ⅱ水平的增加可促使儿茶酚胺在心肌中积聚、血管收缩,进而影响心肌能量代谢,使心肌高能磷酸化合物减少,导致心室重构,影响心肌收缩和舒张功能^[2-3]。细胞的死亡方式包括坏死和程序性死亡,凋亡属于程序性死亡,常在有害信号的温和刺激下或在个体发育过程中发生。而 caspase-3 活化可引起细胞特征性的凋亡形态学改变。因此,caspase-3 蛋白水平反映了凋亡水平。心肌细胞感染病毒后启动了凋亡程序,细胞凋亡在病毒性心肌炎的发生发展中发挥重要作用。在病毒漫长的进化过程中,凋亡这种特殊的细胞死亡方式被病毒利用^[4-5]。有研究发现,在心肌缺血及缺血再灌注后肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)被激活,促进心肌病理生理的改变,引起心肌损伤及细胞凋亡,而 ACE 抑制剂具有拮抗这种损伤的作用。临床上,雷米普利作为一种含羧基的 ACE 抑制剂,常用于治疗病毒性心肌炎,但在治疗机制上,雷米普利是否可改善因病毒引起的心肌细胞凋亡,目前尚未见报道。

本研究结果表明,CVB3 感染心肌细胞后,细胞凋亡率和凋亡相关蛋白 caspase-3 表达水平均升高,提示 CVB3 能促进心肌细胞的凋亡。而在感染 CVB3 后加入 Ang Ⅱ因子,心肌细胞凋亡率升高,提示 Ang Ⅱ在影响心肌能量代谢等过程中进一步引起了心肌细胞的凋亡。但无论是感染 CVB3 的心肌细胞,还是感染 CVB3 后与 Ang Ⅱ共培养的心肌细胞,雷米普利均会使心肌细胞的凋亡率及凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达明显降低,提示雷米普利可以降低因病毒感染及 Ang Ⅱ水平升高引起的心肌细胞凋亡。其机制可能是雷米普利作为一种含羧基的 ACE 抑制剂,可抑制 Ang Ⅰ向 Ang Ⅱ的转化,降低 Ang Ⅱ的体内水平,从而抑制 Ang Ⅱ相关的心肌细胞凋亡等过程。

参 考 文 献

- [1] Yu F, Chen R, Takahashi T, et al. Candesartan improves myocardial damage in obese mice with viral myocarditis and induces cardiac adiponectin[J]. Int J Cardiol, 2008, 129(3): 414-421.
- [2] Huang TF, Wu XH, Wang X, et al. Fas-FasL expression and myocardial cell apoptosis in patients with viral myocarditis[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(2):15027607.
- [3] Peng Y, Fu ZZ, Guo CS, et al. Effects and mechanism of baicalin on apoptosis of cervical cancer HeLa cells in-vitro [J]. Iran J Pharm Res, 2015, 14(1):251-261.
- [4] Lin L, Zhang M, Yan R, et al. Inhibition of Drp1 attenuates mitochondrial damage and myocardial injury in Cocksackievirus B3 induced myocarditis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(3):550-556.
- [5] Zhang X, Ha T, Lu C, et al. Poly (I:C) therapy decreases cerebral ischaemia/reperfusion injury via TLR3-mediated prevention of Fas/FADD interaction[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(3):555-565.

(收稿:2018-04-12 修回:2018-07-27)

(本文编辑:胡晓静)