

血管紧张素受体和脑啡肽酶双效抑制剂在急性心肌梗死早期的应用价值

刘东升 张侃迪 毕昌龙 张鹏 张田田 张俊峰

【摘要】 目的:评估在小鼠急性心肌梗死(AMI)早期应用新型血管紧张素受体和脑啡肽酶双效抑制剂(ARNI)诺欣妥(LCZ696)的价值。 方法:将 10~12 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠,随机分为对照组和手术组。手术组采用结扎左前降支法行心梗造模,按给药不同分为模型组、缬沙坦组和 LCZ696 组,分别予玉米油(对照组和模型组)、缬沙坦($9.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和 LCZ696($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃。于 AMI 后多个时间节点对所有小鼠心脏行超声多普勒检测和心肌组织 Masson 染色。 结果:(1)心脏超声:对比造模后多时间节点结果发现,模型组小鼠左室射血分数(LVEF)逐渐下降,药物组均有所回升。自 AMI 后第 7 天开始,LCZ696 组即明显高于模型组($P < 0.05$);自 AMI 后第 14 天开始,缬沙坦组 LVEF 与模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);AMI 后第 28 天和第 42 天,LCZ696 组 LVEF 较缬沙坦组恢复更好(P 均 < 0.05)。(2)Masson 染色:对各组小鼠心脏同一切面的心肌组织行 Masson 染色,进行纤维化分析发现,各手术组随着时间进展,均表现出一定程度的心肌纤维化,以模型组更为明显,该组自 AMI 后第 7 天开始,即表现出较缬沙坦组和 LCZ696 组更大的纤维化面积占比($P < 0.01$);LCZ696 组的心肌纤维化减轻程度自 AMI 后第 14 天开始便表现出与缬沙坦组的统计学差异($P < 0.05$)。 结论:在小鼠 AMI 早期应用 LCZ696 优于单用缬沙坦,药效获益主要表现为改善 LVEF 和对抗心肌纤维化。

【关键词】 血管紧张素受体和脑啡肽酶双效抑制剂;急性心肌梗死;心肌纤维化

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2020.05.010

Application of angiotensin receptor-neprilysin inhibitor in early stage of acute myocardial infarction

LIU Dongsheng, ZHANG Kandi, BI Changlong, ZHANG Peng, ZHANG Tiantian, ZHANG Junfeng Department of Cardiology, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

【Abstract】 Objective: To evaluate the effects of angiotensin receptor-neprilysin inhibitor (ARNI) Entresto (LCZ696) in the early stage of acute myocardial infarction (AMI) in mice. **Methods:** Healthy male C57BL/6 mice aged 10-12 weeks were randomly divided into control group and surgery group. The left anterior descending branch of mice in the surgery group was ligated to establish the model of myocardial infarction, and according to the administration, the mice in the surgery group were further divided into the model group, the valsartan group and the LCZ696 group. Corn oil (the control group and the model group), valsartan ($9.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and LCZ696 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) were administered by oral gavage, respectively. Doppler echocardiogram detection and Masson staining of tissue sections were performed in all groups at multiple time points after myocardial infarction. **Results:** (1)Echocardiogram: after modeling the left ventricular ejection fraction (LVEF) of the mice in the model

group gradually decreased, while that of the mice in the valsartan group and the LCZ696 group rose. Since the 7th day after AMI, LVEF of the LCZ696 group was significantly higher than that of the model group ($P < 0.05$); since the 14th day after AMI, LVEF of the valsartan group was higher than that of the model group ($P < 0.05$). At the 28th and 42nd day after AMI, LVEF of the LCZ696 group was higher than that of the valsartan group ($P < 0.05$). (2) Masson staining: Masson staining was performed on the myocardial tissue of the same section in each group. Quantitative analysis of collagen fiber showed that each surgical group presented a certain degree of myocardial fibrosis over time, especially in the model group. And since the 7th day after AMI, the proportion of fibrosis area in the valsartan group and the LCZ696 group were smaller than that of the model group ($P < 0.01$). The proportion of fibrosis area in the LCZ696 group was smaller than that of the valsartan group since the 14th day after AMI ($P < 0.05$). **Conclusions:** LCZ696 is superior to valsartan alone in the early stage of acute myocardial infarction in mice, with improvement of LVEF and the prevention of myocardial fibrosis.

【Key words】 Angiotensin receptor-neprilysin inhibitor; Acute myocardial infarction; Myocardial fibrosis

急性心肌梗死(AMI)患者如因为各种原因未能及时行再灌注治疗,则其受损心肌重构,患者最终可发展为缺血性心肌病、心力衰竭(心衰)^[1-2]。

依照现行临床路径管理,AMI 确诊后如无禁忌应及早常规使用肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)抑制剂,以遏制心肌纤维化,对抗心室重构,延缓心衰进程^[3]。随着新型血管紧张素受体和脑啡肽酶双效抑制剂(ARNI)的出现,特别是基于 PARADIGM-HF 的试验结果,沙库巴曲缬沙坦钠片(诺欣妥,LCZ696)对抗心衰的作用受到广泛关注^[4]。然而,AMI 早期应用 ARNI 是否优于目前常规应用的 RAAS 抑制剂,包括血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素受体抑制剂(ARB)尚无定论。本研究借助小鼠 AMI 模型,评估 LCZ696 在小鼠 AMI 早期应用的确切价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10~12 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠,SPF 级,购自江苏集萃药康生物科技有限公司,饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物中心,饲养环境及动物护理严格按国家标准执行。

1.2 主要试剂

玉米油、LCZ696、缬沙坦购自大连美仑生物技术有限公司,Masson 染色试剂盒购自武汉谷歌生物科技有限公司。

1.3 小鼠 AMI 模型的建立

乙醚棉球诱导小鼠麻醉后固定小鼠,脱毛膏脱去待手术区毛发,碘伏消毒,剪开颈部皮肤,暴露气管,气管插管后连接呼吸机。根据小鼠体质量调节潮气量($600 \sim 800 \mu\text{L}/30 \text{ g}$),呼吸比设置为 1 : 1,频率为 $100 \sim 120 \text{ 次}/\text{min}$ 。给予异氟烷吸入麻醉,麻醉维持

浓度为 5%。剪开胸部皮肤和肌肉,横行打开胸腔,采用 4-0 手术缝合线悬吊肋骨,暴露小鼠心脏,采用 7-0 缝合线结扎小鼠心脏左前降支,确定冠状动脉血流阻断后,排除胸腔空气,采用 4-0 手术缝合线关胸,缝合胸部皮肤,去除气管插管,等待小鼠苏醒。

1.4 实验分组

AMI 建模后第 1 天,采用心超检测小鼠心功能,将左室射血分数(LVEF)为 25%~40%的小鼠纳入手术组,按 LVEF 数值大小排序后依次分至模型组、缬沙坦组和 LCZ696 组。对照组操作同上,只是不行左前降支结扎。

1.5 药物干预

予对照组和模型组玉米油灌胃,缬沙坦组将缬沙坦溶于玉米油后按 $9.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 进行灌胃,LCZ696 组将 LCZ696 溶于玉米油后按 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。给药溶剂体积一致,固定给药时间,每日顿服。

1.6 超声检测

AMI 后第 1、7、14、28、42 天在 M 模式下行小鼠超声检测。

1.7 Masson 染色

速取小鼠心脏,生理盐水轻轻洗去残余血液,4%多聚甲醛固定,酒精脱水,透明化后石蜡包埋切片。按试剂盒说明书行 Masson 染色,显微镜下观察心肌细胞和间质纤维化情况,拍照并使用 Image Pro Plus 6.0 软件计算纤维化面积。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,采用 GraphPad Prism 5 软件作图分析。计量资料以均数 ± 标准差表示,组间比较采用未配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMI 早期应用 LCZ696, 心功能改善优于单用缬沙坦

在小鼠 AMI 后第 7、14、28、42 天行 LVEF 检测。各手术组与对照组相比, 所有检测时间节点 LVEF 差异均具有统计学意义(P 均 <0.05)。小鼠 AMI 后第 7 天, LCZ696 组 LVEF 即明显高于模型组($P=0.043$), 缬沙坦组 LVEF 虽然高于模型组, 但差异不具有统计学意义($P=0.1103$)。小鼠 AMI 后第 14 天, 缬沙坦组 LVEF 开始明显高于模型组($P=0.0068$)。随着时间的延续, 模型组 LVEF 逐渐下降, LCZ696 组和缬沙坦组均有所回升, 小鼠心梗后第 28 天和第 42 天, LCZ696 组较缬沙坦组 LVEF 恢复得更好($P<0.05$)。见表 1。

1.2 LCZ696 和缬沙坦的使用可有效减轻心肌纤维化

取手术组小鼠 AMI 部位、对照组小鼠对应区域

行 Masson 染色, 红色代表心肌组织, 蓝色指示心肌纤维化, 细胞核呈蓝黑色, 切片切面垂直心脏长轴。结果显示, 随着时间的进展, 各手术组小鼠均表现出一定程度的心肌纤维化。与模型组相比, LCZ696 组和缬沙坦组心肌排列更为规整, 纤维化程度更轻, 特别是 LCZ696 组, 在 AMI 第 28、42 天时, 心肌纤维化的程度明显低于同一时间节点的其他手术组。见图 1。

对各组小鼠的 Masson 染色图片进行纤维化定量分析可见, 对照组心肌纤维化显著低于各手术组(P 均 <0.001)。自 AMI 后第 3 天开始, 各手术组随着时间进程, 均表现出一定程度的心肌纤维化; 其中模型组最为明显, 自 AMI 后第 7 天开始, 其心肌纤维化比例均明显高于 LCZ696 组和缬沙坦组(P 均 <0.01); 而 LCZ696 组心肌纤维化比例自 AMI 后第 14 天开始出现与缬沙坦组的明显差异(P 均 <0.05)。见表 2。

表 1 各组小鼠心脏超声 LVEF 比较

AMI 后时间	对照组		模型组组		缬沙坦组		LCZ696 组	
	<i>n</i>	LVEF	<i>n</i>	LVEF	<i>n</i>	LVEF	<i>n</i>	LVEF
第 1 天	3	58.47±2.87	10	31.13±1.44	10	31.15±1.38	10	31.41±1.38
第 7 天	3	61.90±3.68	9	26.20±3.12	10	33.98±3.36	10	37.43±3.97 ⁽¹⁾
第 14 天	3	61.40±1.82	8	18.28±2.95	9	31.78±3.09 ⁽¹⁾	9	36.01±3.88 ⁽¹⁾
第 28 天	3	60.30±2.45	8	14.99±2.81	8	32.15±3.81 ⁽¹⁾	8	44.65±3.72 ⁽¹⁾⁽²⁾
第 42 天	3	63.83±2.21	7	14.76±3.24	7	35.44±4.03 ⁽¹⁾	7	48.69±4.05 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:与模型组比较,⁽¹⁾ $P<0.05$;与缬沙坦组比较,⁽²⁾ $P<0.05$

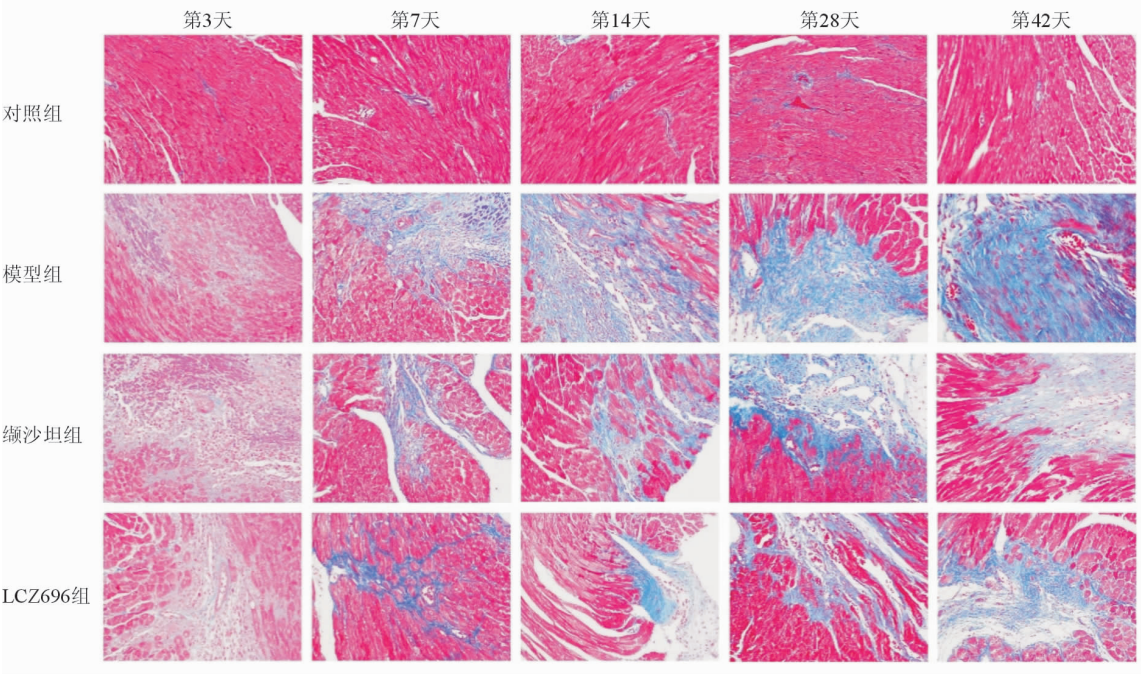


图 1 各组小鼠心肌 Masson 染色结果(×200)

表 2 各组小鼠心肌纤维化 Masson 染色结果比较

AMI 后时间	对照组 (n = 4)	模型组 (n = 4)	缬沙坦组 (n = 4)	LCZ696 组 (n = 4)
第 3 天	0.31 ± 0.057	3.55 ± 1.18	2.65 ± 0.35	2.41 ± 0.242
第 7 天	0.27 ± 0.047	30.03 ± 3.17	16.77 ± 1.30 ⁽¹⁾	13.26 ± 1.36 ⁽¹⁾
第 14 天	0.28 ± 0.055	41.17 ± 2.19	25.91 ± 1.81 ⁽¹⁾	17.23 ± 1.65 ⁽¹⁾⁽²⁾
第 28 天	0.34 ± 0.11	53.34 ± 2.08	40.73 ± 1.68 ⁽¹⁾	27.24 ± 2.43 ⁽¹⁾⁽²⁾
第 42 天	0.32 ± 0.06	72.39 ± 3.30	53.83 ± 2.85 ⁽¹⁾	39.53 ± 3.08 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:与模型组比较,⁽¹⁾ $P<0.05$;与缬沙坦组比较,⁽²⁾ $P<0.05$

3 讨论

为对抗心肌坏死引发的心肌纤维化、心室重构,改善预后,早期常规给予 RAAS 抑制剂已被广泛接受。欧洲心脏病学会(ESC)ST 段抬高型急性心肌梗死(STEMI)管理指南明确指出,有心衰证据、左心室受损、糖尿病或前壁 AMI 的患者,推荐发病 24 h 内开始 ACEI 治疗,若不能耐受,可替换为 ARB(I 类推荐,A 级证据)^[5]。基于 PARADIGM-HF 等一系列临床研究,全球第一个上市的 ARNI 类代表药物诺欣妥对抗心衰的显著作用受到广泛关注,已列为射血分数降低心衰(HFrEF)患者的 I 类推荐^[6]。因此,使用 ARNI 代替 RASS 抑制剂,扩充 ARNI 适应证,成为心血管领域关注的焦点。目前,在 AMI 早期使用 ACEI/ARB 已成为指南推荐,但是早期使用 ARNI 的价值仍有待评估。

与 ACEI 和 ARB 会引起血压下降类似,在 AMI 时应用 LCZ696 可能引起血压降低的不良反应。因此,本研究在参考相关文献的基础上,选用不影响血压基线水平的最大药物剂量进行灌胃给药,缬沙坦的剂量按照 LCZ696 中的药物占比进行计算^[7],以避免在 AMI 早期因部分小鼠血流动力学不稳定而影响实验结果。另外,为了观察 AMI 早期小鼠心功能及心肌纤维化的动态演变过程,本研究设置了多个时间检测节点,以确保数据的全面性,更好地呈现这一动态过程。

在本研究中,随着时间进展模型组小鼠的心功能持续恶化,而缬沙坦组和 LCZ696 组小鼠的心功能均有所改善。模型组心功能的恶化对应在心肌 Masson 染色上,表现为不断扩大的心肌纤维化面积,提示心肌纤维化的发生发展在小鼠 AMI 后心室重构、心功能减退中扮演着重要角色。而在缬沙坦组和 LCZ696 组,对比同一时间节点的心肌纤维化比例和 LVEF,更低的心肌纤维化比例对应着更为明显的 LVEF 提升,且此现象在 LCZ696 组更为明显,提示拮抗 RASS 可以在一定程度上减轻 AMI

急性期的心肌纤维化,而 LCZ696 在拮抗 RASS 的基础上联合了脑啡肽酶抑制剂的作用,可以更有效地对抗心肌纤维化。

LCZ696 是一种新型血管紧张素受体及脑啡肽酶双效抑制剂,是由沙库巴曲与缬沙坦结合而成的盐复合物晶体,口服易吸收,生物利用度高,给药后在体内可分解为缬沙坦和 AHU377,后者可快速代谢为有抑制脑啡肽酶活性的 LBQ657^[8-10]。缬沙坦可选择性地阻断血管紧张素 II(Ang II)与血管紧张素 1 型受体(AT1)的结合,从而发挥抗 RASS 作用;LBQ657 则可抑制脑啡肽酶,减少体内利钠肽系统(NPs)的降解,NPs 通过相应的受体激活鸟苷酸环化酶(GC),产生第二信使环磷酸鸟苷(cGMP),进而激活下游信号传导通路,起到降低血管阻力,舒张血管,对抗心肌纤维化的作用^[11-12]。有研究证实,心房利钠肽(ANP)、脑钠肽(BNP)可通过 cGMP 信号通路,抑制转化生长因子-β(TGF-β)表达,进而有效对抗心肌纤维化^[13-14]。此外,外源性输入 C 型利钠肽(CNP)亦可减轻 Ang II 介导的心肌重构^[15]。小鼠 AMI 早期使用双效抑制剂 LCZ696,抗纤维化作用明显优于单用缬沙坦。

综上所述,本研究在小鼠 AMI 早期使用 LCZ696 和缬沙坦,发现 LCZ696 可以获得比单用缬沙坦更好的对抗心肌纤维化、改善 LVEF 的效果,这为临床探索 ARNI 新的用药适应证提供依据。

参 考 文 献

[1] 胡盛寿, 杨跃进, 郑哲, 等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3):209-220.

[2] Zhang YH, Zhang J, Butler J, et al. Contemporary epidemiology, management, and outcomes of patients hospitalized for heart failure in China: results from the China Heart Failure (China-HF) Registry[J]. J Card Fail, 2017, 23(1):868-875.

[3] 张瑞岩, 高炜. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南(2019)[J]. 中华心血管病杂志, 2019, 47(10):766-783.

[4] McMurray JJ, Packer M, Desai AS, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure[J]. N

- Engl J Med, 2014, 371(11):993-1004.
- [5] Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation[J]. Kardiol Pol, 2018, 76(2):229-313.
- [6] Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on clinical practice guidelines and the Heart Failure Society of America [J]. Circulation, 2017, 136 (6): e137-e161.
- [7] Ishii M, Kaikita K, Sato K, et al. Cardioprotective effects of LCZ696 (Sacubitril/Valsartan) after experimental acute myocardial infarction[J]. JACC Basic Transl Sci, 2017, 2 (6):655-668.
- [8] Hsiao HL, Langenickel TH, Greeley M, et al. Pharmacokinetic drug-drug interaction assessment between LCZ696, an angiotensin receptor neprilysin inhibitor, and hydrochlorothiazide, amlodipine, or carvedilol [J]. Clin Pharmacol Drug Dev, 2015, 4(6):407-417.
- [9] 刘岳, 汪芳. 沙库巴曲缬沙坦的药代动力学和药效学特点[J]. 中国循环杂志, 2018, 33 (2) :198-200.
- [10] Akahori M, Ayalasomayajula S, Langenickel T, et al. Pharmacokinetics after single ascending dose, food effect, and safety of Sacubitril/Valsartan (LCZ696), an angiotensin receptor and neprilysin inhibitor, in healthy Japanese subjects[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2017, 42(3):407-416.
- [11] Leong DP, McMurray JJV, Joseph PG, et al. From ACE inhibitors/ARBs to ARNIs in coronary artery disease and heart failure (Part 2/5)[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 74 (5):683-698.
- [12] Mangiafico S, Costello-Boerrigter LC, Andersen IA, et al. Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics[J]. Eur Heart J, 2013, 34(12):886-893.
- [13] Li P, Wang D, Lucas J, et al. Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor beta-induced Smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts[J]. Circ Res, 2008, 102(2):185-192.
- [14] Kapoun AM, Liang F, O'Young G, et al. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation[J]. Circ Res, 2004, 94(4):453-461.
- [15] Izumiya Y, Araki S, Usuku H, et al. Chronic C-type natriuretic peptide infusion attenuates angiotensin II-induced myocardial superoxide production and cardiac remodeling[J]. Int J Vasc Med, 2012, 2012:246058.

(收稿:2020-03-01 修回:2020-08-10)

(本文编辑:胡晓静)