

内皮素受体拮抗剂 CPU0213 和钙拮抗剂 CPU86017 改善异丙肾上腺素诱导的大鼠心衰的作用机制

成于思, 戴德哉*, 季晖**, 戴茵

(中国药科大学药理学研究室, 南京 210009)

摘要 为了验证内皮素受体拮抗剂 CPU0213 和钙拮抗剂 CPU86017 改善异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO) 诱导的大鼠心衰的分子生物学机制, 将 SD 大鼠均分为 5 组: 正常组、ISO 组、药物治疗组(3 组)。除正常组外, 其余 4 组均皮下给予异丙肾上腺素(ISO, 1 mg/kg, 10 d), 其中 3 个治疗组于第 10, 11 天分别皮下注射: 氨基胍(30 mg/kg)、CPU0213(30 mg/kg) 和 CPU86017(4 mg/kg)。结果发现, ISO 组, 内皮素受体 A(ET_A)、iNOS、衰老蛋白 p66Shc、ε 型蛋白激酶 C(PKCε)、瘦素受体(OBRb)、NADPH 氧化酶 p67^{phox}、瘦素(leptin)mRNA 或蛋白表达均上调, 药物治疗后对这些异常均有逆转。CPU0213 和 CPU86017 均通过抑制内皮素受体和氧化应激及下调 p66Shc 和 PKCε 等相关分子表达, 减轻 ISO 引起的心衰。

关键词 CPU0213; CPU86017; 心衰; PKCε; p66Shc

中图分类号 R965 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)01-0058-06

Mechanism of endothelin receptor antagonist CPU0213 and calcium antagonist CPU86017 ameliorated rats' heart failure induced by isoproterenol

CHENG Yu-si, DAI De-zai*, JI Hui**, DAI Yin

Research Division of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The purpose of this experiment was to verify whether endothelin receptor antagonist CPU0213 and calcium antagonist CPU86017 improved isoproterenol (ISO)-induced heart failure in rats by inhibiting p66Shc and PKCε. 40 SD male rats were randomly divided into 5 groups. Except for the normal group, the other groups were given isoproterenol for 10 d (1mg/kg, sc). Three treatment groups (sc, mg/kg, from day 10-11) included: aminoguanidine group 30 and CPU0213 group 30 and CPU86017 group 4. It was found that mRNA or the protein expressions of endothelin receptor A (ET_A), iNOS, p66Shc, PKCε, OBRb, NADPH oxidase p67^{phox} and leptin increased in ISO group. After drug treatment, the above abnormal indicators were mitigated and even reversed. Hence, it suggested that CPU0213 and CPU86017 improved the ISO-induced heart failure by inhibiting the endothelin receptor and oxidative stress and down-regulating the expressions of p66Shc and PKCε.

Key words CPU0213; CPU86017; heart failure; PKCε; p66Shc

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81070145)

心血管疾病常因应激恶化, 导致死亡率增加。异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO) 造成体内应激状态; β-受体过度激活导致心肌内活性氧(reactive oxygen species, ROS) 和内皮素-1(endothelin-1, ET-1) 过量产生, 激活衰老蛋白 p66Shc 和 ε 型蛋白激

酶 C (protein kinase C epsilon, PKCε), 介导心肌病变。同时异丙肾上腺素上调 ET 受体, 增加瘦素(leptin) 的水平^[1], 使 leptin 受体(OBRb) 上调, 产生高瘦素血症等, 伤害心肌。ROS 激活的 PKCε 也是心肌重构的促进因素^[2]。

* 收稿日期 2010-04-21 通讯作者 * Tel: 025-83271270 E-mail: dezaidai@vip.sina.com

** Tel: 025-86205849 E-mail: Huijicpu@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81070145)

p66Shc 是一种与氧化应激和凋亡有关,由原癌基因 *shc* 编码的蛋白,它可诱导体内 ROS 的过度产生。p66Shc 还可减少线粒体电子传递,增强 NADPH 氧化酶活性,使 ROS 产生增多^[3]。

CPU0213 是非选择性内皮素受体拮抗剂,对肺动脉高压、糖尿病肾病、心衰有疗效^[4-5]。对氯苄基四氢小檗碱(CPU86017)具有阻断 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 通道及抗氧化作用^[6-7]。两者结构式见图 1。

本实验的目的是验证 p66Shc 及 PKC ϵ 是否参与应激性大鼠心衰病变,它们是否是 CPU0213 和 CPU86017 改善心衰的作用靶点。

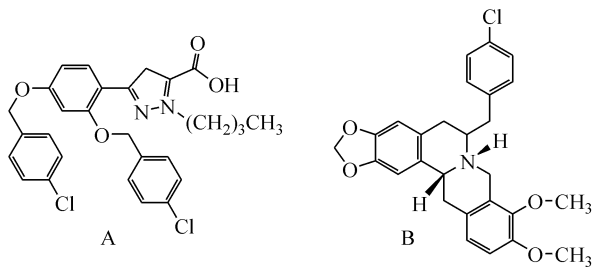


Figure 1 Chemical structures of CPU0213 (A) and CPU86017 (B)

1 材料

1.1 试剂

盐酸异丙肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒:南京建成生物工程研究所;Trizol、AMV 逆转录酶、*Taq* DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、dNTP(各 10 mmol/L)、DEPC(南京天为科技有限公司); β -actin 一抗、NADPH 氧化酶 p67^{phox} 一抗(美国 Upstate 生物技术公司);瘦素一抗、二抗(武汉博士德生物工程有限公司);CPU0213(纯度 > 98%)、CPU86017(纯度 > 98%)由中国药科大学药物化学研究室提供。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

MPA-2000 型多道生理记录仪(上海第二军医大学生理研究所);UVP 图像分析系统(美国 UVP 公司);GDS8000 凝胶成像分析系统(英国 Syngene 公司);PCR 仪、低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);752 紫外分光光度仪、721 分光光度仪(上海第三分析仪器厂)。

1.3 动物

SD 雄性大鼠 40 只,体重 220 ~ 250 g,由浙江省实验动物中心提供,合格证号:SCXK(浙)20080033。

2 方法

2.1 动物分组

大鼠随机均分为 5 组。除正常组外,其余各组连续 10 d 皮下注射 ISO(1 mg/kg)。3 个治疗组在造模后第 10 天和第 11 天分别皮下注射:氨基胍(AMI,30 mg/kg)、CPU0213(30 mg/kg)、CPU86017(4 mg/kg)。均用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液混悬后给药。正常组和 ISO 组给予等体积的 CMC-Na 溶液。

2.2 血流动力学变化

大鼠用乌拉坦麻醉(1.5g/kg, ip),固定于鼠台,右颈总动脉插管测量大鼠血流动力学指标,左心室收缩压(LVSP),左心室末期舒张压(LV-EDP),左心室最大收缩速率[LV + (dP/dt)_{max}],左心室最小收缩速率[LV - (dP/dt)_{min}]。

2.3 心脏重量系数的测定

放血处死动物,迅速取出心脏,冰冷的生理盐水洗净血迹后,滤纸吸干。取大鼠左心室,并称量左心室重量和全心重,然后放入液氮罐中保存待用。

2.4 血清 MDA 生化测定

根据试剂盒说明,测定血清中 MDA 含量。

2.5 左心室 OBRb, NADPH 氧化酶 p67^{phox}, iNOS, ET_A(内皮素 A 受体), p66Shc, PKC ϵ mRNA 表达的测定

用 Trizol 提取左心室组织总 mRNA,取 mRNA 2 μg 进行逆转录,得到 cDNA,取 1 μg 用特定的引物进行扩增,测定 mRNA 表达。扩增产物于 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EB 染色后,UV 系统进行拍照,基因的表达量以 18S 为内参物,通过 Labworks 图像分析系统的灰度比值计算,并比较它们的表达量的变化。引物序列见表 1。

2.6 左心室 NADPH 氧化酶 p67^{phox}, Leptin, PKC ϵ , p66Shc 蛋白表达的测定

取心肌 100 mg,加入匀浆裂解液 1 mL,冰浴中进行匀浆。裂解 30 min 后,用移液器将裂解液移

至 1.5 mL 离心管中,然后在 4 °C 下,10 000 r/min 离心 20 min,取上清以考马斯亮蓝法测定蛋白含量后,调整蛋白浓度至基本一致。取上样样品至 0.5 mL 离心管中,以 1:1 加入上样缓冲液。上样前将样品于沸水中煮 5min 使蛋白变性。经 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白电转至硝酸纤维素膜上,封闭液室

温摇动封闭 1 h,将膜用稀释后的一抗(1:200)室温下孵育 1~2 h 后,PBST 缓冲液室温下洗 3 次,然后二抗稀释液室温下孵育 1~2 h 后,PBST 室温下洗 3 次,DAB 显色剂试剂盒显色。将膜进行拍照,用凝胶图象处理系统分析目标带的相对分子质量和净吸收度并用 β -actin 的数据进行校正。

Table 1 Primer nucleotide sequences and PCR conditions of some biological indicators

Biological indicator	Primer sequence	Annealing temperature/°C	Cycles
Leptin receptor (OBRb)	Sense: 5'-TGG TCAGCAACG TGAAAACAGTGG-3' Antisense: 5'-AACAGGATTGAAACTGGGGCATGT-3'	60	32
Endothelin receptor A (ET _A)	Sense: 5'-ATCGCTGACAATGCTGAGAG-3' Antisense: 5'-CCACGATGAAAATGGTACAG-3'	63	34
Inductible nitric oxide synthase (iNOS)	Sense: 5'-CGGATCCTAGGCTAACAAGACCCAAAG-3' Antisense: 5'-ATCCTTTCTAGAAAACCTCC-3'	52	28
NADPH oxidase p67 ^{phox} (p67 ^{phox})	Sense: 5'-GAAAGCATGAAGGATGCCTGG-3' Antisense: 5'-ATAGCACCAAGATCACATCTCC-3'	60	30
Protein kinase C epsilon (PKC ϵ)	Sense: 5'-GAT GAGCCTCGTTCTCGGTTCTA-3' Antisense: 5'-AGG AGT CCCACA GAA GGT GGT A-3'	55	32
p66Shc	Sense: 5'-TACAACCCACTTCGGAATGGTCT-3' Antisense: 5'-ATGTACCGAACCAAGTAGG-3'	60	40
18S	Sense: 5'-GCTGCTGGCACCAGACTT-3' Antisense: 5'-CGGCTACCACATCCAAGG-3'	50	28

2.7 数据处理及统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较使用单因素方差 (One way-ANOVA) 检查方差齐性,然后用 Bonferroni's multiple comparison tests 分析差异显著性;两组间比较使用 Student's *t*-test 进行差异显著性分析。分析结果以 $P < 0.05$ 认为差异具有显著性意义。

3 结果

3.1 ISO 致左心室肥厚及功能障碍

与正常组比较,ISO 组表现明显的左心室肥厚现象以及功能障碍。ISO 组左心室重量指数较正常组增加了 52.13% ($P < 0.01$)。心脏收缩功能指标 LVSP 减少了 29.7% ($P < 0.01$),LV + (dP/dt)_{max} 减小了 44.4% ($P < 0.01$)。心脏舒张功能指标削弱,使 LVEDP 增加 538.3% ($P < 0.01$),LV - (dP/dt)_{min} 增加 51.8% ($P < 0.01$)。经过氨基胍、CPU0213 和 CPU86017 干预后,ISO 诱导的心重指数和血流动力学异常均有一定程度逆转(图 2)。

3.2 氧化应激参与 ISO 诱导心肌病和心衰

ISO 组血浆中 MDA 的含量较正常组明显上

调,相对应的 NADPH 氧化酶 p67^{phox} 的 mRNA 和蛋白表达也分别上调 86.1% ($P < 0.01$) 和 90.8% ($P < 0.01$),表明氧化应激参与了 ISO 诱导的心肌病变和心衰。与正常组比较,ISO 组 ET_A、iNOS 和 OBRb 的 mRNA 及 Leptin 的蛋白水平均明显上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明内皮素系统和 iNOS 是炎症因子,瘦素也是炎症因子,均激活参与 ISO 诱导的心肌病变和心衰。氨基胍、CPU0213 和 CPU86017 均能在一定程度上逆转这些分子的异常表达(图 3)。

3.3 p66Shc 表达变化及 CPU0213 和 CPU86017 的改善作用

PKC ϵ 作为信号转导分子,其 mRNA 和蛋白表达在 ISO 诱导的心肌病中明显表达上调 ($P < 0.01$)。p66Shc 的 mRNA 和蛋白表达在 ISO 组也明显上调 ($P < 0.01$),表明 p66Shc 可能是心衰治疗的新靶点。逆转 p66Shc 的表达,有助于改善疾病和延长寿命。经过氨基胍(阻断 iNOS 的药物)、CPU0213 以及 CPU86017 的干预,对上述各项指标的异常均有所逆转(图 4)。

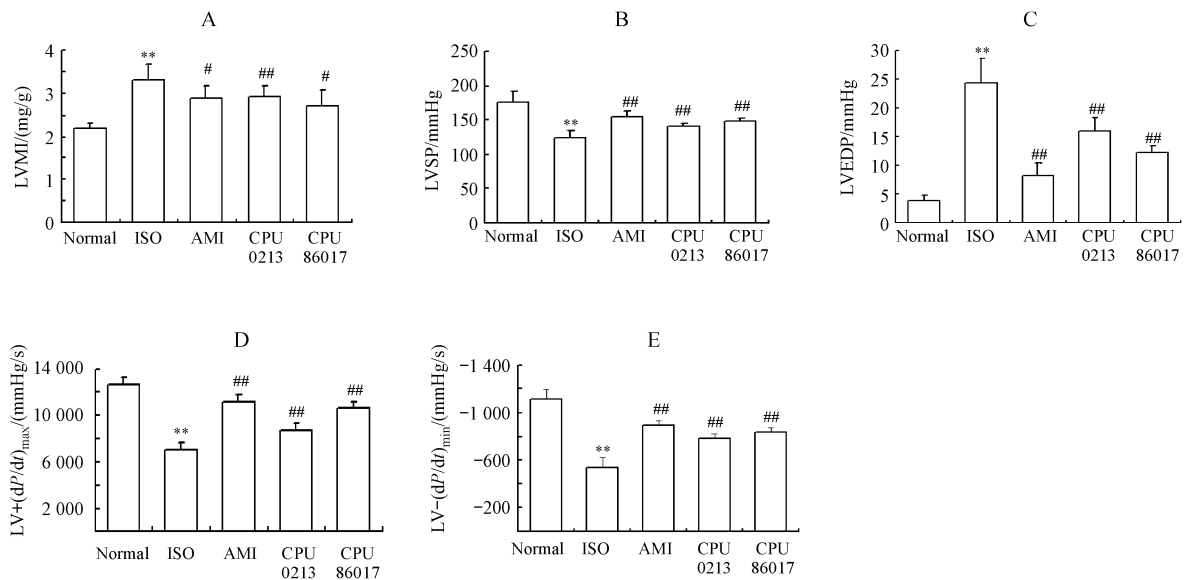


Figure 2 Aminoguanidine (AMI), CPU0213 and CPU86017 mitigated isoproterenol (ISO) induced abnormal left ventricular weight index and hemodynamic parameters of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: Left ventricular mass index (LVMI); B: Left ventricular systolic pressure (LVSP); C: Left ventricular end-diastole pressure (LVEDP); D: Maximum uprising rate of left ventricular pressure [LV + (dP/dt)_{max}]; E: Minimum declining rate of left ventricular pressure [LV - (dP/dt)_{min}]

** $P < 0.01$ vs normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs ISO group

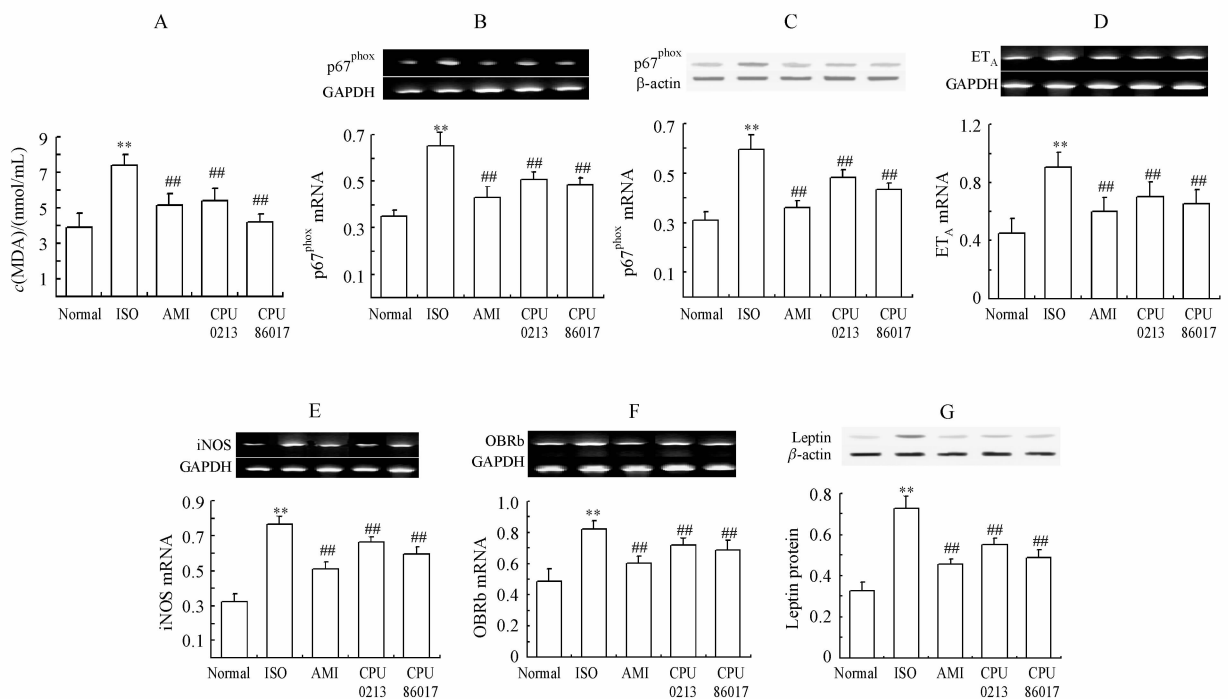


Figure 3 AMI, CPU0213 and CPU86017 improved oxidative stress and inflammation in cardiomyopathic rats induced by ISO ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: Malondialdehyde (MDA); B: p67^{phox} mRNA; C: p67^{phox} protein; D: ET_A mRNA; E: iNOS mRNA; F: OBRb mRNA; G: Leptin protein

** $P < 0.01$ vs normal group; ## $P < 0.01$ vs ISO group

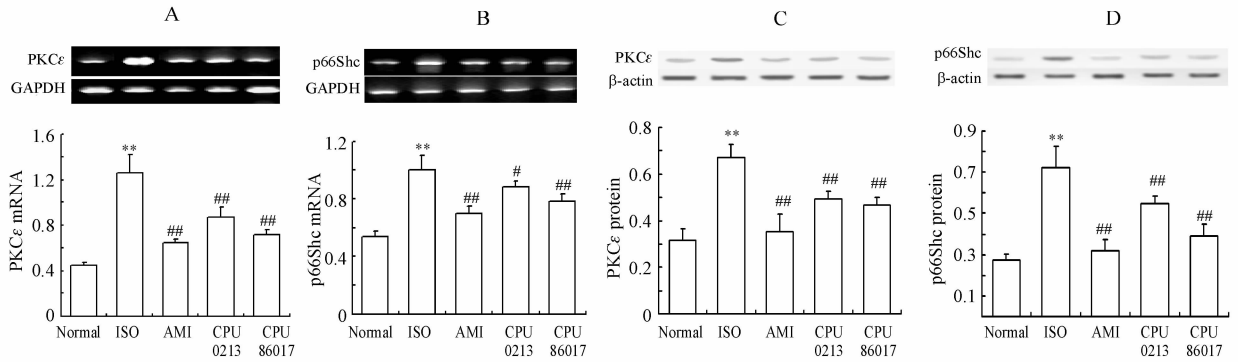


Figure 4 AMI, CPU0213 and CPU86017 improved abnormal mRNA expressions of PKC ϵ and promoter of apoptosis (p66Shc) in cardiomyopathic rats induced by ISO ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: PKC ϵ mRNA; B: p66Shc mRNA; C: PKC ϵ protein; D: p66Shc protein

** $P < 0.01$ vs normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs ISO group

4 讨论

本实验中,由 ISO 诱发应激性心衰,使心肌发生重构,血流动力学产生异常。血中 MDA 含量增多, NADPH 氧化酶 p67^{phox}、ET_A、iNOS 和 OBRb 及 Leptin 表达上调,均参与 ISO 诱导的心衰。PKC ϵ mRNA 表达上调,介导心肌肥大和心衰的病理过程。ISO 引起 ET_A 受体表达增加,导致血管内皮细胞损伤等病理改变。CPU0213、氨基胍和 CPU86017 对上述异常均有所改善。

ET_A 是 ET-1 的主要受体。ET-1 是非常强烈的缩血管物质。ET-ROS 通路参与了多种疾病的病理进程^[8-9]。ISO 的刺激,引起 ET_A 受体表达增加,导致血管收缩,内皮细胞损伤等病理改变。所以内皮素受体阻断剂 CPU0213 能有效改善大鼠心肌血管内皮损伤^[10]。而氨基胍和 CPU86017 也可通过对抗炎反应和抗氧化作用,改善大鼠心肌血管内皮损伤。

p66Shc 的 mRNA 和蛋白表达上调,表明它是心衰治疗的新靶点。逆转 p66Shc 表达,可改善疾病和延长寿命。p66Shc 上调和内皮细胞损伤有关^[11]。p66Shc 基因下调,对抗内皮细胞功能障碍,延长小鼠寿命。本研究证明,氨基胍和 CPU86017 及 CPU0213 通过抑制 p66Shc 表达,改善心功能。p66Shc 还可通过受体依赖途径诱导心肌肥厚和心衰^[12]。p66Shc 的表达可被 G α q 所诱导, p66Shc 是新的诱导心肌肥厚和心肌细胞凋亡及心衰的调节物,是心衰治疗的新靶点。p66Shc 敲除的小鼠对抗氧化应激的能力明显增强,心功能

更好,寿命延长。p66Shc^{-/-}小鼠的心脏,表现出正常的血流动力学和左室厚度,可抵抗血管紧张素 II (Ang II) 诱导的心室重构。Ang II 诱导的左心室肥厚的病理形态及心肌细胞和内皮细胞的凋亡,在 p66Shc^{-/-}小鼠中被完全抑制^[13]。不仅 p66Shc 可形成更多 ROS,而且 ROS 可通过转录和转录后方式,增加 p66Shc 的蛋白水平。形成 p66Shc-ROS 循环,加速心肌损害。

线粒体 NADPH 氧化酶也是 ROS 的重要来源,在心肌重构和衰竭过程中发挥重要作用^[14]。ISO 激活 NADPH 氧化酶,使 ROS 大量生成, iNOS、leptin 等炎症因子表达增加,加剧了心衰病理进程,形成更多的 ROS,上调 p66Shc 表达,形成正反馈。引起心功能损伤。

ROS 进入细胞核内有几条调节转录途径: PKC (蛋白激酶 C)、MAPK 和 calcineurin^[15]。当 β -受体过度激活, PKC 系统激活,这与以往研究一致。我们曾报道: PKC ϵ 的过度磷酸化参与 ISO 诱导的心律失常, pPKC ϵ 在心室各部心肌的表达差异,反映心室中生物学成分的异质性改变,使信号传导不协调,从而导致心功能异常和心律失常^[16]。

本研究发现 p66Shc 和 PKC ϵ 与内皮素系统、氧化应激、炎症因子有密切联系,共同介导了应激性心衰过程。3 种药物均通过抑制内皮素受体和氧化应激及 p66Shc 和 PKC ϵ 等,减轻 ISO 引起的心衰。

参考文献

- [1] Xu M, Ji H, Dai DZ, et al. Protective effect of the endothelin antagonist CPU0213 against isoprenaline-induced heart failure by

- suppressing abnormal expression of leptin, calcineurin and SERCA2a in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, **60**(6): 739 - 745.
- [2] Hunter JC, Korzick DH. Age- and sex-dependent alterations in protein kinase C (PKC) and extracellular regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in rat myocardium [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, **126**(5): 535 - 550.
- [3] Menini S, Amadio L, Oddi G, et al. Deletion of p66Shc longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress [J]. *Diabetes*, 2006, **55**(6): 1 642 - 1 650.
- [4] Cui B, Cheng YS, Dai DZ, et al. CPU0213, a non-selective ET_A/ET_B receptor antagonist, improves pulmonary arteriolar remodeling of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, **36**(2): 169 - 175.
- [5] Xu M, Dai DZ, Dai Y. Normalizing NADPH oxidase contributes to attenuating diabetic nephropathy by the dual endothelin receptor antagonist CPU0213 in rats [J]. *Am J Nephrol*, 2009, **29**(3): 252 - 256.
- [6] Dai DZ. CPU86017: a novel class III antiarrhythmic agent with multiple actions at ion channels [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2006, **24**(2): 101 - 115.
- [7] 王红兰 (Wang HL), 李思本 (Li SB), 戴德哉 (Dai DZ). CPU 86017 对肥厚豚鼠心室细胞 L-型钙电流的影响 [J]. 中国药科大学学报 (*J China Pharm Univ*), 2004, **35**(3): 259 - 262.
- [8] Qi MY, Liu HR, Dai DZ, et al. Total triterpene acids, active ingredients from Fructus Corni, attenuate diabetic cardiomyopathy by normalizing ET pathway and expression of FKBP12.6 and SERCA2a in streptozotocin-rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, **60**(12): 1 687 - 1 694.
- [9] Liu HR, Tang XY, Dai DZ, et al. Ethanol extracts of Rehmannia complex (*Di Huang*) containing no Corni fructus improve early diabetic nephropathy by combining suppression on the ET-ROS axis with modulate hypoglycemic effect in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, **118**(3): 466 - 472.
- [10] Xu J, Li N, Dai DZ, et al. The endothelin receptor antagonist CPU0213 is more effective than aminoguanidine to attenuate isoproterenol-induced vascular abnormality by suppressing overexpression of NADPH oxidase, ET_A, ET_B, and MMP9 in the vasculature [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, **52**(1): 42 - 48.
- [11] Martin-Padura I, de Nigris F, Migliccio E, et al. p66Shc deletion confers vascular protection in advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E knockout mice [J]. *Endothelium*, 2008, **15**(5/6): 276 - 287.
- [12] Messina E, Giacomello A. Diabetic cardiomyopathy: a "cardiac stem cell disease" involving p66Shc, an attractive novel molecular target for heart failure therapy [J]. *Circ Res*, 2006, **99**(1): 1 - 2.
- [13] Graiani G, Lagrasta C, Migliccio E, et al. Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage [J]. *Hypertension*, 2005, **46**(2): 433 - 440.
- [14] Anilkumar N, Sirker A, Shah AM. Redox sensitive signaling pathways in cardiac remodeling, hypertrophy and failure [J]. *Front Biosci*, 2009, **14**: 3 168 - 3 187.
- [15] Adiga IK, Nair RR. Multiple signaling pathways coordinately mediate reactive oxygen species dependent cardiomyocyte hypertrophy [J]. *Cell Biochem Funct*, 2008, **26**(3): 346 - 351.
- [16] Cheng YS, Dai DZ, Dai Y. Isoproterenol disperses distribution of NADPH oxidase, MMP-9, and pPKC epsilon in the heart, which are mitigated by endothelin receptor antagonist CPU0213 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, **30**(8): 1 099 - 1 106.

· 新 进 展 ·

2010 年跨国制药公司新药研发进展 (4)

2010 年 FDA 及 EMA 批准的新药

2010 年, FDA 批准的具有数十亿美元销量潜力的药物有达比加群酯 (Dabigatran)、芬戈莫德 (Fingolimod)、利拉鲁肽 (Liraglutide)、普瑞巴林 (Pregabalin)、Tesamorelin、妥克利骨 (Tocilizumab)、狄诺塞麦 (Denosumab) 和疫苗 Pevnar 13、Provenge、Menveo。辉瑞有 3 个新药获得 FDA 批准, 成为最大的赢家。下面列出的是部分具有“重磅炸弹”级潜力药物。

- Denosumab (狄诺塞麦), 安进公司, 治疗骨质疏松症。
- Fingolimod (芬戈莫德), 三菱田边制药公司, 复发型的多发性硬化症。Tocilizumab (妥克利骨), 罗氏公司, 治疗类风湿性关节炎。
- Dabigatran (Pradaxa, 达比加群酯), 勃林格殷格翰公司, 治疗房颤患者发生卒中风险的口服凝血酶抑制剂。

2010 年, EMA 批准的“重磅炸弹”级的潜力药物有 Tocilizumab (妥克利骨)、Denosumab (狄诺塞麦)、单克隆抗体 Ofatumumab 和 Pazopanib (帕唑帕尼)。葛兰素史克有 4 个新药获得 EMA 批准, 成为欧洲 R&D 的佼佼者, 默沙东紧随其后, 有 3 个新药获得批准。不过文迪雅的退市使欧洲药物市场黯然失色。

(中国医药报, 本刊有删改)