文章编号:1000-5404(2007)05-0445-03

论著

不同严重程度心力衰竭患者心肌组织ACE和AngⅡ蛋白的表达

王 江,田 颖,聂 凌,宋 熔,李震魁,谭红梅,祝善俊 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 了解不同程度心力衰竭患者心肌组织血管紧张素转换酶(angiotensin convering enzyme, ACE)和血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)蛋白表达与心肌重构和心功能的关系。**方法** 通过手术取材,采用Western blot技术检测35例瓣膜病所致心力衰竭患者和5例正常人的心肌组织中ACE和AngⅡ蛋白表达,采用免疫组织化学方法检测ACE和AngⅡ在心力衰竭患者和正常人心肌组织中的表达部位。**结果** 瓣膜病所致心力衰竭患者心肌组织呈心肌重构病理改变。轻度心力衰竭患者心肌组织ACE和AngⅡ蛋白表达较正常人增高,中重度心力衰竭患者AngⅡ增高更为显著,但ACE/AngⅡ比值随着心力衰竭程度加重逐渐下降。免疫组织化学染色显示ACE主要在心肌细胞膜表达,AngⅡ主要在心肌细胞细胞质表达。**结论** 心力衰竭患者心肌组织ACE和AngⅡ蛋白表达量明显增加,直接参与心肌重构的发生发展。心衰时ACE/AngⅡ值下降,提示AngⅡ的生成与分解可能依赖非ACE的其他途径。

关键词: 心力衰竭; 血管紧张素转换酶; 血管紧张素Ⅱ
中图法分类号: R322.11;R446.6;R541.602 **文献标识码:** A

Expressions of ACE and AngⅡ in myocardium of congestive heart failure patients

WANG Jiang, TIAN Ying, NIE Ling, SONG Rong, LI Zhen-kui, TAN Hong-mei, ZHU Shan-jun (Cardiovascular Disease Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the relationship of the expressions of myocardial angiotensin convering enzyme (ACE) and angiotensin Ⅱ (AngⅡ), and myocardial remodeling and cardiac functions in patients with congestive heart failure (CHF). **Methods** Pathologic and morphologic studies on myocardial tissue samples of 35 patients with CHF due to valvular heart diseases and of 5 matched health subjects dying of accidents were carried out with light and electronic microscopy assay. Protein expressions of ACE and AngⅡ in myocardial tissues were analyzed using Western blotting. Immunohistochemistry was used to determine the positions of ACE and AngⅡ expressions. **Results** Pathological changes of CHF patients showed typical myocardial remodeling. Their ACE and AngⅡ expressions were increased than in the control subjects, but ACE/AngⅡ ratio was decreased in the patients with severe CHF than in the mild CHF. Immunohistochemistry showed that ACE mainly expressed in the membrane of cardiocyte, and AngⅡ mainly in the endochylema of cardiocyte. **Conclusion** The expressions of ACE and AngⅡ are up-regulated in CHF patients, which may be involved in the myocardium remodeling. The ratio of ACE/AngⅡ is decreased in CHF patients, suggested that AngⅡ production may be ACE independent.

Key words: congestive heart failure; angiotensin convering enzyme; angiotensin

心力衰竭(简称心衰)的核心问题是心肌重构,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin angiotensin system, RAS)激活是心肌重构的重要介导因素,而血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)是RAS的核心酶,催化产生RAS最关键的效应因子血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)。本研究通过手术取材,采用Western blot和免疫组织化学的方法检测心肌组织局部ACE和AngⅡ蛋白表达,探讨其与心肌重构的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2005年3-6月在本院心血管外科住院的瓣膜病需接受二尖瓣置换术的心衰患者35例为疾病组。其中男性20例,女性15例,年龄26~61岁,平均41岁。根据纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级标准,心功能Ⅱ级6例,心功能Ⅲ级17例,心功能Ⅳ级12例。摄胸部X线片测量心胸比率(HTR),HP500型彩色多普勒超声心动图仪于患者术前1周测定左心室舒张末内径(LVED)、左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(FS)、心输出量(CO)和心脏指数(CI)。患者均排除急

作者简介:王 江(1973-),女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事心力衰竭发病机制方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68774601,E-mail:a65223875@cta.cq.cn
通讯作者:祝善俊,电话:(023)68755701
收稿日期:2006-07-18;修回日期:2006-11-29

慢性感染、糖尿病、自身免疫性疾病、恶性肿瘤、严重的肝肾功能障碍、急性心肌梗死等。

正常对照组5例来自意外死亡的器官捐献者，性别及年龄与疾病组比较无显著差异（$P>0.05$）。

1.2 心肌取材

二尖瓣置换术患者于术中夹取少量左心室乳头肌，意外死亡者于死亡后2 h内夹取少量左心室乳头肌，立即置入液氮中冻存进行Western blot检测，或多聚甲醛固定、石蜡包埋进行病理、免疫组化检测。所有标本于3个月内同批检测。

1.3 Western blot半定量检测心肌组织ACE和AngⅡ蛋白表达

用RIPA裂解组织总蛋白，Bradford法测定蛋白浓度。制备10%分离胶和5%积层胶，每孔上样量为150 μg，电泳，半干转移仪转膜，封闭，羊抗ACE和羊抗AngⅡ多克隆抗体（均购自Santa Cruz美国，抗体编号：sc-12187、sc-7419）（1∶500稀释）4 ℃过夜，加Ⅱ抗（鼠抗羊抗体，购自北京中杉金桥生物技术公司）室温孵育1 h，DAB显色。膜扫描后经Guantity one软件分析光密度值。

1.4 免疫组织化学方法检测心肌组织ACE和AngⅡ表达部位

将新鲜心肌组织置入多聚甲醛固定24 h，送病理科进行脱水处理、石蜡包埋、切片。按SABC免疫组化试剂盒（购自北京中杉金桥生物技术公司）操作步骤进行，DAB显色，自来水充分冲洗，苏木精复染，中性树胶封片。

1.5 统计学处理

计量资料以$x\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 患者一般临床资料

心衰患者临床资料显示，NYHA心功能分级越差，心胸比率和左心室舒张末内径越大，左心室射血分数和左心室短轴缩短率越小（表1）。

表1 不同程度心力衰竭患者临床资料

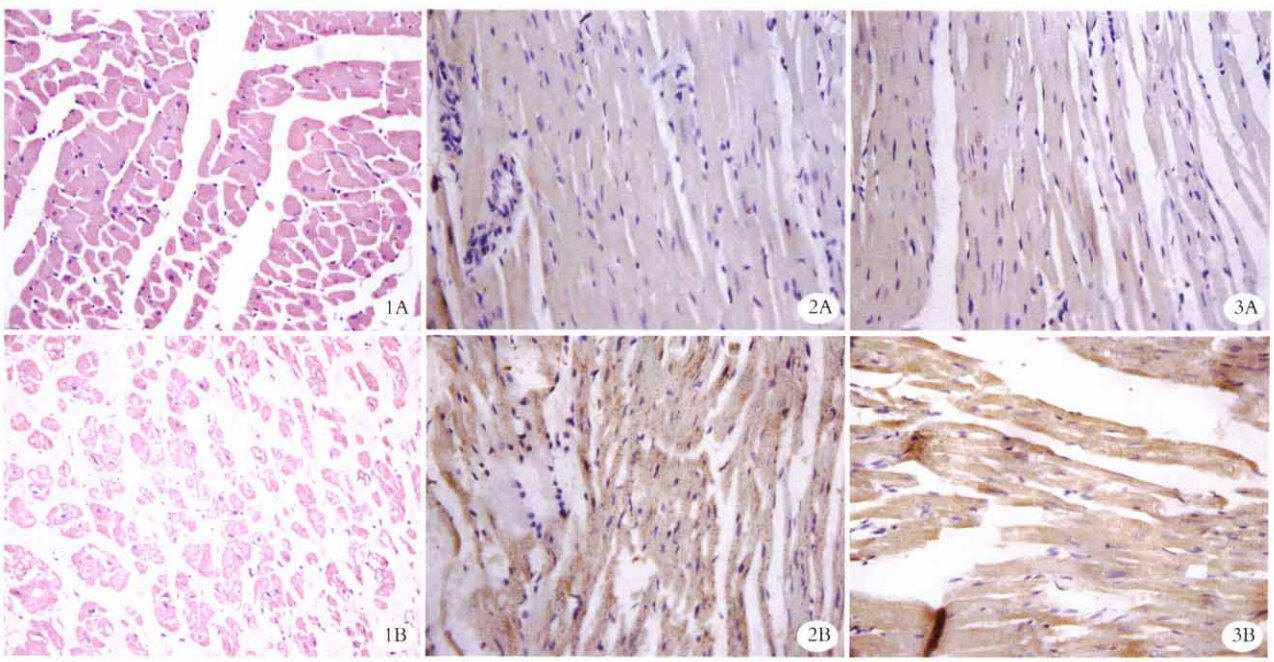
组别	例数	心胸比率	LVED(mm)	LVEF(%，$x\pm s$)	FS(%，$x\pm s$)
Ⅱ/NYHA	6	0.45±0.04	47.2±5.3	55.2±3.0	29.4±3.7
Ⅲ/NYHA	17	0.58±0.05	53.5±6.4	47.5±5.2	28.1±4.9
Ⅳ/NYHA	12	0.65±0.08	60.7±5.9	39.7±7.9	21.2±5.3

2.2 心肌组织病理改变

正常组心肌细胞排列整齐，连接紧密（图1A）。心衰患者随着心功能恶化，心肌细胞排列紊乱，早期心肌细胞代偿性肥大，晚期出现局灶性坏死，间质胶原结缔组织增生，纤维化，瘢痕形成（图1B）。

2.3 心肌组织免疫组织化学染色结果

免疫组化染色后，可见ACE和AngⅡ蛋白表达阳性呈棕黄色颗粒，ACE阳性表达主要存在于心肌细胞膜，AngⅡ阳性表达主要存在于心肌细胞细胞质。正常组心肌组织染色较浅，心力衰竭患者心肌组织染色偏深（图2、3）。



A：正常心肌；B：衰竭心肌

图1 心肌组织形态观察 （HE×400）

图2 心肌组织AngⅡ免疫组化染色 （SABC×400）

图3 心肌组织ACE免疫组化染色 （SABC×400）

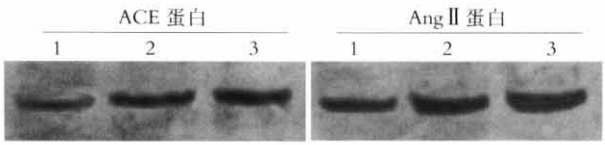
2.4 心肌组织Western blot结果

与正常组比较，心衰患者ACE和AngⅡ蛋白表达量明显升高（$P<0.01$），中重度心衰患者（NYHA Ⅲ-Ⅳ级）AngⅡ蛋白表达量升高更为显著（$P<0.01$），但ACE/AngⅡ值下降（表2，图4）。

表 2　各组患者心肌组织 ACE 和 Ang Ⅱ 蛋白表达

组别	例数	ACE(INT×mm²)	Ang Ⅱ(INT×mm²)	ACE/Ang Ⅱ
对照组	5	4.60±0.24	7.84±0.18	0.59
Ⅱ/NYHA	6	7.42±0.31[a]	10.91±0.21[a]	0.68
Ⅲ Ⅳ/NYHA	29	7.80±0.48[a]	14.51±0.36[ab]	0.53

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与Ⅱ/NYHA 组比较



1：正常组；2：轻度心衰组；3：中重度心衰组

图 4　Western blot 检测 ACE 蛋白和 Ang Ⅱ 蛋白的表达

3　讨论

Ang Ⅱ 对心脏和肾脏等靶器官发挥着多重效应，生理水平的 Ang Ⅱ 在调节血压和维持机体水电解质平衡等方面发挥着重要作用，但过量的 Ang Ⅱ 可导致心肌细胞肥大、坏死、凋亡、血管功能紊乱，诱发心肌重构，参与心衰的发生和发展[1]。

我们通过手术取材获得心衰患者的心肌组织标本，病理检查显示心肌重构证据。轻度心衰患者以心肌细胞肥大为主。中重度心衰患者心肌细胞排列紊乱，局灶性坏死，心肌间质增生、纤维化，残余部分心肌细胞肥大。超微结构发现细胞器破坏，心肌间质水肿，灶性肌原纤维断裂、溶解。

Ang Ⅱ 诱导心肌重构的机制很复杂，近年来研究主要涉及：①胶原合成增加是心肌重构的主要事件。Ang Ⅱ 刺激胶原合成，促使心肌纤维化，这一过程受到脂质代谢的调节。有研究报道高脂饮食大鼠皮下注射 Ang Ⅱ 后，左心室肥厚相关基因表达水平高于正常饮食组[2]。Chen 等[3]报道普伐他汀和匹格列酮（过氧化物酶增殖子-活化受体-γ 配体 PPAR-γ 配体）能降低 Ang Ⅱ 刺激引起的前胶原-1 表达，减轻心肌纤维化。Morikawa-Futamatsu 等[4]报道他汀类药物通过弱化 Rho 和细胞周期蛋白 D1 抑制 Ang Ⅱ 刺激引起的心肌重构。②Ang Ⅱ 刺激胶原合成与氧化应激反应有关。Lijnen 等[5]培养心脏成纤维细胞，Ang Ⅱ 刺激胶原合成增加，该效应可被 NADPH 氧化酶复合物抑制剂阻断，与 NADPH 氧化酶复合物抑制剂降低超氧负离子和活性氧簇水平有关。ACEI 能减轻心肌重构，研究表明 ACE Ⅰ 可降低左心室超氧负离子和氧化蛋白产物的过度表达，因此，ACE Ⅰ 的抗氧化作用是其发挥抗心肌重构的机制之一。③Ang Ⅱ 诱导心肌重构与炎症反应有关。研究表明 Ang Ⅱ 刺激后，大鼠血管间隙炎症反应调节因子被激活，同时 NADPH 氧化酶水平升高，而洛沙坦能抑制上述效应。

我们观察到心衰患者心肌组织 ACE 和 Ang Ⅱ 蛋白表达均增强，但 ACE/Ang Ⅱ 比值却下降，由此推测心肌组织合成 Ang Ⅱ 可能还依赖于除 ACE 之外的其他途径，抑制 ACE 活性并不能有效阻止心肌合成 Ang Ⅱ。研究表明心肌合成 Ang Ⅱ 的酶有 ACE 和糜蛋白酶两种，其中糜蛋白酶有可能发挥主要作用。Shimizu 等[6]报道叙利亚地鼠慢性压力超负荷时糜蛋白酶活性明显增强，而 ACE 活性却降低，提示心肌重构时 Ang Ⅱ 合成增加主要依赖于心脏糜蛋白酶活化。

Ang Ⅱ 的产生受到多种酶的调节，2000 年新发现一种 ACE 的同系物，命名为 ACE2，ACE2 的主要效应是水解 Ang Ⅱ，产生 Ang1-7。Ang1-7 是血管舒张因子，对衰竭心肌有保护作用。Crackower 等[7]首先建立 ACE2 基因敲除小鼠模型，发现左心室收缩功能减退。Yamamoto 等[8]发现 ACE2 基因敲除小鼠压力超负荷时，心肌加速出现肥厚和扩张，心肌局部 Ang Ⅱ 水平显著升高，而 ACE2 能抑制上述效应。随着对 ACE2 的研究进一步深入，针对 ACE2 的药物可能成为继 ACEI 和 AT1 受体拮抗剂之后新的 Ang Ⅱ 抑制剂。

参考文献：

[1] Gavras I, Gavras H. Angiotensin Ⅱ as a cardiovascular risk factor[J]. J Hum Hypertens, 2002, 16(Suppl 2): S2-S6.

[2] Foldes G, Vajda S, Lako-Futo Z, *et al*. Distinct modulation of angiotensin Ⅱ-induced early left ventricular hypertrophic gene programming by dietary fat type[J]. J Lipid Res, 2006, 47(6): 1219-1226.

[3] Chen J, Mehta J L. Angiotensin Ⅱ-mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts: blockade by pravastatin and pioglitazone[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(4): H1738-H1745.

[4] Morikawa-Futamatsu K, Adachi S, Maejima Y, *et al*. HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin prevents angiotensin Ⅱ-induced cardiac hypertrophy *via* Rho kinase and inhibition of cyclin D1[J]. Life Sci, 2006, 79(14): 1380-1390.

[5] Lijnen P, Papparella I, Petrov V, *et al*. Angiotensin Ⅱ-stimulated collagen production in cardiac fibroblasts is mediated by reactive oxygen species[J]. J Hypertens, 2006, 24(4): 757-766.

[6] Shimizu M, Tanaka R, Fukuyama T, *et al*. Cardiac remodeling and angiotensin Ⅱ-forming enzyme activity of the left ventricle in hamsters with chronic pressure overload induced by ascending aortic stenosis[J]. J Vet Med Sci, 2006, 68(3): 271-276.

[7] Crackower M A, Sarao R, Oudit G Y, *et al*. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function[J]. Nature, 2002, 417(6891): 822-828.

[8] Yamamoto K, Ohishi M, Katsuya T, *et al*. Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin Ⅱ[J]. Hypertension, 2006, 47(4): 718-726.

（编辑　王　红）