文章编号:1000-5404(2008)19-1779-04

论著

大鼠严重烧伤早期 RAS 的变化对心功能及心肌损害的影响

雷泽源,黄跃生,肖 蓉,张兵钱,张 琼 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究烧伤早期 RAS 对心功能及心肌损伤的影响。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠 42 只,随机数字法分为对照组(正常组,假伤组)和烧伤组,在大鼠 30% TBSA Ⅲ度烧伤后 1、3、6、12、24 h 检测血清 AngⅡ,ACE,cTn-I 和心肌组织 AngⅡ,ACE,ACE2 含量变化及血流动力和心肌力学指标(SBP, DBP, LVSP, LVEDP, $+LVdp/dt_{max}$, $-LVdp/dt_{max}$),Western blot 检测心肌组织中 ACE2 表达。**结果** 烧伤后 1 h 开始 LVSP, $+LVdp/dt_{max}$, $-LVdp/dt_{max}$ 较对照组均明显降低($P<0.01$),LVEDP 明显增高($P<0.01$),并于 6 h 达到高峰,血清中 cTn-I,AngⅡ,ACE 和心肌组织中的 AngⅡ,ACE,1 h 开始较对照组明显增高($P<0.01$),6 h 达峰值;而心肌组织中的 ACE2 在烧伤前后无明显变化。**结论** ACE-AngⅡ轴的变化趋势与血流动力、心肌力学指标及血清 cTn-I 变化相一致,提示 RAS 中重要效应轴 ACE-AngⅡ轴在烧伤早期心肌损害中起着重要作用。烧伤后 ACE2 无明显变化,可能是导致 ACE-AngⅡ轴过度激活的原因之一。

关键词: ACE;AngⅡ;ACE2;血流动力学;心肌力学;肌钙蛋白 I
中图法分类号: R322.11; R329.25; R644 **文献标识码**: A

Roles of renin-angiotension system in cardiac mechanics and myocardial damage at early stage following severe scald in rats

LEI Ze-yuan, HUANG Yue-sheng, XIAO Rong, ZHANG Bing-qian, ZHANG Qiong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of RAS and its effects to heart function and myocardial damage at early stage of rat scald. Methods The rats were grouped as control group (normal group and sham scald group, totally $n=12$) and scalded group ($n=30$). The rat model of 30% TBSA of full-thickness burns was made in 30 male Wistar rats. Hemodynamics and myocardiac mechanics index (SBP, DBP, LVSP, LVEDP, $+LVdp/dt_{max}$, $-LVdp/dt_{max}$), cTn-I, AngⅡ, ACE levels in serum, and AngⅡ, ACE, ACE2 in myocardium were determined 1, 3, 6, 12, 24 h after scald. Results Compared with control group, LVSP, $+LVdp/dt_{max}$, $-LVdp/dt_{max}$ were decreased obviously 1 h after scald ($P<0.01$), whereas LVEDP increased significantly 1 h after scald ($P<0.01$), and peaked 6 h after scald. The levels of cTn-I, AngⅡ, ACE in serum, and AngⅡ and ACE in myocardium were increased obviously 1 h after scald ($P<0.01$) compared with control group, and peaked 6 h after scald. No obvious changes of myocardiac ACE2 were detected before and after scald. Conclusion The changing tendency of ACE-AngⅡ axis similar to that of hemodynamic index and serum level of cTn-I indicted that ACE-AngⅡ axis of RAS plays an important role in myocardial damage at the early stage after scald. No obvious changes of ACE2 before and after scald may be one of the reasons to activate ACE-AngⅡ axis.

Key words: ACE; AngⅡ; ACE2; hemodynamics; myocardiac mechanics; cardiac troponin-I

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522601);国家自然科学基金重点项目(30430680);国家教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0712)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522601), the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30430680) and a Grant from Cheung Kong Scholars Programm and the Development of Creative Teams by Ministry of Education of China (IRT0712)

作者简介:雷泽源,男,贵州省都匀市人,博士研究生,主要从事烧伤后"休克心"方面的研究。电话:(023)68754173, E-mail : lzy0854@yahoo.com.cn
通信作者:黄跃生,电话:(023) 68754173,E-mail : yshuang@public.cta.cq.cn

收稿日期:2007-12-05;**修回日期**:2008-04-23

以往认为,烧伤早期由于保护性反应,使血流重分配,可保证心脏等重要器官血流供应,心脏一般不发生缺血缺氧损害。我们近年来的研究证明,烧伤后可迅速发生心肌缺血缺氧损害和功能减退,但原因不完全清楚[1]。心脏存在有独立的肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS),在调节心脏局部血流有着重要作用,此外在维持心脏功能,细胞增殖,炎症反应等方面存在多方面效应[2]。而2000年发现的血管紧张素转化酶(angiotensin-convertion enzyme, ACE)的同类物——血管紧张素转化酶2(angiotensin-convertion enzyme2, ACE2),能降解血管紧张素Ⅱ(angiotensin, AngⅡ)为有生物活性的肽血管紧张素(1-7)[angiotensin(1-7), Ang(1-7)],并拮抗AngⅡ的多种生物学效应,因此成为心血管内源性保护的研究热点[3]。本研究着重研究新的RAS在烧伤早期的变化及其对心功能及心肌损伤的影响,为揭示烧伤早期心脏损伤的机制和寻找内源性保护措施奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器

健康雄性Wistar大鼠42只,体质量200~250 g(第三军医大学实验动物中心提供);大鼠AngⅡ、ACE和心肌钙蛋白I(cardiac troponin-I, cTn-I)ELISA试剂盒(美国USCN LIFE);ACE2兔多克隆抗体IgG(santa cruz);HRP羊抗兔多克隆抗体(北京中杉金桥);RM6240B生理信号采集处理系统(成都仪器厂);BIO-RAD model550酶标仪(美国)。

1.2 实验分组及处理方法

42只大鼠随机数字法分为正常组(N组,6只),假伤组(S组,6只)和烧伤组(30只)。烧伤组大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,背部剃毛,浸于95℃水浴中18 s,造成30% TBSA Ⅲ度烧伤(切片证实),除正常组外,其余各组以Parkland公式[4 ml·kg^{-1}·(1% TBSA)$^{-1}$]腹腔注射乳酸林格氏液抗休克补液,于伤后即刻和伤后8 h各注入24 h总量的一半,烫伤后动物分笼饲养,自由进食、水,以确保液体抗休克的一致性。假伤组除浸于37℃水浴中18 s外,其余操作同烧伤组。

1.3 标本采集与处理

于正常组(N组),假伤组(S组)及伤后1、3、6、12、24 h(分别为B1、B3、B6、B12、B24组,每时相点6只大鼠)行颈动脉插管至左心,测定血流动力和心肌力学指标,然后由颈动脉插管取血4~5 ml,速开胸取心脏,置4℃冰盐水中洗去血液,去除大血管及心房组织,吸干,液氮中保存。分离出的血清于-20℃保存待测。

1.4 血流动力和心肌力学指标测定

正常组,假伤组及伤后1、3、6、12、24 h行颈动脉插管,烧伤各组于时相点前15~20 min进行颈动脉插管操作,完成后稳定5 min,将插管导管接入RM6240B生理信号采集处理系统压力换能器通道,开始记录动脉收缩压(SBP),动脉舒张压(DBP),而后缓慢将导管推入左心室,稳定5 min后记录左心室收缩压(LVSP),左心室终末舒张压(LVEDP),左室压最大上升速率(dp/dt_{max}),左室压最大下降速率($-dp/dt_{max}$)。

1.5 ELISA检测血清AngⅡ、ACE、cTn-I及心肌组织AngⅡ,ACE含量

取0.3 g心肌加入1 ml 0.1 mol/L PBS(pH值7.4),4℃中匀浆,4℃离心(3 000 r/min)10 min,然后收集上清液以10 000 r/min, 4℃离心15 min,取上清液和血清一并按ELISA试剂盒说明书操作。用酶标仪在450 nm波长依序检测各孔的光密度值[$D(450)$],根据标准曲线计算含量。

1.6 Western blot检测心肌组织ACE2表达量

1.6.1 总蛋白的提取 取大鼠左心室心肌组织0.200 0 g,减碎后放入匀浆器中,每管加入1 ml细胞裂解液(Tris-HCl 50 mmol/L pH 7.4, NaCl 150 mmoL/L,去氧胆酸钠0.25%, Triton-X-100 1%, EDTA 1 mmol/L, PMSF 1 mmol/L, Aprotinin 1 μg/ml, leupeptin 1 μg/ml, pepstain 1 μg/ml),冰浴中匀浆,之后静置30 min。4℃离心12 500 r/min,取上清,BCA法进行蛋白定量。

1.6.2 电泳 文献[7]报道大鼠ACE2的相对分子质量为90×10^3,故选择8%的分离胶和5%的积层胶进行电泳。凝胶制成后,取蛋白样品与等体积的2×蛋白上样缓冲液充分混匀,100℃水浴5 min使蛋白变性,每孔上样50 μg,积层胶电压60 V,分离胶80 V,约2.5 h。冰浴中,100 V湿转2 h至醋酸纤维膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h,加抗ACE2兔多克隆抗体IgG(santa cruz,1∶500稀释)湿盒中4℃过夜,1% TBST洗涤5次,每次15 min。加1∶5 000二抗(HRP羊抗兔抗体,购自北京中杉金桥生物技术公司)室温孵育1 h,1% TBST洗涤5次,每次15 min。DAB显色,膜扫描后经quantity one4.5软件分析图形密度(Mean Value INT),得到ACE2∶GAPDN光密度百分比。

1.7 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.5统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 血流动力和心肌力学变化

如表1所示,SBP于烫伤后6 h显著低于正常组及假伤组($P<0.01$),并于12 h达到最低值,24 h有所回升;DBP于伤后6 h显著下降($P<0.01$),并于12 h达最低值,24 h仍显著低于正常组及假伤组($P<0.01$);烫伤后1 h, $+dp/dt_{max}$和$-dp/dt_{max}$即显著下降($P<0.01$),并于6 h达最低值;LVSP于伤后6 h显著下降($P<0.01$),伤后12 h回升,至伤后24 h接近正常;LVEDP于伤后1 h开始升高($P<0.01$),6 h达峰值,24 h有所下降,但仍显著高于正常对照水平($P<0.01$)。

表 1　大鼠严重烫伤早期各时相点血流动力和心肌力学指标的变化情况（$n=6$, $\bar{x}\pm s$）

组别	SBP (kPa)	DBP (kPa)	LVSP (kPa)	LVEDP (kPa)	$+LVdp/dt_{max}$ (kPa·s^{-1})	$-LVdp/dt_{max}$ (kPa·s^{-1})
N	18.3±2.6	15.4±2.4	18.8±1.9	0.9±0.1	1.0±0.2	1.0±0.1
S	17.9±1.5	14.4±2.9	17.3±2.4	0.8±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1
B1	17.2±1.8	13.8±1.5	16.4±1.7^{a}	1.8±0.5^{ab}	0.8±0.2^{a}	0.5±0.1^{ab}
B3	16.9±1.9	11.9±1.2	15.2±1.2^{a}	2.3±0.6^{ab}	0.8±0.1	0.5±0.1^{ab}
B6	13.9±2.2^{ab}	8.3±1.0^{ab}	12.9±1.2^{ab}	3.4±0.7^{ab}	0.5±0.2^{ab}	0.4±0.2^{ab}
B12	11.6±2.0^{ab}	8.3±2.4^{ab}	14.4±2.6^{ab}	2.6±0.6^{ab}	0.8±0.2^{a}	0.4±0.1^{ab}
B24	14.8±2.1	10.1±1.8^{ab}	15.8±1.3^{a}	1.8±0.7^{ab}	0.8±0.3	0.6±0.2^{ab}

a:$P<0.01$, 与正常组(N 组)比较;b:$P<0.01$,与假伤组(S 组)比较

2.2　血清 cTn-I 含量变化

与正常组(1.43±0.12) ng/ml 和假伤组(1.44±0.11)ng/ml 相比,烧伤后 1 h(2.28±0.06)ng/ml,大鼠血清 cTn-I 含量即显著升高($P<0.01$),给药 3 h 后继续升高(2.86±0.22)ng/ml,于伤后 6 h 达高峰(5.45±0.42)ng/ml,12 h(4.47±0.31)ng/ml 至 24 h(2.25±0.22)ng/ml 逐渐下降。

2.3　血清和心肌 AngⅡ含量变化

烧伤后 1 h 开始,大鼠血清和心肌组织中 AngⅡ含量即显著高于正常组及假伤组($P<0.01$),于伤后 6h 达高峰,12 ~ 24 h逐渐回落(表 2)。

表 2　大鼠严重烫伤早期各时相点血清和心肌中 AngⅡ的含量变化（$n=6$, $\bar{x}\pm s$）

组别	血清(ng/ml)	心肌(ng/g)
N	126.77±9.17	17.78±2.41
S	134.81±5.87	18.65±4.16
B1	170.48±6.53^{ab}	25.82±3.90^{ab}
B3	231.33±12.50^{ab}	32.66±4.67^{ab}
B6	416.41±12.71^{ab}	57.57±5.26^{ab}
B12	348.01±12.65^{ab}	44.68±5.71^{ab}
B24	303.09±10.80^{ab}	31.93±4.31^{ab}

a:$P<0.01$, 与正常组(N 组)比较;b:$P<0.01$,与假伤组(S 组)比较

2.4　血清和组织中 ACE 的含量变化

烧伤后 1 h,大鼠血清和心肌组织 ACE 含量即显著升高($P<0.01$),于伤后 6h 达高峰,12 ~24 h 逐渐回落,但仍显著高于正常组和假伤组(表 3)。

表 3　大鼠严重烫伤早期各时相点 ACE 的含量变化

组别	血清(ng/ml)	心肌(ng/g)
N	123.74±13.91	22.85±3.31
S	127.58±16.21	22.55±3.15
B1	185.61±16.25^{ab}	39.26±4.06^{ab}
B3	244.75±15.53^{ab}	52.76±3.41^{ab}
B6	456.59±37.24^{ab}	100.11±5.17^{ab}
B12	398.38±15.88^{ab}	80.16±3.94^{ab}
B24	315.82±17.28^{ab}	68.64±4.17^{ab}

a:$P<0.01$, 与正常组(N 组)比较;b:$P<0.01$,与假伤组(S 组)比较

2.5　心肌组织 ACE2 表达含量变化

Western blot 检测结果显示,烧伤早期心肌组织 ACE2 表达量无明显变化(图 1)。图形密度(Mean Value INT)ACE2:GAPDH(% of contral)处理结果:各组间无统计学差异。

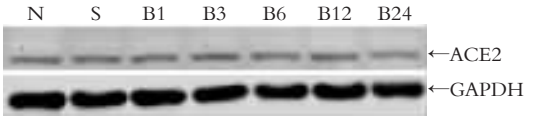


图 1　烧伤早期心肌组织 ACE2 蛋白表达 Western blot 检测结果

3　讨论

我们以往的研究证明[4]:在毛细血管通透性增加导致血容量显著下降之前,心肌即发生了缺血缺氧损害和心功能减退。这种即早出现的心肌损害及心脏泵血功能减弱,不仅引起心功能不全,还可诱发或加重休克,成为严重烧伤休克和缺血缺氧的重要启动因素之一。稍后,血容量的减少又可进一步加重心肌的缺血缺氧。根据上述认识,提出了烧伤早期缺血缺氧损害的“休克心”假说。但烧伤后迅速发生心肌缺血缺氧损害的原因还不完全清楚。

心脏存在有独立的 RAS,心脏可自身合成、释放肾素、血管紧张素,与循环 RAS 不同, 心脏局部 RAS 采用自分泌,旁分泌等方式只作用于心脏局部, 主要参与心肌局部血流量和血管紧张性的调节, 也参与心肌收缩力的调节[5],并增加交感神经末梢释放儿茶酚胺, 促进血管内皮释放内皮素[6]。RAS 的主要生物活性物质 AngⅡ对心脏的生理及病理过程具有重要的调节作用。2000 年,ACE 的同类物 ACE2 被发现, ACE2 主要产物的 Ang(1 -7)由 AngⅡ(8 肽)降解后产生与之拮抗的作用,主要表现在舒张血管、调节血压、抗细胞增殖等效应[7]。其特异的功能及作用底物特点显示 ACE2 -Ang(1 -7)轴对 ACE-AngⅡ轴起负调控作用。了解新 RAS 系统在烧伤早期的变化情况对烧伤早期心脏损害的防治有积极意义[8]。

实验结果显示:烧伤后 1 h RAS 中 ACE-AngⅡ轴就被迅速激活,血清和心肌组织中 AngⅡ,ACE 含量明显整加,并与血流动力和心肌力学指标 SBP, DBP, LVSP, LVEDP, $+LVdp/dt_{max}$, $-LVdp/dt_{max}$ 和心肌损伤血清指标 cTn-I 变化趋势相一致,心肌损伤和心功能降低于烧伤后 6 h 最为严重,而 ACE-AngⅡ轴的变化情况也于伤后 6 h 达到峰值。ACE 主要分布在内皮组织,ACE 的激活直接导致了血液中 AngⅡ的迅速增加,大量增加的 AngⅡ打破了收缩和舒张血管的平衡,除了直接调节血管血流量以外,AngⅡ还可以通过其

受体 ATR,增多氧化自由基,促进黏附分子的表达,诱发炎症过程,引起内皮功能异常,加重心肌损害。可见 RAS 中重要效应轴 ACE-AngⅡ轴在烧伤早期心肌损害中起着重要作用。

研究表明 RAS 中 ACE2-Ang (1－7)轴中 ACE2 在烧伤早期并没有被激活。ACE2 是第一个被认识的 ACE 同源物,与 ACE 相比,ACE2 的分布较局限。ACE2 主要分布于心脏、肾脏的内皮细胞,血管平滑肌细胞仅有少量表达[9]。ACE2 只有一个活性酶位点,属一种羧肽酶类,能降解 10 肽的 AngⅠ的 C 末端胱氨酸残基,形成 Ang1－9, Ang1－9 也可以在 ACE 的作用下生成为 Ang1－7。Ang1－9 的功能目前还不是很清楚。ACE2 也能降解 AngⅡ为有生物活性的肽 Ang(1－7)。在体外研究结果显示,ACE2 催化 AngⅡ的效率是催化 AngⅠ的 400 倍[10],表明 ACE2 的主要作用是使 AngⅡ转化为 Ang(1－7)[11]。对 ACE2 基因敲除小鼠的研究发现,这种小鼠出现异常的心脏功能,心肌收缩功能严重受损,且血浆、心脏、肾脏 AngⅡ水平明显增高,说明 ACE2 在对 AngⅡ的清除和失活中起重要作用,引人注意的是,这种功能的改变没有心肌纤维化、心肌肥厚的增加及胚胎基因型等表现,而是类似于心肌冬眠/顿抑,同时发现的缺氧基因 BNIP-3 和 PAI-1 的上调提示 ACE2 缺失可能介导心肌缺血。推断 ACE2 缺失可能经由冠脉收缩、微循环功能紊乱、冠脉血液的分流而引起心肌营养血供的减少,继而使心肌出现类似于冬眠/顿抑的收缩功能的下降[12]。ACE2 基因敲除小鼠的心脏功能异常可以在同时敲除 ACE 基因的情况下完全逆转[13],可见 RAS 中 ACE2 -Ang(1－7)轴和 ACE-AngⅡ轴存在的平衡状态对维持心脏正常功能有重要意义,ACE2 的主要作用底物是 AngⅡ,并产生与 AngⅡ有拮抗作用的 Ang (1－7),烧伤早期 ACE 的迅速激活导致 AngⅡ的大量产生,而 ACE2 在烧伤早期无明显变化,也是导致 AngⅡ降解减少,累积增加的重要原因。

Burrell 等[14]观察了大鼠 MI 后心肌 ACE2 的 mRNA表达水平影响,发现在 MI 后 3 天时梗死区和梗死/存活边界区心肌 ACE2 的 mRNA 表达较存活区心肌高,MI 后 28 天时存活心肌 ACE2 的 mRNA 较正常对照组也明显升高。提示 ACE2 在急性损伤过程中的反应可能存在一个滞后的过程,其调节机制少见报道,与 ACE 可能存在不同的。ACE2 在烧伤早期无明显变化的原因亦有待研究。

综上可见:在烧伤早期 ACE-AngⅡ轴迅速激活,而 ACE2 无明显变化,使得 RAS 系统中的正负调节平衡被打破,影响了心脏的正常生理功能,可能是造成烧伤早期心脏损害的重要因素之一。如果在烧伤早期主动调节 ACE2 -Ang(1－7)轴和 ACE-AngⅡ轴是否可以减轻心脏的损害,则有待进一步研究。

参考文献:

[1] 黄跃生. 烧伤后"休克心"与早期损害[J]. 中国医师杂志,2002, 4(2): 120－121.

[2] Lindpaintner K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence[J]. Circ Res, 1991, 68(4): 905－921.

[3] Tipnis S R, Hooper N M, Hyde R, *et al*. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase[J]. J Biol Chem, 2000, 275(43): 33238－33243.

[4] 黄跃生. 严重烧伤后早期心肌损害的细胞分子机制与防治策略研究进展[J]. 中华烧伤杂志,2006,22(3):161－163.

[5] Lindpaintner K, Niedermaier H, Drexler H, *et al*. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: does the cardiac renin-angiotensin system play a role? [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 20(Suppl 1): 341－S47.

[6] Varagic J, Frohlich E D. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(11): 1435－1442.

[7] Keidar S, Kaplan M, Gamliel-Lazarovich A. ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1－7) [J]. Cardiovasc Res, 2007, 73(3): 463－469.

[8] 张西联,黄跃生,党永明,等.生脉注射液对大鼠烧伤后心肌细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 94－96.

[9] Turner A J, Hooper N M. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology[J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(4): 177－183.

[10] Vickers C, Hales P, Kaushik V, *et al*. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase[J]. J Biol Chem, 2002, 277(17): 14838－14843.

[11] Zisman L S, Meixell G E, Bristow M R, *et al*. Angiotensin-(1－7) formation in the intact human heart: in vivo dependence on angiotensin II as substrate[J]. Circulation, 2003, 108(14): 1679－1681.

[12] Bernstein K E. Two ACEs and a heart[J]. Nature, 2002, 417(6891): 799－802.

[13] 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.

[14] Burrell L M, Risvanis J, Kubota E, *et al*. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans[J]. Eur Heart J, 2005, 26(4):369－375.

(编辑 邓强庭)