论著

文章编号:1000-5404(2008)19-1810-04

心衰大鼠ACE/ACE2表达变化及血管紧张素转换酶抑制剂的干预作用

王 江,宋 熔,田 颖,聂 凌,李 楠,谭红梅,祝善俊 (第三军医大学新桥医院全军心血管病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌组织ACE/ACE2表达变化及苯钠普利的干预作用。**方法** 结扎大鼠左冠状动脉前降支复制心肌梗死后心衰模型,分为心衰对照组、苯钠普利组、假手术组。喂养2个月后检测血流动力学指标,计算体重与左心室重量指数,RT-PCR方法检测心肌组织ACE和ACE2 mRNA表达,免疫组化检测ACE和ACE2蛋白表达。**结果** 心衰对照组大鼠心肌组织ACE和ACE2的mRNA和蛋白表达均增强($P<0.01$),ACE/ACE2比值升高。苯钠普利组大鼠血流动力学指标改善($P<0.01$),心肌组织ACE mRNA和蛋白表达下降($P<0.01$),ACE2 mRNA和蛋白表达显著增强($P<0.01$),ACE/ACE2比值降低。**结论** 心衰大鼠心肌组织ACE和ACE2表达上调,ACE上调更显著,ACE/ACE2比值升高;苯钠普利抑制ACE表达,刺激ACE2表达增强,ACE/ACE2比值下降,这是对该药物作用机制的新解释。

关键词: 慢性心力衰竭;苯钠普利;血管紧张素转换酶;血管紧张素转换酶2
中图法分类号: R329.25; R541.6; R972.1 **文献标识码:** A

ACE and ACE2 alterations in congestive heart failure rats and intervention effect of benazepril

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

Abstract: Objective To explore the expressions of ACE/ACE2 in congestive heart failure (CHF) rats after myocardial infarction and the treatment effect of benazepril, an angiotensin converting enzyme inhibitor. **Methods** The rat heart failure model was induced by acute myocardial infarction (AMI) through ligating the left anterior descending coronary artery. One month after operation, rats were randomized to CHF placebo group and benazepril group. Sham-operated rats were used as the control group. Then 8 weeks later the rats were evaluated for hemodynamic parameters, body mass and left ventricular mass index, ACE and ACE2 mRNA expressions by RT-PCR and their protein expressions by immunohistochemical methods. **Results** The mRNA and protein expressions of ACE and ACE2 were increased in CHF placebo group than sham-operation group ($P<0.01$), and the ratio of ACE/ACE2 was elevated. The hemodynamic parameters of benazepril group improved significantly than CHF placebo group ($P<0.01$). Furthermore, the levels of ACE mRNA and protein of benazepril group decreased significantly ($P<0.01$), whereas the level of ACE2 mRNA and protein were increased ($P<0.01$), therefore, the ratio of ACE/ACE2 decreased. **Conclusion** The mRNA and protein expressions of ACE and ACE2 were upregulated in CHF rats, and the ratio of ACE/ACE2 was elevated. Administer of benazepril can downregulate ACE expression and upregulate ACE2 expression, so the ratio of ACE/ACE2 decreases, which might be the another intervention mechanism of the drug.

Key words: congestive heart failure; benazepril; angiotensin converting enzyme; angiotensin converting enzyme2

慢性心力衰竭(congestive heart failure,CHF)的发病机制很复杂,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)过度激活是其重要的发病机制之一。血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme,ACE)是RAS的核心酶,其酶解产物血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,AngⅡ)是RAS最重要的效应因子,因

基金项目:重庆市自然科学基金(2007BB5020)
Supported by the Project Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2007BB5020)
作者简介:王 江,女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事心力衰竭防治方面的研究。电话:(023)68774601,E-mail:a65223875@cta.cq.cn
通信作者:祝善俊,电话:(023)68755701
收稿日期:2007-12-13;修回日期:2008-06-03

而成为 CHF 的主要药物治疗靶点。血管紧张素转换酶 2(angiotensin converting enzyme 2,ACE2)是 2000 年才发现的 ACE 的同系物,主要生物学效应是降解 Ang Ⅱ生成 Ang1-7。由此我们设想,ACE/ACE2 的表达变化参与了 CHF 的发生、发展过程;血管紧张素转换酶抑制剂的作用机制除了抑制 ACE 之外,是否影响 ACE2 的表达? 改变 ACE/ACE2 的表达? 本研究观察心肌梗死后 CHF 大鼠 ACE/ACE2 表达变化,以及苯钠普利的治疗效果,试图对血管紧张素转换酶抑制剂的作用机制进行新的探讨。

1　材料与方法

1.1　复制大鼠心肌梗死模型

乙醚吸入麻醉大鼠,在胸骨左缘第 4、5 肋间隙撑开胸腔,轻轻挤压两侧胸腔,心脏即迅速弹出胸腔,用 0/6 无创缝合针结扎左冠状动脉前降支,迅速将心脏复位,人工胸外按压使心肺复苏。术前与术后记录心电图,术后 24 h 抽血查心肌酶谱,出现 ST 段弓背向上抬高和心肌酶谱显著升高者作为冠脉结扎成功标志归入 CHF 对照组或苯钠普利组。假手术组缝线仅穿过冠状动脉而不结扎,余步骤均相同。室内饲养,规律照明、自由进食及饮水,饲养 4 周。

1.2　实验设计与分组

模型成功 1 个月后,将大鼠分为 3 组。假手术组:等量饮用水灌胃,每天 1 次,共 2 个月。CHF 对照组:等量饮用水灌胃,每天 1 次,共 2 个月。苯钠普利组:将苯钠普利片(洛丁新片,10 mg/片,购自诺华医药公司)研磨成粉状,溶入饮用水中,按 10 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 的量灌胃,每天 1 次,共 2 个月。

1.3　血流动力学测定

大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉后,暴露颈动脉,插入自制直径约 0.5 mm 的硬塑管至左心室,硬塑管另一端接 8 导电生理记录仪观察记录心率、左心室压力曲线,包括左心室舒张末压(LVEDP)和收缩末压(LVSP),计算左心室压力最大上升速率($+dp/dt_{max}$)和左心室压力最大下降速率($-dp/dt_{min}$)。

1.4　体质量与左心室质量指数(LVMI)测定

大鼠麻醉后称量,取心脏,仔细分离左房、右房和右室,留取左心室和室间隔组织,滤纸吸干水分,称量,计算左心室(含室间隔)/体量比值,以 mg/g 表示。

1.5　心肌组织 ACE 和 ACE2 mRNA 表达(RT-PCR)

反转录 PCR 检测心肌组织 ACE 和 ACE2 mRNA 表达。ACE 引物(赛百盛合成):上游 5′- TTGACGTGAGCAACTTCCAG -3′,下游 5′- GGCTGCAGCTCCTGGTATAG -3′,扩增片段为 421 bp。ACE2 引物(赛百盛合成):上游 5′- GTGCACAAAGGT-CACAATGG -3′,下游 5′- TGTTTCATCATGAGGCAGAGG -3′,扩增片段为 409 bp。GAPDH 引物(赛百盛合成):上游 5′- GT-GCTGAGTATGTCGTGGAGT -3′,下游 5′- CAGTCTTCTGAGTG-GCAGTGAT -3′,扩增片段为 291 bp。按下列条件进行扩增:94℃预变性 2 min,98℃变性 10 s→53℃退火 30 s→68℃延伸 1 min,循环 35 次,4 ℃保存。即可进行琼脂糖凝胶电泳,重复 6 次,凝胶成像系统分析光密度值,并与内参照 GAPDH 的比值作为半定量指标。

1.6　心肌组织 ACE 和 ACE2 免疫组化

切取室间隔心肌组织,石蜡包埋切片。切片脱蜡至水;微波修复抗原;滴加 H_2O_2,37℃孵育 10 min;滴加正常羊血清封闭液,37 ℃孵育 20 min;滴加山羊 ACE 或 ACE2 一抗(1∶500 稀释,均购自 Santa Cruz 美国)4 ℃过夜;滴加生物素化抗山羊 IgG(免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物公司),37 ℃孵育 20 min;滴加辣根过氧化物酶标记的 C 液, 37 ℃孵育 20 min;DAB 显色;苏木精复染;盐酸酒精分化;中性树胶封片。显微镜下观察、照相。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,采用 SPSS 13.0 软件包进行分析。

2　结果

2.1　动物死亡率及血流动力学结果

喂养过程中假手术组大鼠无死亡;CHF 对照组大鼠死亡 4 只,死亡率为 22%;苯钠普利组大鼠死亡 3 只,死亡率为 17%。

CHF 对照组和苯钠普利组大鼠血流动力学状况较假手术组明显下降,$+dp/dt_{max}$ 和 $-dp/dt_{min}$ 绝对值、LVSP 均低于假手术组($P<0.01$),而 LVEDP 则高于假手术组($P<0.01$)。苯钠普利组的血流动力学参数较 CHF 对照组有所改善,$+dp/dt_{max}$ 和 $-dp/dt_{min}$ 绝对值、LVSP 均高于 CHF 对照组($P<0.01$),而 LVEDP 则低于 CHF 对照组($P<0.01$)(表 1)。

表 1　各组大鼠血流动力学参数($n=14$, $\bar{x} \pm s$)

组别	LVEDP (mmHg)	LVSP (mmHg)	$+dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	$-dp/dt_{min}$ (mmHg/s)
假手术组	2.60 ± 0.61	145 ± 3.65	5 640 ± 308	4 879 ± 315
CHF 对照组	6.73 ± 1.03[a]	118 ± 5.09[a]	4 247 ± 432[a]	3 609 ± 461[a]
苯钠普利组	5.13 ± 0.41[ab]	130 ± 4.69[ab]	4 800 ± 352[ab]	4 118 ± 374[ab]

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与 CHF 对照组比较

2.2　体质量及左心室质量指数(LVMI)结果

CHF 对照组和苯钠普利组大鼠体质量较假手术组降低($P<0.05$,$P<0.01$);苯钠普利组大鼠体质量较 CHF 对照组有升高趋势,但没有统计学意义($P>0.05$)。

CHF 对照组和苯钠普利组大鼠 LVMI 较假手术组显著升高($P<0.01$);苯钠普利组 LVMI 较 CHF 对照组明显降低($P<0.01$)(表 2)。

表 2　各组大鼠体质量与左心室质量指数(LVMI)变化($n=14$, $\bar{x} \pm s$)

组别	体质量(g)	LVMI(mg/g)
假手术组	371 ± 23	2.10 ± 0.08
CHF 对照组	314 ± 37[a]	2.46 ± 0.12[a]
苯钠普利组	326 ± 41[b]	2.31 ± 0.07[ab]

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与假手术组比较;c:$P<0.01$,与 CHF 对照组比较

2.3　心肌组织 ACE 和 ACE2 mRNA 结果

2.3.1　ACE mRNA 结果　　CHF 对照组和苯钠普利组大鼠心

肌组织 ACE mRNA 表达显著高于假手术组($P<0.01$),苯钠普利组 ACE mRNA 表达较 CHF 对照组降低($P<0.01$)。

2.3.2　ACE2 mRNA 结果　　CHF 对照组和苯钠普利组 ACE2 mRNA 表达高于假手术组($P<0.01$),苯钠普利组升高最为显著($P<0.01$)(表3,图1、2)。CHF 对照组 ACE/ACE2 比值较假手术组升高,苯钠普利组 ACE/ACE2 比值较假手术组降低(表3,图1、2)。

表3　各组大鼠心肌组织 ACE 和 ACE2 mRNA 表达($n=14$, $\bar{x}\pm s$)

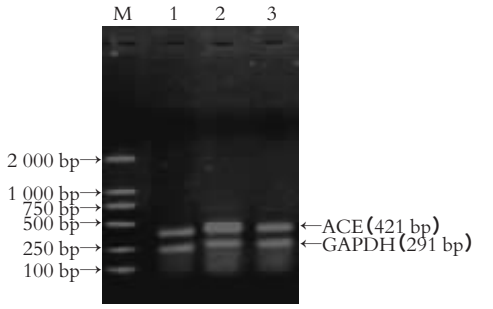
组别	ACE/GAPDH	ACE2/GAPDH	ACE/ACE2
假手术组	1.01±0.08	0.81±0.06	1.23
CHF 对照组	1.82±0.09[a]	1.09±0.07[a]	1.67
苯钠普利组	1.45±0.10[ab]	1.42±0.10[ab]	1.02

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与 CHF 对照组比较

2.4　心肌组织 ACE 和 ACE2 免疫组化结果

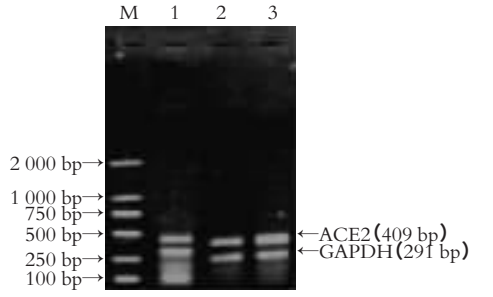
2.4.1　ACE 免疫组化结果　　ACE 蛋白阳性呈棕黄色颗粒,位于细胞膜。假手术组心肌 ACE 阳性染色较少,CHF 对照组阳性染色明显增多,苯那普利组阳性染色较 CHF 对照组减少(图3)。

2.4.2　ACE2 免疫组化结果　　ACE2 蛋白阳性呈棕黄色颗粒,位于细胞膜。假手术组心肌 ACE2 阳性染色很少,CHF 对照组和苯那普利组阳性染色明显增多(图4)。



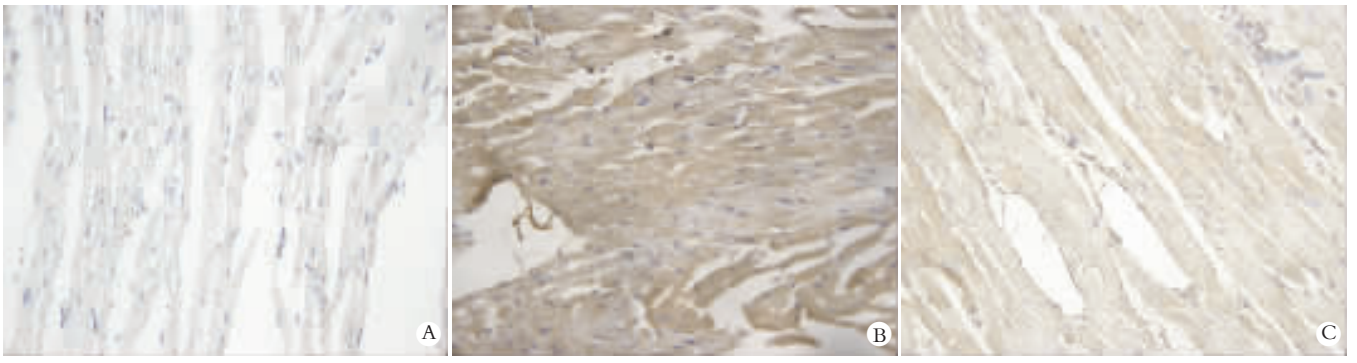
M:Marker 1:假手术组 2:CHF 对照组 3:苯钠普利组

图1　各组大鼠心肌组织 ACE mRNA 与 GAPDH 比值



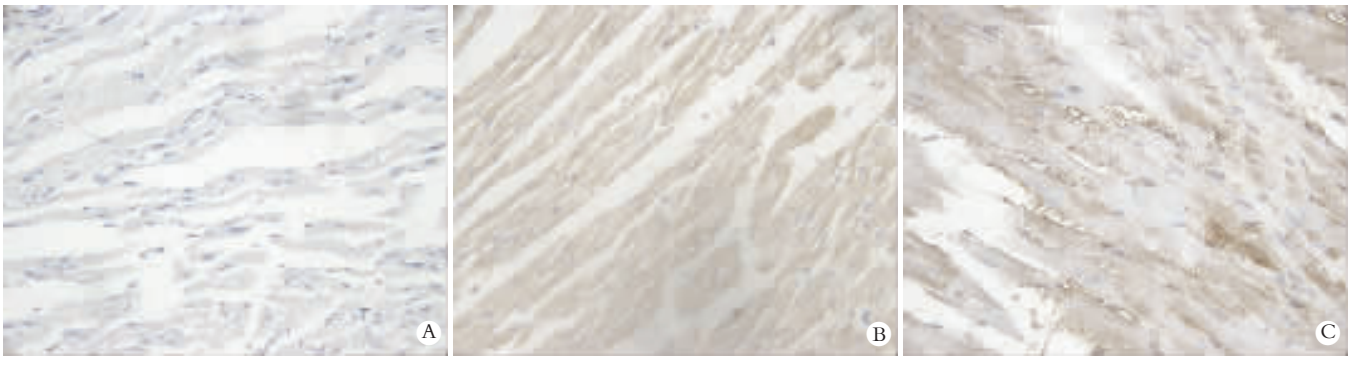
M:Marker 1:假手术组 2:CHF 对照组 3:苯钠普利组

图2　各组大鼠心肌组织 ACE2 mRNA 与 GAPDH 比值



A:假手术组　心肌 ACE 阳性染色很少;B:CHF 对照组　心肌 ACE 阳性染色明显增多;C:苯钠普利组　心肌 ACE 阳性染色较 CHF 对照组弱

图3　各组大鼠心肌 ACE 免疫组化染色结果　(S-P×400)



A:假手术组　心肌 ACE2 阳性染色很少;B、C:分别为 CHF 对照组和苯钠普利组　心肌 ACE2 阳性染色明显增强

图4　各组大鼠心肌 ACE2 免疫组化染色结果　(S-P×400)

3　讨论

CHF 是大多数心血管疾病的最终归宿,其发病率高,预后差,5 年生存率与恶性肿瘤相仿。对 CHF 的发病机制的研究一直是心血管领域的重点和难点,目前公认 RAS 的过度激活是 CHF 的始动和促发因素[1]。ACE 是 RAS 的核心酶,其酶解产物 AngⅡ是 RAS 最重要的效应因子。研究表明 AngⅡ可直接引起心肌细胞肥大、坏死、凋亡、血管功能紊乱,因而成为 CHF 的主要药物治疗靶点[2,3]。2000 年, Donoghue 等[4]首先报道了 ACE 的同源物,命名为 ACE2,其主要的生物学效应是降解 Ang Ⅱ产生 Ang1 -7[5]。Ang1 -7 具有舒张血管、拮抗细胞增殖及抗炎症的作用,对衰竭心脏具有保护作用[6,7]。越来越多的证据显示, ACE2 在调节心脏和血管生理功能方面发挥着重要作用,其表达异常可导致心血管系统的病理改变。Yamamoto 等[8]报道,ACE2 基因敲除小鼠在压力超负荷的情况下,更容易出现严重的心腔扩大和心功能障碍,同时心肌中 AngⅡ的水平明显升高。Diez-Freire 等[9]通过转基因技术使自发性高血压大鼠的心肌组织中高表达 ACE2,发现 ACE2 可减轻心肌重构,改善心功能。

我们设想 ACE 和 ACE2 是一对功能效应相反的酶,依据为:①二者酶底物不同(ACE 的酶底物是 AngI, ACE2 的酶底物是 AngⅡ,ACE2 的酶底物是 ACE 的酶解产物);②二者酶解产物不同(ACE 的产物是 AngⅡ, ACE2 的产物是 Ang1 -7);③二者酶解产物的生物学效应不同(AngⅡ与 Ang1 -7 的生物学效应相反)。

本研究复制心肌梗死后 CHF 大鼠模型,血流动力学指标显示 + dp/dt_{max} 和 - dp/dt_{min} 绝对值、LVSP 显著下降,而 LVEDP 升高,表明 CHF 模型复制成功。CHF 对照组大鼠 LVMI 高于假手术组,表明衰竭心肌存在心肌重构。CHF 对照组大鼠心肌组织 ACE mRNA 表达升高,免疫组化显示 ACE 蛋白阳性染色明显增强,这符合 CHF 时心肌组织局部 RAS 激活的观点。同时 CHF 对照组 ACE2 mRNA 表达亦升高,ACE2 蛋白免疫组化染色增强,我们分析这是机体的代偿反应,通过增强 ACE2 的表达加速 AngⅡ的降解。虽然 CHF 时 ACE 和 ACE2 的 mRNA 水平都上调,但 ACE/ACE2 比值升高,表明 CHF 时心肌局部 ACE 的激活程度强于 ACE2,以 ACE 的酶活性占主导,结果 AngⅡ大量产生,加速 CHF 进展恶化。

血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor,ACEI)能降低 CHF 患者死亡率和住院率,是治疗 CHF 最成功的药物。本研究选取 ACEI 的代表药物——苯钠普利作为治疗药物,研究表明苯钠普利能改善 CHF 大鼠血流动力学紊乱,增强心脏泵血功能,表现为 + dp/dt_{max} 和 - dp/dt_{min} 绝对值和 LVSP 升高,LVEDP 降低。本研究还证实苯钠普利降低 LVMI,逆转心肌重构,降低 CHF 大鼠死亡率。

ACEI 治疗 CHF 的主要机制是抑制 ACE,减少 AngⅡ产生和缓激肽的降解,增加缓激肽的活性及其介导的前列腺素的生成。本研究显示,苯钠普利治疗 2 个月后,心肌组织 ACE mRNA 表达减弱,表明苯钠普利对 ACE 基因表达有直接抑制作用。本研究结果显示,苯钠普利明显升高心肌 ACE2 mRNA 水平,这与苯那普利降低 ACE mRNA 表达,减少 AngⅡ产生有关,Gallagher 等[10]报道 AngⅡ直接抑制脑星形胶质细胞 ACE2 mRNA 表达。总之,苯那普利通过抑制 ACE,刺激 ACE2 表达增强,降低 ACE/ACE2 比值,使 ACE2 的效应占主导地位,加速 AngⅡ降解为 Ang1 -7,减轻 AngⅡ对心肌的毒性作用[11],增强 Ang1 -7 对心肌的保护作用,这样从正反两方面共同作用,保护残存的心功能。

参考文献:

[1] 王　江, 田　颖, 宋　熔, 等. 心力衰竭患者心肌组织 ACE2 和 ACE 基因表达[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 945 -947.

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

[3] 王　江,田　颖,聂　凌, 等. 不同严重程度心力衰竭患者心肌组织 ACE 和 AngⅡ蛋白的表达[J]. 第三军医大学学报,2007,29(5):445 -447.

[4] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, *et al*. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9[J]. Circ Res, 2000, 87(5): E1 -E9.

[5] Trask A J, Averill D B, Ganten D, *et al*. Primary role of angiotensin-converting enzyme-2 in cardiac production of angiotensin-(1-7) in transgenic Ren-2 hypertensive rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(6):H3019 -H3024.

[6] Santos R A, Castro C H, Gava E, *et al*. Impairment of *in vitro* and *in vivo* heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice [J]. Hypertension, 2006, 47(5): 996 -1002.

[7] Simoes-e-Silva A C, Pinheiro S V, Pereira R M, *et al*. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator[J]. Mini Rev Med Chem, 2006, 6(5): 603 -609.

[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.

[9] Diez-Freire C, Vazquez J, Correa-de-Adjounian M F, *et al*. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR[J]. Physiol Genomics, 2006, 27(1):12 -19.

[10] Gallagher P E, Chappell M C, Bernish W B, *et al*. ACE2 expression in brain: angiotensin Ⅱ downregulates ACE2 in astrocytes[J]. Hypertension, 2003, 42: 389.

[11] Danilczyk U, Penninger J M. Angiotensin-converting enzyme Ⅱ in the heart and the kidney[J]. Circ Res, 2006, 98(4):463 -471.

(编辑　王　红)