论著

文章编号:1000-5404(2008)13-1272-03

大鼠右心室血管紧张素转换酶 2 在高原低氧适应过程中表达的变化

王宇亮,高文祥,高钰琪,刘福玉 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 研究低氧(2% O_2)对成年雄性 SD 大鼠心脏右心室血管紧张素转换酶 2(angiotensin conversion enzyme 2,ACE2)mRNA、蛋白水平表达的影响。方法 在常氧与低氧环境(模拟海拔 5 000 m 高原、23 h/d)下饲养 SD 大鼠,并随机分为缺氧 1、3、30 d 组和常氧对照组,每组 10 只,分别在模拟海拔 5 000 m 高原低压舱内(缺氧各组)和舱外(常氧对照组)测定肺动脉压、右心室功能、左右心室质量指数,采用 RT-PCR、Western blot 检测各组大鼠心脏右心室心肌 ACE2 mRNA、蛋白水平的表达变化。结果 缺氧组大鼠肺动脉压、右心室收缩压显著高于对照组($P<0.01$),缺氧 30 d 组右心室明显肥大伴右心功能显著上调,同时右心室 ACE2 mRNA、蛋白合成均有明显增加($P<0.01$)。结论 慢性低压低氧环境下 SD 大鼠心脏右心室心肌组织 ACE2 mRNA 表达、蛋白水平显著上调。

关键词:低氧;血管紧张素转换酶 2;心室肥大
中图法分类号:R322.11;R339.54;R345.5 文献标识码:A

Changes of angiotensin conversion enzyme 2 expression in right ventricular of adult rat in adapting to hypoxia

WANG Yu-liang, GAO Wen-xiang, GAO Yu-qi, LIU Fu-yu (Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of hypoxia on the angiotensin conversion enzyme 2 (ACE2) mRNA and protein expressions in rat right ventricle. Methods Forty male adult Sprague Dawley (SD) rats, raised both under normoxia and hypoxia environment (simulating the altitude 5000 meters, 23 h per day) were divided randomly into 4 groups: the control group, the 1-day hypoxia group, the 3-day hypoxia group and the 30-day hypoxia group. Pulmonary arterial pressure (PAP), right ventricular function, ventricular weight index were detected in all rats. ACE2 mRNA and protein of right ventricle were measured by RT-PCR and Western blot. Results PAP, RVSP were increased significantly in hypoxia groups compared with those in the control group. Right ventricular hypertrophy and right ventricular function, ACE2 mRNA and ACE2 protein synthesis in right ventricle were increased accordingly after 30-day exposure to hypoxia ($P<0.01$). Conclusion ACE2 mRNA of the right ventricule and ACE2 protein synthesis were increased under hypoxia environment, suggesting that ACE2 may play a role in hypoxic adaptation of the heart.

Key words: hypoxia; angiotensin converting enzyme 2; ventricular hypertrophy

心脏肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin angiotensin system, RAS)在缺氧环境下对心脏结构重塑和功能改变起重要的作用[1,2]。既往认为,血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)是唯一调节 RAAS 主要的效应分子血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)的关键酶,而随着血管紧张素转换酶 2(ACE2)的发现,对 RAAS 有了更深入的认识。ACE2 在心脏中度表达,是一种含锌离子的单羧基肽糖蛋白酶,可以水解 Ang Ⅱ羧基端脯氨酸与苯丙氨酸之间的肽键,生成 Ang1 ~7。目前认为 ACE2 的主要作用是与 ACE 共同调节体内 Ang1 ~7、Ang Ⅰ、Ang Ⅱ的水平,对体内血压、体液和内环境稳定起重要的调控作用[3],并可延缓心肌肥厚、心肌纤维化的发展,与心功能改变密切相关[4-6]。有理由认为:ACE2 可能在心脏缺氧环境的适应性改变中起重要作用,而目前少见相关研究报道。

作者简介:王宇亮,男,内蒙古自治区赤峰市人,硕士研究生,医师,主要从事高原心脏病发病机制方面的研究。电话:13883937751, E-mail: wangtmmu@tmmu.edu.cn
通信作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail:gaoy66@yahoo.com
收稿日期:2007-10-06 修回日期:2008-01-14

本实验利用小动物低压氧舱，建立急、慢性高原缺氧大鼠模型，研究了高原低氧环境中心脏右心室心肌 ACE2 mRNA 以及蛋白水平的表达变化。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及仪器

Tripure Isolation Reagent（Roche 公司，瑞士），M-MLV 反转录酶（TOYOBO，日本），引物合成及 *Taq* DNA 聚合酶（上海生工公司），羊抗大鼠 ACE2 多克隆抗体 IgG（Santa Cruz 公司，美国），辣根过氧化酶标记兔抗山羊 IgG（北京中杉公司），蛋白酶抑制剂鸡尾酒片（Roche 公司，瑞士），小动物低压氧舱。

1.2　实验分组

成年雄性 SD 大鼠 40 只，体质量 300～350 g（本校实验动物中心提供），按完全随机分组法分为缺氧 1、3、30 d 组和平原对照组，每组 10 只。缺氧各组大鼠置于模拟海拔 5 000 m 高原低压舱内饲养，23 h/d。对照组动物于舱外（重庆，海拔 300 m）同时饲养。

1.3　血流动力学测定

实验动物用 10% 乌拉坦腹腔注射麻醉（10 ml/kg）后，分别在舱内和舱外利用自制的导管进行肺动脉插管，导管管径为 2.5 mm。六道生理记录仪记录压力变化。分离右侧颈静脉并插管，待出现右心室压波形后记录右心室收缩压（right ventricular systolic pressure，RVSP）、右心室压力上升最大速率（RV + dp/dt_{max}）。将插管左旋并向前推进，当压力基线上升并出现肺动脉波形时，记录肺动脉压（pulmonary artery pressure，PAP）。

1.4　心室质量指数的测定

开胸摘取心脏，立刻置于冰冷的生理盐水中，剪除心房，分别称取右心室游离壁和左心室 + 室间隔质量，然后将心室心肌组织迅速放入液氮中保存。计算左、右心室质量指数和 Hermann-Willson 指数：左心室质量指数 = 左心室 + 室间隔质量/体质量（LV/BW）；右心室质量指数 = 右心室质量/体质量（RV/BW）；Hermann-Willson 指数 = 右心室质量/左心室 + 室间隔质量（RV/LV）。

1.5　ACE2 mRNA 表达检测

取液氮保存的心肌样本，Tripure 试剂盒提取组织总 RNA，利用 M-MLV 反转录酶反转录合成 cDNA，然后以 cDNA 产物为模板分别进行目的片断的 PCR 扩增。引物序列及扩增条件如下：ACE2，5′-GGAGGAGAATGCCCAAAAGATGTCGTCCAATCCTGGTTCAAGTA-3′，GenBank 序列 NM_001012006，59 ℃，共 35 个循环；GAPDH，5′-TGGAAAGCTGTGGCGTGATGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGC-3′，GenBank 序列 M17701，58 ℃，共 26 个循环。

扩增产物经 5 % 琼脂糖凝胶电泳后成像，用凝胶成像系统进行图像分析，以 *OD*（ACE2）/*OD*（GAPDH）表示 ACE2 mRNA 表达量的变化。

1.6　Western 印迹检测 ACE2 蛋白表达

取液氮保存的心肌样本，加入含有蛋白酶抑制剂鸡尾酒片的蛋白提取缓冲液（HEPES 10 mmol/L，NaCl 150 mmol/L，EGTA 1 mmol/L，$MgCl_2$ 5 mmol/L，0.02% NaN_3，5% Triton X-100，pH = 7.4），剪碎、重悬，内切式匀浆机以 13 000 r/min 高速匀浆，4 ℃，1 000 × *g* 离心 30 min，收获上清 - 70 ℃ 保存[7]。考马斯亮蓝 G250 进行蛋白定量，取 200 μg 蛋白进行常规 SDS-PAGE 电泳。Bio-Rad 半干转印仪 2 mA/cm^2 转印 60～90 min 至 PVDF 膜上。TBST 配制的 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 加 1∶500 封闭液稀释的一抗（羊抗大鼠 ACE2 多克隆抗体）室温孵育过夜 加 TBST 1∶2 000 稀释的辣根过氧化酶标记马抗羊二抗，室温孵育 2 h 室温 DAB 显色 5 min。凝胶成像系统分析处理，蛋白含量以平均光密度值 × 面积（Int × mm^2）表示。

1.7　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　缺氧对大鼠血流动力学指标的影响

缺氧 30 d 组大鼠 PAP、RVSP、RV + dp/dt_{max} 指标显著高于对照组及缺氧 1、3 d 组（$P < 0.01$），缺氧 1、3 d 组 PAP、RVSP 显著高于对照组（$P < 0.01$），见表 1。

表 1　缺氧大鼠血流动力学指标的变化（$n = 10$，$\bar{x} \pm s$）

组别	RVSP（mmHg）	RV + dp/dt_{max}（mmHg/s）	PAP（mmHg）
对照组	36.359 ± 7.780	1 501.655 ± 375.810	15.407 ± 7.450
缺氧 1 d 组	45.809 ± 6.650[ab]	1 592.168 ± 424.910	25.336 ± 4.580[ab]
缺氧 3 d 组	50.484 ± 10.210[ab]	1 406.355 ± 416.140	26.629 ± 4.630[ab]
缺氧 30 d 组	78.766 ± 19.840[a]	4 102.060 ± 419.170[a]	45.638 ± 10.720[a]

a：$P < 0.01$，与对照组比较；b：$P < 0.01$，与缺氧 30 d 组比较

2.2　缺氧对大鼠左、右心室质量指数的影响

缺氧 30 d 组大鼠 RV/BW、RV/LV 指数显著高于对照组及缺氧 1、3 d 组（$P < 0.01$），见表 2。

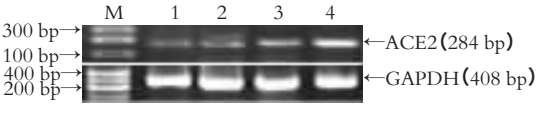
表 2　缺氧对大鼠左右心室质量指数的影响（$n = 10$，$\bar{x} \pm s$）

组别	LV/BW（mg/g）	RV/BW（mg/g）	RV/LV
对照组	2.09 ± 0.34	0.54 ± 0.08	0.260 ± 0.054
缺氧 1 d 组	2.12 ± 0.83	0.63 ± 0.10	0.300 ± 0.045
缺氧 3 d 组	2.03 ± 0.18	0.70 ± 0.16	0.350 ± 0.102
缺氧 30 d 组	2.34 ± 0.27	1.18 ± 0.14[a]	0.510 ± 0.063[a]

a：$P < 0.01$，与对照组比较

2.3　低氧对大鼠心脏右心室 ACE2 mRNA 表达的影响

大鼠缺氧 30 d 组右心室 ACE2 mRNA 表达显著高于对照组及缺氧 1、3 d 组（$P < 0.01$），见图 1。光密度分析结果：对照组为（0.29 ± 0.26），缺氧 1 d 组为（0.33 ± 0.28），缺氧 3 d 组为（1.00 ± 0.49），缺氧 30 d 组为（2.02 ± 0.24）。缺氧 30 d 与其余 3 组比较有显著性差异（$P < 0.01$）。

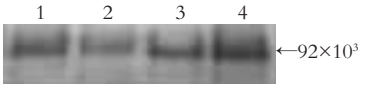


M 标准；1 对照组；2 缺氧 1 d 组；3 缺氧 3 d 组；4 缺氧 30 d 组

图 1　右心室心肌组织 ACE2 mRNA 电泳图

2.4 低氧对心脏右心室 ACE2 蛋白水平表达的影响

缺氧 30 d 组右心室 ACE2 蛋白水平显著高于对照组及缺氧 1、3 d 组($P<0.01$),见图 2。光密度分析结果:对照组为(0.05 ± 0.00),缺氧 1 d 组为(0.03 ± 0.01),缺氧 3 d 组为(0.06 ± 0.02),缺氧 30 d 组为(0.10 ± 0.03)。缺氧 30 d 与对照组和缺氧 1 d 组比较有显著性差异($P<0.01$)。



1:对照组;2:缺氧 1 d 组;3:缺氧 3 d 组;4:缺氧 30 d 组

图 2 Western blot 检测右心室心肌组织 ACE2 蛋白表达

3 讨论

高原心脏适应性变化以右心室为主的心肌细胞肥大、纤维化伴心功能上调为主要特点,RAAS 在其形成过程中起重要的作用[1,3]。长期暴露在高原缺氧环境下,循环 AngⅡ、AngⅠ、ACE、肾素,右心室心肌 AngⅡ、ACE 的活性会发生上调,而且与缺氧环境下诱导产生的心肌肥大、心肌纤维化密切相关[7-9]。ACE 抑制剂在临床应用及动物实验中均可以抑制高原缺氧环境中形成的心肌结构重塑以及功能改变[1,2]。我们的实验提示:慢性高原缺氧环境(缺氧 30 d)中,SD 大鼠出现显著右心室肥大以及心功能上调,同时右心室 ACE2 的表达在 mRNA、蛋白水平上均有显著上升。实验结果提示急性缺氧 1、3 d 对大鼠右心室心功能与心肌结构均无明显变化,与此对应的,急性期 ACE2 表达变化并不显著。可以看出右心室 ACE2 在高原缺氧适应过程中出现表达上调,而且与右心室心肌结构功能改变有相似的变化趋势。提示 ACE2 可能与心脏对高原缺氧的适应性变化相关。

ACE2 可以改善病理性心肌重塑以及由之引起的心功能恶化。如心脏 ACE2 高表达的高血压大鼠心脏收缩、舒张功能、心肌细胞肥大程度及心肌纤维化程度较对照组有明显改善[4,10],而 ACE2 基因敲除小鼠则出现心室扩张、心肌收缩功能明显降低[5]。ACE2 高表达也可以抑制缺氧诱导的心肌成纤维细胞胶原合成[11]。由此推测,低压低氧环境中心室局部 ACE2 表达上调可能与抑制心肌细胞肥大、心室扩张、心肌纤维化,产生适度的心肌结构功能代偿,避免过度的心肌重塑及心功能恶化有关。

多数研究认为:心肌缺血、缺氧以及负荷过重导致的损伤可以上调心肌局部 ACE2 表达[3-5];缺氧可以上调 HepG2 细胞 ACE2 表达[6];与我们的实验结果相符。作为组织 RAAS 系统的限速酶之一,ACE2 在转录水平受到底物以及产物的广泛调节,体内 AngⅡ、AngⅠ、ACE 水平的变化均对其有显著的影响,如 AngⅡ通过 AT1 受体对心、肾、星形胶质细胞 ACE2 mRNA 水平起负向调控的作用,而这种影响均可以被 ACE 抑制剂以及 Ang1~7 抑制[2]。高原缺氧环境下可以促使循环 AngⅡ、AngⅠ、ACE、肾素,右心室心肌 AngⅡ、ACE 的活性上调,缺氧对这些血管紧张素水平的影响可能与 ACE2 表达水平的变化有关。

综上所述:在大鼠发生以右心室肥厚伴心功能上调为代表的高原低氧适应性变化同时,右心室心肌组织 ACE2 mRNA、蛋白表达水平也出现上调,说明 ACE2 与缺氧心脏适应性变化有关,可能起到避免过度心肌结构重塑、保障正常循环功能的作用。

参考文献:

[1] 高钰琪. 高原军事医学[M]. 重庆:重庆出版社, 2005:35-74.

[2] Pelouch V, Kolar F, Ost'adal B, *et al*. Regression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and fibrosis: effect of enalapril[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 1997, 11(2): 177-185.

[3] Ferrario C M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation[J]. Hypertension, 2006, 47(3): 515-521.

[4] 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.

[5] 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.

[6] Santo R A S, Ferreria A J, Simoes E, *et al*. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme2-angiotensin(1-7)-mas axis[J]. Exp Physiol, 2008, 93(5): 519-527.

[7] Paizis G, Tikellis C, Cooper M E, *et al*. Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2[J]. Gut, 2005, 54(12): 1790-1796.

[8] 刘 燕,王仕军,谢增柱. 卡托普利对缺氧大鼠心肌血管紧张素Ⅱ含量及右心室肥大的影响[J]. 中华航空医学杂志, 1994, 5(3): 143-146.

[9] 徐正平,朱健华,邹瑞秀,等. 卡托普利对动脉粥样硬化大鼠内皮素转换酶表达的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(4): 56-60.

[10] Paniczyk U J, Penninger J M. Angictensin-convevting enzyme Ⅱ in the heart and the kidney[J]. Circ Res, 2006, 98(4): 463-471.

[11] Grobe J L, Der-Sarkissian S, Stewart J M, *et al*. ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts[J]. Clin Sci (Lond), 2007, 113(8): 357-364.

(编辑 陈聪连)