文章编号:1000-5404(2009)18-1753-04

论著

血管紧张素(1-7)对不同模型高血压大鼠左心室结构的影响

于学军,何作云,黄 岚,王晓燕 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨血管紧张素(1-7)[Ang(1-7)]对单纯压力负荷增加及肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活的高血压模型左心室肥厚及心肌纤维化的影响及其机制。**方法** 建立二肾一夹(2K1C)及肾下主动脉缩窄(INAC)模型,应用微渗泵植入技术,使Ang(1-7)进行不同时间(14、28 d)的体内干预,采用定性及定量分析的方法检测Ang(1-7)对这2种高血压模型早期(14 d)和晚期(42 d)左心室心肌细胞及纤维化程度的影响。**结果** 对2K1C和INAC动物模型,早期其左心室质量(LVW)、左心室质量指数(LVI)及左心室心肌细胞横断面积(LCA)均较对照组明显增加($P<0.05$),晚期上述指标增加更为显著($P<0.01$);Ang(1-7)可使2K1C动物模型的上述指标均显著下降($P<0.05$),但对INAC动物模型,Ang(1-7)使其上述指标在早期显著下降($P<0.05$),晚期略有下降($P>0.05$)。对2K1C动物模型,早期已出现明显的心肌纤维化($P<0.05$),晚期更为显著($P<0.01$);Ang(1-7)可明显抑制早期的间质及血管周围纤维化($P<0.05$),在晚期,Ang(1-7)可明显抑制血管周围纤维化($P<0.05$),但对间质纤维化,虽有下降趋势,但不明显($P>0.05$)。对INAC动物模型,早期心肌纤维化并不显著($P>0.05$),晚期则有明显表现($P<0.05$),Ang(1-7)可有效抑制间质和血管周围纤维化($P<0.05$)。**结论** Ang(1-7)可预防改善这2种高血压模型的左心室肥厚和心肌纤维化,但对2种模型不同时期的改善程度不同,提示Ang(1-7)可能具有不同的作用机制。

关键词: 血管紧张素(1-7);压力超负荷;肾素-血管紧张素-醛固酮系统;左心室肥厚;心肌纤维化
中图法分类号: R322.11;R544.1;R977.1 **文献标识码:** A

Effect of angiotensin(1-7) on left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis in 2K1C and INAC hypertensive models

YU Xue-jun, HE Zuo-yun, HUANG Lan, WANG Xiao-yan (Cardiovascular Diseases Research Institute, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To determine the effect of angiotensin(1-7) [Ang(1-7)] on the left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis in a pressure-overload hypertensive models, infra-nephric aorta coarctation (INAC), and a renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) activation hypertensive model, two kidney one clip (2K1C) in the early and late stage. **Methods** Totally 120 health male Wistar rats were randomly and equally divided into 6 groups, that is, sham INAC group, INAC group, INAC Ang(1-7) group, sham 2K1C group, 2K1C group and 2K1C Ang(1-7) group. INAC and 2K1C hypertensive models was established to corresponding groups and osmotic minipump implantation was carried out to the rats to deliver the Ang(1-7) to their body homogenously and to examine the parameters representing the blood pressure, including left ventricular hypertrophy (LVW, LVI, CA) and myocardial fibrosis (CVF and PVCA). **Results** Left ventricular hypertrophy (LVH) was observed in the early stage and developed in the late stage both in the 2K1C and INAC groups. Ang(1-7) decreased LVW, LVI, CA both in the early and late stage in the 2K1C model($P<0.05$). But to INAC model, Ang (1-7) only decreased the pressures in the early stage($P<0.05$), but not in the late stage($P>0.05$). Myocardial fibrosis happened and developed progressively in the 2K1C hypertensive model ($P<0.05$). Ang(1-7) was able to alleviate interstitial as well as perivascular fibrosis as used in the early stage($P<0.05$), while it only alleviated perivascular fibrosis in the late stage($P<0.05$), had no marked effect on the interstitial fibrosis($P>0.05$). There was a mild myocardial fibrosis happened in the left ventricle of the INAC model in the late stage($P<0.05$), and Ang(1-7) was able to alleviate both interstitial and perivascular

作者简介: 于学军,男,河北省承德市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事心脏和血管重建方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68774200,E-mail:yxuejun2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-27;**修回日期:** 2009-05-15

fibrosis effectively ($P<0.05$). **Conclusion** Ang(1-7) can effectively prevent and improve left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis, but in the different stage, it exerts different effect, which indicate there are multiple mechanisms of Ang(1-7).

Key words: angiotensin(1-7); pressure overload hypertension; renin-angiotensin-aldosterone system; left ventricular hypertrophy; myocardial fibrosis

血管紧张素(1-7)[Ang(1-7)]是肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)内最近发现的一种效应物质[1]。现已发现,Ang(1-7)具有对抗 Ang Ⅱ的效应,同时可抑制血管紧张素转换酶(ACE)活性,加强缓激肽的作用,从而达到扩张血管、降低血压等效应[2]。目前对 Ang(1-7)的生物学作用及其机制的研究,主要来自体外研究的结果[1,2]。在体内研究中,主要集中在 Ang(1-7)对受试动物或志愿者血压、血流或压力感受器敏感性的即时影响,且结论不一[3,4]。迄今为止,长期应用 Ang(1-7)对各种高血压模型靶器官功能及形态影响的报道尚少。此外,有研究显示,Ang(1-7)对不同类型的高血压,以及同一类型高血压的不同组织器官的作用不尽相同[3,4]。Ang(1-7)是否具有预防和逆转高血压心室重构的作用,以及对不同时期和不同类型高血压左心室重构作用的程度如何,尚无确切的结论。为此,我们采用单纯压力负荷增加及 RAAS 激活的 2 种经典高血压动物模型——肾下主动脉缩窄(INAC)及二肾一夹(2K1C)模型,应用 Ang(1-7)进行较长时期(14、28 d)的体内干预,检测其对这 2 种高血压模型左心室重构的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立及分组

选用 120 只 20 周左右雄性 Wistar 大鼠,体质量 180~220 g,由第三军医大学实验动物中心提供。按前期的方法分别建立 2K1C 和 INAC 模型并安装微渗泵(1003D 及 2ML4 型,美国 Alza 公司)[5]。实验动物的分组:2K1C 组用于观察 RAAS 激活模型各项指标的自然演变,2K1C + Ang(1-7)组用于观察 Ang(1-7)(Sigma 公司,释放速度24 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$)对这一模型各项指标的影响,INAC 组用于观察单纯压力负荷增高模型各项指标的自然演变,INAC + Ang(1-7)组用于观察 Ang(1-7)对此模型各项指标的影响,2K1C 模型和 INAC 模型分别设立对照组。

以上各组均取动物 20 只,分成 2 个亚组,每个亚组 10 只。第 1 个亚组在手术时将微渗泵植入皮下,14 d 后处死;第 2 个亚组在术后 14 d 植入微渗泵,植入后 28 d 处死。每个亚组选取 8 只进行检测。

1.2 检测指标

大鼠血压测定方法参照文献[5]。左心室质量(LVW)及左心室质量指数(LVI):放血处死大鼠,分离左、右心室,称取 LVW,并计算 LVI(LVI = 左心室质量/体质量)。

大鼠心肌细胞和胶原的定性及定量分析:取左心室中段横截面心肌组织,常规固定、包埋和制片,进行 HE 染色和天狼星红染色,以清晰显示心肌细胞和胶原组织。

应用德国 Zisse 公司 VMSP30 型显微分光光度计和 KS400 型图像分析仪,在 HE 染色下测量心肌细胞面积。每个标本取 5 个细胞核位于中央的心肌细胞,取其均值作为该标本的所得值。

在天狼星红染色下测量心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)和心肌血管周围胶原面积(perivascular collagen area, PVCA)[6]。CVF = 胶原面积/总面积,其中胶原面积不包括血管周围胶原面积;随机分析 5 个视野,取其均值作为该心脏的 CVF。PVCA = 壁内小动脉管腔周围胶原面积/动脉管腔面积;每个标本取 4 根壁内小动脉横切面进行测量,取其均值作为该心脏的 PVCA。

1.3 统计学处理

各项数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 8.0 统计学软件进行单因素方差分析,并行方差齐性检验及 Neuman Keuls 检验做两两比较。

2 结果

2.1 Ang(1-7)对 2 种动物模型血压的影响

2K1C 动物模型第 1 亚组术后 3 d 血压即有增高趋势,5 d 达到统计学标准,以后则持续增加,14 d 时达到高峰。2K1C + Ang(1-7)组各时相点血压均低于 2K1C 组,以第 7、9 天最明显($P<0.01$)。第 2 亚组 2K1C 动物在前 14 d 的变化趋势与第 1 亚组基本相同,但 14 d 以后维持在较高水平,血压波动不明显。术后 14 d 应用 Ang(1-7),血压迅速下降,4 d 即下降 12.7%,应用后 1~2 周,血压维持在较低水平,以后血压虽有轻度回升,但与 2K1C 组比较,仍有明显下降($P<0.05$)。

对 INAC 动物模型,由于手术后无法应用尾动脉测量血压,故采用颈动脉插管只能获得有创血压值,不能观察其动态改变。但无创和有创血压具有很强的相关性($r=0.998$)。术前 INAC 动物模型各组血压差异无统计学意义($P>0.05$),而在术后,无论是 14 d 还是 42 d,均显著增高;同时应用 Ang(1-7),在术后 14 d 时血压下降 13.6%($P<0.05$),术后 14 d 开始应用 Ang(1-7),到术后 42 d 时,血压下降 7.94%($P>0.05$)。

2.2 Ang(1-7)对 2 种动物模型左心室质量及心肌细胞横断面积的影响

对 2K1C 动物模型,建模 14 d 时其 LVW、LVI 及心肌细胞横断面积(LCA)均较对照组明显增加($P<0.05$),42 d 时上述指标增加更为显著($P<0.01$),Ang(1-7)则使其在各时相点显著下降($P<0.05$,表 1)。对 INAC 动物模型,14 d 时其

LVW、LVI 及 LCA 均较对照组明显增加($P<0.05$),42 d 时上述指标增加更为显著($P<0.01$),Ang(1－7)在 14 d 时使上述指标显著下降($P<0.05$),在 42 d 时虽有下降,但差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

2.3　Ang(1－7)对 2 种动物模型左心室心肌胶原含量及分布的影响

2K1C 动物模型在第 14 天时其左心室胶原已明显增多,CVF 及 PVCA 均明显增加($P<0.05$)。2K1C 动物模型心肌细胞周围的胶原纤维明显增生,排列不规则,是间质纤维化比较典型的表现;血管周围胶原增多,并有向周围间质延伸的现象,胶原纤维较粗。Ang(1－7)可明显抑制间质及血管周围纤维化,使 CVF 及 PVCA 减低($P<0.05$),并使胶原纤维的排列较为规则。42 d 时,心肌纤维化程度加重,CVF 及 PVCA 增加均十分明显($P<0.01$),胶原纤维不但明显增加,且纤维粗大,排列紊乱,将心肌细胞完全分隔,并有部分心肌细胞缺失由胶原纤维所代替。血管周围胶原纤维量有所增加,纤维变粗,明显向间质延伸(图 1A、B)。Ang(1－7)可明显抑制血管周围纤维化,但对间质纤维化,虽有使其下降的趋势,但无统计学意义($P>0.05$),见图 1C、D,表 1。

对 INAC 动物模型,14 d 时其间质胶原较对照组有轻度增多,但排列较规律,且纤维较细,血管周围胶原增加不显著,排列较规整;定量分析 CVF 及 PVCA,虽有增高趋势,但不明显($P>0.05$);Ang(1－7)对 INAC 动物模型 CVF 及 PVCA 有轻度改善($P>0.05$)。42 d 时其间质胶原较对照组有明显增多,排列较紊乱,但纤维较细(图 2A),CVF 较对照组明显增高($P<0.05$);血管周围胶原亦显著增加,但排列较规整(图 2B),PVCA 亦明显增高($P<0.05$);Ang(1－7)可有效抑制间质和血管周围纤维化($P<0.05$),见图 2C、D,表 2。

3　讨论

目前,对高血压左心室重建的病理变化已经进行了较深入的研究。左心室肥厚(LVH)和心肌纤维化(MF)是它的 2 个重要的病理表现。但在不同的高血压模型,其病理变化及其机制并不相同[6,7]。Ang(1－7)是否具有预防和逆转高血压左心室重构的作用,对不同时期及不同类型高血压左心室重构作用的程度如何,目前尚无确切的结论。

本研究发现,2K1C 和 INAC 动物模型术后 14 d 出现了 LVH,42 d 时更为显著。Ang(1－7)可明显减轻 2K1C 和 INAC 模型早期的 LVH,但对 INAC 模型后期的 LVH 作用不明显。体内和体外实验都已经证实,压力增高本身可引起心肌细胞肥厚和"胎儿化表型"的出现。此外,循环和心脏局部 RAAS 的激活,也是导致心肌肥厚的重要原因。对比观察 2 种动物模型的血压变化可以发现,LVH 的发生与血压的升高呈同步改变,与是否有 ARRS 的激活无明显相关,而 Ang(1－7)主要是通过其降压作用而预防和逆转 LVH 的发生与发展。

在 2K1C 模型,术后 14 d 心肌内胶原由血管周围向邻近间质短距离延伸,以后延伸距离逐渐加大,把整个心肌分割成条纹状,定量检测其 CVF 和 PVCA 呈进行性增加,从而形成了血管周围和间质纤维化;到 42 d 时,纤维化程度更为明显,并取代部分心肌组织,形成疤痕。Ang(1－7)可明显减轻其早期间质和血管周围纤维化的发生;在其后期,对血管周围纤维化仍有明显的抑制作用,对其间质纤维化则作用不明显。2K1C 是 RAS 激活的模型,早期血浆 Ang Ⅱ 水平增高,可引起血管通透性增加,表现为在反应性纤维化阶段的肌间隙增宽。由于血管通透性增加,使一些生长因子如血小板衍生生长因子(PDGF)等进入细胞外间隙,促使成纤维细胞(FBC)增生,胶原合成增多,从而形成反

表 1　Ang(1－7)对 2K1C 模型大鼠左心室心肌细胞及纤维胶原的影响　($n=8,\bar{x}\pm s$)

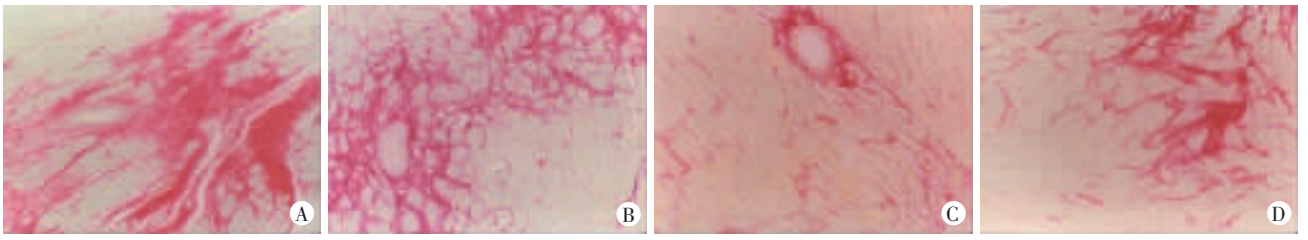
组别		LVW(mg)	LVI(mg/g)	LCA(μm^2)	CVF(%)	PVCA(%)
对照组	第 1 亚组	616.4 ±53.7[a]	2.31 ±0.16[b]	182.6 ±21.3[b]	2.57 ±0.64[b]	3.16 ±0.42[b]
	第 2 亚组	658.7 ±49.6[b]	2.19 ±0.17[b]	192.5 ±24.8[b]	2.68 ±0.82[b]	3.37 ±0.38[b]
2K1C 组	第 1 亚组	828.6 ±62.7	3.46 ±0.28	296.7 ±32.4	5.14 ±1.73	7.18 ±0.96
	第 2 亚组	1 097.5 ±113.2	4.12 ±0.32	436.2 ±49.5	8.79 ±2.13	10.25 ±1.84
2K1C + Ang(1－7)组	第 1 亚组	734.2 ±51.9[a]	2.85 ±0.21[a]	235.1 ±24.6[b]	3.95 ±1.26[a]	4.59 ±0.63[b]
	第 2 亚组	864.9 ±96.3[a]	3.25 ±0.31[b]	368.4 ±42.1[a]	7.64 ±1.34	5.78 ±0.83[b]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 2K1C 组对应亚组比较

表 2　Ang(1－7)对 INAC 模型大鼠左心室心肌细胞及纤维胶原的影响　($n=8,\bar{x}\pm s$)

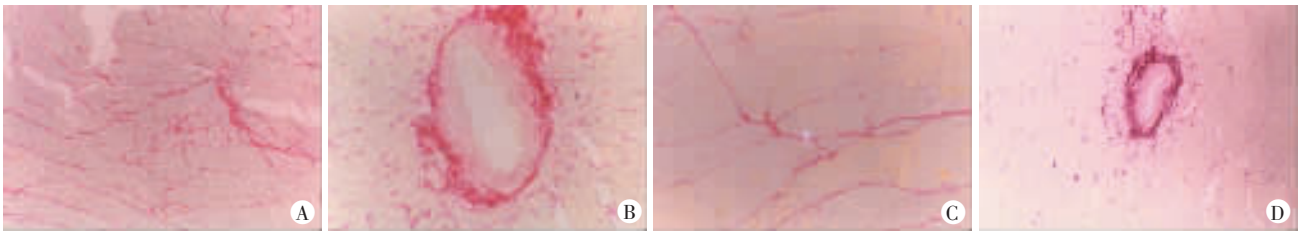
组别		LVW(mg)	LVI(mg/g)	LCA (μm^2)	CVF(%)	PVCA(%)
对照组	第 1 亚组	594.7 ±62.4[a]	2.47 ±0.26[b]	176.3 ±25.6[b]	2.41 ±0.64	3.27 ±0.36
	第 2 亚组	645.1 ±57.9[b]	2.35 ±0.24[b]	187.9 ±20.8	2.59 ±0.65[a]	3.18 ±0.41[a]
INAC 组	第 1 亚组	762.8 ±67.1	3.35 ±0.28	267.9 ±30.2	2.67 ±0.59	3.34 ±0.52
	第 2 亚组	1 007.2 ±96.8	3.97 ±0.36	436.2 ±49.5	3.96 ±0.83	4.17 ±0.47
INAC + Ang(1－7)组	第 1 亚组	715.9 ±53.6	2.74 ±0.22[a]	218.9 ±23.8[a]	2.48 ±0.76	3.32 ±0.37
	第 2 亚组	943.4 ±102.6	3.61 ±0.29	395.2 ±46.1	3.14 ±0.71[a]	3.64 ±0.36[a]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 INAC 组对应亚组比较



A：2K1C 组，见间质纤维化表现；B：2K1C 组，见血管周围和间质纤维化表现；C：2K1C + Ang(1 －7)组，Ang(1 －7)可使血管周围纤维化明显减轻；D：2K1C + Ang(1 －7)组，Ang(1 －7)对间质纤维化的影响不明显

图1 Ang(1 －7)对2K1C模型大鼠(42 d)心肌纤维化分布的影响 （天狼星红 ×66）



A：INAC 组，见间质纤维化表现；B：INAC 组，见血管周围和间质纤维化表现；C、D：INAC + Ang(1 －7)组，Ang(1 －7)可使间质和血管周围纤维化明显减轻

图2 Ang(1 －7)对INAC模型大鼠(42 d)心肌纤维化分布的影响 （天狼星红 ×66）

应性纤维化[8]。术后 42 d 大鼠心肌细胞除发生上述变化外，还出现坏死缺失，被纤维疤痕取代，形成修复性纤维化。Ang(1 －7)预防和逆转 MF 的主要机制是抑制和对抗 AngⅡ的作用，以及降低压力负荷(尤其是冠脉内的压力负荷)[9]。它对 2K1C 模型后期间质纤维化作用不明显，可能与此时心肌细胞坏死，胶原纤维替代形成纤维疤痕，即出现修复性纤维化有关[1]。

在 INAC 动物模型，14 d 时其间质胶原较对照组虽有轻度增多($P>0.05$)。42 d 时其间质胶原较对照组有明显增多，排列较紊乱，纤维较粗，血管周围胶原显著增加，PVCA 及 CVF 较对照组明显增高($P<0.05$)，Ang(1 －7)可明显减轻其间质和血管周围纤维化的发生。INAC 动物模型是非 RAAS 激活模型，其循环系统内无血管紧张素的增高，但在其高血压晚期，心肌组织内 ACE 活化并重新分布，RAAS 也被激活[9,10]，从而导致了心肌纤维化。Ang(1 －7)并未显著降低压力负荷，却明显减轻了纤维化的发生，这可能是由于 Ang(1 －7)对直接抑制了 RAAS 以及对冠状动脉的直接作用。研究显示，即使在低浓度时(ng 级)，Ang(1 －7)即可对冠状动脉的内皮细胞产生影响，促进其分泌 NO 及 PGI2，并可抑制平滑肌细胞及成纤维细胞的肥厚、增生及分泌胶原纤维的功能[11]。

综上所述，Ang(1 －7)对这 2 种高血压模型的 LVH 和 MF 均有不同程度的抑制作用，但其作用的程度和机制并不完全相同，其抑制 LVH 与其降压作用有关，而其抑制心肌纤维化的作用主要是作用于 RAAS 的结果。

参考文献：

[1] Schindler C, Bramlage P, Kirch W, *et al*. Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1 －7) in cardiovascular drug therapy[J]. Vasc Health and Risk Manag, 2007, 3(1): 125 －137.

[2] Ferrario C M, Jessup J, Chappell M C, *et al*. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin Ⅱ receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2[J]. Circulation, 2005, 111(20): 2605 －2610.

[3] Iyer S N, Ferrario C M, Chappell M C. Angiotensin (1 －7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system[J]. Hypertension, 1998, 31(1 Pt 2): 356 －361.

[4] Wilsdorf T, Gainer J V, Murphey L J, *et al*. Angiotensin-(1 －7) does not affect vasodilator or TPA responses to bradykinin in human forearm [J]. Hypertension, 2001, 37(4): 1136 －1140.

[5] 于学军，何作云，黄 岚，等. 血管紧张素(1 －7)对两种模型高血压大鼠心功能的影响[J]. 心脏杂志，2008，20(6)：668 －672.

[6] 于学军，何作云，王晓燕. 两种高血压大鼠模型心肌纤维化的动态变化及其与循环、心肌组织内肾素-血管紧张素系统和压力负荷之间的关系[J]. 中国微循环，2004，8(4)：209 －213.

[7] Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling[J]. Physiol Rev, 1999, 79(1): 215 －262.

[8] 田 颖，祝善俊，王 江，等. BRL37344 对心衰大鼠血液 TNF-α、AngⅡ、ET-1 含量及心肌重构的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(19)：1939 －1942.

[9] 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.

[10] Grobe J L, Mecca A P, Lingis M, *et al*. Prevention of angiotensin Ⅱ-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1 －7)[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(2): H736 －H742.

[11] Grobe J L, Mecca A P, Mao H, *et al*. Chronic angiotensin-(1 －7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(6): H2417 －H2423.

（编辑 王 红）