维普资讯 http://www.cqvip.com

心力衰竭患者心肌组织ACE2表达与心功能的关系

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

[摘 要] **目的** 观察心力衰竭(简称心衰)患者不同心功能状态下血管紧张素转换酶2(ACE2)基因和蛋白表达变化,探讨其与心衰患者心功能的关系。**方法** 通过手术取材,采用RT-PCR和Western Blot技术检测30例瓣膜病所致不同程度心衰患者和5例正常人心肌组织中ACE2 mRNA和蛋白表达。**结果** 瓣膜病所致心衰患者心肌组织ACE2 mRNA和蛋白表达均较正常组明显升高($P<0.01$),其中中重度心衰患者升高尤为显著($P<0.01$)。**结论** 心衰患者心肌组织ACE2基因和蛋白表达明显增强,这可能是心脏的代偿机制,促进ANGII降解,增加ANG1-7合成,保护残存的心功能。

[关键词] 心力衰竭;血管紧张素转换酶2;心功能;心肌
[中图分类号] R542.5; R541.6 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2007)01-0013-03

Relationship between heart function and ACE2 expression in myocardium of congestive heart failure patients

WANG Jiang, TIAN Ying, NIE Ling, SONG Rong, TAN Hong-mei, ZHU Shan-jun (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the angiotensin converting enzyme2 (ACE2) gene and protein expression in congestive heart failure (CHF) patients, and the relationship between ACE2 gene and protein expression and heart function. **Methods** Pathologic and morphologic studies on myocardial tissue of 30 patients with CHF due to valvular heart disease and 5 control subjects were carry out with optical microscopy assay. mRNA and protein expression of ACE2 in myocardial tissue were analyzed using RT-PCR and Western Blot. **Results** ACE2 mRNA and protein expression increased in the patients with CHF than in the control subjects ($P<0.01$), especially in patients with severe heart failure ($P<0.01$). **Conclusion** The expression of ACE2 was up-regulated in CHF patients, may be due to cardiac compensation, to promote the degradation of ANGII, and increase (1-7) level.

Keywords: congestive heart failure; angiotensin converting enzyme2; heart function; myocardium

对心力衰竭(简称心衰)发病机制的研究一直是心血管领域的热点和难点,目前公认肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)过度激活不仅是心衰发病的启动环节,而且加速心衰病程,促使心衰恶化。RAS由肾素、血管紧张素、血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)和醛固酮组成,其中ACE是RAS的核心酶,其催化产物血管紧张素II(angiotensin II, ANGII)是RAS最主要的效应肽。Donogue等[1-2]于2000年首先发现RAS的新成员,是ACE的同系物,命名为ACE2。有关ACE2的生物学效应和病理生理意义的研究目前还处于起步阶段。本实验通过手术取材,采用RT-PCR和Western Blot方法检测心肌组织局部ACE2基因和蛋白表达,探讨其与心衰患者心功能的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2005年3月至2005年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30例。其中男18例,女12例,年龄26~61岁,平均年龄41岁。根据纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级标准,心功能II级(II/NYHA)6例,心功能III级(III/NYHA)18例,心功能IV级(IV/NYHA)6例。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)和左心室短轴缩短率(FS)。所有患者均排除急慢性感染、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。

1.2 心肌取材

二尖瓣置换术患者于术中取少量左心室乳头肌,意外死亡者于死亡后2 h内取少量左心室乳头肌,立即置入液氮中冻存,或多聚甲醛固定、石蜡包埋进行病理检测。所有标本均于3个月内同批检测。

[作者简介] 王 江(1973-),女,重庆市人,主治医师,在读博士,主要从事心力衰竭发病机制的研究。电话:(023)68774601, E-mail: a65223875@cta.cq.cn
[通讯作者] 祝善俊,第三军医大学附属新桥医院全军心血管病研究所

[收稿日期] 2006-11-30 [修回日期] 2006-12-15

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 反转录 PCR(RT-PCR)检测

称取 100 mg 液氮冻存的心肌组织,加入 1 ml Trizol(购自北京鼎国公司)充分匀浆、弃沉淀,氯仿抽提,异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤沉淀,DEPC 水溶解沉淀,-20 ℃保存。紫外分光光度仪测定其在 260 ~ 280 nm 波长处的吸光度(OD260 和 OD280),计算 RNA 浓度,同时计算 OD260 和 OD280 的比值,当两者比值大于 1.8 时,说明提取的 RNA 纯度较好,无蛋白质和 DNA 污染。本实验 RNA 样品 OD260 和 OD280 比值在 1.8 ~ 2.0 之间,符合 RNA 纯度要求。RT-PCR 检测心肌组织中 ACE2 mRNA 表达。ACE2 引物(赛百盛合成):上游 5'-CATTGGAGCA AGTGTTGGATCTT-3',下游 5'-GAGCTAATGCATGCCATTCTCA-3',扩增片段为 108 bp。GAPDH(赛百盛合成):上游 5'-CGGATTT-GGTCGTATTGGG-3',下游 5'-TCTCGCTCCTGGAAGATGG-3',扩增片段为 216 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。

1.4 Western Blot 检测

称取 100 mg 液氮冻存的心肌组织,加入 1 ml RIPA 裂解组织总蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度。制备 8% 分离胶和 5% 积层胶,每孔上样量为 250 μg,电泳,积层胶电压 60 V,分离胶 90 V,共 3 h 左右。半干转移仪转膜,封闭,羊抗 ACE2 多克隆抗体(购自美国 Santa Cruz,1∶250 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 one1 软件分析光密度值。

1.5 统计学处理

计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行显著性 t 检验,$P < 0.05$ 表示组间有显著性差异。

2 结果

2.1 心衰患者一般临床资料

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($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HTR	LVED(mm)	LVEF(%)	FS(%)
II/NYHA	6	0.45 ± 0.04	47.2 ± 5.3	55.2 ± 3.0	29.4 ± 3.7
III/NYHA	18	0.58 ± 0.05	53.5 ± 6.4	47.5 ± 5.2	28.1 ± 4.9
IV/NYHA	6	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

正常对照组心肌细胞排列整齐,连接紧密。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。

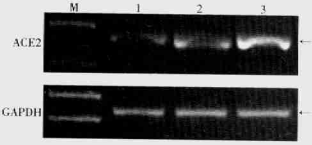
2.3 心肌组织 RT-PCR 检测结果

与正常对照组比较(表 2、图 1),心衰患者 ACE2 mRNA 表达量明显升高($P < 0.01$),中重度心衰患者(NYHA III-IV 级)升高更为显著($P < 0.01$)。

表 2 各组心衰患者心肌组织 ACE2 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ACE2/GAPDH
对照组	5	0.82 ± 0.02
II/NYHA	6	1.13 ± 0.04 *
III - IV/NYHA	24	1.31 ± 0.04 *#

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



M:标准;1:正常组;2:轻度心衰组;3:中重度心衰组

图 1 心肌组织 ACE2 mRNA 电泳

2.4 心肌组织 Western Blot 检测结果

与正常对照组比较(表 3),心衰患者 ACE2 蛋白表达量明显升高($P < 0.01$),中重度心衰患者(NYHA III-IV 级)升高更为显著($P < 0.01$)。

表 3 各组心衰患者心肌组织 ACE2 Western Blot ODu 值($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ACE2(INT × mm²)
对照组	5	3.07 ± 0.20
II/NYHA	6	5.06 ± 0.37 *
III - IV/NYHA	24	6.32 ± 0.51 *#

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

3 讨论

心力衰竭的发病机制非常复杂,由于对心衰的发病机制缺乏系统完整的认识,因此心衰的治疗一直是临床上的重点和难点。目前公认肾素 - 血管紧张素系统(RAS)的过度激活是心衰发生、发展的重要决定因素,并因此已成为心衰治疗的主要靶点。ACE 是 RAS 的核心酶,催化产生 RAS 的核心效应因子 ANGII,发挥血管收缩、细胞增殖、促进心肌重构的作用。Donoghue[1] 和 Tipnis[2] 分别从人淋巴瘤和扩心病心衰患者左心室组织的 cDNA 文库中克隆出 ACE 的同源物 ACE2,ACE2 是锌指金属肽酶,全长的 ACE2 cDNA 编

维普资讯 http://www.cqvip.com

码805个氨基酸，分子量约120 KD，包含一个HEXXH+E的锌联接共有序列，在结构上有42%的成分与ACE保持一致。ACE2是I型膜蛋白，有催化活性的部位朝向细胞外，发挥胞外酶的作用，可水解循环中的蛋白质。ACE2主要表达于心脏、肾脏和睾丸。目前对ACE2的研究大多停留在细胞和动物研究水平[3]。本研究利用RT-PCR和Western Blot方法检测心衰患者心肌组织ACE2基因和蛋白表达，发现心衰患者ACE2基因和蛋白表达均增强，且心功能越差，升高越显著。

有研究表明ACE2在调节心脏和血管生理功能方面有重要意义，其表达异常可导致心血管系统的病理改变。Crackower等[4]通过ACE2基因敲除动物模型，发现ACE2基因敲除小鼠心功能受损，超声检查发现左心室壁变薄、左心室舒张末直径增大，左心室收缩功能减退，且呈进行性加重趋势，表明ACE2是心功能的重要调节因子。Yamamoto等[5]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ANGII水平明显升高。ACE2表达缺陷可使心功能下降，而ACE2过度表达可能使心源性卒死增加。有报道ACE2转基因小鼠心肌过度表达ACE2后，出现心脏传导阻滞和室性心动过速，且与转基因表达水平呈正相关[6]。

ACE2对心脏的保护效应主要是通过降解ANGII产生ANG1-7实现的[7]，与ANGII的效应相反，ANG1-7具有舒张血管、抗增生、抗炎症的作用，对衰竭心脏有保护作用。本研究显示心衰患者心肌组织ACE2基因和蛋白表达显著升高，这可能是机体的一种代偿反应，通过ACE2促进ANGII降解，产生更多的对心肌有保护作用的ANG1-7，保护残存的心功能。

ACE2的发现使RAS变得更加复杂，目前认为RAS存在两条功能相反的通路，分别是ACE产生ANGII和ACE2产生ANG1-7，这两条通路的平衡决定了循环和器官局部RAS效应肽的水平，对维持血压和心脏正常结构功能有重要意义[8]。目前关于ACE2的研究基本处于起步阶段，ACE2如何调节RAS，细胞生物学特征如何，参与心血管疾病的机制，是否能替代ACEI，通过转基因技术使特定细胞过度表达ACE2能否改善心衰患者预后，这些都是未来研究的课题。

[参考文献]

[1] 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.

[2] Tipnis SR, Hooper NM, 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.

[3] Warner FJ, Smith AI, Hooper NM, et al. Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(21): 2704 - 2713.

[4] Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function[J]. Nature, 2002, 417(20): 822 - 826.

[5] 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.

[6] Donoghue M, Wakimoto H, Maguire CT, et al. Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins[J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(9): 1043 - 1053.

[7] 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.

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

(编辑：余汇洋)

关于法定计量单位的使用

我国的法定计量单位包括：①国际单位制的基本单位，如长度(m)、质量(kg)、时间(s)等；②国际单位制的辅助单位；③国际单位制中具有专门名称的导出单位，如频率(Hz)、压力(Pa)、能量(J)；④国家选定的非国际单位制单位，如时间(min、h、d)、转速(r/min)；⑤由以上单位构成的组合形式单位，如速度(m/s)、浓度(mol/L)；⑥由词头和以上单位所构成的倍数和分数单位，如μm、kPa、ml等。在医学写作时必须严格执行国务院的命令和有关的国家标准。

(本刊编辑部)