重庆维普 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2008)09-1050-04

压力超负荷左室肥厚大鼠心肌组织血管紧张素Ⅱ受体的表达

王玉兵[1],陈 明[2]

(1.四川省南充市川北医学院附属医院心内科,南充 637000;2. 重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:本研究观察压力超负荷左室肥厚(Left ventricular hypertrophy,LVH)大鼠心肌组织 AT_1 和 AT_2 的表达,进一步探讨血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ,Ang Ⅱ)受体在左室肥厚中的作用及可能机制。方法:采用腹主动脉缩窄法建立 LVH 模型,14 只 Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为:(1)假手术组(n=7);(2)手术组(手术组 n=7);用免疫组化法及 RT-PCR 检测血管紧张素Ⅱ受体(AT)的表达,同时检测 LVH 的指标:心肌纤维化、左室质量指数(LVMI)、心肌细胞横切面积(CSA)、心肌细胞凋亡指数。结果:与假手术组比较,手术组 SBP、DBP、MBP、LVMI、心肌细胞 CSA、心肌细胞凋亡指数(Apoptosis index,APOI)、血浆 Ang Ⅱ水平及 AT_1 和 AT_2 蛋白和 mRNA 的表达水平均显著升高。结论:左室肥厚大鼠心肌组织 AT_1 和 AT_2 从蛋白和 mRNA 表达水平均明显升高;AT_1 和 AT_2 均参与左室肥厚过程,但二者可能发挥相互拮抗的作用。

【关键词】左室肥厚;血管紧张素Ⅱ;受体

【中国图书分类法分类号】R541.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-03

Expression of caraiomyocyte angiotensin Ⅱ receptors in rat with pressure over load-induced left ventricular hypertrophy

WANG Yu-bing,et al

(*Department of Cardiovascular, the Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the role of Ang Ⅱ receptors(AT_1 and AT_2) in the left ventricular hypertrophic process and its mechanisms through detecting the expression of Ang Ⅱ receptors(AT_1 and AT_2) in hypertrophic cardiomyocyte induced by pressure overload in rats. *Methods*:Fourteen Male Sprague-Dawley rats were divided into two groups: sham group(n=7),and operation group(n=7). Left ventricular hypertrophy model was well established after abdominal aortic stenosis in each group.The expression of AT_1 and AT_2 was detected by immunohistochemistry(IHC) and RT-PCR,respectively. Indexes of left ventricular hypertrophy,including myocardial fibrosis,LVMI,cross-sectional area and apoptosis index(APOI),were also measured. *Results*: SBP,DBP,MBP,LVMI,and cardiomyocyte CSA,APOI,level of plasma Ang Ⅱ and expression of AT_1 and AT_2 in operation group were markedly increased as compared with sham group. *Conclusion*:Expression of cardiomyocyte AT_1 and AT_2 receptors were increased significantly in rat of left ventricular hypertrophy,which indicated that AT_1 and AT_2 receptors both participate in the process of left ventricular hypertrophy but they may play antagonism effects.

【Key words】Left ventricular hypertrophy;Ang Ⅱ;Receptor

肾素-血管紧张素系统(Renin-angiotensin system,RAS)在心血管左室重塑中起关键作用,而Ang Ⅱ是 RAS 的重要介质,Ang Ⅱ通过与其受体(主要是 1 型受体 Angiotensin Ⅱ type 1 receptor AT_1 和 2 型受体 Angiotensin Ⅱ type 2 receptor AT_2)结合发挥生物作用。Ang Ⅱ大部分心血管作用主要通过 AT_1 介导的已被广泛认可,但对 AT_2 的心血管作用目前尚存争议。而高血压引起的 LVH 已被公认是心血管疾病致残率和死亡率的强的独立的预测因子,也是发生各种心血管疾病并发症如冠心病、心肌梗死、脑卒中、心力衰竭的独立危险因素。目前,已有学者在自发性高血压大鼠、二肾一夹型高血压大鼠和 Ang Ⅱ灌注的大鼠离体肥大心脏模型上观察了 AT 亚型变化及意义,但争议较大。本实验采用大鼠腹主动脉缩窄模型,观察在体肥大心肌细胞 AT 亚型的变化,探讨

作者介绍:王玉兵(1978-),女,硕士,
研究方向:高血压左室肥厚。
通讯作者:陈 明,男,教授,E-mail:chenmingcq@yahoo.com。

重庆维普 http://www.cqvip.com

AT 亚型在左室肥大中的作用,为临床防治心室重塑提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

清洁级健康雄性 SD 大鼠,12 周龄,体重为(227 ± 18)g,随机分为:(1)假手术组(n=7);(2)手术组(n=7)。

1.2 动物模型的建立

采用腹主动脉缩窄法建立 LVH 模型[1]:大鼠用 10%水合氯醛(0.5ml/100g)腹腔麻醉后,在无菌条件下开腹,分离腹主动脉,手术组在双肾动脉上方约 5mm 处用丝线将 7 号针头(直径约 0.7mm)与腹主动脉共同结扎,抽出针头,使腹主动脉缩窄约 70%,缝合腹腔。假手术组仅开腹行腹主动脉下穿线,不予结扎,其它步骤同手术组。术后 4 周将假手术组和手术组有创测血压取标本。

1.3 实验过程及指标的测定方法

1.3.1 动脉血压测定 各组大鼠观察期满后用 10%水合氯醛腹腔麻醉后,分离左颈总动脉,插入充满肝素的塑料导管,导管另一端接压力换能器输入多媒体生物信号记录仪系统,记录动脉收缩压(Systolic arterial pressure,SAP)、动脉舒张压(Diastolic arterial pressure,DAP)、平均动脉压(Mean arterial pressure,MAP)。

1.3.2 采集标本

1.3.2.1 采血 有创测血压后开胸从右心取血 5ml 迅速注入放在冰水浴中冷却的抗凝管中摇匀,1 000r/min 4℃离心 5min,分离血浆,放入 -20℃冰箱保存,以备检测血浆 Ang Ⅱ 水平。

1.3.2.2 心脏标本留取及 LVMI 的测定 采血后迅速摘取心脏,用冰生理盐水冲洗,滤纸吸干后电子天平称心脏重量(Heart weight,HW)。然后沿房室环剪去左右心房及右室游离壁,然后称左心室(包括室间隔)重量(Left ventricular weight LVW),计算 LVMI= 左室湿重(即左心室重量)/ 体重(mg/g)。然后将左心室横切为两份,一份放于 10%中性甲醛溶液中固定,制作病理切片。在 HE 染色切片上使用测微计测量心肌细胞 CSA,每张切片随机测量 10 个心肌细胞 CSA 取其均值。另一份立即放入液氮中冻存然后转移至 -70℃冰箱以备做 RT-PCR 之用。

1.3.3 心肌组织 AT_1 和 AT_2 蛋白表达的检测 采用免疫组化 SABC 法,DAB 棕黄色反应呈色。实验操作步骤参照实际和进行,并设立阴性对照组。阳性标准胞膜或胞浆染成棕黄色。对表达结果进行半定量分析:应用成都金盘病理多媒体图像分析系统计算每个视野中阳性表达面积占整个视野面积的比值。

1.3.4 心肌组织 AT_1mRNA 和 AT_2mRNA 表达的检测 采用 RT-PCR 法。

1.3.4.1 引物设计及合成 在 Genebank 中检出 AT_1 和 AT_2 的核苷酸序列,由上海英俊生物技术有限公司设计和合成引物。引物序列如下:AT_1 上游序列:5'-CATCATCTGGCTAATGGCTG-3',下游序列:5'-ATAGCGGTGTCCACAATGTC-3', 扩增长度 401bp。AT_2 上游序列:5'-GAACAGAATTACCCGTGACC-3', 下游序列:5'-GAGCCAAGTAATGGGAACTC-3',扩增长度 282bp。GAPDH 上游序列:5'-AGAACATCATCCCTGCATCC-3',下游序列:5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCATA-3'扩增长度 360bp。退火温度均为 55.4℃。

1.3.4.2 总 RNA 的提取 参照 Trizol RNA 提取试剂说明书的流程提取组织总 RNA。

1.3.4.3 cDNA 的合成及 PCR 扩增 GAPDH、AT_1 和 AT_2 参照 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0)进行。

1.3.4.4 PCR 扩增产物半定量分析 PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)扫描采图,用 Quantity-one 软件进行图像分析和半定量分析,结果以特异的 DNA 条带的灰度值与内参 GAPDH 的 DNA 条带的灰度值之比表示。

1.3.5 凋亡检测 石蜡切片经常规二甲苯和梯度乙醇脱蜡水化后,应用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling,TUNEL)原位标记心肌凋亡细胞核。

1.3.5.1 按 TUNEL 试剂盒步骤说明操作。

1.3.5.2 设立对照实验 (1)阳性对照:将正常的心肌组织切片用 DNase Ⅰ(10μg/ml)消化以诱导 DNA 链断裂,然后再按操作步骤加 TUNEL 反应混合液,TUNEL POD 法显色。(2)阴性对照:将正常的心肌组织切片仅用 Label Solution 而不加 Enzyme Solution 孵育组织切片,37℃,1h,然后再按操作步骤用 Converter POD 法显色。

1.3.5.3 心肌细胞凋亡计数 正常心肌细胞核呈蓝色,而凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。在光学显微镜下计数 5 个高倍视野中凋亡阳性心肌细胞核数目及其占总细胞核数目的比例,求其均值。

1.3.6 血浆 Ang Ⅱ 放射免疫方法检测。

1.4 统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验、多组间差异采用方差分析,组间比较用 SNK 法,$P < 0.05$ 为差异有显著性。采用 SAS8.1 软件处理。

2 结 果

2.1 压力超负荷致左室肥厚

采用腹主动脉缩窄法建立 LVH 模型,结果显示:从组织病理学切片可以见到心肌细胞肥大、间质细

重庆维普 http://www.cqvip.com

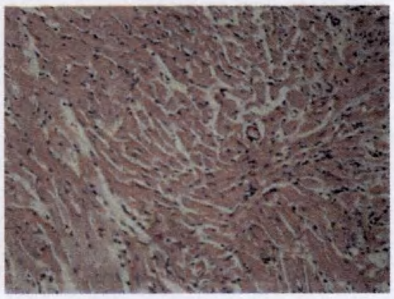


图 1 假手术组(HE,400×)正常心肌细胞

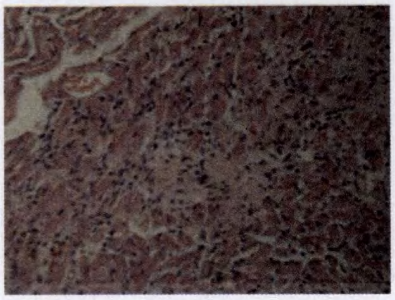


图 2 手术组(HE,400×)可见间质增生、纤维化、炎性细胞侵润

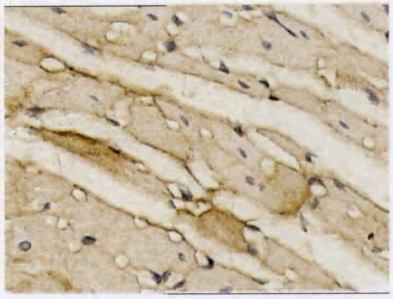


图 3 假手术组 AT_1 表达(IHC,400×)

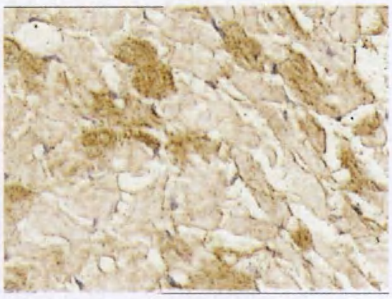


图 4 手术组 AT_1 表达(IHC,400×)

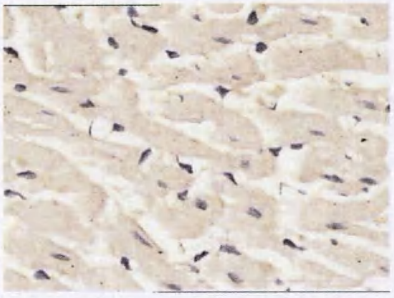


图 5 假手术组 AT_2 表达(IHC,400×)

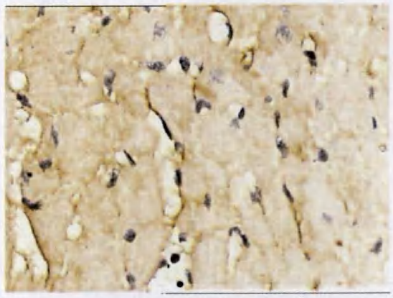


图 6 手术组 AT_2 表达(IHC,400×)



图 7 假手术组心肌细胞凋亡(TUNEL,400×)

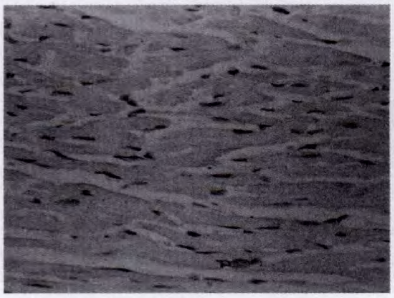
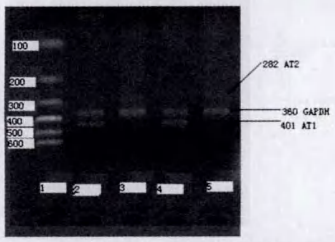


图 8 手术组心肌细胞凋亡(TUNEL,400×)



1.表示 marker;2、3.表示假手术组;4、5.表示手术组

图 9 假手术组及手术组 AT1mRNA 和 AT2mRNA

表 1 手术组和假手术组血压、LVMI、CSA 及血浆 AngⅡ水平比较

指标	假手术组	手术组	*P* 值
SAP(mmHg)	137.34 ± 16.62	206.74 ± 19.78	<0.01
DAP(mmHg)	106.16 ± 8.45	142.75 ± 16.41	<0.01
MAP(mmHg)	120.67 ± 10.33	173.13 ± 18.59	<0.01
LVMI(mg/g)	2.06 ± 0.23	2.88 ± 0.33	<0.01
APOI(%)	1.14 ± 0.28	10.72 ± 1.76	<0.01
CSA(μm^2)	256.75 ± 52.80	336.13 ± 65.35	<0.05
AngⅡ(pg/ml)	296.72 ± 24.76	466.75 ± 51.06	<0.01

胞增生、间质纤维化和炎性细胞侵润(见图 1 和2);左室肥厚指标结果显示手术组血压、LVMI、CSA、APOI 及血浆 AngⅡ水平均较假手术组明显升高,均有统计学意义,见表 1。

2.2 免疫组化及 RT-PCR 法检测 AT_1 和 AT_2

实验显示手术组 AT_1 和 AT_2 从蛋白及基因水平

重庆维普 http://www.cqvip.com

表 2 手术组和假手术组 AT1 和 AT2 蛋白及基因表达水平的比较

指标	假手术组	手术组	P 值
AT_1 蛋白	0.13 ± 0.05	0.49 ± 0.14	<0.01
AT_2 蛋白	0.09 ± 0.04	0.41 ± 0.06	<0.01
AT_1mRNA/GAPDHmRNA	0.76 ± 0.13	1.61 ± 0.37	<0.01
AT_2mRNA/GAPDHmRNA	0.30 ± 0.10	0.81 ± 0.18	<0.01

表达均较假手术组增强，有明显统计学差异，见表2。

3 讨 论

目前认为高血压左室重构主要有 LVH 和心肌纤维化[1]，表现为明显的左室重量增加、心肌细胞肥大、心肌细胞凋亡、间质细胞增生、血管周围纤维化和间质纤维化。本试验通过腹主动脉缩窄法建立左室肥厚模型观察到：术后 4 周，手术组心肌细胞体积增大、排列紊乱、血管周围纤维化、间质增生、炎性细胞侵润；LVMI 增加 40%、心肌细胞 CSA、APOI显著增加，说明本实验模型建立成功[2]能用于 LVH 的研究。

肾素血管紧张素系统(RAS)的激活对左室肥大起至关重要的作用，AngⅡ是 RAS 重要效应因子，AngⅡ主要与其受体(主要是 AT_1 和 AT_2)结合发挥作用，其大部分作用如：收缩血管，升高血压，促进醛固酮、抗利尿激素、内皮素等的合成和释放，刺激交感神经，促进心肌肥大、间质增生，刺激血管平滑肌细胞增殖和迁移，诱导纤维化等是通过 AT_1 介导已被广泛认可[1,3]。既往已通过左室肥厚模型观察到在左室肥厚过程中 AT_1 表达增高促进心肌细胞肥大增殖[4]。对于 AT_2 作用了解甚少，有研究显示：AT_2 具有拮抗 AT_1 的功能，起着对抗细胞生长、心肌肥厚及促细胞分化、凋亡作用，扩张血管、降低血压，抑制纤维化等作用[5~12]。

本实验应用腹主动脉缩窄法成功建立左室肥厚模型，并通过检测左室肥厚指标及 AT_1 和 AT_2 表达变化观察到：在高血压引起 LVH 过程中，AT_1 和AT_2 表达均上调，手术组 LVMI、心肌细胞 CSA、APOI 及AngⅡ均较假手术组明显升高；镜下见心肌细胞肥大，间质增生、纤维化，炎性细胞侵润均较假手术组明显，这一实验结果与以前试验结果相符。该试验结果显示：在高血压引起的左室肥厚过程中，RAS 激活，AngⅡ水平升高，肥厚心肌细胞中 AT_1 和 AT_2 从蛋白和 mRNA 表达水平均升高。升高的 AngⅡ一部分与AT_1 结合促进细胞增殖、心肌细胞肥大、间质增生等，另一部分通过与 AT_2 结合发挥抑制生长、分化、抑制纤维化作用，这一结果与以前的研究结果相符[6~13]，这说明在左室肥厚过程中 AT_1 和 AT_2 表达比例发生变化二者共同参与 LVH 过程，但二者可能发挥相互拮抗的作用，这提示在以后临床治疗高血压性心脏病左室肥厚可通过调节 AT_1 和 AT_2 表达比例来改善心室重构。

参 考 文 献

[1] Baker KM, Cherin MI, Wixon SK, et al. Renin angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rats [J]. Am J Physio, 1990; 59(3): 324-H332.

[2] PeterRK, Ted DF. Electrophysiological effects of left ventricular hypertrophy. Effect of calcium and potassium channel blockade [J]. Circulation, 1991; 83(6): 2067-2075.

[3] Harada K, Sugaya T, Murakami K, et al. Angiotensin Ⅱ type 1a receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction [J]. Circulation, 1999; 100(20): 2093-2099.

[4] Malhotra R, Sadoshima J, Brosius FC, et al. Mechanical stretch and angiotensin Ⅱ differentially upregulate the rennin-angiotensin system in cardiac myocytes in vitro[J]. Cir Res, 1999; 85(1): 137.

[5] Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, et al. The angiotensin II type 2(AT_2)receptor antagonizes the growth effect of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92(3): 10663-10667.

[6] Stoll M, Steckelings M, Paul M, et al. The angiotensin AT_2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells[J]. J Clin Invest, 1995; 95(8): 651-657.

[7] Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, et al. The angiotensin II AT_2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells[J]. Mol Cell Endocrinol, 1996; 122(2): 59-67.

[8] Morrissey JJ, Klahr S. Effect of AT_2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis[J]. Am J Physiol, 1999; 276 (1 pt 2): F39-F45.

(下转第 1135 页)

重庆维普 http://www.cqvip.com

成脊柱或双下肢全长图像，图像密度均匀性、拼接质量及临床测量能够达到医疗的需要，但 CR 图像的空间分辨率和信噪比不及 DR 图像[3-4]。MRI 系统的全脊柱拼接成像有报告，MRI 能够获得密度均匀性好且拼接准确的理想的全脊柱影像，但缺点是 MR扫描病人不能直立检查，而脊柱侧弯需要观察重力状态下的侧弯程度，且 MRI 检查费用昂贵[5]。

近年来，DR 在图像拼接技术方面有很大提高，DR 拼接图像的原始图像采集方式有两种。一种图像拼接，往往是 X 线管垂直上下移动的同时，DR 平板探测器跟随 X 线管实现同步移动。另一种图像拼接，X 线管相对静止在一个感兴趣区中心位置，当 DR 平板探测器在上下做垂直运动的同时，X 线管上下转动角度。这两种方式只要有合适的图像拼接软件都可以满足临床诊断和治疗的需要，我院采用的是第一种方式，对 35 例骨科患者进行了全景拼接成像(见表 1)，获得较为满意的全脊柱侧弯病人术前、术后拼接图像和双下肢拼接图像(见图 1~3)。个矮的患者下肢全景成像通常两次曝光采集可完成。部分疾病的拼接图像临床医师不要求观察骨盆，仅显示从股骨开始的全景像，曝光采集两次完成，可降低患者的辐射剂量。准确拼接全脊柱和下肢图像的关键有两个要点，一个是轴线，二是缝线，图像轴线要对齐且不能成角，图像的衔接处不能分离且重叠较少，才能保证图像不变形，使测量更加准确。Canon 图像处理软件有一定的缺陷，无图像平滑处理，因此全景图像的密度均匀性不是很理想，但拼接的脊柱和下肢的全长图像及角度、长度测量可以满足骨科临床医疗需要。

参 考 文 献

[1] 张旭峰，严壮志，N.R.Wanigasekara，等.基于拼接技术的医学 X 光片全景成像[J]. 航天医学与医学工程，2005；18(5)：360-364.

[2] Yaniv Z，Joskowics L.Long bone panoramas from fluoroscopic X-ray images[J]. IEEE Trans Medical Imaging，2004；23(1)：26-36.

[3] 凌寿佳，黄仲奎，龙莉玲，等.全脊柱 CR 单次曝光与多次曝光成像的比较[J]. 实用放射学杂志，2006；22(10)：1285-1287.

[4] 白亚妮，贺洪德，邓振生.CR 在双下肢全长投照技术中的应用[J]. 实用放射学杂志，2006；22(9)：1141-1142.

[5] 杨 勇，贾勤刚，徐常杰，等.MRI 全脊柱移床扫描对脊柱疾病的诊断[J]. 实用放射学杂志，2004；20(7)：614-616.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 1053 页)

[9] Akishita M，Wu L.Inhibitory effect of angiotensin Ⅱ type 2 receptor on arterial remodeling after aortic binding in mice[J]. Circulation，2000；102(14)：1684-1689.

[10] Siragy HM，Inagami T，Ichiki T，et al.Sustained hypersensitivity to angiotensin Ⅱ and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT_2) angiotensin Ⅱ receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1999；96(11)：6506-6510.

[11] Jozef B，Ellen OW，Minori T，et al. Angiotensin Ⅱ type 2 receptor blockade amplifies the early signals of cardiac growth response to angiotensin Ⅱ in hypertrophied hearts[J]. Circulation，1999；99(1)：22-25.

[12] Lakó-Futó Z，Szokodi I，Sármán B，et al.Evidence for a functional role of angiotensin Ⅱ type 2 receptor in the cardiac hypertrophic process In vivo in the rat heart[J]. Hyper-tension，2003；108(19)：2414-2422.

[13] Masaki H，Kurihara T，Yamaki A，et al.Cardiac-specific over-rexpression of angiotensin Ⅱ AT_2 receptor causes attenuated response to AT_1 receptor-mediated pressor and chonotropic effects[J]. J Clin Invest，1998；101(3)：527-535.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 1066 页)

1389.

[8] Richard EBS，Elisabeth AS，Naohiko K，et al. Cooperative interactions of laminin 5 γ2 chain，matrix metalloproteinase-2，and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vas- culogenesis by aggressive melanoma[J]. Cancer Res，2001；61(17)：6322-6327.

[9] Anil KS，Mavis SF，Jeremy EC，et al. Functional role of matrix metal-loproteinases in ovarian tumor cell plasticity[J]. Am J Obstet Gynecol，2004；190(4)：899-909.

[10] Angla RH，Elisabeth AS，Richard EBS，et al. Phosphoinositide-3-kinase regulates membrane type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry[J]. Cancer Res，2003；63(16)：4757-4762.

[11] Hess AR，Seftor EA，Gruman LM，et al. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway：implications for vasculogenic mimicry[J]. Cancer Biol Ther，2006；5(2)：228-233.

[12] Seftor EA，Meltzer PS，Kirschmann DA，et al. The epigenentic reorogra-mming of poorly aggressice melanoma cells by metastatic microenvironment[J]. J Cell Mol Med，2006；10(1)：174-196.

(责任编辑：谭乐勤)