

## 两肾一夹型高血压大鼠重塑血管对血管紧张素 II 反应变化及其机制

王双<sup>1</sup>, 万载阳<sup>2</sup>, 唐朝克<sup>2</sup>, 李悦梅<sup>2</sup>, 杨永宗<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅医学院, 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 肾性高血压大鼠的血管反应变化及其机制; 逆转录聚合酶链反应; 血管重塑; 血管紧张素 $\text{I}_1$  血管紧张素受体

[摘要] 为了探讨两肾一夹型高血压大鼠重塑血管对血管紧张素 $\text{I}_1$ 的反应变化及其机制, 在制作两肾一夹型高血压大鼠模型血管基础上, 观察了两肾一夹型高血压大鼠大、小动脉的形态学改变; 用肠系膜微血管口径显微电视测量法和离体血管环灌注实验分别观察了两肾一夹型高血压大鼠肠系膜动脉和胸主动脉对血管紧张素 $\text{I}_1$ 的反应以及洛沙坦对该反应的作用; 并用逆转录-聚合酶链反应检测两组动物胸主动脉血管紧张素 $\text{I}_1$ 型受体 mRNA 和 2 型受体 mRNA 的表达。结果发现两肾一夹型高血压大鼠胸主动脉和肠系膜动脉中膜厚度增加, 细胞层数增加, 胶原纤维及弹力纤维含量增加; 随着血管紧张素 $\text{I}_1$ 的浓度升高, 肠系膜动脉、离体胸主动脉环收缩反应增加, 而且在每一个血管紧张素 $\text{I}_1$ 浓度, 两肾一夹型高血压大鼠肠系膜动脉和离体胸主动脉环对血管紧张素 $\text{I}_1$ 的收缩反应都比对照组增强; 洛沙坦完全阻断离体胸主动脉环对血管紧张素 $\text{I}_1$ 的反应; 两肾一夹型高血压大鼠胸主动脉血管紧张素 $\text{I}_1$ 型受体 mRNA 表达增多, 血管紧张素 $\text{I}_2$ 型受体 mRNA 也有表达, 而正常大鼠未见血管紧张素 $\text{I}_2$ 型受体 mRNA 表达。此结果提示: (1) 两肾一夹型高血压大鼠重塑血管对血管紧张素 $\text{I}_1$ 的反应增强, 洛沙坦完全阻断血管对血管紧张素 $\text{I}_1$ 的反应; (2) 血管紧张素 $\text{I}_1$ 型受体 mRNA 表达增多可能是两肾一夹型高血压大鼠重塑血管对血管紧张素 $\text{I}_1$ 的反应增强的机制之一。

[中图分类号] R353

[文献标识码] A

### The Change and the Mechanism in the Reactivity of Remodeling Vessel of Renal Hypertension Rats to Angiotensin $\text{I}_1$

WANG Shuang<sup>1,2</sup>, WAN Zai-Yang<sup>2</sup>, TANG Chao-Ke<sup>2</sup>, LI Yue-Mei<sup>2</sup>, and YANG Yong-Zong<sup>2</sup>

(1. Xiangya Medical College, Central South University, Changsha, 410078; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Hypertension; Vascular Remodeling; Angiotensin $\text{I}_1$ ; Angiotensin $\text{I}_1$  Type 1 Receptor; Angiotensin $\text{I}_2$  Type 2 Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of the change in the reactivity of the remodeling vessels of hypertension to Angiotensin $\text{I}_1$  (Ang $\text{I}_1$ ). **Methods** Use the method of Video-Microscope to observe the contractility of the third embanchment of the mesentery artery of the normotensive Sprague-Dawley (SD) rats and the two-kidney one-clip (2K1C) renal hypertension (RH) rats to Ang $\text{I}_1$ . Use the method of isolation vascular ring perfusion to exploration the activity to Ang $\text{I}_1$  of the aortic rings either group rats and the effect of losartan on the activity. Use RT-PCR to measure AT1R mRNA and AT2R mRNA expression in the thoracic aorta of either group rats. **Results** All of the contractility of the aortic rings and the third embanchment of the mesentery artery to Ang $\text{I}_1$  increased with dose-dependent, and the contractility of the remodeling vessels of the 2K1C RH rats to Ang $\text{I}_1$  toned up more evidently at every dose of angiotensin $\text{I}_1$ . Losartan block the the contractility of the aortic rings to Ang $\text{I}_1$  completely. AT1R mRNA expression in the thoracic aorta of 2K1C RH rats is more than which in the the thoracic aorta of normotensive rats and AT2R mRNA express only in the thoracic aorta of 2K1C RH rats. **Conclusions** (1) The response of the remodeling vessel in hypertension to Ang $\text{I}_1$  one up. (2) The mechanism of change in the reactivity of remodeling vessel of renal hypertension rats to Angiotensin $\text{I}_1$  may due to AT1R mRNA up regulated.

随着对高血压血管形态学变化及其机制研究的深入, 人们开始关注重塑 (remodeling) 血管的功能变

化。国内外有文献报道, 慢性高血压机体小动脉对去甲肾上腺素的收缩反应升高、对乙酰胆碱的舒张

[收稿日期] 2003-05-08

[修回日期] 2003-10-25

[基金项目] 国家九七三项目 (G20000569) 和南华大学项目 (5-01-XJ-042) 资助

[作者简介] 王双, 女, 1971 年出生, 安徽省安庆市人, 硕士, 讲师, 研究方向为心血管疾病, 联系电话 0734-8281277, E-mail: swansino@hotmail.com。杨永宗, 男, 1937 年出生, 福建省仙游县人, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化; 为本文通信作者, 联系电话 0734-8281288, E-mail: yzang@mail.hy.hn.cn。

反应减弱<sup>[3]</sup>,但对血管紧张素(angiotensin, Ang) ②的反应变化尚鲜见报道。两肾一夹型高血压大鼠在缩窄肾动脉后血浆肾素活性与血管紧张素 ②水平立即升高,是研究该系统与血管重塑关系的良好动物模型<sup>[4]</sup>。本文研究两肾一夹型高血压大鼠大动脉的重塑特征、重塑动脉血管紧张素 ①型受体(angiotensin ①type 1 receptor, AT1R) mRNA 和 AT2R mRNA 的表达情况、重塑大小动脉对 Ang ②的反应以及 AT1R 拮抗剂对该反应的影响,希望为临床应用肾素-血管紧张素系统抑制剂、拮抗剂治疗高血压提供更充分的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物分组及手术<sup>[5]</sup>

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重 140~160 g。随机分成实验组和对照组。实验组用 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,背位固定,行腹部正中左侧 2 cm 切口,暴露左肾并钝性分离出左肾动脉,用直径为 0.2 mm 的银夹套在左肾动脉上,造成左肾动脉部分狭窄,右侧肾脏保持不动,以复制两肾一夹型高血压模型。对照组只分离左肾动脉不套银夹,术后自由进食和饮水。

术后 6 周行颈总动脉插管,用二道生理记录仪(LMS-2B 型,成都仪器厂)记录颈总动脉平均动脉压,实验组取平均动脉压大于 150 mm Hg 者( $n=24$ ),对照组取平均动脉压小于 120 mm Hg 者( $n=24$ )。每组各 6 只用于胸主动脉和肠系膜动脉形态学的观察;各 6 只用于血清血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)、血浆 Ang ②含量的测定以及胸主动脉 AT1R mRNA 和 AT2R mRNA 的检测,每组各 6 只用于肠系膜微血管口径测量,每组各 6 只用于离体胸主动脉环灌流。

### 1.2 血清血管紧张素转化酶活性和血浆血管紧张素 ②含量测定

1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,心脏采血,用紫外分光光度法测定 ACE 的活性,ACE 试剂盒由海军总医院提供。用放射免疫法测定血浆 Ang ②的含量,Ang ②试剂盒由中国科学院原子能同位素研究所提供。

### 1.3 各级动脉形态学观察<sup>[6]</sup>

胸主动脉和肠系膜动脉于 10% 的福尔马林中固定,石蜡包埋,均匀切片 5~10 张,切片厚度 5  $\mu$ m,分别进行 HE 染色、胶原染色和弹力纤维染色。用 HPIAS-1000 型图象分析系统(武汉同济医学院华海公司)测量血管中膜厚度、细胞层数、弹力纤维及胶

原纤维含量。

### 1.4 肠系膜微血管口径显微电视测量

1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,腹部正中切口,拉出一段肠系膜固定,置于体视显微镜(JSZ8 型体视显微镜,南京江南光电集团股份有限公司)下,恒温(37℃)恒速滴加 Krebs 液(Krebs 液成分为:NaCl 6.9 g, KCl 0.35 g, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.29 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.16 g, CaCl<sub>2</sub> 0.28 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.0 g, 葡萄糖 2.0 g 溶于 1 000 mL 双蒸馏水中)。先测定肠系膜动脉的初始口径,然后每隔 10 min 由低浓度到高浓度( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 和  $10^{-6}$  mol/L)滴加预热至 37℃的 Ang ②参考赵克森<sup>[7]</sup>和金惠铭<sup>[6]</sup>等关于微血管口径的显微电视测量法,于 5 min 后测量肠系膜动脉口径。

### 1.5 离体胸主动脉环灌流<sup>[9]</sup>

颈总动脉放血处死后迅速打开胸腔,取出胸主动脉,放入 4℃ Krebs 液中。仔细剥除血管周围脂肪和结缔组织,取两段长 3~4 mm 血管环,分别固定于含 37℃ 10 mL Krebs 液的恒温浴槽内,持续通入 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 混合气,用张力换能器(JH-Z 10 g, 北京航天医学工程研究所)在 Pclab 生理记录仪(VIR2.20, 北京微信斯达科技发展有限公司)上记录血管张力变化,调节动脉环前负荷为 2.0 g,平衡 1.5 h,在其中一个恒温浴槽中加入洛沙坦(终浓度为  $10^{-6}$  mol/L)孵育 30 min,观察并记录不同浓度 Ang ②( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 和  $10^{-6}$  mol/L)引起动脉环张力变化。洛沙坦由本校药理教研室馈赠,Ang ②购自 Sigma 公司。

### 1.6 胸主动脉血管紧张素 ①型受体 mRNA 和 2 型受体 mRNA 表达检测<sup>[10,11]</sup>

1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,取出胸主动脉,用 Trizol(购自 Sigma 公司)法提取组织总 RNA,逆转录-聚合酶链反应按试剂盒(购自北京鼎国生物工程公司)说明书进行。AT1R (572 bp)引物的上游为 5'-GCCTGCAGATGTTCCCTTTCCITTATG-3',下游为 5'-GCCGAATTCCTGAACCTGTCACTCCACG-3'; AT2R (476 bp)引物的上游为 5'-TGAGTCCGCATTTAACTGC-3',下游为 5'-ACCACTGAGCATATTTCTCGGG-3'; GAPDH (349 bp)引物的上游为 5'-CATGGTCTACATGT-TCCAGT-3',下游为 5'-GGCTAAGCAGTTGGTGGTGC-3'。以上引物由上海生物工程公司合成。95℃ 3 min 预变性后上机(PE 公司)循环,循环参数为 95℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环后 72℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物 10  $\mu$ L, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果,凝胶成像系统测定吸光度值(A/mm<sup>2</sup>),以 AT1R 与 GAPDH 的 A/mm<sup>2</sup> 比值、AT2R 与 GAPDH 的

A/mm<sup>2</sup> 比值分别半定量表示 AT1R 和 AT2R 的 mRNA 含量,重复三次。

### 1.7 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 所用统计学方法为 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差别有显著性。

## 2 结果

### 2.1 两组大鼠血压改变

对照组大鼠平均动脉压为  $104 \pm 11$  mm Hg, 实验组大鼠平均动脉压  $158 \pm 7$  mm Hg, 两组大鼠平均动脉压差异有显著性统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明两肾一夹型肾性高血压模型制作成功。

### 2.2 两组大鼠肾素—血管紧张素系统活性改变

对照组血浆 Ang II 浓度为  $48.5 \pm 8.3$  ng/L, 实验组为  $85.6 \pm 10.9$  ng/L, 两组相比, 差异有显著性统计学意义 ( $P < 0.05$ )。对照组血清 ACE 活性为  $38.1 \pm 4.9$  U, 实验组为  $59.5 \pm 6.7$  U, 两组相比, 差异有显著性统计学意义 ( $P < 0.05$ )。此结果表明肾性高血压大鼠 RAS 系统被激活。

### 2.3 两组大鼠动脉形态变化

2.3.1 胸主动脉形态改变 两组大鼠胸主动脉形态改变的定量分析见表 1 (Table 1)。可见实验组中膜厚度增加, 细胞层数增加, 胶原纤维和弹力纤维含量增加, 与对照组比较, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 说明实验组胸主动脉形态结构发生明显变化, 存在血管重塑。

表 1. 胸主动脉形态改变

Table 1. The morphologic change of the thorac aorta

分 组	中膜厚度 ( $\mu\text{m}$ )	细胞层数	胶原纤维 ( $\times 10^{-2}$ )	弹力纤维 ( $\times 10^{-2}$ )
对照组	$87.5 \pm 3.6$	$7.00 \pm 0.23$	$4.94 \pm 1.31$	$13.5 \pm 1.3$
实验组	$107.1 \pm 3.1^a$	$8.83 \pm 0.31^a$	$7.01 \pm 0.25^a$	$21.6 \pm 2.4^a$

a:  $P < 0.05$  与对照组比较

2.3.2 肠系膜动脉形态改变 两组大鼠肠系膜动脉形态改变的定量分析见表 2 (Table 2)。可见实验组肠系膜动脉中膜厚度增加, 细胞层数增加, 胶原纤维及弹力纤维含量增加, 与对照组比较, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 说明实验组肠系膜动脉发生了血管重塑。

### 2.4 两组大鼠动脉对血管紧张素 II 的反应改变

2.4.1 肠系膜微循环观察 肠系膜血管对 Ang II 的反应性见图 1 (Figure 1)。可见随着 Ang II 的浓度升高, 肠系膜动脉缩窄的程度增加, 两者呈剂量依

赖性效应关系; 而且在每一个给定的 Ang II 浓度, 实验组肠系膜动脉对 Ang II 的收缩反应都明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 说明实验组大鼠小动脉对 Ang II 的反应性增强。

表 2. 肠系膜动脉形态改变

Table 2. The morphologic change of the arteria mesenterica

分 组	中膜厚度 ( $\mu\text{m}$ )	细胞层数	胶原纤维 ( $\times 10^{-2}$ )	弹力纤维 ( $\times 10^{-2}$ )
对照组	$17.3 \pm 2.8$	$2.40 \pm 0.24$	$6.32 \pm 0.59$	$7.2 \pm 0.6$
实验组	$24.8 \pm 1.9^a$	$3.60 \pm 0.17^a$	$7.23 \pm 0.50^a$	$10.3 \pm 1.0^a$

a:  $P < 0.05$  与对照组比较

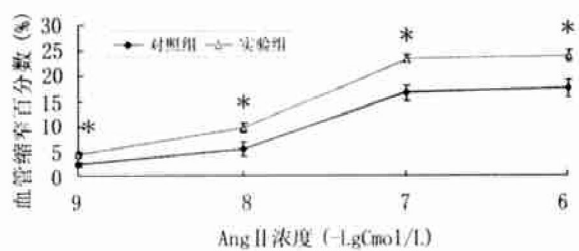


图 1. 肠系膜动脉对血管紧张素 II 的反应 \* :  $P < 0.05$ , 与对照组比较

Figure 1. The response of the arteria mesenterica on Ang II

2.4.2 离体胸主动脉环灌流实验 离体胸主动脉环对 Ang II 的反应见图 2 (Figure 2), 可见随着血管紧张素 II 的浓度升高, 离体胸主动脉环收缩反应增加, 两者呈剂量依赖性效应关系; 而且在每一个给定的 Ang II 浓度, 实验组离体胸主动脉环对 Ang II 的收缩反应都明显强于对照组 ( $P < 0.05$ ), 说明实验组大鼠胸主动脉对 Ang II 的反应增强。

洛沙坦完全阻断离体胸主动脉环对 Ang II 的缩血管反应, 实验组和对照组与洛沙坦孵育后, 两者对 Ang II 都失去反应。

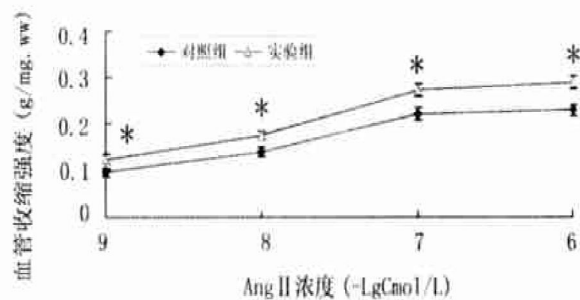


图 2. 离体胸主动脉环对血管紧张素 II 的反应 \* :  $P < 0.05$ , 与对照组比较

Figure 2. The response of the isolation thoracic aorta ring on angiotensin II

## 2.5 大鼠胸主动脉血管紧张素 $\text{①}$ 受体 mRNA 表达

大鼠胸主动脉血管紧张素 $\text{①}$ 受体 mRNA 的表达见图 3(Figure 3)。可见实验组胸主动脉 AT1R mRNA 表达增多,与对照组进行比较,差异有显著性( $P < 0.05$ );AT2R mRNA 在对照组胸主动脉不表达,而在实验组有表达。

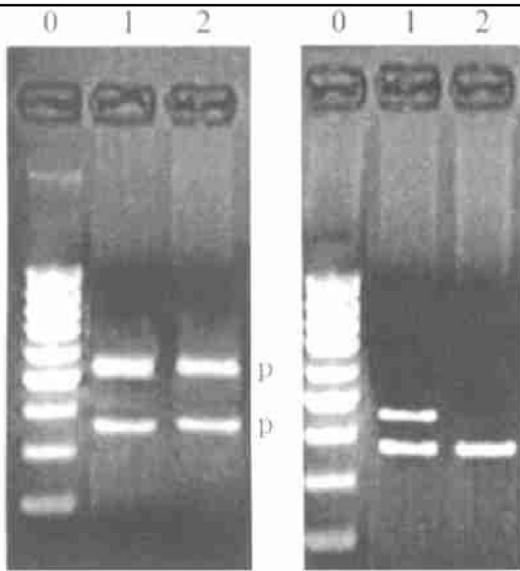


图 3. 胸主动脉血管紧张素 1 型受体 mRNA 和 2 型受体 mRNA 的表达 左为 AT1R, 右为 AT2R。0 为 Marker, 1 为实验组, 2 为对照组。

Figure 3. AT1R mRNA and AT2R mRNA expression in the thoracic aorta

## 3 讨论

随着对高血压血管形态学变化及其机制研究的深入,人们开始关注重塑血管的功能变化。国内外有文献报道,慢性高血压机体小动脉对去甲肾上腺素的收缩反应升高、对乙酰胆碱的舒张反应减弱,但对 Ang $\text{①}$ 的反应变化尚鲜见报道<sup>[12]</sup>。

本文通过制作两肾一夹型肾性高血压大鼠模型,使 SD 大鼠血压升高、血浆 Ang $\text{①}$ 含量升高、ACE 活性增强,以获得重塑的各级动脉并研究后者对 Ang $\text{①}$ 的反应变化及其机制。术后六周,对实验组大鼠和对照组大鼠胸主动脉、肠系膜动脉分别进行形态学观察,结果表明各级动脉中膜厚度增加,细胞层数增加,胶原纤维及弹力纤维含量增加,说明两肾一夹型高血压大鼠大、小动脉均发生肥厚性、增生性重塑。

在动物模型制作成功的基础上,本文作者用微血管口径显微电视测量法观察了在体肠系膜动脉对 Ang $\text{①}$ 的反应,用离体血管环灌流的方法观察了离体

主动脉环对 Ang $\text{①}$ 的反应,结果表明两肾一夹型肾性高血压大鼠重塑大、小动脉对 Ang $\text{①}$ 的反应都增高,提示重塑血管有功能改变,后者也可能是参与高血压发生发展的重要机制之一。

洛沙坦可以完全阻断 Ang $\text{①}$ 对正常鼠和两肾一夹型肾性高血压大鼠的缩血管效应。用 RT-PCR 检测胸主动脉 AT1R mRNA 和 AT2R mRNA 的含量,两肾一夹型高血压大鼠胸主动脉 AT1R mRNA 表达增多,AT2R mRNA 有表达;正常大鼠未见 AT2R mRNA 表达。以上结果提示两肾一夹型高血压大鼠重塑血管对 Ang $\text{①}$ 的反应升高,与 AT1R 表达增多有关,AT2R 不介导 Ang $\text{①}$ 对血管的舒缩反应。

血管紧张素(Ang) $\text{①}$ 引起高血压血管重塑的机制还有待于进一步阐明,尤其是其作用于 AT2R 产生的生物学效应有待于进一步明确,以利于针对血管重塑的关键环节如内皮不良功能、细胞生长和凋亡的不平衡等方面对高血压疾病进行积极有效的防治<sup>[13]</sup>;对重塑血管功能的研究也待进一步的深入,后者也是高血压得以维持和恶化的重要因素之一。

## [参考文献]

- [1] Van de Voorde J, Vanheel B, Leusen I. Endothelium dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. *Circ Res*, 1992, **70** (1): 1-8
- [2] Saito Y, Berk BC. Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin $\text{①}$  to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, **33** (1): 3-7
- [3] Signon DH, Beierwaltes WH. Influence of nitric oxide in the chronic phase of two kidney, one clip renovascular hypertension. *Hypertension*, 1998, **31** (2): 649-656
- [4] Marson O, Saragoca MA, Ribeiro AB, Bossolan D, Tufik S, Ramos OL. Anteroventral third ventricle and renin-angiotensin system interaction in the two kidney, one clip hypertensive rat. *Hypertension*, 1983, **5** (6Pt3): V90-93
- [5] Doyle AE, Harrap SB, Torresi J. Pressor sensitivity to angiotensin I and angiotensin $\text{②}$  during the development of experimental renal hypertension in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1986, **13** (7): 563-568
- [6] 杜乃立, 戴文航, 丘喜盛, 朱鼎良. 依那普利和洛沙坦对自发性高血压大鼠血管重塑的影响. *中国现代医学杂志*, 2000, **10** (8): 1-3
- [7] 杨贵远, 赵克森, 姜勇. 一氧化氮参与失血性休克后期血管反应性下降. *第一军医大学学报*, 1999, **19** (1): 36-38
- [8] 金惠铭, 陈达信, 段继才, 阎友珍. 小鼠肠系膜微血管口径的显微电视简易测量法. *上海第一医学院学报*, 1991, **11** (1): 13-14
- [9] Dillon PF, Root-Bernstein RS, Holsworth DD. Augmentation of aortic ring contractions by angiotensin $\text{①}$  antisense peptide. *Hypertension*, 1998, **31** (3): 854-860
- [10] Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW Jr. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol*, 1999, **277** (3Pt2): F437-446
- [11] Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin $\text{①}$  type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1998, **32** (3): 467-472
- [12] 支建明, 刘忠保, 赵荣瑞. Losartan 对肾性高血压大鼠冠状动脉血流量的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (4): 330-332
- [13] Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, 2001, **38** (3Pt2): 581-587

(此文编辑 朱雯霞, 胡必利)