

[文章编号] 1007-3949(2009)17-05-0375-04

• 实验研究 •

阿托伐他汀对高血压大鼠心脏血管紧张素转换酶 2 表达的影响

张林叶¹, 邢文², 王安才²

(1. 安徽省芜湖市第二人民医院心内科; 2. 弋矶山医院干内科, 安徽省芜湖市 241000)

[关键词] 高血压; 血管紧张素转换酶 2; 血管紧张素 Ang ; 心肌重构; 阿托伐他汀; 缬沙坦

[摘要] 目的 观察阿托伐他汀对两肾一夹高血压大鼠心脏血管紧张素转换酶 2 及心肌重构表达的影响, 探讨阿托伐他汀改善心肌重构可能的新作用机制。方法 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 5 组, 每组 8 只: 假手术组、血管紧张素转换酶 2 高血压组、缬沙坦组、阿托伐他汀 10 mg/(kg·d) 组和阿托伐他汀 30 mg/(kg·d) 组。测定药物干预后血压变化及全心重量、左心室重量、左心室重量指数; 免疫组织化学法检测心脏血管紧张素转换酶 2 蛋白表达; 放射免疫法测定心肌组织血管紧张素 Ang 水平; 逆转录聚合酶链反应法检测心脏血管紧张素转换酶 2 mRNA 表达。结果 (1) 高剂量阿托伐他汀组较高血压组血压降低显著 ($P < 0.01$)。 (2) 药物干预后高剂量阿托伐他汀组全心重量、左心室重量、左心室重量指数低于高血压组 ($P < 0.05$)。 (3) 高剂量阿托伐他汀组较高血压组降低心肌组织血管紧张素 Ang 浓度显著 ($P < 0.01$)。 (4) 缬沙坦组、阿托伐他汀组心脏血管紧张素转换酶 2 蛋白表达较高血压组增强。 (5) 逆转录聚合酶链反应显示各组大鼠心脏组织中均有血管紧张素转换酶 2 mRNA 的表达, 缬沙坦组、低剂量、高剂量阿托伐他汀组较高血压组不同程度增高 ($P < 0.05$)。结论 阿托伐他汀在降低血压的同时, 具有改善心肌重构作用, 其可能是通过降低心肌组织血管紧张素 Ang 浓度, 增加心脏组织血管紧张素转换酶 2 蛋白表达, 增加心脏组织血管紧张素转换酶 2 mRNA 表达来实现的。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Atorvastatin on the Expression of Angiotensin-converting Enzyme 2 in the Heart of Hypertensive Rats

ZHANG Lin-Ye, XING Wen, and WANG An-Cai

(Department of Cardiology, Wuhu Second People's Hospital, Wuhu 241000, China)

[KEY WORDS] Hypertension; Angiotensin-converting enzyme 2; Angiotensin Ang ; Myocard remodeling; Atorvastatin; Valsartan

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of atorvastatin on the expressions of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) with heart in two kidney and one-clamp (2K1C) hypertensive rats. To discuss new possible mechanism of atorvastatin on improving myocard remodeling. **Methods** Fifty adult male Wistar rats were randomly divided into five groups ($n = 8$): control group, 2K1C hypertension group, valsartan group, atorvastatin 10 mg/(kg·d) group and atorvastatin 30 mg/(kg·d) group. SBP was measured before making 2K1C hypertension model after drugs were given for 4 weeks and 8 weeks by tail-cuff method. After 8 weeks, entire heart and left ventricle were weighed. The left ventricular weight index was calculated. The distribution and expression of ACE2 in heart were detected by immunohistochemistry and the expression of ACE2 mRNA was determined by RT-PCR. The myocardial angiotensin Ang level was measured by radioimmunoassay. **Results** The high dose atorvastatin and valsartan group could make SBP significantly decreased compared with the hypertension group ($P < 0.01$). (2) Compared with the hypertension group, entire heart weight, left ventricular weight and left ventricular weight index were decreased in the control, high dose atorvastatin and valsartan group after all drugs were given for 8 weeks ($P < 0.05$). (3) The level of angiotensin Ang in rat myocardium tissue was decreased in high dose atorvastatin group compared with that of the hypertension group ($P < 0.01$). (4) The expression of ACE2 protein was increased in the valsartan, low and high dose atorvastatin group compared with that of the hypertension group. (5) ACE2 mRNA in heart was expressed in all rats. The levels of ACE2 mRNA expression increased differently by valsartan, low and high dose atorvastatin treatment compared with that of the hypertensive group ($P < 0.05$).

Conclusion Atorvastatin can improve myocard remodeling along with SBP decreases. The myocard remodeling effect of atorvastatin may be ascribed to the increased ACE2 in heart, the decreased angiotensin Ang in myocardium tissue.

[收稿日期] 2009-02-20

[修回日期] 2009-04-20

[作者简介] 张林叶, 硕士, 主治医师, 研究方向为高血压病防治及冠状动脉介入治疗, E-mail为 zhanglinye1791@163.com. 通讯作者 王安才, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病临床, 联系电话为 0553-5739308, E-mail为 yjswad@sina.com. 邢文, 硕士, 住院医师, 研究方向为老年心血管病, 联系电话为 0553-5739308, E-mail为 xingwen2004@sina.com.

他汀类药物发挥调脂作用的同时,人们发现其具有更多的非调脂作用,其中降压作用是其作用之一。阿托伐他汀能明显降低自发性高血压大鼠血压,心肌组织血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 浓度降低,心室重构改善,至于通过何种机制不明^[1],阿托伐他汀能降低自发性高血压大鼠的血压机制之一是对心肌 $\text{Ang}(\text{I})$ 受体有双重调节作用,即使 $\text{Ang}(\text{I})$ 受体1下调、 $\text{Ang}(\text{I})$ 受体2上调^[2]。阿托伐他汀是否通过体内的血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2 ACE2)来改善心肌重构目前尚未有报道。本实验通过观察高血压大鼠心脏ACE2的表达及心肌血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 水平变化,探讨他汀类药物改善心肌重构可能的新的作用机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠二肾一夹高血压模型的建立和分组

健康雄性Wistar大鼠40只,体重 220 ± 20 g购自河南大学实验动物中心,随机分成5组:假手术组;高血压组;缙沙坦 $20 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$;阿托伐他汀 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$;阿托伐他汀 $30 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。用3%戊巴比妥钠($30 \text{ mg}/\text{kg}$ 静脉点滴)麻醉大鼠,皮肤消毒后于剑突下 1.5 cm 处沿腹正中中线打开腹腔,分离左侧肾动脉,在近主动脉端用银夹(直径为 0.3 mm)夹住使其缩窄 $3/4$ 左右,建立二肾一夹(two kidney and one-clip, 2K1C)高血压模型,假手术组大鼠除不用银夹夹肾动脉外,其余操作同上。

1.2 给药和血压的测定

将阿托伐他汀(立普妥,辉瑞制药有限公司产品)药粉溶于少量蒸馏水中,缙沙坦(代文,北京诺华公司产品)药粉混于蒸馏水中制成悬液,采用灌胃法给药,每日上午定时一次,共8周。假手术组Wistar大鼠和正常对照的高血压大鼠均用等量生理盐水灌胃,每日一次。采用鼠尾容积法测量大鼠的尾动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP),分别在购入大鼠后术前、术后1周、给药4周、8周时测量一次血压,每只鼠连续测量收缩压3次,间隔 60 s 取其平均值。若手术后1周收缩压超过术前 30 mmHg 则认为模型成功。

1.3 大鼠重量、全心重量、左心室重量、左心室重量指数与心肌血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 的含量测定

大鼠处死后,立即开胸摘取心脏,剪去周围大血管,滤纸吸干心脏血液,称取全心湿重,沿房室环剪去心房及右室游离壁,称取余下的室间隔、左室游离壁作为左室湿重。取左心室游离壁心肌组织,准确

称取 0.2 g 在冰冷的生理盐水中漂洗数次,滤纸吸干,加入0.86%冷生理盐水 1.8 mL 充分研磨,制备成10%的心肌组织匀浆,每支试管中加入酶抑制剂(参照试剂说明书),煮沸 10 min , $3 \text{ kr}/\text{min}$ 离心 10 min ,取上清液迅速放入 -20°C 冰箱保存。制备心肌组织匀浆全过程在 4°C 条件下进行,并在 15 min 内完成。应用放射免疫法($\text{Ang}(\text{I})$ 放射免疫试剂盒,北京普尔伟业生物科技有限公司)测定心肌 $\text{Ang}(\text{I})$ 的含量。

1.4 大鼠心脏血管紧张素转换酶2免疫组织化学染色的观察

取左心肌 3 mm^3 ,用10%福尔马林固定,常规脱水、浸蜡、包埋,制成 $6 \mu\text{m}$ 肾脏切片,免疫组织化学法检测ACE2在心脏组织中的表达。一抗ACE2(C-18)(Canta Cruz, American), SP-9003免疫组织化学试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.5 RT-PCR法检测心脏ACE2 mRNA表达

在取心肌标本同时取心肌组织 100 mg 用于检测ACE2基因的表达。ACE2上游引物:5'-AAC ACC AAC ATT ACG GAG GAG-3',下游引物:5'-TCT TGC CAT CTC ATT TTT CAG G-3',扩增片段长度 426 bp 。 β -actin上游引物:5'-TCC TAG CAC CAT GAA GAT C-3',下游引物:5'-AAA CGC AGC TCA GTA ACA G-3',扩增片段长度 189 bp 。扩增体系 $25 \mu\text{L}$,扩增条件两个反应体系在同一PCR条件下反应,其程序为: 94°C 预变性 5 min 后,PCR循环 94°C 30 s \rightarrow 58°C 30 s \rightarrow 72°C 30 s 最后 72°C 延伸 10 min 。扩增ACE2基因用32个循环,而扩增 β -actin基因用26个循环。琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,紫外凝胶成像系统拍摄电泳照片,利用Quantity One软件对电泳条带的灰度值进行分析。

1.6 统计学方法

统计方法采用单因素方差分析,两两之间比较采用LSD检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高血压大鼠模型建立和药物干预情况

建立高血压模型各组术后收缩压明显高于假手术组($P < 0.01$);药物干预后,阿托伐他汀高剂量组 and 缙沙坦组与高血压组相比收缩压下降差异有显著性($P < 0.01$,图1)。

2.2 阿托伐他汀对大鼠体重、心脏重量、左心室重量和左心室重量指数的影响

给药8周后假手术组、阿托伐他汀高剂量组与

缬沙坦组大鼠重量 (body weight BW)、全心重量 (entire heart weight HW)、左心室重量 (left ventricular weight LVW)、左心室重量指数 (left ventricular weight index LVW I= LVW /BW) 均明显低于高血压组 ($P < 0.05$ 表 1)。

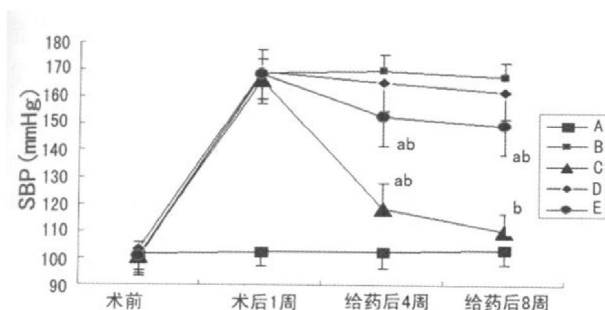


图 1 各组间的收缩压变化情况 ($n = 8$) (1 mm Hg = 0.133 kPa) A 为假手术组; B 为 2K1C 高血压组; C 为缬沙坦组; D~E 分别为阿托伐他汀 10、30 mg/(kg·d) 组。a 为 $P < 0.01$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$ 与 2K1C 高血压组比较。

表 1 各组大鼠体重、心脏重量、左心室重量和左心室重量指数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	BW (g)	HW (g)	LVW (g)	LVW I(mg/g)
高血压组	315.4 ± 15.6	1.36 ± 0.08	0.90 ± 0.09	2.85 ± 0.21
缬沙坦组	320.5 ± 17.8	1.18 ± 0.10 ^a	0.79 ± 0.10 ^a	2.46 ± 0.19 ^a
低阿托伐他汀组	317.0 ± 18.1	1.30 ± 0.09	0.88 ± 0.07	2.77 ± 0.28
高阿托伐他汀组	312.7 ± 21.4	1.21 ± 0.11 ^a	0.80 ± 0.12 ^a	2.55 ± 0.25 ^c
假手术组	311.7 ± 12.3	1.18 ± 0.12 ^a	0.69 ± 0.07 ^a	2.21 ± 0.24 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与高血压组比较。

2.3 阿托伐他汀对心肌组织血管紧张素 Ⅱ水平的 影响

与对照组相比, 高血压组和低剂量阿托伐他汀组心肌组织 AngⅡ浓度升高 ($P < 0.05$); 而阿托伐他汀高剂量组和缬沙坦组较高血压组显著降低 ($P < 0.05$ 表 2)。

表 2 8 周后各组大鼠心肌局部血管紧张素 Ⅱ浓度比较

分 组	n	AngⅡ浓度 (ng/g)
假手术组	8	4.38 ± 1.23 ^c
高血压组	8	9.17 ± 2.34 ^b
缬沙坦组	8	5.21 ± 1.02 ^c
阿托伐他汀 10 mg/(kg·d) 组	8	7.66 ± 1.87 ^b
阿托伐他汀 30 mg/(kg·d) 组	8	6.03 ± 1.09 ^{ca}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$ 与假手术组比较; c 为 $P < 0.01$ 与高血压组比较。

2.4 阿托伐他汀对心脏和肾脏血管紧张素转换酶 2 蛋白表达的影响

各组大鼠心肌细胞的胞浆中均可见 ACE2 蛋白表达 (深棕黄色颗粒), 假手术组心肌细胞的胞浆中均可见显著的 ACE2 蛋白表达; 与假手术组相比, 高血压组心肌细胞胞浆 ACE2 蛋白表达明显减少; 与高血压组比较, 缬沙坦组、阿托伐他汀 10 mg/(kg·d) 组、阿托伐他汀 30 mg/(kg·d) 组各组心肌细胞胞浆 ACE2 蛋白表达均呈不同程度的增强 (图 2)。

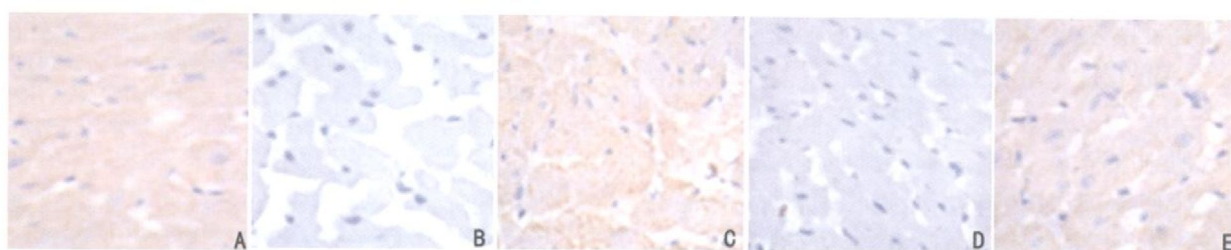


图 2 大鼠心脏组织血管紧张素转换酶 2 免疫组织化学染色 ($\times 400$) A 为假手术组 (■); B 为高血压组 (+); C 为缬沙坦组 (■); D 为阿托伐他汀 10 mg/(kg·d) 组 (■); E 为阿托伐他汀 30 mg/(kg·d) 组 (■)。■~■为心肌细胞 ACE2 有显著的表达 (棕黄色); ■为 ACE2 于心肌细胞有表达 (棕黄色); + 为心肌细胞的 ACE2 表达明显减少 (棕黄色)。

2.5 阿托伐他汀对肾脏血管紧张素转换酶 2 mRNA 表达的影响

各组大鼠心脏组织中均有 ACE2 mRNA 的表达。与假手术组相比, 高血压组组 ACE2 mRNA 表

达水平明显降低 ($P < 0.05$); 而缬沙坦组、阿托伐他汀 10 mg/(kg·d) 组、阿托伐他汀 30 mg/(kg·d) 组 ACE2 mRNA 表达水平与高血压组比较呈不同程度增高 ($P < 0.05$ 图 3 和表 3)。

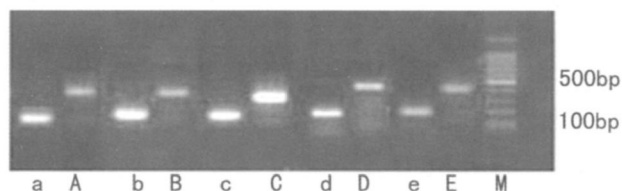


图3 各组血管紧张素转换酶 2 mRNA 电泳图 (426 bp) 与 β -actin (189 bp) M 为 Marker (100~2000 bp), A 为假手术组; B 为高血压组; C 为缬沙坦组; D 为阿托伐他汀 10 mg/(kg·d) 组; E 为阿托伐他汀 30 mg/(kg·d) 组。a h c d e 为对应 A, B, C, D, E 组 β -actin

表3 各组大鼠心脏组织血管紧张素转换酶 2 mRNA 表达

分 组	n	ACE2/ β -actin
假手术组	8	0.82 ± 0.10
高血压组	8	0.57 ± 0.08 ^a
缬沙坦组	8	1.04 ± 0.13 ^b
阿托伐他汀 10 mg/(kg·d) 组	8	0.81 ± 0.11 ^b
阿托伐他汀 30 mg/(kg·d) 组	8	0.96 ± 0.15 ^b

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与高血压组比较。

3 讨论

自从 2000 年 Donoghue 等^[3]发现 ACE2 以来, ACE2 研究一直颇受众多学者关注, 早有研究^[4]表明 ACE2 的基因位于人的 X 染色体上, 相当于高血压老鼠型 X 染色体上标记的未知基因的性状遗传位点, 可影响高血压的复杂表型的表达。ACE2 作为 RAS 系统新的调控成员, 能与体内血压水平以及局部如肾脏, 心脏及外周血管通过自分泌与旁分泌参与调控, 其很可能是高血压的一个新的候选基因。已有研究证明左心室 Ang II 水平与左心室重量呈正相关^[5], Ang II 是左室肥大的生长因子。ACE2 的效应分子 Ang (1-7) 具有舒张血管、降低血压、利尿、抑制心肌细胞肥大、抑制血管平滑肌细胞和心脏成纤维细胞增殖等作用, 且在体内外均能拮抗 Ang II 的活性^[6,7], ACE2 有望成为一个重要的治疗靶点。因此, 各种药物特别是影响 ACE2 生成以及降低 Ang II 活性的药物具有十分重要的临床价值。

有研究发现组织 RAS 主要来自局部自分泌或旁分泌产生, 基本不受循环肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 影响^[8], 细胞水平研究显示 ACE2 主要限制在血管内皮和肾小管上皮细胞, 循环中 ACE2 含量甚少, 在体外培养细胞的培

养基中也可以检测到它的一种可溶性的分泌形式^[3,9], 因而 ACE2 的活性可能是通过旁分泌或自分泌的途径起作用, 这对局部 RAS 的功能影响尤为重要, 也是调控靶器官损害机制的重要因素之一。

周鹏等^[10]在研究氧化型低密度脂蛋白对人体外血管内皮细胞 ACE2 表达的影响时, 发现阿托伐他汀可呈剂量和时间依赖性抑制氧化型低密度脂蛋白下调 ACE2 mRNA 和蛋白的表达。本实验亦发现一定剂量的阿托伐他汀在发挥降压作用的同时, 心肌重构改善, 心肌组织 Ang II 浓度降低, 而且这种降低作用可能存在量效关系; 实验发现心肌重构改善的同时, 心肌组织 ACE2 蛋白升高, 检测心肌组织 ACE2 mRNA 表达水平也是升高的。阿托伐他汀诱导心肌组织 ACE2 合成的增加, 使分解 Ang II 为 Ang (1-7) 的作用增强, 一方面降低 Ang II 的缩血管促心肌肥厚等作用, 一方面发挥了 Ang (1-7) 的抑制心肌细胞肥大、抑制血管平滑肌细胞和心脏成纤维细胞增殖等作用, 因而心肌重构改善。

[参考文献]

- [1] 王安才, 成 蓓, 谢晓竟, 等. 阿托伐他汀对自发性高血压大鼠心室重构的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9 (8): 880-884
- [2] 王安才, 成 蓓, 谢晓竟, 等. 阿托伐他汀对自发性高血压大鼠血压和心血管紧张素 AT_1 型和 AT_2 型受体表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (1): 40-44
- [3] 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
- [4] Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function [J]. Nature 2002, 417 (6891): 822-828
- [5] Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, et al. Converting enzyme inhibitors regress cardiac hypertrophy and reduced tissue angiotensin AT_1 in SHR [J]. J Hypertens 1991, 9 (7): 595-599
- [6] Iwata M, Cowling RT, Gurantz D, et al. Angiotensin (1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005, 289 (6): H2356-363
- [7] Grobe JL, Mecca AP, 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): H736-742
- [8] Urata H, Healy B, Stewart RW, et al. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts [J]. Circ Res 1990, 66 (4): 883-890
- [9] Huentelman MJ, Zubcevic J, Katovich MJ, et al. Cloning and characterization of a secreted form of angiotensin-converting enzyme 2 [J]. Regul Rep 2004, 122 (2): 61-67
- [10] 周 鹏, 李志梁, 徐春生, 等. 氧化型低密度脂蛋白及阿托伐他汀对培养的人脐静脉内皮细胞血管紧张素转化酶 2 表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (12): 889-892

(此文编辑 李玲玲)