

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0109-05

• 实验研究 •

缬沙坦对大鼠主动脉内皮球囊损伤后血管紧张素转化酶与血管紧张素转化酶 ② 表达的影响

苟瑜琳, 李永红, 刘平, 蔡尚郎

(青岛大学医学院附属医院心内科, 山东省青岛市 266003)

[关键词] 缬沙坦; 球囊损伤; 血管紧张素转化酶; 血管紧张素转化酶 ②

[摘要] 目的 观察大鼠主动脉内皮球囊损伤后血管重塑发生以及血管紧张素转化酶 ① 、血管紧张素转化酶 ② 的变化, 探讨缬沙坦对其干预作用及作用机制。方法 建立球囊损伤大鼠主动脉内皮损伤模型, 并将大鼠随机分为对照组、手术组和缬沙坦治疗组。每组分别于术后 14天和 30天取主动脉组织, 通过逆转录酶连反应技术检测血管紧张素转化酶 ① 、血管紧张素转化酶 ② 的 mRNA 水平, 应用免疫组化方法检测血管紧张素转化酶 ① 、血管紧张素转化酶 ② 的蛋白表达。结果 主动脉球囊损伤大鼠术后 14天和 30天血管内膜较对照组均显著增厚, 给予缬沙坦干预 14天和 30天大鼠主动脉血管内膜较手术组明显减轻。手术组较对照组血管紧张素转化酶 ① 的 mRNA 及蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$), 血管紧张素转化酶 ② 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。缬沙坦能够降低血管紧张素转化酶 ① 的 mRNA 与蛋白表达 ($P < 0.05$), 增加血管紧张素转化酶 ② 的蛋白表达 ($P < 0.05$)。结论 缬沙坦逆转主动脉内皮球囊损伤后血管重塑可能与增加血管紧张素转化酶 ② 表达和降低血管紧张素转化酶 ① 表达有关。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Effects of Valsartan on Expression of Angiotensin-Converting Enzyme and Angiotensin-Converting Enzyme ② After Vascular Balloon Injury in Rats

QING Yu-Lin, LI Yong-Hong, LIU Ping and CAI Shang-Lang

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003 China)

[KEY WORDS] Valsartan; Balloon Injury; Angiotensin Converting Enzyme; Angiotensin Converting Enzyme ②

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin-converting enzyme ② (ACE ②) and the effects of Valsartan on them after vascular balloon injury in rats. **Methods** Rat models of aortic endothelial denudation were made by an 2F balloon catheter. Rats were randomly allocated into three groups. Group 1 served as controls. Group 2 were given vascular balloon injury. Group 3 were given Valsartan from 1 day before injury to 30 days after injury. The expression of ACE mRNA and the level of protein of ACE or ACE ② were investigated at day 14 and 30 after injury by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and immunohistochemistry method respectively. **Results** Intimal thickening was significant at 14 days and 30 days after injury. Valsartan significantly and comparably prevented intimal thickening at 14 days and 30 days after balloon injury. The expression of ACE mRNA and protein was significantly increased at 14 days and 30 days after injury ($P < 0.05$), while the expression of ACE ② protein was significantly increased at 14 days and 30 days after injury ($P < 0.05$). Valsartan can decrease the expression of ACE mRNA and protein and increase the expression of ACE ② protein ($P < 0.05$). **Conclusion** The effects of Valsartan on aortic endothelial denudation and regression of vascular remodeling are related with the increased expression of ACE ② protein and the decreased expression of ACE.

有效预防血管重构是未来防治经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention, PCI) 术后再狭窄的中心环节, 肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 过度激活是血管重构的始

动与恶化因素, 因此成为 PCI 术后再狭窄的主要治疗靶点。血管紧张素转化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 为 RAS 主要的核心酶, 其酶解产物血管紧张素 ① (angiotensin ① , Ang ①) 参与血管重构。血管紧张素转化酶 ② (angiotensin-converting enzyme 2, ACE ②) 是迄今为止发现的 ACE 的第一个类酶^[1], 能高效催化 Ang ① 直接转化为血管紧张素 ② (angiotensin ② , Ang ②)。干预 Ang ① 介导的血管重建。我们设想, ACE 与 ACE ② 的表达失衡参与了血管重塑的发生发展过程; 血管紧张素受体拮抗剂

[收稿日期] 2009-11-15 [修回日期] 2010-02-08

[基金项目] 青岛市科学技术局资助项目 (编号 02-2-kjym-25)

[作者简介] 苟瑜琳, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床研究, E-mail 为 qingyulin2001@sina.com。通讯作者李永红, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床研究, E-mail 为 liyonghong-66@163.com。刘平, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床研究, E-mail 为 liuping14@163.com。

(angiotensin receptor blocker, ARB)的作用机制除了阻断血管紧张素 ① 型受体(angiotensin ① type 1 receptor, AT1-R)之外,是否影响ACE ② 的表达?本文主要观察大鼠主动脉球囊损伤后ACE、ACE ② 的表达变化以及缬沙坦的治疗效果,探讨ARB预防再狭窄的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源

雄性健康Wistar大鼠52只,体重300~350 g,购自青岛市药检所。

1.2 药物与主要试剂来源

缬沙坦由北京诺华公司提供;Trizol试剂盒购自美国Invitrogen公司;RT试剂盒购自Promega公司;PCR试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司;ACE、ACE ② 、 β -actin引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;ELISA试剂盒购自北京中杉金桥生物公司。

1.3 动物分组与处理

将大鼠随机分为对照组($n=16$)、手术组($n=18$)和治疗组($n=18$)。饲养条件为室温饲养,标准饲料,自由饮水,术前适应性饲养1周。大鼠术前禁食12 h,术前1天至术后3天给予青霉素10万单位/只/天,腹腔注射,以预防感染。手术组应用10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射,全身麻醉后,自大鼠左颈总动脉插入自制的2 F球囊导管,行主动脉内皮损伤术。治疗组手术方法同手术组,并于术前1天至术后30天给予缬沙坦20 mg/(kg·d),灌胃。对照组除不插入球囊导管外,其余操作同手术组。

1.4 标本取材及处理

应用10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射,将大鼠全身麻醉后,75%酒精浸泡5 s,在超净工作台内,无菌条件下取其主动脉血管段约4~5 cm,在近主动脉端剪去5 mm投入10%甲醛中固定,石蜡包埋,并行病理学、免疫组织化学法检测ACE ② 、ACE在主动脉中的表达。

1.5 检测血管组织中血管紧张素转换酶 ② 、血管紧张素转换酶的mRNA

各对引物序列及产物长度见表1。按照TaqTM说明书进行PCR,在CHEM I GEN US2凝胶成像分析系统下观察并拍摄电泳图像。测定各条灰度值,以大鼠的GAPDH表达量为基准,计算ACE mRNA/GAPDH mRNA、ACE ② mRNA/GAPDH mRNA,以表

示ACE、ACE ② mRNA的相对表达量。

表1 扩增目的基因及内参照GAPDH的引物序列、退火温度及产物长度

基因名称	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)
ACE ②	GAATGCGACCATCAAGCG CCAAGCCCAGAGCCTACG	52	229
ACE	TTCGTGGAGGAGTATGACC TCAGAGTAGCCGTTGAGC	52	506
GAPDH	TATGACAACTCCCTCAAGAT AGATCCACAACGGATACATT	52	317

1.6 HE染色观察血管病理学变化

上述大鼠石蜡切片HE染色,光镜下观察切片并拍照,每只动物取3张切片观察,用Simple PCI图形分析系统辅助测量血管内膜及中膜厚度^[2]。

1.7 免疫组织化学法检测血管组织中血管紧张素转换酶 ② 、血管紧张素转换酶的蛋白表达

石蜡切片脱蜡至水,滴加适当比例稀释的一抗(ACE 1:150 ACE ② 1:200),辣根酶标记羊抗兔多聚体二抗工作液,DAB显色,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片,显微镜下观察。随机选择血管的5个区域用Simple PCI图形分析系统辅助测量测ACE、ACE ② 表达水平,以平均光密度值表示其相对含量。

1.8 统计学方法

用SPSS 16.0软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立大鼠主动脉内皮损伤模型

手术组及治疗组各有2只死于手术过程及术后感染,术后存活48只。各组分别于术后14天和30天取主动脉组织,每个时间点均检测8只大鼠。

2.2 组织学检查

术后14天及30天可见主动脉内膜增厚($P < 0.05$)。应用缬沙坦治疗14天及30天,主动脉内膜厚度均较手术组降低($P < 0.05$,图1和表2)。

2.3 大鼠血管组织中血管紧张素转换酶 ② 、血管紧张素转换酶的mRNA的表达

RT-PCR电泳图像灰度分析结果显示,与对照组相比,术后14天及30天手术组ACE mRNA表达明显升高($P < 0.05$);与手术组相比,术后14天及

30天治疗组 ACE mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$ 进行统计。
图 2和表 3)。ACE $\ominus$ mRNA 仅部分标本表达, 故未

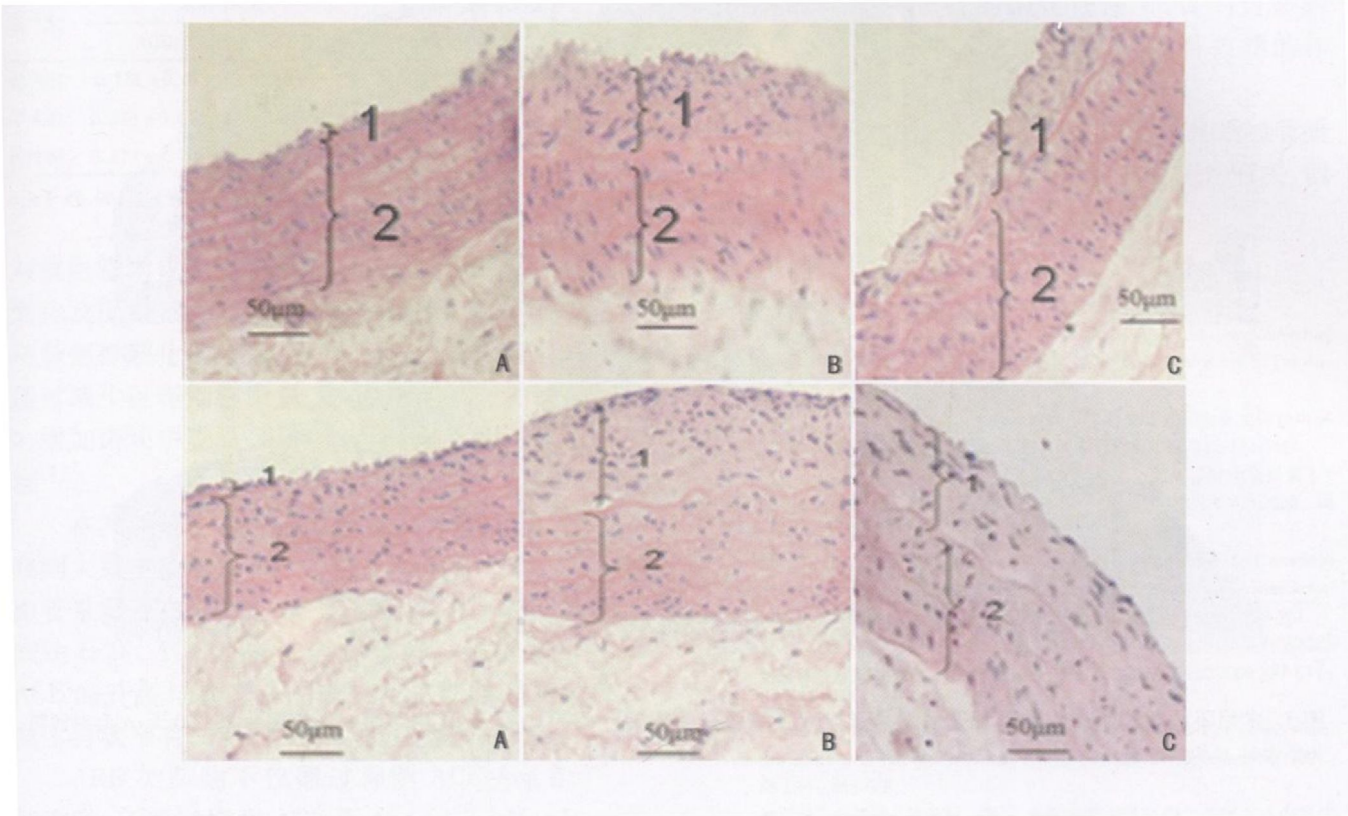


图 1 术后不同时间大鼠主动脉管壁的 HE 染色 ($\times 200$ 倍) ($n = 8$) 上图为术后 14 天, 下图为术后 30 天; A 为对照组, B 为手术组, C 为治疗组; 1 为血管内膜, 2 为血管中膜。

表 2 球囊损伤血管内皮后血管内膜和中膜厚度的变化 (μm , $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

时 间	对照组		手术组		治疗组	
	内膜	中膜	内膜	中膜	内膜	中膜
术后 14 d	21.9 $\pm$ 2.1	204.1 $\pm$ 8.0	85.7 $\pm$ 5.2 ^a	261.2 $\pm$ 12.0 ^a	49.7 $\pm$ 4.9 ^{ab}	228.7 $\pm$ 7.6 ^{ab}
术后 30 d	24.5 $\pm$ 1.7	203.4 $\pm$ 8.4	105.5 $\pm$ 6.3 ^a	262.7 $\pm$ 11.6 ^a	65.6 $\pm$ 4.2 ^b	231.3 $\pm$ 9.5 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与手术组比较。

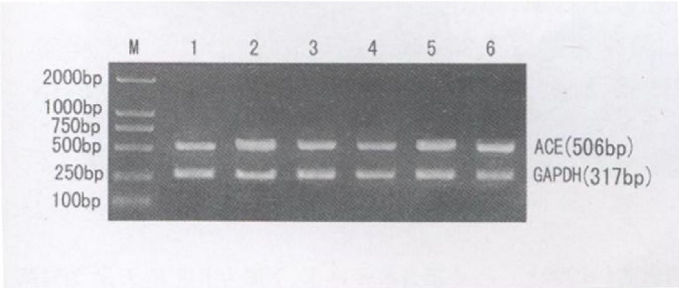


图 2 大鼠主动脉组织血管紧张素转换酶的 mRNA 表达水平 ($n = 8$)。 M 为 Marker 1~3 为对照组、手术组、治疗组术后 14 天, 4~6 为对照组、手术组、治疗组术后 30 天。

2.4 大鼠血管组织中血管紧张素转换酶 $\ominus$ 、血管紧张素转换酶的蛋白的表达

免疫组织化学结果显示 ACE、ACE $\ominus$ 蛋白在血

管内皮细胞、平滑肌细胞胞膜表达 (棕黄色)。用光密度法比较血管组织中 ACE、ACE $\ominus$ 的表达。与对照组相比,手术组术后 14 天及 30 天 ACE 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$), ACE $\ominus$ 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$), 与手术组相比,治疗组于术后 14 天及 30 天 ACE 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$ 图 3 和表 4) ACE $\ominus$ 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$ 图 4 和表 4)。

表 3 血管紧张素转换酶 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	术后 14 d	术后 30 d
对照组	0.99 $\pm$ 0.09	0.99 $\pm$ 0.05
手术组	1.47 $\pm$ 0.08 ^a	1.46 $\pm$ 0.09 ^a
治疗组	1.26 $\pm$ 0.04 ^{ab}	1.18 $\pm$ 0.06 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与手术组比较。

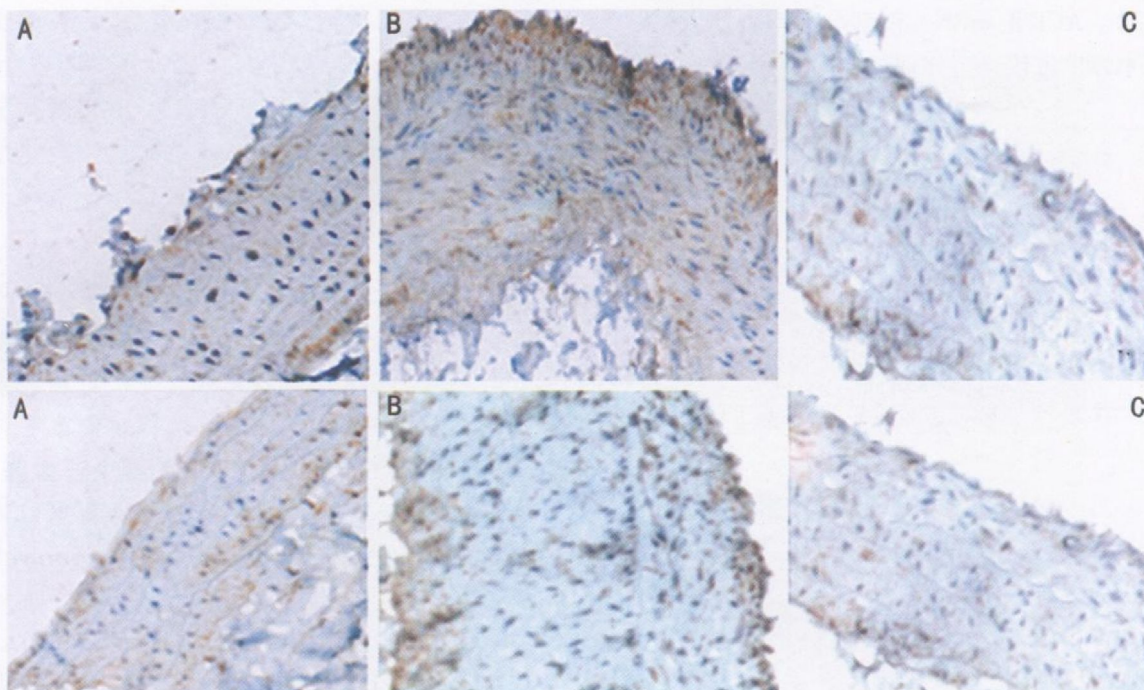


图3. 术后不同时间大鼠主动脉管壁血管紧张素转换酶蛋白的表达($\times 200$)
 上图是术后14天,下图为术后30天;A为对照组,B为手术组,C为治疗组。

上图是术后14天,下图为术后30天;A为对照组,B为手术组,C为治疗组。

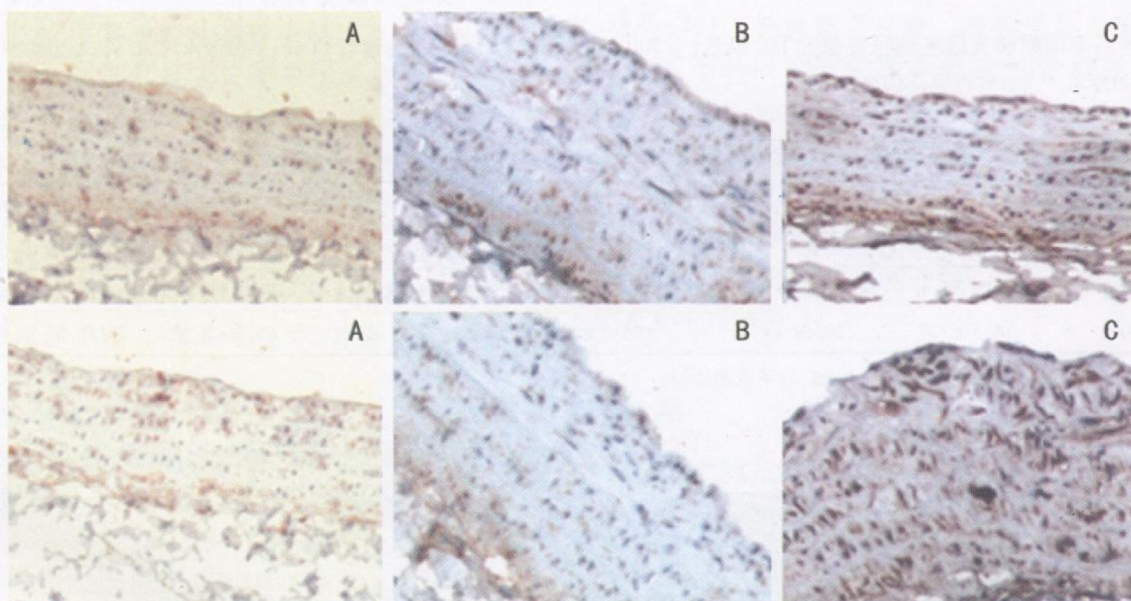


图4. 术后不同时间大鼠主动脉管壁血管紧张素转换酶II蛋白的表达($\times 200$)
 上图是术后14天,下图为术后30天;A为对照组,B为手术组,C为治疗组。

上图是术后14天,下图为术后30天;A为对照组,B为手术组,C为治疗组。

3 讨论

目前的研究发现内源性的 Ang^{II} 受 ACE 及 ACE^{II} 的调节, ACE^{II} 与 ACE 的结构相近, 具有拮抗 ACE 的作用。ACE 能高效催化 Ang^{II} 直接转化

为 Ang^{I} (1-7)。近年来发现 ACE^{II} 与血管重构及动脉粥样斑块的形成密切相关^[3-5]。在 ACE^{II} 缺乏小鼠中血浆 Ang^{I} (1-7) 水平的降低以及潜在的内皮保护功能受损可增强 Ang^{II} 对血管内皮的损害作用^[6]。钟久昌等研究发现 ACE^{II} 基因过表达可以

表 4 血管紧张素转换酶和血管紧张素转换酶 ②蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	术后 14天		术后 30天	
	ACE	ACE②	ACE	ACE②
对照组	0.161 ± 0.013	0.172 ± 0.006	0.168 ± 0.009	0.177 ± 0.007
手术组	0.314 ± 0.012 ^a	0.145 ± 0.005 ^a	0.276 ± 0.015 ^a	0.139 ± 0.005 ^a
治疗组	0.174 ± 0.012 ^b	0.244 ± 0.007 ^{ab}	0.186 ± 0.013 ^b	0.264 ± 0.007 ^{ab}

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与手术组比较。

对抗血管内皮细胞中 Ang ①和 Ang ②所诱导的促氧化及促炎症效应,其基因或活性异常可能参与动脉粥样硬化的发生、发展^[7]。ACE ②基因治疗能通过减少巨噬细胞聚集,降低 MCP-1、MMP-3、MMP-9 增加斑块中胶原含量,稳定 12~14 周动脉粥样斑块^[8]。

本实验通过建立大鼠主动脉球囊损伤模型,观察到大鼠主动脉血管壁球囊损伤术后 14 天及 30 天血管重塑存在,同时发现血管壁 ACE mRNA 及蛋白表达升高,ACE ②蛋白表达下降。以上结果提示 ACE 的升高与 ACE ②的减少与主动脉球囊损伤后发生再狭窄有一定的关系,应进行深入研究。

ARB 类药物不仅通过抑制 ACE-Ang ②-AT1R 轴途径,还通过增强 ACE ②-Ang-(1-7)-Mas 轴途径从而预防心血管疾病^[9]。既往研究发现大鼠主动脉球囊损伤后,应用 ARB 可增加 AT2R 表达,改善大鼠主动脉球囊损伤后血管重构^[9]。奥美沙坦能增加自发性高血压大鼠大动脉的 ACE ②和 Ang-(1-7) 表达,并改善血管重塑及减轻左室肥厚^[10,11]。本研究也观察到应用缬沙坦可使大鼠主动脉球囊损伤术后 14 天及 30 天血管重构减轻,同时还发现术后 14 天及 30 天血管壁 ACE ②蛋白表达上调,ACE mRNA 及蛋白表达下调。

我们推测大鼠主动脉球囊损伤后,缬沙坦通过竞争性的结合 AT1R,抑制 Ang ②的主要生理功能,引起血浆及血管组织中 Ang ②含量升高,从而既增

高与 AT2R 的结合机率,同时也为 ACE ②提供了更多的底物,并可能通过反馈途径增加 ACE ②的表达。在高表达 ACE ②的催化作用下,体内过多的 Ang ②转化为 Ang-(1-7),发挥减轻血管重塑的作用。

总之缬沙坦逆转主动脉内皮球囊损伤后血管重塑可能与增加 ACE ②表达和降低 ACE 表达有关,值得进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin 1 to Angiotensin 1-9 [J]. *Circ Res* 2000; **87** (5): E1-9
- [2] 程讯民,何国祥,王国超. 血管球囊损伤后血管紧张素 ②受体在内膜增生中的作用 [J]. *中华心血管病杂志*, 1998; **26** (2): 142-144
- [3] 张月辉,朱莉,于庆涛,等. 血管紧张素转化酶 2 和血管紧张素 1-7 在兔动脉粥样硬化斑块中的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (11): 893-895
- [4] Igase M, Strawn WR, Gallagher PE, et al. Angiotensin ② AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats [J]. *Am J Physiology*, 2005; **289** (3): 980-981
- [5] 董波,张月辉,董秋立,等. 血管紧张素转化酶 2 基因转染对实验性动脉硬化兔斑块炎症的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2009; **37** (7): 622-625
- [6] Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Hypertension*, 2001; **38** (3): 665-668
- [7] 钟久昌,余细勇,林秋雄,等. 血管紧张素转化酶 2 基因对人内皮细胞巨噬细胞移动抑制因子表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (7): 556-558
- [8] Dong B, Zhang C, Feng JB, et al. Over expression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28** (7): 1270-276
- [9] Santos RA, Ferreira AJ, Simoes-E-Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis [J]. *Exp Physiol* 2008; **93**: 519-527
- [10] Agata J, Ura N, Yoshida H, et al. Olmesartan is an angiotensin ② receptor blocker with an inhibitory effect on angiotensin-converting enzyme [J]. *Hypertens Res* 2006; **29** (11): 865-874
- [11] Igase M, Kohara K, Nagai T, et al. Increased expression of angiotensin converting enzyme 2 in conjunction with reduction of neointima by angiotensin ② type 1 receptor blockade [J]. *Hypertens Res* 2008; **31** (3): 553-559

(此文编辑 李玲玲)