

RNA 干扰下调 ACE 和 AT1R 对自发性高血压大鼠血压及脑组织损伤的影响

周 华, 张翠芳, 陈瑞瑞, 李 瑾, 高 奋, 杨志明

(山西医科大学第二医院心血管内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] RNA 干扰; 脑组织损伤; 血管紧张素转换酶; 血管紧张素 II 1 型受体; 自发性高血压大鼠

[摘要] **目的** 用 RNA 干扰下调血管紧张素转换酶(ACE)和血管紧张素 II 1 型受体(AT1R), 观察其对自发性高血压大鼠(SHR)血压及脑组织损伤的影响。**方法** SHR 随机分为 5 组: 空白对照组、病毒对照组、Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组, 同时设 WKY 正常血压对照组。各组大鼠均于实验第 1、17 天各注射 1 次, 干预前后检测血压、心率的变化。于首次注射后第 3 天, 酶联免疫吸附法检测大鼠脑组织中 ACE、Ang II 含量, 实时荧光定量 PCR 检测脑组织 ACE mRNA、AT1R mRNA 表达, Western blot 检测脑组织 ACE、AT1R 蛋白表达。实验结束时做脑组织光镜病理检查观察脑结构。**结果** 于首次注射后第 3 天, Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组尾动脉压分别下降 25.2 ± 5.3 mmHg、 23.5 ± 4.8 mmHg、 27.1 ± 6.4 mmHg, 第 14 天分别下降 24.4 ± 5.6 mmHg、 23.6 ± 4.9 mmHg、 26.3 ± 6.9 mmHg, 第 17 天时血压有所回升; 第 2 次注射后 Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组尾动脉压再次明显下降, 第 23 天时较首次注射前分别下降 40.2 ± 4.5 mmHg、 37.8 ± 3.9 mmHg、 43.7 ± 7.3 mmHg, 第 37 天时血压有所回升, 第 40 天时血压上升至第 2 次注射前水平; 空白对照组和病毒对照组血压则持续升高 26 mmHg, 两组比较差异无统计学意义; 正常血压对照组尾动脉压无明显变化。Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组脑组织 ACE、Ang II 显著低于空白对照组和病毒对照组 ($P < 0.05$), 而与正常血压对照组比较差异无统计学意义。Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组脑组织 ACE mRNA 和 Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组脑组织 AT1R mRNA 的表达明显低于空白对照组、病毒对照组 ($P < 0.05$), 而与正常血压对照组比较差异无统计学意义。Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组脑组织 AT1R 蛋白表达显著低于空白对照组、病毒对照组 ($P < 0.05$)。光镜显示 Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组脑组织结构明显改善。**结论** RNA 干扰下调 ACE 和 AT1R 表达, 降低 SHR 血压并改善脑损伤, 尤以 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组效果明显且副作用少。RNA 干扰对高血压的基因治疗具有良好应用前景。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of RNA interference on blood pressure and brain tissue injury in spontaneously hypertensive rats by downregulating ACE and AT1R

ZHOU Hua, ZHANG Cui-Fang, CHEN Rui-Rui, LI Jin, GAO Fen, YANG Zhi-Ming

(Department of Cardiology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China)

[KEY WORDS] RNA interference; Brain tissue injury; Angiotensin converting enzyme; Angiotensin II type 1 receptor; Spontaneously hypertensive rats

[ABSTRACT] **Aim** RNA interference was used to downregulate angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensin II type 1 receptor (AT1R), and to observe its effects on blood pressure and brain tissue injury in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** SHR was randomly divided into 5 groups: blank control group, virus control group, Ad5-ACE-shRNA treatment group, Ad5-AT1R-shRNA treatment group, Ad5-ACE-AT1R-shRNA treatment group, and WKY normal blood pressure control group was set up. All rats in each group were injected 1 time in the first and seventeenth day of the experiment. On the third day after the first injection, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was

used to detect the contents of ACE and Ang II in rat brain, real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of ACE mRNA and AT1R mRNA in brain tissue, Western blot was used to detect the expression of ACE and AT1R protein in brain tissue. At the end of the experiment, brain tissue was examined by light microscopy to observe the brain structure. **Results** On the third day after the first injection, the tail arterial pressure of Ad5-ACE-shRNA treatment group, Ad5-AT1R-shRNA treatment group and Ad5-ACE-AT1R-shRNA treatment group decreased by 25.2 ± 5.3 mmHg, 23.5 ± 4.8 mmHg and 27.1 ± 6.4 mmHg, 24.4 ± 5.6 mmHg, 23.6 ± 4.9 mmHg and 26.3 ± 6.9 mmHg respectively on the 14th day, and the blood pressure rose on the 17th day after Ad5-ACE-shRNA treatment and Ad5-AT1R-shRNA treatment after the second injection. The tail arterial pressure of Ad5-ACE-AT1R-shRNA treatment group decreased again. On the 23rd day, the arterial pressure decreased by 40.2 ± 4.5 mmHg, 37.8 ± 3.9 mmHg and 43.7 ± 7.3 mmHg respectively before the first injection. On the 37th day, The blood pressure rose to the level before the second injection on the 40th day. The blood pressure of the blank control group and the virus control group continued to increase by 26 mmHg, there was no significant difference between the two groups; the tail arterial pressure of the normal blood pressure control group had no obvious change. The expression of ACE mRNA in brain tissue of Ad5-ACE-shRNA treatment group and Ad5-ACE-AT1R-shRNA treatment group and the expression of AT1R mRNA in the brain tissue of Ad5-AT1R-shRNA treatment group and Ad5-ACE-AT1R-shRNA treatment group were significantly lower than those of blank control group and virus control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference compared with normal blood pressure control group. The expression of AT1R protein in brain tissue of Ad5-ACE-shRNA treatment group, Ad5-AT1R-shRNA treatment group and Ad5-ACE-AT1R-shRNA treatment group was significantly lower than that of blank control group and virus control group ($P < 0.05$). The light microscope showed that the brain tissue structure of Ad5-ACE-shRNA treatment group, Ad5-AT1R-shRNA treatment group and Ad5-ACE-AT1R-shRNA treatment group was significantly improved. **Conclusion** RNA interference downregulated ACE and AT1R expression, reduced blood pressure in spontaneously hypertensive rats and improved brain injury, especially Ad5-ACE-AT1R-shRNA treatment had obvious effect and less side effect. RNA interference has a good application prospect for gene therapy of hypertension.

高血压是心脑血管疾病最主要的危险因素之一,与冠心病、心力衰竭、肾功能不全、脑卒中的发生密切相关,导致全球每年约有 760 万人死亡^[1-3]。研究表明脑卒中是引起中国成年人残疾的主要原因,对患者和社会造成重大经济负担^[4]。目前,虽有多种药物用于降低血压,但控制率仅约 11.2%^[5-9],导致患者过早死亡和脑卒中的发生,究其原因可能与降压药物半衰期相对短、副作用大、依从性差、患者不易坚持服药等有关。有效的降压治疗可减少卒中及其他脑血管疾病的发生风险,故寻求一种持续平稳且副作用少的降压药物成为目前研究的热点。众所周知,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在高血压的发生发展、血管重构、心衰、肾衰及脑卒中的发生中起重要作用。多项研究发现,同时阻断血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)和血管紧张素受体 II 1 型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1R)可显著改善高血压靶器官损害^[10-12]。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是调节多系统基因表达的基本生物过程,它多用于沉默基因的表达,也成为标准的生物技术工具^[13],RNA 干扰已在生命科学的各个领域取得了重大研究进展。近年来研究发现,RNA 干扰可达到持久平稳的降压

效果,同时对高血压引起的心肌损伤有保护作用^[14],但通过干预 ACE 和 AT1R 对高血压脑组织损伤的发生机制尚不清楚。本研究运用 RNA 干扰技术,以 RAS 中的 AT1R 和 ACE 为靶点,设计并构建单个及串联的短发夹 RNA(short-hairpin RNA, shRNA)表达载体,观察对高血压大鼠的治疗作用,为高血压的基因治疗提供新方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物、材料和试剂

成年雄性自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和 WKY 正常血压对照鼠,均 12 周龄,体重 270~320 g(中科院上海实验动物中心),分笼饲养,每笼 3~5 只,保持室温(24 ± 2)℃,相对湿度 60%~65%,12 h 人工昼夜循环照明,自由进食进水。表达 ACE 特异 shRNA 的重组腺病毒载体 Ad5-ACE-shRNA、表达 AT1R 特异 shRNA 的重组腺病毒载体 Ad5-AT1R-shRNA、同时表达 ACE 和 AT1R 特异 shRNA 的重组腺病毒载体 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 和对照腺病毒 Ad5,感染性滴度(TCID₅₀/mL)为 4.5×10^9 、 4.5×10^9 、 2.25×10^9 和 7.5×10^9 ,均由北京本元正阳基因技术有限公司合成。超

艳 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒(上海生工工程有限公司);PCR 引物、TaqMAN 探针(上海基康生物技术工程有限公司);NMLV 逆转录系统、Taq 酶、dNTP(美国 Promega 公司)。

1.2 动物分组及干预方法

SHR 随机分为 5 组:①空白对照组($n=12$),注射生理盐水 1 mL;②病毒对照组($n=12$),注射 Ad5 1 mL;③ Ad5-ACE-shRNA 治疗组($n=12$),注射 Ad5-ACE-shRNA 1 mL;④ Ad5-AT1R-shRNA 治疗组($n=12$),注射 Ad5-AT1R-shRNA 1 mL;⑤ Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组($n=12$),注射 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 1 mL。同时设 WKY 正常血压对照组($n=12$),注射生理盐水 1 mL。通过尾静脉注射,时间为实验开始的第 1、17 天。

1.3 血压及心率的测定

分别于注射前及注射后每 2~5 天采用尾袖法在安静环境中测量大鼠清醒状态下尾动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)和心率,每次测量的时间点相同。将大鼠尾部预热至 40℃ 左右,固定于舒适位置,引入加压袖口放置于大鼠尾根部,设定最高血压为 270 mmHg,充气加压,当压力达到 270 mmHg 时自动缓慢减压,经压力换能器和放大器连接于 Medlab 生物机能实验系统记录血压和心率。每只大鼠连续测量 5 次,取其平均值为该大鼠的动脉收缩压和心率值。

1.4 大鼠脑组织 ACE、Ang II 含量检测

于首次注射后第 3 天,每组随机取 6 只大鼠,心脏体外采血,同时取脑组织按照 ACE 和 AngII 酶联免疫吸附测试盒说明操作:1)标本 2000 r/min 离心 20 min,取上清检测;2)取出酶标板,依照次序分别对应加入 100 μ L 标准品于空白微孔中;3)分别标记样品编号,加入 100 μ L 样品于空白微孔中;4)在标准品孔和样品孔中加入 50 μ L 酶标记溶液,轻柔混合 15 s;5) $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 孵育反应 60 min;6)洗板机清洗 5 次,每次静置 10~20 s;7)每孔加入底物 A、B 液各 50 μ L,轻柔混合 5 s;8) $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 15 min;9)每孔加入 50 μ L 终止液,终止反应;10)于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值;11)以 $B/B_0\%$ 值为纵坐标(B =标准品 OD 值、 B_0 =标准品 0 点 OD 值),以标准品的浓度为横坐标,在对数坐标纸上绘制标准曲线;12)在标准曲线上查找对应的浓度范围。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测脑组织 ACE 和 AT1R mRNA 的表达

于首次注射后第 3 天,每组随机取 6 只大鼠,取脑组织 0.5 g 利用超艳 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂

盒提取总 RNA, NMLV 逆转录系统逆转录成 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 检测。引物、探针的设计用 Primer 5.0 设计完成,由上海基康生物技术工程有限公司合成。ACE 上游引物为 5'-GCC TCC CAA CGA GTT AGA AGA G-3',下游引物为 5'-CGG GAC GTG GCC ATT ATA TT-3',探针序列为 5'-FTG GCA CTT GTC TGT CAC TGG AGC CTG ATP-3';AT1R 上游引物为 5'-CAA CCT CTA CGC CAG TGT GTT C-3',下游引物为 5'-GTG ACT TTG GCC ACC AGC AT-3',探针序列为 5'-FTC TCA CGT GTC TCA GCA TCG ACC GP-3';探针修饰:F 代表 FAM, 3'-TAMRA、3'-P04, P 代表 TAQMAN-MGB 基团。制备标准曲线样品:先将样品的目的基因及管家基因(β -actin)进行 PCR 扩增,其产物进行梯度稀释用于做标准曲线。PCR 反应体系:10 \times Buffer 2 μ L, MgCl₂ 2 μ L, dNTP 0.5 μ L,上游引物 0.2 μ L,下游引物 0.2 μ L,探针 0.25 μ L, Taq 酶 0.5 μ L,反应模板 2 μ L,无菌去离子水补体积至 20 μ L。PCR 反应条件:94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 15 s, 60℃ 退火、延伸 30 s, 共 30 个循环,加于荧光 PCR 管中,在 GeneAmp 5700 sequence Detector System 荧光定量 PCR 检测仪上进行扩增并收集荧光信号,分析结果。为进一步消除 mRNA 定量、逆转录及 PCR 反应效率的差异对结果的影响,实验中同步进行内对照 β -actin 绝对拷贝数的定量检测,以检测基因与 β -actin 绝对拷贝数之比作为检测基因的相对表达量。

1.6 Western blot 检测脑组织 ACE、AT1R 蛋白的表达

于首次注射后第 3 天,每组随机取 6 只大鼠,取脑组织进行检测。蛋白质的提取按蛋白抽提试剂盒说明操作:①取新鲜或冰冻组织 100 mg 剪碎,用 PBS 漂洗一次,弃去 PBS;②加 0.5~1 mL 冰冷的 CEB-A;③在超声匀浆机中匀浆,直到 90% 的细胞破碎;④4℃、1000 g 离心 5 min;⑤上清移到一新管,进一步 4℃、12000 g 离心 5 min,再把上清移到一新管中,加 20% 甘油存贮于 -70℃ 备用。蛋白浓度的测定按 BCA 试剂盒说明书进行蛋白浓度测定。分装后, -20℃ 保存。

1.7 脑组织光镜病理检查

无菌分离脑组织,用 10% 福尔马林液固定 8~12 h,石蜡包埋,5 μ m 厚切片,HE 染色观察。

1.8 肝、肾功能检测

实验结束时取各组大鼠血清,用 Beckman 全自动生化分析仪按说明书步骤检测肝、肾功能。

1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,血压和心率的比较采用

重复测量方差分析,其余指标多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法,数据采用 SPSS 13.0 统计软件分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干预前后血压及心率的变化

各组 SHR 干预前尾动脉压均与正常血压对照组有显著性差异 ($P < 0.01$),而各组 SHR 之间干预前尾动脉压差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明 SHR 造模成功,SHR 各组之间具有可比性。于首次注射后第 3 天,Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组尾动脉压分别下降 25.2 ± 5.3 mmHg、 23.5 ± 4.8 mmHg、 27.1 ± 6.4 mmHg,第 14 天分别下降 24.4 ± 5.6 mmHg、

23.6 ± 4.9 mmHg、 26.3 ± 6.9 mmHg,第 17 天时血压有所回升;第 2 次注射后 Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组尾动脉压再次明显下降,第 23 天时较首次注射前分别下降 40.2 ± 4.5 mmHg、 37.8 ± 3.9 mmHg、 43.7 ± 7.3 mmHg,第 37 天时血压有所回升,第 40 天时血压上升至第 2 次注射前水平。Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组尾动脉压与治疗前及空白对照组和病毒对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),空白对照组和病毒对照组尾动脉压持续升高,正常血压对照组尾动脉压无明显变化。各组大鼠干预前后心率均无明显变化,组间比较差异无统计学意义 (图 1 和 2)。每日观察动物的局部及全身反应,均未发现食欲减退、体重下降、体温升高等异常反应。

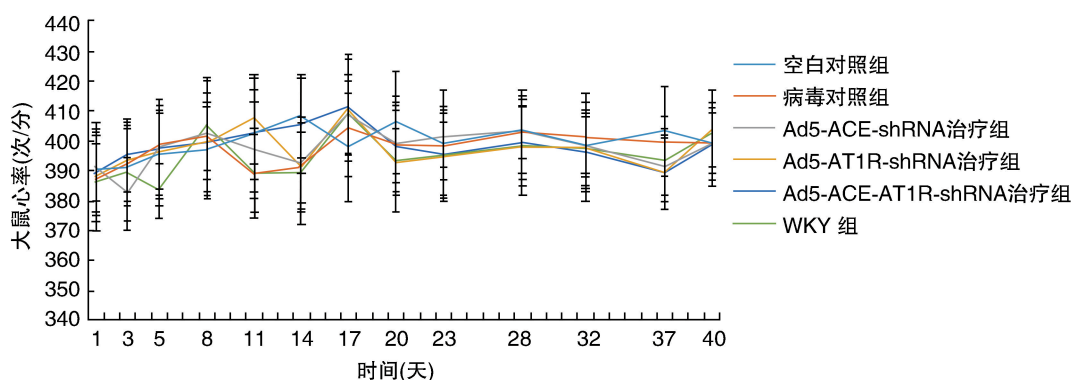


图 1. 各组大鼠干预前后心率的变化 (次/分)

Figure 1. Changes in heart rate values before and after intervention in each group (beat/min)

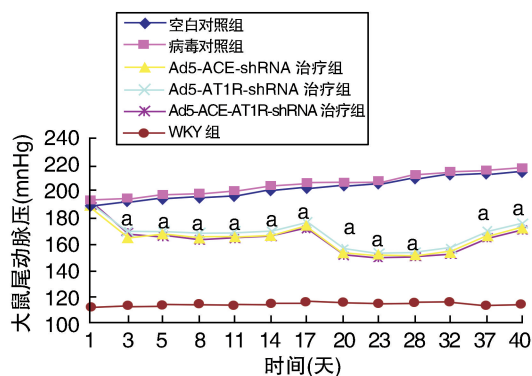


图 2. 各组大鼠干预前后血压水平的变化 a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组或病毒对照组比较。

Figure 2. Changes in blood pressure levels before and after intervention in each group

2.2 治疗后大鼠脑组织 ACE 和 Ang II 含量

空白对照组、病毒对照组脑组织 ACE、Ang II 明

显高于正常血压对照组 ($P < 0.05$)。Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组脑组织 ACE、Ang II 显著低于空白对照组和病毒对照组 ($P < 0.05$),而与正常血压对照组无统计学差异 ($P > 0.05$)。说明 Ad5-ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 经尾静脉注射后明显降低脑组织 ACE、Ang II 水平 (表 1)。

2.3 脑组织 ACE 和 AT1R mRNA 的表达

空白对照组、病毒对照组脑组织 ACE 和 AT1R mRNA 表达较正常血压对照组显著增高 ($P < 0.05$); Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组脑组织 AT1R mRNA 表达较空白对照组、病毒对照组显著降低 ($P < 0.05$); Ad5-AT1R-shRNA 治疗组和 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组 AT1R mRNA 表达与正常血压

对照组和 Ad5-ACE-shRNA 治疗组比较差异有统计学差异($P<0.05$)。Ad5-ACE-shRNA 治疗组和 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组 ACE mRNA 表达较空白对照组、病毒对照组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组显著

降低($P<0.05$),而与正常血压对照组无统计学差异($P>0.05$)。说明 SHR 在尾静脉注射 Ad5-ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 后,ACE 和/或 AT1R mRNA 的表达明显降低(表 2)。

表 1. 干预后第 3 天脑组织 ACE 和 Ang II 含量($\bar{x}\pm s$)

Table 1. The content of ACE and Ang II in brain tissue 3 days after intervention($\bar{x}\pm s$)

分 组	<i>n</i>	Ang II (pg/100 mg)	ACE(ng/100 mg)
空白对照组	6	9.51±1.13 ^a	20.95±3.72 ^a
病毒对照组	6	9.36±1.02 ^a	21.83±3.43 ^a
Ad5-ACE-shRNA 治疗组	6	6.53±1.46 ^b	12.96±2.76 ^b
Ad5-AT1R-shRNA 治疗组	6	6.59±1.74 ^b	13.25±3.61 ^b
Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组	6	6.47±1.61 ^b	12.56±2.35 ^b
正常血压对照组	6	6.02±1.23	11.67±3.41

a 为 $P<0.05$,与正常血压对照组比较;b 为 $P<0.05$,与空白对照组或病毒对照组比较。

表 2. 干预后第 3 天脑组织 ACE 和 AT1R mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$)

Table 2. The expression of ACE and AT1R mRNA in brain tissue 3 days after intervention($\bar{x}\pm s$)

分 组	<i>n</i>	ACE mRNA	AT1R mRNA
空白对照组	6	0.352±0.052 ^a	0.424±0.035 ^a
病毒对照组	6	0.343±0.043 ^a	0.418±0.032 ^a
Ad5-ACE-shRNA 治疗组	6	0.089±0.016 ^b	0.215±0.025 ^b
Ad5-AT1R-shRNA 治疗组	6	0.332±0.023 ^{ac}	0.104±0.016 ^{abc}
Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组	6	0.085±0.013 ^{bd}	0.094±0.016 ^{abc}
正常血压对照组	6	0.097±0.014	0.217±0.017

a 为 $P<0.05$,与正常血压对照组比较;b 为 $P<0.05$,与空白对照组或病毒对照组比较;c 为 $P<0.05$,与 Ad5-ACE-shRNA 治疗组比较;d 为 $P<0.05$,与 Ad5-AT1R-shRNA 治疗组比较。

2.4 脑组织 ACE 和 AT1R 蛋白的表达

空白对照组、病毒对照组脑组织 ACE 和 AT1R 蛋白表达均较正常血压对照组显著增高($P<0.05$)。Ad5-ACE-shRNA 治疗组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组脑组织 AT1R 蛋白表达均较空白对照组、病毒对照组显著降低($P<0.05$);Ad5-AT1R-shRNA 治疗组和 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组 AT1R 蛋白表达与正常血压对照组和 Ad5-ACE-shRNA 治疗组差异有统计学差异($P<0.05$)。Ad5-ACE-shRNA 治疗组和 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组 ACE 蛋白表达较空白对照组、病毒对照组、Ad5-AT1R-shRNA 治疗组显著降低($P<0.05$),而与正常血压对照组无统计学差异($P>0.05$),与实时荧光定量 PCR 结果一致。说明 SHR 在尾静脉注射 Ad5-ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 后,随着 ACE 和/或 AT1R mRNA 的表达降低,相应功能蛋白的表达也随之降低(图 3)。

2.5 脑组织光镜检查结果

空白对照组和病毒对照组大脑皮层细胞明显肥大,细小动脉充血、出血、水肿。尾静脉注射 Ad5-

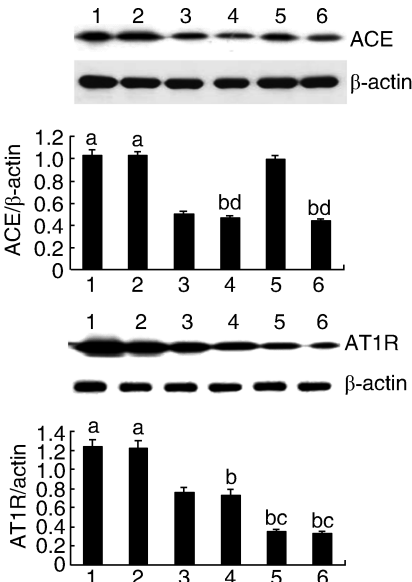


图 3. 脑组织 ACE 和 AT1R 蛋白表达 1 为空白对照组,2 为病毒对照组,3 为正常血压对照组,4 为 Ad5-ACE-shRNA 治疗组,5 为 Ad5-AT1R-shRNA 治疗组,6 为 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组。a 为 $P<0.05$,与正常血压对照组比较;b 为 $P<0.05$,与空白对照组或病毒对照组比较;c 为 $P<0.05$,与 Ad5-ACE-shRNA 治疗组比较;d 为 $P<0.05$,与 Ad5-AT1R-shRNA 治疗组比较。

Figure 3. The expression of ACE and AT1R protein in brain tissue

ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 后,大脑皮层细胞肥大和细小动脉充血、出血、水肿明显减轻,尤以 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组改善明显(图 4)。

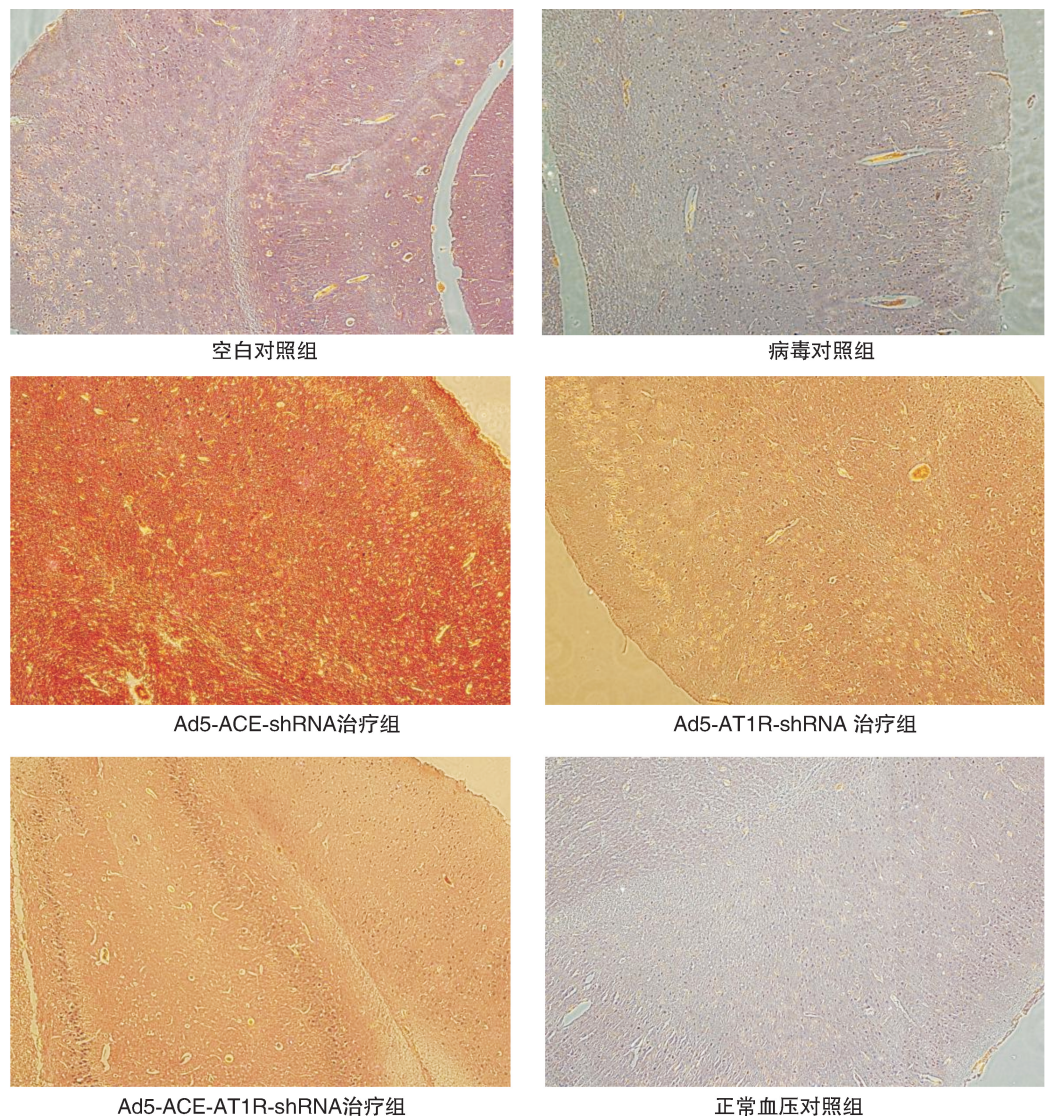


图 4. RNA 干扰对脑组织的影响(×100)
Figure 4. Effect of RNA interference on brain tissue(×100)

2.6 对肝肾功能的影响
各组大鼠肝肾功能指标无统计学差异 ($P>0.05$),表明各种干预对肝肾功能无影响(表 3)。

表 3. 干预后大鼠肝肾功能指标变化
Table 3. Changes of liver and kidney function in rats after intervention

分 组	<i>n</i>	ALT(IU/L)	Scr(μmol/L)	BUN(mmol/L)
空白对照组	6	31±5	35±7	9.1±0.4
病毒对照组	6	32±6	34±7	9.2±0.5
Ad5-ACE-shRNA 治疗组	6	29±6	37±5	8.9±0.8
Ad5-AT1R-shRNA 治疗组	6	28±6	36±6	8.7±0.9
Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组	6	28±6	34±5	8.6±1.2
正常血压对照组	6	29±8	40±8	8.8±1.4

3 讨 论

在高血压的发生发展和靶器官损害过程中,RAS 激活起关键作用,ACE 位于这个系统的中心,是 RAS 活性的限速酶,能使血管紧张素 I(Ang I)降解,生成 Ang II,Ang II 是 RAS 的主要效应物质,通过与体内受体 AT1R 结合,对多种器官组织,如心脏、血管、肾脏、脑组织等的生理功能产生重要影响,引起血管收缩、交感神经系统活性增高、血管床构型重建,同时可刺激肾上腺皮质球状带分泌醛固酮,促进水钠重吸收等,在高血压的发生、发展过程中扮演重要角色。目前 ACE、AT1R 已成为现代高血压、脑卒中、心衰、肾衰等疾病治疗的重要靶点。在使用 ACEI 的过程中,ACE 被抑制,但是 Ang II 仍可通过人体的脑、心脏、肾脏器官的细胞和血管平滑肌及肾素的释放等方式产生,这说明 ACEI 并不能完全阻断 Ang II 的生成。ARB 抑制 AT1R 的同时,AT2R 表达增加,与 Ang II 结合,产生心血管保护作用。ARB 比 ACEI 能更好抑制 Ang II 的副作用,且不会影响缓激肽的降解,使不良反应的发生明显减少。因此,理论上 ACEI 和 ARB 联合治疗可以发挥协同作用,优势互补。近年来相关研究表明,联合应用这两种药物降压效果更好^[15-17]、明显改善心衰患者的运动耐量^[10]及高血压肾病患者肾功能^[11-12]等。

由于 RNA 干扰的易于诱导性和高效性,因此已广泛应用于整个科学领域,主要为肿瘤、昆虫、抗病毒感染等方面,同时,大量动物实验研究已经证实 RNA 干扰有望用于人类疾病的治疗^[18-26]。近年来,国内外已有学者运用该技术在高血压方面进行研究,取得了很好的降压效果,为临床高血压患者提供了一种新的降压治疗手段,并且避免了口服药物必须每天服用、多药联用、药物副作用及依从性差等缺点。

在课题组前期的研究中,运用 RNA 干扰技术已经成功构建了质粒 pACE-AT1R-shRNA,并且有效抑制了 ACE 和 AT1R mRNA 及相应功能蛋白的表达,为本研究的进行奠定了理论和技术基础。腺病毒载体具有多种优势,使其成为广泛使用的基因转移载体之一。本研究中,我们利用前期实验中构建好的同时表达 AT1R 和 ACE 基因的特异性 shRNA 重组腺病毒载体,观察小剂量应用重组腺病毒介导的 ACE 和 AT1R 串联的 shRNA 同时抑制 ACE 和 AT1R 治疗 SHR,并与分别表达 AT1R 和 ACE 基因的特异性 shRNA 重组腺病毒载体常规剂量单基因分别抑制 ACE 和 AT1R 表达来治疗 SHR 进行比较,观察 SHR 血压和脑组织损伤等影响。目的是为了

寻找一个最佳的 RAS 阻断方式,在有效降低血压的同时又可以减少高血压靶器官损害,还可以通过有效使用剂量的减少降低副作用的发生。

我们课题组已成功运用 RNA 干扰同时下调 SHR 的 AT1R 和 ACE 基因表达,持久有效地降低了血压及减少了心肌重构^[11]。但目前我们检索到的国内外文献还没有两者联合应用在高血压脑损伤方面的报道,两者合用对脑组织的损伤或保护作用尚无结论。本研究结果发现,每次注射后,各治疗组血压均显著下降,单次给药后降压作用至少可维持 15 天,比现有的降压药物有明显优势,同时降压作用不引起心率的变化。本研究中小剂量应用 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 比普通剂量应用 Ad5-ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA 的降压作用仍大 2~3 mmHg,但降压作用无统计学意义,表明小剂量应用 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 的降压疗效可能是 ACE 和 AT1R 双基因同时抑制的协同效应,但因为观察时间短,没有发现明显的差异。

众所周知,Ang II 水平过度增高对机体不利。本研究中,同时用 ELISA 测定脑组织 ACE、Ang II 水平,发现 Ad5-AT1R-shRNA 治疗组、Ad5-ACE-shRNA 治疗组和 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组脑组织 ACE、Ang II 含量显著降低,与正常血压对照组比较差异均无统计学意义。表明尾静脉注射 Ad5-AT1R-shRNA、Ad5-ACE-shRNA 和 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 后在有效降压的同时,抑制了高血压各主要脏器的病理性重构,其作用并非通过影响循环 RAS,而是通过抑制局部组织的 ACE、Ang II 水平来实现的。局部组织 RAS 异常可能是导致高血压并发症的主要因素之一。Ad5-ACE-shRNA 使组织内 ACE、Ang II 水平下降的机制在于 Ad5-ACE-shRNA 对组织 ACE 的直接作用;Ad5-AT1R-shRNA 治疗后血浆 Ang II 水平上升可能与反馈性 RAS 活性增加有关,Ad5-AT1R-shRNA 使组织内 Ang II 水平下降的机制在于其与循环中的 Ang II 竞争性地结合 AT1R,使 AT1R 水平下降,通过受体空间占位效应,使循环中的 Ang II 不能与 AT1R 结合,Ang II 细胞内摄作用减低,从而使组织 Ang II 水平下降。联合沉默和单基因沉默后脑组织 ACE 和 Ang II 浓度较空白对照和病毒对照组明显减低,表明 Ad5-ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA 和 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 经鼠尾静脉注射后被脑组织广泛吸收,有效发挥了基因沉默作用,抑制了组织 ACE 和 Ang II 浓度的升高,同时也说明了局部 RAS 在机体高血压进程中所起的重要作用。Ad5-ACE-AT1R-shRNA 小剂量应用比 Ad5-ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA 常规剂量应用的抑制作用更强一些,但差异无统计学意义。

从脑组织分子及蛋白水平的研究发现,各治疗组脑组织 ACE 和 AT1R mRNA 及相关蛋白的表达均较空白对照和病毒对照组明显降低,表明 shRNA 成功发挥了基因沉默作用,在 mRNA 和蛋白水平有效干扰了基因和蛋白的表达,因此产生了明显持续的降压作用。Ad5-ACE-AT1R-shRNA 小剂量使用比 Ad5-ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA 普通剂量使用对 ACE 及 AT1R mRNA 和蛋白质的抑制作用更强一些,也许是由 ACE 和 AT1R 联合基因沉默的共同效应,弥补了单基因抑制 ACE 和 AT1R 不足,还可显著抑制脑组织交感神经活性,增强降压和靶器官保护作用。

脑组织病变是高血压病的重要病理变化,主要表现为:①脑动脉病变:细小动脉纤维化、玻璃样变,严重者可有纤维素样坏死,并发血栓及微动脉瘤;②脑软化:由于动脉硬化,造成局部缺氧,脑组织内可出现多数小软化灶;③脑出血。光镜结果显示:在尾静脉注射 Ad5-ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 后,大脑皮层细胞肥大和细小动脉充血、出血、水肿明显减轻,Ad5-ACE-AT1R-shRNA 治疗组改善更明显。表明 SHR 在注射 Ad5-ACE-shRNA、Ad5-AT1R-shRNA、Ad5-ACE-AT1R-shRNA 后明显改善了脑组织的病理改变。而且小剂量注射 Ad5-ACE-AT1R-shRNA 更显著地改善了脑组织的结构,可能为同时抑制 ACE 与 AT1R mRNA 和蛋白质表达所产生的双基因联合沉默的协同效应有关。

总之,高血压病程长,需终身服药,不易根治,临床上主要采用口服降压药进行治疗,但目前降压药物需每天服用,患者依从性差,导致血压达标率低。本研究中的降压策略能有效持久地降低血压,同时对靶器官有保护作用,但其应用仅限于动物,将该技术应用于人类尚需要进行大量的研究,我们课题组将在此方向做进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] Vasan RS, Larson MG, Leip EP, et al. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease[J]. N Engl J Med, 2001, 345: 1 291-297.
- [2] Dregan A, Stewart R, Gulliford MC. Cardiovascular risk factors and cognitive decline in adults aged 50 and over: a population-based cohort study[J]. Age Ageing, 2013, 42: 338-345.
- [3] Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A, et al. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001 [J]. Lancet, 2008, 371 (9623): 1 513-518.
- [4] Sun H, Zou X, Liu L. Epidemiological factors of stroke: a survey of the current status in china[J]. J Stroke, 2013, 15: 109-114.
- [5] Yoon SS, Carroll MD, Fryar CD. Hypertension prevalence and control among adults: United States, 2011-2014[J]. NCHS Data Brief, 2015, 220: 1-8.
- [6] Unger A, Felzemburgh RD, Snyder RE, et al. Hypertension in a Brazilian urban slum population[J]. J Urban Health, 2015, 92: 446-459.
- [7] Sengul S, Akpolat T, Erdem Y, et al. Changes in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in Turkey from 2003 to 2012[J]. J Hypertens, 2016, 34: 1 208-217.
- [8] Tailakh A, Evangelista LS, Mendes JC, et al. Hypertension prevalence, awareness, and control in Arab countries: a systematic review[J]. Nurs Health Sci, 2014, 16: 126-130.
- [9] Li D, Lv J, Liu F, et al. Hypertension burden and control in mainland China: analysis of nationwide data 2003-2012 [J]. Int J Cardiol, 2015, 184: 637-644.
- [10] Edis G, Ivana D, Dragic B. Effects of combination of AT1-antagonist candesartan cilexetil and ACE-inhibitors in patients with congestive heart failure[J]. Srp Arh Celok Lek, 2013, 141(1-2): 29-34.
- [11] 沙卫红. ACEI 和 ARB 联合治疗肾性高血压的疗效观察[J]. 全科医学临床与教育, 2016, 14(4): 453-454.
- [12] Linas SL. Are two better than one angiotensin-converting enzyme inhibitors plus angiotensin receptor blockers for reducing blood pressure and proteinuria in kidney disease [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2008, 3(Suppl 1): S 17-23.
- [13] Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man[J]. Curr Genet, 2006, 50: 81-99.
- [14] 周华, 边云飞, 李茂莲, 等. RNA 干扰联合基因沉默 ACE 和 AT1R 对自发性高血压大鼠血压及心肌重构的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2010, 38(1): 60-66.
- [15] 姜子彦. ACEI 和 ARB 联合治疗原发性高血压的临床研究[J]. 心血管病防治知识(学术版), 2016, 3: 13-15.
- [16] 叶静. ACEI 联合 ARB 治疗中重度原发性高血压患者的临床研究[J]. 中国医药导刊, 2016, 18(3): 286-287.
- [17] Hu K, Gaudron P, Anders HJ, et al. Chronic effects of early started angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin AT1 receptor subtype blockade in rats with myocardial infarction: role of bradykinin [J]. Cardiovasc Res, 1998, 39: 401-412.
- [18] Salame TM, Ziv C, Hadar Y, Yarden O. RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89: 501-512.
- [19] Shen WG. RNA interference and its current application in mammals [J]. Chin Med J, 2004, 117: 1 084-091.
- [20] Tenllado F, Llave C, Diaz-Ruiz JR. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants [J]. Virus Res, 2004, 102: 85-96.
- [21] Zhang J, Hua ZC. Targeted gene silencing by small interfering RNA-based knock-down technology [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2004, 5: 1-7.
- [22] Chapman EJ, Carrington JC. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8: 884-896.
- [23] Nowotny M, Yang W. Structural and functional modules in RNA interference[J]. Curr Opin Struct Biol, 2009, 19: 286-293.
- [24] Ender C, Meister G. Argonaute proteins at a glance[J]. J Cell Sci, 2010, 123: 1 819-823.
- [25] Guo J, Jiang X, Gui S. RNA interference-based nanosystems for inflammatory bowel disease therapy [J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 5 287-310.
- [26] Suresh S, Ehrenkauer G, Zhang H. Development of RNA interference trigger-mediated gene silencing in Entamoeba invadens [J]. Infect Immun, 2016, 84: 964-975.

(此文编辑 文玉珊)