

药物预处理后缺血再灌注损伤大鼠心肌重塑与血管紧张素受体表达

唐显军¹, 陈明², 王建², 张冬颖²

(1. 重庆市肿瘤研究所 400031; 2. 重庆医科大学附属第一医院心内科 400050)

摘要:目的 观察用肾素血管紧张素系统(RAS)阻断剂药物预处理后,大鼠心肌缺血再灌注损伤中血管紧张素受体的表达与心肌重塑。方法 148 只大鼠随机分成四组:假手术组(Sham 组)、对照组、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)组、血管紧张素受体阻滞剂(ARBs)组。术前对照组给予生理盐水灌胃,ACEI 组给予福辛普利 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、ARBs 组缬沙坦 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃 4 周,对照组、ACEI 组、ARBs 组予以手术开胸结扎大鼠心脏左冠状动脉前降支 30 min,然后松脱此结扎线建立缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤动物模型,Sham 组开胸不结扎,术后各组继续药物干预,分别于术后 3、7、14、28 d 采集大鼠心脏标本。予天狼腥红染色、免疫组化(SABC)观察心肌间质胶原沉积;血管紧张素 II-1、2 型受体(angiotensin II type 1,2 receptor, AT1R、AT2R)在心肌细胞的定位、表达的动态变化。结果 对照组心肌间质胶原沉积各参数随时间进展逐渐升高,于术后 14、28 d 显著高于相应 Sham 组;ACEI 组、ARBs 组间质胶原沉积于术后 28 d 显著性低于对照组。SABC 分析显示 AT1R 在心肌细胞分布弥散,IR 术后初期有较高表达,晚期有衰减趋势;AT2R 定位于心内膜下层的成纤维细胞膜、部分心肌细胞膜、心肌间质的成纤维细胞膜;AT2R 呈一过性表达,对照组 IR 术后 7 d 时达峰值,ARBs 组较对照组 AT2R 表达峰值提高、提前。结论 ACEI、ARBs 能有效地抑制心肌间质重塑。IR 术后 AT2R 呈一过性表达。可能部分是由于相对较长时间术前 AT1R 的阻断。AT2R 可能具有抑制心肌细胞重塑的作用。

关键词:心肌缺血;再灌注损伤;受体,血管紧张素;福辛普利

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.28.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)28-2851-03

Angiotensin receptor expression and myocardium remodelling in IR rat after ACEI/ARBs pretreatment

Tang Xianjun¹, Chen Ming², Wang Jian², Zhang Dongying²

(1. Chongqing Tumor Institute, Chongqing 400031, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400050, China)

Abstract: Objective To observe the distribution of myocardial and expression of AT2R in IR rat under the antagonist pretreatment of RAS. **Methods** 148 rats were divided randomly into four groups: Sham group, Control group, ACEI group and ARBs group. The Control group were received placebo, ACEI group were received foscipril ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and the ARBs group were received valsartan ($10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) respectively via gavage for 4 weeks before surgery. To make IR model, the thorax of rats was opened, and the LAD(left anterior descending coronary artery) was ligated for the control group, ACEI group and ARBs group. After 30 minutes, the ligature was removed and the treatment was continued to use till the heart was removed. On the 3rd, 7th, 14th, 28th postoperation day, rats were killed for the heart (after hemodynamics). The section was stained by picosirus red and immunohistochemistry to observe collagen deposition in institution and areas around vessels and dynamic expression of AT. **Results**

Collagen deposition in the myocardial interstitial of Control group increased gradually, and there was significantly difference between the Sham group and the Control group at day 7, 14, and 28. However, collagen deposition of ACEI group and ARBs group was significantly decreased compared with the Control group. The distribution of AT1R was dispersed, and it was increased for a short period and decreased slowly after IR. While the distribution of AT2R was localized on the membrane of fibroblast in subendocardial, and part of the myocardial membrane. The expression of AT2R was transient after IR under pretreatment of ACEI and ARB. Its reexpression reached a peak at day 7 in Control group, while in ARBs group the peak was earlier and higher than that in the Control group. **Conclusion** ACEI and ARBs may inhibit cardiovascular remodelling effectively. The reexpression of AT2R was transient after IR. It was partly because of the long-term blockade of AT1R after pretreatment of ARBs.

Key words: myocardial ischemia; reperfusion injury; receptors angiotensins; fosinopril

肾素血管紧张素系统(RAS)尤其是心脏局部 RAS 在心脏疾患中起重要作用。血管紧张素 II-2 型受体(AT2R)主要分布于胚胎组织,出生后大多数组织器官的 AT2R 迅速衰减甚至消失^[1],因此 AT2R 的研究有一定的困难。但新近研究表明在某些病理状态下:如缺血性心脏病、扩张性心肌病、组织重建、创伤修复、实验性心肌肥厚、心肌梗死、血管新生内膜损伤,AT2R 再度重新表达^[2],而其在心脏中定位、分布、表达规律,以及其与血管紧张素 II-1 型受体(AT1R)之间的相互作用关系仍存在较大的争议。理论及实验证实 AT1R 被长期阻断后,RAS 发生负反馈激活,血中血管紧张素 II(Ang II)升高。

本实验基于以上相关理论,采用术前相对较长时间的 AT1R 阻断使大鼠体内 Ang II 反馈性升高,然后给予心肌缺血,再灌注损伤,促使 AT2R 的再度表达,并继续阻断 AT1R,

以使升高的 Ang II 作用于 AT2R 来观察 AT2R 激活后产生的功能,以及 IR 损伤后 AT2R 的表达规律。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备 健康雄性 SD 大鼠 148 只,体质量 150~250 g。实验分四组:假手术组(Sham 组)28 只及对照组 40 只给予生理盐水灌胃;血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)组 40 只给予福辛普利 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;血管紧张素受体阻滞剂(ARBs)组 40 只给予缬沙坦 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。各组术前 4 周开始灌胃,手术采用开胸结扎左冠状动脉前降支,30 min 后松脱此结扎线,恢复血流再灌注,Sham 组开胸不结扎动脉。术后第 2 天各组仍每日原药物灌胃,Sham 组术后 1 周处死取材,其余三组(对照组、ACEI 组、ARBs 组)每组各分成 4 个亚组,每个亚组 10 只大鼠,分别灌胃 3、7、14、28 d,于相应时

间点处死取材。

1.2 标本取材及主要试剂 各时点心腔内注射氯化钾使心脏停跳在舒张期并灌注生理盐水,再灌注 4%多聚甲醛以预固定心脏;取出心脏标本再行固定 24 h (4 °C);常规石蜡包埋切片。主要试剂:购买 Santa Cruz 公司的兔抗鼠 I 型胶原抗体、兔抗鼠 III 型胶原抗体;USA 的天狼猩红 Sigma;武汉博士德生物有限公司的即用型 SABC、DAB 显色试剂盒、兔抗鼠 AT1R 抗体、兔抗鼠 AT2R 原抗体。

1.3 病理检查 常规苏木精-伊红(HE)染色。苦味酸-天狼猩红(picrosirius-red,PSR)染色、常规免疫组化(SABC)染色。半定量分析:间质胶原容积分数测定,PSR 染色的切片,在光镜下分为缺血区(ischemia zone, IZ)和非缺血区(nonischemia zone, NIZ),每区随机选取 4 个不含血管视野,用 Image Pro Plus 4.0 专业显微图像分析软件进行图像分析,计算每个视野中胶原组织占整个视野面积的百分比(collagen volume fraction CVF),根据天狼猩红染色切片在偏振光下 I 型胶原呈红色、黄色,III 型胶原呈绿色来分析测量 I 型、III 型胶原,并计算 I/III。血管紧张素受体光密度值测量,随机取 4 个视野,高倍镜下分为缺血区和非缺血区,用 Image Pro Plus 4.0 专业显微图像分析软件进行图像分析,通过灰度调节测量每个视野的光密度值。

1.4 统计学处理 实验结果数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 10.0 统计软件包进行分析。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 *q'* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AT2R 的定位 AT2R 定位于心内膜下层的成纤维细胞膜、部分心肌细胞膜、心肌间质的成纤维细胞膜。

2.2 IR 损伤心脏血管紧张素受体的动态变化 AT1R 在各手术组 IR 术后缺血区 3 d 即有较高表达,7 d 时达峰值,晚期有衰减趋势。AT2R 在对照组 IR 术后 3 d 表达较低,7 d 时达高值。AT2R 在 ARBs 组:IR 术后 3、7 d 时 AT2R 高表达,且它的这两个时间点光密度值相接近。AT2R 在 Sham 组未检出。IR 术后 14、28 d 时对照组、ARBs 组 AT2R 低检出。见图 1~2,插 II 图 3。

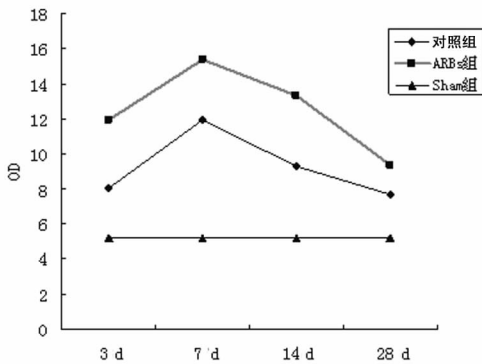


图 1 缺血区 AT1R 的变化

2.3 心肌重塑改变 对照组缺血区胶原容积随着时间进展逐渐增加,于 IR 术后 14、28 d 较 Sham 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。28 d 时胶原沉积量数倍于相应 Sham 组。ACEI、ARBs 组缺血区胶原容积增加缓慢。统计学上,术后 28 d 时 Sham 组、对照组差异有统计学意义($P < 0.05$),高于 Sham 组,低于对照组;各时点胶原沉积 ACEI 组、ARBs 组之间差异无统计学意义。见表 1、插 II 图 4~6。

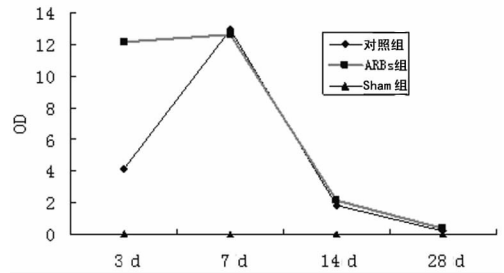


图 2 缺血区 AT2R 的变化

表 1 缺血区细胞外基质胶原沉积($\bar{x} \pm s$)

类别	组别	3 d	7 d	14 d	28 d
I	Sham 组	6.04±0.53	6.04±0.53	6.04±0.53	6.04±0.53
	对照组	12.20±1.15	22.38±1.31*	30.65±0.96*	38.95±2.21*
	ACEI 组	11.08±1.02	16.10±1.22	21.57±1.26*	29.30±1.73*▲
II	Sham 组	1.63±0.13	1.63±0.13	1.63±0.13	1.63±0.13
	对照组	3.35±0.42	5.32±0.54	6.46±0.72*	7.60±0.79*
	ACEI 组	2.85±0.51	3.75±0.56	4.47±0.76	5.83±0.53*▲
I/III	Sham 组	3.70±0.10	3.70±0.10	3.70±0.10	3.70±0.10
	对照组	3.68±0.44	4.24±0.44	4.80±0.58	5.17±0.57
	ACEI 组	3.98±0.69	4.33±0.38	4.92±0.62	5.04±0.28
	ARBs 组	3.85±0.60	4.28±0.49	4.44±0.49	4.82±0.51

*: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较;▲: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

3.1 AT2R 的分布、定位 AT2R 的组织学定位因其与功能密切相关近年来备受关注,也成为众多研究的热点。血管紧张素 II 受体(ATR)定位亦是众说纷纭^[3-4]。本实验发现:AT2R 定位于心内膜下层的成纤维细胞膜、部分心肌细胞膜、心肌间质的成纤维细胞膜。目前,AT2R 的细胞类型定位争议较大。Horiuchi 等^[5]、Akishita 等^[6]发现 AT2R 定位于成纤维细胞、平滑肌细胞、内皮细胞表达 AT2R,与本实验观察较一致。而 Fabrice 等^[7]发现 AT2R 分布于肠系膜动脉的中膜或外膜上。这种差异可能源于所观察的组织学对象:肠系膜动脉与本实验的心肌组织的不同。

3.2 ATR 表达的动态改变 新近的动物实验对于 ATR 的表达初步取得了一些突破:AT1R、AT2R 在蛋白水平的变化与信使核糖核酸(mRNA)水平的转录调节是一致的,AT1R 表达在心肌梗死(MI)后 3 d 至 8 周显著增加,AT2R 在病理状态再度重新表达^[8]。本实验发现:AT1R 在对照组和给药组(ACEI、ARBs 组)术后持续较高表达,晚期有衰减趋势,推测可能系(1)IR 手术本身刺激 AT1R 的表达;(2)术前相对较长时间的 AT1R 阻断,受体与其阻断剂之间的相互作用使 AT1R 蛋白表达增加;(3)IR 的损伤是有限的,晚期与损伤有关的生物因子有回复趋势。各实验组的 14、28 d 时光密度值极低或不能检测出;在对照组术后 3 d 可以检测出 AT2R,7 d 时达峰值;在 ARBs 组,可观察到术后 3、7 d 时 AT2R 的高表达,高于其他实验组的各个时间点,且它的这两个时间点光密度值相接近,推测其峰值可能在 3~7 d 中的一个时间点;在非缺血区 AT2R 表达低于各组相应时点的光密度值,AT2R 在本实验中的表达规律提示在 IR 损伤中 AT2R 的表达呈一过性,持续 AT1R 的阻断可引起 AT2R 表达提高,提前。由以上推测本实验 AT2R 表达可能系(1)心肌缺血再灌注损伤本身可能是引起 AT2R 再度表达的最主要原因;(2)AT2R 可能对损伤更为敏感,随着 IR 对心脏损伤作用的减弱,AT2R 迅速衰减;(3)术前相对

较长时间的 AT1R 阻断可能参与了 ARBs 组 AT2R 表达的提高、提前。Yang 等^[9]发现 AT1R 表达在 IR 后立即增加,AT2R 并未受影响。Horiuchi 等^[5]发现 AMI 后梗死区和非梗死区术后 1 d AT2R 受体密度即增加,7 d 时更进一步上调。

3.3 ATR 与心肌重塑 I 型和 III 型胶原的合理比例对维护间质网络的结构与功能完整具有重要的意义,也能较好地反映心肌纤维化程度^[10]。ACEI、ARBs 药物干预的动物实验、大型临床实验研究表明此二类药物对心脏的保护作用已经得到认同^[11]。IR 术后 Ang II 通过 AT1R 介导了胶原的沉积、间质的重塑,而当 AT1R 被阻断后,反馈性升高的 Ang II 与 AT2R 结合抑制了 AT1R 的心脏重塑作用。提示在整个心室重塑的进展变化中,由于 AT2R 表达的量及增加、衰减的变化规律,AT2R 在心室重塑中的作用是有限的、次要的;而促进胶原沉积作用的 AT1R 的持续被阻断才是在 ARBs 抑制心室重塑中起主要作用。以至于在作者的实验中看到虽然 ARBs 组术后 14、28 d 时 AT2R 的表达已经衰减到难以检出的程度,ARBs 组由于 AT1R 的持续被阻断,IR 后期心脏的重塑仍处于持续被抑制状态,并不因可能具有抑制效应的 AT2R 的衰减而开始发生心室重塑。AT2R 可能具有与 AT1R 相拮抗的生物学功能^[12]。另外,IR 术前 AT1R 的相对较长时间的阻断对于术后胶原沉积的抑制作用是不可忽视的,缙沙坦在内的 ARBs 一类药物相对起效较为缓慢,要达到 AT1R 的充分阻断需要一个体内代谢过程,故实验中 ARBs 组术后观察到的胶原沉积抑制效应是与术前的持续 AT1R 的阻断密不可分的,且 ARBs 逆转已发生的心室重塑和抑制心室重塑是有区别的。本研究与大部分的文献报道相一致。而 Xu 等^[13]发现:MI 后心脏重塑,血动力学、心脏功能的病理生理中 AT2R 不是重要的调节,AT2R 只是在 AT1R 被阻断后才抑制心肌细胞肥大,成纤维细胞增生,而出现心脏保护作用,Booz 等^[14]认为,心血管重塑与 AT1R、AT2R 的分布比例有关,甚至可能与性别相关^[15]。因此可以推测:在抑制间质重塑中,AT1R 的阻断起主要作用,AT2R 的激活起辅助作用。

综上所述,IR 术后 AT2R 呈一过性表达。AT2R 定位于心内膜下层的成纤维细胞膜、部分心肌细胞膜、心肌间质的成纤维细胞膜。AT2R 可能对抗 AT1R 的部分作用,在心肌间质重塑中 AT1R 的阻断起主要作用,AT2R 的激活可能起部分次要作用。

参考文献:

- [1] Nakajima M, Hutchinson H, Fujinaga M, et al. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(23): 10663-10667.
- [2] Akishita M, Horiuchi M, Yamada H, et al. Accentuated vascular proliferation and altered remodeling after injury in mice lacking angiotensin II type 2 receptor[J]. Circulation, 1997, 96(Suppl 1): I-547.
- [3] Monike SU, Muscha S, Martin P, et al. The angiotensin

AT2-Receptor Mediates Inhibition of Cell Proliferation in Coronary Endothelial Cells[J]. J Clin Invest, 1995, 95(2): 651-657.

- [4] Sabri A, Levy BI, Poitevin P, et al. Differential roles of AT1 and AT2 receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(2): 257-264.
- [5] Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent Progress in Ang II Iotensin II Type 2 Receptor Research in the Cardiovascular System [J]. Hypertension, 1999, 33(2): 613-621.
- [6] Akishita M, Iwai M, Wu L, et al. Inhibitory Effect of Angiotensin II Type 2 Receptor on Coronary Arterial Remodeling After Aortic Banding in Mice [J]. Circulation, 2000, 102(14): 1684-1689.
- [7] Fabrice B, Cooper ME, Caney RM, et al. Vascular expression of angiotensin type 2 receptor in the adult rat; influence of angiotensin II infusion [J]. J Hypertension, 2001, 19(6): 1075-1081.
- [8] Sun Y, Weber KT. Angiotensin II receptor binding following myocardial infarction in the rat [J]. Cardiovasc Res, 1994, 28(11): 1623-1628.
- [9] Yang Z, Bove CM, French BA, et al. Antiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction [J]. Circulation, 2002, 106(1): 106-111.
- [10] Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell [M]. 3rd ed. New York: Garland Publishing, 1994.
- [11] Mankad S, d'Amato TA, Reichek N, et al. Combined Angiotensin II Receptor Antagonism and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Further Attenuates Postinfarction Left Ventricular Remodeling [J]. Circulation, 2001, 103(23): 2845-2850.
- [12] 景涛, 王海东, 何国祥, 等. 条件表达 AT2R 基因对体外培养血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. 重庆医学, 2007, 36(11): 1045-1048.
- [13] Xu J, Carretero OA, Liu YH, et al. Role of AT2 Receptors in the Cardioprotective Effect of AT1 Antagonists in Mice [J]. Hypertension, 2002, 40(3): 244-250.
- [14] Booz GW. Cardiac angiotensin AT2 receptor: what exactly does it do [J]. Hypertension, 2004, 43(6): 1162-1163.
- [15] Sampson AK, Moritz KM, Jones ES, et al. Enhanced angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to chronic low-dose angiotensin II in female rats [J]. Hypertension, 2008, 52(4): 666-671.

(收稿日期: 2011-04-14 修回日期: 2011-06-08)

(上接第 2850 页)

- [11] Stevenson DJ, Morgan C, McLellan LI, et al. Reduced glutathione levels and expression of the enzymes of glutathione synthesis in cryopreserved hepatocyte monolayer cultures [J]. Toxicol In Vitro, 2007, 21(3): 527-532.
- [12] Martin H, Abadie C, Heyd B, et al. N-acetylcysteine par-

tially reverses oxidative stress and apoptosis exacerbated by Mg-deficiency culturing conditions in primary cultures of rat and human hepatocytes [J]. J Am Coll Nutr, 2006, 25(5): 363-369.

(收稿日期: 2011-04-09 修回日期: 2011-05-03)