

· 基础研究 ·

缬沙坦预处理后缺血再灌注损伤大鼠冠状动脉重构与 AT2R 表达

唐显军, 钟艺华

(重庆市肿瘤研究所 400031)

摘要:目的 观察肾素-血管紧张素阻断剂缬沙坦预处理后大鼠心肌缺血再灌注损伤中血管紧张素受体 AT2R 的表达与冠状动脉重构。方法 将 123 只大鼠随机分成 3 组:假手术(Sham)组、对照(Control)组、缬沙坦(ARB)组。术前假手术组、对照组给予生理盐水灌胃,缬沙坦组给予缬沙坦 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃 4 周,对照组、缬沙坦组予以手术开胸结扎大鼠心脏左冠状动脉前降支 30 min 后松脱结扎线建立缺血再灌注(I-R)损伤动物模型,假手术组开胸不结扎,术后各组继续用生理盐水、缬沙坦灌胃,分别于术后 3、7、14、28 d 4 个时间点测量左心室舒张压后处死大鼠并采集大鼠心脏标本。予天狼猩红染色、免疫组化链霉素亲和素-生物素-过氧化酶复合物(SABC)观察冠状动脉重构、冠周胶原沉积以及 AT2R 在冠状动脉的定位、表达的动态变化。结果 免疫组化分析显示 AT2R 定位于冠状动脉外膜呈放射状分布,尤以大血管管周密度较高,冠状动脉内膜也有部分表达。AT2R 呈一过性表达,对照组 I-R 术后 7 d 时达峰值,缬沙坦组较对照组 AT2R 表达峰值提高、提前。I-R 术后 3 d 心脏舒张功能受损;缬沙坦组左心室舒张末压(LVEDP)显著性低于对照组。缬沙坦组冠周间质胶原沉积于术后 28 d 显著性低于对照组;对照组心肌冠状动脉周围胶原沉积随时间进展逐渐升高,术后 14、28 d 显著高于 Sham 组。结论 缬沙坦可能通过心肌 I-R 损伤后 AT2R 的一过性高表达来抑制冠状动脉重构而保护心功能。

关键词:心肌缺血;再灌注损伤;血管紧张素受体;缬沙坦

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.25.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)25-3008-03

Coronary arterial remodeling and angiotensin II type 2 receptor expression in ischemia-reperfusion injury rat after valsartan pretreatment

Tang Xianjun, Zhong Yihua

(Chongqing Tumor Research Institute, Chongqing 400031, China)

Abstract: Objective To observe the expression of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) and coronary arterial remodeling in ischemia-reperfusion(I-R) injury rat after the renin-angiotensin blocker valsartan pretreatment. **Methods** 123 rats were randomly divided into 3 groups: sham-operation group(sham), control group and valsartan group(ARB). The control group and the sham group received the gavage of normal saline and the ARB group received valsartan gavage $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ for 4 weeks before surgery. The I-R injury rat model was established by thoracotomy for ligating the left anterior descending (LAD) coronary artery and removing the ligation after 30 min. The sham group was performed the thoracotomy without ligation. At the 4 timepoints of postoperative 3, 7, 14, 28 d, the left ventricular diastolic and systolic pressures were measured, then the rats were killed for collecting the rat heart sample. The section was stained by sirius red. The collagen deposition in coronary arterial remodeling and coronary arterial peripheral area, and the dynamic change of location and expression of AT2R in the coronary artery were observed by the immunohistochemical streptavidinbiotin peroxidase complex (SABC). **Results** The immunohistochemical analysis revealed that AT2R was localized in the adventitia of coronary arteries with the radial distribution, showing the higher density especially in large coronary arterial peripheral area, the partial expression existed in the coronary arterial intima. The expression of AT2R was transient, which on 7 d after I-R operation in the control group reached the peak value, while the expression peak value of AT2R in the valsartan group was higher and earlier than that in the control group. The heart diastolic function on 3 d after I-R operation was impaired; the left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) in the valsartan group was significantly lower than that in the control group. The collagen deposition of coronary peripheral mesenchyma on postoperative 28 d in the valsartan group was significantly lower than that in the control group; the coronary peripheral collagen deposition in the control group was gradually increased with the time progression, which on postoperative 14, 28 d was significantly higher than that in the sham group. **Conclusion** Valsartan could inhibit the coronary arterial remodeling for protecting the heart function possible by the transient high AT2R expression after myocardial I-R injury.

Key words: myocardial ischemia; reperfusion injury; angiotensin receptor type 2; valsartan

心脏作为内分泌器官存在独立的肾素-血管紧张素系统(RAS),它是心血管生理、病理最重要的调节系统,血管紧张素 II(Ang II)被证实可以引起血管重构,血管内皮细胞分泌的 Ang II 可促进血管平滑肌细胞的增殖与肥大^[1]。在某些病理

状态下:如缺血性心脏病、组织重建、心肌梗死、血管新生内膜损伤、血管紧张素 II 2 型受体(AT2R)再度重新表达。

血管重构在原发性高血压研究颇多,而临床常见急性冠脉缺血事件,反复的缺血及再血管化实则已触发了相应冠状动脉

构型的变化。本实验采用术前相对较长时间的血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)阻断,缺血再灌注术后持续阻断 AT1R 来观察大鼠冠状动脉重构与 AT2R 表达关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备 健康雄性 SD 大鼠 123 只,体质量 150~250 g。随机分成 3 组:假手术(Sham)组 11 只;对照(Control)组即生理盐水灌胃组:14 只×4 组(分设 4 个时间点:3、7、14、28 d);缬沙坦(ARB)组即缬沙坦 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃组:14 只×4 组(分设 4 个时间点:3、7、14、28 d)。各组术前 4 周开始灌胃。手术行气管切开插管,连通动物呼吸机(潮气量约 40 mL/kg,呼吸频率为每分钟 70 次)。沿左侧胸骨旁斜切口,手术采用开胸结扎左冠状动脉前降支,30 min 后松脱结扎线,恢复血流再灌注,Sham 组开胸不结扎动脉。术后继续给药:前 3 d 腹腔注射给药,剂量各组不变,3 d 后改为灌胃,直至于相应时间点(3、7、14、28 d)对照组,ARB 组各亚组处死取材,假手术组 7 d 处死取材。

1.2 血流动力学检测 各时间点给予 2.5%戊巴比妥腹腔内注射麻醉大鼠,逐层切开皮肤、浅筋膜、深筋膜,分离出颈总动脉,结扎远心端,近心端血管钳钳夹,插入聚苯乙烯心导管,松开血管钳,将导管推送至主动脉,连接 MPA-2000M 型多道生理记录仪,当数值稳定时记录动脉收缩压(SBP)、动脉舒张压(DBP);然后将导管插进左心室,当数值稳定时记录左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP),左室压力上升、下降速率。

1.3 标本取材 各时间点大鼠测定完血流动力学后,导管退出左心室,从导管内注射 30 mmol/L 氯化钾后拔除导管,活体灌注生理盐水,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 ℃ 4%多聚甲醛);常规石蜡包埋;自心脏中部开始分别向上、向下沿左室长轴垂直每隔 1 mm 横断面连续切片,两张为一对(4 μm 厚),分别标记 +1 对、+2 对……;-1 对、-2 对……。免疫组化(immunohistochemistry, IHC)检测 AT2R 等均用配对切片。

1.4 主要试剂 兔抗鼠 I 型胶原抗体、兔抗鼠 III 型胶原抗体(SantaCruz 公司);天狼猩红(Sigma, 美国);即用型 SABC、DAB 显色试剂盒、兔抗鼠 AT2 抗体(武汉博士德生物有限公司)。

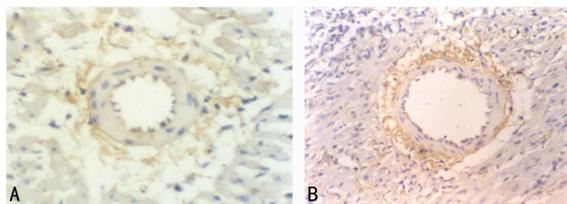
1.5 病理检查 血管周围胶原容积分数测定:每张经 PSR 染色的切片,在光镜下分为外径为 100 μm 以上(大冠状动脉)和 100 μm 以下(小冠状动脉)的血管^[2],用 Image Pro Plus 4.0 专业显微图像分析软件进行图像分析,计算每个视野中胶原组织所占面积与血管内腔面积之比值(划轮廓线计算面积)。并计算中膜面积与内膜面积之比值以及 F 值。F=1 视为正圆,0.75≤F<1 视为椭圆,F<0.75 的血管视为不规则弃之。血管紧张素受体光密度值测量:随机取 4 个视野,用 Image Pro

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。

1.6 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 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 定位于冠状动脉外膜呈放射状分布。冠脉内膜也有部分表达,见图 1。



A: ARB 组 3 d 时小冠状动脉 AT2R 的表达(IHC×400); B: Control 组 7 d 时大冠状动脉 AT2R 表达(IHC×200)。

图 1 血管紧张素受体分布

2.2 血流动力学改变 缺血再灌注损伤(I-R)术后 3 d 心功能明显下降,舒张功能受损尤为明显;28 d 心功能有明显恢复,ARB 组各血流动力学指标恢复接近正常水平(表 1)。

2.3 I-R 损伤后 AT2R 的动态变化 AT2R 在对照组 I-R 术后 3 d 较低表达,7 d 时达峰值。ARB 组 I-R 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。I-R 术后 14 d 及 28 d 时对照组、ARB 组 AT2R 低检出(图 2)。

2.4 冠状动脉重构 I-R 术后冠状动脉重构表现为血管周围胶原沉积;血管中膜增生,血管腔狭窄。I-R 术后 28 d 时大冠状动脉血管周围胶原容积分数对照组高于假手术组和 ARB 组,差异有统计学意义(P<0.05);而 ARB 组略高于 Sham 组,差异无统计学意义。阻力小动脉血管周围胶原容积分数各实验组差异无统计学意义。I-R 术后血管 M/L:在阻力小动脉、大冠状动脉中对照组及 ARB 组较 Sham 组高,但差异无统计学意义(表 2、图 3)。

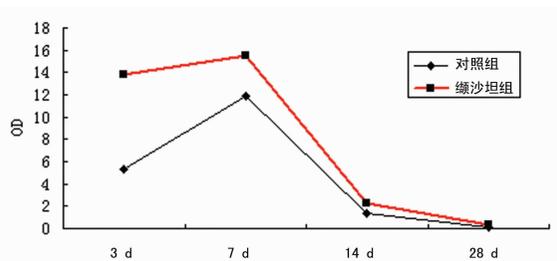


图 2 冠状动脉血管周围 AT2R 的变化

表 1 各实验组 I-R 术后 3、28 d 血流动力学变化($\bar{x} \pm s$)

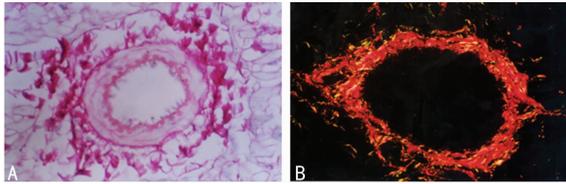
组别	SBP(mm Hg)	DBP(mm Hg)	LVSP(mm Hg)	LVEDP(mm Hg)	+dp/dt(mm Hg/s)	-dp/dt(mm Hg/s)
Sham	124.9±9.3	94.8±6.2	129.7±10.1	4.8±1.2	5 085±294	3 559±206
Control 3 d	91.6±7.0	75.3±6.0	96.3±5.0	12.4±2.2	4 429±309	2 866±249
Control 28 d	99.6±3.8	82.5±5.7	103.0±6.2	7.8±1.5	4 467±316	2 875±207
ARB 3 d	93.0±9.1	73.2±6.3	89.0±10.4	10.6±3.5*	4 590±377	2 881±353
ARB 28 d	124.2±8.2	93.8±7.1	124.9±6.6	5.3±1.3	5 215±409	3 464±217

*: P<0.05, 与 Sham 组比较。

表 2 I-R 术后 28 d 冠状动脉重构($\bar{x} \pm s$)

组别	小冠状动脉	大冠状动脉	小冠状动脉	大冠状动脉
	PCVF	PCVF	M/L	M/L
Sham	0.33±0.04	0.53±0.08	0.59±0.08	0.40±0.05
Control	0.39±0.06	0.81±0.08*	0.66±0.09	0.45±0.05
ARB	0.37±0.05	0.61±0.07▲	0.62±0.06	0.42±0.05

*: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较; ▲: $P < 0.05$, 与 Control 组比较。



A: ARB 组 28 d 时小冠状动脉胶原沉积(PSR×400); B: ARB 组 28 d 时大冠状动脉胶原沉积(PSR×200 偏振光)。

图 3 胶原沉积

3 讨论

本实验发现: AT2R 定位于冠状动脉外膜呈放射状分布, 尤以大血管冠周密度较高, 冠状动脉内膜也有部分表达。Akishita 等^[3]认为 AT2R 定位于冠状动脉管周区, 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。

血管重构一直以来受到学术界广泛的关注, 有学者用中膜/内腔比值来观察^[4]。管腔狭窄、中膜平滑肌增生导致的中膜增厚、血管周围胶原的沉积无一不影响着血管的生物学活性, 而不同口径的冠状动脉发生重构及其产生的生物学效应是不完全一致的。相关文献报道: 大动脉重构主要表现为主动脉中层 VSMC 增加, 而小动脉主要通过持续收缩状态增加微循环阻力, 而其 VSMC 增殖和细动脉管壁纤维化的器质性病变不明显^[5]。

本实验因客观条件的限制粗略地将冠状动脉按内径大小以 100 μm 为界值分成两组: 大冠状动脉(内径远大于 100 μm) 和小冠状动脉(内径小于 100 μm)。为减少可能产生的误差, 在图像分析处理时, 尽量采集规则圆形或近圆形分析。对照组冠脉血管周围胶原沉积, I-R 术后 28 d 大冠状动脉血管周围胶原容积分数对照组高于假手术组, 差异具有统计学意义。而冠状动脉中膜面积与内腔面积的比值虽然与 Sham 组无显著性差异, 但大冠状动脉及阻力小动脉 M/L 高于 Sham 组, 且阻力小动脉 M/L 增加的幅度相对高于主冠状动脉, 这些结果提示: 在 I-R 的冠状动脉重构中, 大冠状动脉的血管周围胶原沉积可能占相对优势, 而阻力小血管中膜增厚可能会在此后更长时间的小冠状动脉重构中会占相对优势。冠状动脉的这种形态结构的几何改变与小冠状动脉阻力增加, 大动脉的弹性、顺应性下降等生物学行为变化是相关联的。冠状动脉构型的这种改变最终将传导至心脏血流动力学的改变, 以致本实验观察到 I-R 术后 3 d 心功能明显下降, 尤以舒张功能受损明显。

在 ARB 组作者观察到胶原在血管周围的沉积受到抑制, 在大冠状动脉管周 PCVF 与对照组比较明显下降, 差异具有统计学意义, 28 d 时的 PCVF 较接近于 Sham 组。同时, IHC 染色发现 AT2R 在血管周围有一过性的高表达, 血管内皮细胞也有少量表达, 在本实验中 AT2R 在血管重构方面的这种变化是与文献报道相一致的。不同级别的动脉血管发生重构

的形态学变化不同, 其机制也不一致^[6-7]。血管紧张素转换酶受体拮抗剂(ARB)可通过阻断 Ang II 的介导反应, 从而抑制血管内皮细胞的表达, 影响血管重构, 延缓动脉硬化及心血管病的进展^[8]。RAS 系统、血管重构之间存在着复杂的网络联系, Ang II 在其中起关键调控作用^[9]。Ang II 还可能通过结缔组织生长因子、炎症因子的表达刺激胶原纤维增生以及细胞外基质沉积、加速血管平滑肌的生长发育, 促进血管重构的形成^[10]。

因此作者推测 I-R 损伤术后冠状动脉血管发生重构; 主要表现为大冠状动脉血管周围的胶原沉积, 小冠状动脉 M/L 增加。AT2R 在抑制胶原沉积, 改变动脉中膜内腔比值中起重要作用, 缬沙坦可能正是通过心肌 I-R 损伤后 AT2R 的一过性高表达来抑制冠状动脉重构从而达到保护心功能的目的。

参考文献:

- [1] Dhingra S, Sharma AK, Singla DK, et al. p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF- α and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(16):3524-3531.
- [2] Numaguchi K, Egashira K, Takemoto M, et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats[J]. *Hypertension*, 1995, 26(pt 1):957.
- [3] Akishita M, Ewai M, Wu L, et al. Lan inhibitory effect of ang II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice[J]. *Circulation*, 2000, 102(14):1684-1689.
- [4] Kassiri Z, Zhong J, Guo D, et al. Loss of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates maladaptive left ventricular remodeling in response to myocardial infarction[J]. *Circ Heart Fail*, 2009, 2(5):446-455.
- [5] 曹相致, 孙金萍, 景丽, 等. 原发性高血压大鼠动脉血管重构的形态学研究[J]. *重庆医学*, 2012, 41(27):2801-2803.
- [6] Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2011, 13(2):122-128.
- [7] Paravicini TM, Montezano AC, Yusuf H, et al. Activation of vascular p38 MAPK by mechanical stretch is independent of c-Src and NADPH oxidase: influence of hypertension and angiotensin II[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2012, 14(2):275-298.
- [8] 王筱梅, 刘少奎. 缬沙坦对血管损伤小鼠血管重构的影响[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2012, 4(4):363-365.
- [9] Galderisi M, de Divitiis O. Risk factor-induced cardiovascular remodeling and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, 51(4):523-531.
- [10] Zhong JC, Yu XY, Lin QX, et al. Enhanced angiotensin converting enzyme 2 regulates the insulin/Akt signalling pathway by blockade of macrophage migration inhibitory factor expression[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(1):66-74.