

佐芬普利对肾血管性高血压大鼠肾脏血管肾张素转换酶 2 及 Mas 受体的影响

秦晓毅, 卢新政*, 张 辉, 杨玉青, 郑宏健, 黄红娟, 侯麦花, 陈明龙, 孔祥清, 黄 峻

(南京医科大学第一附属医院心内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨佐芬普利对大鼠肾血管性高血压、心肌肥厚及肾脏血管肾张素转换酶 2(ACE2)及血管紧张素 1-7(Ang1-7)受体 Mas 的影响。**方法:**清洁型雄性 SD 大鼠 70 只,随机分为假手术组(S)20 只、2K1C 手术组 50 只。采用两肾一夹法(two-kidney one clip, 2K1C)制作肾血管性高血压模型,高血压造模成功大鼠 46 只,随机分为 2K1C + 蒸馏水组(K)23 只、2K1C + 佐芬普利组(Z)23 只。分别于术后第 4、8、12 周,无创血压仪套尾法监测血压,二维超声心动图监测心脏结构和功能;术后第 8、12 周分别处死大鼠取其代偿肾脏,荧光定量 PCR 检测其 ACE2 及 Ang1-7 受体 Mas mRNA 表达,Western blot 技术检测 ACE2 及 Mas 蛋白表达。**结果:**①术后 K 组各时间段血压均明显升高,Z 组较 K 组血压显著降低(P 均 < 0.01);②术后第 8、12 周,K 组收缩及舒张末期左室后壁厚度、室间隔厚度均显著增加,Z 组上述指标明显改善(P 均 < 0.01),第 12 周时 K 组射血分数显著降低,Z 组显著增加(P 均 < 0.01);③K 组中,Mas 基因及蛋白水平第 8 周时上调,第 12 周时下调,与 K 组相比,Z 组第 8 周时明显下调,第 12 周时明显上调(P 均 < 0.01);K 组中 ACE2 基因及蛋白水平第 8 周时上调,第 12 周时无显著变化,与 K 组相比,Z 组第 8 周时上调,第 12 周时显著下降($P < 0.01$);**结论:**2K1C 法成功复制肾血管性高血压大鼠模型,并致高血压性心脏改变;佐芬普利不仅能显著降低肾性高血压大鼠血压,还能改善心肌重构,上调肾脏组织中 Mas 基因与蛋白水平,下调 ACE2 基因及蛋白水平。

[关键词] 佐芬普利;肾血管性高血压;肾脏;血管紧张素转换酶 2;Mas 受体

[中图分类号] R541.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-749-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130607

Influence of Zofenopril to renovascular hypertension rats on ACE2 and Mas with kidney

Qin Xiaoyi, Lu Xinzhen*, Zhang Hui, Yang Yuqing, Zheng Hongjian, Huang Hongjuan, Hou Maihua, Chen Minglong, Kong Xiangqing, Huang Jun

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To discuss the effect of ACE2/angiotensin1-7/Mas receptor axis in renovascular hypertension rat kidney and myocardial hypertrophy of Zofenopril. **Methods:**Seventy male SD rats weighting 190~210 g were randomly divided into sham operation group (S, $n=20$) and 2 kidney 1 clip (2K1C) group ($n=50$). There were 46 rats developed hypertension successfully, and they were randomly divided into 2K1C + distilled water group (K, $n=23$) and 2K1C+Zofenopril group (Z, $n=23$). The systolic blood pressure were measured (SBP) by tail artery sleeve method at the end of 4th, 8th and 12th week respectively and ultrasonography was taken at the same time. After that, collected the right kidney at the 8th and 12th week respectively, detected the mRNA levels of ACE2 and Mas by RT-PCR, tested the protein expressions of ACE2 and Mas receptor by Western blot. **Results:**①Compared with the S group, the blood pressure of K group increased remarkably ($P < 0.01$) at the end of the 4th, 8th and 12th week respectively, and decreased significantly ($P < 0.01$) after been treated with Zofenoprilat. ②The end-diastolic and end-systolic ventricular septal thickness, left ventricular wall thickness in K group were significantly enhanced compared with S group at the end of the 8th and 12th week respectively ($P < 0.01$), EF reduced significantly at the 12th week. The front index were decreased ($P < 0.01$, respectively) and EF enhanced remarkably after been treated with Zofenopril. ③ The mRNA and protein expression of Mas receptor were up-regulated at the 8th week, while down-regulation occurred at the 12th week in K group contrast to S group. After being treated with Zofenopril, they decreased at the 8th week and elevated at the 12th week ($P < 0.01$, respectively).The mRNA and protein expression of ACE2

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30770890)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xzlu@sohu.com

were higher in K group in the two periods ($P < 0.01$, respectively) compared to S group. When treated with Zofenopril, it was reduced remarkably ($P < 0.01$). **Conclusion:** We established renovascular hypertension model successfully by two kidney one clip method. Zofenopril may significantly reduce the blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy of renovascular hypertension rats while inhibiting the down regulation of Mas receptor and impelling the down regulation of ACE2.

[Key words] Zofenopril; renovascular hypertension; kidney; angiotensin converting enzyme-2; mas receptor

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 749-753]

肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 在高血压心肌肥厚发病机制中发挥重要作用。血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 是近年发现的 RAAS 通路新成员, 其主要作用将血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 降解为 Ang1-7^[1], 后者与其 Mas 受体结合, 拮抗 Ang II 的心脏毒性, 具有抗心肌肥厚及心脏重塑的保护作用^[2]。血管紧张素转换酶抑制剂 (angiotensin-converting enzyme inhibitors, ACEI) 通过作用于 RAAS 中的血管紧张素转换酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE), 减少 Ang II 生成并增加 Ang1-7 水平而发挥作用。ACE2 与 ACE 同源, 但其催化作用并不一致^[3]。有研究显示, ACE2 对正常肾脏的形态及功能发育影响较小, 但在慢性肾脏病时其表达下调。ACE2 缺陷的慢性肾脏病模型大鼠肾损害较非 ACE2 缺陷者严重^[4]。肾脏是高血压及心肌肥厚的主要调节器官, 也是产生 RAAS 成员的主要来源。ACEI 对肾脏组织中的 ACE2、Ang1-7 及其受体 Mas 表达的作用尚未明了。佐芬普利是一种新型巯基类 ACEI。本研究旨在探讨佐芬普利对肾血管性高血压的治疗作用, 并阐明其对肾脏 ACE2/Ang1-7/mas 信号通路变化影响, 为临床治疗肾血管性高血压及高血压肾病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级 SD 大鼠 70 只, 体重 (200 ± 10)g, 南京医科大学实验动物中心 (动物合格证号: 2007000504395) 提供。银制肾动脉夹 (内径 0.2 mm, 上海奥尔科特科技生物科技有限公司), 大鼠无创血压仪 BP-2000 (上海曼普生物科技有限公司), 佐芬普利 (济南富创有限公司), 10% 水合氯醛、注射用青霉素钠 (华北制药股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 术前准备及分组

所有大鼠均饲以常规清洁固体饲料, 自由饮水适应 1 周, 手术前禁食 8 h, 器械以 0.1% 新洁尔灭浸泡消毒。然后将所有大鼠随机分为 2 组: 假手术组 (S) ($n=20$)、2K1C 手术组 ($n=50$)。2K1C 组中造模成功大鼠 46 只, 再随机分为 2K1C + 蒸馏水组 (K) ($n=23$)、2K1C + 佐芬普利组 (Z) ($n=23$)。Z 组于术后 4 周灌胃给药, 剂量为 10 mg/(kg·d)^[5], K 组予以等量蒸馏水灌胃。对所有动物处理符合伦理学标准。

1.2.2 大鼠肾血管性高血压模型制作

所有大鼠禁食 8 h, 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 腹腔注射麻醉, 然后将其固定、备皮、碘伏消毒、铺巾, 于剑突下沿腹正中线切开腹腔, 暴露左侧肾脏, 小心分离左侧肾动脉, 于肾动脉中段植入银夹, 缩窄动脉。S 组仅游离左肾动脉, 不作缩窄处理。所有手术大鼠均腹腔内使用青霉素预防感染, 消毒皮肤后缝合, 术后分笼, 置于室温, 苏醒后给予常规饮食。术后 3 d 内腹腔注射青霉素钠预防感染。

1.2.3 血压监测

采用无创血压仪 BP-2000 系统, 经套尾法分别于术前、术后 4、8、12 周测量各组大鼠血压, 术后 4 周收缩压 > 150 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 为造模成功标准^[6]。

1.2.4 心脏结构及功能监测

10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 腹腔麻醉, 二维超声心动图 (7.5 MHz 高频线控探头, GE 公司 VIVID7 型) 检测心脏结构及功能。测量指标如下: 舒张末期室间隔厚度 (IVSd)、收缩末期室间隔厚度 (IVSs)、舒张末期左室后壁厚度 (LVPWd)、收缩末期左室后壁厚度 (LVPWs)、射血分数 (EF) 等。测量值取 3~5 个心动周期计算平均值, 所有操作均由 1 人完成。

1.2.5 mRNA 提取及 RT-PCR 检测

分阶段处死各组大鼠, 收集其右侧肾脏, 分 2 份, 分别保存于 -80℃ 冰箱。用 TRIzol 试剂提取肾脏总 RNA (Invitrogen 公司, 美国)^[7]。测量提取肾脏 RNA 在 260 nm 处吸光度, 得到 RNA 浓度。通过实

时荧光定量 PCR (realtime fluorescence quantitative PCR)试剂盒(大连宝生物公司)检测肾脏中 ACE2 及 Mas 受体的 mRNA 表达水平。逆转录条件如下: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 停止。逆转录所得 cDNA 用于 PCR 反应, 按试剂盒提供的反应体系加样, 反应条件如下: 95℃ 2 min 变性; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min (40 个循环)。PCR 反应所需引物序列如下: ACE2 上游序列 5'-TCAGAGCTGGGATGCAGAAA-3', 下游序列 5'-GGCTCAGTCAGCATGGAGTTT-3'; Mas 上游序列 5'-TCCACCATCAATAGCAGC-3', 下游序列 5'-AAGCCACCCACATTCAGC-3'; β -actin 上游序列 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3', 下游序列 5'-CC-CATAC CCACCATCACACC-3'。

1.2.6 Western blot

采用蛋白提取试剂盒(凯基生物, 南京)提取肾脏组织总蛋白, 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶(碧云天生物, 杭州)电泳, 每组蛋白上样 100 μ g, 电泳完成后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 然后用 5% 脱脂奶粉封闭膜 1.5 h。再分别以 ACE2 抗体和 Mas 抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国)孵育, 置于 4℃ 冰箱过夜。次日以 TBST 洗膜 3 次, 再以联有辣根过氧化物酶的羊抗兔二抗(Bioword Technoligy 公司, 中国)室温孵育 2 h。蛋白表达情况经超敏 ECL 发光底物(Cell Signaling Technology 公司, 美国)曝光后直观呈现。三磷酸甘油酸脱氢酶(GAPDH, Cell Signaling Technology 公司, 美国)作为内参对照。最后各蛋白表达水平经内参校正后进行比较。Western 具体操作按以往文献报道进行^[8-9]。

1.3 统计学方法

计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用单因素方差分析, 组内不同时间点两两比较采用 SNK。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义, $P \leq 0.01$ 为差异有显著统计学意义, 统计数据均采用统计软件 SPSS 16.0 处理。

2 结果

2.1 大鼠存活情况

S 组大鼠均存活, 无麻醉及手术死亡情况; 2K1C 手术后, 大鼠死亡 1 只, 造模失败 3 只; K、Z 组药物干预后直至实验结束分别死亡 3 只、1 只。各时间段入统计分析大鼠每组均为 8 只。

2.2 动脉血压

S 组各时间段间血压无明显差异($P > 0.05$), 各组术前血压无明显差异。K 组术后各时间段血压较 S 组均显著升高($P < 0.01$)。K 组术后 12 周血压较术后 4、8 周均显著下降($P < 0.01$)。Z 组术后 8、12 周血压较 K 组均显著下降($P < 0.01$)。其中 8 周血压较 4 周显著下降 ($P < 0.01$), 12 周较 8 周血压显著下降($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 各组不同时间段收缩压比较

Table 1 The comparison of systolic pressure at different time (mmHg, $\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	术前	术后 4 周	术后 8 周	术后 12 周
S	126 \pm 3	127 \pm 5**	125 \pm 3**	126 \pm 7**
K	125 \pm 5	202 \pm 14	208 \pm 4	182 \pm 4#
Z	125 \pm 6	196 \pm 5	150 \pm 8**	137 \pm 3**

各组与同时点 K 组比较, ** $P < 0.01$; K 组术后 12 周血压与术后 8 周比较, # $P < 0.01$ 。

2.3 心脏结构及功能

S 组术后 8、12 周心脏各指标无显著变化。与 S 组相比, 8 周时, K 组大鼠室间隔厚度、左室后壁厚度及左室射血分数均显著增加($P < 0.01$); Z 组较 K 组室间隔厚度、左室后壁厚度均显著下降 ($P < 0.01$), 射血分数下降($P < 0.05$)。术后 12 周, K 组较 S 组室间隔厚度、左室后壁厚度仍有不同程度升高, 射血分数显著降低 ($P < 0.01$); 与 K 组相比, Z 组室间隔厚度、左室后壁厚度均有不同程度降低, 射血分数显著升高($P < 0.01$, 表 2)。

表 2 2K1C 大鼠术后 8、12 周的各组心脏超声心动图指标比较

Table 2 The comparison of heart echocardiography index in 8 and 12 weeks after operation ($\bar{x} \pm s, n=8$)

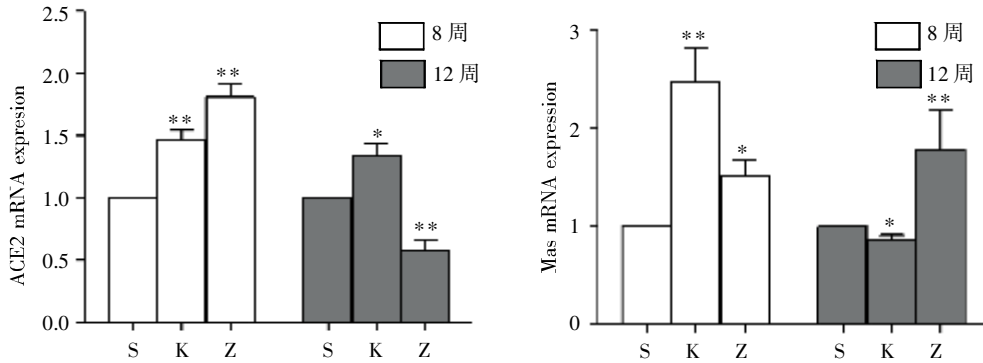
组别	IVSd(cm)	IVSs(cm)	LVPWd(cm)	LVPWs(cm)	EF(%)
S	0.17 \pm 0.01**	0.25 \pm 0.01**	0.17 \pm 0.03**	0.29 \pm 0.02**	76.98 \pm 0.68**
K	0.25 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01	0.29 \pm 0.02	0.38 \pm 0.03	84.84 \pm 1.75
Z	0.21 \pm 0.02**	0.28 \pm 0.03**	0.22 \pm 0.02**	0.31 \pm 0.02**	82.33 \pm 1.86*
S	0.18 \pm 0.01**	0.27 \pm 0.02**	0.17 \pm 0.0**	0.29 \pm 0.03*	77.12 \pm 0.58**
K	0.26 \pm 0.03	0.34 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01	0.33 \pm 0.01	73.51 \pm 1.24
Z	0.18 \pm 0.02**	0.26 \pm 0.01**	0.19 \pm 0.02**	0.29 \pm 0.01*	80.63 \pm 3.52**

同一时间点各组与 K 组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

2.4 肾脏 ACE2、Mas 受体表达

肾脏 ACE2、Mas 受体的表达采用 RT-PCR (图 1) 及 Western blot 法 (图 2) 检测。K 组中,ACE2 mRNA 及蛋白水平 8 周时显著上调 ($P < 0.01$),12 周较 8 周下调 ($P < 0.05$),但较 S 组仍显著上调 ($P <$

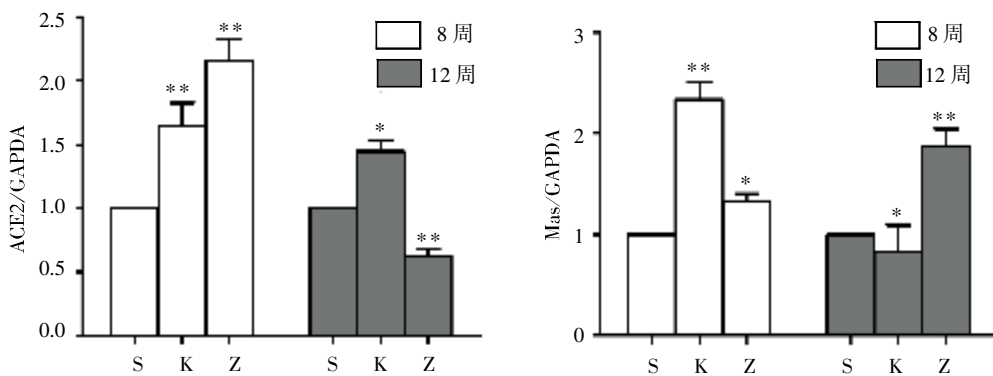
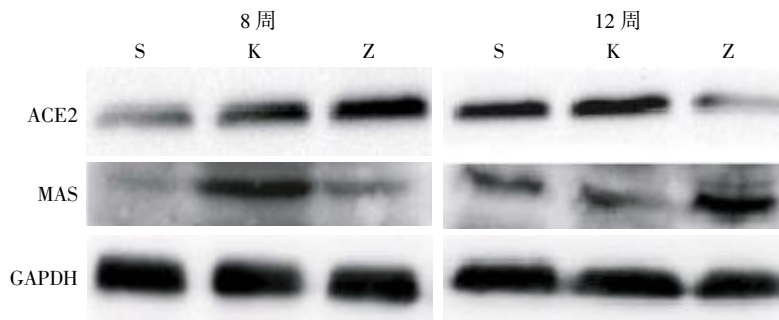
0.01);与 K 组相比,Z 组 8 周时显著上调,12 周时显著下调 ($P < 0.01$)。K 组中,Mas mRNA 水平及蛋白水平在 8 周时上调 ($P < 0.01$),12 周时下调 ($P < 0.05$);与 K 组相比,Z 组 8 周时下调 ($P < 0.05$),12 周时显著上调 ($P < 0.01$)。



8 周时 K 组与 S 组相比,12 周时 K 组与 8 周时 K 组相比,Z 组与对应时间段 K 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=8$)。

图 1 不同时间段各组大鼠肾脏 ACE2、Mas mRNA 表达水平

Figure 1 The expression of renal ACE2 and Mas mRNA in different time of each group



8 周时 K 组与 S 组比,12 周时 K 组与 8 周时 K 组相比,Z 组与对应时间段 K 组比,** $P < 0.01$,* $P < 0.01$ ($n=8$)。

图 2 不同时间段各组大鼠肾脏 ACE2、Mas 蛋白表达水平

Figure 2 The expression of renal ACE2 and Mas protein in different time of each group

3 讨论

长期血压升高使心肌适应性肥厚,继而导致一系列心血管事件。该过程中,常伴有 RAAS 系统激活,如高血压伴有抑郁症作为长期慢性应激作用,促

使交感神经兴奋,RAAS 激活,导致 Ang II 分泌增加,进一步加重高血压^[10],对机体产生有害作用。近年研究发现 RAAS 系统另一通路,即 ACE2/Ang1-7/Mas,该通路具有多种心脏保护作用,抑制心脏重构,改善心肌缺血再灌注后收缩功能^[1-2,11]。

ACE2 在大部分组织中均有表达,并与动脉粥样硬化、高血压、心衰等密切相关^[3]。目前对于肾脏 ACE2 的研究尚存在争议。在小鼠试验中,ACE2 对健康肾脏的发育无显著作用^[12]。有研究显示,自发性高血压大鼠肾脏 ACE2 表达下调^[13];也有报道,人类肾脏病时,肾小球 ACE2 表达升高^[14]。而在肾血管性高血压大鼠模型,其肾脏既有原发损害,又有高血压导致的继发损害,肾脏 ACE2 及 Mas 的表达尚未明了。

本研究采用 2K1C 复制肾血管性高血压大鼠模型,术后 4 周血压水平明显升高,提示大鼠肾血管性高血压造模成功,术后 8 周心脏超声显示心肌明显肥厚。其主要机制是手术缩窄大鼠一侧肾动脉,RAAS 过度激活,水钠潴留,血压升高,心肌肥厚。肾血管性高血压形成 4 周,以佐芬普利灌喂干预,术后 8 周、12 周血压显著下降,心肌肥厚及心功能明显改善。佐芬普利具有显著降压及改善心肌重构作用,其机制主要是佐芬普利抑制 ACE 功能,阻断 Ang I 转化为 Ang II,Ang I 经 ACE2 途径转化为 Ang1-9,Ang1-9 再降解为 Ang1-7,发挥心脏保护作用。早期高血压大鼠左心室壁肥厚、舒张功能受限;但随着高血压进展,K 组高血压大鼠术后 12 周与术后 8 周比较,心肌厚度无明显改变,EF、血压水平均显著下降,可能机制是 RAAS 过度激活后通过负反馈调节抑制了 Ang II 的过度释放。K 组健侧肾脏 ACE2 表达上调,Mas 受体表达下调,佐芬普利组 ACE2 下调,Mas 受体上调。可能机制是全身 RAAS 激活后,Ang II 水平升高,代偿性地促使 ACE2 水平升高,产生更多的 Ang1-7,又反应性地引起 Mas 受体减少;使用佐芬普利后,阻断 Ang II 的生成,故其下游 ACE2 适应性下调,Mas 适应性上调。

佐芬普利阻断了 RAAS 系统恶性循环,减少 Ang II 来源,抑制 ACE2/Ang1-7/MAS 轴过度激活。值得注意的是肾小球和组织的这种 ACE2 的差异表达在肾病进展中可能发挥重要作用。ACE2 下调可能使肾脏损害进一步恶化,对于肾动脉狭窄引起的高血压者,虽然血管紧张素转换酶抑制剂可降低血压改善心肌重构,但其可能引起肾病加重,提示对这类患者使用该药时需慎重。

[参考文献]

[1] Rice GI,Thomas DA,Grant PJ,et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE),its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism [J].

Biochem J,2004,383(Pt1):45-51

- [2] Santos RA,Ferreira AJ,Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme2-an giotensin1-7-mas axis[J]. Exp Physiol,2008,93(5):519-527
- [3] Tikellis C,Thomas MC. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a key modulator of the renin angiotensin system in health and disease [J]. Int J Pept,2012,2012:256-294
- [4] Li N,Zimpelmann J,Cheng K,et al. The role of angiotensin-converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules [J]. Am J Physiol, 2005,288(2):F353-F362
- [5] Capasso JM,Strobeck JE,Malhotra A,et al. Contractile behavior of rat myocardium after reversal of hypertensive hypertension[J]. Am J Physiol,1982,242 (5):H882-H889
- [6] Kusumoto K,Igata H,Ojima M,et al. Antihypertensive, insulin-sensitising and renoprotective effects of a novel, potent and long-acting angiotensin II type 1 receptor blocker,azilsartan medoxomil,in rat and dog models[J]. Eur J Pharmacol,2011,669(1-3):84-93
- [7] Correale J,Villa A. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis[J]. Ann Neurol,2010,67 (5):625-638
- [8] Fan Y,Shen F,Frenzel T,et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice [J]. Ann Neurol,2010,67(4):488-497
- [9] Kang YJ,Digicaylioglu M,Russo R,et al. Erythropoietin plus insulin-like growth factor-I protects against neuronal damage in a murine model of human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders [J]. Ann Neurol,2010,68(4):342-352
- [10] 吴俊,王东霞. 老年高血压伴抑郁患者血管紧张素 II 和皮质醇与动态血压的变化 [J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(8):1087-1090
- [11] Carlos M Ferrario. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin1-7:an evolving story in cardiovascular regulation[J]. Hypertension,2006,47(3):515-521
- [12] 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
- [13] 黄群英,晋学庆,吴可贵,等. 自发性高血压大鼠肾脏血管紧张素转换酶 2 mRNA 转录及其蛋白表达[J]. 中华高血压杂志,2007,15(6):473-476
- [14] Lely AT,Hamming I,van Goor H,et al. Renal ACE2 expression in human kidney disease[J]. J Pathol,2004,204 (5):587-593

[收稿日期] 2013-02-07