

不同年龄自发性高血压大鼠血浆和心室肌 Ang II 及心室肌 ATR 表达*

张军波¹, 吕颖^{2**}, 韩稳琦², 刘仲伟², 潘军强², 王军奎²

(1. 西安交通大学第一附属医院 周围血管科, 陕西 西安 710061; 2. 陕西省人民医院 & 西安交通大学第三附属医院 心内科, 陕西 西安 710068)

[摘要] 目的: 探讨年龄对血浆和心室肌血管紧张素 II (Ang II) 水平及心室肌受体血管紧张素受体 (ATR) 表达的影响。方法: 雄性自发性高血压大鼠 (SHR) 60 只均分为幼年组 (7 周龄)、成年组 (26 周龄) 及老年组 (51 周龄); 取各组大鼠 SHR 血浆及心室肌组织, 采用 ELISA 法检测循环血液和心室肌组织匀浆中的 Ang II 水平, 取左心室石蜡染色、切片观察间质纤维化程度, 免疫组化 SABC 法测定 ATR 亚型 AT1 和 AT2 表达。结果: 3 组 SHR 大鼠循环血浆中 Ang II 含量随年龄增大而增加、但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 心室肌匀浆中 Ang II 含量随年龄增加而升高、差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 3 组 SHR 大鼠心肌 IOD 值随年龄增加而增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且心肌胶原纤维沉积随年龄增加而明显增加, 尤其在老年组; 3 组 SHR 大鼠左室心肌中 AT1 的 GD 值随年龄增加而降低, AT2 的 GD 值在幼年组均高于成年及老年组 ($P < 0.05$); 老年组和成年组的 AT1/AT2 值均低于幼年组 ($P < 0.01$)。结论: 年龄对 SHR 循环血液中 Ang II 影响较小, 但可引起心肌组织局部血管紧张素受体 (ATR) 的改变, 导致心肌间质纤维化。

[关键词] 血管紧张素受体; 血管紧张素 II; 年龄; 自发性高血压大鼠; 心室肌

[中图分类号] R544.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)06-0653-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.007

Expression of Plasma, Ang II and ATR in Ventricular Myocardium of Spontaneously Hypertensive Rats with Different Age

ZHANG Junbo¹, LV Ying², HAN Wenqi², LIU Zhongwei², PAN Junqiang², WANG Junkui²

(1. Department of Peripheral Vascular Medicine, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xian 710061, Shaanxi, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, Shaanxi Provincial People's Hospital & the Third Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xian 710068, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate changes of age on expressions of plasma, AngII and ATR in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods:** 60 male SHR were randomly divided into young group (7 w), adult group (26 w) and elder group (51 w). Collecting SHR plasma and ventricular muscle tissue and adopting ELISA assay to detect the expression of angiotensin II (Ang II) level from circulating blood and ventricular muscle tissue homogenate; interstitial fibrosis was observed by Mallory staining with paraffin section, and ATR protein expression was measured by immunohistochemical SABC method. **Results:** AngII content increased with age in three groups SHR circulating plasma, differences were not statistically significant ($P > 0.05$). AngII content in ventricular muscle homogenate increased with age, differences were statistically significant ($P < 0.01$). Ventricular muscle IOD value increased with age in three groups, differences were statistically significant ($P < 0.01$); ventric-

*[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81600646)

** 通信作者 E-mail: 56396092@qq.com

网络出版时间: 2019-06-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190622.0723.007.html>

ular muscle collagen fiber sediment increased with age, especially in elder group; GD value of AT1 in left ventricular increased with age in all three groups SHR, GD value of AT2 in young group was higher than that of elder group ($P > 0.05$); AT1/AT2 value of both adult group and elder group were lower than that of young group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Age has little effect on circulating Ang II in SHR, but it can cause local ATR changes in myocardial tissue and myocardial interstitial fibrosis.

[**Key words**] angiotensin receptor; angiotensin II; age; spontaneously hypertensive rats; ventricular myocardium

流行病学研究表明,高血压是一种年龄相关疾病,除引起血压升高外,还会导致左心室重构等靶器官损害,高血压与左心室肥厚(left ventricular hypertension, LVH)均是心血管疾病发病和死亡的主要危险因素^[1]。在心血管系统,循环血液及局部组织中均存在肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS),有证据表明局部 RAS 较循环 RAS 对高血压发生、发展及其靶器官损害有着更为重要的作用。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是血管局部 RAS 中最主要的效应活性肽,主要通过 2 个血管紧张素受体(angiotensin receptor, ATR)亚型【I 型(angiotensin receptor-1, AT1)和 II 型(angiotensin receptor-1, AT2)】发挥作用。Ang II 与 AT1 结合后,主要发挥血管收缩和促醛固酮分泌的作用,还能刺激产生细胞因子,促进细胞增殖、促纤维化和促炎症反应;AT2 的作用与 AT1 相反,过度表达的 AT2 起着对抗 AT1 介导的生物效应,包括血管舒张、抑制增殖等^[3]。ATR 在线粒体、细胞核或细胞膜的相对表达,决定了局部 RAS 激活后的病理生理效应^[4]。本研究通过探析不同年龄自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)心肌局部 AT1、AT2 及二者比例与心肌结构重塑的关系,从而为老年高血压患者心肌肥厚的治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂仪器

60 只雄性 SHR 大鼠(第四军医大学动物实验中心提供)均分为幼年组(7 周龄)、成年组(26 周龄)及老年组(51 周龄),每组各 20 只。AT1 及 AT2 一抗由美国 ADI4 生物制剂公司生产,SA1022 即用型兔二抗 SABC 免疫纯化试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司生产,DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;其余试剂均为国产分析纯级。仪器 RBP-I 型大鼠血压心率测定仪由中日友好医院临床研究所生产,QWin550CW 图像

系统由德国莱卡公司生产。

1.2 方法

1.2.1 循环血浆中 Ang II 浓度测定 所有大鼠自由饮水,每 12 h 光暗循环 1 次,温度 18 ~ 25 °C,湿度 45% ~ 65%,氨浓度 < 20 mg/L,换气量为 1.27 m/h。各组 SHR 大鼠预适应饲养 1 周,称取体质量(Body Mass, BM),苯巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后从腹主动脉抽取血液 4 ~ 5 mL 至试管中,4 °C 3 000 r/min 离心 10 min 后取上层血浆, - 70 °C 冰箱保存;取 0.5 g 心肌低温匀浆后,4 °C 3 000 r/min 离心 10 min;ELISA 法测以上样品中 AngII 含量,双孔法取平均值。

1.2.2 心室肌标本的取材及胶原纤维和 ATR 的检测 4% 多聚甲醛灌注取材,取左心室固定 24 h,石蜡包埋切片,Mallory 染色观察胶原纤维,免疫组化 SABC 法(一抗 1:50,二抗 1:200)测定 AT1 和 AT2 表达。采用 QWin550CW 图像系统进行采集与分析,测 Mallory 染色下蓝色胶原纤维的累积光密度值(integral optical density, IOD)。对于免疫组化 SABC 法染色,测定的 ATR 蛋白表达水平以每个视野的阳性物质的灰度值(gray density, GD)表示,在高倍镜下选 3 个视野,测定每个视野的阳性物质的 GD。

1.3 统计学分析

用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布且方差齐的计量资料采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 法检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆及心室肌局部 Ang II

3 组 SHR 大鼠循环血浆 Ang II 含量随年龄增加而升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),心室肌匀浆 Ang II 含量随年龄增加而升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组 SHR 大鼠血浆及心室肌组织
Ang II 的表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Plasma and the myocardial tissue Ang II
expression of three groups SHR

组别	Ang II (ng/L)	
	循环血浆	心肌组织
幼年组	75. 61 ± 9. 33	70. 25 ± 8. 93
成年组	83. 20 ± 15. 09	96. 66 ± 12. 09 ⁽¹⁾
老年组	81. 86 ± 11. 40	112. 28 ± 10. 83 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾ 与幼年组比较, $P < 0. 01$; ⁽²⁾ 与成年组比较, $P < 0. 01$

2.2 心肌纤维化

3 组 SHR 大鼠心肌 IOD(IOD 的大小与纤维化程度正相关) 随年龄增加而增加, 老年组 (348 ± 27) > 成年组 (163 ± 18) > 幼年组 (90 ± 20), 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$); 且心肌胶原纤维沉积随年龄增加而明显增加, 尤其在老年组; 见图 1。老年组 Mallory 染色可见心肌组织间冠状动脉中膜增厚、纤维化, 管腔变小, 见图 2。

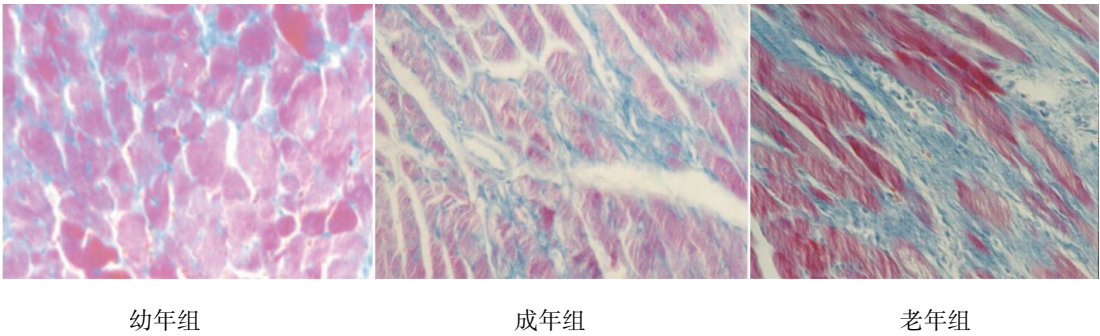


图 1 各组 SHR 大鼠心室肌组织形态学结果 (Mallory 染色, $\times 100$)

Fig. 1 Myocardial Histology of three SHR groups

注: 红色为心肌细胞, 蓝色为胶原纤维沉积

($P < 0. 05$), 成年组与老年组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0. 05$); 老年组和成年组的 AT1/AT2 值均低于幼年组 ($P < 0. 01$), 但成年组大鼠与老年组比较差异无统计学意义 ($P > 0. 05$), 见表 2 和图 3。

表 2 各组 SHR 心肌 ATR 表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of IOD value of Mallory
staining in three SHR groups

组别	AT1 (GD)	AT2 (GD)	AT1/AT2
幼年组	180 ± 12	143 ± 16	1. 25 ± 0. 09
成年组	157 ± 9 ⁽¹⁾	194 ± 13 ⁽¹⁾	0. 84 ± 0. 08 ⁽²⁾
老年组	118 ± 15 ⁽²⁾⁽³⁾	188 ± 20 ⁽¹⁾	0. 61 ± 0. 10 ⁽²⁾

与幼年组比较, ⁽¹⁾ $P < 0. 05$, ⁽²⁾ $P < 0. 01$; ⁽³⁾ 与成年组比较, $P < 0. 05$

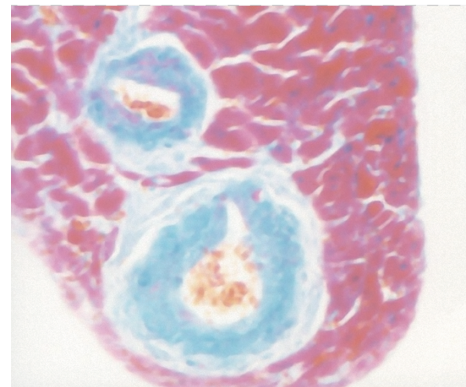


图 2 老年组 SHR 心肌内冠状动脉重构
(Mallory 染色, $\times 100$)

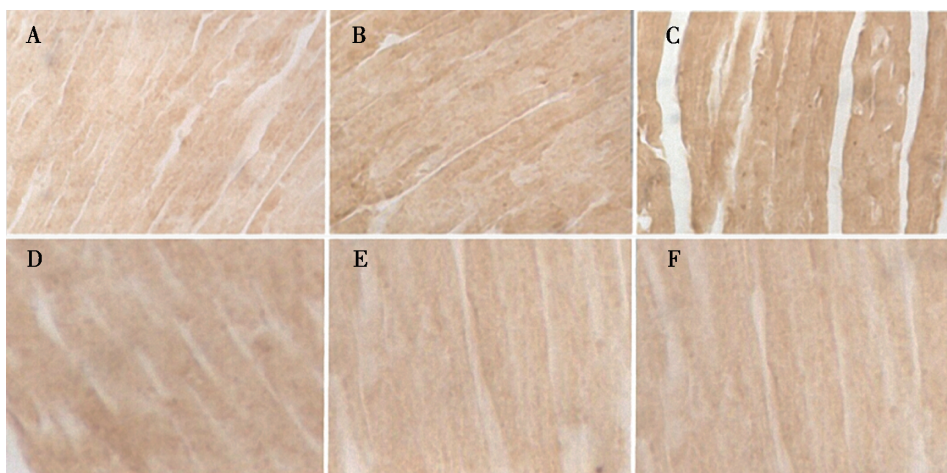
Fig. 2 Myocardial coronary remodeling
in the elderly group

2.3 心肌 ATR 表达

免疫组化及苏木素复染图片中, 图像颜色越深, 代表蛋白表达量越高, 而 GD 值也越小。结果提示 AT1 及 AT2 在各年龄组的表达有差异: 左室心肌中 AT1 的 GD 值随年龄增加而降低, GD 值在幼年组均高于成年及老年组 ($P < 0. 05$, 或 $< 0. 01$), 成年组高于老年组 ($P < 0. 05$), AT2 的 GD 随年龄的增加而增加, 幼年组均低于成年及老年组

3 讨论

本课题组前期研究发现, 高盐负荷能显著增加心肌、主动脉及肠系膜上动脉壁局部 AT1 和 AT2 表达, 在血管中以中等直径的肠系膜上动脉壁改变较为显著^[5-6], 血管局部的 AT1 和 AT2 也随着年龄增加有一定的改变^[7]。本研究发现老年组 SHR 大鼠心室肌纤维化增加, 血浆 Ang II 含量随年龄增



注:A、D 为幼年组, B、E 为成年组, C、F 为老年组;A、B、C 为 AT1,D、E、F 为 AT2, 图象颜色深度越浅,表示蛋白的表达越少

图 3 各组 SHR 大鼠心室肌细胞 AT1 及 AT2 表达(苏木素染色, $\times 100$)

Fig. 3 Expression of AT1 and AT2 in cardiomyocytes in all groups

高无明显变化,心肌匀浆中 Ang II 含量随年龄增加而升高,提示局部 RAS 表达改变对于心肌纤维化的作用可能较循环 RAS 更为重要。

30 d 和 100 d Ren-2 转基因大鼠腹腔注射抗 AT1 药物,除降压作用外,还可减少心肌肥厚,大幅度改善血管紧张素依赖性血管收缩^[8]。线粒体对所有组织代谢和细胞凋亡起到关键作用,特别是在老龄化过程中,已有报道在肾皮质、心肌细胞的线粒体中存在 AT1,幼龄动物线粒体 AT1 水平很低,随着年龄增长其在核及线粒体表达显著增加^[9]。

AT2 在大鼠心肌细胞线粒体膜高表达^[10],并在胚胎期高表达,出生后迅速下降;在高血压等病理状态下,成年大鼠局部心肌 AT2 的增高可能继发于 AT1 的增高,发挥一定的代偿作用。相较于 AT1,线粒体中 AT2 表达随年龄增长逐步降低。与本研究相似,Gwathmey 等^[9]发现年轻大鼠肾细胞中 AT2 占 ATR 的 80%,随着年龄的增加,AT1 占 85%,线粒体中 AT2 随年龄增加而减少,长期服用血管紧张素受体拮抗剂后可以在体内恢复二者平衡,增加线粒体 AT2 表达。

心脏中成纤维细胞约占到心肌结构的 2/3,心肌的细胞外基质主要由 I 型和 III 型胶原组成,尤其是前者占心肌间质总胶原比重超过 80%。心肌纤维化是心脏老化的一个重要特征,心肌间质纤维化会引发心肌结构紊乱、僵硬增加、心脏顺应性降低、心律失常发生率增高,是心肌异常僵硬的结构基础^[11]。一些临床研究已证实,高血压患者除心肌重构外,心肌内小的冠状动脉也发生了结构重

构,中膜厚度/管腔比率增大和纤维化^[12]。纤维化亦是高血压患者冠脉血管舒张能力受到损害的主要因素。

因 GD 值与心肌细胞图象颜色深度呈反相关,因此本研究中 AT1 表达随年龄增加而升高,AT2 表达随年龄增加而降低,导致 AT1/AT2 比值持续变小,同时心肌胶原纤维沉积明显增加,尤其是老年组。中年组与老年组 AT2 无进一步减少,甚至有增加的趋势,可能与血压和局部 Ang II 增加将上调 AT2 的表达有关^[13]。此外,一系列体外实验显示,局部 RAS 对心肌存在独立于血压外的重构作用,组织纤维化发生可不依赖于血压升高^[14]。成纤维细胞的激活与增生是导致年龄增长过程中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 过度表达和胶原沉积的原因^[15],Ang II 和 TGF- $\beta 1$ 增加抑制了基质金属蛋白酶活性,刺激蛋白酶抑制剂的表达,导致胶原纤维的降解减少,促使心肌纤维化^[11]。

综上所述,本研究结果显示心肌局部 AT1、AT2 及二者比例的改变可能是由于年龄增长导致心肌重塑、胶原沉积的机制之一,提示防治高血压年龄增加过程中的心肌纤维化对维持正常心脏结构具有重要的意义。

4 参考文献

- [1] 中国老年医学学会高血压分会, 国家老年疾病临床医学研究中心中国老年心血管病防治联盟. 中国老年高

- 血压管理指南 2019[J]. 中国心血管杂志, 2019, 24(1): 1-23.
- [2] ROY S G, DE P, MUKHERJEE D, et al. Excess of glucocorticoid induces cardiac dysfunction via activating angiotensin II pathway[J]. Cellular Physiology & Biochemistry, 2009, 24(1-2): 1-10.
- [3] LUIS C M, JIA Q H, HELMAY M S. Angiotensin AT2 receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension [J]. Hypertension, 2011, (57): 308-313.
- [4] ABADIR P M, WALSTON J D, CAREY R M. Subcellular characteristics of functional intracellular rennin-angiotensin systems[J]. Peptides, 2012, 38(2): 437-445.
- [5] 吕颖, 孙超峰, 殷艳蓉, 等. 高盐负荷上调 SHR 胸主动脉、肠系膜上动脉壁 AT1 和 AT2 受体表达实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2012, 41(12): 1571-1573.
- [6] 张军波, 吕颖, 韩稳琦, 等. 盐负荷对 SHR 左心室 AT1 和 AT2 受体表达的影响[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2018, 18(3): 2468-2470.
- [7] 吕颖, 孙超峰, 张军波, 等. 自发性高血压大鼠大、中动脉壁 AT1 和 AT2 受体表达的增龄性变化[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2012, 33(5): 598-601.
- [8] ABDIR P M, FOSTER D B, CROW M, et al. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, (108): 14849-14854.
- [9] GWATHMEY T M, PENDERGRASS K D, RENID S D, et al. Angiotensin-(1-7)-angiotensin-converting enzyme 2 attenuates reactive oxygen species formation to angiotensin II within the cell nucleus [J]. Hypertension 2010, (55): 166-171.
- [10] TADEVOSYAN A, MAGUY A, VILLENEUVE L R, et al. Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression[J]. Biol Chem, 2010, (285): 22338-22349.
- [11] 何卫, 董丽君, 许国军, 等. 增龄和心房颤动所致的左心房结构重构与 miRNA 表达改变的相关性研究[J]. 中华心律失常学杂志, 2015, (1): 60-64.
- [12] ZAMIR M, VERCNOCKE A J, EDWARDS P K, et al. Myocardial perfusion; characteristics of distal intramyocardial arteriolar trees[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2015, 43(11): 2771-2779.
- [13] WAL R M A, HARST P, WAGENAAR L J, et al. Angiotensin II type 2 receptor vasoactivity in internal mammary arteries of patients with coronary artery disease[J]. Cardiovascular Pharmacology, 2007, 50(4): 372-379.
- [14] MASAHIRO Y, MOTOI K, TOMOHIRO O, et al. Vasoconstrictor effect of aldosterone via angiotensin II type 1 (AT1) receptor; possible role of AT1 receptor dimerization[J]. Cardiovascular Research, 2008, 79(1): 169-178.
- [15] FAN Z, GUAN J. Antifibrotic therapies to control cardiac fibrosis[J]. Biomaterials Research, 2016, 20(1): 1-13.
- (2019-03-25 收稿, 2019-06-06 修回)
中文编辑: 严 征; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 652 页)

- [12] KO E W, LIN S C, CHEN Y R, et al. Skeletal and dental variables related to the stability of orthognathic surgery in Skeletal Class III malocclusion with a surgery-first approach[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2013, 71(5): e215-e223.
- [13] HENANDEZ-ALFARO F, GUIJARRO-MRRTINEZ R, Peiró-Guijarro M A. Surgery first in orthognathic surgery: What have we learned? A comprehensive workflow based on 45 consecutive cases [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2014, 72: 376-390.
- [14] URIBEA F, AGARWALB S, SHAFERC D, et al. Increasing orthodontic and orthognathic surgery treatment efficiency with a modified surgery-first approach[J]. American Journal of Orthodontic and Dentofacial Orthopedic, 2015, 148(5): 838-848.
- [15] MAH D H, KIM S G, OH J S, et al. Comparative study of postoperative stability between conventional orthognathic surgery and a surgery-first orthognathic approach after bilateral sagittal split ramus osteotomy for skeletal class III correction[J]. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg, 2017, 43(1): 23-28.
- [16] WANG T Y, HAN J J, HEE-KYUN O H, et al. Comparison of orthodontic-first and surgery-first approach in positional changes of the condyle after mandibular setback surgery using three-dimensional analysis[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2016, 74(12): 2487-2496.
- [17] CASTROFLORIO T, GAMERRO E F, CAVIGLIA G P, et al. Biochemical markers of bone metabolism during early orthodontic tooth movement with aligners[J]. Angle Orthod, 2017, 87(1): 74-81.
- [18] YAMAGUCHI M, RANK R O. During orthodontic tooth movement[J]. Orthod Craniofac Res, 2009, 12: 113-116.
- [19] EIXEIRA CC, KHOO E, TRAN J, et al. Cytokine expression and accelerated tooth movement [J]. J Dent Res, 2010, 89: 1135-1140.
- (2019-03-12 收稿, 2019-05-30 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 雷 妍