

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01282

· 论 著 ·

## 慢性心力衰竭大鼠心房血管紧张素 II 1 型受体和尼古丁 $\alpha 7$ 受体的表达

杨中伟, 赵 婷, 李冬洁, 倪 敏, 沈甫明\*

第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 观察血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)和尼古丁  $\alpha 7$  受体( $\alpha 7$ nAChR)在心力衰竭大鼠心房的表达。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分成 4 组,行腹主动脉缩窄术,制备心衰模型。采用蛋白质印迹法,比较缩窄 4、8、12 和 16 周后对照组和缩窄组大鼠心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 的表达变化情况。**结果** 与同时时间点对照组相比,心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 的表达在缩窄后 4、8、12 和 16 周差异均无统计学意义。**结论** 在腹主动脉缩窄致大鼠心衰模型中,心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 可能并不参与心衰早期发生、发展的病理过程。

**[关键词]** 心力衰竭;心房;1 型血管紧张素受体;尼古丁  $\alpha 7$  受体

**[中图分类号]** R 541.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)12-1282-04

### Expression of atrial angiotensin II type 1 receptor and $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor during development of heart failure in rats

YANG Zhong-wei, ZHAO Ting, LI Dong-jie, NI Min, SHEN Fu-ming\*

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the atrial expression of angiotensin II receptor type 1(AT1R) and  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor( $\alpha 7$ nAChR) during the development of heart failure in rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into 4 groups. Abdominal aorta coarctation (AAC) was used to prepare heart failure model. Expression of AT1R and  $\alpha 7$ nAChR was determined by Western blotting analysis at 4, 8, 12, and 16 weeks after AAC in all the groups. **Results** Compared with the control group, expression of AT1R and  $\alpha 7$ nAChR in AAC group was not significantly different at all the 4 time points after AAC. **Conclusion** Our findings suggest that atrial AT1R and  $\alpha 7$ nAChR may not be involved in the early stage pathological process of AAC-induced heart failure.

**[Key words]** heart failure; heart atria; type 1 angiotensin receptor;  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(12):1282-1285]

慢性心力衰竭(心衰)是各种心脏病发展到终末阶段的一种临床综合征。其发病率高,国外 65 岁以上人群中心衰患病率可达 6%~10%,我国为 1.3%。5 年存活率与恶性肿瘤相仿。心衰正成为 21 世纪最主要的心血管病症<sup>[1]</sup>。

近年研究发现,炎症在慢性心衰的病理生理机制中起重要作用<sup>[2]</sup>。血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)是肾素-血管紧张素系统中最重要效应因子之一,具有维持血容量和调节血压、促炎症活性和氧化活性作用,并参与慢性炎症过程。目前已发现细胞表面主要存在着 Ang II 的 2 种受体,即 1 型受体(AT1R)和 2 型受体(AT2R),AT1R 介导了几乎

所有 Ang II 的生物学效应<sup>[3]</sup>。高血压病可致心衰,高血压病时交感神经过度激活而副交感神经处于相对抑制状态<sup>[4]</sup>。新近的研究发现迷走神经的主要递质乙酰胆碱具有抗炎作用,其作用是通过激活尼古丁  $\alpha 7$  受体( $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor,  $\alpha 7$ nAChR)实现的<sup>[5]</sup>。

因此,AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 的表达水平可能对心衰的发生、发展有着重要的意义。然而,关于心衰时心房 AT1R 表达的研究结果并不一致<sup>[6-8]</sup>,关于心衰过程中心房  $\alpha 7$ nAChR 的表达变化未见报道。大鼠腹主动脉缩窄是研究压力超负荷型心衰的理想模型,本实验中,我们以腹主动脉缩窄术后大鼠为实验

**[收稿日期]** 2010-08-10 **[接受日期]** 2010-11-25

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30870940),上海市基础研究重点项目(08JC1406000). Supported by National Natural Science Foundation of China(30870940) and Key Basic Research Program of Shanghai Municipality(08JC1406000).

**[作者简介]** 杨中伟,硕士生. E-mail: yangzhongweitem@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871276, E-mail: fumingshen@126.com

对象, 观察在心衰过程中心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 的表达。

## 1 材料和方法

1.1 试剂与仪器 细胞/组织蛋白提取液(上海康成生物科技公司), BSA 蛋白分析试剂盒(天根公司), 兔源 AT1R 多克隆抗体(1:100, Santa Cruz 公司), 大鼠来源  $\alpha 7$ nAChR 单克隆抗体(1:10 000, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 小鼠来源 GAPDH 单克隆抗体(1:5 000, 上海康成生物科技公司), Infred Dye 800 CW 绵羊抗大鼠 IgG(1:5 000, 美国 Rockland 公司), Infred Dye 800 CW 绵羊抗兔 IgG(1:5 000, 美国 Rockland 公司), Infred Dye 800 CW 绵羊抗小鼠 IgG(1:5 000, 美国 Rockland 公司), Odyssey Infrared Imaging System(美国 LI-COR 公司)。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量 180~220 g, 由第二军医大学实验动物中心提供。饲养于 12 h:12 h 光暗环境, 给予标准饲料, 自由摄食及饮水。

1.3 腹主动脉缩窄心衰模型制作及分组 腹主动脉缩窄(abdominal aorta coarctation, AAC)组: 雄性 SD 大鼠用氯胺酮(50 mg/kg)和地西洋(5 mg/kg)腹腔注射麻醉, 麻醉后大鼠仰卧位固定, 腹部剪毛、消毒, 于腹部正中切开皮肤层, 沿腹白线切开肌肉层。用生理盐水纱布遮盖创面, 然后分离膈肌下肾动脉分支上的一小段腹主动脉, 将棉线穿至腹主动脉下, 选择直径 0.7 mm 磨平尖头的皮下注射针头置于腹主动脉上, 用棉线将动脉及针头结扎在一起至完全阻断血流后, 抽出针头, 结扎后的腹主动脉内径即为针头直径。缝合手术创面, 消毒, 腿部肌内注射青霉素, 术后注意保暖, 待动物完全清醒, 送回动物房常规饲养。对照组: 实施假手术, 即除了不缩窄腹主动脉外, 其余手术操作同 AAC 组。每组术后随机分为 4、8、12 和 16 周各 4 个亚组。

1.4 蛋白质印迹法检测心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 表达 大鼠脱颈椎处死后立即剪取约 30 mg 心房组织(左右心房各半), 加入 1 ml 的细胞/组织蛋白提取液中(含 1% 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和 PMSF), 冰浴匀浆。4℃, 11 000×g 离心 10 min 并取上清, BSA 蛋白定量分析试剂盒测定蛋白浓度, 分装后置于-80℃保存。10% SDS-PAGE, 然后电转移至 NC 膜上, 恒压 100 V, 1 h。用含 10% 脱脂牛奶的 PBS 室温封闭 4 h, 加入一抗, 室温孵育 2 h, 加

二抗, 室温孵育 1 h。用 1×磷酸盐缓冲液(含 0.1% Tween-20)洗膜 4 次, 每次 5 min, 于 Odyssey Infrared Imaging System 获得并存储图像。使用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件对条带进行灰度分析, 计算目的蛋白与 GAPDH 的比值即为目的蛋白的相对表达量。实验重复 2 次。

1.5 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用成组  $t$  检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 术后 4 周心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 的表达变化 在术后 4 周, AAC 组心房 AT1R 的表达与对照组相比差异无统计学意义( $0.88 \pm 0.14$  vs  $1.00 \pm 0.14$ ,  $P > 0.05$ , 图 1), 心房  $\alpha 7$ nAChR 的表达与对照组相比差异也无统计学意义( $1.04 \pm 0.12$  vs  $1.00 \pm 0.12$ ,  $P > 0.05$ , 图 1)。

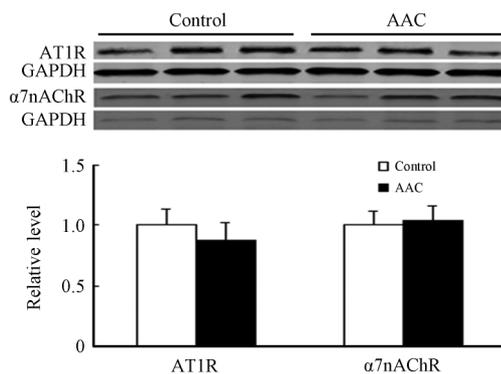


图 1 术后 4 周大鼠心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 的表达变化  
Fig 1 Atrial expression of AT1R and  $\alpha 7$ nAChR at 4 weeks after abdominal aorta coarctation in rats  
 $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 术后 8 周心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 的表达变化 在术后 8 周, AAC 组心房 AT1R 的表达与对照组相比有上升趋势但差异无统计学意义( $1.19 \pm 0.05$  vs  $1.00 \pm 0.07$ ,  $P > 0.05$ , 图 2), 心房  $\alpha 7$ nAChR 的表达与对照组相比有下降趋势但差异亦无统计学意义( $0.81 \pm 0.11$  vs  $1.00 \pm 0.16$ ,  $P > 0.05$ , 图 2)。

2.3 术后 12 周心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 的表达变化 在术后 12 周, AAC 组心房 AT1R 的表达与对照组相比有上升趋势但差异无统计学意义( $1.15 \pm 0.12$  vs  $1.00 \pm 0.30$ ,  $P > 0.05$ , 图 3)。心房  $\alpha 7$ nAChR 的表达与对照组相比有下降趋势但差异亦无统计学意义( $0.96 \pm 0.18$  vs  $1.00 \pm 0.10$ ,  $P > 0.05$ , 图 3)。

2.4 术后 16 周心房 AT1R 和  $\alpha 7$ nAChR 的表达变化 在术后 16 周, AAC 组心房 AT1R 的表达与对照

组相比有上升趋势但差异无统计学意义( $1.10 \pm 0.02$  vs  $1.00 \pm 0.03$ ,  $P > 0.05$ ,图4);心房  $\alpha 7nAChR$  的表达与对照组相比有下降趋势但差异亦无统计学意义( $0.84 \pm 0.08$  vs  $1.00 \pm 0.17$ ,  $P > 0.05$ ,图4)。

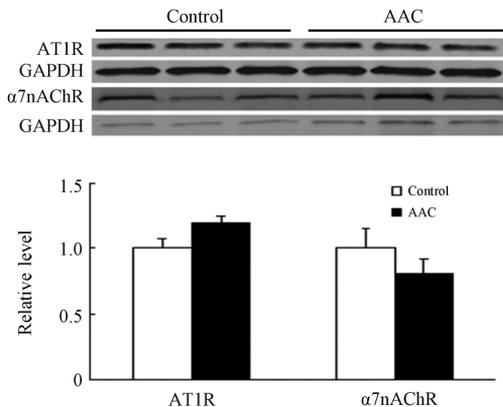


图2 术后8周大鼠心房AT1R和 $\alpha 7nAChR$ 的表达变化

Fig 2 Atrial expression of AT1R and  $\alpha 7nAChR$  at 8 weeks after abdominal aorta coarctation in rats

$n=3, \bar{x} \pm s$

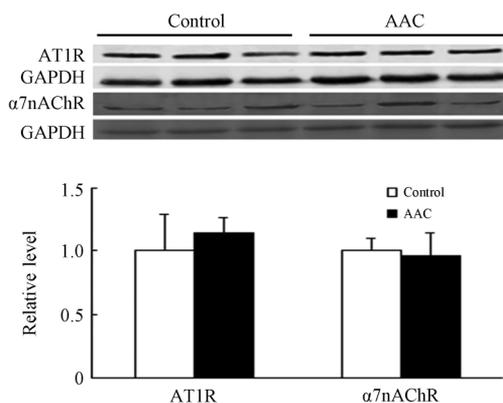


图3 术后12周大鼠心房AT1R和 $\alpha 7nAChR$ 的表达变化

Fig 3 Atrial expression of AT1R and  $\alpha 7nAChR$  at 12 weeks after abdominal aorta coarctation in rats

$n=3, \bar{x} \pm s$

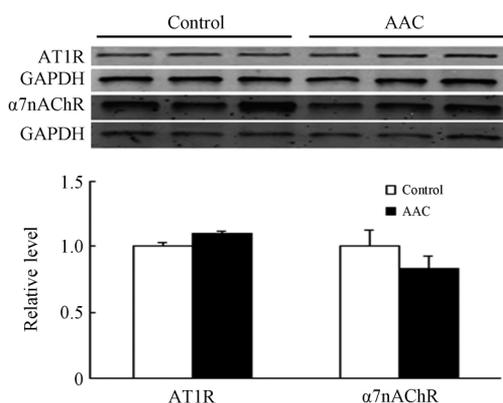


图4 术后16周大鼠心房AT1R和 $\alpha 7nAChR$ 的表达变化

Fig 4 Atrial expression of AT1R and  $\alpha 7nAChR$  at 16 weeks after abdominal aorta coarctation in rats

$n=3, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

研究表明,心衰与慢性炎症及免疫激活有关,炎症因子在心衰的病理生理机制中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。Ang II作为重要的炎症介质,通过促使反应性氧化物的产生而介导炎症反应。Ang II可以直接作用于细胞,引起靶细胞产生第二级炎症介质(如前列腺素、白三烯、血管内皮生长因子),直接参与促炎过程;或者通过刺激压力感受器对内皮细胞造成损伤,从而间接地对血管通透性造成影响,参与病理状态下的血管新生、渗漏损伤和炎症反应。沙坦类药物通过拮抗AT1R,阻断Ang II的作用,可以降低高血压患者血浆中IL-6和TNF- $\alpha$ 等炎症因子的浓度,同时缓解甚至逆转左心室肥厚、动脉粥样硬化、心肌纤维化、慢性心力衰竭、肾衰、血管重构和血管瘤等高血压并发症<sup>[9-10]</sup>。AT1R介导了几乎所有Ang II的生物学效应。本研究发现,在腹主动脉缩窄致心衰的大鼠模型中,术后4、8、12和16周心房AT1R的表达与同时时间点的对照组相比差异并无统计学意义。Lenza等<sup>[11]</sup>的研究发现心衰患者心房的AT1R的表达并无变化,与我们的发现一致。这说明在腹主动脉缩窄16周之前,AT1R可能不参与心衰发生的病理过程。

尼古丁抗炎通路(或神经-免疫调节通路)指的是:迷走神经释放的主要递质乙酰胆碱可以激活细胞膜 $\alpha 7nAChR$ ,巨噬细胞 $\alpha 7nAChR$ 被激活后,可以有效减少巨噬细胞释放致炎细胞因子和调节抗炎细胞因子含量,从而达到控制炎症反应程度,发挥抗炎损伤、感染和休克作用<sup>[12]</sup>。高血压病和高血压并发心衰时交感神经过度激活而迷走神经处于相对抑制状态<sup>[4]</sup>。我们的研究发现,在腹主动脉缩窄致慢性心力衰竭的大鼠模型中,术后4、8、12和16周心房 $\alpha 7nAChR$ 的表达与同时时间点的对照组相比差异并无统计学意义,说明在腹主动脉缩窄16周之前,尼古丁抗炎通路可能不参与心衰发生的病理过程。

本实验测定了介导炎症的AT1R和具有抗炎作用的 $\alpha 7nAChR$ 在心房的表达,发现两种受体与同时时间点的对照组相比均无明显差异,提示在腹主动脉缩窄16周前心房AT1R和 $\alpha 7nAChR$ 并不参与大鼠心衰发生。也发现随时间延长心房AT1R的表达有上升趋势,而 $\alpha 7nAChR$ 的表达呈下降趋势,提示随着心衰进一步发展,心房AT1R和 $\alpha 7nAChR$ 可能参与到心衰的病理过程,这有待于进

一步研究证实。

### [参考文献]

- [1] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性心力衰竭诊断治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35: 1076-1095.
- [2] El Desoky E S. Drug therapy of heart failure: an immunologic view[J]. Am J Ther, 2010, Mar 2. [Epub ahead of print]
- [3] Regitz-Zagrosek V, Fielitz J, Fleck E. Myocardial angiotensin receptors in human hearts[J]. Basic Res Cardiol, 1998, 93(Suppl 2): 37-42.
- [4] Neumann S A, Jennings J R, Muldoon M F, Manuck S B. White-coat hypertension and autonomic nervous system dysregulation[J]. Am J Hypertens, 2005, 18: 584-588.
- [5] Fodale V, Santamaria L B. Cholinesterase inhibitors improve survival in experimental sepsis: a new way to activate the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. Crit Care Med, 2008, 36: 622-623.
- [6] Bauer P, Regitz-Zagrosek V, Hofmeister J, Lokies J, Rolfs A, Hildebrandt A G, et al. Reduced atrial angiotensin receptor type 1 mRNA content in end-stage human heart failure: assessment by a novel quantitative PCR-ELISA technique[J]. J Mol Med, 1996, 74: 447-454.
- [7] Kaprielian R R, Dupont E, Hafizi S, Poole-Wilson P A, Khaghani A, Yacoub M, et al. Angiotensin II receptor type 1 mRNA is upregulated in atria of patients with end-stage heart failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29: 2299-2304.
- [8] Regitz-Zagrosek V, Friedel N, Heymann A, Bauer P, Neuss M, Rolfs A, et al. Regulation, chamber localization, and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts [J]. Circulation, 1995, 91: 1461-1471.
- [9] Liao T D, Yang X P, Liu Y H, Shesely E G, Cavasin M A, Kuziel W A, et al. Role of inflammation in the development of renal damage and dysfunction in angiotensin II-induced hypertension [J]. Hypertension, 2008, 52: 256-263.
- [10] Schiffrin E L. The flame that lights the fire: oxidative stress, inflammation, and renal damage in angiotensin II-induced hypertension[J]. Hypertension, 2008, 52: 205-206.
- [11] Lenza O, Schmid B, Kiltera H, La Roséa K, Flescha M, Kuhn-Regnier F, et al. Effects of angiotensin II and angiotensin-converting enzyme inhibitors on human myocardium [J]. Eur J Pharmacol, 1995, 294: 17-27.
- [12] Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4: 673-684.

[本文编辑] 尹 茶

### • 书 讯 •

## 卫生部“十一五”规划教材《现代光谱分析》已出版

第二军医大学药学院天然药化教研室陈海生教授主编的卫生部“十一五”规划教材、全国高等学校教材《现代光谱分析》一书, 近日由人民卫生出版社出版。ISBN: 978-7-117-12982-4, 开本: 16 开, 定价: 49.00 元。该书在第二军医大学研究生院教育专项经费资助下, 经过第二军医大学药学院六位老师的努力, 在多年教学经验的基础上编写而成。

《现代光谱分析(供药学类专业用)》图文并茂, 全书共分八章, 内容包括紫外光谱(UV)、红外光谱(IR)、核磁共振氢谱( $^1\text{H}$  NMR)、核磁共振碳谱( $^{13}\text{C}$  NMR)、二维核磁共振谱(2D-NMR)、质谱(MS)、色谱-质谱联用(LC-MS), 以及光谱分析在有机化合物结构鉴定中的应用实例, 重点介绍了核磁共振氢谱、核磁共振碳谱、二维核磁共振谱和质谱的主要原理、技术方法和应用。

该书结合编者科研工作介绍了有关光谱分析联用技术, 选编了一些不同结构类型的天然产物的综合分析图谱和结构解析, 并附有学习要求与思考题, 供读者练习应用, 有利于提高学生的综合分析能力。

《现代光谱分析(供药学类专业用)》主要供药学专业的本科生和研究生, 以及从事有机化学、天然药物化学、药物化学、生物化学和有关专业的人员学习使用与参考。