

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01291

• 论 著 •

血管紧张素转化酶 2 过表达对大鼠心肌梗死后心室重构的影响

张 波, 范晋奇, 张全军, 陈少杰, 殷跃辉*

重庆医科大学附属第二医院心血管内科, 重庆 400010

[摘要] **目的** 观察血管紧张素转化酶 2(ACE2)过表达对大鼠急性心肌梗死(AMI)后心室重构的影响,并探讨其可能的分子机制。**方法** 75 只 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、AMI 组、生理盐水组(AMI+NS 组)、报告基因组(AMI+AdEGFP 组)和重组腺病毒 AdACE2 组(AMI+AdACE2 组),每组 15 只。结扎大鼠冠状动脉左前降支建立 AMI 模型,AMI+NS、AMI+AdEGFP、AMI+AdACE2 组于心肌梗死周边区各选取 5 个点分别注射生理盐水、AdEGFP 和 AdACE2,Sham 组与 AMI 组不予注射。建模 4 周后测量血流动力学指标和心室质量;用组织学方法评价心肌组织结构变化与胶原沉积;用免疫组化染色检测心肌组织血管紧张素(Ang)Ⅱ(Ang Ⅱ)、Ang-(1-7)及 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达,蛋白质印迹法检测心肌组织 ACE2、Src 同源结构域 2 蛋白酪氨酸磷酸酶 1(SHP-1)、ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38、 α -SMA 及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)蛋白的表达。**结果** (1)与其他 4 组相比,AMI+AdACE2 组 ACE2 表达水平升高($P<0.05$),同时 Ang-(1-7)表达也升高($P<0.05$)。(2)与 Sham 组相比,AMI、AMI+NS 及 AMI+AdEGFP 组左室舒张末压,心室质量/体质量比值,胶原沉积,梗死周边区 Ang Ⅱ、Ang-(1-7)、SHP-1、p-ERK1/2/ERK1/2、p-p38/p38、 α -SMA、TGF- β_1 表达均升高($P<0.05$)。(3)与 AMI、AMI+NS 及 AMI+AdEGFP 组相比,AMI+AdACE2 组 Ang-(1-7)、SHP-1 表达升高($P<0.05$),p-ERK1/2/ERK1/2、p-p38/p38、 α -SMA 及 TGF- β_1 表达降低($P<0.05$)。**结论** 过表达 ACE2 可明显改善大鼠心肌纤维化进程,缓解心室重构,其机制可能与 ACE2 激活酪氨酸磷酸酶 SHP-1,负性调节肾素-血管紧张素系统(RAS)下游丝裂原活化蛋白激酶(MAKPs)活性有关。

[关键词] 心肌梗死;心室重构;血管紧张素转化酶 2;SHP1 蛋白酪氨酸磷酸酶

[中图分类号] R 542.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)12-1291-08

Effect of angiotensin-converting enzyme 2 over-expression on ventricular remodeling in rat model of myocardial infarction

ZHANG Bo, FAN Jin-qi, ZHANG Quan-jun, CHEN Shao-jie, YIN Yue-hui*

Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) over-expression on ventricular remodeling in rat model of acute myocardial infarction (AMI) and the related mechanisms. **Methods** Totally 75 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups ($n=15$): Sham group, AMI group, AMI+normal saline (AMI+NS) group, AMI+adenovirus-EGFP (AMI+AdEGFP) group, and AMI+adenovirus-ACE2 (AMI+AdACE2) group. AMI models were established by ligating the left anterior descending coronary artery of rats. Rats in the AMI+NS, AMI+AdEGFP and AMI+AdACE2 groups received intramyocardial injection of NS, AdEGFP and AdACE2 in five different infarction border zones, respectively. Rats in the Sham and AMI groups received no injection intervention. Four weeks later, left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and heart weight/body weight (HW/BW) were examined. Myocardial structure changes and collagen deposition were evaluated histopathologically. The expression of angiotensin (Ang) Ⅱ (Ang Ⅱ), Ang-(1-7) and α -smooth muscle actin (α -SMA) proteins was assessed by immunohistochemical staining. The relative protein expression of ACE2, Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP-1), ERK1/2, p-ERK1/2, p38, p-p38, α -SMA and transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) was measured by Western blotting analysis. **Results** (1) Compared with the other

[收稿日期] 2013-06-23 **[接受日期]** 2013-07-31

[基金项目] 国家自然科学基金(81170166),高等学校博士学科点专项科研基金(20095503110002),重庆市卫生局重点项目(2010-1-67). Supported by National Natural Science Foundation of China (81170166), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20095503110002), and Key Project of Health Bureau of Chongqing (2010-1-67).

[作者简介] 张 波,硕士生. E-mail: zhangbozai.2008@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-63693079, E-mail: yinyh63@163.com

four groups, the protein expression levels of ACE2 and Ang-(1-7) were significantly increased in myocardial tissues in AMI+AdACE2 group ($P<0.05$). (2) Compared with the Sham group, LVEDP, the values of HW/BW, collagen deposition, and the expression levels of Ang II, Ang-(1-7), SHP-1, p-ERK1/2/ERK1/2, p-p38/p38, α -SMA and TGF- β_1 were all significantly upgraded in AMI, AMI+NS and AMI+AdEGFP groups ($P<0.05$). (3) Compared with AMI, AMI+NS and AMI+AdEGFP groups, the expression levels of Ang-(1-7) and SHP-1 were significantly increased in AMI+AdACE2 group ($P<0.05$); while p-ERK1/2/ERK1/2, p-p38/p38, α -SMA and TGF- β_1 protein expression levels were significantly decreased in AMI+AdACE2 group ($P<0.05$). **Conclusion** This study suggests that over-expression of ACE2 can improve ventricular fibrosis and ameliorate ventricular remodeling after myocardial infarction in rats, which may be due to that ACE2 increases SHP-1 protein expression, and the latter negatively regulates renin-angiotensin system (RAS) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) pathway.

[Key words] myocardial infarction; ventricular remodeling; angiotensin-converting enzyme 2; SHP1 protein tyrosine phosphatase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12): 1291-1298]

随着我国经济发展和人民生活方式的改变,冠心病已成为严重危害人民健康与生命的高发疾病。心肌长期慢性缺血和心室重构是冠心病发展成心力衰竭(缺血性心肌病)的重要病理生理变化,除再血管化治疗外,延缓心室重构是预防冠心病向心力衰竭发展的重要治疗策略之一。近年研究表明,心室重构与肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)的过度激活密切相关,其中血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 发挥着重要作用^[1-2]。Ang II 与其受体结合后激活丝裂原活化蛋白激酶 [mitogen-activated protein kinases, MAPKs; 以 p38 MAPK、细胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2 为代表] 级联反应及随后的核内基因转录,导致成纤维细胞增殖和细胞外分泌性基质蛋白表达增加^[1,3]。与血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)具有较高同源性的 ACE2 作为 Ang II 内源性调节酶之一,可将胞外的 Ang I 和 Ang II 转化为 Ang-(1-7),而 ACE2 和 Ang-(1-7)具有拮抗 Ang II 所致的心肌肥大、间质纤维化增生、炎症反应以及氧化应激等效应,被视为 RAS 重要的负性调节因子^[4-6]。Src 同源结构域 2 蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (SHP1) 的去磷酸化效应对蛋白酪氨酸激酶具有重要的负性调节作用^[7]。Cui 等^[8]和 Gava 等^[9]研究表明 Ang-(1-7)通过激活 SHP-1 从而抑制 p38 MAPK 及 ERK1/2 的激活。然而,过表达 ACE2 能否激活 SHP-1,从而负性调节 MAPKs 活性,最终拮抗 Ang II 所致的纤维化效应鲜有报道。本研究通过建立大鼠急性心肌梗死模型,将重组腺病毒 AdACE2 注射于梗死周边区,观察其对大鼠心肌梗死后心室重构的影响,探讨 SHP-1 在 ACE2 过表达后对 RAS 和 MAPKs 信号通路调节的分子机制。

1 材料和方法

1.1 大鼠急性心肌梗死模型的建立、分组及处理

雄性 SD 大鼠 75 只(由重庆医科大学实验动物中心提供,体质量 250 ~ 300 g),随机分为假手术组(Sham 组)、急性心肌梗死组(AMI 组)、生理盐水组(AMI+NS 组)、报告基因组(AMI+AdEGFP 组)和重组腺病毒 AdACE2 组(AMI+AdACE2 组),每组 15 只,参照 Olivetti 等^[10]的手术方式结扎大鼠冠状动脉左前降支建立急性心肌梗死模型。AMI+NS、AMI+AdEGFP 和 AMI+AdACE2 各组分别用微注射器于梗死周边区分 5 点均匀注射生理盐水、AdEGFP 和 AdACE2(长沙赢润生物技术有限公司,病毒含量为 1×10^9 pfu/100 μ L)共 100 μ L,Sham 组和 AMI 组不予注射。术后各组大鼠肌注青霉素 40 万单位 3 d,同等条件喂养 4 周后采集标本。

1.2 血流动力学指标测定 手术 4 周后,各组大鼠均行血流动力学指标检测。术前称体质量并麻醉,参照 Fraccarollo 等^[11]方法分离右颈外动脉并置入微压力传感器,与生理记录仪相连,最后将导管逆行送入左心室,测定左室压力变化情况。记录平均动脉压(mean blood pressure, MBP)和左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)。

1.3 心室质量测定 血流动力学指标测定完毕后经大鼠静脉注入 10% KCl,使心脏停跳于舒张末期。迅速打开胸腔,取出心脏置于冰生理盐水中,去除心房、大血管及心外结缔组织,冲洗干净,滤纸吸干后称心室质量,并与体质量相除,计算心室质量/体质量比值(单位:mg/g)。

1.4 组织病理学检测 沿垂直于左室长轴方向切取梗死周边区心肌组织,置于 10% 甲醛溶液中固定,常规脱水,石蜡包埋,切片。H-E 染色观察心肌组织

形态结构及细胞形态变化, Masson 染色观察心肌间质胶原表达情况。

1.5 免疫组化染色检测心肌组织 AngII、Ang-(1-7) 及 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达 5 μ m 厚的石蜡切片按 SP 检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)说明书进行免疫组化染色, 用 Image Pro Plus 6.0 软件进行图像分析。校正标准灰度值后每个标本随机选取 5 个视野, 测定平均光密度值 (D 值), 均值作为标本 D 值。AngII、Ang-(1-7) 抗体购自美国 Abcam 公司, α -SMA 抗体购自美国 Sigma 公司。

1.6 蛋白质印迹法检测心肌组织 ACE2、SHP-1、ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38、TGF- β_1 、 α -SMA 蛋白的表达 常规提取心肌梗死周边区组织总蛋白, BCA 法测定各组蛋白浓度。沸水变性后行 SDS-PAGE, 电转到 PVDF 膜, 室温摇床封闭 1 h, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗 [ACE2 (1 : 500)、SHP-1 (1 : 200)、ERK1/2 (1 : 1 000)、p-ERK1/2 (1 : 1 000)、p38 (1 : 500)、p-p38 (1 : 100)、TGF- β_1 (1 : 100)、 α -SMA (1 : 200)、Tubulin (1 : 1 000)] 过夜, 选取一抗来源相对应的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温孵育 1 h, ECL 显影, Bio-rad 凝胶成像分析系统扫描, 用 Quantity One 软件分析各样本灰度值。ACE2 一抗购自美国

Abcam 公司, SHP-1 一抗购自美国 Abnova 公司, ERK1/2、p-ERK1/2、p38、p-p38、TGF- β_1 、 α -SMA、Tubulin 一抗购自美国 Santa Cruz 公司, 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 动物一般情况 Sham 组大鼠在实验过程中无死亡。建模 4 周后, AMI 组大鼠存活率为 66.7% (10/15), AMI+NS 组为 73.3% (11/15), AMI+AdEGFP 组为 60% (9/15), AMI+AdACE2 组为 73.3% (11/15), 各组间存活率差异无统计学意义。

2.2 血流动力学指标及心室质量测定 大鼠体质量和 MBP 在各组间差异均无统计学意义。与 Sham 组相比, 其他 4 组大鼠 LVEDP 升高 ($P < 0.05$), 心室质量/体质量比值增加 ($P < 0.05$); AMI+AdACE2 组与 AMI、AMI+NS、AMI+AdEGFP 组相比, 大鼠 LVEDP 降低, 心室质量/体质量比值下降 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 建模 4 周后大鼠血液动力学指标和心室质量测定结果

Tab 1 Hemodynamic parameters and ventricular weight 4 weeks after AMI establishment

| Group | <i>n</i> | BW <i>m/g</i> | HW/BW $\omega_B/(mg \cdot g^{-1})$ | MBP <i>p/mmHg</i> | LVEDP <i>p/mmHg</i> |
|------------|----------|---------------|------------------------------------|-------------------|----------------------------|
| Sham | 15 | 382 \pm 8 | 2.21 \pm 0.11 | 112 \pm 6 | 3.75 \pm 0.28 |
| AMI | 10 | 372 \pm 13 | 3.06 \pm 0.07* Δ | 115 \pm 12 | 23.65 \pm 1.91* Δ |
| AMI+NS | 11 | 378 \pm 11 | 3.04 \pm 0.09* Δ | 117 \pm 11 | 22.61 \pm 2.52* Δ |
| AMI+AdEGFP | 9 | 374 \pm 12 | 2.99 \pm 0.03* Δ | 113 \pm 9 | 24.38 \pm 1.63* Δ |
| AMI+AdACE2 | 11 | 375 \pm 11 | 2.64 \pm 0.11* | 112 \pm 10 | 14.33 \pm 1.17* |

AMI: Acute myocardial infarction; NS: Normal saline; AdEGFP: Adenovirus-enhanced green fluorescent protein; AdACE2: Adenovirus-angiotensin-converting enzyme 2; BW: Body weight; HW/BW: Heart weight/body weight; MBP: Mean arterial pressure; LVEDP: Left ventricular end-diastolic pressure. 1 mmHg=0.133 kPa. * $P < 0.05$ vs Sham group; $\Delta P < 0.05$ vs AMI+AdACE2 group

2.3 组织学评价

2.3.1 H-E 染色 Sham 组大鼠心肌细胞排列整齐, 胞质纹理清晰, 胞核明显, 细胞间连接存在; AMI、AMI+NS、AMI+AdEGFP 组大鼠梗死周边区心肌纤维排列稀疏紊乱, 肌丝断裂, 胞质明显减少甚至缺如, 大量胞核浓缩、碎裂, 炎细胞浸润, 细胞间连接消失; AMI+AdACE2 组上述改变明显减轻。

见图 1A。

2.3.2 Masson 染色 Sham 组大鼠心肌间质有少量胶原纤维 (蓝色) 沉积, AMI、AMI+NS、AMI+AdEGFP 组大鼠梗死周边区心肌间质中有大量胶原纤维沉积, 而 AMI+AdACE2 组大鼠梗死周边区心肌间质胶原纤维沉积较 AMI、AMI+NS 及 AMI+AdEGFP 组减少, 但仍多于 Sham 组。见图 1B。

2.4 ACE2 调节 RAS 系统相关指标

2.4.1 免疫组化分析心肌组织 Ang II、Ang-(1-7) 表达结果 Ang II、Ang-(1-7) 定位于心肌细胞,阳性染色为棕黄色。与 Sham 组相比,其他 4 组 Ang II

和 Ang-(1-7) 表达升高 ($P < 0.05$); 与 AMI、AMI+NS 及 AMI + AdEGFP 组比较,AMI + AdACE2 组 Ang II 表达降低 ($P < 0.05$),Ang-(1-7) 表达升高 ($P < 0.05$)。见图 2。

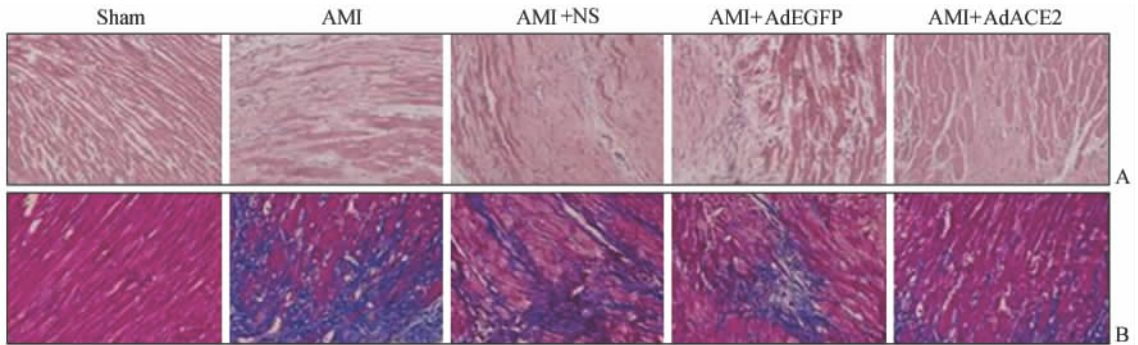


图 1 各组大鼠心肌梗死周边区组织学改变

Fig 1 Histological changes of infarction border tissues after acute myocardial infarction (AMI) in each group

NS: Normal saline; AdEGFP: Adenovirus-enhanced green fluorescent protein; AdACE2: Adenovirus-angiotensin-converting enzyme 2. A: H-E staining; B: Masson staining. Original magnification: $\times 400$

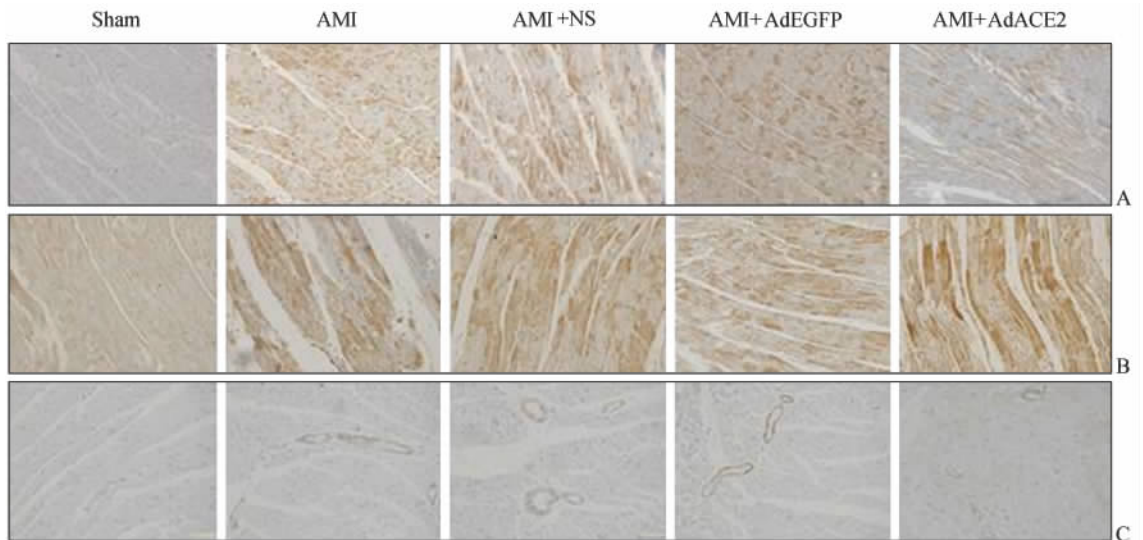


图 2 各组大鼠心肌组织 Ang II、Ang-(1-7)和 α -SMA 蛋白表达

Fig 2 Expression of Ang II, Ang-(1-7) and α -SMA proteins in myocardial tissues of rats in various groups

AMI: Acute myocardial infarction; NS: Normal saline; AdEGFP: Adenovirus-enhanced green fluorescent protein; AdACE2: Adenovirus-angiotensin-converting enzyme 2; Ang: Angiotensin; α -SMA: α -Smooth muscle actin. A-C: Immunohistochemical staining of Ang II, Ang-(1-7) and α -SMA, respectively (Original magnification: $\times 400$); D: Quantitative analysis of Ang II, Ang-(1-7) and α -SMA expression. * $P < 0.05$ vs Sham group; $\Delta P < 0.05$ vs AMI+AdACE2 group. $n=5, \bar{x} \pm s$

2.4.2 蛋白质印迹法检测心肌组织 ACE2 表达结果
蛋白质印迹分析结果(图 3A)显示, 4 周后

AMI+AdACE2 组大鼠心肌组织 ACE2 表达水平明显高于其他各组($P<0.05$)。

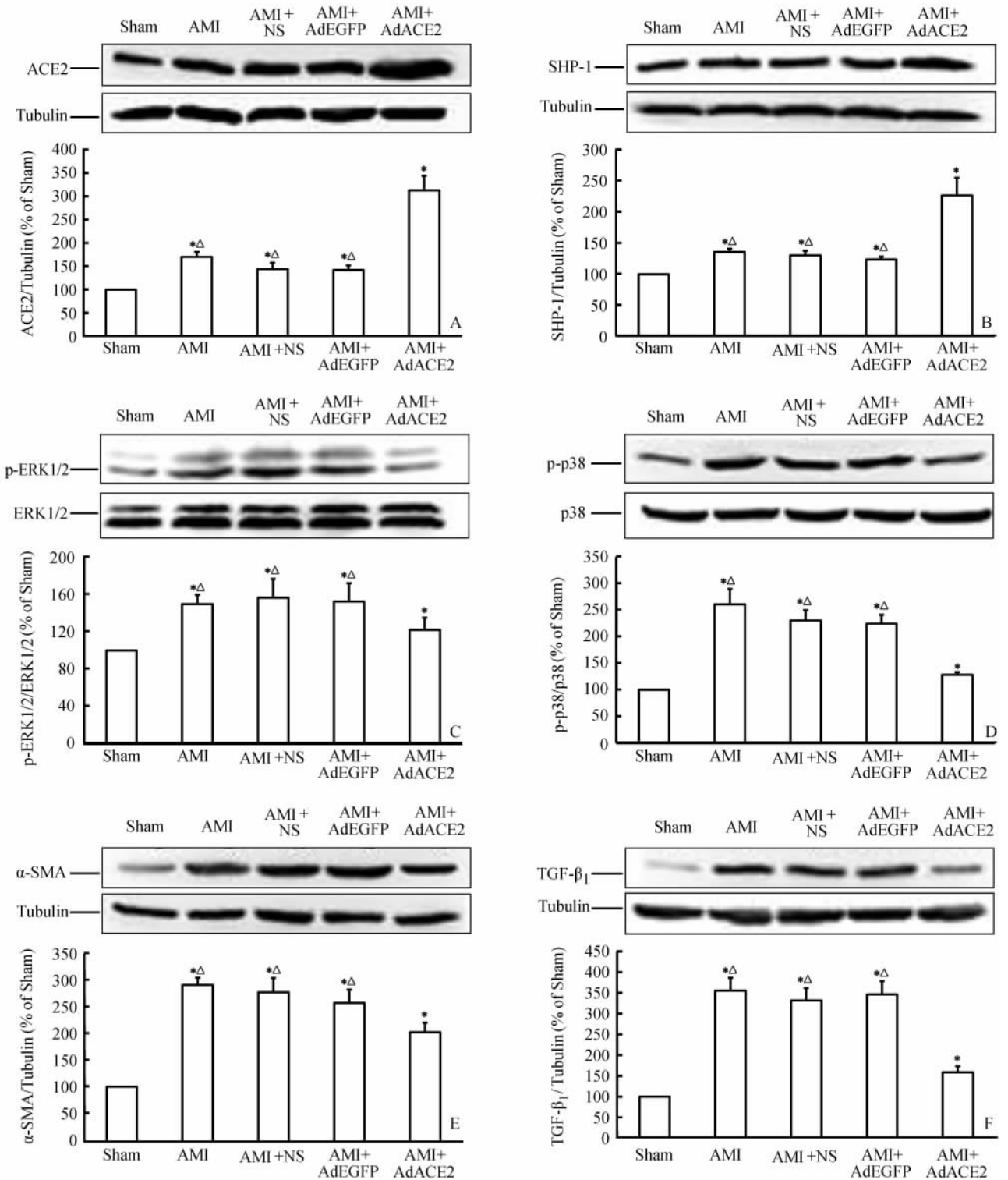


图 3 蛋白质印迹分析检测各组大鼠心肌组织 ACE2(A)、SHP-1(B)、p-ERK1/2/ERK1/2(C)、

p-p38/p38(D)、α-SMA(E)和 TGF-β₁(F) 蛋白表达

Fig 3 Protein expression of ACE2(A), SHP-1(B), p-ERK1/2/ERK1/2(C), p-p38/p38(D), α-SMA(E) and TGF-β₁(F) in rat myocardial tissues of each group detected by Western blotting analysis

AMI: Acute myocardial infarction; NS: Normal saline; AdEGFP: Adenovirus-enhanced green fluorescent protein; AdACE2: Adenovirus-angiotensin-converting enzyme 2; SHP-1: Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1; α-SMA: α-Smooth muscle actin; TGF-β₁: Transforming growth factor β₁. * $P<0.05$ vs Sham group; Δ $P<0.05$ vs AMI+AdACE2 group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

2.4.3 ACE2 调节 SHP-1 与 MAPKs 家族的表达 蛋白质印迹法检测心肌梗死周边区 SHP-1 及 MAPKs 成员 ERK1/2、p-ERK1/2、p38 及 p-p38 的蛋白表达,结果显示:(1)与 Sham 组相比,其他 4 组 SHP-1 表达均升高($P < 0.05$),AMI+AdACE2 组升高更为显著(图 3B);(2)与 Sham 组相比,其他 4 组 p-ERK1/2/ERK1/2 及 p-p38/p38 表达均升高($P < 0.05$);与 AMI、AMI+NS 及 AMI+AdEGFP 组相比,AMI+AdACE2 组 p-ERK1/2/ERK1/2 及 p-p38/p38 表达降低($P < 0.05$,图 3C、3D)。

2.5 ACE2 直接下调纤维化相关指标

2.5.1 免疫组化分析心肌组织 α -SMA 表达结果 α -SMA 定位于血管平滑肌细胞胞质内,少量表达于心肌成纤维细胞胞质,呈棕黄色。与 Sham 组相比,AMI、AMI+NS 及 AMI+AdEGFP 组血管平滑肌阳性染色细胞明显增加,且心肌细胞胞质 α -SMA 表达少量增加;AMI+AdACE2 组与 AMI、AMI+NS 及 AMI+AdEGFP 组相比阳性染色细胞减少;Sham 组未见明显阳性表达(图 2C)。

2.5.2 蛋白质印迹分析检测 α -SMA、TGF- β_1 表达 蛋白质印迹分析结果(图 3E、3F)显示,与 Sham 组相比,其他 4 组 α -SMA 和 TGF- β_1 表达升高($P < 0.05$),AMI+AdACE2 组 α -SMA 和 TGF- β_1 表达低于 AMI、AMI+NS 及 AMI+AdEGFP 组($P < 0.05$)。

3 讨论

近年来大量研究表明,ACE2 在人和啮齿类动物的组织器官中,尤其在心脏中表达丰富,且其具有拮抗 ACE 的作用。ACE 将 Ang I 转化为强缩血管物质 Ang II,ACE2 则将 Ang II 转化为强舒血管物质 Ang-(1-7),并且 Ang-(1-7)还具有抗增殖、抑制血管重构和心肌肥厚,负性调节 RAS 系统作用^[7,12-13]。Burrell 等^[14]和 Averill 等^[15]研究证实 ACE2 可以通过心肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞及平滑肌细胞的旁分泌方式抑制成纤维细胞的促纤维化效应。Kawano 等^[16]研究表明 Ang II 引起胶原合成增加,导致心肌纤维化,并且降低 Ang II 的蓄积浓度可以减少胶原的产生。相反,Ang-(1-7)可以通过

Ang II 依赖或者非依赖的形式抑制心肌细胞和心肌成纤维细胞导致的心室重构效应^[17-18]。现有的研究表明 ACE2 通过降解 Ang II 和产生 Ang-(1-7)介导心脏保护作用。本研究结果显示,心肌梗死大鼠过表达 ACE2 后,梗死周边区心肌组织 Ang II 表达降低,Ang-(1-7)表达升高,与上述研究结果一致。

SHP-1 是一种蛋白酪氨酸磷酸酶,最早发现于造血细胞的胞质中,对细胞内的信号转导起负性调节作用。在血管平滑肌细胞中,Ang II AT2 受体介导的 JNK 激活、c-Jun 表达和 ERK1/2 磷酸化均与 SHP-1 的激活密切相关^[8,19]。Gava 等^[9]的研究表明在肾小管细胞中,Ang-(1-7)通过激活 SHP-1 抑制了高糖所致的 p38 MAPK 的磷酸化。Tallant 等^[20]在心肌细胞中的研究证实 Ang-(1-7)通过 MAS 受体激活 SHP-1 抑制 MAPKs 激活。目前研究认为 MAPKs 重要成员 ERK1/2、p38 与细胞生长、分化和增殖的调控密切相关^[21]。本研究结果表明,大鼠心肌梗死后梗死周边区胶原合成明显增加,心室重构明显,Ang II 及 Ang-(1-7)表达升高,相反,在 ACE2 过表达心肌梗死大鼠中,Ang II 的表达降低,且 Ang-(1-7)的升高更为显著,同时,SHP-1 的表达也升高,作为 Ang II 信号通路下游的 MAPKs 组分 ERK1/2、p38 的磷酸化水平降低。因此,我们推测 ACE2 是通过将 Ang II 转化为 Ang-(1-7),Ang-(1-7)进一步激活 SHP-1 从而抑制 MAPKs 组分 ERK1/2、p38 的磷酸化,最终起到拮抗 RAS 系统的作用。

TGF- β_1 是 Ang II 信号通路下游一个重要的促心室重构的细胞因子^[22-23],在心肌梗死后的心肌细胞中其基因表达明显增加^[24],而且心肌梗死 4 周后,TGF- β_1 表达与增加的胶原表达呈正相关^[25]。Okada 等^[26]的研究也证实减少心肌梗死后 TGF- β_1 的表达可以缓解心室重构,并延长心肌梗死动物的生存时间。体外实验进一步表明 TGF- β_1 具有刺激心脏成纤维细胞分化为肌成纤维细胞的能力,促使其标记物 α -SMA 活化及表达,导致大量胶原合成,从而加速心肌纤维化进程^[27]。本研究中,我们通过 Masson 染色分析梗死周边区心肌胶原的表达证实 ACE2 过表达组心肌梗死大鼠胶原沉积明显改善;

蛋白质印迹分析也表明 ACE2 过表达的大鼠 α -SMA 及 TGF- β_1 的表达较 AMI 组降低; 免疫组化也提示 ACE2 过表达组 α -SMA 阳性染色细胞降低, 蛋白表达减少。这与上述的研究结果一致, 证实 ACE2 过表达可以有效降低梗死周边区胶原合成, 并下调促纤维化信号因子 α -SMA 及 TGF- β_1 的表达。

综上所述, 本研究证实过表达 ACE2 能够有效减少急性心肌梗死大鼠梗死周边区心肌纤维化, 缓解心室重构。其机制可能与激活蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP-1, 负性调节 RAS 系统及其下游的 MAPKs 组分 ERK1/2 和 p38 的磷酸化, 并减少直接促纤维化信号因子 α -SMA 及 TGF- β_1 的表达相关, 提示增加梗死周边区 ACE2 的表达活性(基因转染或者药物刺激)对急性心肌梗死后心室病理重构具有重要的保护作用, 可能为心血管疾病提供新的药物靶点。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Kumar R, Singh V P, Baker K M. The intracellular renin-angiotensin system; implications in cardiovascular remodeling[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, 17:168-173.
- [2] Sun Y. Intracardiac renin-angiotensin system and myocardial repair/remodeling following infarction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48:483-489.
- [3] Mehta P K, Griendling K K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292:C82-C97.
- [4] Mercure C, Yogi A, Callera G E, Aranha A B, Bader M, Ferreira A J, et al. Angiotensin(1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart [J]. *Circ Res*, 2008, 103:1319-1326.
- [5] Giani J F, Muñoz M C, Mayer M A, Veiras L C, Arranz C, Taira C A, et al. Angiotensin-(1-7) improves cardiac remodeling and inhibits growth-promoting pathways in the heart of fructose-fed rats[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298:H1003-H1013.
- [6] Zhong J, Basu R, Guo D, Chow F L, Byrns S, Schuster M, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction[J]. *Circulation*, 2010, 122:717-728, 18p following 728.
- [7] Shibasaki Y, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Masaki H, Kosaki A, et al. Angiotensin II type 2 receptor inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by increasing association of SHP-1 tyrosine phosphatase[J]. *Hypertension*, 2001, 38:367-372.
- [8] Cui T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Shiuchi T, Daviet L, et al. Pivotal role of tyrosine phosphatase SHP-1 in AT2 receptor-mediated apoptosis in rat fetal vascular smooth muscle cell[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49:863-871.
- [9] Gava E, Samad-Zadeh A, Zimpelmann J, Bahramifarid N, Kitten G T, Santos R A, et al. Angiotensin-(1-7) activates a tyrosine phosphatase and inhibits glucose-induced signalling in proximal tubular cells[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24:1766-1773.
- [10] Olivetti G, Capasso J M, Meggs L G, Sonnenblick E H, Anversa P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats[J]. *Circ Res*, 1991, 68:856-869.
- [11] Fraccarollo D, Hu K, Galuppo P, Gaudron P, Ertl G. Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarction: possible involvement of myocardial endothelin system in ventricular remodeling[J]. *Circulation*, 1997, 96:3963-3973.
- [12] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9[J]. *Circ Res*, 2000, 87:E1-E9.
- [13] Tipnis S R, Hooper N M, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner A J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:33238-33243.
- [14] Burrell L M, Risvanis J, Kubota E, Dean R G, MacDonald P S, Lu S, et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans[J]. *Eur Heart J*, 2005, 26:369-375.

- [15] Averill D B, Ishiyama Y, Chappell M C, Ferrario C M. Cardiac angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2003, 108: 2141-2146.
- [16] Kawano H, Do Y S, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law R E, et al. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts [J]. *Circulation*, 2000, 101: 1130-1137.
- [17] Grobe J L, Mecca A P, Mao H, Katovich M J. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290: H2417-H2423.
- [18] Iwata M, Cowling R T, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan J X, et al. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289: H2356-H2363.
- [19] Matsubara H, Shibasaki Y, Okigaki M, Mori Y, Masaki H, Kosaki A, et al. Effect of angiotensin II type 2 receptor on tyrosine kinase Pyk2 and c-Jun NH2-terminal kinase via SHP-1 tyrosine phosphatase activity: evidence from vascular-targeted transgenic mice of AT2 receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282: 1085-1091.
- [20] Tallant E A, Ferrario C M, Gallagher P E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289: H1560-H1566.
- [21] Grobe J L, Mecca A P, Lingis M, Shenoy V, Bolton T A, Machado J M, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7) [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292: H736-H742.
- [22] Lim H, Zhu Y Z. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 2584-2596.
- [23] See F, Kompa A, Martin J, Lewis D A, Krum H. Fibrosis as a therapeutic target post-myocardial infarction [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11: 477-487.
- [24] Deten A, Hölzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer H G. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33: 1191-1207.
- [25] Sun Y, Zhang J Q, Zhang J, Ramires F J. Angiotensin II, transforming growth factor-beta1 and repair in the infarcted heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30: 1559-1569.
- [26] Okada H, Takemura G, Kosai K, Li Y, Takahashi T, Esaki M, et al. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure [J]. *Circulation*, 2005, 111: 2430-2437.
- [27] Dobaczewski M, Bujak M, Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza L H, Wang X F, et al. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2010, 107: 418-428.

[本文编辑] 商素芳