

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0893-03

• 实验研究 •

血管紧张素转化酶 2和血管紧张素 1-7在兔动脉粥样硬化斑块中的表达

张月辉^{1,2}, 朱莉², 于庆涛², 张永欢², 张绪洪¹, 刘春喜², 董波^{1,2}, 张运²

(1 山东大学附属省立医院心内科, 山东省济南市 250021;

2 山东大学齐鲁医院心内科 教育部和卫生部心血管重构和功能研究重点实验室, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理学; 动脉粥样硬化; 血管紧张素转化酶 2; 血管紧张素 1-7; 免疫组织化学

[摘要] 目的 观察血管紧张素转化酶 2和血管紧张素 1-7在兔动脉粥样硬化斑块中的表达, 确定斑块中表达血管紧张素转化酶 2蛋白的细胞类型。方法 雄性新西兰大白兔动脉内膜损伤术后饲以高脂饲料 4个月建立动脉粥样硬化模型。取腹主动脉组织进行免疫组织化学染色。结果 血管紧张素转化酶 2和血管紧张素 1-7蛋白在兔腹主动脉斑块中表达, 大多数的巨噬细胞、部分平滑肌细胞和内皮细胞都表达血管紧张素转化酶 2。血管紧张素 1-7主要在血管紧张素转化酶 2阳性区域表达, 分布于血管紧张素转化酶 2阳性细胞胞外。结论 血管紧张素转化酶 2和血管紧张素 1-7都在兔动脉粥样硬化斑块中表达, 血管紧张素转化酶 2及血管紧张素 1-7在动脉粥样硬化发生发展中的作用值得进一步探讨。

[中图分类号] R361

[文献标识码] A

Expression and Significance of Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Angiotensin-(1-7) in Rabbit Atherosclerotic Plaques

ZHANG Yue-Hui^{1,2}, ZHU Li², YU Qing-Tao², ZHANG Yong-Huan², ZHANG Xu-Hong¹, LIU Chun-Xi², DONG Bo^{1,2}, and ZHANG Yun²

(1 Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021; 2 The Key Laboratory of Cardiovascular Remodeling and Function Research, Chinese Ministry of Education and Chinese Ministry of Health, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Angiotensin-Converting Enzyme 2; Angiotensin-(1-7); Immunohistochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To observe angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) proteins' expression in rabbit atherosclerotic tissues and determine which cell types express ACE2 protein. **Methods** Male New Zealand white rabbits were underwent balloon-induced arterial wall injury and fed with high-fat diet for 4 months to construct atherosclerosis models. Abdominal aorta was processed for immunohistochemistry. **Results** Both ACE2 and angiotensin-(1-7) were expressed in abdominal aorta plaque. A large proportion of macrophage-positive cells and a percentage of smooth muscle cells, endothelia within atherosclerotic plaques expressed ACE2 protein. Angiotensin-(1-7) was present in areas with extracellular ACE2 immunostaining. **Conclusions** ACE2 and angiotensin-(1-7) are present in atherosclerotic tissues, which may participate in development of atherosclerosis.

近年来有关肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS)最重要的进展是 2000年血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)的发现^[1]。ACE2是人类发现的第一个血管紧张素转化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE)的同系化合物^[2,3], 其主要功能是水解血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ (angiotensin I , $\text{Ang}(\text{I})$)生成血管紧张素 1-7 [Angiotensin-(1-7), $\text{Ang}(\text{1-7})$]^[4]。Ang-(1-7)在动脉

粥样硬化 (atherosclerosis, As)的发生发展过程中起保护作用^[5,6]。作者前期的研究发现 ACE2与 As的发生发展密切相关^[7]。有关 As斑块中 ACE2与 Ang-(1-7)表达及意义的研究目前极少。为此本研究建立兔 As模型, 观察 ACE2与 Ang-(1-7)蛋白在 As斑块中的表达情况, 并探讨 As斑块中 ACE2蛋白阳性表达的细胞类型。

1 材料及方法

1.1 动脉粥样硬化模型建立^[8]

雄性新西兰大白兔先高脂饮食 1周, 然后行动脉内膜损伤术。方法为 2%戊巴比妥钠每公斤体重 2 mL经耳缘静脉麻醉, 常规消毒, 分离右股动脉, 结

[收稿日期] 2008-06-19 [修回日期] 2008-10-08

[作者简介] 张月辉, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病的机制。E-mail为 xiaohan0405@126.com。朱莉, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及治疗, 联系电话为 15065462732。E-mail为 jiejienhao2005@163.com。通讯作者董波, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, 联系电话为 13356691808。E-mail为 dongbol@medmail.com.cn。

扎右股动脉远端, 阻断近心端血流, 切开动脉前壁, 向近心端插入 4F-Fogarty 球囊导管, 在导管的后方连接盛有 0.4 mL 生理盐水的 1 mL 注射器, 在 X 线下, 将球囊导管沿股动脉进入左心室, 然后回撤到离主动脉瓣 0.5 cm 处, 扩张球囊, 拉回导管至股动脉处, 回抽注射器, 重复 3 次, 取出导管, 结扎动脉, 缝合皮肤。饲以高脂饲料 (1% 胆固醇 + 5% 猪油的颗粒饲料) 4 个月建立动脉粥样硬化模型。

1.2 标本的处理

将 4% 多聚甲醛固定后的兔腹主动脉切成 3~4 mm 长度组织块, 按常规方法将组织进行乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 包埋。

1.3 病理切片的制备

将包埋的组织蜡块连续切片, 切片厚 2~5 μm , 于 60°C 烤片机烤 2 h 备用。

1.4 免疫组织化学染色

用于检测组织中 ACE2 与 Ang-(1-7) 蛋白表达及标记巨噬细胞、平滑肌细胞。常规脱蜡至水, 用 3% 的 H_2O_2 10 min 灭活内源性过氧化物酶, 1 × PBS 洗 3 次 (每次 5 min), 浸入 0.01% 枸橼酸盐缓冲液中进行抗原修复, 1 × PBS 洗 3 次 (每次 5 min), 加一抗 [小鼠抗兔单核巨噬细胞单克隆抗体 (RAM 11), 购自 NeoMarkers 公司; 羊抗 ACE2 多克隆抗体, 购自 Santa Cruz 公司; 小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体, 购自武汉博士德生物工程有限公司; 兔抗 Ang-(1-7) 抗体, 购自 PHOENIX PHAR-

MACEUTICALS 公司], 4 °C 过夜; 1 × PBS 洗 3 次 (每次 5 min), 加辣根过氧化物酶标二抗 (购自中杉金桥公司), 37 °C 孵育 30 min, 1 × PBS 洗 3 次 (每次 5 min), 加 DAB 显色 3~5 min, 观察结果 (阳性表达呈现棕黄色), 苏木素复染。常规脱水透明, 中性树脂封片。

2 结果

2.1 兔动脉粥样硬化斑块内血管紧张素转化酶 2 与血管紧张素 1-7 蛋白的表达

免疫组织化学染色结果显示兔动脉粥样硬化斑块内有大量 ACE2 与 Ang-(1-7) 蛋白的表达; 主要分布于斑块巨噬细胞、平滑肌细胞和内皮细胞 (图 1 和图 2)。

2.2 血管紧张素转化酶 2 表达阳性的细胞类型

连续系列切片免疫组织化学染色显示斑块内含有大量的巨噬细胞及巨噬细胞源性泡沫细胞, 呈团簇状分布; 内膜及中膜均有平滑肌细胞, 形态呈梭形。相邻系列切片示斑块中大多数巨噬细胞、部分平滑肌细胞和内皮细胞都表达 ACE2 (图 1)。

2.3 血管紧张素 1-7 蛋白表达与血管紧张素转化酶 2 蛋白表达的关系

相邻切片显示在 ACE2 阳性区域同时有 Ang-(1-7) 蛋白表达, 它主要在 ACE2 阳性细胞外表达 (图 2)。

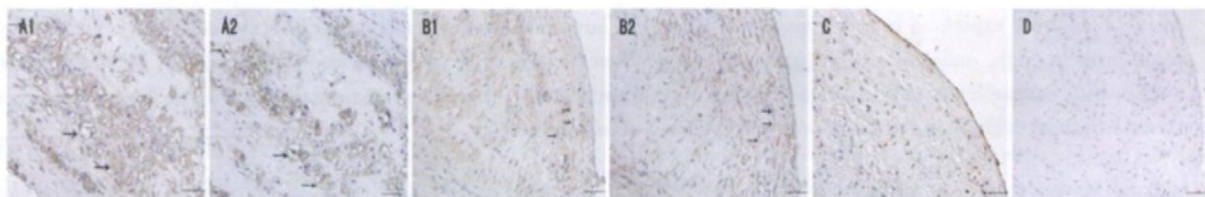


图 1 ACE2 表达阳性的细胞类型 (标尺长度为 50 μm) A1 和 B1 为 ACE2 蛋白在动脉粥样硬化斑块中的表达, A2 为巨噬细胞, B2 为平滑肌细胞, C 为 ACE2 蛋白在动脉粥样硬化血管内皮细胞中的表达, D 为阴性对照。

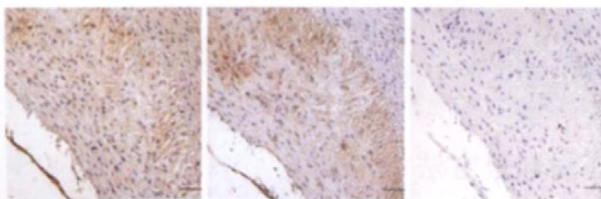


图 2 Ang-(1-7) 蛋白在动脉粥样硬化斑块中的表达及其与 ACE2 蛋白表达的关系 (标尺长度为 50 μm) 左为 ACE2 蛋白的表达, 中为 Ang-(1-7) 蛋白的表达, 右为阴性对照。

3 讨论

血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 因能高效水解 Ang^{II} 生成具有心血管保护作用的 Ang-(1-7) 而被看作 RAS 中治疗心血管疾病的新靶点^[9, 10]。在 ACE2 缺失小鼠中, 血浆中 Ang-(1-7) 水平的降低以及潜在的内皮保护作用受损可能会加强 Ang^{II} 对冠状动脉内皮的损害作用^[11, 12]; Sahara 等^[13] 近期在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠体内的研究为 ACE2 抗 As 的作用提供了证据。钟久昌等^[14] 研究发现

ACE2基因过表达可以对抗血管内皮细胞中 Ang Ⅱ和 Ang Ⅲ所诱导的促氧化及促炎症效应,其基因或活性异常可能参与 As的发生、发展。在兔 As动物模型中,作者以前的研究已证实 ACE2基因治疗能通过减少巨噬细胞聚集,降低 MCP-1、MMP-3、MMP-9表达,增加斑块中胶原含量,稳定 12~16周的 As斑块^[7]。Ang-(1-7)具有舒张血管、利钠利尿、抗生长和抗增殖的作用,被认为是能对抗 Ang Ⅱ作用最强的舒血管活性物质之一^[15,16]。Freeman等^[17]报道 Ang-(1-7)对抗 Ang Ⅱ刺激大鼠主动脉血管平滑肌的增生作用,而冠状 As中血管平滑肌细胞的增殖与血管狭窄密切相关。RAS新成员 ACE2、Ang-(1-7)的发现给心脑血管疾病的发病机制及治疗方法的研究提供了新思路:可通过增加 ACE2 mRNA、蛋白的表达及活性,继而增加 Ang-(1-7)的产生,可能对 As及其所致心脑血管病的治疗起到积极的作用。

本文通过建立新西兰大白兔 As模型,研究 As斑块中 ACE2与 Ang-(1-7)蛋白的表达情况,发现在 As斑块中 ACE2与 Ang-(1-7)蛋白大量表达;采用相邻系列切片免疫组织化学染色观察了 ACE2蛋白阳性表达的细胞类型,结果发现在 As斑块巨噬细胞、平滑肌细胞及内皮细胞中都表达 ACE2蛋白。同时在 ACE2阳性区域有大量 Ang-(1-7)蛋白表达,它主要存在于 ACE2阳性细胞胞外。以上结果提示它们与 As的发生发展可能有一定联系,值得进一步探讨。

综上所述,本研究用免疫组织化学染色的方法发现了兔 As斑块中的 ACE2与 Ang-(1-7)蛋白表达部位。为进一步对 ACE2和 Ang-(1-7)在 As斑块形成及稳定 As斑块中所起作用的组织学研究打下了基础。

[参考文献]

- [1] Raizada MK, Ferreira AJ. ACE2: A new target for cardiovascular disease therapeutics [J]. *Cardiovasc Pharmacol* 2007; **50** (2): 112-119.
- [2] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 [J]. *Circ Res* 2000; **87** (5): E1-E9.
- [3] Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase [J]. *Biol Chem*, 2000; **275** (43): 33 238-243.
- [4] Boehm M, Nabel EG. Angiotensin-converting enzyme 2—a new cardiac regulator [J]. *N Engl J Med*, 2002; **347** (22): 1 795-797.
- [5] Osei SY, Ahima RS, Minkes RK, et al. Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds [J]. *Eur J Pharmacol* 1993; **234** (1): 35-42.
- [6] Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) and antihypertension mechanisms [J]. *Nephrol* 1998; **11** (6): 278-283.
- [7] Dong B, Zhang C, Feng JB, et al. Overexpression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28** (7): 1 270-276.
- [8] Akawa M, Rabkin E, Okada Y, et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atherosclerosis—a potential mechanism of lesion stabilization [J]. *Circulation*, 1998; **97** (24): 2 382-383.
- [9] Warner FJ, Smith AJ, Hooper NM, et al. Angiotensin-converting enzyme 2: a molecular and cellular perspective [J]. *Cell Molecular Life Sci* 2004; **61** (21): 2 704-713.
- [10] Danilczyk U, Eriksson U, Oudit GY, et al. Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Cell Molecular Life Sci* 2004; **61** (21): 2 714-719.
- [11] Brosnahan KB, Li P, Talkant EA, et al. Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation [J]. *Biol Res* 1998; **31** (3): 227-234.
- [12] Ferreira AJ, Santos RAS, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Hypertension*, 2001; **38** (3): 665-668.
- [13] Sahara M, Sata M, Morita T, et al. Acceleration of hyperlipidemia-induced atherosclerosis in apolipoprotein E and angiotensin-converting enzyme 2 double-knockout mice [J]. *Circulation*, 2007; **116** 11242.
- [14] 钟久昌, 余细勇, 林秋雄, 等. 血管紧张素转化酶 2 基因对人内皮细胞巨噬细胞移动抑制因子表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (7): 556-558.
- [15] Maia LG, Ramos MC, Fernandes L, et al. Angiotensin (1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats [J]. *Cardiovasc Pharmacol* 2004; **43** (5): 685-691.
- [16] Haulica I, Bick W, and Serban DN. Angiotensin peptides and their pleiotropic actions [J]. *Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2005; **6** (3): 121-131.
- [17] Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth cell growth [J]. *Hypertension*, 1996; **28** (1): 104-108.

(此文编辑 李小玲)