

# 血管紧张素-(1-7)预处理减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤

何建桂, 彭龙云, 马虹, 廖新学, 高修仁, 麦炜颐, 何文, 张雪娇  
(中山大学附属第一医院心血管内科//心血管研究所, 广东广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨较大剂量血管紧张素-(1-7)预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及其信号机制。【方法】48只SD大鼠随机分为4组,每组12只:缺血再灌注对照组、血管紧张素-(1-7)预处理组、血管紧张素-(1-7)预处理加磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)抑制剂Wortmannin处理组、Wortmannin处理对照组,观察较大剂量血管紧张素-(1-7)预处理对大鼠离体缺血再灌注心脏左心室收缩压、冠状动脉流量、肌酸磷酸激酶和乳酸脱氢酶释放、心肌梗死范围以及心肌蛋白激酶B(Akt)、糖原合成酶激酶-3(GSK-3)磷酸化的影响。【结果】与缺血再灌注对照组相比,血管紧张素-(1-7)预处理组心脏左心室收缩压、冠状动脉流量显著提高,冠状动脉循环流出液中肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶含量降低,心肌梗死范围减小,心肌磷酸化Akt(Ser473)、磷酸化GSK-3(Ser9)水平增高,PI3K抑制剂Wortmannin能够抑制血管紧张素-(1-7)预处理所致的Akt、GSK-3磷酸化,但只能部分消除血管紧张素-(1-7)预处理的心脏保护效应。【结论】较大剂量血管紧张素-(1-7)预处理能够减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤,PI3K/Akt/GSK-3信号通路参与介导血管紧张素-(1-7)预处理的心脏保护作用。

关键词: 血管紧张素-(1-7); 预处理; 心肌缺血再灌注损伤; 信号机制

中图分类号: R541.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0515-04

## Angiotensin-(1-7) Preconditioning Attenuates Isolated Rat Heart Ischemia Reperfusion Injury

HE Jian-gui, PENG Long-yun, MA Hong, LIAO Xin-xue, GAO Xiu-ren, MAI Wei-yi,  
HE Wen, ZHANG Xue-jiao

(Department of Cardiovascular Medicine, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University//Cardiovascular Research Institute of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To explore the effects of large dose angiotensin-(1-7) preconditioning on isolated rat heart ischemia reperfusion injury and investigate the signal mechanism underlying the role of angiotensin-(1-7) preconditioning.【Methods】Forty eight rats were randomly separated into 4 groups: ischemia reperfusion (IR) control group, IR treated with angiotensin-(1-7) preconditioning group, IR treated with angiotensin-(1-7) preconditioning and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor wortmannin group, and IR treated with wortmannin alone to evaluate the effects of large dose angiotensin-(1-7) preconditioning on left ventricular systole pressure, coronary artery flow, creatine phosphokinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) release, myocardial infarction size, and the level of myocardial phospho-protein kinase B/Akt (Ser473), phospho-glycogen synthase kinase-3 (Ser9).【Results】Left ventricular systole pressure and coronary artery flow were improved significantly, and the release of CK and LDH was reduced significantly with obvious reduction of myocardial infarction size in angiotensin-(1-7) preconditioning group as compared to ischemia reperfusion control group. Meanwhile, the levels of phospho-protein kinase B/Akt (Ser473) and phospho-glycogen synthase kinase-3 (Ser9) were increased in angiotensin-(1-7) preconditioning group compared with these in ischemia reperfusion control group. Wortmannin inhibited the increase of phospho-protein kinase B/Akt (Ser473) and phospho-glycogen synthase kinase-3 (Ser9) induced by angiotensin-(1-7) preconditioning, but only abolished partly the cardioprotection of angiotensin-(1-7)

收稿日期: 2006-03-05

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(5001675)

作者简介: 何建桂(1964-),男,湖南望城人,博士,副教授;马虹,博士生导师,通讯作者. E-mail: sums-mahong@21cn.com

preconditioning. 【Conclusion】 Large dose angiotensin- (1-7) preconditioning attenuates isolated rat heart ischemia reperfusion injury. The phosphorylation of protein kinase B/ glycogen synthase kinase-3 signal pathway is involved in the cardioprotection of angiotensin- (1-7) preconditioning.

Key words: Angiotensin- (1-7); preconditioning; myocardial ischemia reperfusion injury; signal mechanism

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):515-518, 524]

血管紧张素-(1-7)是近年发现的肾素-血管紧张素系统中的重要成员,它在许多方面拮抗血管紧张素的作用,但在某些方面又与血管紧张素的作用相似或协同。现有的有限资料和我们初步的研究结果显示<sup>[1-4]</sup>,低剂量(0.1~1 nmol/L)的血管紧张素-(1-7)有减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的作用。也有研究显示<sup>[5]</sup>,随着剂量增大(>10 nmol/L),血管紧张素-(1-7)呈剂量依赖性加重大鼠离体心脏缺血再灌注损伤。较大剂量血管紧张素-(1-7)加重心脏缺血再灌注损伤的机制尚不清楚,血管紧张素-(1-7)增强氧化应激可能与之有关<sup>[6,7]</sup>。再者,血管紧张素-(1-7)在较高浓度或剂量时直接与血管紧张素 1 型受体结合发挥与血管紧张素相似的作用<sup>[8]</sup>。血管紧张素 预处理能够减轻心脏缺血再灌注损伤<sup>[9]</sup>,而较大剂量血管紧张素-(1-7)预处理是否也能减轻心脏缺血再灌注损伤目前尚未见报道。我们就此进行探讨,并试图探索其相关作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

雄性 SD 大鼠,8 周龄,体质量 250~300 g,由中山大学实验动物中心提供。血管紧张素-(1-7)、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)抑制剂 Wortmannin、兔来源的 Actin 抗体购于 Sigma 公司。蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)抗体、磷酸化 Akt(p-Akt Ser473)抗体、糖原合成酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)抗体、磷酸化 GSK-3(p-GSK-3 Ser9)抗体均购于 Cell Signaling 公司。

### 1.2 大鼠离体心脏缺血再灌注

SD 大鼠 48 只,随机(随机数法)分为 4 组(n=12):缺血再灌注对照组(Control),不给予药物处理;血管紧张素-(1-7)预处理组(A17),缺血再灌注前 15 min 里经灌流给予血管紧张素-(1-7),终浓度为 1  $\mu$ mol/L;血管紧张素-(1-7)预处理加 Wortmannin 处理组(A17wort),给予如 A17 组相同

的血管紧张素-(1-7)预处理,并在缺血再灌注前 20 min 内,经灌流给予 Wortmannin,终浓度为 0.1  $\mu$ mol/L;Wortmannin 处理对照组(Wort),给予如 A17wort 组相同的 Wortmannin 处理作为对照。大鼠离体心脏缺血再灌注方法如下,给予大鼠腹腔注射体积分数 10%水合氯醛麻醉(0.3 mL/100 g),随后腹腔注射肝素 500 U 抗凝,迅速开胸,快速取出心脏,浸于 4 改良 Krebs-Henseleit 缓冲液中(经 95%O<sub>2</sub> 加 5%CO<sub>2</sub> 混合气饱和),在 1 min 内主动脉插管悬挂于 Langendorff 灌流装置上,用过滤除菌的改良 Krebs-Henseleit 缓冲液行非循环式主动脉逆行灌流,灌流压为 65 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa),温度稳定在 37  $^{\circ}$ C,灌流液充以 95%O<sub>2</sub> 加 5%CO<sub>2</sub> 混合气饱和,pH 7.4 左右。心脏平衡灌流 20 min 后,再经历 20 min 灌流以给予不同药物处理,然后在左心耳的下缘、肺动脉圆锥的左缘之间,用 6-0 带针丝线穿刺结扎(线结内垫一小橡皮)左冠状动脉造成心肌缺血,缺血灌流 30 min 后,从小橡皮处剪除线结再灌流 60 min。

### 1.3 血流动力学指标和乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶释放的测定

剪去左心耳,将一端带乳胶薄壁球囊的心导管经左心房插入左心室,球囊内充生理盐水 0.15~0.20 mL,使得左室舒张末压在实验前保持在 8 mmHg,导管另一端连接压力换能器,以成都泰盟公司 BL-420S 生物机能实验系统分别在缺血前、再灌注后 30 min 测定心率、左心室收缩压。在右心房上部剪一小口收集冠状动脉回流液,分别在心脏平衡灌流 20 min、再灌流 30 min 时收集 2 min 的冠状动脉流量,计算冠状动脉流量。收集平衡灌流 20 min、再灌注 30 min 的冠状动脉循环流出液,全自动生化分析仪测定其乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶的含量。

### 1.4 心肌梗死范围的测定

各组大鼠离体心脏缺血再灌注结束后各取 6 个心脏,分离出左室心肌,快速液氮冻存,随后移入-80  $^{\circ}$ C 冰箱冻存,待行 Western blot 检测。其余 6 个心脏即测定心肌梗死范围,先分离出左室心肌

并横切成5片,置入TTC磷酸缓冲液(pH 7.4)中37℃水浴15 min,非坏死区染成砖红色,坏死区不染色呈灰白色,然后置于10%中性甲醛中固定过夜,分离坏死区与非坏死区后称重,梗死范围以坏死心肌质量占左室心肌质量的百分比表示。

### 1.5 Akt、GSK-3 蛋白表达和磷酸化状态

用Western-blot检测心肌Akt、GSK-3的蛋白表达和磷酸化状态,上样总蛋白量为50 μg,以上样缓冲液等体积稀释,室温下SDS-PAGE电泳,4℃过夜电转到PVDF膜上,常规洗膜封闭,孵育相应一抗(非磷酸化抗体1:1000稀释,磷酸化抗体1:500稀释,Actin抗体1:3000稀释)和二抗(1:2000稀释),然后化学发光,随后X线胶片曝光、显影、定影。每张膜先行磷酸化蛋白检测,然后洗脱2次分别检测非磷酸化蛋白和Actin的含量。用IBAS 2.5全自动图象分析系统对Western blot图片作图象分析,以Actin的蛋白含量作为内参照。

### 1.6 统计学方法

数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 11.0软件作方差分

析,组间两两比较用S-N-K检验, $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 血流动力学指标

各组离体心脏缺血再灌注前冠状动脉流量、心率、左室收缩压基线值无差异( $P > 0.05$ ),缺血再灌注30 min后各组心脏冠状动脉流量、左室收缩压均有明显下降。与缺血再灌注对照组比较,血管紧张素-(1-7)预处理组冠状动脉流量、左室收缩压均有明显提高( $P < 0.01$ )。在A17wort组,血管紧张素-(1-7)预处理的同时给予Wortmannin处理,其冠状动脉流量、左室收缩压与缺血再灌注对照组比较无显著差异( $P > 0.05$ )。Wortmannin单独应用对离体缺血再灌注心脏的冠状动脉流量、左室收缩压没有显著影响。各组心脏缺血再灌注30 min后心率均有所减慢,但各组无显著差异( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 冠状动脉流量、心率、左室收缩压的变化和乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶的释放

Table 1 Changes of coronary flow, heart rate, left ventricular systole pressure and release of lactate dehydrogenase, creatine phosphokinase (n=12,  $\bar{x} \pm s$ )

	Before ischemia reperfusion				30 min after ischemia reperfusion			
	Control	A17	A17wort	Wort	Control	A17	A17wort	Wort
CF (mL/min)	10.5 ± 1.0	11.0 ± 0.9	10.6 ± 0.9	10.7 ± 0.6	7.9 ± 0.5	10.1 ± 0.3 <sup>1)</sup>	8.8 ± 0.4 <sup>2)</sup>	7.8 ± 0.6
HR (beat/min)	245 ± 8	242 ± 20	243 ± 8	246 ± 9	224 ± 7	224 ± 8	225 ± 5	225 ± 4
LVSP (mmHg)	100 ± 1	101 ± 8	101 ± 9	103 ± 0	66 ± 10	83 ± 8 <sup>1)</sup>	71 ± 8 <sup>2)</sup>	64 ± 5
LDH (U/L)	15 ± 3	15 ± 4	16 ± 3	13 ± 2	215 ± 25	106 ± 13 <sup>1)</sup>	188 ± 17 <sup>2)</sup>	240 ± 21
CK (U/L)	50 ± 7	52 ± 7	52 ± 6	52 ± 6	751 ± 52	362 ± 33 <sup>1)</sup>	637 ± 39 <sup>2)</sup>	756 ± 41

CF: coronary flow; HR: heart rate; LVSP: left ventricular systole pressure; LDH: lactate dehydrogenase; CK: creatine phosphokinase

1) compared with control group,  $P < 0.01$ ; 2) compared with A17 group,  $P < 0.01$

### 2.2 乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶的释放

缺血再灌注前,各组离体心脏冠状动脉循环流出液乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶的含量没有差异( $P > 0.05$ )。缺血再灌注后30 min,缺血再灌注对照组心脏冠状动脉循环流出液乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶的含量分别升高14、15倍左右,而缺血再灌注血管紧张素-(1-7)预处理组乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶的含量仅升高7倍左右,差异有显著性( $P < 0.01$ ),Wortmannin能够部分消除血管紧张素-(1-7)预处理的这种效应。见表1。

### 2.3 心肌梗死范围

缺血再灌注对照组的心肌梗死范围(以左室坏死心肌质量占左室心肌质量的百分比表示)为43.5%,血管紧张素-(1-7)预处理组心肌梗死范围减少到27.8%( $P < 0.01$ ),在血管紧张素-(1-7)预处理的同时给予Wortmannin处理,其心肌梗死范围为35.5%,与血管紧张素-(1-7)预处理组比较有所增大( $P < 0.01$ ),但仍比缺血再灌注对照组小( $P < 0.01$ )。

### 2.4 Akt、GSK-3 的蛋白表达和磷酸化状态

各组离体心脏经30 min缺血/60 min再灌注后,其心肌组织中Akt、GSK-3的蛋白表达无显著

差异( $P > 0.05$ )。但是,与缺血再灌注对照组相比,血管紧张素-(1-7)预处理组心肌组织中磷酸化 Akt (Ser473)、磷酸化 GSK-3 (Ser9) 明显增加 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), Wortmannin 能够抑制血管紧张素-(1-7)预处理所引起的磷酸化 Akt (Ser473)、磷酸化 GSK-3 (Ser9) 增加。缺血再灌注 Wortmannin 处理对照组与缺血再灌注对照组相比,磷酸化 Akt (Ser473)、磷酸化 GSK-3 (Ser9) 的水平无显著差异 ( $P > 0.05$ )。见图 1, 2。

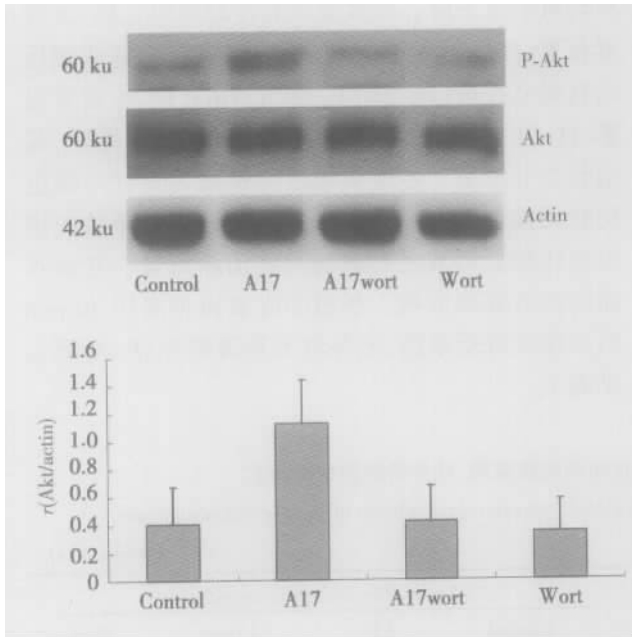


图 1 Western blot 检测离体缺血/再灌注心脏 Akt、磷酸化 Akt (Ser473) 的水平

Fig.1 Western blot detecting for the levels of phospho-Akt (Ser473) and Akt in isolated ischemia/reperfusion hearts

Top panel, representative Western-blot photos. Bottom panel, averaged relative density of phospho-Akt (Ser473)(contrast with actin)

\* Compared with control group,  $P < 0.01$ ; \*\* Compared with Control group,  $P > 0.05$

### 3 讨论

我们的研究结果显示,较大剂量(10  $\mu\text{mol/L}$ )的血管紧张素-(1-7)预处理能够促进离体缺血再灌注大鼠心脏的冠状动脉流量和收缩功能恢复,减少心脏缺血再灌注过程中 LDH、CK 释放,减小心肌梗死范围。我们的研究结果还显示,较大剂量的血管紧张素-(1-7)预处理能够促进 Akt、GSK-3 磷酸化, Akt、GSK-3 的上游激酶磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)抑制剂 Wortmannin 能够完全阻止血管

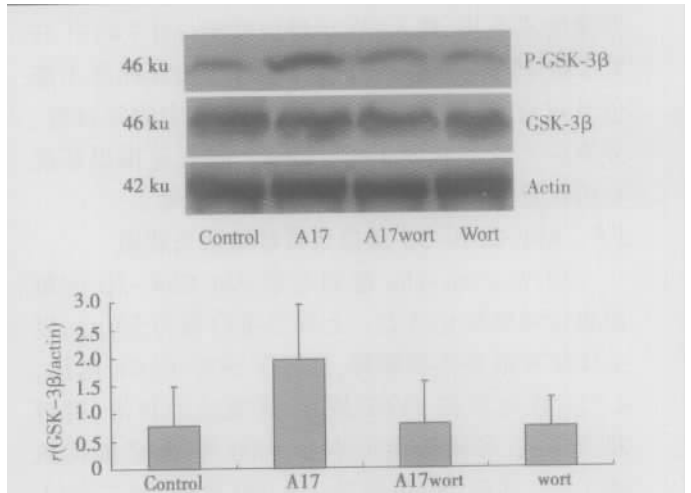


图 2 Western blot 检测离体缺血/再灌注心脏 GSK-3、磷酸化 GSK-3 (Ser9) 的水平

Fig.2 Western blot detecting for the levels of phospho-GSK-3 (Ser9) and GSK-3 in isolated ischemia/reperfusion hearts

Top panel, representative Western-blot photos. Bottom panel, averaged relative density of phospho-GSK-3 (Ser9)(contrast with actin)

\* Compared with control group,  $P < 0.05$ ; \*\* Compared with Control group,  $P > 0.05$

紧张素-(1-7)预处理所引起的 Akt、GSK-3 磷酸化,但这仅能部分消除血管紧张素-(1-7)预处理的心脏保护作用;而 Wortmannin 单独应用对离体缺血再灌注大鼠心脏的冠状动脉流量、收缩功能、梗死范围以及 Akt 和 GSK-3 的磷酸化无影响。这些研究结果提示,较大剂量血管紧张素-(1-7)预处理对大鼠离体缺血再灌注心脏具有保护作用, PI3K/Akt/GSK-3 信号通路参与介导血管紧张素-(1-7)预处理的保护作用。GSK-3 起初仅被认为通过磷酸化糖原合成酶而抑制糖原合成,但现在认为 GSK-3 广泛参与各种细胞功能的调节,它的活性受其磷酸化状态的调节,在其 Ser9 丝氨酸残基被磷酸化后 GSK-3 活性降低而促进细胞存活, Akt 是 GSK-3 的主要上游激酶<sup>[10]</sup>。有研究显示,缺血预处理、药物预处理等多种心肌保护因素都通过促进 Akt、GSK-3 信号分子磷酸化而减轻心肌缺血再灌注损伤<sup>[11,12]</sup>。然而,较大剂量血管紧张素-(1-7)是通过何种途径促使 Akt、GSK-3 磷酸化,我们目前的研究还不能回答这一问题。结合现有的文献资料<sup>[6-8]</sup>,我们推测较大剂量血管紧张素-(1-7)可能是通过增强氧化应激或直接与血管紧张素 1 型受体结合而促进 Akt、GSK-3 磷酸化,从

(下转第 524 页 to page 524)

- precursors in situ [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 991(2): 229- 236.
- [6] JIN K, SUN Y, XIE L, et al: Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(1): 171- 189.
- [7] AHMAD I. Stem cells: new opportunities to treat eye diseases [J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 2001, 42(6): 2743- 2747.
- [8] PERRON M, KANEKAR S, VETTER ML, et al. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the xenopus eye [J]. *Dev Biol*, 1998, 199(2): 185- 200.
- [9] AHMAD I, TANG L, PHAM H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye [J]. *Bioch Bioph Res Comm*, 2000, 270(3): 517- 521.
- [10] TROPEPE V, COLES B L, CHIASSON B J, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye [J]. *Science*, 2000, 287(54): 2032- 2036.
- [11] YANG P, SEILER M G, ARAMANT R B, et al. In vitro isolation and expansion of human retinal progenitor cells [J]. *Exp Neurol*. 2002,177(1):326- ,331.
- [12] 马 静, 唐仕波, 罗 燕, 等. 条件培养液对人视网膜前体细胞分化的诱导[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2006, 1(41):65- 68.
- [13] 俞海燕, 沈 丽, 陈 雪, 等. 体外培养人胚胎来源视网膜干细胞的诱导分化[J]. *中华眼科杂志*, 2004, 7 (40): 448- 452.
- [14] COLES BL, ANGENIEUX B, INOUE T, et al. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(44): 15772- 15777.
- [15] LILLIEN L. Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor [J]. *Nature*, 1995, 377 (6545): 158- 162.

(编辑 刘清海)

(上接第 518 页 from page 518)

而发挥心脏保护作用。另一方面, 血管紧张素-(1-7)受体可能存在不同的亚型, 不同剂量的血管紧张素-(1-7)可能与不同受体亚型结合, 发挥的作用也就可能不同。

## 参考文献:

- [1] FERREIRA A J, SANTOS R A, ALMEIDA A P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Hypertension*, 2001, 38 (3): 665- 668.
- [2] FERREIRA A J, SANTOS R A, ALMEIDA A P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2002, 35(9):1083- 1090.
- [3] 何建桂, 廖新学, 马 虹, 等. 血管紧张素-(1-7)与血管紧张素 在心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. *临床心血管病杂志*, 2003, 19 (10): 615- 617.
- [4] 廖新学, 何建桂, 马 虹, 等. 血管紧张素-(1-7)对大鼠心肌缺血再灌注的影响[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2003, 24 (5): 451- 454.
- [5] NEVES L A, ALMEIDA A P, KHOSLA M C, et al. Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts [J]. *Braz J Med Biol Res*, 1997, 30 (6): 801- 809.
- [6] GONZALES S, NORIEGA G O, TOMARO M L, et al. Angiotensin-(1-7) stimulates oxidative stress in rat kidney [J]. *Regul Pept*, 2002, 106(1-3): 67- 70.
- [7] HEITSCH H, BROVKOVYCH S, MALINSKI T, et al. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells [J]. *Hypertension*, 2001, 37 (1): 72- 76.
- [8] OUDOT A, VERGELY C, ECARNOT-LAUBRIET A, et al. Pharmacological concentration of angiotensin-(1-7) activates NADPH oxidase after ischemia-reperfusion in rat heart through AT1 receptor stimulation [J]. *Regul Pept*, 2005, 127(1-3): 101- 110.
- [9] KIMURA S, ZHANG G X, NISHIYAMA A, et al. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin [J]. *Hypertension*, 2005, 45(5): 860- 866.
- [10] HARDT S E, SADOSHIMA J. Negative regulators of cardiac hypertrophy [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63(3): 500- 509.
- [11] TONG H, IMAHASHI K, STEENBERGEN C, et al. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective [J]. *Circ Res*, 2002, 90(4): 377- 379.
- [12] BULLARD A J, GOVEWALLA P, YELLON D M. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo [J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(5): 397- 403.

(编辑 黄小延)