

网络出版时间: 2024-07-03 17:11:49 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240702.1447.003>

肾素-血管紧张素系统在血管性痴呆大鼠心肌损伤中的作用

李 键 朱博涵 高 鹏 陈 极 陈和木 高晓平

摘要 目的 探讨肾素-血管紧张素系统在实验性血管性痴呆大鼠心肌损伤中的作用。方法 24只成年雄性SD大鼠分为正常组、假手术组和模型组。Morris水迷宫用于评估大鼠学习记忆功能;免疫染色法观察心肌细胞横截面积和间质胶原蛋白分数以评估实验性血管性痴呆引起的心肌改变。检测血清中血管紧张素II(Ang II)和血管紧张素1-7(Ang1-7)的浓度,以及心肌中血管紧张素转换酶(ACE)、血管紧张素转换酶2(ACE2)、Ang II、Ang1-7、血管紧张素1型(AT1)受体和Mas受体的蛋白表达水平。结果 与假手术组和正常组比较,模型组大鼠存在明显的认知功能障碍($P < 0.01$)和心肌损伤($P < 0.0001$)。此外,模型组大鼠心肌中肾素-血管紧张素系统的ACE/Ang II/AT1轴上调($P < 0.01$),而ACE2/Ang1-7/Mas轴下调($P < 0.05$)。结论 实验性血管性痴呆大鼠心肌损伤可能与肾素-血管紧张素系统失调有关。

关键词 血管性痴呆;肾素-血管紧张素系统;心肌损伤;脑-心相互作用

中图分类号 R 542.2+3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1123-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.003

血管性痴呆(vascular dementia, VaD)是第二大痴呆类型,中国VaD的总体患病率约为0.96%^[1],随着年龄的增长而增加。考虑到中国庞大的人口基数和严峻的老龄化趋势,患有VaD并受其影响的人数将是显著的。神经系统和心血管系统之间存在复杂的相互作用,一个系统的功能障碍可能会导致另一个系统的功能变化,这被称之为脑-心相互作用。一方面,心血管疾病^[2],如心力衰竭和高血压,是VaD的危险因素。另一方面,心功能障碍也可能出现在无原发性心脏病的VaD小鼠中^[3]。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)是一个复杂的网络,在心血管和神经退行性疾病的发展

中起着至关重要的作用。考虑到RAS对多个系统和器官的影响,RAS被认为参与了脑心之间的相互作用。该研究旨在观察VaD发生后的心肌损伤及RAS的改变,增加对VaD发展过程的理解,并为VaD及其并发症的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24只8周龄SPF级雄性SD大鼠由安徽医科大学实验动物中心提供,体质量180~220g。大鼠饲养于12h光/暗循环、温度21~24℃、湿度55%~75%的环境中,并按照安徽医科大学《研究动物护理和使用指导原则》进行饲养。实验方案经安徽医科大学实验动物伦理委员会正式批准(批准号:LLSC20221234)。

1.1.2 主要试剂 大鼠血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)、血管紧张素1-7(angiotensin1-7, Ang1-7)试剂盒购于美国ELK生物技术公司;兔单克隆血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)抗体、兔多克隆抗Ang1-7/Mas受体抗体、兔抗AGTR1抗体和兔单克隆GAPDH抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组 实验前大鼠先接受为期1周的适应喂养。随后被随机均分为三组:模型组、假手术组和正常组。模型组采用改良的双侧颈总动脉结扎法(2-vessel occlusion, 2VO)来制备VaD大鼠^[4],该过程包括用10%的水合氯醛(300mg/kg)溶液腹腔麻醉大鼠,再在颈部正中切口,将右侧颈总动脉与迷走神经分离,用5-0丝线永久结扎,1周后,在左侧颈总动脉上重复进行同样的手术。除血管结扎外,假手术组仅切开颈部皮肤而不结扎血管,对照组无手术干预。术后将大鼠放置在电热毯上,直到它们恢复意识,再给予青霉素钠注射液(4×10^4 U/d),共3d,以降低感染风险。

1.2.2 Morris水迷宫实验 术后3周,对大鼠进行水迷宫测试,以评估它们的空间学习和记忆能力。圆形水迷宫池被平均分为4个象限,在第4象限放

2024-02-25 接收

基金项目:安徽省高等学校科学研究项目(编号:2022AH051160)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院康复医学科,合肥 230022

作者简介:李 键,男,博士研究生;

高晓平,男,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail:

gxp678@163.com

置1个直径为10 cm的透明平台,淹没在水面以下2 cm处。测试期共持续5 d,其中第1天为适应性训练,随后3 d为定位导航测试,第5天为空间探索测试。在适应期和定位导航试验中,每天从不同的象限开始,将大鼠头向池壁,靠近池壁放入池中。每次试验的上限为60 s,大鼠寻找平台的时间为逃逸潜伏期。在大鼠未找到平台的情况下,逃逸潜伏期被记录为60 s。每次试验结束后,无论大鼠是否找到了平台,都将被放置在平台上15 s。平均逃逸潜伏是根据在3 d内观察到的逃逸潜伏期计算得出。第5天移除平台,记录每只大鼠在90 s内穿过原始平台区域的次数。

1.2.3 组织制备 水迷宫实验结束后,腹腔注射10%水合氯醛深度麻醉大鼠。为了暴露心脏,在腹腔内做1个切口,然后进行膈肌穿刺和胸腔解剖。采用21G针头和5 ml注射器进行心脏穿刺采血。以3 000 r/min的速度离心10 min,分离血清,然后在-80 °C下保存至进一步使用。采血后,经主动脉经心脏灌注预冷的0.9%氯化钠溶液,直到所有血液全部排出。灌注后用4%多聚甲醛固定液固定分离脑和心脏,4 °C在同一溶液中固定过夜。脱水后,将固定组织用石蜡包埋,切片成6 μm厚的连续冠状切片。

1.2.4 免疫染色 HE染色评估海马CA1区的病理变化,小天狼星红染色检测心肌间质胶原蛋白分数(interstitial collagen fraction, ICF)和心肌细胞横截面积(myocyte cross-sectional area, MCSA)。每个切片分别分析了5个随机视图。在×200放大的显微镜下观察海马神经元和心肌组织的病理变化,并用数码相机捕捉。使用ImageJ软件对海马CA1区存活神经元数量、ICF和MCSA进行半定量分析。

1.2.5 酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA) 用玻璃均质器在PBS中均质,并在冰上进行超声处理。3 000 r/min离心10 min,收集上清液。随后,使用大鼠ELISA试剂盒确定血清和心脏组织中Ang II和Ang1-7的浓度。

1.2.6 Western blot 测定蛋白含量 使用PMSF裂解缓冲液从心肌组织中提取蛋白质,使用BCA试剂盒定量蛋白浓度。再加载到聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳并转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜在含有5%脱脂奶粉的封闭液中封闭1 h,加入一抗,4 °C孵育过夜;再将膜转移到含二抗的玻璃平皿中,于室温摇床上孵育2 h。洗涤后,ECL显色,化学光敏模式曝光显影,使用ImageJ软件进行定量。

1.3 统计学处理 实验所得数据使用Graph Pad Prism8软件进行统计分析。所有数据均以均值±标准误差表示,三组间的分析采用单因素方差分析,采用重复测量方差分析调查逃逸潜伏期随时间的变化。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 改良的2VO诱导大鼠认知功能障碍 在术后3周进行了Morris水迷宫测试(图1)。图1A为Morris水迷宫中定位导航实验的代表性图像。在图1B中,三组大鼠在进行自适应训练的第1天和在第2天进行定位导航测试时,它们的逃逸潜伏期差异无统计学意义。然而,在随后的第3天($q = 7.693$, $P < 0.001$)和第4天($q = 7.150$, $P < 0.001$)的定位导航测试中,模型组比正常组和假手术组表现出更长的逃避潜伏期。图1C为Morris水迷宫中空间探索实验的代表性图像。图1D显示,空间探索实验中,与其他两组比较,模型组大鼠的穿越平台总数显著减少($q = 5.735$, $P = 0.0016$)。

2.2 改良的2VO诱导大鼠海马神经元病理性改变和心肌损害 术后4周,采用HE染色法观察海马CA1区神经元形态(图2A)。HE染色显示正常组和假手术组心肌细胞结构有序、清晰,模型组的心肌细胞出现组织紊乱,核变形明显,成纤维细胞增殖明显(图2B)。通过小天狼星红染色测量MCSA和ICF来评估心肌肥大和纤维化程度(图2C)。与正常组和假手术组比较,模型组大鼠CA1区域的神经元数量显著减少($q = 7.917$, $P < 0.0001$),大鼠VaD造模成功(图2D)。与正常组和假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞大小明显增加($q = 10.820$, $P < 0.0001$,图2E),表现出明显的心肌纤维化($q = 10.570$, $P < 0.0001$,图2F),间质纤维化加重。这些发现提示改良的2VO可引起心肌细胞肥大和心肌间质纤维化。

2.3 血清和左心室心肌中Ang II和Ang1-7水平的变化 如图3A所示,与正常组和假手术组比较,模型大鼠的血清中Ang1-7的水平明显降低($q = 12.530$, $P < 0.0001$)。如图3B所示,模型组大鼠血清中Ang II水平明显高于正常组和假手术组($q = 16.210$, $P < 0.0001$)。在左心室心肌中也观察到类似的情况(图3C、D)。正常组和假手术组的Ang II水平和Ang1-7水平差异无统计学意义。

2.4 左侧心室肌ACE、ACE2、AT1、Mas表达水平的变化 与正常组和假手术组比较,模型组大鼠中

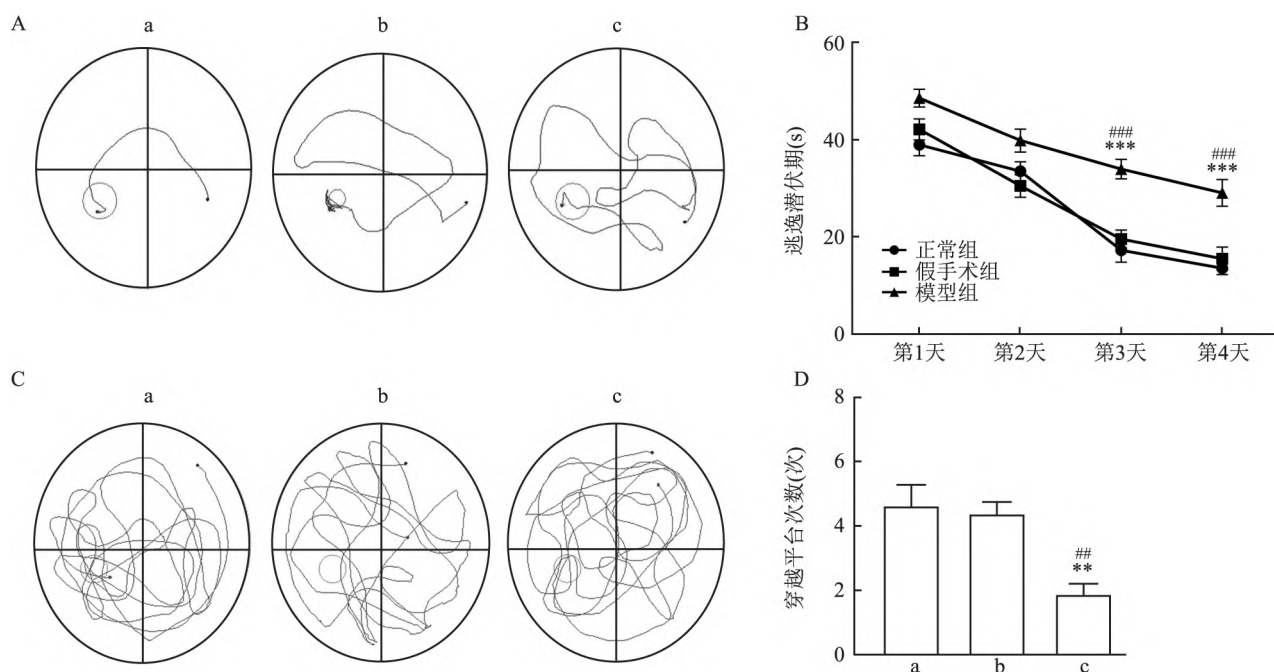


图1 改良2VO对大鼠认知功能的影响

A: Morris水迷宫中定位导航实验的代表性图像; B: 不同时间点各组大鼠的逃脱潜伏期; C: Morris水迷宫中空间探索实验的代表性图像; D: 各组大鼠穿越平台次数; a: 正常组; b: 假手术组; c: 模型组; 与模型组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与正常组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

ACE ($q = 16.320$, $P < 0.0001$) 和 AT1 ($q = 9.962$, $P = 0.0010$) 的表达水平显著升高, 而 ACE2 ($q = 7.863$, $P = 0.0035$) 和 Mas ($q = 5.900$, $P = 0.0139$) 的表达水平降低, 见图4。结合 ELISA 结果提示, 改良的2VO诱导血管性痴呆增强了RAS中ACE/Ang II/AT1轴的表达, 而下调了ACE2/Ang1-7/Mas轴的表达。

3 讨论

VaD是一种以海马神经元损伤和其他病理改变为特征的认知障碍, 常与慢性脑灌注不足有关。2VO可诱发脑灌注不足, 导致认知功能障碍和海马神经元损伤^[5]。心肌纤维化是许多心血管疾病的主要病理特征, 与心脏电功能和机械功能的改变有关^[6]。心功能障碍可导致认知功能下降和痴呆, 也可由脑卒中、创伤性脑损伤和神经退行性疾病^[7]等引起。

本研究观察到VaD大鼠心肌中ACE/Ang II/AT1受体轴的激活增强, 而ACE2/Ang1-7/Mas轴的激活下调。实验性VaD可能通过几种途径破坏RAS的平衡。一方面, RAS可能在实验性VaD后由于脑血流的变化、血压的降低或应激激素的增加而被激活^[8]。RAS的激活主要放大了经典轴, 导致血管收缩、钠潴留、氧化应激和炎症。Ang II是一种由

ACE从Ang I转化而来的肽类激素, 可引起血管收缩、血压升高、炎症、细胞生长和氧化应激^[9]。Ang II可损害内皮型一氧化氮合酶的功能。一氧化氮生成减少可导致内皮功能障碍, 这是动脉粥样硬化发展的关键早期事件^[10]。此外, Ang II可以增加多种促炎细胞因子和黏附分子的表达, 如血管细胞黏附分子-1、细胞间黏附分子-1和单核细胞趋化蛋白1^[11]。这可以增强免疫细胞的黏附和浸润, 导致血管炎症, 而阿齐沙坦, 一种Ang II受体的特异性拮抗剂, 可以显著逆转这一反应^[12]。AT1受体存在于血管、肾脏、肾上腺、心脏和大脑中。AT1受体的激活是Ang II的大多数有害影响的原因, 如血管收缩、高血压、氧化应激和炎症。ACE2/Ang1-7/Mas轴被认为具有心脏保护作用。ACE2可将Ang II转化为Ang1-7。Ang1-7有助于保护心脏、血管和肾脏免受过度活跃的肾素-血管紧张素系统和高Ang II水平造成的损伤。Ang1-7通过激活位于心脏、血管、肾脏和大脑的G蛋白偶联的Mas受体来发挥其大部分的影响。通过Ang1-7激活Mas受体可导致血管舒张、抗炎、抗细胞生长和抗氧化活性。动物研究发现^[13], Ang II诱导的小鼠高血压、心肌肥厚和纤维化被细菌来源的ACE2样酶抑制。此外, Ang1-7通过降低心脏重量和心室壁厚度, 增加舒张末期压, 显示了其对心肌肥厚的保护作用^[14]。

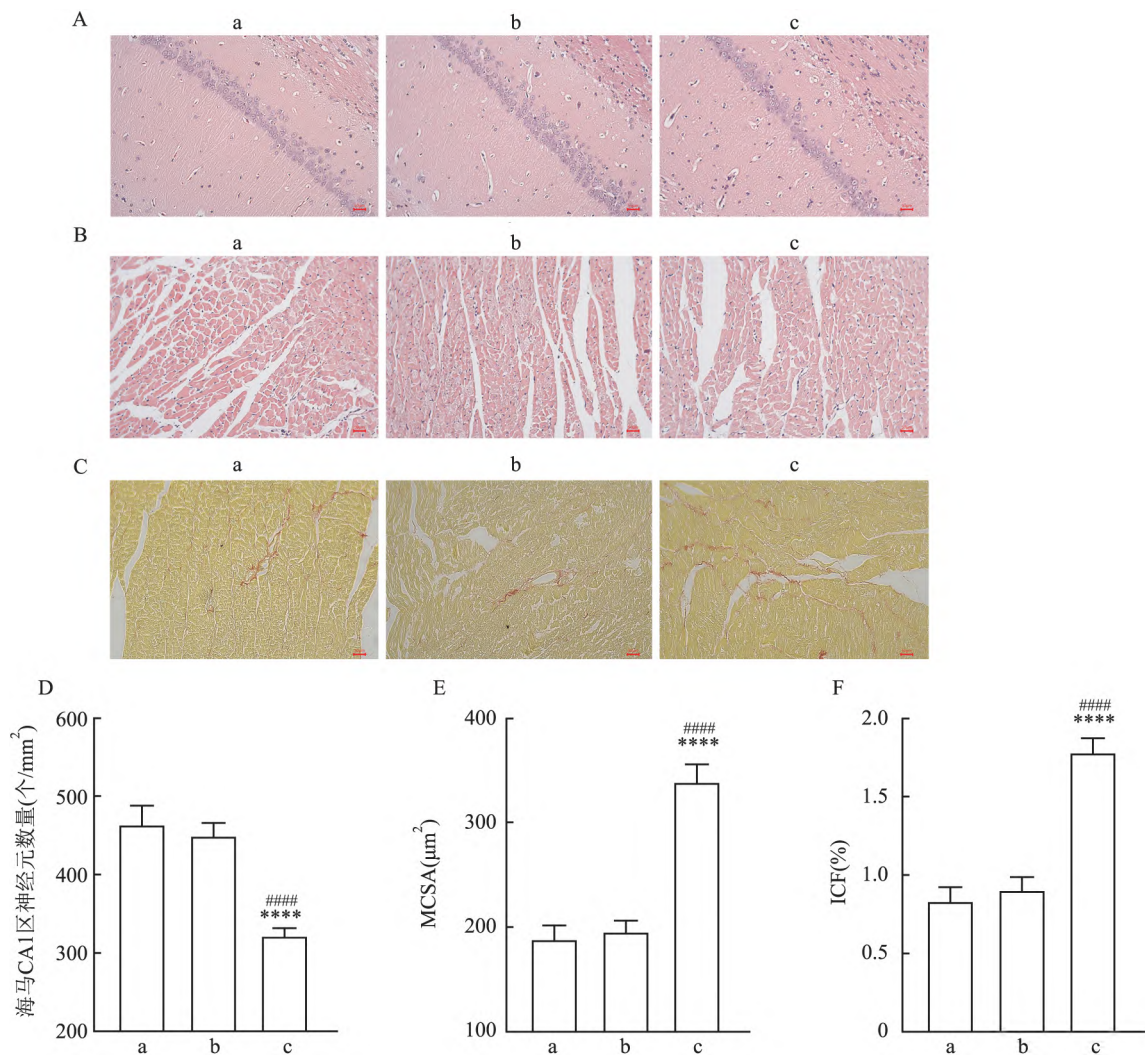


图2 改良2VO对海马和心肌病理改变的影响 ×200

A: 大鼠海马病理变化的代表性HE图像; B: 大鼠心肌病理改变的代表性HE图像; C: 心脏组织中小天狼星红染色的代表性图像; D: CA1区神经元数量的定量数据; E: MCSA的定量数据; F: ICF的定量数据; a: 正常组; b: 假手术组; c: 模型组; 与模型组比较: **** $P < 0.0001$; 与正常组比较: **** $P < 0.0001$

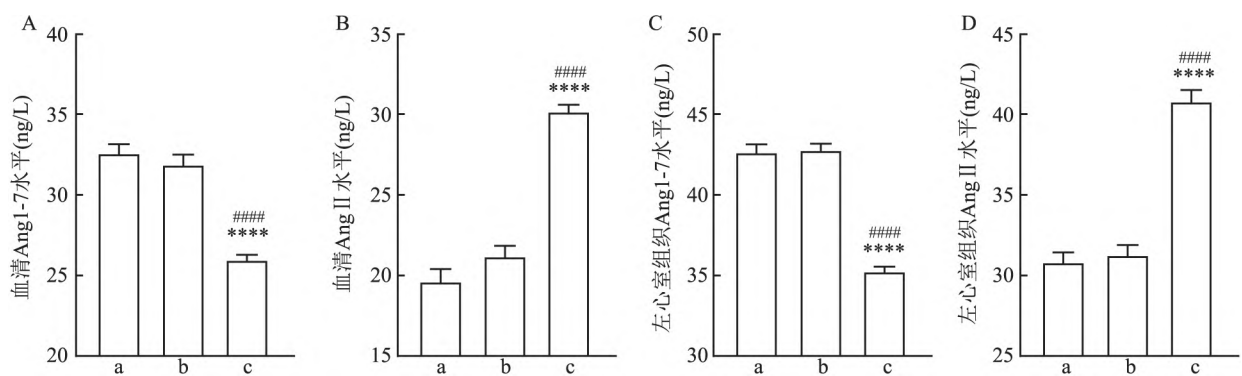


图3 改良2VO对大鼠血清和左心室心肌 Ang II 和 Ang1-7 的影响

A: 血清中 Ang1-7 水平; B: 血清中 Ang II 水平; C: 左心室心肌中 Ang1-7 水平; D: 左心室心肌中 Ang II 水平; a: 正常组; b: 假手术组; c: 模型组; 与模型组比较: **** $P < 0.0001$; 与正常组比较: **** $P < 0.0001$

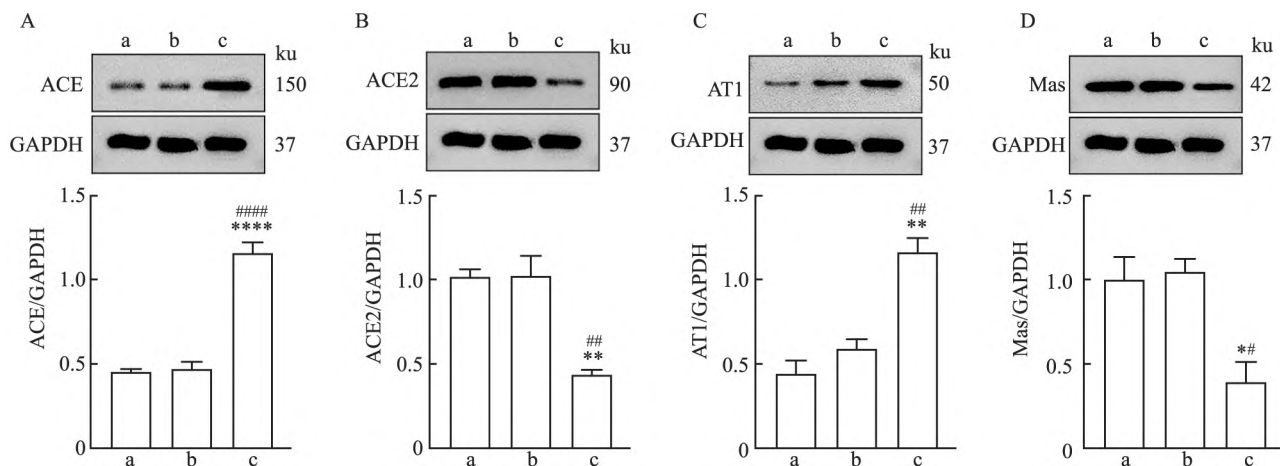


图4 改良2VO对大鼠左室心肌ACE、AT1、ACE2、Mas表达的影响

A: ACE的表达水平; B: ACE2的表达水平; C: AT1的表达水平; D: Mas的表达水平; a: 正常组; b: 假手术组; c: 模型组; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$; 与正常组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.0001$

另一方面,大脑的某些区域,如下丘脑和脑干,帮助调节RAS。实验性VaD对这些区域的损伤可能导致RAS失调。这可能进一步导致自主神经系统功能障碍,引起诸如高血压或低血压、心律失常和心力衰竭等问题。此外,除了全身性RAS外,在各种器官中也存在局部RAS,包括脑^[15]。实验性VaD可能影响局部RAS,特别是脑RAS,进而影响血流调节、细胞生长和炎症。这可能介导了Ang II的高血压和心肌肥厚效应。

本研究的结果表明,实验性VaD大鼠的经典轴过度激活而替代轴被抑制,可能介导了氧化应激和炎症,进而导致心肌纤维化和心肌细胞肥大。然而,本研究也存在一些不足之处。VaD常继发于脑卒中、高血压、糖尿病等慢性疾病,其病理机制复杂。改良2VO诱导的实验性VaD可能不能充分反映真实临床情况。此外,脑-心脏相互作用的机制中,自主神经功能障碍和RAS等各种机制之间可能存在潜在相互影响,有待进一步探索。

参考文献

- [1] Jiao C, Wei S, Liu T, et al. The prevalence of vascular dementia in China: A systematic review and meta-analysis from 2009 - 2019 [J]. Iran J Public Health 2021, 50(1): 11 - 23.
- [2] Wang Y, Li S, Zhou Q, et al. Vascular dementia has the highest hospitalisation rate in China: A nationwide hospital information system study [J]. Stroke Vasc Neurol 2023, 8(1): 59 - 68.
- [3] An L, Chopp M, Zacharek A, et al. Cardiac dysfunction in a mouse vascular dementia model of bilateral common carotid artery stenosis [J]. Front Cardiovasc Med 2021, 8: 681572.
- [4] Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, et al. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: What can be learned from experimental models [J]. J Neurol Sci 2002, 203: 263 - 6.
- [5] Qiu Y, Xue X, Jun L, Liu G, et al. Perillaldehyde improves cognitive function *in vivo* and *in vitro* by inhibiting neuronal damage via blocking TRPM2/NMDAR pathway [J]. Chin Med 2021, 16(1): 136.
- [6] Scridon A, Balan A I. Targeting myocardial fibrosis—a magic pill in cardiovascular medicine? [J]. Pharmaceutics 2022, 14(8): 1599.
- [7] Wei B, Wu S, Wang Z, et al. Comparison of cognitive performance and cardiac function between three different rat models of vascular dementia [J]. Neuropsychiatr Dis Treat 2022, 18: 19 - 28.
- [8] Li C Y, Zhang L, Li J, et al. Effect of endogenous arginine-vasopressin arising from the paraventricular nucleus on learning and memory functions in vascular dementia model rats [J]. Bio Med Res Int 2017, 2017: 1 - 7.
- [9] Silva G M, Franca-Falcao M S, Calzerra N T M, et al. Role of renin-angiotensin system components in atherosclerosis: Focus on Ang-II, ACE2, and Ang-1-7 [J]. Front Physiol 2020, 11: 1067.
- [10] Gori T. Exogenous NO therapy for the treatment and prevention of atherosclerosis [J]. Int J Mol Sci 2020, 21(8): 2703.
- [11] 赵雅洁, 季嘉玲, 文先丽, 等. N-乙酰半胱氨酸对血管紧张素II诱导的HK-2细胞炎症相关因子的抑制作用 [J]. 安徽医科大学学报 2020, 55(7): 1068 - 72.
- [12] Wei G, Zhu D, Sun Y, et al. The protective effects of azilsartan against oscillatory shear stress-induced endothelial dysfunction and inflammation are mediated by KLF6 [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(6): 1 - 8.
- [13] Minato T, Nirasawa S, Sato T, et al. B38-CAP is a bacteria-derived ACE2-like enzyme that suppresses hypertension and cardiac dysfunction [J]. Nat Commun 2020, 11(1): 1058.
- [14] Teixeira L B, Parreiras-e-Silva L T, Bruder-Nascimento T, et al. Ang-1-7 is an endogenous β -arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11903.
- [15] Vadhan J D, Speth R C. The role of the brain renin-angiotensin system (RAS) in mild traumatic brain injury (TBI) [J]. Pharmacol Ther 2021, 218: 107684.

网络出版时间: 2024-07-04 13:46:29 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20240702.1448.004>

大麻二酚抑制创伤性脑损伤大鼠睾丸凋亡相关蛋白的表达

李佳丽^{1*}, 凌腾晗^{1*}, 曹艳¹, 尹爱平¹, 李恒希¹, 杨莉², 吴海鹰², 李坪¹

摘要 目的 研究创伤性脑损伤(TBI)后大鼠睾丸的损伤情况,并分析大麻二酚(CBD)对TBI引起的睾丸损伤的干预作用。方法 将18只SD大鼠随机分为3组:假手术组(Sham组)、模型组(TBI组)和治疗组(TBI+CBD组)。采用HE染色法观察大鼠睾丸组织病理学变化,采用ELISA法检测大鼠血清中的睾酮水平。采用TUNEL染色法观察细胞

凋亡,同时采用免疫荧光染色、Western blot和RT-qPCR法检测Bax、Bcl-2、Cleaved Caspase-3和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白及mRNA表达。结果 HE结果显示,与Sham组比较,TBI组大鼠睾丸出现病理改变。ELISA检测表明,与Sham组比较,TBI组的睾酮水平下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。免疫荧光结果显示,与Sham组比较,TBI组大鼠睾丸Bax荧光表达强度升高($P < 0.01$);而CBD干预后Bax荧光强度下降且Bcl-2荧光强度升高($P < 0.01$)。Western blot结果表明,大鼠经CBD治疗后降低了睾丸凋亡相关蛋白(Bax和Cleaved Caspase-3,均 $P < 0.05$)和炎症相关蛋白(TNF- α , $P < 0.01$)的蛋白水平,升高了抗凋亡蛋白Bcl-2的蛋白水平($P < 0.05$)。RT-qPCR结果趋势近似,与TBI组比较,CBD干预后Bax($P < 0.05$)和TNF- α ($P < 0.01$)的mRNA表达下降,而Bcl-2的mRNA表达升高($P < 0.05$)。结论 TBI导致睾丸损伤,CBD能够减轻TBI大鼠睾丸组织的凋亡和炎症反应。

关键词 大麻二酚;创伤性脑损伤;凋亡;炎症;大鼠;睾丸
中图分类号 R 742

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1128-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.004

2024-02-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82060241,82260387);云南省科技厅计划项目(编号:202101AY070001-002);云南省医疗机构科研项目(编号:202403AC100010);昆明医科大学研究生创新基金(编号:2023S133)

作者单位:¹昆明医科大学人体解剖学与组织胚胎学系,昆明 650500

²昆明医科大学第一附属医院急诊科,昆明 650032

作者简介:李佳丽,女,硕士研究生;

吴海鹰,女,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: why02092022@163.com;

李坪,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: kyzp@163.com

* 对本文具有同等贡献

Role of the renin-angiotensin system in myocardial injury in rats with vascular dementia

Li Jian, Zhu Bohan, Gao Peng, Chen Ji, Chen Hemu, Gao Xiaoping

(Dept of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To observe the role of the renin-angiotensin system in myocardial injury induced by experimental vascular dementia. **Methods** Eighteen adult male rats were categorized into a normal group, sham group, and modified 2-vessel occlusion group (model). To assess the myocardial injury caused by experimental vascular dementia, immunostaining was conducted to evaluate the interstitial collagen fraction and myocyte cross-sectional area. The concentrations of angiotensin II (Ang II) and angiotensin 1-7 (Ang1-7) in the serum, as well as the expression levels of angiotensin converting enzyme (ACE), angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), Ang II, Ang1-7, angiotensin type 1 (AT1) receptor, and Mas receptor in the myocardium, were assessed. **Results** Modified 2-vessel occlusion led to pronounced cognitive dysfunction ($P < 0.01$) and myocardial injury ($P < 0.0001$) when compared to the sham and normal groups. Additionally, modified 2-vessel occlusion induced significant upregulation of the ACE/Ang II/AT1 receptor axis ($P < 0.01$) and downregulation of the ACE2/Ang1-7/Mas axis ($P < 0.05$) of the renin-angiotensin system in the myocardium. **Conclusion** Myocardial injury in rats with experimental vascular dementia may be related to dysregulation of the renin-angiotensin system.

Key words vascular dementia; renin-angiotensin system; myocardial injury; brain-heart interaction