

文章编号 1006-8147(2016)01-0009-04

论著

## 去肾交感神经术对梗犬下丘脑 Ang(1-7) 及酪氨酸羟化酶的影响

马艺杰<sup>1</sup>, 李超<sup>2</sup>, 卢成志<sup>2</sup>

(1.天津医科大学第一临床学院心内科, 天津 300070; 2.天津市第一中心医院心内科, 天津 300192)

**摘要** 目的:研究去肾交感神经术(RDN)对心肌梗死(MI)犬下丘脑血管紧张素(1-7)[Ang(1-7)]及酪氨酸羟化酶(TH)的影响。方法:健康杂种犬随机分为对照组、模型组、去肾交感神经术治疗组(RDN组),每组6只。对模型组、RDN组行前降支明胶海绵栓塞构建MI模型,对照组只行冠脉造影检查。建模后1周,RDN组行去肾交感神经术,余两组只行肾动脉造影检查。建模后4周行超声心动图检查,分别检测下丘脑 Ang(1-7)含量,TH蛋白表达及 ACE2、MasR mRNA 表达。结果:模型组心功能降低,下丘脑 Ang(1-7)含量、TH蛋白表达水平升高,ACE2、MasR mRNA 表达增加;行 RDN 后,心功能较前改善,下丘脑 TH 蛋白表达水平明显降低,Ang(1-7)水平进一步升高,ACE2、MasR mRNA 表达进一步增加,差异均具有显著统计学意义( $P<0.01$ )。结论:去肾交感神经术可以增加 MI 犬下丘脑 ACE2 表达,促进 Ang(1-7)生成,降低肾上腺素能神经元活性,改善 MI 后心功能。

**关键词** 去肾交感神经术;心肌梗死;下丘脑;血管紧张素(1-7);酪氨酸羟化酶;犬

中图分类号 R542.2+2

文献标志码 A

### Effect of renal denervation on hypothalamus angiotensin (1-7) and tyrosine hydroxylase in myocardial infarction dogs

MA Yi-jie<sup>1</sup>, LI Chao<sup>2</sup>, LU Cheng-zhi<sup>2</sup>

(1.Department of Cardiology, The First Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2.Department of Cardiology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

**Abstract Objective:** To explore the effect of renal denervation (RDN) on hypothalamus angiotensin (1-7) [Ang(1-7)] and tyrosine hydroxylase (TH) in myocardial infarction (MI) dogs. **Methods:** Eighteen healthy mongrel dogs were randomly divided into control group, model group and RDN group. Myocardial infarction model was made in model group and RDN group by gelatin sponge embolization of the left anterior descending artery. One week after MI, RDN was given to dogs in RDN group. Echocardiography examination was administered four weeks after MI. Levels of hypothalamus angiotensin (1-7), expression of TH protein, expression of ACE2 and MasR mRNA in each group were detected respectively. **Results:** Compared with control group, heart function was reduced in model group, levels of hypothalamus Ang (1-7), TH protein, ACE2 and MasR mRNA were higher in model group and RDN group ( $P<0.01$ ). Heart function was improved in RDN group; relatively expression of TH protein was decreased ( $P<0.01$ ); levels of Ang (1-7) and expression of ACE2, MasR mRNA were remarkably increased in hypothalamus in RDN group, as compared to the model group ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** RDN is able to increase the levels of hypothalamus ACE2 and Ang(1-7), inhibit the activity of adrenergic neuron, and improve heart function in MI canine model.

**Key words** renal denervation; myocardial infarction; hypothalamus; angiotensin (1-7); tyrosine hydroxylase; dog

心肌梗死(myocardial infarction, MI)时,尽管规律服用肾素-血管紧张素系统、交感神经系统拮抗剂等药物治疗,左室重构、心衰的发生率仍居高不下<sup>[1]</sup>。研究发现,肾素-血管紧张素系统除了经典的血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)/血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)/AT1受体轴外,亦存在血管紧张素转换酶 2(ACE2)/血管紧

张素(1-7)[Ang(1-7)]/Mas受体轴,两者共同参与心血管疾病的发生发展<sup>[2]</sup>。Ang(1-7)作为 Ang II 的生理性拮抗剂<sup>[3-4]</sup>,主要由 ACE2 降解 Ang II 生成<sup>[5]</sup>。下丘脑作为重要的心血管中枢,在整合交感活动及神经体液信号中起关键作用<sup>[6]</sup>。Xiao 等<sup>[7]</sup>在 MI 致心衰大鼠中发现,下丘脑内 ACE2 过表达可以降低外周交感神经活性,改善心衰。笔者推测是否有药物以外的其他治疗手段通过影响中枢 ACE2/Ang(1-7)的表达,抑制交感神经元活性,用于 MI 的治疗。去肾交感神经术(renal denervation, RDN)通过阻断肾交感神经用于顽固性高血压、MI 后心衰、心室肥厚、

基金项目 天津市卫生局科技基金资助项目(2014KY11);天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCYBJC26100)

作者简介 马艺杰(1990-),女,硕士在读,研究方向:高血压、冠心病;  
通信作者:卢成志, E-mail: lucz8@126.com。

恶性心律失常等高交感神经活性疾病的治疗<sup>[8-9]</sup>。但是 RDN 是否可以通过影响下丘脑 ACE2/ Ang(1-7)的表达进而影响中枢神经元活性治疗 MI,目前尚少有报道。本实验在犬 MI 模型中,观察 RDN 对下丘脑 Ang(1-7)及酪氨酸羟化酶(TH)的影响,旨在进一步探讨 RDN 治疗 MI 的可能中枢机制。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物分组及处理** 18 只成年杂种犬,体质量 14~17 kg。随机分为 3 组:对照组 6 只,只行冠脉造影,1 周后行肾动脉造影检查;模型组 6 只,MI 模型建立后 1 周只行肾动脉造影;RDN 组 6 只,MI 模型建立后 1 周行 RDN。

**1.2 MI 模型建立、去肾交感神经术** 用 6%戊巴比妥钠 30 mg/kg 将犬全麻固定后,气管插管机械通气,股动脉穿刺置入 6F 鞘管,行左冠状动脉造影,于前降支第一对角支远端经微导管注射自制直径约 1 mm 的明胶海绵颗粒。于栓塞后 10 min 再次行冠脉造影,以靶血管呈“残根样”改变,确认血流阻断,作为判断构建心梗模型成功的标准。犬背部粘贴消融电极板,连接 IBI-1500T 射频消融仪(the United States IBI company),设定温度 43 °C,消融功率 10 W,消融时间 90 s。行股动脉穿刺送入 6F JR4.0 造影导管行双侧肾动脉造影定位后用冷盐水消融导管(6F, Synaptic Medical, China)由远及近沿肾动脉壁行环形 4 点消融,术后再对肾动脉进行造影检查。

**1.3 超声检测** MI 后 4 周用 CS50 便携式彩超(荷兰 Philips 公司)行超声心动图检查:左室舒张末期容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左室收缩末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。所有参数取 3 个连续心动周期的均值。

**1.4 下丘脑 Ang(1-7)、TH 蛋白的检测** MI 后 4 周处死各组犬开颅器开颅取脑,于灰结节和视交叉之间留取下丘脑。下丘脑组织匀浆离心后取上清,ELISA 检测 Ang(1-7)含量(试剂盒购自上海博谷生物科技有限公司):酶标仪 450 nm 波长测量各孔的吸光度,计算样品 Ang(1-7)的含量。Western blot 检测 TH 蛋白表达(TH 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司):采用 Image J 软件分析条带吸光度值,并得出半定量指标。

**1.5 下丘脑 ACE2、MasR mRNA 的检测** MI 后 4 周处死各组犬取材下丘脑,采用 Real-time PCR 法。各基因 PCR 扩增的引物序列见表 1。PCR 产物于 2%

琼脂糖凝胶电泳后经凝胶成像系统对 ACE2、MasR mRNA 进行分析。

表 1 ACE2、MasR 及内参引物序列

Tab 1 Primer sequences of ACE2, MasR and actin

mRNA	上游序列	下游序列
ACE2	5'-TTCAGCACAGTGGATCATCA-3'	5'-CAAGTAATAAGCACTCCTGA-3'
MasR	5'-TGAGCAACAAGCTGAAGTCC-3'	5'-AGGCACCTCCAGTCACACAA-3'
actin	5'-TGGAGTCTACTGGCTCTT-3'	5'-TGTCATATTCTCTGCTGTCA-3'

**1.6 统计学分析** 应用 SPSS20.0 统计软件进行分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较用 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组犬存活情况** 模型组及 RDN 组分别于第 1 天、第 3 天死亡 1 只,对照组无死亡。

**2.2 各组犬超声心动图检测结果** 与对照组比较,模型组犬 LVEF 明显降低 ( $P < 0.01$ ),LVEDV 和 LVESV 明显增加 ( $P < 0.01$ );RDN 组与模型组比较,LVEF 有所改善 ( $P = 0.028$ ),LVEDV 和 LVESV 明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 各组犬心动图检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Echocardiographic data of dogs( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	LVEDV/mL	LVESV/mL	LVEF/%
对照组	6	30.75 ± 1.80	13.72 ± 1.16	55.37 ± 2.98
模型组	5	41.24 ± 2.56 <sup>a</sup>	25.92 ± 1.38 <sup>a</sup>	37.04 ± 3.05 <sup>a</sup>
RDN 组	5	36.96 ± 3.52 <sup>ab</sup>	21.51 ± 1.85 <sup>ab</sup>	41.72 ± 2.91 <sup>ab</sup>

与对照组相比 <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比 <sup>b</sup> $P < 0.01$

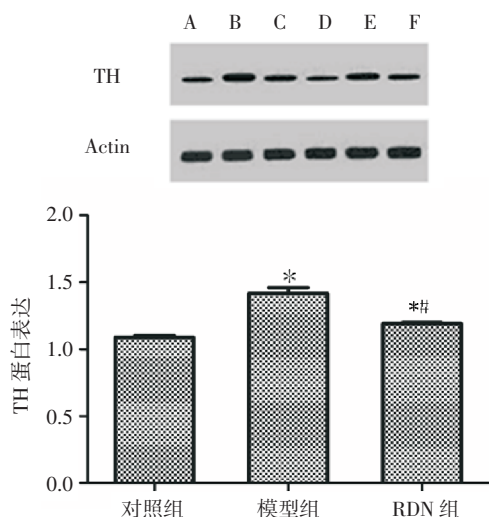
**2.3 各组犬下丘脑 Ang(1-7)含量及 TH 蛋白表达** MI 后 4 周,与对照组比较,模型组犬下丘脑 Ang(1-7)含量及 TH 蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ );RDN 组与模型组比较,Ang(1-7)含量进一步增加,TH 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3、图 1。

表 3 各组犬下丘脑 Ang(1-7)含量及 TH 蛋白的相对表达

Tab 3 The level of Ang(1-7) and relative expression of TH protein in the hypothalamus of each group

组别	例数	Ang(1-7)/(ng/mL)	TH
对照组	6	22.63 ± 1.18	1.09 ± 0.02
模型组	5	27.76 ± 1.64 <sup>a</sup>	1.42 ± 0.10 <sup>a</sup>
RDN 组	5	42.11 ± 1.57 <sup>ab</sup>	1.19 ± 0.02 <sup>ab</sup>

与对照组相比 <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比 <sup>b</sup> $P < 0.01$



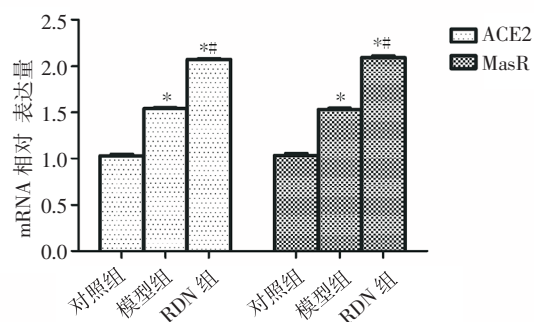
A、D:对照组;B、E:模型组;C、F:RDN 组

与对照组相比 \* $P < 0.01$ ;与模型组相比 # $P < 0.01$

图1 各组犬下丘脑 TH 蛋白表达

Fig 1 The expression of TH protein in the hypothalamus of each group

2.4 各组犬下丘脑 ACE2、MasR mRNA 表达 MI 后 4 周,模型组犬下丘脑 ACE2、MasR mRNA 表达增加 (分别为  $1.42 \pm 0.13$  比  $1.04 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ ;  $1.33 \pm 0.03$  比  $1.04 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ ); RDN 组与模型组比较,ACE2、MasR 基因表达进一步增加 (分别为  $2.07 \pm 0.02$  比  $1.42 \pm 0.13$ ,  $P < 0.01$ ;  $2.09 \pm 0.04$  比  $1.33 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2。



与对照组相比 \* $P < 0.01$ ;与模型组相比 # $P < 0.01$

图2 各组犬下丘脑 ACE2、MasR mRNA 表达

Fig 2 The expression of ACE2, MasR mRNA in the hypothalamus of dogs

### 3 讨论

ACE2 是肾素-血管紧张素系统的负向调节酶,也是体内 Ang II 降解的主要途径,其产物 Ang(1-7)通过作用于 G 蛋白偶联 Mas 受体产生扩血管、降压、抑制心肌重构等与 Ang II 相反的作用<sup>[4-5]</sup>。在 MI 患者及心衰大鼠中发现血清、心肌 ACE2 基因及蛋白表达增加<sup>[10-11]</sup>,外源性予以 Ang(1-7)或 ACE2 过表达可以抑制心肌纤维化、抑制心脏重构<sup>[4,12]</sup>、改善心功能。Xiao 等<sup>[7]</sup>在 MI 致心衰大鼠脑内发现,ACE2

过表达可以抑制交感神经流出,降低尿去甲肾上腺素排泄,改善心功能,予以 Mas 受体阻断剂可以部分消除上述作用。尽管动物及临床试验证实 ACE2/Ang(1-7)可以降低交感神经活性,发挥心梗、心衰保护作用,但关于心梗后中枢 ACE2/Ang(1-7)表达变化的研究甚少。本实验在 MI 犬模型中发现,模型组下丘脑 Ang(1-7)含量、ACE2 及 MasR mRNA 表达增加,表明 MI 犬下丘脑内存在 ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴的激活。RDN 后下丘脑 Ang(1-7)含量、ACE2 及 MasR mRNA 表达进一步增加,心功能较前改善,表明 RDN 可以通过进一步促进 MI 犬下丘脑内 ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴的表达,改善 MI 后心功能。

脑内多种神经递质相互作用共同调节交感神经活性。酪氨酸羟化酶(TH)是催化去甲肾上腺素(NE)合成的限速酶,是肾上腺素能神经元活性的标志物<sup>[13]</sup>。本实验结果显示,模型组下丘脑内 TH 蛋白表达增加,说明 MI 后下丘脑内肾上腺素能神经元活性增加;行 RDN 后,TH 蛋白表达显著减少,说明 RDN 能降低心梗后下丘脑内增加的肾上腺素能神经元活性。Yu 等<sup>[14]</sup>发现,中枢应用 Ang II 可以增加下丘脑 NE 释放,增加下丘脑及脑干 TH mRNA 表达;而中枢 Ang(1-7)可以通过抑制 TH 磷酸化,或通过促进泛素、蛋白酶体结合至 TH 增加 TH 分解降低大鼠下丘脑及脑干 TH 的活性及表达<sup>[15]</sup>。研究证实,中枢 Ang(1-7)除通过抑制 TH 活性及表达进而抑制 NE 合成外,尚可以通过抑制 NE 的释放及重吸收降低中枢 NE 浓度<sup>[16]</sup>,进而参与交感神经活性的负性调节。实验在 MI 犬模型中初次发现,MI 犬下丘脑内存在 ACE2/Ang(1-7)/MasR 轴的激活及肾上腺素能神经元活性的增加。考虑 MI 后,机体通过代偿机制上调 ACE2 的表达,降解下丘脑中过度增加的 Ang II 并且催化 Ang(1-7)的生成,降低增加的肾上腺素能神经元活性;RDN 可以通过进一步促进 MI 犬下丘脑 ACE2 的表达及 Ang(1-7)的生成,降低下丘脑肾上腺素能神经元活性,改善 MI 后心功能。

综上所述,去肾交感神经术可以增加 MI 犬下丘脑 ACE2 表达,促进 Ang(1-7)生成,抑制 MI 犬下丘脑肾上腺素能神经元活性,改善犬 MI 后心功能。

### 参考文献:

- [1] Pfeffer M A, McMurray J, Velazquez E J. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both[J]. N Engl J Med, 2004,13 (2):31
- [2] Zucker I H, Xiao L, Haack K K. The central renin-angiotensin system and sympathetic nerve activity in chronic heart failure[J]. Clin Sci, 2014, 126(10): 695

- [3] Mendoza-Torres E, Oyarzún A, Mondaca-Ruff D, et al. ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension[J]. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2015, 9(4): 217
- [4] Hao P P, Yang J M, Zhang M X, et al. Angiotensin-(1-7) treatment mitigates right ventricular fibrosis as a distinctive feature of diabetic cardiomyopathy[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(9): H1007
- [5] Garabelli P J, Modrall J G, Penninger J M, et al. Distinct roles for angiotensin-converting enzyme 2 and carboxypeptidase A in the processing of angiotensins within the murine heart[J]. *Exp Physiol*, 2008, 93(5): 613
- [6] Ranson R N, Motawei K, Pyner S, et al. The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion[J]. *Exp Brain Res*, 1998, 120(2): 164
- [7] Xiao L, Gao L, Lazartigues E, et al. Brain-selective overexpression of angiotensin-converting enzyme2 attenuates sympathetic nerve activity and enhances baroreflex function in chronic heart failure[J]. *Hypertension*, 2011, 58(6): 1057
- [8] Schirmer S H, Sayed M M, Reil J C, et al. Improvements in left ventricular hypertrophy and diastolic function following renal denervation: effects beyond blood pressure and heart rate reduction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(18): 1916
- [9] Armaganijan L V, Staico R, Moreira D A, et al. 6-Month outcomes in patients with implantable Cardioverter-Defibrillators undergoing renal sympathetic denervation for the treatment of refractory ventricular arrhythmias[J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2015, 8(7):984
- [10] Liang B, Li Y, Han Z, et al. ACE2-Ang (1-7) axis is induced in pressure overloaded rat model[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 1443
- [11] Wang J, Li N, Gao F, et al. Balance between angiotensin converting enzyme and angiotensin converting enzyme 2 in patients with chronic heart failure[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2015, 16(3): 553
- [12] Burchill L J, Velkoska E, Dean R G, et al. Combination renin-angiotensin system blockade and angiotensin-converting enzyme 2 in experimental myocardial infarction: implications for future therapeutic directions[J]. *Clin Sci*, 2012, 123(11): 649
- [13] Burgi K, Cavalleri M T, Alves A S, et al. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 300(2): R264
- [14] Yu K, Lu D, Rowland N E, et al. Angiotensin II regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the neuronal cultures of normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. *Endocrinology*, 1996, 137(8): 3566
- [15] Lopez Verrilli M A, Pirola C J, Pascual M M, et al. Angiotensin-(1-7) through AT receptors mediates tyrosine hydroxylase degradation via the ubiquitin-proteasome pathway[J]. *J Neurochem*, 2009, 109(2):326
- [16] Lopez Verrilli M A, Rodriguez Fermepeín M, Longo Carbajosa N, et al. Angiotensin-(1-7) through Mas receptor up-regulates neuronal norepinephrine transporter via Akt and Erk 1/2-dependent pathways [J]. *J Neurochem*, 2012, 120(1): 46

(2015-09-15 收稿)

## 医学论文中被误用为单位符号的“ppm、ppb、ppt”英文缩写的换算

在医学论文中,“ppm、ppb、ppt”这类英文缩写常常被作者作为单位符号使用,而“ppm、ppb、ppt”不是量纲一的量的单位的专门名称,也不是数学符号,更不是单位符号,只是表示数量份额的英文名词缩写(英文全称分别为 parts per million、parts per billion、parts per trillion)。在实际研究中,仪器测量的数值可能会以“ppm、ppb、ppt”形式给出结果,作者在撰写文章进行数据描述时则需对“ppm、ppb、ppt”进行换算。

对溶液而言,换算前需了解体积比还是质量比。 $1\mu\text{g/mL}$ 是质量-体积比,如果溶液的密度是 $1\text{g/mL}$ ,则 $1\mu\text{g/mL}$ 相当于 $1\text{ppm}$ ;如果溶液密度不是 $1\text{g/mL}$ ,则需要进行换算。

对大气中的污染物而言,常用体积浓度和质量-体积浓度来表示其在大气中的含量。体积浓度是用每立方米大气中含有污染物的体积数来表示(如 $\text{cm}^3/\text{m}^3$ 、 $\text{mL}/\text{m}^3$ ),换算关系是: $1\text{ppm}=1\text{cm}^3/\text{m}^3=10^{-6}$ , $1\text{ppb}=10^{-9}$ , $1\text{ppt}=10^{-12}$ ;质量-体积浓度是用每立方米大气中污染物的质量数来表示(如 $\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $\text{g}/\text{m}^3$ ),换算关系是: $C=22.4X/M$ ,式中: $X$ 为污染物以 $\text{mg}/\text{m}^3$ 表示的浓度值; $C$ 为污染物以 $\text{ppm}$ 表示的浓度值; $M$ 为污染物的分子质量。

在土壤、动植物、固体废弃物中“ppm、ppb、ppt”与质量含量的换算关系为: $1\text{ppm}=1\text{mg}/\text{kg}=1000\mu\text{g}/\text{kg}$ ; $1\text{ppb}=1\mu\text{g}/\text{kg}=10^{-3}\text{mg}/\text{kg}$ ; $1\text{ppt}=1\text{ng}/\text{kg}=10^{-6}\text{mg}/\text{kg}$ 。

本刊编辑部