

血管紧张素转化酶抑制肽 LAP 改善血压及心室重构的研究

黄俊玲 罗明 谢南姿 沈艺 罗帮镇 王海峰 刘阳

【摘要】 目的:探讨血管紧张素转化酶抑制肽 LAP 的长期降压效果及对心室重构的干预作用。 方法:选取 10 周龄雄性自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 为动物模型,随机分为空白对照组、依那普利组 (Ena 组) 和 LAP 组。干预时间为 8 周,干预期间监测 SHR 的血压变化,干预结束后对 SHR 的心脏形态、心脏功能、心肌肥厚程度及心肌纤维化指标进行检测。 结果:(1) 干预 2 周后 LAP 组血压明显低于空白对照组 ($P < 0.05$), 降压效果持续至干预结束; LAP 组与 Ena 组比较血压无显著性差异。(2) 干预 8 周后,与空白对照组相比, LAP 组及 Ena 组室间隔厚度 (IVST)、左室舒张末期内径 (LVDd)、左室收缩末期内径 (LVSD)、左室后壁收缩末期厚度 (LVPWTs)、左室后壁舒张末期厚度 (LVPWTD) 明显下降 ($P < 0.05$), 左室短轴缩短率 (FS)、射血分数 (EF)、心输出量 (CO) 明显升高 ($P < 0.05$); 心室肌肥厚指数 (VMI) 明显下降 ($P < 0.05$); 而 LAP 组与 Ena 组比较, 上述各指标无显著性差异。(3) 干预 8 周后, HE 染色下, 空白对照组心肌纤维结构明显紊乱, LAP 组及 Ena 组较空白对照组心肌纤维明显纤细, 纤维结构略有紊乱; Masson 染色下, 与空白对照组相比, LAP 组及 Ena 组心肌胶原容积分数 (CVF) 和血管周围胶原面积 (PVCA) 明显下降 ($P < 0.05$), LAP 组及 Ena 组间比较无显著性差异。 结论: LAP 对 SHR 可长期有效降压, 能改善 SHR 的心脏功能, 逆转左心室重构。

【关键词】 血管紧张素转化酶抑制肽; 高血压; 心室重构

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2016.05.011

The effects of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide LAP to blood pressure and ventricular remodeling HUANG Junling, LUO Ming, XIE Nanzi, SHEN Yi, LUO Bangzhen, WANG Haifeng, LIU Yang. Department of Geriatrics, Tongji Hospital affiliated to Tongji University, Shanghai 200065, China

【Abstract】 Objective: To study the protective effects of angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptide LAP on blood pressure and ventricular remodeling. **Methods:** Ten-week-old male spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided into three groups: blank control group, enalapril (Ena) group and ACE-inhibitory peptide LAP-treated (LAP) group. Each group was treated for 8 weeks. The alterations of blood pressure (BP), cardiac morphology, cardiac function, cardiac hypertrophy and morphological changes of myocardial fibers were investigated. **Results:** (1) After 2 weeks intervention, the BP of LAP group was significantly lower than blank control group ($P < 0.05$), the effect lasted till the end of the study, the difference between LAP group and Ena group was not significant. (2) After 8 weeks intervention, as compared with blank control group, the IVST, LVDd,

基金项目:上海市自然科学基金(10ZR1433200);同济大学附属同济医院院级课题(TJ1505)

作者单位:200065 上海,同济大学附属同济医院老年科

通信作者:罗明, Email: Lmfc84@126.com

LVSd, LVPWTs, LVPWTd and VMI of LAP group and Ena group were significantly lower ($P < 0.05$), while FS, EF and CO were significantly higher ($P < 0.05$). But there was no significant differences between LAP group and Ena group. (3) After 8 weeks intervention, by HE staining, the structures of myocardial fibers in blank control group were obviously disordered. In LAP group and Ena group, myocardial fibers were significantly thinner than those in blank control group and their structures were slightly disordered. By Masson staining, the CVF and PVCA in LAP group and Ena group were significantly lower than those in blank control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between two groups. **Conclusion:** LAP has a long-term beneficial effect on BP of SHR. It can improve the SHR's heart function and reverse left ventricular remodeling.

【Key words】 Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide; Hypertension; Ventricular remodeling

左心室肥厚是高血压的重要病理变化,其进程中伴随着心室重构^[1]。心肌纤维化以心肌胶原浓度增加或心肌胶原容积分数(CVF)增高为特征,是心力衰竭的重要机制之一,使高血压患者发生心血管事件的危险性明显增加^[2-3]。对心肌纤维化进行干预,能有效抑制心室重构,延缓心力衰竭的发生和发展。肾素-血管紧张素系统(RAS)是引起心室重构的重要因素^[4],血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)可有效降压,并可抑制和逆转心室重构^[5],但同时具有较多不良反应。天然来源的血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽能有效抑制 ACE 的作用,达到降压目的,且具有安全性高、不良反应小等特点。本研究以自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)为动物模型,通过腹腔注射合成的 ACE 抑制肽 LAP,观察其长期降压效果,并探讨其对心室重构的干预作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10 周龄 SHR 30 只,清洁级,雄性,体重 250~300 g,合格证号:SCXK(沪 2007-0005),购自上海斯莱克试验动物有限责任公司。

1.2 实验分组及干预方法

SHR 随机分为 3 组,每组 10 只,每天同一时间腹腔注射药物。空白对照组:不给药;依那普利组(Ena 组):注射依那普利 1 mg/kg·d⁻¹(依那普利溶于 0.5 mL 生理盐水中);LAP 组:注射 LAP 50 μg/d (LAP 由上海强耀生物科技有限公司合成,取 LAP 500 μg,溶于 2.5 mL 生理盐水,加 2.5 mL 弗氏不完全佐剂,充分乳化,每只注射 0.5 mL)。干预时间共 8 周。

1.3 血压检测

用大鼠血压测定仪测量实验前及实验期间的大鼠血压,实验期间每周测量 1 次,每次每只测量 3 次,收缩压及舒张压各取 3 次的平均值。

1.4 超声心动图检测

干预结束后,动物超声心动图检测大鼠的心脏形态和功能。用氯胺酮 1 mL/kg 腹腔注射麻醉,大鼠左胸前剃毛,用频率 17.5 Hz 探头置于大鼠胸骨左侧,与胸骨中线成角 10°~30°,显示胸骨旁左侧短轴左室乳头肌水平切面,由二维图像引导取 M 型曲线进行测量。测量指标包括室间隔厚度(IVST)、左室舒张末期内径(LVDd)、左室收缩末期内径(LVSd)、左室后壁收缩末期厚度(LVPWTs)、左室后壁舒张末期厚度(LVPWTd)。超声仪自动计算出左室短轴缩短率(FS)、射血分数(EF)、心输出量(CO)。各指标均测量连续 3 个心动周期,取平均值。

1.5 心室肥厚程度检测

心室肌肥厚指数(VMI)是反映心室肥厚程度的指标,为心室质量(VW)与体质量(BW)的比值。用电子天平称取大鼠 BW,3%戊巴比妥钠 1 mL/kg 腹腔注射麻醉,迅速解剖取心脏,去除心房、大血管和心包组织,生理盐水冲洗,清洁滤纸吸干水分,用电子天平称取 VW,计算 VW 与 BW 的比值。

1.6 心肌纤维化指标定性和定量分析

心室组织于 4%多聚甲醛固定 2 d,经包埋、脱水、切片,制成 3 μm 厚标本。用计算机辅助图像分析系统,HE 染色后观察心室肌的基本病理变化。Masson 染色后,测定 CVF 和血管周围胶原面积(PVCA)。切片上随机取 8 个视野,通过灰度调节

区别胶原和非胶原成分,CVF 为胶原面积与心肌面积的比值,取平均值,其中胶原面积不包括血管周围胶原面积。切片上随机取 4 支呈横切面的小动脉,测量动脉周围胶原面积与血管腔面积,计算比值,取其平均值作为 PVCA。

1.7 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析,进行正态性检验后,组间计量资料比较采用方差分析,率的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 血压变化情况

3 组 SHR 10 周龄时收缩压及舒张压无显著性

差异;用药 2 周后,LAP 组及 Ena 组收缩压及舒张压均明显低于空白对照组 ($P < 0.05$),Ena 组降压作用略强于 LAP 组,但两组间比较无显著性差异。与空白对照组相比,LAP 组及 Ena 组降压作用持续至实验结束 ($P < 0.05$)。SHR 18 周龄时,Ena 组降压作用仍略强于 LAP 组,但两组间收缩压及舒张压比较仍无显著性差异。见表 1。

2.2 超声心动图指标

经过 8 周的干预,超声心动图检查结果显示,与空白对照组相比,LAP 组及 Ena 组 IVST、LVDd、LVSd、LVPWTs、LVPWtd 均明显下降 ($P < 0.05$),FS、EF、CO 明显升高 ($P < 0.05$);而 LAP 组与 Ena 组比较,上述指标无显著性差异,见表 2。

表 1 各组大鼠尾动脉收缩压及舒张压/mmHg

| | 周龄 | 空白对照组 | Ena 组 | LAP 组 |
|-----|----|---------|-------------------------|------------------------|
| 收缩压 | 10 | 185 ± 5 | 181 ± 4 | 184 ± 3 |
| | 12 | 192 ± 5 | 180 ± 3 ⁽¹⁾ | 182 ± 4 ⁽¹⁾ |
| | 14 | 198 ± 8 | 173 ± 6 ⁽¹⁾ | 178 ± 7 ⁽¹⁾ |
| | 16 | 198 ± 9 | 166 ± 3 ⁽¹⁾ | 174 ± 8 ⁽¹⁾ |
| | 18 | 201 ± 8 | 162 ± 11 ⁽¹⁾ | 169 ± 5 ⁽¹⁾ |
| 舒张压 | 10 | 142 ± 7 | 144 ± 3 | 144 ± 3 |
| | 12 | 144 ± 5 | 138 ± 6 ⁽¹⁾ | 139 ± 4 ⁽¹⁾ |
| | 14 | 151 ± 5 | 130 ± 3 ⁽¹⁾ | 138 ± 6 ⁽¹⁾ |
| | 16 | 152 ± 4 | 128 ± 4 ⁽¹⁾ | 136 ± 3 ⁽¹⁾ |
| | 18 | 152 ± 5 | 128 ± 9 ⁽¹⁾ | 136 ± 3 ⁽¹⁾ |

注:与空白对照组相比,⁽¹⁾ $P < 0.05$

表 2 各组超声心动图指标比较

| | 空白对照组 | Ena 组 | LAP 组 |
|--------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|
| IVST/mm | 2.85 ± 0.24 | 2.31 ± 0.11 ⁽¹⁾ | 2.33 ± 0.12 ⁽¹⁾ |
| LVDd/mm | 5.79 ± 0.32 | 4.63 ± 0.53 ⁽¹⁾ | 4.72 ± 0.63 ⁽¹⁾ |
| LVSd/mm | 3.22 ± 0.56 | 1.60 ± 0.51 ⁽¹⁾ | 2.00 ± 0.54 ⁽¹⁾ |
| LVPWTs/mm | 4.61 ± 0.37 | 3.78 ± 0.40 ⁽¹⁾ | 4.01 ± 0.51 ⁽¹⁾ |
| LVPWtd/mm | 3.14 ± 0.63 | 2.15 ± 0.34 ⁽¹⁾ | 2.23 ± 0.28 ⁽¹⁾ |
| FS/% | 49.70 ± 10.14 | 65.55 ± 5.24 ⁽¹⁾ | 64.28 ± 6.09 ⁽¹⁾ |
| EF/% | 79.23 ± 8.50 | 93.19 ± 4.31 ⁽¹⁾ | 93.12 ± 4.81 ⁽¹⁾ |
| CO/L · min ⁻¹ | 0.08 ± 0.03 | 0.13 ± 0.04 ⁽¹⁾ | 0.13 ± 0.03 ⁽¹⁾ |

注:与空白对照组相比,⁽¹⁾ $P < 0.05$

2.3 心室肥厚程度指标

经过 8 周的干预, LAP 组及 Ena 组 VMI 与空白对照组相比均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); LAP 组与 Ena 组比较 VMI 无显著性差异, 见表 3。

2.4 心肌纤维化指标

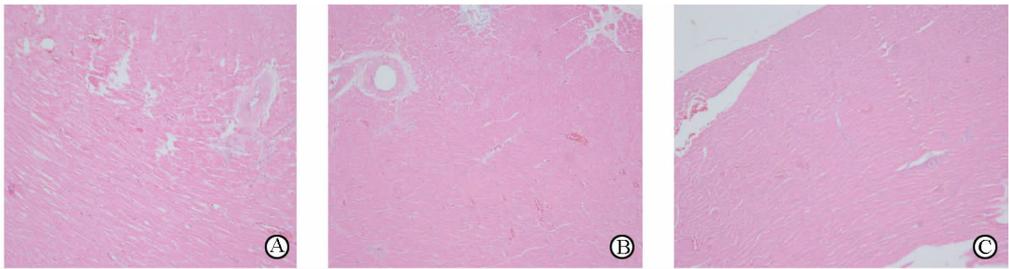
经过 8 周的干预, 心肌组织的 HE 染色显示, 空白对照组心肌纤维结构明显紊乱, LAP 组及 Ena 组较空白对照组心肌纤维明显纤细, 结构略有紊乱, 见图 1。

Masson 染色下, 心肌细胞核呈蓝黑色, 胞浆呈红色, 胶原纤维呈蓝色。空白对照组 SHR 心肌纤维变粗, 部分心肌纤维断裂、排列紊乱, 细胞间隙及血管壁周围可见大量胶原纤维增生, 而 LAP 组和 Ena 组心肌纤维略变粗, 排列较整齐, 细胞间隙及血管壁周围胶原纤维增生不明显, 见图 2。LAP 组及 Ena 组与空白对照组相比, CVF 和 PVCA 均有明显下降 ($P < 0.05$), 但 LAP 组与 Ena 组比较 CVF 和 PVCA 无显著性差异, 见表 4。

表 3 各组心室肌肥厚指数比较

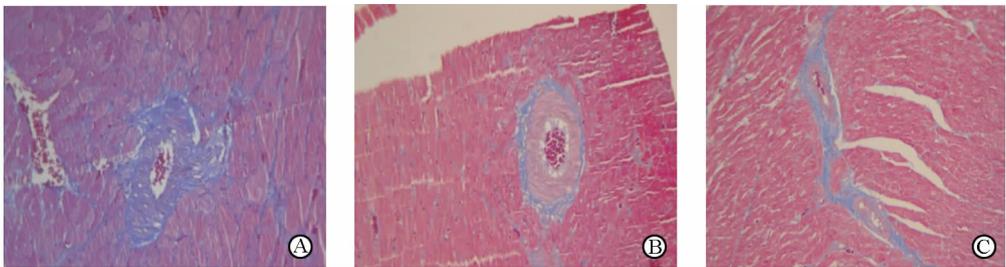
| 组别 | BW/g | VW/mg | VMI |
|-------|----------|-----------|----------------------------|
| 空白对照组 | 386 ± 15 | 1550 ± 84 | 4.01 ± 0.15 |
| Ena 组 | 381 ± 28 | 1442 ± 96 | 3.68 ± 0.08 ⁽¹⁾ |
| LAP 组 | 384 ± 27 | 1465 ± 84 | 3.72 ± 0.08 ⁽¹⁾ |

注: 与空白对照组相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$



注: A 为空白对照组; B 为 Ena 组; C 为 LAP 组

图 1 各组 SHR 心肌组织 HE 染色



注: A 为空白对照组; B 为 Ena 组; C 为 LAP 组

图 2 各组 SHR 心肌组织 Masson 染色

表 4 各组心肌组织 CVF、PVCA 比较

| | 空白对照组 | Ena 组 | LAP 组 |
|--------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| CVF/% | 6.67 ± 0.64 | 3.14 ± 0.52 ⁽¹⁾ | 4.32 ± 0.49 ⁽²⁾ |
| PVCA/% | 1.17 ± 0.10 | 0.48 ± 0.11 ⁽¹⁾ | 0.82 ± 0.10 ⁽²⁾ |

注: 与空白对照组相比, ⁽¹⁾ $P < 0.01$, ⁽²⁾ $P < 0.05$

3 讨论

国内外已有多项研究证实, ACEI 能有效降压, 改善高血压心室重构, 且 ACEI 治疗高血压具有类效应^[6]。张静等^[7]研究证实, 依那普利可降低老年 SHR 过高的左心室负荷, 改善心功能减退症状, 逆转 SHR 的左心室质量指数升高及心肌细胞肥大。研究证实海产品来源的 ACE 抑制肽对高血压大鼠有显著的降压作用, 每天给予 ACE 抑制肽, 可使 SHR 血压明显下降, 降压效果与卡托普利相似, 而未发现明显的不良反应^[8]。但是 ACE 抑制肽对大鼠心室重构的作用是否与 ACEI 类药物相似, 尚无相关研究。

本研究中使用的 ACE 抑制肽 LAP 由 6 个氨基酸残基(亮氨酸-精氨酸-脯氨酸-缬氨酸-丙氨酸-丙氨酸)组成, 其结构与食物源性自然肽相似, 故安全性较高。体外实验证实 LAP 有抑制 ACE 的作用, 呈浓度依赖性, 半抑制浓度 IC₅₀ 为 4.14 μmol/L, 与食物源性自然肽对 ACE 的抑制作用相似, 且可以用化学合成的方法大量生产^[9]。我们前期研究已证实, LAP 对 SHR 有显著的降压效果, 可改善 SHR 的血管重构, 效果与依那普利相似^[10]。本实验对 SHR 腹腔注射 LAP, 2 周后血压下降, 降压作用持续至实验结束, 证明 LAP 对 SHR 可长期有效降压。

本研究还证实了 LAP 能明显改善 SHR 的心脏功能、心室肥厚和心肌间质纤维化。经过 8 周的干预, 与空白对照组相比, LAP 组和 Ena 组的 FS、EF、CO、LVDd、LVSd 等反映心脏功能的指标改善; VMI、IVST、LVPWTs、LVPWTD 等反映心肌肥厚的指标降低, 心肌纤维明显纤细且排列整齐; 反映心肌纤维化的指标 CVF 和 PVCA 明显降低; 而上述指标在 LAP 组与 Ena 组之间无明显统计学

差异。提示 LAP 能有效改善 SHR 的左心室重构, 改善心功能, 效果与 ACEI 类药物依那普利相似。

综上所述, LAP 对 SHR 可长期有效降压, 能抑制心室肥厚, 减少心肌纤维化, 改善心室重构, 有望成为高血压治疗及靶器官保护的新型药物。

参 考 文 献

- [1] Katragadda S, Arora RR. Role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in vascular modulation; beyond the hypertensive effects[J]. Am J Ther, 2010, 17(1): e11-23.
- [2] 沈芳芳, 邵 湍, 申进阁, 等. 通心络胶囊对扩张型心肌病大鼠心功能和心室重构的影响[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(6): 372-375.
- [3] Kumarswamy R, Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure[J]. Circ Res, 2013, 113(6): 676-689.
- [4] 杨 君, 杨 龙, 唐 倩, 等. 替米沙坦在牵张刺激导致的心室肌细胞延迟整流钾通道改变中的作用[J]. 国际心血管病杂志, 2015, 42(1): 51-57.
- [5] Hughes AD, Stanton AV, Jabbar AS, et al. Effect of antihypertensive treatment on retinal microvascular changes in hypertension[J]. J Hypertens, 2008, 26(8): 1703-1707.
- [6] Labat C, Lacolley P, Lajemi M, et al. Effects of valsartan on mechanical properties of the carotid artery in spontaneously hypertensive rats under high-salt diet [J]. Hypertension, 2001, 38(3): 439-443.
- [7] 张 静, 高 欢. 依那普利对老年自发性高血压大鼠心功能和心室重构的改善作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(16): 4616-4617.
- [8] Zhao YH, Li BF, Dong SY, et al. A novel ACE inhibitory peptide isolated from Acaudina molpadioides hydrolysate[J]. Peptides, 2009, 30(6): 1028-1033.
- [9] Hong F, Ming L, Yi S, et al. The antihypertensive effect of peptides; a novel alternative to drugs[J]. Peptides, 2008, 29(6): 1062-1071.
- [10] Junling H, Ming L, Hong F, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide LAP on vascular remodeling[J]. Clin Exp Hypertens, 2013, 35(6): 437-443.

(收稿: 2016-02-01 修回: 2016-06-11)

(本文编辑: 胡晓静)