

• 基础研究 •

不同剂量的食用白酒对大鼠心脏结构与功能影响的研究*

刘爱东,蒋 慧#,牛 晨,田 虹,潘贵书△
(遵义医学院生理学教研室,贵州遵义 563000)

摘 要:目的 观察不同剂量的食用白酒对大鼠心脏结构和功能的影响,并探讨其对心脏损害的机制。方法 将成年雄性 SD 大鼠 54 只分成生理盐水组、乙醇组和白酒组,每组各分为低、中和高剂量组。灌胃 12 周后,监测大鼠左心室内压,计算左心室内压变化幅度;测定全心质量指数;快速 Masson 染色观察心肌细胞纤维化情况;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测心肌组织血管紧张素 II(Ang II)含量;荧光定量聚合酶链反应(PCR)法检测心肌组织血管紧张素转换酶(ACE)、ACE2 mRNA 表达。结果 白酒、乙醇增加了全心质量指数、左心室内压变化幅度,剂量依赖性地加重了心肌细胞变性,纤维组织增生,且剂量依赖性地增加了心肌组织 Ang II 含量及 ACE mRNA 表达。低剂量的白酒、乙醇增加了心肌组织 ACE2 mRNA 表达,但其中、高剂量降低了心肌组织 ACE2 mRNA 表达。结论 长期饮酒可破坏心肌内的 ACE 和 ACE2 平衡,使 ACE 和 Ang II 升高,ACE2 降低,导致心肌纤维化,其纤维化的变化程度与饮酒量以及时间长短有关。

关键词:血管紧张素 II;肽基二肽酶 A;心肌组织;食用白酒
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.030 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2013)32-3926-03

Effects of different dose of edible liquor on cardiac structure and function in rats*

Liu Aidong, Jiang Hui#, Niu Chen, Tian Hong, Pan Guishu△
(Department of Physiology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract:Objective To investigate the effects of different dose of edible liquor on cardiac structure and function in rats, and explore its underlying mechanisms. **Methods** 54 male SD rats were randomly divided into saline group, alcohol group, liquor group, each group were further divided into low-, middle- and high-dose groups. After 12 weeks of feeding, left ventricular pressure was determined, and left ventricular pressure amplitude and indexes of HW / BW were calculated. Myocardial fibrosis was observed by Masson staining, Ang II content of myocardial tissue were detected by ELISA, and ACE and ACE2 mRNA expressions were detected by RT-PCR, respectively. **Results** Left ventricular pressure amplitude and HW/BW index were increased by both liquor and alcohol. The myocardial cell turbidity, degeneration, hyperplasia of fibrous tissue change were gradually worsened, and the Ang II contents and the ACE mRNA expressions of the myocardial tissue were also increased by both liquor and alcohol. The ACE2 mRNA expression of the myocardial tissue were higher by low-dose liquor and alcohol, while the ACE2 mRNA expression of the myocardial tissue were lower by middle- and high-dose liquor and alcohol. **Conclusion** Long-term alcohol consumption can damage the balance of cardiac ACE and ACE2, causing the increase of ACE, Ang II and the decrease of ACE2, resulting in myocardial fibrosis, whose degree is related to the amount of alcohol consumption and drinking history.

Key words: angiotensin II; peptidyl-dipeptidase A; myocardial tissue; edible liquor

饮酒对心脏的损害已成为威胁人类健康的世界性问题^[1-2],但其机制至今尚未完全清楚。乙醇可激活体内肾素-血管紧张素(rennin angiotension system, RAS),使血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)生成增多,Ang II 与组织细胞的炎症、纤维化有关^[3],且慢性饮酒可通过激活 RAS 而影响心功能^[4]。故认为 Ang II 在促进心肌细胞肥大、增殖,以及心肌成纤维细胞激活进而在心肌重塑的形成中起关键作用。据报道,血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)是惟一调节 Ang II 的关键酶,然而,随着 ACE 同源物 ACE2 的发现,该观点受到挑战。ACE2 的主要作用是高效催化 Ang II 转化为 Ang-(1-7),而 Ang-(1-7)具有拮抗 Ang II 的效应,是重要的心血管功能调节剂,具有舒张血管,改善心功能等作用。因此认为 ACE2 在 RAS 各成员间的平衡中发挥着中枢性的调节作用,本研究观察食用白酒对心肌组织 ACE、ACE2 mRNA 表达的影响,为人们科学而健康饮酒提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 市售 52°贵州某品牌白酒, Trizol、逆转录试

剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ II、β-actin、ACE、ACE2 引物购自大连宝生物工程有限公司,大鼠 Ang II ELISA 检测试剂盒购自美国 RD 公司,快速 Masson 染色试剂盒购自南京建成科技有限公司。
1.2 主要仪器 Eppendorf Master-cycler Gradient(德国, Eppendorf), iCycler iQ real-time PCR 仪(美国, BIO-RAD), BL-420S 生物实验系统(成都泰盟科技有限公司)。
1.3 实验动物及分组 54 只清洁级雄性成年 SD 大鼠, 体重 200~220 g, 购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心[(合格证书号: SCXK(渝)2007-0005)]。大鼠适应性喂养 1 周, 用简单随机抽样方法分成生理盐水组、52°食用乙醇组和 52°白酒组, 每组各分为低、中、高剂量组, 每组 6 只。按低剂量(0.25 mL·100 g⁻¹·d⁻¹)、中剂量(0.5 mL·100 g⁻¹·d⁻¹)、高剂量(1 mL·100 g⁻¹·d⁻¹), 每日分两次(早 8:00 和晚 8:00)给予大鼠灌胃, 连续灌胃 12 周。每周称质量 1 次, 根据大鼠体重调整下 1 周的灌胃量。灌胃期间各组大鼠自由进水、正常饮食。

* 基金项目:贵州省科技厅资助项目(黔科合重大专项字[2010]6004 号);贵州省遵义市科技局资助项目(遵市科合社重字[2009]1 号)。
作者简介:刘爱东(1969~),副教授,硕士,主要从事心血管生理和肾脏生理研究。 # 共同第一作者。 △ 通讯作者, E-mail: pgs@zmc.edu.cn。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠左心室内压的测定 各组大鼠在灌胃 12 周后禁食 12 h,腹腔注射 25%氨基甲酸乙酯溶液麻醉,行左心室插管,描记一段左心室压力曲线,计算左心室内压变化幅度(曲线最高值-曲线最低值)。

1.4.2 大鼠全心质量指数 待上述测定结束后,迅速打开胸腔,取出完整心脏,迅速用 4℃生理盐水冲洗,滤纸吸干水分,减去大血管,去掉脂肪及结缔组织,称质量,根据心脏质量与体质量的比值计算获得每只大鼠的全心质量指数(HW/BW)值。

1.4.3 标本留取和快速 Masson 染色 采用上述称质量的心脏标本,从心底部至心尖部依次分 4 份环形剪下心肌。取相应 3 份分装冷冻存管中后置于-80℃低温冰箱保存备用。剩余 1 份组织样品置于 10%的中性福尔马林溶液固定 24 h,脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,切片,并按试剂盒说明书进行快速 Masson 染色。

1.4.4 ELISA 检测心肌组织 Ang II 浓度 从-80℃低温冰箱取出冻存的 1 份心肌组织样品移入 1.5 mL EP 管中,用冰浴生理盐水冲洗,经剪碎后加入 1 mL 0.1 mol/L 醋酸中,采用匀浆器制成匀浆,95℃水浴 10 min,冷却后 4℃、15 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液,按 ELISA 检测试剂盒说明书进行操作。

1.4.5 荧光定量 PCR 检测心肌组织 ACE、ACE2 mRNA 表达 根据 Genebank 数据库获取的待检基因序列为模版设计引物(如表 1 所示),并交大连宝生物(TaKaRa)公司合成。大鼠心脏总 RNA 按 Trizol 一步法抽取,比色法测定总 RNA 的浓度和纯度。采用 Eppendorf Master-Cycler Gradient PCR 仪逆转录后,通过 iCycler iQ real-time PCR 仪进行扩增。PCR 反应条件:95℃ 3 min,循环 1 次;95℃ 10 s,60℃ 45 s,循环 40

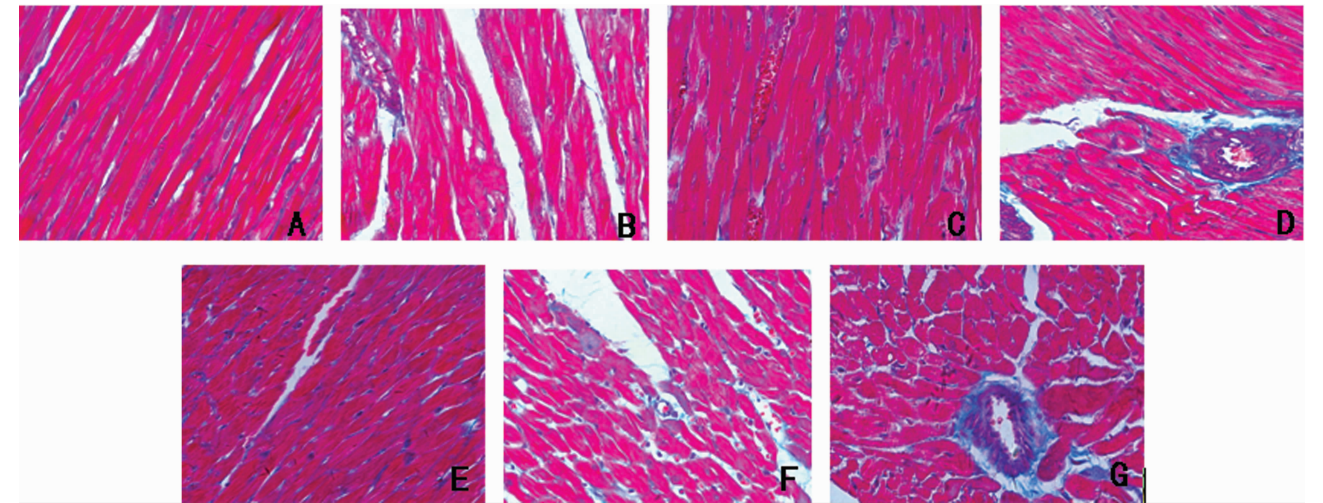
次。以 Ct 值为统计参数依次计算下列数据:(1)平均 $C_t = (C_{t1} + C_{t2})/2$ (重复管);(2) $dC_t = \text{平均 } C_t - \text{中间值}$;(3)基因的表达以 $2^{-\Delta(-dC_t)}$ 表示;(4)以目的基因的表达/ β -actin 基因的表达比值对 ACE、ACE2 mRNA 表达进行相对定量。

表 1 ACE、ACE2 和 β -actin 的基因引物参数		
基因名称	引物序列	扩增片段
ACE	上游引物 5'-AGCCTCAGTGGACTTCTA-3'	99 bp
	下游引物 5'-CCCATTTCTGTGGTGGGCTA-3'	
ACE2	上游引物 5'-AATCGTAGGCTCTGGGCTTGG-3'	198 bp
	下游引 5'-TTCGATCAACTGGTTTCGGTTGTA-3'	
β -actin	上游引物 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	150 bp
	上游引物 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'	

1.5 统计学处理 利用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。数值变量资料经正态性和方差齐性检验后,满足条件者行 F 检验,有差异者进一步做两两比较的 q 检验(SNK 检验),数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠全心质量指数 灌胃 12 周后,低剂量白酒组的 HW/BW 指数 $2.329 6 \pm 0.243 9$ 和低剂量乙醇组 $2.438 1 \pm 0.180 3$ 与低剂量生理盐水组 $2.368 3 \pm 0.090 1$ 相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。而中、高剂量白酒组($2.660 5 \pm 0.201 6$ 、 $2.639 6 \pm 0.243 9$)和中、高剂量乙醇组($2.672 4 \pm 0.181 8$ 、 $2.624 2 \pm 0.153 2$)均高于中、高剂量生理盐水组($2.392 6 \pm 0.086 8$ 、 $2.363 9 \pm 0.085 7$)。但各剂量白酒组与乙醇组的 HW/BW 指数之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:生理盐水组;B:低剂量乙醇组;C:低剂量白酒组;D:中剂量乙醇组;E:中剂量白酒组;F:高剂量乙醇组;G:高剂量白酒组。
图 1 各组大鼠心肌组织 Masson 染色结果(× 40)

2.2 大鼠左心室内压幅度变化 灌胃 12 周后,低、中、高剂量白酒组的左心室内压幅度分别为($112.296 7 \pm 21.057 1$)、($103.016 0 \pm 18.179 4$)、($107.120 0 \pm 20.307 2$) mm Hg 和低、中、高剂量乙醇组的($105.242 3 \pm 26.300 6$)、($123.801 6 \pm 20.022 2$)、($108.7214 \pm 9.690 1$) mm Hg 均比低、中、高剂量生理盐水组($93.021 7 \pm 10.095 0$)、($92.370 0 \pm 11.148 0$)、($85.530 0 \pm 15.333 3$) mm Hg 有所增加($P < 0.05$)。但各剂量白酒组的左心室内压幅度与乙醇组之间无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 大鼠心脏组织 Masson 染色 生理盐水组:心肌细胞胞浆红染,细胞排列紧密、规则,细胞界限清楚,间质纤维呈蓝色,分布均匀、纤细,见图 1A。白酒组、乙醇组中低剂量组细胞排列尚规则,少量纤维组织增生,见图 1B、1C;中剂量组局部心肌细胞萎缩,纤维组织增生较明显,见图 1D、1E;高剂量组心肌纤维排列紊乱,存在空泡变性,间质纤维明显增生,见图 1F、1G。在各剂量组中,以乙醇组的心肌结构变化明显。

2.4 大鼠心肌组织 Ang II 的含量 低、中、高剂量白酒组的心肌组织 Ang II 含量均高于生理盐水组($P < 0.05$),且随剂量的

增加而增加。中、高剂量白酒组的心肌组织 Ang II 含量高于低剂量组 ($P < 0.05$), 但中剂量组与高剂量组比较, Ang II 含量无明显差异。各剂量乙醇组的心肌组织 Ang II 含量改变与白酒组相似。

2.5 大鼠心肌组织 ACE mRNA 表达 低、中、高剂量白酒组的心肌组织 ACE mRNA 表达分别高于生理盐水组 ($P < 0.01$)。中、高剂量白酒组的心肌组织 ACE mRNA 表达高于低剂量组 ($P < 0.05$), 且高剂量组的 ACE mRNA 表达高于中剂量组 ($P < 0.05$)。各剂量乙醇组的心肌组织 ACE mRNA 表达出现与白酒组相似的改变。

2.6 大鼠心肌组织 ACE2 mRNA 表达 低剂量白酒组的心肌组织 ACE2 mRNA 表达高于生理盐水组 ($P < 0.01$), 中、高剂量组的心肌组织 ACE2 mRNA 表达均低于生理盐水组、白酒低剂量组 ($P < 0.05$), 而中、高剂量组的心肌组织之间 ACE2 mRNA 表达无明显差异 ($P > 0.05$)。乙醇组出现与白酒组相似的变化。

3 讨 论

白酒的主要成分是乙醇和水, 约占总量的 98% 左右, 它们构成了白酒的主干, 其余是非乙醇成分, 那白酒对心脏的作用是否与单纯乙醇不同? 对此, 本研究探索了白酒与乙醇对心脏可能的影响。有实验表明, 给予长期大剂量饮酒后的大鼠行超声心动图检测, 心脏主要表现为左室离心性肥大、舒张功能下降, 但其收缩功能尚未下降, 而酒精性心脏损害与心肌细胞凋亡和纤维化有关^[5]。本研究发现白酒及乙醇剂量依赖性地加重心肌细胞变性及纤维组织增生, 提示心肌损伤的严重程度主要与服用乙醇的剂量和持续时间相关。有趣的是各剂量乙醇组的心肌细胞损伤程度重于相应的白酒组, 推测白酒中所含的其他成分可能对心肌有一定保护作用, 但具体成分需要进一步研究。

有研究显示: 乙醇可激活体内 RAS, 使 Ang II 生成增多, 而 Ang II 与组织细胞的炎症、纤维化有关^[3]。Cheng 等^[4]研究也认为, 慢性饮酒可通过激活 RAS 系统而影响心功能。在心脏内, Ang II 既可以由循环 RAS 产生, 也可以由局部 RAS 产生。与循环 Ang II 比较, 心肌局部的 Ang II 含量对于心肌肥厚更重要。AT1 拮抗剂氯沙坦在预防和逆转心肌肥厚的同时, 循环 Ang II 水平明显增高而心肌组织内 Ang II 水平却降低^[6]。本研究观察了 HW/BW 和左心室内压变化幅度, 旨在间接反映心肌肥厚和心功能变化, 发现白酒和乙醇增加了 HW/BW、左心室内压变化幅度, 且剂量依赖性地增加了大鼠心肌组织 Ang II 含量, 提示心肌肥厚、心肌顺应性下降与心肌组织内 Ang II 含量增加有关。

ACE 和 ACE2 是 Ang II 合成主要的限速酶, 是 RAS 的枢纽。ACE 主要生理活性是将 Ang I 转换为 Ang II, 而 ACE2 主要是降解 Ang II 生成 Ang(1-7)^[7], 二者具有相互拮抗的作用, 相互作用维持 RAS 平衡, 共同调节心脏结构功能。据报道^[8-9], 过表达的 ACE2 明显改善 Ang II 介导的心肌细胞肥大及心肌纤维化程度, 心脏收缩、舒张功能也得到明显改善, 但高血压情况无明显改善。Burrell 等^[10]研究认为, 在心衰和心肌梗死大鼠的心脏中 ACE2 表达升高是对局部组织 RAS 激活的一种代偿性补偿, 占主导作用的还是 ACE。于继红等^[11]观察到在给 Wistar 大鼠乙醇灌胃 4 周末时, 肝组织 Ang II 水平即表现为升高, 8 周末时进一步升高, 12 周末达到高峰, 并且明显高于血浆 Ang II 水平。本实验发现低剂量的白酒、乙醇增加了

心肌组织 ACE2 mRNA 表达, 但其中、高剂量降低了心肌组织 ACE2 mRNA 表达, 这可能在乙醇早期刺激而光镜下心肌未出现明显间质纤维化表现时, 就激活心肌组织中 RAS, 参与纤维化的过程。心肌组织内增加的 ACE 进一步促进 Ang II 的生成, 从而发挥致纤维化作用, 作为代偿机制, 心肌组织内 ACE2 表达增加发挥对心肌的保护作用, 但随时间延长和灌酒量的增加, 心肌发生间质损伤后 ACE2 表达下调, 但 ACE 表达仍呈增加趋势, 二者表达的失衡加剧使病情进展, 间质纤维化进行性发展。

总之, 本研究发现长期饮酒可破坏心肌内的 ACE 和 ACE2 平衡, 使 ACE 和 Ang II 的升高, ACE2 降低, 导致心肌纤维化, 其纤维化的变化程度与饮酒量以及时间长短有关。

参考文献:

- [1] Ikehara S, Iso H, Toyoshima H, et al. Alcohol consumption and mortality from stroke and coronary heart disease among Japanese men and women; the Japan collaborative cohort study[J]. *Stroke*, 2008, 39(11): 2936-2942.
- [2] Djoussé L, Gaziano JM. Alcohol consumption and heart failure: a systematic review[J]. *Current Atheroscl Rep*, 2008, 10(2): 117-120.
- [3] 董波, 张月辉, 董秋立, 等. 血管紧张素转化酶 2 基因转染对实验性动脉硬化斑块炎症的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2009, 37(7): 622-625.
- [4] Cheng CP, Cheng HJ, Cunningham C. Angiotensin II type1receptor blockade prevents alcoholic cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2006, 114(3): 226-236.
- [5] 张丽, 王佩显, 林静娜. 长期大量饮酒对大鼠心脏损伤的研究[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(2): 195-198.
- [6] Mizuno K, Tani M, Hushimoto S, et al. Effects of losartan; a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist on cardiac hypertrophy and tissue angiotensin II content in spontaneously hypertensive rats[J]. *Life Sci*, 1992(5): 367-381.
- [7] Snow WM, Murray R, Ekuma O, et al. Alcohol use and cardiovascular health outcomes: a comparison across age and gender in the winnipeg health and drinking survey cohort[J]. *Age Ageing*, 2009, 38(2): 206-212.
- [8] Huentelman MJ, Grobe JL, Vazquez J, et al. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats[J]. *Exp Physiol*, 2005, 90(5): 783-790.
- [9] Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation[J]. *Hypertension*, 2006, 47(3): 515-521.
- [10] Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans [J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(4): 369-375.
- [11] 于继红, 陈玉帅, 林红, 等. 血管紧张素 II 在大鼠酒精性肝纤维化发病机制中的作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(31): 3492-3497.