

医学
拾萃

IMPROVE REVIEW

免疫学诊断篇

Immunological Diagnosis

二〇二〇年十月刊
October, 2020

Article Reading Guidance
文献导读

Article Abstract Collection
文献摘要

Featured Article
文献精读

Original Article Reading
文献原文

医学
拾萃

CONTENTS

 Article Reading Guidance
文献导读 | p01

 Article Abstract Collection
文献摘要 | p23

 Featured Article
文献精读 | p38

 Original Article Reading
文献原文 | p44

主编 邓冠华 博士
Chief Editor Dr. Guanhua Deng

联合主编 朱勇 博士
Co-Editor-in-Chief Dr. Yong Zhu

执行主编 高树勇
Executive Editor Shuyong Gao

专刊编辑 李小林 博士 孙其岭 博士 杨艳 博士
Special Editor Dr. Jerry Li Dr. Qiling Sun Dr. Yan Yang

田艳丽 博士 罗江兰
Dr. Yanli Tian Jianglan Luo

审核编辑 吴涛明
Audit Editor Taoming Wu

协作单位 阳普学院
Partnership Improve College

广东省医用材料血液相容性研究企业重点实验室
Guangdong Enterprise Key Laboratory of
Blood Compatibility of Medical Materials

美国吉迪思诊断有限公司
GIMDx, Inc.

联系方式 yxsc@improve-medical.com
Contact Us

 **陽普醫療**
IMPROVE MEDICAL



电子文献



Article Reading Guidance

文献导读

肆虐全球的由新型冠状病毒 SARS-CoV-2 感染引起的 COVID-19 大流行始于 2019 年秋冬季。至截稿时为止，全球 COVID-19 感染人数已突破两千万，死亡人数接近百万，给人类生命健康和世界经济带来了前所未有的重创。预计该感染性疾病将贯穿整个 2020 年，并可能在相对较长时期内与人类社会相伴共生。

SARS-CoV-2 的侵入机制是依靠其病毒表面的刺突糖蛋白（spike glycoprotein, S 糖蛋白）与人体细胞（在下呼吸道上皮细胞表面高表达）表面的血管紧张素转换酶 2（ACE2）结合而介导的。2003 年引发严重急性呼吸综合征（SARS）的冠状病毒 SARS-CoV 感染也是藉由同样的机制来侵入人体细胞。

ACE2 是 20 多年前发现的一种新的血管紧张素转换酶，它不同于传统的血管紧张素转换酶 ACE。众所周知，肾素-血管紧张素系统在人体血压调节中发挥着至关重要的作用，而 ACE2 则是肾素-血管紧张素系统的负调节剂。ACE2 能否作为新型心血管病诊断及风险预测的生物标志物？在过去的 20 多年中引发了科学家的关注，一些研究表明，ACE2 有可能作为某些心血管病诊断和预测的生物标志物，如其对阻塞性冠状动脉病患者主要不良心血管事件的独立预测价值等。

COVID-19 大流行以来，重症患者、危重症患者以及死亡患者除了呼吸道严重受累之外，部分患者的心血管系统、肝脏和肾脏等多脏器也遭受了致命性损伤，再次引发了人们对于 ACE2 能否用于心血管病实验室诊断的兴趣。但总体而言，鉴于肾素-血管紧张素系统调控的高度复杂性和高度敏感性，目前的研究结果虽有一些苗头，但缺乏一致性，有些甚至相互矛盾。ACE2 作为心血管病诊断以及风险预测的独立工具走上临床尚有较大距离，尚需时日假以大规模临床研究。

值此 COVID-19 全球大流行之年，本期导读特别推荐由加拿大学者撰写的综述《血管紧张素转换酶 2：SARS-CoV-2 的受体和肾素-血管紧张素系统的调节剂 庆祝 ACE2 发现 20 周年》，期望对于大家全面系统了解 ACE2 有所帮助。

朱勇

阳普医疗免疫学诊断产品线首席科学家

2020 年 8 月 12 日

血管紧张素转换酶 2：SARS-CoV-2 的受体和肾素-血管紧张素系统的调节剂

庆祝 ACE2 发现 20 周年

摘要

ACE2（血管紧张素转换酶 2）围绕其三价功能产生多种生理作用：肾素-血管紧张素系统的负调节剂；氨基酸转运的促进者；严重急性呼吸综合征-冠状病毒（SARS-CoV）和 SARS-CoV-2 的受体。ACE2 广泛表达于包括肺、心血管系统、肠道、肾脏、中枢神经系统和脂肪组织在内的脏器和组织。最近 ACE2 被确认为是导致 2019 年冠状病毒病的病原体——SARS-CoV-2 的受体，在免疫力、炎症、ACE2、心血管疾病之间提供了重要的关联。尽管与 SARS-CoV 具有密切的进化关系，但 SARS-CoV-2 的受体结

合结构域在几个关键氨基酸残基上有所不同,从而使其与人 ACE2 受体的结合亲和力更强,这可能就是 SARS-CoV-2 具有更大致病力的原因。与 SARS-CoV-2 结合后,由于内吞作用以及蛋白水解切割和加工的激活,导致 ACE2 功能的丧失。ACE2 系统对于包括心肌梗死和高血压在内的具有减少和保留射血分数的心力衰竭,以及肺部疾病和糖尿病都具有重要的保护作用。ACE2 对肠道营养不良和血管通透性的控制已成为肺动脉高压和糖尿病性心血管并发症的重要机制。重组 ACE2、ACE2 的基因递送、Ang1-7 类似物和 Mas 受体激动剂可增强 ACE2 的作用,并可作为与肾素-血管紧张素系统活化相关疾病的潜在疗法。已完成临床试验的 rhACE2 (重组人 ACE2),分别有效地降低或增加了血浆血管紧张素 II 和血管紧张素 1-7 的水平。我们的综述总结了过去 20 年的进展,重点介绍了 ACE2 作为新型 SARS-CoV-2 的受体和肾素-血管紧张素系统负调节剂的重要作用,及其对冠状病毒病 2019 大流行和相关心血管病的影响。

原文出处: Circulation Research. 2020;126:1457-1475. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317015

作者: Gheblawi M, et al.

关键词: 心血管病; 冠状病毒; 营养不良; 心力衰竭; 肾素-血管紧张素系统

自从发现 ACE2 (血管紧张素转换酶 2) 以来,过去的 20 年已经积累了诸多关于 ACE2 的基本生物学和生理学知识,为我们进一步加深对肾素-血管紧张素系统 (RAS) 的理解提供了主要动力^[1-4]。ACE2 具有多种作用,包括对各种底物的催化活性;作为严重急性呼吸综合征 (SARS) 冠状病毒 (SARS-CoV) 的功能性受体;作为氨基酸转运蛋白^[5-8]。ACE2 的作用主要是通过将 Ang (血管紧张素) I 和 Ang II 转换为 Ang1-9 和 Ang1-7^[1,4]。在人类疾病实验模型中,采用功能丧失和功能获得的手段都确定了 ACE2 在心力衰竭 (HF)、系统高血压和肺部高血压 (PH)、心肌梗死 (MI) 和糖尿病性心血管并发症中的关键作用^[1]。在血管病和肺部疾病^[9,10]及糖尿病^[11]中,ACE2 轴是控制肠道营养不良和肠道通透性改变的重要机制。临床和实验研究支持 ACE2 在心血管疾病 (CVD) 中的生理学和病理生理学作用,并且增加/激活 ACE2 可能引起对高血压和 CVD 的保护作用,尽管尚未被临床证明^[1,12-14]。

最近,ACE2 作为 2019 年冠状病毒性疾病 (COVID-19) 大流行的致病病毒 SARS-CoV-2 的细胞受体引起了广泛的关注,该病于 2019 年末从中国武汉爆发^[4,15,16]。急性肺损伤中 ACE2 能提供保护作用,这表明,尽管它有助于病毒在上皮表面进入细胞,但可以谨慎地操纵 ACE2/Ang1-7 轴以减轻 SARS 诱导的组织损伤,这也代表了治疗干预的潜在目标^[17,18]。在肺部疾病的实验模型中,具有催化活性的 ACE2 减轻了肺损伤和血管损伤^[17,19]并能防止 PH、减少肺纤维化、动脉重构和改善右心室功能^[12],这是由于其在肺部的直接作用与借助 ACE2 依赖的肠-肺轴的共同作用所致^[19,20]。两个 II 期临床试验研究显示,使用 ACE2 可减少全身性炎症,并使 RAS 肽平衡从 Ang II 漂移到 Ang1-7^[21,22]。全球正努力聚焦于操纵 ACE2/Ang1-7 轴来控制 SARS-CoV-2 的感染,同时为 COVID-19 患者的肺损害和心血管损害提供最大的保护作用。在这篇

综述中,我们总结了 ACE2 的多种作用,重点介绍了它作为 SARS-CoV-2 受体和 RAS 的负调节剂,以及对 COVID-19 大流行的影响。在探索与 CVD 和 COVID-19 相关的 ACE2 途径的基础上,我们还提供了一个开发新型治疗策略的框架。



基础生物化学

ACE2 的发现

继 Tigerstedt 和 Bergman 于 1898 年首次发现肾素后,RAS 现已是一个由酶、肽和受体组成的复杂网络 (图 1)^[2,3,15,16,23-27]。许多金属肽酶集聚在小的相互关联的基因家族中 (例如脑啡肽酶 [neprilysin, NEP] 家族)。不同寻常的是,在世纪之交,尚未发现血管活性的锌肽酶 ACE (血管紧张素转换酶) 的人类同源物。几乎同时,在 2000 年,2 个独立搜索 ACE 同源物的方法揭示存在着 ACE 基因近亲,被命名为 ACEH2 或 ACE2^[3]。从人淋巴瘤 cDNA 文库克隆了 ACEH2,从人 HF 心室 cDNA 文库克隆了 ACE2,后者强调了 ACE2 在心血管病理学中可能具有作用。最初发现 ACE2 基因表达在心脏、肾脏和睾丸,但随后的研究表明其分布更为广泛,包括上呼吸道、肺、肠和肝 (图 2A)。ACE 和 ACE2 的序列对比强

烈表明, ACE2 与 ACE 一样是完整的跨膜蛋白(也是胞外酶), 其跨膜锚点靠近 C 末端(I 型膜蛋白)。ACE 和 ACE2 基因之间存在密切的进化关系, 推测这两种蛋白具有相似的底物特异性, 且以相似的方式参与 RAS。

特别是在酶的活性位点区域具有重要的差异, 使得这两种酶反向平衡而不是增强彼此的作用。在 20 年中, 许多后续研究表明了它们之间的相互关系、分别在 RAS 中的不同作用、多重

生理学和病理学作用: 从血管活性肽代谢(重要的不仅包括 Ang II 还包括 apelin) 到影响先天免疫力的小肠氨基酸转运以及肺功能和脑淀粉样蛋白代谢(将 A β 43 转化为 A β 42, ACE 的一种底物)^[1,4,28]。关于 ACE2 生物学的另一个意外是于 2003 年它被鉴定为当时新发现的 SARS-CoV 的细胞表面受体, 该病导致超过 8000 例 SARS 病例和近 800 例死亡^[5], 并且它也是目前正在席卷全球许多国家的 SARS-CoV-2 的受体^[29,30]。

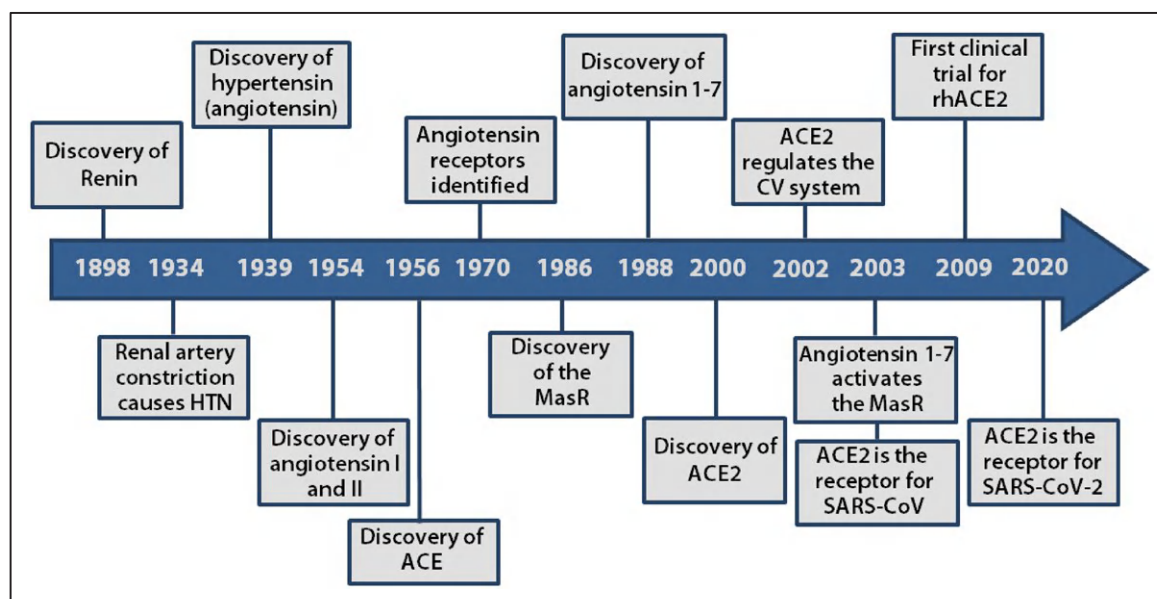


图 1. 发现肾素-血管紧张素系统 (RAS) 主要成分的历史时间轴, 包括 ACE2 (血管紧张素转换酶 2)

肾素是在兔肾提取物产生升压效应后发现的 RAS 的第一个成分 (Tigerstedt 和 Bergman, 1898 年), 然后发现肾动脉的收缩会导致高血压 (HTN), 从而推动了高血压素和血管紧张素的发现 (后来称为血管紧张素; Goldblatt 等人²⁷; Page 和 Helmer²⁴), Ang (血管紧张素) 随后被纯化, 并分离出两种形式: Ang I 和 Ang II。因此, 预测了转化酶的存在 (ACE), 随后对其进行了分离和表征 (Skeggs 等²⁶)。随后描述了 RAS 的反调节轴, 由两个独立的研究小组 (Donoghue 等³; Tipnis 等人²) 首先发现了 ACE2, 并确定了 Ang1-7/Mas 受体轴 (Santos 等¹⁰¹)。ACE2 的心脏保护作用在不久后被发现 (Crackower 等²⁵)。研究已经确定 ACE2 蛋白酶结构域是严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV; Li 等⁵) 的受体, 最近, 也将其确定为 SARS-CoV-2 受体 (Walls 等¹⁵; Yan 等¹⁶)。

ACE2 基因与基础生物化学

与位于人类 17 号染色体上的 ACE 基因不同, 40 kb 的 ACE2 基因位于 Xp22 染色体上, 包含 18 个外显子, 其中大多数与 ACE 基因中的外显子相似。体细胞 ACE 含有两个活性位点, 而 ACE2 仅具有单个催化结构域。ACE 和 ACE2 均具有锌金属蛋白酶作用, 但具有不同的底物特异性, 决定了它们在 RAS 中的独特作用和相互抵消作用。ACE 可以从敏感底物 (肽基二肽酶) 上裂解 C 末端二肽残基, 而 ACE2 则是一种简单的羧肽酶, 能够水解 Ang I 形成 Ang1-9, 水解 Ang II 形成 Ang1-7 (图 2B)。由于 ACE2 不能裂解缓激肽, 从而可进一步将其特异性与 ACE 区分开来, 同时其对常规 ACE 抑制剂

也不敏感^[2,28]。ACE2 的 C 末端结构域与 ACE 没有相似性, 而是肾蛋白 collectrin 的同源物, 它调节氨基酸转运蛋白向细胞表面的递送, 赋予 ACE2 多种独特的生理功能。正是由于 ACE2 发挥的多种生理学功能, 使得其可被 SARS-CoV-2 劫持为受体, 从而导致了 COVID-19 大流行^[15,16]。结构学研究揭示了 SARS-CoV, 以及最近发现的 SARS-CoV-2 与 ACE2 的复合物结构 (图 2B)^[31,32]。对于 SARS-CoV-2, 其主要的刺突糖蛋白 (S1) 结合 ACE2 的 N 末端区域。自从 ACE2 发现以来的过去 20 年中积累的有关生物学和生理学知识将对理解 SARS-CoV-2 感染的某些关键步骤及其最终预防提供重要动力。

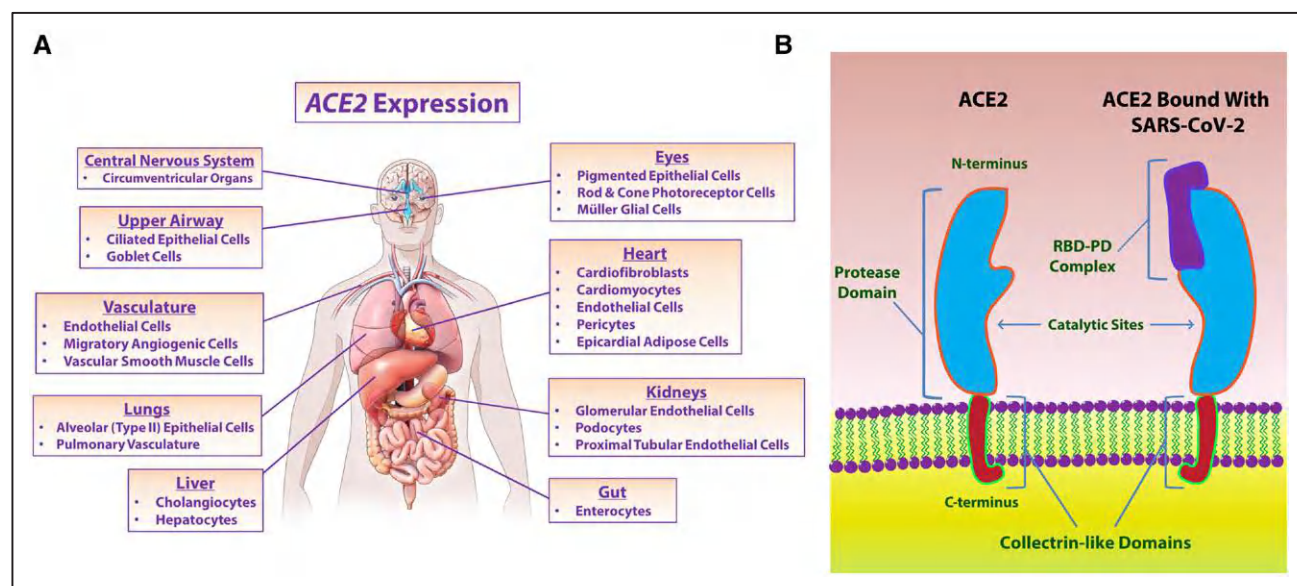


图 2. ACE2（血管紧张素转换酶 2）在体内的表达以及 ACE2 主要结构域的示意图

A: ACE2 在血管系统（内皮细胞、移行性血管生成细胞和血管平滑肌细胞）、心脏（心肌成纤维细胞、心肌细胞、内皮细胞、周细胞和心外膜脂肪细胞）和肾脏（肾小球内皮细胞、足细胞和近端小管上皮细胞）中表达。ACE2 在肝脏的局部 RAS（胆管细胞和肝细胞）、视网膜（色素上皮细胞、视杆和视锥光感受器细胞和 Müller 胶质细胞）、肠内肠上皮细胞、中枢神经系统的脑室周围器官、上呼吸道（杯状和纤毛上皮细胞）、肺泡（II 型）上皮细胞和肺血管系统中也有表达和发挥作用；

B: ACE2 具有面向细胞外的 N 端结构域和具有胞质尾的 C 端跨膜结构域，蛋白质的 N 端部分含有爪状蛋白酶结构域（PD），而 C 端结构域被称为集合蛋白样结构域，严重急性呼吸综合征冠状病毒（SARS-CoV-2）的受体结合域（RBD）与 ACE2 的 PD 结合，形成不同于 ACE2 催化位点的 RBD-PD 复合物。

ACE2 在 COVID-19 中的作用

COVID-19 大流行

2020 年 3 月 11 日，世界卫生组织宣布 SARS-CoV-2 爆发为全球性大流行，报告了南极洲以外的每个大陆社区的规模性传播。此后，到 2020 年 4 月初，暴发已升级至超过一百万例，并在全球范围内造成 6 万多人死亡。然而，在 2002 年出现 SARS-CoV 之前，冠状病毒通常被视为在自然界各种宿主和中间物种间循环的不重要的病原体，仅偶尔会感染人类，引起轻度的上呼吸道感染和普通感冒症状^[33-35]。因此，为了更好地了解 SARS-CoV-2 给全球健康带来的严重风险并优化感染患者的治疗，我们必须认识 ACE2 在 SARS-CoV-2 发病机理中的作用。除了呼吸系统受累，对 SARS-CoV-2 感染的应答会导致多器官功能障碍^[36-38]。尽管呼吸道症状是主要的，但已报道感染患者具有急性心脏损伤和肾脏损伤、心律不齐、肠道和肝功能异常，提示 COVID-19 患者存在心肌、肾、肠、肝损害。同样，SARS-CoV 也会导致心脏、胃肠道、肝脏、肾脏和其他组织损害的全身性表现^[39,40]。

ACE2 作为 SARS-CoV-2 的受体

SARS-CoV-2 与原来的 SARS-CoV 的区别在于 380 个氨

基酸的不同，这转化为二者的病毒刺突（S）蛋白负责与细胞表面表达的人 ACE2 结合的受体结合结构域中的 6 个重要氨基酸中有 5 个不同^[41]。病毒 S 蛋白已被很好地确定为宿主嗜性的重要决定因素并代表了治疗和疫苗开发的主要靶标。另外，宿主细胞蛋白酶对于 SARS-CoV-2 的进入和细胞感染很重要，因为在此过程中 S 蛋白和 ACE2 都经过了蛋白水解修饰。SARS-CoV-2 与 ACE2 的结合亲和力似乎比 SARS-CoV 更强，其中几个氨基酸残基的改变允许增强疏水性相互作用和盐桥形成，这可能解释了 COVID-19 对全球的影响要比初始的 SARS 更大的原因^[16,42]。此外，SARS-CoV-2 已经进化为能够利用多种宿主蛋白酶，包括组织蛋白酶 L、组织蛋白酶 B、胰蛋白酶、X 因子、弹性蛋白酶、弗林蛋白酶和 TMPRSS2（跨膜丝氨酸蛋白酶 2），从而组装好 S 蛋白并在结合受体后促进病毒进入细胞^[43]。到目前为止已发现，TMPRSS2 和组织蛋白酶 L/B 能引导 SARS-CoV-2 组装好 S 蛋白，并且丝氨酸蛋白酶抑制剂与组织蛋白酶 L/B 抑制剂联合的 camostat 甲磺酸盐—E-64d 能阻断 SARS-CoV-2 进入细胞^[44]。病毒 S 蛋白与跨膜 ACE2 蛋白的胞外结构域之间的相互作用能促进 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 进入细胞，随后表面 ACE2 的表达则下调（图 3）^[5,15,29]。在 12 名 COVID-19 患者的队列中，与健康对照组相比，其循环 Ang II 水平显著升高（与病毒载量线性相

关), 提供了组织 ACE2 下调与系统性 RAS 不平衡之间具有直接关联, 并促进了 SARS-CoV-2 感染造成的多脏器损伤^[4,45]。潜在的治疗策略可能包括通过阻断病毒 S 蛋白的受体结合结构域 (RBD), 从而防止人类 ACE2 和 SARS-CoV-2 的

结合。除了这种受体结合结构域阻断策略外, 其他可能的治疗选择还包括局部使用 ACE2 衍生肽、小分子抑制剂、ACE2 抗体或针对 ACE2 的单链抗体片段。

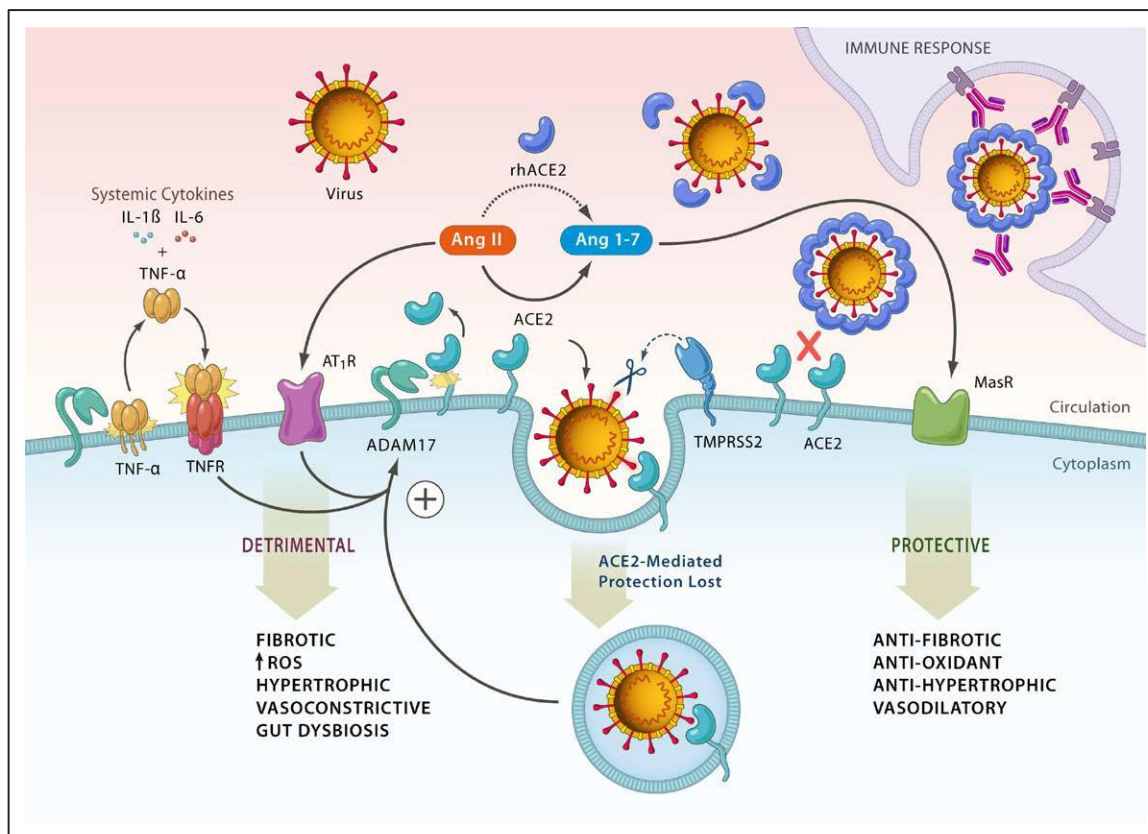


图 3. ACE2 (血管紧张素转换酶 2) 在 2019 年冠状病毒疾病的发病机理和炎症反应中的作用

ACE2 介导的心血管保护作用会在其内吞急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV-2) 病毒颗粒后丧失, 血管紧张素 II (Ang II) 水平随着血管紧张素 I 受体 (AT1R) 活性的增加而升高, 以 ACE2/Ang1-7 驱动的途径为代价, 导致不良扩张、肥大、活性氧 (ROS) 增加、血管收缩和肠道失调。SARS-CoV-2 棘突蛋白会使 ADAM17 (一种去整合素和金属蛋白酶 17) 介导的 ACE2 蛋白水解酶裂解水平升高。升高的 Ang II 水平激活 AT1R 也进一步提高了 ADAM17 的活性, ADAM17 也相应地将其主要底物裂解, 释放可溶性 TNF-α (肿瘤坏死因子-α) 进入细胞外区域, 细胞外区域具有自身和旁分泌功能, TNF-α 激活其肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 是提高 ADAM17 活性的第三个途径。由于 SARS-CoV-2 感染而释放的 TNF-α 和全身细胞因子, 以及糖尿病和高血压等共病可导致细胞因子风暴。TMPRSS2 表示跨膜蛋白酶丝氨酸 2。

COVID-19 患者的心血管疾病

在对死于 SARS-CoV 的 20 例患者进行的尸体心脏组织解剖中, 有 7 个心脏样本可检测到病毒 SARS-CoV 基因组, 其特征是心肌纤维化增加, 炎症和心肌 ACE2 表达下降^[46]。这些患者还具有更多与早死相关的严重疾病。此外, SARS-CoV 患者尸检时经常观察到双侧胸腔积液, 进一步支持了心脏受累的证据。先前患有糖尿病、高血压和肺部疾病的人特别容易感染 COVID-19^[37,47], 这很可能是由于在这些情况下 RAS 系统发生了失调^[4,48]。SARS-CoV-2 感染在心血管系统中的意义可通过急性心肌损伤的发生 (高敏感性肌钙蛋白 I 水平升高和/或出现新的 ECG/超声心动图异常)、心律不齐、心脏骤停、脓毒血症、脓毒性休克、病毒性心肌炎和 HF (NT-proBNP 水平

升高、心脏磁共振成像收缩功能障碍) 等反映出来^[49-52]。实验室检查得出的其他异常, 包括反映血栓形成风险增加的 D-二聚体升高, 可能导致急性冠状动脉综合征; 在整个临床过程中炎症细胞因子水平的持续升高提示 COVID-19 患者具有进行性全身性炎症和组织炎症^[36,37,47]。

肠道营养不良与 COVID-19 患者疾病进展的可能关联

在整个胃肠道腔表面广泛表达, 尤其在肠细胞中高表达的 ACE2, 可作为 SARS-CoV-2 肠道感染的二级部位 (图 2A)。ACE2 的增加或减少可缓解或加重人类疾病实验模型中胃肠道渗漏的状况^[8,11]。COVID-19 的患者还会出现胃肠道不适和腹泻, 其发生时间可能早于并发的呼吸道疾病, 同时与以

前的冠状病毒感染爆发一样,可在粪便中检出病毒 RNA^[38,47,53-56]。此外,已知常见的 CVD 合并症(包括糖尿病和肥胖症)会影响胃肠道血屏障的完整性,并导致肠道营养不良、菌血症和全身性炎症(图 4)。胃肠道渗漏和肠道营养不良的发展相应地与通过肠肺轴的肺动脉高压(PH)的发作相关联,并且与 ACE2 丧失引起的 ACE/Ang II/AT1R (血管紧张素 II 1 型受体)轴的过度活化密切相关^[20,57]。宿主肠上皮细胞持续产生病毒,使这种情况长期保持,并使肠肺轴情况恶化^[54,55],证据表明 SARS-CoV-2 感染可能导致肠道血液屏障的变性,导致细菌、内毒素和微生物代谢产物的全身扩散,可能影响宿主对

COVID-19 感染的反应,并累积为多系统功能障碍和脓毒性休克^[37,38,47]。在 2000 年代初首次爆发的 SARS 冠状病毒感染中记录下了肠道受累及患者结局的相关恶化。在高达 70% 的患者粪便中检测到病毒 RNA,这些病毒从患者胃肠道脱落,并与进行性临床病程相关^[54,55]。在另一项研究中,在回肠和结肠的顶端肠上皮细胞的细胞质和表面微绒毛中检测到 SARS-CoV 颗粒^[55];而在 COVID-19 患者粪便中检测到 SARS-CoV-2,提示了粪口传播途径^[58]。因此,SARS-CoV 的胃肠道和 SARS-CoV-2 患者的胃肠道也有可能为病毒持续复制提供舞台,破坏了肠 ACE2 轴并产生不良结局^[39,47,54,55,59,60]。

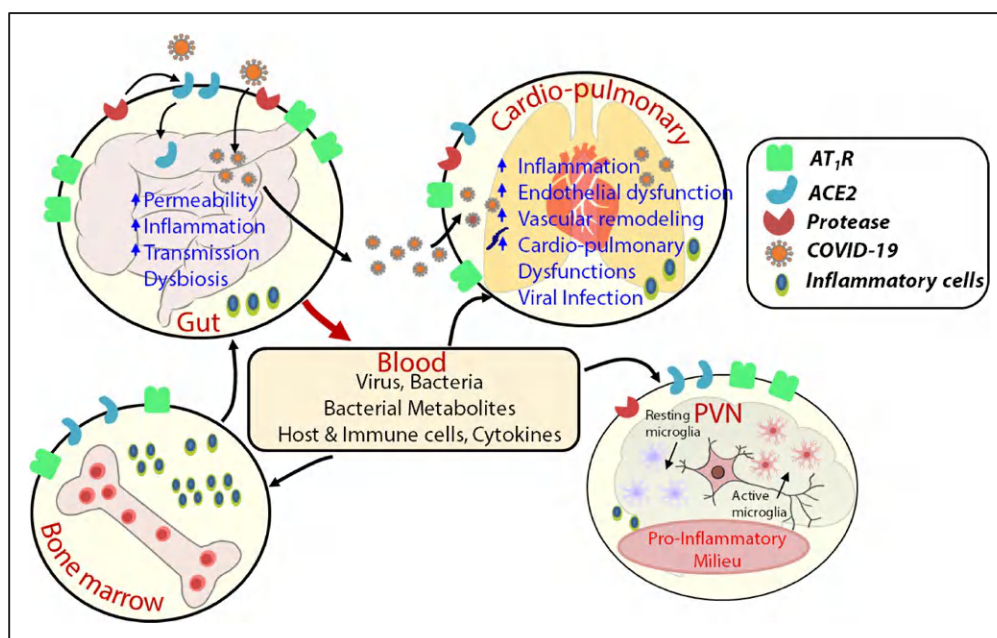


图 4. 血管紧张素转换酶 2、肠道失调和心血管疾病之间的联系

肠道腔表面 ACE2 的丢失改变了微生物群的分布,从而加速了营养不良和上皮屏障完整性的破坏,上皮功能障碍为胃肠道代谢物和细菌进入血管床提供了通道,从而导致局部和全身炎症,这可能在高血压和败血性休克中累积。ACE2 缺乏和肠道失调易通过肠-肺轴发生肺动脉高压。严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV-2)肠道或肺部感染除了肺功能恶化外,还可通过增加细菌感染和炎症进一步恶化肠-肺轴的病理生理学。AT1R 表示血管紧张素 II 1 型受体;COVID-19,新型冠状病毒-2019。

除了病毒对微生物组的直接影响外,诸如糖尿病^[61]和肺部疾病等疾病也会对肠道微生物组有不利影响^[62,63],并可能因 SARS-CoV-2 感染而进一步恶化。动物模型^[64]和人类中依赖于 Ang II 的高血压^[10,63,65,66]与肠道营养不良、肠道渗漏增多和肠道壁病变有关^[10,63,65,66]。这些观察结果在包括 PH、COPD 和哮喘^[67,68]在内的肺部疾病和以营养不良为特征的 2 型糖尿病中得到了广泛支持,后者主要是微生物丰富性和多样性减少、细菌代谢途径发生改变、Firmicutes (F) 和 Bacteroidetes (B) 的组成发生变化^[69-71]。生物医学模型中的 ACE2 破坏表明,肠道营养不良非常普遍,微生物谱的这种改变可以使加重糖尿病和高血压糖的系统性途径发生改变。我们最近的研究表明,ACE2 缺乏会放大糖尿病引起的营养不良^[11],其特征是产生肽聚糖的细菌增加和使 ACE2^{-/-}-Akita 小鼠肠道屏障的完整性丧失。我们还

确定了骨髓细胞在肠道中的新作用。在 ACE2^{-/-}-Akita 或 Akita 小鼠中,肠壁屏障的破坏与循环中具有修复功能的造血细胞—血管生成细胞的水平下降有关。给野生型小鼠提供外源性循环血管生成细胞可纠正 ACE2^{-/-}-Akita 或 Akita 小鼠的肠道屏障功能障碍。因此,SARS-CoV-2 感染引起的肠道 ACE2 表达降低可能会类似地减少循环中的血管生成细胞并损害内皮和肠上皮的完整性,导致营养不良。需要进一步的检查来验证此关联性以及它是病毒感染的直接作用还是间接影响^[11]。

ACE2, ADAM17 和炎症之间的关联

ADAM-17 介导的 ACE2 蛋白水解

TNF- α (肿瘤坏死因子- α) 是一种与慢性炎症有关的细胞

因子,其胞外结构域的脱落和激活是由膜结合蛋白酶 TACE (TNF- α 转化酶)驱动^[72,73],TACE 也称为 ADAM-17 (去整合素和金属蛋白酶 17)。ADAM-17 是一种 I 型跨膜蛋白,属于 Zn 依赖金属蛋白酶的 adamalysin 亚家族^[74]。继发现 ADAM-17 能够裂解 TNF- α 后,该酶的底物特异性已经扩展到包括各种细胞因子和受体,其中许多与炎症的启动和加剧有关^[75,76]。重要的是,还发现 ADAM-17 能介导 ACE2 的蛋白水解和胞外结构域脱落^[77]。ACE2 的脱落增加源于 RAS 的过度活化,并且随后的 ADAM-17 上调驱动了 HF、心房纤颤、冠状动脉病和胸主动脉瘤的发病过程^[1,13,78,79]。Ang II 介导的 AT1R 活化触发一个信号级联反应,最终导致 p38 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶)的活化和 NADPH 氧化酶 2 诱导的活性氧形成,导致 ADAM-17 磷酸化^[80,81]。磷酸化增强了 ADAM-17 的催化活性,从而增加 ACE2 的脱落,导致膜表面 ACE2 的丧失和 Ang II (转化为 Ang1-7)的转化受损,以正反馈循环方式发挥 RAS 介导的有害作用^[77,82]。

重要的是,细胞表面 ACE2 的消耗是 SARS-CoV-2 感染的关键病理学结局。SARS-CoV-2 被表达 ACE2 细胞吞噬。因此,病毒感染的最初有害作用始于 ACE2 介导的组织保护功能的丧失^[83]。SARS-CoV 与 ACE2 结合后,ADAM-17 活性上调,并促进病毒进入细胞。siRNA 对 ADAM-17 的敲低作用可严重减弱 SARS-CoV 进入细胞的能力^[84]。比较了 SARS-CoV 和另一种仅引起轻度呼吸道症状的人类冠状病毒 HNL63-CoV 的分子机制,有趣的是,尽管 HNL63-CoV 也利用 ACE2 作为进入细胞的受体,但它不诱导 ADAM-17 活化和 ACE2 胞外结构域脱落^[84,85]。因此,该研究阐明了 ADAM-17 介导的 ACE2 脱落是 SARS-CoV 感染性中的独特作用,并可能提示不同冠状病毒亚型之间存在着严重性的差异。此外,膜 ACE2 的丧失促进了 Ang II 的累积,这也激活了 ADAM-17 的活性,从而使 ACE2 的膜脱落、RAS 过度活化和炎症持续存在^[77]。

ACE2, SARS-CoV-2 和炎症

正如最近发生的 COVID-19 大流行特别显示的那样,ACE2 对 Ang II/AT1R 和 Ang1-7/MasR 轴的调节作用使得其成为预防和治疗慢性炎症和炎症疾病的合理靶标^[29]。COVID-19 患者发展为肺炎,同时易感患者的损伤加速导致多器官功能衰竭^[30,86],其中部分是由炎症细胞因子风暴引起,是危重症患者的主要死亡原因^[30,86]。当免疫系统由于 SARS-CoV-2 感染等因素激活后,Th17/Treg 细胞功能失衡,免疫细胞过度活化,从而分泌大量促炎性细胞因子^[17,87,88]。COVID-19 患者的 RAS 系统失衡以及 ACE2 丧失进一步导致组织和系统性炎症^[30,86]。脂多糖诱导的急性肺损伤降低了 ACE2 的表达,引起炎症性损伤并上调肾素、Ang II、ACE 和 AT1 受体的表达^[89]。注射

rhACE2 后,肺功能和病理损伤随着炎症减轻而改善^[89]。此外, rhACE2 是有益的并改善了由于 SARS-CoV、酸吸入和脓毒症引起的急性肺损伤^[17,18,88]。

与正常的 WT 对照小鼠相比,ACE2 基因敲除 (KO) 小鼠表现出非常严重的急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) /急性肺损伤病理学、血管通透性增加、肺水肿增加、中性粒细胞积聚和肺功能恶化^[18,87]。通过进一步删除 Ace 基因^[17],ACE 缺陷部分地挽救了具有 ACE2 单突变小鼠的急性肺损伤严重表型,这表明 ACE2/ACE 水平的平衡是炎症风暴期间肺损伤/肺保护的关键。ARBs (AT1R 阻断剂)能诱导 ACE2、Ang1-7 和 Mas 的表达,这与减少促炎细胞因子和诱导抗炎细胞因子 IL-10 相一致^[88]。我们证明当给予 rhACE2 以挽救 Ang II 诱导的 T 淋巴细胞介导的炎症时,ACE2 KO 高血压小鼠表现出增强的促炎细胞因子,IL-1 β 、IL6、TNF- α 和趋化因子 (CC 基序)配体 5^[90,91]。D-Ala7-Ang1-7 (A-779) 对 Mas 受体的阻滞作用完全抑制了 Ang1-7 介导的抗炎作用,而 Ang1-7 受体激动剂 AVE 0991 则能模拟 Ang1-7 的作用^[88]。

ACE2 的生理学作用

RAS 的负调节剂

ACE2 的发现导致了 RAS 各个方面的范式发生了改变。ACE2 是一种单羧肽酶,可将 Ang I 转换为九肽 Ang1-9,可将 Ang II 转换为七肽 Ang1-7 (图 5A)。这种独特的对 Ang I 和 Ang II 的酶促降解途径对 RAS 激活起到负调节作用并减轻 Ang II 和 AT1R 介导的有害作用^[1],这在 RAS 被过度刺激的病理状况下特别有意义。Ang1-7 是一种生物活性肽,其作用谱与 Ang II^[92-98]相反。此外,ACE2 可以拮抗不依赖于 ACE II 的 Ang II 形成,例如来自于肥大细胞糜酶的降解^[13,99]。2003 年,一种内源性孤儿受体—Mas 受体 (MasR) 被确定为 Ang1-7 的受体,而 MasR 拮抗剂 A779 则显示可抑制大多数 Ang1-7 效应^[94,100-103]。Ang1-9 也已显示可通过 AT2R 产生有益的生物学效应,从而对心脏产生保护作用^[104-107]。因此,ACE2/Ang1-7/MasR 轴作为一种生理性拮抗剂出现,可以反调节激活的 RAS^[93,108-112]。ACE2 的心脏保护作用汇总起来可以归因于:(1) 将 Ang I 降解为 Ang1-9,从而限制了 ACE 在其底物上的作用;(2) 通过肽的降解,减轻了 Ang II 的有害作用;(3) 形成具有心脏保护作用的 Ang1-7。Ang1-7 的形成是 ACE2 介导保护的重要机制,因为使用 Ang1-7 的拮抗剂 A779 消除了 rhACE2 在小鼠收缩功能障碍模型中的有益作用^[113]。ACE2 活性的降低导致 Ang II/AT1R 轴活化,这有助于促进 CVD 的进展。ACE2 水平和活性的升高会导致 Ang1-9 和 Ang1-7 的形成,从而导致对 CVD 的保护 (图 5A)。

与 Apelin 肽的相互作用

Apelin 肽家族通过 apelin 受体介导的对 CVD 的保护而发挥作用^[114,115]。X 连锁的 APLN 基因编码一个 77 个氨基酸的 apelin 前体，随后被内肽酶切割成长度为 13 ~ 36 个氨基酸的多种生物活性肽。CVD（包括 HF 和高血压）的特征是人心肌和血浆中的 apelin 处于缺乏状态^[116-118]。Apelin KO 小鼠在冠状动脉结扎后表现出梗塞面积增大和收缩功能障碍、心肌收缩力降低、在压力超负荷模型中对 HF 的敏感性增加^[119,120]。Apelin KO 小鼠的心肌 ACE2 mRNA 和 ACE2 蛋白水平均降低，给其注入 apelin-13 后可以挽救，表明 apelin 在 ACE2 基因表达中的具有关键调节作用^[121]。通过 Apelin 受体的 Apelin

信号传导特别增加了 ACE2 启动子活性，导致 ACE2 mRNA 和蛋白表达的增加^[121-123]。这些作用与 pyr-apelin-13 肽能负调节 Ang II 介导的超氧化物产生、心肌肥大、功能障碍和纤维化的能力相一致^[123]，也与 apelin-17 类似物能预防由于给低密度脂蛋白受体 KO 模型输注 Ang II 而诱导的腹主动脉破裂相一致^[124]。但是，ACE2 由于其单羧肽酶活性，能通过心脏和脉管系统的负反馈机制裂解并失活生物活性 apelin 肽 apelin-13 和 apelin-36（图 5B）^[28,125]。由于血浆中内源性 apelin 肽的半衰期短，所以合成 apelin 肽类似物会抵抗 ACE2 对其的降解并保留其与内源性 apelin 受体的结合能力，从而激发对心血管系统的保护。正在探索使其成为潜在的新疗法^[114,124]。

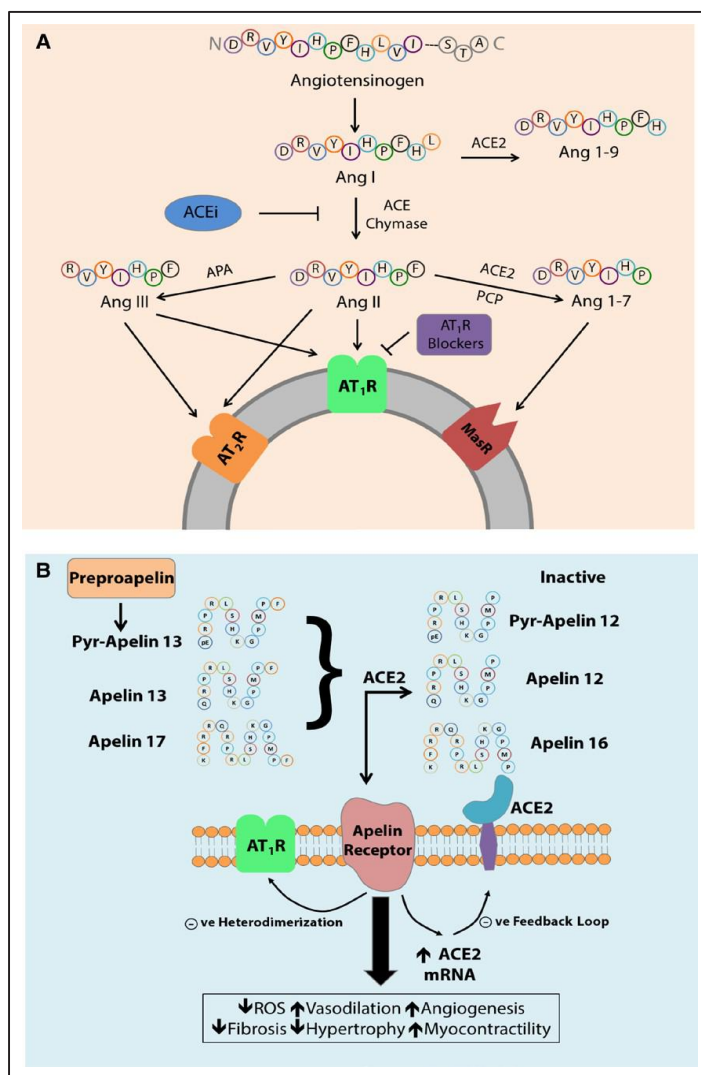


图5 血管紧张素转换酶2在肾素-血管紧张素系统级联反应中的作用及其与非线性肽系统的相互作用

A：血管紧张素原被肾素加工成 Ang I（血管紧张素 I），然后被 ACE 或肥大细胞糜酶进一步切割成 Ang II。血管紧张素 II 主要通过血管紧张素 1 型受体（AT₁R）或血管紧张素 2 型受体（AT₂R）影响心血管系统。另外，血管紧张素 II 可被羧肽酶 ACE2 或 PCP（脯氨酰羧肽酶）降解成 Ang 1-7（血管紧张素 1-7）。Ang 1-7 介导宿主 Mas 受体（MasR）的整个组织的保护作用。Ang 1-7 可以通过 ACE2 在 Ang I 上的活性进一步形成 Ang 1-9，然后被 ACE 或 NEP（中性溶酶）裂解。

B：apelin 肽刺激 apelin 受体导致心血管保护作用，同时通过受体异二聚体整合 AT₁R 破坏 Ang II 信号传导。Apelin 通过 ACE2 的 C 末端苯丙氨酸裂解而失活，而 Apelin 受体的刺激促进 ACE2 mRNA 转录，从而表明 apelin 作为 ACE2 的正向调节剂。ROS 表示活性氧。

ACE2 作为氨基酸转运蛋白 B0AT1 (SLC6A19) 的伴侣蛋白

B0AT1 具有吸收中性氨基酸的功能, 在小肠和肾脏中高表达^[126]。ACE2-B0AT1 复合物组装成异二聚体, ACE2 的 collectrin 样结构域介导同源二聚化^[16]。ACE2 具有不依赖 RAS 的功能、调节肠道氨基酸稳态、抗菌肽和肠道微生物组的表达^[8]。ACE2 对于 Hartnup 转运蛋白在小肠的表达是必需的, 突变体 B0AT1 转运蛋白与 ACE2 在小肠中的不同功能性关联可调节人 Hartnup 疾病的表型异质性^[126]。

ACE2 在心血管病和肺病中的作用

ACE2 与心脏病

心血管疾病是全球首要的死亡原因, 也是主要的公共卫生问题。心脏病的特征是与病理性肥大和适应不良的心室重构相关的几种信号通路的激活。在心脏, ACE2 定位于心肌细胞、心脏成纤维细胞、心外膜脂肪组织和冠状血管内皮^[77,127,128]; Ang1-7/MasR 也存在于心肌细胞、心脏成纤维细胞以及内皮和血管平滑肌细胞^[100,129-131]。遗传性 ACE2 缺失可导致高血压小鼠心脏和肾脏由 Ang II 介导的心肾纤维化和氧化应激加剧, 应用 rhACE2 (重组人 ACE2) 后可以挽救 Ang II 引起的高血压、病理性肥大、氧化损伤和心脏功能障碍^[90,91]。

各种 ACE2 多态性都与 CVD 相关联^[132]。MI 后重塑和冠心病是 HF 的常见原因^[1,133]。值得注意的是, MI 增加人、小鼠和大鼠心脏中 ACE2 mRNA 的表达^[134,135], 而遗传性 ACE2 缺失使 MI 引起的心脏功能障碍、梗塞面积、MMP (基质金属蛋白酶) 2/MMP9 激活和细胞外基质破坏更加恶化^[134,135]。ACE2 的丧失导致梗死和梗死周围区域中性粒细胞浸润的增加, 导致炎症性细胞因子上调: γ -干扰素、IL (白介素) -6、趋化因子 MCP-1 (单核细胞趋化蛋白-1), 导致 ERK1/2 (细胞外信号调节激酶 1/2) 和 JNK1/2 信号通路的磷酸化增加; 被 ARB 阻断后最终导致了心肌功能的改善^[135]。相反, ACE2 的过表达和 Ang1-7 的作用改善了 MI 诱导的心脏重塑^[136,137]。重要的是, 如同在扩张型心肌病患者的植入心脏中所见, ACE2 杂合子丢失足以增加对心脏病的易感性^[138]。

保留射血分数的心力衰竭是一种促炎症状态, 与肥胖相关的心脏和微血管功能障碍密切相关, 目前尚无批准的疗法^[128,139,140]。心外膜脂肪组织是可能对心脏产生不利影响的炎症细胞因子的主要来源^[139]。ACE2 的丧失可使保留射血分数心衰患者的心外膜脂肪组织中的巨噬细胞定向转变为促炎性 M1 表型增多 (或者激活的 CD11c⁺), 而减少了向抗炎性 M2 型巨噬细胞的转变, 并使保留射血分数的心力衰竭在应对饮食诱发的肥胖时恶化^[139]。重要的是, Ang1-7 减少了心外膜脂肪组

织中的巨噬细胞定向转变, 并保留了 ACE2 KO 肥胖小鼠的心脏功能^[128,141]。Ang1-7 在肥胖 2 型糖尿病小鼠的脂肪组织中具有有效的抗炎作用, 并对糖尿病性心肌病和肾病具有保护作用^[141-143]。ACE2/Ang1-7 轴还能促进脂肪组织的褐色变, 从而改善新陈代谢效果和减轻体重, 从而给心血管系统进一步提供益处^[144,145]。

ACE2 与血管病

阻滞 RAS 有害部位一直是高血压患者治疗管理的主要内容。ACE 抑制剂和血管紧张素受体阻滞剂 (ARB) 能增强 ACE2 和 RAS 的血管保护轴, 明显强化了这种观点 (请参阅下面的 RAS 和 ACE2 表达的药理拮抗剂部分)。此外, 增加的 ACE2 表达可预防高血压, 而 ACE2 缺乏会加剧高血压。在高血压实验模型中, 肾脏 ACE2 的表达与血压呈负相关^[25]。与正常的血压 Wistar-Kyoto 大鼠相比, 自发性高血压大鼠和易发中风自发性高血压大鼠的肾脏 ACE2 mRNA 水平下降^[25]。这些研究支持 ACE2 在维持健康血压中的重要作用。慢病毒过度表达的 ACE2 会导致 RAS 降压组件的表达增加并减缓血压升高^[146,147]。用 rhACE2 进行预处理可预防由 Ang II 引起的高血压, 降低血浆 Ang II, 同时升高血浆 Ang1-7 水平^[148]。将所有神经元 (AC-N) 中的 ACE2 和 ADAM17 有选择地敲低, 这表明与血压调节相关的 AC-N 交感神经元的抑制性输入减少。Sim1 神经元上选择性敲低 ACE2 的小鼠在盐敏感性高血压的发生过程中, 表现出血压升高钝化并保留了 ACE2 活性^[14]。金属蛋白酶 ADAM17 负责介导 ACE2 从细胞膜结合结构域脱落, 而 Ang II 可促进这一过程, 并且 ACE2 以可溶形式释放到血浆中^[14,77,149], 损害大脑 ACE2 的代偿活性, 从而促使神经源性高血压的发展^[150]。遗传性 ACE2 缺乏与动脉粥样硬化的可能介质上调相关, 并增强了对促炎性刺激的应答, 提示 ACE2 在抑制血管炎症和动脉粥样硬化中起关键作用^[151]。此外, ACE2 抑制作用还可以阻止神经肽 catestatin 介导的对喂食高脂饮食的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化发展的保护作用^[152]。

ACE2 在糖尿病性心血管并发症中的作用

RAS 轴的 ACE2/Ang1-7/MasR 的负调节作用已在糖尿病并发症 (包括心血管病和肾病) 的进展中得到了很好的鉴定^[1,153,154], 对 ACE2 在糖尿病中重要性的支持来自于其对糖尿病并发症的影响, 其中糖尿病诱导的血管功能异常与 RAS 轴向促纤维化、促炎症迁移, 同时保护臂下降具有强烈的相关性 (图 6)。RAS 保护作用的丧失与组织和循环 Ang II 水平的调节以及糖尿病背景下的后遗症有关^[155,156]。RAS 内的改变被认为是糖尿病性微血管和大血管并发症发展的关键所在^[1,157]。

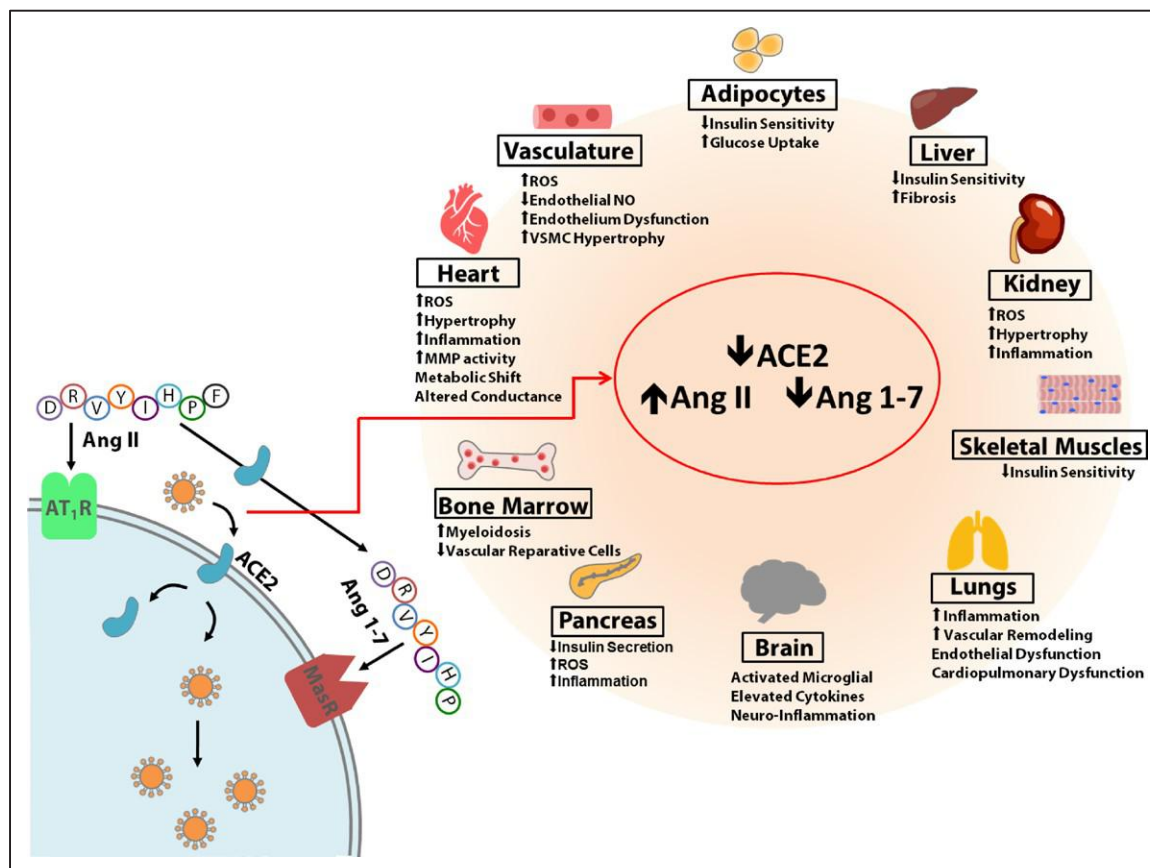


图 6. ACE2 (血管紧张素转化酶 2) 的丢失通过多种疾病机制加剧了糖尿病性心血管并发症。

糖尿病状态下 ACE2 活性的丧失会使 Ang II (血管紧张素 II) 水平升高并降低组织和全身 Ang1-7 的水平。血管紧张素 II/血管紧张素 II 1 型受体 (AT1R) 信号的增加导致各种终端器官的多种病理改变,从而升高了活性氧 (ROS) 并促进了纤维化,肥大和炎症,这是由于 Ang1-7 的保护作用丧失所致。Ang II 刺激还可以全身性地改变受影响组织的代谢谱并调节胰岛素敏感性。

在糖尿病的实验模型和糖尿病患者中,对 RAS 促炎症和促纤维化臂的阻断提供了显著的肾脏保护。尽管 ACE2 的丧失加剧了糖尿病肾损害^[158],但 rhACE2 在糖尿病肾病^[153]和实验性阿尔波特综合征^[159]动物模型中具有治疗作用。T1D 中的 ACE 抑制剂和 T2D 中的氯沙坦和厄贝沙坦对血管紧张素受体的阻滞延迟了肾病的进展^[160]。在糖尿病肾小管中,ACE2 基因表达降低 $\approx 50\%$,这将减少 Ang1-7 的形成并允许 Ang II 的积累,因此直接增加了 TGF- β 和 CTGF (结缔组织生长因子) 的表达,导致肾小管间质纤维化^[161]。如上所述,RAS 阻滞延迟了肾脏损害,而 ACE 抑制剂治疗导致 ACE2 的代偿性增加,从而发挥肾保护作用^[91]。因此,对 ACE2 丧失导致糖尿病的血管并发症的支持来自于有力的临床和实验证据^[1]。

视网膜病变是最常见的糖尿病并发症,也是工作年龄成人失明的主要原因之一,与 RAS 的氧化应激、促纤维化和促炎症臂的激活有关,在实验模型中可以通过 ACE2/Ang1-7 轴来有效减少^[162,163]。骨髓间充质干细胞促炎细胞因子的分泌使其造血功能偏向于产生更多数量的髓样-单核细胞^[164]。糖尿病并发症的靶标组织对高糖诱导的应激应答下分泌 CCL2^[165],促

进了 CCR2⁺细胞归巢到这些区域并促进血管并发症的发展^[166-171]。除了淀粉样变增加,具有并发症的糖尿病患者体内骨髓来源的血管修复细胞和循环血管生成细胞 (CD34⁺细胞) 均下降^[11]。ACE2 mRNA 的水平也是糖尿病患者存在微血管病的重要预测指标^[172]。与年龄、性别和与血糖相匹配的糖尿病视网膜病变患者^[172]相比,那些尽管血糖控制不佳超过 40 年,但仍未发生视网膜病变的糖尿病患者有更高 mRNA 水平的血管保护轴基因 (ACE2/Mas)。在来自糖尿病个体的功能异常的 CD34⁺细胞中,通过将细胞暴露于 Ang1-7 可以通过恢复可利用的 NO 并减少活性氧来纠正其功能障碍。在小鼠视网膜缺血-再灌注损伤模型中,对 CD34⁺细胞的 Ang1-7 基因进行修饰,恢复了这些细胞的体内血管修复功能^[172]。此外,AAV-ACE2 或 Ang1-7 眼内给药减少了糖尿病引起的视网膜血管渗漏和炎症,从而预防了视网膜病变^[163]。

糖尿病患者具有 RAS 失调,可能影响 SARS-CoV-2 对其的致命性。Guan 等检查了 1099 名确诊为 COVID-19 的个体,其中 173 例患有严重疾病,其中 16.2% 为糖尿病患者^[47]。Zhang 等研究了 140 例因 COVID-19 严重感染而住院的患者,

其中 12%患有糖尿病。有趣的是,为什么糖尿病患者比普通人群患 SARS-CoV-2 的风险更高,这可能是由于通常在糖尿病病人和糖尿病动物模型的脉管系统观察到 ACE2 水平降低所致^[173]。确实,ACE2 的丧失与明显的肠道营养不良有关,且在患有 1 型糖尿病模型中会进一步恶化^[11]。

ACE2 与肺部疾病

肺上皮细胞表达高水平的 ACE2,且与气道上皮的分化程度呈正相关^[17,19,174]。在多种动物中已经确定了由多种疾病(包括 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2)引发的 ACE2 参与的 ARDS^[18,175]。ACE2 KO 小鼠表现出严重的 ARDS 病理学状态^[17,19]。另外,Ace 缺陷,或用 AR1R 阻断剂治疗 ACE2 KO 小鼠可将其从 ARDS 中拯救出来的事实,提示了 ACE2 的益处以及保护性与促炎性和促纤维化 RAS 轴之间的关键平衡^[18]。这些发现与脂多糖诱导的 ARDS 猪模型中,rhACE2 对肺血流量和氧合的有益作用的证据相一致^[176]。老年 COVID-19 患者中,年龄相关的肺 ACE2 丧失与死亡率增加和恶化表型具有相关性^[174]。

ACE2 通过诱导 RAS 失衡而参与急性肺损伤。有证据表明,在急性肺损伤中:(1)肺 ACE2 降低和 Ang II 水平升高;(2)补充 ACE2 或抑制 Ang II 可改善预后;(3)缺乏或减少肺 ACE2 加剧了病毒引起的急性肺损伤。ACE2 也参与了 PH 和纤维化^[19]。使用 rhACE2 增加 ACE2 活性可减少博来霉素诱导的炎症和纤维化,从而改善肺功能和活动能力^[19]。而 ACE2 活化剂 DIZE 可保护动物免受 PH 和纤维化的侵害^[177]。此外,口服生物封装形式的 ACE2 可以保护和阻止 PH 的发展^[12]。这种保护作用的验证来自一项小型的人类研究,其表明 PH 的特征是 ACE2 活性降低,给这些个体补充 rhACE2 后改善了肺血液动力学并降低了氧化和炎症标志物^[21]。总体而言,这些研究明确地建立了这样一个概念框架,即 ACE2 在正常肺功能中起关键作用,其失衡会导致肺部疾病。

ACE2 靶向治疗

RAS 的药理学拮抗剂和 ACE2 的表达

RAS 的病理性神经激素激活驱动了 CVD 的发展和进程。目前的药物治疗旨在通过不同的作用方式实现多水平的 RAS 抑制。尽管 ACE2 不是这些疗法的直接细胞靶标,但由于 RAS 的复杂性质,ACE2 基因的转录、翻译和最终的催化活性都得到了修饰。通过限制 Ang II 的形成和作用来阻断 ACE/Ang II/AT1R 轴会增强 ACE2 作为内源性 RAS 负调节剂的作用。ARBS 持续增加心脏、肾脏、胸主动脉中 ACE2

mRNA 的表达、蛋白质水平和催化活性,但在 ACE 抑制剂的实验模型和组织之间,蛋白质和活性的翻译水平不同(表^[77,178-185])。给正常血压的 Lewis 大鼠使用赖诺普利和氯沙坦联合治疗,消除了单独治疗时观察到的 ACE2 mRNA 水平升高,但保留了氯沙坦诱导的心脏 ACE2 活性升高^[179]。此外,血压正常的 Lewis 大鼠中,赖诺普利在不影响心脏 ACE2 活性的情况下增加了 ACE2 mRNA 的表达,但在肾脏中却观察到了相反的情况^[179,180]。这些发现可以归因于 ACE2 调节的组织特异性,如同在 Sprague-Dawley 大鼠心脏中 ACE2 蛋白质水平更高,但在肾脏中的 ACE2 活性却更高^[186]。在 1 型糖尿病 Akita 血管紧张素原转基因小鼠中,培哚普利和氯沙坦的双重 RAS 阻断作用使得肾脏 ACE2 mRNA 表达和蛋白表达水平降低^[187]。这些发现表明,Ang II 在病理条件下的积累是 RAS 阻断对于 ACE2 调节作用的原因。



Ang II 可通过 AT1R 调节 ACE2 的表达。健康的心脏和肾脏高水平表达 ACE2 mRNA 和蛋白以及适量的 ACE^[191]。CVD 中的 RAS 过度活化增加了 Ang II 对 AT1R 的刺激,促进 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路在上调 ACE 表达的同时下调 ACE2 的表达^[191]。p38 MAPK 的激活通过胞浆区的翻译后磷酸化的正反馈回路引起表面 ACE2 脱落,从而上调 ADAM17 活性,并可以解释观察到的 ARB 能增加 ACE2 蛋白水平和活性的结果^[77,80,81]。ACE 抑制剂和 ARB 增强 ACE2 mRNA 表达水平的机制尚待进一步鉴定。此外,盐皮质激素受体拮抗剂能增加来自慢性 HF 患者、野生型小鼠和大鼠样品中 ACE2 mRNA 的表达和活性,且不同组织之间增加的程度不同,但在大鼠高血压模型的心脏中没有增加(表^[188-190])。螺内酯,一种非选择性盐皮质激素受体拮抗剂,可以阻止 ACE 和 AT1R mRNA 水平的升高,并阻止心肌细胞醛固酮信号传导引起的 AT1R 密度的增加^[192,193]。盐皮质激素受体的激活还刺激了与 AT1R 重叠的下游信号通路,包括 ERK1/2 和之前提到的 p38 MAPK 途径^[194,195]。阻止这些信号传导途径有助于观察到盐皮质激素受体拮抗剂对 ACE2 基因表达、表面蛋白水平和活性的影响。

Table. Pharmacological Regulation of the RAS and Their Effects on RAS Components, ACE2 Gene Expression, Protein Levels, and Cellular Activity

Pharmacological Agent	Experimental Model/Subject	Tissues	Observation
ACE inhibitors			
Lisinopril	Lewis rats	Heart	Decrease in plasma Ang II, increase in plasma Ang1-7 and Ace2 mRNA, but not cardiac ACE2 activity ¹⁷⁹
Enalapril	Coronary artery ligation in Sprague Dawley rats	Heart	Increased plasma and cardiac ACE2 activity, and cardiac Ace2 mRNA levels 8 wk post-surgery ¹⁸³
Lisinopril	Transgenic Ren2 rats	Heart/Kidney	Decrease in plasma Ang II, increase in plasma Ang1-7, cardiac and renal Ace2 mRNA and activity ¹⁸²
Lisinopril	Lewis rats	Kidney	No change in kidney Ace2 mRNA but increased ACE2 activity ¹⁸⁰
Angiotensin receptor blockers			
Losartan/ Olmesartan	Coronary artery ligation in Lewis rats	Heart	Increase in plasma Ang II, Ang1-7 and Ace2 mRNA 28 days post surgery ¹⁷⁸
Losartan	Lewis rats	Heart	Increase in plasma Ang II, Ang1-7 levels, Ace2 mRNA and cardiac ACE2 activity ¹⁷⁹
Irbesartan	C57BL/6 mice	Heart	Increase in cardiac Ace2 mRNA, Irbesartan prevented Ang II-induced decrease in ACE2 protein levels ⁷⁷
Losartan	Transgenic Ren2 rats	Heart/Kidney	Increase in plasma Ang II, Ang1-7, cardiac and renal Ace2 mRNA and activity ¹⁸²
Telmisartan	C57BLKS/J mice	Kidney	Following 2 wk administration, increased ACE2 protein levels, and Ace2 mRNA expression ¹⁸⁴
Irbesartan	C57BL/6 mice	Aorta	Treatment with irbesartan significantly augmented ACE2 protein levels and Ace2 mRNA expression ¹⁸⁵
Olmesartan	Spontaneously hypertensive rats	Aorta	Increased plasma Ang II and Ang1-7 levels, Ace2 mRNA expression and ACE2 protein levels ¹⁸¹
Mineralocorticoid receptor blockers			
Spironolactone	Patients with heart failure	Monocytederived macrophage	Increase in ACE2 activity and ACE2 mRNA expression 1-month post-therapy ¹⁸⁸
Eplerenone	Balb/C mice	Heart/Kidney	Increase in cardiac ACE2 activity and Ace2 mRNA expression but nonsignificant increase in the kidneys ¹⁸⁸
Eplerenone	Wistar rats	Heart	Prevented aldosterone induced reduction in cardiac Ace2 mRNA expression ¹⁸⁹
Eplerenone	Dahl salt-sensitive hypertensive rats	Heart	No effect on cardiac Ace2 mRNA expression and protein levels observed in DS rats ¹⁹⁰

ACE indicates angiotensin-converting enzyme; and RAS, renin-angiotensin system.

增强 ACE2 作用

rhACE2 或 Ang1-7 受体激动剂 AVE 0991 对 ACE2/Ang1-7/Mas 信号传导的促进可对多种病因的 CVD 和肺部疾病产生有益的治疗作用^[1]。已显示 Ang1-7 受体激动剂 AVE 0991 可发挥心肾和肺保护作用^[88]，并且 rhACE2 治疗可改善多种临床前模型中的急性肺损伤、CVD 和肾损伤的症状^[17,87,88,90]。通过维持 ACE2/Ang1-7/MasR 的负反向调节水平，可维持 CVD 患者或易患常见 CVD（诸如糖尿病、高血压和肥胖症等）个体

的 ACE2 水平，并在这些患者感染 SARS-CoV-2 的情况下阻止合并症的发展。

rhACE2 在功能上可隔离循环的病毒颗粒，以防止 S 蛋白与内源性 ACE2 相互作用，同时调节全身 RAS，这可能在 COVID-19 中提供治疗益处，并且正在进入欧洲的 II 期临床试验^[196]。rhACE2 的潜在局限性是由于其分子较大，限制了其抗组织 RAS 的渗透性和活性。特别是药理学 RAS 阻断剂 ARB 能够调节全身和组织 RAS，在实验模型中同时增加 ACE2 的

表达和活性。在 COVID-19 感染的高血压患者中, RAS 抑制的直接意义仍然难以捉摸, 急需临床证据来确定使用这些药物的相对获益和风险^[197]。尽管如此, 给已经感染 SARS-CoV-2 的患者使用 ARB 可能是一种有效的解决病毒介导的 RAS 失衡的治疗方法, 目前正在一些临床试验中进行研究 (www.ClinicalTrial.gov, 编号 NCT04312009, NCT04311177 和 NCT04318418) ^[198-200]。

通过使用益生菌 *Lactobacillus paracasei* (LP), 也可以促进 ACE2 用于治疗潜力, 该益生菌种可以基因工程形式表达重组蛋白。用表达分泌型 ACE2 霍乱毒素无毒亚基 B (充当载体以促进跨粘膜转运) 融合蛋白的重组 LP 处理小鼠, 显示血清和组织中 ACE2 活性增加, 糖尿病性视网膜病减轻^[201]。这些结果为进一步使用生物工程益生菌作为活载体递送 ACE2 提供了概念验证, 其用于治疗糖尿病并发症时具有增强的组织生物利用度, 也可能用于治疗 CVD 和 COVID-19 感染。

结论

自从 2000 年发现 ACE2 以来, 在阐明其生物化学作用和 CVD 中的基本角色, 以及最近作为 SARS-CoV-2 受体方面, 都取得了巨大的进步。ACE2 是通过将 Ang II 代谢成有益肽 Ang1-7, 从而对 RAS 发挥负调控的主要机制, 并且正在利用这一重要的生物化学和生理学特性, 以作为 HF 患者的潜在疗法。由于 SARS-CoV-2 与 ACE2 的结合而导致的 RAS 轴激活, 导致了 ACE2 的直接丧失, 以及通过蛋白水解加工和脱落的间接作用, 部分地驱动了 COVID-19 的全身性症状和体征。对这些患者需要仔细靶向 RAS 轴以优化其临床结局, 包括使用 AT1 受体阻滞剂 (ARB)。



参考文献

- Patel VB, Zhong JC, Grant MB, Oudit GY. Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 axis of the renin-Angiotensin system in heart failure. *Circ Res*. 2016;118:1313-1326. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.307708
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of Angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000;275:33238-33243. doi: 10.1074/jbc.M002615200
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, et al. A novel Angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87:E1-E9. doi: 10.1161/01.res.87.5.e1
- Wang K, Ghebraw M, Oudit GY. Angiotensin converting enzyme 2: a double-edged sword. *Circulation*. 2020. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047049
- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003; 426:450-454. doi: 10.1038/nature02145
- Turner AJ, Hiscox JA, Hooper NM. ACE2: from vaso-peptidase to SARS virus receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:291-294. doi: 10.1016/j.tips.2004.04.001
- Clarke NE, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2: the first decade. *Int J Hypertens*. 2012;2012:307315. doi: 10.1155/2012/307315
- Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, Trichereau J, Ishiguro H, Paolino M, Sigl V, Hanada T, Hanada R, Lipinski S, et al. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature*. 2012;487: 477-481. doi: 10.1038/nature11228
- Qi Y, Kim S, Richards EM, Raizada MK, Pepine CJ. Gut microbiota: potential for a unifying hypothesis for prevention and treatment of hypertension. *Circ Res*. 2017;120:1724-1726. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310734
- Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, Kim S, Yang T, Shenoy V, Cole-Jeffrey CT, Lobaton GO, Stewart DC, Rubiano A, et al. Hypertension-linked pathophysiological alterations in the gut. *Circ Res*. 2017;120: 312-323. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309006
- Duan Y, Prasad R, Feng D, Beli E, Li Calzi S, Longhini ALF, Lamendella R, Floyd JL, Dupont M, Niothi SK, et al. Bone marrow-derived cells restore functional integrity of the gut epithelial and vascular barriers in a model of diabetes and ACE2 deficiency. *Circ Res*. 2019;125: 969-988. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315743
- Shenoy V, Kwon KC, Rathinasabapathy A, Lin S, Jin G, Song C, Shil P, Nair A, Qi Y, Li Q, et al. Oral delivery of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-(1-7) bioencapsulated in plant cells attenuates pulmonary hypertension. *Hypertension*. 2014;64:1248-1259. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03871
- Basu R, Poglitsch M, Yogasundaram H, Thomas J, Rowe BH, Oudit GY. Roles of Angiotensin peptides and recombinant human ACE2 in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69:805-819. doi: 10.1016/j.jacc.2016.11.064
- Mukerjee S, Gao H, Xu J, Sato R, Zsombok A, Lazartigue E. ACE2 and ADAM17 interaction regulates the activity of presympathetic neurons. *Hypertension*. 2019;74:1181-1191. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13133
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181:281-292. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058
- Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020;367:1444-1448. doi: 10.1126/science.abb2762

17. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*. 2005;436:112-116. doi: 10.1038/nature03712
18. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, Huan Y, Yang P, Zhang Y, Deng W, et al. A crucial role of Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005;11:875-879. doi: 10.1038/nm1267
19. Rey-Parra GJ, Vadivel A, Coltan L, Hall A, Eaton F, Schuster M, Loibner H, Penninger JM, Kassiri Z, Oudit GY, et al. Angiotensin converting enzyme 2 abrogates bleomycin-induced lung injury. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90:637-647. doi: 10.1007/s00109-012-0859-2
20. Kim S, Rigatto K, Gazzana MB, Knorst MM, Richards EM, Pepine CJ, Raizada MK. Altered gut microbiome profile in patients with pulmonary arterial hypertension. *Hypertension*. 2020;75:1063-1071. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14294
21. Hemnes AR, Rathinasabapathy A, Austin EA, Brittain EL, Carrier EJ, Chen X, Fessel JP, Fike CD, Fong P, Fortune N, et al. A potential therapeutic role for Angiotensin-converting enzyme 2 in human pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2018;51:1702638.
22. Khan A, Benthin C, Zeno B, Albertson TE, Boyd J, Christie JD, Hall R, Poirier G, Ronco JJ, Tidswell M, et al. A pilot clinical trial of recombinant human Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*. 2017;21:234. doi: 10.1186/s13054-017-1823-x
23. Bernstein KE, Xiao HD, Frenzel K, Li P, Shen XZ, Adams JW, Fuchs S. Six truths concerning ACE and the renin-Angiotensin system deduced from the genetic analysis of mice. *Circ Res*. 2005;96:1135-1144. doi: 10.1161/01.RES.0000169536.73576.66
24. Page IH, Helmer OM. Angiotensin-activator, renin- and Angiotensin-inhibitor, and the mechanism of Angiotensin tachyphylaxis in normal, hypertensive, and nephrectomized animals. *J Exp Med*. 1940;71:495-519. doi: 10.1084/jem.71.4.495
25. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002;417:822-828. doi: 10.1038/nature00786
26. Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med*. 1956;103:295-299. doi: 10.1084/jem.103.3.295
27. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. 1934;59:347-379. doi: 10.1084/jem.59.3.347
28. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of Angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in Angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*. 2004;383:45-51. doi: 10.1042/BJ20040634
29. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579:270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7
30. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395:1054-1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3
31. Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*. 2005;309:1864-1868. doi: 10.1126/science.1116480
32. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020;367:1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507
33. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:439-450. doi: 10.1038/nrmicro2147
34. Künkel F, Herrler G. Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology*. 1993;195:195-202. doi: 10.1006/viro.1993.1360
35. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967;57:933-940. doi: 10.1073/pnas.57.4.933
36. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395:507-513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7
37. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, Cheng Z, Xiong Y, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020;323:1061-1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585
38. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395:497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
39. Ding Y, He L, Zhang Q, Huang Z, Che X, Hou J, Wang H, Shen H, Qiu L, Li Z, et al. Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J Pathol*. 2004;203:622-630. doi: 10.1002/path.1560
40. Gu J, Gong E, Zhang B, Zheng J, Gao Z, Zhong Y, Zou W, Zhan J, Wang S, Xie Z, et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med*. 2005;202:415-424. doi: 10.1084/jem.20050828
41. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, Meng J, Zhu Z, Zhang Z, Wang J, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020;27:325-328. doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001
42. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 [published online March 30, 2020]. *Nature*. doi: 10.1038/s41586-020-2179-y. Available at nature.com/articles/s41586-020-2179-y.
43. Millet JK, Whittaker GR. Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res*. 2015;202:120-134. doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.021

44. da Silva JS, Gabriel-Costa D, Wang H, Ahmad S, Sun X, Varagic J, Sudo RT, Ferrario CM, Dell'Italia LJ, Sudo GZ, et al. Blunting of cardioprotective actions of estrogen in female rodent heart linked to altered expression of cardiac tissue chymase and ACE2. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2017;18:1470320317722270. doi: 10.1177/1470320317722270
45. Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, Wang Z, Li J, Li J, Feng C, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci.* 2020;63:364-374. doi: 10.1007/s11427-020-1643-8
46. Oudit GY, Kassiri Z, Jiang C, Liu PP, Poutanen SM, Penninger JM, Butany J. SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS. *Eur J Clin Invest.* 2009;39:618-625. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02153.x
47. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, et al; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China [published online February 28, 2020]. *N Engl J Med.* doi: 10.1056/NEJMoa2002032. Available at nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2002032.
48. Kuster GM, Pfister O, Burkard T, Zhou Q, Twerenbold R, Haaf P, Widmer AF, Osswald S. SARS-CoV2: should inhibitors of the renin-Angiotensin system be withdrawn in patients with covid-19? [published online March 20, 2020]. *Eur Heart J.* doi: 10.1093/eurheartj/ehaa235. Available at academic.oup.com/eurheartj/article/doi/10.1093/eurheartj/ehaa235/5810479.
49. Inciardi RM, Lupi L, Zacccone G, Italia L, Raffo M, Tomasoni D, Cani DS, Cerini M, Farina D, Gavazzi E, et al. Cardiac involvement in a patient with Coronavirus disease 2019 (COVID-19) [published online March 27, 2020]. *JAMA Cardiol.* doi: 10.1001/jamacardio.2020.1096. Available at jamanetwork.com/journals/jamacardiology/fullarticle/2763843.
50. Shi S, Qin M, Shen B, Cai Y, Liu T, Yang F, Gong W, Liu X, Liang J, Zhao Q, et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China [published online March 25, 2020]. *JAMA Cardiol.* doi: 10.1001/jamacardio.2020.0950. Available at jamanetwork.com/journals/jamacardiology/fullarticle/2763524.
51. Clerkin KJ, Fried JA, Raikhelkar J, Sayer G, Griffin JM, Masoumi A, Jain SS, Burkhoff D, Kumaraiah D, Rabbani L, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) and cardiovascular disease [published online March 21, 2020]. *Circulation.* doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046941. Available at ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046941.
52. Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, Wang H, Wan J, Wang X, Lu Z. Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) [published online March 27, 2020]. *JAMA Cardiol.* doi: 10.1001/jamacardio.2020.1017. Available at jamanetwork.com/journals/jamacardiology/fullarticle/2763845.
53. Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J, Xing F, Liu J, Yip CC, Poon RW, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet.* 2020;395:514-523. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9
54. Cheng PK, Wong DA, Tong LK, Ip SM, Lo AC, Lau CS, Yeung EY, Lim WW. Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2004;363:1699-1700. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16255-7
55. Leung WK, To KF, Chan PK, Chan HL, Wu AK, Lee N, Yuen KY, Sung JJ. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology.* 2003;125:1011-1017. doi: 10.1016/S0016-5085(03)01215-0
56. Zhou J, Li C, Zhao G, Chu H, Wang D, Yan HH, Poon VK, Wen L, Wong BH, Zhao X, et al. Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Sci Adv.* 2017;3:eaa04966. doi: 10.1126/sciadv.aao4966
57. Santisteban MM, Kim S, Pepine CJ, Raizada MK. Brain-gut-bone marrow axis: implications for hypertension and related therapeutics. *Circ Res.* 2016;118:1327-1336. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.307709
58. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X, Yin H, Xiao Q, Tang Y, Qu X, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:434-435. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30083-2
59. Yeoa C, Kaushala S, Yeoa D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible? *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:335-337.
60. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol.* 2004;203:631-637. doi: 10.1002/path.1570
61. Beli E, Yan Y, Moldovan L, Vieira CP, Gao R, Duan Y, Prasad R, Bhatwadekar A, White FA, Townsend SD, et al. Restructuring of the gut microbiome by intermittent fasting prevents retinopathy and prolongs survival in db/db mice. *Diabetes.* 2018;67:1867-1879. doi: 10.2337/db18-0158
62. Vallianou NG, Stratigou T, Tsagarakis S. Microbiome and diabetes: where are we now? *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;146:111-118. doi: 10.1016/j.diabres.2018.10.008
63. Budden KF, Gellatly SL, Wood DL, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, Hansbro PM. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15:55-63. doi: 10.1038/nrmicro.2016.142
64. Iyer SN, Lu D, Katovich MJ, Raizada MK. Chronic control of high blood pressure in the spontaneously hypertensive rat by delivery of Angiotensin type 1 receptor antisense. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9960-9965. doi: 10.1073/pnas.93.18.9960
65. Qi Y, Goel R, Kim S, Richards EM, Carter CS, Pepine CJ, Raizada MK, Buford TW. Intestinal permeability biomarker zonulin is elevated in healthy aging. *J Am Med Dir Assoc.* 2017;18:810.e1-810.e4. doi: 10.1016/j.jamda.2017.05.018
66. Sharma RK, Yang T, Oliveira AC, Lobaton GO, Aquino V, Kim S, Richards EM, Pepine CJ, Sumners C, Raizada MK. Microglial cells impact gut microbiota and gut pathology in Angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res.* 2019;124:727-736. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313882
67. Cole-Jeffrey CT, Liu M, Katovich MJ, Raizada MK, Shenoy V. ACE2 and microbiota: emerging targets for cardiopulmonary disease therapy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2015;66:540-550. doi: 10.1097/FJC.0000000000000307

68. Oliveira AC, Richards EM, Raizada MK. Pulmonary hypertension: patho- physiology beyond the lung. *Pharmacol Res.* 2020;151:104518. doi: 10.1016/j.phrs.2019. 104518
69. Syvanen M. Churning out safer microbes for drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2003;21:758-759. doi: 10.1038/nbt0703-758
70. Steidler L. Genetically engineered probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroen- terol.* 2003;17:861-876. doi: 10.1016/s1521-6918(03)00072-6
71. Bron PA, Kleerebezem M. Lactic acid bacteria for delivery of endogenous or engineered therapeutic molecules. *Front Microbiol.* 2018;9:1821. doi: 10.3389/fmicb.2018.01821
72. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997;385:729-733. doi: 10.1038/385729a0
73. Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, et al. Cloning of a disintegrin metallo- proteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature.* 1997;385:733-736. doi: 10.1038/385733a0
74. Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:654-659. doi: 10.1016/s0955-0674(98)80042-2
75. Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010;45:146-169. doi: 10.3109/10409 231003628015
76. Fan D, Takawale A, Shen M, Wang W, Wang X, Basu R, Oudit GY, Kassiri Z. Cardiomyocyte a disintegrin and metalloproteinase 17 (adam17) is essential in post-myocardial infarction repair by regulating Ang Iogenesis. *Circ Heart Fail.* 2015;8:970-979. doi: 10.1161/CIRCHEAR TFAILURE.114.002029
77. Patel VB, Clarke N, Wang Z, Fan D, Parajuli N, Basu R, Putko B, Kassiri Z, Turner AJ, Oudit GY. Ang Iotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feed- back mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;66:167-176. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.017
78. Shen M, Hu M, Fedak PWM, Oudit GY, Kassiri Z. Cell-specific functions of ADAM17 regulate the progression of thoracic aortic aneurysm. *Circ Res.* 2018;123:372-388. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313181
79. Epelman S, Tang WH, Chen SY, Van Lente F, Francis GS, Sen S. Detec- tion of soluble Ang Iotensin-converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin-Ang Io- tensin-aldosterone system. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:750-754. doi: 10.1016/j.jacc.2008.02.088
80. Scott AJ, O'Dea KP, O'Callaghan D, Williams L, Dokpesi JO, Tatton L, Handy JM, Hogg PJ, Takata M. Reactive oxygen species and p38 mitogen-acti- vated protein kinase mediate tumor necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM-17) activation in primary human monocytes. *J Biol Chem.* 2011;286:35466-35476. doi: 10.1074/jbc.M111.277434
81. Xu P, Derynck R. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell.* 2010;37:551-566. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.034
82. Xu J, Sriramula S, Xia H, Moreno-Walton L, Culicchia F, Domenig O, Poglitsch M, Lazartigues E. Clinical relevance and role of neuronal AT1 re- ceptors in ADAM17-mediated ACE2 shedding in neurogenic hypertension. *Circ Res.* 2017;121:43-55. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310509
83. Wang H, Yang P, Liu K, Guo F, Zhang Y, Zhang G, Jiang C. SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin-and caveolae- independent endocytic pathway. *Cell Res.* 2008;18:290-301. doi: 10.1038/cr.2008.15
84. Haga S, Yamamoto N, Nakai-Murakami C, Osawa Y, Tokunaga K, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka Y. Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF- alpha production and facilitates viral entry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:7809-7814. doi: 10.1073/pnas.0711241105
85. Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pöhlmann S. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syn- drome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:7988-7993. doi: 10.1073/pnas.0409465102
86. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural stud- ies of SARS. *J Virol.* 2020;94:e00127-20. doi: 10.1128/JVI.00127-20
87. Kuba K, Imai Y, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Trilogy of ACE2: a pep- tidase in the renin-Ang Iotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol Ther.* 2010;128:119-128. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.06.003
88. Jia H. Pulmonary Ang Iotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and inflam- matory lung disease. *Shock.* 2016;46: 239-248. doi: 10.1097/SHK. 0000000000000633
89. Ye R, Liu Z. ACE2 exhibits protective effects against LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the LPS-TLR4 pathway. *Exp Mol Pathol.* 2020;113:104350. doi: 10.1016/j.yexmp.2019.104350
90. Zhong J, Basu R, Guo D, Chow FL, Byrns S, Schuster M, Loibner H, Wang XH, Penninger JM, Kassiri Z, et al. Ang Iotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation.* 2010;122:717-728, 18 p following 728. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.955369
91. Zhong J, Guo D, Chen CB, Wang W, Schuster M, Loibner H, Penninger JM, Scholey JW, Kassiri Z, Oudit GY. Prevention of Ang Iotensin II- mediated renal oxidative stress, inflammation, and fibrosis by Ang Io- tensin-converting enzyme 2. *Hypertension.* 2011;57:314-322. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164244
92. Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ, Santos RA, Walther T, Touyz RM, Reudelhuber TL. Ang Iotensin(1-7) blunts hy- pertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res.* 2008; 103:1319-1326. doi: 10.1161/CIRCRESAHA. 108.184911
93. Oudit GY, Penninger JM. Recombinant human Ang Iotensin-converting en- zyme 2 asa new renin-Ang Iotensin system peptidase for heart failure therapy. *Curr Heart Fail Rep.* 2011;8:176-183. doi: 10.1007/s11897-011-0063-7
94. Alenina N, Xu P, Rentzsch B, Patkin EL, Bader M. Genetically altered animal models for Mas and Ang Iotensin-(1-7). *Exp Physiol.* 2008;93:528-537. doi: 10.1113/expphy siol.2007.040345

95. Bader M. ACE2, Ang Iotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Arch.* 2013;465:79-85. doi: 10.1007/s00424-012-1120-0
96. Santos RAS, Oudit GY, Verano-Braga T, Canta G, Steckelings UM, Bader M. The renin-Ang Iotensin system: going beyond the classical paradigms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019;316:H958-H970. doi: 10.1152/ajpheart.00723.2018
97. Chappell MC. Emerging evidence for a functional Ang Iotensin-con-verting enzyme 2-Ang Iotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension.* 2007;50:596-599. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.076216
98. Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC. Ang Iotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-Ang Iotensin system. *Hypertension.* 1998;31:356-361. doi: 10.1161/01.hyp.31.1.356
99. Dell'Italia LJ, Collawn JF, Ferrario CM. Multifunctional role of chymase in acute and chronic tissue injury and remodeling. *Circ Res.* 2018;122:319-336. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310978
100. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Ang Iotensin-(1-7) through receptor Mas me- diates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension.* 2007;49:185-192. doi: 10.1161/01.HYP.0000251865.35728.2f
101. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, et al. Ang Iotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8258-8263. doi: 10.1073/pnas.1432869100
102. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Ang Iotensin-(1-7) inhib-its growth of cardiac myocytes through activation of the mas recep-tor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1560-H1566. doi: 10.1152/ajpheart.00941.2004
103. Zhang Y, Li B, Wang B, Zhang J, Wu J, Morgan T. Alteration of car-diac ACE2/Mas expression and cardiac remodelling in rats with aortic constriction. *Chin J Physiol.* 2014;57:335-342. doi: 10.4077/CJP. 2014.BAD268
104. Flores-Muñoz M, Godinho BM, Almalik A, Nicklin SA. Adenoviral delivery of Ang Iotensin-(1-7) or Ang Iotensin-(1-9) inhibits cardiomyocyte hypertrophy via the mas or Ang Iotensin type 2 receptor. *PLoS One.* 2012;7:e45564. doi: 10.1371/journal.pone.0045564
105. Flores-Munoz M, Work LM, Douglas K, Denby L, Dominiczak AF, Graham D, Nicklin SA. Ang Iotensin-(1-9) attenuates cardiac fibro-sis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the an-giotensin type 2 receptor. *Hypertension.* 2012;59:300-307. doi: 10.1161/ HYPERTENSIONAHA.111.177485
106. Ocaranza MP, Lavandero S, Jalil JE, Moya J, Pinto M, Novoa U, Apablaza F, Gonzalez L, Hernandez C, Varas M, et al. Ang Iotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens.* 2010;28:1054-1064. doi: 10.1097/hjh.0b013e328335d291
107. Ocaranza MP, Rivera P, Novoa U, Pinto M, González L, Chiong M, Lavandero S, Jalil JE. Rho kinase inhibition activates the homologous Ang Iotensin- converting enzyme-Ang Iotensin-(1-9) axis in experimental hypertension. *J Hypertens.* 2011;29:706-715. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833440665
108. Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:93-101. doi: 10.1016/s1050-1738(02)00233-5
109. Lo J, Patel VB, Wang Z, Levasseur J, Kaufman S, Penninger JM, Oudit GY. Ang Iotensin-converting enzyme 2 antagonizes Ang Iotensin II-induced pressor response and NADPH oxidase activation in Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol.* 2013;98:109-122. doi: 10.1113/expphysiol.2012.067165
110. Oudit GY, Kassiri Z, Patel MP, Chappell M, Butany J, Backx PH, Tsushima RG, Scholey JW, Khokha R, Penninger JM. Ang Iotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice. *Cardiovasc Res.* 2007;75:29-39. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.04.007
111. Patel VB, Bodiga S, Fan D, Das SK, Wang Z, Wang W, Basu R, Zhong J, Kassiri Z, Oudit GY. Cardioprotective effects me-diated by Ang Iotensin II type 1 receptor blockade and enhancing Ang Iotensin 1-7 in experimental heart failure in Ang Iotensin-converting enzyme 2-null mice. *Hypertension.* 2012;59:1195-1203. doi: 10.1161/ HYPERTENSIONAHA.112.191650
112. Danilczyk U, Penninger JM. Ang Iotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res.* 2006;98:463-471. doi: 10.1161/01. RES.0000205761. 22353.5f
113. Patel VB, Takawale A, Ramprasath T, Das SK, Basu R, Grant MB, Hall DA, Kassiri Z, Oudit GY. Antagonism of Ang Iotensin 1-7 prevents the therapeu- tic effects of recombinant human ACE2. *J Mol Med (Berl).* 2015;93:1003-1013. doi: 10.1007/s00109-015-1285-z
114. Zhong JC, Zhang ZZ, Wang W, McKinnie SMK, Vederas JC, Oudit GY. Targeting the apelin pathway as a novel therapeutic approach for cardio- vascular diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863:1942-1950. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.007
115. Pitkin SL, Maguire JJ, Bonner TI, Davenport AP. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev.* 2010;62:331-342. doi: 10.1124/pr.110.002949
116. Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2006;8:355-360. doi: 10.1016/j.ejheart.2005.10.007
117. Chen MM, Ashley EA, Deng DX, Tsalenko A, Deng A, Tabibiazar R, Ben-Dor A, Fenster B, Yang E, King JY, et al. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation.* 2003;108:1432-1439. doi: 10.1161/01.CIR.0000091235.94914.75
118. Przewlocka-Kosmala M, Kotwica T, Mysiak A, Kosmala W. Reduced circulating apelin in essential hypertension and its association withcardiac dysfunction. *J Hypertens.* 2011;29:971-979. doi: 10.1097/HJH.0b013e328344da76
119. Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, Leschnik M, Leibbrandt A, Markovic M, Makovic M, et al. Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res.* 2007;101:e32-e42. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107. 158659
120. Wang W, McKinnie SM, Patel VB, Haddad G, Wang Z, Zhabeyev P, Das SK, Basu R, McLean B, Kandam V, et al. Loss of Apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic Apelin analogues. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000249. doi: 10.1161/JAHA.113.000249

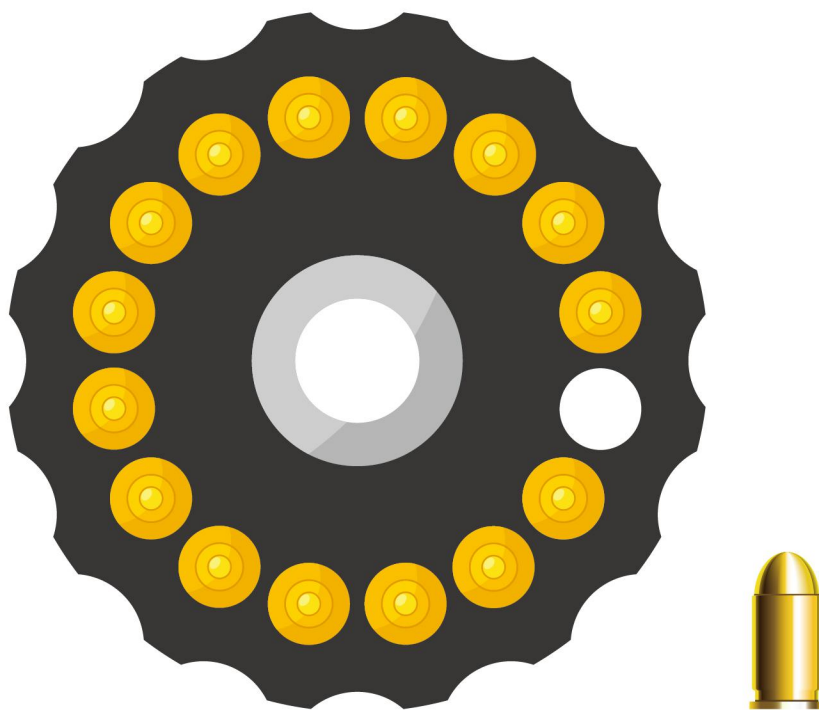
121. Sato T, Suzuki T, Watanabe H, Kadowaki A, Fukamizu A, Liu PP, Kimura A, Ito H, Penninger JM, Imai Y, et al. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *J Clin Invest*. 2013;123:5203-5211. doi: 10.1172/JCI69608
122. Siddiquee K, Hampton J, McAnally D, May L, Smith L. The apelin receptor inhibits the Angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br J Pharmacol*. 2013;168:1104-1117. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02192.x
123. Zhang ZZ, Wang W, Jin HY, Chen X, Cheng YW, Xu YL, Song B, Penninger JM, Oudit GY, Zhong JC. Apelin is a negative regulator of Angiotensin II-mediated adverse myocardial remodeling and dysfunction. *Hypertension*. 2017;70:1165-1175. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10156
124. Wang W, Shen M, Fischer C, Basu R, Hazra S, Couvineau P, Paul M, Wang F, Toth S, Mix DS, et al. Apelin protects against abdominal aortic aneurysm and the therapeutic role of neutral endopeptidase resistant apelin analogs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116:13006-13015. doi: 10.1073/pnas.1900152116
125. Wang W, McKinnie SM, Farhan M, Paul M, McDonald T, McLean B, Llorens-Cortes C, Hazra S, Murray AG, Vederas JC, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 metabolizes and partially inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: physiological effects in the cardiovascular system. *Hypertension*. 2016;68:365-377. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06892
126. Camargo SM, Singer D, Makrides V, Huggel K, Pos KM, Wagner CA, Kuba K, Danilczyk U, Skovby F, Kleiter R, et al. Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and collectrin differentially interact with hartnup mutations. *Gastroenterology*. 2009;136:872-882. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.055
127. Patel VB, Zhong JC, Fan D, Basu R, Morton JS, Parajuli N, McMurtry MS, Davidge ST, Kassiri Z, Oudit GY. Angiotensin-converting enzyme 2 is a critical determinant of Angiotensin II-induced loss of vascular smooth muscle cells and adverse vascular remodeling. *Hypertension*. 2014;64:157-164. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03388
128. Patel VB, Mori J, McLean BA, Basu R, Das SK, Ramprasath T, Parajuli N, Penninger JM, Grant MB, Lopaschuk GD, et al. ACE2 deficiency worsens epicardial adipose tissue inflammation and cardiac dysfunction in response to diet-induced obesity. *Diabetes*. 2016;65:85-95. doi: 10.2337/db15-0399
129. Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in Angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*. 2006;47:996-1002. doi: 10.1161/01.HYP.0000215289.51180.5c
130. Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates Angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. 2007;50:1093-1098. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.084848
131. Iwata M, Cowling RT, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan JX, Greenberg BH. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H2356-H2363. doi: 10.1152/ajpheart.00317.2005
132. Patel SK, Velkoska E, Freeman M, Wai B, Lancefield TF, Burrell LM. From gene to protein-experimental and clinical studies of ACE2 in blood pressure control and arterial hypertension. *Front Physiol*. 2014;5:227. doi: 10.3389/fphys.2014.00227
133. Gheorghiade M, Sopko G, De Luca L, Velazquez EJ, Parker JD, Binkley PF, Sadowski Z, Golba KS, Prior DL, Rouleau JL, et al. Navigating the crossroads of coronary artery disease and heart failure. *Circulation*. 2006;114:1202-1213. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.623199
134. Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, Tikellis C, Grant SL, Lew RA, Smith AI, et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J*. 2005;26:369-375; discussion 322. doi: 10.1093/eurheartj/ehi114
135. Kassiri Z, Zhong J, Guo D, Basu R, Wang X, Liu PP, Scholey JW, Penninger JM, Oudit GY. Loss of Angiotensin-converting enzyme 2 accelerates maladaptive left ventricular remodeling in response to myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2009;2:446-455. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.840124
136. Qi YF, Zhang J, Wang L, Shenoy V, Krause E, Oh SP, Pepine CJ, Katovich MJ, Raizada MK. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits high-mobility group box 1 and attenuates cardiac dysfunction post-myocardial ischemia. *J Mol Med*. 2016;94:37-49.
137. Wang Y, Qian C, Roks AJ, Westermann D, Schumacher SM, Escher F, Schoemaker RG, Reudelhuber TL, van Gilst WH, Schultheiss HP, et al. Circulating rather than cardiac Angiotensin-(1-7) stimulates cardioprotection after myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2010;3:286-293. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.905968
138. Wang W, Patel VB, Parajuli N, Fan D, Basu R, Wang Z, Ramprasath T, Kassiri Z, Penninger JM, Oudit GY. Heterozygote loss of ACE2 is sufficient to increase the susceptibility to heart disease. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92:847-858. doi: 10.1007/s00109-014-1149-y
139. Patel VB, Shah S, Verma S, Oudit GY. Epicardial adipose tissue as a metabolic transducer: role in heart failure and coronary artery disease. *Heart Fail Rev*. 2017;22:889-902. doi: 10.1007/s10741-017-9644-1
140. Packer M. Epicardial adipose tissue may mediate deleterious effects of obesity and inflammation on the myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:2360-2372. doi: 10.1016/j.jacc.2018.03.509
141. Patel VB, Basu R, Oudit GY. ACE2/Ang 1-7 axis: A critical regulator of epicardial adipose tissue inflammation and cardiac dysfunction in obesity. *Adipocyte*. 2016;5:306-311. doi: 10.1080/21623945.2015.1131881
142. Mori J, Patel VB, Abo Alrob O, Basu R, Altamimi T, Desaulniers J, Wagg CS, Kassiri Z, Lopaschuk GD, Oudit GY. Angiotensin 1-7 ameliorates diabetic cardiomyopathy and diastolic dysfunction in db/db mice by reducing lipotoxicity and inflammation. *Circ Heart Fail*. 2014;7:327-339. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000672
143. Mori J, Patel VB, Ramprasath T, Alrob OA, Desaulniers J, Scholey JW, Lopaschuk GD, Oudit GY. Angiotensin 1-7 mediates renoprotection against diabetic nephropathy by reducing oxidative stress, inflammation, and lipotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306:F812-F821. doi: 10.1152/ajprenal.00655.2013

144. Morimoto H, Mori J, Nakajima H, Kawabe Y, Tsuma Y, Fukuhara S, Kodo K, Ikoma K, Matoba S, Oudit GY, et al. Angiotensin 1-7 stimulates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018;314:E131-E138. doi: 10.1152/ajpendo.00192.2017
145. Kawabe Y, Mori J, Morimoto H, Yamaguchi M, Miyagaki S, Ota T, Tsuma Y, Fukuhara S, Nakajima H, Oudit GY, et al. ACE2 exerts anti-obesity effect via stimulating brown adipose tissue and induction of browning in white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;317:E1140-E1149. doi: 10.1152/ajpendo.00311.2019
146. Díez-Freire C, Vázquez J, Correa de Adjoulian MF, Ferrari MF, Yuan L, Silver X, Torres R, Raizada MK. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics.* 2006;27:12-19. doi: 10.1152/physiolgenomics.00312.2005
147. Rentzsch B, Todiras M, Iliescu R, Popova E, Campos LA, Oliveira ML, Baltatu OC, Santos RA, Bader M. Transgenic Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension.* 2008;52:967-973. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114322
148. Wysocki J, Ye M, Rodriguez E, González-Pacheco FR, Barrios C, Evora K, Schuster M, Loibner H, Brosnihan KB, Ferrario CM, et al. Targeting the degradation of Angiotensin II with recombinant Angiotensin-converting enzyme 2: prevention of Angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2010;55:90-98. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138420
149. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem.* 2005;280:30113-30119. doi: 10.1074/jbc.M50511200
150. Xia H, Sriramula S, Chhabra KH, Lazartigues E. Brain Angiotensin-converting enzyme type 2 shedding contributes to the development of neurogenic hypertension. *Circ Res.* 2013;113:1087-1096. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301811
151. Thomas MC, Pickering RJ, Tsorotes D, Koitka A, Sheehy K, Bernardi S, Toffoli B, Nguyen-Huu TP, Head GA, Fu Y, et al. Genetic ACE2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse. *Circ Res.* 2010;107:888-897. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.219279
152. Chen Y, Wang X, Yang C, Su X, Yang W, Dai Y, Han H, Jiang J, Lu L, Wang H, et al. Decreased circulating catenestatin levels are associated with coronary artery disease: the emerging anti-inflammatory role. *Atherosclerosis.* 2019;281:78-88. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.025
153. Oudit GY, Liu GC, Zhong J, Basu R, Chow FL, Zhou J, Loibner H, Janzek E, Schuster M, Penninger JM, et al. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2010;59:529-538. doi: 10.2337/db09-1218
154. Patel VB, Bodiga S, Basu R, Das SK, Wang W, Wang Z, Lo J, Grant MB, Zhong J, Kassiri Z, et al. Loss of Angiotensin-converting enzyme-2 exacerbates diabetic cardiovascular complications and leads to systolic and vascular dysfunction: a critical role of the Angiotensin II/AT1 receptor axis. *Circ Res.* 2012;110:1322-1335. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268029
155. Tikellis C, Pickering R, Tsorotes D, Du XJ, Kiriazis H, Nguyen-Huu TP, Head GA, Cooper ME, Thomas MC. Interaction of diabetes and ACE2 in the pathogenesis of cardiovascular disease in experimental diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2012;123:519-529. doi: 10.1042/CS20110668
156. Patel VB, Parajuli N, Oudit GY. Role of Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in diabetic cardiovascular complications. *Clin Sci (Lond).* 2014;126:471-482. doi: 10.1042/CS20130344
157. Cooper ME, Johnston CI. Optimizing treatment of hypertension in patients with diabetes. *JAMA.* 2000;283:3177-3179. doi: 10.1001/jama.283.24.3177
158. Wong DW, Oudit GY, Reich H, Kassiri Z, Zhou J, Liu QC, Backx PH, Penninger JM, Herzenberg AM, Scholey JW. Loss of Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) accelerates diabetic kidney injury. *Am J Pathol.* 2007;171:438-451. doi: 10.2353/ajpath.2007.060977
159. Bae EH, Fang F, Williams VR, Konvalinka A, Zhou X, Patel VB, Song X, John R, Oudit GY, Pei Y, et al. Murine recombinant Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates kidney injury in experimental Alport syndrome. *Kidney Int.* 2017;91:1347-1361. doi: 10.1016/j.kint.2016.12.022
160. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S; RENAAL Study Investigators. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001;345:861-869. doi: 10.1056/NEJMoa011161
161. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, Cooper ME. Characterization of renal Angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension.* 2003;41:392-397. doi: 10.1161/01.HYP.0000060689.38912.CB
162. Verma A, Shan Z, Lei B, Yuan L, Liu X, Nakagawa T, Grant MB, Lewin AS, Hauswirth WW, Raizada MK, et al. ACE2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy. *Mol Ther.* 2012;20:28-36. doi: 10.1038/mt.2011.155
163. Dominguez JM II, Hu P, Caballero S, Moldovan L, Verma A, Oudit GY, Li Q, Grant MB. Adeno-associated virus overexpression of Angiotensin-converting enzyme-2 reverses diabetic retinopathy in Type 1 diabetes in mice. *Am J Pathol.* 2016;186:1688-1700. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.01.023
164. Busik JV, Tikhonenko M, Bhatwadekar A, Opreanu M, Yakubova N, Caballero S, Player D, Nakagawa T, Afzal A, Kielczewski J, et al. Diabetic retinopathy is associated with bone marrow neuropathy and a depressed peripheral clock. *J Exp Med.* 2009;206:2897-2906. doi: 10.1084/jem.20090889
165. Hazra S, Jarajapu YP, Stepps V, Caballero S, Thinschmidt JS, Sautina L, Bengtsson N, Licalzi S, Dominguez J, Kern TS, et al. Long-term type 1 diabetes influences hematopoietic stem cells by reducing vascular repair potential and increasing inflammatory monocyte generation in a murine model. *Diabetologia.* 2013;56:644-653. doi: 10.1007/s00125-012-2781-0
166. Hinojosa AE, Garcia-Bueno B, Leza JC, Madrigal JL. CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *J Neuroinflammation.* 2011;8:77. doi: 10.1186/1742-2094-8-77
167. Skuljec J, Sun H, Pul R, Bénardais K, Ragancokova D, Moharreh-Khiabani D, Kotsiari A, Trebst C, Stangel M. CCL5 induces a pro-inflammatory profile in microglia in vitro. *Cell Immunol.* 2011;270:164-171. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.05.001

168. Semple BD, Kossman T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/ CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30:459-473. doi: 10.1038/jcbfm.2009.240
169. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007;117:902-909. doi: 10.1172/JCI29919
170. Huang D, Wujek J, Kidd G, He TT, Cardona A, Sasse ME, Stein EJ, Kish J, Tani M, Charo IF, et al. Chronic expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the central nervous system causes delayed encephalopathy and impaired microglial function in mice. *FASEB J.* 2005;19:761-772. doi: 10.1096/fj.04-3104com
171. Schilling M, Strecker JK, Ringelstein EB, Schäbitz WR, Kiefer R. The role of CC chemokine receptor 2 on microglia activation and blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* 2009;1289:79-84. doi: 10.1016/j.brainres.2009.06.054
172. Jarajapu YP, Bhatwadekar AD, Caballero S, Hazra S, Shenoy V, Medina R, Kent D, Stitt AW, Thut C, Finney EM, et al. Activation of the ACE2/ Ang Iotensin-(1-7)/Mas receptor axis enhances the reparative function of dysfunctional diabetic endothelial progenitors. *Diabetes.* 2013;62:1258- 1269. doi: 10.2337/db12-0808
173. Reich HN, Oudit GY, Penninger JM, Scholey JW, Herzenberg AM. Decreased glomerular and tubular expression of ACE2 in patients with type 2 diabetes and kidney disease. *Kidney Int.* 2008;74:1610-1616. doi: 10.1038/ki.2008.497
174. Xie X, Xudong X, Chen J, Junzhu C, Wang X, Xingxiang W, Zhang F, Furong Z, Liu Y, Yanrong L. Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung. *Life Sci.* 2006;78:2166-2171. doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.038
175. Yilin Z, Yandong N, Faguang J. Role of Ang Iotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 in a rat model of smoke inhalation induced acute respiratory distress syndrome. *Burns.* 2015;41:1468-1477. doi: 10.1016/j.burns.2015.04.010
176. Trembl B, Neu N, Kleinsasser A, Gritsch C, Finsterwalder T, Geiger R, Schuster M, Janzek E, Loibner H, Penninger J, et al. Recombinant Ang Iotensin-converting enzyme 2 improves pulmonary blood flow and oxygenation in lipopolysaccharide-induced lung injury in piglets. *Crit Care Med.* 2010;38:596-601. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181c 03009
177. Rigatto K, Casali KR, Shenoy V, Katovich MJ, Raizada MK. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2013;713:89-93. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.017
178. Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM. Upregulation of Ang Iotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of Ang Iotensin II receptors. *Hypertension.* 2004;43:970-976. doi: 10.1161/01.HYP.0000124667. 34652.1a
179. Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, Diz DI, Gallagher PE. Effect of Ang Iotensin-converting enzyme inhibition and Ang Iotensin II receptor blockers on cardiac Ang Iotensin-converting enzyme 2. *Circulation.* 2005;111:2605-2610. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510461
180. Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Ann Tallant E, Smith RD, Chappell MC. Effects of renin-Ang Iotensin system blockade on renal Ang Iotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int.* 2005;68: 2189-2196. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00675.x
181. Igase M, Strawn WB, Gallagher PE, Geary RL, Ferrario CM. Ang Iotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and Ang Iotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289:H1013-H1019. doi: 10.1152/ajpheart.00068.2005
182. Jessup JA, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, Chappell MC, Ferrario CM. Effect of Ang Iotensin II blockade on a new congenic model of hypertension derived from transgenic Ren-2 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H2166-H2172. doi: 10.1152/ajpheart.00061.2006
183. Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, Roman M, Ramirez C, Copaja M, Diaz-Araya G, et al. Enalapril attenuates downregulation of Ang Iotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension.* 2006; 48:572-578. doi: 10.1161/01.HYP.0000237862. 94083.45
184. Soler MJ, Ye M, Wysocki J, William J, Lloveras J, Batlle D. Localization of ACE2 in the renal vasculature: amplification by Ang Iotensin II type 1 receptor blockade using telmisartan. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296:F398-F405. doi: 10.1152/ajprenal.90488.2008
185. Jin HY, Song B, Oudit GY, Davidge ST, Yu HM, Jiang YY, Gao PJ, Zhu DL, Ning G, Kassiri Z, et al. ACE2 deficiency enhances Ang Iotensin II-mediated aortic profilin-1 expression, inflammation and peroxynitrite production. *PLoS One.* 2012;7:e38502. doi: 10.1371/journal.pone.0038502
186. Gembardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss HP, Siems WE, Walther T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides.* 2005;26:1270-1277. doi: 10.1016/j.peptides.2005.01.009
187. Lo CS, Liu F, Shi Y, Maachi H, Chenier I, Godin N, Filep JG, Ingelfinger JR, Zhang SL, Chan JS. Dual RAS blockade normalizes Ang Iotensin-converting enzyme-2 expression and prevents hypertension and tubular apoptosis in Akita Ang Iotensinogen-transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302:F840-F852. doi: 10.1152/ajprenal.00340. 2011
188. Keidar S, Gamliel-Lazarovich A, Kaplan M, Pavlotzky E, Hamoud S, Hayek T, Karry R, Abassi Z. Mineralocorticoid receptor blocker increases Ang Iotensin-converting enzyme 2 activity in congestive heart failure patients. *Circ Res.* 2005; 97:946-953. doi: 10.1161/01.RES.0000187500. 24964.7A
189. Yamamuro M, Yoshimura M, Nakayama M, Abe K, Sumida H, Sugiyama S, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Ogawa H. Aldosterone, but not Ang Iotensin II, reduces Ang Iotensin converting enzyme 2 gene expression levels in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ J.* 2008;72:1346-1350. doi: 10.1253/circj.72.1346
190. Takeda Y, Zhu A, Yoneda T, Usukura M, Takata H, Yamagishi M. Effects of aldosterone and Ang Iotensin II receptor blockade on cardiac Ang Iotensinogen and Ang Iotensin-converting enzyme 2 expression in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2007;20:1119-1124. doi: 10.1016/j.amjhyper.2007.05.008
191. Koka V, Huang XR, Chung AC, Wang W, Truong LD, Lan HY. Ang Iotensin II up-regulates Ang Iotensin I-converting enzyme (ACE), but down-regulates ACE2 via the AT1-ERK/p38 MAP kinase pathway. *Am J Pathol.* 2008;172: 1174-1183. doi: 10.2353/ajpath.2008.070762

192. Harada E, Yoshimura M, Yasue H, Nakagawa O, Nakagawa M, Harada M, Mizuno Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Ito T, et al. Aldosterone induces Angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation*. 2001;104:137-139. doi: 10.1161/01.cir.104.2.137
193. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension*. 1999;33:981-986. doi: 10.1161/01.hyp.33.4.981
194. Fu GX, Xu CC, Zhong Y, Zhu DL, Gao PJ. Aldosterone-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves MR, ERK, and p38 MAPK. *Endocrine*. 2012;42:676-683. doi: 10.1007/s12020-012-9675-2
195. Walczak C, Gaignier F, Gilet A, Zou F, Thornton SN, Ropars A. Aldosterone increases VEGF-A production in human neutrophils through PI3K, ERK1/2 and p38 pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:2125-2132. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.07.010
196. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*. 2020;46:586-590. doi: 10.1007/s00134-020-05985-9
197. Vaduganathan M, Vardeny O, Michel T, McMurray JJV, Pfeffer MA, Solomon SD. Renin-Angiotensin-aldosterone system inhibitors in patients with COVID-19 [published online March 30, 2020]. *N Engl J Med*. doi: 10.1056/NEJMSr2005760. Available at nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMSr2005760.
198. Minnesota Uo. Losartan for patients with covid-19 requiring hospitalization. 2020. www.ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04312009.
199. Minnesota Uo. Losartan for patients with covid-19 not requiring hospitalization. 2020. www.ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04311177.
200. Augusto Di Castelnuovo NI. ACE inhibitors, Angiotensin II type-I receptor blockers and severity of covid-19 (covid-ace). 2020. www.ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04318418.
201. Verma A, Xu K, Du T, Zhu P, Liang Z, Liao S, Zhang J, Raizada MK, Grant MB, Li Q. Expression of human ACE2 in lactobacillus and beneficial effects in diabetic retinopathy in mice. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019;14:161-170. doi: 10.1016/j.omtm.2019.06.007





量大为王，快人一步



阳普医疗全自动荧光免疫分析平台 QT-1000



Article Abstract Collection

文献摘要

本期文献摘要版块主要是关于血管紧张素转换酶 ACE2 对肾素-血管紧张素系统的调节机制研究，以及 ACE2 作为药物靶标在治疗心肾和血管疾病中的潜在价值。也介绍了 ACE2 作为心血管病生物学标志物的可能性。

参考文献摘要翻译

1. Oudit GY, et al. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13(3):93±101. PMID: 12691672.

摘要

肾素-血管紧张素系统 (RAS) 与心血管和肾脏功能以及疾病状况密切相关，并且已被证明比最初设想的要复杂得多。最近发现的血管紧张素转换酶 (ACE) 的同源物 ACE2 似乎对 RAS 具有负调节作用。ACE2 分别将 Ang I 和 Ang II 切割为无活性的 Ang1-9 和 Ang1-7。ACE2 在肾脏和心脏中高度表达，尤其是在内皮细胞高表达。通过数量性状基因座 (QTL) 作图，在高血压大鼠模型中 ACE2 被定义 X 染色体上的 QTL。在这些动物模型中，肾脏 ACE2 信使 RNA 和蛋白质表达显著降低，使得 ACE2 成为该 QTL 的候选基因。靶向破坏小鼠 ACE2 未能引起高血压，但导致心肌收缩力严重受损，同时伴随血管紧张素 II 水平升高。将无 ACE2 小鼠的 ACE 基因消除挽救了心脏表型。这些遗传数据表明，ACE2 是体内心脏功能的重要调节分子。ACE2 的失活不会改变基本肾脏形态学和功能。ACE2 能够水解其他几种肽 (如 apelin 肽、阿片类和激肽代谢产物) 的新作用，增加了血管紧张素及其衍生物以外的其他肽系统也可能在调节心血管和肾功能中发挥重要作用的可能性。

2. Tesanovic S, et al. Vasoprotective and atheroprotective effects of Ang Iotensin (1±7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(8):1606 ± 13. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.204453> PMID: 20448208.

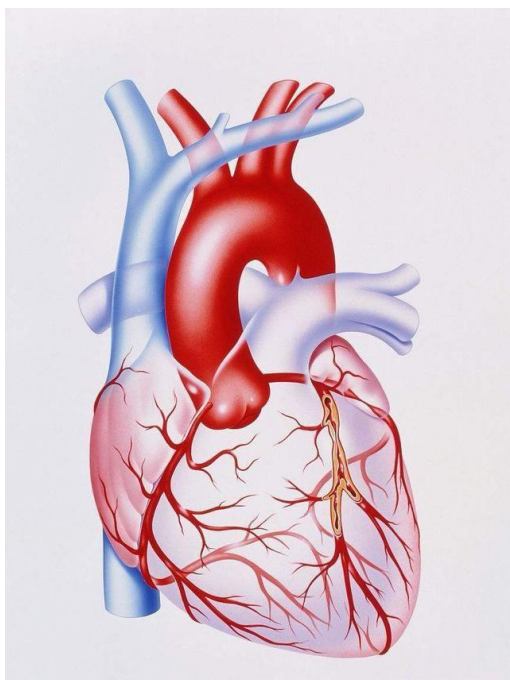
摘要

目的：评估长期血管紧张素 (Ang) (1-7) 治疗对于抑制载脂蛋白 E 缺乏症 (ApoE (-/-)) 小鼠动脉粥样硬化进展的有效性。

方法和结果：Ang (1-7) 是一种七肽片段，已被提议用来反向调节 Ang II 的促动脉粥样硬化作用。在接受为期 16 周的致动脉粥样硬化高脂 (21%) 饮食的载脂蛋白 E (-/-) 小鼠中，检查了长期 4 周 Ang (1-7) 治疗对抑制动脉粥样硬化病变发展和改善内皮功能的影响。慢性 Ang (1-7) 治疗可显著改善内皮功能，与 2 型血管紧张素 (AT (2)) 或 Mas 受体阻滞的作用相反。在这些血管中，与赋形剂治疗相比，Ang (1-7) 治疗显著降低了超氧化物的产生并增加了内皮一氧化氮合酶的免疫反应性。这些作用均可被 AT (2) 和 Mas 受体拮抗剂所阻断。Ang (1-7) 治疗后，与相应的对照相比，通过脂肪沉积物 (油红 O) 和内膜与中膜比值评估的病损进展也

明显减轻。与 AT (2) 或 Mas 受体拮抗剂共同治疗可逆转 Ang (1-7) 介导的病损进展减轻。

结论：长期 Ang (1-7) 治疗可通过改善血管内皮功能而产生血管保护作用，并产生动脉粥样硬化保护作用，并在动脉粥样硬化模型中减少病损进展。这些作用似乎是由对一氧化氮生物利用的恢复所介导的，并且涉及 Mas 和 AT (2) 受体的复杂相互作用。



3. Donoghue M, et al. novel Angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts Angiotensin I to Angiotensin 1±9. *Circ Res.*2000; 87(5):E1±9. PMID: 10969042.

摘要

ACE2 是第一个已知的人血管紧张素转换酶 (ACE) 的同源物，是由人心力衰竭心室 cDNA 文库 5'测序确定的。ACE2 具有明显的信号肽、单个金属蛋白酶活性位点和跨膜结构域。ACE2 和 ACE 的金属蛋白酶催化结构域具有 42% 的相同性，并且基因组结构的比较表明这两个基因是通过复制产生的。与普遍存在的 ACE 相比，在所检查的 23 种人体组织中 ACE2 转录本仅存在于心脏、肾脏和睾丸。免疫组化显示 ACE2 蛋白主要存在于冠状动脉和肾内血管的内皮以及肾小管上皮中。活性 ACE2 酶通过切割跨膜结构域的 N 末端，从转染细胞中分泌出来。重组 ACE2 水解血管紧张素 I 的 C 末端亮氨酸，生成血管紧张素 1-9，后者在体外通过 ACE 和培养

中的心肌细胞将其转化为更小的血管紧张素肽。ACE2 还可以切割 des-Arg 缓激肽和神经降压素，但不能切割缓激肽或其他 15 种血管活性和激素肽。ACE2 不受赖诺普利或卡托普利的抑制。ACE2 的器官和细胞特异性表达及其对关键血管活性肽的独特切割性表明，ACE2 在心脏和肾脏的局部肾素-血管紧张素系统中起着至关重要的作用。

4. Lambert DW, et al. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem.* 2005; 280(34):30113±9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505111200> PMID: 15983030.

摘要

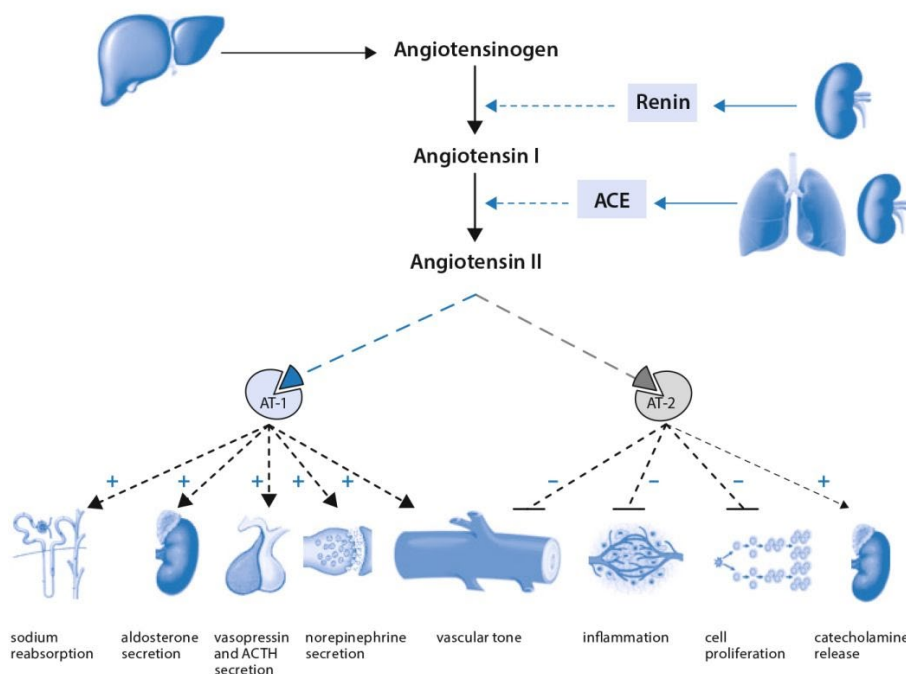
血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 是心脏功能的关键调节剂，是严重急性呼吸综合征 (SARS) 病原体——SARS-CoV (冠状病毒) 的细胞受体。ACE2 是一种 I 型跨膜蛋白，具有包含活性位点的胞外 N 末端结构域和胞内 C 末端短尾。缺乏其细胞内和跨膜结构域的可溶形式 ACE2 已显示出能阻断 SARS-CoV 刺突蛋白与其受体的结合。在本研究中，我们检查了 ACE2 蛋白水解脱落的能力，并研究了造成该脱落事件的机制。我们证明，ACE2 在 HEK293 细胞中异源性表达，在 Huh7 细胞中内源性表达，经历金属蛋白酶介导的、佛波酯诱导的胞外结构域脱落。通过使用对 ADAM (一种去整合素和金属蛋白酶) 蛋白酶不同成员具有不同效力的抑制剂，我们将 ADAM17 鉴定为刺激 ACE2 脱落的候选媒介。此外，使用特定的小干扰 RNA 双链体去除 ADAM17 的表达，可减少调节的 ACE2 脱落，而 ADAM17 的过表达则显著增加脱落。总之，这些数据为 ADAM17 参与调控的 ACE2 胞外域脱落提供了直接的证据。鉴定出 ADAM17 是负责 ACE2 脱落的蛋白酶，可能为 ACE2 的生理学作用提供新的见解。

5. Patel VB, et al. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 66:167±76. <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2013.11.017> PMID: 24332999.

摘要

血管紧张素转换酶 (ACE) 2 是肾素-血管紧张素系统的关键负调节剂, 它将血管紧张素 (Ang) II 代谢为 Ang 1-7。我们假设 Ang II 通过增加 TNF- α 转换酶 (TACE) 的活性和裂解 ACE2 来抑制 ACE2。给野生型小鼠连续 2 周输注 Ang II (1.5 mg/kg/天) 导致心肌 ACE2 蛋白水平和活性大大降低, 血浆 ACE2 活性相应增加, 而这可以通过 AT1R 的阻断所防止。Ang II 导致 AT1R 介导的心肌 TACE 表达和活性增加以及 TACE 膜移位。Ang II

处理的 Huh7 细胞表现出 AT1R 依赖性金属蛋白酶介导的 ACE2 脱落, 而 siTACE 转染可防止 ACE2 脱落。TACE 的心肌细胞特异性缺失也可以防止 ACE2 脱落。活性氧起关键作用, 因为 p47 (phox) KO 小鼠对 Ang II 诱导的 TACE 磷酸化和活化具有抵抗力, 并保留了心肌 ACE2, 从而减轻了 Ang II 诱导的心脏功能障碍和肥大。总之, Ang II 通过促进 TACE 活性作为正反馈机制来诱导 ACE2 脱落, 从而使 Ang II 促进其负调节剂 ACE2 的丢失。在 HF 中, 血浆 ACE2 活性升高可能代表心脏中 ACE2 保护作用的丧失。



6. Burrell LM, et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J*. 2005; 26(4):369 ± 75; discussion 22 ± 4. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi114> PMID: 15671045.

摘要

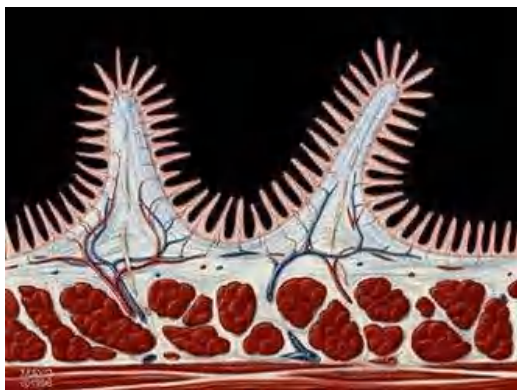
目的: 血管紧张素转化酶 (ACE) 2 催化血管紧张素 (Ang) I 裂解为 Ang1-9, 将 Ang II 裂解为 Ang1-7。ACE2 缺乏会损害心脏收缩力并上调缺氧诱导的基因, 提示与心肌缺血有关。我们研究了大鼠心肌梗塞 (MI) 后以及人类衰竭心脏中 ACE2 的表达。

方法和结果: 在 MI 后第 1、3 和 28 天将大鼠处死, 或用 ACE 抑制剂雷米普利 (1 mg/kg) 治疗 4 周。ACE 和

ACE2 的心脏基因和蛋白质表达分别通过实时定量逆转录酶-聚合酶链反应和免疫组化/活性测定/体外放射自显影进行评估。与心肌梗死后第 3 天的存活面积相比, 边缘/梗死区域的 ACE ($p = 0.022$) 和 ACE2 ($p = 0.015$) 的 mRNA 均增加。到第 28 天, 与对照组大鼠的心脏相比, MI 大鼠的存活心肌中 ACE ($p = 0.005$) 和 ACE2 ($p = 0.006$) 的 mRNA 增加。ACE2 蛋白位于巨噬细胞、血管内皮、平滑肌和心肌细胞中。雷米普利减轻心脏肥大并抑制心脏 ACE。相比之下, 雷米普利对心肌 ACE2 mRNA 无影响, 心肌 ACE2 mRNA 在 MI 大鼠心脏的所有区域均保持升高。在衰竭的人类心脏中, ACE 和 ACE2 的免疫反应性均增加。

结论: 心肌梗死后 ACE2 的增加提示: ACE2 在心脏损伤后, 通过血管紧张素肽的生成和降解, 对肾素血管紧

张素系统发挥负调节作用。



7. Zulli A, et al. ACE2 and AT4R are present in diseased human blood vessels. *Eur J Histochem.* 2008; 52(1):39 ± 44. PMID: 18502721.

摘要

越来越多的证据表明,血管紧张素 II 片段 Ang (1-7) 和 Ang (3-8) 具有血管活性作用,但是产生 Ang (1-7) 的酶 ACE2 或与 Ang (3-8) 结合的 AT4R 受体蛋白并未同时定位于正常和患病的人血管中。我们试图在进行冠状动脉搭桥手术的人乳腺内部和桡动脉中确定 ACE2 和 AT4R 的免疫组织化学分布。我们发现在正常和患病血管中都有丰富的 ACE2 阳性细胞,存在于新内膜和基质中。ACE2 阳性免疫反应性不存在于导管血管的内皮层中,但在小的新形成的血管生成血管以及毛细血管中明显可见。在正常和患病动脉中均很少观察到内皮 AT4R 免疫反应性,但在与内弹力层相邻的乳内动脉、桡动脉新内膜以及两者的基质中观察到 AT4R 阳性细胞。AT4R 在毛细血管和小血管生成血管中含量丰富。AT4R 和 ACE2 均与平滑肌细胞 α 肌动蛋白共定位。本研究确定了人类血管以及血管生成血管中的平滑肌细胞 α 肌动蛋白阳性 ACE2 和 AT4R,表明这些酶在病理疾病中可能发挥作用。

8. Lew RA, et al. Ang Iotensin-converting enzyme 2 catalytic activity in human plasma is masked by an endogenous inhibitor. *Exp Physiol.* 2008; 93(5):685 ± 93. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.040352> PMID: 18223027.

摘要

血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 被认为与其同源物——血管紧张素转化酶 (ACE) 的作用相反,其作用是使血管

收缩肽血管紧张素 II 失活并产生血管扩张片段血管紧张素 (1-7)。ACE 和 ACE2 都是膜结合的胞外酶,并可能由于蛋白水解脱落事件而在血浆中循环。在这项研究中,我们表明 ACE2 在人血浆中循环,但是其活性受到内源性抑制剂的抑制。对该抑制剂的部分纯化表明该抑制剂是小的亲水性阳离子,但不是二价金属阳离子。这些观察结果促使我们开发了一种去除抑制剂的方法,从而可以使用基于淬灭荧光底物的灵敏测试法检测血浆 ACE2 水平。使用该技术,健康志愿者 ($n = 18$) 血浆中测得的 ACE2 活性范围为切割底物的 $1.31 \sim 8.69$ pmol/min/mL (均值 ± 标准差, 4.44 ± 0.56 pmol/min/mL)。对心血管、肾脏和肝脏疾病患者的进一步研究将确定血浆 ACE2 水平是否与在这些情况下观察到的组织水平平行升高。

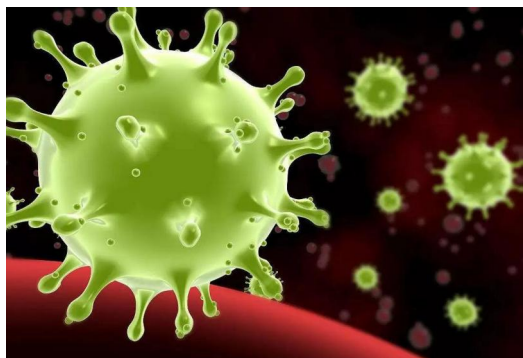


9. Rice GI, et al. Circulating activities of Ang Iotensin-converting enzyme, its homolog, Ang Iotensin-converting enzyme 2, and neprilysin in a family study. *Hypertension.* 2006; 48(5):914±20. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000244543.91937.79> PMID:17000927.

摘要

肾素-血管紧张素系统是血压 (BP) 的关键调节剂,临床上使用血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制剂来治疗高血压和其他心血管疾病。ACE2 是该系统的新成员,可将血管紧张素 II 转换为血管紧张素,并且尚未发现其在血浆中的存在。这项研究的目的是确定家族研究中循环 ACE、ACE2 和中性溶酶 (NEP) 的遗传性,它们也可能是 BP 的调节剂,并确定它们是否是有助于血浆活性变化的协变量。在利兹家族研究中,使用选择性荧光底物测量了 534 名受试者血浆中的 ACE、ACE2 和 NEP 活性。遗传因素分别占循环 ACE、ACE2 和 NEP 表型变异的 24.5%、67%和 22.7%。ACE 插入/缺失多态性和其他

测量的协变量占循环 ACE 中变异的 23.8%。高密度脂蛋白胆固醇是循环 ACE2 的重要决定因素。测得的协变量占循环 NEP 变化的 17.3%。单因素分析显示 ACE 和 NEP 与收缩压和舒张压相关。然而,在考虑了协变量和共同的童年家庭生活之后,只有 ACE 与收缩压和舒张压 BP 独立相关。



10. Epelman S, et al. Detection of soluble Angiotensin converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin-Angiotensin-aldosterone system. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52(9):750±4. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.02.088> PMID: 18718423.

摘要

目的: 我们试图确定心力衰竭 (HF) 患者血浆中循环可溶性血管紧张素转化酶 2 (sACE2) 是否增加。

背景: 血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 是一种不可或缺的膜蛋白,可拮抗血管紧张素 II 的作用并阻止 HF 在动物模型中的发展。但是,由于需要进行侵入性心脏组织采样,因此人们对 ACE2 是否参与人类 HF 的病理生理了解甚少。

方法: 我们开发了一种灵敏而特异性的测定方法来测量人血浆中的 sACE2 活性,并筛选了一组疑似患有临床 HF 的异质性患者。

结果: sACE2 血浆活性增加与 HF 的临床诊断 ($p = 0.0002$)、左心室射血分数恶化 ($p < 0.0001$) 和 B 型脑钠肽水平升高 ($p < 0.0001$) 密切相关。类似于 B 型脑钠肽, sACE2 活性反映了 HF 的严重程度,其水平升高与纽约心脏协会功能类别的恶化相关 ($p < 0.0001$)。这些关联与其他疾病状态和药物使用无关。我们发现,缺血性和非缺血性心肌病患者以及临床心衰但左心室射

血分数保持不变的患者, sACE2 活性均升高。

结论: HF 患者可溶性 ACE2 活性增加,并与疾病严重程度相关,表明肾素-血管紧张素-醛固酮系统的心脏保护臂在 HF 中具有活性。

11. Walters TE, et al. Angiotensin converting enzyme 2 activity and human atrial fibrillation: increased plasma Angiotensin converting enzyme 2 activity is associated with atrial fibrillation and more advanced left atrial structural remodelling. *Europace.* 2016.

摘要

目的: 血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 是一种完整的膜蛋白,其主要作用是降解血管紧张素 II。在各种心血管疾病中,血浆 ACE2 活性均增加。我们旨在确定血浆 ACE2 活性与人房颤 (AF) 之间的关系,尤其是其与左心房 (LA) 结构重塑的关系。

方法和结果: 来自三级心律失常中心的 103 名参与者,包括 58 名阵发性房颤 (PAF)、20 名持续性房颤 (PersAF) 和 25 名对照,接受了临床评估、超声心动图分析和血浆 ACE2 活性的测量。由 20 名参与者组成的小组进行了侵入性 LA 电解剖作图。AF 中血浆 ACE2 活性水平升高 [对照组 13.3 (9.5 ~ 22.3) pmol/min/mL; PAF 16.9 (9.7 ~ 27.3) pmol/min/mL; PersAF 22.8 (13.7 ~ 33.4) pmol/min/mL, $p = 0.006$]。血浆 ACE2 升高与年龄、男性、高血压和血管疾病、左心室 (LV) 质量增加、左室舒张功能受损和晚期心房疾病有关 (所有 p 均 < 0.05)。血浆 ACE2 活性升高是 AF ($p = 0.04$) 和血管疾病 ($p < 0.01$) 的独立预测因子。ACE2 活性升高与低平均 LA 双极性电压 (调整后的 $R^2 = 0.22$, $p = 0.03$)、高比例的复杂分级心电图 ($R^2 = 0.32$, $p = 0.009$) 和较长的 LA 活化时间之间存在显著关系 ($R^2 = 0.20$, $p = 0.04$)。

结论: 人房颤时血浆 ACE2 活性升高。AF 和血管疾病均可预示血浆 ACE2 活性升高,血浆 ACE2 升高与更晚期的 LA 结构重塑显著相关。

12. Roberts MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 activity in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 28(9):2287±94. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft038> PMID: 23535224.

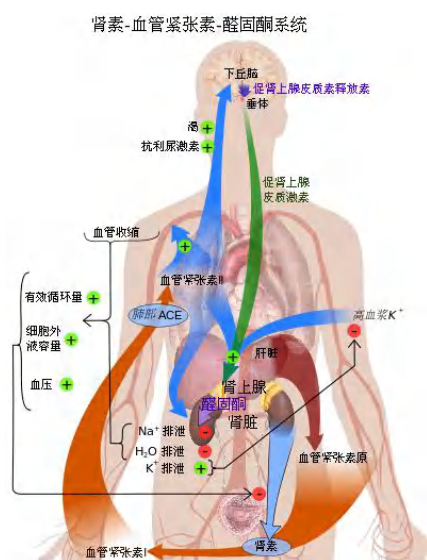
摘要

背景：血管紧张素转换酶 2（ACE2）是一种新的肾素-血管紧张素系统调节剂，可抵消血管紧张素 II 的不利作用。在心力衰竭患者中，血浆 ACE2 活性升高预示了不良事件和更大的心肌功能障碍。我们旨在描述肾脏疾病患者血浆 ACE2 活性及其临床关联性。

方法：从单一中心招募的患者包括慢性肾病 III/IV 期（CKD）患者、血液透析患者和肾移植受者（KTR）。使用血浆中的荧光底物测试法测量基线处收集并储存在-80℃的血浆中的 ACE2 酶活性。分别在男性和女性中进行线性回归，以确定与对数转换的 ACE2 相关的协变量。

结果：以 pmol/mL/min 为单位的血浆 ACE2 活性的中位数（四分位数范围）：CKD（n = 59）为 15.9（8.4 ~ 26.1），血液透析（n = 100）为 9.2（3.9 ~ 18.2），KTR（n = 80； $p < 0.01$ ）为 13.1（5.7 ~ 21.9）。在男性血液透析患者中，ACE2 活性为 12.1（6.8 ~ 19.6），而女性为 4.4（2.5 ~ 10.3）（ $p < 0.01$ ）。对数转化的 ACE2 血浆活性与女性血液透析后的收缩压有关[β 系数 0.04，95%置信区间（95%CI）0.01 ~ 0.06， $p = 0.006$]。在男性中，对数转化的 ACE2 血浆活性与 B 型脑钠肽相关（ β 系数 0.39，95%CI 0.19 ~ 0.60， $p < 0.001$ ）。血浆 ACE2 活性与死亡率无关。

结论：与 CKD 患者相比，血液透析患者血浆 ACE2 活性降低，与男性相比，女性血液透析患者血浆 ACE2 活性降低。男性和女性血液透析患者之间血浆 ACE2 活性的不同关联表明，ACE2 在心血管疾病中的作用可能因性别而异。



13. Anguiano L, et al. Circulating Angiotensin converting enzyme 2 activity as a biomarker of silent atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Atherosclerosis*. 2016; 253:135±43. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.032> PMID: 27615597.

摘要

背景与目的：在没有心血管疾病（CVD）病史的慢性肾脏疾病（CKD）患者中，循环血管紧张素转换酶 2（ACE2）的活性与经典危险因素（高龄、糖尿病和男性）相关。此外，无症状动脉粥样硬化已被描述为 CKD 与 CVD 之间的病理联系。我们分析了非透析 CKD3-5 期（CKD3-5）患者的基线 ACE2 活性，作为随访 2 年后肾脏进展、无症状动脉粥样硬化和 CV 事件的生物学标志物。

方法：对西班牙多中心 NEFRONA 研究中未包含任何先前心血管事件的 1458 名 CKD3-5 期受试者进行了前瞻性研究。分析基线循环 ACE2 活性与肾参数、颈动脉/股动脉回声图谱、动脉粥样硬化疾病、踝臂指数、内腹中层厚度、肾脏替代疗法的需要、心血管事件和随访 24 个月死亡之间的关系。

结果：与稳定患者相比，24 个月时斑块面积增加的患者显示基线 ACE2 活性水平显著更高 [29.6（20.6 ~ 47.6）RFU/μL/h vs. 35.7（24.5 ~ 56）， $p < 0.001$]。多元线性回归分析显示，男性、病理性踝臂指数和进行性无症状动脉粥样硬化定义为在 24 个月时出现斑块的区域增加与基线 ACE2 活性增加有关。男性、老年人、糖尿病、吸烟和基线循环 ACE2 升高是随访 24 个月动脉粥样硬化的独立预测因子。

结论：在 CKD3-5 期患者中，基线较高的循环 ACE2 活性与较高的无症状动脉粥样硬化风险相关，这表明 ACE2 可以作为 CVD 之前预测 CV 风险的生物学标志物。

14. Soro-Paavonen A, et al. Circulating ACE2 activity is increased in patients with type 1 diabetes and vascular complications. *J Hypertens*. 2012; 30(2):375 ± 83. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32834f04b6> PMID: 22179088.

摘要

目的：血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 是 ACE 的同源物，可抵消血管紧张素 (AT) II 的作用并促进血管舒张。在实验模型中，循环中的 ACE2 活性在糖尿病中增加。ACE2 在人类病理生理学中的作用尚不清楚。我们检查了患有和不患有糖尿病性肾病的 1 型糖尿病 (T1D) 患者的 ACE2 活性是否改变。

方法：在芬兰糖尿病肾病 (FinnDiane) 研究中，在 204 名健康对照者中，通过荧光分析法测定了 859 例 T1D 患者血清中的 ACE2 活性。在 319 例 T1D 患者和 114 例对照中进行了带有增强指数 (AIx) 测量的脉搏波分析。

结果：与无蛋白尿的患者 (27.0 ± 0.5 ngE/ml, $p < 0.05$) 或对照组 (25.6 ± 0.8 ngE/ml, $p < 0.05$) 相比，患有 T1D 和微量蛋白尿 (30.2 ± 1.5 ngE/ml) 的男性 ACE2 活性增加。在接受 ACE 抑制剂 (ACEi) 治疗的男性和女性患者中，ACE2 活性均增加，并且与蛋白尿无关。患有冠心病 (CHD) 的男性和女性患者的 ACE2 活性均显著增加 (男性 T1D 患者与男性对照者之间分别为 35.5 ± 2.5 ngE/ml vs. 27.0 ± 0.5 ngE/ml, $p < 0.001$)。ACE2 活性与收缩压 ($r_s = 0.175$, $p < 0.001$)、AIx ($r_s = 0.191$, $p = 0.010$) 和糖尿病持续时间 ($r_s = 0.198$, $p < 0.001$) 正相关，与男性 T1D 患者的估计肾小球滤过率 ($r_s = -0.109$, $p = 0.016$) 负相关。

结论：ACE2 活性随血管紧张度增加而增加，在 T1D 患者患有微血管或大血管疾病时也增加。这表明 ACE2 可能作为补偿机制参与 T1D 患者的血管和肾脏功能调节。

15. Epelman S, et al. Soluble Angiotensin-converting enzyme 2 in human heart failure: relation with myocardial function and clinical outcomes. *J Card Fail.* 2009; 15(7):565-71. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.01.014> PMID: 19700132.

摘要

背景：血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 是肾素-血管紧张素系统的内源性反向调节剂。尚不明确慢性收缩性心力衰竭患者中可溶性 ACE2 (sACE2)、心肌功能与临床结局之间的关系。

方法和结果：我们测量了 113 例慢性收缩性心力衰竭 (左心室射血分数 [LVEF] $\leq 35\%$, 纽约心脏协会 II-IV 级) 患者的 sACE2 活性。在采血时进行了全面的超声心动

图检查。我们前瞻性地检查了 34 ± 17 个月内的不良临床事件 (死亡、心脏移植和心力衰竭住院)。sACE2 血浆活性更高的患者更有可能具有更低的 LVEF (Spearman $r = -0.36$, $p < 0.001$)、更大的右室收缩功能障碍 ($r = 0.33$, $p < 0.001$)、更高的估计肺动脉收缩压 ($r = 0.35$, $p = 0.002$)、更大的左室舒张末期直径 ($r = 0.23$, $p = 0.02$) 和更高的血浆 NT-proBNP 水平 ($r = 0.35$, $p < 0.001$)。sACE2 与舒张功能障碍的相关性较小 ($r = 0.19$, $p = 0.05$)，在缺血性和非缺血性心脏病患者中相似。sACE2 活性与全身性炎症标志物之间没有关系。针对 NT-proBNP 和 LVEF 调整后，sACE2 活性仍是不良临床事件的独立预测因子 [HR=1.7 (95%CI, 1.1 ~ 2.6), $p = 0.018$]。

结论：血浆 sACE2 活性升高与心肌功能障碍的严重程度相关，并且是不良临床事件的独立预测因子。

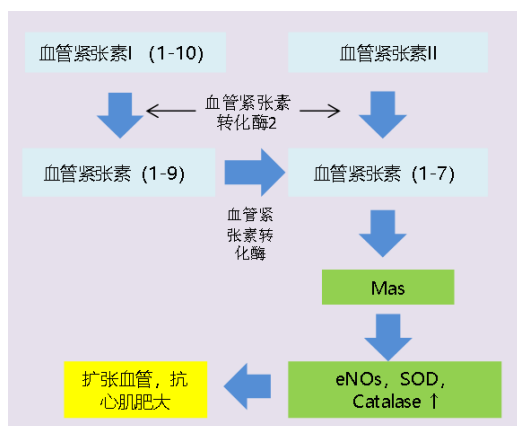


16. Chong CP, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and Angiotensin-converting enzyme-2 levels and their association with postoperative cardiac complications after emergency orthopedic surgery. *Am J Cardiol.* 2012; 109(9):1365-73. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.12.032> PMID: 22381157

摘要

心脏生物学标志物 N 末端脑钠肽 (NT-proBNP) 和血管紧张素转换酶 2 (ACE-2) 在预测骨科手术后不良心脏预后方面的预后价值还没有得到很好的研究。我们研究的目的是确定围手术期 NT-proBNP 和 ACE-2 在预测急诊骨科手术后心脏事件中的作用。对做过整形外科手术并进行了为期 1 年的对任何心脏并发症 (定义为急性心肌梗死、充血性心力衰竭、心房颤动或严重心律失常) 和死亡随访的连续 187 名年龄 > 60 岁的患者的围

手术期 NT-proBNP 和 ACE-2 水平进行了检测。在 187 例患者中,有 20 例 (10.7%) 持续住院术后心脏并发症。医院内全因死亡率和 1 年死亡率分别为 1.6% (187 例中的 3 例) 和 8.6% (187 例中的 16 例)。持续发生院内心脏事件的患者术前和术后中位 NT-proBNP 水平高于未住院的患者 (386 pg/mL vs. 2273 pg/mL, $p < 0.001$, 605 pg/mL vs. 4316 pg/mL, $p < 0.001$)。同样,院内心脏事件患者的术后中位 ACE-2 水平显著高于未住院患者 (25.3 pmol/mL/min vs. 39.5 pmol/mL/min, $p = 0.012$)。术前 NT-proBNP ≥ 741 pg/mL (比值比 4.5, 95%置信区间 1.3 ~ 15.2, $p = 0.017$)、术后心肌肌钙蛋白升高 (比值比 4.9, 95%置信区间 1.3 ~ 18.9, $p = 0.022$)、并发症数量 (比值比 1.8, 95%置信区间 1.2 ~ 2.8, $p = 0.009$) 在多变量分析中均独立预测了院内心脏并发症。术前和术后 NT-proBNP 水平可独立预测 1 年心血管并发症,但不能预测 ACE-2 水平。总之,围手术期 NT-proBNP 升高可预测急诊骨科人群的住院和 1 年心脏事件,但 ACE-2 水平并非如此,还需要进一步的研究进行验证。



17. Maddox TM, et al. Nonobstructive coronary artery disease and risk of myocardial infarction. JAMA. 2014; 312(17):1754±63. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14681> PMID: 25369489.

摘要

重要性: 对非阻塞性冠状动脉疾病 (CAD) 患者的心脏不良事件知之甚少。

目的: 比较全国队列中非阻塞性 CAD、阻塞性 CAD 和无明显 CAD 患者之间的心肌梗塞 (MI) 和死亡率。

设计、环境和参与者: 2007 年 10 月 ~ 2012 年 9 月在退

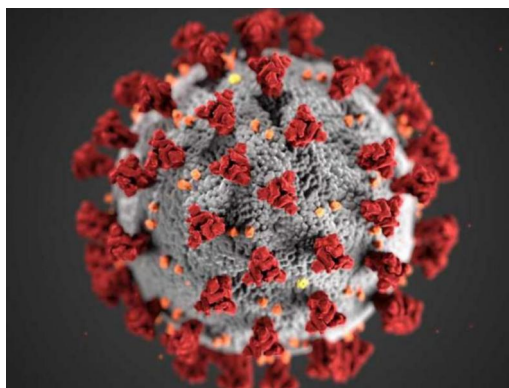
伍军人事务卫生保健系统中接受冠状动脉造影选拔的所有美国退伍军人的回顾性队列研究。排除先前有 CAD 事件的患者。

暴露: 血管造影 CAD 程度, 按程度定义 (无明显 CAD: 无 $> 20\%$ 的狭窄; 无阻塞性 CAD: ≥ 1 狭窄 $\geq 20\%$ 但无狭窄 $\geq 70\%$; 阻塞性 CAD: 任何狭窄 $\geq 70\%$ 或左主干 [LM] 狭窄 $\geq 50\%$) 和分布 (1、2 或 3 根血管)。

主要结局和指标: 主要结局是在血管造影后因非致命性心肌梗塞而住院一年。次要结局包括 1 年全因死亡以及 1 年 MI 和死亡的组合。

结果: 在 37674 例患者中, 8384 例患者 (22.3%) 有无阻塞性 CAD, 20899 例患者 (55.4%) 有阻塞性 CAD。一年之内, 有 845 例患者死亡, 385 例因心肌梗死而再次入院。在没有明显 CAD 的患者中, 1 年心梗率是 0.11% ($n = 8$, 95%CI, 0.10% ~ 0.20%), 并逐渐增加: 1 根血管无阻塞性 CAD, 0.24% ($n = 10$, 95%CI, 0.10% ~ 0.40%); 2 根血管无阻塞性 CAD, 0.56% ($n = 13$, 95%CI, 0.30% ~ 1.00%); 3 根血管无阻塞性 CAD, 0.59% ($n = 6$, 95%CI, 0.30% ~ 1.30%); 1 根血管阻塞性 CAD, 1.18% ($n = 101$, 95%CI, 1.00% ~ 1.40%); 2 根血管阻塞性 CAD, 2.18% ($n = 110$, 95%CI, 1.80% ~ 2.60%); 3 根血管或 LM 阻塞性 CAD, 2.47% ($n = 137$, 95%CI, 2.10% ~ 2.90%)。调整后, 1 年心梗率随着 CAD 程度的增加而增加。相对于无明显 CAD 的患者, 具有 1 根血管非阻塞性 CAD 的患者 1 年 MI 的危险比 (HR) 为 2.0 (95%CI, 0.8 ~ 5.1); 2 根血管非阻塞性 HR 为 4.6 (95%CI, 2.0 ~ 10.5); 3 根血管非阻塞性 HR 为 4.5 (95%CI, 1.6 ~ 12.5); 1 根血管阻塞性 HR 为 9.0 (95%CI, 4.2 ~ 19.0); 2 根血管阻塞性 HR 为 16.5 (95%CI, 8.1 ~ 33.7); 3 根血管或 LM 阻塞性 HR 为 19.5 (95%CI, 9.9 ~ 38.2)。1 年死亡率与 CAD 程度的增加有关, 范围从无明显 CAD 患者的 1.38% 到有 3 根血管或 LM 阻塞性 CAD 的 4.30%。风险调整后, 1 根或 2 根血管非阻塞性 CAD 与死亡率之间无显著相关性。但 3 根血管非阻塞性 CAD 与死亡率 (HR, 1.6; 95%CI, 1.1 ~ 2.5)、1 根血管阻塞性 CAD 与死亡率 (HR, 1.9; 95%CI, 1.4 ~ 2.6)、2 根血管阻塞性 CAD 与死亡率 (HR, 2.8; 95%CI, 2.1 ~ 3.7) 和 3 根血管或 LM 阻塞性 CAD 与死亡率 (HR, 3.4; 95%CI, 2.6 ~ 4.4) 均有显著相关性。组合结局也显示出相似的关联性。

结论和相关性：在这组接受冠状动脉造影的患者中，非阻塞性 CAD 与无明显 CAD 相比，1 年 MI 风险和全因死亡率显著增加。这些发现表明非阻塞性 CAD 的临床重要性，并有必要进一步研究干预措施以改善这些患者的预后。



18. Anguiano L, et al. Circulating Angiotensin-converting enzyme 2 activity in patients with chronic kidney disease without previous history of cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(7):1176±85. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv025> PMID:25813276.

摘要

背景：患有心血管（CV）疾病的患者具有升高的循环血管紧张素转换酶 2（ACE2）活性，但是关于无 CV 病史的慢性肾脏疾病（CKD）患者 ACE2 变化的信息很少。我们检查了 3-5 级（CKD3-5）的 CKD 患者和没有 CV 病史的透析（CKD5D）患者的循环 ACE2 活性。

方法：在 NEFRONA 研究中（n = 2572），检测了对照组（CONT）（n = 568）、CKD3-5（n = 1458）和 CKD5D（n = 546）的乙二胺四乙酸（EDTA）血浆样品中的循环 ACE2 活性。分析了不同的临床和分析变量，例如性别、年龄、糖尿病、血脂异常和高血压病史、血糖、肾脏、脂质和贫血状况、维生素 D 类似物治疗和降压药治疗（血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素受体阻滞剂）。使用改良的荧光测试法测量了 EDTA 血浆样品循环中的 ACE2 和 ACE 活性，检测前在血浆样品中加入氯化锌以恢复酶活性。

结果：与 CONT 相比，CKD3-5 和 CKD5D 中的循环 ACE2 活性显著降低。但是在进行配对病例对照研究时，CKD3-5 和 CKD5D 之间没有发现差异。通过多元线

性回归分析，在所有组中，男性和高龄被确定为 ACE2 活性的独立预测因子。糖尿病被确定为 CKD3-5 中 ACE2 活性的独立预测因子。与 CONT 相比，CKD3-5 和 CKD5D 中循环 ACE 活性显著增加；与 CKD3-5 相比，CKD5D 中循环 ACE 活性显著增加。通过多元回归分析，女性和年轻被确定为 CONT 和 CKD3-5 中 ACE 活性的独立预测因子。糖尿病也被确定为 CKD3-5 患者 ACE 活动的独立预测因子。

结论：可以在人 EDTA 血浆样品中添加锌以恢复酶活性，然后测量循环 ACE2 和 ACE 的活性。在没有 CV 病史的 CKD 人群中，来自人 EDTA 血浆样品的 ACE2 活性与经典 CV 危险因素直接相关，即老年、糖尿病和男性。我们的数据表明，在有 CV 事件风险的 CKD 患者中循环 ACE2 水平发生了改变。

19. Soler MJ, et al. Circulating Angiotensin converting enzyme 2 activity in kidney transplantation: a longitudinal pilot study. *Nephron Clin Pract*. 2012; 121(3±4):c144±50. <https://doi.org/10.1159/000345508> PMID:23257682.

摘要

背景/目的：血管紧张素转换酶 2（ACE2）是唯一已知的 ACE 活性同源物，可将血管紧张素（Ang）II 和 Ang I 分别降解为 Ang（1-7）和 Ang（1-9）。尚不清楚 ACE2 在肾移植（KT）中的作用。我们的目的是调查 KT 患者的循环 ACE2 活性，以及血清 ACE2 活性与 KT 患者的年龄、性别、移植功能和心血管危险标志物之间的关系。

方法：该横断面研究包括 113 名 KT 患者，他们的移植功能稳定。使用荧光测定法评估循环 ACE2 活性。

结果：与没有缺血性心脏病的 KT 患者相比，在患有缺血性心脏病的 KT 患者中可检测到循环 ACE2 活性，并且水平升高（ 105.9 ± 8.7 RFU/ μ l/h vs. 97.1 ± 7.05 RFU/ μ l/h, $p < 0.05$ ）。与女性相比，男性 KT 中的 ACE2 活性增加（ 105.2 ± 9.1 RFU/ μ l/h vs. 84.7 ± 6.9 RFU/ μ l/h, $p = 0.05$ ）。ACE2 活性与血清肌酐（ $r = 0.27$ ）、血清尿素（ $r = 0.29$ ）、年龄（ $r = 0.24$ ）、天冬氨酸转氨酶（ $r = 0.39$ ）、丙氨酸转氨酶（ $r = 0.48$ ）、 γ -谷氨酰转氨酶（ γ -GT）（ $r = 0.52$ ）、年龄（ $r = 0.24$ ）和糖化血红蛋白（ $r = 0.19$ ）均呈正相关（ $p < 0.05$ ）。通过多元回归分析，年龄、血清肌酐和血清 γ -GT 是血

清 ACE2 活性的独立预测因子 ($r = 0.66$, $p < 0.001$)。

结论: KT 患者中的循环 ACE2 活性是可测量的, 并且与年龄、肾移植和肝功能参数直接相关。这些发现表明, 血清 ACE2 的测量可用作一种非侵入性标志物, 以了解 KT 患者肾素-血管紧张素系统的作用。



20. Ortiz-Perez JT, et al. Role of circulating Angiotensin converting enzyme 2 in left ventricular remodeling following myocardial infarction: a prospective controlled study. PLoS ONE. 2013; 8(4):e61695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061695> PMID:23630610.

摘要

血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 将血管紧张素 II 裂解为血管紧张素 (1-7), 后者是一种心脏保护肽。在慢性心力衰竭中, 血清可溶性 ACE2 (sACE2) 活性升高, 提示对于左心功能不全具有补偿作用。我们的目的是研究 ST 抬高型心肌梗死 (STEMI) 后的 sACE2 活性、梗死面积、左心室收缩功能和重塑之间的关系。在 95 例初发 STEMI 的患者中进行了一项对比增强心脏磁共振研究, 并在 6 个月时重复进行, 以测量左室舒张末期容积指数、射血分数和梗死面积。将入院后第 24 小时至 48 小时和入院第 7 天通过荧光酶法测定的基线 sACE2 活性与 22 个匹配对照中测量的活性进行比较。患者在基线时显示的 sACE2 高于对照组 [104.4 (87.4 ~ 134.8) RFU/ μ l/hr vs. 74.9 (62.8 ~ 87.5) RFU/ μ l/hr, $p < 0.001$]。在第 7 天, sACE2 活性较基线显著增加 [115.5 (92.9 ~ 168.6) RFU/ μ l/hr, $p < 0.01$]。观察到 sACE2 活性与急性期和后续射血分数之间呈负相关 (分别为 $r = -0.519$, $p < 0.001$; $r = -0.453$, $p = 0.001$)。此外, sACE2 与梗死面积直接相关 ($r = 0.373$, $p < 0.001$)。梗死面积 [$\beta = -0.470$ (95%CI, -0.691 ~ -0.248), $p < 0.001$] 和 7 天时的 sACE2 [$\beta = -0.025$ (95%CI, -0.048 ~

-0.002), $p = 0.030$] 是随访射血分数的独立预测因子。上四分位 sACE2 的患者左室重构不良的发生率增加了 4.4 倍 (95%置信区间: 1.3 ~ 15.2, $p = 0.027$)。总之, 血清 sACE2 活性与梗死面积、左心室收缩功能障碍有关, 并且与左心室重塑的发生有关。

21. Bangalore S, et al. Renin Angiotensin system inhibitors for patients with stable coronary artery disease without heart failure: systematic review and metaanalysis of randomized trials. BMJ. 2017; 356:j4. <https://doi.org/10.1136/bmj.j4> PMID:28104622.

摘要

目的: 与主动对照或安慰剂相比, 严格评估肾素血管紧张素系统抑制剂 (RASi) 对于无心力衰竭的冠心病患者的疗效。

设计: 随机试验的荟萃分析。

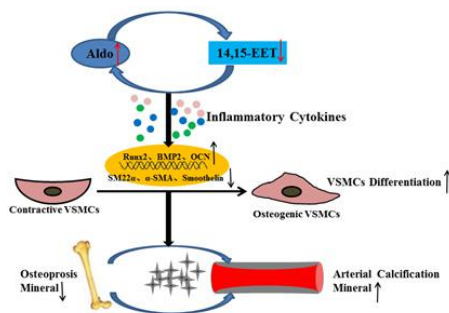
数据来源: 截至 2016 年 5 月 1 日的 PubMed、EMBASE 和 CENTRAL 数据库。

选择研究的资格标准: 在没有心力衰竭 (定义为左心室射血分数 $\geq 40\%$ 或没有临床心力衰竭) 的稳定冠心病患者中进行的 RASi 随机试验, 并与安慰剂或主动对照组对比。每个试验都必须招募至少 100 名无心力衰竭的冠心病患者, 并至少随访 1 年。如果研究有修订或比较了血管紧张素转化酶抑制剂与血管紧张素受体阻滞剂的应用, 则排除该研究。结局是死亡、心血管死亡、心肌梗塞、心绞痛、中风、心力衰竭、血运重建、糖尿病和因不良反应而停药。

结果: 24 个试验, 包括 198275 患者随访年。与安慰剂相比, RASi 降低了所有原因导致的死亡率 (比率 0.84, 95%置信区间 0.72 ~ 0.98)、心血管疾病的死亡率 (0.74, 0.59 ~ 0.94)、心肌梗塞 (0.82, 0.76 ~ 0.88)、中风 (0.79, 0.70 ~ 0.89)、心绞痛、心力衰竭和血运重建, 但与主动对照组相比则没有作用 (所有原因死亡率为 1.05, 0.94 ~ 1.17, 交互作用 $p = 0.006$; 心血管疾病死亡率 1.08, 0.93 ~ 1.25, 交互作用 $p < 0.001$; 心肌梗塞 0.99, 0.87 ~ 1.12, 交互作用 $p = 0.01$; 中风 1.10, 0.93 ~ 1.31; 交互作用 $p = 0.002$)。Bayesian 回归分析表明, 与安慰剂相比, RASi 对所有原因死亡率和心血管疾病死亡率的影响取决于对照事件的发生率, 因此, RASi 仅在具有较高对照事件发生率的试验

中有益（每 1000 例患者年死亡数 > 14.10 例，心血管死亡数 > 7.65 例），而在控制事件发生率较低的试验中则没有益处。）

结论：在稳定的无心力衰竭的冠状动脉疾病患者中，RASi 仅在与安慰剂相比时才有减少心血管事件和死亡的作用，而与主动对照组相比时则没有。即使在这项研究的安慰剂对照试验中，RASi 的获益也主要出现在对照事件发生率较高的试验中，而在对照事件发生率较低的试验中则没有益处。证据也不支持 RASi 优于其他主动对照。



22. Sluimer JC, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and activity in human carotid atherosclerotic lesions. *J Pathol.* 2008; 215(3):273±9. <https://doi.org/10.1002/path.2357> PMID: 18498093.

摘要

血管紧张素转换酶（ACE）2 是最近发现的 ACE 同源物。由于 ACE2 能使促动脉粥样硬化的血管紧张素 II 失活，因此我们推测 ACE2 可能在动脉粥样硬化中起保护作用。使用分子组织学（原位杂交、免疫组织化学）研究了 ACE2 mRNA 和蛋白在人血管中的时空定位以及与动脉粥样硬化的可能关联。另外，使用酶分析法研究了 ACE: ACE2 的平衡。ACE2 mRNA 在早期和晚期人颈动脉粥样硬化病变中表达。此外，ACE2 蛋白存在于人的静脉、未患病的乳腺动脉和动脉粥样硬化的颈动脉中，并在内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞中表达。免疫反应性的定量分析表明，在动脉粥样硬化的所有阶段，ACE 和 ACE2 在总血管壁的表达相似。与早期和破裂的动脉粥样硬化病变相比，在稳定的晚期动脉粥样硬化病变中观察到的 ACE2 蛋白具有酶促活性，但活性较低。这些结果表明在动脉粥样硬化的发展过程中 ACE2 活性的差异调节，并表明这种新型的肾素-血管紧张素系统分子可能在动脉粥样硬化的发病机理中起作用。

23. Zulli A, et al. Immunolocalization of ACE2 and AT2 receptors in rabbit atherosclerotic plaques. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54(2):147±50. <https://doi.org/10.1369/jhc.5C6782.2005> PMID: 16116029.

摘要

有证据表明，血管紧张素 2 型受体（AT2R）和血管紧张素转化酶 2（ACE2）在动脉粥样硬化中起保护作用。尚未在兔动脉粥样硬化斑块中发现这些因素。我们的目的是在兔动脉粥样硬化组织中定位 ACE2 和 AT2R，并确定哪些细胞类型表达这些因子。新西兰大白兔饲喂对照饮食或 0.5%胆固醇饮食（n = 8/组），持续 12 周。使用市售的 ACE2、AT2R、RAM 11（用于识别巨噬细胞）和 α 平滑肌细胞肌动蛋白（αSMC）抗体，对石蜡固定的胸主动脉进行连续切片并进行免疫组织化学处理，以鉴定平滑肌细胞和成肌纤维细胞。AT2R 免疫反应性，而不是 ACE2 免疫反应性，明显存在于覆盖正常血管壁的内皮细胞中。但是，AT2R 和 ACE2 免疫反应性均明显存在于覆盖新内膜和动脉粥样硬化斑块的内皮细胞中。在噬斑内，在巨噬细胞和 αSMC 肌动蛋白阳性细胞中均观察到 AT2R 和 ACE2 免疫反应性。连续切片的检查显示，大多数细胞均为 ACE2-和 AT2R 阳性。巨噬细胞和 αSMC 肌动蛋白阳性细胞在动脉粥样硬化斑块中产生 ACE2 和 AT2R。确定这些因素在控制动脉粥样硬化中的作用将需要进一步的研究。

24. Dong B, et al. Overexpression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(7):1270±6. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.164715> PMID: 18403726.

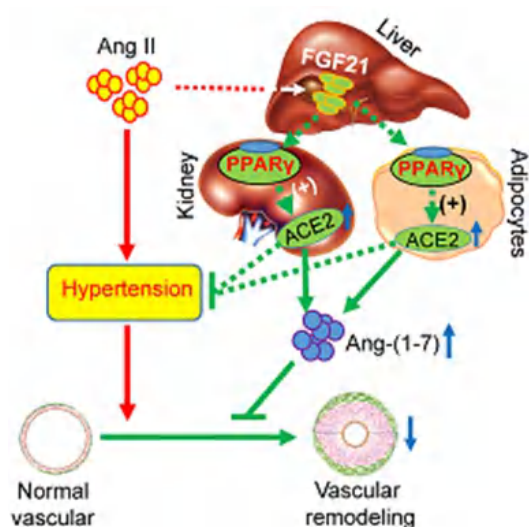
摘要

目的：本研究的目的是检验以下假设：ACE2 过表达可通过拮抗 ACE 活性并将血管紧张素 II 转化为血管紧张素 1-7 来增强动脉粥样硬化斑块的稳定性。

方法与结果：内皮损伤及致动脉粥样硬化饮食致 114 只家兔发生腹主动脉粥样硬化斑块。基因治疗分别在第 4 周的 A 组和第 12 周的 B 组中进行。将每组兔随机分为 3 个亚组，分别接受重组 ACE2 表达载体（AdACE2）、对照载体 AdEGFP 和血管紧张素 1-7 受体拮抗剂 AdACE2+A779。从第 4 周到第 8 周，局部

ACE2 的过度表达减弱了病变的进展,但未能减轻第 12 周到第 16 周斑块大小的进展。与 AdEGFP 亚组相比, AdACE2 亚组的斑块组织中胶原蛋白含量更高,斑块稳定性得分更高,血管紧张素 II 水平降低,血管紧张素 1-7 水平升高。

结论: ACE2 的过表达导致动脉粥样硬化斑块稳定,其机制可能是血管收缩性血管紧张素 II 向血管保护性血管紧张素 1-7 的转化。

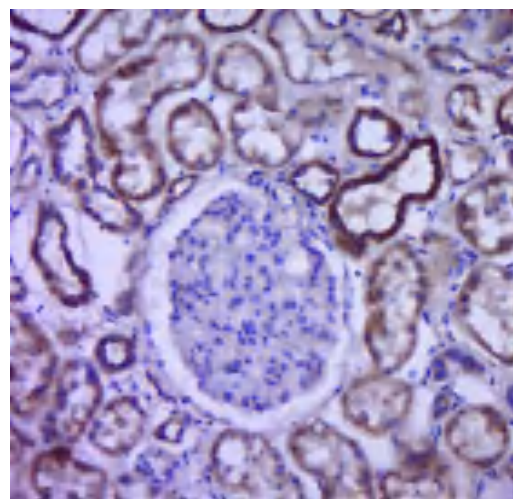


25. Zhang C, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates atherosclerotic lesions by targeting vascular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107 (36):15886-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001253107> PMID: 20798044.

摘要

血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 是新发现的 ACE 同源物,其作用与血管紧张素 II (Ang II) 的作用相反。但是,对 ACE2 有效抑制早期动脉粥样硬化病变的潜在机制仍然知之甚少。在这里,我们在体外和体内均显示, ACE2 通过抑制血管平滑肌细胞 (VSMC) 的生长并改善内皮功能来抑制早期动脉粥样硬化病变的发展。在一项相对较大的动物队列研究 (66 只兔) 中, Ad-ACE2 转染的主动脉段显示出明显的脂肪条纹形成减弱,新内膜巨噬细胞浸润和内皮功能受损的减轻。部分还显示单核细胞趋化蛋白 1、凝集素样氧化的低密度脂蛋白受体 1 和增殖的细胞核抗原的表达降低,从而导致动脉粥样硬化病变的延迟发作。在细胞水平上, ACE2 显著调节 Ang II 诱导的人脐静脉内皮细胞和 VSMC 的生长和迁

移。ACE2 的抗动脉粥样硬化作用涉及下调 ERK-p38、JAK-STAT 和 Ang II-ROS-NF-kappaB 信号通路,并上调 PI3K-Akt 通路。这些发现揭示了 ACE2 的抗动脉粥样硬化活性的分子机制,并表明调节 ACE2 可以为动脉粥样硬化提供治疗选择。



26. Zhao X, et al. Gene silencing of TACE enhances plaque stability and improves vascular remodeling in a rabbit model of atherosclerosis. *Sci Rep*. 2015; 5:17939. <https://doi.org/10.1038/srep17939> PMID: 26655882.

摘要

我们旨在检验以下假设:在兔动脉粥样硬化模型中,肿瘤坏死因子 α 转换酶 (TACE) 的基因沉默可能会减轻病变炎症和积极的血管重塑,并增强斑块稳定性。将慢病毒介导的 TACE shRNA 注射到兔的腹主动脉斑块中,从第 8 周到第 16 周有效地下调了 TACE 表达和活性。TACE 基因沉默可降低重塑指数和斑块负荷,并减少巨噬细胞和脂质含量,同时增加平滑肌细胞和主动脉斑块中的胶原蛋白的含量。此外, TACE 基因沉默可减弱 P65、iNOS、ICAM-1、VEGF 和 Flt-1 的局部表达以及 MMP9 和 MMP2 的活性,同时增加 TGF- β 1 的局部表达并减少主动脉中的新血管数量。TACE shRNA 处理导致 TACE 在巨噬细胞中的表达下调、ERK-P38 磷酸化钝化以及共培养的小鼠血管平滑肌细胞或人脐静脉内皮细胞的血管形成。总之, TACE 的基因沉默增强了斑块稳定性并改善了血管阳性重塑。该机制可能涉及局部炎症的减轻、新血管形成和 MMP 活化,以及可能通过下调 ERK-NF- κ B 和上调 TGF- β 1 信号通路来增加胶原蛋白的产生。

27. Burrell LM, et al. The ACE2 gene: its potential as a functional candidate for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2013; 124(2):65±76.

摘要

RAS (肾素-血管紧张素系统) 在 CVD (心血管疾病) 的病理生理中起重要作用, 而 RAS 阻滞是在 CVD 管理中的重要治疗策略。现在已知存在 RAS 的新平衡臂, 其中 ACE (血管紧张素转换酶) 2 降解经典 RAS 的主要效应分子 Ang (血管紧张素) II, 并产生 Ang- (1-7)。在 CVD 的实验模型中, 改变的 ACE2 表达与心脏和血管疾病相关, 并且 ACE2 在衰竭的人心脏和动脉粥样硬化血管中升高。在人类, 循环中的 ACE2 活性随冠心病以及心力衰竭而增加, 血浆 ACE2 水平的很大一部分变化都归因于遗传因素。ACE2 基因定位于 Xp22 染色体。本文综述了 ACE2 基因变异与 CVD 相关的证据, 并研究了可能改变基因表达或转录活性的潜在功能性 ACE2 变异体的线索。迄今为止的研究已经调查了 ACE2 基因与高血压、左心室肥大和冠状动脉疾病的相关性, 但结果不一致。差异可能反映了研究的样本量、受试者的性别或种族、心血管表型或所研究的 ACE2 单核苷酸多态性。如果得到证实, 经常观察到明显的性别依赖性可能特别重要。迄今为止, 还没有研究可以同时评估 ACE2 基因多态性和循环 ACE2 活性。迫切需要进行仔细的大规模临床研究, 以更准确地阐明 ACE2 在 CVD 中的潜在作用。

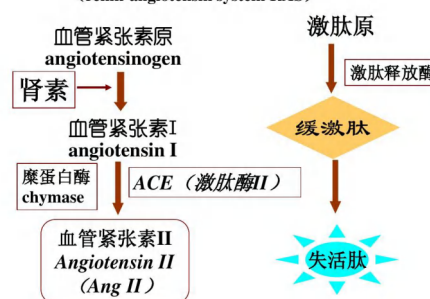
28. Yang W, et al. Association study of ACE2 (Angiotensin I-converting enzyme 2) gene polymorphisms with coronary heart disease and myocardial infarction in a Chinese Han population. *Clin Sci (Colch)*. 2006; 111(5):333±40.

摘要

结果表明, ACE2 (血管紧张素 I 转换酶 2) 可能是心血管疾病的保护性蛋白。但是, 仅对人类进行了少量研究。这促使我们进行了一项病例对照研究, 以研究 ACE2 多态性与 CHD (冠心病) 和 MI (心肌梗塞) 的关系。通过 PCR-RFLP (限制性片段长度多态性) 技术对中国人群中 811 例 CHD 患者 (其中 508 例为 MI 患者) 和 905 名正常对照者 ACE2 基因的三个单核苷酸多态性 (1075A/G、8790A/G 和 16854G/C) 进行基因分型。多态性是连锁不平衡的 ($r^2 = 0.854 \sim 0.973$)。因为 ACE2 基因在 X 染色体上, 所以按性别进行了分析。在

女性隐性模型中, 校正协变量后, 检测到与 MI 的相关性分别为 1075A/G ($p = 0.026$; 比值比 = 1.98) 和 16854G/C ($p = 0.028$; 比值比 = 1.97)。在男性受试者中, 常见两种单倍型 (AAG 和 GGC)。与最常见的单倍型 AAG 相比, 在不饮酒的男性受试者中, 单倍型 GGC 与 1.76 倍的冠心病危险性相关 [95%CI (置信区间) 1.15 ~ 2.69; $p = 0.007$]; 在调整了环境因素的情况下, 与 1.77 倍的 MI 风险相关 (95%CI, 1.12 ~ 2.81; $p = 0.015$)。总之, 本研究结果表明, ACE2 基因的常见遗传变异可能会影响女性的 MI, 并可能与饮酒交互作用, 从而影响中国男性的 CHD 和 MI 风险。

肾素—血管紧张素系统 (renin-angiotensin system RAS)



29. Palmer BR, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 A1075G polymorphism is associated with survival in an acute coronary syndromes cohort. *Am Heart J*. 2008; 156(4):752±8.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.06.013> PMID: 18926157.

摘要

背景: 在先前的研究中已知位于 X 染色体上的血管紧张素转换酶 2 (ACE2) 的基因多态性与高血压和左心室肥大相关。我们测试了一种假设, 即 ACE2 基因多态性的罕见等位基因与急性冠状动脉综合征 (ACS) 事件发生后的危险因素和不良后果相关。

方法: 招募入院后发生 ACS 事件的患者 ($n = 1042$), 并针对血管紧张素转换酶 2 基因的 A1075G 多态性进行基因分型。在中位数 2.19 年的随访中, 测试了该遗传标志物与基线测量、超声心动图测量和临床结局的相关性。由于 ACE2 基因是 X 连锁的, 因此分别对男性和女性进行了分析。患者主要是欧洲人种 (90.1%)。

结果: 经协变量校正后, A1075 等位基因与男性患者的

死亡率显著相关（危险比 1.95，95%CI 1.10 ~ 3.46， $p = 0.047$ ），但未经校正的则显示不相关（危险比 1.14，95%CI 0.736 ~ 1.76， $p = 0.56$ ）。与欧洲血统相比，毛利人患者的 G1075（ $p < 0.035$ ）等位基因更为高频。A1075 组的男性左心室舒张功能和充盈压的超声心动图指标 E/E' 较高（G 等位基因组 10.5 [95%CI 10.0 ~ 11.0]，A 等位基因组 11.4 [95%CI 10.8 ~ 12.1]）， $p = 0.024$ ）。A1075 基因型与男性生存率显著相关（死亡率：A 12.8%， $n = 39$ ；G 29.2%， $n = 48$ ； $p = 0.037$ ），但如同时接受 β 受体阻滞剂治疗则无相关性（死亡率：A 13.5%， $n = 273$ ；G 8.2%， $n = 304$ ， $p =$ 无意义）。

结论：A1075 等位基因与经协变量调整后的男性患者死亡率相关。

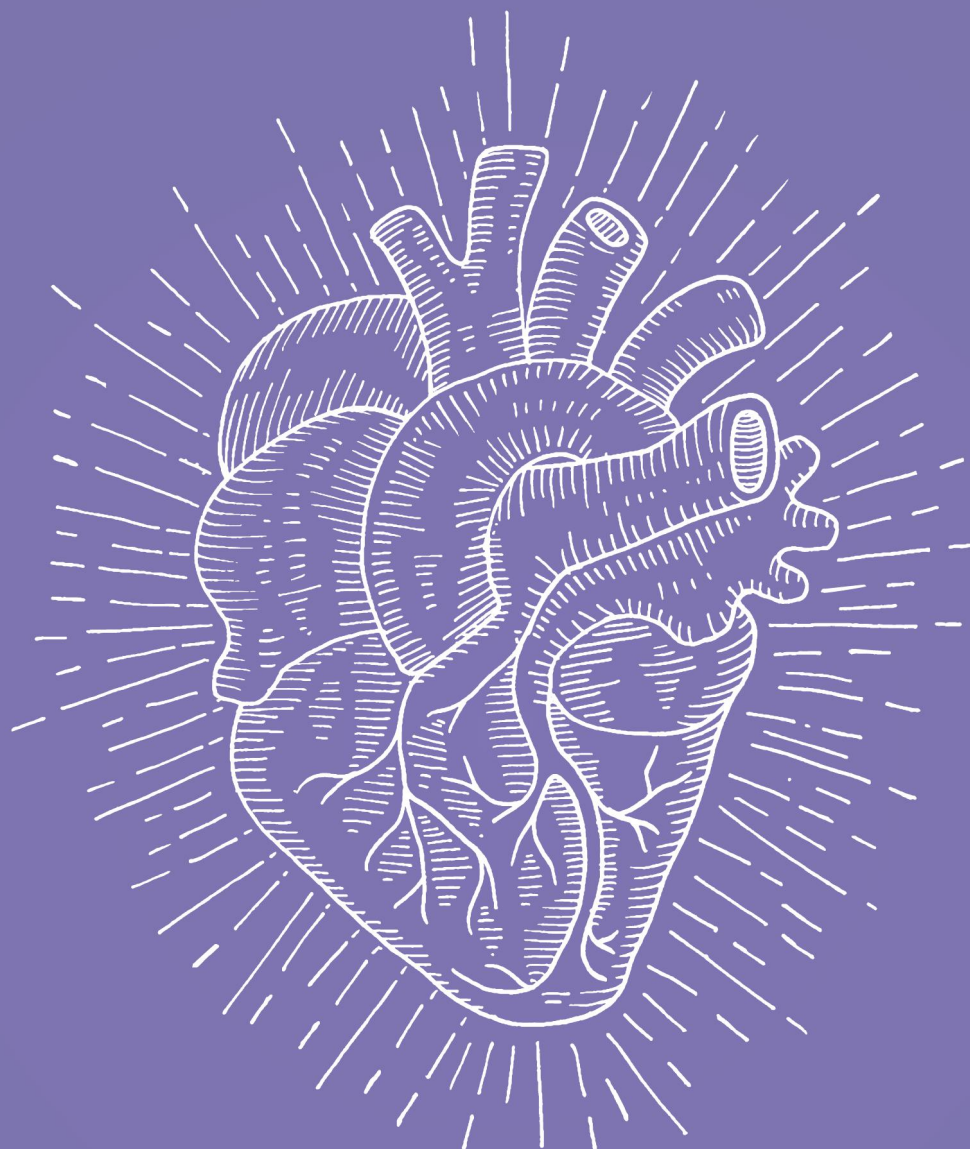
30. Patel SK, et al. From gene to protein-experimental and clinical studies of ACE2 in blood pressure control and arterial hypertension. *Front Physiol.* 2014; 5:227. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00227> PMID: 25009501.

摘要

高血压是中风、冠状动脉事件、心衰和肾衰的主要危险因素，并且肾素-血管紧张素系统（RAS）在其发病机理

中起主要作用。在 RAS 中，血管紧张素转化酶（ACE）将血管紧张素（Ang）I 转化为血管收缩剂 Ang II。存在一个 RAS 的“替代”臂，其中 ACE2 通过降解 Ang II 和生成血管扩张剂 Ang1-7 来抵消经典 RAS 的作用。ACE2 在心脏、血管和肾脏中高度表达。ACE2 的胞外催化活性结构域发生脱落，导致 ACE2 进入循环。ACE2 基因映射到三种遗传性高血压大鼠品系中 X 染色体上的数量性状基因座，表明 ACE2 可能是高血压的候选基因。假设组织中 ACE/ACE2 平衡的破坏会导致血压的变化，而 ACE2 表达的增加可防止血压升高，而 ACE2 缺乏会导致高血压。实验性高血压研究已经测量了心脏或肾脏和/或血浆中的 ACE2，并报告 ACE2 的缺失或抑制会导致高血压，而促进 ACE2 可以预防高血压的发生，因此增加 ACE2 可能是人类高血压管理中的治疗选项。在 ACE2 基因或循环水平上对高血压患者的研究相对较少。健康受试者的血浆 ACE2 活性较低，但具有心血管危险因素或心血管疾病的患者血浆 ACE2 活性较高。遗传学研究调查了 ACE2 基因多态性与高血压或血压之间的关系，并得出了不一致的结论。这篇综述讨论了关于实验性高血压模型中 ACE2 的证据，以及循环 ACE2 活性和 ACE2 多态性与人的血压和动脉高血压之间的关系。





即时检测，更早呵护



阳普医疗干式荧光免疫定量检测平台 QT-200



本期精读是一篇研究论著，研究者在 10 余年的随访过程中，通过前瞻性研究阻塞性 CAD 患者血浆 ACE2 水平和活性与主要不良心血管事件之间的关联，表明阻塞性 CAD 患者升高的血浆 ACE2 活性是 MACE 的独立预测因子。

血浆血管紧张素转换酶 2 升高是阻塞性冠状动脉病患主要不良心血管事件的独立预测因子

摘要

背景：血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 是肾素血管紧张素系统的内源性调节剂。循环中 ACE2 的增加可预测心力衰竭 (HF) 患者的不良预后，但尚不明确阻塞性冠状动脉疾病 (CAD) 患者血浆中 ACE2 活性的升高是否可预测其主要不良心血管事件 (MACE)。

方法：我们前瞻性招募了阻塞性 CAD 患者（定义为在侵入性冠状动脉造影上，左冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ 和/或 ≥ 1 条其他主要心外膜血管狭窄 $\geq 70\%$ ），并测量了血浆 ACE2 活性。对患者进行随访以确定循环中的 ACE2 活性水平是否可预测 MACE 的主要终点（心血管疾病死亡、HF 或心肌梗塞）。

结果：我们招募了 79 例阻塞性冠状动脉疾病患者。血浆 ACE2 活性的中位数 (IQR) 为 29.3 pmol/mL/min [21.2 ~ 41.2]。在中位数为 10.5 年 [9.6 ~ 10.8 年] 的随访中，46% 的患者发生了 MACE (36 个事件)。在 Kaplan-Meier 分析中，高于中位数的血浆 ACE2 活性与 MACE (对数秩检验, $p = 0.035$) 和心衰住院 ($p = 0.01$) 具有相关性。在 Cox 多变量调整后，log ACE2 活性仍是 MACE [危险比 (HR) 2.4, 95% 置信区间 (CI) 1.24 ~ 4.72, $p = 0.009$] 和 HF 住院 (HR: 4.03, 95%CI: 1.42 ~ 11.5, $p = 0.009$) 的独立预测因子。

结论：血浆中的 ACE2 活性独立增加了阻塞性 CAD 患者长期不良心血管结局的风险。

原文出处：PLOS ONE | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198144> June 13, 2018

作者：Ramchand J, et al.

引言

心血管 (CV) 疾病是发病和死亡的主要原因^[1]，并且与肾素-血管紧张素系统 (RAS) 的激活有关。在 RAS 中，血管紧张素转化酶 (ACE) 将血管紧张素 (Ang) I 转化为血管收缩剂和促动脉粥样硬化肽 Ang II^[2]，而 ACE2 则是 RAS 的内源性抑制剂，其主要通过对 Ang II 的降解而发挥作用^[3]。心脏和血管中高表达 ACE2^[4]，ACE2 通过肿瘤坏

死因子 α 转化酶 (TACE) 的作用从细胞表面裂解下来，并将具有催化活性的胞外结构域释放到循环中^[5-6]。在人类心肌中，ACE2 定位于微循环的内皮^[7]，也存在于动脉粥样硬化斑块基质中^[8]。在健康个体中，循环中的 ACE2 活性水平很低^[9,10]，但在心血管疾病或存在心力衰竭 (HF)^[11]、心房颤动 (AF)^[12]、肾脏疾病^[13,14] 和 1 型糖尿病^[15] 等风险因子时升高。迄今为止，关于循环 ACE2 活性水平的预

后信息仍是有限的且结果相互矛盾。例如，增加的 ACE2 活性可预测心力衰竭的不良 CV 结局^[16]，但却不能预测急诊骨科手术后患者^[17]或患有慢性肾脏疾病患者的不良 CV 结局^[13,14]。这些差异可能反映了患者人群、患者人群的相对心血管疾病风险或随访时间长度。本研究的目的是在对经血管造影证实为阻塞性 CAD 的患者高危队列十多年的随访中，调查血浆 ACE2 活性水平预测 CV 事件的作用。



材料和方法

前瞻性招募年龄大于 18 岁的、于 2004 年 11 月至 2006 年 1 月之间被转诊至三级心血管中心进行冠状动脉造影检查以调查可疑 CAD 的连续患者，只有那些患有显著阻塞性 CAD 的患者才有资格参加本研究。心源性休克、既往有充血性心力衰竭、或血管造影左室射血分数 < 30% 的患者被排除在外。获得墨尔本奥斯汀人类健康研究伦理委员会的批准，该研究符合《赫尔辛基宣言》。所有患者签署了书面知情同意。

完成了一份标准的医疗问卷，并与医院的病历进行了核对；测量了血压并进行了人体测量。通过有创冠状动脉造影术的视觉评估，阻塞性 CAD 被定义为左冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ 和/或 ≥ 1 条其他主要心外膜冠状动脉狭窄 $\geq 70\%$ ^[18]；根据记录的病史、接受葡萄糖治疗降低血糖或空腹血糖 >7 mmol/L 做出糖尿病的诊断；如果先前由医生做出过诊断和/或当前正在使用抗高血压药物，则定义为高血压；如果先前由医师做出过诊断和/或当前正在使用降脂药，则定义为血脂异常；在之前 12 个月内有吸烟则定义为吸烟。

入院时收集空腹血样，以测量肾功能、脂质和心肌肌钙蛋白。Access AccuTnI 测定法（Beckman-Coulter, Chaska, MN, USA）用于测量血浆心肌肌钙蛋白的第 99 百分位数，而健康人群的参考值为 $0.04 \mu\text{g/L}$ 。本研究中心肌肌钙蛋白水平 $\geq 0.04 \mu\text{g/L}$ （第 99 百分位数）则考虑为异常。

对于血浆 ACE2 的测量，在就诊后的 48 小时内将血液收

集到肝素锂试管中，并在 4°C 以 3000 rpm 的速度离心血液 10 分钟来获得血浆，并储存于 -80°C 下直至进行测试。在收集所有样品后的 2 年内测量血浆 ACE2 活性。对样本进行分批，并在 2 天的时间内进行 ACE2 分析。使用已经验证的、敏感的淬灭荧光底物为基础的测试方法测定 ACE2 的催化活性^[9]。简而言之，将血浆（0.25 mL）稀释到低离子强度缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl, pH 6.5）中，并加到已去除了 ACE2 活性内源性抑制剂的 200 μL ANX-Sepharose 4 Fast-Flow 树脂（Amersham Biosciences, GE Healthcare, Uppsala, Sweden）上^[9]。结合并洗涤后，测定所得洗脱液的 ACE2 催化活性。将复份样品与 ACE2 特异性淬灭的荧光底物一起孵育，含有或不含有 100 mM 乙二醇四乙酸。通过与游离荧光素 4-氨基-甲氧基香豆素（MCA; Sigma, MO, USA）的标准曲线比较，来确定底物的切割速率，并表示为裂解底物的 pmole/mL 血浆/min 。批内和批间变异系数分别为 5.6% 和 11.8%。

主要终点是主要不良心脏事件（MACE）的复合，定义为 CV 死亡、HF 住院或心肌梗塞（MI），次要终点是心衰住院。根据 2014 年美国心血管学会/美国心脏协会关于临床试验中 CV 终点的定义，对终点进行了描述^[19] CV 死亡的定义是由于心源性猝死、心衰、急性心梗、脑血管意外、CV 出血、CV 手术或其他 CV 原因而导致的死亡，即不包括在先前类别中的死亡，但具有特定的已知 CV 原因，例如肺栓塞^[19]；心力衰竭住院定义为患者入院时初步诊断为心力衰竭，住院时间至少为 24 小时，期间患者出现新的或恶化的心力衰竭症状，有客观证据导致新的或恶化的心力衰竭，并接受了针对心力衰竭的强化治疗^[19]；根据既定标准，将心肌梗死定义为 ST 抬高型或非 ST 抬高型心肌梗死的临床诊断^[20,21]。



由经验丰富的不知情研究人员通过审查病历并与每个患者和/或指定的全科医生联系以获取更多信息来收集临床结局。

使用 STATA，版本 14.2（Statacorp, College Station, TX, USA）进行统计学分析。用均值 $\pm$ 标准差表示正态分布

的连续变量；用中位数和四分位数间距（IQR）表示非正态分布数据（血浆 ACE2 活性、甘油三酯、心肌肌钙蛋白和肾小球滤过率）。用 t 检验或 Mann Whitney U 检验（针对非正态分布数据）评估高于和低于中位数 ACE2 活性的患者之间连续变量的差异。以计数和百分比表示分类变量，并使用 Fisher 精确检验或卡方检验进行比较。多元回归分析用于确定可能独立影响血浆 ACE2 活性的变量。血浆 ACE2 活性、心肌肌钙蛋白水平和肾小球滤过率因其偏斜分布而采用自然对数转换分析。通过目视检查变量的分布和 Q-Q 作图，可以得到更正态的分布。

通过 Kaplan Meier 方法估计 MACE 的累积发生率，用对数秩检验评估血浆中 ACE2 活性低于和高于中位数值患者之间的差异。如果在随访期间出现多个终点，则到达第一个事件的时间被考虑用于 MACE 分析。Cox 比例风险模型用于估计 MACE 的调整后风险比（HR）和 95%置信区间（CI）。将单变量分析中的显著变量（ $p < 0.1$ ）输入到最终的多元模型中以

确定 MACE 的独立预测因子。除 log ACE2 以外，还使用常规的预后变量，包括年龄、糖尿病史、log 心肌肌钙蛋白以及使用他汀、 β 受体阻滞剂、ACE 抑制剂或血管紧张素受体阻滞剂进行治疗。双尾 p 值 < 0.05 被认为具有显著性意义。

结果

我们招募了 79 例经血管造影证实为阻塞性 CAD 的患者，没有失访患者，中位随访时间为 10.6 年（IQR 9.6 ~ 10.9 年）。表 1 列出了研究人群的临床和生化特征。该队列包括 65%的男性，年龄均数 $\pm$ SD 为 66 ± 12 岁，BMI 为 27.4 ± 4.4 kg/m^2 。患者的心血管风险很高，其中 69%的人有吸烟史，而有 CAD 的病史则为 66%，血脂异常的比例为 60%，高血压的比例为 82%，糖尿病的比例为 24%，房颤的比例为 11%。就诊时正在进行的药物治疗而言，有 59%正在使用血管紧张素转换酶抑制剂（ACEi）或血管紧张素受体阻滞剂（ARB），58%正在使用 β -受体阻滞剂，72%正在使用他汀类药物，100%正在使用阿司匹林。

Table 1. Participant characteristics in total cohort and according to plasma ACE2 activity.

Variable	All patients	ACE2 < median (n = 39)	ACE2 > median (n = 40)	P-value
Age (years)	66 $\pm$ 12	67 $\pm$ 11	63 $\pm$ 13	0.27
Male gender [n (%)]	51 (65%)	18(46%)	33 (83%)	0.001
BMI (kg/m^2)	27.4 $\pm$ 4.4	27.4 $\pm$ 5.2	27.3 $\pm$ 3.6	0.939
SBP (mmHg)	130 $\pm$ 17	131 $\pm$ 15	130 $\pm$ 19	0.746
DBP (mmHg)	70 $\pm$ 13	71 $\pm$ 13	68 $\pm$ 14	0.321
Presentation with ACS	51 (65%)	23 (59%)	28 (70%)	0.306
Previous history [n (%)]				
CAD	51 (66%)	24 (63%)	27 (69%)	0.573
Dyslipidemia	48 (60%)	23 (59%)	25 (63%)	0.748
Hypertension	64 (82%)	30 (77%)	34 (87%)	0.238
Diabetes	19 (24%)	11 (29%)	8 (20%)	0.357
Atrial fibrillation	9 (11%)	1 (3%)	8 (20%)	0.015
Smoking history	54 (69%)	24 (63%)	30 (75%)	0.257
Medical treatment [n (%)]				
ACEi/ARB	45 (59%)	24 (63%)	21 (55%)	0.484
Beta-blocker	44 (58%)	23 (61%)	21 (55%)	0.642
Statin	56 (72%)	27 (69%)	29 (74%)	0.615
Aspirin	79 (100%)	39 (100%)	40 (100%)	1
Serum biochemistry				
LDL (mmol/L)	2.5 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 0.8	0.736
Triglycerides (mmol/L)	1.2 [0.9–1.9]	1 [0.8–1.9]	1.4 [0.9–2]	0.119
eGFR (ml/min/1.73m ²)	70 [48–96]	76 [59–98]	69 [46–95]	0.675
Troponin I ($\mu\text{g/L}$)	0.6 [0–14.5]	0.54 [0–8.2]	2.3 [0–21.2]	0.211
LVEF < 50% [n (%)]	42 (58%)	18(53%)	24 (62%)	0.459
Culprit vessel [n (%)]				
Right coronary	27 (34)	15 (39)	12 (30)	0.428
Left anterior descending	23 (23)	13 (33)	10 (25)	0.415
Left circumflex	20 (25)	8 (21)	12 (30)	0.332
Left main	1 (1)	0	1 (3)	0.320
Inpatient revascularisation [n (%)]	61 (77)	31 (79)	30 (75)	0.635
MACE [n (%)]	36 (46%)	12 (31%)	24 (60%)	0.009

Values are mean $\pm$ standard deviation, n (%) or median [interquartile range].
ACS = acute coronary syndrome; BMI = body mass index; ACEi = angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB = angiotensin receptor blocker; CAD = coronary artery disease; DBP = diastolic blood pressure; eGFR = estimated glomerular filtration rate; LVEF = left ventricular ejection fraction; LDL = low-density lipoprotein; MACE = major adverse cardiovascular events; SBP = systolic blood pressure

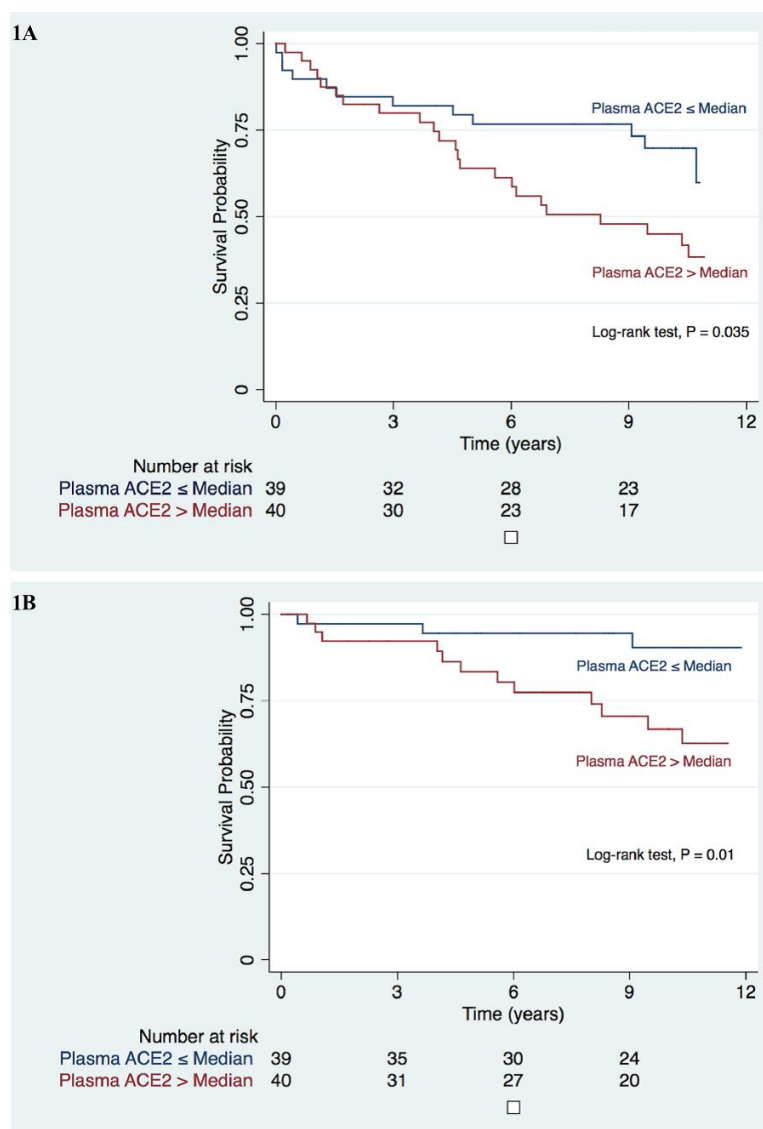
ST 段抬高的急性冠状动脉综合征 (ACS) [n = 24, 中位数 31.7 pmol/mL/min (IQR 5.6 ~ 43.9)] 与非 ST 段抬高的 ACS 患者 [n=27, 中位数 29.1 pmol/mL/min (IQR 23.1 ~ 46.4)] 以及稳定型心绞痛患者 [n = 28, 中位数 26.7 pmol/mL/min (IQR 18.7 ~ 39.8)], $p = 0.386$ 之间的血浆 ACE2 水平无差异, 因此对整个队列进行了进一步的分析。

整个队列中的中位数 ACE2 水平为 29.3 pmol/mL/min [IQR 21.2 ~ 41.2]。根据血浆中高于/低于中位数 ACE2 水平的 ACE2 活性对患者进行分类。血浆 ACE2 活性高于中位数的患者更可能是男性且患有房颤 (表 1, 两者 $p < 0.05$)。进行了多元回归分析以识别影响血浆 ACE2 活性的变量。男性是更高 ACE2 活性的唯一独立预测因子 ($p = 0.022$)。两组的 CAD 和心脏病危险因素 (包括血脂异常、高血压、糖尿病和吸烟)

的发生率均相似, LVEF < 50%、使用药物、低密度脂蛋白胆固醇水平、甘油三酯水平、肾功能和心肌肌钙蛋白水平也是相似的 (所有 $p > 0.05$)。

在随访期间, 有 18 例死亡, 19 例心肌梗死和 16 例 HF 住院。MACE 的主要终点指标是 CV 死亡率与 HF 住院或 MI 的复合结局, 发生在 36 例患者中 (46%)。

与中位数以下的 ACE2 水平相比, 高于中位数水平的 ACE2 (> 29.3 pmol/mL/min) 与发生 MACE (对数秩检验, $p = 0.035$; 图 1A) 和心衰住院 ($p = 0.01$; 图 1B) 的发生率显著相关。而 CV 死亡 ($p = 0.195$) 或 MI ($p = 0.35$) 的发生率没有显著性差异。在仅包括男性患者的亚组分析中, 根据 ACE2 的中位数水平, MACE 的发生率则无显著性差异 ($p = 0.124$)。



使用 Cox 回归模型进行的生存分析表明，年龄、房颤史、糖尿病史和 log ACE2 都是 MACE 主要终点的单变量预测因子。在多变量 Cox 回归分析中，Log ACE2 活性则是唯一有

意义的 MACE 预测指标（HR：2.4；95%CI：1.24 ~ 4.72； $p = 0.009$ ）（表 2）。

Table 2. Cox regression analysis for MACE in patients with obstructive CAD.

Variable	Unadjusted HR (95% CI)	Unadjusted p Value	Adjusted HR (95% CI)	Adjusted p Value
Age	1.03 (1.0–1.06)	0.068	1.03(1–1.06)	0.129
Male	1.36 (0.65–2.83)	0.413		
Atrial fibrillation	2.26 (0.98–5.21)	0.053	1.49 (0.63–3.52)	0.364
Diabetes	1.92 (0.96–3.87)	0.067	1.88 (0.93–3.78)	0.078
ACEi/ARB	0.64 (0.32–1.26)	0.195		
β -blocker use	0.57 (0.29–1.13)	0.107		
Statin use	0.65 (0.32–1.32)	0.237		
Log troponin	1.07 (0.97–1.18)	0.194		
Log ACE2	2.56 (1.31–5)	0.006	2.42 (1.24–4.72)	0.009

ACE2 = angiotensin converting enzyme 2; ACEi = angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB = angiotensin receptor blocker; MACE = major adverse cardiovascular events

关于 HF 的次要终点，log ACE2（HR：4.03；95%CI：1.42 ~ 11.5； $p = 0.009$ ）和年龄（HR：1.06；95%CI：1.01 ~ 1.12， $p = 0.026$ ）均为独立的心力衰竭预测指标。

讨论

当前研究的主要发现是血浆 ACE2 活性独立地增加了严重阻塞性 CAD 患者心血管不良事件的危险。在这项研究中，对高危患者进行了中位数 10.6 年的随访，结果表明，即使在包括具有预后意义的多变量模型中进行了全面的多变量调整后，ACE2 活性升高仍然是 CV 死亡和发病的独立预测因子。CAD 患者的平均 ACE2 水平为 29 pmol/mL/min，高于我们先前报告的年轻健康志愿者的水平（ 4.44 ± 0.56 pmol/mL/min）^[9]以及老年患者的水平（中位数为 19.4 pmol/mL/min）^[17]。我们排除了已知 HF 或严重 LV 收缩功能障碍的患者，因为两者均与循环 ACE2 水平升高相关^[11,16]。与其他研究结果一致^[13–15,22]，男性患者血浆 ACE2 活性较高，但我们未发现其他独立预测血浆 ACE2 活性水平的因子。



关于循环 ACE2 水平的预后价值存在矛盾的发现，可能反映了整个研究人群的随访期差异和 CV 事件风险差异。一组

HF 患者中（ $n = 113$ ），在 34 个月的随访期间，有 23% 的患者发生了不良心血管事件（死亡、心脏移植、HF 住院），并且在针对射血分数和升高的 N 端前脑钠肽进行调整后，循环中的 ACE2 水平依然是独立预测因子^[16]。在另一组先前没有 CV 疾病的慢性肾脏病（CKD）患者中，循环 ACE2 活性则不是 24 个月随访期间 CV 死亡率或事件的独立预测因素^[13,14]。与之相一致的是，我们的小组报告，在 CKD III/IV 期患者、血液透析患者或肾移植受者中，升高的循环 ACE2 活性和不良心血管结局之间没有显著相关性^[13]。我们还发现，在接受急诊骨科手术老年患者中，随访 12 个月后 ACE2 水平的升高不能预测 CV 事件（ $p = 0.051$ ）^[17]。我们将血浆 ACE2 活性增加与本研究中发现的不良 CV 结局之间的显著相关性归因于在研究队列中观察到的更高的 CV 结局发生率以及更长的随访时间。

几个证据链表明血浆 ACE2 活性可能是动脉粥样硬化的标志物。在非透析 CKD 患者中，循环中的 ACE2 活性与颈动脉和周围血管的无症状动脉粥样硬化有关^[14]。在患有 1 型糖尿病且有 CAD 史的患者中，循环 ACE2 活性是增加的^[15]。在具有 CAD 病史的肾脏移植受者中观察到了相同的模式^[23]。这进一步支持了循环中 ACE2 活性升高与冠状动脉粥样硬化之间的联系。在另一项经血管造影证实为 CAD 患者的研究中，Ortiz-Perez 等展示了与没有已知 CAD 的对照组相比，患有 ST 抬高型心肌梗死患者的基线（24 ~ 48 h）循环 ACE2 水平升高^[24]。但根据 Ortiz-Perez 等的研究结果，并不清楚升高的循环 ACE2 是反映了急性心脏损伤还是反映了潜在的动脉粥样硬化。我们的研究扩展了这方面的知识，因为我们仅纳入了经血管造影证实为阻塞性冠状动脉疾病的患者，无论有无急性表现。由于依据患者的表现，其 ACE2 并无差异，因此我们的结果表明血浆 ACE2 的增加反映了潜在的动脉粥样硬化而不是急性心肌梗

伤。

RAS 在动脉粥样硬化发病机理中的重要性已得到充分确立,并且对经典 RAS 的靶向药物抑制确实改善了包括 CAD 在内的动脉粥样硬化疾病的预后^[25]。在动脉粥样硬化的实验模型中,我们和其他人报道了 ACE2 在动脉粥样硬化斑块内的血管内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞中均有表达^[26,27]。我们还报道了 ACE2 也存在于接受冠状动脉搭桥术的冠心病患者的动脉粥样硬化血管^[8]。实验研究表明 ACE2 过表达能促进动脉粥样硬化斑块稳定并减轻动脉粥样硬化病损^[28,29]。TACE 的激活导致 ACE2 从组织脱落增加进入循环系统^[6]。组织脱落并丢失 ACE2 是由血管紧张素 II 介导的,导致血管紧张素 II 的促炎症作用不受抑制^[6]。在兔动脉粥样硬化模型中,TACE 的基因沉默^[30]确实增强了斑块稳定性和改善了血管重塑,这可能是通过减少 ACE2 从组织脱落来实现的。这些发现加强了 ACE2 在动脉粥样硬化中的重要反向调节作用,并表明 ACE2 的调节可能为未来动脉粥样硬化疾病患者的治疗提供新的选项。

组织与循环中 ACE2 水平之间的关系尚不清楚。推测在正常生理学条件下,血浆 ACE2 水平可能与组织 ACE2 平行表达,并且以恒定的速率脱落^[16],尽管尚无同时测量组织和循环 ACE2 水平以及 TACE 水平的研究来解决这一假设。我们的发现增加了一种可能性,那就是在人类动脉粥样硬化中那些具有不良心血管结局的患者血浆中的 ACE2 活性升高反映了持续的反向调节过程,尽管该过程不足以将持续 Ang II 激活的

有害作用重新转为平衡。编码 ACE2 的基因内变异和外周基因变异可能解释 ACE2 表达或活性的差异。确实,ACE2 基因位于 X 染色体上某个已知可以逃避 X 灭活的区域中,因此导致性别之间的表型差异和 X 灭活的组织特异性差异^[31]。此外,ACE2 基因中的 rs1978124 多态性与中国汉族^[32]和欧洲人^[33]这两个独立 CAD 患者队列的不良预后具有相关性,但尚无研究将遗传方法与血浆 ACE2 活性测定相结合^[34]。

这项研究有许多局限性,包括相对较小的样本量和使用了常规心肌钙蛋白测试法,因为在招募患者时还没有高灵敏度的测定法。此外,血浆 ACE2 活性升高及其与不良结局相关的发现仅提示可能的关系,而不能确定原因或结果。但是主要优势包括了详细的血管造影评估和长期随访。

总之,我们的研究表明,升高的血浆 ACE2 活性是阻塞性 CAD 患者 MACE 的独立预测因子。



Elevated plasma angiotensin converting enzyme 2 activity is an independent predictor of major adverse cardiac events in patients with obstructive coronary artery disease

Jay Ramchand^{1,2}, Sheila K. Patel¹, Piyush M. Srivastava^{1,2}, Omar Farouque^{1,2}, Louise M. Burrell^{1,2*}

¹ Department of Medicine, The University of Melbourne, Austin Health, Heidelberg, Victoria, Australia,
² Department of Cardiology, Austin Health, Heidelberg, Victoria, Australia

* l.burrell@unimelb.edu.au

Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Ramchand J, Patel SK, Srivastava PM, Farouque O, Burrell LM (2018) Elevated plasma angiotensin converting enzyme 2 activity is an independent predictor of major adverse cardiac events in patients with obstructive coronary artery disease. PLoS ONE 13(6): e0198144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198144>

Editor: Tatsuo Shimomura, The University of Tokyo, JAPAN

Received: March 27, 2018

Accepted: May 14, 2018

Published: June 13, 2018

Copyright: © 2018 Ramchand et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: In order to comply with our institutions ethics agreements we cannot make our data, which consists of potentially identifying and sensitive patient information, publicly available. However, data may be made available to interested parties upon request to the Austin Health Human Research Ethics Committee (email: ethics@austin.org.au).

Funding: This work was supported by National Health & Medical Research Council project grant

Background

Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) is an endogenous regulator of the renin angiotensin system. Increased circulating ACE2 predicts adverse outcomes in patients with heart failure (HF), but it is unknown if elevated plasma ACE2 activity predicts major adverse cardiovascular events (MACE) in patients with obstructive coronary artery disease (CAD).

Methods

We prospectively recruited patients with obstructive CAD (defined as $\geq 50\%$ stenosis of the left main coronary artery and/or $\geq 70\%$ stenosis in ≥ 1 other major epicardial vessel on invasive coronary angiography) and measured plasma ACE2 activity. Patients were followed up to determine if circulating ACE2 activity levels predicted the primary endpoint of MACE (cardiovascular mortality, HF or myocardial infarction).

Results

We recruited 79 patients with obstructive coronary artery disease. The median (IQR) plasma ACE2 activity was 29.3 pmol/ml/min [21.2–41.2]. Over a median follow up of 10.5 years [9.6–10.8 years], MACE occurred in 46% of patients (36 events). On Kaplan-Meier analysis, above-median plasma ACE2 activity was associated with MACE (log-rank test, $p = 0.035$) and HF hospitalisation ($p = 0.01$). After Cox multivariable adjustment, log ACE2 activity remained an independent predictor of MACE (hazard ratio (HR) 2.4, 95% confidence interval (CI) 1.24–4.72, $p = 0.009$) and HF hospitalisation (HR: 4.03, 95% CI: 1.42–11.5, $p = 0.009$).

Conclusions

Plasma ACE2 activity independently increased the hazard of adverse long-term cardiovascular outcomes in patients with obstructive CAD.

(APP268914) to Louise M Burrell. Dr. Jay Ramchand is supported by a postgraduate scholarship co-funded by the National Heart Foundation of Australia and National Health & Medical Research Council (APP1132717). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Cardiovascular (CV) disease is a major cause of morbidity and mortality,[1] and is associated with activation of the renin-angiotensin system (RAS). Within the RAS, angiotensin converting enzyme (ACE) converts angiotensin (Ang) I to the vasoconstrictor and pro-atherosclerotic peptide Ang II,[2] whilst ACE2 is an endogenous inhibitor of the RAS through its major action to degrade Ang II.[3] ACE2 is highly expressed in the heart and blood vessels[4] and is cleaved from the cell surface to release the catalytically active ectodomain[5] into the circulation through the action of tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE).[6] In human myocardium, ACE2 is localized to the endothelium of the microcirculation,[7] and is also present in the media of atherosclerotic radial arteries.[8] In healthy individuals, circulating ACE2 activity levels are low[9, 10] but increase in the presence of CV disease or risk factors including heart failure (HF),[11] atrial fibrillation (AF),[12] kidney disease[13, 14] and type 1 diabetes.[15] To date, there is limited information on the prognostic role of circulating ACE2 activity levels and the results are conflicting. For example, increased ACE2 activity predicted adverse CV outcomes in heart failure,[16] but not in patients after emergency orthopedic surgery[17] or with chronic kidney disease.[13, 14] These differences may reflect the patient population, the relative cardiovascular risk of the patient population or the length of follow up. The aim of this study was to investigate the utility of plasma ACE2 activity levels to predict CV events in a high-risk cohort of patients with angiographically proven obstructive CAD with more than 10 years of follow-up.

Materials and methods

Consecutive patients aged >18 years were prospectively recruited between November 2004 and January 2006 after referral to a tertiary cardiovascular centre for a coronary angiogram to investigate suspected CAD. Only those with significant obstructive CAD were eligible for this study. Patients in cardiogenic shock, with a past history of congestive heart failure or with a left ventricular (LV) ejection fraction < 30% on angiography were excluded. Ethical approval was obtained from the Human Research Ethics Committee at Austin Health, Melbourne and the study complied with the Declaration of Helsinki. All patients gave informed written consent.

A standardised medical questionnaire was completed and verified with the hospital medical record. Blood pressure was measured and anthropometric measurements were taken. Obstructive CAD was defined as $\geq 50\%$ stenosis of the left main coronary artery and/or $\geq 70\%$ stenosis in ≥ 1 other major epicardial coronary artery by visual assessment on invasive coronary angiography.[18] Diabetes was diagnosed based on a documented history, treatment with glucose lowering therapy or if fasting blood glucose was >7 mmol/L. Hypertension was defined if previously diagnosed by a physician and/or current use of anti-hypertensive medication. Dyslipidaemia was defined if previously diagnosed by a physician and/or current use of lipid lowering agents. Cigarette smoking was defined as smoking within the preceding 12 months.

Fasting blood samples were collected at the time of admission for measurement of kidney function, lipids, and troponin. The Access AccuTnI assay (Beckman-Coulter, Chaska, MN, USA) was used to measure plasma troponin with the 99th percentile of a healthy reference population of 0.04 $\mu\text{g/L}$. Levels of ≥ 0.04 $\mu\text{g/L}$ (99th percentile) were considered abnormal in this study.

For plasma ACE2 measurement, blood was collected within 48 hours of presentation into lithium heparin tubes, and plasma was obtained by centrifuging blood at 3000 rpm at 4°C for 10 minutes and stored at -80°C until tested. Plasma ACE2 activity was measured within 2 years after all samples were collected. Samples were batched and ACE2 assays were run over a

period of 2 days. The catalytic activity of ACE2 was measured using a validated, sensitive quenched fluorescent substrate-based assay as previously described.[9] Briefly, plasma (0.25 ml) was diluted into low-ionic-strength buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH 6.5) and added to 200 μ l ANX-Sepharose 4 Fast-Flow resin (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) that removed a previously characterized endogenous inhibitor of ACE2 activity.[9] After binding and washing, the resulting eluate was assayed for ACE2 catalytic activity. Duplicate samples were incubated with the ACE2-specific quenched fluorescent substrate, with or without 100 mM ethylenediaminetetraacetic acid. The rate of substrate cleavage was determined by comparison to a standard curve of the free fluorophore, 4-amino-methoxycoumarin (MCA; Sigma, MO, USA) and expressed as μ mol of substrate cleaved/mL of plasma/min. The intra-assay and inter-assay coefficient of variation was 5.6 and 11.8% respectively.

The primary endpoint was a composite of major adverse cardiac events (MACE) defined as CV death, hospitalisation for HF or myocardial infarction (MI). The secondary endpoint was HF hospitalisation. Endpoints were described according to the 2014 American College of Cardiology/ American Heart Association definitions for CV endpoints in clinical trials.[19] CV death was defined as death due to sudden cardiac death, HF, acute MI, cerebrovascular accident, CV haemorrhage, CV procedures or other CV causes, that is death not included in the previous categories but with a specific, known CV cause such as pulmonary embolism.[19] Hospitalisation for HF was defined as an event where the patient is admitted to the hospital with a primary diagnosis of HF where the length of stay is at least 24 hours, where the patient exhibits new or worsening symptoms of heart failure on presentation, has objective evidence of new or worsening heart failure and receives intensification of treatment specifically for heart failure.[19] Myocardial infarction was defined as the clinical diagnosis of ST elevation or non-ST elevation myocardial infarction according to established criteria.[20, 21]

Clinical outcomes were collected by an experienced blinded investigator via medical records review and by contacting each patient and/or the nominated general practitioner for additional information.

Statistical analysis was performed using STATA, version 14.2 (Statacorp., College Station, TX, USA). Normally distributed continuous variables are expressed as mean $\pm$ standard deviation and non-normally distributed data (Plasma ACE2 activity, triglycerides, troponin and glomerular filtration rate) are expressed as the median and inter-quartile range (IQR). Student *t* test or the Mann Whitney *U* test (for non-normally distributed data) was used to assess differences in continuous variables between patients with above and below median ACE2 activity. Categorical variables are expressed as counts and percentages and compared using Fisher's exact or chi-square tests. Multiple regression analysis was used to identify variables that may independently influence plasma ACE2 activity. Plasma ACE2 activity, troponin levels and glomerular filtration rate were natural-logarithm transformed for analysis because of their skewed distribution. This rendered a more normal distribution by visual inspection of the distribution of the variables and Q-Q plots.

Cumulative incidence of MACE was estimated by the Kaplan Meier method and the log-rank test used to evaluate differences between patients with below and above median plasma ACE2 activity. When multiple end-points occurred during follow-up, the time to the first event was considered for analysis of MACE. Cox proportional hazard modelling was used to estimate the adjusted hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (CI) for MACE. Significant variables ($p < 0.1$) from univariate analysis were entered into the final multivariate model to identify independent predictors of MACE. Conventional prognostic variables were used including age, history of diabetes, log troponin and treatment with statin, beta-blocker, ACE inhibitor or angiotensin receptor blocker in addition to log ACE2. Two-tailed *p*-values < 0.05 were considered significant.

Results

We recruited 79 patients with angiographically proven obstructive CAD. No patient was lost to follow up and the median follow-up was 10.6 years (IQR 9.6–10.9 years). The clinical and biochemical characteristics of the study population are presented in Table 1. The cohort comprised 65% males with a mean $\pm$ SD age of 66 ± 12 years and BMI of 27.4 ± 4.4 kg/m². Patients were at significant CV risk with 69% having a smoking history, and a history of CAD in 66%, dyslipidaemia in 60%, hypertension in 82%, diabetes in 24% and AF in 11%. With regard to pharmacological therapy at the time of presentation, 59% were on angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) or angiotensin receptor blockers (ARB), 58% on beta-blockers, 72% on statins and 100% on aspirin.

Table 1. Participant characteristics in total cohort and according to plasma ACE2 activity.

Variable	All patients	ACE2 < median (n = 39)	ACE2 > median (n = 40)	P-value
Age (years)	66 $\pm$ 12	67 $\pm$ 11	63 $\pm$ 13	0.27
Male gender [n (%)]	51 (65%)	18(46%)	33 (83%)	0.001
BMI (kg/m ²)	27.4 $\pm$ 4.4	27.4 $\pm$ 5.2	27.3 $\pm$ 3.6	0.939
SBP (mmHg)	130 $\pm$ 17	131 $\pm$ 15	130 $\pm$ 19	0.746
DBP (mmHg)	70 $\pm$ 13	71 $\pm$ 13	68 $\pm$ 14	0.321
Presentation with ACS	51 (65%)	23 (59%)	28 (70%)	0.306
Previous history [n (%)]				
CAD	51 (66%)	24 (63%)	27 (69%)	0.573
Dyslipidemia	48 (60%)	23 (59%)	25 (63%)	0.748
Hypertension	64 (82%)	30 (77%)	34 (87%)	0.238
Diabetes	19 (24%)	11 (29%)	8 (20%)	0.357
Atrial fibrillation	9 (11%)	1 (3%)	8 (20%)	0.015
Smoking history	54 (69%)	24 (63%)	30 (75%)	0.257
Medical treatment [n (%)]				
ACEi/ARB	45 (59%)	24 (63%)	21 (55%)	0.484
Beta-blocker	44 (58%)	23 (61%)	21 (55%)	0.642
Statin	56 (72%)	27 (69%)	29 (74%)	0.615
Aspirin	79 (100%)	39 (100%)	40 (100%)	1
Serum biochemistry				
LDL (mmol/L)	2.5 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 0.8	0.736
Triglycerides (mmol/L)	1.2 [0.9–1.9]	1 [0.8–1.9]	1.4 [0.9–2]	0.119
eGFR (ml/min/1.73m ²)	70 [48–96]	76 [59–98]	69 [46–95]	0.675
Troponin I (μ g/L)	0.6 [0–14.5]	0.54 [0–8.2]	2.3 [0–21.2]	0.211
LVEF < 50% [n (%)]	42 (58%)	18(53%)	24 (62%)	0.459
Culprit vessel [n (%)]				
Right coronary	27 (34)	15 (39)	12 (30)	0.428
Left anterior descending	23 (23)	13 (33)	10 (25)	0.415
Left circumflex	20 (25)	8 (21)	12 (30)	0.332
Left main	1 (1)	0	1 (3)	0.320
Inpatient revascularisation [n (%)]	61 (77)	31 (79)	30 (75)	0.635
MACE [n (%)]	36 (46%)	12 (31%)	24 (60%)	0.009

Values are mean $\pm$ standard deviation, n (%) or median [interquartile range].

ACS = acute coronary syndrome; BMI = body mass index; ACEi = angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB = angiotensin receptor blocker; CAD = coronary artery disease; DBP = diastolic blood pressure; eGFR = estimated glomerular filtration rate; LVEF = left ventricular ejection fraction; LDL = low-density lipoprotein; MACE = major adverse cardiovascular events; SBP = systolic blood pressure

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198144.t001>

There was no difference in plasma ACE2 levels between patients with ST elevation acute coronary syndrome (ACS) [n = 24, median 31.7 pmol/ml/min (IQR 5.6–43.9)], non-ST elevation ACS [n = 27, median 29.1 pmol/ml/min (IQR 23.1–46.4)] or stable angina [n = 28, median 26.7 pmol/ml/min (IQR 18.7–39.8), p = 0.386] and so further analysis was conducted in the whole cohort.

The median ACE2 level in the whole cohort was 29.3 pmol/ml/min [IQR 21.2–41.2]. Patients were categorized according to plasma ACE2 activity above / below the median ACE2 level. Patients with above-median plasma ACE2 activity were more likely to be male and have AF (Table 1, both p < 0.05). Multiple regression analysis was performed to identify variables that influence plasma ACE2 activity. Male gender was the only independent predictor of higher ACE2 activity (p = 0.022). The prevalence of CAD and cardiac risk factors including dyslipidaemia, hypertension, diabetes and cigarette smoking were similar in the two groups, as was LVEF <50%, the use of pharmacological agents, low density lipoprotein cholesterol, triglycerides levels, kidney function and troponin level (all p > 0.05).

Over the follow-up period, there were 18 deaths, 19 myocardial infarcts and 16 hospitalisations with HF. The primary endpoint of MACE, a composite of CV mortality, HF hospitalisation or MI occurred in 36 patients (46%).

Above median levels of ACE2 (>29.3 pmol/ml/min) were significantly associated with a higher incidence of MACE (log-rank test, p = 0.035; Fig 1A) and HF hospitalisation (p = 0.01; Fig 1B) compared with those with below-median ACE2. There was no significant difference in the incidence of CV death (p = 0.195) or MI (p = 0.35). In a subgroup analysis including male patients only, there was no significant difference in the incidence of MACE according to median levels of ACE2 (p = 0.124).

Survival analysis using the Cox regression model indicated that age, history of atrial fibrillation, history of diabetes and log ACE2 were univariate predictors of the primary endpoint of MACE. On multivariable Cox regression analysis, Log ACE2 activity remained the only significant predictor of MACE (HR: 2.4; 95% CI: 1.24 to 4.72; p = 0.009) (Table 2).

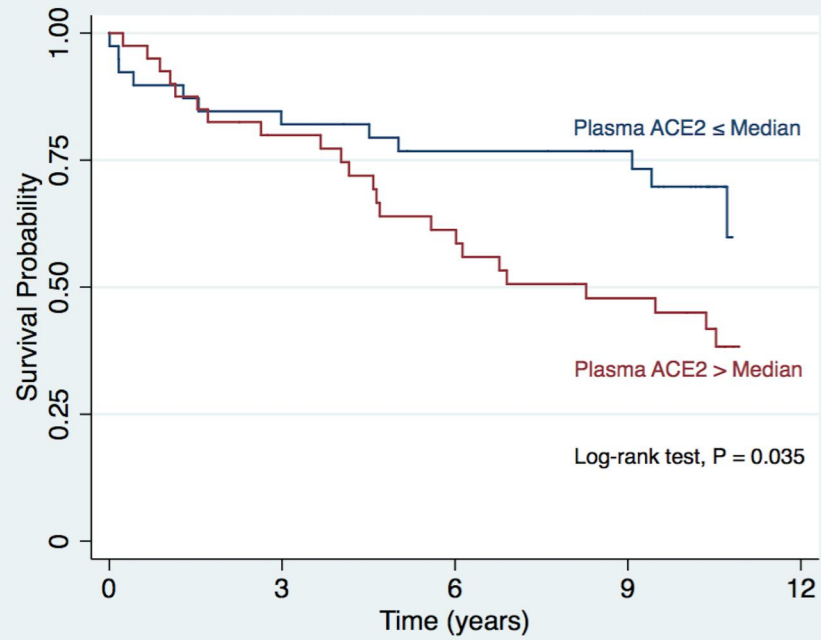
With regard to the secondary endpoint of HF, both log ACE2 (HR: 4.03; 95% CI: 1.42–11.5; p = 0.009) and age (HR: 1.06; 95% CI: 1.01–1.12, p = 0.026) were independent predictors of heart failure.

Discussion

The major finding of the current study was that plasma ACE2 activity independently increased the hazard for adverse cardiovascular events in patients with significant obstructive CAD. In this study in high-risk patients followed for a median of 10.6 years, elevated ACE2 activity remained an independent predictor of CV mortality and morbidity even after comprehensive multivariable adjustment in a model that included prognostically meaningful variables. The median ACE2 level in patients with CAD was 29 pmol/ml/min which is higher than levels we previously reported in young healthy volunteers (4.44 ± 0.56 pmol/ml/min)[9] and in elderly patients (median 19.4 pmol/ml/min).[17] We excluded patients with known HF or severe LV systolic dysfunction as both are associated with increased circulating ACE2 levels.[11, 16] Consistent with results of other studies,[13–15, 22] plasma ACE2 activity was higher in male patients but we found no other independent predictors of plasma ACE2 activity levels.

There are conflicting findings regarding the prognostic value of circulating ACE2 levels likely reflecting the differences in follow-up period and risk of CV events across the study populations. In a cohort of patients with HF (n = 113), 23% had an adverse CV event (death, cardiac transplant, HF hospitalisation) over a 34 month follow up and circulating ACE2 levels remained an independent predictor after adjustment for reduced ejection fraction and

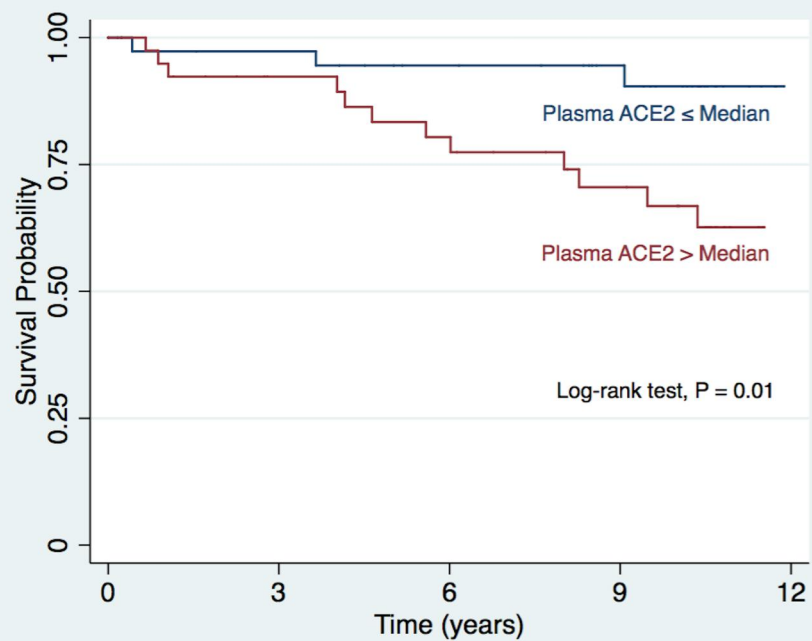
1A



Number at risk				
Plasma ACE2 $\leq$ Median	39	32	28	23
Plasma ACE2 $>$ Median	40	30	23	17



1B



Number at risk				
Plasma ACE2 $\leq$ Median	39	35	30	24
Plasma ACE2 $>$ Median	40	31	27	20



Fig 1. Clinical events at follow-up. Kaplan Meier Survival plot illustrating event free survival from major adverse cardiac events (A) and heart failure hospitalisation (B) in patients with coronary artery disease, stratified according to median plasma ACE2 level of 29.3 pmol/ml/min. ACE2 = angiotensin converting enzyme 2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198144.g001>

increased N-terminal-pro brain natriuretic peptide.[16] In another cohort of patients with chronic kidney disease (CKD) without prior CV disease, circulating ACE2 activity was not an independent predictor of CV mortality or events over a follow-up period of 24 months.[13, 14] In concordance, our group reported no significant associations between elevated circulating ACE2 activity and adverse CV outcomes in patients with CKD stage III/ IV, haemodialysis patients or kidney transplant recipients.[13] We also found that in elderly patients undergoing emergency orthopaedic surgery, elevated ACE2 levels did not predict CV events after 12 months of follow-up ($p = 0.051$).[17] We ascribe the significant association between increased plasma ACE2 activity and adverse CV outcomes seen in the present study to a higher rate of CV outcomes observed in the study cohort and longer follow-up duration.

Severe lines of evidence suggest that plasma ACE2 activity may serve as a marker of atherosclerosis. In non-dialysis patients with CKD, circulating ACE2 activity was associated with silent atherosclerosis in carotid and peripheral vessels.[14] In patients with type 1 diabetes and a history of CAD, circulating ACE2 activity was increased.[15] The same pattern was observed in kidney transplant recipients with a history of CAD,[23] further supporting the association between raised circulating ACE2 activity and coronary atherosclerosis. In another study of patients with angiographically confirmed CAD, Ortiz-Perez et al. demonstrated elevated levels of circulating ACE2 at baseline (24–48h) in patients presenting with ST-elevation myocardial infarction compared to a control group of patients without known CAD.[24] It is not therefore clear from the Ortiz-Perez et al. study whether the increase in circulating ACE2 reflects acute cardiac injury or underlying atherosclerosis. Our study extends knowledge in this regard as we included only patients with angiographically proven obstructive coronary artery disease, both with and without an acute presentation. As there was no difference in ACE2 according to presentation, our results suggest that the increase in plasma ACE2 reflects underlying atherosclerosis rather than acute myocardial injury.

The importance of the RAS in the pathogenesis of atherosclerosis is well established and indeed targeted pharmacological inhibition of the classic RAS improves outcomes in atherosclerotic disease including CAD.[25] In experimental models of atherosclerosis, we and others reported that ACE2 is expressed in vascular endothelial cells, macrophages and smooth muscle

Table 2. Cox regression analysis for MACE in patients with obstructive CAD.

Variable	Unadjusted HR (95% CI)	Unadjusted p Value	Adjusted HR (95% CI)	Adjusted p Value
Age	1.03 (1.0–1.06)	0.068	1.03(1–1.06)	0.129
Male	1.36 (0.65–2.83)	0.413		
Atrial fibrillation	2.26 (0.98–5.21)	0.053	1.49 (0.63–3.52)	0.364
Diabetes	1.92 (0.96–3.87)	0.067	1.88 (0.93–3.78)	0.078
ACEi/ARB	0.64 (0.32–1.26)	0.195		
β-blocker use	0.57 (0.29–1.13)	0.107		
Statin use	0.65 (0.32–1.32)	0.237		
Log troponin	1.07 (0.97–1.18)	0.194		
Log ACE2	2.56 (1.31–5)	0.006	2.42 (1.24–4.72)	0.009

ACE2 = angiotensin converting enzyme 2; ACEi = angiotensin converting enzyme inhibitor; ARB = angiotensin receptor blocker; MACE = major adverse cardiovascular events

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198144.t002>

cells within atherosclerotic plaques.[26, 27] We also reported that ACE2 was present in atherosclerotic blood vessels in patients with CAD undergoing coronary artery bypass surgery.[8] Experimental studies have shown that ACE2 overexpression promotes atherosclerotic plaque stability and attenuates atherosclerotic lesions[28, 29]. Activation of TACE results in increased ACE2 shedding from tissue into the circulation.[6] Shedding and hence loss of ACE2 from the tissue is mediated by angiotensin II and results in the pro-inflammatory effects of angiotensin II being unopposed.[6] Certainly in a rabbit model of atherosclerosis, gene silencing of TACE enhanced plaque stability and improved vascular remodelling,[30] possibly via reduced tissue ACE2 shedding. These findings reinforce the important counter-regulatory role of ACE2 in atherosclerosis and suggest that modulation of ACE2 could offer a future therapeutic option in patients with atherosclerotic disease.

The relationship between tissue and circulating levels of ACE2 is not yet understood. It has been postulated plasma ACE2 levels may parallel tissue ACE2 expression with a constant rate of shedding in normal physiology[16], although there are no studies that have concurrently measured both tissue and circulating ACE2 and TACE levels to address this hypothesis. Our findings raise the possibility that in human atherosclerosis, increased plasma ACE2 activity in those with adverse cardiovascular outcomes reflect a persistent albeit insufficient counter-regulatory process to shift the balance away from the deleterious effects of sustained Ang II activation. Genetic variation in and around the gene encoding ACE2 may account for differences in ACE2 expression or activity. Indeed, the location of the ACE2 gene within the X chromosome in an area where genes are known to escape X-inactivation may contribute to phenotypic differences between sexes and tissue-specific differences in X-inactivation.[31] Furthermore, the rs1978124 polymorphism in the *ACE2* gene has been associated with poorer outcomes in two separate CAD cohorts of Chinese Han[32] and European[33] ancestry but there are not yet studies that combine genetic approaches with measurement of plasma ACE2 activity.[34]

The study has a number of limitations including the relatively small sample size and the use of a conventional troponin assay, as a high sensitivity assay was not available at the time of patient recruitment. Furthermore, the finding of elevated plasma ACE2 activity and its association with adverse outcomes only suggest a possible relationship and does not determine cause or effect. However major strengths include the detailed angiographic assessment and the long term follow up.

In conclusion, our study demonstrates that elevated plasma ACE2 activity is an independent predictor of MACE in patients with obstructive CAD.

Future

This study has identified ACE2 as a potential surrogate marker of CV outcomes, and possibly a target for therapeutic intervention. Whether targeting patients with increased plasma ACE2 levels for more intensive therapy would lead to improved outcomes has yet to be tested.

Acknowledgments

This work was supported by National Health & Medical Research Council project grant (APP268914). Dr. Jay Ramchand is supported by a postgraduate scholarship co-funded by the National Heart Foundation of Australia and National Health & Medical Research Council (APP1132717).

Author Contributions

Conceptualization: Louise M. Burrell.

Data curation: Jay Ramchand, Sheila K. Patel, Louise M. Burrell.

Formal analysis: Jay Ramchand, Sheila K. Patel, Louise M. Burrell.

Funding acquisition: Louise M. Burrell.

Investigation: Jay Ramchand, Sheila K. Patel, Omar Farouque, Louise M. Burrell.

Methodology: Jay Ramchand, Sheila K. Patel, Piyush M. Srivastava, Omar Farouque, Louise M. Burrell.

Project administration: Piyush M. Srivastava.

Resources: Piyush M. Srivastava, Omar Farouque, Louise M. Burrell.

Software: Omar Farouque.

Supervision: Sheila K. Patel, Piyush M. Srivastava, Omar Farouque, Louise M. Burrell.

Validation: Jay Ramchand.

Visualization: Jay Ramchand, Louise M. Burrell.

Writing – original draft: Jay Ramchand.

Writing – review & editing: Sheila K. Patel, Piyush M. Srivastava, Omar Farouque, Louise M. Burrell.

References

1. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017; 135(10):e146–e603. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000485> PMID: 28122885
2. Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med*. 2003; 13(3):93–101. PMID: 12691672
3. Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1–7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(8):1606–13. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.204453> PMID: 20448208
4. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ Res*. 2000; 87(5):E1–9. PMID: 10969042
5. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, et al. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J Biol Chem*. 2005; 280(34):30113–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505111200> PMID: 15983030
6. Patel VB, Clarke N, Wang Z, Fan D, Parajuli N, Basu R, et al. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. *J Mol Cell Cardiol*. 2014; 66:167–76. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.017> PMID: 24332999
7. Burrell LM, Risvanis J, Kubota E, Dean RG, MacDonald PS, Lu S, et al. Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans. *Eur Heart J*. 2005; 26(4):369–75; discussion 22–4. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi114> PMID: 15671045
8. Zulli A, Burrell LM, Buxton BF, Hare DL. ACE2 and AT4R are present in diseased human blood vessels. *Eur J Histochem*. 2008; 52(1):39–44. PMID: 18502721
9. Lew RA, Warner FJ, Hanchapola I, Yarski MA, Ramchand J, Burrell LM, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 catalytic activity in human plasma is masked by an endogenous inhibitor. *Exp Physiol*. 2008; 93(5):685–93. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.040352> PMID: 18223027
10. Rice GI, Jones AL, Grant PJ, Carter AM, Turner AJ, Hooper NM. Circulating activities of angiotensin-converting enzyme, its homolog, angiotensin-converting enzyme 2, and neprilysin in a family study. *Hypertension*. 2006; 48(5):914–20. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000244543.91937.79> PMID: 17000927
11. Epelman S, Tang WH, Chen SY, Van Lente F, Francis GS, Sen S. Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the

renin-angiotensin-aldosterone system. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52(9):750–4. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.02.088> PMID: 18718423

12. Walters TE, Kalman JM, Patel SK, Mearns M, Velkoska E, Burrell LM. Angiotensin converting enzyme 2 activity and human atrial fibrillation: increased plasma angiotensin converting enzyme 2 activity is associated with atrial fibrillation and more advanced left atrial structural remodelling. *Europace*. 2016.
13. Roberts MA, Velkoska E, Ierino FL, Burrell LM. Angiotensin-converting enzyme 2 activity in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28(9):2287–94. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft038> PMID: 23535224
14. Anguiano L, Riera M, Pascual J, Valdivielso JM, Barrios C, Betriu A, et al. Circulating angiotensin converting enzyme 2 activity as a biomarker of silent atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Atherosclerosis*. 2016; 253:135–43. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.032> PMID: 27615597
15. Soro-Paavonen A, Gordin D, Forsblom C, Rosengard-Barlund M, Waden J, Thorn L, et al. Circulating ACE2 activity is increased in patients with type 1 diabetes and vascular complications. *J Hypertens*. 2012; 30(2):375–83. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32834f04b6> PMID: 22179088
16. Epelman S, Shrestha K, Troughton RW, Francis GS, Sen S, Klein AL, et al. Soluble angiotensin-converting enzyme 2 in human heart failure: relation with myocardial function and clinical outcomes. *J Card Fail*. 2009; 15(7):565–71. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.01.014> PMID: 19700132
17. Chong CP, Lim WK, Velkoska E, van Gaal WJ, Ryan JE, Savige J, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and angiotensin-converting enzyme-2 levels and their association with postoperative cardiac complications after emergency orthopedic surgery. *Am J Cardiol*. 2012; 109(9):1365–73. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.12.032> PMID: 22381157
18. Maddox TM, Stanislawski MA, Grunwald GK, Bradley SM, Ho PM, Tsai TT, et al. Nonobstructive coronary artery disease and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2014; 312(17):1754–63. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.14681> PMID: 25369489
19. Hicks KA, Tcheng JE, Bozkurt B, Chaitman BR, Cutlip DE, Farb A, et al. 2014 ACC/AHA Key Data Elements and Definitions for Cardiovascular Endpoint Events in Clinical Trials: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Data Standards (Writing Committee to Develop Cardiovascular Endpoints Data Standards). *Circulation*. 2015; 132(4):302–61. <https://doi.org/10.1161/CIR.000000000000156> PMID: 25547519
20. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2012; 126(16):2020–35. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31826e1058> PMID: 22923432
21. Amsterdam EA, Wenger NK, Brindis RG, Casey DE Jr., Ganiats TG, Holmes DR Jr., et al. 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 64(24):e139–228. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.09.017> PMID: 25260718
22. Anguiano L, Riera M, Pascual J, Valdivielso JM, Barrios C, Betriu A, et al. Circulating angiotensin-converting enzyme 2 activity in patients with chronic kidney disease without previous history of cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2015; 30(7):1176–85. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv025> PMID: 25813276
23. Soler MJ, Riera M, Crespo M, Mir M, Marquez E, Pascual MJ, et al. Circulating angiotensin-converting enzyme 2 activity in kidney transplantation: a longitudinal pilot study. *Nephron Clin Pract*. 2012; 121(3–4):c144–50. <https://doi.org/10.1159/000345508> PMID: 23257682
24. Ortiz-Perez JT, Riera M, Bosch X, De Caralt TM, Perea RJ, Pascual J, et al. Role of circulating angiotensin converting enzyme 2 in left ventricular remodeling following myocardial infarction: a prospective controlled study. *PLoS ONE*. 2013; 8(4):e61695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061695> PMID: 23630610
25. Bangalore S, Fakheri R, Wandel S, Toklu B, Wandel J, Messerli FH. Renin angiotensin system inhibitors for patients with stable coronary artery disease without heart failure: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *BMJ*. 2017; 356:j4. <https://doi.org/10.1136/bmj.j4> PMID: 28104622
26. Sluimer JC, Gasc JM, Hamming I, van Goor H, Michaud A, van den Akker LH, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and activity in human carotid atherosclerotic lesions. *J Pathol*. 2008; 215(3):273–9. <https://doi.org/10.1002/path.2357> PMID: 18498093
27. Zulli A, Burrell LM, Widdop RE, Black MJ, Buxton BF, Hare DL. Immunolocalization of ACE2 and AT2 receptors in rabbit atherosclerotic plaques. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54(2):147–50. <https://doi.org/10.1369/jhc.5C6782.2005> PMID: 16116029

28. Dong B, Zhang C, Feng JB, Zhao YX, Li SY, Yang YP, et al. Overexpression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(7):1270–6. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.164715> PMID: 18403726
29. Zhang C, Zhao YX, Zhang YH, Zhu L, Deng BP, Zhou ZL, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates atherosclerotic lesions by targeting vascular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(36):15886–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001253107> PMID: 20798044
30. Zhao X, Kong J, Zhao Y, Wang X, Bu P, Zhang C, et al. Gene silencing of TACE enhances plaque stability and improves vascular remodeling in a rabbit model of atherosclerosis. *Sci Rep.* 2015; 5:17939. <https://doi.org/10.1038/srep17939> PMID: 26655882
31. Burrell LM, Harrap SB, Velkoska E, Patel SK. The ACE2 gene: its potential as a functional candidate for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond).* 2013; 124(2):65–76.
32. Yang W, Huang W, Su S, Li B, Zhao W, Chen S, et al. Association study of ACE2 (angiotensin I-converting enzyme 2) gene polymorphisms with coronary heart disease and myocardial infarction in a Chinese Han population. *Clin Sci (Colch).* 2006; 111(5):333–40.
33. Palmer BR, Jarvis MD, Pilbrow AP, Ellis KL, Frampton CM, Skelton L, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 A1075G polymorphism is associated with survival in an acute coronary syndromes cohort. *Am Heart J.* 2008; 156(4):752–8. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.06.013> PMID: 18926157
34. Patel SK, Velkoska E, Freeman M, Wai B, Lancefield TF, Burrell LM. From gene to protein-experimental and clinical studies of ACE2 in blood pressure control and arterial hypertension. *Front Physiol.* 2014; 5:227. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00227> PMID: 25009501



2000km/h



20km/h

理念不同，速度决然不同



阳普医疗干式荧光免疫定量检测平台 QT-200

广州阳普医疗科技股份有限公司出版
仅供阳普医疗内部使用。
本刊所连载及翻译文章, 版权属原作者及
阳普医疗所有, 请勿用于其他用途!

MKD-135
2020年10月1日

医学
拾萃

IMPROVE REVIEW

 广州阳普醫療科技股份有限公司
IMPROVE GUANG ZHOU IMPROVE MEDICAL INSTRUMENTS CO.,LTD

地址: 广州市经济技术开发区科学城开源大道102号

服务热线: 4001-300030

电话: +86 20-3231-2666

传真: +86 20-3231-2667

网站: www.improve-medical.com

邮编: 510530