

· 论著 ·

内毒素对体外培养大鼠肺微血管内皮细胞
血管紧张素转换酶 2 表达的影响

王楠 张泓 孙耕耘

【摘要】 目的 观察内毒素对大鼠肺微血管内皮细胞(RPMVEC)上血管紧张素转换酶 2(ACE2)表达的影响,探讨 ACE2 参与内毒素性急性肺损伤(ALI)发生的机制。方法 体外培养 Wistar 大鼠 RPMVEC,以 10 mg/L 的内毒素与之共同孵育;分别于实验 3、6、12 和 24 h 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 ACE2 的 mRNA 和蛋白表达。结果 10 mg/L 内毒素处理 RPMVEC 后 3 h,ACE2 的 mRNA 和蛋白表达即显著下降,6 h 有所回升,之后显著下降并持续至 24 h;统计学分析显示,除 6 h 外,余各时间点 ACE2 mRNA 和蛋白表达均显著低于未用内毒素处理对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 10 mg/L 内毒素可下调 RPMVEC 中 ACE2 的 mRNA 和蛋白表达水平,可能是 ALI 发生机制之一。

【关键词】 血管紧张素转换酶 2; 内毒素; 内皮细胞; 肺损伤,急性

Effect of endotoxin on expression of angiotensin converting enzyme-2 in cultured rat pulmonary microvascular endothelial cells WANG Nan*, ZHANG Hong, SUN Geng-yun. * Emergency Department, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui, China
Corresponding author: SUN Geng-yun (Email: sungengyun@tom.com)

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of endotoxin on angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) expression in rat pulmonary microvascular endothelial cells (RPMVECs) in vitro, and discuss the role of ACE2 in endotoxin-induced acute lung injury (ALI). **Methods** In vitro, cultured RPMVECs were incubated with endotoxin (10 mg/L), the expression of ACE2 mRNA and protein were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting techniques at time points of 3, 6, 12, and 24 hours respectively after incubation with endotoxin. **Results** After the treatment of RPMVECs with endotoxin (10 mg/L), the levels of ACE2 mRNA and protein decreased significantly, and then they increased slightly at 6 hours, followed by a continuous decrease until 24 hours. The statistic analysis demonstrated that, except at the 6-hour time point, the levels of ACE2 mRNA and protein expression at other time points were lower than those of control group significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The downregulation of ACE2 mRNA and protein expression in RPMVECs by endotoxin may play an important role in pathogenesis of ALI.

【Key words】 angiotensin converting enzyme-2; endotoxin; endothelial cell; acute lung injury

已知肾素-血管紧张素系统(RAS)不仅对血压和血流起重要的调节作用,还参与并调节炎症反应。RAS 中最主要的效应分子血管紧张素 I (Ang I) 是由血管紧张素转换酶(ACE)水解 Ang I 的两个氨基酸残基所生成;2000 年从人类的 cDNA 文库中克隆得到的 ACE2 是一种与 ACE 明显同源的蛋白质^[1-2]。目前针对 ACE2 参与肺部疾病尤其是急性肺损伤(ALI)发生过程的研究尚少,我们既往的研究发现,大鼠肺微血管内皮细胞(RPMVEC)能够表达 ACE2^[3]。本研究中通过体外培养 RPMVEC,采用分

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670935);安徽省自然科学基金资助项目(070413075)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院急诊内科(王楠,张泓),呼吸内科(孙耕耘)

通信作者:孙耕耘,博士生导师,Email:sungengyun@tom.com

作者简介:王楠(1979-),女(汉族),河南省人,硕士研究生,主治医师,主要从事急危重症相关研究,Email:nan_wang@tom.com。

子生物学技术观察内毒素对 RPMVEC 上 ACE2 基因和蛋白表达的影响,为进一步探讨 ACE2 在内毒素诱导 ALI 中的作用和机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:胎牛血清及 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM,美国 Hyclone 公司),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的植物血凝素(PHA,美国 Sigma 公司),TRIzol 试剂(日本 TaRaKa 公司),鸟类成髓细胞性白血病病毒(AMV)逆转录试剂盒、Taq 酶、dNTP(美国 Promage 公司),ACE2 聚合酶链反应(PCR)引物(上海生工公司合成),兔抗人 ACE2 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(美国 Santacruz 公司),其余试剂为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 RPMVEC 的分离培养:选择雄性 Wistar 大鼠 1 只,腹腔注射肝素钠后颈动脉放血活杀,开胸从

右心灌注 DMEM 培养液 50 ml, 取出双肺, 取肺表面 3~5 mm 的外周组织切割至约 1 mm³ 大小, 均匀放置在培养瓶中, 间距约 1 cm。在体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱内孵育 2 h 后, 加入含体积分数为 10% 胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 kU/L 链霉素的 DMEM, 放入 37 ℃、5% CO₂、湿度为 95%~100% 的孵箱内静置培养 60 h。每隔 3~4 d 更换 1 次培养液, 观察细胞单层汇合至 80%~90% 时, 用质量分数 0.25% 的胰蛋白酶消化后按 1:2 传代, 收集 2~5 代的细胞用于实验。

1.2.2 RPMVEC 鉴定: 进行 PHA 结合实验, 用倒置相差显微镜观察细胞形态及生长特性。将细胞悬液稳定贴壁于盖玻片上, 经磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗、冷丙酮固定、干燥、加 FITC 标记的 PHA (25 mg/L) 避光孵育, PBS 漂洗、干燥、树脂封片, 荧光显微镜下观察。

1.2.3 检测指标及方法: 以 10 mg/L 的内毒素作用于 RPMVEC, 3、6、12 和 24 h 4 个时间点分别检测其 ACE2 表达。

1.2.3.1 ACE2 mRNA 检测: 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)。
 ①总 RNA 提取: 取生长良好的 RPMVEC, 用胰酶将细胞消化后移入小离心管 (EP 管) 中, PBS 重悬洗涤, 加入 TRIzol, 按试剂盒说明书步骤提取总 RNA。
 ②cDNA 合成: 在 EP 管中分别加入溶于焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水中的 RNA 模板 9 μl 和随机引物 2 μl, 70 ℃ 水浴 10 min 后冰浴 5 min, 加入 dNTP 3 μl, 5×Buffer 缓冲液 4 μl, AMV 逆转录酶 1 μl, RNA 酶抑制剂 1 μl, 充分混匀, 瞬时离心后置 42 ℃ 水浴 1 h, 95 ℃ 水浴 3 min, 立即冰浴备用。
 ③PCR 扩增: 取逆转录产物 5 μl, 加入上、下游引物各 0.5 μl, 10×Buffer 缓冲液 5 μl, dNTP 2 μl, MgCl₂ 2 μl, Taq 酶 0.3 μl 及 DEPC 水 34.7 μl, 并设阴性对照管 (即以相同体积的 DEPC 水代替逆转录产物加入反应体系中), 各管扩增体系总体积均 50 μl。扩增条件: 95 ℃ 5 min 预变性, 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 45 s, 72 ℃ 20 s 循环 40 次, 最后 72 ℃ 延伸 8 min。ACE2 引物合成按照文献 [4] 方法。
 ④PCR 产物电泳分析: 用磷酸胺酸 (TBE) 溶液配制琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭), 加 TBE 电泳液, 取 PCR 产物 9 μl 与 10×上样缓冲液 1 μl 充分混匀后上样, 取 5 μl 的 DNA 标记 (Marker) 一同上样, 90 V 电压电泳 20 min, 结果经凝胶成像系统观察并照相。

1.2.3.2 ACE2 蛋白检测: 用蛋白质免疫印迹法 (Western blotting)。
 ①总蛋白提取: 取 RPMVEC 用

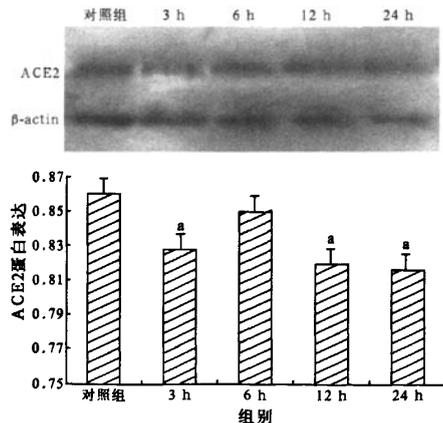
胰酶将细胞消化后移入 EP 管中, PBS 重悬洗涤, 加入单去污细胞裂解液, 冰浴、离心, 取上清液进行实验。
 ②按文献 [5] 方法进行凝胶电泳。凝胶制成后, 取蛋白样品与等体积 2×蛋白上样缓冲液充分混匀, 95 ℃ 水浴 5 min 使蛋白变性, 每孔上样 10 μl, 并取 10 μl 蛋白 Marker 一同上样电泳。
 ③将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 浸入含脱脂奶粉的含 0.05% 吐温 20 (Tween 20) 的 Tris 缓冲盐 (TBS-T) 中 4 ℃ 封闭过夜, 加一抗 (兔抗人 ACE2 多克隆抗体) 于 37 ℃ 孵育 60 min, TBS-T 洗膜 3 次, 再加二抗 (辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG) 于 37 ℃ 孵育 60 min, TBS-T 溶液洗膜 3 次, 浸入 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 溶液至清晰显色, 自来水终止反应。结果用扫描仪扫描保存, 以同一样本来源的 ACE2 和 β-肌动蛋白 (β-actin) 产物条带积分吸光度 (A) 比值作数据分析, 与未加内毒素处理的对照组进行比较。

1.3 统计学方法: 统计分析使用 SPSS 11.0 软件处理。实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

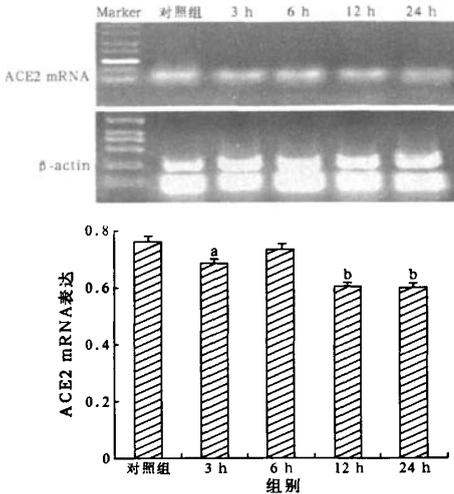
2.1 RPMVEC 的培养、鉴定 (彩色插页图 1, 图 2): 倒置显微镜下观察, 培养的 RPMVEC 从组织块脱落时多为类圆形、多边形, 生长 2~3 周时出现单层汇合, 呈铺路石样排列, 颜色浅淡。RPMVEC 与 FITC 标记的 PHA 结合呈黄绿色荧光。

2.2 ACE2 蛋白表达 (图 3): ACE2 蛋白表达于内毒素作用后 3 h 显著降低, 6 h 有所回升, 之后显著下降并持续至 24 h。除 6 h 外, 其余时间点 ACE2 蛋白含量均较对照组显著下降 (*P* 均 < 0.05)。



注: 与对照组比较, **P* < 0.05
图 3 10 mg/L 内毒素对 RPMVEC ACE2 蛋白表达的影响

2.3 ACE2 mRNA 表达(图 4):ACE2 mRNA 表达于内毒素作用后 3 h 即出现下降,6 h 时有所回升,之后显著下降并持续至 24 h。除 6 h 外,其余时间点 ACE2 mRNA 表达均显著低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 4 10 mg/L 内毒素对 RPMVEC ACE2 mRNA 表达的影响

3 讨论

ACE2 是新近发现的 RAS 新成员,它是 ACE 的同源化合物,但具有拮抗 ACE 的作用,对 RAS 起负调控作用。有研究表明,在使用酸吸入或脓毒症方法建立的小鼠肺损伤模型中,ACE2 对肺损伤具有保护作用。相关研究还发现,ACE2 与肺动脉高压和肺纤维化的发生机制具有相关性^[6-8]。对 ACE2 在体内表达的研究曾认为,其分布具有高度的器官特异性,仅存在于心脏、肾脏和睾丸中,近期我们研究发现,在 RPMVEC 上有 ACE2 表达,表达部位是胞膜及胞质^[3]。

ALI 为临床常见危重症,感染是其最常见病因,由于 RPMVEC 是该综合征发生的关键环节,故本研究中选用 RPMVEC 作为靶细胞,探讨 ACE2 在炎症诱导 RPMVEC 损伤中的作用。已有研究表明,内毒素在作用于机体或体外培养的细胞后,RAS 中多种组分如血管紧张素原、肾素、Ang I、血管紧张素 II 型受体(AT1R)等的含量都会发生变化^[10-13]。本研究结果显示,针对体外培养的 RPMVEC 给予 10 mg/L 的内毒素作用后,ACE2 mRNA 和蛋白表达在 3、12 和 24 h 均显著下降,因此认为内毒素对

ACE2 的表达有下调作用,但无明显的时效关系。内毒素对 RPMVEC 表达 ACE2 在 mRNA 和蛋白水平上的下调作用究竟是直接起效,还是通过对其他物质的调节间接影响 ACE2 所致,还有待于更深入的研究探讨。

综上所述,内毒素对 RPMVEC 上 ACE2 基因后表达水平起下调作用,据此我们推测,在脓毒症引起 ALI 过程中,RPMVEC 表达 ACE2 的下调致使机体的保护作用被削弱,可能构成肺损伤发生机制的一部分,为进一步阐明 ALI 发病机制及探讨防治措施提供了研究基础。

参考文献

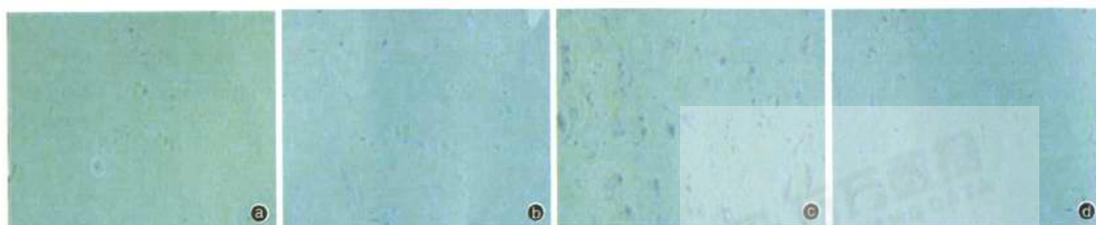
- [1] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin 1 to angiotensin 1-9 [J]. *Cir Res*, 2000, 87 (5): E1-9.
- [2] Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme, cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(43):33238-33243.
- [3] 王楠,孙耕耘,张泓.血管紧张素转换酶 2 在大鼠肺微血管内皮细胞上的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2007, 42(2):136-139.
- [4] Tikellis C, Wookey PJ, Candido R, et al. Improved islet morphology after blockade of the renin-angiotensin system in the ZDF rat [J]. *Diabetes*, 2004, 53(4):989-997.
- [5] Li N, Zimpelmann J, Cheng K, et al. The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288(2):F353-F362.
- [6] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus [J]. *Nature*, 2003, 426(6965):450-454.
- [7] Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure [J]. *Nature*, 2005, 436(7047):112-116.
- [8] Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO, et al. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom [J]. *Thorax*, 2000, 55(2):143-146.
- [9] Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Induction of rat liver angiotensinogen mRNA following acute inflammation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 129(3):826-832.
- [10] Okamoto H, Ohashi Y, Itoh N. Involvement of leukocyte and glucocorticoid in the acute-phase response of angiotensinogen [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 145(3):1225-1230.
- [11] Nyui N, Tamura K, Yamaguchi S, et al. Tissue angiotensinogen gene expression induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 1997, 30(4):859-867.
- [12] Zhang H, Sun GY. Expression and regulation of AT1 receptor in rat lung microvascular endothelial cell [J]. *J Surg Res*, 2006, 134(2):190-197.

(收稿日期:2008-05-12 修回日期:2008-07-11)

(本文编辑:李银平)

高氧对早产鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的影响及降钙素基因相关肽的保护作用

(正文见578页)



①:空气组; ②:高氧组; ③:高氧CGRP组; ④:高氧CGRP受体拮抗剂组

图1 各组早产鼠AECⅡ损伤情况(巴氏染色, ×250)

内毒素对体外培养大鼠肺微血管内皮细胞血管紧张素转换酶2表达的影响

(正文见582页)

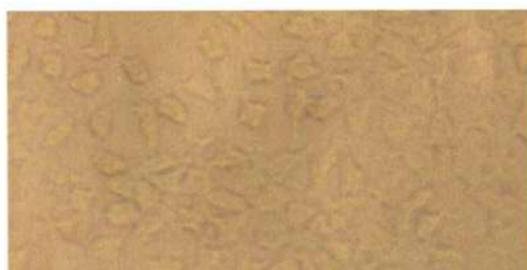


图1 倒置相差显微镜下观察原代培养2周时的RPMVEC(×100)

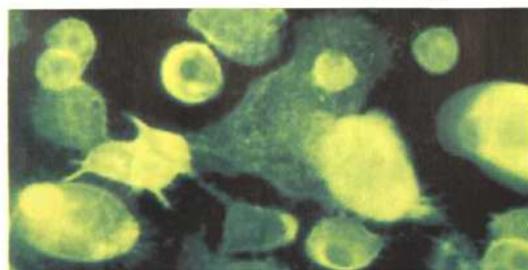
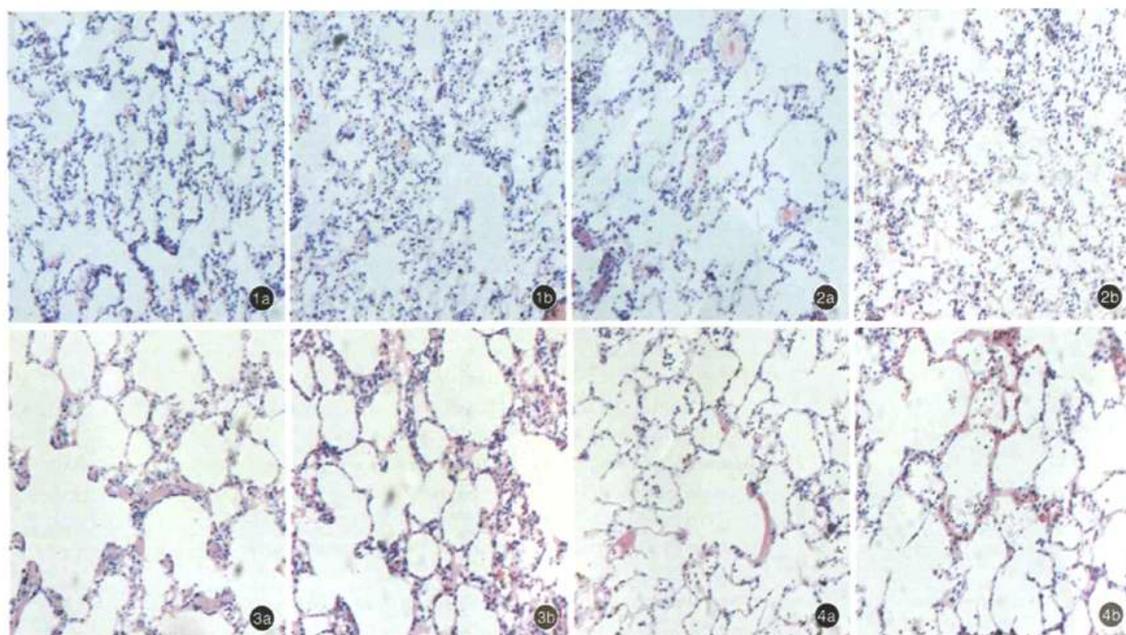


图2 荧光显微镜下观察RPMVEC与PHA结合呈黄绿色荧光(×400)

俯卧位通气加肺复张对急性呼吸窘迫综合征的作用

(正文见592页)



1:仰卧位组; 2:仰卧+RM组; 3:俯卧位组; 4:俯卧+RM组; a:腹侧; b:背侧

图3 光镜下观察各组动物右膈叶腹、背侧肺组织病理学改变(HE, ×100)