

血管紧张素 I 诱导急性肺损伤大鼠血管紧张素 II 2 型受体表达调控的研究

朱英 邱海波 杨毅 刘玲 赵明明 陈秋华 郭涛

【摘要】 目的 探讨静脉注射血管紧张素 I (Ang I) 和血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)阻断药氯沙坦对大鼠肺组织 AT2R 表达的影响及 AT2R 与急性肺损伤(ALI)的相关性。方法 24 只 SD 大鼠被随机分为 4 组,每组 6 只。正常对照组和 Ang I 组:持续皮下注射生理盐水或 Ang I $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 72 h; Ang I + 氯沙坦组:注射 Ang I 前 24 h 及注射过程中给予氯沙坦 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,连用 4 d; 氯沙坦组:仅用氯沙坦 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,连用 4 d。给药后活杀大鼠,分别用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测肺组织 AT2R 的 mRNA 和蛋白表达,并行组织损伤病理评分。结果 Ang I 组肺组织病理评分 $[(3.33 \pm 1.14)$ 分]明显高于正常对照组 $[(0.73 \pm 0.09)$ 分]; Ang I + 氯沙坦组评分降至 (1.98 ± 0.30) 分,而氯沙坦组为 (0.95 ± 0.20) 分,各组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Ang I 组 AT2R mRNA 表达 $[(47.90 \pm 9.88)\%]$ 明显低于正常对照组 $[(86.33 \pm 5.90)\%]$; Ang I + 氯沙坦组 AT2R mRNA 表达上调 $[(90.63 \pm 19.66)\%]$,而氯沙坦组为 $(68.65 \pm 4.88)\%$,各组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。正常对照组肺组织 AT2R 蛋白表达为 $(78.80 \pm 41.26)\%$, Ang I 组为 $(68.98 \pm 23.93)\%$, Ang I + 氯沙坦组为 $(68.13 \pm 23.23)\%$, 氯沙坦组为 $(70.15 \pm 17.16)\%$, 各组间比较差异均无统计学意义。结论 Ang I 可以诱导大鼠 ALI 并下调 AT2R mRNA 在肺组织中的表达,此时应用氯沙坦可上调 AT2R mRNA 表达,改善肺损伤; AT2R 可能在 ALI 中发挥肺保护作用。

【关键词】 血管紧张素 I; 血管紧张素 II 受体; 受体阻断药; 肺损伤,急性

Angiotensin II type 2 receptor expression and its modulation in angiotensin I induced acute lung injury in rat ZHU Ying, QIU Hai-bo, YANG Yi, LIU Ling, ZHAO Ming-ming, CHEN Qiu-hua, GUO Tao. Intensive Care Unit of Zhongda Hospital and School of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

Corresponding author: QIU Hai-bo (Email: haiboq2000@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To study the effect of angiotensin I (Ang I) and losartan, which is an angiotensin II type 1 receptor (AT1R) antagonist, on expression of AT2R in rat lung and the relationship between AT2R with acute lung injury (ALI). Methods Twenty-four Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal group, Ang I group, Ang I + losartan group and losartan group, with 6 rats in each group. Normal group and Ang I group were treated with continuous subcutaneous injection of normal saline (NS, $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) or Ang I ($1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) for 72 hours respectively. Ang I + losartan group was gavaged with losartan ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 24 hours before and during the 72 hours' continuous subcutaneous injection of Ang I for a duration of 4 days. In losartan group rats were gavaged with losartan ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 4 days only. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were employed to measure AT2R mRNA and protein. The pathology of the rat pulmonary was scored. Results Smith's score of pathology in Ang I group $[(3.33 \pm 1.14)$ scores] was significantly higher than that of the normal group $[(0.73 \pm 0.09)$ score], while it was significantly lower in Ang I + losartan group $[(1.98 \pm 0.30)$ scores] than that of Ang I group. Smith's score of pathology in losartan group was $[(0.95 \pm 0.20)$ scores]. The differences among four groups showed significant statistical difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). AT2R mRNA in Ang I group $[(47.90 \pm 9.88)\%]$ was significantly lower than that of normal group $[(86.33 \pm 5.90)\%]$, while it was significantly higher in Ang I + losartan group $[(90.63 \pm 19.66)\%]$ than Ang I group. AT2R mRNA of losartan group was $(68.65 \pm 4.88)\%$. The differences among four groups had significant statistical difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). While on protein level showed no statistically significant difference among the four groups. The values of AT2R were $(78.80 \pm 41.26)\%$, $(68.98 \pm 23.93)\%$, $(68.13 \pm 23.23)\%$ and $(70.15 \pm 17.16)\%$, respectively. Conclusion Ang I could induce ALI and downregulate AT2R mRNA expression in the lung of ALI rats, whereas losartan acts as a positive regulator. AT2R seems to present lung protection in ALI.

【Key words】 angiotensin I; angiotensin II receptor; receptor antagonist; acute lung injury

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30640012) 作者单位:210009 江苏南京,东南大学附属中大医院 ICU

通信作者:邱海波,教授,博士生导师,Email:haiboq2000@yahoo.com.cn

作者简介:朱英(1977-),女(汉族),江苏人,硕士研究生,Email:zhuying.1977@yahoo.com.cn.

急性肺损伤(ALI)时炎症反应失控,促炎/抗炎失衡,许多对其实施干预的措施收效甚微。近年来,血管紧张素 I (Ang I)作为一种促炎反应调质在心血管及肾脏疾病领域得到了广泛认可,但其分子机制及受体亚型在其中的作用尚不完全清楚。我们假设肺组织也存在局部肾素-血管紧张素系统(RAS),那么在 ALI 失控的炎症反应中,Ang I 是否扮演着重要角色? 本研究中观察与血管紧张素 I 2 型受体(AT2R)密切相关的 Ang I 及 AT1R 阻断药氯沙坦对大鼠肺组织 AT2R 表达的影响及 AT2R 与 ALI 的相关性,以期治疗 ALI 提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及给药方法:24 只 SD 大鼠,体重(200±12)g,由南京军区总院动物研究中心提供。按随机数字表法分正常对照组、Ang I 组、Ang I + 氯沙坦组和氯沙坦组。各组给药方法见表 1,给药完毕即处死大鼠,取肺组织备检。

1.2 AT2R mRNA 表达检测:按 TRIzol 试剂要求提取肺组织总 RNA,测吸光度(A)值,计算 RNA 纯度及浓度,稀释 RNA 工作液至 50 mg/L。用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)一步法检测,按试剂盒说明书操作,引物由上海生物工程技术公司合成。逆转录 48 °C 45 min,预变性 94 °C 3 min,变性 94 °C 1 min,退火 60 °C 45 s,延伸 72 °C 1 min,循环 40 次,最后延伸 72 °C 7 min。PCR 产物用质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统扫描图像、数据分析。计算 AT2R/β-肌动蛋白(β-actin)的 mRNA (%)作为半定量分析结果。

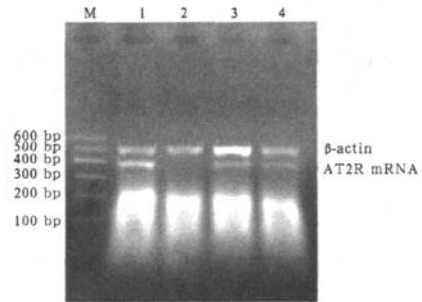
1.3 AT2R 蛋白水平检测:液氮中研磨肺组织,加入蛋白质裂解缓冲液及蛋白酶抑制剂,离心取上清液,辛可宁二酸(BCA)法测蛋白质含量。用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)鉴定蛋白:蛋白样品经电泳、转膜、封闭,加 AT2R 多克隆抗体孵育、漂洗,加羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)孵育 2 h,再漂洗,膜上加底物化学发光(ECL)显色液,在成像仪中观察结果。AT2R 蛋白表达量为条带灰度值与 β-actin 内参照灰度值的比值。

1.4 肺组织损伤病理评分:取右肺下叶,用中性甲醛水溶液固定,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。参照文献[1]方法进行病理评分。每张切片观察 12 个高倍视野(×400),取均值。

1.5 统计学处理:检测数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 进行统计分析,样本均数两两比较采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

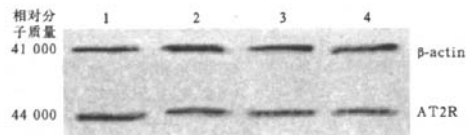
2 结 果

2.1 AT2R mRNA 及蛋白表达(表 1;图 1,图 2): Ang I 组 AT2R mRNA 表达较正常对照组显著降低,而 Ang I + 氯沙坦组较 Ang I 组升高,差异均有统计学意义(P 均<0.01)。各组间 AT2R 蛋白表达比较差异均无统计学意义。



M:Marker;1~4 依次为正常对照组、Ang I 组、Ang I + 氯沙坦组、氯沙坦组

图 1 RT-PCR 检测各组大鼠肺组织 AT2R mRNA 表达



1~4 依次为正常对照组、Ang I 组、Ang I + 氯沙坦组、氯沙坦组

图 2 Western blotting 检测各组大鼠肺组织 AT2R 蛋白表达

2.2 组织病理学改变(表 1;彩色插页图 3):Ang I 组肺组织病理评分较正常对照组显著升高(P<0.01),加用氯沙坦后评分显著下降(P<0.05),氯沙坦组与正常对照组比较差异无统计学意义。光镜下观察:Ang I 组有明显的肺泡出血、水肿、炎性细胞浸润、肺不张等 ALI 表现,而 Ang I + 氯沙坦组

表 1 各组大鼠制模方法、肺组织损伤病理评分及 AT2R 的 mRNA 和蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 动物数 | 制模方法 | 病理评分(分) | AT2R mRNA 表达(%) | AT2R 蛋白表达(%) |
|--------------|-----|--|---------------------------|----------------------------|---------------|
| 正常对照组 | 6 | 皮下注射生理盐水 1 μg · kg ⁻¹ · min ⁻¹ × 72 h | 0.73 ± 0.09 | 86.33 ± 5.90 | 78.80 ± 41.26 |
| Ang I 组 | 6 | 皮下注射 Ang I 1 μg · kg ⁻¹ · min ⁻¹ × 72 h | 3.33 ± 1.14 ^b | 47.90 ± 9.88 ^b | 68.98 ± 23.93 |
| Ang I + 氯沙坦组 | 6 | 皮下注射 Ang I 1 μg · kg ⁻¹ · min ⁻¹ × 72 h + 灌胃氯沙坦 10 mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹ × 4 d | 1.98 ± 0.30 ^{ac} | 90.63 ± 19.66 ^d | 68.13 ± 23.23 |
| 氯沙坦组 | 6 | 灌胃氯沙坦 10 mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹ × 4 d | 0.95 ± 0.20 ^d | 68.65 ± 4.88 ^e | 70.15 ± 17.16 |

注:与正常对照组比较,*P<0.05,*P<0.01,与 Ang I 组比较,*P<0.05,*P<0.01,与 Ang I + 氯沙坦组比较,*P<0.05

肺损伤较 Ang I 组有所减轻。

2.3 AT2R mRNA 表达与 ALI 的相关性分析: Ang I 组肺组织病理评分最高,镜下也观察到损伤最严重,AT2R mRNA 表达最低;Ang I + 氯沙坦组病理评分降低,损伤也减轻,AT2R mRNA 表达显著升高;氯沙坦组 AT2R mRNA 和病理评分与正常对照组比较差异均无统计学意义。

3 讨论

Ang I 作为一种促炎反应调质,在调节血管炎症反应中起关键作用。它可活化炎症反应细胞并使其向血管聚集,造成血管损伤,同时炎症细胞也可产生 Ang I,由此形成正反馈效应;此外,Ang I 还可调节在炎症反应不同阶段发挥效应的细胞黏附分子、化学增殖素、细胞因子及生长因子的表达,在动脉粥样硬化性疾病的形成和发展中起重要作用。给予 Ang I 受体拮抗剂可显著降低机体肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C-反应蛋白(CRP)、白细胞介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达^[2-4]。体外实验显示,Ang I 可显著增加内毒素所致肺微血管内皮细胞通透性^[5]。

AT2R 是 Ang I 特异性受体之一,主要存在于胚胎的发育过程中,在成人则有拮抗 AT1 的病理作用,能抑制 Ang I 诱导的促生长和促炎反应,降低血压。Ang I 与 AT2R 结合后具有抗炎作用,AT2R 基因敲除动物的炎症因子水平明显升高^[6]。那么肺组织是否也存在局部 RAS? 在 ALI/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)炎症反应失控时 AT2R 是否具有抗炎、保护肺组织的作用? Imai 等^[7]在 2005 年的一项研究中发现:正常肺组织存在 AT2R 表达,应用特异性 AT2R 阻断药 PD123319 后 ALI 加重,肺弹性显著下降,推断 AT2R 在 ALI 时可能通过某些未明机制发挥肺保护作用。

我们之前的研究显示,静脉注射 Ang I 可以造成大鼠 ALI,表现为肺组织湿/干重比值增加,病理损伤加重,肺组织 TNF- α mRNA、核转录因子- κ B (NF- κ B)、髓过氧化物酶(MPO)和丙二醛(MDA)表达增加,血浆血管性假血友病因子(vWF)抗原表达增加,给予氯沙坦后上述各项指标有所下降,肺损伤减轻^[8],提示 Ang I 可能主要通过 AT1R 结合发挥促炎作用。但是,这一实验存在一定的缺陷,受体间的交叉对话没有被重视,AT2R 往往对 AT1R 起着抗衡作用,这一作用可能在阻断 AT1R 后变得更加显著,从而对实验的最终结果产生了影响。故本实验中进一步在核酸和蛋白水平检测 AT2R,研究其

在 ALI 中的可能作用。研究发现,Ang I 组大鼠肺组织 AT2R mRNA 明显降低,肺损伤最严重,而加用氯沙坦后,AT2R mRNA 表达明显上升,相应的肺损伤减轻,提示在 Ang I 诱导的 ALI 中,Ang I 对 AT2R mRNA 表达起下调作用,AT1R 阻断药氯沙坦则对其起上调作用,这一结果与先前在心血管、肾脏中的研究^[9-10]一致。但在蛋白水平未看到这一现象,各组间蛋白表达量差异无统计学意义。我们是否可以提出这样的假设:AT2R 蛋白虽在量上未看到变化,但其性状或功能可能已发生了改变,最终表现为各组肺损伤程度不同,但需进一步实验进行深入研究以证实这一假设。此外,蛋白水平无明显差异还可能与我们在给药 72 h 即处死大鼠,时间较短,外周 AT2R 蛋白尚未耗竭有关,下一步实验我们将设置更多时间点以阐明蛋白变化的时间规律。

参考文献

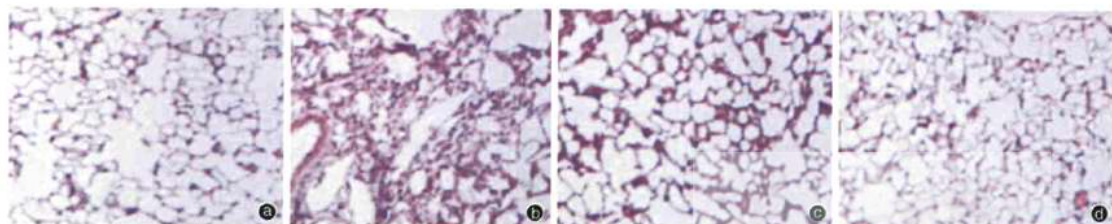
- [1] Smith KM, Mrozek JD, Simonton SC, et al. Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques; gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome [J]. Crit Care Med, 1997, 25(11):1888-1897.
- [2] Miyazaki M, Takai S. Anti-atherosclerotic efficacy of olmesartan [J]. J Hum Hypertens, 2002, 16(Suppl 2):S7-12.
- [3] Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, et al. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia [J]. Circulation, 2000, 101(13):1586-1593.
- [4] Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension; role of angiotensin I [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005, 14(2):125-131.
- [5] 张泓, 孙耕耘. 血管紧张素 I 及其受体拮抗剂对大鼠肺微血管内皮炎性损伤效应的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(10):608-610.
- [6] Wu L, Iwai M, Nakagami H, et al. Roles of angiotensin I type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin I type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury [J]. Circulation, 2001, 104(22):2716-2721.
- [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] 刘玲, 邱海波, 杨毅, 等. 血管紧张素 I-血管紧张素 II 型受体途径在介导大鼠肺部炎症反应中的作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(6):601-605.
- [9] Kijima K, Matsubara H, Murasawa S, et al. Regulation of angiotensin I type 2 receptor gene by the protein kinase C-calcium pathway [J]. Hypertension, 1996, 27(3 Pt 2):529-534.
- [10] Jugdutt BI, Menon V. AT2 receptor and apoptosis during AT1 receptor blockade in reperfusion myocardial infarction in the rat [J]. Mol Cell Biochem, 2004, 262(1-2):203-214.

(收稿日期:2008-01-13 修回日期:2008-02-06)

(本文编辑:李银平)

血管紧张素 II 诱导急性肺损伤大鼠血管紧张素 II 2 型受体表达调控的研究

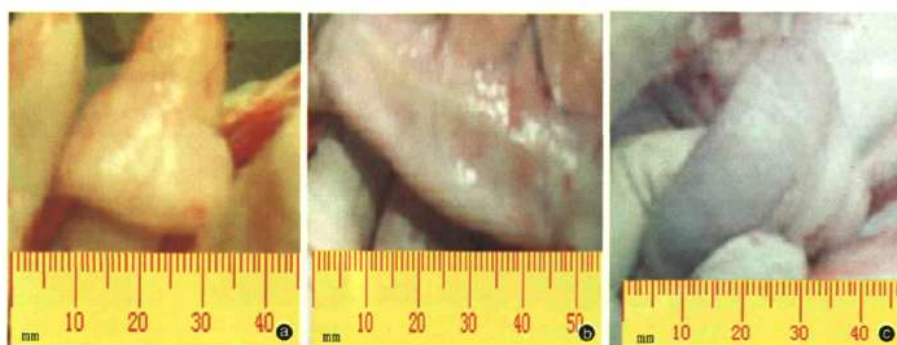
(正文见585页)



①:正常对照组, ②:Ang II组, ③:Ang II+氯沙坦组, ④:氯沙坦组
图3 各组大鼠肺组织病理学改变(HE, ×100)

不同潮气量联合呼气末正压通气对急性肺损伤犬小肠的影响

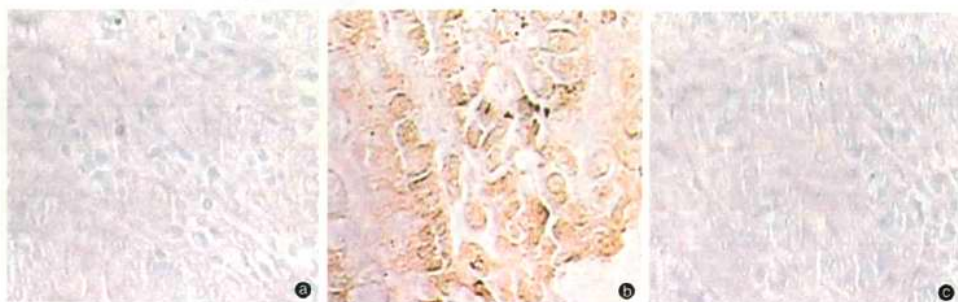
(正文见611页)



①:正常对照(N)组, ②:小VT MV(LV)组, ③:大VT MV(HV)组
图1 各组犬小肠大体观察



①a: N组小肠黏膜上皮正常; ①b: HV组小肠黏膜上皮明显坏死、脱落;
②a: N组小肠黏膜上皮组织正常; ②b: HV组小肠黏膜上皮组织疏松、剥离
图2 光镜下观察各组犬小肠组织病理学改变(HE, ×200)



①: N组, ②: LV组, ③: HV组
图3 各组犬小肠黏膜细胞凋亡检测结果(TUNEL, ×400)