

李树民,徐洪,杨奕,等. 血管紧张素转换酶 2 调节肺肾素血管紧张素系统减轻肢体缺血再灌注诱导的急性肺损伤[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 618-626.

Li SM, Xu H, Yang Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates acute lung injury induced by limb ischemia reperfusion in mice via regulation of pulmonary renin-angiotensin system [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 618-626.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2020. 05. 005

血管紧张素转换酶 2 调节肺肾素血管紧张素系统减轻肢体缺血再灌注诱导的急性肺损伤

李树民^{1,3}, 徐洪^{1,2}, 杨奕⁴, 李雅倩^{2,3}, 靳馥宇^{2,3}, 李田^{2,3}, 杨秀红³, 杨方^{1,2*}

(1. 华北理工大学公共卫生学院,河北 唐山 063210; 2. 华北理工大学河北省器官纤维化重点实验室,河北 唐山 063210; 3. 华北理工大学基础医学院,河北省慢性疾病重点实验室,唐山市慢性病临床基础研究重点实验室,河北 唐山 063210; 4. 华北理工大学教务处,河北 唐山 063210)

【摘要】 目的 探讨血管紧张素转换酶 2(angiotensin converting enzyme 2,ACE2)对小鼠肢体缺血再灌注诱导的急性肺损伤的保护作用和机制。**方法** 雄性野生型和 ACE2 转基因(过表达 ACE2 基因)ICR 小鼠随机分为 6 组($n=18$):野生对照组、野生模型组、ACE2 对照组、ACE2 模型组、ACE2 模型 + A779 干预组和 ACE2 模型 + MLN-4760 干预组。采用橡皮筋结扎双侧后肢根部的方法建立急性肺损伤模型(缺血 2 h,再灌注 4 h)。HE 染色观察肺组织病理学变化;肺组织脏器系数、湿/干重比、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)细胞计数和蛋白浓度检测肺组织含水量和肺泡毛细血管通透性;酶联免疫吸附法检测 BALF 中白介素-6(interleukin-6,IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α),以及肺组织血管紧张素 II(angiotensin II,Ang II)/Ang-(1-7)的浓度。qRT-PCR 法分析肺组织 ACE/ACE2 的 mRNA 表达。Western Blot 法检测肺组织 ACE/ACE2 和 AT1/Mas 受体的蛋白表达。**结果** 与野生模型组相比,过表达 ACE2 基因可减轻肺组织病变,降低肺泡毛细血管通透性,降低 BALF 炎性细胞因子表达,逆转肺组织肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system,RAS)稳态失衡。而且 ACE2 的这些保护作用被特异性 ACE2 抑制剂 MLN-4760 和 Mas 受体阻断剂 A779 所消除。**结论** ACE2 可通过 ACE2-Ang-(1-7)-Mas 轴改善肺组织局部 RAS 稳态失衡减轻急性肺损伤。

【关键词】 血管紧张素转化酶 2;急性肺损伤;肾素-血管紧张素系统;肢体缺血再灌注

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0618-09

Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates acute lung injury induced by limb ischemia reperfusion in mice via regulation of pulmonary renin-angiotensin system

LI Shumin^{1,3}, XU Hong^{1,2}, YANG Yi⁴, LI Yaqian^{2,3}, JIN Fuyu^{2,3}, LI Tian^{2,3}, YANG Xiuhong³, YANG Fang^{1,2*}

Corresponding author: YANG Fang. E-mail: fangyang@ncst.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the protective potential and mechanism of angiotensin-converting enzyme II (ACE2) in acute lung injury (ALI) induced by limb ischemia reperfusion in mice. **Methods** Male wild-type and ACE2 transgenic mice (overexpression of ACE2) Institute of Cancer Research mice were randomly divided into six groups ($n=$

[基金项目] 国家自然科学基金(81972988,81372029,81970359),河北省自然科学基金(H2020209052),河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2019077),河北省研究生创新资助项目(CXZZBS2017127)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81972988,81372029,81970359), Natural Science Foundation of Hebei Province under Grant(H2020209052), Science and Technology Research Projects of Hebei Higher Education Institutions (ZD2019077), Postgraduate Innovation Funding Program of Hebei Province under Grant(CXZZBS2017127)。

[作者简介] 李树民(1972—)女,硕士研究生,研究方向:器官损伤和纤维化。Email: 13463501676@163.com

[通信作者] 杨方(1955—),男,教授,博士,研究方向:器官损伤和纤维化研究。Email: fangyang@ncst.edu.cn

18): wild control group (Control), wild model group (Model), ACE2 control group (ACE2 + Control), ACE2 model group (ACE2 + Model), ACE2 model + A779 group (ACE2 + Model + A779), and ACE2 model + MLN-4760 group (ACE2 + Model + MLN-4760). ALI models were established using rubber band ligation of the bilateral hind limb roots (ischemia for 2 h and reperfusion for 4 h). Lung histological changes were observed using hematoxylin and eosin (HE) staining. Lung water content and pulmonary permeability were indicated by the organ coefficient, wet-to-dry weight ratio, cell numbers, and protein concentration in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the concentrations of BALF interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , and lung angiotensin II (Ang II)/angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)]. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to analyze mRNA expression of ACE/ACE2, and western blot used to quantify the protein expression of ACE/ACE2 and AT1/Mas receptors. **Results** Compared with the wild model group, overexpression of ACE2 attenuated lung lesions (HE staining and lung injury score), reduced alveolar capillary permeability (organ coefficient, wet-to-dry weight ratio, BALF cell numbers, protein concentration), improved the expression profiles of inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) in the BALF, and (particularly) reversed pulmonary renin-angiotensin system imbalance. Moreover, these effects were abrogated by MLN-4760 (a specific ACE2 inhibitor) and A779 (a specific Mas receptor antagonist). **Conclusions** The findings indicate that ACE2 can ameliorate the imbalance of the pulmonary renin-angiotensin system and the ALI via the ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis.

【Keywords】 angiotensin-converting enzyme 2; acute lung injury; renin-angiotensin system; limb ischemia reperfusion

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肢体缺血再灌注 (limb ischemia-reperfusion, LIR) 是临床上常见的病理征象,与血栓形成,栓塞,创伤和长期使用止血带有关^[1]。肢体恢复供血后,自由基产生增加,导致细胞钙超载,引发血管内皮细胞和中性粒细胞相互作用,炎症介质和细胞因子激活、释放,不仅会造成肢体缺血坏死,还会造成其他非缺血器官的损伤,严重者引起多脏器功能衰竭,甚至危及生命^[2]。肺由于血液循环丰富,而且是静脉血液返回心脏后首个供血器官,最容易受到 LIR 影响^[3],导致急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 甚至急性呼吸窘迫综合征^[4]。但是, LIR 引起 ALI 的机制尚未得到充分阐明。

最近研究证实,肺组织局部肾素-血管紧张素系统 (renin angiotensin system, RAS) 稳态失衡与 ALI 的发生发展密切相关^[5-6]。RAS 两条作用轴的正负调控平衡在维持正常生理功能中发挥重要作用。其中,血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE), 及其效应分子血管紧张素 II (angiotensin, Ang II) 和血管紧张素 II 受体 1 (AT1) 轴的激活是 ALI 发生发展的重要因素^[7-9]; 随后发现的血管紧张素转化酶 2 (ACE2), 将 Ang II 水解生成血管紧张素-(1-7) [Ang-(1-7)], Ang-(1-7) 通过与 G 蛋白偶联受体 Mas 结合, 发挥抗炎, 抗纤维化, 抗增殖和血管舒张作用^[10-12]。因此, ACE2-Ang-(1-7)-Mas 受体轴可能是肺损伤治疗的潜在靶标。

课题组前期研究发现,在 LIR 诱导的小鼠急性肺损伤模型中,小鼠肺组织 ACE, Ang II/Ang-(1-7) 和 AT1/Mas 表达增加, ACE2 表达减少。给予 ACE2 激活剂三氮脒 (diminazene aceturate, DIZE) 预处理 4 周能够逆转这些变化,肺损伤程度减轻。此外,与野生型小鼠相比,给予 ACE2 过表达小鼠 DIZE 处理后, DIZE 也可逆转急性肺损伤引起的 RAS 稳态失衡,而且效果更加明显^[13]。这些结果提示, ACE2 在急性肺损伤中发挥了重要的保护作用。然而, ACE2 激活后,其作用是否通过 ACE2-Ang-(1-7)-Mas 受体轴发挥目前尚不清楚。因此,本研究采用 ACE2 转基因小鼠 (过表达 ACE2 基因), 构建 LIR 诱导的急性肺损伤模型, 给予特异性 ACE2 抑制剂 MLN-4760 和特异性 Mas 受体阻断剂 A779 干预, 探讨 ACE2 在急性肺损伤中发挥保护作用的机制, 旨在发现治疗 ALI 的新靶标。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 8 ~ 12 周龄 ACE2 转基因雄性 ICR 小鼠 72 只, 体重 (28 $\pm$ 5) g, 在华北理工大学实验动物中心 SPF 级动物房繁殖、饲养【SYXK (冀) 2015-0038】。SPF 级 8 ~ 12 周龄野生型 ICR 小鼠 36 只, 体重 (30 $\pm$ 5) g, 由北京维通利华公司提供【SCXK

(京)2016-0001】。所有小鼠自由进食水,饲养环境温度 23 ~ 25℃,湿度 35% ~ 55%,12 h 光照/黑暗周期。所有实验程序均已获得华北理工大学伦理委员会批准(批准号 2013-038 和 2017-025)。

1.1.2 主要试剂与仪器

A779 (4030357; Bachem, 瑞士); MLN-4760 (530616; Millipore, 德国); 兔单克隆 ACE (EPR2757)、ACE2 [EPR4435 (2)]、AT1 (EPR3873) 抗体 (Epitomics, 美国); 鼠单克隆 Mas 抗体 (sc-390453; Santa Cruz Biotechnology, 美国); 兔单克隆 β -actin 抗体 (AC026; ABclonal Science Inc, 美国); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 (5220-0336)、山羊抗鼠 (5220-0341) 二抗 (SeraCare, 美国); BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (PQ0012; 联科生物, 中国); Ang II (CSB-E04495 m)/Ang-(1-7) (CSB-E13763 m) 酶联免疫吸附测定 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (Cusabio, 美国); 白介素-6 (interleukin-6, IL-6, RK00008) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , RK00027) ELISA 试剂盒 (ABclonal Science Inc, 美国); TRIzol (15596-018, Invitrogen, 美国); 反转录 (ZR102-2) 和 qRT-PCR (ZF102-2) 试剂盒 (北京庄盟, 中国); 引物序列 Thermo Fisher Scientific。

荧光显微镜 (BX53, 日本 OLYMPUS); 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9140 A, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司); 酶标仪 (iMark™; Bio-rad, 美国); Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

野生型 ICR 小鼠随机分为 2 组, 每组 18 只: (1) 野生对照组 (Control), (2) 野生模型组 (Model)。ACE2 基因过表达 ICR 小鼠随机分为 4 组, 每组 18 只: (1) ACE2 对照组 (ACE2 + Control); (2) ACE2 模型组 (ACE2 + Model), (3) ACE2 模型 + A779 干预组 (ACE2 + Model + A779) 和 (4) ACE2 模型 + MLN-4760 干预组 (ACE2 + Model + MLN-4760)。除 2 个对照组外, 其余各组均制备 LIR 模型。药物干预组分别在模型建立前给予 A779 (5 mg/(kg·d), s.c.) 和 MLN-4760 (1 mg/(kg·d), s.c.) 4 周预处理。对照组和模型组皮下注射等量生理盐水 4 周。

1.2.2 模型制备与样本处理

采用我室常规方法制备 LIR 模型。1%戊巴比

妥钠 (50 mg/kg, i.p.) 麻醉小鼠, 橡皮筋绑扎双侧后肢根部阻断肢体血流, 诱导局部缺血 2 h, 然后去除橡皮筋恢复血液灌注。再灌注后 4 h, 取血处死小鼠。每组 18 只小鼠中, 6 只小鼠左肺用于检测肺组织的湿/干重比 (Wet-to-Dry, W/D), 右肺用 4% 多聚甲醛固定, 用于组织学分析; 6 只小鼠的肺组织样本 -80℃ 保存, 用于检测 RAS 组分的表达; 6 只小鼠进行支气管肺泡灌洗, 对灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 进行细胞计数、蛋白浓度测定和炎症因子分析。

1.2.3 肺组织脏器系数与湿/干重比值 (W/D) 测定

小鼠处死后, 电子天平称体重 (灵敏度为 0.01 g); 开胸分离双侧肺, 滤纸轻轻吸干表面血液; 分析天平 (灵敏度为 0.0001 g) 称量两肺及左肺重量 (湿重); 将左肺放入真空干燥箱中 (60℃) 72 h 后, 重新称取左肺重量 (干重)。肺组织脏器系数 = 两肺样本的湿重/体重 $\times$ 100%; 肺组织 W/D = 左肺湿重/干重。

1.2.4 肺组织学分析

小鼠右肺组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 常规石蜡切片, 苏木精和伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察肺组织学变化, 并评估肺损伤程度。主要基于以下指标分析每个样本的病变程度: (1) 肺泡壁毛细血管扩张充血; (2) 肺泡出血; (3) 肺泡壁炎性细胞浸润; (4) 肺泡间质增厚/水肿。每个指标分为 5 个等级: 0 分 (无损伤), 1 分 (轻度损伤, 损伤范围 $\leq$ 25%/视野), 2 分 (中度损伤, 损伤范围 26% ~ 50%/视野), 3 分 (重度损伤, 损伤范围 51% ~ 75%/视野), 4 分 (极重度损伤, 损伤范围 76% ~ 100%/视野)。对 4 项指标的分数求和, 取随机 10 个视野的平均值作为最终结果^[14]。

1.2.5 ELISA 法检测肺组织 Ang II 和 Ang-(1-7) 浓度

适量肺组织剪碎, 在磷酸盐缓冲液 (PBS, 1 mL/100 mg) 中匀浆; 匀浆液置于 -20℃, 经过两次冻融后, 3000 r/min, 4℃ 离心 20 min, 取上清。按照 ELISA 试剂盒使用说明操作。酶标仪检测 450 nm 吸光度值, 绘制标准品标准曲线, 计算肺组织样本 Ang II 和 Ang-(1-7) 的浓度。

1.2.6 肺泡灌洗液收集与分析

1%戊巴比妥钠麻醉小鼠, 仰卧位固定, 颈部正中切开皮肤, 分离气管, 在甲状软骨下约 0.2 cm 插

入 20 g 钝针头,结扎气管和针头,1 mL 预冷 PBS 注入肺组织,停留 1 min 后吸出灌洗液,反复抽吸 3 次留存;重复此步骤 3 次,混合 3 次灌洗液,4℃ 1500 r/min 离心 10 min,分离上清和沉淀。用血细胞计数板对沉淀中的细胞进行计数。按照试剂盒说明书,BCA 法检测上清液中蛋白浓度;ELISA 法检测 IL-6 和 TNF- α 的浓度。

1.2.7 肺组织总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 ACE/ACE2 的 mRNA 表达水平

适量肺组织在液氮中研磨,使用 TRIzol 试剂提取肺组织总 RNA, NANO Drop 2000C Spectrophotometer 测定 RNA 浓度和纯度。以 2 μ g RNA 为模板,按照逆转录酶试剂盒说明操作合成 cDNA。以 cDNA 为模板,进行 qRT-PCR 扩增;根据相应样本中 β -肌动蛋白(β -actin)的 Ct 值,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示样本结果。引物序列:ACE sense, 5'-CAGTGTCTACCCCCAAGCAT-3', ACE antisense, 5'-CTTCCATCAAAGACCCTCCA-3'^[14]; ACE2 sense, 5'-CCTTCTCAGCCTTGTTGCTGTAC-3', ACE2 antisense, 5'-TGCCCAGAGCCTAGAGTTGTAGTC-3'^[15]; β -actin sense, 5'-GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3'; and β -actin antisense, 5'-GCAATGCCTGGGTACATGCTGG-3'^[14]。反应条件为:94℃ 2 min,随后 94℃ 15 s,60℃ 30 s,共 40 个循环。

1.2.8 Western Blot 检测肺组织 ACE/ACE2 与 AT1/Mas 受体蛋白表达

称取肺组织,加入含有 1% 蛋白酶抑制剂的冷 RIPA 裂解液(1 mL/100 mg),冰上超声匀浆,裂解物 12 000 r/min,4℃ 离心 20 min,取上清。BCA 法检测蛋白浓度。用 RIPA 裂解液调整样本蛋白浓度至 5 μ g/ μ L,按照 1:4 比例与 5 $\times$ 上样缓冲液混匀,100℃ 加热 10 min。30 μ g 蛋白用于 10% SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳;90 V 恒压转膜(PVDF 膜);5% 脱脂奶粉封闭 1 h,孵育 ACE(1:1000 稀释)、ACE2(1:1000 稀释)、AT1(1:1000 稀释)和 Mas(1:300 稀释)一抗 4℃ 过夜;次日 HRP 标记二抗 37℃ 孵育 1 h;ECL 显影;Image J 分析结果。

1.3 统计学分析

计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析。多组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),进一步两两比较采用 Least Significant Difference

(LSD)检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 过表达 ACE2 基因减轻小鼠肺组织学变化

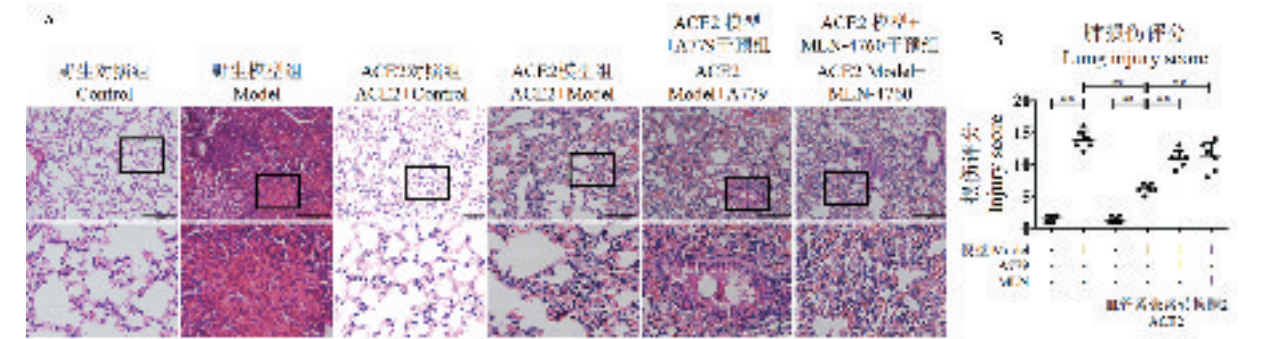
肉眼观,野生对照(Control)和 ACE2 对照组(ACE2 + Control)小鼠肺组织颜色粉红有弹性;经过肢体缺血再灌注处理的小鼠肺体积增大,呈暗红色,尤以野生模型组(Model)最为明显。光镜下 HE 染色结果显示(图 1A),野生和 ACE2 对照组小鼠,肺组织结构清晰,肺泡壁薄,无明显充血及炎细胞浸润。野生模型组小鼠肺泡壁毛细血管扩张充血,偶可见出血,肺泡腔内及肺泡壁大量炎性细胞浸润,肺泡间质增厚、水肿。ACE2 模型组(ACE2 + Model)小鼠肺组织病理学变化较轻。然而,给予 A779(ACE2 + Model + A779)和 MLN-4760(ACE2 + Model + MLN-4760)干预后再进行 LIR 处理,加剧了 LIR 对 ACE2 小鼠肺组织的损伤程度。进一步进行肺损伤评分,如图 1B 显示,野生对照和 ACE2 对照组肺损伤评分无显著差异。与野生对照组相比,野生模型组肺损伤评分明显升高($P < 0.01$);ACE2 模型组较野生模型组评分显著减低($P < 0.01$),而 A779 和 MLN-4760 处理后 ACE2 模型组肺损伤评分增加($P < 0.01$)。

2.2 过表达 ACE2 基因降低小鼠肺泡毛细血管通透性

如图 2 所示,与野生对照组相比,野生模型组小鼠肺组织脏器系数(图 2A)、W/D 比值(图 2B),肺泡灌洗液中细胞计数(图 2C)和蛋白浓度(图 2D)明显升高($P < 0.01$);与 ACE2 对照组相比,ACE2 模型组各项指标仅轻度升高($P < 0.05$),且较野生模型组显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);给予 MLN-4760 和 A779 干预后,各指标又较 ACE2 模型组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.3 过表达 ACE2 基因降低小鼠 BALF 炎性细胞因子表达

如图 3 所示,与野生对照组相比,野生模型组小鼠肺泡灌洗液中 IL-6(图 3A)和 TNF- α (图 3B)表达明显升高($P < 0.01$);与 ACE2 对照组相比,ACE2 模型组肺泡灌洗液中两炎性因子浓度仅轻微升高(IL-6, $P > 0.05$; TNF- α , $P < 0.05$),且较野生模型组显著降低($P < 0.01$);A779 和 MLN-4760 干预,取消了过表达 ACE2 的作用,IL-6 和 TNF- α 表达较 ACE2 模型组升高($P < 0.05$)。



注:A:过表达 ACE2 小鼠 LIR 后肺组织病理学变化 [HE 染色,× 40(上)× 200(下)];B:基于 HE 染色结果的肺损伤评分; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 过表达 ACE2 基因减轻小鼠肺组织学变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. A, Pathological changes in the lungs of ACE2 transgenic mice subjected to limb ischemia-reperfusion. HE staining, magnification of × 40 and × 200. B, Lung injury score; semi-quantitative pathological analysis based on HE staining. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Overexpression of ACE2 attenuates lung injury in mice($\bar{x} \pm s, n=6$)



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 过表达 ACE2 基因减轻小鼠肺泡毛细血管通透性($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.(The same in the following figures)

Figure 2 Overexpression of ACE2 reduces the permeability of alveolar capillaries in mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

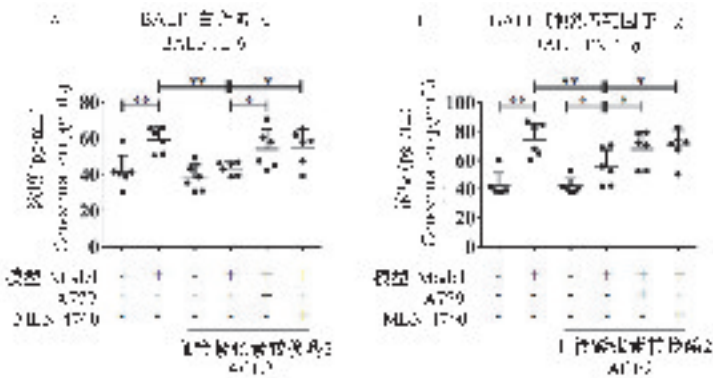


图 3 过表达 ACE2 基因降低小鼠肺泡灌洗液中 IL-6 和 TNF-α 表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 3 Overexpression of ACE2 reduces the expression of IL-6 and TNF-α in the BALF in mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.4 过表达 ACE2 基因调节小鼠肺组织 RAS 表达

与野生对照组相比,野生型 ICR 小鼠 LIR 处理后,肺组织 ACE2 mRNA(图 4A)和蛋白(图 5B)表达水平降低($P < 0.01, P < 0.05$),ACE mRNA(图 4B)和蛋白(图 5C)表达水平升高($P < 0.01$)。ACE2 对照组小鼠,肺组织 ACE2 mRNA 和蛋白水平较野生对照组明显升高,经过 LIR 处理后,ACE2

(mRNA/蛋白)水平降低($P < 0.05, P < 0.01$),ACE(mRNA, $P < 0.01$ /蛋白, $P > 0.05$)水平升高。进一步与野生模型组比较,二者变化较野生模型组明显减轻($P < 0.01, P < 0.05$)。A779 和 MLN-4760 干预加剧了 ACE2 模型组的变化($P < 0.01, P < 0.05$)。

结果提示,肢体缺血再灌注后,小鼠肺组织 AT1

(图 5D) 和 Mas(图 5E) 蛋白表达同样发生了变化。野生模型组和 ACE2 模型组 AT1 和 Mas 受体的蛋白表达均较相应对照组增加($P < 0.01, P < 0.05$); 但 ACE2 模型组较野生模型组 AT1 水平更低($P < 0.05$), Mas 水平更高($P < 0.01$)。应用 A779 和 MLN-4760 使 ACE2 模型组小鼠肺组织 Mas 水平降低($P < 0.01$), AT1 进一步升高($P < 0.01, P < 0.05$)。如图 5F 所示, ACE2 模型组 AT1 与 Mas 的比值低于野生模型组($P < 0.05$), 药物干预

后比值升高($P < 0.01$)。且与 ACE2 对照组相比, AT1 与 Mas 蛋白的比值在 ACE2 模型组略有降低($P > 0.05$)。

检测肺组织 ACE 和 ACE2 的效应分子 Ang II 和 Ang-(1-7) 的表达, 发现这两个效应分子的变化与 ACE 和 ACE2 的变化不一致。野生模型组和 ACE2 模型组 Ang II(图 6A) 和 Ang-(1-7)(图 6B) 的浓度均较相应对照组增加; 但 ACE2 模型组较野生模型组 AngII 水平更低($P < 0.05$), Ang-(1-7)

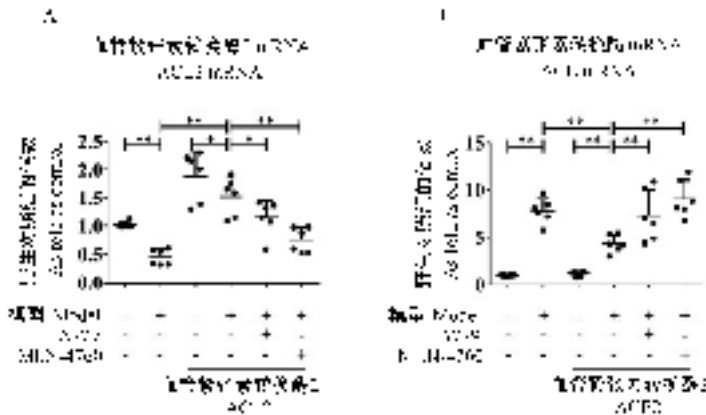


图 4 过表达 ACE2 基因调节小鼠肺组织 ACE2 和 ACE mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n=6$)
Figure 4 Overexpression of ACE2 regulates lung mRNA levels of ACE2 and ACE in mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

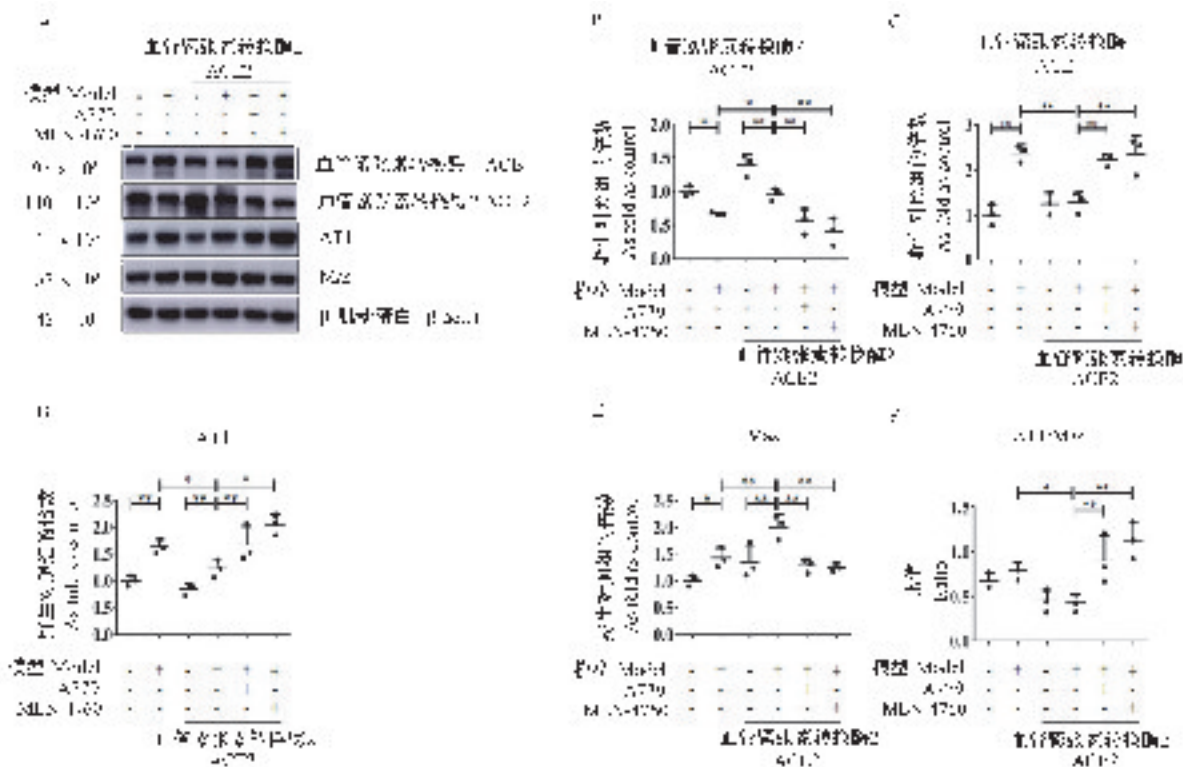


图 5 过表达 ACE2 基因调节小鼠肺组织 ACE2、ACE、AT1 和 Mas 受体蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=6$)
Figure 5 Overexpression of ACE2 regulates the protein expression of ACE2, ACE, AT1, and Mas in the lungs of mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

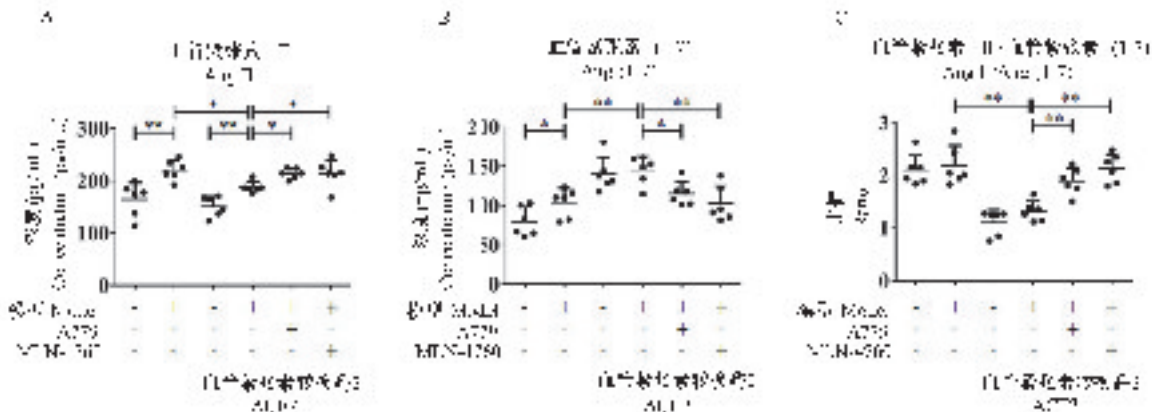


图 6 过表达 ACE2 基因调节小鼠肺组织 Ang II 和 Ang-(1-7) 表达($\bar{x} \pm s, n=6$)
Figure 6 Overexpression of ACE2 regulates lung Ang II and Ang-(1-7) in mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

水平更高($P < 0.01$)。应用 A779 和 MLN-4760 使 ACE2 模型组小鼠肺组织 Ang-(1-7) 水平降低($P < 0.05, P < 0.01$)，Ang II 进一步升高($P < 0.05$)。进一步比较 Ang II 与 Ang-(1-7) 的比值发现，ACE2 模型组和药物干预组的变化与相应各组 ACE 蛋白水平的变化类似(图 6C)。

3 讨论

肾素-血管紧张素系统(RAS)是人和动物体内重要的体液调节系统,以循环和局部两种形式,在调节血压、水和电解质平衡以及器官功能中发挥重要作用。近年来研究表明,肺组织局部 RAS 参与了急性肺损伤的发生与发展^[7-9]。

研究结果表明,野生型和过表达 ACE2 基因小鼠在肢体缺血再灌注处理后均出现了典型的肺损伤的组织学表现,肺组织脏器系数、湿/干重比值、BALF 蛋白浓度和细胞计数明显升高,同时肺组织 ACE、Ang II 和 AT1 受体表达升高。这些结果提示 ACE-Ang II-AT1 轴的激活可能参与了 LIR 后小鼠急性肺损伤的病理过程。已有研究表明,ALI 的早期主要表现为血管内皮细胞损伤,而 Ang II 是重要的血管损伤因子,Ang II 的过度表达可通过 AT1 受体引起内皮细胞肿胀和变性^[14]。Ang II 还可显著诱导肺上皮细胞凋亡,导致上皮屏障功能受损和通透性增加^[16]。此外,增高的 Ang II 抑制肺泡上皮的钠离子通道,诱导肺组织水通道蛋白 1 和水通道蛋白 5 的异常表达^[17-18],引起肺泡壁通透性增加,液体清除率降低,导致肺水肿和渗出液中蛋白质含量增加^[7,17]。Ang II 还刺激多种炎症反应,激活炎症因子,导致炎症损伤。其中,IL-6 和 TNF- α 已被动

物实验和临床研究证实参与了急性肺损伤的发生与发展^[19-20]。有学者认为,早期检测外周血 IL-6 和 TNF- α 水平可以预测急性胰腺炎引发的急性肺损伤的发生,并对评估急性肺损伤的严重程度和预后具有重要价值^[21]。本研究结果也提示,在两个基因型的模型组小鼠中,肺泡灌洗液 IL-6 和 TNF- α 浓度升高,尤以野生模型组升高更为明显。

近年来,随着 ACE2 的发现,ACE2-Ang-(1-7)-Mas 轴在呼吸系统疾病中的作用越来越受到重视。研究表明,ACE2 在肺泡上皮和肺血管内皮细胞均有表达^[22-23]。ACE2 能够抑制炎症损伤,从而保护肺组织免受损伤的影响^[10,24-27];敲除小鼠 ACE2 基因会导致 ACE/Ang II 与 Ang II/Ang-(1-7) 稳态失衡,加重肺部损伤^[14],给予合成 ACE2 会显著减轻肺组织病理变化^[28]。我们的前期研究也发现,无论是外源性激活(DIZE 干预)还是内源性高表达 ACE2 基因,均能减轻 LIR 诱导的小鼠急性肺损伤^[13];而且,DIZE 的作用可被特异性酶抑制剂 MLN-4760 和 Mas 受体阻断剂 A779 所取消(文献尚未发表)。在本研究中,LIR 引起两种基因型小鼠肺组织 ACE、Ang II、AT1 表达增加,ACE2 表达减少,但与野生模型组相比,过表达 ACE2 基因显著降低了模型组肺组织中 ACE-AngII-AT1 轴组分的变化幅度。此外,过表达 ACE2 基因,还减轻了肺组织的病变程度,降低了肺泡毛细血管通透性,降低了肺泡灌洗液中 IL-6 和 TNF- α 的表达。然而,ACE2 的这些有益作用被 MLN-4760 和 A779 所消除。因此,可以推断 ACE2 可能通过 ACE2-Ang-(1-7)-Mas 轴调控 RAS,进而发挥对小鼠急性肺损伤的保护作用。

研究中我们还发现,野生型和 ACE2 基因过表

达小鼠 LIR 后,肺组织 Ang-(1-7) 和 Mas 受体的表达均增加,这与 ACE2 的结果变化不一致。这种不一致可以通过以下几种原因解释:(1) Ang-(1-7) 除通过 ACE2 水解 Ang II 产生外,还可以通过其他代谢途径生成,比如它可以通过中性内肽酶(NEP)/肺氨酰内肽酶(PEP)的催化作用从 Ang I 产生,或者通过 ACE/NEP 从 Ang-(1-9) 中分离出来^[29]。(2) 在过表达 ACE2 基因小鼠中,肺组织 ACE2 mRNA 和蛋白表达水平高于野生型小鼠^[13-14],而 LIR 小鼠肺组织的 Ang II 水平也较高,因而为升高的 ACE2 提供了更多的底物,产生更多的 Ang-(1-7)。(3) Ang-(1-7) 升高会激活 Mas 受体并增加受体的表达^[30],二者结合发挥对 ALI 的保护作用。尽管 Ang-(1-7) 和 Mas 受体的表达增加,但从模型组 Ang II 与 Ang-(1-7) 的比值,以及 AT1/Mas 的比值上看,两个模型组 Ang II/Ang-(1-7) 的比值,以及野生模型组 AT1/Mas 的比值仍高于对照组,因此, LIR 小鼠肺组织 Ang-(1-7) 的水平不足以完全对抗 Ang II 的致损伤作用,最终导致肺损伤。但与野生型小鼠相比,ACE2 过表达小鼠肺组织 ACE2 和 Ang-(1-7) 水平较高,能够更好的拮抗 ACE-Ang II-AT1 轴的作用,肺部损伤程度较轻。ACE2 过表达模型组中 ACE 蛋白表达水平无明显变化也证实了这一点。此外,有文献报道,脂多糖诱导的肺损伤的恢复时间为 Ang-(1-7) 干预后 3 d,3 d 后较高水平的 Ang-(1-7) 可能与 Mas 受体结合发挥保护作用^[31]。而本研究观察的是缺血再灌注后 4 h 肺组织 RAS 的变化,与文献报道时间相比,还处于早期阶段,Ang-(1-7) 的保护作用还不能有效发挥。

总之,肺组织 RAS 稳态失衡在急性肺损伤的发生发展中发挥重要作用。本研究证实了 ACE2 可通过激活 ACE2-Ang-(1-7)-Mas 受体轴,改善 RAS 稳态失衡,进而减轻肢体缺血再灌注引发的急性肺损伤。因此,靶定 ACE2 对 RAS 稳态的调节,可以作为治疗急性肺损伤的有效策略。

参 考 文 献(References)

- [1] Obara H, Matsubara K, Kitagawa Y. Acute limb ischemia[J]. Ann Vasc Dis, 2018, 11(4): 443-448.
- [2] Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, et al. Ischemia/reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 5034.
- [3] Kao MC, Jan WC, Tsai PS, et al. Magnesium sulfate mitigates lung injury induced by bilateral lower limb ischemia-reperfusion in rats[J]. J Surg Res, 2011, 171(1): e97-e106.
- [4] Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries [J]. JAMA, 2016, 315(8): 788-800.
- [5] Tan WSD, Liao W, Zhou S, et al. Targeting the renin-angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases[J]. Curr Opin Pharmacol, 2018, 40: 9-17.
- [6] Xu S, Chen YH, Tan ZX, et al. Vitamin D3 pretreatment alleviates renal oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015, 152: 133-141.
- [7] Tao W, Li PS, Xu G, et al. Soluble epoxide hydrolase plays a vital role in angiotensin II-induced lung injury in mice [J]. Shock, 2018, 50(5): 589-594.
- [8] Wang Y, Zhu Y, Zhu Y, et al. Regulation of the angiotensin II-p22phox-reactive oxygen species signaling pathway, apoptosis and 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1 retrieval in hyperoxia-induced lung injury and fibrosis in rats [J]. Exp Ther Med, 2017, 13(6): 3397-3407.
- [9] El-Sayed LA, Osama E, Mehesen MN, et al. Contribution of angiotensin II in hepatic ischemia/reperfusion induced lung injury: Acute versus chronic usage of captopril [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2020, 60: 101888.
- [10] Fang Y, Gao F, Liu Z. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates inflammatory response and oxidative stress in hyperoxic lung injury by regulating NF-kappaB and Nrf2 pathways [J]. QJM, 2019, 112(12): 914-924.
- [11] Calò LA, Rigato M, Bertoldi G. ACE2/Angiotensin 1-7 protective antiinflammatory and antioxidant role in hyperoxic lung injury: support from studies in Bartter's and Gitelman's syndromes[J]. QJM, 2020, 113(6): 440-441.
- [12] Zhang X, Zheng J, Yan Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 regulates autophagy in acute lung injury through AMPK/mTOR signaling[J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 672: 108061.
- [13] Li SM, Wang XY, Liu F, et al. ACE2 agonist DIZE alleviates lung injury induced by limb ischemia-reperfusion in mice [J]. Sheng Li Xue Bao, 2018, 70(2): 175-183.
- [14] Chen LN, Yang XH, Nissen DH, et al. Dysregulated renin-angiotensin system contributes to acute lung injury caused by hind-limb ischemia-reperfusion in mice [J]. Shock, 2013, 40(5): 420-429.
- [15] Wiener RS, Cao YX, Hinds A, et al. Angiotensin converting enzyme 2 is primarily epithelial and is developmentally regulated in the mouse lung [J]. J Cell Biochem, 2007, 101(5): 1278-1291.
- [16] Lee YH, Mungunsukh O, Tutino RL, et al. Angiotensin-II-induced apoptosis requires regulation of nucleolin and Bcl-xL by SHP-2 in primary lung endothelial cells [J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt 10): 1634-1643.
- [17] Qi QY, Chen W, Li XL, et al. H(2)S protecting against lung injury following limb ischemia-reperfusion by alleviating

- inflammation and water transport abnormality in rats[J]. Biomed Environ Sci, 2014, 27(6): 410-418.
- [18] 岳胜, 朱平, 岳磊, 等. 急性肺损伤大鼠呼吸膜 AQP1 和 AQP5 的表达[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(8): 70-74, 90.
Yue S, Zhu P, Yue L, et al. Expression of AQP1 and AQP5 is decreased in the alveolar-capillary membrane in rats with acute lung injury[J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(8): 70-74, 90.
- [19] Ling T, Xie J, Shen YS, et al. Trichostatin A exerts anti-inflammation functions in LPS-induced acute lung injury model through inhibiting TNF- α and upregulating micorRNA-146a expression[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(7): 3935-3942.
- [20] Li N, Wang BM, Cai S, et al. The role of serum high mobility group Box 1 and Interleukin-6 levels in acute pancreatitis: a meta-analysis[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 616-624.
- [21] 林燕, 张发钦, 李海涛. 外周血 IL-6、TNF- α 早期检测对急性胰腺炎相关肺损伤及其性质的临床预测价值[J]. 中国医学创新, 2018, 15(30): 7-10.
Lin Y, Zhang FQ, Li HT. Clinical predictive value of early detection of IL-6 and TNF- α in peripheral blood on acute lung injury during acute pancreatitis and its severity[J]. Med Innov Chin, 2018, 15(30): 7-10.
- [22] Li Y, Zeng Z, Cao Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF-kappaB signaling pathways[J]. Sci Rep, 2016, 6: 27911.
- [23] Gao X, Xu H, Zhang B, et al. Interaction of *N*-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline with the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-Mas axis attenuates pulmonary fibrosis in silicotic rats[J]. Exp Physiol, 2019, 104(10): 1562-1574.
- [24] Kong EL, Zhang JM, An N, et al. Spironolactone rescues renal dysfunction in obstructive jaundice rats by upregulating ACE2 expression[J]. J Cell Commun Signal, 2019, 13(1): 17-26.
- [25] Li XY, Peng Y, Bu XW, et al. Balancing effect of Biejiajian Oral Liquid (鳖甲煎口服液) on ACE-Ang II-AT1R Axis and ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis in rats with CCl4-induced hepatic fibrosis[J]. Chin J Integr Med, 2018, 24(11): 853-859.
- [26] Williams VR, Scholey JW, Angiotensin-converting enzyme 2 and renal disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2018, 27(1): 35-41.
- [27] Zhao S, Ghosh A, Lo CS, et al. Nrf2 Deficiency upregulates intrarenal angiotensin-converting enzyme-2 and angiotensin 1-7 receptor expression and attenuates hypertension and nephropathy in diabetic mice[J]. Endocrinology, 2018, 159(2): 836-852.
- [28] 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.
- [29] Ferrario CM, Ahmad S, Joyner J, et al. Advances in the renin angiotensin system focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7)[J]. Adv Pharmacol, 2010, 59: 197-233.
- [30] Stegbauer J, Vonend O, Oberhauser V, et al. Effects of angiotensin-(1-7) and other bioactive components of the renin-angiotensin system on vascular resistance and noradrenaline release in rat kidney[J]. J Hypertens, 2003, 21(7): 1391-1399.
- [31] Chen Q, Yang Y, Huang Y, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates lung fibrosis by way of mas receptor in acute lung injury[J]. J Surg Res, 2013, 185(2): 740-747.

[收稿日期] 2020-07-13