

高表达血管紧张素转化酶 2 的羊膜间充质干细胞对肺动脉高压大鼠的干预作用

吴长芳 张洪哲 查杰 高震

摘要 目的 观察转染血管紧张素转化酶 2(ACE2) 基因的人羊膜间充质干细胞(hAMSCs) 对野百合碱诱发的肺动脉高压(PAH) 大鼠模型的干预作用。方法 ① 用携带 ACE2 基因的慢病毒转染 hAMSCs, 检测转染前后 hAMSCs 中 ACE2、胰岛素样生长因子(IGF-1)、粒细胞趋化蛋白-2(GCP-2) 基因的表达、细胞迁移以及成管能力的变化。② 实验动物选用雄性、健康、6 周龄 SD 大鼠, 随机分为正常对照组(Control 组)、肺动脉高压组(PAH 组)、人羊膜间充质干细胞治疗组(hAMSCs 组) 以及转染 ACE2 的人羊膜间充质干细胞治疗组(ACE2-hAMSCs 组)。造模成功 2 周后测量平均肺动脉压力(mPAP)、右心室壁厚指数(RVHI), 肺组织 HE 染色观察肺小动脉管腔大小以及血管壁的厚薄变化, qPCR 测定了肺组织中 GCP-2、ACE2、 α -肌动蛋白(α -actin)、血管紧张素 II(Ang II) mRNA 的表达水平。结果 体外细胞实验显示 ACE2-hAMSCs 较单纯的 hAMSCs 组的细胞迁移能力、成管能力提高($P < 0.05$)。ACE2-hAMSCs 上调了 ACE2 及促血管生成因子 IGF-1、GCP-2 mRNA 表达($P < 0.01$)。干预处理 2 周后, PAH 组的 mPAP、RV/LV+S 较正常对照组升高($P < 0.01$) 与 PAH 组及 hAMSCs 组比较, ACE2-hAMSCs 组的 mPAP、心脏 RV/LV+S 下降($P < 0.01$)。与 PAH 组相比, ACE2 的 mRNA 表达水平在 ACE2-hAMSCs 组的肺组织中明显升高。结论 ACE2-hAMSCs 能够降低野百合碱(MCT) 诱导的 PAH 大鼠模型的肺平均动脉压力, 改善肺血管及右心室重塑, 其治疗作用优于 hAMSCs 组, 考虑可能一方面与 ACE2-hAMSCs 促进 hAMSCs 的旁分泌作用, 促进促血管生长因子 GCP-2、IGF-1 表达, 修复损伤的肺血管内皮细胞, 减轻肺动脉高压有关, 另一方面与 hAMSCs 中高表达的 ACE2 调节 RAS 有关。

关键词 血管紧张素转化酶 2; 羊膜间充质干细胞; 肺动脉高压

中图分类号 R 543.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0366-07

2022-08-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81760046); 贵州省自然科学基金(编号: QKH[2018]2758、QKH[2020]1Z058)

作者单位: 贵州医科大学临床医学院, 贵阳 550000

作者简介: 吴长芳, 女, 硕士研究生;

张洪哲, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 1939363232@qq.com

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.004

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH) 是由多种病因引起的一类无法治愈的血管性疾病^[1-2]。目前普遍认为内皮损伤及功能障碍是 PAH 的始动因素, 而肾素-血管紧张素系统(renin angiotensins system, RAS) 在其过程中发挥着重要作用^[3]。经典 RAS 的效应物质血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II) 促进了 PAH 的形成。研究发现 RAS 存在血管紧张素转化酶 2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)/血管紧张素 1-7/特异性受体 Mas 轴, 发挥着舒张血管、抗增殖、抗炎等作用^[4]。ACE2 一方面降解 Ang II, 另一个方面生成血管紧张素 1-7, 拮抗 Ang II 的作用^[5]。因此, 通过上调 ACE2 表达量, 可能是治疗 PAH 的一个有效措施。此外, 补充充足的内皮细胞也许是修复肺动脉内皮的有效手段之一。研究中发现人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs) 具有多向分化、低免疫原性、来源丰富、不受伦理限制等多个优点^[5]。因此, 该课题组通过将 ACE2 转染至 hAMSCs, 观察其对野百合碱诱发的 PAH 大鼠模型的干预作用, 为 PAH 治疗策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂实验动物 动物研究对象为 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 24 只, 6 周龄, 实验动物由辽宁长生生物技术股份有限公司提供(许可证号: SCXK(辽)2020-0001)。饲养条件: 自然光、安静环境下饲养, 自然进食、饮用自来水, 环境温度在 18~26℃, 相对湿度 40%~70%, 通风换气 8~12 次/h, 设置白天和黑夜各 12 h。

主要试剂: α -MEM 培养基(武汉普诺塞生命科技有限公司, 批号: PM150421)、胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号: 10091-148)、PVDF 膜(美国 Millipore 公司, 批号: IPVH00010)、抗体 CD29-APC(美国 Ebioscience 公司, 批号: 17-0299-41)、CD45-PE(美国 Ebioscience 公司, 批号: E-AB-F1039D)、蛋白 marker

(10-250KD) (北京海利克思科技有限公司,批号:P12103-2)。

1.2 实验方法

1.2.1 hAMSCs 的培养 原代人羊膜间充质干细胞购于上海赛百慷生物技术股份有限公司。待细胞的密度达到 85% ~ 90% 时,收集离心,然后加入完全培养基制成单细胞悬液,根据 1:3 的比例传代,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下传代培养。

1.2.2 携带 ACE2 基因的慢病毒转染 hAMSCs 高表达 ACE2 基因的慢病毒由武汉巴菲尔生物技术服务有限公司构建并包装、检测。筛选生长状态良好的第三代 hAMSCs,当细胞在培养板中融合达到约 35% ~ 50% 时,从 -80 °C 冰箱中取出病毒,迅速置于 37 °C 水浴锅中彻底溶解病毒液,用 MEM α 培养基以细胞感染复数 (MOI) 为 10 进行稀释病毒原液。细胞在培养箱孵育 24 h 后更换培养基。在转染 72 h 以后,通过荧光显微镜观察转染 ACE2 的 hAMSCs 中荧光的表达情况。转染后根据细胞情况予细胞换液及传代培养。

1.2.3 ACE2-hAMSCs 的流式细胞仪鉴定及功能测定 分别选取第三代 hAMSCs 及 ACE2-hAMSCs,待细胞培养融合达到 90% 左右,收集细胞并计数后,每管中加入 1×10^6 个细胞以及 1 ml PBS (含 0.5% BSA) 液,加入抗体 CD29-APC 和 CD45-PE,同时设置阴性对照组,在避光、室温下孵育 30 min 后,用 PBS 清洗 2 次,最后重悬细胞,转移至流式上样管中,流式细胞仪进行检测分析。

ACE2-hAMSCs 迁移实验: 收集细胞,细胞计数并稀释浓度至 3×10^5 个/ml 备用;在 24 孔板中加入 10% FBS 的培养基(含双抗),使用 Transwell 检测细胞迁移情况,显微镜下观察拍照。

ACE2-hAMSCs 的成管实验: 收集细胞,计数后按 1.5×10^5 个/孔细胞均匀接种到预铺有 matrigel 胶的 24 孔板中,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件过夜培养;培养 12 ~ 24 h 拍照($\times 100$, $\times 40$)。

1.2.4 Q-PCR 检测 ACE2-hAMSCs、hAMSCs 中 ACE2、GCP-2、IGF-1 基因表达 使用 QPCR 检测 ACE2-hAMSCs 中基因的表达水平。采用 TRizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测定其含量,严格按照反转录合成试剂盒说明书将提取的 RNA 进行反转录。依据 SYBR Green Master Mix 试剂盒说明书进行 PCR 反应,在反应完成之后,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法进行数据分析。引物序列: ACE2, F: 5'-TGCTTG-GTGATATGTGGGGT-3', R: 5'-ACTTTCCGGTCATCT-

CCTGG-3'; GCP-2, F: 5'-CTCAAGCTGCTCCTTCT-CG-3', R: 5'-GCTTCTGGGTCAAGACAAACA-3'; IGF, F: 5'-ATCAGCAGTCTTCCAACCCA-3', R: 5'-TGTCT-CCACACACGAACTGA-3'。

1.2.5 实验动物分组与处理 随机实验分成 4 组, Control、PAH、hAMSCs、ACE2-hAMSCs 组,每组 6 只。模型组大鼠予 MCT 50 mg/kg 一次性腹腔注射,而 Control 组予相同量的生理盐水腹腔注射作为对照。给药 3 周后, hAMSCs 组、ACE2-hAMSCs 组尾静脉注射相应细胞, Control 组、PAH 组注射等量的生理盐水,每周注射 1 次,共注射 2 次。

1.2.6 测量各组大鼠平均肺动脉压力及测定右心室肥厚指数 干预处理 2 周后,各组大鼠以 5 ml/kg 腹腔注射 7% 水合氯醛麻醉后,将压力探头连接到 Medlab 生理记录仪,并将充满肝素钠的微导管插进右心室以检测各组大鼠的 mPAP。然后处死大鼠,分离出右心室 (RV) 和左心室加室间隔 (LV + S) 并称量, RV/(LV + S) 比值算出右心室肥厚指数 (RVHI)。然后用 10% 甲醛溶液将肺组织固定 1 d,石蜡包埋固定用于下一步 HE 染色。

1.2.7 各组大鼠肺组织的 HE 染色 将石蜡切片常规脱蜡,依次放入浓度梯度乙醇溶液中。使用 Mayer 氏苏木精染液染色、伊红染液染色,镜检观察炎症浸润、肺小动脉管壁增厚与管腔狭窄情况。

1.2.8 Q-PCR 检测各组大鼠肺组织中 GCP-2、ACE2 和 α -actin、Ang II 基因表达水平 使用 Q-PCR 检测 ACE2-hAMSCs 中基因的表达水平。采用 TRizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测定其含量,严格按照反转录合成试剂盒说明书将提取的 RNA 进行反转录。依据 SYBR Green Master Mix 试剂盒说明书进行 PCR 反应,在反应完成后,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法进行数据分析。引物序列: ACE2, F: 5'-TG-CTTGGTGATATGTGGGGT-3', R: 5'-ACTTTC-CGGTC-ATCTCCTGG-3'; GCP-2, F: 5'-CTCAAGCT-GCTCCTT-TCTCG-3', R: 5'-GCTTCTGGGTCAAGACAAACA-3'; α -actin, F: 5'-GGTGCTGTCTCTCTAT-GCCT-3', R: 5'-GGTAGTCAGTAAGGTCGCCA-3'。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件分析,定量数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本均数运用单因素方差分析,方差齐采用 LSD 方法检验,方差不齐采用 Tamhane 法检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人羊膜间充质干细胞的形态学观察 人羊膜

间充质干细胞贴壁生长,呈现均匀的成纤维细胞形态,多呈梭形或纺锤形,胞质丰富。

2.2 转染 ACE2 的 hAMSCs 绿色荧光蛋白表达 使用感染复数(MOI)为 10 的慢病毒原液感染 hAM-SCs,转染 72 h 后,通过荧光显微镜下观察荧光蛋白的分布情况,见图 1。

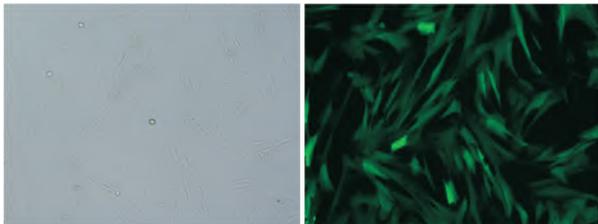


图 1 转染 ACE2 的 hAMSCs 的绿色荧光蛋白表达情况 ×100

2.3 流式细胞术检测 FACS 分析 hAMSCs 及 ACE2-hAMSCs 显示出 MSC 特异性特征,表达 CD29 表面抗原,不表达 CD45 表面抗原。流式细胞术检测结果表明 hAMSCs CD29 表达率为 98.58%,CD45 表达率为 0.59%,D 为 ACE2-hAMSCs 表达结果,CD29 表达率为 94.15%,CD45 表达率 2.79%,见

图 2。

2.4 ACE2-hAMSCs 促进细胞迁移、血管形成试验

细胞迁移试验表明细胞培养 24 h 后,ACE2-hAM-SCs 较单纯的 hAMSCs 的细胞迁移能力明显增强 68% ($P < 0.05$),见图 3。小管形成实验表明细胞培养 15 h 后,ACE2-hAMSCs 较单纯的 hAMSCs 的小管形成能力明显增强 ($P < 0.05$),见图 4。

2.5 ACE2-hAMSCs 表现出高 ACE2、GCP-2、IGF-1 mRNA 表达量 从 mRNA 水平确定 ACE2-hAMSCs 中 ACE2 的表达,本课题进行了 QPCR 检测。与单独的 hAMSCs 相比,在 ACE2-hAMSCs 中检测到 ACE2 mRNA 水平明显升高 ($P < 0.01$),同时 ACE2-hAMSCs 也明显提高了促血管生成因子 GCP-2、IGF-1 的基因表达量 ($P < 0.01$),见图 5。

2.6 各组大鼠 mPAP 及 RV/LV+S 检测结果 为了研究 ACE2-hAMSCs 在 PAH 中的治疗作用,本课题组通过尾静脉将 1×10^6 个细胞注射到野百合碱诱发的肺动脉高压的大鼠模型体内。细胞移植 2 周后结果表明:与 Control 组比较,PAH 组的 mPAP 升高;与 PAH 组比较,ACE2-hAMSCs 组及 hAMSCs 组的 mPAP 均明显下降 ($P < 0.01$),见图 6。

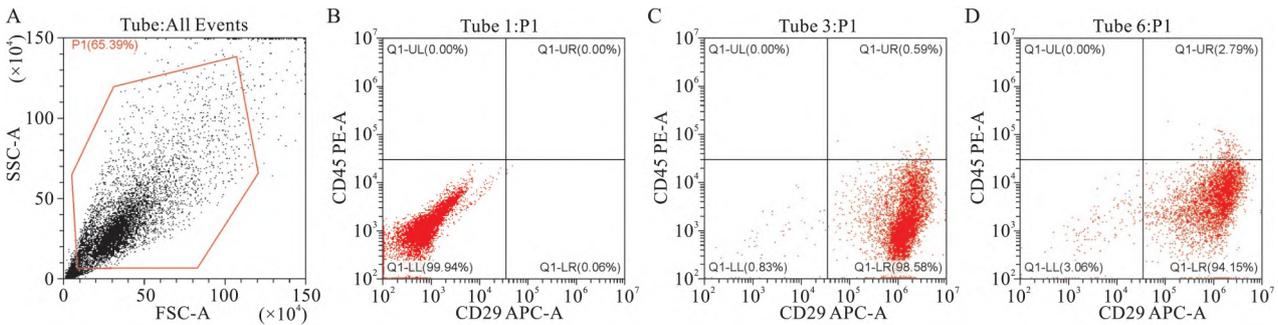


图 2 hAMSCs 和 ACE2-hAMSCs 表面抗原的流式细胞术检测

A: 空白对照; B: 空白对照; C: hAMSCs; D: ACE2-hAMSCs

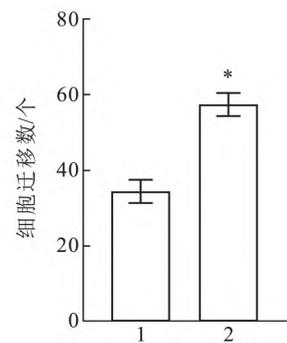
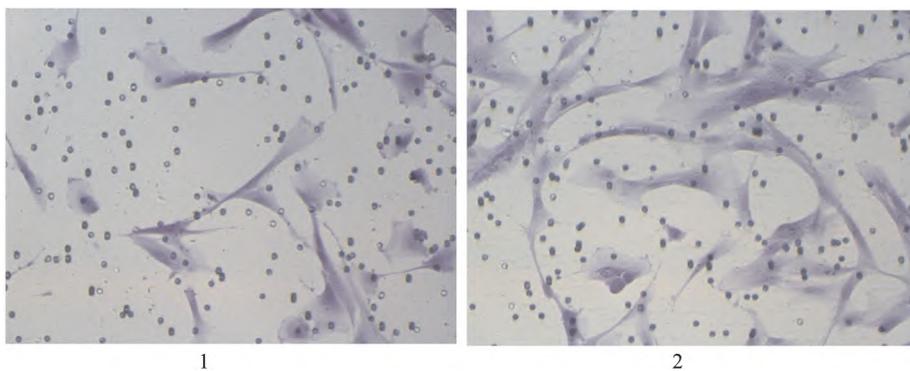


图 3 转染 ACE2 的 hAMSCs 的细胞迁移实验

1: hAMSCs; 2: ACE2-hAMSCs; 与 hAMSCs 组比较: * $P < 0.05$

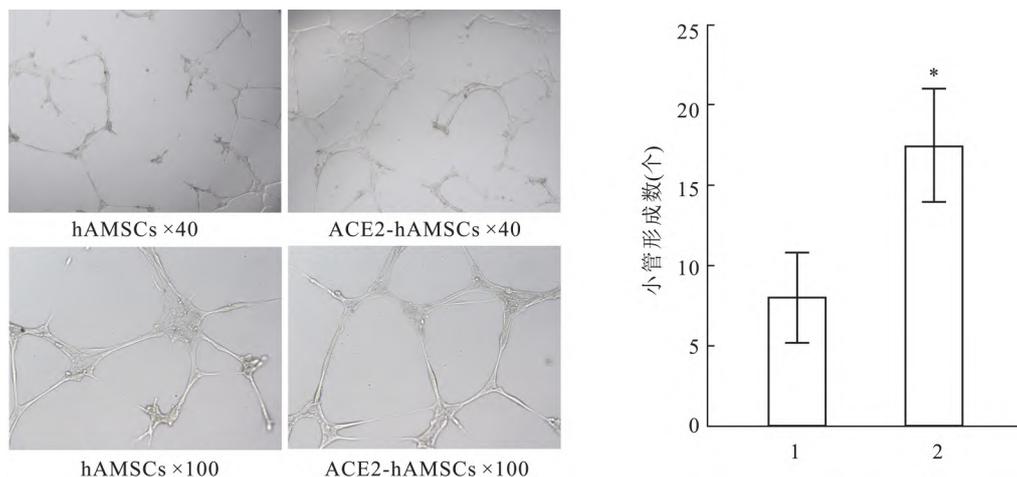


图4 ACE2-hAMSCs 的小管形成能力
1: hAMSCs; 2: ACE2-hAMSCs; 与 hAMSCs 组比较: * $P < 0.05$

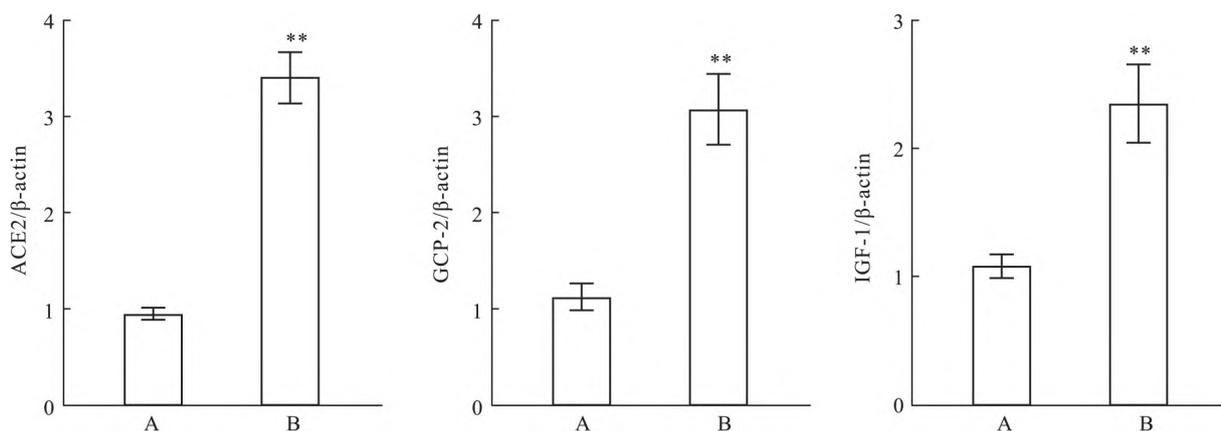


图5 ACE2-hAMSCs 中 ACE2、GCP-2 和 IGF-1 的基因表达
A: hAMSCs; B: ACE2-hAMSCs; 与 hAMSCs 组比较: ** $P < 0.01$

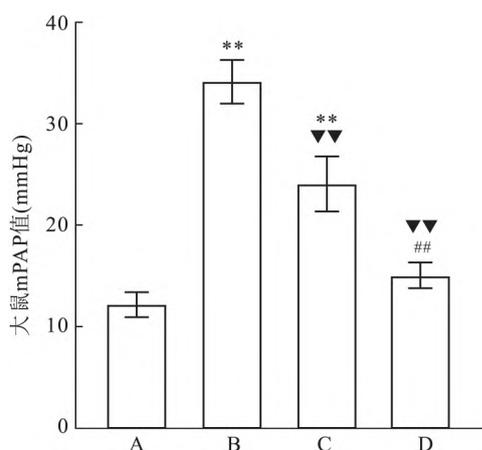


图6 各组大鼠平均肺动脉压力
A: Control 组; B: PAH 组; C: hAMSCs 治疗组; D: ACE2-hAMSCs 治疗组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 PAH 组比较: $P < 0.01$; 与 hAMSCs 治疗组比较: ## $P < 0.01$

与 Control 组比较, PAH 组的 $RV/(LV+S)$ 明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 PAH 组、hAMSCs 组比较, ACE2-hAMSCs 组的 $RV/(LV+S)$ 明显下降, 见图 7。

2.7 大鼠肺组织标本 HE 染色镜下观察情况 肺组织标本的 HE 染色: 在光学显微镜下 ($\times 200$) 显示, PAH 组与 Control 组相比较, 炎症细胞浸润明显, 肺小动脉壁明显增厚, 管腔明显狭窄。ACE2-hAMSCs 组与 PAH 组和 hAMSCs 组相比, 炎症细胞浸润明显减少, 肺小动脉管壁厚度减轻, 管腔增大, 见图 8。

2.8 Q-PCR 检测各组大鼠肺组织中 ACE2、GCP-2、 α -actin、Ang II mRNA 的表达水平 QPCR 检测各组大鼠肺组织中的 GCP-2、ACE2、 α -actin、Ang II mRNA 的表达量, 结果显示与 Control 组相比, PAH 组的 ACE2、GCP-2 mRNA 明显降低, α -actin、Ang II

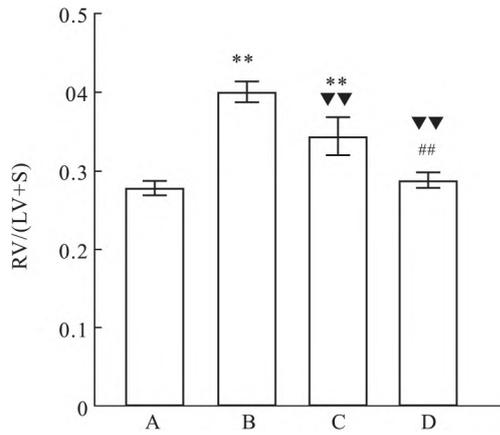


图7 各组大鼠右心室肥厚指数

A: Control 组; B: PAH 组; C: hAMSCs 治疗组; D: ACE2-hAMSCs 治疗组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 PAH 组比较: $P < 0.01$; 与 hAMSCs 组治疗组比较: ## $P < 0.01$

明显升高 ($P < 0.01$)。与 PAH 组相比, ACE2-hAMSCs 治疗组的 ACE2、GCP2 mRNA 表达水平明显升

高 α -actin、Ang II 明显降低 ($P < 0.01$), 见图 9。

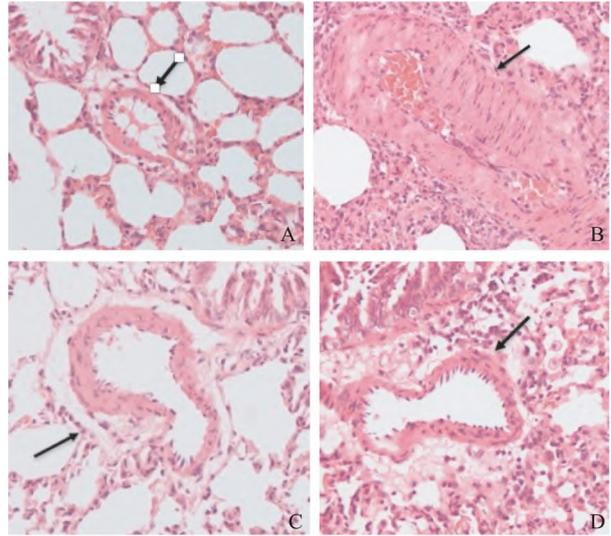


图8 大鼠肺组织 HE 染色 $\times 200$

A: Control 组; B: PAH 组; C: hAMSCs 治疗组; D: ACE2-hAMSCs 治疗组

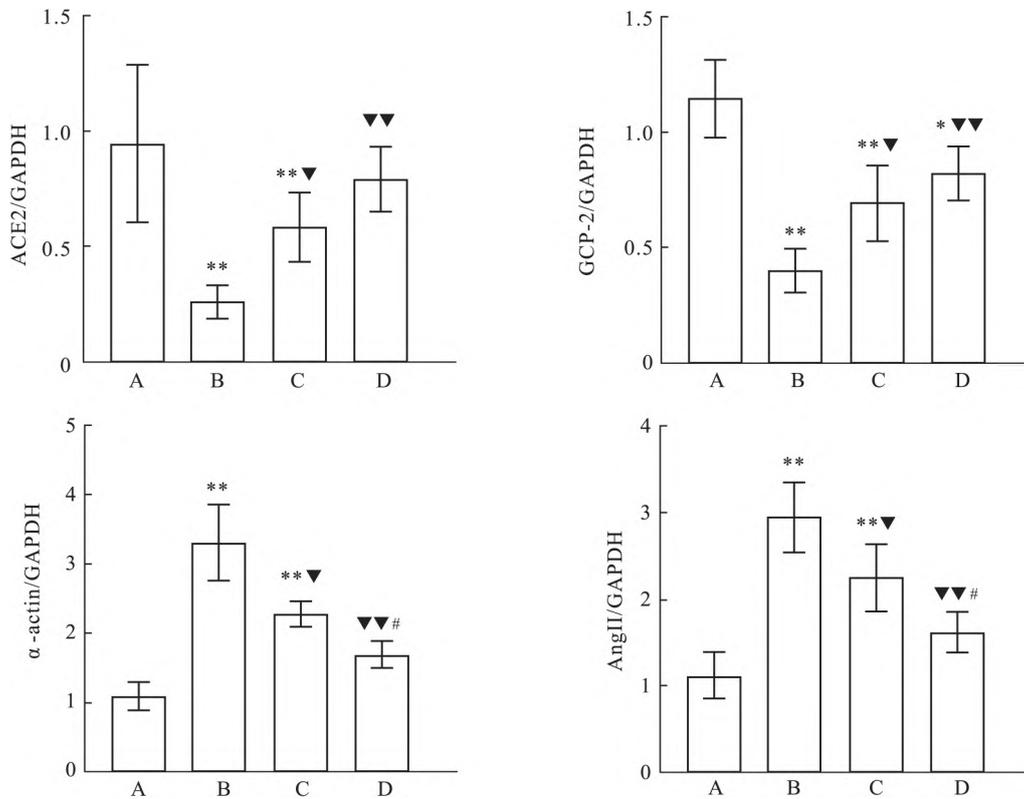


图9 QPCR 检测各组肺组织 ACE2、GCP-2、 α -actin、Ang II mRNA 的表达水平

A: Control 组; B: PAH 组; C: hAMSCs 治疗组; D: ACE2-hAMSCs 治疗组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 PAH 组比较: $P < 0.05$, $P < 0.01$; 与 hAMSCs 组治疗组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

目前 PAH 是不能根治的慢性血管性疾病之一,

PAH 的发病机制尚不明确。肺动脉内皮细胞损伤及功能紊乱可引起血管活性物质失衡、炎症细胞浸润、肺血管平滑肌细胞异常增生, 导致肺血管重构、

血管进行性异常收缩、血管阻力增加,继而出现不可逆转的右心衰竭^[6-7]。因此,治疗肺动脉高压的重要靶点可能是修复损伤的血管内皮细胞。

本研究发现,hAMSCs治疗组大鼠与PAH组比较,大鼠的mPAP、RV/LV+S均有明显下降,但仍高于ACE2-hAMSCs治疗组及Control组,表明羊膜间充质干细胞对肺动脉高压具有保护作用,这与既往研究报道一致,能够在一定程度上降低肺动脉高压大鼠模型的平均肺动脉压力、改善右心室重塑。这可能与MSCs分化充足的内皮细胞和其旁分泌作用有关,发挥着促进血管生成、免疫抑制等作用^[8],从而修复损伤的肺血管内皮。

研究^[9]发现,ACE2作为RAS中另一条保护性轴的关键酶,它可拮抗Ang II的促炎、促增殖、促血管收缩的作用。研究^[10]发现,激活ACE2可以抑制肺动脉高压的形成,其机制为调节抗炎与促炎细胞因子的平衡从而改善肺动脉内皮功能。

本次研究中ACE2-hAMSCs治疗组的mPAP、RV/LV+S均较PAH组和hAMSCs治疗组明显下降,此外,ACE2-hAMSCs治疗组大鼠肺组织中ACE2 mRNA表达水平明显增加,Ang II mRNA表达水平明显降低。上述结果证实了高表达ACE2基因的hAMSCs不仅能够有效降低肺动脉高压大鼠模型的平均肺动脉压,还能够有效改善右心室重构,以及调节了RAS朝着ACE2-Ang1-7-Mas轴方向移动,且表现出了其治疗作用优于hAMSCs治疗组。

本研究中,转染ACE2的hAMSCs中,表现出ACE2稳定的高表达水平,高表达的ACE2可能更有效的拮抗ACE的作用,不仅催化Ang I、Ang II生成Ang1-9、Ang1-7,同时也减少体内的Ang II生成,从而上调ACE2-Ang1-7-Mas轴,下调ACE-Ang II-AT1轴,更好的发挥了舒张血管、抑制炎症反应、逆转血管重塑等作用,从而有效的改善了肺动脉高压。

已有研究证实MSC分泌的血管内皮生长因子、粒细胞趋化蛋白-2、碱性成纤维细胞生长因子-2、血管生成素等因子发挥着促进血管生成、抗凋亡和免疫炎症调节的作用,从而阻止血管性疾病发生发展^[11]。本次体外研究发现,ACE2-hAMSCs治疗组中促血管生成因子胰岛素样生长因子-1、GCP-2表达水平较hAMSCs治疗组明显增加,且ACE2-hAMSCs治疗组的细胞迁移能力和小管形成能力较hAMSCs治疗组增强,可能与转染ACE2促进了hAMSCs的旁分泌作用,上调了促血管生成因子的表达水平,更好的发挥了促进血管生成、保护血管内

皮的作用,有利于修复受损的血管内皮细胞,从而更有效的改善了肺动脉高压。

研究^[12]表明,PAH患者中的转化生长因子通过激活了p38/MAP激酶途径而表达增加,引起 α -actin的表达量增加,导致肺血管平滑肌收缩,从而促进肺动脉高压的发生发展。本研究中与既往研究一致,在PAH患者中 α -actin明显上调,通过ACE2-hAMSCs治疗后,下调了 α -actin,发挥舒张血管、恢复血管内皮功能的作用,从而改善肺动脉高压。

本研究中结果提示高表达ACE2基因的hAMSCs能有效改善PAH大鼠模型的预后,但其具体作用机制、信号通路有待进一步的研究完善。

参考文献

- [1] Chen Z W, Chen C W, Wu C K, et al. Balloon pulmonary angioplasty in chronic pulmonary thromboembolic pulmonary hypertension[J]. Acta Cardiol Sin 2019, 35(2): 183-7.
- [2] 畅雪,孙娜,吴炳祥. 肺血管阻力在评估肺动脉高压患者病情中的应用价值[J]. 中华心血管病杂志, 2021, 49(1): 96-101.
- [3] Shenoy V, Ferreira A J, Katovich M, et al. Chapter 38-angiotensin converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis: emerging pharmacological target for pulmonary diseases[J]. The Protective Arm of the ReninAngiotensinSystem(RAS), 2015: 269-74.
- [4] Morrell N W, Stenmark K R. The renin-angiotensin system in pulmonary hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(10): 1138-9.
- [5] Kim S W, Zhang H Z, Guo L, Kim J M, Kim M H. Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities[J]. PLoS One 2012, 7(7): e41105.
- [6] Dummer A, Rol N, Szulceek R, et al. Endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: loss of cilia length regulation upon cytokine stimulation[J]. Pulm Circ, 2018, 8(2): 2045894018764629.
- [7] Saito T, Miyagawa K, Chen S Y, et al. Upregulation of human endogenous retrovirus-k is linked to immunity and inflammation in pulmonary arterial hypertension[J]. Circulation 2017, 136(20): 1920-35.
- [8] Kin K, Yasuhara T, Date I. Encapsulation of mesenchymal stem cells: dissecting the underlying mechanism of mesenchymal stem cell transplantation therapy[J]. Neurosci Insights, 2020, 15: 263310552095906.
- [9] Fatima N, Patel S N, Hussain T. Angiotensin II type 2 receptor: a target for protection against hypertension, metabolic dysfunction, and organ remodeling[J]. Hypertension, 2021, 77(6): 1845-56.
- [10] 蒲明玉,郑泽琪. ACE2对野百合碱诱导大鼠肺动脉高压的影响研究[J]. 中国循环杂志, 2014, 7(3): 149-50.

- [11] Hoch A I , Binder B Y , Genetos D C , Leach J K. Differentiation-dependent secretion of proangiogenic factors by mesenchymal stem cells [J]. *PLoS One* 2012 7(4) : e35579.
- [12] Ferrario C M , Strawn W B. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease [J]. *Am J Cardiol* 2006 ,198(1) : 121 –8.

Interventional effect of amniotic mesenchymal stem cells with high expression of angiotensin – converting enzyme 2 on pulmonary hypertension rats

Wu Changfang , Zhang Hongzhe , Zha Jie , Gao Zhen

(*Clinic Medical College , Guizhou Medical University , Guiyang 550000*)

Abstract Objective To observe the interventional effects of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) transfected with angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) gene on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension (PAH) in rats. **Methods** ① HAMSCs were transfected with lentivirus carrying ACE2 gene , and the expression of ACE2 , insulin-like growth factor (IGF-1) , granulocyte chemoattractant protein-2 (GCP-2) gene , cell migration and tube formation ability was detected before and after transfection. ② Male , healthy , 6-week-old SD rats were randomly divided into normal Control group (Control group) , pulmonary hypertension group (PAH group) , human amniotic mesenchymal stem cell treatment group (hAMSCs group) and ACE2-transfected human amniotic mesenchymal stem cell treatment group (ACE2-hAMSCs group) . The mean pulmonary arterial pressure (mPAP) and right ventricular hypertrophy index (RVHI) were measured 2 weeks after the model was established. The lumen size of pulmonary arterioles and the thickness of vessel wall were observed by HE staining. The mRNA expression levels of GCP-2 , ACE2 , α -actin and angiotensin II (Ang II) in lung tissue were determined by QPCR. **Results** *In vitro* cell experiments showed that the cell migration ability and tube formation ability of ACE2-hamsocs were higher than those of pure hAMSCs ($P < 0.05$) . Ace2-hamsocs up-regulated the mRNA expressions of ACE2 and pro-angiogenic factors IGF-1 and GCP-2 ($P < 0.01$) . After 2 weeks of intervention , the mPAP and cardiac RV/LV + S of the PAH group significantly increased compared with the normal control group ($P < 0.01$) , and the mPAP and cardiac RV/LV + S of the ACE2-hAMSCs group significantly decreased compared with the PAH and hAMSCs groups ($P < 0.01$) . Compared with PAH group , the mRNA expression level of ACE2 significantly increased in the lung tissue of ACE2-hamsocs group. **Conclusion** ACE2-hAMSCs can significantly reduce the mean pulmonary arterial pressure of monocrotaline (MCT) -induced PAH rat model , and significantly improve pulmonary vascular and right ventricular remodeling. The therapeutic effect of ACE2-hamsocs is significant in hAMSCs group. It is considered that ACE2-hAMSCs may not only promote the paracrine effect of hAMSCs , The expression of pro-vascular growth factors GCP2 and IGF-1 can repair the injured pulmonary vascular endothelial cells and reduce the high pressure of pulmonary artery. Moreover , the high expression of ACE2 in hAMSCs is related to the regulation of RAS.

Key words angiotensin converting enzyme 2; amniotic mesenchymal stem cells; pulmonary arterial hypertension