

网络出版时间: 2018-4-27 9:39 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180426.1411.010.html>

## 人重组血管紧张素转化酶 2 对血管紧张素 II 诱导的人肾小球系膜细胞增殖凋亡的影响

张红利 张晓翠 李秀 赵其星 邓芳

**摘要** 目的 研究人重组血管紧张素转化酶 2( rhACE2) 对血管紧张素 II ( AngII) 诱导的人肾小球系膜细胞( HRMC) 增殖凋亡的影响。方法 体外培养 HRMC 随机分为对照组、rhACE2 组、AngII 组、AngII + rhACE2 组。MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞周期及凋亡率。结果 与对照组比较, AngII 组系膜细胞活力、S 期细胞比例明显增高( $P < 0.05$ ) ; 凋亡率减少( $P < 0.05$ ) 。与 AngII 组比较, AngII + rhACE2 组细胞活力、S 期细胞比例减少( $P < 0.05$ ) ; 凋亡率增加( $P < 0.05$ ) 。单用 rhACE2 对 HRMC 无明显影响。结论 AngII 诱导 HRMC 增殖, rhACE2 能抑制 AngII 诱导的系膜细胞增殖并促进细胞凋亡。

**关键词** 肾小球系膜细胞; 血管紧张素转化酶 2; 血管紧张素 II; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 726.9; R 345

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)05-0707-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.05.010

过敏性紫癜性肾炎( Henoch-Schonlein purpura nephritis ,HSPN) 是过敏性紫癜( Henoch-Schonlein purpura ,HSP) 严重的并发症。肾小球系膜细胞是肾小球内重要的固有细胞, 在 HSPN 的发生发展中起着关键性的作用。血管紧张素 II ( angiotensinII , AngII) 可致肾小球系膜细胞损伤和诱导其凋亡。近来研究<sup>[1-3]</sup> 显示血管紧张素转换酶 2( angiotensin converting enzyme2 , ACE2) 是具有多种生物学活性的肾素 - 血管紧张素系统( renin-angiotensin system , RAS) 新成员, 在血管减压、心血管、肾脏等疾病中发挥着保护作用, 可以拮抗 AngII, 但 ACE2 能否拮抗 AngII 所诱导的系膜细胞增殖目前尚不清楚。该实验通过体外培养人肾小球系膜细胞( human renal mesangial cells ,HRMC) , 研究重组人血管紧张素转换酶 2( recombinant human angiotensin converting en-

zyme 2 ,rhACE2) 对 AngII 诱导的 HRMC 增殖凋亡的影响, 探究其对 HSPN 是否存在保护作用, 为临床 HSPN 疾病的防治提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞与试剂** HRMC( 广州吉妮欧生物技术有限公司); 低糖 DMEM 培养液( 美国 Hyclone 公司); 胎牛血清( 以色列 BI 公司); 0.25% 胰酶( 上海碧云天生物技术有限公司); rhACE2( 美国 R&D 公司); Ang II ( 英国 Tocris 公司); MTT 试剂( 美国 Sigma 公司); 周期试剂盒、凋亡试剂盒( 美国 BD 公司)。

**1.2 仪器与设备** HF90/HF240 细胞培养箱; 细胞超净工作台( 苏州净化设备有限公司); 多功能酶标仪( 美国 Thermo fisher scientific 公司); 流式细胞仪( 美国 BD 公司)。

**1.3 细胞培养** 体外培养的 HRMC 细胞生长至 80% 融合, 弃去旧的培养液, PBS 轻轻荡洗 2 次, 加入 1 ml 0.25% 胰酶消化, 37 °C 温育 1 min, 显微镜下见细胞圆缩、间隙增大时, 立即弃去消化液, 用 PBS 轻轻荡洗 1 次, 加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液, 反复吹打, 使之成为单个悬浮细胞, 分成 3 瓶, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养。

**1.4 细胞分组** 将 HRMC 随机分为 4 组: 对照组; AngII 组( $10^{-6}$  mol/L); rhACE2 组( $0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ); AngII + rhACE2 组: 在加入 AngII  $10^{-6}$  mol/L 的基础上, 分别加入不同浓度的 rhACE2( $0.001, 0.01, 0.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )。

**1.5 HRMC 细胞活力的测定** 采用 MTT 法检测 HRMC 的细胞活力。取对数生长期的 HRMC, 以  $5 \times 10^4$  个/ml 接种于 96 孔板中, 如上分组, 置细胞培养箱过夜。次日加药物刺激, 细胞培养箱中孵育 24 h 后, 加 MTT 溶液, 37 °C 孵育 4 h 后加入等体积二甲基亚砜( DMSO) 酶标仪 490 nm 下测定各孔的吸光度( optical density ,OD) 值。

**1.6 HRMC 细胞周期的测定** 取对数期生长的 HRMC, 以  $5 \times 10^4$  个/ml 接种于 12 孔板中, 如上分组, 置细胞培养箱过夜。次日加药物刺激, 细胞培养

2018-02-07 接收

基金项目: 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目( 编号: 17040804027)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院儿科, 合肥 230022

作者简介: 张红利, 女, 硕士研究生;

邓芳, 女, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: dengfang1997@126.com

箱培养 24 h 后, PBS 洗涤后收集细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 用 70% 的冰乙醇 4℃ 固定过夜; 400 μl PBS 重悬细胞, PBS 洗涤 2 次, 重悬细胞于 0.5 ml 的 PI/RNase staining Buffer, 室温避光孵育 15 min, 上流式细胞仪检测。

**1.7 HRMC 细胞凋亡率的测定** 取对数期生长的 HRMC, 以  $5 \times 10^4$  个/ml 接种于 12 孔板中, 如上分组, 置细胞培养箱过夜。次日加药物刺激, 细胞培养箱培养 24 h 后, PBS 洗涤后收集细胞, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 100 μl Binding Buffer 重悬 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 染色, 室温避光孵育 15 min, 上流式细胞仪检测。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件对不同组间均数进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 rhACE2 对 AngII 诱导的 HRMC 细胞活力的影响** 与对照组比较, 单用 rhACE2 时 OD 值变化不大; 与对照组比较, AngII 组 OD 值明显增加, HRMC 细胞活力增加, 差异有统计学意义 ( $F = 16.171, P < 0.05$ )。与 AngII 组比较, AngII + rhACE2 组 OD 值明显减小, 且随着 rhACE2 浓度增加 OD 值减小, 细胞活力减小; 其中 0.1 ng/μl rhACE2 抑制作用最显著, 差异有统计学意义 ( $F = 16.171, P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 rhACE2 对 AngII 诱导的 HRMC 细胞周期变化的影响** 与对照组比较, rhACE2 组 S 期细胞比例减少,  $G_0/G_1$  期增多, 但是变化不明显, 差异无统计学意义。与对照组比较, AngII 组 S 期细胞比例明显增多, 差异有统计学意义 ( $F = 10.816, P < 0.05$ );

表 1 MTT 检测 rhACE2 对 AngII 诱导的系膜

细胞增殖的影响 ( $n = 3 \bar{x} \pm s$ )

组别	rhACE2 浓度 (ng/μl)	OD 值
对照	-	$0.90 \pm 0.08$
rhACE2	-	$0.88 \pm 0.01$
AngII	-	$1.27 \pm 0.09^*$
AngII + rhACE2	0.001	$1.15 \pm 0.10$
AngII + rhACE2	0.01	$1.04 \pm 0.10^{\#}$
AngII + rhACE2	0.1	$0.91 \pm 0.01^{\#}$

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 AngII 组比较: #  $P < 0.05$

$G_0/G_1$  期减少, 差异有统计学意义 ( $F = 4.822, P < 0.05$ ), AngII 可促进细胞由  $G_1$  期进入 S 期。与 AngII 组比较, AngII + rhACE2 组 S 期细胞比例减少,  $G_0/G_1$  期增多, 且呈剂量依赖性变化。当 rhACE2 浓度为 0.1 ng/μl 时, S 期细胞比例明显减少, 差异有统计学意义 ( $F = 10.816, P < 0.05$ ), rhACE2 抑制细胞由  $G_1$  期进入 S 期, 抑制细胞周期的进展。见表 2。

**2.3 rhACE2 对 AngII 诱导的 HRMC 细胞凋亡的影响** 与对照组比较, AngII 组细胞凋亡率减小, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 AngII 组比较, AngII + rhACE2 组细胞凋亡率增加, rhACE2 抑制了 AngII 对系膜细胞的作用, 使增生系膜细胞的凋亡率增加, 差异有统计学意义 ( $F = 26.415, P < 0.05$ )。见表 3、图 1。

## 3 讨论

HSP 是一种比较常见的微血管变态反应性出血性疾病<sup>[4]</sup>, 主要特征为全身性广泛的小血管炎, 尤其是皮肤和肾脏的小血管, 主要表现为皮肤紫癜、关节痛、胃肠出血和血尿<sup>[5]</sup>。HSPN 是 HSP 的严重并发症, 占 HSP 患者的 30%~50%<sup>[6]</sup>。90% 的患儿在

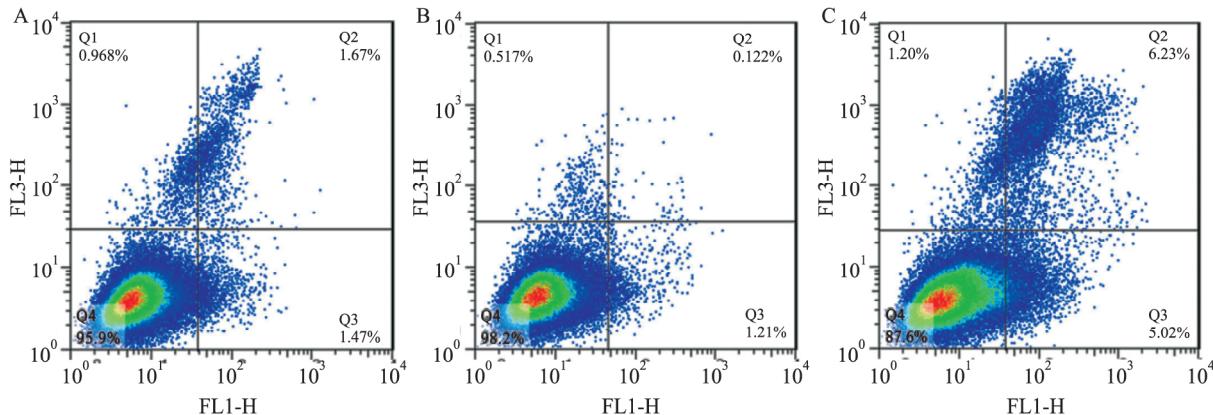


图 1 rhACE2 对 AngII 诱导系膜细胞凋亡的影响 ( $n = 3 \bar{x} \pm s$ )

A: 对照组; B: AngII 组; C: AngII + rhACE2 组

表2 rhACE2 对 AngII 诱导的肾小球系膜细胞周期变化的影响( $n=3 \bar{x} \pm s$ )

组别	rhACE2 浓度(ng/μl)	$G_0/G_1(\%)$	S(%)	$G_2/M(\%)$
对照	-	$51.65 \pm 3.68$	$38.22 \pm 2.77$	$10.13 \pm 6.42$
rhACE2	-	$50.94 \pm 1.02$	$36.90 \pm 0.58$	$12.16 \pm 1.32$
AngII	-	$42.24 \pm 1.51^*$	$46.57 \pm 1.69^*$	$11.20 \pm 3.11$
AngII + rhACE2	0.001	$45.07 \pm 2.81$	$43.37 \pm 0.63$	$11.56 \pm 2.59$
AngII + rhACE2	0.01	$46.40 \pm 3.63$	$43.10 \pm 2.74$	$10.50 \pm 3.67$
AngII + rhACE2	0.1	$48.38 \pm 3.22$	$40.49 \pm 1.66^{\#}$	$11.13 \pm 3.62$

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 AngII 组比较: #  $P < 0.05$

表3 rhACE2 对 AngII 诱导系膜细胞凋亡的影响( $n=3 \bar{x} \pm s$ )

组别	rhACE2 浓度(ng/μl)	凋亡率(%)
对照	-	$4.15 \pm 1.15$
AngII	-	$1.77 \pm 0.71^*$
AngII + rhACE2	0.001	$5.15 \pm 1.30^{\#}$
AngII + rhACE2	0.01	$6.99 \pm 0.96^{\#}$
AngII + rhACE2	0.1	$10.06 \pm 1.03^{\#}$

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 AngII 组比较: #  $P < 0.05$

患 HSP 8 周后出现肾脏损伤。肾活检下肾小球病变呈多样性,以系膜增生常见,容易出现灶状节段性纤维素样坏死,白细胞增多,炎症浸入和间质纤维化,新月体形成,免疫荧光显微镜显示颗粒性免疫球蛋白 A 在系膜区沉积<sup>[7-8]</sup>。HSPN 的进展极大程度的影响了 HSP 的预后。

RAS 是生物体内调节血压、血流和内环境重要因素之一,在肾脏病发展过程中 RAS 也起着重要的作用。传统的经典理论认为 RAS 由肾素原、肾素、血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I)、血管紧张素转化酶( angiotensin converting enzyme, ACE)、Ang II、血管紧张素受体组成。Ang II 是整个 RAS 的中心环节,作用于 Ang II 1型受体,引起肾小球内高滤过损伤,导致肾小球超滤系数下降,刺激系膜细胞的增生和肥大,促进细胞外基质增加,可影响肾病的进展和预后。而与其在功能上相拮抗的 ACE2-Ang(1-7)-Mas 轴的发现,使人们认识到 RAS 的调节机制是动态平衡的。新近研究<sup>[9]</sup>显示 AngI 及 AngII 均可被 ACE2 水解去除羧基端一个氨基酸残基,分别生成 Ang (1-9) 及具有血管舒张作用的 Ang(1-7)。Ang(1-7) 与 G 蛋白偶联受体 Mas 结合发挥舒张血管、抗增殖、抗纤维化等生物效应。ACE2 作为该轴中的关键酶,其在肾脏疾病治疗方面的潜在应用价值。

本研究显示 AngII 作用于 HRMC 促使细胞活力增强,促进细胞由  $G_0/G_1$  期进入 S 期,这与之前研究<sup>[10]</sup>的 AngII 促使系膜细胞增殖是一致的。HSPN 累及到肾脏,肾小球系膜细胞增殖,系膜区扩张,细胞外基质沉积。正常组织中,细胞增殖与凋亡处于

一个动态平衡,贯穿于整个生命的始终。细胞增殖增加和(或)凋亡减少都会打破这个动态平衡,导致机体的异常状态。细胞凋亡是在生理或病理刺激下,机体为维护内环境稳定由基因控制的细胞主动死亡的过程。因此有效地抑制系膜细胞异常增殖,促进增殖的系膜细胞凋亡,成为防治 HSP、延缓 HSPN 进展的重要环节。本研究显示在应用 AngII 的基础上加入 rhACE2,使 AngII 诱导的系膜细胞增殖作用减弱并成剂量依赖性增强。本研究还显示 rhACE2 能抑制细胞由  $G_0/G_1$  期进入 S 期,且促进增殖的系膜细胞凋亡。细胞增殖减少、凋亡增加,从而细胞数目减少,这也与本研究中细胞活力减小实验一致。以往研究<sup>[11]</sup>表明,Ang(1-7) 可抑制 AngII 所诱导的系膜细胞增殖。据此推测 rhACE2 对 AngII 诱导的系膜细胞增殖的抑制作用也许与 rhACE2 水解 AngII,使 AngII 含量减少,并且生成的 Ang(1-7) 能抑制系膜细胞增殖促进其凋亡有关。

在糖尿病大鼠肾脏中肾小管 ACE2 表达下降<sup>[12]</sup>。既往研究<sup>[13]</sup>指出,rhACE2 延缓糖尿病肾病的进展。糖尿病肾病主要累及肾小球,导致肾小球硬化,主要表现为肾小球系膜增生。同样地,HSPN 患者体内 AngII 增多,同时有系膜增生伴不同程度的多种细胞增殖、小灶性坏死、渗出,肾小球玻璃样变,基质增厚,肾小球滤过率下降,最终可有局灶性阶段性瘢痕形成而导致硬化,导致肾脏疾病进一步发展恶化。而本研究结果 rhACE2 可抑制 AngII 诱导的系膜细胞增殖,促使增生的系膜细胞凋亡,防止肾脏损伤及病情的进一步进展,推测增加 ACE2 水平或许可以延缓 HSPN 的发展。以上结果都指出 rhACE2 抑制 AngII 诱导的系膜细胞增殖并促进凋亡,关于 ACE2 能否应用于机体组织,发挥抑制系膜细胞增殖作用,抑制 AngII 所致的组织器官损伤,缓解肾脏组织重构等发展,这将关系到 HSPN 治疗的一个新的方向,关于这方面有待于进一步的研究。

## 参考文献

- [1] Santos R A, Simoes e Silva A C, Maric C, et al. Angiotensin-(1-

- 7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas [J]. Proc Natl Acad Sci U S A ,2003 ,100( 14) :8258 – 63.
- [2] Bader M , Alenina N , Andrade-Navarro M A , et al. MAS and its related G protein-coupled receptors ,Mrgprs[J]. Pharmacol Rev ,2014 ,66( 4) :1080 – 105.
- [3] Ferrario C M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1–7) : an evolving story in cardiovascular regulation[J]. Hypertension 2006 ,47( 3) :515 – 21.
- [4] Saulsbury F T. Henoch Schonlein purpura [J]. Curr Opin Rheumatol 2001 ,13( 1) :35.
- [5] Sinclair P. Henoch-Schonlein purpura a review: review article [J]. Curr Allergy Clin Im 2010 ,23( 3) :116 – 20.
- [6] Narchi H. Risk of long term renal impairment and duration of follow up recommended for Henoch-Schonlein purpura with normal or minimal urinary findings: a systematic review[J]. Arch Dis Child ,2005 ,90( 9) :916 – 20.
- [7] Fervenza F C. Henoch-Schonlein purpura nephritis[J]. Int J Dermatol 2003 ,42( 3) :170 – 7.
- [8] Davin J C , Weening J. Henoch Schonlein purpura nephritis: an update[J]. Eur J Pediatr ,2001 ,160( 12) :689 – 95.
- [9] Vickers C , Hales P , Kaushik V , et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin converting enzyme related carboxypeptidase [J]. J Biol Chem 2002 ,277( 17) :14838 – 43.
- [10] Wolf G Ziyadeh F N. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy[J]. Kindey Int ,1999 ,56( 2) :393.
- [11] Zhang J , Noble N A , Border W A , et al. Infusion of angiotensin-(1–7) reduces glomerulosclerosis through counteracting angiotensin II in experimental glomerulonephritis [J]. Am J Physiol Renal Physiol 2010 ,298( 3) :F579 – 88.
- [12] Tikellis C , Johnston C I , Forbes J M , et al. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy [J]. Hypertension 2003 ,41 ( 3) :392 – 7.
- [13] Oudit G Y Liu G C Zhong J et al. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy [J]. Diabetes ,2010 ,59( 2) :529 – 38.

## Inhibitory effects of recombinant human angiotensin converting enzyme 2 on the proliferation and apoptosis of human renal mesangial cells induced by angiotensin II

Zhang Hongli ,Zhang Xiaocui ,Li Xiu , et al

( Dept of Pediatrics ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the inhibitory effect of recombinant human angiotensin converting enzyme 2 on the proliferation and apoptosis of human renal mesangial cells induced by angiotensin II . **Methods** Cultured human renal mesangial cells were randomly divided into 4 groups: control , rhACE2 ,AngII , AngII + rhACE2. The cell vitality was measured by MTT. The cell cycle and apoptosis were determined by flow cytometry. **Results** Compared with the control group ,the cell viabilities and rate of S phase were significantly increased( $P < 0.05$ ) , and the cell apoptosis percentage was decreased( $P < 0.05$ ) in AngII group. In AngII + rhACE2 group ,the cell viabilities and rate of S phase cells were lower than AngII group ( $P < 0.05$ ) ,while the apoptosis percentage was higher than AngII group ( $P < 0.05$ ) . And rhACE2 alone had no effect on HRMC. **Conclusion** Ang II induces HRMC proliferation and rhACE2 inhibites AngII-induced proliferation and promotes cell apoptosis.

**Key words** renal mesangial cells; angiotensin converting enzyme 2; angiotensin II ; proliferation; apoptosis