

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-Schönlein purpura nephritis, HSPN) 是过敏性紫癜 (Henoch-Schönlein 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 (angiotensin II, 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 enzyme 2, 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);AngII (英国 Torics 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 ng/μl); 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 ng/μl)。

**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 °C 固定过夜; 400  $\mu$ l 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  $\mu$ l Binding Buffer 重悬, 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l 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/ $\mu$ l 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/ $\mu$ l)	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/ $\mu$ l 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

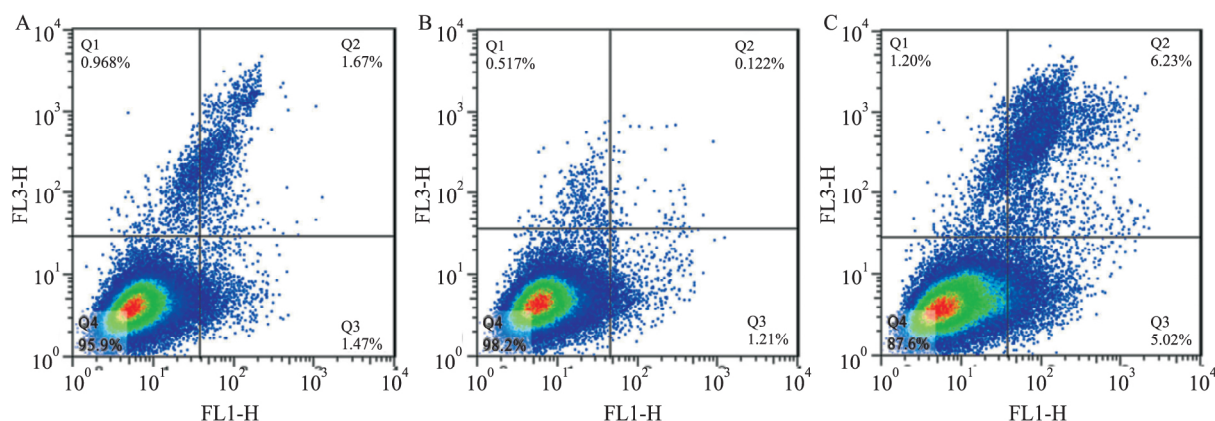


图 1 rhACE2 对 AngII 诱导系膜细胞凋亡的影响( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

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/ $\mu$ l)	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> ( % )	S( % )	G <sub>2</sub> /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 <sup>#</sup>	11.13 $\pm$ 3.62

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

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/ $\mu$ l)	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 <sup>#</sup>
AngII + rhACE2	0.01	6.99 $\pm$ 0.96 <sup>#</sup>
AngII + rhACE2	0.1	10.06 $\pm$ 1.03 <sup>#</sup>

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

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<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 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,贯穿于整个生命体的始终。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<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 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 所致使的组织器官损伤,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]. *Kidney 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