

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01517

外源性血管紧张素Ⅱ在体灌注对大鼠肺泡屏障的损伤作用及机制

Exogenous angiotensin Ⅱ lavage-induced alveolar barrier injury in rats and the related mechanism

庄甲举^{1*}, 邓淑凤¹, 张维立², 王志玲¹, 姜虹¹, 刘会敏¹

1. 白求恩军医学院生理学教研室, 石家庄 050081

2. 解放军 66481 部队医院医疗所, 天津 301700

[摘要] **目的:**观察外源性血管紧张素(Ang)Ⅱ灌注大鼠气道对肺上皮屏障的损伤作用,并探讨其可能的损伤机制。**方法:**Wistar大鼠随机分为5组:PBS对照组、Ang 6、20 h组、Ang+zVAD-fmk组、Ang+氯沙坦组($n=10$),各组大鼠分别经气管灌注 PBS、Ang($10 \mu\text{mol/L}$)磷酸盐缓冲溶液、Ang($10 \mu\text{mol/L}$)+zVAD-fmk($60 \mu\text{mol/L}$)、Ang+氯沙坦(losartan, $100 \mu\text{mol/L}$),另设 10 只大鼠不作任何处理作为空白对照组。大鼠经气管灌入相应溶液后在体灌洗动物肺脏,测定灌洗液中的血红蛋白(Hb)和灌洗肺前由静脉注入的荧光物质(BODIPY)标记的白蛋白含量,判断肺损伤;取肺组织标本进行病理学观察;采用末端脱氧核苷酸转移酶标记法(TUNEL)和抗 caspase 3 免疫标记方法检测肺泡上皮细胞凋亡。**结果:**灌注 Ang 6 h 后,支气管和肺泡上皮细胞内标定的断裂 DNA 片段($P<0.05$)和活性 caspase 3 ($P<0.01$)显著增加,但单纯灌注磷酸盐缓冲溶液没有作用;同时灌注 caspase 抑制剂 zVAD-fmk 或 Ang 受体 1 阻断剂氯沙坦均阻断 Ang 对 DNA 和 caspase 3 的作用。灌注 Ang 6 h 后,肺泡灌洗液中荧光标定的白蛋白含量($P<0.01$)和 Hb 含量($P<0.05$)亦显著增加;zVAD-fmk 或氯沙坦亦阻断支气管肺泡灌洗液中荧光白蛋白含量和 Hb 含量的变化。**结论:**在体大鼠呼吸道内灌注外源性 Ang 可介导肺泡上皮细胞凋亡;Ang 诱导的在体肺泡上皮细胞凋亡可能与 Ang 受体 1 亚型介导的激活 caspase 3 信号转导通路有关。

[关键词] 血管紧张素Ⅱ;细胞凋亡;肺损伤;肺泡上皮细胞**[中图分类号]** R 563 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1517-04

肺泡上皮细胞凋亡是急性肺损伤和肺水肿形成的重要原因之一^[1]。Uhal 等^[2]认为,正常肺泡上皮屏障较其毛细血管内皮屏障紧密,除非肺泡上皮屏障被破坏,否则单纯肺毛细血管通透性增加不会导致间质性肺水肿。血管紧张素(Angiotensin, Ang)Ⅱ能以剂量依赖的方式诱导体外培养的肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡,此作用能被选择性的 Ang 受体 1 阻断剂——氯沙坦(losartan, Los)抑制^[3];Ang 在 Fas 诱导的肺泡上皮细胞损伤中也发挥重要作用^[4-5];其在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)肺损伤中亦起重要作用^[6-7]。上述研究均为离体状态下 Ang 对肺泡上皮细胞行为学的影响结果,目前缺乏深入的在体研究结果。Gil 等^[8]的动物实验发现,静脉输入 Ang 可导致家兔严重的肺水肿,但无法用血流动力学的变化解释。结果提示,在体状态下 Ang 对肺泡上皮细胞可能也有一定的损伤作用。为此,本研究进一步观察在体状态下,Ang 对肺泡上皮屏障的确切影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 纯化 AngⅡ购自 Sigma 公司, caspase 抑制剂——z-Val-Ala-DL-Asp (OMe)-fluoromethylketone (zVAD-fmk)购自 Kamiya 生物医学公司,氯沙坦购自 Merck 公司,氟硼荧(BODIPY)标记的小牛血清白蛋白购自 Molecular

Probes 公司, caspase 3 抗体、DNA 片段测定试剂盒(apoTACS kits)均购自 R&D 公司。

1.2 动物及分组 成年雄性 Wistar 大鼠购自河北医科大学实验动物中心,体质量 175~200 g。Wistar 大鼠随机分为 5 组($n=10$):PBS 对照组、Ang 6 h 组、Ang 20 h 组、Ang+zVAD-fmk 组、Ang+氯沙坦组。按 Wang 等^[9]的方法,5 组大鼠分别经气管灌注 PBS、Ang($10 \mu\text{mol/L}$)磷酸盐缓冲溶液、Ang($10 \mu\text{mol/L}$)+zVAD-fmk($60 \mu\text{mol/L}$)、Ang+氯沙坦($100 \mu\text{mol/L}$);另设 10 只大鼠不作任何处理作为空白对照组。

1.3 急性肺损伤动物模型的建立及检测样本的获取 苯巴比妥腹腔麻醉,各组大鼠在呼气末经直径 1.5 mm 的弯气管套管插管分别灌注 300 μl 无菌 PBS 或含有不同试剂的 PBS 溶液,随后立即推注 3 ml 空气以使灌注的试剂弥散入远端气道。在进行支气管肺泡灌洗和动物处死之前 15 min,所有大鼠均接受静脉注射 400 μl 含 2×10^5 mFU 荧光小牛血清白蛋白(约 50 μg)的 PBS 溶液;以 6 ml 无菌 PBS 缓慢灌洗肺泡 2 次并收集灌洗液,为收集支气管肺泡灌洗液(BALF),在灌洗前 10 min 行气管插管。立即离心 BALF 收集细胞,制备细胞溶解液,做血红蛋白(Hb)光谱学测定。行 BODIPY 荧光分析前,上清液-20℃保存。空白对照大鼠不作任何处理。在灌洗后处死

[收稿日期] 2008-08-05 **[接受日期]** 2008-11-07**[作者简介]** 庄甲举,教授,硕士生导师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0311-87977093, E-mail: zhuangj-888@sohu.com

动物,取肺标本经气管套管注入 4%PBS 低聚甲醛溶液,并放在其中固定 2 h。用 PBS 溶液清洗固定好的肺组织 3 次,15 min 后石蜡包埋,用标准方法制作 5 μm 肺组织切片^[10]。

1.4 末端脱氧核苷酸转移酶标记(TUNEL)法检测细胞凋亡 60℃烘烤切片 30 min,常规脱蜡、水化。PBS 液洗涤 3 次,20 mg/L 蛋白酶 K 18~24℃下消化 20 min,PBS 液洗涤,以 TdT 酶和 B-dNTP 混合液覆盖 37℃湿室孵育 1 h,PBS 液洗涤 3 次,加抗-BrdU 抗体 37℃孵育 1 h,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗生物素抗体,37℃反应 10 min,PBS 洗涤,TACS 蓝色标定溶液显色 5 min,双蒸水洗涤,伊红复染,乙醇和二甲苯脱水,盖玻片封片,显微镜下观察。细胞核成蓝色为阳性反应细胞。在放大 400 倍条件下,每张切片最少随机选 6 个视野计算含 DNA 片段的阳性核数,对 TUNEL 进行量化分析。以每一视野阳性核数占同一视野中总核数的百分数表示。每组至少有 6 只大鼠肺组织标本通过此方法进行阳性核的量化分析。

1.5 免疫组织化学观察细胞 caspase 3 的表达 切片常规脱蜡后,3%BSA/PBS 覆盖 37℃45 min,抑制内源性氧化酶,PBS 晃动洗涤;加兔抗小鼠 caspase 3 单克隆抗体,37℃孵育 2 h,PBS 液洗涤;再用 AP 标记的羊抗兔 IgG 37℃ 45 min,PBS 液洗涤;NBT 溶液覆盖显色,室温 30 min,PBS 液冲洗;盖玻片封片,显微镜下观察,细胞核或胞质出现紫蓝色颗粒为阳性反应细胞。用 TUNEL 的量化分析方法对 caspase 3

的表达进行量化分析。

1.6 肺上皮屏障损伤的检测 通过分析从肺泡间隔血管流出的由微静脉注入的荧光白蛋白,判断肺泡上皮屏障的损伤。收集支气管肺泡灌洗液之后离心去除细胞,将其上清液冻干后再制成水悬液,在 Biotek FL600 荧光盘阅读器测定荧光 BODIPY。以 500 μl 纯水将离心后的支气管肺泡灌洗液中的细胞再制成细胞溶解水悬液,取 50 μl 样本测定血红蛋白光密度值。采用 RTBP2000 系统(Kent Scientific,Litchfield,CT),通过尾套法测量血压。

1.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Ang 诱导的细胞凋亡

2.1.1 TUNEL 标定的 DNA 损伤 TUNEL 测定断裂 DNA 揭示,与仅灌注 PBS 组相比(图 1A),绝大多数凋亡细胞位于肺泡壁内,特别是在近肺泡管处更为明显(图 1B);高倍镜下显示,许多标记细胞位于肺泡内表面的拐角处,其位置与肺泡 II 型细胞一致(图 1C)。在 TUNEL 阳性细胞集聚处的肺泡内往往有红细胞(图 1B、1C)。TUNEL 阳性细胞的量化分析结果(表 1)发现,气管内单纯灌注 PBS 没有诱导可见的凋亡发生,但灌注 Ang 6 h 后肺泡壁的细胞凋亡数增加 4.5 倍($P < 0.01$);灌注 Ang 后 20 h,TUNEL 阳性细胞恢复到对照组。

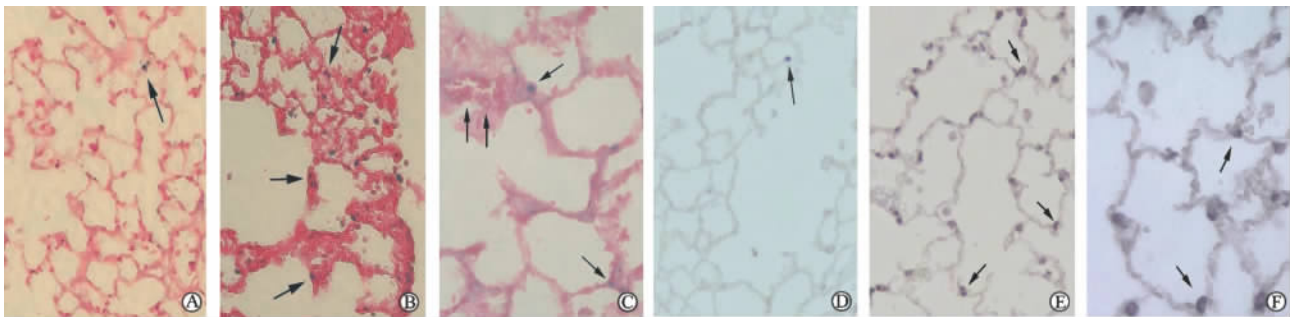


图 1 气管内灌注 Ang 后肺泡上皮细胞凋亡的原位检测

A-C:TUNEL(+)细胞(箭头所示);D-F:Caspase 3(+)细胞(箭头所示)。A,D:PBS 对照组;B,C,E,F:Ang 6 h 组。Original magnification:×100(A,D);×200(B,E);×400(C,F)

2.1.2 Caspase 3 的活性形式 未灌注 Ang 的对照组肺组织切片(图 1D)偶尔显示有 caspase 3 阳性细胞;气管内灌注 Ang 6 h 后,可见有显著数量的 caspase 3 阳性细胞($P < 0.01$,图 1E、1F)。与 TUNEL 阳性细胞一样,许多标记的阳性细胞位于肺泡壁表面的拐角处(图 1E、1F),与肺泡 II 型上皮细胞的位置一致。灌注 Ang 后 20 h,阳性细胞显著减少,但仍高于 PBS 对照组($P < 0.05$,表 1)。

2.2 Ang II 受体拮抗剂和 caspase 抑制剂对细胞凋亡的影响

在灌注 Ang 的同时加入 caspase 抑制剂 zVAD-fmk 或氯沙坦后 6 h,在体 TUNEL 阳性细胞和 caspase 3 阳性细胞数与 PBS 对照组和空白对照均无统计学差异(表 1)。

表 1 zVAD-fmk 或氯沙坦对 Ang 诱导的 TUNEL 和 caspase 3 的影响

组别	(n=10, $\bar{x} \pm s$, %)	
	TUNEL 阳性细胞	Caspase 3 阳性细胞
空白对照组	1.29 ± 0.29	6.32 ± 0.53
PBS	1.35 ± 0.21	3.41 ± 1.71
Ang 6 h	6.14 ± 0.72*	35.49 ± 4.28**
Ang 20 h	1.89 ± 0.35	15.80 ± 2.51*
Ang+zVAD-fmk	0.82 ± 0.14	8.33 ± 2.01
Ang+氯沙坦	1.49 ± 0.07	4.91 ± 1.14

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 与空白对照组比较

2.3 支气管肺泡灌洗液成分的变化

2.3.1 支气管肺泡灌洗液中荧光白蛋白的定量 如表 2 所示,与单纯灌注 PBS 比,灌注 Ang 6 h 显著增加动物肺泡灌洗液中可回收的荧光-白蛋白量($P < 0.01$)。进一步分析显示,在灌洗液中回收的荧光物质与蛋白结合而不是游离的 BODIPY。

2.3.2 支气管肺泡灌洗液中血红蛋白的含量 结果(表 2)显示,灌注 Ang 6 h 显著增加灌洗中的血红蛋白量($P < 0.05$),而灌洗 PBS 对血红蛋白含量没有影响。气管灌注 Ang 和 zVAD-fmk 后 1 h,对动物的动脉血压没有影响。

表 2 Ang 对肺泡灌洗液(BALF)成分的作用和 zVAD-fmk 或氯沙坦对 Ang 作用的影响

组别	BODIPY-albumin (mFU/ml)	Hb 含量 (unit BALF)
空白对照	805±34	0.06 ±0.015
PBS	1 011±36	0.113±0.073
Ang 6 h	3 560±978**	0.279±0.094*
Ang 20 h	1 121±154	0.121±0.065
Ang+zVAD-fmk	1 254±112	0.111±0.056
Ang+氯沙坦	1 873±142	0.138±0.053

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 与 PBS 组比较

2.4 Ang II 受体拮抗剂和 caspase 抑制剂对灌洗液成分的影响 灌注 Ang 6 h,灌洗液中回收的 BODIPY-白蛋白量的增加,同样被血管紧张素受体拮抗剂氯沙坦或 caspase 3 抑制剂 zVAD-fmk 所阻断(表 2)。zVAD-fmk 或氯沙坦亦抑制 Ang 诱导的灌洗血红蛋白的增加。

3 讨论

在正常肺组织中,由于血浆中 Ang 的半寿期相当短(约 30 s)和完整的肺泡毛细血管屏障^[11],血中的 Ang 可能与肺泡上皮细胞没有直接接触。Ang II 诱导离体肺泡上皮细胞凋亡的作用可能是分离的刺激所致。在体的肺泡上皮细胞可能会像原代培养的肺泡上皮细胞一样,表达 Ang 依赖的凋亡信号转导通路^[3]。气管内灌注 300 μl 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ang 后 6 h,TUNEL 标定和抗 caspase 3 免疫组织化学染色显示,大鼠肺组织切片 TUNEL 阳性细胞和含有活性形式 caspase 3 的细胞数量显著增加。以往研究^[12]证实,肺泡上皮细胞有 Ang 受体 1 和受体 2 两种主要受体亚型;Ang II 可诱导离体肺泡上皮细胞凋亡是由 Ang 受体 1 亚型介导,而不是受体 2 亚型^[4]。本研究发现选择性的 Ang 受体 1 拮抗剂,能与离体情况下一样阻断外源性 Ang 诱导的在体肺泡上皮细胞凋亡,提示 Ang 作用于直接朝向肺泡腔的上皮细胞的受体 1 亚型发生作用^[3]。气管灌注 Ang 6 h 可见的细胞凋亡到灌注后 20 h 便消失,提示经过这一段时间细胞通过增殖完成肺泡上皮的修复^[10]。这一发现也提示血管紧张素肽的生物半寿期很短。

大多数 TUNEL 标定的细胞和 caspase 3 阳性细胞位于肺泡壁内,尤其是靠近呼吸性细支气管和肺泡管部位更明显;高倍镜下显示,TUNEL 和 caspase 3 阳性细胞在肺泡腔

的内表面,许多位于肺泡的拐角处,与肺泡 II 型上皮细胞的位置吻合。TUNEL 阳性细胞局限的肺泡内,往往能见到局灶性出血(有红细胞)。结果表明,Ang 诱导细胞凋亡导致肺泡上皮屏障损坏出血^[2]。

灌注 Ang 后支气管肺泡灌洗液中 BODIPY-白蛋白量和血红蛋白量的显著增加,进一步说明外源性 Ang 诱导的细胞凋亡足以引起肺泡壁上皮细胞屏障的明显损伤,这种损伤至少是暂时的。Caspase 抑制剂或 Ang 受体 1 拮抗剂,均能阻断外源性 Ang 导致的肺泡灌洗液中成分的变化,证实了肺泡上皮细胞在维持正常肺泡壁的通透性所发挥的重要作用。本研究数据显示 Ang 诱导的肺泡上皮细胞凋亡与肺泡上皮屏障的破坏和局灶性出血相关联,且均能被抑制 Ang 诱导的凋亡所阻断,进一步证实肺泡上皮屏障是肺泡壁的真正屏障,在肺水肿的发生中起决定性作用^[2]。

综上所述,在体大鼠呼吸道内灌注外源性 Ang II 可介导肺泡上皮细胞凋亡,引起肺泡屏障损伤,导致血管内成分漏入肺泡腔隙;caspase 抑制剂 zVAD-fmk 和选择性 Ang 受体 1 阻断剂氯沙坦均能部分阻断血管内成分的漏出。结果提示肺泡上皮屏障的破坏与肺泡上皮细胞凋亡密切相关;Ang 诱导的在体肺泡上皮细胞凋亡可能是通过 Ang 受体 1 亚型介导的激活 caspase 3 信号转导通路发挥作用。

[参考文献]

- [1] Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling[J]. Cell Mol Immunol,2007,4:419-429.
- [2] Uhal B D. Fas and apoptosis in the alveolar epithelium: holes in the dike[J]? Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2001,281:L326-L327.
- [3] Papp M, Li X, Zhuang J, Wang R, Uhal B D. Angiotensin receptor subtype AT1 mediates alveolar epithelial cell apoptosis in response to ANG II [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002,282:L713-L718.
- [4] Wang R, Zagariya A, Ang E, Ibarra-Sunga O, Uhal B D. Fas-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires ANG II generation and receptor interaction[J]. Am J Physiol,1999,277(6 Pt 1):L1245-L1250.
- [5] Li X, Zhuang J, Rayford H, Zhang H, Shu R, Uhal B D. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by intratracheal administration of antisense oligonucleotides against angiotensinogen mRNA[J]. Curr Pharm Des, 2007,13:1257-1268.
- [6] Wenz M, Steinau R, Gerlach H, Lange M, Kaczmarczyk G. Inhaled nitric oxide does not change transpulmonary angiotensin II formation in patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Chest,1997,112:478-483.
- [7] Imai Y, Kuba K, Penninger J M. The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice [J]. Exp Physiol,2008,93:543-548.
- [8] Gil J, McNiff J M. Alveolar epithelial lesions induced by angiotensin in rabbit lungs[J]. Am J Pathol,1983,113: 331-340.
- [9] Wang R, Ibarra-Sunga O, Verlinski L, Pick R, Uhal B D. Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by a caspase inhibitor[J]. Am J Physiol Lung

- Cell Mol Physiol, 2000, 279: L143- L151.
- [10] Uhal B D. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium[J]. Am J Physiol, 1997, 272(6 Pt 1): L1031-L1045.
- [11] Filippatos G S, Gangopadhyay N, Lalude O, Parameswaran N, Said S I, Spielman W, et al. Regulation of apoptosis by vasoactive peptides[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281: L749-L761.
- [12] Wang R, Zagariya A, Ibarra-Sunga O, Gidea C, Ang E, Deshmukh S, et al. Angiotensin II induces apoptosis in human and rat alveolar epithelial cells[J]. Am J Physiol, 1999, 276(5 Pt 1): L885-L889.

[本文编辑] 贾泽军