

血管紧张素 II 对大鼠肾小球 内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响

潘茜¹, 杨向红², 刘春英¹, 王哲¹, 井欢¹, 王莹¹, 高原¹, 于丹¹

(1. 辽宁中医药大学病理教研室, 辽宁省沈阳市 110032; 2. 中国医科大学附属盛京医院, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 血管紧张素 II; 肾小球微血管内皮细胞; 单核细胞趋化蛋白 1; 血管紧张素 II 1 型受体

[摘要] **目的** 观察血管紧张素 II (Ang II) 对大鼠肾小球内皮细胞(GEC)单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)表达的影响,探讨其相关作用机制。**方法** 对大鼠 GEC 进行分离培养与鉴定;采用 Western blot 法检测大鼠 GEC 炎症因子 MCP-1 蛋白的表达;RT-PCR 和 Western blot 法检测血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)的 mRNA 和蛋白水平。**结果** 与正常对照组比较,施加 Ang II 刺激因素后 MCP-1 表达量明显增高,呈剂量(10^{-7} mol/L ~ 10^{-5} mol/L)依赖效应; 10^{-5} mol/L Ang II 作用下,大鼠 GEC 的 AT1R mRNA 和蛋白水平明显增加,成时间依赖效应; 10^{-6} mol/L AT1R 拮抗剂替米沙坦(TEL)可以抑制 Ang II (10^{-5} mol/L)的作用,MCP-1 的表达量下降。**结论** Ang II 通过上调大鼠 GEC 的 AT1R 水平,使大鼠 GEC 的 MCP-1 表达量增加。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Angiotension II on the Expression of MCP-1 in Rat Glomerular Endothelial Cells

PAN Qian¹, YANG Xiang-Hong², LIU Chun-Ying¹, WANG Zhe¹, JING Huan¹, WANG Ying¹, GAO Yuan¹, and YU Dan¹

(1. Pathology Department of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China; 2. Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China)

[KEY WORDS] Angiotension II; Glomerular Endothelial Cells; Monocyte Chemoattractant Protein-1; Angiotension II Type 1 Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of angiotension II (Ang II) on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat glomerular endothelial cells (GEC) and the related mechanism. **Methods** Primary GEC were isolated from Sprague-Dawley (SD) rats. The synthesis of MCP-1 in rat GEC was determined by Western blot method. RT-PCR method was used to detect the expression of angiotension II type 1 receptor (AT1R) mRNA. **Results** Ang II stimulation increased the synthesis of MCP-1 and promoted the expression of AT1R mRNA in rat GEC. Telmisartan (TEL), an AT1R blocker, blocked the effect of Ang II on rat GEC and decreased the expression of MCP-1. **Conclusion** Ang II induces MCP-1 production in rat GEC mediated by the AT1R.

肾内肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的局部激活是多种慢性肾脏病发生发展过程中的主要特点,血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 作为该系统的效应因子在机体血容量、血流动力学及内环境稳态的调节中发挥主导作用^[1-2]。已有研究表明肾内局部升高的 Ang II 水平

与高血压、糖尿病时肾脏病变的发生发展关系密切^[3]。研究发现 Ang II 不仅可以导致球内高压,同时还具有生长因子和炎症因子的作用,致使肾小球发生硬化病变^[4]。肾小球内皮细胞 (glomerular endothelial cells, GEC) 又称肾脏微血管内皮细胞,是肾小球滤过屏障的重要组成部分,是血液内的致病

[收稿日期] 2013-12-25

[基金项目] 辽宁省博士科研启动基金(20111132)

[作者简介] 潘茜,博士,讲师,主要从事心血管病变研究。杨向红,博士,教授,主要从事糖尿病微血管病研究。刘春英,博士,教授,主要从事肿瘤疾病研究。

因子以及血液动力学变化易损伤的靶细胞,受损激活后可分泌单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)等多种炎症因子^[5]。目前有关 Ang II 是否会诱导肾小球内皮细胞发生炎症反应方面的研究,尚未见报道。Ang II 的作用主要通过 AT1 和 AT2 两种类型受体介导,在成人肾脏组织中,AT1 受体分布广泛,而 AT2 受体分布很少^[6-7]。Ang II 在心血管系统中的作用主要通过 AT1 受体介导。本实验主要从炎症方面探讨 Ang II 对大鼠肾小球内皮细胞的作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 RGEN 分离培养与鉴定

SD 乳鼠(雌雄不限,购于中国医科大学实验动物部),体重 20 ~ 30 g [动物合格证:SCX K(辽)2003-0009]。无菌条件下取双肾,剥去被膜,眼科剪剪下肾皮质部分于培养皿中,将其剪碎后分别经由 80、100、200 目尼龙筛网滤过^[8],离心取沉淀,加入 0.125% 胰蛋白酶,水浴震荡 30 min。将消化好的肾血管球离心取沉淀,置于配制好的 10% 胎牛血清 DMEM 的培养液中(Invitrogen),接种于预先涂有 0.2% 明胶的培养瓶内,放入饱和湿度、37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。72 h 后首次换液,后隔日再换液。培养 5 ~ 7 日后,倒置相差显微镜下观察细胞爬满培养瓶底 80% 以上,胰酶消化传代,第 3 ~ 5 代细胞用于实验。细胞的鉴定采用免疫荧光法检测第 VIII 因子相关抗原:RGEN 培养 7 日后,倒置相差显微镜下观察细胞爬满培养瓶底 80% 以上,胰酶消化传代,种植 0.2% 明胶包被的玻片上,6 空培养板内培养 4 天后取出玻片。以 4% 多聚甲醛固定 30 min,加 0.2% Triton 1 滴,室温放置 20 min,在玻片上滴加 VIII 因子一抗(北京中杉),4℃ 过夜。吸除一抗, PBS 冲洗干净,加入 FITC 和罗丹明分别标记的二抗(北京中杉),37℃ 孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次,荧光显微镜下观察,照相。

1.2 Western blot 法检测 MCP-1 蛋白表达

待细胞在培养瓶中生长至 80% ~ 90% 融合时换用无血清的 DMEM 同步化 24 h,给予不同浓度 Ang II (10⁻⁷ mol/L ~ 10⁻⁵ mol/L, Sigma 公司)分别作用 6 h、12 h、24 h。应用 AT1R 拮抗剂替米沙坦(TEL, 10⁻⁶ mol/L, Merk 公司)药物时,先加入药物孵育 0.5 h 后,再加入 10⁻⁵ mol/L Ang II,对照组加无血清培养液培养。收集各组细胞,经 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,以 Lowry 法检测总蛋白浓度。

取待测蛋白,每孔上样 40 μg, 10% SDS-PAGE 进行电泳。电泳后,将蛋白转印到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入 MCP-1 一抗(1:200, Biolegend 公司)4℃ 孵育过夜, PBS 冲洗,加入辣根过氧化物酶标记的 II 抗(1:2000)37℃ 孵育 2 h, PBS 冲洗后加入化学发光剂进行曝光。用 LEICA-Q-550 IW 图像分析系统对所得区带的积分吸光度进行扫描分析。以 β-actin 作为对照,对比各组间蛋白表达的差异。

1.3 RT-PCR 法检测 AT1 受体 mRNA 水平

应用 Trizol 提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值,琼脂糖凝胶电泳证实所提 RNA 的完整性。引物序列及相应扩增条件见表 1。

RT-PCR 反应按照说明书进行操作,PCR 产物 5 μL 用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,采用凝胶成像分析系统进行半定量分析,紫外灯下观察结果并拍照。

表 1. 引物序列及相应扩增条件

Table 1. PCR primer sequences and amplification conditions

名称	引物序列(上游/下游)	T _m (°C)	引物长度 (bp)
大鼠 AT1	5'-ATCTCGCCTTGGCTGACTTA-3' 5'-GACTTCATTGGGTGGACGA-3'	58	200
大鼠 GAPDH	5'-GGTGTGCTGACTATGTCGTG-3' 5'-TTCAGCTCTGGGATGACC-3'	56	400

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 GEC 的培养与鉴定

倒置相差显微镜下观察 GEC 形态,原代分离培养肾小球内皮细胞单层贴壁生长,互不重叠,细胞呈多角形或短梭形,5 ~ 7 天时肾小球内皮细胞生长融合至 80% 左右,外观呈铺路石状,边界清楚;经第 VIII 因子相关抗原免疫荧光鉴定,大鼠 GEC 胞膜和胞浆处呈红色荧光(图 1),即表达较高密度的 VIII 因子相关抗原,胞核呈蓝色荧光(DAPI 染核),证实为肾小球内皮细胞。

2.2 Ang II 对大鼠肾小球内皮细胞 MCP-1 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,浓度效应组中,正常对照组 MCP-1 蛋白表达量较低, 10^{-7} mol/L ~ 10^{-5} mol/L 浓度 Ang II 刺激肾小球内皮细胞能显著

增加 MCP-1 表达,且随着 Ang II 作用浓度的增加 MCP-1 表达增加,呈剂量依赖效应;时间效应组中, 10^{-5} mol/L Ang II 作用 6 h 时 MCP-1 的表达量明显增加,12 h 达到顶峰,作用 24 h 时 MCP-1 的表达量下降(图 2)。

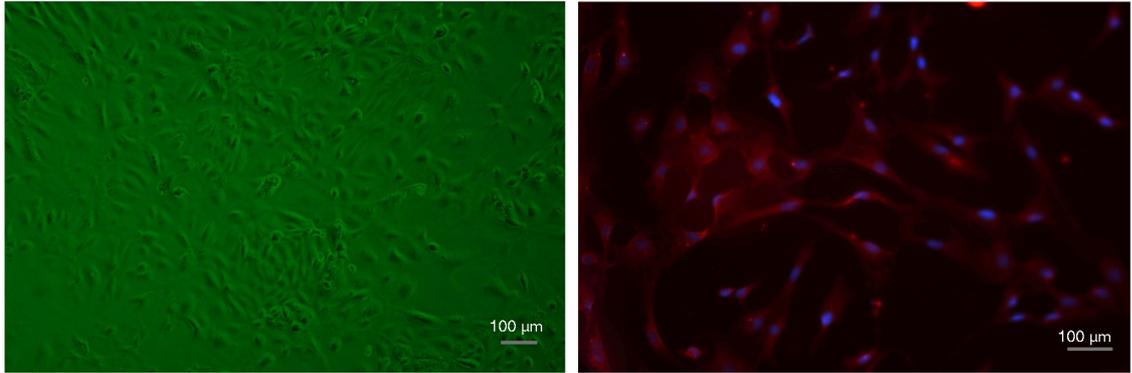


图 1. 倒置相差显微镜下观察大鼠肾小球内皮细胞 左图为原代培养的 RGEc;右图为第Ⅷ因子免疫荧光鉴定。

Figure 1. Light microscopy and immunohistochemical characterization of glomerular endothelial cells

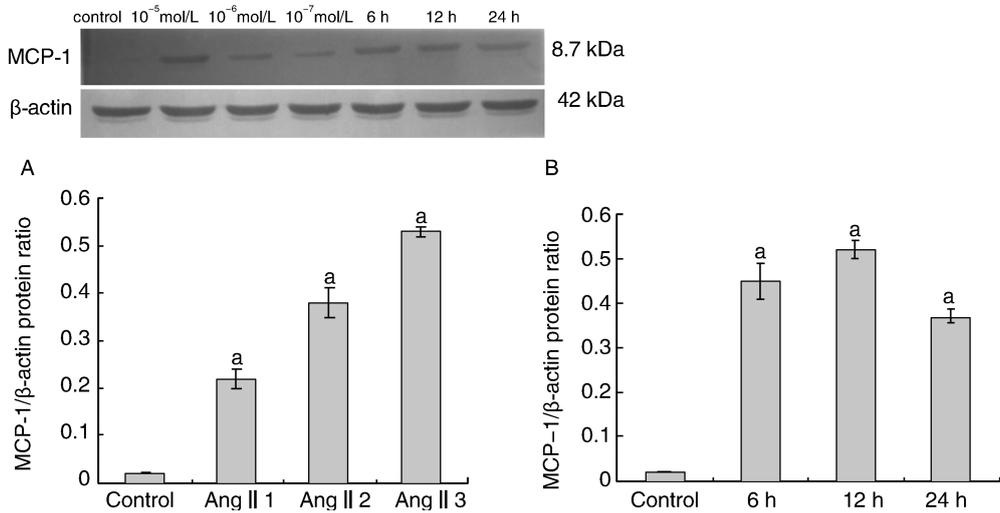


图 2. Ang II 对大鼠肾小球内皮细胞 MCP-1 表达的影响 A 图示浓度分别为 Ang II 1 (10^{-7} mol/L)、Ang II 2 (10^{-6} mol/L)、Ang II 3 (10^{-5} mol/L)作用 12 h 肾小球内皮细胞 MCP-1 表达量的变化;B 图示浓度为 10^{-5} mol/L Ang II 分别作用 6 h、12 h、24 h 时肾小球内皮细胞 MCP-1 的表达量的变化。与正常对照组比较,施加 Ang II 刺激因素后 MCP-1 表达量明显增高。 a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较($n = 8$)。

Figure 2. The effect of Ang II on MCP-1 production in cultured rats' glomerular endothelial cells

2.3 Ang II 对大鼠肾小球内皮细胞 AT1 受体 mRNA 和蛋白水平的影响

RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,与正常对照组相比,给予 10^{-5} mol/L 的 Ang II 刺激因素后,大鼠肾小球内皮细胞 AT1 受体的 mRNA 水平明显增加,呈时间依赖效应(图 3)。

2.4 AT1R 拮抗剂替米沙坦对大鼠肾小球内皮细胞 MCP-1 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,应用 AT1 受体拮抗

剂替米沙坦(TEL, 10^{-6} mol/L)可以抑制 Ang II (10^{-5} mol/L)的作用,大鼠肾小球内皮细胞 MCP-1 的表达量明显下降(图 4)。

3 讨论

血管紧张素 II 作为肾素-血管紧张素系统的主要效应因子在机体血容量、血流动力学及内环境稳态的调节中发挥主导作用。已有研究表明肾内局部

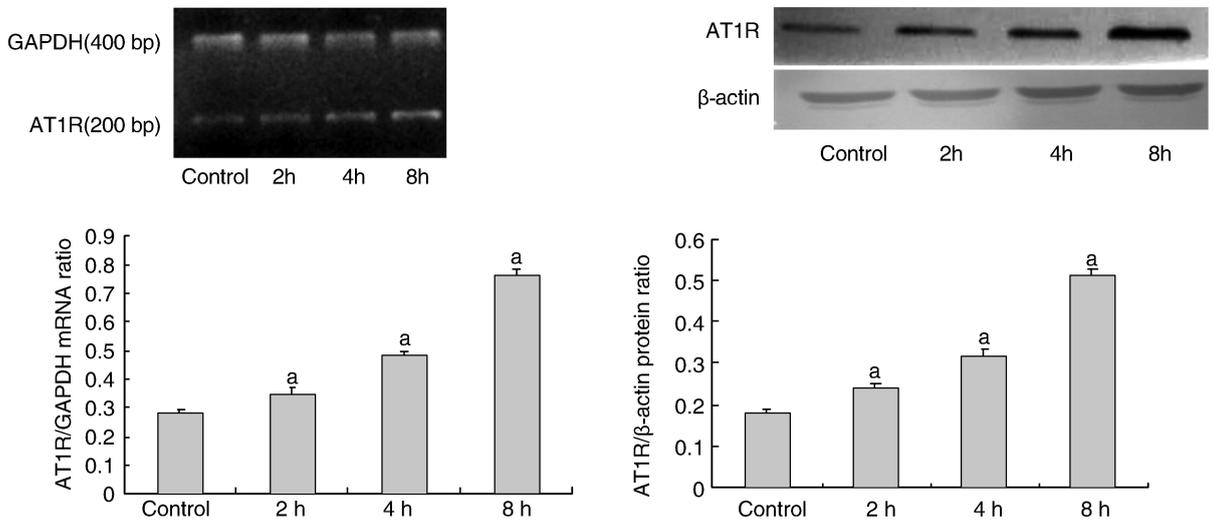


图 3. Ang II 对大鼠肾小球内皮细胞 AT1 受体 mRNA 和蛋白水平的影响 与正常对照组相比, 10^{-5} mol/L Ang II 作用下大鼠肾小球内皮细胞 AT1 受体的 mRNA 和蛋白水平明显增加, 成时间依赖效应。a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较 ($n = 8$)。

Figure 3. The effect of Ang II on AT1 receptor production in cultured rats' glomerular endothelial cells

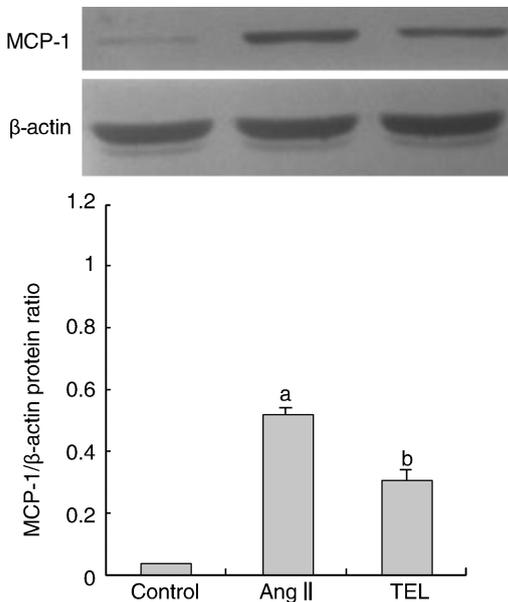


图 4. AT1R 拮抗剂替米沙坦对大鼠肾小球内皮细胞 MCP-1 表达的影响 ($n = 8$) 应用 AT1 受体拮抗剂 TEL (10^{-6} mol/L) 可以抑制 Ang II (10^{-5} mol/L) 的作用, MCP-1 的表达量下降。a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Ang II 组比较。

Figure 4. The effect of Telmisartan on MCP-1 production in cultured rats' glomerular endothelial cells

升高的 Ang II 水平与高血压、糖尿病时肾脏病变的发生发展关系密切^[3-4]。研究发现 Ang II 不仅可以导致肾小球内压力升高, 同时还具有生长因子和炎症因子的作用, 促进疾病状态下肾小球系膜细胞的增生和内皮细胞的损伤, 加快病变肾脏肾小球的硬化改变。

目前有关 Ang II 对血管内皮细胞结构和功能影

响的研究愈来愈受到重视^[9-10], 肾脏的肾小球内皮细胞属于微血管内皮细胞, 是肾小球滤过屏障的重要组成部分, 微血管内皮细胞受到损伤后可分泌多种炎症因子。本实验结果表明血管活性肽 Ang II 诱导大鼠肾小球内皮细胞发生炎症反应, 生成炎症因子 MCP-1。已有研究证实糖尿病肾病发病过程中, 肾组织内炎症因子 MCP-1 的基因与蛋白表达均有增加^[11-12], 炎症因子 MCP-1 的作用主要是募集单核-巨噬细胞在肾组织浸润, 进一步促进炎症反应的发生发展^[13-14]。本研究结果揭示糖尿病肾病时肾内肾素-血管紧张素系统被激活后, Ang II 的生成量增多, 肾内局部 Ang II 浓度的增加可能会激活肾小球内皮细胞, 使得炎症因子 MCP-1 的表达量增多, 促进局部炎症反应的发生, 久之易导致肾脏局部肾小球出现硬化病变。

Ang II 的作用主要是通过 AT1 和 AT2 两种类型受体所介导, 在人体不同组织中 Ang II 两种受体的分布不同。在成人肾脏组织中, AT1 受体分布广泛而 AT2 受体分布较少。相关研究表明心血管系统中, Ang II 的作用主要通过 AT1 受体所介导^[15-16]。本研究的另一结果显示 Ang II 可诱导大鼠肾小球内皮细胞上调 AT1R 的 mRNA 和蛋白表达水平, 说明血管紧张素 II 促进大鼠肾小球内皮细胞发生炎症反应, 生成炎症因子 MCP-1 的作用, 主要是通过 AT1 受体介导完成。同时本实验结果也表明 AT1 受体拮抗剂替米沙坦可以抑制 Ang II 的作用, 降低 MCP-1 的生成量, 进一步印证 Ang II 对肾小球内皮细胞的作用主要是通过 AT1 受体所介导。

肾小球内皮细胞是一种微血管内皮细胞,构成了肾小球滤过屏障的重要组成部分,对肾功能的维持起到重要作用。肾小球内皮细胞的生理病理改变在高血压、糖尿病等疾病所导致肾脏病变的发生发展过程发挥了重要作用。肾内 RAS 系统的效应因子 Ang II 作为肾功能不全的进展因素,不仅可以导致肾间质局部血流动力学障碍,而且参与肾脏病理改变发生的各个环节之中,因此进一步研究 Ang II 与肾小球内皮细胞、Ang II 与肾脏微血管病变之间的关系具有重要意义,可为临床更有效的应用血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB) 类药物治疗糖尿病肾病等肾脏病变,提供一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] Fan YY, Kobori H, Nakano D, et al. Aberrant activation of the intrarenal renin-angiotensin system in the developing kidneys of type 2 diabetic rats [J]. *Horm Metab Res*, 2013, 45(5): 338-343.
- [2] Kobori H, Kamiyama M, Harrison-Bernard LM, et al. Cardinal role of the intrarenal renin-angiotensin system in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *J Investig Med*, 2013, 61(2): 256-264.
- [3] Lee HB, Seo JY, Yu MR, et al. Radical approach to diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int Suppl*, 2007, 106, s67-70.
- [4] Farhad A, Sean S, Wang XD, et al. Angiotensin II activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells is altered by high glucose [J]. *Kidney Int*, 2009, 61: 1 605-616.
- [5] 李珊, 郑丽丽, 李冲. 胰高血糖素样肽 1 受体激动剂对高糖诱导的血管内皮细胞 NF- κ B、ICAM-1 和 VCAM-1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 4(3): 196-198.
- [6] Zheng H, Whitman SA, Wu W, et al. Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2011, 60(11): 3 055-066.
- [7] Liu HQ, Wei XB, Sun R, et al. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecular-1 via an AT1 receptor/nuclear factor-KB pathway in brain microvascular endothelial cells [J]. *Life Science*, 2009, 78: 1 293-298.
- [8] Gunter W, Fuad NZ, Gunter Z, et al. Angiotensin II is mitogenic for cultured rat glomerular endothelial cells [J]. *Kidney Int*, 2010, 45: 314-319.
- [9] 于世勇, 黄岚, 宋明宝, 等. 晚期糖基化终末产物刺激下内皮细胞活性氧的变化及来源分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(11): 857-860.
- [10] Lee HB, Yu MR, Yang YQ, et al. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 14: S241-S245.
- [11] Amy KB, Sean S, Ma GC, et al. Effects of simvastatin on high glucose- and angiotensin-induced activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells [J]. *AJP-Renal Physiol*, 2010, 291: F116-F121.
- [12] Mima A, Kitada M, Gerald P, et al. Glomerular VEGF resistance induced by PKC δ / - SHP-1 activation and contribution to diabetic nephropathy [J]. *FASEB J*, 2012, 26(7): 2 963-974.
- [13] Tuttle KR. Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 1 537-538.
- [14] 高夏青, 薛凌. 心肌缺血再灌注损伤相关细胞因子及细胞通路研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(4): 298-302.
- [15] Liang XB, Ma LJ, Takashi N, et al. Angiotensin type 1 receptor blocker restores podocyte potential to promote glomerular endothelial cell growth [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 17: 1 886-895.
- [16] Mii A, Shimizu A, Masuda Y, et al. Angiotensin II receptor blockade inhibits acute glomerular injuries with the alteration of receptor expression [J]. *Lab Invest*, 2009, 89(2): 164-177.

(此文编辑 李小玲)