

[文章编号] 1000-4718(2009)01-0022-04

地塞米松抑制肾素-血管紧张素系统 减轻大鼠急性肺损伤*

张勇¹, 娄冬梅², 李洪岩¹, 金德男³, 高井真司³, 于振香^{4△}

(¹ 吉林大学基础医学院病理生理教研室, ⁴ 吉林大学第一医院呼吸内科, 吉林 长春 130021;
² 长春市中心医院心血管内科一区, 吉林 长春 130051; ³ 日本大阪医科大学药理教研室, 日本 大阪)

[摘要] 目的: 观察肾素-血管紧张素系统(RAS)在大鼠急性肺损伤中的作用及地塞米松(DEX)的影响。方法: 在大鼠失血性休克的基础上,腹腔注射内毒素(二次打击)造成急性肺损伤模型,直接插管法检测大鼠平均动脉血压(MAP);逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)观察各组大鼠肺脏组织中血管紧张素转换酶(ACE)、血管紧张素原(AGT)、血管紧张素 II 1 型受体(AT1)和血管紧张素 II 2 型受体(AT2)mRNA 的表达及测定大鼠血清血管紧张素 I (Ang I)、血管紧张素 II(Ang II)的变化。结果: 二次打击组(HL)大鼠平均动脉血压恢复很慢,而地塞米松治疗组(HLD)平均动脉血压恢复的速度较 HL 明显增快,且平均动脉血压水平的升高具有明显差异。与对照组(C)相比,HL 组 ACE、AGT mRNA 表达水平明显增高,而 HLD 组明显低于 HL 组。AT1、AT2 mRNA 各组表达水平则无明显差异。与 C 组相比,HL 组 Ang II 的含量明显升高,HLD 组大鼠血清 Ang II 的含量比 HL 组均明显减低,Ang I 含量的变化不明显。结论: 失血性休克后 LPS 诱发的急性肺损伤可能与激活肺脏的肾素-血管紧张素系统有关,抑制肺脏的肾素-血管紧张素系统的激活是 DEX 轻这种急性肺损伤的机制之一。

[关键词] 急性肺损伤; 肾素-血管紧张素系统; 血管紧张素 II; 地塞米松; 脂多糖类

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effects of dexamethasone on acute lung injury by inhibiting renin-angiotensin system in rats

ZHANG Yong¹, LOU Dong-me², LI Hong-yan¹, JIN De-nan³, GAO Jing-zhensi³, YU Zhen-xiang⁴

(¹ Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Jilin University, ⁴ Department of Respiratory, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China; ² Central Hospital of Changchun, Changchun 130051, China; ³ Department of Pharmacology, Osaka Medical University, Japan. E-mail: yuzhenxiang2005@sina.com)

[ABSTRACT] AIM: To explore the relationship between renin-angiotensin system (RAS) and acute lung injury (ALI) in rats, and the effect of dexamethasone (DEX) on RAS was observed. METHODS: The rat model of ALI was induced by hemorrhagic shock and LPS administered intraperitoneally. The changes of MAP and the effects of DEX on MAP were observed. The mRNA expressions of ACE, AGT, AT1 and AT2 in lung tissue were assayed by RT-PCR. The changes of Ang I and Ang II in the serum and the effects of DEX on them were observed. RESULTS: The increasing of MAP was statistically obvious. MAP in hemorrhagic shock + LPS (HL) group recovered more slowly than that in HL + DEX (HLD) group. ACE, AGT, AT1 and AT2 mRNA expressions in HL group were increased, and higher than those in HLD group. The change of Ang II in serum in HL group was obviously higher than that in HLD group, while that of Ang I was not obvious. CONCLUSION: ALI activates RAS in rat lung, and promotes the production of Ang II then aggravates the injury of lung through increasing the expression of ACE and AGT. DEX decreases expression of Ang II.

[KEY WORDS] Acute lung injury; Renin-angiotensin system; Angiotensin II; Dexamethasone; Lipopolysaccharides

[收稿日期] 2007-11-15 [修回日期] 2008-04-10

* [基金项目] 吉林省科学技术厅资助项目(No. 200705152)

△通讯作者 Tel: 0431-85612443; E-mail: yuzhenxiang2005@sina.com

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是以广泛的肺毛细血管损伤、严重低氧血症和肺顺应性减低为特点的难治性疾病之一。近年来研究发现,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)除了参与各种心血管和肾脏疾病的发生发展外,还与肺疾病转归及预后有关。RAS中的血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)可调节细胞因子、趋化因子和黏附分子等多种炎症介质的表达,参与机体炎症相关疾病的发生和发展^[1]。因此,本研究利用失血性休克后给予脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导大鼠急性肺损伤模型^[2,3],并给予地塞米松(dexamethasone, DEX)进行治疗^[4,5],探讨RAS在急性肺损伤过程中的作用。

材 料 和 方 法

1 材料和试剂

18只成年Wistar大鼠,由吉林大学医学动物繁育中心提供,雌雄不拘,体重在230-250g。地塞米松注射液(天津药业集团新郑股份有限公司,生产批号030216);大肠埃希杆菌脂多糖(LPS, *E. coli* O111:B4)(Sigma)。Trizol Reagent(北京鼎国公司);dNTP、M-MLV逆转录酶、oligo(dT)、Taq DNA合成酶(Promega);DGL2000 DNA marker、Prestained marker(大连宝生物)。

2 方法

2.1 实验动物分组及模型建立 18只大鼠,随机分为3组:①对照组(C组, $n=6$):只分离颈总动脉、股动脉、股静脉并插管,不流血;②二次打击模型组(HL组, $n=6$):即失血性休克+复苏+葡萄糖溶液(5 mL/kg BW)LPS(2 mg/kg BW);③地塞米松治疗组(HLD组, $n=6$):即失血性休克+复苏+地塞米松(2 mg/kg BW)+LPS(2 mg/kg BW)^[3]。

模型建立分为首次打击(失血性休克+复苏再灌注)和二次打击(内毒素血症)两个阶段。①大鼠术前称重,用戊巴比妥(30 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉、固定,分离左侧颈总动脉插管后连接RM-6000型四导生理记录仪上,分别记录休克前、休克、回输及LPS注射后1 h、2 h、4 h、6 h的平均动脉血压(mean artery pressure, MAP)。分离股动、静脉,分别插管备用。②首次打击:缓慢自股动脉插管放血,并于15 min内使MAP降至40 mmHg,形成失血性休克。③首次打击后预处理:血压在40 mmHg维持60 min后,再自股静脉回输自体肝素化血及盐水,并使血压恢复达110 mmHg(基础血压的80%)左右。

同时HLD组经腹腔注射地塞米松(2 mg/kg BW),而HL组经腹腔注射等体积的葡萄糖溶液(5 mL/kg BW)。④二次打击:10 min后HL组和HLD组经腹腔注射LPS(2 mg/kg),C组注射(5 mL/kg)生理盐水。

2.2 肺组织中血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)、血管紧张素转换酶(angiotensin-conversion enzyme, ACE)、血管紧张素II1型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1)和血管紧张素II2型受体(angiotensin II type 2 receptor, AT2)的mRNA测定

①肺脏组织 取肺脏置液氮中速冻,后转为-70℃保存,用于RNA表达的检测。

②肺脏组织总RNA的提取 参照Trizol试剂盒的方法提取总RNA,总RNA经逆转录合成cDNA,-20℃保存备用。

③针对ACE、AGT、AT1和AT2的mRNA序列分别设计引物及内参照GAPDH。引物由联星生物公司合成。所有引物都源于GenBank公布的序列,并进行了BLAST检测以确保每个序列的特异性。GAPDH(617 bp):正义链5'-GGG TGA TGC TGG TGC TGA GTA TGT-3';反义链5'-TTT GGG CTT CAT CTC CAC CCT G-3'。AT1(445 bp):正义链5'-GCA CAA TCG CCA TAA TTA TCC-3';反义链5'-CAC CTA TGT AAG ATC GCT TC-3'。AT2(275 bp):正义链5'-GTG TCC AGC ATT TAC ATC TTC A-3';反义链5'-CAC CAA ACA AGG GGA ACT AC-3'。ACE(383 bp):正义链5'-CCT GAT CAA CAA GGA GTT TGC AGA G-3';反义链5'-GCC AGC CTT CCC AGG CAA ACA GCA C-3'。AGT(265 bp):正义链5'-TTG TTG AGA GCT TGG GTC CCT TCA C-3';反义链5'-CAC AGA CAC TGA GGT GCT GTT GTC CA-3'。扩增的条件:ACE、AT2和GAPDH为94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,30个循环。AGT为94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,30个循环。AT1为94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 30 s,28个循环。最后1次72℃延伸5min。扩增产物和DGL2000 marker一起用10 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳分离,图像采用上海天能科技有限公司GIS凝胶成像系统照相,特异性条带的丰度值用GIS图像分析系统处理。

2.3 血清中血管紧张素I(angiotensin I, Ang I)及Ang II含量的测定 在LPS腹腔注射后6 h,由腹主动脉取血分离血清,采用放免法测定Ang I及Ang II的含量,操作步骤严格按照试剂盒说明书(天津市协

和医药科技有限公司)进行。

3 统计学处理

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,目的基因电泳条带密度值以灰度 × 面积/参照物的比值表示。采用 SPSS11.0 统计软件包处理,多组间比较用方差分析,两两比较采用 *t* 检验。

结 果

1 DEX 对休克 - 内毒素二次打击大鼠平均动脉血压(MAP)变化及影响

由表 1 可见,与 HL 组比较,HLD 组治疗后 2、4、6 h 的平均动脉压明显升高($P < 0.01$)。

表 1 休克 - 内毒素二次打击大鼠模型中平均动脉血压变化
Tab 1 Changes of MAP in hemorrhage - LPS two - hits rats (mmHg. $\bar{x} \pm s$. $n = 10$)

Group	HL	HLD
	MAP	
Before shock	141.0 ± 11.4	139.0 ± 9.6
Shock	42.0 ± 5.4	43.0 ± 6.6
Blood transfusion	111.0 ± 5.9	113.0 ± 6.8
LPS 1 h	89.0 ± 6.2	92.0 ± 7.4
LPS 2 h	85.0 ± 7.9	105.0 ± 10.6*
LPS 4 h	60.0 ± 8.5	100.0 ± 10.8**
LPS 6 h	41.0 ± 10.8	83.0 ± 10.9**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HL group. HL: hemorrhage - LPS two - hit; HLD: hemorrhage - LPS + DEX.

2 DEX 对休克 - 内毒素二次打击大鼠肺脏组织中 ACE、AGT、AT1 和 AT2 mRNA 表达的影响

提取肺脏组织总 RNA, RT - PCR 扩增 ACE、AGT、AT1 和 AT2 mRNA 片段,以 GAPDH 为内参照进行电泳分析,并对电泳条带进行灰度扫描,结果见图 1。与对照组相比,HL 组 ACE、AGT mRNA 表达水平明显增高($P < 0.01$),HLD 组明显低于 HL 组($P < 0.05$)。AT1、AT2 mRNA 各组表达水平无明显差异($P > 0.05$)。

3 DEX 对休克 - 内毒素二次打击大鼠血清 Ang I、Ang II 的影响

二次打击 6 h 后检测血清中 Ang I 及 Ang II 的变化,可见与对照组相比,HL 组 Ang II 的含量明显升高($P < 0.05$);与 HL 组相比,HLD 组 Ang II 的含量却明显减低($P < 0.01$);而 Ang I 的变化不明显,见表 2。

讨 论

急性肺损伤在临床失血性休克继发的脏器损伤

表 2 DEX 对大鼠血清中 Ang I 和 Ang II 的影响

Tab 2 The effects of DEX on serum Ang I and Ang II level in rats ($\bar{x} \pm s$. $n = 10$)

Group	Ang II ($\mu\text{g/L}$)	AngI ($\mu\text{g/L}$)
Control	464.06 ± 15.25	9.14 ± 1.23
HL	515.64 ± 13.65*	9.22 ± 1.09
HLD	398.53 ± 16.75#	10.26 ± 1.45

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.01$ vs HL group.

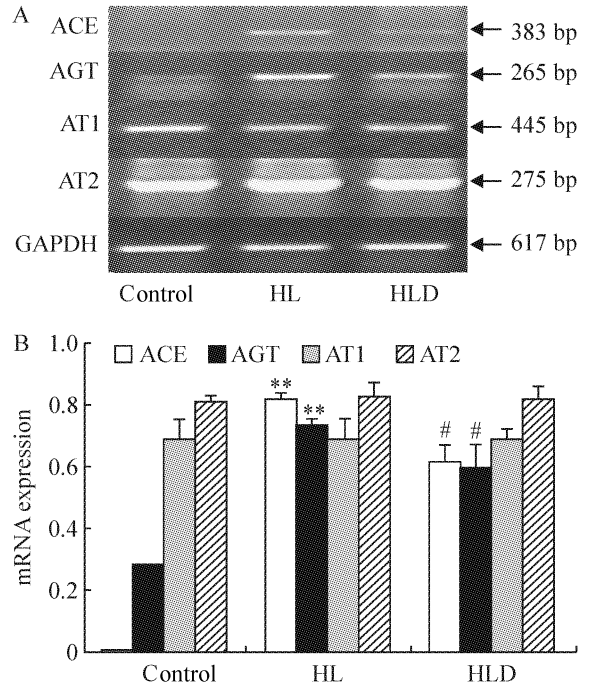


Fig 1 The effects of DEX on the expression of AEC, AGT, AT1 and AT2 mRNA in lung tissues of rats with two - hits of hemorrhagic shock and LPS. $\bar{x} \pm s$. $n = 4$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs HL group. A: electrophoretogram; B: histogram.

图 1 DEX 对休克 - 内毒素二次打击大鼠肺组织中 ACE、AGT、AT1 和 AT2 mRNA 表达的影响

中常最先出现,是全身炎症反应综合征病理过程中最易受损伤的首位靶器官。因此,研究失血性休克后 ALI 的发生机制及防治措施具有重要意义^[6]。

有文献报道,在机体受到有害刺激后,肾素 - 血管紧张素系统被激活^[7]。近年来研究发现,Ang II 除具有调节血管张力、血流及促进细胞生长、增殖等作用,还具有致炎作用,它可调节细胞因子、趋化因子和黏附分子等多种炎症介质的表达,参与机体炎症相关疾病的发生和发展^[7,8]。由于 ACE 在肺组织中的含量丰富,活性最强^[7],因而其促使 Ang I 转化为 Ang II 的作用最强。已有实验表明,核转录因子 κB (NF - κB) 的活化在炎症损伤中起着关键作用,而 Ang II 可介导 NF - κB 的活化,因此,Ang II 可能是 ALI 发生发展的一个重要环节^[9-12]。地塞米松是一

种临床应用历史悠久的非甾体类抗炎激素,通过稳定溶酶体膜,降低毛细血管通透性和抑制巨噬细胞聚集等作用发挥其强大的抗炎作用。

本实验结果表明,与 HL 组比较,HLD 组在二次打击后平均动脉压明显升高($P < 0.01$),提示地塞米松治疗有效。二次打击后的大鼠(HL 组)肺脏组织中 ACE、AGT mRNA 表达水平明显增高($P < 0.01$),HL 组血清中 Ang II 的含量明显升高($P < 0.05$),说明二次打击致肺损伤后,可以激活肾素-血管紧张素系统,通过增加 ACE(催化 Ang I 生成 Ang II)、AGT 的表达,促使 Ang II 生成明显增加,而 Ang I 的变化不明显。经过地塞米松治疗后,可以使 ACE 和 AGT 在肺组织中表达的量减少。结合本实验的 AT1 和 AT2 受体 mRNA 表达水平无明显差异($P > 0.05$),推测 Ang II 是急性肺损伤炎症反应的关键介质。也有体外试验证实,Ang II 可通过上调促炎因子和趋化因子的合成,激活炎症反应过程,而炎性细胞亦可产生 Ang II,并可导致组织损伤的加重^[9,10]。

通过本实验说明,二次打击导致急性肺损伤,可能通过增加 ACE 和 AGT mRNA 的表达,促进 Ang II 生成增加,加重急性肺损伤。地塞米松至少部分可能通过调控肾素-血管紧张素系统减少 Ang II 的合成,减轻急性肺损伤。

[参 考 文 献]

- [1] Jerng JS, Hsu YC, Wu HD, et al. Role of the renin-angiotensin system in ventilator-induced lung injury: an *in vivo* study in a rat model[J]. *Thorax*, 2007, 62(6): 527-535.
- [2] Agorreta J, Garayoa M, Montuenga LM, et al. Effects of acute hypoxia and lipopolysaccharide on nitric oxide synthase 22 expression in acute lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 168(3): 287-296.
- [3] 袁兆新,刘 潇,季东平,等.“失血加 LPS”大鼠肺脏 I κ B α 和 TLR4 基因表达及参麦的肺脏保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(4): 730-733.
- [4] Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms[J]. *Clin Sci*, 1998, 94(6): 557-572.
- [5] Meduri GU, Carratu P, Freire AX. Evidence of biological efficacy for prolonged glucocorticoid treatment in patients with unresolving ARDS[J]. *Eur Respir J Suppl*, 2003, 42:57s-64s.
- [6] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(18): 1334-1349.
- [7] 江程澄,张楠华,吴亚梅.血管紧张素转移酶(ACE)与肺部疾病的关系[J]. *重庆医学*, 2002, 31(3): 241-242.
- [8] Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(3): 747-803.
- [9] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, et al. Proinflammatory actions of angiotensins[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001, 10(3): 321-329.
- [10] Phillips MI, Kagiya S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2002, 3(4): 569-577.
- [11] Marshall RP, Gohlke P, Chambers RC, et al. Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(1): L156-L164.
- [12] Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multipleorgan failure[J]. *Surg Clin N Am*, 1995, 75(2): 257-277.