

# ACE 2 在奶牛乳腺中的表达定位 及其抗炎性损伤作用的研究

刘小倩, 刘颖, 荣超, 王鲲, 肖航, 张源淑\*

(南京农业大学 农业部动物生理生化重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:** 本研究旨在通过体内外试验, 明确 ACE 2 在奶牛乳腺中的表达定位, 并对其在高精料饲喂致内源性奶牛乳房炎中的抗损伤作用进行初步探讨。体外试验分别选用牛乳腺组织样品和牛乳腺上皮细胞(Mac-T 细胞), RT-PCR 和 Western blotting 法检测 ACE 2 在奶牛乳腺组织中的 mRNA 和蛋白表达; 免疫荧光法测定 ACE 2 蛋白在 Mac-T 细胞中的定位。体内试验, 选用 6 头健康泌乳期荷斯坦奶牛, 随机分为对照组和高精料饲喂组, 饲喂 20 周后, 活体采集乳腺组织及乳。测定乳中 LPS 含量、体细胞数及相关炎性指标; 制作乳腺组织学切片; 分析乳腺组织中 ACE、AT 1、ACE 2、MasR mRNA 表达水平, ELISA 法检测 Ang II、Ang1-7 含量。体外试验结果表明, 奶牛乳腺中 ACE 2 在基因和蛋白水平上均有表达, 细胞学定位在细胞的胞浆和胞膜。体内试验结果显示, 高精料长期饲喂, 奶牛乳中体细胞数和 LPS 含量均明显升高 ( $P < 0.01$ ); 乳中 NAGase 和 AKP 酶活力均显著高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), MPO 活力两组之间无明显差异; 乳腺组织学表现出一定炎性损伤变化; 其中 Ang1-7 含量显著增高 ( $P < 0.05$ ), Ang II 的含量显著降低 ( $P < 0.05$ ); ACE、AT 1、ACE 2、MasR mRNA 表达量均显著上升 ( $P < 0.05$ ), ACE 2/ACE mRNA 比值高于对照组。本研究首次证实奶牛乳腺组织中有 ACE 2 的存在。在高精料长期饲喂造成奶牛乳房炎性损伤时, 乳腺组织中 RAS 处于激活状态, ACE/ACE 2 比例失衡, 以 ACE 2-Ang1-7-MasR 轴的活力处于优势状态, 即 ACE 2 的抗损伤作用占优势。ACE 2 可能通过降解 AngII, 产生 Ang1-7 发挥抗损伤作用, 对乳腺组织炎性损伤具有一定的保护作用。

**关键词:** 肾素-血管紧张素系统(RAS); 血管紧张素转化酶 2(ACE 2); 奶牛乳腺组织; 表达; 抗损伤

中图分类号: S823.9<sup>+</sup>1.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)03-0552-09

## Expression Localization of Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE 2) in Dairy Cow Mammary Gland and Its Anti-inflammation Effect

LIU Xiao-qian, LIU Ying, RONG Chao, WANG Kun, XIAO Hang, ZHANG Yuan-shu\*

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture,  
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The aim of this study is to gain a clear understanding of the expression distribution of ACE 2 through both *in vivo* and *in vitro* experiments and also to study ACE 2's anti-injury effect in dairy cow mastitis induced by long-term high concentrate feeding. *In vitro*, mammary tissues samples from the lactating Holstein cows and Mac-T cells were used. The mRNA and protein expression of ACE 2 in bovine mammary gland was determined using RT-PCR and Western blotting. The location of ACE 2 protein in Mac-T cell was determined using immune fluorescence method. *In vivo*, 6 healthy lactating Holstein cows were divided into 2 groups: normal feeding group (40% concentrate, dry matter basis) and high concentrate feeding group (60% concen-

收稿日期: 2016-08-30

基金项目: 国家自然科学基金(30871838)

作者简介: 刘小倩(1992-), 女, 湖北潜江人, 硕士生, 主要从事营养生物化学研究, E-mail: 2015107034@njau.edu.cn

\* 通信作者: 张源淑, 教授, 博士生导师, 主要从事营养生物化学研究, E-mail: zhangyuanshu@njau.edu.cn

trate). After 20 weeks' feeding, mammary biopsy samples and milk samples were collected. Milk LPS content, somatic cell number, as well as some inflammatory indicators including NA-Gase, AKP and MPO were tested. Histopathological test was also performed. The mRNA expression level of ACE 2, ACE and their receptors AT 1 and MasR in mammary tissues were analysed using RT-qPCR. The contents of AngII and Ang1-7 were also determined using ELISA. The results showed that both mRNA and protein expression of ACE 2 were found in dairy cow mammary gland, ACE 2 was located in the cytoplasm and on the membrane of the Mac-T cell. With a long-term high concentrate feeding, somatic cell number and LPS content in milk significantly increased ( $P < 0.01$ ); the activities of NAGase and AKP were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ), MPO activity had no significant differences between the 2 groups; mammary gland tissues in the high concentrate group cows found inflammatory injury changes. The mRNA expression level of ACE, ACE 2, AT 1, MasR increased, and the mRNA ratio of ACE 2/ACE was higher than the control group. Ang1-7 content was significantly higher in breast tissue ( $P < 0.05$ ), AngII content was significantly lower ( $P < 0.05$ ). Conclusion: It is the first time that the presence of ACE 2 in bovine mammary gland has been confirmed. When mammary inflammatory injuries are induced by long-term high concentrate feeding, the local RAS in mammary is activated, ratio of ACE/ACE 2 varies and the ACE 2-Ang1-7-MasR pathway takes the dominant position, that is to say that the anti-injury effect of ACE 2 becomes significant. ACE 2 helps to protect the mammary from inflammatory injuries by degrading Ang II to Ang1-7.

**Key words:** renin-angiotensin system(RAS); angiotensin converting enzyme 2 (ACE 2); mammary tissue of dairy cows; expression; anti-injury

肾素-血管紧张素系统(Renin-angiotensin system, RAS)是体内重要的体液调节系统,由经典的 ACE-AngII-AT 1/AT 2 和新的 ACE 2-Ang1-7-Mas 两条代谢通路组成。血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)是经典 RAS 通路中的关键酶,其催化产物血管紧张素 II (Angiotensin II, AngII)是途径中的核心,生理剂量的 AngII 可通过血液循环到外周组织与其靶细胞膜上的 AT 1 受体结合发挥体液调节等多种效应。过量的 AngII 可导致血压升高,血管和组织纤维化、氧化应激以及组织损伤等<sup>[1-2]</sup>。

血管紧张素转化酶 2 (Angiotensin converting enzyme 2, ACE 2)是 2000 年发现的 RAS 系统的负向调控因子。其在体内均能够有效水解 AngII 产生 Ang1-7,后者与 Mas 受体结合,抑制 AngII 的作用,实现对组织的保护作用<sup>[3]</sup>。ACE 2 在肾、肺、心等多种器官中的抗损伤作用及其在糖尿病、高血压、心血管疾病、肝纤维化及肺损伤等多种疾病中的保护作用已得到证实<sup>[4-5]</sup>。在动物上的研究较少。

2005 年, K. Tybitanclova 等<sup>[6]</sup>研究证实乳腺局部存在 RAS 所有成员,化学诱导乳腺损伤或乳腺

癌时, RAS 中的 AT 1 受体及 ACE 的 mRNA 表达均升高,提示 ACE-AngII-AT 1 轴在乳房损伤及肿瘤细胞的发生发展过程中起重要作用。Y. Luo 等<sup>[7]</sup>利用免疫组学的方法调查了 132 例乳腺浸润导管癌(IDC)患者的 MasR 的表达量,结果显示,在正常组织中 MasR 高表达,但在 IDC 患者中, MasR 表达量显著下降。K. Misako 等<sup>[8]</sup>发现三阴性乳腺癌(TNBC)中有 MasR 的表达,给予 Ang1-7 处理可以提高 MasR 的活性,细胞凋亡存活率显著减弱。以上结果表明,乳腺局部存在 RAS,同在其他组织一样, Ang II 仍然是关键的调控因子,其过量产生对乳腺健康是不利的。ACE 2 可以降解 Ang II,在乳腺中是否和在其它组织中一样具有抗损伤或抗炎作用?这方面的研究,特别是在奶牛乳腺方面尚未见报道。

亚急性瘤胃酸中毒(Subacute rumen acidosis, SARA)是一种发病率较高的代谢性疾病。SARA 时,瘤胃生物种群结构改变,瘤胃生态平衡失调,造成瘤胃和肠道后段 G-崩解并产生大量 LPS,超出了肠道脱毒能力并移位至血液,造成内毒血症和全身性炎症反应,包括乳腺炎症,直接影响乳腺上皮细

胞凋亡损伤及进入乳腺的乳成分前体物(葡萄糖、氨基酸以及脂肪酸等)发生重分配,导致牛乳质和量的下降<sup>[9-10]</sup>。许多试验已经发现,在中国现阶段多采用高谷物精料饲喂泌乳奶牛或山羊,其血液和瘤胃液中 LPS 浓度显著升高,乳中 SCC、TNF- $\alpha$ 、NAGase 等均显著升高,造成内毒血症和全身性炎症反应,包括乳腺炎症,并发现伴随乳腺组织中 ACE 2 mRNA 表达上调,后期则呈下降趋势。推测高精料长期饲喂,内源 LPS 升高致乳腺处于低水平炎症状态时,ACE 2 mRNA 表达上调可能是乳腺局部应对损伤的一种积极调控方式<sup>[10-11]</sup>。这方面的研究尚不多见。

因此,本研究拟以泌乳期奶牛为研究对象,采用分子生物学、细胞学等多种方法,明确 ACE 2 在奶牛乳腺组织中的表达及细胞学定位,并通过研究高精料长期饲喂致泌乳奶牛乳腺炎性损伤时乳腺局部 RAS 的变化,探讨 ACE 2 在乳腺炎性损伤中的抗损伤作用及保护作用,从 RAS 两条通路各关键因子基因表达变化的角度初步探讨其相关的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器及试剂

MyiQ2 Real-Time PCR 仪(美国 Bio Rad); Tper-sonral 型 PCR 仪(美国 Biometra); Power pac300 电泳

仪及半干转移仪(美国 Bio Rad); GelDoc-It 凝胶成像系统(美国 UVP); EPSON 扫描仪(V500 Photo), LSM 700 激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss)。

羊抗兔 ACE 2 多克隆抗体(美国 Santa Cruse); 碱性磷酸酶(AKP)、髓过氧化物酶(MPO)和  $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAGase)测定试剂盒(南京建成生物技术公司); Ang II 和 Ang1-7 试剂盒(上海朗顿生物技术公司); LPS 试剂盒(上海博华生物科技有限公司)等。

### 1.2 体外试验

1.2.1 材料 乳腺组织样品:健康泌乳期荷斯坦奶牛活体取样的乳腺组织样品。

牛乳腺上皮细胞(Mac-T 细胞系),美国伊利诺伊大学 J. Looor 教授馈赠,本实验室保存。

1.2.2 乳腺组织中 ACE 2 基因 mRNA 的 RT-PCR 分析

1.2.2.1 总 RNA 提取及反转录:TRIzol 一步抽提法提取,测定 RNA 浓度和纯度。选取 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 比值为 1.8~2.0 的样品,二步法进行反转录获得 cDNA, -20 °C 保存。

1.2.2.2 PCR 扩增:基因引物序列来自 GenBank, Primer5.0 软件设计,由北京鼎国生物公司合成。引物序列及参数见表 1。

表 1 ACE2 和  $\beta$ -actin 引物参数

Table 1 Parameters of primer pairs for ACE2 and  $\beta$ -actin genes

基因 Gene	序列编号 Accession No.	引物序列(5'-3') Sequence	产物大小/bp Product size
ACE 2	NM_001024502	F:CCCTTCAGCATAGCGG R:CCTTCCCAAGCCCAGAG	202
$\beta$ -actin	AF122902	F:CCCTGTGCTGCTCACCGA R:ACAGTGTGGGTGACCCCGTC	175

以  $\beta$ -actin 作为内标参照。PCR 产物在 2%EB 染色的琼脂糖凝胶上电泳。图像处理及灰度分析在 GelDoc-It 凝胶成像系统上进行。

1.2.2.3 牛乳腺组织中 ACE 2 的 Western blotting 分析:参照张伟等<sup>[12]</sup>方法。BCA 法测定蛋白浓度。20  $\mu$ L 样品上样,5%浓缩胶,8%分离胶,100 V 电泳 1.5 h。PVDF 膜转印,5%脱脂奶粉封闭。4 °C 孵育一抗(1:300 稀释)过夜,洗膜后室温孵育二抗(1:5000 稀释)。凝胶成像系统分析并拍照。

1.2.3 ACE 2 蛋白的细胞学定位 Mac-T 细胞系培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 中,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。细胞学定位采用免疫荧光方法进行。参照 F. J. Warner 等<sup>[13]</sup>方法,12 孔培养板中进行。4%多聚甲醛室温固定,0.5% TritonX-100 室温通透,一抗为山羊抗大鼠 ACE 2 (1:100 稀释),二抗为山羊抗大鼠 IgG (1:500 倍稀释),100 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> DAPI 染核,封片液封片,激光共聚焦显微镜观察采集图像。

### 1.3 体内试验

1.3.1 动物分组及饲养 6 头健康、体重相当、分娩日期接近的泌乳期荷斯坦奶牛购自南京农业大学畜牧试验站奶牛场。随机分组:①对照组:精/粗饲料比 4:6 ②高精料组:精/粗饲料比 6:4。饲料配方参考 Cornell-Penn-Miner System (NRC 2001) 设计(表 2)。

表 2 日粮配方与营养水平

项目 Item	%	
	对照组 Control group (4:6)	高精料组 High concentrate group(6:4)
原料 Ingredient		
玉米青贮 Corn silage	30.00	20.00
苜蓿 Alfalfa	30.00	20.00
玉米 Corn	24.30	32.00
麸皮 Bran	0.00	12.40
豆粕 Soybean	13.50	13.00
碳酸氢钙 Dicalcium	0.85	0.45
石粉 Powder	0.00	0.80
食盐 Salt	0.35	0.35
预混料 Premix	1.00	1.00
总计 Total	100.00	100.00
净能/(MJ·kg <sup>-1</sup> )NE	6.36	6.71
粗蛋白质 CP	16.99	16.92
粗脂肪 EE	3.93	4.07
中性洗涤纤维 NDF	36.54	31.45
酸性洗涤纤维 ADF	22.51	17.56
非纤维性碳水化合物 NFC	33.76	39.32
钙 Ca	0.88	0.89
磷 P	0.43	0.43

#### 1.3.2 样品采集

1.3.2.1 乳样采集:试验结束时,于饲喂前挤奶,采集 50 mL 乳样,经 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min,收集脱脂乳,用于体细胞计数。

1.3.2.2 乳腺组织样品采集:饲喂 20 周后乳腺活体取样。术前牛尾静脉注射盐酸甲苯噻嗪,在牛乳腺后乳区正后方上 1/3 处,剃毛后消毒。拨开乳区术部中心点皮肤和皮下筋膜,插入取样器乳房取样。分装于液氮速冻后,-80℃ 保存。部分样品用 4%

多聚甲醛固定。

#### 1.3.3 指标测定

1.3.3.1 乳中体细胞数测定:采集的鲜乳样品添加饱和重铬酸钾 10 μL,早、中、晚 3 次样品按照 4:3:3 混合,送南京卫岗乳业有限公司,通过 Fossomatic 5000F 乳成分分析仪检测。

1.3.3.2 乳及乳腺组织中炎性指标测定:测定指标包括 AKP、MPO、NAG 及 LPS。均选用 ELISA 法测定。具体操作按测定试剂盒说明书进行。

1.3.3.3 乳腺组织形态学检测:常规法进行。乳腺组织固定 24 h,不同浓度乙醇脱水、浸洗、二甲苯透明和石蜡包埋,5 μm 石蜡切片,HE 染色。封片后在光学显微镜下观察并拍照。

1.3.3.4 乳腺组织中 AngII、Ang1-7 含量测定:ELISA 方法测定。按试剂盒说明书进行。450 nm 测量各孔 OD 值,得出标准曲线及回归方程,在回归方程上计算出对应的样品浓度。

1.3.3.5 乳腺组织中 ACE 2、ACE、AT 1、MasR 的 Real-time PCR 分析

1.3.3.5.1 总 RNA 提取及反转录:同 1.2.2.1。

1.3.3.5.2 Real-time PCR:采用 Real-time PCR SybrGreen 染料法对 ACE 2、ACE、AT 1、MasR mRNA 进行相对定量分析。 $\beta$ actin 作内标。引物序列及参数见表 3。

各样本结果均用相对应的  $\beta$ -actin 标化,用相对定量  $\Delta\Delta$ Ct 法进行数据统计。具体反应条件:95℃ 预变性 1 min,95℃ 变性 20 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环。 $\beta$ -actin:95℃ 预变性 1 min,95℃ 变性 20 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环。

### 1.4 数据分析

所有数据均采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,差异显著性检验采用独立样本 *t* 检验 (Independent T-test, LSD)。所有数值均以“平均值±标准误 (Mean±SE)”表示。

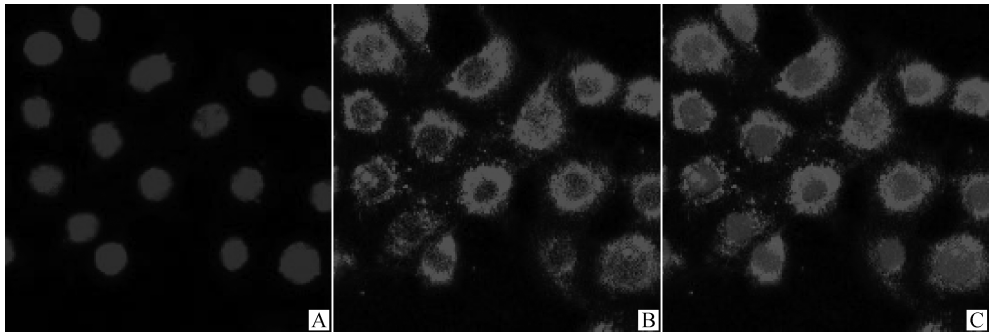
## 2 结果

### 2.1 体外试验

2.1.1 ACE 2 蛋白的细胞学定位 激光共聚焦结果见图 1。由图 1 看出,在 MAC-T 细胞中有 ACE 2 分布,细胞定位在乳腺上皮细胞的胞浆及胞膜中。

表3 目的基因和  $\beta$ -actin 引物参数Table 3 Parameters of primer pairs for target and  $\beta$ -actin genes

基因 Gene	序列号 Accession No.	序列(5'-3') Sequence	产物大小/bp Size
ACE 2	NM-001024502.4	F:CATTTTCGTTGTCATTCCAT R:TTGAGCCCTTGTTTACCT	158
ACE	NM-001206668.1	F:CTTGATGTTACCGATGTTATGG R:TCTTTCCTGTTGTAGAAGTCCC	197
AT 1	NM-174233.2	F:TATGTAATTGTGCCTTCC R:AGACTGACTAACCCAAGAG	106
MasR	NM-001192450.1	F:GGTGGATGATGTTCTTATTTG R:AACCAGAGGATGCCGTAG	166
$\beta$ -actin	AY141970.1	F:GTGTTGGCGTAGAGGT R:AGGTCATCACCATCGG	158



A. 细胞核; B. ACE 2; C. 细胞核+ACE 2

A. Cell nucleus; B. ACE 2; C. Cell nucleus + ACE 2

图1 ACE 2在牛乳腺上皮细胞(MAC-T细胞)的定位 200 $\times$ Fig. 1 Location of ACE 2 in MAC-T cells 200 $\times$ 

2.1.2 乳腺组织中 ACE 2 mRNA 表达 由图 2 可知, ACE 2 PCR 产物为 202 bp, 电泳在 100~250 bp 出现目的条带, 说明奶牛乳腺组织中有 ACE 2 基因存在。

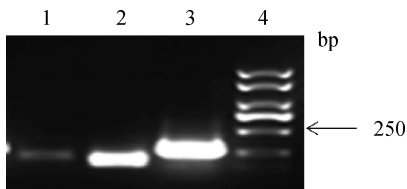
1, 2.  $\beta$ -actin; 3. ACE 2; 4. DNA 分子质量标准1, 2.  $\beta$ -actin; 3. ACE 2; 4. DNA marker

图2 ACE 2 PCR 产物电泳

Fig. 2 The electrophorogram of ACE 2 PCR product

2.1.3 牛乳腺组织中 ACE 2 Western blotting 检测 结果如图 3 所示。在 120 ku 处可以见到 ACE 2 蛋白特异性表达条带, 与 mRNA 结果相符。

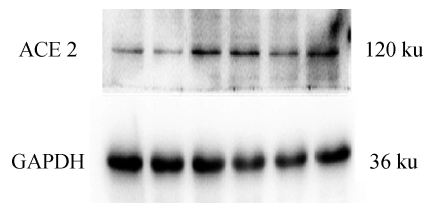


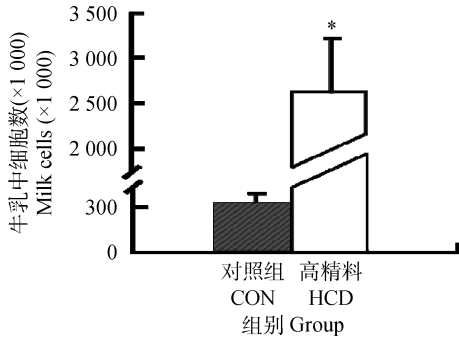
图3 牛乳腺组织 ACE 2 蛋白表达

Fig. 3 The protein expression of ACE 2 in bovine mammary tissue

## 2.2 体内试验

2.2.1 乳中体细胞数的测定结果 健康的牛乳中的细胞数量一般在  $(20\sim30)$  万  $\cdot$  mL $^{-1}$ , 当乳房发生炎症时, 体细胞数一般都超过 50 万  $\cdot$  mL $^{-1}$  [14]。结果如图 4 所示, 长期饲喂高精料日粮, 乳中体细胞数量激增, 提示奶牛乳腺可能有炎性损伤。

2.2.2 乳及乳腺组织中炎性指标的变化(表 4) 高精料饲喂组奶牛乳中 NAGase、AKP 活力均显著高



与正常对照组相比, \* 表示差异显著( $P < 0.05$ )  
\* means significant difference compared with normal control group( $P < 0.05$ )

图 4 牛乳中体细胞数变化( $n=3$ )  
Fig. 4 Somatic cells number changes in milk ( $n=3$ )

于对照组( $P < 0.05$ ; MPO 酶活力无显著变化; LPS 含量极显著上升( $P < 0.01$ )。乳腺组织中各炎症指标两组之间均无显著差异, 高精料组有上升趋势。

2.2.3 乳腺组织病理学变化 高精料组奶牛乳腺腺泡腔内可见炎性细胞浸润。腺泡结构模糊不清(图 5B), 而对照组结构清晰(图 5A)。

2.2.4 RAS 中各组成成分的变化

2.2.4.1 乳腺组织中 AngII、Ang1-7 含量测定: 与对照组相比, 高精料组 Ang1-7 含量显著升高( $(94.17 \pm 3.37) \& (111.94 \pm 1.39)$ ,  $P < 0.05$ ); Ang II 的含量则由  $282.97 \pm 14.92$  显著降低至  $157.82 \pm 29.13$  ( $P < 0.05$ )。

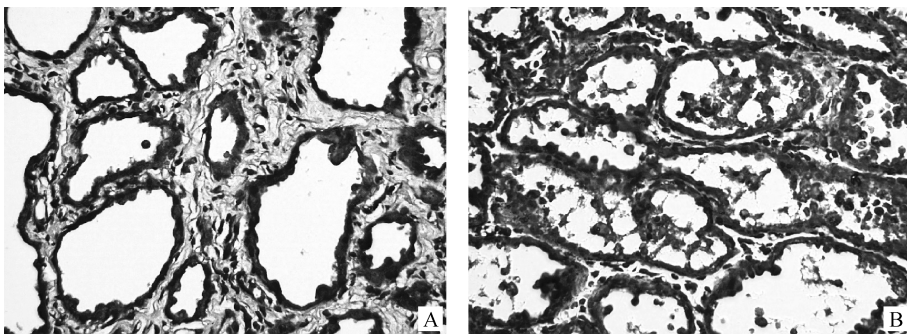
表 4 乳及乳腺中炎症指标的测定结果( $n=3$ )

Table 4 The changes of inflammatory indicators in milk and mammary tissue( $n=3$ )

组别 Group	NAGase/ ( $U \cdot gprot^{-1}$ )	AKP/ (金氏单位 $\cdot gprot^{-1}$ )	MPO / $(U \cdot g^{-1})$	LPS/ ( $EU \cdot mL^{-1}$ )
对照组(乳)Control group(milk)	$5.15 \pm 0.54$	$8.15 \pm 2.87$	$62.54 \pm 3.11$	$4.67 \pm 0.30$
高精料组(乳) High concentrate group(milk)	$9.67 \pm 0.35^*$	$9.67 \pm 1.52^*$	$65.31 \pm 2.97$	$9.25 \pm 1.02^{**}$
对照组(乳腺) Control group(mammary gland)	$1.35 \pm 0.20$	$0.23 \pm 0.05$	$2.76 \pm 0.63$	—
高精料组(乳腺) High concentrate group(mammary gland)	$1.77 \pm 0.09$	$0.24 \pm 0.02$	$4.00 \pm 0.96$	—

与正常对照组相比, \* .  $P < 0.05$ 。下同。\* \* .  $P < 0.01$

\* means very significant difference compared with normal control group ( $P < 0.05$ ). The same as below. \* \* .  $P < 0.01$



A. 对照组; B. 高精料组  
A. Control group; B. High-concentrate group

图 5 奶牛乳腺组织 HE 染色 400×  
Fig. 5 Hematoxylin and eosin staining of cow mammary gland 400×

2.2.4.2 乳腺组织中 AT 1、MasR、ACE、ACE 2 mRNA 表达变化: 高精料饲喂组牛乳腺组织中 ACE、ACE 2、AT 1、MasR mRNA 的表达水平均显

著高于对照组, 即高精料饲喂组牛乳腺组织中 RAS 处于激活状态(表 5)。

2.2.4.3 乳腺组织中 ACE 2/ACE mRNA 的比

值:综上所述,高精料长期饲喂 ACE 2 和 ACE 的 mRNA 表达均处于激活状态。为了比较二者的优势情况,对 ACE 2 mRNA/ACE mRNA 比值进行了分析,结果高精料组 ACE 2/ACE mRNA 比值为 1.25,高于对照组比值 1.125,说明在高精料长期饲喂 ACE 2 轴的激活占优势(表 5)。

表 5 牛乳腺组织中 AT 1、MasR、ACE、ACE 2 mRNA 表达水平( $n=3$ )

Table 5 The mRNA expression level of AT 1, MasR, ACE, ACE 2 in cows mammary gland ( $n=3$ )

基因 Gene	对照组	高精料组
	Control group	High concentrate group
ACE 2	0.54±0.24	1.70±0.32*
ACE	0.48±0.07	1.36±0.29*
AT 1	0.58±0.18	1.88±0.26*
MasR	0.54±0.10	1.68±0.32*

### 3 讨论

#### 3.1 奶牛乳腺组织中 ACE 2 的表达定位

ACE 2 是 2000 年发现的 ACE 的类似物,在 RAS 中发挥负向调节作用。机体出现异常时,ACE 2 能够通过水解 Ang II 产生 Ang1-7 发挥抗损伤作用<sup>[15]</sup>。目前研究主要集中在人医方面,在动物方面的相关报道较少。在乳腺方面的研究也仅限于人的乳腺癌等方面,奶牛乳腺组织中未见报道。本试验首先采用 RT-PCR 方法证明 ACE 2 在乳腺组织中有 mRNA 表达,进一步采用 Western blotting 的方法验证 ACE 2 在奶牛乳腺组织中蛋白的表达,结果显示在乳腺组织中 ACE 2 蛋白有表达,即在奶牛乳腺组织中存在 ACE 2 的分布表达。这与 2005 年 K. Tybitanclova<sup>[6]</sup>证实 ACE 2 在人乳腺组织中存在的结果一致。ACE 2 蛋白在不同的组织器官中分布具有特异性,如在肾 ACE 2 蛋白主要分布在肾小管细胞刷状缘<sup>[16]</sup>,在肺中则主要分布在肺泡 I、II 型上皮细胞<sup>[17]</sup>,在肠道中 ACE 2 分布在肠上皮细胞刷状缘处<sup>[18]</sup>。本试验也通过免疫荧光法证实 ACE 2 蛋白在乳腺上皮细胞的细胞浆和膜上均有分布。

#### 3.2 高精料长期饲喂对奶牛乳腺健康的影响及 ACE 2 的抗损伤作用

在中国奶牛饲养均采用高、中、低精料 3 种的模

式,因中国牧草缺乏且质量不高,实际生产中仍然以高精料饲养为主,但研究已经证实长期饲喂高精料日粮对奶牛健康会造成严重的危害,诱发瘤胃酸中毒、隐性乳房炎等,直接影响乳腺健康及牛奶品质<sup>[19]</sup>。乳腺发生炎症时,炎性细胞分泌的化学物质导致乳腺微血管通透性增加,血乳屏障破坏,血液成分渗入乳中,包括体细胞(SCC)、溶酶体酶和急性期蛋白<sup>[20]</sup>。此外,乳腺炎时乳汁中一些酶的生物活性随 SCC 的升高而增强。包括 NAGase(分泌型细胞被破坏及反映乳腺炎发病程度的标志)<sup>[21]</sup>。MPO 是 PMN 的标志酶,氧依赖性杀菌系统的重要组成部分。AKP 是机体防御感染的因子之一<sup>[22]</sup>。本试验中给泌乳奶牛长期饲喂高精料日粮,结果发现,乳中 NAGase 和 AKP 活性上升,乳中 SCC 明显增加,同时乳腺组织病理学变化能够观察到腺泡中有炎性细胞的存在,表明长期高精料饲喂可诱发乳腺炎性损伤。

在本试验中,从炎性指标判断奶牛乳腺组织的损伤程度应该属于初级阶段,此阶段高精料组 ACE 2 的表达量显著高于正常对照组,ACE 2 在损伤的早期阶段有积极的保护作用,这与文献<sup>[23-24]</sup>结果相符。在本试验中,进一步研究也发现高精料饲喂组奶牛乳腺组织中 RAS 两条通路中 ACE、AT 1、ACE 2 和 MasR 表达水平均高于对照组,即高精料致乳腺损伤时乳腺组织局部 RAS 两条通路均处于激活状态。且高精料组 ACE 2/ACE mRNA 比值高于正常对照组,Ang1-7 含量明显升高,说明在高精料长期饲喂致乳腺低水平炎性损伤时,以 ACE 2 为中心的 ACE 2-Ang-(1-7)-Mas 轴的激活占优势,即 ACE2 轴的抗损伤作用占优势。

AngII 是 ACE 轴的主要产物和核心,其产生过量可以导致组织损伤,对机体是不利的。但 AngII 是 ACE 2 的主要底物,ACE 2 可通过降解 AngII 产生 Ang1-7 拮抗其对组织的损伤作用,从而实现对组织的保护作用。另外,在 RAS 中 ACE2-Ang-(1-7)轴和 ACE-AngII 轴之间存在着动态平衡状态,ACE2-Ang-(1-7)轴在 RAS 中起对抗 ACE-AngII 轴的作用,ACE 2/ACE 之间的相对平衡决定着 AngII 的生成量<sup>[25]</sup>,本研究结果表明高精料长期饲喂致奶牛乳腺低水平或隐性炎性损伤时,ACE 2 激活程度强于 ACE,提示 ACE 2 抗衡了 ACE 的作用,通过降解 AngII 对乳腺组织的损伤具有保护作用。

## 4 结 论

本研究首次明确奶牛乳腺组织中有 ACE 2 的存在,分布定位在乳腺上皮细胞的胞浆和胞膜上。长期高精料日粮饲喂可致奶牛乳腺一定程度损伤(隐性乳房炎),乳腺中 RAS 处于激活状态,以 ACE 2-Ang1-7-MasR 轴的活性占优势,ACE 2 通过降解 AngII,产生 Ang1-7,对乳腺组织的损伤具有一定的保护作用。

## 参考文献(References):

- [1] VINTURACHE A E, SMITH F G. Renal effects of angiotensin II in the newborn period: role of type 1 and type 2 receptors[J]. *BMC Physiol*, 2016, 16(1):1-10.
- [2] GOWRISANKAR Y V, CLARK M A. Regulation of angiotensinogen expression by angiotensin ii in spontaneously hypertensive rat primary astrocyte cultures[J]. *Brain Res*, 2016, 1643(4):51-58.
- [3] SILVA A S E, SILVEIRA K D, FERREIRA A J, et al. ACE 2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169(3):477-492.
- [4] CRACKOWER M A, SARAO R, OUDIT G Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function [J]. *Nature*, 2002, 417(6891):822-828.
- [5] KUBA K, IMAI Y, RAO S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE 2) in SARS coronavirus-induced lung injury[J]. *Nat Med*, 2005, 11(8):875-879.
- [6] TYBITANCLOVA K, MACEJOVA D, LISKA J, et al. AT 1, receptor and ACE mRNA are increased in chemically induced carcinoma of rat mammary gland [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 244(1-2):42-46.
- [7] YI L, TANABE E, KITAYOSHI M, et al. Expression of MAS1 in breast cancer[J]. *Cancer Sci* 2015, 106(9):1240-1248.
- [8] MISAKO K, KOUICHI M. Caffeine synthase and related methyltransferases in plants[J]. *Front Biosci*, 2004, 9(1-3):1833-1842.
- [9] BAUMAN D E, MATHER I H, WALL R J, et al. Major advances associated with the biosynthesis of milk[J]. *J Dairy Sci*, 2006, 89(4):1235-1243.
- [10] KLEEN J L, HOOIJER G A, REHAGE J, et al. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review[J]. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 2003, 50(8):406-414.
- [11] DONG H, WANG S, JIA Y, et al. Long-term effects of subacute ruminal acidosis (SARA) on milk quality and hepatic gene expression in lactating goats fed a high-concentrate diet. [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82850.
- [12] 张 伟, 苗晋锋, 王艳霞, 等. 苏钟猪 ACE 2 基因克隆及其遗传进化分析[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(1): 86-91.  
ZHANG W, MIAO J F, WANG Y X, et al. Cloning of ACE 2 gene of Suzhong pigs and its phylogenetic analysis[J]. *Jiangsu Journal of Agriculture Sciences*, 2012, 28(1):86-91. (in Chinese)
- [13] WARNER F J, LEW R A, SMITH A I, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE 2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(47):39353-39362.
- [14] 郭抗抗, 张为民, 张彦明, 等. 奶牛隐性乳房炎的调查分析[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(11):26-29.  
GUO K K, ZHANG W M, ZHANG Y M, et al. Investigation and analysis on subclinical mastitis of cow [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2010, 31(11):26-29. (in Chinese)
- [15] PATEL V B, MORI J, MCLEAN B A, et al. ACE 2 deficiency worsens epicardial adipose tissue inflammation and cardiac dysfunction in response to diet-induced obesity[J]. *Diabetes*, 2016, 65(1):85-95.
- [16] KÜÇÜK M U, SUCU N, FIRAT S Ş, et al. Role of ACE I/D gene polymorphisms on the effect of ramipril in inflammatory response and myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass grafts[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2014, 70(12): 1443-1451.
- [17] YUAN S T, ELLINGROD V L, SCHIPPER M, et al. Genetic variations in TGFβ1, tPA, and ACE and radiation-induced thoracic toxicities in patients with non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 314(13):195-201.
- [18] SINGER D, CAMARGO S M, RAMADAN T, et al. Defective intestinal amino acid absorption in ACE 2 null mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(6):686-695.
- [19] XU T, TAO H, CHANG G, et al. Lipopolysaccharide derived from the rumen down-regulates stearoyl-CoA desaturase 1 expression and alters fatty acid composi-



- tion in the liver of dairy cows fed a high-concentrate diet[J]. *BMC Vet Res*, 2015, 11(z1):1-11.
- [20] LE R Y, LAURENT F, MOUSSAOUI F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change[J]. *Vet Res*, 2003, 34(5):629-645.
- [21] HALL S M, RYCROFT A N. Causative organisms and somatic cell counts in subclinical intramammary infections in milking goats in the UK[J]. *Vet Rec*, 2007, 160(1):19-22.
- [22] MORONI P, PISONI G, RUFFO G, et al. Study of intramammary infections in dairy goats from mountainous regions in Italy[J]. *N Z Vet J*, 2005, 53(5):375-376.
- [23] YU C, TANG W, WANG Y, et al. Downregulation of ACE 2/Ang-(1-7)/mas axis promotes breast cancer metastasis by enhancing store-operated calcium entry[J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(2):268-277.
- [24] MA C, XIN H, JIANG X Y, et al. Relationship between renal injury and the antagonistic roles of angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13 (2):2333-2242.
- [25] ZHANG W, MIAO J, LI P, et al. Up-regulation of components of the ennin - angiotensin system in liver fibrosis in the rat induced by CCL4[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 95(1):54-58.

(编辑 程金华)