

ACE2 基因过表达减轻血管紧张素 II 诱导的神经细胞氧化应激*

彭雯雯, 刘国英, 潘燕霞[△], 赵晓霖

(福建医科大学医学技术与工程学院康复治疗学系, 福建 福州 350004)

[摘要] **目的:** 探讨过表达血管紧张素转换酶 2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 基因对血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II) 诱导的小鼠神经母细胞瘤 Neuro-2A 细胞氧化应激和 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)表达的影响。**方法:** 构建 ACE2 重组慢病毒载体, 以感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 10 转染 Neuro-2A 细胞 72 h, 测定 ACE2 基因转染效率和 ACE2 蛋白表达, 并检测神经细胞标志物以鉴定 Neuro-2A 细胞。Neuro-2A 细胞分为 7 组: 空白对照(control)组、慢病毒载体(eGFP)组、重组 ACE2(ACE2-eGFP)组、Ang II 刺激(Ang II)组、Ang II + 慢病毒载体(Ang II-eGFP)组、Ang II + ACE2(Ang II-ACE2-eGFP)组和 Ang II + 重组 ACE2 + A779(Ang II-ACE2-eGFP-A779)组。采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定 Ang(1-7)水平, DHE 染色法检测活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平, Western blot 检测 MAS 受体及 NOX 亚基(NOX2、NOX4、p47^{phox}和 p67^{phox})蛋白表达。**结果:** Ang II 显著增加 Neuro-2A 细胞 ROS 水平($P < 0.01$), 上调 NOX2、NOX4、p47^{phox}和 p67^{phox}蛋白表达($P < 0.01$), 但下调 MAS 蛋白表达($P < 0.01$)。ACE2 过表达抑制 Ang II 诱导的 ROS 增加($P < 0.05$), 下调 NOX2、NOX4、p47^{phox}和 p67^{phox}蛋白表达($P < 0.01$), 还可增加神经细胞 Ang(1-7)含量($P < 0.01$)和 MAS 受体表达($P < 0.01$)。MAS 受体拮抗剂 A779 能阻断 ACE2 下调 NOX 表达的作用($P < 0.05$)。**结论:** ACE2 过表达通过 MAS 受体对抗 Ang II 诱导的神经细胞氧化应激。

[关键词] 血管紧张素转换酶 2; Neuro-2A 细胞; 氧化应激; NADPH 氧化酶; MAS 受体

[中图分类号] R544.1; R363.2

[文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.06.019

Over-expression of ACE2 gene alleviates Ang II-induced oxidative stress in neural cells

PENG Wen-wen, LIU Guo-ying, PAN Yan-xia, ZHAO Xiao-lin

(Department of Rehabilitation Medicine, Medical Technology and Engineering, College of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China. E-mail: ypan266@sina.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of over-expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) gene on angiotensin II (Ang II)-induced oxidative stress and NADPH oxidase (NOX) expression in mouse neuroblastoma Neuro-2A cells. **METHODS:** The recombinant lentivirus encoding ACE2 gene was constructed and transfected into the Neuro-2A cells at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 72 h. The transfection efficiency of ACE2 gene and protein expression of ACE2 were detected, and the Neuro-2A cells were identified by detection of a neural cell marker. The Neuro-2A cells were divided into 7 groups: control group, eGFP group, ACE2-eGFP group, Ang II treatment group, Ang II-eGFP group, Ang II-ACE2-eGFP group and Ang II-ACE2-eGFP-A779 group. The Ang(1-7) level was determined by ELISA. The level of reactive oxygen species (ROS) in the cells was measured with a method of DHE staining. The protein expression of MAS receptor and NOX subunits (NOX2, NOX4, p47^{phox} and p67^{phox}) was detected by Western blot. **RESULTS:** Ang II significantly increased ROS levels ($P < 0.01$) and up-regulated the protein expression of NOX2, NOX4, p47^{phox} and p67^{phox} ($P < 0.01$), but down-regulated MAS protein expression ($P < 0.01$). Over-expression of ACE2 inhibited Ang II-induced increase in ROS, down-regulated the protein expression of NOX2, NOX4, p47^{phox} and p67^{phox}, and still increased the Ang (1-7) level ($P < 0.01$) and MAS receptor expression ($P < 0.01$). An antagonist of the MAS receptor, A779, blocked the down-regulating effect of ACE2 on NOX expression ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** ACE2 over-expression antagonizes Ang

[收稿日期] 2019-01-07 [修回日期] 2019-04-17

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81372111); 福建省自然科学基金资助项目 (No. 2014J01339)

△通讯作者 Tel: 0591-83574533; E-mail: ypan266@sina.com

II-induced oxidative stress via MAS receptor in the neural cells.

[KEY WORDS] Angiotensin-converting enzyme 2; Neuro-2A cells; Oxidative stress; NADPH oxidases; MAS receptor

中枢氧化应激是高血压发生发展的病理生理机制,血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)是刺激活性氧生成的关键因素^[1-2]。然而,血管紧张素转换酶 2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)能降解 Ang II 生成血管紧张素(1-7)[angiotensin(1-7), Ang(1-7)],后者与 MAS 受体结合拮抗 Ang II 作用^[3]。在中枢神经系统,高血压大鼠延髓心血管中枢 ACE2 降低,而过表达 ACE2 则降低血压^[4]。中枢 ACE2 过表达还可阻止 Ang II 介导的升压反应^[5]。在 Ang II 诱导的高血压小鼠,过表达 ACE2 基因延缓高血压进展^[6]。中枢 ACE2 在心血管疾病(高血压和慢性心衰)中的作用日益受到重视^[7]。研究表明,ACE2 降压作用与其抑制中枢交感神经活动^[6, 8]、减轻氧化应激^[7-8]、增强压力反射功能^[6-7]等有关。自发性高血压大鼠过表达 ACE2 能降低心脏、肾脏和动脉内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平^[5];相反,ACE2 基因敲除加剧 Ang II 灌注所致脑内活性氧水平升高,过表达 ACE2 则降低脑内 ROS 水平,抑制还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)表达,从而降低血压^[8]。

尽管 ACE2 能对抗 Ang II 诱导的氧化应激,在高血压和心力衰竭等心血管疾病中发挥重要作用,但 ACE2 引起氧化应激的通路尚未完全清楚。由于在整体动物,ACE2 的作用受到神经和激素因素的影响,所以本研究在体外培养的神细胞 Neuro-2A,将携带 ACE2 基因的慢病毒转染神经细胞,探讨过表达 ACE2 对 Ang II 诱导氧化应激的影响及其作用机制,为 ACE2 作为心脑血管疾病新的治疗靶标提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 细胞和材料

小鼠脑神经母细胞瘤 Neuro-2A 细胞购买于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。DMEM 高糖培养液和胰酶(含 EDTA)购自 HyClone;胎牛血清购自 GEMINI;ACE2 重组慢病毒载体(lentil-ACE2-eGFP)和慢病毒空载体携带绿色荧光蛋白(lentil-eGFP)由上海吉凯基因化学有限公司构建。Ang II、A779 和 dihydroethidium (DHE)购自 MCE;Ang(1-7) ELISA 试剂盒购自武汉华美生物科技有限公司;兔单克隆 ACE2、AT1 受体、NADPH 氧化酶(NADPH

oxidase, NOX)2 和 NOX4 抗体购自 Abcam;兔多克隆 MAS 抗体购自 Alomone;兔多克隆 p47^{phox} 和 p67^{phox} 抗体购自 Abcam;兔单克隆 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP 等购自北京鼎国公司;Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG 购自 Abcam。

2 方法

2.1 细胞培养 Neuro-2A 细胞在含 10% 胎牛血清、 1.0×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养液中,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱内常规传代培养。实验所用细胞均为对数生长期细胞。待培养瓶内细胞融合度达 80% 以上时进行传代培养,实验在第 3 代细胞上进行。

2.2 ACE2 基因重组慢病毒载体构建 ACE2 基因重组慢病毒表达载体由上海吉凯基因化学有限公司构建。ACE2 基因全长 2 459 bp,序列号为 NM_021804。利用 PCR 技术进行扩增人源 ACE2 cDNA 片段,引物序列为:正义序列 5'-GAGGATCCCCGGG-TACCGGTCGCCACCATGTCAAGCTCTTCCTGGCTCC-TTC-3';反义序列 5'-TCCTTG TAGTCCATACCAAAG-GAGGTCTGAACATCATCAGTG-3'。将扩增的人源 ACE2 基因片段与慢病毒载体 GV358 进行同源重组,酶切克隆位点为 Age I/Age I,形成目的基因慢病毒为 GV358-ACE2。阳性克隆测序证实测序结果与 GenBank 网站上人源 ACE2 序列一致。将连接成功的 GV358-ACE2 慢病毒转染 293T 细胞,通过抽提病毒、浓缩和病毒滴度测定,最终获得 ACE2 重组慢病毒的滴度为 5×10^{11} TU/L。

2.3 实验分组 Neuro-2A 细胞接种 36 h,细胞达到 50% ~ 60% 融合时,慢病毒载体和重组 ACE2 以感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 10 加入培养液中,培养 10 h 后弃去病毒液,加入新鲜的正常培养液继续培养 96 h 提取细胞总蛋白。实验共分为 7 组:空白对照(control)组、慢病毒载体(eGFP)组、重组 ACE2(ACE2-eGFP)组、Ang II 刺激(Ang II)组、Ang II + 慢病毒载体(Ang II-eGFP)组、Ang II + 重组 ACE2(Ang II-ACE2-eGFP)组和 Ang II + 重组 ACE2 + A779(Ang II-ACE2-eGFP-A779)组。

空白对照组不做任何处理。eGFP 组和 ACE2-eGFP 组均以 MOI = 10 将慢病毒转染神经细胞。

Ang II 干预组:预实验时,以终浓度为 1 000、100、10 和 1 nmol/L 的 Ang II 孵育细胞 24 h 后检测 AT1 受体蛋白水平,以此确定 Ang II 最佳浓度为 100

nmol/L^[9]。

A779 干预组: Ang(1-7)拮抗剂 A779 以终浓度为 10 μ mol/L 加入培养液预处理 30 min 后,与 Ang II 共刺激细胞 24 h。

2.4 Neuro-2A 细胞的组织学鉴定 用镊子取出 6 孔板中的细胞爬片,预温 37 $^{\circ}$ C 的 PBS 洗涤 2 次。预温 37 $^{\circ}$ C 的 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。0.2% Triton 透化 15 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。5% 羊血清室温封闭 1 h,甩干,勿洗。滴加适量兔抗 NeuN 抗体(1:200)于盖玻片上,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次,每孔 2 mL,每次 5 min。滴加适量 Alexa Fluor 594 标记的羊抗兔 IgG(1:500)于盖玻片上,室温避光孵育 2 h。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。滴加适量抗荧光淬灭剂避光孵育 5 min,吸除多余抗荧光淬灭剂,中性树脂封片,应用正置荧光显微镜进行观察并拍照。

2.5 ACE2 重组慢病毒转染 Neuro-2A 细胞 选用第 3 代生长状态良好的神经细胞,按照 5×10^7 /L 细胞密度接种 2 mL 到 6 孔板中。待细胞生长融合至孔底面积的 50% 左右时,更换为无血清的 DMEM 饥饿培养 12 h。慢病毒以 MOI 为 10 感染 Neuro-2A 细胞 10 h 后,弃去病毒液,更换为完全培养液继续培养。病毒感染 72 h 后,通过荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况。感染 96 h 后,使用细胞裂解液提取总蛋白。

2.6 原位检测细胞内 ROS 水平 Neuro-2A 细胞按照每孔 2.5×10^4 个细胞密度接种到 24 孔板中,加入 lentil-eGFP 和 lentil-ACE2-eGFP 进行转染,72 h 后加入 Ang II(100 nmol/L)继续培养 24 h。96 h 后弃去旧培养液,室温下 PBS 漂洗 3 次,加入含有 2 μ mol/L DHE 荧光探针的 DMEM 培养液 500 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,继续用 PBS 洗涤细胞 3 次,在荧光显微镜下观察并拍照。利用 ImageJ 软件进行荧光强度分析。

2.7 ELISA 法测定 Ang(1-7)水平 Neuro-2A 细胞加入裂解液提取细胞蛋白,4 $^{\circ}$ C、13 500 \times g 离心 20 min,取上清放入新的 EP 管中。采用 ELISA 试剂盒(CSB-E13763m)测定 Ang(1-7)水平,按照说明书步骤进行操作^[5]。

2.8 ACE2、MAS 受体和 NADPH 氧化酶蛋白水平检测 收集各组细胞,预冷 PBS 冲洗 2 次,加入细胞裂解液(RIPA:PMSF:蛋白酶抑制剂=100:1:1),冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C、13 500 \times g 离心 20 min,上清为细胞总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μ g

蛋白进行 SDS-PAGE 电泳(10% 分离胶)、湿转恒压 100 V,5% 的脱脂奶粉室温下封闭 1 h,分别孵育兔抗 ACE2、p47^{phox}、p67^{phox}(1:1 000)及兔抗 MAS、NOX2、NOX4(1:2 000),4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。次日 TBST 洗 3 次,每次 10 min。II 抗(1:3 000)室温摇床 1 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min。加入 ECL 发光液进行显色、曝光。利用 ImageJ 软件进行灰度值分析,以 GAPDH 作为内参照,结果采用目的蛋白与 GAPDH 蛋白比值表示。

3 统计学分析

上述每个独立实验均重复 3 次以上,全部数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,采用 SPSS 20.0 软件系统进行统计学分析。各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),再采用最小显著性差异法(LSD 法)进行两两比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 体外培养 Neuro-2A 细胞鉴定及 ACE2 基因转染

神经细胞标志物神经元核抗原(neuronal nuclear antigen, NeuN)在荧光显微镜下呈现红色。图 1A 可见 Neuro-2A 细胞胞浆呈红色,证明为神经细胞。慢病毒载体上携带绿色荧光蛋白,重组 ACE2 转染神经细胞 72 h 后,图 1B 显示 80% 以上的细胞呈现绿色荧光,说明 ACE2 基因成功导入神经细胞中。图 1C 是 A 和 B 的重叠,提示导入 ACE2 基因的细胞是神经细胞。慢病毒载体和重组 ACE2 以 MOI = 10 感染 Neuro-2A 细胞 72 h 后,图 1D 显示空白对照组和慢病毒载体组不表达 ACE2 蛋白,ACE2 基因导入组 ACE2 蛋白水平为空白对照组的 1.45 ± 0.31 倍($P < 0.05$)。

2 Ang II 干预对 AT1 受体蛋白表达的影响

AT1 受体蛋白表达水平随 Ang II 浓度升高而增加,呈现浓度依赖性,AT1 受体蛋白较空白组显著增加($P < 0.05$),其中 100 nmol/L 组的 AT1 受体蛋白表达达到峰值,故作为本实验后续的干预浓度,见图 2。

3 ACE2 过表达对 Ang II 诱导的 ROS 水平的影响

重组 ACE2 基因转染培养的神经细胞,其 ROS 水平与空白对照组无显著差异($P > 0.05$)。Ang II 刺激显著升高 ROS 水平($P < 0.01$),但 ACE2 基因过表达能抑制 Ang II 引起的 ROS 水平升高($P < 0.01$),ACE2 基因转染 + Ang II 组 ROS 显著低于 Ang II 处理组($P < 0.05$),见图 3。

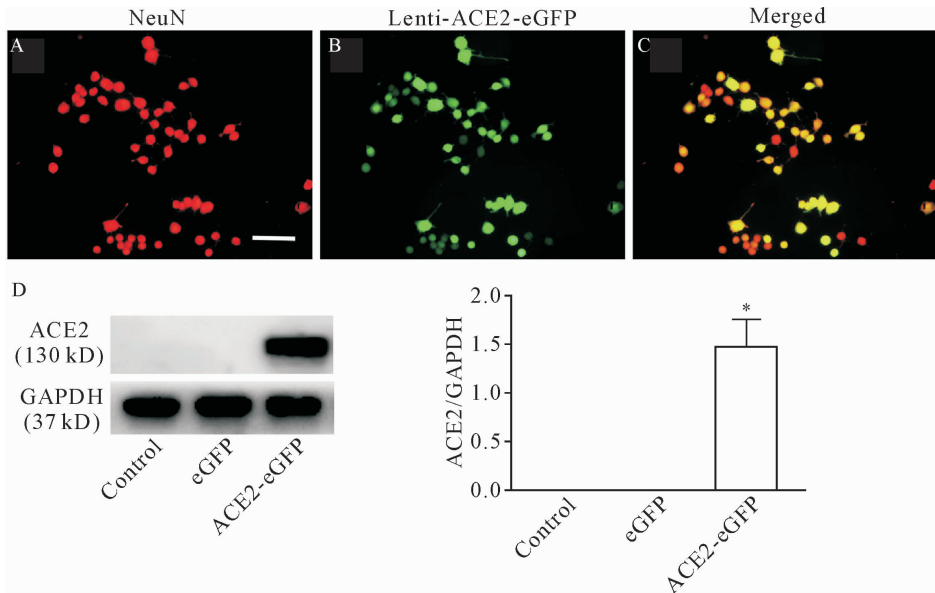


Figure 1. Identification of the Neuro-2A cells and *ACE2* gene transfection. A: NeuN positive cells (red); B: *ACE2*-transfected cells (green); C: merged image of A and B; D: *ACE2* protein expression after *ACE2* transfection. The scale bar = 50 μ m. Mean \pm SD. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs the control or eGFP group.

图1 Neuro-2A 细胞鉴定及 *ACE2* 基因转染

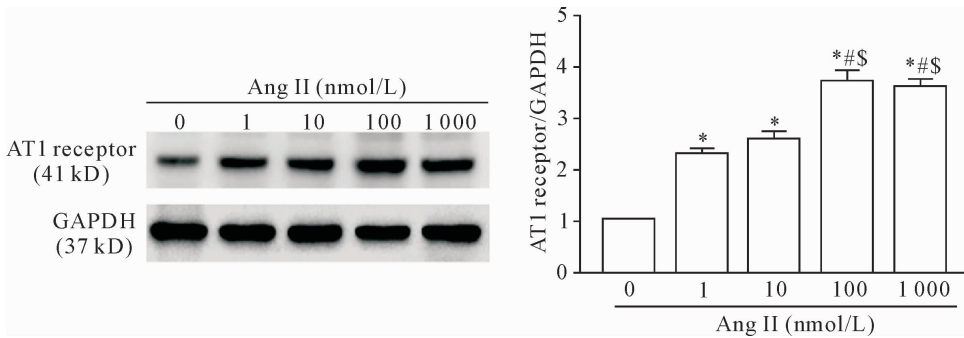


Figure 2. The effects of various concentrations of Ang II on AT1 receptor protein expression in the Neuro-2A cells. Mean \pm SD. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs 0 nmol/L; # $P < 0.05$ vs 1 nmol/L; \$ $P < 0.05$ vs 10 nmol/L.

图2 Ang II 诱导 Neuro-2A 细胞 AT1 受体蛋白表达的量效关系

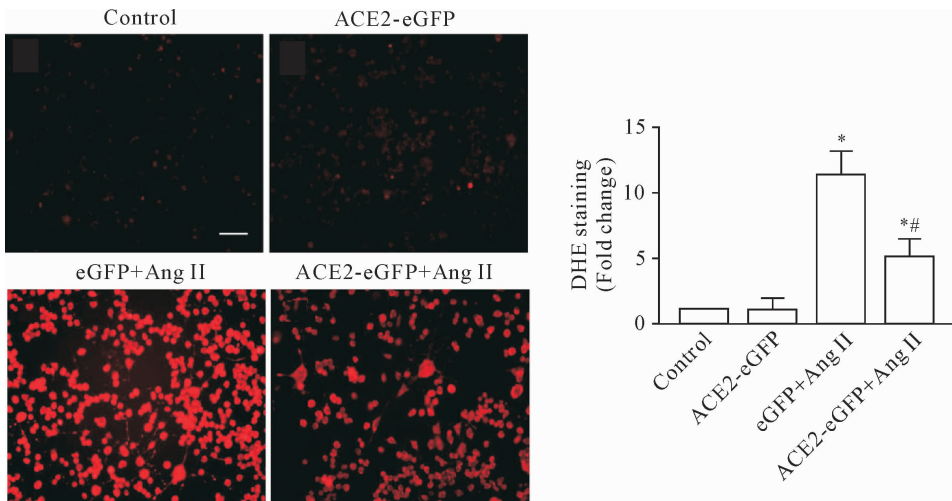


Figure 3. The changes of reactive oxygen species in the Neuro-2A cells (DHE staining). The scale bar = 50 μ m. Mean \pm SD. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs eGFP + Ang II group.

图3 DHE 染色显示 Neuro-2A 细胞内活性氧变化

4 ACE2 过表达对 Ang II 诱导的 NADPH 氧化酶的影响

空白对照组和慢病毒载体组的 NOX2、NOX4、p47^{phox} 和 p67^{phox} 蛋白表达无显著差异。Ang II 处理组 NOX2、NOX4、p47^{phox} 和 p67^{phox} 的蛋白表达显著高于

对照组 ($P < 0.01$)，ACE2 基因过表达则抑制 Ang II 诱导 NOX2、NOX4、p47^{phox} 和 p67^{phox} 的蛋白表达 ($P < 0.01$)。慢病毒载体不影响 Ang II 上调 NOX2、NOX4、p47^{phox} 和 p67^{phox} 蛋白表达的作用，见图 4。

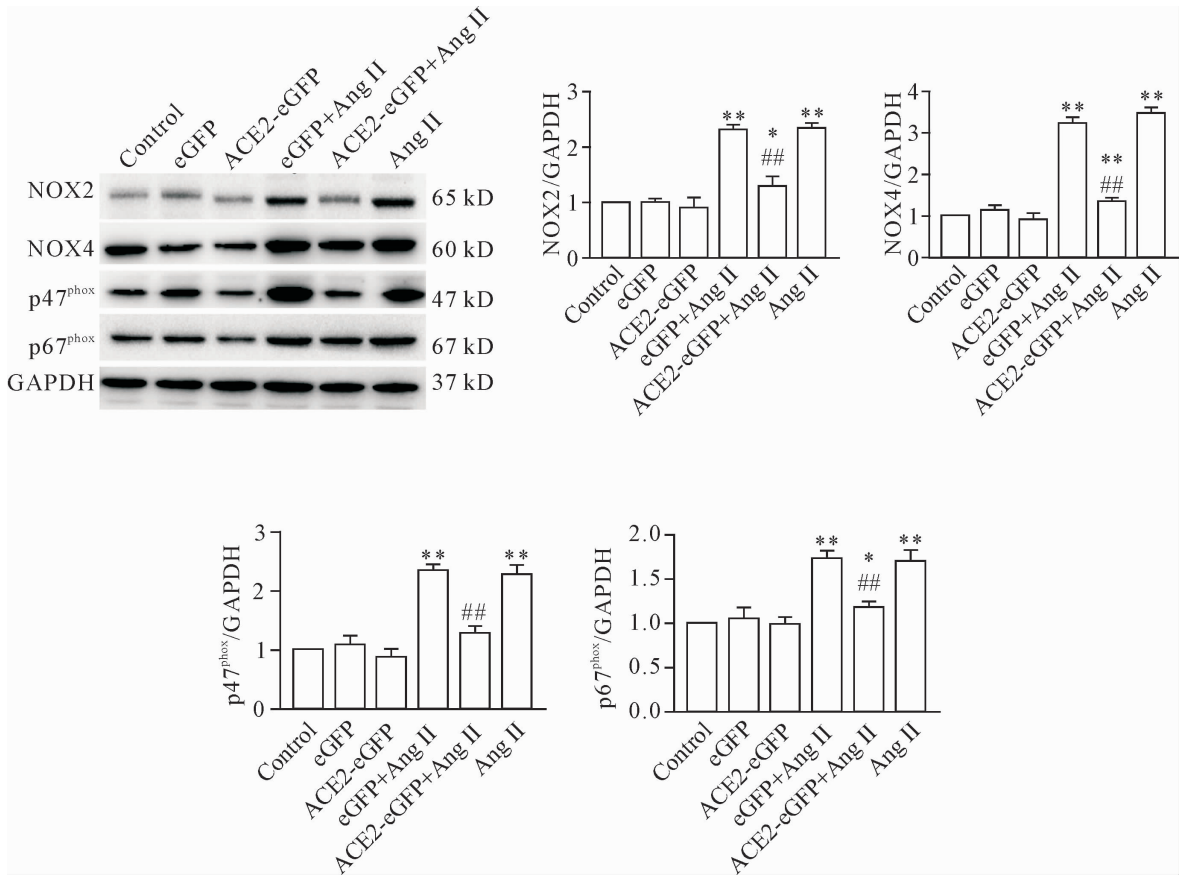


Figure 4. The effect of ACE2 over-expression on the protein expression of NADPH oxidase (NOX) in the Neuro-2A cells. Mean \pm SD. $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs eGFP + Ang II group.

图 4 ACE2 过表达对 Neuro-2A 细胞 NADPH 氧化酶蛋白表达的影响

5 ACE2 过表达对 Ang II 诱导的 Ang(1-7) 水平的影响

空白对照组、慢病毒载体组和 ACE2-eGFP 组的 Ang(1-7) 水平无显著差异 ($P > 0.05$)。Ang II 处理组或病毒空载体 + Ang II 组也不影响 Ang(1-7) 水平 ($P > 0.05$)，但 ACE2-eGFP + Ang II 组 Ang(1-7) 水平显著升高于空白对照组和 Ang II 处理组 ($P < 0.05$)，见图 5A。

6 ACE2 过表达对 Ang II 诱导的 MAS 蛋白表达的影响

空白对照组、慢病毒载体组和重组 ACE2 组，3 组 MAS 蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$)。Ang II 处理显著下调 MAS 蛋白表达 ($P < 0.01$)，慢病毒载体 + Ang II 组 MAS 蛋白表达也显著低于空白对照组 ($P < 0.05$)，ACE2-eGFP + Ang II 组 MAS 蛋白表达

较单独 Ang II 处理组显著上调 ($P < 0.05$)，见图 5B。

7 Ang(1-7) 受体拮抗剂对 NADPH 氧化酶的影响

与空白对照组相比，Ang II 处理显著增强 NOX2、NOX4、p47^{phox} 和 p67^{phox} 蛋白表达 ($P < 0.01$)。ACE2 基因过表达则显著降低 Ang II 介导的 NOX2、NOX4、p47^{phox} 和 p67^{phox} 蛋白表达 ($P < 0.05$)，但这种作用可以被 MAS 受体拮抗剂 A779 所阻断 ($P < 0.05$)，见图 6。

讨 论

ACE2 是血管紧张素转换酶的同源物，但作用与其相反。ACE2 主要作用是降解 Ang II 生成 Ang(1-7)，一方面 Ang II 水平降低，能改善与 Ang II 相关的疾病；另一方面，Ang(1-7) 水平升高，对 Ang II 产生负性调节作用^[10]。因此，ACE2 能调节 Ang II/Ang(1-7) 平衡。在整体水平，ACE2 基因功能受到神经

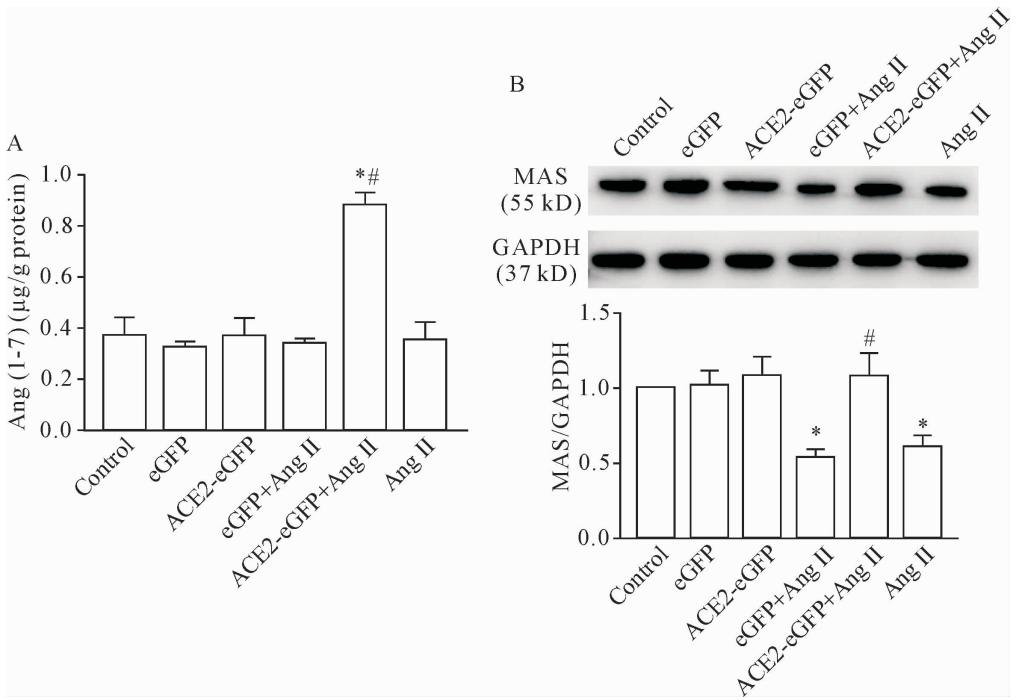


Figure 5. The effect of ACE2 over-expression on Ang(1-7) level (A) and MAS protein expression (B) in Neuro-2A cells. Mean ± SD. $n=4$. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs eGFP + Ang II group.

图5 ACE2 过表达对 Neuro-2A 细胞 Ang(1-7) 水平和 MAS 蛋白表达的影响

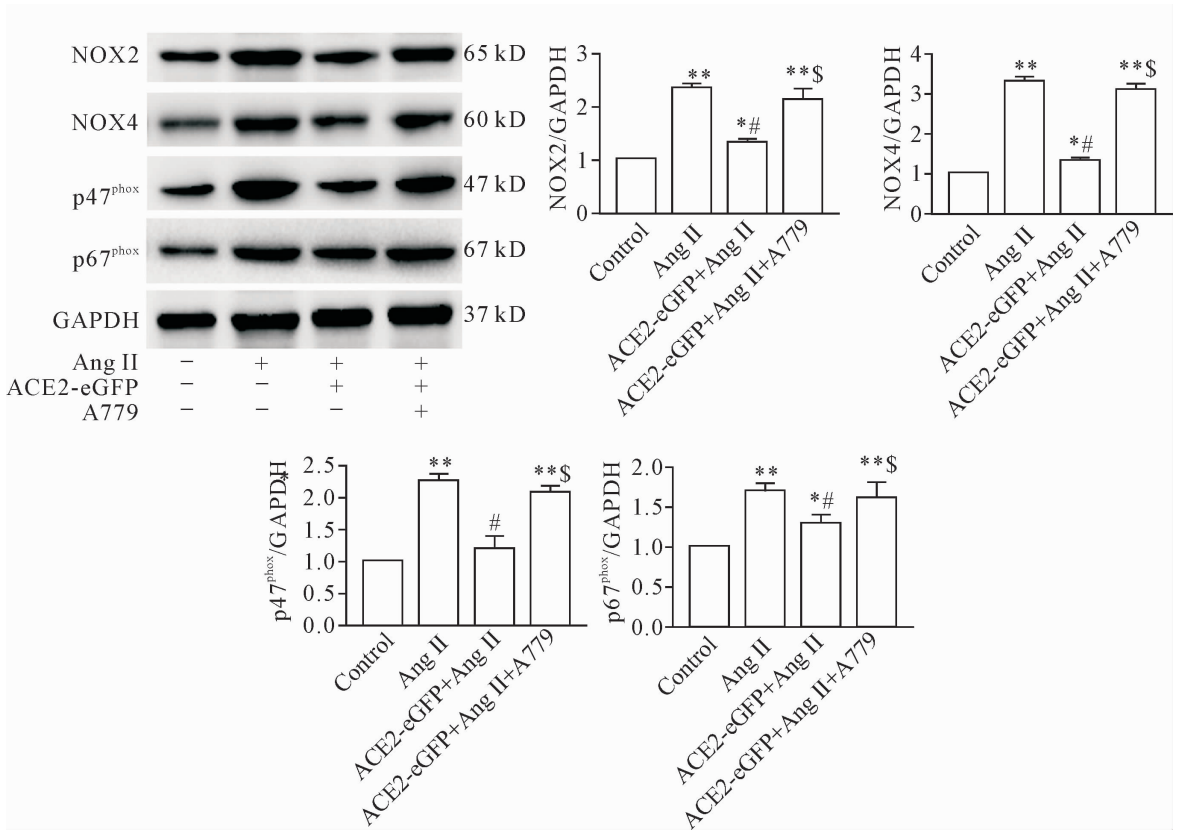


Figure 6. Effects of MAS receptor antagonist A779 on the protein expression of NADPH oxidase in the Neuro-2A cells. Mean ± SD. $n=4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs Ang II group; \$ $P < 0.05$ vs ACE2-eGFP + Ang II group.

图6 MAS 受体拮抗剂 A779 对 Neuro-2A 细胞 NADPH 氧化酶表达的影响

和其体液因素影响。为研究 ACE2 基因在中枢神经系统中作用及其下游信号通路,本实验选用培养的

神经细胞,探讨 ACE2 过表达对 Ang II 诱导的氧化应激的影响及其介导因素。Neuro-2A 细胞是脑神经瘤

细胞,主要用于研究神经细胞的分化、轴突生长及中枢信号通路等。它含有肾素-血管紧张素系统大多数成分,如肾素、Ang II 和 AT1 受体等,但 ACE2 含量非常少。若没有外来刺激,几乎无法检测到 ACE2 蛋白表达。因此,Neuro-2A 细胞是研究 ACE2 基因功能的理想模型^[11]。本实验采用同源重组技术构建携带 ACE2 和 eGFP 双基因的慢病毒载体,并转染 Neuro-2A 细胞,在荧光显微镜下,Neuro-2A 细胞检测到绿色荧光,说明 ACE2 基因已成功进入 Neuro-2A 细胞。NeuN 是神经细胞标志物^[12],采用免疫荧光技术对 Neuro-2A 细胞进行染色,Neuro-2A 细胞在荧光显微镜下也检测红色荧光,从而证实 ACE2 成功导入的 Neuro-2A 细胞是神经细胞。Western blot 显示神经细胞内 ACE2 蛋白高表达,进一步证明 ACE2 成功导入神经细胞,为后续研究奠定基础。

Ang II 是引起细胞氧化应激的主要刺激物^[13],本实验在培养神经细胞加入 100 nmol/L Ang II,细胞内 ROS 水平较空白对照组增加了 (10.26 ± 1.9) 倍,ACE2 基因显著抑制 Ang II 诱导的 ROS 水平升高。在培养血管内皮细胞,ACE2 基因过表达也产生抑制细胞氧化应激的作用^[14]。细胞内 ROS 水平升高主要来自 NADPH 氧化酶激活^[15-16]。正常情况下 NADPH 氧化酶由胞膜上 NOX2 (gp91^{phox}) 和 p22^{phox} 亚基,以及胞浆 p47^{phox} 和 p67^{phox} 亚基组成,胞膜上亚基与胞浆亚基分离,NADPH 氧化酶没有活性。但在 Ang II 刺激下,胞浆内亚基活化,并转位到胞膜上,与胞膜上亚基结合,激活 NADPH 氧化酶,导致 ROS 生成增多^[2]。本研究也观察到,在 Ang II 刺激下,NADPH 氧化酶 NOX2、NOX4、p47^{phox} 和 p67^{phox} 亚基蛋白表达均上调,显著高于空白对照组,但 ACE2 基因过表达则显著抑制 Ang II 诱导的 NOX2、NOX4、p47^{phox} 和 p67^{phox} 表达。ACE2 基因以慢病毒为载体,本研究结果显示,慢病毒载体不影响 Ang II 对 NADPH 氧化酶的刺激作用。在没有 Ang II 刺激情况下,单独 ACE2 基因过表达也不影响 NADPH 氧化酶亚基的表达。在培养的血管内皮细胞,Ang II 刺激明显增加 NADPH 氧化酶亚基 p22^{phox} 的表达,而 ACE2 基因过表达则明显抑制 p22^{phox} 表达^[14]。此外,ROS 水平升高还与 NADPH 氧化酶激活有关。Zhong 等^[17]报道 Ang II 能增强 NADPH 氧化酶活性,促进 ROS 生成增加。若敲除 ACE2 基因则增加肾脏 ROS 水平和 NADPH 氧化酶活性^[18]。上述研究结果表明 ACE2 过表达通过抑制 NADPH 氧化酶表达和活性而减轻 Ang II 诱导的氧化应激。

为了明确介导 ACE2 作用的下游信号通路,本实

验检测 Ang(1-7) 水平和 MAS 受体表达。结果表明,Neuro-2A 细胞内 Ang(1-7) 较低水平,给予 Ang II 刺激后,Ang(1-7) 水平无明显变化,这与 Zhang 等^[19] 结果不一样,Zhang 等^[19] 报道 Ang II 刺激后,内皮细胞内 Ang(1-7) 水平明显下降。造成这个差异可能由于内皮细胞存在内源性 ACE2,Ang II 刺激后,Ang II 浓度升高抑制 ACE2 酶活性,导致 Ang(1-7) 生成减少。而 Neuro-2A 细胞几乎测不到内源性 ACE2,加入 Ang II 对神经细胞内 Ang(1-7) 水平无明显影响。然而,神经细胞过表达 ACE2 后,Ang II 刺激不仅不能降低 Ang(1-7),反而显著提高 Ang(1-7) 水平。其可能原因是,外源性 Ang II 浓度高于生理水平,ACE2 过表达使 Ang II 分解为 Ang(1-7) 增多,从而提高神经细胞 Ang(1-7) 水平。Lo 等^[5] 报道正常大鼠灌注 Ang II,引起血浆 Ang II 水平升高,Ang(1-7) 水平降低,ACE2 过表达则升高血浆 Ang(1-7)。本实验 ACE2 过表达取消了 Ang II 抑制 MAS 受体表达的作用,MAS 受体蛋白水平恢复,接近于空白对照组水平。同样地,Sriramula 等^[20] 在 Ang II 灌注诱导高血压大鼠模型中,Ang II 灌注下调 ACE2 和 MAS 受体表达,而 ACE2 过表达则上调 MAS 受体表达。若无 Ang II 刺激,ACE2 基因过表达对神经细胞 Ang(1-7) 和 MAS 受体无明显影响。这说明 ACE2 过表达对正常情况无明显影响,但能够对抗 Ang II 作用。

为了明确 ACE2 抑制 NADPH 氧化酶表达是否由 MAS 受体介导的,本研究在 ACE2 过表达的神经细胞加入 MAS 受体阻断剂 A779,与 Ang II 共同处理神经细胞,结果表明 A779 取消了 ACE2 抑制 NADPH 氧化酶亚基表达的作用,A779 组 NOX2、NOX4、p47^{phox} 和 p67^{phox} 等蛋白表达升高,接近于单纯 Ang II 处理组,这一结果提示 ACE2 下调 NADPH 氧化酶表达是通过 MAS 受体介导的。在培养的脂肪细胞,Liu 等^[21] 证实 Ang(1-7) 可以降低 NADPH 氧化酶水平,抑制氧化应激,而 MAS 受体阻断剂 A779 可拮抗 Ang(1-7) 的作用。

综上所述,在 Ang II 诱导氧化应激的神经细胞,ACE2 基因过表达通过 MAS 受体介导减轻细胞氧化应激,这一作用与 NADPH 氧化酶表达降低有关。

[参 考 文 献]

- [1] Huber G, Schuster F, Raasch W. Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases [J]. Pharmacol Res, 2017, 125(Pt A):72-90.
- [2] Young CN, Davison RL. Angiotensin II, the brain, and hypertension: an update [J]. Hypertension, 2015, 66(5):920-926.

- [3] Xu P, Sriramula S, Lazartigues E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 300(4):R804-R817.
- [4] Yamazato M, Yamazato Y, Sun C, et al. Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes long-term decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2007, 49(4):926-931.
- [5] Lo J, Patel VB, Wang Z, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 antagonizes angiotensin II-induced pressor response and NADPH oxidase activation in wistar-kyoto rats and spontaneously hypertensive rats [J]. *Exp Physiol*, 2013, 98(1):109-122.
- [6] Feng Y, Xia H, Cai Y, et al. Brain-selective overexpression of human angiotensin-converting enzyme type 2 attenuates neurogenic hypertension[J]. *Circ Res*, 2010, 106(2):373-382.
- [7] Xia H, Lazartigues E. Angiotensin-converting enzyme 2: central regulator for cardiovascular function[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2010, 12(3):170-175.
- [8] Xia H, Suda S, Bindom S, et al. ACE2 mediated reduction of oxidative stress in the central nervous system is associated with improvement of autonomic function [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7):e22682.
- [9] 龚晶婧, 卢卓强, 曹金龙, 等. 血管紧张素转换酶2基因转染抑制大鼠平滑肌细胞血管紧张素 II 1型受体表达及下游转录激活子3信号通路[J]. *中华心血管杂志*, 2012, 40(7):607-613.
- [10] Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, et al. The ACE2/angiotensin-(1-7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1-7)[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(1):505-553.
- [11] Okamura T, Clemens DL, Inagami T. Renin, angiotensins, and angiotensin-converting enzyme in neuroblastoma cells: evidence for intracellular formation of angiotensins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, 78(11):6940-6943.
- [12] Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker[J]. *Acta Naturae*, 2015, 7(2):42-47.
- [13] 邓耀良, 黎承杨, 孙丙华. 血管紧张素 II 刺激高草酸尿症大鼠肾脏 NADPH 氧化酶的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(11):2131-2135.
- [14] 钟久昌, 余细勇, 于汇民, 等. 血管紧张素转换酶2基因转染对人血管内皮细胞中氧化应激水平的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16(6):499-502.
- [15] Rabelo LA, Alenina N, Bader M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease [J]. *Hypertens Res*, 2011, 34(2):154-160.
- [16] 潘燕霞, 王 玮. 中枢活性氧升高介导心力衰竭时压力感受性反射功能衰减[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(5):833-838.
- [17] Zhong J, Guo D, Chen CB, et al. Prevention of angiotensin II-mediated renal oxidative stress, inflammation, and fibrosis by angiotensin-converting enzyme 2[J]. *Hypertension*, 2011, 57(2):314-322.
- [18] Wysocki J, Ortiz-Melo DI, Mattocks NK, et al. ACE2 deficiency increases NADPH-mediated oxidative stress in the kidney[J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(3):e00264.
- [19] Zhang L, Wang J, Liang J, et al. Propofol prevents human umbilical vein endothelial cell injury from Ang II-induced apoptosis by activating the ACE2-(1-7)-Mas axis and eNOS phosphorylation[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7):e0199373.
- [20] Sriramula S, Cardinale JP, Lazartigues E, et al. ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(3):401-408.
- [21] Liu C, Lv XH, Li HX, et al. Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes[J]. *Acta Diabetol*, 2012, 49(4):291-299.

(责任编辑: 林白霜, 罗 森)