

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.032

异丙酚对人肺血管内皮细胞中 ACE II 表达的影响

沈 华¹ 徐铭术¹ 徐 锦¹ 王 茜¹ 周先科¹ 李志坚²

(1 长沙市八医院麻醉科 湖南 长沙 410100; 2 中南大学湘雅二医院麻醉科 湖南 长沙 410011)

摘要 目的:观察异丙酚对人肺动脉内皮细胞中 ACE2 的影响。**方法:**以人肺动脉内皮细胞为研究对象,利用 Real-time PCR 检测不同浓度(1、10、20、40、50 $\mu\text{mol/L}$)异丙酚在不同时间点(6、12、18、24、30h)对 HPAEC 中 ACE2 mRNA 表达的影响;Western Blot 检测不同浓度(1、10、20、40、50 $\mu\text{mol/L}$)异丙酚对 HPAEC 中 ACE2 蛋白表达的影响;观察磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抑制剂 LY294002 对异丙酚调节 HPAEC 中 ACE2 mRNA 表达的影响。**结果:**异丙酚呈剂量和时间依赖性可提高人肺动脉内皮细胞 ACE2mRNA 水平($P<0.05$)。但异丙酚浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时对 ACE2 mRNA 水平表达无明显影响($P>0.05$)。Western Blot 检测结果显示异丙酚可增加 HPAEC 中 ACE2 蛋白的表达,且在 24 h 内具有剂量依赖性。异丙酚在 24h 时剂量依赖性提高 Akt 的磷酸化,而 LY294002 可逆转异丙酚对 Akt 磷酸化的影响。**结论:**异丙酚可分别通过 PI3K/Akt 信号途径上调 ACE2 的表达,使 RAS 轴处在动态平衡中,从而发挥舒张血管和镇痛作用。

关键词:异丙酚;肾素/血管紧张素系统;血管紧张素转换酶 2

中图分类号:R614;R563;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)16-3119-04

Effect of Propofol on ACE2 Expression of Human Pulmonary Artery Endothelial Cells

SHEN Hua¹, XU Ming-shu¹, XU Jin¹, WANG Qian¹, ZHOU Xian-ke¹, LI Zhi-jian²

(1 The 8th Hospital of Changsha, Changsha, Hunan, 410100, China;

2 The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410011, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of propofol on Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) expression of human pulmonary artery endothelial cells. **Methods:** Original generation human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC) were taken as the objects. Real-time PCR were used to detect the effect of different concentrations (1, 10, 20, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$) of propofol for different time (6, 12, 18, 24, 30h) on the ACE2 mRNA expression in HPAEC; Western blot was also applied to detect the ACE2 protein expression in HPAEC after treated by propofol of different concentrations (1, 10, 20, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$). Observe the effect of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 on the regulation of propofol. **Results:** Propofol increased the ACE2 mRNA levels of treated cells in dose- and time-dependent manner ($P<0.05$), but had no effect on the ACE2 mRNA level when with a concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$. Western Blot detection results showed that propofol could increase the HPAEC ACE2 protein expression, and in a dose-dependent manner within 24 hours. In 24 hours, propofol increased the Akt phosphorylation dose-dependently, and LY294002 down-regulated the phosphorylation of Akt. **Conclusions:** Propofol increased the expression of ACE2 through the PI3K/Akt signaling pathways and rebalanced RAS axis, and thus played a role in relaxing blood vessels and had analgesic effects.

Key words: Propofol; Renin-Angiotensin System; Angiotensin-Converting Enzyme 2

Chinese Library Classification: R614; R563; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3119-04

前言

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是由多种病因引起的慢性疾病,主要表现为肺血管阻力和肺动脉压力的持续增高,最终导致右心衰竭,甚至死亡^[1]。尽管目前对肺动脉高压的临床治疗已经取得了很大的进步,但是其预后仍然很

差^[2]。肾素、血管紧张素系统(rennin-angiotensin system, RAS)是心血管内皮细胞功能和重构的重要调节系统,被认为是导致 PAH 发生的重要因素^[3]。在 RAS 中,血管紧张素原经肾素代谢产生血管紧张素 I (angiotensin I, AngI),AngI 再经血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)形成血管紧张素 II(angiotensin II, AngII)。ACE II 在肺动脉内皮细胞、肺泡上皮细胞和支气管上皮细胞中高度表达^[4,5],其在 PAH 形成过程中具有关键作用^[6-15]。

异丙酚(2,6-二异丙基苯酚,Propofol)是目前临床上广泛应用的静脉镇静麻醉药物^[4]。异丙酚除具有很强的麻醉作用外,

作者简介:沈华,副主任医师,研究方向:临床麻醉及应用研究,

Tel:13875938989, E-mail:358150953@qq.com

(收稿日期:2013-10-21 接受日期:2013-11-15)

还具有免疫调节、抗焦虑及镇痛、神经保护、抗缺血和低氧损伤等效应。研究表明异丙酚可有效抵抗血管内皮细胞损伤并可舒张人肺动脉^[5-7]。异丙酚是否可通过调控 ACE II 的表达参与抑制 PAH 的形成尚未见相关报道。本研究中,我们通过观察异丙酚对人肺动脉内皮细胞 ACE II 表达的影响,探讨异丙酚与 ACE II 之间的关系。

1 材料及方法

1.1 细胞

人肺动脉内皮细胞购自 Cell Applications Inc. (San Diego, Calif., USA)。

1.2 试剂

逆转录酶(SuperScript II)、核糖核酸酶抑制剂(RNasin)购自美国 Promega 公司;荧光定量试剂盒购自美国 BBI 公司;Anti-ACE2,anti-Akt (ser473) (sc-24500) 和 anti-P-Akt (ser473) (sc-101629) 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;其他试剂均购于北京鼎国公司。

1.3 方法

1.3.1 人肺血管内皮细胞培养 人肺血管内皮细胞以 0.1% I 型胶原酶 37℃ 温箱中消化 15 min。加入 DMEM 培养基终止反应,收集消化液,1000 r/min 离心 8 min。弃去上清,收集细胞,加入 DMEM 培养液悬浮细胞,计数细胞数量。分装于培养瓶中,置于 5% CO₂, 37℃ 培养箱内培养。传代培养:内皮细胞 4 h 即可贴壁,3-4 d 可长满培养瓶,以 0.25%胰蛋白酶消化传代。选择生长良好的第 2-5 代细胞用于实验。

1.3.2 实时定量 RT-PCR 提取 RNA, -80℃ 保存备用。按照逆转录试剂盒的说明书,分三步在冰盒内将实际依次加入 0.2 mL 的 PCR 专用反应管,并按步骤放入 PCR 仪中进行反应。人 ACE2 引物:上游 5'-GCAGCTAAGTATAATGGTCTCTG-3' 和下游 5'-AGTGTTCACCCCCACAAA-3';人 GAPDH 引物:上游 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3' 和下游 5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3' PCR 热循环参数:96℃ 4 min, 三步反应分别所处温度及时间:94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 进行 40 个循环,于每个循环的第三步即 72℃ 30s 收集荧光信号。以 GAPDH 为内参照基因,与对照组相比,得到目的基因表达的相对定量值,用于统计分析。

1.3.3 蛋白印迹分析 BCA 法测定各样本的蛋白浓度。将样品点入上样孔中以 80V 电压跑完上层胶,再以 120V 跑完下层胶。转膜电压 90V, 1.5 h。将膜完全浸入封闭液,室温摇动封闭。分别加入 1:200 稀释的 PKC γ 一抗及 1:10 000 稀释的 β -actin 一抗,室温在摇床上摇 2h。1× TBST 的洗 3 次,每次于脱色摇床摇 10 分钟。0.5 μ L 二抗稀释于 5 mL 0.1%Triton 封闭液中 (1:10000), 室温, 100RPM, 1 h。1× TBST 10 min× 3 次, 1500RPM, 室温。根据 Pierce 公司 ECL 检测液试剂盒进行显色操作。根据信号的强弱适当调整曝光时间,显影 1 min,定影 5 min。用 Quantity One 图像分析系统对蛋白条带进行分析,蛋白质的相对含量用目的蛋白与 e-actm 内参条带光密度的比值表示,按计量资料进行统计分析。

1.4 统计学分析

使用 SPSS17.0 对统计数据进行分析。数据值以平均值 $\pm$

标准差的形式表示。不同组间平均值的对照使用单变量 ANOVA 分析及配对 t 检验。

2 结果

2.1 异丙酚对人肺血管内皮细胞 ACE2 mRNA 表达的影响

异丙酚在浓度为 20 μ mol/L 时,随着时间的延长,增加人肺血管内皮细胞 ACE2 mRNA 的表达($P<0.05$)(见图 1)。异丙酚浓度在 10-40 μ mol/L 时,处理 24h 的时间范围内可呈剂量依赖性提高 ACE2 mRNA 的表达($P<0.05$)(见图 2)。但异丙酚浓度为 1 μ mol/L 时对 ACE2 mRNA 表达水平表达无明显影响($P>0.05$)。

ACE2 mRNA Lever

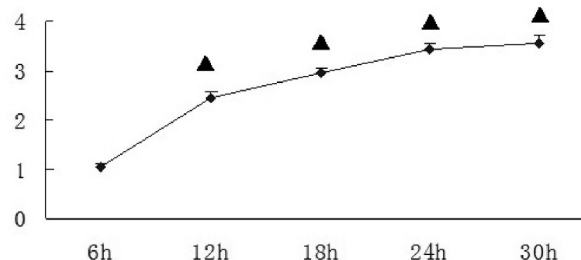


图 1 异丙酚处理人肺血管内皮细胞不同时间点 ACE2 mRNA 水平

注: ▲与 6 h 组比较, $P<0.05$

Fig. 1 The ACE2 mRNA levels of HPAEC after treated by propofol for different time

Note: ▲ Compared with the 6 h group, $P<0.05$.

ACE2 mRNA Lever

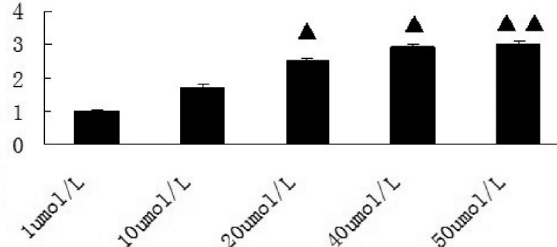


图 2 不同浓度异丙酚处理后的人肺血管内皮细胞 ACE2 mRNA 水平

注: ▲与 1 μ mol/L 组比较, $P<0.05$; ▲▲与 1 μ mol/L 组比较, $P<0.01$.

Fig. 2 The ACE2 mRNA levels of HPAEC after treated by propofol of different concentrations

Note: ▲ Compared with the 1 μ mol/L group, $P<0.05$; ▲▲ compared with the 1 μ mol/L group, $P<0.01$.

2.2 异丙酚对人肺血管内皮细胞 ACE2 蛋白表达的影响

Western Blot 检测显示异丙酚可增加人肺血管内皮细胞 ACE2 蛋白的表达,且在 24h 内具有剂量依赖性(图 3)。

2.3 PI3K 对人肺血管内皮细胞 mRNA 的影响

为观察异丙酚调节 ACE2 表达的信号途径,我们使用选择性磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抑制剂对人肺血管内皮细胞进行了处理,结果观察到选择性磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抑制剂 LY294002 可明显逆转异丙酚对人肺血管内皮细胞上 ACE2mRNA 水平的影响(图 4)。

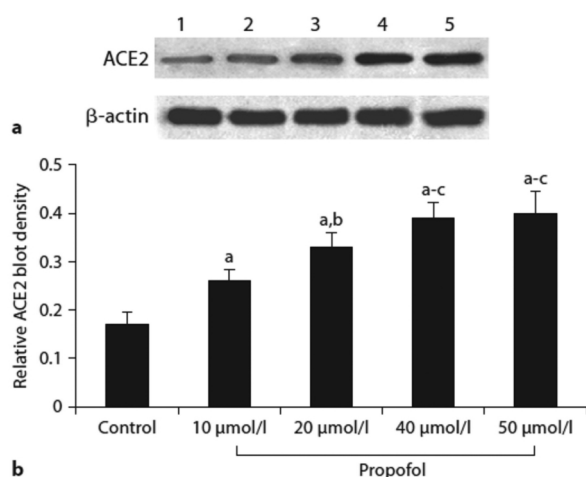


图3 免疫印迹分析使用异丙酚处理后人肺血管内皮细胞中 AngII 的表达

注: a. $P < 0.05$ 与未处理对照组相比。 b. $P < 0.05$ 与异丙酚浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组相比。
c. $P < 0.05$ 与异丙酚浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组相比。

Fig. 3 The AngII expression in HPAEC after treated by propofol detected by western blot

Note: a. $P < 0.05$ compared with the control group;

b. $P < 0.05$ compared with the group treated by 10 $\mu\text{mol/L}$ propofol;

c. $P < 0.05$ compared with the group treated by 20 $\mu\text{mol/L}$ propofol.

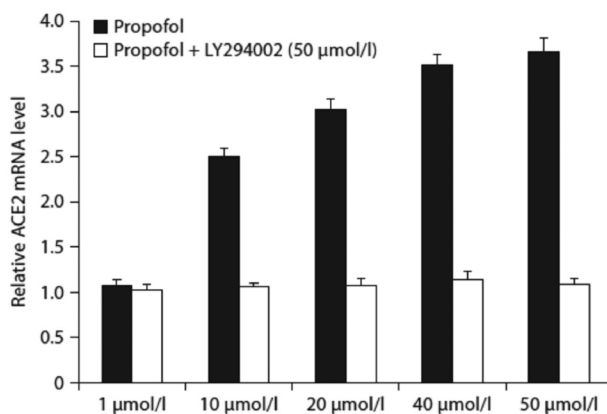


图4 LY294002 对异丙酚调节人肺血管内皮细胞中 ACE2 mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effect of LY294002 on the regulation of propofol to ACE2 mRNA expression in HPAEC

3 讨论

肺动脉高压是一种慢性肺部疾病,并且很难以早期诊断并且治疗方法有限。研究表明 ACE2 在肺疾病的发生发展,尤其是 PAH 形成过程中起到了关键作用^[7-11]。同时,AngII 作为 RAS 的关键性效应肽,能够对肺血管系统产生有害的影响,导致肺血管收缩、炎症反应和内膜增生等,这些变化均会导致 PAH 的发生和发展^[14],肺动脉内膜增生将导致不可逆的肺动脉高压。以上提示 RAS 的改变可能是引起 PAH 病理变化的主要原因之一。

近期研究发现,ACE2 作为 RAS 的新成员之一,可通过将 AngII 代谢为预期的保护肽 Ang-(1-7)来对 RAS 系统进行负向

调节作用^[15]。ACE2 在肺组织中的表达丰富,且目前有研究表明其在肺病理生理过程中起核心作用^[6-8]。近期研究表明,ACE2 的过量表达会对 PAH 产生显著的有益效应^[21]。因此,ACE2 可作为一种治疗 PAH 的靶位,其应用前景广阔^[14]。

异丙酚是全身麻醉剂中重要的血管内调控因子。相较于其他麻醉药物而言,异丙酚的优势是其副作用小^[15]及麻醉效果好^[13]。异丙酚具有血管保护作用,因此可能具有治疗高血压的潜力^[16]。异丙酚和 ACE2 均对血管内膜有一定保护作用,但他们之间的潜在关系目前未见报道。本研究表明,异丙酚在一定的范围内可呈剂量和时间依赖性的提高 HPAEC 上 ACE2 mRNA 和蛋白质的表达。以上提示异丙酚可通过调控 ACE2 的表达,影响血管收缩。

异丙酚已被证实具有增加一氧化氮的产生进而起保护血管的作用,可抑制 ET-1 的表达,提高机体抗氧化应急能力,减少血管内皮细胞的凋亡^[16,17]。已有报道表明异丙酚可通过 PI3K/Akt 途径发挥血管保护效应^[17]。本研究表明,PI3K 的抑制剂 LY294002 可消除异丙酚诱导的 ACE2 的转录,借此抑制异丙酚诱导的 Akt 的活化,这表明异丙酚可以通过 PI3K/Akt 依赖性途径增加 ACE2 的转录。PI3K/Akt 的信号通路是通过多种转录因子进行调控的,包括 FOXO 转录子和 NFκB^[18,19]。深入探讨异丙酚是如何通过 HPAEC 下游 PI3K/Akt 途径调节 ACE2 转录和活性的机制将有利于阐明异丙酚在 RAS 中的作用网络。

参考文献(References)

- [1] Berger R M F, Beghetti M, Humpl T, et al. Clinical features of paediatric pulmonary hypertension: a registry study [J]. The Lancet, 2012, 379(9815): 537-546
- [2] Ling Y, Johnson M K, Kiely D G, et al. Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the Pulmonary Hypertension Registry of the United Kingdom and Ireland [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2012, 186(8): 790-796
- [3] Morrell NW, Adnot S, Archer SL, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54 (suppl 1): S20-31
- [4] Matthay M A, Ware L B, Zimmerman G A. The acute respiratory distress syndrome[J]. The Journal of clinical investigation, 2012, 122 (8): 2731-2740
- [5] Patel V B, Bodiga S, Fan D, et al. Cardioprotective Effects Mediated by Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade and Enhancing Angiotensin 1-7 in Experimental Heart Failure in Angiotensin-Converting Enzyme 2 Null Mice [J]. Hypertension, 2012, 59 (6): 1195-1203
- [6] 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]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(007): 607-613
- Gong Jing-jing, Lu Zhuo-qiang, Cao Jin-long, et al. Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 inhibits angiotensin II type 1 receptor expression and signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation in cultured smooth muscle cells[J]. Chinese Journal of Cardiology, 2012, 40(007): 607-613

- [7] 王刚, 杨军, 唐振旺, 等. 汉族人群中血管紧张素转换酶抑制剂所致咳嗽与血管紧张素转换酶基因及缓激肽 $\beta 2$ 受体基因多态性的关系[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(031): 6011-6014
Wang Gang, Yang Jun, Tang Zhen-wang, et al. The Association between ACE Inhibitor (ACEI)-Induced Cough and the Polymorphism of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Gene and Bradykinin $\beta 2$ Receptor (BDKRB2) Gene in Han Nationality [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(031): 6011-6014
- [8] Matthay M A, Ware L B, Zimmerman G A. The acute respiratory distress syndrome[J]. The Journal of clinical investigation, 2012, 122(8): 2731-2740
- [9] Yamazato Y, Ferreira AJ, Hong KH, et al. Prevention of pulmonary hypertension by angiotensin- converting enzyme 2 gene transfer[J]. Hypertension, 2009, 54: 365-371
- [10] 吴明毅, 孙玉明, 褚文彦, 等. 丙泊酚靶控输注麻醉维持对老年胃癌根治术患者血流动力学及苏醒质量的影响[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(033): 6549-6551
Wu Ming-yi, Sun Yu-ming, Chu Wen-yan, et al. Influence on Hemodynamic Changes and Awake State by Propofol Target-Controlled Infusion for Anesthesia Maintained in Elderly Patients with Radical Gastrectomy [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(033): 6549-6551
- [11] Uemura Y, Shibata R, Ohashi K, et al. Adipose-derived factor CTRP9 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation[J]. The FASEB Journal, 2013, 27(1): 25-33
- [12] Wojciak-Stothard B, Zhao L, Oliver E, et al. Role of RhoB in the regulation of pulmonary endothelial and smooth muscle cell responses to hypoxia[J]. Circulation research, 2012, 110(11): 1423-1434
- [13] Kim J D, Kang H, Larrivée B, et al. Context-dependent proangiogenic function of bone morphogenetic protein signaling is mediated by disabled homolog 2[J]. Developmental cell, 2012, 23(2): 441-448
- [14] Teichert-Kuliszewski K, Kutryk MJ, Kuliszewski MA, et al. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension [J]. Circ Res, 2006, 98(2): 209-217
- [15] Shaw J G, Dent A G, Passmore L H, et al. Genetic influences on right ventricular systolic pressure (RVSP) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. BMC pulmonary medicine, 2012, 12(1): 25
- [16] Cheng TH, Chen JJ, Chen CH, et al. Effects of propofol on cyclic strain-induced endothelin-1 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. Anesthesiology, 2009, 110(6): 74-80
- [17] Chen J, Chen W, Zhu M, et al. Propofol attenuates angiotensin II-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells[J]. Br J Anaesth, 2011, 107(4): 525-532
- [18] Shenoy V, Qi Y, Katovich MJ, et al. ACE2, a promising therapeutic target for pulmonary hypertension[J]. Curr Opin Pharmacol, 2011, 11(2): 150-155
- [19] Blandszun G, Lysakowski C, Elia N, et al. Effect of perioperative systemic $\alpha 2$ agonists on postoperative morphine consumption and pain intensity: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Anesthesiology, 2012, 116(6): 1312-1322

(上接第 3108 页)

- [11] Kostopanagiotou G, Pandazi AK, Andreadou I, et al. Effects of mannitol in the prevention of lipid peroxidation during liver resection with hepatic vascular exclusion[J]. J Clin Anesth, 2006, 18(8): 570-574
- [12] Tsao J, Liu L, Li X. Hepatobiliary and pancreatic: transient hepatic ischemia caused by acute portal vein thrombosis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(9): 1433
- [13] 余灵祥, 李志伟, 郭晓东, 等. 脾切断流术对肝硬化门静脉高压症患者肝功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(05): 950-953
Yu Ling-xiang, Li Zhi-wei, Guo Xiao-dong, et al. The Effect of liver function in patients with Cirrhosis and Portal Hypertension after Splenectomy and Pericardial Blood Vessels Disarticulation [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(05): 950-953
- [14] Kröpil F, Schauer M, Krausch M, et al. Splenic artery switch for revascularization of the liver: a salvage procedure for inflammatory arterial hemorrhage[J]. World J Surg, 2013, 37(3): 591-596
- [15] Shetty GS, You YK, Choi HJ, et al. Extending the limitations of liver surgery: outcomes of initial human experience in a high-volume center performing single-port laparoscopic liver resection for hepatocellular carcinoma[J]. Surg Endosc, 2012, 26(6): 1602-1608
- [16] Knicpcissd, Iberer F, Grasser B, et al. A single-center experience with retrograde reperfusion in liver transplantation[J]. Transpl int, 2003, 16(10): 730-735
- [17] Xue Q, Yuan Z, Chen Z, et al. Protective role of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on cold ischemic-reperfusion injury of rat liver graft[J]. Transplant Proc, 2012, 44(4): 948-951
- [18] 郭晓东, 杨美, 熊璐, 等. 肝癌患者血清乙肝病毒特异性 miRNAs 水平指标检测与术后肿瘤复发的相关性研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(09): 1742-1743+1724
Guo Xiao-dong, Yang Mei, Xiong Lu, et al. The Relationship between Expression of Serum Hepatitis B Virus (HBV)-specific miRNAs and the Recurrence after Surgical Resection for Patients with Hepatocellular Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(09): 1742-1743+1724
- [19] Bezinover D, Kadry Z, Uemura T, et al. Association between plasma cyclic guanosine monophosphate levels and hemodynamic instability during liver transplantation[J]. Liver Transpl, 2013, 19(2): 191-198
- [20] Chung IS, Kim HY, Shin YH, et al. Incidence and predictors of post reperfusion syndrome in living donor liver transplantation [J]. Clin Transplant, 2012, 26(4): 539-543