生理学报 *Acta Physiologica Sinica*, April 25, 2018, 70(2): 175–183
DOI: 10.13294/j.aps.2018.0029 http://www.actaps.com.cn

研究论文

血管紧张素转换酶2激动剂三氮脒减轻小鼠肢体缺血再灌注引发的肺损伤

李树民[1,2,3]，王枭鹰[1]，刘 帆[1]，杨秀红[1,2,3,*]

[1]华北理工大学基础医学院生理学系；[2]河北省慢性疾病重点实验室；[3]唐山市慢性病临床基础研究重点实验室，唐山 063210

摘 要：本文旨在探讨血管紧张素转换酶2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2)激动剂三氮脒(diminazene aceturate, DIZE)对小鼠肢体缺血再灌注(limb ischemia-reperfusion, LIR)引发的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的作用。雄性8周龄野生型和人ACE2 (hACE2)转基因ICR小鼠随机分为：野生对照组(W组)、野生模型组(WL组)、野生模型DIZE干预组(WLD组)、hACE2转基因对照组(T组)、hACE2转基因模型组(TL组)和hACE2转基因模型DIZE干预组(TLD组)，每组6只。采用常规止血带套扎双侧后肢的方法复制小鼠LIR模型。各DIZE干预组在LIR前预先腹腔注射DIZE (15 mg/kg)，持续4周。LIR结束时，计算肺组织脏器系数和湿干质量比(wet/dry weight ratio, W/D)；计数肺泡灌洗液细胞并检测蛋白浓度；HE染色后观察肺组织形态变化并进行病理损伤评分；用ELISA法测定肺组织中血管紧张素II (angiotensin II, Ang II)和Ang (1-7)水平；用Western blot检测肺组织血管紧张素II受体1 (angiotensin II type 1 receptor, AT1)和Mas受体蛋白表达变化。结果显示：(1) WL和TL组小鼠均有明显的肺损伤，TL组小鼠肺损伤轻于WL组，而DIZE可减轻WL和TL组小鼠肺损伤。(2) WL组小鼠肺组织Ang II水平升高，Ang (1-7)水平降低，TL组小鼠这两种蛋白没有明显变化，而DIZE可降低WL和TL组Ang II水平，升高WL组Ang (1-7)水平。(3) WL和TL组小鼠肺组织AT1和Mas受体蛋白表达升高，而DIZE可逆转WL和TL组AT1蛋白表达的变化，并进一步上调这两组Mas受体蛋白表达。以上结果提示，DIZE可能通过调控局部肺组织ACE2-Ang (1-7)-Mas轴改善肾素-血管紧张素系统稳态失衡，减轻LIR所致小鼠ALI，从而发挥保护作用。

关键词：缺血再灌注；肺损伤；肾素-血管紧张素系统；血管紧张素转换酶；血管紧张素转换酶2；三氮脒
中图分类号：R363

ACE2 agonist DIZE alleviates lung injury induced by limb ischemia-reperfusion in mice

LI Shu-Min[1,2,3], WANG Xiao-Ying[1], LIU Fan[1], YANG Xiu-Hong[1,2,3,*]

[1]*Physiology Department, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China;* [2]*Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan 063210, China;* [3]*Tangshan Key Laboratory for Preclinical and Basic Research on Chronic Diseases, Tangshan 063210, China*

Abstract: This study was aimed to explore the effect of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) agonist diminazene aceturate (DIZE) on acute lung injury (ALI) induced by limb ischemia-reperfusion (LIR) in mice. Male 8-week-old wild-type and hACE2 transgenic ICR mice were randomly divided into 6 groups (6 in each group), including wild-type control (W), wild-type model (WL), wild-type model with DIZE administration (WLD), transgenic control (T), transgenic model (TL), and transgenic model with DIZE administration (TLD) groups. LIR model was established by 4 h reperfusion following 2 h ischemia of bilateral hindlimbs with rubber

Received 2017-08-19 Accepted 2018-01-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81372029), the National Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of China (No. 201510081007), the Postgraduate Innovation Funding Program of Hebei Province, China (No. CXZZBS2017127), and the Graduate Student Innovation Fund of North China University of Science and Technology (No. 2017B10).

[*]Corresponding author. Tel: +86-315-8805519; E-mail: ljkyxhljn@163.com

bands in mice. The WLD and TLD groups were pretreated with DIZE (15 mg/kg, i.p.) for 4 weeks before LIR. At the end of LIR, the mice were sacrificed and lung tissues were sampled. Indexes for evaluating lung injury include organ coefficient and wet/dry weight ratio (W/D), cell count and protein concentration of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), as well as morphological change and pathological score were detected. Angiotensin II (Ang II) and Ang (1-7) levels in lung tissue were determined by using ELISA commercial kits. And the protein expressions of angiotensin II type 1 receptor (AT1) and Mas receptor protein in lung tissue were detected by Western blot. The results were as follows: (1) There was obvious lung injury in both the WL and TL groups. The lung injury in the TL group was lighter than that in the WL group. DIZE could attenuate the lung injury in both the two groups. (2) The WL group showed increased Ang II and decreased Ang (1-7) levels, whereas the TL group did not exhibit any changes of these two proteins. DIZE decreased the level of Ang II in both the WL and TL groups, and increased the level of Ang (1-7) in the WL group. (3) In the WL and TL groups, AT1 and Mas receptor protein expressions were up-regulated. DIZE reversed the change of AT1 protein expression, whereas further increased Mas receptor expression in both the two groups. These results suggest that DIZE may improve the renin-angiotensin system homeostasis by regulating ACE2-Ang (1-7)-Mas axis in local lung tissue and play a protective role in LIR-induced ALI in mice.

Key words: ischemia and reperfusion; lung injury; renin-angiotensin system; angiotensin-converting enzyme; angiotensin converting enzyme 2; diminazene aceturate

肢体缺血再灌注 (limb ischemia-reperfusion, LIR) 在临床上多见于血栓闭塞、栓塞、长时间应用止血带、下肢手术、创伤等情况。LIR 不仅造成局部组织损伤，还会累及远隔器官。由于肺脏是静脉血回心后首先供血的器官，其成为最常受 LIR 累及的器官之一，出现急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)，严重时可引起急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)。大量研究证实，肺组织局部肾素 - 血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 稳态失衡参与了 ALI 的发生与发展。其中血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE)-血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)- 血管紧张素 II 受体 1 (angiotensin II type 1 receptor, AT1) 与血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2)-血管紧张素 (1-7)[angiotensin (1-7), Ang (1-7)]-Mas 受体这两条作用轴的正负调控平衡在这个系统中发挥关键作用。研究已证实，ACE-Ang II-AT1 轴是引起肺损伤的重要因素，而 ACE2 通过其效应分子 Ang (1-7) 和 Mas 受体的结合，可显著改善患者和动物模型肺损伤 [1,2]。近年来，ACE2-Ang (1-7)-Mas 轴在呼吸系统疾病中的作用亦越来越受到重视。本研究组前期研究也显示，LIR 小鼠肺组织 ACE 表达升高，ACE2 表达降低；Ang II/Ang (1-7) 表达失衡；而敲除小鼠 ACE2 基因可加重肺损伤 [3]。

三氮脒 (diminazene aceturate, DIZE)，又名贝尼尔、血虫净，属于芳香双脒类，传统作为广谱抗血液原虫药，主要用于治疗锥虫病。近年来研究显示 DIZE 可激活 ACE2，发挥对多种脏器的保护作用。然而，DIZE 对 ALI 的作用尚未见文献报道。因此，本研究观察野生型及人 ACE2 (hACE2) 转基因小鼠发生 LIR 时 RAS 活性因子 Ang II/Ang (1-7)、AT1/Mas 受体蛋白表达和肺损伤的变化，并探讨 DIZE 干预对这些变化的影响，以期明确 ACE2 激活或高表达对 LIR 小鼠 ALI 的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 实验方案获得华北理工大学伦理委员会的批准，并严格按照要求操作。野生型 ICR 小鼠由北京维通利华公司提供，动物合格证号 SCXK(京)2002-0003。hACE2 转基因 ICR 小鼠 F1 代由中国医学科学院实验动物研究所提供，在华北理工大学实验动物中心 SPF 级动物房繁殖、饲养。随机选取雄性 8 周龄野生型和 hACE2 转基因 ICR 小鼠各 18 只，体重 25~35 g，自由进食水。

1.2 主要试剂 iMark 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)；双目生物显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)；高速冷冻离心机 (美国 DuPont 公司)。DIZE (SIGMA-ALDRICH)；Ang II 和 Ang (1-7) ELISA 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司)；兔抗 AT1 受体抗体 (美国 Santa Cruz 公司)；小鼠抗 Mas 受体抗体 (以色列 Alomone Labs 公司)；兔抗 β-actin 抗体 (杭州华安生物技术有限公司)；BCA 蛋白浓度检测试剂、RIPA 组织蛋白裂解液、彩色预染蛋白分子量标准、醋酸纤维素膜、山羊抗兔、山羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记二抗、ECL 发光剂均购自碧云天生物技术研究所。

1.3 实验分组 将野生型小鼠随机分为野生对照组 (W 组)、野生模型组 (WL 组)、野生模型 DIZE 干预组 (WLD 组)，每组 6 只小鼠；将 hACE2 转基因小鼠随机分为转基因对照组 (T 组)、转基因模型组 (TL 组) 和转基因模型 DIZE 干预组 (TLD 组)，每组 6 只小鼠。WL 和 TL 组小鼠复制 LIR 模型；WLD 和 TLD 组在复制模型前每日 16:00~18:00 腹腔注射 0.1% DIZE (15 mg/kg)，持续给药 4 周 [4]；对照组 (W 和 T 组) 和模型组 (WL 和 TL 组) 腹腔注射等量生理盐水，持续 4 周。

1.4 制备小鼠 LIR 模型 采用本研究组常规方法复制小鼠 LIR 模型 [3]。小鼠腹腔注射 3% 水合氯醛 (3 mg/kg) 麻醉，双后肢根部橡皮圈结扎，缺血 2 h 后剪断橡皮圈，按摩双后肢恢复血液灌注。于再灌注后 4 h 麻醉状态下摘除眼球取血处死小鼠，留取肺组织，−80 °C 保存。

1.5 病理组织学检测肺损伤 将左侧肺浸泡于 4% 甲醛溶液中，常规方法制作病理组织切片，HE 染色，光镜下观察肺组织形态改变。镜下病理改变主要有 4 种类型：(1) 肺泡壁毛细血管扩张充血；(2) 肺泡和间质水肿；(3) 肺泡壁和血管壁嗜中性粒细胞浸润；(4) 肺泡壁增厚。按照病变的严重程度分为 5 个等级：0 分 (无损伤)；1 分 (轻度损伤，每个视野损伤范围 ≤ 25 %)；2 分 (中度损伤，每个视野损伤范围 26%~50%)，3 分 (重度损伤，每个视野损伤范围 51%~75%)，4 分 (极重度损伤，弥漫性肺损伤，伴有大量炎细胞浸润)。计算视野中 4 种病变损伤程度的得分总和；随机选取每只小鼠左肺切片的 10 个随机视野，所获得分的平均值为每组最终得分 [3]。

1.6 肺脏器系数和湿干质量比 (wet/dry weight ratio, W/D) 测定 称量小鼠体重，再取双肺组织，滤纸吸干肺组织表面血液，称量双肺重量。脏器系数 = 脏器重量 / 体重 × 100%；取小鼠右肺上叶，滤纸吸干表面血液后称湿重，置于电热真空干燥箱内，60 °C 烘烤 72 h[3]，称干重，计算 W/D。

1.7 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 细胞计数和蛋白浓度测定 制备小鼠 LIR 模型，缺血 2 h，再灌注后 4 h，麻醉状态下小鼠仰卧位固定，颈部正中切口，分离气管，插入自制气管导管，手术线结扎气管和导管，用 1 mL 4 °C 预冷的 PBS 进行肺泡灌洗，灌洗液停留 1 min，反复 3 次后收集；重复灌洗 3 次，混合 3 次灌洗液，4 °C 1 500 r/min 离心 10 min，收集上清。血细胞计数板计数沉淀中细胞总数，BCA 法检测上清液中蛋白浓度。

1.8 ELISA 法检测血清和肺组织 Ang II 和 Ang (1-7) 含量 取适量肺组织，于预冷 PBS 中清洗去除血液；称重；按照组织与 PBS 的质量体积比为 1:5 加入 PBS；剪碎后超声匀浆；4 °C 3 000 r/min 离心 15 min，取上清；按照 ELISA 试剂盒说明操作，酶标仪测定 450 nm 波长吸光度，绘制标准曲线，计算样品 Ang II 和 Ang (1-7) 含量。

1.9 Western blot 检测肺组织 AT1 和 Mas 受体蛋白表达 称取肺组织，加入蛋白裂解液 RIPA (1 mL/100 mg)，冰上超声匀浆；4 °C 12 000 r/min 离心 15 min，取上清。BCA 法检测上清液中蛋白浓度，并用 RIPA 调整蛋白浓度至 6 μg/μL，与 5× 上样缓冲液混匀，煮沸 10 min；10% SDS-PAGE 电泳，90 V 转膜，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，一抗 4 °C 冰箱孵育过夜 (抗 AT1 抗体 1:300，抗 Mas 受体抗体 1:300，抗 β-actin 抗体 1:1 000)；次日洗膜，辣根过氧化物酶标记二抗 37 °C 孵育 1 h，再次洗膜，ECL 显影、成像，Image Lab 分析结果，用 β-actin 作为内参蛋白。

1.10 统计学分析 数据以 mean ± SD 表示，采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析，多组间均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)，两两比较采用 Dunnett's T3 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺脏器系数和肺W/D

WL 组小鼠肺脏器系数较 W 组升高 ($P < 0.05$)，WLD 组脏器系数较 WL 组下降 ($P < 0.05$)；hACE2 转基因小鼠各组的变化趋势与野生型各组一致，而且 TL 组脏器系数较 WL 组降低 ($P < 0.05$)(图 1*A*)。

WL 组小鼠肺 W/D 较 W 组升高 ($P < 0.05$)，WLD 组肺 W/D 较 WL 组下降 ($P < 0.05$)；hACE2 转基因小鼠各组肺 W/D 的变化有类似趋势，但 TL 组较 T 组无显著变化；TL 组数值较 WL 组降低 ($P < 0.05$)(图 1*B*)。

2.2 BALF细胞计数和蛋白浓度

LIR 后，WL 组小鼠 BALF 细胞计数较 W 组升高 ($P < 0.05$)，WLD 组较 WL 组下降 ($P < 0.05$)；hACE2 转基因小鼠的变化趋势与野生型小鼠类似，且 TL 和 TLD 组细胞计数分别较 WL 和 WLD 组减少 ($P < 0.05$)(图 2*A*)。

LIR 后，WL 组小鼠 BALF 蛋白浓度较 W 组小鼠升高 ($P < 0.05$)，WLD 组较 WL 组下降 ($P < 0.05$)；hACE2 转基因小鼠三组之间也有类似变化趋势，但 TL 组较 T 组无显著变化，而 TL 组蛋白浓度较 WL 组降低 ($P < 0.05$)(图 2*B*)。

2.3 肺组织病理变化及肺损伤评分

肉眼观察对照组肺组织体积正常，颜色淡红而有弹性；模型组肺组织体积增大，呈暗红色，偶可见出血。光镜下观察结果显示，W 和 T 组肺泡结构清晰，肺泡壁完整，间质无充血、水肿和炎症细胞浸润 (图 3*A*)；WL 和 TL 组肺泡毛细血管扩张，充血；肺泡和间质水肿；血管壁和支气管壁炎细胞浸润；肺泡间隔增厚伴炎细胞浸润，肺气肿等病理改变 (图 3*A*)，但 TL 组的病理变化轻于 WL 组。无论肉眼观察还是镜下所见，DIZE 干预组 (WLD 和 TLD 组) 肺损伤病理改变均轻于模型组 (WL 和 TL 组)，并且 TLD 组病理减轻程度较 WLD 组更为明显 (图 3*A*)。

WL 组小鼠肺损伤评分较 W 组升高 ($P < 0.05$)，WLD 组肺损伤评分低于 WL 组 ($P < 0.05$)；hACE2 转基因小鼠出现同样的变化趋势，而且 TL 组较 WL 组、TLD 组较 WLD 组肺损伤评分明显降低 ($P < 0.05$)。

2.4 肺组织和血清 Ang II 和 Ang(1-7) 含量

WL 组小鼠肺组织 Ang II 水平较 W 组升高 ($P < 0.05$)，WLD 组较 WL 组下降 ($P < 0.05$)。TL 和 TLD 组 Ang II 水平分别较 WL 和 WLD 组下降 ($P < 0.05$) (图 4*A*)。

WL 组肺组织 Ang (1-7) 水平高于 W 组 ($P <$

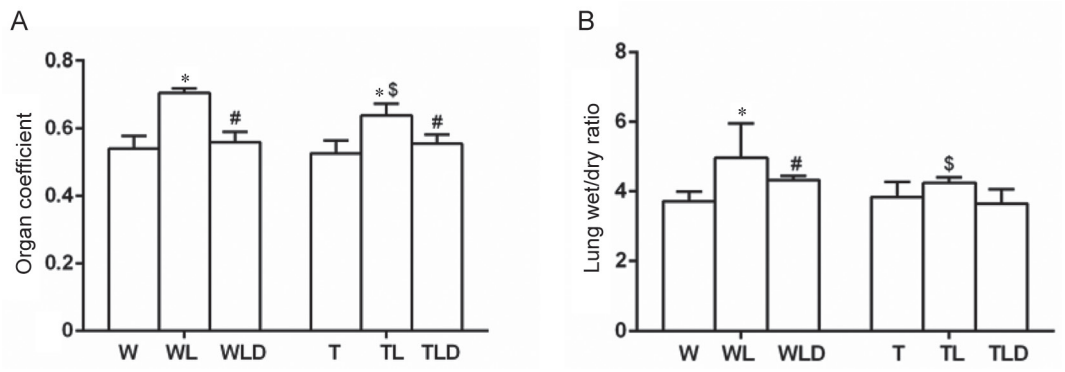

图 1. 野生及hACE2转基因小鼠不同组别肺脏器系数和湿干质量比

Fig. 1. The organ coefficient (*A*) and wet/dry ratio (*B*) of lung tissue in different groups of wild-type and hACE2 transgenic mice. Mean ± SD, $n = 6$. $^{*}P < 0.05$ *vs* control group (W and T respectively); $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group (WL and TL respectively); $^{\$}P < 0.05$ *vs* WL group. W, wild-type control group; WL, wild-type model group; WLD, wild-type model with DIZE group; T, transgenic control group; TL, transgenic model group; TLD, transgenic model with DIZE group.

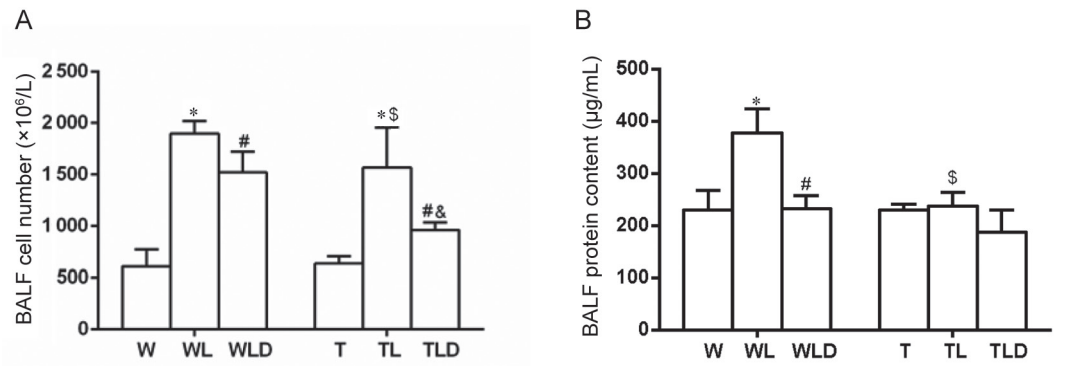

图 2. 野生及hACE2转基因小鼠不同组别支气管肺泡灌洗液细胞计数和蛋白浓度

Fig. 2. The cell number (*A*) and protein concentration (*B*) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in different groups of wild-type and hACE2 transgenic mice. Mean ± SD, $n = 6$. $^{*}P < 0.05$ *vs* control group (W and T respectively); $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group (WL and TL respectively); $^{\$}P < 0.05$ *vs* WL group; $^{\&}P < 0.05$ *vs* WLD group. W, wild-type control group; WL, wild-type model group; WLD, wild-type model with DIZE group; T, transgenic control group; TL, transgenic model group; TLD, transgenic model with DIZE group.

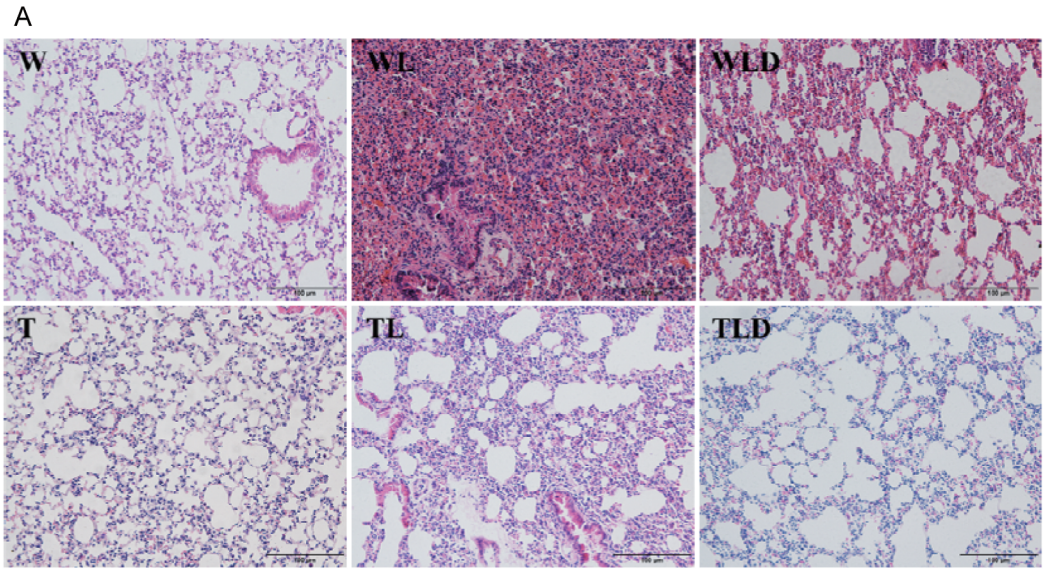

图 3. 野生及hACE2转基因小鼠各组肺损伤病理变化和肺组织损伤评分

Fig. 3. Lung pathological damage (*A*) and injury score (*B*) in different groups of wild-type and hACE2 transgenic mice. Scale bar, 100 μm. Mean ± SD, $n = 6$. $^{*}P < 0.05$ *vs* control group (W and T respectively); $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group (WL and TL respectively); $^{\$}P < 0.05$ *vs* WL group; $^{\&}P < 0.05$ *vs* WLD group. W, wild-type control group; WL, wild-type model group; WLD, wild-type model with DIZE group; T, transgenic control group; TL, transgenic model group; TLD, transgenic model with DIZE group.

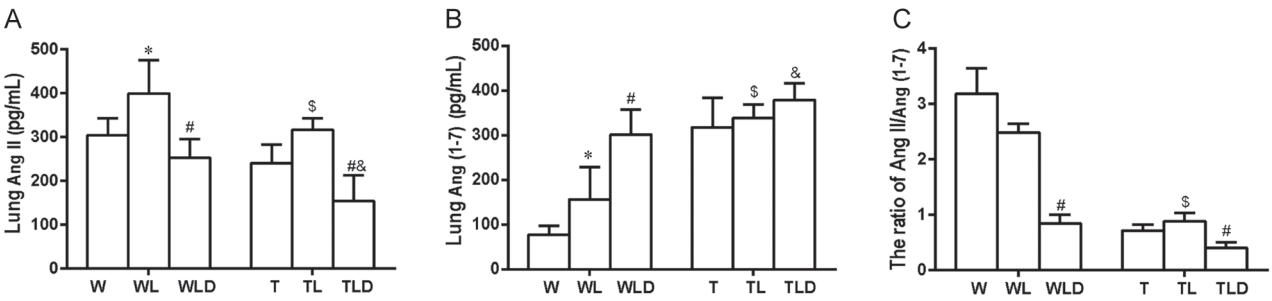

图 4. 野生及hACE2转基因小鼠各组肺组织血管紧张素II和血管紧张素(1-7)水平变化

Fig. 4. Changes of Ang II and Ang (1-7) levels in lung tissue in different groups of wild-type and hACE2 transgenic mice. The levels of Ang II and Ang (1-7) were examined by ELISA. *A*: Lung Ang II level; *B*: Lung Ang (1-7) level; *C*: The ratio of Ang II/Ang 1-7. Mean ± SD, $n = 6$. $^{*}P < 0.05$ *vs* control group (W and T respectively); $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group (WL and TL respectively); $^{\$}P < 0.05$ *vs* WL group; $^{\&}P < 0.05$ *vs* WLD group. W, wild-type control group; WL, wild-type model group; WLD, wild-type model with DIZE group; T, transgenic control group; TL, transgenic model group; TLD, transgenic model with DIZE group.

0.05)，WLD 组高于 WL 组 ($P < 0.05$)；hACE2 转基因小鼠变化趋势与野生型相似，但 T 和 TL 组之间无明显差异；TL 组和 TLD 组肺组织 Ang (1-7) 水平分别高于 WL 组和 WLD 组 ($P < 0.05$)(图 4*B*)。

比较各组 Ang II 和 Ang (1-7) 比值，转基因各组的比值均较野生型各组减低，且 WLD 组和 TLD 组的比值分别显著低于 WL 和 TL 组 ($P < 0.05$)(图 4*C*)。

2.5 肺组织AT1和Mas受体蛋白表达

与 W 组相比，WL 组 AT1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)，WLD 组蛋白表达较 WL 组下降 ($P < 0.05$)；

hACE2 转基因各组出现了类似的变化趋势，TL 和 TLD 组 AT1 蛋白表达水平分别较 WL 和 WLD 组明显降低 ($P < 0.05$)(图 5*A*, *B*)。

WL 组 Mas 受体蛋白表达较 W 组升高 ($P < 0.05$)，WLD 组蛋白表达较 WL 组升高；hACE2 转基因小鼠出现了类似的变化趋势；TL 和 TLD 组 Mas 受体蛋白表达水平分别较 WL 和 WLD 组升高 ($P < 0.05$) (图 5*A*, *C*)。

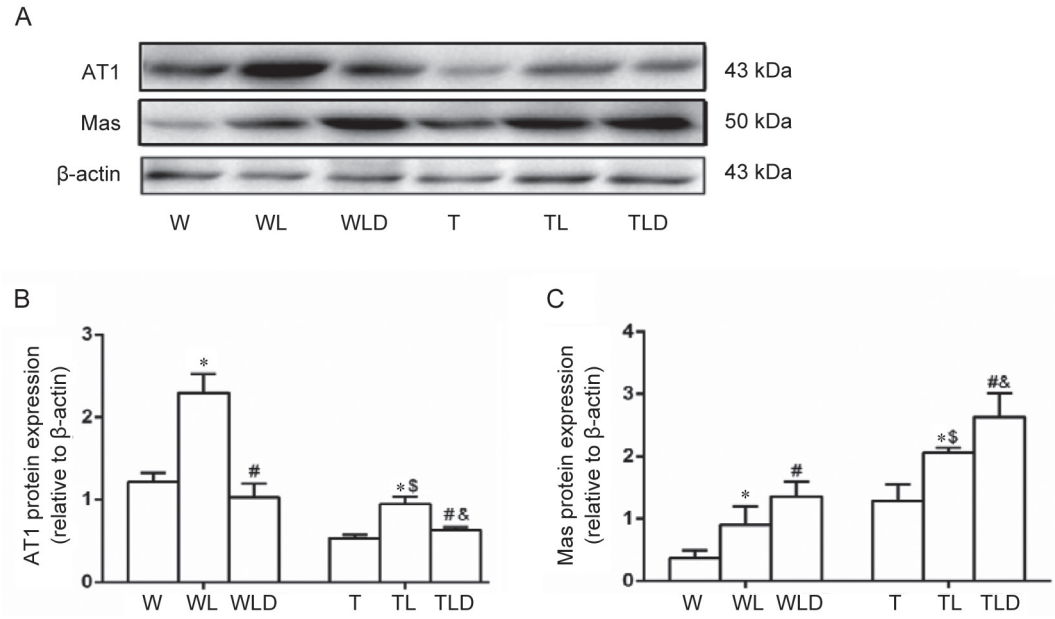

图 5. 野生及hACE2转基因小鼠各组肺组织AT1、Mas受体蛋白表达

Fig. 5. Expressions of AT1 and Mas receptor proteins in different groups of wild-type and hACE2 transgenic mice. Protein levels of AT1 and Mas receptor were examined by Western blot. *A*: Image of representative blots; *B*: AT1 expression; *C*: Mas receptor protein expression. Mean ± SD, $n = 6$. $^{*}P < 0.05$ *vs* control group (W and T respectively); $^{\#}P < 0.05$ *vs* model group (WL and TL respectively); $^{\$}P < 0.05$ *vs* WL group; $^{\&}P < 0.05$ *vs* WLD group. W, wild-type control group; WL, wild-type model group; WLD, wild-type model with DIZE group; T, transgenic control group; TL, transgenic model group; TLD, transgenic model with DIZE group.

3 讨论

本研究结果显示，野生型和 hACE2 转基因型 LIR 小鼠肺组织 Ang II 水平及 AT1 受体蛋白表达均升高；肺组织出现肺泡毛细血管扩张，充血、肺泡和间质水肿、肺泡间隔增厚、炎细胞浸润等病理学表现；肺组织 W/D、脏器系数、BALF 细胞计数及蛋白浓度显著提高，提示 Ang II 有可能通过 AT1 受体引起 ALI。ALI/ARDS 是由多种原因引起的、以急性进行性呼吸衰竭为主要表现的复杂病理状态，具有较高的发病率和病死率。ALI 早期即有炎性反应和肺细胞损伤性改变，随后出现胶原沉积、肺纤维化等变化。临床和实验研究已经证实，经典 RAS 在 ALI 中发挥重要作用。循环和局部组织中均存在 RAS，调节体内多个脏器的功能。其中，ACE 水解 Ang I 生成 Ang II，通过 AT1 受体发挥调节血压和水钠平衡、收缩血管、促炎症和增殖等作用。Ang II 在肺损伤中的作用已得到广泛认可。Ang II 诱导超氧化物的产生，上调 NADPH 氧化酶的活性，激活 NF-κB，调控多种炎性因子的表达 [5]；Ang II 促进肺泡上皮细胞和肺血管内皮细胞凋亡，导致肺泡和微血管屏障功能破坏，毛细血管通透性增加，促进炎症细胞浸润和水肿形成；此外，Ang II 还抑制肺组织上皮细胞 Na^+ 通道，下调水通道蛋白 AQP-1 和 AQP-5 的表达，肺泡液体清除率降低 [6]。

研究表明，ACE2 在肺损伤、肺纤维化、炎症等多种肺部疾病中发挥保护作用。在肺血管内皮和肺泡上皮均可检测到 ACE2，它能降低肺泡灌洗液 Ang II/Ang (1-7) 的比例，上调 Mas 受体 mRNA 表达，减轻脂多糖诱导的 ALI[7]；在博来霉素 [8–11] 和呼吸道合胞病毒 [12] 所致的动物模型中，ACE2 抑制肺动脉内皮细胞凋亡，降低血管通透性。反之，敲除小鼠 *ACE2* 基因，可加重 ACE/ACE2 和 Ang II/Ang (1-7)

的不平衡状态，使肺损伤变化加重[3]；在酸吸入、脓毒症、盲肠结扎穿孔术所致的小鼠 ALI 中，ACE2 基因缺陷小鼠发生的肺损伤，比野生型、ACE 和 AT1 受体基因缺陷小鼠更为严重，如果给予合成 ACE2，损伤程度明显减轻[13, 14]。作为 ACE2 的效应分子 Ang (1-7)，通过 Mas 受体激活内皮型一氧化氮合酶，调节血管内皮功能，减轻大鼠损伤肺组织中性粒细胞浸润，预防肺动脉高压和右心室肥大的发生[15]。本研究采用了 hACE2 转基因小鼠，在内源性小鼠 ACE2 启动子的调控下，转基因小鼠肺、肾、心和小肠均表达 hACE2 基因[16]，且肺组织 ACE2 mRNA 和蛋白水平均高于野生型小鼠[3]。本研究结果显示，转基因小鼠肺组织 Ang (1-7) 和 Mas 受体表达较野生型小鼠上调，而各组 Ang II/ Ang (1-7) 比值较野生型相应各组明显降低，这个结果和 ACE2 促进 Ang II 水解生成 Ang (1-7) 有关，与我们前期研究结果[3]一致。LIR 后，转基因小鼠 (TL 组) 的肺组织病理变化较野生型减轻；肺 W/D 和 BALF 蛋白浓度与对照组 (T 组) 相比无显著差异。这些结果均提示，ACE2-Ang (1-7)-Mas 轴在肺损伤过程中发挥着重要调节作用。

为进一步证实 ACE2-Ang (1-7)-Mas 轴在肺损伤过程的保护作用，本研究给予 ACE2 激活剂 DIZE 干预，观察前述各指标的变化。DIZE 是传统抗锥虫病药物，DIZE 选择性阻断锥虫动基体的 DNA 合成和复制，并与核产生不可逆性结合，从而使锥虫的动基体消失，不能分裂繁殖[17]。但该作用是否与心肺保护作用有关尚未见文献报道。近年来研究显示，DIZE 可增加 ACE2 活性[18]，提高 ACE2 的催化效率，促进 Ang (1-7) 的生成，降低 Ang II 水平和 AT1 受体的表达[19]，从而发挥抗高血压[20]和对心、肾和胃[21–23]的保护作用；DIZE 还可通过增加抗氧化剂和抗炎因子水平等多种途径抑制炎症反应，可治疗内毒素诱导的葡萄膜和视网膜炎[19,24]。DIZE 能有效改善心肌梗死大鼠的心脏重构，增加心脏和肾脏 ACE2 活性和 mRNA 表达，降低 ACE 活性和 mRNA 表达，这些效应可被 ACE2 抑制剂 C16 阻断，而对 ACE2 缺失的小鼠没有影响[21, 25]；本研究结果显示，DIZE 干预后，LIR 模型小鼠肺损伤指标明显好转；肺组织 Ang II 水平降低、Ang (1-7) 水平升高、Ang II/ Ang (1-7) 比值降低；肺组织 AT1 受体表达下调，Mas 受体表达上调，而且 TLD 组各项指标的变化较 WLD 组更为明显。结合我们前期研究结果[3]，这些证据提示，DIZE 可通过激活 ACE2，继而激活 Ang (1-7)-Mas 轴发挥对肺损伤的减轻作用；在转基因高表达 ACE2 小鼠，DIZE 可进一步改善 RAS 稳态失衡，减轻肺损伤。

然而关于 DIZE 的作用，有学者得到了不一致的研究结果。Haber 等[26]在小鼠和大鼠的体内和体外实验中证实，DIZE 不影响血浆或肾脏 ACE2 活性，也不影响血浆 Ang II 和 Ang (1-7) 水平；Velkoska 等[27]研究也显示，DIZE 不能改变肾切除大鼠心脏 ACE2 和 Ang (1-7) 的活性，而是通过抑制 ACE2 从细胞膜裂解，间接保持 ACE2 水平，减少 Ang II 的生成，从而发挥改善心肌纤维化和心脏舒张功能的作用。综合上述研究证据，DIZE 在多种疾病中的确发挥了保护作用，但其是否作为 ACE2 的激动剂激活 ACE2，继而激活 ACE2-Ang (1-7)-Mas 受体轴发挥作用，尚需在不同的疾病和动物模型中进行证实，我们推测 DIZE 对 ACE2 的激活作用可能存在器官特异性。此外，本研究为预防性干预，在肺损伤出现之前给予 DIZE 4 周激活 ACE2，防止肺损伤时出现的 ACE2 下调，在此条件下观察保护作用。DIZE 治疗作用以及最佳的治疗时间窗还有待于进一步探讨。已有文献证实了 DIZE 在心肌损伤模型中的治疗作用[21]；而且，DIZE 不易被降解、价格低廉、容易获得，已被用于人类受试者[18]。

综上所述，肺组织局部 ACE/ACE2 和 Ang II/ Ang (1-7) 稳态失衡，在 LIR 造成的 ALI 中具有重要作用；高表达 ACE2 和 DIZE 干预均可激活 ACE2-Ang (1-7)-Mas 受体轴，从而减轻 ALI。针对 ACE2 的 RAS 稳态调节，可以起到对肺损伤的保护作用，但具体机制有待进一步研究。

参考文献

1 Wösten-van Asperen RM, Lutter R, Specht PA, Moll GN, van Woensel JB, van der Loos CM, van Goor H, Kamilic J, Florquin S, Bos AP. Acute respiratory distress syndrome leads to reduced ratio of ACE/ACE2 activities and is prevented by angiotensin-(1-7) or an angiotensin II receptor antagonist. J Pathol 2011; 225(4): 618–627.

2 Wösten-van Asperen RM, Bos AP, Bem RA, Dierdorp BS, Dekker T, van Goor H, Kamilic J, van der Loos CM, van den Berg E, Bruijn M, van Woensel JB, Lutter R. Imbalance between pulmonary angiotensin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme 2 activity in acute respiratory distress syndrome. Pediatr Crit Care Med 2013; 14(9): e438–e441.

3 Chen LN, Yang XH, Nissen DH, Chen YY, Wang LJ, Wang JH, Gao JL, Zhang LY. Dysregulated renin-angitotensin system contributes to acute lung injury caused by hind-limb ischemia-reperfusion in mice. Shock 2013; 40(5): 420–429.

4 Yuan SN (袁胜男), Yang Y, Wang SM, Cao WS, Liu Z, Yang XH, Zhang YX, Zhang N. Effect of ACE2 activator DIZE on ANG II/ANG1–7 in renal injury of exhaustive training mice. Chin J Coal Industry Med (中国煤炭工业医学杂志) 2015; 10:1716–1720 (in Chinese with English abstract).

5 Zhang F (张帆), Wang CB. Advances in the research of local angiotensin system in acute lung injury. Clin Lab J (Elect Ed) (临床检验杂志电子版) 2015; 4(2): 850–858 (in Chinese with English abstract).

6 Qi QY, Chen W, Li XL, Wang YW, Xie XH. H_2S protecting against lung injury following limb ischemia-reperfusion by alleviating inflammation and water transport abnormality in rats. Biomed Environ Sci 2014; 27(6): 410–418.

7 Li Y, Zeng Z, Cao Y, Liu Y, Ping F, Liang M, Xue Y, Xi C, Zhou M, Jiang W. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF-κB signaling pathways. Sci Rep 2016; 6: 27911.

8 Wang L, Li Y, Qin H, Xing D, Su J, Hu Z. Crosstalk between ACE2 and PLGF regulates vascular permeability during acute lung injury. Am J Transl Res 2016; 8(2): 1246–1252.

9 Yu X, Lin Q, Qin X, Ruan Z, Zhou J, Lin Z, Su Y, Zheng J, Liu Z. ACE2 antagonizes VEGFa to reduce vascular permeability during acute lung injury. Cell Physiol Biochem 2016; 38(3): 1055–1062.

10 Bao H, Gao F, Xie G, Liu Z. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits apoptosis of pulmonary endothelial cells during acute lung injury through suppressing MiR-4262. Cell Physiol Biochem 2015; 37(2): 759–767.

11 Ji Y, Gao F, Sun B, Hao J, Liu Z. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits apoptosis of pulmonary endothelial cells during acute lung injury through suppressing SMAD2 phosphorylation. Cell Physiol Biochem 2015; 35(6): 2203–2212.

12 Gu H, Xie Z, Li T, Zhang S, Lai C, Zhu P, Wang K, Han L, Duan Y, Zhao Z, Yang X, Xing L, Zhang P, Wang Z, Li R, Yu JJ, Wang X, Yang P. Angiotensin-converting enzyme 2 inhibits lung injury induced by respiratory syncytial virus. Sci Rep 2016; 6: 19840.

13 Shen LH (沈利汉), Mo HY, Cai LH, Zhang BJ, Xiao ZL. The role of renin-angiotensin system in acute lung injury and acute respiratory dysfunction syndrome. Chin J Respir Crit Care Med (中国呼吸与危重监护杂志) 2010; 9(3): 310–314 (in Chinese with English abstract).

14 Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, Crackower MA, Fukamizu A, Hui CC, Hein L, Uhlig S, Slutsky AS, Jiang C, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. Nature 2005; 436(7047): 112–116.

15 Wagenaar GT, Laghmaniel H, Fidder M, Sengers RM, de Visser YP, de Vries L, Rink R, Roks AJ, Folkerts G, Walther FJ. Agonists of MAS oncogene and angiotensin II type 2 receptors attenuate cardiopulmonary disease in rats with neonatal hyperoxia-induced lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2013; 305(5): L341–L351.

16 Yang XH (杨秀红), Deng W, Tong Z, Liu YX, Zhang LF, Zhu H, Gao H, Huang L, Liu YL, Ma CM, Xu YF, Ding MX, Deng HK, Qin C. Susceptibility of hACE2 transgenic ICR mice to SARS-CoV infection. Acta Lab Anim Sci Sin (中国实验动物学报) 2007; 15(6): 453–457, 492–493 (in Chinese with English abstract).

17 Zhou J, Le V, Kalia D, Nakayama S, Mikek C, Lewis EA, Sintim HO. Diminazene or berenil, a classic duplex minor groove binder, binds to G-quadruplexes with low nanomolar dissociation constants and the amidine groups are also critical for G-quadruplex binding. Mol Biosyst 2014; 10(10): 2724–2734.

18 Shenoy V, Gjymishka A, Jarajapu YP, Qi Y, Afzal A, Rigatto K, Ferreira AJ, Fraga-Silva RA, Kearns P, Douglas JY, Agarwal D, Mubarak KK, Bradford C, Kennedy WR, Jun JY, Rathinasabapathy A, Bruce E, Gupta D, Cardounel AJ, Mocco J, Patel JM, Francis J, Grant MB, Katovich MJ, Raizada MK. Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187(6): 648–657.

19 Tao L, Qiu Y, Fu X, Lin R, Lei C, Wang J, Lei B. Angiotensin-converting enzyme 2 activator diminazene aceturate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting MAPK and NF-κB pathways in human retinal pigment epithelium. J Neuroinflammation 2016; 13: 35.

20 De Maria ML, Araújo LD, Fraga-Silva RA, Pereira LA, Ribeiro HJ, Menezes GB, Shenoy V, Raizada MK, Ferreira AJ. Anti-hypertensive Effects of diminazene aceturate: An angiotensin-converting enzyme 2 activator in rats. Protein Pept Lett 2016; 23(1): 9–16.

21 Qi Y, Zhang J, Cole-Jeffrey CT, Shenoy V, Espejo A, Hanna M, Song C, Pepine CJ, Katovich MJ, Raizada MK. Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. Hypertension 2013; 62(4): 746–752.

22 Malek M, Nematbakhsh M. The preventive effects of diminazene aceturate in renal ischemia/reperfusion injury in male and female rats. Adv Prev Med 2014; 2014: 740647.

23 Souza LK, Nicolau LA, Sousa NA, Araújo TS, Sousa FB,

Costa DS, Souza FM, Pacífico DM, Martins CS, Silva RO, Souza MH, Cerqueira GS, Medeiros JV. Diminazene aceturate, an angiotensin-converting enzyme II activator, prevents gastric mucosal damage in mice: Role of the angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis. Biochem Pharmacol 2016; 112: 50–59.

24 Zheng C, Lei C, Chen Z, Zheng S, Yang H, Qiu Y, Lei B. Topical administration of diminazene aceturate decreases inflammation in endotoxin-induced uveitis. Mol Vis 2015; 21: 403–411.

25 Thatcher SE, Zhang X, Howatt DA, Yiannikouris F, Gurley SB, Ennis T, Curci JA, Daugherty A, Cassis LA. Angiotensin-converting enzyme 2 decreases formation and severity of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34(12): 2617–2623.

26 Haber PK, Ye M, Wysocki J, Maier C, Haque SK, Batlle D. Angiotensin-converting enzyme 2-independent action of presumed angiotensin-converting enzyme 2 activators: studies *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro*. Hypertension 2014; 63(4): 774–782.

27 Velkoska E, Patel SK, Griggs K, Burrell LM. Diminazene aceturate improves cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in rats with kidney disease. PLoS One 2016; 11(8): e0161760.