

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.21.005

## Ang II 及其受体阻滞剂对急性肺损伤大鼠肺泡液体清除的影响

邓嘉, 王乐

(重庆市江北区中医院内一科 400020)

**[摘要]** **目的** 探讨内源性血管紧张素 II (Ang II) 及其 1 型(AT1)受体阻滞剂对脂多糖诱导急性肺损伤(ALI)大鼠肺泡液体清除的效应。**方法** 25 只 SD 大鼠分为空白对照组、ALI 组及 ALI+ZD7155(AT1 受体阻滞剂)组。ALI 组又按作用时间分为 2、4、6 h 3 个亚组。10 mg/kg 脂多糖(LPS)腹腔注射诱导 ALI 大鼠模型。10 mg/kg ZD7155 于 LPS 注射前 30 min 经腹腔注射。每组或亚组各 5 只大鼠。观察肺组织病理学改变、肺湿质量/干质量(W/D)比值, ELISA 测定血浆及肺组织中 Ang II 水平的变化。在肺泡液体清除(AFC)测定中,活杀 25 只 SD 大鼠取肺组织,分为空白对照组、阿米洛利组、ALI 组、ALI+ ZD7155 组、ALI+ZD7155+阿米洛利组。每组各 5 只大鼠肺。伊文思蓝(evans-blue)标记 5%清蛋白法测定 AFC。**结果** ALI 4 h 组肺组织 W/D 较空白对照组显著增加( $P<0.01$ ),ZD7155 干预后肺组织 W/D 较 ALI 4 h 组显著降低( $P<0.05$ )。随 LPS 作用时间增加,ALI 大鼠模型血浆及肺组织内 Ang II 浓度变化呈现时间依赖性逐渐升高,各时间点组间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。阿米洛利组与 ALI 4 h 模型组 AFC 均较空白对照组显著降低( $P<0.01$ ),ALI 4 h 组 AFC 高于阿米洛利组( $P<0.05$ );ALI+ZD7155 组 AFC 高于 ALI 4 h 组( $P<0.05$ ),但 ALI+ZD7155+阿米洛利组 AFC 降低,与阿米洛利组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** Ang II 减弱 ALI 大鼠 AFC;其 AT1 受体阻滞剂可逆转此病理生理过程。

**[关键词]** 血管紧张素 II;急性肺损伤;上皮钠通道;肺泡液体清除

**[中图分类号]** R563.8

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)21-2895-03

## Effect of angiotensin II and Ang II type 1 receptor antagonist on alveolar fluid clearance in rat with acute lung injury

Deng Jia, Wang Le

(First Department of Internal Medicine, Traditional Chinese Medical Hospital of Jiangbei District, Chongqing 400020, China)

**[Abstract]** **Objective** To research the effect of angiotensin II (Ang II) and Ang II type 1 (AT1) receptor antagonist on alveolar fluid clearance (AFC) in rats with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharides (LPS). **Methods** Twenty-five healthy Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, ALI group and AT1 receptor blocker pretreatment group (ALI+ZD7155 group), with 5 rats in each group. The ALI group was further divided into three subgroups of observation at 2, 4 and 6 hours. ALI model of rats was reproduced with intraperitoneal injection of LPS 10 mg/kg. ZD7155 10 mg/kg was injected intraperitoneally thirty minutes before administration of LPS. The pathological changes and ratio of wet to dry (W/D) weight of lung tissue were measured at various intervals. The level of Ang II in serum and lung tissue was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). In measurement of AFC, The twenty-five SD rats lungs were obtained and randomly divided into control group, amiloride group, ALI group, ALI+ZD7155 group and ALI+ZD7155+amiloride group, with 5 lungs of rats in each group. AFC was estimated by evans-blue labeled albumin. **Results** W/D weight of lung tissue was significantly increased in ALI group ( $P<0.01$ ), but significantly decreased in ALI+ZD7155 group ( $P<0.05$ ). LPS significantly increased concentration of Ang II in serum and lung tissue in a time-dependent manner ( $P<0.05$ ). Concentration of Ang II in serum and lung tissue was significantly lower in ALI+ZD7155 group than in ALI group ( $P<0.05$ ). AFC in amiloride group and ALI group was significantly decreased when compared with control group ( $P<0.01$ ). However, AFC in ALI group was significantly higher than amiloride group ( $P<0.05$ ). AFC in ALI+ZD7155 group was significantly increased compared with ALI group ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in AFC between ALI+ZD7155+amiloride group and amiloride group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Ang II attenuates AFC in rats with ALI, however, AT1 receptor antagonist could reverse the effect of Ang II on AFC.

**[Key words]** angiotensin II; acute lung injury; epithelial sodium channel; alveolar fluid clearance

急性肺损伤(ALI)病死率高达 50%~60%,其发病机制仍未完全阐明。目前研究认为促进肺泡液体清除(AFC)有助于改善 ALI 预后<sup>[1]</sup>。血管紧张素 II (Ang II)在局部肺组织中也有表达,在 ALI 中起调控炎症发生的作用,但对 ALI AFC 的影响如何尚不明确。本实验通过脂多糖(LPS)诱导 ALI 大鼠模型,观察 Ang II 及其 1 型(AT1)受体阻滞剂对 AFC 的影响,探讨相关机制。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 清洁健康成年雄性 SD 大鼠 50 只,体质量(280±20)g(重庆医科大学动物实验中心)。LPS、阿米洛利、戊巴比

妥、ZD7155(AT1 受体阻滞剂)、伊文思蓝(evans-blue)、Ang II ELISA 检测试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) ELISA 检测试剂盒均购自美国 Sigma 公司。

## 1.2 方法

## 1.2.1 动物分组

**1.2.1.1 ALI 模型制备及药物干预分组** 将 25 只大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉,仰卧固定。分为:(1)空白对照组:注射与 LPS 等量的生理盐水,作用时间 4 h;(2)ALI 组:注射 LPS 10 mg/kg 复制 ALI 模型,再根据按不同作用时间又分为 2、4、6 h 3 个亚组;(3)ALI+ ZD7155 组:LPS 注射前 30

min 注射 10 mg/kg ZD7155, 再注射 10 mg/kg LPS 作用 4 h。各实验组或亚组大鼠均为 5 只。采集动脉血并制备血浆-20℃冻存, 然后活杀大鼠取肺组织。

**1.2.1.2 离体肺组织肺泡液体清除率测定的分组** (1)空白对照组: 等量生理盐水注射作用大鼠 4 h 后, 给予右下肺灌注液; (2)阿米洛利组: 等量生理盐水注射作用 4 h 取肺后, 向右下肺内滴入含  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 阿米洛利的灌注液; (3)ALI 组: 大鼠经 LPS 作用 4 h 后, 给予右下肺灌注液; (4)ALI+ZD7155 组: 大鼠经 LPS 作用 4 h 后, 向右下肺内滴入含  $1 \times 10^{-4}$  mol/L ZD7155 的灌注液; (5)ALI+ZD7155+阿米洛利组: 大鼠经 LPS 作用 4 h 后, 向右下肺内滴入含  $1 \times 10^{-4}$  mol/L ZD7155 和  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 阿米洛利的灌注液。每组大鼠均为 5 只。各组给予灌注液后再行机械通气 1 h, 抽取肺泡液体测定 AFC。

**1.2.2 肺湿质量/干质量(W/D)比值测定** 游离大鼠左肺, 称量湿质量(W), 然后 80℃烤箱脱水 72 h 后再称量干质量(D), 计算 W/D 比值。W/D 比值=(肺湿质量-肺干质量)/肺干质量。

**1.2.3 病理形态学检查** 各组或亚组大鼠在作用 4 h 后均取右下肺下叶组织, 放入 10% 甲醛溶液中固定 48 h, 石蜡包埋, 苏木素-伊红(HE)染色, 光镜观察肺间质及肺泡病理学改变。

**1.2.4 血清 Ang II 及 TNF- $\alpha$  浓度测定** 动脉血 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 用 ELISA 分别测定血清 Ang II 及 TNF- $\alpha$  浓度, 按照试剂盒说明书进行操作。

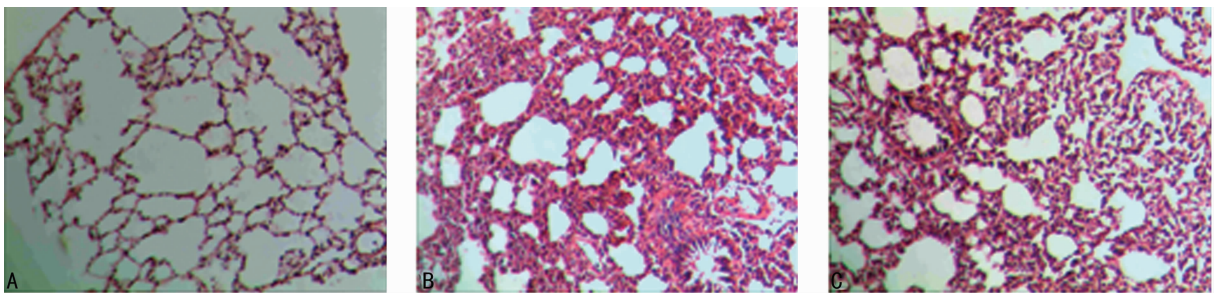
**1.2.5 肺组织 Ang II 浓度测定** 将肺组织剪碎后与匀浆介质按 1:9 比例混合, 玻璃匀浆器使肺组织充分匀浆化, 然后 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 用酶联免疫分析法测定, 按照试剂盒说明书进行操作。

**1.2.6 离体肺组织肺泡液体清除率的测定** 将 LPS 或生理盐水作用 4 h 后的大鼠麻醉处死, 气管切开后进行气管插管, 取出全部气管、肺脏及心脏, 用保鲜膜包被后放入 38℃ 水箱中孵育。经气管导管将灌注液(0.15 mg/mL 伊文思蓝标记的 5% 清蛋白等渗生理盐水)以 4 mL/kg 灌入大鼠右下肺下叶, 并给予 2 mL 的氧气确保灌注液到达肺脏。持续给予 100% 氧气, 使气道压力在 650~700 Pa, 行机械通气 1 h。然后以采样管吸取右下肺下叶内的肺泡液体 0.2 mL, 通过分光光度计, 在 620 nm 处测定 Evans 蓝标记的清蛋白浓度, 计算 AFC。

**1.3 统计学处理** 运用 SPSS13.0 软件进行资料的分析处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以 ANOVA 检验组间参数的差异, 相关性采用直线相关分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺组织病理变化** 与正常肺组织(图 1A, 未见炎症细胞浸润, 无间质水肿)相比, ALI 组大鼠(图 1B)肺组织肺泡完整性破坏, 部分肺泡塌陷, 肺间质增厚水肿明显, 大量炎症细胞浸润。ALI+ZD7155 组大鼠(图 1C)肺泡结构较 ALI 组完整, 部分肺泡复张, 肺间质厚度明显减轻, 炎症细胞浸润明显减少。



A: 正常肺组织; B: ALI 组; C: ALI+ZD7155 组。

图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色结果 ( $\times 100$ )

**2.2 肺组织 W/D 比值** ALI 4 h 组肺组织含水量与空白对照组相比明显增加( $P < 0.01$ ); ALI+ZD7155 组大鼠肺组织含水量较 ALI 4 h 组显著减少, 但仍高于空白对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 1。

**2.3 血清 TNF- $\alpha$  浓度** ALI 4 h 模型组血清 TNF- $\alpha$  浓度较对照组显著增加( $P < 0.01$ ); ZD7155 干预 ALI 大鼠后血清 TNF- $\alpha$  浓度较模型组显著降低( $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 Ang II 对 ALI 大鼠血清 TNF- $\alpha$  及肺组织 W/D 比值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g/L}$ )	W/D 值
空白对照组	1.43 $\pm$ 0.53	3.94 $\pm$ 1.11
ALI 4 h 组	4.89 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	7.34 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>
ALI+ZD7155 组	2.65 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	5.58 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>

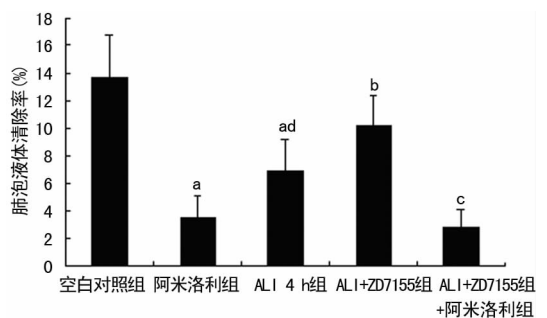
<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组相比; <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ ; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ALI 组相比。

**2.4 血浆及肺组织 Ang II 浓度变化** LPS 诱导 ALI 大鼠模型血浆及肺组织内 Ang II 浓度变化呈现时间依赖性, 随着 LPS 作用时间的延长呈进行性增加, 各时间点组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 各组大鼠血浆及肺组织 Ang II 浓度变化 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	血浆 Ang II 浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肺组织 Ang II 浓度 (ng/g)
空白对照组	1.03 $\pm$ 0.25	78.34 $\pm$ 19.70
ALI 2 h 组	2.53 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	190.20 $\pm$ 38.23 <sup>b</sup>
ALI 4 h 组	3.78 $\pm$ 1.14 <sup>c</sup>	305.00 $\pm$ 72.99 <sup>c</sup>
ALI 6 h 组	4.97 $\pm$ 1.10 <sup>c</sup>	580.40 $\pm$ 129.16 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与空白对照组相比; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ALI 2 h 组相比; <sup>d</sup>:  $P < 0.01$ , <sup>e</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ALI 4 h 组相比。



<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与空白对照组相比; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ALI 组(4 h)相比; <sup>c</sup>:  $P < 0.01$ , 与 ALI+ZD7155 组相比; <sup>d</sup>:  $P < 0.05$ , 与阿米洛利组相比。

图 2 ALI 4 h 各组大鼠离体肺组织肺泡液体清除率比较

**2.5 AFC 变化** 阿米洛利组较空白对照组 AFC 显著降低 ( $P < 0.01$ )。ALI 组 (4 h) AFC 较空白对照组减少 ( $P < 0.01$ )，但仍高于阿米洛利组 ( $P < 0.05$ )。ALI+ZD7155 组 AFC 高于 ALI 组 ( $P < 0.05$ )；ALI+ZD7155+阿米洛利组 AFC 降低，与阿米洛利组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，见图 2。

**2.6 肺组织 Ang II 浓度与 AFC 变化的相关性分析** ALI 4 h 大鼠肺组织 Ang II 浓度与 AFC 呈负相关 ( $r = -0.895$ ,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨 论

Ang II 是肾素-血管紧张素系统 (RAS) 中最关键的效应物质。研究证实, Ang II 在局部组织能通过自分泌和旁分泌方式发挥调节器官生理功能的作用<sup>[2]</sup>。Ang II 浓度与 ALI 炎性介质的浓度显著相关, 血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 抑制 Ang II 的生成后促炎细胞因子分泌显著减少<sup>[3]</sup>。进一步研究发现, Ang II 主要通过其 1 型受体促使 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 等多种细胞因子生成, 诱导或加重 ALI 的发生、展<sup>[4]</sup>。本实验结果说明, 血清以及肺组织 Ang II 的浓度随 LPS 诱导 ALI 动物模型作用时间的延长而进行性增加, 血清 TNF- $\alpha$  浓度升高也与 Ang II 的诱导生成相关, 同时特异性 AT1 受体阻滞剂抑制 Ang II 和 TNF- $\alpha$  生成, 提示 Ang II 通过 AT1 受体调节 ALI 炎症过程。

除诱导炎症作用之外, Ang II 在肺水肿的发生发展中也扮演重要的作用。本实验中, ALI 大鼠模型的病理结果显示肺泡水肿明显, 且肺 W/D 比较对照组显著增加, 而 AT1 受体阻滞剂干预后病理水肿及肺湿质量/干质量比结果均明显减少, 肺水肿缓解。Ang II 可以通过多种方式调节 ALI 肺水肿的形成。局部诱导生成的 Ang II 能促发肺血管的漏出增加<sup>[5]</sup>, 而在 AT1 受体基因敲除鼠上这种作用显著减弱<sup>[6]</sup>, 提示 Ang II 通过 AT1 受体途径促进肺血管通透性增加, 加重肺水肿, 与本研究结果相一致。Ang II 还能显著下调 ALI 大鼠水通道蛋白 1 (AQP1) 表达, 促进肺水肿形成<sup>[7]</sup>。

在 ALI 肺水肿的发生中 Ang II 对肺泡液体清除的作用如何仍然不清楚。本实验结果显示, Ang II 通过 AT1 受体减弱 AFC, 不利于肺泡液体清除; 在阿米洛利同时作用下, AT1 受体阻滞剂对 AFC 的升高作用被完全消除, 并且与阿米洛利单独作用时的 AFC 相比较没有显著差异, 提示 Ang II 通过 AT1 受体对 AFC 调节的作用通路和阿米洛利的的作用通路可能是一致的。阿米洛利是肺泡上皮钠通道 (ENaC) 的特异性阻断剂, 后者被认为是肺泡内钠水重吸收的限速步骤<sup>[8]</sup>, 阿米洛利能够显著降低 ENaC 对钠离子的转运力, 从而影响肺泡内液体的重吸收。因此本实验提示 Ang II 对 AFC 的影响是通过对 ENaC 的调控实现的。其可能的机制为: 多种组织的研究结果发现 Ang II 与 AT1 受体相互作用后能够介导细胞内环化腺苷一磷酸 (cAMP) 浓度减少<sup>[9-11]</sup>。细胞内 cAMP 浓度变化能够调控 ENaC 全细胞电流, 诱导顶膜侧钠通透性的快速增加<sup>[12]</sup>, cAMP 浓度降低使阿米洛利敏感性 ENaC 肺液清除能力减弱; 用  $\beta$  肾上腺能受体激动剂特布他林进行干预后, 能升高细胞内 cAMP 浓度, 从而增强阿米洛利敏感性短路电流, 增加跨上皮钠电流<sup>[13]</sup>, 改善 AFC。

总之, Ang II 通过 AT1 受体降低肺泡液体清除; 运用 AT1 受体阻滞剂可以逆转上述病理生理过程, 减轻肺水肿。

### 参考文献

[1] Briot R, Frank JA, Uchida T, et al. Elevated levels of the

receptor for advanced glycation end products, a marker of alveolar epithelial type I cell injury, predict impaired alveolar fluid clearance in isolated perfused human lungs[J]. Chest, 2009, 135(2): 269-275.

- [2] Paul M, Poyan MA, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems[J]. Physiol Rev, 2006, 86(3): 747-803.
- [3] Hagiwara S, Iwasaka H, Matumoto S, et al. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the inflammatory response in in vivo and in vitro models[J]. Crit Care Med, 2009, 37(2): 626-633.
- [4] Wang F, Xia ZF, Chen XL, et al. Angiotensin II type-1 receptor antagonist attenuates LPS-induced acute lung injury[J]. Cytokine, 2009, 48(3): 246-253.
- [5] Imai Y, Kuba K, Penninger JM. The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice[J]. Exp Physiol, 2008, 93(5): 543-548.
- [6] Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure[J]. Nature, 2005, 436(7047): 112-116.
- [7] 曹春水, 殷勤, 黄亮, 等. 血管紧张素 II 对急性肺损伤大鼠肺水通道蛋白 1 表达的影响[J]. 中国危重症急救医学, 2010, 22(7): 426-429.
- [8] Althaus M, Fronius M, Buch-CKert Y, et al. Carbon monoxide rapidly impairs alveolar fluid clearance by inhibiting epithelial sodium channels[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 41(6): 639-650.
- [9] Saha S, Li Y, Anand-Srivastava MB. Reduced levels of cyclic AMP contribute to the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2008, 86(4): 190-198.
- [10] Li XC, Carretero OA, Navar LG, et al. AT1 receptor-mediated accumulation of extracellular angiotensin II in proximal tubule cells: role of cytoskeleton microtubules and tyrosine phosphatases[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 291(2): 375-383.
- [11] Jensen AM, Bae EH, Fenton RA, et al. Angiotensin II regulates V2 receptor and pAQP2 during ureteral obstruction[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(1): 127-134.
- [12] Richards KS, Bommert K, Szabo G, et al. Differential expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunits in mouse hippocampal interneurons and pyramidal cells [J]. J Physiol, 2007, 585(2): 491-505.
- [13] Mutlu GM, Factor P. Alveolar epithelial beta2-adrenergic receptors[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 38(2): 127-134.

(收稿日期: 2015-01-12 修回日期: 2015-03-26)