文章编号:1000-5404(2010)12-1293-03

论著

# 腺苷 A2a 受体对肺泡上皮细胞钠离子通道 α 亚基的上调作用

邓 旺,李长毅,王导新 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 研究腺苷 A2a 受体对肺泡上皮 A549 细胞钠离子通道 α 亚基(epithelial sodium channel α-subunit, α-ENaC)表达变化的影响,探讨其在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中的作用。**方法** 不同剂量(0、0.1、1、10、100 μmol/L)和不同时间(0、1、4、8、24、48 h)的腺苷 A2a 受体激动剂 CGS-21680 干预 A549 细胞,分别用 RT-PCR 和 Western blot 检测 α-ENaC mRNA 和蛋白表达情况。**结果** ①不同剂量 CGS-21680 作用 A549 细胞 8 h 后,α-ENaC mRNA 和蛋白表达水平从 0.1 μmol/L 开始增加,并与 CGS-21680 剂量呈正相关(mRNA 表达:$r=0.959$, $P<0.01$;蛋白表达:$r=0.988$, $P<0.01$),与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。②100 μmol/L CGS-21680 作用 A549 细胞 1 h 后,α-ENaC mRNA 和蛋白表达水平开始增加,4 h 后与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 激动腺苷 A2a 受体能上调 α-ENaC 的表达,有益于急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的预后。

[关键词] 腺苷 A2a 受体;上皮细胞钠离子通道 α 亚基;成人呼吸窘迫综合征
[中图法分类号] R322.35; R341; R394.3 [文献标志码] A

# Activation of adenosine receptor A2a up-regulates epithelial sodium channel α-subunit in cultured alveolar epithelium cells

Deng Wang, Li Changyi, Wang Daoxin (Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of adenosine receptor A2a on the expression of epithelial sodium channel α-subunit (α-ENaC) in alveolar epithelium A549 cells and the effects of adenosine receptor A2a in acute lung injury/aute respiratory distress syndrome. **Methods** After alveolar epithelium A549 Cells were incubated with 0, 0.1, 1, 10 and 100 μmol/L adenosine receptor A2a agonist CGS-21680 for 8 h or with 100 μmol/L CGS-21680 for 0, 1, 4, 8, 24 and 48 h respectively, the mRNA and protein levels of α-ENaC were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis respectively. **Results** After A549 cells were incubated with CGS-21680 at different doses for 8 h, the mRNA and protein levels of α-ENaC were elevated significantly at 0.1 μmol/L CGS-21680 treatment compared with the control group ($P<0.05$), and had a positive correlation with the increase of CGS-21680 concentration. After A549 cells were incubated with 100 μmol/L CGS-21680 for 4 h, the mRNA and protein levels of α-ENaC were elevated significantly compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Activation of adenosine receptor A2a up-regulates α-ENaC, which is beneficial to the prognosis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome.

[**Key words**] receptor, adenosine A2a; epithelial sodium channel α-subunit; respiratory distress syndrome, adult

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30971303). Corresponding author: Wang Daoxin, E-mail: wangdaoxin1@163.com

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是危及生命的危重症。ALI/ARDS 发生、发展过程中,由于肺泡腔内大量富含蛋白质的渗出液产生而导致肺水肿形成,因此有效地清除多余的水肿液具有重要意义。腺苷受体(adenosine receptors)属于 G 蛋白偶联受体超家族,目前已确定 Al、A2a、A2b 和 A3 4 种亚型。研究发现腺苷 A2a 受体在肺泡上皮中的表达量最高,特异性地激动腺苷 A2a 受体,能促进肺泡上皮钠离子转运和肺水肿液的清除[1]。目前认为钠离子转运是参与肺水肿清除的主要离子转运机制,而上皮钠离子通道(epithelial sodium channel, ENaC)是钠离子转运系统最重要的组成部分[2]。ENaC 是一种跨膜蛋白,由 3 个同源亚体 α、β、γ 构成。研究表明,α-ENaC 基因敲出的小鼠因不能有效清除肺水肿在出生后不久后均死亡,是肺水肿液清除中必不可少的[3]。腺苷 A2a 受体是否通过对 ENaC 亚基表达的调控来促进肺水肿的清除,目前仍然不清楚。因此,讨论腺苷 A2a 受体与

[基金项目] 国家自然科学基金(30971303)
[通信作者] 王导新,E-mail: wangdaoxin1@163.com

α-ENaC 表达调控的关系,对研究肺水肿的清除的机制具有重要意义。本实验通过激动腺苷 A2a 受体,动态观察 α-ENaC 表达情况,探讨其在 ALI/ARDS 可能的作用机制,为临床治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

A549 细胞、10% 小牛血清和 1640 培养基由重庆医科大学生命科学院基础研究所提供。CGS-21680(腺苷 A2a 受体特异性的激动剂[4])购自英国 Tocris 公司,总 RNA 提取试剂盒购自北京白泰克生物技术有限公司,膜蛋白提取试剂盒和凯基 Super RT-PCR 试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,α-ENaC 兔抗人多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔 IgG 购自北京博奥森公司。

### 1.2 细胞培养

本实验以国内外常用的 A549 细胞作为肺泡上皮细胞的实验模型,用含 10% 小牛血清的 1640 培养基在 37 ℃、5% $CO_2$ 孵箱培养。细胞用胰蛋白酶消化传代,细胞贴壁 100% 时开始干预。加入相同浓度的 CGS-21680(100 μmol/L),用含 10% 小牛血清的 1640 培养基培养 0、1、4、8、24、48 h。加入不同剂量的 CGS-21680(0.1、1、10、100 μmol/L)培养 8 h,对照组为不含 CGS-21680 的培养基培养。

### 1.3 RT-PCR 检测 α-ENaC mRNA 表达情况

按 RNA 提取试剂盒说明书按步骤提取不同时间和不同剂量 A549 细胞总 RNA。紫外分光光度计及琼脂糖电泳检测 RNA 纯度和完整性后,依据凯基公司 Super RT-PCR 试剂盒说明书建立反应体系,PCR 仪进行反转录和扩增目的基因和内参 β-actin。其中 α-ENaC 引物序列:上游:5′-GACAGAAAGGGAG-GTGCT-3′,下游:5′-GTGGACTGTGGAGGGCTA-3′,产物长度 407 bp。β-actin 内参引物序列:上游:5′-GCTCGTCGTCGAC-AACGGCTC-3′;下游:5′-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3′,产物长度 359 bp。反应条件:42 ℃保温 1 h,随后进行 PCR 扩增。α-ENaC 反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,33 个循环,72 ℃ 10 min。β-actin 内参反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,54 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,33 个循环,72 ℃ 10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描,计算 α-ENaC/β-actin 比值,Quantity One 软件进行定量分析。

### 1.4 Western blot 检测 α-ENaC 蛋白表达情况

按蛋白提取试剂盒说明书提取细胞膜蛋白后采用 BCA 法进行蛋白定量,绘制标准蛋白曲线,定量后 -80 ℃分装保存。蛋白 100 ℃煮沸 5 min 后,上样进行 SDS-PAGE 电泳(8% 分离胶,5% 浓缩胶),电转移法转膜,封闭液室温封闭 1 h,一抗 α-ENaC(1∶500)、内参 β-actin(1∶500)4 ℃孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶2 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜后,ECL 显色。图像扫描后用 Quantity One 4.6 软件分析,比较 α-ENaC 与 β-actin 条带的平均灰度值并进行半定量分析。

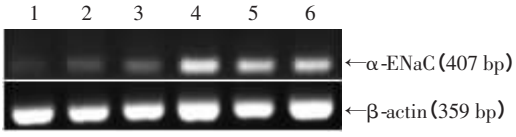
### 1.5 统计学分析

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 不同作用时间 CGS-21680 对 α-ENaC mRNA 表达的影响

相同剂量的 CGS-21680(100 μmol/L)培养 A549 细胞 0、1、4、8、24、48 h 后,RT-PCR 检测显示 α-ENaC mRNA 在各时间段的表达分别为(0.04 ± 0.02)、(0.08 ± 0.03)、(0.14 ± 0.05)、(0.78 ± 0.09)、(0.50 ± 0.06)、(0.46 ± 0.05),其中 α-ENaC mRNA 表达在 4、8、24、48 h 与对照组相比显著增加($P < 0.05$,图 1)。

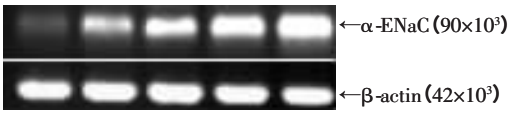



1:0 h(对照组);2:1 h;3:4 h;4:8 h;5:24 h;6:48 h

**图 1 100 μmol/L CGS-21680 作用不同时间对 α-ENaC mRNA 表达的影响**

### 2.2 不同剂量 CGS-21680 对 α-ENaC mRNA 表达的影响

不同剂量的 CGS-21680 培养 A549 细胞 8 h 后,RT-PCR 检测 α-ENaC mRNA 的表达分别为(0.11 ± 0.04)、(0.49 ± 0.08)、(0.67 ± 0.09)、(1.04 ± 0.18)、(1.22 ± 0.15),其中 α-ENaC mRNA 表达随 CGS-21680 浓度增加呈上升趋势,与对照组相比显著增加,剂量与 α-ENaC mRNA 表达的变化呈正相关($r = 0.959$,$P < 0.01$,图 2)。




1:0 μmol/L(对照组);2:0.1 μmol/L;3:1 μmol/L;4:10 μmol/L;5:100 μmol/L

**图 2 不同剂量 CGS-21680 对 α-ENaC mRNA 表达的影响**

### 2.3 不同作用时间 CGS-21680 对 α-ENaC 蛋白表达的影响

相同剂量的 CGS-21680(100 μmol/L)培养 A549 细胞 0、1、4、8、24、48 h 后,Western blot 检测 α-ENaC 蛋白表达分别为(0.64 ± 0.05)、(0.68 ± 0.04)、(0.8 ± 0.03)、(1.26 ± 0.03)、(1.14 ± 0.04)、(1.05 ± 0.05),其中 α-ENaC 蛋白表达与对照组相比在 4、8、24、48 h 显著增加($P < 0.05$,图 3)。



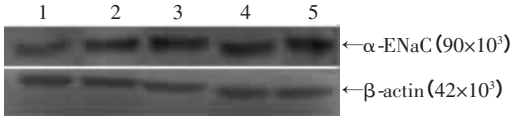

1:0 h(对照组);2:1 h;3:4 h;4:8 h;5:24 h;6:48 h

**图 3 100 μmol/L CGS-21680 作用不同时间对 α-ENaC 蛋白表达的影响**

### 2.4 不同剂量 CGS-21680 对 α-ENaC 蛋白表达的影响

不同剂量的 CGS-21680 培养 A549 细胞后,Western blot 检测 α-ENaC 蛋白表达分别为(0.38 ± 0.04)、(0.66 ± 0.08)、(1.02 ± 0.12)、(1.38 ± 0.07)、(1.79 ± 0.05),其中 α-ENaC 蛋

白表达随 CGS-21680 剂量增加呈上升趋势,与对照组相比显著增加,浓度与 α-ENaC 蛋白表达的变化呈正相关($r=0.988$,$P<0.01$,图 4)。




1:0 μmol/L(对照组);2:0.1 μmol/L;3:1 μmol/L;4:10 μmol/L;5:100 μmol/L

**图 4 不同剂量 CGS-21680 对 α-ENaC 蛋白表达的影响**

## 3 讨论

ALI 病情进行性加重时则发展为 ARDS,但迄今其发病机制仍然未完全阐明。目前研究发现,ALI/ARDS 时,肺泡上皮细胞的液体清除功能受损,与患者的死亡率显著相关。因此有效地清除肺水肿液,维持肺泡腔相对干燥的环境对治疗 ALI/ARDS 有重要意义。目前在压缩肺泡排液技术、β 肾上腺素受体激动剂[5]、激素的相关治疗[6]等方面已通过实验证明能通过提高肺水肿液的清除从而改善 ALI/ARDS 的预后。这对研究 ALI/ARDS 发病机制及临床治疗有了更进一步的认识。

目前体内体外实验[7-9]表明激活腺苷 A2a 受体能减轻急性肺损伤中 PMNs、TNF-α、趋化因子等炎症介质的释放,被认为具有保护肺组织的作用,但腺苷 A2a 受体在 ALI/ARDS 发生、发展中的具体机制不清楚。Factor 等[1]研究发现激动腺苷 A2a 受体能促进肺泡上皮钠离子的转运,从而有利于肺水肿的清除,但其具体的信号转导机制不清楚。ENaC 由 α、β、γ 3 种亚基构成,其中 α-ENaC 是参与肺泡上皮钠离子转运及肺水肿液清除必不可少的环节[10]。为此我们设计了本实验,探讨在不同时间、不同剂量 CGS-21680 干预下腺苷 A2a 受体与 α-ENaC 表达调控的关系。

本实验中,我们给予不同浓度的 CGS-21680(0.1、1、10、100 μmol/L)干预 A549 细胞,检测 α-ENaC mRNA和蛋白表达情况时,发现随着 CGS-21680 的剂量增加而增加,呈正相关。由此,我们认为 CGS-21680 作用于 A549 细胞后,通过激活腺苷 A2a 受体呈剂量依赖性上调 α-ENaC 的表达,这种作用可能是通过基因转录实现的。如之前所述,α-ENaC 表达的上调有利于 ALI/ARDS 时肺泡上皮钠离子转运及肺泡腔内水肿液的清除。同时,我们用 100 μmol/L CGS-21680 作用于 A549 细胞后,从 4 h 开始 α-ENaC 基因转录显著增加,8 h 达到一个较高水平,之后 α-ENaC 表达有所下降,其变化趋势与 Western blot 检测结果一致。已有研究[11,12]表明 ENaC 的 α、β、γ 3 个亚基各自都参与了肺水肿的清除,而且在肺泡上皮细胞中 α 亚基含量相对较高,β 亚基含量较低。结合本实验,我们推测在药物干预 8 h 后,腺苷 A2a 受体首先参与 α-ENaC 表达的调节,但不同时间的药物干预可能引起腺苷 A2a 受体同时参与 β 亚基、γ 亚基或是其中一种亚基的表达调节,其中的信号转导通路也不清楚,而且 3 种亚基在 ENaC 中的功能和含量也不完全一样,这些因素可能影响 α-ENaC 的表达,但这些假设都还需要进一步的实验来证明。

综上所述,从肺水肿清除的角度来看,腺苷 A2a 受体上调 α-ENaC 的表达,这有益于 ALI/ARDS 的预后,但腺苷 A2a 受体与 ENaC 各亚基调控的信号通路还需要体内实验进一步研究验证。

## 参考文献:

[1] Factor P, Mutlu G M, Chen L, *et al*. Adenosine regulation of alveolar fluid clearance[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(10): 4083-4088.

[2] Berthiaume Y, Matthay M A. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2007, 159(3): 350-359.

[3] Hummler E, Barker P, Gatzy J, *et al*. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice[J]. Nat Genet, 1996, 12(3): 325-328.

[4] Klotz K N, Hessling J, Hegler J, *et al*. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1998, 357(1): 1-9.

[5] Wu X M, Wang H Y, Li G F, *et al*. Dobutamine enhances alveolar fluid clearance in a rat model of acute lung injury[J]. Lung, 2009, 187(4): 225-231.

[6] Folkesson H G, Matthay M A. Alveolar epithelial ion and fluid transport: recent progress[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 35(1): 10-19.

[7] Chen C M, Penuelas O, Quinn K, *et al*. Protective effects of adenosine A2A receptor agonist in ventilator-induced lung injury in rats[J]. Crit Care Med, 2009, 37(7): 2235-2241.

[8] Lisle T C, Gazoni L M, Fernandez L G, *et al*. Inflammatory lung injury after cardiopulmonary bypass is attenuated by adenosine A(2A) receptor activation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 136(5): 1280-1287.

[9] Reutershan J, Cagnina R E, Chang D, *et al*. Therapeutic anti-inflammatory effects of myeloid cell adenosine receptor A2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury[J]. J Immunol, 2007, 179(2): 1254-1263.

[10] Lee I H, Campbell C R, Cook D I, *et al*. Regulation of epithelial $Na^+$ channels by aldosterone: role of Sgk1[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35(2): 235-241.

[11] Barker P M, Nguyen M S, Gatzy J T, *et al*. Role of gammaENaC subunit in lung liquid clearance and electrolyte balance in newborn mice. Insights into perinatal adaptation and pseudohypoaldosteronism[J]. J Clin Invest, 1998, 102(8): 1634-1640.

[12] McDonald F J, Yang B, Hrstka R F, *et al*. Disruption of the beta subunit of the epithelial $Na^+$ channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(4): 1727-1731.

(**收稿**:2009-12-10;**修回**:2010-01-28)

(编辑 张 维)