

过表达 AT2R 对 LPS 诱导的 AML12 细胞炎症反应的影响

许昌勇 张世浩 魏 伟

摘要 目的 探究过表达血管紧张素 II 2 型受体(AT2R)对脂多糖(LPS)诱导的小鼠肝细胞(AML12 细胞)炎症反应的影响。方法 以乳鼠组织器官为样本,通过 PCR 扩增出含有 EcoR I 和 Hind III 双酶切位点的 AT2R 目的基因片段,通过酶切、连接得到最终产物,挑选出的阳性克隆经测序鉴定;将 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒转染至 HEK 293T 细胞,24 h 后采用 Western blot 法检测 Flag 蛋白的表达;通过 Western blot 和激光共聚焦显微镜观察 AML12 细胞上的 AT2R 表达;对 AML12 细胞进行不同的处理,分为对照组、LPS 处理组、pCMV-Flag-N-AT2R 组和 pCMV-Flag-N-AT2R + LPS 组,通过 CCK-8 检测细胞活力;Western blot 检测 PCNA 蛋白,观察细胞增殖;qPCR 检测细胞炎症因子水平;Western blot 检测细胞核中转录因子 NF- κ B (p65) 表达水平。结果 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定以及测序结果表明 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒构建成功,Western blot 法的检测结果表明 AT2R 蛋白成功表达;激光共聚焦观察到 AML12 细胞上有 AT2R 受体,AT2R 重组质粒可以在 AML12 上表达;与对照组比较,LPS 处理的 AML12 细胞中细胞的活力和增殖能力减弱,而白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平升高,核转录因子 NF- κ B (p65) 表达水平升高;与 LPS 组比较,pCMV-Flag-N-AT2R 和 LPS 联合处理的 AML12 细胞中细胞的活力和增殖能力增强,而 IL-6 和 TNF- α 水平降低,核转录因子 NF- κ B (p65) 表达水平降低。结论 成功构建了 AT2R 过表达质粒,并在 AML12 细胞上成功表达,且 AT2R 可以抑制 LPS 诱导的 AML12 细胞的炎症反应。

关键词 血管紧张素 II 2 型受体;白细胞介素-6;肿瘤坏死因子- α ;脂多糖;AML12;质粒构建

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1712-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.018

急性肝损伤是短时间内突发的由多种因素导致

2023-06-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81871973)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥 230032

作者简介:许昌勇,男,硕士研究生;

张世浩,男,副研究员,博士生导师,责任作者,E-mail: shi-haozhang@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

的肝细胞大面积坏死或肝脏发生炎症反应以及肝功能受损的严重疾病,通常预后不良且病死率高。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是引起肝损伤的诱因之一^[1]。LPS 是革兰阴性菌的细胞壁成分,是最常见的致炎刺激,可引起急性肝损伤,最终导致肝硬化等慢性疾病^[2]。

血管紧张素 II 2 型受体(angiotensin II type 2 receptor, AT2R)是血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)受体的亚型之一,是肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin-system, RAS)的重要组成部分,介导 RAS 系统中多种细胞内信号的转导。AT2R 可被视为内源性修复系统,在组织损伤时会发生上调并介导组织保护作用^[3]。已有研究发现 AT2R 对脑损伤^[4]、肾损伤^[5]以及缺血性心脏损伤^[6]等都会产生保护作用,AT2R 被考虑为最具有潜力的药物靶点,但在急性肝损伤中的作用情况尚不清楚。该研究拟构建 AT2R 过表达质粒 pCMV-Flag-N-AT2R,并采用 LPS 诱导 AML12 细胞建立体外肝细胞炎症损伤模型,探讨过表达 AT2R 对 LPS 诱导的 AML12 细胞炎症反应的影响,为深入研究 AT2R 在急性肝损伤中的作用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞、菌株、主要试剂 pCMV-Flag-N 质粒由本课题组前期构建并保存;HEK 293T 细胞和 AML12 细胞均购自中国科学院上海细胞库;大肠杆菌(DH5 α)感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基及 DMEM/F12 培养基购自以色列 Biological industries 公司;限制性内切酶 EcoR I、限制性内切酶 Hind III、Prime STAR DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、1 kb DNA Ladder (Dye Plus) 均购自日本 Takara 公司;100 bp Ladder 购自康为世纪股份有限公司;San-Prep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;质粒小提中量试剂盒购自 TIANGEN 天根生化科技(北京)有限公司;Flag 抗体、PCNA 抗体、NF- κ B (p65) 抗体购自美国 Cell Sig-

naling Technology 公司; AT2R 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 山羊抗兔和山羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG 购自英国 Abcam 公司; 逆转录试剂盒购自诺唯赞生物科技有限公司; 琼脂糖凝胶微珠购自美国 GE 公司; PEI 转染试剂购自上海翌圣生物科技股份有限公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; LPS 和 CCK-8 试剂盒购自索莱宝生物科技有限公司; HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 和 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 均购自诺唯赞生物科技有限公司。白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 由通用生物(安徽)股份有限公司合成。

1.1.2 主要仪器 T100™ PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 核酸电泳仪和 DYY-6C 型电泳系统购自北京六一生物技术有限公司; Tanon 1600 全自动数码凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司; Scientz-HID 超声波细胞粉碎机购自南京赛飞生物技术有限公司; ImageQuant LAS 4000 荧光及化学发光成像系统购自美国 GE 公司; 多功能酶标仪购自瑞士 Tecan 公司; RT-qPCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 激光共聚焦显微镜购自德国徕卡公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 样本的提取 从乳鼠中获取肝、脾、肾、心、肺新鲜的组织样本; 使用 TRIzol 法提取组织 RNA 并通过酶标仪检测 RNA 浓度。依据逆转录试剂盒说明书进行实验操作, 将上述提取的 RNA 逆转录为 cDNA; 逆转录体系为: 模板 RNA 1 μg , 5 \times HisScript II qRT SuperMix 4 μl , RNase free ddH₂O 补足至 20 μl 体系。运行程序为: ① 50 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; ② 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 s。

1.2.2 引物设计、合成与 PCR 从 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11609> 获取鼠源 AT2R 基因序列 (NC_000086.8), 设计并添加 EcoR I 和 Hind III 酶切位点; 上游引物: 5'-AAAAGAATTCGTATGA-AGGACAACCTTCAGT-3', 下游引物: 5'-AAAAAAGCT-TTTTAAGACACAAAGGTGTC-3', 所有引物均由通用生物(安徽)股份有限公司合成。所获取的 cDNA 样本通过 PCR 反应扩增。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 出现约 1 000 bp 左右的条带时利用 DNA 胶回收试剂盒回收产物。

1.2.3 pCMV-Flag-N-AT2R 表达质粒的构建与鉴定 PCR 产物与 pCMV-Flag-N 质粒(氨苄抗性) 通过

EcoR I 和 Hind III 两个内切酶酶切, 并通过 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 涂板, 后挑取菌落进行双酶切鉴定及测序验证。

1.2.4 pCMV-Flag-N-AT2R 表达质粒的转染 按每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中, 细胞密度达到 70% ~ 80% 时, 用 PBS 洗过后, 加入 2 ml 新的含 10% 血清的 DMEM 培养基; 配制转染试剂: 一个 EP 管含有 200 μl 无血清培养基与 3 μl PEI, 另一个 EP 管含有 200 μl 无血清培养基与 1 μg pCMV-Flag-N-AT2R 质粒, 分别混匀静置 5 min; 两个 EP 管中的试剂合并到一个 EP 管中, 震荡混匀, 静置 20 min; 将混合液缓缓加入孔板中轻轻混匀; 6 h 后更换新鲜的含 10% 血清的 DMEM 培养基, 继续培养至 24 h。

1.2.5 Western blot 检测 Flag 标签蛋白的表达 转染 24 h 后, 收集 HEK 293T 细胞加细胞裂解液冰上裂解 30 min, 超声破碎提取蛋白, 加入 5 \times 蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴煮 10 min 变性, Western blot 检测蛋白表达情况。

1.2.6 免疫荧光检测 细胞爬片用 PBS 洗 3 次, 随后用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次; 5% BSA 封闭 30 min 后直接一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 拿出室温复温 30 min, PBS 洗 3 次, 荧光二抗及 DAPI 室温孵育 90 min, 封片; 激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.7 Western blot 检测 PCNA 蛋白和 NF- κ B (p65) 蛋白在 AML12 细胞中的表达 AML12 细胞转染 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒后, 使用 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激 24 h^[7], 裂解细胞, Western blot 检测蛋白表达情况。

1.2.8 CCK-8 检测 AML12 细胞活性 将 AML12 细胞接种于 96 孔板中, 对 AML12 细胞进行不同的处理, 分为对照组(不作处理)、LPS 处理组(仅加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LPS 处理)、pCMV-Flag-N-AT2R 组(转染终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒) 和 pCMV-Flag-N-AT2R + LPS 组(转染 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒后, 并加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LPS 处理) 按照不同分组分别对每组进行实验处理, 48 h 后每孔加入 10 μl 的 CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 通过酶标仪测定 450 nm 的吸光度值。

1.2.9 qPCR 检测炎症因子 mRNA 表达水平 收集各组细胞, 采用 TRIzol 法提取各组细胞 mRNA, 并以提取的 RNA 样品为模板反转录为 cDNA。根据 SYBR Green 试剂盒说明书对 cDNA 样品进行实时荧光定量 PCR, 引物序列见表 1。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$

表1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: CGTCCCGTAGACAAAATGGT
	R: GAATTTGCCGTGAGTGGAGT
IL-6	F: AGTTGCCTTCTTGGACTGA
	R: TCCACGATTTCCAGAGAAC
TNF-α	F: AGCCCCAGTCTGTATCCTT
	R: CTCCTTTGCGAACTCAGG

预变性 5 min 后进入循环; 95 °C、10 s、60 °C、30 s, 扩增 40 个循环。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两独立样本均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增目的基因片段 为确定能否从小鼠中获取目的基因, 选择从乳鼠不同组织器官中提取的 cDNA 为模板, 利用合成引物进行 PCR 扩增。凝胶成像系统检测发现, 在 1 000 bp 左右有一条清晰的亮带与 AT2R 基因片段长度一致, 且脾的 cDNA 所得到的亮带较亮。见图 1A。因此, 后续的实验中以脾脏的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获得 AT2R 的目的基因片段以构建鼠源的 AT2R 质粒。

2.2 质粒的构建 将 PCR 的胶回收产物与 pCMV-Flag-N 空载体分别通过 EcoR I 和 Hind III 限制性

内切酶进行双酶切反应, 并进行琼脂糖凝胶电泳和胶回收, 电泳结果显示, 在对应的 1 000 bp 左右 (AT2R 基因片段) 和 3 700 bp 左右 (pCMV-Flag-N 载体) 都有一条清晰的亮带。见图 1B。

酶切产物胶回收后, 通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 构建 pCMV-Flag-N-AT2R 表达质粒。挑取单个阳性菌落, 摇菌, 提取质粒。提取的质粒双酶切鉴定结果显示, 在 3 700 bp 左右出现线性 pCMV-Flag-N 目的片段, 在 1 000 bp 左右出现线性 AT2R 目的片段, 提示 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒成功构建。见图 1C。将酶切结果显示正确的质粒送出进行测序, 并利用 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> 网址对测序结果进行测序比对, 发现测序结果与 AT2R standard Seq 一致, pCMV-Flag-N-AT2R 质粒未发生突变, 测序序列对比未出现异常, 说明 pCMV-Flag-N-AT2R 重组质粒成功构建。见图 1D。

2.3 pCMV-Flag-N-AT2R 蛋白成功表达 收集转染 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒的 HEK 293T 细胞, 提取蛋白, Western blot 检测 AT2R 蛋白的表达, 结果表明 pCMV-Flag-N-AT2R 在 HEK 293 T 细胞中成功表达。见图 2。

2.4 AT2R 在 AML12 细胞上的表达 AML12 细胞孵 AT2R 抗体进行荧光染色, 镜下观察到细胞上有 AT2R 的表达, 见图 3A。pCMV-Flag-N-AT2R 质粒转染 AML12 细胞, 激光共聚焦观察到细胞上有荧

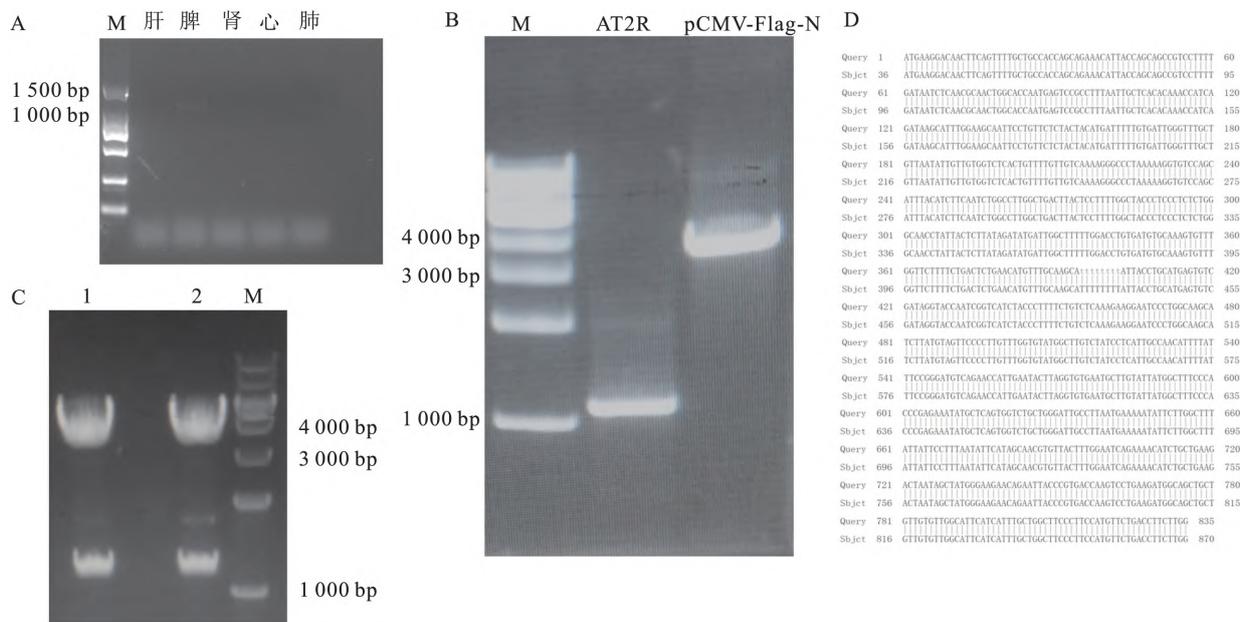


图1 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒的构建

A: PCR 扩增的电泳图, M: marker (100 bp Ladder); B: PCR 产物及载体双酶切电泳图, M: marker (1 kb DNA Ladder); C: pCMV-Flag-N-AT2R 质粒的酶切鉴定, M: marker (1 kb DNA Ladder), 1、2: pCMV-Flag-N-AT2R; D: pCMV-Flag-N-AT2R 质粒的测序结果比对

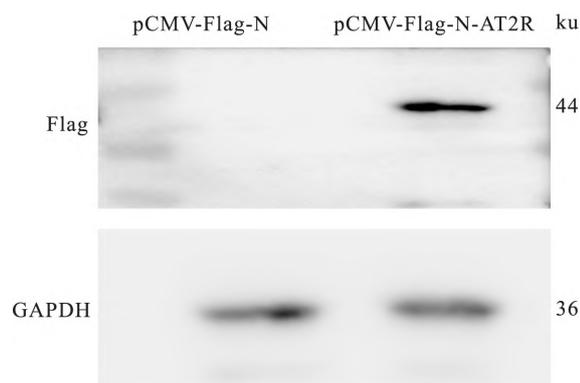


图2 Western blot 检测 Flag 蛋白表达

光表达,提示 AT2R 过表达质粒成功转染到 AML12 细胞上,见图 3B。pCMV-Flag-N-AT2R 质粒转染到 AML12 细胞上后,Western blot 检测结果显示 AT2R 质粒可以在 AML12 细胞上过表达($t = 4.315$, $P < 0.05$) ,见图 3C。

2.5 过表达 AT2R 对细胞增殖活力的影响 在 AML12 细胞中转染 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒后,使用 LPS 刺激转染的细胞 24 h,收集样本,通过 Western blot 检测 PCNA 蛋白的表达,CCK-8 检测细胞活力。结果显示:与对照组比较,LPS 处理的 AML12 细胞的 PCNA 蛋白表达明显降低($t = 4.48$, $P < 0.05$) ,

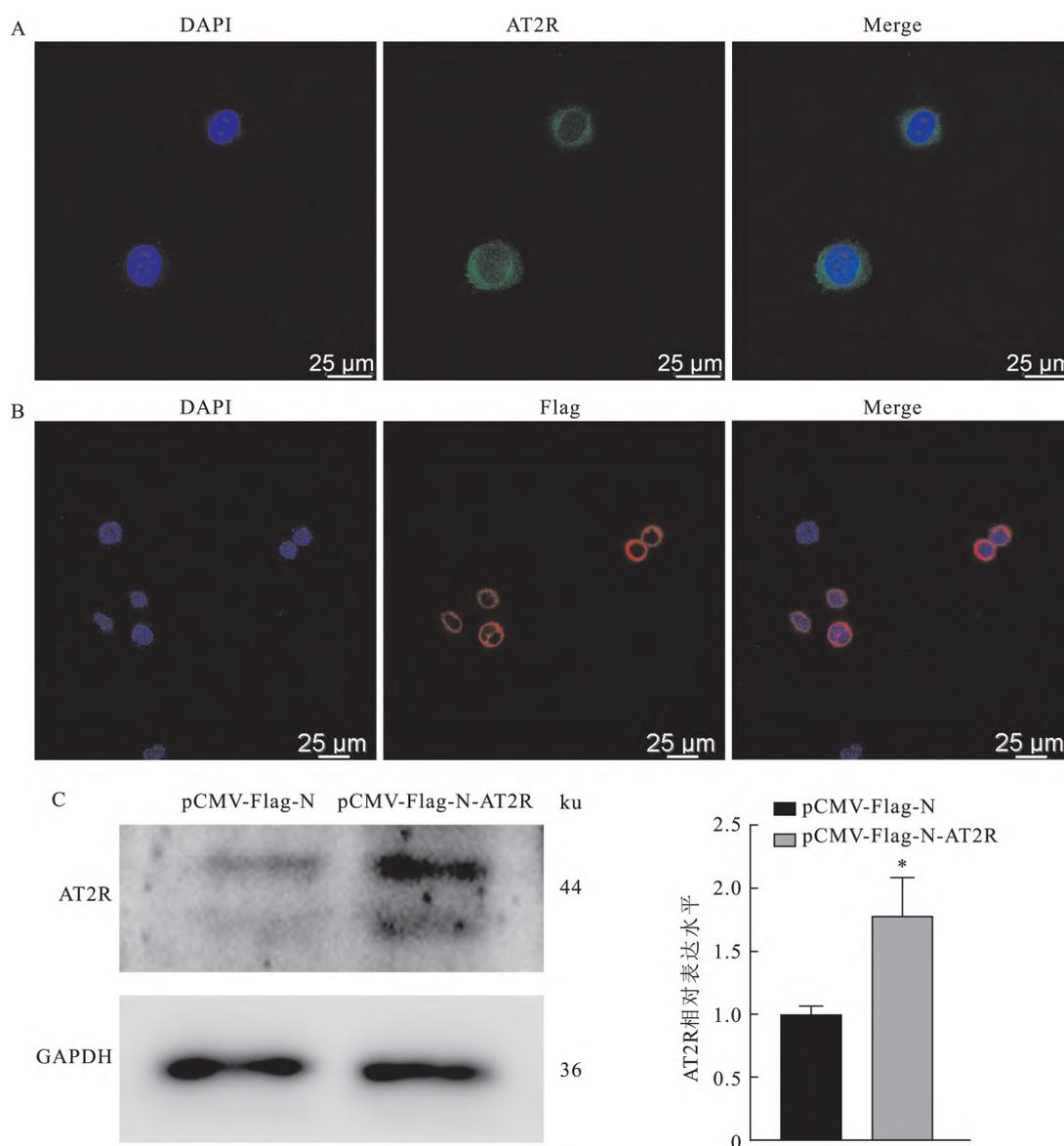


图3 激光共聚焦及 Western blot 观察 AT2R 在 AML12 细胞上的表达

A: 通过共聚焦观察 AT2R 在 AML12 细胞上的表达 $\times 63$; B: 通过共聚焦观察 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒在 AML12 细胞上成功转染 $\times 63$; C: 通过 Western blot 观察 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒在 AML12 细胞上的过表达;蓝色代表 DAPI 绿色代表 AT2R 红色代表 Flag;与 pCMV-Flag-N 组比较: * $P < 0.05$

细胞活力减弱($t = 11.14, P < 0.001$); 与 LPS 处理组比较, pCMV-Flag-N-AT2R + LPS 联合处理的 AML12 细胞的 PCNA 蛋白表达明显增加($t = 4.66, P < 0.01$), 细胞活力明显增强($t = 10.63, P < 0.001$)。见图 4。

2.6 AT2R 过表达对 LPS 诱导下 AML12 细胞炎症因子水平的影响 qPCR 检测 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平。结果显示: 与对照组比较, LPS 处理的 AML12 细胞的 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平升高($t = 17.17, P < 0.001; t = 20.37, P < 0.001$); 与 LPS 处理组比较, pCMV-Flag-N-AT2R + LPS 联合处理的 AML12 细胞的 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平下降($t = 5.67, P < 0.01; t = 8.51, P < 0.01$)。见图 5。

2.7 AT2R 过表达对 LPS 诱导的 AML12 细胞 p65 蛋白表达水平的影响 Western blot 结果显示: 与对照组比较, LPS 处理组 p65 蛋白表达水平显著升高($t = 11.63, P < 0.001$); 与 LPS 处理组比较, pCMV-Flag-N-AT2R + LPS 联合处理组 p65 蛋白表

达水平降低($t = 2.88, P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

肝脏作为机体主要的代谢器官对维护人体健康是必不可少的。正因为肝脏特殊的代谢能力, 导致肝脏极易遭受损伤。本研究用 LPS 诱导 AML12 细胞建立肝细胞损伤的体外模型, 在给予 LPS 刺激后, AML12 细胞的活力和细胞增殖能力明显减弱, 炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的表达水平明显增多。

AT1R 和 AT2R 是 Ang II 的同源受体, 并且 Ang II 与两种受体具有较高且相等的亲和力。因此 Ang II 主要通过 AT1R 和 AT2R 发挥作用, 而 AT1R 和 AT2R 虽同属于 GPCR, 但两个亚型之间只有约 34% 的序列同源^[8], AT2R 在基因结构、蛋白质序列、组织表达、信号和调控等方面与 AT1R 均有差异^[9-10]。AT1R 具有维持体液电解质平衡、调节血压和促进交感神经传导的能力, 其阻断剂在临床上被广泛用作降压药物^[11]; AT2R 与神经生长、疼痛控

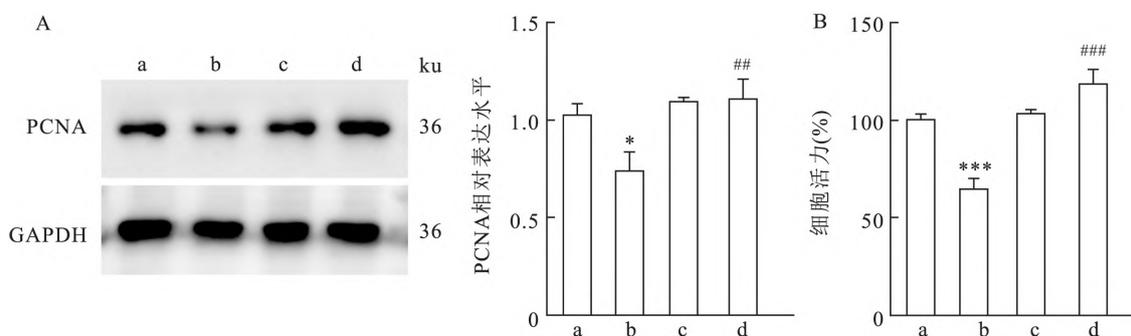


图 4 过表达 AT2R 对细胞增殖活力的影响 ($n = 5$)

A: Western blot 检测 PCNA 蛋白表达并分析; B: CCK-8 检测 AML12 细胞活力; a: 对照组; b: LPS 处理组; c: pCMV-Flag-N-AT2R 组; d: pCMV-Flag-N-AT2R + LPS 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 LPS 处理组比较: ### $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

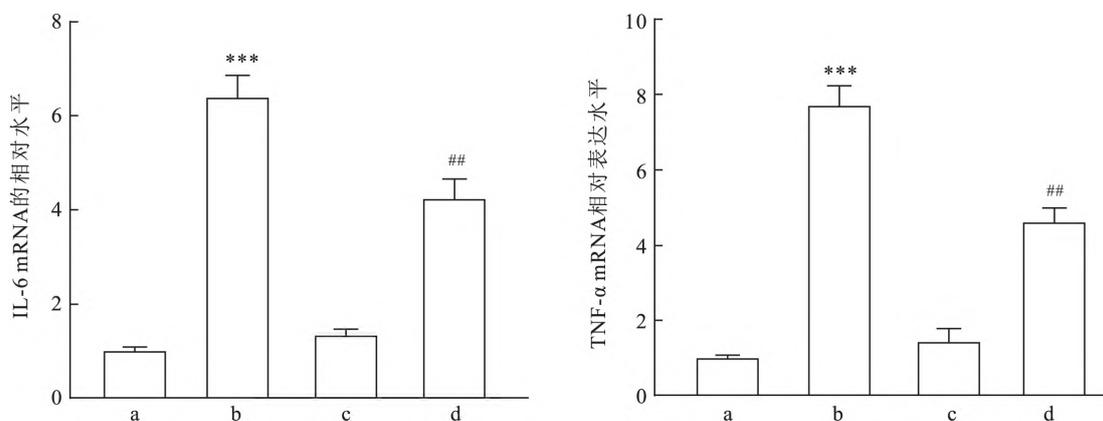


图 5 各组细胞中细胞炎症因子的 mRNA 水平 ($n = 5$)

a: 对照组; b: LPS 处理组; c: pCMV-Flag-N-AT2R 组; d: pCMV-Flag-N-AT2R + LPS 组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 LPS 处理组比较: ## $P < 0.01$

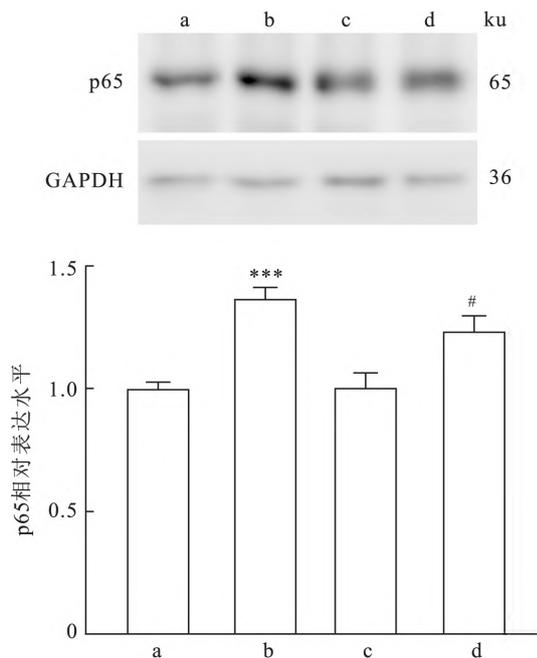


图6 各组 AML12 细胞中 NF- κ B 蛋白表达水平 ($n=5$)

a: 对照组; b: LPS 处理组; c: pCMV-Flag-N-AT2R 组; d: pCMV-Flag-N-AT2R + LPS 组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 LPS 处理组比较: # $P < 0.05$

制和心肌再生相关,靶向 AT2R 的药物可以缓解神经性疼痛、抗炎和促进组织损伤修复等有益作用,但关于 AT2R 更多的功能及机制仍不清楚。本研究构建 AT2R 过表达质粒,为后续对 AT2R 生物学功能的进一步探索奠定了基础。

AT2R 与机体的发育相关,在机体发育阶段大量表达,但随着年龄的增长逐渐减少,在成年阶段几乎不表达。因此,本研究试图从乳鼠的组织器官(肝、脾、肾、心和肺)中获取 AT2R 基因片段,根据电泳结果显示脾脏所示的亮带较亮,继而后续研究选择以脾脏的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。

获得有活性的 AT2R 质粒是进一步研究其功能和作用机制的前提。本研究通过设计引物,利用 PCR 扩增技术获得 AT2R 基因片段,并采用分子克隆技术将 AT2R 基因片段连接到 pCMV-Flag-N 载体上,成功构建 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒,通过酶切鉴定和测序结果证明 pCMV-Flag-N-AT2R 质粒的构建成功。再利用 PEI 瞬时转染技术将其转染入 HEK 293T 细胞中,通过 Western blot 验证 AT2R 在 HEK 293T 细胞中正确表达;为了确定 AT2R 可以参与 LPS 诱导的 AML12 细胞炎症反应,本研究通过激光共聚焦以及 Western blot 确定 AML12 细胞上有 AT2R 蛋白的表达,并且构建的 AT2R 质粒可以在

AML12 细胞上过表达。为了解 AT2R 对 AML12 细胞损伤的影响,本研究通过过表达 AT2R 观察对 LPS 诱导的 AML12 细胞炎症损伤的影响;结果显示 LPS 处理细胞后细胞的增殖活性降低,而在 AT2R 过表达处理后改善了 LPS 对细胞的影响,细胞增殖活性加强。

LPS 诱导炎症的病理学特征就是释放多种促炎细胞因子,导致炎症因子水平升高,如 IL-6 和 TNF- α ^[12]。本研究发现 LPS 诱导的 AML12 细胞中 IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平明显高于对照组,而在 AT2R 干预后,IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平得到明显改善,说明 AT2R 具有改善 LPS 导致的炎症反应功能。在以往的研究中 LPS 作为内毒素导致 IL-6 和 TNF- α 等炎症因子的高表达,主要是其诱发了 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4) 的激活,TLR4 激活后会进一步激活下游的 NF- κ B 等信号而导致的^[13]。本研究中 LPS 处理 AML12 细胞后,细胞核中 NF- κ B (p65) 蛋白表达明显上升;而 LPS 处理的转染 AT2R 过表达质粒的 AML12 细胞中,细胞核中的 NF- κ B (p65) 蛋白表达相比于 LPS 处理组有所降低。

综上所述,过表达 AT2R 可以改善 LPS 导致的 AML12 细胞的活力下降以及炎症反应,为 AT2R 参与急性肝损伤的研究和药物干预治疗提供研究依据。

参考文献

- [1] Sun Z, Li H, Li Y, et al. Lactobacillus salivarius, a potential probiotic to improve the health of LPS-challenged piglet intestine by alleviating inflammation as well as oxidative stress in a dose-dependent manner during weaning transition [J]. Front Vet Sci, 2020, 7: 547425.
- [2] Liu J, Du S, Kong Q, et al. HSPA12A attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury through inhibiting caspase-11-mediated hepatocyte pyroptosis via p38- α -dependent acyl-oxoacyl hydrolyase expression [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(9): 2651-67.
- [3] Rompe F, Artuc M, Hallberg A, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB [J]. Hypertension, 2010, 55(4): 924-31.
- [4] Li Y, Xiao D, Yang S, et al. Promoter methylation represses AT2R gene and increases brain hypoxic-ischemic injury in neonatal rats [J]. Neurobiol Dis, 2013, 60: 32-8.
- [5] Sharma N, Gaikwad A B. Ameliorative effect of AT2R and ACE2 activation on ischemic renal injury associated cardiac and hepatic dysfunction [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2020, 80: 103501.
- [6] Curato C, Slavic S, Dong J, et al. Identification of noncytotoxic and

- il-10-producing CD8⁺ AT2R⁺ T cell population in response to ischemic heart injury [J]. *J Immunol* 2010, 185(10): 6286–93.
- [7] Tu Y, Chen D, Pan T, et al. Inhibition of mir-431-5p attenuated liver apoptosis through KLF15/p53 signal pathway in s100 induced autoimmune hepatitis mice [J]. *Life Sci* 2021, 280: 119698.
- [8] Zuo Y M, Wang Y, Liu J P. Recent advances and findings of angiotensin type 2 receptor: a review [J]. *Chin Med J (Engl)* 2010, 123(23): 3462–6.
- [9] Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, et al. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors [J]. *J Biol Chem* 1993, 268(33): 24539–42.
- [10] Bienvenu T, Poirier K, Van Esch H, et al. Rare polymorphic variants of the AGTR2 gene in boys with non-specific mental retardation [J]. *J Med Genet* 2003, 40(5): 357–9.
- [11] Ruster C, Wolf G. Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis [J]. *J Am Soc Nephrol* 2011, 22(7): 1189–99.
- [12] Wang T, Yan H, Lu Y, et al. Anti-obesity effect of lactobacillus rhamnosus ls-8 and lactobacillus crustorum mn047 on high-fat and high-fructose diet mice base on inflammatory response alleviation and gut microbiota regulation [J]. *Eur J Nutr* 2020, 59(6): 2709–28.
- [13] Min Y, Kim M J, Lee S, et al. Inhibition of traf6 ubiquitin-ligase activity by prdx1 leads to inhibition of NF- κ B activation and autophagy activation [J]. *Autophagy* 2018, 14(8): 1347–58.

Effects of overexpression of AT2R on LPS-induced inflammatory responses in AML12 cells

Xu Changyong, Zhang Shihao, Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University,*

Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education,

Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract *Objective* Angiotensin II Type 2 receptor (AT2R) is a major receptor of angiotensin II, which has a protective effect on damage to various tissues and organs. In this study, an overexpression plasmid of AT2R was constructed to explore the effect of overexpression of AT2R on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in mouse hepatocytes (AML12 cells). *Methods* Mice tissues and organs were used as samples to amplify the gene of interest (AT2R) fragments containing EcoR I and Hind III restriction sites, and then the final product was obtained by digestion and ligation. The final positive clones were sequenced and identified. The pCMV-Flag-N-AT2R plasmid was transfected into HEK 293T cells, and the expression of Flag protein was detected by the Western blot method after 24 h. AT2R expression on AML12 cells was observed by Western blot and laser confocal microscopy. AML12 cells were treated differently and divided into control group, LPS treatment group, pCMV-Flag-N-AT2R group and pCMV-Flag-N-AT2R + LPS group, and cell viability was detected by CCK8. Western blot detected PCNA proteins and observed cell proliferation; Cytokine levels were detected by qPCR; Western blot detected the expression level of nuclear transcription factor NF- κ B (p65) in cells. *Results* The identification and sequencing results of EcoR I and Hind III double restriction showed that pCMV-Flag-N-AT2R plasmid was successfully constructed, and the detection results of the Western blot method showed successful expression of AT2R protein. Laser confocal observed that there were AT2R receptors on AML12 cells, and AT2R recombinant plasmids could be expressed on AML12; Compared with the control group, the viability and proliferation ability of LPS-treated AML12 cells were weakened, while the levels of IL-6 and TNF- α increased, and the expression level of nuclear transcription factor NF- κ B (p65) increased. Compared with the LPS group, the viability and proliferation of cells in AML12 cells treated with pCMV-Flag-N-AT2R and LPS were enhanced, while the levels of IL-6 and TNF- α decreased. The expression of the nuclear transcription factor NF- κ B (p65) decreased. *Conclusion* AT2R overexpression plasmids were successfully constructed and successfully expressed on AML12 cells, and AT2R could inhibit the inflammatory response of LPS-induced AML12 cells.

Key words angiotensin II type 2 receptor; interleukin-6; tumor necrosis factor- α ; lipopolysaccharide; AML12; plasmid construction