文章编号:1000-5404(2013)14-1459-07

论著

缺血-再灌注损伤诱导大鼠视网膜 AQP4 内化及其溶酶体降解

甘胜伟[1],孙善全[1],冉建华[1],陈 海[2],樊 萍[3],朱淑娟[1],黄 娟[1],陈 臻[4] (400016 重庆,重庆医科大学神经科学研究中心[1];400014 重庆,重庆市第三人民医院神经内科[2];400062 重庆,重庆市第五人民医院妇产科[3];650031 昆明,云南省第一人民医院眼科[4])

[摘要] **目的** 研究在急性高眼压作用后不同再灌注时间水通道蛋白4(aquaporin-4 ,AQP4)内化及其向溶酶体分选(降解)的规律,探讨 AQP4 的内化及其降解与视网膜胶质细胞水肿的关系。**方法** 取 72 只体质量 190~210 g 的雌性 SD 大鼠(8 周龄),在其左眼建立急性高眼压模型,并根据再灌注时间分为 0、1、2、4、8、12 h 组($n=12$),应用免疫荧光双标的方法鉴定视网膜内胶质细胞的分布部位,并检测各组大鼠视网膜 AQP4 与早期内涵体抗原 1(early endosome antigen 1, EEA1)、晚期内涵体标记物甘露糖-6-磷酸受体(mannose-6-phosphate receptor,MPR)及溶酶体相关膜蛋白-1(lysosomal-associated membrane protein-1,LAMP1)的共表达,分别计数 AQP4 阳性细胞及 AQP4/EEA1、AQP4/LAMP1 共表达细胞,计算其比例并进行统计学比较。**结果** 视网膜内星形胶质细胞位于神经纤维层及节细胞层,Müller 细胞位于内核层;在高眼压介导的再灌注损伤 0~8 h,可见 AQP4 分别与 EEA1、MPR 有共表达,再灌注 12 h 则仅见 AQP4 与 EEA1 的共表达;再灌注 1~12 h 都可见 AQP4 与 LAMP1 的共表达,再灌注 4 h,胶质细胞中 AQP4 与 LAMP1 共表达细胞的比例达到最大值(55.60±13.03)%,与其他时间点相比,差异有统计学意义($P<0.05$),此后共表达细胞比例逐渐减少。**结论** 高眼压所致的视网膜缺血-再灌注损伤可诱导 AQP4 发生内化,内化的 AQP4 可分选至溶酶体降解。AQP4 的内化/降解可能在视网膜水肿的发生、发展中起作用。

[关键词] 水通道蛋白-4;胶质细胞;再灌注损伤;内化;内涵体;溶酶体
[中图法分类号] R362;R364.12;R774.1 [文献标志码] A

Ischemia-reperfusion injury induces internalization and lysosomal degradation of retinal AQP4 in mice

Gan Shengwei[1], Sun Shanquan[1], Ran Jianhua[1], Chen Hai[2], Fan Ping[3], Zhu Shujuan[1], Huang Juan[1], Chen Zhen[4] ([1]Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurology, Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 400014; [3]Department of Gynecology and Obstetrics, Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 400062; [4]Department of Ophthalmology, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan Province, 650031, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the internalization and lysosomal degradation of retinal aquaporin-4 (AQP4) induced by different reperfusion phases after acute ocular hypertension (AOH) in rats, so as to explore the relationship of AQP4 internalization and degradation with the glial edema of retinae. Methods A total of 72 rats, 8-week-old, and weighting 190 to 210 g, were induced to AOH models in the left eye, and then divided into 6 reperfusion groups ($n=12$ for each group) according to the different duration of reperfusion, that is, 0, 1, 2, 4, 8 and 12 h following 60 minutes' ischemia. Double-immunofluorescence labeling was applied to identify the localization of glial cells and detect the co-expression of AQP4/early endosome antigen 1 (EEA1), AQP4/mannose-6-phosphate receptor (MPR), and AQP4/lysosomal-associated membrane protein-1 (LAMP1). The numbers of single-labeled $AQP4^+$ cells, and double-labeled $AQP4^+/EEA1^+$, and $AQP4^+/LAMP1^+$ cells were estimated and statistical compared between the consecutive groups. Results The astrocytes which were positive to GFAP were located in the nerve fiber layer and ganglion cell layer, and the Muller cells positive to GS were located in the inner nuclear layer. AQP4/EEA1 and AQP4/MPR were co-localized during an 8-hour reperfusion window following 60 min ischemia, but only AQP4 and EEA1 were still

[基金项目] 国家自然科学基金(30470608,30500171);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10022, CSTC2011jjA10003,CSTC2010BB5098)
[通信作者] 孙善全,E-mail:sunsq2151@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1105.018.html(2013-03-21)

observed till 12 h of reperfusion. The co-expression of AQP4 and LAMP1 was seen from 1 to 12 h of reperfusion, with increased first and then decreased gradually, At the 4-hour reperfusion, the cells co-expressing AQP4 and LAMP1 reached the largest count, accounting for (55.60 ± 13.03)% ($P < 0.05$, compared with other time points). **Conclusion** Ischemia-reperfusion injury in the retina resulted from ocular hypertension induces the internalization of retinal AQP4, which are then degraded by lysosome. Internalization and lysosomal degradation of AQP4 may play a role in the pathogenesis and progress of retinal edema.

[**Key words**] aquaporin-4; glial cells; reperfusion injury; internalization; endosome; lysosome

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470608, 30500171) and the Natural Science Foundation Project of Chongqing (CSTC2012jjA10022, CSTC2011jjA10003 and CSTC2010BB5098). Corresponding author: Sun Shanquan, E-mail: sunsq2151@cqmu.edu.cn

水通道蛋白-4(aquaporin-4,AQP4)作为脑和视网膜中表达最多的一种水通道蛋白,定位于胶质细胞(包括星形胶质细胞及Müller细胞)的特殊膜域,使水沿着静水压和渗透压的梯度从高向低流动。研究表明,AQP4在正常视网膜中可维持水、电解质、渗透压的平衡并调节眼内压,而其异常分布与胶质细胞的肿胀有关[1]。

缺血-再灌注损伤是各种眶内疾病引起视网膜水肿、进而导致视力下降的主要原因之一[2]。在再灌注阶段,缺血所致视网膜细胞的损伤仍可持续进展,并由于再灌注过程中产生大量的氧自由基、兴奋性氨基酸及Ca^{2+}内流而导致更严重的损伤[3-4];在再灌注过程中,视网膜中AQP4的表达减少[1],但其具体机制尚不清楚。离体实验证实,特定的处理条件可导致胞膜上的AQP4发生内化,同时伴随着其功能可逆性的改变[5],而且内化入胞的AQP4也可被分选到溶酶体内降解[6],使AQP4完全丧失功能。因此,本课题研究高眼压大鼠模型再灌注阶段是否存在AQP4的内化及溶酶体的降解,并探讨该过程在视网膜水肿发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康、雌性SD大鼠72只,8周龄,体质量190~210 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 材料与试剂

小鼠单克隆胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)抗体(1∶50,Abcam,英国)及兔多克隆抗谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase,GS)抗体(1∶1 000,Sigma-Aldrich,美国);兔多克隆抗AQP4抗体(1∶100,Santa Cruz,美国)及小鼠单克隆抗甘露糖-6-磷酸受体(mannose-6-phosphate receptors,MPR)抗体(1∶100,Abcam,英国);小鼠单克隆抗AQP4抗体(1∶200,Abcam,英国)及兔多克隆抗早期内涵体1(Early Endosome Antigen 1, EEA1)抗体(1∶200,Abcam,英国)或兔多克隆抗溶酶体相关膜蛋白1(lysosome associated membrane protein 1, LAMP1)抗体(1∶100,Abcam,英国)。相应的二抗为FITC结合的抗小鼠IgG及TRITC结合的抗兔IgG(1∶200,北京中杉公司);CY3结合的抗山羊IgG(1∶200,碧云天生物技术研究所)和FITC结合的抗小鼠IgG(1∶50,博奥森公司);CY3结合的抗山羊二抗(1∶200,碧云天生物技术研究所)及FITC结合的抗小鼠IgG二抗(1∶200,北京中杉公司);DAPI染液(1∶20,贝博生物)。

1.3 高眼压大鼠模型的复制

根据Holcombe等[7]的方法建立急性高眼压大鼠模型,造成大鼠左眼110 mmHg的高眼压,导致眼内的血流完全阻断。并根据高眼压作用60 min后的再灌注时间将大鼠分为再灌注0(加压结束后立即进行灌流固定并剥离视网膜)、1、2、4、8、12 h组,每组12只,其中6只用于切片,6只用于铺片。每组大鼠中,取一半右眼(6个眼球,3个用于铺片,3个用于切片)仅穿刺而不加压,作为假手术对照组,以排除操作过程对实验结果的影响,另一半作为正常对照组不做任何处理。

1.4 组织处理

各组大鼠在到达相应时间点时,使用水合氯醛麻醉,经左心室快速灌注预热(37 ℃)含肝素(10 000 U/L)的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, pH = 7.2)200 mL,然后使用4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L PBS配制,pH = 7.2)进行灌流固定,取出完整的眼球,在角膜中部剪一小口并置于相同的固定液中后固定1 h后,去除角膜、晶状体、玻璃体,保留眼后杯放入固定液中继续固定1 h。随后部分经固定的眼后杯放入梯度蔗糖磷酸盐缓冲液(浓度10%~30%,pH = 7.2)中脱水,使用OCT包埋剂包埋并进行冰冻切片,片厚12 μm。另一部分眼后杯进行视网膜铺片,分离出视网膜,呈放射状分成4片,继续后固定30 min后,铺于已包被明胶的载玻片上。

1.5 免疫荧光

视网膜切片经0.01 mol/L PBS(pH = 7.2)漂洗30 min,0.3% Triton X-100作用30 min;1%牛血清白蛋白(BSA)封闭,37 ℃,90 min;适当稀释的一抗混合液4 ℃孵育过夜;0.01 mol/L PBS漂洗5 min×4次,加入相应的二抗孵育,37 ℃,90 min;0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次,5% DAPI-甲醇溶液孵育5 min,0.01 mol/L PBS漂洗5 min×4次,50%甘油+50% PBS封片。空白对照采用一抗稀释液代替一抗进行孵育。在视网膜铺片染色过程中一抗混合液孵育时间延长到24 h,其他步骤同切片。

1.6 图像获取

免疫荧光结果使用激光共焦显微镜(LSM 510 Meta,Zeiss,

Oberkoc hen, Germany) 观察并拍照。激光共聚焦的设置为：DAPI的激发波长 405 nm，发射波长 420～480 nm；FITC 的激发波长 488 nm，发射波长 505～550 nm；TRITC 的激发波长 543 nm，发射波长 560～615 nm。图片使用 ZEISS LSM 图片浏览软件导出(LSM Image Browser，版本号 4.2.0.121)。

1.7 数据处理及统计学分析

每个视网膜挑选 12 个视野拍照，对于视网膜切片染色结果，参照 Peng 等[8]的方法，分别计数各组中节细胞层及内核层中 AQP4 阳性细胞及 AQP4/EEA1 共表达细胞的数目，并计算共表达细胞占所有 AQP4 阳性细胞的百分比。对于视网膜铺片的染色结果，参照 Galindo-Romero 等[9]的方法，分别计数 AQP4 阳性细胞及 AQP4/LAMP1 共表达细胞的数量，并计算共表达细胞占所有 AQP4 阳性细胞的百分比。细胞计数在双盲情况下进行。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析比较相邻两个时间点间 AQP4/EEA1、AQP4/LAMP1 共表达细胞比例的差别。使用 SPSS 10.0 统计软件进行最小显著差异(least significant difference，LSD) t 检验。

2 结果

2.1 胶质细胞的分布

结果见图 1。视网膜中 GFAP 阳性的星形胶质细胞胞体位于神经纤维层和节细胞层；而 GS 阳性的 Müller 细胞胞体位于内核层，其突起分布于从内界膜至外界膜的整个视网膜神经层中。阴性对照组未见非特异性染色的出现。

2.2 AQP4 与 EEA1 在视网膜中的共表达

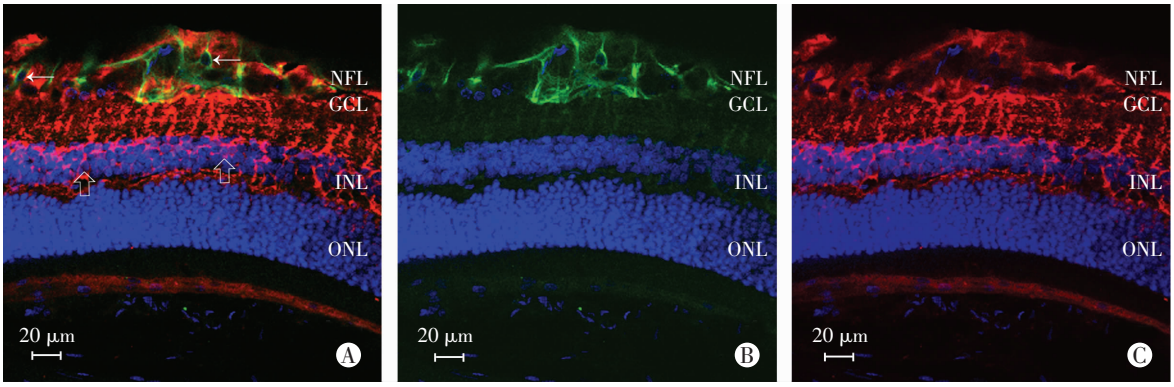
在假手术组(结果未显示)及正常对照组大鼠视网膜中，可见早期内涵体标记物 EEA1 的微弱表达，但未见 AQP4/EEA1 的共表达(图 2A)。在高眼压后再灌注 0 h，即可见视网膜节细胞层中有部分细胞存在 AQP4/EEA1 的共表达(图 2B)；在再灌注 2 h，AQP4/EEA1 共表达细胞略微增加(图 2C)；在再灌注 4 h，在节细胞层存在 AQP4 与 EEA1 共表达细胞，在内核层也可见到共表达细胞(图 2D)；在再灌注 8 h，视网膜节细胞层及内核层中共表达细胞的比例随着再灌注时间的延长而略微下降(图 2E)；至再灌注 12 h，共表达细胞仅局限于节细胞层(图 2F)。各时间段内，共表达细胞占 AQP4 阳性细胞的比例均无统计学差别($P>0.05$，表 1)。

2.3 AQP4 与 MPR 在视网膜中的表达

在正常对照组(图 3A)及假手术组(结果未显示)视网膜中，都未发现晚期内涵体标记物 MPR 与 AQP4 的共表达；在再灌注 0、2、4、8 h，视网膜中均可见到 AQP4 与 MPR 的共表达(图 3B～E)。但是在再灌注 12 h，则未见到 AQP4 与 MPR 的共表达(图 3F)。

2.4 AQP4 与 LAMP1 在视网膜中的表达

在对照组和假手术组(结果未显示)视网膜切片及铺片中，可见溶酶体标记物 LAMP1 有微弱的表达，但未见到其与 AQP4 共表达。再灌注 0 h 未见到 AQP4 与 LAMP1 的共表达(图 4A、5A)；再灌注 1 h 和 2 h，LAMP1 的表达增加，视网膜节细胞层可见到 LAMP1 与 AQP4 共表达细胞(图 4B、C)，视网膜铺片计数显示共表达细胞占 AQP4 阳性细胞总数的比例均值分别为 22.81% 和 26.77%(图 5B、C，表 1)；再灌注 4 h，视网膜中 AQP4 与 LAMP1 的共表达部位没有改变，仍位于节细胞层(图 4D)，视网膜铺片计数显示共表达细胞所占比例均值为 55.60%(图 5D，表 1)。再灌注 8 h 及 12 h，节细胞层中仅能见到少量 AQP4 与 LAMP1 的共表达(图 4E、4F，表 1)，视网膜铺片显示共表达细胞所占比例均值分别为 9.69% 和 2.64%(图 5E、F，表 1)。在再灌注 12 h 内，AQP4/LAMP1 共表达细胞的比例呈现先增加后减少的趋势(表 1)。



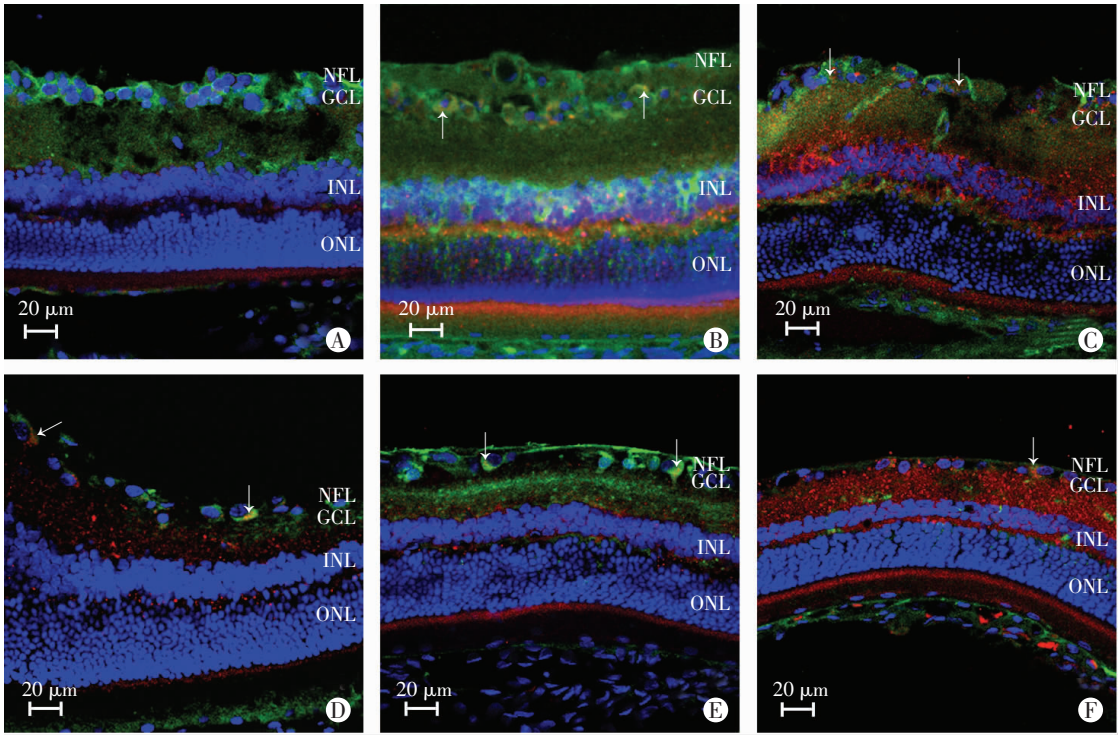
↑：GFAP 阳性星形胶质细胞；⇧：GS 阳性 Müller 细胞；NFL：神经纤维层；GCL：节细胞层；INL：内核层；ONL：外核层
A：GFAP、GS 阳性细胞在视网膜中的表达；B：GFAP 阳性细胞在视网膜中的表达；C：GS 阳性细胞在视网膜中的表达

图 1 激光共聚焦显微镜观察正常大鼠视网膜中 GFAP、GS 阳性细胞的分布

表 1 缺血 1 h 后不同再灌注时间视网膜节细胞层共表达细胞占 AQP4 阳性细胞的比例 [$n=6$，($\bar{x} \pm s$)%]

细胞标记物的种类	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h
AQP4 与 EEA1 共表达细胞	72.97±9.89	73.43±8.55	76.64±9.77	75.88±8.95	75.32±7.95
AQP4 与 LAMP1 共表达细胞	0	26.77±7.82	55.60±13.03[a]	9.69±2.38[a]	2.64±1.27[a]

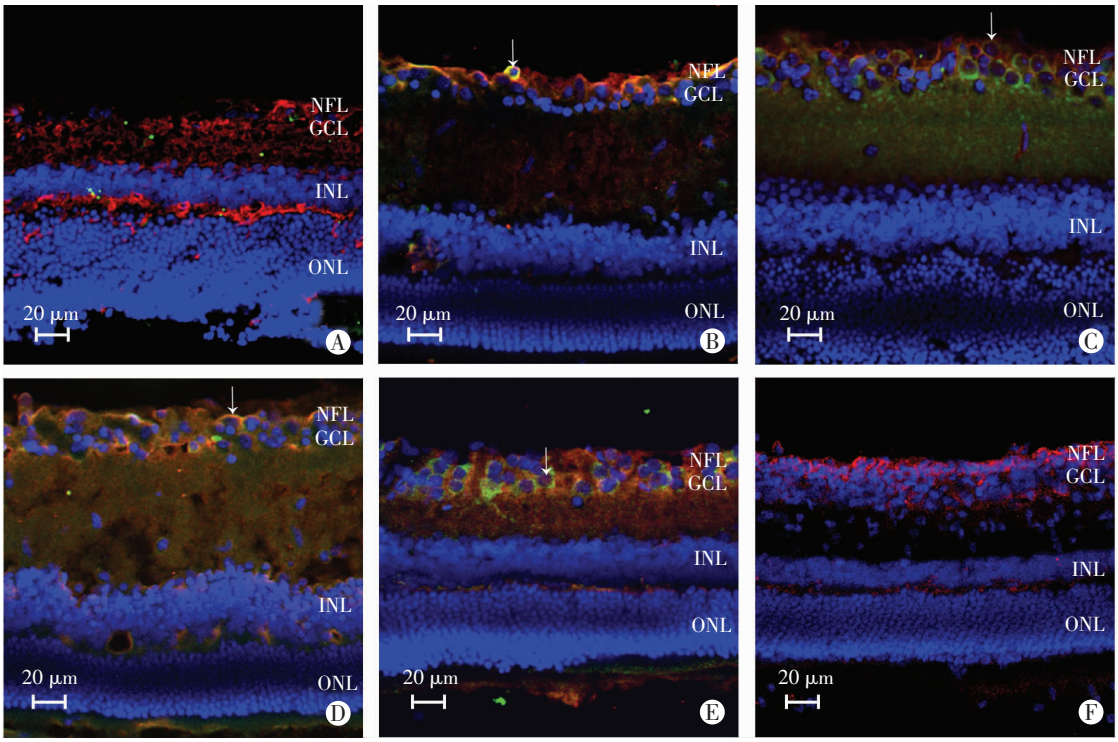
a：$P<0.05$，与相邻前一时间点比较



NFL:神经纤维层;GCL:节细胞层; INL:内核层; ONL: 外核层;↑:共表达细胞;绿色:AQP4;红色:EEA1;蓝色:DAPI

A:正常对照组;B:再灌注0 h组; C:再灌注2 h组;D:再灌注4 h组;E:再灌注8 h组;F:再灌注12 h组

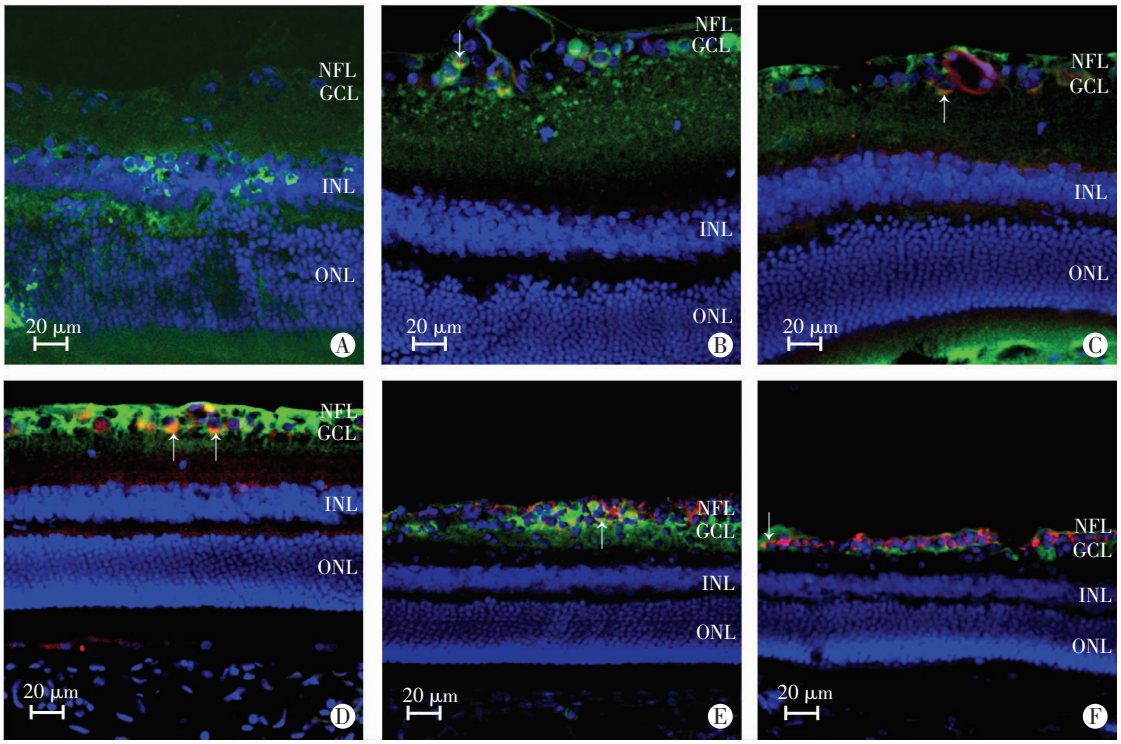
图2 激光共聚焦显微镜观察不同组别大鼠视网膜内AQP4/EEA1共表达细胞的分布



NFL:神经纤维层;GCL:节细胞层; INL:内核层; ONL: 外核层;↑:共表达细胞;红色:AQP4;绿色:MPR;蓝色:DAPI

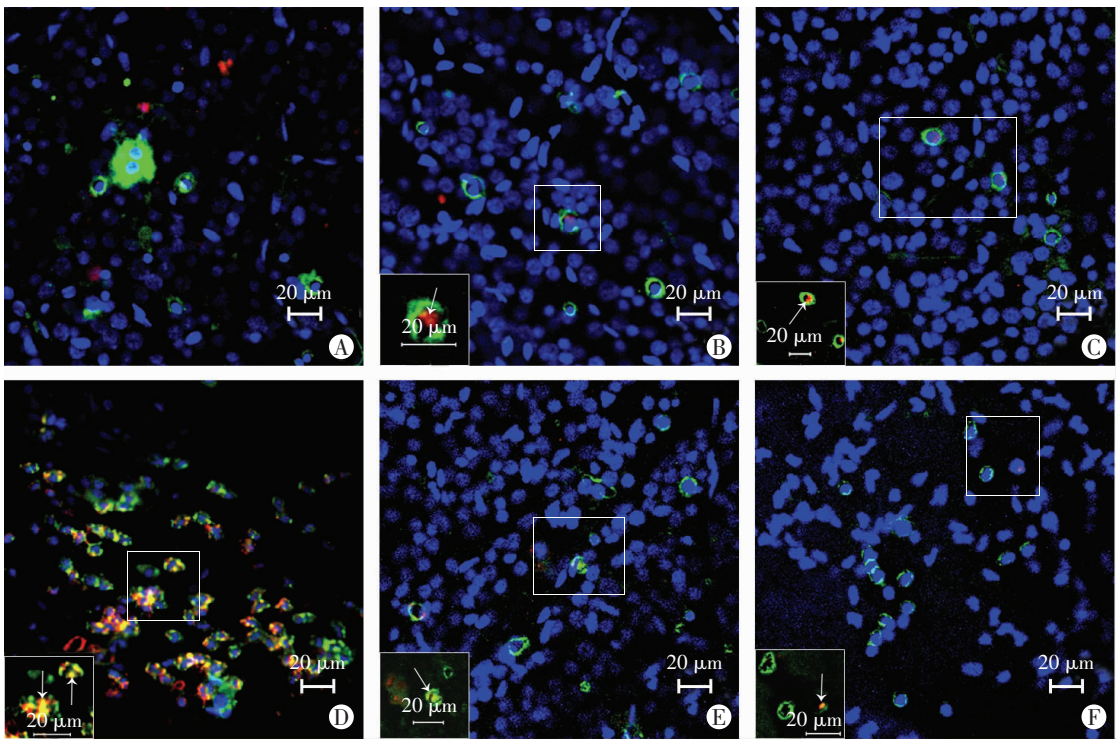
A:正常对照组;B:再灌注0 h组; C:再灌注2 h组;D:再灌注4 h组;E:再灌注8 h组;F:再灌注12 h组

图3 激光共聚焦显微镜观察不同组别大鼠视网膜内AQP4/MPR共表达细胞的分布



NFL:神经纤维层;GCL: 节细胞层; INL:内核层; ONL: 外核层;↑:共表达细胞;绿色:AQP4;红色:LAMP1;蓝色:DAPI
A:再灌注 0 h 组;B:再灌注 1 h 组; C:再灌注 2 h 组;D:再灌注 4 h 组;E:再灌注 8 h 组;F:再灌注 12 h 组

图 4　激光共聚焦显微镜观察不同组别大鼠视网膜切片内 AQP4/LAMP1 共表达细胞的分布



插图示方框区域未显示 DAPI 染色的高倍图片;↑:共表达细胞;绿色:AQP4;红色:LAMP1;蓝色:DAPI
A:再灌注 0 h 组;B:再灌注 1 h 组; C:再灌注 2 h 组;D:再灌注 4 h 组;E:再灌注 8 h 组;F:再灌注 12 h 组

图 5　激光共聚焦显微镜观察不同组别大鼠视网膜铺片内 AQP4/ LAMP1 共表达细胞的分布

3 讨论

视网膜缺血-再灌注损伤可在不同的视网膜疾病状态下发生,与视网膜水肿的发展直接相关[1]。视网膜水肿是缺血及细胞膜离子通道破坏过程早期所发生的一种病理生理学变化,表现为进入视网膜组织中的液体增加或者组织中的水分向血管回流减少,从而引起感光细胞退行性变、神经元死亡,最终导致失明[10]。由于AQP4在水的快速跨膜双向流动中发挥着重要作用,其与缺血-再灌注阶段所致的神经元和胶质细胞水肿的形成及视网膜功能的损伤密切相关。

本研究使用已被学术界公认的急性高眼压大鼠模型[11-12],以模拟病理条件下视网膜缺血后再灌注损伤的过程。本课题组之前的研究表明,大鼠视网膜在高眼压作用的早期(5~60 min),可出现胶质细胞AQP4的内化,即AQP4进入早期内涵体并转移至晚期内涵体[13]。当急性高眼压模型中外加液体所致的压力去除后,虽然眼内压显著的下降,但是高眼压所致的损伤机制及视网膜水肿仍然存在[14],该阶段是否存在AQP4的内化过程也需要进行研究。本研究显示再灌注0、2、4、8 h的大鼠视网膜中存在AQP4/EEA1和AQP4/MPR共表达,表明再灌注早期(0~8 h),AQP4发生了内化,从细胞膜进入早期内涵体,并转运至晚期内涵体,发生内化的细胞包括节细胞层(神经纤维层)中的星形胶质细胞和位于内核层中的Müller细胞。再灌注1~12 h内,可见到节细胞层中出现AQP4/LAMP1的共表达,提示在再灌注早期(1~12 h),星形胶质细胞表达的AQP4从晚期内涵体分选到溶酶体内降解;同时发现,在这一时间段内,AQP4/LAMP1共表达的细胞数量从再灌注1 h开始逐渐增加,于4 h达高峰后再逐渐减少。唐兆华等[15]在氧-糖剥夺条件下培养星形胶质细胞并恢复氧气供应,发现在复氧初始阶段AQP4表达降低,本实验结果与该研究可以相互印证。在高眼压大鼠视网膜缺血阶段,视网膜的水肿主要是细胞毒性水肿[16-17],至再灌注早期阶段,视网膜肿胀仍在持续,但未见视网膜血管通透性增加[18],可见肿胀的原因还是细胞毒性水肿,内流进入胞内的水会进一步增加[19]。胶质细胞中AQP4的内化及降解,将导致AQP4失去活性,使其对水的跨膜转运功能显著下降[5],在缺血再灌注的早期对水转运功能的抑制可以防止Müller细胞和星形胶质细胞的肿胀并减轻视网膜内层的病理改变。因此,AQP4的内化及降解对视网膜水肿而言,是一个潜在的具有保护作用的靶点,对于视网膜缺血再灌注早期阶段胶质细胞的水肿及视网膜的功能的恢复具有积极作用。Da等[12]的研究证实,AQP4基因敲除后的小鼠能保护缺血的视网膜,减轻其水肿的发生,表明AQP4表达水平减少是有益的。由此可见,在视网膜缺血-再灌注损伤的早期阶段(0~12 h),促进AQP4的内化及其降解是有益的,在相关的治疗中可将其作为药物作用的靶点。

总之,本实验证实在高眼压所致缺血再灌注视网膜中,AQP4发生了内化,并进入溶酶体降解,但阐明AQP4内化及溶酶体降解的分子机制及其在急性高眼压所致视网膜水肿中的作用,需要进一步研究。

参考文献:

[1] Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O, *et al*. A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina[J]. Mol Cell Neurosci, 2004, 26(4): 493-502.

[2] Donati G, Kapetanios A, Dubois-Dauphin M, *et al*. Caspase-related apoptosis in chronic ischaemic microangiopathy following experimental vein occlusion in mini-pigs[J]. Acta Ophthalmol, 2008, 86(3): 302-306.

[3] Prasad S S, Kojic L, Wen Y H, *et al*. Retinal gene expression after central retinal artery ligation: effects of ischemia and reperfusion[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(12): 6207-6219.

[4] Fernandez D C, Chianelli M S, Rosenstein R E. Involvement of glutamate in retinal protection against ischemia/reperfusion damage induced by post-conditioning[J]. J Neurochem, 2009, 111(2): 488-498.

[5] Carmosino M, Procino G, Nicchia G P, *et al*. Histamine treatment induces rearrangements of orthogonal arrays of particles (OAPs) in human AQP4-expressing gastric cells[J]. J Cell Biol, 2001, 154(6): 1235-1243.

[6] Kadohira I, Abe Y, Nuriya M, *et al*. Phosphorylation in the C-terminal domain of Aquaporin-4 is required for Golgi transition in primary cultured astrocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(2): 463-468.

[7] Holcombe D J, Lengefeld N, Gole G A, *et al*. The effects of acute intraocular pressure elevation on rat retinal glutamate transport[J]. Acta Ophthalmol, 2008, 86(4): 408-414.

[8] Peng P H, Chao H M, Juan S H, *et al*. Pharmacological preconditioning by low dose cobalt protoporphyrin induces heme oxygenase-1 overexpression and alleviates retinal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Curr Eye Res, 2011, 36(3): 238-246.

[9] Galindo-Romero C, Valiente-Soriano F J, Jimenez-Lopez M, *et al*. Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(2): 974-985.

[10] Cho H, Madu A. Etiology and treatment of the inflammatory causes of cystoid macular edema[J]. J Inflamm Res, 2009, 2: 37-43.

[11] Hirrlinger P G, Ulbricht E, Iandiev I, *et al*. Alterations in protein expression and membrane properties during Muller cell gliosis in a murine model of transient retinal ischemia[J]. Neurosci Lett, 2010, 472(1): 73-78.

[12] Da T, Verkman A S. Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(12): 4477-4483.

[13] 甘胜伟, 孙善全, 冉建华, 等. 急性高眼压大鼠视网膜胶质细胞水通道蛋白-4的内化[J]. 解剖学杂志, 2013, 36(4): 716-720.

[14] 郭斌, 杨新光, 刘钊, 等. 急性高眼压条件下视网膜神经感觉层超微结构的变化[J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(1): 49 - 51.
[15] 唐兆华, 廖正步, 蒋光元, 等. 水通道蛋白 4 在缺氧缺糖后水肿星形胶质细胞中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(13): 1387 - 1390.
[16] Chen J, Chiang C W, Zhang H, *et al*. Cell swelling contributes to thickening of low-dose N-methyl-D-aspartate-induced retinal edema [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(6): 2777 - 2785.
[17] Loffler S, Wurm A, Kutzera F, *et al*. Serum albumin induces osmotic swelling of rat retinal glial cells[J]. Brain Res, 2010, 1317: 268 - 276.
[18] 陈海. AQPs 在急性高眼压大鼠视网膜损伤中的作用及机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2008.
[19] Li S Y, Yang D, Yeung C M, *et al*. Lycium barbarum polysaccharides reduce neuronal damage, blood-retinal barrier disruption and oxidative stress in retinal ischemia/reperfusion injury[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16380.

(**收稿**:2012-12-28;**修回**:2013-02-24)
(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2013)14-1465-01

个案与短篇

前列腺导管腺癌 5 例临床病理特征分析

侯 川,刘 冰,李艳东,王美妮,孙斌斌,郑建云 (710077 西安,西安医学院附属医院病理科)

[**关键词**] 导管腺癌;前列腺腺癌;临床病理
[**中图法分类号**] R737.25 [**文献标志码**] B

前列腺导管腺癌(ductal adenocarcinoma of the prostate, DAP)少见,是前列腺癌(acinar adenocarcinoma of prostate, PA)形态学上独特的亚型,发病率较低,单纯型 DAP 约占全部前列腺恶性肿瘤的 1%。目前对 DAP 来源、诊断及预后仍存在争论,其形态易与高级别前列腺上皮内瘤变(HGPIN)、导管内癌(IDC-P)及转移性腺癌混淆。本研究回顾性分析 5 例 DAP 的临床病理特征,为其诊断、鉴别诊断提供依据。

1 资料与方法

选取本科 2006 - 2011 年 DAP 穿刺活检存档标本 5 例,年龄 66 ~ 80 岁,平均 71.6 岁。诊断以 2004 版 WHO 制定标准为依据。患者因不同程度的尿路梗阻、肉眼血尿及尿频入院。术前血清 PSA 水平 4 例略升高(4.0 ~ 6.7 ng/mL),1 例明显升高(17.3 ng/mL)。患者肿瘤 TNM 分期最低为 $T_{1c}N_0M_0$,最高为 $T_{3a}N_0M_0$。标本经 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,HE 染色,EnVision 两步法行 PSA、PSAP、P504S、34βE12、P63、TTF-1、Ki67 免疫组化染色。

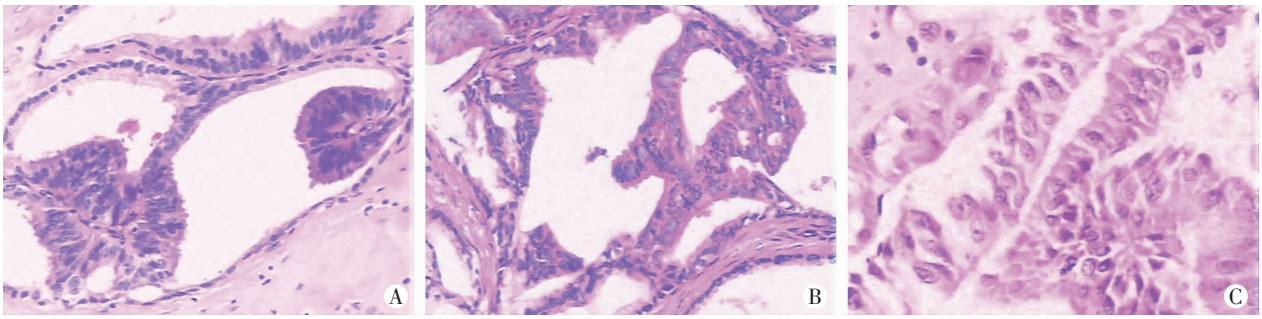
2 结果

中央型 DAP 2 例,其余 3 例为同时有中央型和周围型 DAP,癌细胞排列呈腔内乳头状、筛状结构,常见两种结构并存,癌细胞呈柱状、高柱状,异型性明显,胞质丰富双染性,核呈假复层排列,核大、深染,可见明显核仁(图 1)。本组单纯型 DAP 3 例,2 例 DAP 伴有 PA,且并存的腺癌 Gleason 评分高(8 分)。PSA、PSAP、P504S 阳性表达 5 例(100%);34βE12 在基底细胞有灶性表达 3 例(60%),P63、TTF-1 均阴性,Ki67 核标记指数 < 5%。5 例患者均获得随访,随访 8 ~ 58 个月,单纯型 DAP 患者均存活而伴随 PA 的混合型 DAP 患者均发生转移并死亡。

3 讨论

根据生长部位,DAP 分为中央型和周围型。中央型 DAP 少见,起源于前列腺尿道部大导管,肿物呈外生性生长,息肉状、菜花状,突出于前列腺尿道内,并沿大导管播散;周围型 DAP 起源于前列腺次级导管,在周围带腺体实质内弥漫浸润性生长,致前列腺体积弥漫增大、质硬。

诊断 DAP 需注意以下特点:①组织学类似高分化子宫内膜癌,癌细胞呈高柱状,单层或假复层排列,胞质丰富双染性,细胞核较大,可见明显核仁,病理性核分裂象常见。此外还有



A:腔内乳头状结构(×200);B:腔内筛状结构(×200);C:癌细胞排列呈乳头状,可见明显的嗜酸性核仁及病理性核分裂象(×400)

图 1 HE 染色观察前列腺导管腺癌组织病理学表现

[**通信作者**] 郑建云,E-mail:jian yunzh@163.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130625.1251.017.html(2013-06-25)

(下转 1470 页)