维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0163-03

水通道蛋白 1 在人羊膜上皮细胞的表达及意义

赵泽燕[1],漆洪波[2],张 华[2],张建华[2]

(1. 山西省运城市中心医院妇产科,运城 044000;2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨水通道蛋白 1(Aquaporin1,AQP1)在人羊膜中的表达、定位及意义。方法:应用免疫组织化学方法检测 12 例正常足月妊娠产妇、11 例羊水过少及 9 例羊水过多者足月妊娠产妇的羊膜组织中 AQP1 蛋白的表达。结果:AQP1 在羊膜组织立方上皮细胞中有阳性表达,且主要位于细胞浆中,而在成纤维细胞中仅有微弱表达。羊水过少及过多患者与正常产妇的羊膜组织 AQP1 蛋白面积积分光密度值比较差异均有显著性($P<0.05$)。结论:人羊膜组织表达 AQP1 蛋白,其在羊水的液体转运中可能起着重要作用,为羊水的水转运机制研究提供了分子生物学基础,并且为羊水量异常的治疗提供了新的思路。

【关键词】水通道蛋白 1(AQP1);羊膜

【中国图书分类法分类号】R714 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-07-03

Expression of aquaporin1 in human amniotic membrane and its significance

ZHAO Ze-yan, et al

(*Department of Gynecology and Obstetrics, Yuncheng Central Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression, location and significance of aquaporin1 (AQP1) in the tissue of amniotic membrane. *Methods*: Immunohistochemical method was used to examine the expression of aquaporin1 in the tissue of amniotic membrane of 12 normal full-term pregnant women, 11 full-term pregnamt woman with oligohydramnios and 9 with polyhydramnios. *Result*: Aquaporin1 was expressed in cuboidal epithelial cells of amniotic membrane, and mainly in cytoplasm. There was but a little expression of aquaporin1 in fibroblast of amniotic membrane tissue. There was statistically significant difference of the AQP1 expression between oligohydramnios, polyhydramnios and normal full-term pregnancy women integrative optical density in amniotic membrane tissue, respectively($P<0.05$). *Conclusion*: AQP1 is expressed in cytoplasm of amniotic membrane tissue of human, and it may play a critical role in the process of water-transference. This study provides a molecular biological basis for the study the on molecular mechanism of amniotic fluid transport, and a new thinking for treating abnormal capacity for amniotic fluid.

【Key words】 Aquaporin1; Amniotic membrane

羊水在整个妊娠及分娩过程中对于母体和胎儿均起重要的保护作用,所以研究羊膜腔和胎儿循环间的水转运机制显得颇为重要。长期以来羊水正常转运的分子机制一直未得到证实,直到 1988 年 Saboori 等[1]在研究红细胞膜分离纯化 Rh 多肽时发现了一个 28ku 的疏水性跨膜蛋白,称为通道构成整合膜蛋白 28(Channel forming integral membrane protein, CHIP28),证实了水转运的另一种形式:通道介导的水转运。CHIP28 是人类发现的第一个水通道蛋白,又称为水通道蛋白(Aquaporin1, AQP1)。研究已经证明 AQP1 在上皮和毛细血管内皮参与水转运[2]。因此,这些水通道蛋白很可能在人羊膜上作为水通道起重要的作用。本文采用免疫组织化学方法,检测正常、羊水过少及羊水过多者羊膜组织 AQP1 的表达水平,以期从分子水平上进一步阐明羊膜的水转运机制。

作者介绍:赵泽燕(1975-),女,硕士,研究方向:围产医学。

通讯作者:漆洪波,男,副教授,E-mail:qihongbo@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助(30672244,30400616)。

1 材料与方法

1.1 材料

维普资讯 http://www.cqvip.com

选择 11 例羊水过少及 9 例羊水过多足月妊娠者(均无其他合并症及并发症,其平均年龄、孕周、体重差异均无显著性)。剖宫产术分娩后的羊膜组织 1cm × 1cm 大小(分娩后 3min 内采集标本),经生理盐水充分漂洗后,放入 4%多聚甲醛固定 10h,常规石蜡包埋。12 例同期住院因社会因素剖宫产分娩的正常产妇的羊膜组织为对照组。

1.2 试剂

抗 AQP1 抗体,抗体稀释液,SABC (StreptAvidin Biotin Complex,SABC 链霉素抗生物素蛋白—过氧化物酶) 试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司。DAB 显色液购于北京中杉生物工程有限公司。

1.3 方法

人羊膜组织 AQP1 采用免疫组化 SABC 法检测,石蜡切片常规脱蜡至水,37℃,3%过氧化氢阻断内源性过氧化氢酶,微波炉抗原修复。5%正常山羊血清 37℃孵育 20min,室温滴加一抗(抗体以抗体稀释液稀释,浓度为 1:200),4℃过夜,然后 37℃孵育 1h,生物素标记二抗 37℃孵育 40min,过氧化氢酶标记链霉卵白素 37℃孵育 40min。DAB 显色,苏木素复染,封片,光镜观察。用已知有 AQP1 丰富表达的大鼠肾小管组织切片作为阳性对照(图 1),用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判定

在光镜下观察 AQP1 免疫组织化学染色切片,细胞中出现棕黄色粗大颗粒为阳性,反之则为阴性。

1.5 图像分析

免疫组化 AQP1 的表达的半定量分析采用北京航天大学图像中心研制的真彩色病理图像分析系统 4.0 软件,在 400 × 的高倍视野下,每个标本选择 3 张切片,每个切片随机选取 5 个视野测定面积积分光密度(Area integrated optical density,AIOD)值,用阳性积分光密度值 / μm^2 表示。

1.6 统计学处理

所有数据资料中计量资料均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)的形式表示。组间差异用 t 检验进行显著性检验,以 SPSS 11.5 统计软件进行分析,$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 AQP1 表达

所有羊膜组织立方上皮细胞均可见阳性着色,且主要位于细胞浆中,而在成纤维细胞中仅有微弱表达,表现为羊膜立方上皮细胞浆被染成程度不同,基本均匀的棕黄色粗大颗粒,见图 2~4。阴性对照组未见类似着色,仅可见被苏木精复染的蓝色细胞核。

2.2 AQP1 表达图像分析

表 1 各组羊膜 AQP1 表达面积几分光密度(AIOD)值

组别	例数	AIOD 值	P 值
正常	12	0.28 ± 0.04	-
羊水过少	11	0.15 ± 0.02	<0.05

注:与正常组比较*$P<0.01$;▼$P<0.05$

羊膜中 AQP1 蛋白表达分析:正常组为(0.28 ± 0.04),羊水过少组为(0.15 ± 0.02),羊水过多组为(0.45 ± 0.10)。羊水过少与正常组相比,AQP1 表达差异有统计学意义(t=2.057,$P<0.05$),羊水过少者 AQP1 表达低于正常产妇羊膜值。而羊水过多者 AQP1 表达明显高于正常产者,二者比较差异有显著性(t=7.350,$P<0.01$)(详见表 1)。

3 讨 论

水通道蛋白(Aquaporins,AQPs)是一类形成所有生命形式的细胞屏障中膜转移通道的蛋白质,它们容许水在细胞和它的周围环境间运动。在人类中,已经确定出了 11 种水通道蛋白。目前,在这个大家族中,对结构和功能的研究相对比较深入的是最早发现的一种分子相对质量为 28ku 蛋白,即 AQP1。它在体内分布十分广泛,参与人体内多种生理功能的调节,对维持人体正常生理状态具有重要作用。研究表明 AQP1 表达异常或调节失控与某些疾病的发生密切相关[3,4]。免疫组化和原位杂交显示:AQP1 在眼中存在于角膜、虹膜、睫状体和晶体的上皮、脉络膜上皮微绒毛的顶膜,还存在于肺泡上皮、骨胳肌、心肌、平滑肌的无孔毛细血管内皮细胞[4]。从以上表达分布规律可以看出,AQP1 一般分布在体内与水的转运、代谢及调节密切相关的组织[5],这种规律具有其特殊的病理生理作用,提示其存在于羊膜的可能。

羊膜表面覆盖了一层无纤毛立方上皮,向外有基底膜、致密层、成纤维细胞及海绵层 5 层。最近研究证明羊水膜内吸收是羊水量调控的重要方式[6],并且膜内吸收部分是通过被动扩散,部分则是一种非被动形式[7]。羊水膜内吸收的主要部位是胎盘胎儿面的绒毛膜羊膜,羊水通过胎盘胎儿面的绒毛膜羊膜跨膜转运到胎儿血循环中。胎儿吞咽、胎尿分泌以及胎肺分泌都是胎儿为满足自身需要而进行的自我调控,对羊水量过多或过少的调控只能通过羊水膜内吸收途径进行调控。阐明羊水吸收机制,

维普资讯 http://www.cqvip.com

探索影响膜内吸收的调节因素,可为临床治疗羊水量异常提供有效可行的方法。

本研究中,应用免疫组化技术检测到 AQP1 在人羊膜立方上皮细胞浆中可见棕黄色粗大颗粒,而成纤维细胞中仅有微弱表达。与 Mamn 等[8]的研究结果一致。AQP1 在人羊膜立方上皮细胞内的表达,说明羊膜上皮细胞能够快速易化羊膜腔和胎儿循环间的水转运,可能正是由于 AQP1 的存在,大量的水分才能通过 AQP1 的水孔快速进入羊膜腔。本实验证实:羊水过少患者的羊膜 AQP1 表达 AIOD 值低于正常产妇羊膜 AQP1 表达 AIOD 值;而羊水过多患者羊膜 AQP1 表达 AIOD 值明显高于正常产妇羊膜 AQP1 表达 AIOD 值。进一步提示:AQP1 在羊水膜内吸收以及维持羊水量平衡方面中可能起重要作用,其表达调控或功能一旦异常可能促进或者导致羊水量的改变。以上研究均为羊水的产生、吸收以及羊水量异常的治疗提供了分子生物学基础。

人羊膜组织中水通道蛋白的出现是一个新的发现。尽管 AQP1 在羊水转运中的功能重要性目前尚无结论。但它的出现表明对于羊水量异常的治疗渴望有新的治疗举措。如 AQP1 抑制剂可用于治疗羊水过多。AQP1 激动剂可用于治疗羊水过少。有关 AQP1 在羊水转运中确切作用有待进一步的研究证实。为羊水异常的治疗提供一种新的思路,从而有望减少羊水异常的发生,降低围生儿病率及围生儿死亡率,有利于优生优育。

参 考 文 献

[1] Saboori AM,Smith BL,Agre P. Polymorphism in the Mr 32,000 Rh protein purified from Rh (D)-positive and negative erythrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1988;85(11):4042-4045.

[2] Mann SE,Nijland MJ,Ross MG. Mathematic modeling of human amniotic fluid dynamics[J]. Am J Obstet Gynecol,1996;175(4Pt1):937-944.

[3] King LS,Yasui M,Agre P. Aquaporins in health and disease[J]. Mol Med Today,2000;6(2):60-65.

[4] Towne JE,Horrod KS,Krane CM,et al. Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2000;22(1):34-44.

[5] Stamer WD,Peppel K,O'Donnell ME,et al. Expression of aquaporin-1 in human trabecular meshwork cells:role in resting cell volume[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2001;42(8):1803-1811.

[6] Daneshmand SS,Cheung CY,Brace RA. Regulation of amniotic fluid volume by intramembranous absorption in sheep:Role of passive permeability and vascular endothelial growth factor[J]. Am J Obstet Gynecol,2003;188(3):786-793.

[7] Faber JJ,Anderson DF. Absorption of amniotic fluid by amniochorion in sheep[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2002;282(3):850-854.

[8] Mann SE,Ricke EA,Yang BA,et al. Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes[J]. Am J Obstet Gynecol,2002;187(4):902-907.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 132 页)

tion,2007;30(3-4):97-104.

[9] Planavila A,Laguna JC.,Vázquez-Carrera M. Nuclear Factor-κB Activation Leads to Down-regulation of Fatty Acid Oxidation during Cardiac Hypertrophy[J]. J Biol Chem,2005;280(17):17464-17471.

[10] Barger PM,Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism[J]. Trends Cardiovase Ned,2000;10(6):238-245.

[11] Makino N,Sugano M, atoh S,et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands attenuate brain natriuretic peptide production and affect remodeling in cardiac fibroblasts in reoxygenation after hypoxia [J]. Cell Biochem Biophys,2006;44(1):65-71.

[12] Xu XH;Xu ZL;Xu YY,et al. Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats[J]. Coron Artery Dis,2005;16(4):245-255.

[13] 唐 滔,胡建国,杨进福,等. 骨髓间充质干细胞移植对大鼠心肌梗死后细胞凋亡的作用[J]. 中南大学学报(医学版),2004;29(3):274-278.

(责任编辑:谭乐勤)