维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)07-0673-03

水通道蛋白-4 在胰腺的表达

汪克建,孙善全,冉建华,陈 海,谭 戈,杨 美

(重庆医科大学基础医学院神经生物学实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察水通道蛋白 -4(AQP4)在大鼠胰腺的表达和分布特点,为研究胰腺的分泌及调节机制提供形态学基础。方法:利用免疫组化和原位杂交技术,检测 AQP4 及其 mRNA 在胰腺外分泌部和内分泌部的表达情况。结果:免疫组化显示,AQP4 在胰腺外分泌部腺泡细胞膜上表达较弱,而在胰岛内分泌部细胞有明显的表达,主要位于细胞膜,呈小泡状;原位杂交显示,AQP4mRNA 在外分泌部腺泡细胞有较弱的表达,在胰岛的内分泌细胞胞浆中有明显的表达。结论:根据 AQP4 及其 mRNA 在胰腺的表达和分布特点,提示其参与了胰岛内分泌细胞合成和分泌激素过程中水和电解质平衡的精细调节;而 AQP4 可能对胰腺外分泌过程的调节作用较小。

【关键词】胰腺;水通道蛋白 -4;免疫组化;原位杂交;大鼠

【中国图书分类法分类号】R318.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-04

Expression of aquaporin-4 in rat pancreas

WANG Kejian, et al

(*Department of Neurobiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To define the localization of aquaporin-4(AQP4) and its mRNA expression in the pancreas. So as to provide morphological basis for the secretory function and regulation mechanisms in the pancreas. *Methods*: Immunohistochemical (IHC) and in situ hybridization(ISH) staining techniques were used to evaluate the expression of AQP4 and mRNA expression in pancreas. *Results*: IHC showed that AQP4 and its mRNA were expressed in the membrane of pancreas islet cells; however light-coloured was expressed in the acinus cell. *Conclusion*: AQP4 might contribute to the precise regulation of water and ion balance in pancreas islet cells, which may be fluctuated during the process of synthesis and secretion of endocrine, but AQP4 might have little contribution to the secretion of pancreatin.

【Key words】Pancreas; Aquaporin-4; Immunohistochemical; In situ hybridization; Rat

迄今为止,在哺乳动物体内已分离克隆出的水通道蛋白(Aquaporins,AQPs)共有 13 种(AQP0~AQP12)[1]。AQPs 对维持细胞内外水、电解质的运输平衡,以及细胞正常形态和功能具有十分重要的意义。据报道,目前对 AQP4 在中枢神经系统、消化系统、泌尿系统等的分布和功能研究较多,但关于 AQP4 在胰腺是否有表达,尚未见确切报道。本实验拟通过对 AQP4 及其 mRNA 在胰腺外分泌部和内分泌部的分布进行研究,以探讨 AQP4 在胰腺分泌中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物及取材

采用重庆医科大学实验动物中心提供的健康成年 Wistar 大鼠 10 只,体质量 200~250g,雌雄各半。适应性饲养 1 周后,用 3% 的异戊巴比妥钠(200mg/kg)经腹腔麻醉,200~300ml 生理盐水(4℃)经左心室快速灌流冲洗血液,再用 4% 多聚甲醛(0.1mol/L PBS 配制)400~500ml(4℃,pH7.4)行灌流固定。取胰腺组织经后固定、脱水,做冰冻切片,片厚 14μm,贴于经 APES 胶处理的清洁载玻片上(原位杂交用载玻片挂胶前 190℃高温烘烤 5h,挂胶后用 0.1% DEPC 水冲洗 2 次,灭活 RNA 酶活性),冷风吹干备用。

1.2 主要试剂

兔抗 AQP4 单克隆抗体(碳端 AQP4)购自美国 Chemico 公司;用 primer5.0 软件设计 AQP4 探针,由上海生物工程服务有限公司合成,其序列为 5'-GACTCCTGTTGTCCTCCATGTAGCTTTTTTGTT-3',5' 端地高辛标记;免疫组化二抗试剂盒和原位杂交试剂盒均购自武汉博士德公司。

1.3 AQP4 免疫组化

切片室温放置 30min;4% 多聚甲醛固定 10min;0.3% 甲

作者介绍:汪克建(1971-),男,讲师,在读博士,主要研究方向:神经生物学。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470608,30500171)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

醇 -H_2O_2,10~15min;山羊血清封闭 20min,37℃;不洗,加入适当稀释的一抗(AQP4 1:400),4℃孵育过夜;二抗(生物素标记的羊抗兔 IgG)90mim,37℃;1:100 碱性磷酸酶标记链霉亲和素 - 生物素化复合物 (SABC-AP)37℃ ,60min;BCIP/NBT 混合液(1:20)显色 30~60min,蒸馏水终止显色;用水溶性封片剂封片,光镜下观察。阴性对照采用 PBS 代替一抗进行孵育。

1.5 AQP4 原位杂交

4%多聚甲醛(0.1mol/L PBS 配制)(pH7.2~7.4),室温固定 20~30 min,3% TritonX-100 6min,3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶 (1ml 3%柠檬酸加 2 滴浓缩型胃蛋白酶, 混匀),37℃或室温消化 5~120s。每张切片加 20μl 预杂交液,37~40℃,2~4h,吸取多余液体,每张切片加 20μl 杂交液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针,将原位杂交专用盖玻片的保护膜揭开后,盖在切片上,37~41.8℃,杂交 36h,杂交后洗涤揭掉盖玻片,30~37℃左右水温的 2×SSC 洗 5min×2 次,0.5×SSC 洗涤 15min×1 次;0.2×SSC 洗涤 15min×1 次,正常山羊封闭液,37℃ 30min,甩去多余液体,滴加生物素化鼠抗地高辛;37℃ 60min,滴加 SABC-AP,37℃ 30min,BCIP/NBT 37℃显色 30~50min,水溶性封片剂封片观察。阴性对照采用不含探针的预杂交液进行杂交。

2 结 果

2.1 正常胰腺的结构

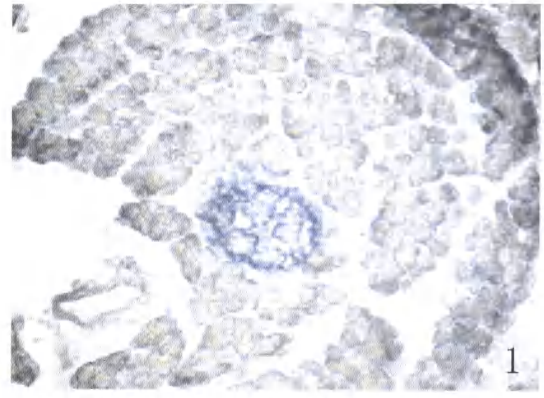
HE 染色可见, 胰腺外分泌部主要为浆液性复管泡状腺组成。而内分泌部主要由内分泌细胞组成的细胞团,即胰岛组成,散在分布,染色浅淡,大小不等,直径为 50~500μm。光镜下 HE 染色不能分辨胰岛细胞的类型。

2.2 免疫组化

2.2.1 免疫组化 光镜下观察所有切片背景清晰,阳性细胞为细胞膜染色呈蓝紫色或紫红色, 胞质、胞核无染色。巢状分布的胰岛 AQP4 蛋白的表达呈强阳性,细胞着色位于细胞膜,为蓝色,胞体较小,圆形,胰岛似许多空泡状结构聚集呈巢状;胰腺的外分泌部 AQP4 表达较弱, 在腺泡细胞膜上可见浅淡的阳性着色(图 1、图 2)。

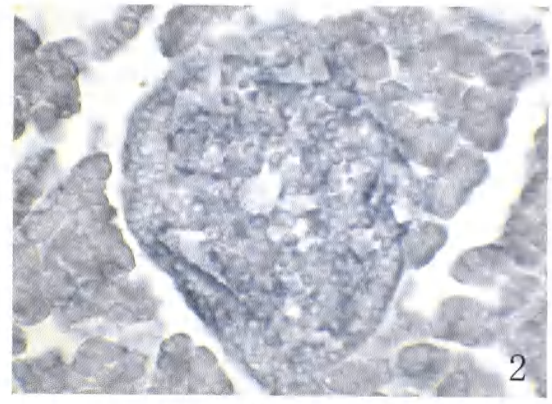
2.2.2 原位杂交 原位杂交染色阳性呈浅紫色,结果显示,胰腺外分泌部腺泡 AQP4 mRNA 的表达较弱, 表达部位为胞浆; 胰岛的内分泌细胞呈 AQP4 mRNA 的阳性表达, 表达部位位于细胞质部分,胞核淡染,整个细胞呈空泡状(图 3)。背景无着色。

2.2.3 阴性对照 免疫组化和原位杂交阴性对照组织均无着色。



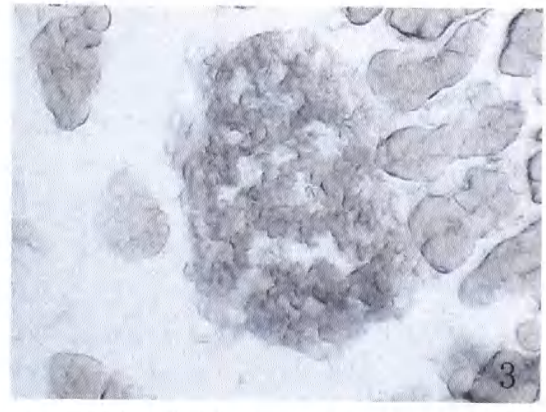
(AQP4 在大鼠胰腺腺泡细胞表达较弱,胰岛细胞胞膜为阳性表达。IHC×200)

图 1 大鼠胰腺 AQP4 的表达



(AQP4 在大鼠胰腺腺泡细胞表达较弱,胰岛细胞胞膜为阳性表达。IHC×400)

图 2 大鼠胰腺 AQP4 的表达



(AQP4mRNA 阳性杂交信号分布在大鼠胰岛细胞胞浆, 腺泡细胞无表达。ISH×250)

图 3 AQP4mRNA 的原位杂交检测

3 讨 论

胰腺主要由内分泌部和外分泌部组成。外分泌

维普资讯 http://www.cqvip.com

部分泌胰液;内分泌部分泌多种激素,进入血液或淋巴,直接或间接参与糖代谢的调节。胰腺的分泌是一个十分复杂的过程。但无论是内分泌还是外分泌,胰腺细胞都要经历分泌物原料的摄取、合成和分泌三个基本生理过程。在此过程中,细胞需要通过质膜不断地从细胞周围间隙摄取各种生物合成相关的酶类、氨基酸、离子、水等多种物质,为胰液和激素的合成及能量代谢提供必要的原料;与此同时,伴随着细胞内、外水和电解质的转运,以及细胞内、外与合成相关酶类、氨基酸及合成产物的转运,从而导致细胞内、外渗透压波动。而细胞内、外渗透压的相对平衡,对维持细胞的正常形态和功能十分重要。但是,迄今为止对细胞内、外渗透压调节的分子机制却知之甚少。

水通道蛋白(AQPs)的发现,为探索水分子的细胞内、外的快速转运及渗透压的调节提供了新的线索。水通道蛋白是一组与水分子跨膜转运相关的膜通道蛋白,其广泛分布于动、植物与吸收、分泌活动密切有关的组织和细胞[2]。目前,在哺乳动物体内已分离出 13 种 AQPs[1],其在不同的组织细胞中有着特异性的分布,并显示出一定的功能差异。资料表明,AQP4 广泛分布于中枢神经系统、肾脏、眼球、内耳、呼吸道、消化道等水分子交换频繁的组织和器官[3,4]。在中枢神经系统内,AQP4 在渗透压介导的水、电解质运输平衡调节中发挥着重要的作用,并兼有渗透压感受器的功能[5,6]。本课题组发现,AQP4 在腺垂体、松果体、甲状腺等主要内分泌器官有表达,并认为 AQP4 参与了这些腺体分泌活动的精细调节[7~9]。尽管对 AQP4 在各系统的定位研究已较为充分,但是关于 AQP4 在胰腺中是否有表达,迄今为止尚无定论。Burghardt 等[10]曾用 RT-PCR 技术检测到胰腺组织中有 AQP4mRNA 的表达,但免疫组化结果却未观察到 AQP4 在胰腺外分泌部组织细胞胰岛细胞上有表达。因此,AQP4 在胰腺,特别是在胰腺外分泌部和胰岛组织中是否有表达,以及其表达的功能意义如何,是一个值得探讨的问题。本实验运用免疫组化和原位杂交技术对 AQP4 及其 mRNA 在胰腺中的表达进行研究,结果显示:在胰腺的外分泌部,AQP4 及其 mRNA 的表达较弱;而在胰腺的内分泌部,AQP4 及其 mRNA 表达明显。上述结果提示,AQP4 可能对胰液的合成和分泌调节作用较小,但却与胰腺的内分泌活动密切相关。

AQP4 在胰腺内分泌细胞的表达具有十分重要的生理意义。Amiry-Moghaddam 等[11]认为,AQP 可能参与内分泌细胞的内外水电解质的精细调节,但未就此进行过系统的研究。胰岛与垂体、松果体、甲状腺等内分泌器官一样,在激素合成、分泌、运输和调节过程中,伴随着细胞内外能量和原料物质的频繁转运,以及激素排出细胞过程,细胞内、外局部渗透压不断变化。AQP4 适时表达,介导细胞与间质之间水分子快速转运,使细胞内外水、电解质迅速平衡,以维持细胞内外渗透压的动态平衡。本实验结果表明,AQP4 能够为细胞提供一个稳定的内环境,对维持细胞的正常形态和生命活动具有非常重要的意义。本实验观察到 AQP4 在胰岛内分泌细胞的表达,为研究胰岛内分泌细胞的分泌调节机制提供了形态学基础。

胰腺外分泌的功能调节一直为临床与基础工作者所关注。目前,有学者对 AQPs 在胰腺的分布进行了研究。Hurley 等[12]在大鼠胰腺的腺泡观察到 AQP8 表达,导管部有 AQP1、AQP5 表达,提示 AQP8、AQP1、AQP5 可能参与了胰液的合成和分泌。Burghardt 等[10]综合应用胰腺导管分离培养、渗透压及药物干预、免疫组化以及 RT-PCR 技术,对 AQPs 及其 mRNA 在胰腺导管的表达及其生理功能进行了研究。结果表明,分离的胰腺导管细胞有大量 AQP1 mRNA 和微量 AQP5 mRNA 表达,免疫组化显示在胰腺导管细胞基侧膜和管腔面有 AQP1 表达,但无 AQP5 表达,认为 AQP1 在胰腺导管细胞水分子转运过程中发挥着重要的作用。在实验中,Hurley[12]等未观察到在胰腺导管部有 AQP4 的表达,但本实验结果却发现,在胰腺的腺泡细胞中,有 AQP4 及其 mRNA 的弱阳性表达,这与文献报道有所差异,我们认为这种差异可能与 AQP4 表达量少和实验方法有关。本实验结果表明 AQP4 对胰腺外分泌的调节作用较小。

综上所述,AQPs 参与了胰腺内、外分泌活动的调节。其中,AQP4 与内分泌的精细调节有关,而对外分泌的调节作用较弱,其具体调节的分子机制尚需深入研究。

(通讯作者:孙善全,男,教授,博士生导师,研究方向:神经生物学。Tel: 023-68485763 E-mail: sunsq2151@sohu.com)

参 考 文 献

[1] Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin

(下转第 745 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

IVIG 500mg/kg×7 天与 OKT3 5mg/天×14 天比较，AR 治愈率并无显著差异（分别为 73%和 87%），而且可以减少 OKT3 的并发症。我们观察到 63.2%患者接受 IVIG 治疗 1 个疗程后，PRA 可以达到最低值。静脉注射大剂量免疫球蛋白的作用还可累加，即如果 1 个疗程后 PRA 降幅不满意，还可进行第 2、第 3 疗程的治疗。本组中即有 26.3%患者接受了 2 个疗程的治疗，并有 10.5%患者接受了 3 个疗程的治疗，第 2、3 疗程结束时的 PRA 较第 1 疗程结束时低。

PRA 检测对了解受者体内抗体水平，预测排斥反应提供了客观依据，而对高致敏肾移植患者，IVIG 能有效降低 PRA 值，提高肾移植的成功率。

参 考 文 献

[1] Colvin RB,Smith RN.Antibody-mediated organ-allograft rejection[J].Nat Rev Immunol,2005;5(10):807-817.

[2] Takemoto SK,Zeevi A,Feng S,et al.National conference to assess antibody mediated rejection in solid organ transplantation[J].Am J Transplant,2004;4(7):1033-1041.

[3] Stanley Jordan,Charlotte Cunningham-Rundles,Robert McEwan.Utility of Intravenous Immune Globulin in Kidney Transplantation:Efficacy,Safety,and Cost Implications[J].Am J Transplant,2003;3(6):653-664.

[4] Leech SH,Lopez-Cepero M,LeFor WM,et al.Management of the sensitized cardiac recipient:the use of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin[J].Clin Transplant,2006;20(4):476-484.

[5] Jordan SC,Vo AA,Penga A,et al. Intravenous Gamma globulin (IVIG):A Novel Approach to Improve Transplant Rates and Out comes in Highly HLA-Sensitized Patients[J].Am J Transplant,2006;6(3):459-466.

[6] Stegall MD,Gloor J,Winters JL,et al.A Comparison of Plasmapheresis Versus High-Dose IVIG Desensitization in Renal Allograft Recipients with High Levels of Donor Specific Alloantibody[J].Am J Transplant,2006;6(2):346-351.

[7] Suberbielle-Boissel C,Boudjeltia S,Fraoui R,et al. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulin[J].Am J Transplant,2002;2(8):758-760.

[8] Jordan SC,Vo AA,Bunnapradist S,et al.IVIG inhibits crossmatch (CMX) positivity and allows successful transplantation in liv ing donor and cadaver transplant recipients[J].Am J Transplant,2002;2(S3):867.

[9] Stanley C,Adrianus W,Lawrence SC,et al.Posttransplant therapy using high dose human immunoglobulin (intravenous gamma g1obulin)to control acute humeral rejection in and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action [J].Transplantation,1997;66(6):800-805.

[10] Ralf,Wassmuth IA,Hauser K,et al.Differential Inhibitory Effects of intravenous Immunoglobulin Preparations on HLA-Alloantibodies In Vitro[J].Transplantation,2001;71(10):1436-1442.

[11] Golberg JC,Argento JA,Greco G,et al.A randomized and prospective study comparing treatment with high-dose intravenous immunoglobulin with monoclonal antibodies for rescue of kidney grafts with steroid-resistant rejection[J].Transplantation,2001;71(1):53-58.

(上接第 675 页)

water channels[J].Am J Physiol Renal Physiol,2000;278(1):F13-28.

[2] Borgnia M,Nielsen S, Engel A,et al.Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels[J].Annu Rev Biochem,1999;68:425-458.

[3] Nagelhus EA,Veruki ML,Torp R,et al.Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes[J].J Neurosci,1998;18(7):2506-2519.

[4] Solenov EI,Vetrivel L,Oshio K,et al.Optical measurement of swelling and water transport in spinal cord slices from aquaporin null mice[J].J Neurosci Methods,2002;113(1):85-90.

[5] Li J,Patil RV,Verkman AS.Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Muller cell aquaporin-4 water channels[J].Invest Ophthalmol Vis Sci,2002;43(2):573-579.

[6] Li J,Verkman AS. Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels[J].J Biol Chem,2001;276(33):31233-31237.

[7] 冉建华，孙善全.AQP4 在大鼠脑垂体中表达的研究[J].解剖学杂志，2005;28(3):264-266.

[8] 彭雪华，孙善全.水通道蛋白-4 在大鼠大脑中的定位研究[J].解剖学报，2004;35(2):132-136.

[9] 汪克建，孙善全，陈 海，等.水通道蛋白-4 在大鼠甲状腺中的表达[J].解剖学杂志，2006;29(2):153-156.

[10] Burghardt B,Elkaer ML,Kwon TH,et al.Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas[J].Gut,2003;52(7):1008-1016.

[11] Amiry-Moghaddam M,Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain[J].Nat Rev Neurosci,2003;4(12):991-1001.

[12] Hurley PT,Ferguson CJ,Kwon TH,et al. Expression and immunolocalization of aquaporin water channels in rat exocrine pancreas[J].Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2001;280(4):G701-709.