维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)05-0666-03

水通道蛋白 1 在高氧肺损伤中的表达变化

郝 杰[1],许 峰[2],谭利平[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院科研处,重庆 400016;2.重庆医科大学附属儿童医院 ICU,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨 AQP1 在高氧肺损伤中的表达变化及其在肺水肿中的作用机制。方法:将 2 周左右 Wistar 大鼠 32 只随机分为空气对照组和高氧暴露不同时间组,分别置于常压高氧仓中(氧体积分数 >0.95)和常压空气中,采用 RT-PCR 和免疫组化方法观察 AQP1 的分布和表达变化,并对支气管肺泡灌洗液(BALF)中的蛋白含量、肺通透系数、肺湿 / 干重比(W/D)及肺组织病理学改变也进行了对比分析。结果:高氧组 3 天时肺组织出现水肿、出血、炎性细胞浸润,7 天时炎性改变进一步加重,14 天时开始出现肺纤维化的倾向。W/D 值、BALF 蛋白含量和肺通透系数在 3、7、14 天时均高于空气组。肺组织 AQP1 mRNA 的表达在高氧 3、7 和 14 天时均明显低于空气组($P<0.05$),随暴露时间延长持续下降,在 14 天时有所恢复;免疫组化显示 AQP1 主要分布在支气管和肺泡壁的毛细血管内皮细胞及间质细胞,高氧损伤后肺 AQP1 的表达部位未发生改变。AQP1 的蛋白表达变化与其 mRNA 表达变化结果是一致的。结论:高氧性肺损伤可能存在 AQPs 的基因表达调控失衡,这可能是高氧性肺损伤肺水肿形成的原因之一。

【关键词】水通道蛋白;高氧;肺损伤;水肿

【中国图书分类号】R563 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-29

The expression change of aquaporin 1 in hyperoxic lung injury

HAO Jie, et al

(*Scientific Research Division, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression change of aquaporin1 in hyperoxia-induced lung injury and the mechanism of action in lung oedema. *Methods*: Thirty-two juvenile(about two weeks) Wistar rats were randomly divided into breathing room-air group (n =8) and hyperoxia exposure group (n =8 at 3, 7 and 14days respectively). The rats were continuously exposed to oxygen (O_2>0.95)or room air (O_2=0.21, respectively. The distributions of AQP1 in the lung tissues were detected by immunohistochemistry and their mRNA expressions were measured by RT-PCR. In addition, the wet-to-dry weight ratio (W/D), the protein content of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung leak index, histological changes of hyperoxia-induced lung injury were measured respectively. *Results*: Light microscopic findings in the hyperoxia group including oedema, hemorrhage and extensive inflammatory cells in the lungs were observed. The lung W/D, the protein content in BALF and the lung leak index in hyperoxia group were significantly higher than those in room air group. The expressions of AQP1 mRNA in the lungs were significantly decreased at 3d of hyperoxia-exposure, minimized at 7d and increased from 14d(P<0.05). Immunohistochemistry for AQP1 was seen primarily in microvascular endothelia cells around bronchus and alveolus, and interstitial cells; the positive regions were similar for room-air group and hyperoxia group. The dynamic changes of AQP1 protein level coincided with the changes of AQP1 mRNA expression. *Conclusion*: Hyperoxic lung injury may induce regulative unbalance of aquaporins expression, maybe it is one of the reasons for lung oedema caused by hyperoxic lung injury.

【Key words】Aquaporin; Hyperoxia; Lung injury; Oedema

支气管肺发育不良 (BPD) 是发生于新生儿(特别是早产儿)持续用高浓度氧气机械通气后的一种肺损伤性疾病,早期特征性改变是肺泡炎性水肿,继之出现肺间质增生和纤维化。临床研究发现,能在肺损伤 12h 内吸收一些肺水肿液体的病人恢复快,死亡率低[1]。水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是一种对水具有特异性转运功能的细胞膜通道蛋白,目前报道在哺乳动物已发现有 12 种 AQP[2],其中表达于肺的 AQP 有 6 种[3],即 AQP1、AQP3、AQP4、AQP5、AQP8、AQP9。AQP1 主要表达于肺毛细血管

作者介绍:郝 杰(1975-),女,硕士,主要研究方向:高氧肺损伤。

基金项目:重庆市教委(基金号:渝教科 2002-18)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

内皮细胞及间质细胞[4]，但对于 AQP1 在高氧肺损伤中的表达变化及其在肺水肿中的作用机制仍不甚清楚。我们采用大鼠高氧肺损伤动物模型，动态观察了 AQP1 变化规律，探讨其在肺水肿中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备

高氧肺损伤动物模型的制备按参考文献[5]介绍的方法进行，2 周左右幼年 Wistar 大鼠 32 只由重庆医科大学动物中心提供，采用随机图表法分为空气对照组和高氧暴露 3、7、14 天组(每组各 8 只)。高氧组置于有机玻璃氧仓中，连续行氧和二氧化碳浓度监测，保证氧体积分数 >0.95；CO_2 体积分数≤0.05，空气组置于同一室内空气中（氧体积分数 =0.21）。两组环境温度控制在 21℃~25℃，湿度 60%~70%，并于每天上午 9 时开箱 10min，清洁氧仓，添加饲料及饮水。

1.2 标本收集

实验动物经腹腔注射 10%乌拉坦 10ml/kg 麻醉，腹主动脉穿刺取血约 1ml 后，放血处死，血标本行血浆蛋白含量的测定；开胸结扎右主支气管，取右上肺用 4%甲醛固定，石蜡包埋，5μm 切片，HE 染色，光镜下检查肺组织病理变化；同时行免疫组化检测肺组织 AQP1 的表达；取右中肺置于 -70℃冰箱保存，用于 AQP1 mRNA 的检测；取右下肺测肺湿 / 干重比值（W/D）；气管插管，注射冷生理盐水 1.0ml，连续 3 次，80%~90%回收，重复 3 次，将收集的肺泡灌洗液（BALF）于 4000r/min 离心 10min，取上清液测蛋白含量。

1.3 检测方法

1.3.1 肺湿重 / 干重比值（W/D）测定　取右下肺，轻轻擦干表面，立即称重记肺湿重。然后置于 80℃烤箱内，48h 后称重记为肺干重，计算肺湿 / 干重比值。

1.3.2 肺通透指数的测定　血浆和 BALF 中蛋白含量采用 Lowrry 法测定，肺通透指数为 BALF 蛋白含量和血浆蛋白含量的比值。

1.3.3 免疫组化检测肺组织 AQP1 的蛋白表达　采用 SABC 法，AQP1 抗体购自美国 ADI 公司，SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3.4 RT-PCR 检测 AQP1mRNA 水平　引物序列参照文献[6]设计，并由上海生工生物有限公司合成。

AQP1 引物序列

上游：5’-GGAGATGAAGCCCAAATAGAG-3’

下游：5’-CAGGAAACAGAAAGAAAGACAG-3’；

β-actin 引物序列

上游：5’-GACTACCTCATGAAGATC-3’，

下游：5’-GATCCACATCTGCTGGAA-3’。

PCR 反应条件：93℃变性 40s，62℃退火 40s，72℃延伸 1min，共 35 个循环。

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后用溴化乙锭染色，紫外灯光下观察结果并照相，经数字化凝胶系统扫描，图象分析软件进行分析，结果以 AQP1 与 β-actin 的积分分光光密度比值表示。

1.4 统计学处理

采用 SPSS for windows 11.0 统计软件进行数据处理分析，各组指标的检测结果均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，各组均数的比较先行方差分析，组间比较采用 q 检验，$P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结　果

2.1 高氧肺损伤的病理学改变

高氧暴露 3 天组见肺组织水肿、出血、炎细胞浸润；高氧 7 天时上述改变进一步加重；14 天时炎性渗出减少，水肿减轻，间质增厚，胶原样物质增多，肺泡间隔增宽。空气对照组大鼠肺组织支气管和肺泡结构正常。肺湿 / 干重 (W/D)、BALF 蛋白含量、肺通透指数、AQP1 mRNA 表达的变化见（表 1，图 1）。

表 1　肺 W/D、BALF 蛋白含量、肺通透指数及 AQP1 mRNA 的动态变化（n=8，$\bar{x} \pm s$）

组别	肺 W/D	BALF总蛋白(g/L)	肺通透指数（$\times 10^{-3}$）	AQP1
空气组	4.98 ± 0.28	0.29 ± 0.08	3.35 ± 0.46	1.256 ± 0.230
高氧 3 天组	5.21 ± 0.24	0.55 ± 0.09*	6.94 ± 1.02*	0.971 ± 0.159*
高氧 7 天组	5.70 ± 0.29*#	0.74 ± 0.12*#	10.52 ± 1.08*#	0.533 ± 0.095*
高氧 14 天组	5.53 ± 0.44*#	0.91 ± 0.19*#	11.97 ± 1.57*#	0.651 ± 0.101*

注：* 示与空气组相比，P<0.05；# 示与 3 天组相比，P<0.05



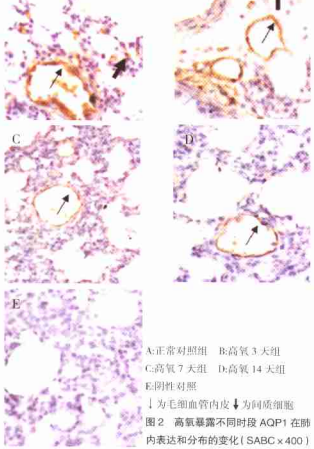
A:正常对照组 B:高氧 3 天组 C:高氧 7 天组
D:高氧 14 天组　E-H: β-actin　M:Marker

图 1　高氧暴露不同时段 AQP1mRNA 的动态变化

2.2 肺组织中 AQP1 的分布和表达

正常肺组织内 AQP1 有阳性表达，主要分布在支气管和肺泡周围的毛细血管内皮细胞及间质细胞；高氧各组与对照组相比表达细胞类型不变，高氧 3 天组即可见 AQP1 的表达减弱；高氧 7 天组表达减弱更加明显，但在高氧 14 天时 AQP1 的表达较第 7 天时有所恢复（图 2），肺组织中 AQP1 mRNA

维普资讯 http://www.cqvip.com



A:正常对照组 B:高氧 3 天组
C:高氧 7 天组 D:高氧 14 天组
E:阴性对照
↓为毛细血管内皮 ↓为间质细胞

图 2 高氧暴露不同时段 AQP1 在肺内表达和分布的变化 (SABC × 400)

表达的动态变化,见(表 1)。

3 讨 论

AQP 是近年来发现的一组与水通透有关的细胞膜转运蛋白,它广泛存在于哺乳动物和植物细胞膜上,主要介导自由水被动跨生物膜转运,对保持细胞内外环境的稳态平衡起重要作用,也参与完成一些机体的重要生理功能[7,8]。高氧性肺损伤是一种弥散性肺泡炎和损伤后修复重建的复杂病理生理过程,其肺损伤早期特征性改变是肺泡炎性水肿,继之出现肺间质增生和肺纤维化,最终导致呼吸功能的完全丧失。Ruddy MK[9]发现在哺乳动物,胚胎肺泡内的大量水分在出生后迅速吸收以过渡到自主呼吸,与此同时机体肺组织内的 AQPs 蛋白表达显著上升。Towne[10]发现小鼠在腺病毒感染后第 7 天和第 14 天,AQP1 和 AQP5 均下降,但在第 14 天时 AQP1 开始恢复,同时炎症反应和肺水肿减轻。显示 AQPs 与肺部感染、水肿有关,AQPs 参与肺部感染时异常液体流动。

研究显示高氧所致急性肺损伤中,3~7 天出现明显的肺水肿,同时支气管和肺泡壁毛细血管内皮细胞及间质细胞 AQP1 表达数量明显减少;当肺水肿于损伤 14 天开始减轻时,毛细血管内皮细胞及间质细胞 AQP1 的表达有所恢复,因此肺损伤水的异常跨膜转运和水在肺组织的异常积聚与 AQPs 有关。肺微血管 AQP1 表达下降对肺水肿形成有一定作用。我们认为高氧性肺损伤可能存在氧自由基攻击导致 AQPs 的基因表达调控失衡,从而导致肺泡炎性水肿液的清除率下降,这可能是高氧性肺损伤肺水肿形成的原因之一。如果早期机体或干预性治疗能使 AQP1 表达增加,促使肺水肿液迅速重吸收,就有可能很快逆转肺损伤和低氧血症,减少氧气使用时间并阻断肺间质增生和肺纤维化,可能是未来支气管肺发育不良 (BPD) 防治的措施之一。

(通讯作者:许 峰,E-mail:xufeng9899@yahoo.com.cn,Tel:63622664)

参 考 文 献

[1] Matthay MA,Flori HR,Conner ER,et al.Alveolar epithelial fluid transport:basic mechanisms and clinical relevance [J].Proc Assoc Am Physicians,1998;110:496-505.

[2] Itoh T,Rai T,Kuwahara M,et al.Identification of a novel aquaporin,AQP12,expressed in pancreatic acinar cells [J].Biochem Biophy Res Commun,2005;330:832-838.

[3] Ishibashi K,Kuwahara M,Gu Y,et al.Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea,but not to glycerol [J].Biochem Biophys Res Commun,1998;244:268-274.

[4] Song Y,Yang B,Matthay MA,et al.Role of aquaporin water channels in pleura fluid dynamics [J].Am J Physiol Cell Physiol,2000;279(6):C 1744-1750.

[5] Xu F,Fok TF,Yine J.Hyperoxia-induced lung injury in premature ratsdescription of a suitable model for the study of lung disease in newborns[J].Chin Med J,1998;111:619-624.

[6] Huebert RC,Splinter PL,Garcia F,et al.Expression and Localization of Aquaporin Water Channels in Rat Hepatocytes.Evidence for a role in canalicular bile secretion[J].J Biol Chem,2002;277(25):22710-22717.

[7] Nicotina PA,Romeo C,Arena S,et al.Immunoexpression of Aquaporin-1 in Adolescent varicocele testes:possible significance for fluid reabsorption[J].Urology,2005;65:149-152.

[8] Nagahama M,Ma M,Semba R,et al.Aquaporin 1 immunoreactive enteric neurons in the rat ileum[J].Neurosci Lett,2005.

[9] Ruddy MK,Drazen JM,Pitkanen OM,et al.Modulation of aquaporin4 and the amiloride- inhibitable sodium channel in perinatal rat lung epithelial cells[J].Am J Physiol,1998;274(6 Pt1):L1066.

[10] Towne JE,Harrod KS,Krane CM,et al.Decreased expression of AQP1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection [J].Am J Respir Cell Mol Biol,2000;22:34-44.