维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)02-0223-04

大鼠眼内组织水通道蛋白 1 的表达

李嘉文，李平华，张　黎

（重庆医科大学附属第一医院眼科，重庆　400016）

【摘　要】目的：观察水通道蛋白 1（AQP1）在正常大鼠眼内组织的表达部位。方法：雄性 Wistar 大鼠断头放血取出眼球，4%多聚甲醛固定，石蜡包埋。做矢状面 5μm 连续切片，每个标本切 3 张，分别用于 AQP1 免疫组化染色、阴性对照和 HE 染色，用已知有 AQP1 表达的大鼠肾脏肾小管切片为阳性对照。结果：光镜下观察 AQP1 免疫组化染色切片，细胞中出现棕色粗大颗粒为阳性，反之为阴性。大鼠眼内组织 AQP1 阳性表达部位有：(1)角膜内皮细胞；(2)虹膜上皮细胞；(3)晶状体上皮细胞；(4)睫状体非色素上皮（NPE）细胞；(5)视网膜神经节细胞层、内核层；(6)视神经胶质细胞。结论：AQP1 在眼内与水代谢有关的多个部位呈阳性表达。

【关键词】水通道蛋白 1；免疫组织化学；眼组织

【中国图书分类法分类号】R322.9+1；R77　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-10-19

Expression of AQP1 in ocular tissues of rat

LI Jiawen, et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect the expression of aquaporin-1 (AQP1) in ocular tissues of normal rats. *Methods*: The eyeballs were enucleated from the male Wistar rats, fixed with 4% formaldehydum polymerisatum and embeded in paraffin. Then, 5μm serial section was made on the sagittal plane. Each sample was cut into 3 pieces for AQP1 HE staining and immunohistochemical staining, the latter of which included negative control and positive control. The immunohistochemical staining of renal tubule, known as positive expression of AQP1, was used as positive control. *Results*: Under the light microscope, the brown cellular granules indicated positive-AQP1 cells. AQP1 was expressed in corneal endothelial cells, iris epithelial cells, crystalline lens epithelial cells, ciliary body non-pigment epithelial(NPE) cells, ganglion cell layer and inner nuclear layer of retina, optic nerve glial cells. *Conclusions*: AQP1 is expressed in many places of ocular tissues related to the water metabolism.

【Key words】Aquaporin-1; Immunohistochemistry; Ocular tissues

水通道是广泛存在于哺乳动物和植物细胞膜上转运水的特异孔道，由一系列具有同源性的内在膜蛋白家族成员组成，它们介导着不同类型细胞膜的跨膜水转运，即水通道蛋白家族（AQPs）。AQP 只允许水分子快速传输而阻挡其它的小分子和离子（包括质子 H^+）的筛选运输。迄今为止，在哺乳动物细胞膜上已发现了 11 种水通道蛋白（AQP0～AQP10），并呈特异性分布。AQPs 在眼内的表达位于液体转运的多个部位。目前研究较多的是 AQP1，与其它 AQPs 比较，它在眼内组织分布最广，特别是它与房水的分泌、排出及调节关系密切，任一环节障碍都可能导致眼内压（IOP）的升高及青光眼的发生。

1　材料和方法

1.1　实验动物

重庆医科大学实验动物中心提供的健康、雄性 Wistar 大鼠（清洁级）10 只，体重 200～250g。

1.2　主要仪器设备

超薄切片机（型号 LEICA RM2135 德国），光学显微镜及摄像系统（型号 OLYMPUS BH2 日本），医用孵育箱（SANYO）。

1.3　药物及主要试剂

作者介绍：李嘉文（1973-　），男，主治医师，硕士，主要研究方向：白内障，青光眼。

维普资讯 http://www.cqvip.com

兔抗鼠 AQP1 抗体（美国 Sigma 公司），即用型羊抗兔 SP-9001 试剂盒（美国 Zymed 公司），牛血清白蛋白（北京中杉金桥生物技术有限公司），DAB 显色液（美国 Zymed 公司）。

1.4 实验方法

雄性 Wistar 大鼠断头放血取出眼球，用 4%多聚甲醛固定 24h，石蜡包埋。做矢状面 5μm 连续切片，每个标本切 3 张，分别用于 AQP1 染色、阴性对照和 HE 染色。取大鼠肾脏沿其长轴剖开用 Bouin 液固定 24h，石蜡包埋，做 5μm 连续切片用作 AQP1 免疫组化染色阳性对照。AQP1 免疫组化染色步骤：石蜡切片脱蜡水化；3%甲醇 $-H_2O_2$ 37℃孵育 30min，以清除内源性过氧化氢酶；蒸馏水冲洗，PBS（0.02M pH7.4）浸泡 5min×3 次；抗原修复；PBS 冲洗 5min×3 次；滴加封闭用正常兔血清 30μl，室温孵育 30min；滴加兔抗鼠 AQP1 抗体工作液（一抗）30μl，4℃冰箱过夜，阴性对照以正常兔非免疫血清代替一抗；PBS 冲洗 5min×3 次；加生物素标记羊抗兔 IgG 工作液（二抗），37℃孵育 60min；PBS 冲洗 5min×3 次；滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液（二抗），37℃孵育 60min；PBS 冲洗 5min×3 次；DAB 显色，显微镜下观察 30～50min，显色适度后 PBS 终止显色；蒸馏水冲洗，苏木素复染 3min，自来水冲洗约 15min 返蓝，常规梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。

2 结 果

光镜下观察 AQP1 免疫组化染色切片，细胞中出现棕色颗粒为阳性，反之为阴性。其免疫反应的阳性部位在胞膜和胞浆。棕色颗粒颜色越深、表示阳性强度越大。大鼠眼球内 AQP1 阳性表达部位位于：角膜内皮细胞；虹膜上皮细胞；晶状体上皮细胞；睫状体非色素上皮（NPE）细胞；视网膜神经节细胞层、内核层；视神经胶质细胞（见图 1～7，图 8 为肾脏 AQP1 染色的阳性对照）。

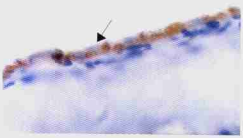


图 2 角膜内皮 AQP1 免疫组化阳性染色（×1000）



图 3 虹膜 AQP1 免疫组化阳性染色（×400）

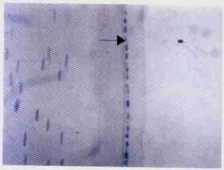


图 4 晶状体上皮 AQP1 免疫组化阳性染色，可见晶状体前囊膜下单层的细胞以及棕色的 AQP1 颗粒（×400）

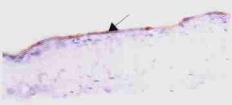


图 1 角膜内皮 AQP1 免疫组化阳性染色，箭头所指为棕色的 AQP1 颗粒（×400）

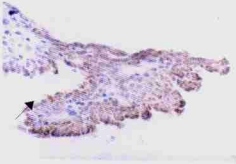


图 5 睫状体 NPE 细胞 AQP1 免疫组化阳性染色，NPE 细胞有很强的 AQP1 阳性表达（×400）

维普资讯 http://www.cqvip.com

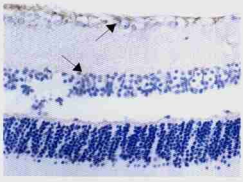


图 6 视网膜 AQP1 免疫组化阳性染色,棕色的 AQP1 颗粒位于视网膜的神经节细胞层及内核层(×1000)

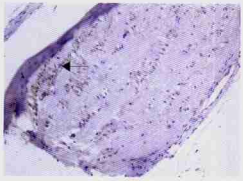


图 7 视神经 AQP1 免疫组化阳性染色,AQP1 位于神经胶质细胞(×400)

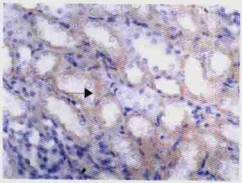


图 8 肾脏 AQP1 免疫组化染色阳性对照(×400)

3 讨 论

1988年,John Hopkins 大学的 Peter Agre 研究小组在分离纯化红细胞膜上的 Rh 多肽时发现了一种分子量为 28kDa 的疏水跨膜蛋白,该蛋白被命名为 CHIP28(channel-forming integral membrane protein, 28kDa),经研究证实该蛋白为水通道蛋白[1],后经人类基因委员会命名 CHIP28 为 Aquaporin-1(AQP1)。AQPs 的发现和研究对眼组织中与水转运有关的生理和病理机制有了进一步的认识。研究证实在眼内组织中存在的 AQPs 有 AQP0 ~ AQP5 以及 AQP9,其中 AQP1 是眼内组织分布最广泛的水通道蛋白。

AQP1 在细胞膜中以四聚体形式存在,每个单聚体(即一个 AQP1 分子)是一个独立功能单元,中心存在一个通道管。该通道还有特定汞敏感结合位点,与汞化合物结合后使通道受抑制。AQP1 基因定位于 12q13,AQP1 cDNA 的全长接近 3kb,分子量为 28.5kD,除了能通透水,也可能转运 CO_2 和其他气体。不排除 AQP1 还有其他非水转运方面的作用:它是有丝分裂的一个早期反应基因,可能在受伤愈合方面起作用。汞剂对其有抑制作用,抗利尿剂、皮质前体类激素、雌激素、血管加压素、渗透压均有可能调节 AQP1 的表达和功能。静息状态下,AQP1 主要分布于细胞膜,还有一部分分布于胞浆内囊泡。促胰液素和秋水仙碱都可以影响 AQP1 的细胞内再分布,因而具有调节其功能的作用。

实验显示 AQP1 在正常 Wistar 大鼠角膜内皮细胞表达(见图 1,2),这与 Stamer 等[2]用免疫荧光定位 AQP1 在牛角膜内皮细胞顶膜和基质膜以及 Wen 等[3]利用共聚焦显微镜在内皮细胞 x,y,z 三个平面观察 AQP1 抗体荧光结合区的结果是一致的。AQP1 在角膜内皮的作用之一是转运水以维持角膜折射面水化的状态,这对于维持角膜的清晰、折射和屈光极为重要,AQP1 在角膜内皮细胞的存在为水提供了迅速进出角膜的通路。

大量研究[2-4]显示 AQP1 分布于虹膜上皮细胞、Schlemm 管内皮细胞、小梁网内皮细胞,表明这些部位的 AQP1 与房水的调节和排出密切相关。我们观察到 AQP1 在虹膜上皮细胞表达(见图 3),但由于实验中脱片导致前房角结构紊乱,无法判断 Schlemm 管内皮细胞、小梁网内皮细胞是否有 AQP1 阳性表达。

晶状体仅有 AQP0 和 AQP1 两种水通道蛋白表达。本研究显示 AQP1 在晶状体上皮细胞(LECs)表达(见图 4)。LECs 由其分泌的囊膜包绕着晶状体与房水及玻璃体隔离开,对维持晶状体内适当的脱水状态,保持透明尤为重要。用反义 AQP1 探针发现晶状体表层有强烈的杂交信号,与 AQP1 抗体染色结果一致[5]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

我们发现 AQP1 在大鼠睫状体 NPE 细胞有很强的阳性表达（见图 5），这与睫状体 NPE 细胞的功能是相一致的。当血液流经睫状体时其中的一部分物质通过有孔的血管滤过到血管和睫状体色素上皮的间隙中，滤过液的大部分成分被睫状体上皮细胞分泌进入后房形成房水。NPE 细胞的基侧质膜有大量的 Na^+-K^+-ATP 酶，可将滤过的离子和水分泌入后房。据估算有四百万个 NPE 细胞，每个细胞每分钟将分泌出相当于其总容量 1/3 的液体，如此大的分泌量用单纯扩散理论无法解释。而 AQP1 在其顶质膜和基侧质膜有大量的表达，每平方微米的数量超过了 1000 个，而离子通道数量却少于 1 个，所以 AQP1 转运水的速率远远超过了单纯扩散。

实验显示出 AQP1 在正常 Wistar 大鼠的神经节细胞层及内核层表达（见图 6）。视网膜神经节细胞层主要由神经节细胞的细胞体组成，在视网膜大部分仅为一层，在视盘颞侧变为二层，至黄斑部增加到 8～10 层，向中心凹方向神经节细胞又逐渐减少，中心凹部神经节细胞完全消失。M ü ller 细胞及神经胶质细胞潜入神经节细胞之间。视网膜内核层有四种细胞：水平细胞、双极细胞、M ü ller 细胞及无长突细胞。M ü ller 细胞对视网膜起支持及营养作用。由于在其他部位的神经细胞上 AQP1 是不存在的，所以我们认为 AQP1 的阳性表达为 M ü ller 细胞和神经胶质细胞。其可能对视网膜在正常和病理状态下（如高 IOP 和视网膜缺血、水肿等）维持水和电解质平衡，保证视网膜神经电生理活动起重要作用。Hamann 等[4]用免疫印迹、免疫电镜显示 AQP1 除存在于上述组织外，还在巩膜成纤维细胞、角膜基质细胞、脉络膜表达，薄冰冻切片显示非常低水平的 AQP1 表达在视网膜的外核层（该信号较弱，用一般标准技术检测不到）。Kim 等[6]制备视网膜的水平振荡切片利用免疫组化显示 AQP1 定位于视网膜内核层的无长突细胞和 M ü ller 细胞的近端突起。这些结果的差异可能与实验技术条件有关。

我们还特别观察到在大鼠的视神经纵切面上也有棕色的颗粒出现，表明在该处也有 AQP1 的阳性表达（见图 7）。视神经由软脑膜包围，从软脑膜发出许多中隔进入视神经内，约 6～9 个厚的中隔把视神经隔成数个部分，它再分出许多细薄的中隔，最终把视神经分隔成许多神经束。在中隔不相连续的部位，被神经胶质细胞充填。我们认为该处为神经胶质细胞的 AQP1 阳性表达。

参 考 文 献

[1] Agre P, Sasaki S, Chrispeeis MJ. Aquaporins:a family of water channel protein [J]. Am J Physiol, 1992; 265(3 pt 2):F461.

[2] Stamer WD, Snyder RW, Smith BL, et al. Localization of aquaporin CHIP in the human eye:implications in the pathogenesis of glaucoma and other disorders of ocular fluid balance[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994; 35(11): 3867-3872.

[3] Wen Q, Diecke FP, Iserovich P, et al. Immunocytochemical localization of aquaporin-1 in bovine corneal endothelial cells and keratocytes [J]. Exp Biol Med, 2001; 226(5):463-467.

[4] Hamann S, Zeuthen T, La Cour M, et al. Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye [J]. Am J Physiol, 1998; 274(5 Pt 1): C1332-1345.

[5] Kevin LS, Mauk L, Rosalie KC, et al. Characterization of human lens major intrinsic protein structure [J].Invest Opthalmol Vis Sci, 2000;41:175-182.

[6] Kim I.B, Oh S.J, Chun M.N, et al. Immunocytochemical localization of aquaporin 1 in the retina[J].Neuroscience letter, 1998; 244:52-54.

（上接第 218 页）

[8] 王 颖，王家龙. Survivin 在原发性肝细胞癌中的表达及意义[J]. 中华消化杂志，2002;22:463-466.

[9] 王孝养，陈仕新，张珍祥，等. Survivin 基因在非小细胞肺癌中的表达及与 p53，c-myc，k-ras 蛋白表达的关系[J].结核和呼吸杂志，2001;24:371-374.

[10] Carter BZ, Milella M, Altieri DC, et al. Cytotkine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia [J]. Blood, 2001; 97(9): 2784-2790.

[11] 林茂芳，孟小莉，蔡 真，等. 抗凋亡基因 survivin 在急性白血病细胞表达及其临床意义[J].中华血液杂志，2002;23(5):251-253.

[12] Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14; 18) chromosome translocation [J]. Science, 1984;226(4678):1097-1099.

[13] Vaux DL, Cory S, Adams JM, et al. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells [J]. Nature, 1988; 335(6189): 440-452.

[14] 吴式琇，谢聪颖，张 萍，等.食管鳞癌中 survivin 和 Bcl-2 的表达与肿瘤细胞凋亡的关系[J].中国癌症杂志，2003;13(4):335-337.

[15] 林 艳，徐永泉. 胰腺癌组织中 survivin 的表达及其与 bcL-2 和 P53 基因表达的相关性 [J]. 中国医科大学学报，2003;32(6):558-559.