DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.09.008
第26卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 9
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)09-0767-03

论著

LPS对培养大鼠肺微血管内皮细胞AQP-1表达的影响

谢艳萍[1],王建春[1],钱桂生[1],王应灯[2],肖贞良[1] ([1]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037;[2]安徽医科大学附属医院呼吸内科,合肥 230022)

提 要:目的 通过观察脂多糖(LPS)刺激下对肺微血管内皮细胞水通道蛋白-1(AQP-1)表达的影响,为进一步研究急性肺损伤时肺水异常代谢的机制提供实验依据。方法 采用体外培养的大鼠肺微血管内皮细胞,使用浓度为100 ng、1、10 μg/ml的LPS与之孵育2、4、6、8 h,应用免疫细胞化学方法以及RT-PCR法检测AQP-1的表达。结果 LPS刺激组AQP-1表达显著低于正常对照组($P<0.01$);AQP-1表达下降与LPS刺激浓度有关。结论 LPS刺激下AQP-1表达下降,提示AQP-1在急性肺损伤时可能与肺水代谢异常有关。

关键词:脂多糖;水通道蛋白;肺微血管内皮细胞;急性肺损伤
中图法分类号:R322.12;R343.8;R394.12 文献标识码:A

Effects of lipopolysaccharide on aquaporin-1 expression in cultured rat lung microvessel endothelial cells

XIE Yan-ping[1], WANG Jian-chun[1], QIAN Gui-sheng[1], WANG Ying-deng[2], XIAO Zhen-liang[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Respiratory Diseases, Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China)

Abstract: **Objective** To determine the effects of lipopolysaccharide (LPS) stimulation on aquaporin-1 (AQP-1) expression in rat lung microvessel endothelial cells (RLMECs) and to offer experimental support for the investigation of the mechanisms of lung fluid abnormal metabolism in acute lung injury. **Methods** Rat lung microvessel endothelial cells cultured *in vitro* were incubated with different concentrations of LPS (100 ng/ml, 1 μg/ml, and 10 μg/ml) for 2, 4, 6, and 8 h. AQP-1 expression was detected by immunocytochemistry and AQP-1 mRNA expression by RT-PCR technique. **Results** AQP-1 expression in the LPS stimulation group was significantly lower than that in the normal control group ($P<0.01$). The decreased AQP-1 expression was associated with the concentrations of LPS. **Conclusion** LPS stimulation can significantly decrease AQP-1 expression, suggesting that AQP-1 may play an important role in abnormal fluid transportation in acute lung injury.

Key words: lipopolysaccharide; aquaporin; lung microvessel endothelial cell; acute lung injury

水通道蛋白是一组水选择通道的分子家族,可以提供液体快速转运的通路,本研究通过在体外培养大鼠肺微血管内皮细胞(rat lung microvessel endothelial cell, RLMEC),应用分子生物学、免疫学技术初步观察LPS刺激下肺微血管内皮细胞水通道蛋白-1(aquaporin-1, AQP-1)表达的影响,为进一步探讨急性肺损伤时肺水代谢异常的机制提供理论基础及实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基、优级胎牛血清(Hyclone公司)、LPS(O111:B4, Sigma公司)、AQP-1抗体(Chemicon公司)、Ⅷ因子相关抗原(ⅧR:Ag)(DAKO公司)、植物凝血素FITC-BSI(Sigma公司)、RT-PCR试剂盒(武汉博士德公司)、SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠肺微血管内皮细胞的培养、分离和鉴定 采用本所创立的培养方法,参照文献[1,2]进行。健康雄性Wistar大鼠30只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量110~140 g。相差显微镜下,细胞呈典型的铺路石状相嵌排列。采用Ⅷ因子相关抗原间接免疫荧光染色、植物凝血素结合试验进行鉴定。

1.2.2 AQP-1抗原表达的测定 将细胞传代培养在盖玻片上,每孔接种浓度为1×10^6/ml,细胞生长至80%以上融合度时用于实验。实验分低浓度(LPS 100 ng/ml),中浓度(LPS 1 μg/ml),高浓度(LPS 10 μg/ml),刺激细胞分别至2、4、6、8 h,每个时相点6个标本。对照组只加培养基。免疫细胞化学采用SABC法[3]。图像分析系统行光密度扫描半定量分析,以平均光密度(average oculus dehter, AOD)表示阳性强度。

基金项目:全军"十五"医学卫生重点课题(01Z074)
Supported by the Key Research Project for Medicine and Health of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01Z074)
作者简介:谢艳萍(1972-),女,江西省萍乡市人,硕士,主治医师,主要从事急性肺损伤方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68755320
收稿日期:2003-06-18;修回日期:2003-08-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.3 AQP-1mRNA 表达的测定 LPS(1 μg/ml)刺激细胞后 2、4、6、8 h, 分别用 Tripure 提取总 RNA, 将提取的总 RNA 与下游引物反转录合成 cDNA, AQP-1 引物 正向: 5′-TGTGCGTTCTGGCTAC-3′; 反向: 5′-CTATTTGGGCTTCATCTC-3′, 扩增片段为 359 bp。β-actin 引物 正向: 5′-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3′; 反向: 5′-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3′ 扩增片段为 500 bp。以合成 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 循环次数为 30 轮。PCR 产物电泳后行图像扫描分析。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS1.0 统计包软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 培养的肺微血管内皮细胞

细胞主要呈多角形、短梭形, 铺路石状排列, 分裂相细胞呈类圆形, 颜色浅淡, 单层贴壁生长(图 1)。



图 1 正常大鼠肺微血管内皮细胞 (倒置显微×200)

Fig 1 Normal rat lung microvessel endothelia cells (Inverted microscope×200)

2.2 肺微血管内皮细胞的鉴定

ⅧR: Ag 检测呈阴性; 与植物凝血素 FITC-BSI 结合阳性, 呈明亮的黄绿色荧光(图 2)。

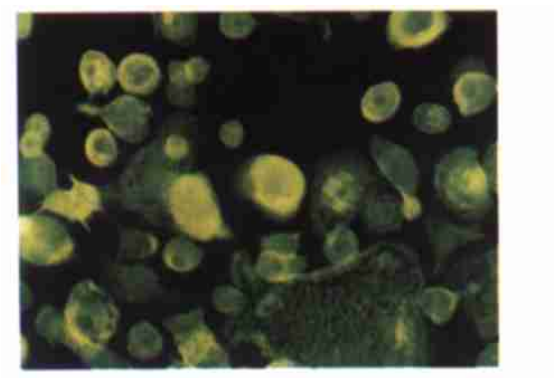


图 2 正常 **RLMEC** 与植物凝血素 **FITC-BSI** 结合的情况 (×400)

Fig 2 Binding of normal RLMECs to FITC-BSI (×400)

2.3 不同浓度的 LPS 刺激对 AQP-1 蛋白表达的影响

2.3.1 与对照组相比, 100 ng/ml、1 μg/ml、10 μg/ml LPS 刺激 2 h, AQP-1 表达开始下降, 4 h 下降显著, 6、8 h 进一步下降。LPS 刺激浓度增加, AQP-1 表达下降越显著(表 1)。

表 **1** **AQP-1** 免疫细胞化学染色平均光密度值(**AOD**)结果 ($n=6$ $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The results of average O. D. of AQP-1 expression by immunocytochemistry ($n=6$ $\bar{x}\pm s$)

Group	2 h	4 h	6 h	8 h
Normal	0.75±0.07	0.79±0.09	0.77±0.06	0.76±0.08
LPS100 ng/ml	0.62±0.08*	0.59±0.09*	0.57±0.08*	0.55±0.07*
LPS1 μg/ml	0.54±0.11**	0.50±0.09**	0.45±0.08**	0.41±0.07**
LPS10 μg/ml	0.51±0.08**	0.48±0.10**	0.41±0.07**	0.35±0.09**

*: $P<0.05$, *vs* normal group; **: $P<0.01$, *vs* normal group

2.3.2 免疫细胞化学法检测正常对照组 AQP-1 表达见图 3; LPS(1 μg/ml)刺激 4 h AQP-1 表达见图 4。



图 **3** 正常对照组 **AQP-1** 表达 (SABC×200)

Fig 3 AQP-1 expression in normal group (SABC×200)



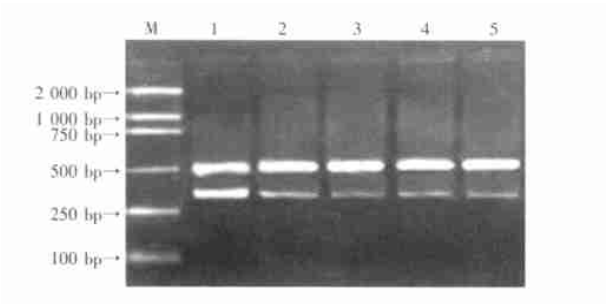
图 **4** **LPS(1 μg/ml)**刺激 **4 h AQP-1** 表达 (SABC×200)

Fig 4 AQP-1 expression at 4 h after treatment with LPS at the concentration of 1 μg/ml (SABC×200)

2.4 RT-PCR 结果

LPS(1 μg/ml)刺激 2、4、6、8 h 对 AQP-1 mRNA 表达的影响(图 5)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



M: Marker; 1: Normal; 2: LPS for 2 h; 3: LPS for 4 h; 4: LPS for 6 h 5: LPS for 8 h

图 5　肺微血管内皮细胞 AQP-1 mRNA 的 PCR 产物电泳结果

Fig 5　Electrophoretogram of PCR product of AQP-1 mRNA of RLMECs

3　讨论

肺是气体交换的场所。肺泡和毛细血管间水的平衡, 对保持肺泡内相对干燥的环境, 维持正常的气体交换功能, 具有重要的意义。肺泡和毛细血管间水的转运需经过上皮、间质和内皮层, 而上皮细胞间的连接非常紧密(紧密连接), 限制了水的通透。因此水主要是经跨细胞膜转运[4]。水的跨膜转运有两种基本方式: 穿越膜脂质双层的简单扩散和通道介导的水转运, 但主要方式是通道介导的水转运[5]。不同组织其水扩散通透性(diffusional water permeability, Pd)系数不同, 但变异不大。Pd 值较低, 约为 10 μm/s, 并呈现出温度依赖性; 其 Arrhenius 活化能较高(Ea> 10 kcal/mol)[6]。膜脂质的分子组成和流动性影响水的扩散[5]。由于水渗透通透性(osmotic water permeability, Pf)远远大于 Pd, 简单扩散无法解释大量水通透细胞膜, 因此提出了功能性水通道的概念。1991 年 Agre 发现水通道 1[7](AQP-1, CHIP28)改写了以往的概念, 因为水通道可以提供另一种液体转运的途径, 水通过水通道蛋白可以向高渗方向移动。AQP-1 分布于体内的不同组织, 它不仅参与生理状态下液体的转运, 可能还与病理状态下液体的转运失衡有关。

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是以通透性肺水肿为特征的一种临床综合征, 其严重阶段即是急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。目前, ARDS 仍是临床的危重症, 死亡率高, 临床缺乏特异治疗。虽然对其发病机制已进行了大量的研究, 发现多种炎性介质和多种细胞参与发病, 但发病机制仍不十分清楚。肺微血管内皮细胞(lung microvessel endothelial cell, LMEC)是构成血气屏障的重要结构, 在各种炎症、损伤等引起的病理过程中如 ALI、ARDS 等, LMEC 通透性增加, 是发病的中心环节。以往人们普遍认为, 肺水肿主要是由于 LMEC 受损所致, 而对 LMEC 存在的水通道在病理生理条件下的作用认识不足。在上述病理过程中, 可能存在肺组织水通道功能的改变从而影响肺组织的生理功能。本研究通过体外培养 RLMEC, 在脂多糖(LPS)刺激作用下, 观察 AQP-1 的表达变化, 研究结果表明在不同浓度 LPS 刺激下, AQP-1 表达 2 h 已经下降, 4 h 显著下降, 6 ~8 h 进一步下降, LPS 刺激浓度大, AQP-1 下降越显著; 同时 RT-PCR 结果表明 LPS 刺激后 2h AQP-1mRNA 表达开始下降, 刺激 4 ~8 h 显著下降, 这与免疫细胞化学检测 AQP-1 蛋白表达结果一致, 可能为 LPS 刺激时 AQP-1 蛋白合成受到影响, 因而我们推测急性肺损伤时肺微血管内皮细胞 AQP-1 表达减少, 水转运功能下降, 可能影响对肺间质水肿液转运, 参与了肺水肿的发病机制。本研究结果提示 AQP-1 在调节肺内液体平衡中起重要作用。

参考文献:

[1] 肖贞良, 孙耕耘, 钱桂生. 肺循环灌注对大鼠肺微血管内皮细胞分离和培养的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(11): 1053－1054.

[2] Chen S F, Fei X, Li S H. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries [J]. Microbas Res, 1995, 50(1): 119－128.

[3] 蔡文琴, 王伯弋云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 406－411.

[4] Matthay M A, Folkesson H G, Verkman A S. Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung [J]. Am J physiol, 1996, 270(4 Pt 1): L487－503.

[5] 陶　军, 杨宗城. 肺组织水通道蛋白的研究进展[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2000, 20(2): 127－130.

[6] King L S, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels [J]. Annu Rev Physiol, 1996, 58: 619－648.

[7] Arge P, Preston G M, Smith B L, *et al*. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel [J]. Am J Physiol, 1993, 256(4 Pt 2): F463－467.

（编辑　刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net