DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.016
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
122 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)02-0122-03

AQP-5在干燥综合征小鼠颌下腺中的表达

杨 军,肖 林,孙 远,周继祥,杨彦春,王碧江 (第三军医大学西南医院口腔科,重庆 400038)

提 要:目的 初步探讨水通道蛋白-5(AQP_5)在干燥综合征(SS)小鼠颌下腺中的表达分布。方法 用免疫组化方法和Western blot分析SS小鼠颌下腺AQP_5表达变化特点。结果 对照组AQP_5在腺泡的顶膜、侧膜和导管等处均有较强表达;实验组AQP_5表达减少或消失,AQP_5在SS残存的腺泡部位,顶膜表达减少,相应基侧膜的表达增强,而且主要分布在导管部位。Western blot检测显示各组均出现分子量为27×10^3的条带,实验组AQP_5的表达量显著减少($P<0.01$)。结论 AQP_5表达量减少和异位表达增强与SS口干病相关。

关键词:水通道蛋白;干燥综合征;颌下腺;免疫组化;免疫印迹
中图法分类号:R593.2;R322.41;R341 文献标识码:A

Expression of aquaporin-5 in submandibular glands of Sjögren's syndrome mouse

YANG Jun, XIAO Lin, SUN Yuan, ZHOU Ji-xiang, YANG Yan-chun, WANG Bi-jiang (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression distribution of aquaporin-5(AQP_5) in submandibular salivary glands of Sjogren's syndrome (SS) mice. Methods A total of 10 BALB/c mice were injected with pertussis vaccine plus complete Freund's adjuvant (CFA) plus homologous antigen of submandibular gland to enhance the immuological reaction. The other 10 mice, injected only with the same volume of saline, were employed as the control. Samples of submandibular glands, were analyzed histologically, with immunohistochemical method and Western blot quantitative analysis at different time points. Results In the control group, AQP_5 was strongly expressed in the apical membrane, the basolateral membrane, and the secretory duct of the acinar cells. AQP_5 immunoreactivity was predominantly localized at the apical membrane of acinar cells. In the experiment group, however, AQP_5 expression decreased or disappeared; in the remaining acinus, decreased AQP-5 was found in the apical membrane, but enhanced expression of AQP-5 was found in the corresponding basolateral membrane, mainly distributed in the basal membrane and duct cells. Western blot analysis showed that there was a 27×10^3 band in both groups, and AQP5 expression in the experiment group decreased significantly ($P<0.01$). Conclusion The significant decrease of AQP_5 expression and abnormal distribution of AQP_5 in salivary gland acini in SS mice may be associated with dry mouth.

Key words: aquaporin; Sjogren's syndrome; submandibular gland; immunohistochemistry; Western blot

干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)是一种侵犯涎腺、泪腺等外分泌腺为主的自身免疫性疾病,涎腺的病理改变主要为淋巴细胞浸润,导致腺泡破坏,导管萎缩,唾液分泌减少引起口干等症状。SS的病因复杂,治疗棘手,目前尚无理想的治疗方法。水通道蛋白(aquaporins, water channel protein, AQP)是近10年来陆续发现的一族细胞跨膜水转运蛋白,迄今至少已发现了10种亚型。本研究目的在于初步探讨与涎腺密切相关的水通道蛋白亚型AQP_5在SS涎腺水代谢障碍中的病理和生理机制,为SS涎腺的基因治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

AQP_5抗体,弗氏完全佐剂,Tripure蛋白提取试剂,均购自美国Santa Cruz公司。

1.2 动物模型的建立[1]

选用BALB/c小鼠20只,8周龄,体质量20 g左右,雌雄不拘,购自第三军医大学实验动物中心。实验组10只分别注射百日咳疫苗+完全弗氏佐剂+同种鼠颌下腺抗原(200 μg/ml),多点注射于小鼠的足垫、背部皮下,总量为0.5 ml,背部注射百

作者简介:杨 军(1962-),男,江苏省淮安市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事口腔颌面外科及老年口腔方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68754439

收稿日期:2003-06-30;修回日期:2003-10-15

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

日咳疫苗 0.05 ml, 对照组 10 只均注射等体积的生理盐水。6 周后用湿质量法测量唾液流率, 1 周的总饮水量后杀鼠, 取出颌下腺标本制成 6 μm 厚的石蜡切片, 进行 HE 染色观察其病理改变; 免疫组化检测 AQP_5 的定位表达特点; 部分标本置于 −70 ℃ 冰箱中用于 Western blot 分析 AQP_5 表达量的变化。

1.3　免疫组化检测 AQP_5 的定位表达[2]

采用免疫组化 SP 法, 试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。将切片用 3% 甲醇过氧化氢溶液作用 10 min, 消除内源性过氧化物酶的活性。双蒸水冲洗, 0.01 mol/L PBS 洗 5 min, 反复 3 次, 加兔抗羊血清封闭 15 min 后倾去不洗, 再加 AQP_5 的羊抗鼠一抗(1∶200)。放入密闭的湿盒内, 置于 37 ℃烤箱 1 h 后取出, 转入 4 ℃冰箱过夜, 再加二抗(1∶400 生物素标记兔抗羊抗体), 37 ℃水浴箱 1 h, 两者均用 0.01 mol/L PBS 冲洗 5 min ×3 次。最后加三抗(1∶400 过氧化物酶链霉菌抗生物素蛋白), 37 ℃水浴箱 30 min, 再用 0.01 mol/L PBS 冲洗 5 min, 反复 3 次。加 DAB 液显色 5 ~ 10 min。水冲洗, 1% 盐酸乙醇脱色, 脱水透明, 中性树胶封片。对照设置: 不加一抗为阴性对照, 不加任何处理因素为空白对照。结果判定: 棕黄色颗粒为阳性。

1.4　Western blot 分析

1.4.1　蛋白的提取　　取出 −70 ℃冰箱中的标本, 称取各组标本 100 mg, 分别置于 5 ml 离心管中, 各加入 1 ml Tripure 裂解液, 按照 Tripure 试剂说明书步骤提取总蛋白, 以 Lowry' s 法测定蛋白质浓度。并置于 −20 ℃待用。

1.4.2　制定标准曲线　　将中分子量标准蛋白稀释为以下 6 个浓度(μg/ml): 0, 50, 100, 150, 200, 250。紫外可见分光光度计(Agilent8453 波长 650 nm)测吸光度(A)。以蛋白标准浓度为横坐标, 以吸光度值为纵坐标作曲线。

1.4.3　测样本浓度　　将提取的蛋白溶液 25 μl 稀释 8 倍至 200 μl, 按 1.4.2 步骤进行测量, 得到相应的吸光度值。将待测标本吸光度值在标准曲线上查出其对应的浓度, 乘以适当稀释倍数即为样本浓度。

1.4.4　免疫印迹　　每个样品取 30 μg 蛋白质加入 200 μl 上样缓冲液, 100 ℃一起煮沸 5 min; 分别取 10 μl 进行定性 SDS/12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后移至 PVDF 膜上, 再用含 5% 脱脂奶的 TBS-T 缓冲液冲洗, 4 ℃孵育过夜, TBS-T 缓冲液冲洗, PVDF 膜在室温下与 1∶200 稀释的 AQP_5 一抗孵育 2 h, 加 1∶2 000 稀释生物素标记二抗(北京中山生物技术公司)37 ℃孵育 1 h, 每次孵育之间均用 TBS-T 缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min, PBST 洗膜, DAB 显色, 扫描照相。用四川大学图像分析软件对扫描结果进行分析, 得到平均吸光度值(A)。

1.5　统计学分析

采用 SPSS11.0 统计软件单向分析 χ^2 检验及配对样本 t 检验。

2　结果

2.1　病理检查

与对照组相比, 实验组小鼠颌下腺在 6 周后出现大量淋巴细胞浸润, 腺泡数量减少, 以重度损害为主, 见图 1。根据 SS 唇腺活检分级标准[3], BALB/c 小鼠淋巴细胞浸润程度见表 1。

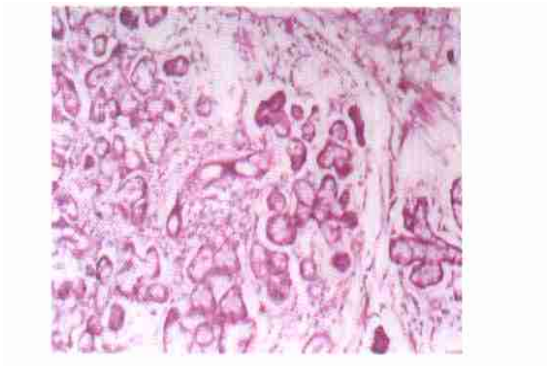


图 1　**SS 小鼠颌下腺组织**　大量淋巴细胞浸润, 腺泡数量减少 (HE× 200)

Fig 1　Submandibular gland of SS BALB/c mouse　Massive infiltration of lymphocytes and reduced number of acini (HE× 200)

表 1　**BALB/c 小鼠颌下腺淋巴细胞浸润程度**

Tab 1　Degree of lymphocytic infiltration in submandibular gland of BALB/c mice

Group	Degree of lymphocytic infiltration				
	Non	Low	Medium	1 focus	> 1 focus
SS	0/8	0/8	1/8	6/8	1/8
Control	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10

*: 2 mice died in SS group

2.2　饮水量

测定每组最后 1 周的饮水量, 实验组与对照组分别为(14.50±2.00) ml 和(10.35±1.70)ml。两者差异显著(P< 0.05)。

2.3　唾液流率

唾液流率可通过 10 min 的唾液总量来反映, 实验组与对照组分别为(7.01±1.39) ml 和(10.07±1.40) ml。两者差异显著(P< 0.05)。

2.4　免疫组化检测结果

对照组小鼠颌下腺在抗 AQP_5 为 1∶200 的一抗浓度时在腺泡的顶膜、侧膜和闰管、分泌管、导管等处均有较强染色, 而实验组 6 周时小鼠颌下腺腺泡、闰管、分泌管、导管等处染色减弱或消失, 表明 AQP_5 表达减少。就残存的腺泡部位而言, AQP_5 与对照组比较在腺泡顶膜表达减少, 相应基侧膜的表达较强, 而且主要分布在导管部位, 见图 2。

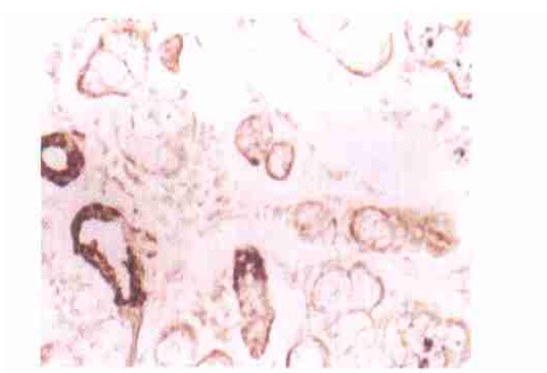


图 2　**AQP_5 在 SS 小鼠颌下腺中表达**　AQP_5 表达减少(S-P× 400)

Fig 2　Expression of AQP_5 in submandibular gland of SS BALB/c　Decreased AQP_5 expression in mouse (S-P× 400)

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

2.5 Western blot 结果

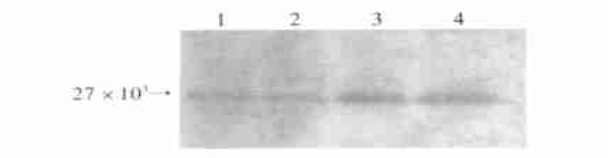
2.5.1 样本蛋白质浓度(g/L) 样本蛋白质浓度用(g/L)表示,各组样本蛋白质浓度均数之间进行多重方差分析检验,各组数据之间没有显著性差异($P>0.05$),见表2。

表2 各组样本蛋白浓度(g/L)

Tab 2 Protein concentrations in each group (g/L)

Group	Sample										$\bar{x}\pm s$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Control	1.485	1.841	1.481	1.826	1.883	1.941	1.273	1.57	1.909	1.758	1.710±0.230
6 week	1.368	1.647	1.951	1.723	1.759	1.769	1.79	1.551			1.695±0.175

2.5.2 蛋白印迹结果 各组样本中均可检测到 AQP_5 的表达:出现分子量为 27×10^3 的条带,见图3。小鼠颌下腺组织总蛋白Western blot分析结果显示,实验组 AQP_5 的表达量与对照组比较显著降低($P<0.01$),见表3。



1, 2: SS group; 3, 4: Control

图3 AQP_5 表达的 Western blot 检测

Fig 3 Western blot analysis of AQP_5 expressed in submandibular gland of SS BALB/c mouse

表3 各组 AQP_5 蛋白表达量(A 值)

Tab 3 Expression levels of AQP_5 protein detected by Western blotting (A)

Group	Sample										$\bar{x}\pm s$
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Control	0.772	0.736	0.976	1.058	0.954	0.85	1.083	0.71	0.97	1.022	0.913±0.182
SS	0.316	0.309	0.247	0.495	0.607	0.26	0.364	0.322			0.365±0.124**

*: $P<0.01$ SS, *vs* Control

3 讨论

早在十几年前人们对水通道蛋白就有所认识,但在水转运中的具体作用尤其在唾液分泌过程中的认识,只是在近年来才得以发现。在哺乳动物内,迄今至少已发现了10种水通道蛋白亚型(从 AQP_0 到 AQP_9)。AQP的分布具有组织和细胞特异性,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[4,5]。

最早被确定分布在涎腺腺泡细胞的是 AQP_5,分布于腺泡腔的顶膜、侧膜、闰管和导管上皮细胞中,AQP_5 构成涎腺唾液分泌的通道,它与其它亚型一样具有水转运的特性[6]。此外,AQP_5 还表达于肺泡Ⅰ型细胞、泪腺腺泡,分别与肺脏渗出液和泪液的分泌密切相关[4]。Ma等[7]进一步研究发现敲除(Knock out)AQP_5 基因后的大鼠,经毛果芸香碱刺激其唾液分泌量减少了60%以上,推测 AQP_5 在唾液分泌中起着重要作用:AQP_5 将唾液转移至纹状管、分泌管中,维持唾液腺的正常分泌。本实验Western blot分析显示各组均出现一 27×10^3 的条带,与报道的 AQP_5 分子量一致。免疫组化染色结果显示:实验组 AQP_5 表达有非常显著改变:即 AQP_5 在腺泡上皮细胞顶膜表达减少或消失,而基侧膜的表达增强,这种表达部位的"易向"可能是水通道蛋白将水分从腺泡细胞顶膜向基侧膜逆向转运,加重了唾液分泌的减少;但是,残存的导管上皮细胞仍然有较强的表达,可能是导管上皮细胞部分改变了其原本单纯重吸收的功能,也参与了水分的分泌,其机制尚需进一步的研究。有学者认为:腺体功能障碍也是导致口干的重要原因,引起腺体分泌障碍的因素包括致炎因子的作用:如 IL-1 和 TNF-α,能阻碍腺体唾液的分泌[8]。有研究表明[9] TNF-α 能上调 AQP_5 的表达,因此 AQP_5 的表达有可能还与各种致炎因子的作用有关,推测可能由于病毒等感染导致炎症因子阻碍了 AQP_5 的表达。与此相似,SS 小鼠颌下腺中 AQP_5 的蛋白表达量的显著降低(*vs* control $P<0.01$),以及分布部位的改变。我们认为可能由于受多种因素作用下导致 AQP_5 表达严重不足(SS 晚期),从而引起唾液分泌量显著减少。

综上所述:涎腺上皮细胞中 AQP_5 构成了涎腺分泌的水分子通道,对调节水分转运速率,维持唾液的分泌起了重要作用。当 SS 颌下腺的重度破坏时,AQP_5 的表达量显著地减少,导致水分转运失代偿,因此利用转基因技术有望将残存的导管上皮细胞转变为能分泌水分及盐分的腺泡样细胞,即改变细胞类型的基本功能,从而改善口干症状,为SS的基因治疗提供了一个新的思路和依据。

参考文献:

[1] 肖 林,杨 军,暨兴华,等. 干燥综合征动物模型的建立[J]. 重庆医学,2003,32(3):306-307.

[2] 杨 军,肖 林,孙 远,等. 人涎腺水通道蛋白的定位[J]. 第三军医大学学报,2002,24(8):967-969.

[3] 王松灵,朱宣智,邹兆菊,等. 舍格伦综合征的诊断标准及分型的评价[J]. 中华口腔医学杂志. 1994,29(6):377-379.

[4] Moore M, Ma T, Yang B, *et al*. Tear secretion by lacrimal glands in transgenic mice lacking water channels AQP_1, AQP_3, AQP_4 and AQP_5[J]. Exp Eye Res, 2000, 70(5): 557-562.

[5] Gresz V, Kwon T H, Hurley P T, *et al*. Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(1): G247-54.

[6] Raina S, Preston G M, Guggino W B, *et al*. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues[J]. J Biol Chem, 1995, 270(4): 1908-1912.

[7] Ma T, Song Y, Gillespie A, *et al*. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels[J]. J Biol Chem, 1999, 274(29): 20071-20074.

[8] Fox R I. Sjögren's syndrome. Controversies and progress[J]. Clin Lab Med, 1997, 17(3): 431-444.

[9] Smith J K, Siddiqui A A, Modica L A, *et al*. Interferon-alpha upregulates gene expression of aquaporin-5 in human parotid glands[J]. J Interferon Cytokine Res, 1999, 19(8): 929-935.

(编辑 王 红)

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