DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.043
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0967-03

论著

人涎腺水通道蛋白的定位

杨 军,肖 林,孙 远,李慧增,杨彦春,张从纪 (第三军医大学附属西南医院口腔科,重庆 400038)

提 要:目的 检测水通道蛋白亚型在人涎腺不同腺体的分布和各亚型所在的部位。方法 使用外伤患者清创缝合术时经患者同意所取得的涎腺组织标本,按冷冻切片技术处理和切片。用免疫组化方法标记确定人涎腺组织中水通道蛋白亚型AQP-1、2、3、4、5的分布情况。结果 AQP2、AQP5为1∶200和AQP1为1∶100的一抗浓度时可以看到它们在腮腺、颌下腺、舌下腺、唇腺有稳定、清晰的染色反应,但AQP3、AQP4为1∶100乃至1∶50的一抗浓度也未观察到染色。AQP1在各涎腺腺泡的基膜,毛细血管床及导管基膜等处被标记。AQP2主要分布在涎腺的基膜和导管。AQP5主要存在于粘液性腺泡的顶膜、基侧膜和浆液性腺泡的基侧膜,以及涎腺的闰管、纹状管,分泌管等处均有较强染色。结论 水通道蛋白亚型AQP1、AQP2、AQP5广泛分布于涎腺中不同组织和腺体不同部位,其布部位和反应强弱有差异,主要存在于涎腺中与唾液分泌密切相关的部位和组织中。

关键词:水通道蛋白;涎腺;免疫组化
中图法分类号:R333.1;R341 文献标识码:A

Localization of water channel proteins in human salivary glands

YANG Jun, XIAO Lin, SUN Yuan, LI Hui-zeng, YANG Yan-chun, ZHANG Cong-ji (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To determine the distribution of various subtypes of water channel protein (aquaporin, AQP) in various structures of different human salivary glands. **Methods** Samples of salivary glands, including parotid gland, submandibular gland, sublingual gland, labial gland, were obtained from injured patients undergoing surgical operations. Samples were cyrosectioned and stained by immunohistochemical method with antibodies against AQP 1 to 5 respectively. **Results** The constant and clear reaction was observed in the salivary gland tissues with the first antibody concentration of 1∶200 for AQP2 and 5, and 1∶100 for AQP1. But the reaction of AQP 3 and 4 were not found at the concentration of 1∶100, even 1∶50. AQP1 was labeled in blood capillary endothelium and basement membrane, and AQP2 in the alveolar basement membrane and secretary duct. AQP5 was mainly distributed in the apical and basolateral membranes of mucous alveoli, in the basement membrane of serous alveoli, and in intercalated, striated and secretary ducts. **Conclusion** AQP 1, 2, and 5 are extensively distributed in various glandular structures and varied salivary glands. Their distribution and reaction degree are different, and mainly located in the structures of salivary glands related to salivary secretion.

Key words: aquaporin; human salivary glands; immunohistochemistry

涎腺水通道蛋白(Water channel protein aquaporin, AQP)研究是近几年研究的热点之一,对于人们认识涎腺水代谢机制及唾液的分泌和水分的吸收具有特别重要的意义,也有助于理解和认识某些疾病(如干燥综合征)唾液的水代谢障碍的发生机制,并为对这类疾病进行基因治疗提供依据。本研究通过免疫组化标记方法研究人类涎腺不同腺体中水通道蛋白不同亚型的分布情况。

1 材料与方法

1.1 组织制备

本研究在征得8位口腔颌面部外伤患者同意后,在清创缝合术的过程中,分别取得腮腺、颌下腺、舌下腺、唇腺组织。取出约米粒大小的涎腺组织,快速以生理盐水洗净血污,立即用4%多聚甲醛固定,12 h后取出标本放入30%的蔗糖溶液,转入4 ℃冰箱过夜待用。

1.2 切片

取出已固定并经30%蔗糖溶液脱水的涎腺组织,进行冷冻切片并记录腺体的部位及来源,切片厚度为6 μm,置于37 ℃烤箱内过夜。

1.3 免疫组化染色

1.3.1 主要试剂 羊抗人AQP1、2、3、4、5抗体,生物素化兔抗羊抗体,过氧化酶链霉菌抗生物素蛋白由美国Santa Cruz公司提供。

1.3.2 免疫组织化学标记 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,再分别加AQP2、AQP5的羊抗人一抗(1∶200),AQP1、AQP3、AQP4为1∶100。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3×5 min。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3×5 min。加DAB液显色2~10 min。水冲洗,1%盐酸酒精脱色,脱水透明,中性树胶封固。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。所有操作步骤都经去脱氧核糖核酸处理,并防止被核糖核酸污染。

2 结果

本研究所选择免疫组化检测的水通道蛋白不同亚型根据市场上所能得到的相关抗体确定的。因此本研究所选择的水通道蛋白亚型包括AQP1、2、3、4、5。AQP2、AQP5为1∶200和AQP1为1∶100的一抗浓度时可以看到它们在腮腺、颌下腺、舌下腺、唇腺

作者简介:杨 军(1962-),男,江苏省淮安市人,硕士,副教授,主要从事口腔面外科方面的研究,发表论文14篇。电话:(023)68754114-73143

收稿日期:2002-03-07;修回日期:2002-06-27

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

有稳定、清晰的染色反应，但 AQP3、AQP4 用 1∶100 乃至 1∶50 也未观察到染色，染色反映情况见表 1。AQP1 在各涎腺腺泡的基膜、毛细血管内皮、导管基膜等处被标记，见图 1。AQP2 主要分布在涎腺腺泡的基膜和分泌管，见图 2。AQP5 主要存在于粘液性腺泡的顶膜、基侧膜和浆液性腺泡的基侧膜，以及涎腺的闰管、纹状管，分泌管等处均有较强染色，见图 3。



图 1 **AQP1** 在涎腺腺体毛细血管内皮、腺泡基侧膜、导管基膜有表达 （ABC× 400）

Fig 1 Expression of AQP1 in the salivary microvascular endothelium, basolateral membrance of acinar cells and basement membrane of salivary duct in salivary gland （ABC× 400）



图 2 **AQP2** 在涎腺腺泡基侧膜及导管有表达 （ABC× 400）

Fig 2 Expression of AQP2 in the basolateral membrances of acinar cells and salivary ducts in salivary gland （ABC× 400）

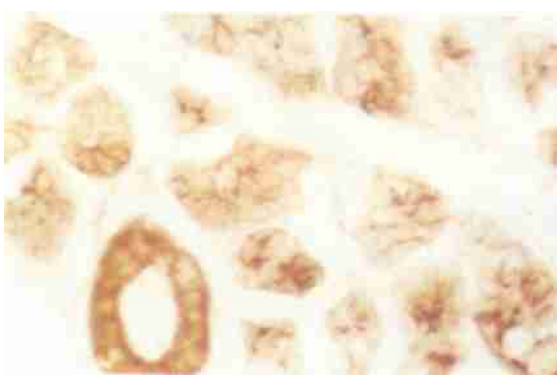


图 3 **AQP5** 在涎腺腺泡顶膜、基侧膜、涎腺闰管、分泌管、导管有表达 （S-P× 400）

Fig 3 AQP5 expression in the apical membrances basolateral membrances of acinar cells, intercalary duct, secretory duct and salivary duct in salivary gland （S-P× 400）

表 1 不同水通道蛋白亚型在涎腺不同腺体的免疫组化标记反应

Tab 1 Immunohistochemical reaction of various subtypes of AQP in various salivary glands

Salivary gland	AQP1	AQP2	AQP3	AQP4	AQP5
Parotid gland	+	+	−	−	+
Submandibular gland	+	+	−	−	++
Sublingual gland	+	+	−	−	++
Labial gland	+	+	−	−	+

3 讨论

早在十几年前人们对水通道蛋白就有所认识，但在水转运中的作用尤其是涎腺水通道蛋白在唾液的分泌过程中的认识，只是在近年的研究中才得以发现。迄今已发现 10 种水通道蛋白亚型，其分别在不同组织结构中起重要作用[1]。这些水通道蛋白具有快速和选择性促进水的穿膜运动（Transmembrane movement），达到渗透梯度（Osmotic gradient）[2]。涎腺的腺泡是唾液分泌的主要场所，水通道蛋白在分泌过程中的具体作用还不太清楚，Gresz 等[3] 研究了 AQP1 在人类唇腺中的表达，并用从胰腺癌组织中分离出来的分泌细胞作为对照。反转录聚合酶联反应（RT-PCR）结果表明在腮腺、舌下腺和唇腺中能清楚地探查到人 AQP1 的表达，DNA 序列测定证实 PCR 产物与人胰腺肿瘤组织中的 AQP1 有同源性，RNA 印迹杂交（Northern blot）显示在上述腺体中 AQP1 有较高水平的表达，人胰腺肿瘤组织中 AQP1mRNA 的存在提示 AQP1 是表达在胰腺的非分泌性部位（毛细血管内皮）。上述腺体高表达 AQP1mRNA 表明 AQP1 可能除毛细血管内皮外也表达于腺实质细胞，我们在本实验中免疫组化染色也证实 AQP1 不只限于毛细血管，腺泡部位也有清晰的抗体标记。相信随着免疫组化的精确定位，有可能证明 AQP1 在唾液分泌中所发挥的重要作用。

本实验显示 AQP2 在涎腺中也有分布，这结果尚未见有文献报道。水通道蛋白 AQP2 是一选择性内在膜蛋白，属主体内在蛋白家族成员。AQP2 在大鼠肾脏有表达，仅存在于肾脏集合管；AQP2 位于集合管主细胞管腔侧和细胞囊胞内，在尿浓缩机制中可能起重要作用。现已证实 AQP2 是血管加压素 AVP 依赖性水通道，它与主细胞基底侧 V2 受体结合后通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶，使细胞内 cAMP 水平升高，促使囊胞膜以出胞方式和管腔膜融合，AQP2 分子插入管腔膜，水通道开放；AVP 撤出后管腔膜以胞饮方式回至膜下胞质区域，水通道关闭。AVP 通过“穿梭机制”使细胞内 AQP2 发生重新分布致使管腔膜上活性 AQP2 增多，此为 AQP2 短时调节，即 AQP2 对 AVP 的急性反应；长期脱水，AQP2 mRNA 合成增多，蛋白表达增强，为 AQP2 长时调节[4]。

Ishikwa 等[5] 的实验研究表明 AQP5 广泛分布在涎腺组织中，在粘液性腺泡的分布较浆液性腺泡丰富。本实验结果也证实，AQP5 在颌下腺及舌下腺的表达较

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

腮腺丰富。腮腺是浆液性腺泡细胞构成，舌下腺是粘液性腺泡细胞构成，而颌下腺是混合性腺体。Ma 等[6]在实验中发现，剔除涎腺 AQP5 基因的大鼠经毛果云香碱刺激后其唾液分泌量减少 60%以上，说明 AQP5 在涎腺液体分泌中起着重要作用。

水的跨膜转运对维持细胞正常代谢具有重要作用。细胞对水的通透性依不同的组织而有很大的不同[7]。AQP1、2、3、4、5 在涎腺不同腺体组织中是否反应或反应强弱存在差异，而且在各腺体分布部位也有差异。但无论是颌下腺，还是唇腺，它们的反应主要集中在与唾液分泌密切相关的部位。这是否意味着在涎腺的分泌和吸收中有更多的水通道蛋白亚型的参与，其表达的强弱差异的原因是因为对渗透调节可能需要特定的水通道蛋白的亚型[2]，但每一种水通道蛋白的调节可能是单一的[8]。涎腺 AQP 的研究起步较晚，其转运确切机制，尤其是 AQP 的调节机制尚不完全明了。加之，涎腺组织的生理状态、局部血管活性物质以及研究手段，都可能影响结果。尽管在涎腺中已检测到具有重要水代谢调节功能的水通道蛋白，但这些水通道蛋白的亚型在涎腺不同腺体组织唾液分泌中起何种作用及如何起作用尚需深入研究。

参考文献：

[1] Dean P M, van Os C H. Epithelial aquaporins[J]. Curr Opin Cell Biol. 1998, 10(4): 435—442.
[2] Beitz E, Kumagami H, Krippeit-Drews P, *et al*. Expression pattern of aquaporin water channels in the inner ear of the rat: the molecular basis for a water regulation system in the endolymphatic sac[J]. Hear Res, 1999, 132(2): 76—84.
[3] Gresz V, Burghardt B, Ferguson C J, *et al*. Expression of aquaporin 1 water channels in human labial salivary glands[J]. Arch Oral Biol, 1999, 44(Suppl 1): s53—s57.
[4] Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, *et al*. Regulation and localization of two type water channel in rat kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 1992, 2(3): 798.
[5] Ishikwa Y, Ishida H. Aquaporin water channel in salivary glands[J]. Jpn J Pharmacol, 2000, 83(2): 95—101.
[6] 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): 20 071— 20 074.
[7] 王蔚东，杨宝学，赵雪伶. 水通道蛋白家族成员-AQP1 研究进展[J]. 1998, 18(11): 1—3.
[8] Fushimi K, Uchida S, Hara Y, *et al*. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule[J]. Nature, 1993, 361(6 412): 549— 552.

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2002)08-0969-01

个案与短篇

100 例宫外孕 B 超图像资料分析

Analysis on the ultrasonogram of 100 cases of extrauterine pregnancy

周木兰，高新茹，郭凤贤，穆世刚　　（陕西省妇幼保健院 B 超室，西安 710003）

通过分析宫外孕患者各孕龄段附件包块的大小及性质特点，可以提高超声对宫外孕诊断的准确性，减少漏诊率。

1　资料与方法

1999—2001 年经我院超声诊断，并经手术、病理确诊为宫外孕的病例 100 例。患者平素月经规律，平均年龄 34 岁。停经 30～40 d 者 9 例，停经 41～77 d 者 91 例。本研究对各孕龄段附件包块的大小及性质特点进行分析。

使用仪器为 Acuson 128XP 彩色超声诊断仪，凸阵探头，频率 3.5 MHz。被检者取仰卧位，充盈膀胱，作盆腔扫查。

2　结果

停经 30～40 d 组，共 9 例，超声检查宫内均未见孕囊，附件区包块最大径在 2.5～3.5 cm 之间者 6 例，＞3.5 cm 者 3 例，附件包块边界较清晰，形态较规则。为低或混合回声。

停经 41～77 d 组，共 91 例，超声检查宫内均未见孕囊，有症状侧附件区均有包块。孕 41～50 d 者 33 例，包块最大径在 4～5 cm 之间者占 66.7%；孕 51～60 d 者 29 例，93%的包块最大径＞4 cm；孕 60 d 以上者 29 例，96.5%包块最大径≥5 cm。包块多为混合性，无包膜，边界不清晰，形态不规则，多位于附件区偏上方或包绕子宫后方。有 3 例包块大小在 3.0～3.7 cm 之间，分别为 1 例宫角妊娠未破裂，2 例输卵管壶腹部妊娠未破裂，包块内可见妊娠囊，囊内可见胎芽或胎体，并见胎心搏动。84 例伴有盆腔或/和腹腔积液，占 92.3%。

本研究 100 例患者均有不同程度的子宫增大，其中 58 例宫内膜厚度＞1.0 cm，13 例宫内少量积血似假孕囊样改变，29 例宫内膜厚度≤1.0 cm。

3　讨论

宫外孕是受精卵在子宫腔以外的地方着床发育。90%发生于输卵管[1]。由于输卵管粘膜不能形成完整的蜕膜层，且输卵管管腔狭小，管壁薄，缺乏粘膜下组织，不能适应胚胎的生长发育，当膨大到一定限度时会发生破裂或流产[2]。

停经 30～40 d 时，孕囊尚小，输卵管肌层尚能抵挡住胚胎绒毛的侵蚀，未发生破裂或流产。超声看到的包块是妊娠段输

（下转 971 页）

作者简介：周木兰(1947—)，女，陕西省西安市人，副主任医师，主要从事妇产科及腹部超声方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(029)7234874

收稿日期：2001-12-30；修回日期：2002-04-12

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