

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00126

## 哮喘小鼠肺组织水通道蛋白5的表达及地塞米松对其的调节

董春玲<sup>1,2</sup>, 鲁继荣<sup>2</sup>, 王桂芳<sup>1</sup>, 李波<sup>1</sup>, 肖奎<sup>1</sup>, 陈智鸿<sup>1</sup>, 白春学<sup>1\*</sup>

1. 复旦大学附属中山医院呼吸内科, 上海 200032
2. 吉林大学第一医院儿科, 长春 130021

**[摘要]** **目的:**探讨支气管哮喘(哮喘)小鼠肺组织中水通道蛋白5(aquaporin 5, AQP5)和黏蛋白5AC(MUC5AC)的变化及地塞米松对其的调节作用。**方法:**雌性C57BL/6小鼠48只,随机分为对照组、哮喘组和地塞米松干预组,每组16只。测定各组小鼠肺组织病理变化及湿/干质量比值,应用实时定量PCR法测定其肺组织中AQP5和MUC5AC mRNA的表达,应用免疫组化法测定各组AQP5蛋白在肺组织中的分布,免疫印迹法测定AQP5蛋白在肺组织中的表达。ELISA法测定各组支气管肺泡灌洗液中MUC5AC的含量。**结果:**哮喘组小鼠肺组织中AQP5表达较对照组明显降低[mRNA减少(42.5±3.6)%,蛋白质减少(64.3±8.2)%]。而MUC5AC表达显著升高[mRNA升高(93.3±8.1)%;蛋白质水平升高(98.3±7.2)%]。地塞米松分别负调节其表达(与模型组比较 $P<0.05$ )。**结论:**哮喘小鼠肺组织中AQP5表达明显降低可能与气道MUC5AC表达的升高有关,地塞米松对其显著负调节从而改善气道黏液高分泌、炎性浸润和肺水渗出的病理生理过程。

**[关键词]** 哮喘;水通道蛋白5;黏蛋白类;地塞米松

**[中图分类号]** R 562.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0126-05

### Expression of aquaporin 5 in pulmonary tissues of bronchial asthmatic mice and influence of dexamethasone on the expression

DONG Chun-ling<sup>1,2</sup>, LU Ji-rong<sup>2</sup>, WANG Gui-fang<sup>1</sup>, LI Bo<sup>1</sup>, XIAO Kui<sup>1</sup>, CHEN Zhi-hong<sup>1</sup>, BAI Chun-xue<sup>1\*</sup>

1. Department of Respiratory Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China
2. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Jilin University, Changchun 130021

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the expression of aquaporin 5 (AQP5) and MUC5AC in lung of bronchial asthmatic murine model and the regulatory effect of dexamethasone on the expression. **Methods:** Forty-eight female C57BL/6 mice were evenly randomized into control group, asthma group and dexamethasone group. The pathological changes of the lungs and the wet/dry weight ratios of the lungs were determined in mice of each group. The expression of AQP5 and MUC5AC mRNA in the lung was determined by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR); the AQP5 protein was examined by Western blotting assay; the distribution of AQP5 protein in the pulmonary tissue was studied immunohistochemically; and the content of MUC5AC in the bronchial alveolar lavage fluid (BALF) was determined by ELISA. **Results:** Compared with the control group, the pulmonary expression of AQP5 in asthma group was obviously decreased (mRNA by [42.5±3.6]%, protein by [64.3±8.2]%), while the expression of MUC5AC was increased (mRNA by [93.3±8.1]%, protein by [98.3±7.2]%). Dexamethasone significantly decreased the pulmonary expression of AQP5 and MUC5AC compared with the asthma group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The decreased pulmonary expression of AQP5 in asthmatic mice might be related to the elevation of MUC5AC expression in the airway; dexamethasone can decrease AQP5 expression and therefore alleviate the overproduction of airway mucus, pulmonary inflammation and lung edema.

**[KEY WORDS]** asthma; aquaporin 5; mucins; dexamethasone

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2): 126-130]

哮喘是全球最常见的慢性呼吸道疾病之一,以 气道炎症、气道高反应性、黏液高分泌和气道重塑为

**[收稿日期]** 2007-10-19 **[接受日期]** 2007-11-24

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30370611);上海市重点学科建设项目(B115). Supported by National Natural Science Foundation of China (30370611) and Key Subject of Shanghai Municipal Government(B115).

**[作者简介]** 董春玲, 博士生, 医师.

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-64041990-3077, E-mail: cxbai@zshospital.com

特征,而气道腔被黏液栓阻塞是一个重要的致死因素<sup>[1]</sup>。现在对哮喘黏液高分泌的治疗聚焦在雾化盐水稀释DNA分裂酶来减少痰的黏稠度,激动剂刺激纤毛活化等<sup>[2]</sup>。近年来研究表明该类疾病的急性发作期或晚期阶段的黏液滞留,除黏蛋白(黏液中决定黏弹性的蛋白)的绝对量增多外,还与黏蛋白/水盐比例失衡有关<sup>[1-2]</sup>。而参与肺水转运过程中一个重要的蛋白为水通道蛋白(aquaporin, AQP)。

自从20世纪末Agre克隆并鉴定了水通道蛋白1以来<sup>[3]</sup>,人们已经发现13种AQP表达于哺乳细胞中,有6种表达于肺<sup>[4]</sup>,在肺水转运过程中起到不可低估的作用,其中以AQP5表达为最多。AQP5广泛分布于肺泡I型上皮细胞的腔顶面,还位于鼻咽和呼吸道黏膜下腺上皮细胞腔顶面及气道上皮细胞腔膜面。有关AQP在肺各种病理生理状态下作用的研究有诸多进展,但是AQP5在哮喘发生发展中作用的相关研究还未见报道。

既往研究表明MUC5AC(黏蛋白5AC)的高表达在哮喘小鼠杯状细胞组织变形发展过程中是重要标志<sup>[2]</sup>。本研究就哮喘小鼠模型肺组织中AQP5和MUC5AC mRNA和蛋白水平的变化研究其相关性,并加用糖皮质激素干预,进一步阐明AQP5对黏液高分泌的可能作用及糖皮质激素治疗支气管哮喘的相关机制。

## 1 材料和方法

1.1 小鼠哮喘模型制作与分组 6~8周龄清洁级雌性C57BL/6小鼠48只(购自复旦大学上海医学院动物部),体质量18~20 g,随机分为对照组(control组)、哮喘组(OVA组)和地塞米松干预组(Dex组),每组16只。哮喘模型的制作参照文献方法<sup>[5]</sup>进行,即小鼠在第0天和第14天分别腹腔注射0.2 ml含20 μg卵蛋白(OVA, V级, Sigma公司)及2.25 mg氢氧化铝凝胶的PBS溶液进行致敏,然后在第25~29天以1%OVA的PBS溶液(1 g OVA/100 ml 1×PBS)分别雾化吸入进行激发,每天1次,每次30 min;地塞米松干预组于激发前30 min予地塞米松1.0 mg/kg腹腔注射,余同哮喘组;对照组以PBS溶液代替OVA致敏和雾化吸入激发。

1.2 肺组织处理 小鼠于末次激发24 h后腹腔注射1%戊巴比妥钠0.1 ml麻醉、固定,每组取8只,暴露胸腔,结扎右肺,切除后上中叶迅速放入-80℃冰箱用作real-time PCR和蛋白质测定;下叶称湿质量后放入56℃恒温箱烤干,72 h后(至衡质量)称干质量,计算湿/干质量比值;然后将一导管插入气管,手术线

结扎,以距水平15 cm高度重力作用沿导管注入4%多聚甲醛使左肺充盈,拔除导管,同时结扎气管离体后再浸入4%多聚甲醛中固定24 h。备用于病理切片及免疫组化。每组的另8只行支气管肺泡灌洗,无需开胸,直接气管插管,用1 ml注射器取生理盐水1 ml经气管套管冲洗双侧支气管肺泡,反复注入回吸3次后回抽液体,如此重复3次,回收得支气管肺泡灌洗液(BALF)约2.7 ml。混匀BALF,离心,留上清于-80℃,用作MUC5AC测定。

### 1.3 实验方法

1.3.1 病理切片及染色 固定于4%多聚甲醛的肺组织,常规脱水,石蜡包埋,切片(厚度为5 μm)。H-E染色,以观察炎症细胞浸润。常规AB-PAS染色,观察气道黏膜杯状细胞数量以及管内黏液分泌。AB-PAS染色步骤为:切片用蒸馏水脱蜡,1%过碘酸水溶液氧化10 min,蒸馏水洗3次,AB-PAS液染色10 min。流水冲洗5 min,苏木精染色1~2 min,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。各组切片取同一级支气管水平进行病理评分,具体方法参照文献<sup>[6]</sup>。

1.3.2 ELISA测定BALF上清中MUC5AC的含量 按照试剂盒(购于武汉中美科技有限公司)说明书步骤进行测定。

1.3.3 免疫组化法检测肺组织AQP5分布及变化 采用SP法,切片经常规脱蜡、水化后,用3%过氧化氢去除内源性氧化酶,微波抗原修复,余步骤按试剂盒说明书进行。用已知阳性片作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照,抗AQP5抗体购自Chemicom公司,SP试剂盒和DAB显色试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。AQP5抗体稀释浓度为1:400。细胞胞质呈棕黄色着色者为阳性表达细胞。

1.3.4 实时定量PCR检测肺组织AQP5和MUC5AC mRNA表达 采用TRIzol试剂(购自Invitrogen公司)参照说明书提取各组小鼠的肺组织总RNA,取2 μg RNA逆转录(逆转录酶购自Promega公司)合成cDNA,其中2 μl cDNA为模板扩增,SYBR Green购自ABI公司,real time-PCR仪为ABI PRISM 7900,肌动蛋白β-actin为内参照,并设阴性对照。反应条件相同。引物序列:β-actin,上游5'-ACG GCC AGG TCA TCA CTA TTG-3',下游5'-GGA TGC CAC AGG ATT CCA T -3' (产物93 bp); MUC5AC,上游5'-TGT TCT ATG AGG GCT GCG TCT-3',下游5'-ATG TCG TGG GAC GCA CAG A -3' (产物102 bp); AQP5,上游5'-GCG CTC AGC AAC AAC ACA AC -3',下游5'-GTG TGA CCG

ACA AGC CAA TG-3'(产物 149 bp)。

1.3.5 免疫印迹分析 AQP5 蛋白的表达 常规提取肺组织蛋白质,BCA法定量,取 50 μg 样品加入等体积的 2×SDS-PAGE 样品缓冲液,沸水煮 5 min,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。其后转移至 PVDF 膜,按免疫印迹试剂盒(购于康成生物公司)说明步骤操作。暗室曝光、显影后用凝胶成像机测灰度,取均值。

1.4 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 11.0 软件,对两组间均数进行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 哮喘模型的建立

2.1.1 病理切片嗜酸粒细胞(EOS)浸润 哮喘组小鼠气道和血管周围有大量的嗜酸粒细胞浸润,较对照组明显增多(图 1A、1B);地塞米松干预组较哮喘组则明显减轻,但仍比对照组增多(图 1C)。每张切片选 5 视野计数评分 EOS 浸润程度,计算每组平均数和标准差,比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 1D)。

2.1.2 气道上皮杯状细胞增生 哮喘组小鼠气道上皮有大量杯状细胞增生,AB-PAS 染色胞质呈紫红色(图 1E、1F);地塞米松干预组较哮喘组则明显减轻,但仍比对照组增多(图 1G)。每张切片观察 5 个气道,杯状细胞与气道上皮细胞数量比例进行评分,各组比较有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 1H)。

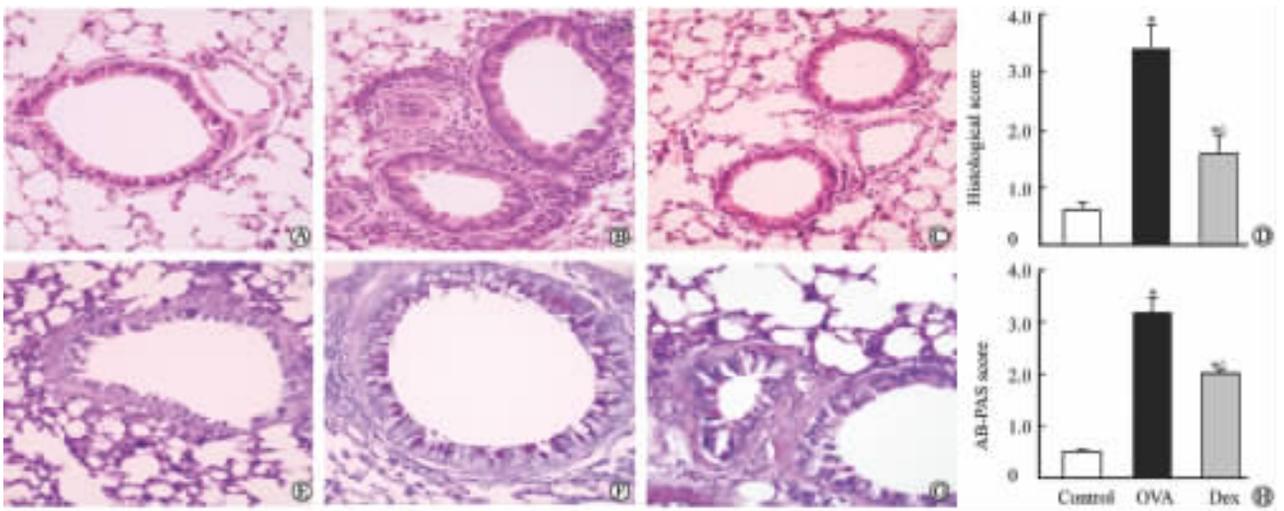


图 1 小鼠肺病理切片 H-E 染色(A-D)和 AB-PAS(E-H)染色结果

Fig 1 H-E(A-D) and AB-PAS(E-H) staining of lung sections of mice

A,E:Control group(original magnification:×400); B,F:OVA group(original magnification:×400); C,G:Dex group(original magnification:×400);D:Histological score of EOS( $n=8,\bar{x} \pm s$ );H:AB-PAS score ( $n=8,\bar{x} \pm s$ ); \*  $P < 0.05$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  vs OVA group

2.2 AQP5 在肺组织中的表达变化 实时定量 PCR 结果表明,与对照组相比,AQP5 在哮喘组小鼠肺组织中的表达 mRNA 水平减少( $42.5 \pm 3.6$ )% ( $P < 0.05$ ),免疫组化(图 2A-2C)结果表明,表达在气道上皮细胞和 I 型肺泡上皮细胞的 AQP5 的减少

为均一分布的,并不是单纯发生在炎症反应重、上皮细胞脱落多的地方;免疫印迹分析(图 2D)结果表明,AQP5 蛋白质水平比对照组降低了( $64.3 \pm 8.2$ )% ( $P < 0.05$ )。



图 2 免疫组化(A-C,×400)和免疫印迹(D)检测小鼠肺组织 AQP5 的表达

Fig 2 Pulmonary expression of AQP5 in mice as detected by immunohistochemistry method (A-C,original magnification:×400) and Western blotting(D)

A:Control group; B:OVA group; C:Dex group;D:Western blotting of AQP5

2.3 肺组织及 BALF 中 MUC5AC 含量 哮喘组肺组织 MUC5AC mRNA 和 BALF 中 MUC5AC 蛋白均明显升高,与对照组相比有显著统计学意义 ( $P < 0.05$ );地塞米松干预组两者与哮喘组比显著减少 ( $P < 0.05$ ),但仍比对照组增多 ( $P < 0.05$ ),见图 3。

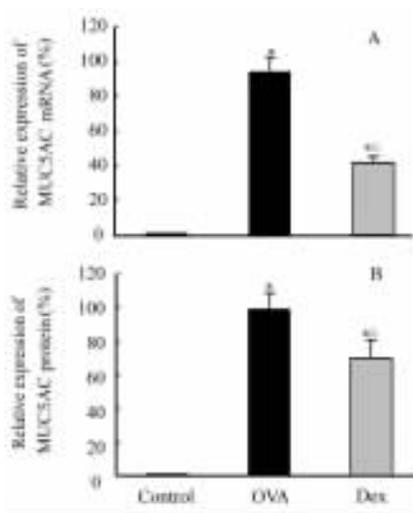


图 3 小鼠肺组织 MUC5AC mRNA(A)和 BALF 中 MUC5AC 蛋白(B)的表达

Fig 3 Pulmonary expression of MUC5AC mRNA(A) and MUC5AC protein content in BALF(B) of mice

\*  $P < 0.05$  vs control;  $\triangle P < 0.05$  vs OVA group;  $n = 8, \bar{x} \pm s$

2.4 肺组织湿/干质量比值 肺湿/干质量比值用来评估肺水肿或肺水失衡。哮喘组肺组织的湿/干质量比值比对照组明显增高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );地塞米松干预组肺组织的湿/干质量比值较哮喘组显著降低 ( $P < 0.05$ ),且与对照组无明显差异,见图 4。

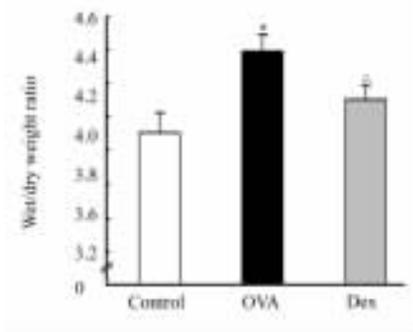


图 4 小鼠肺组织湿/干质量比值的变化

Fig 4 Wet/dry weight ratio of lung of mice in different groups

\*  $P < 0.05$  vs control;  $\triangle P < 0.05$  vs OVA group;  $n = 8, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

本研究为了阐明 AQP5 对黏液高分泌的可能作用及糖皮质激素治疗支气管哮喘的相关机制,首先建立了小鼠哮喘模型,依病理、AB-PAS 染色及肺组织湿/干质量比值证实了卵蛋白的反复刺激成功诱发特征性哮喘,其主要的变化包括黏液高分泌和过敏性炎症以及肺水增多的发生,应用地塞米松后以上的病理改变都有明显的改善。在此模型的基础上,本研究发现哮喘组小鼠肺组织中 AQP5 mRNA、蛋白水平表达均降低,与国外研究的腺病毒感染模型<sup>[7]</sup>或博来霉素肺损伤模型<sup>[8]</sup>引起的 AQP5 降低结果相似。分析其原因可能为哮喘时气道分泌炎症介质、细胞因子及过敏性炎症导致气道损伤,引起上皮细胞的脱落和破坏,导致 AQP5 的降低而进一步加重哮喘的病程。而从免疫组化结果看,表达在气道上皮细胞和 I 型肺泡上皮细胞的 AQP5 的减少为均一分布的,并不是单纯发生在炎症反应重、上皮细胞脱落多的地方,因此单纯用上皮细胞的损伤还不能完全解释 AQP5 的减少,提示可能为更复杂的信号通路通过影响肺上皮细胞中 AQP5 基因表达和亚细胞移位来干预其介导的膜水通透<sup>[9]</sup>。已有研究结果表明全反式维甲酸可增加小鼠肺上皮细胞 AQP5 mRNA 和蛋白的表达<sup>[10]</sup>,导致膜水通透性的增加。相反,前炎症 TNF- $\alpha$  因子<sup>[8]</sup>可降低 AQP5 基因的表达。另外,cAMP 和肾上腺激动剂可调节 AQP5 亚细胞定位发挥作用。Sidhaye 等<sup>[11]</sup>观察到细胞表面 AQP5 经过短期 cAMP 暴露发生细胞内摄作用,经过长期 cAMP 暴露可增加其在胞质膜定位。本实验进一步证明地塞米松对支气管哮喘时肺组织内 AQP5 表达有升高调节作用,且升高的 AQP5 表达是均一的,没有明显区域性,提示地塞米松可能通过作用于以上细胞因子或 cAMP 等发挥作用。

迄今为止黏液高分泌的发病机制尚未完全明确,激素吸入仍是以炎症和黏蛋白高分泌为特征性表现的气道炎症患者的首选治疗方法<sup>[12]</sup>,所以了解激素在暴露于炎症或免疫反应介质时怎样调节黏蛋白基因表达是非常重要的。本研究发现肺组织中 AQP5 表达降低的同时,气道黏液高分泌特征性表现——MUC5AC 生成明显增多,此结果与我们研究小组<sup>[13-14]</sup>既往用 RNAi 技术下调气道上皮细胞 AQP5 的表达后发现其 MUC5AC 表达水平显著升高的研究结果一致。随着地塞米松的干预上调 AQP5 的表达后,MUC5AC 水平也相应降低,进一

步在体内证明 AQP5 表达的变化参与了哮喘过程中 MUC5AC 的生成过程,也为地塞米松抑制 MUC5AC 的作用机制提供了新的依据及其可能的作用途径。

此外,早期发现敲除小鼠 AQP5 会导致远端肺肺泡-毛细血管屏障渗透性水弥散能力降低 10 倍<sup>[15]</sup>,提示 AQP5 在保持正常肺水平衡中发挥重要作用,并且细胞表面 AQP 数量和(或)功能的变化可能有助于不同肺疾病中异常水代谢。本研究发现,哮喘小鼠肺湿/干质量比值明显增加,并且与 AQP5 的表达密切相关,地塞米松可有效改善哮喘小鼠肺水的增多,进而证实了 AQP5 降低导致了哮喘时肺水在毛细血管与肺泡间转运失衡,地塞米松有可能通过提高 AQP5 以加快肺泡内液体的清除来减轻肺组织的水肿程度,从而发挥其减轻哮喘炎症的作用。当然我们也不能完全除外 AQP5 的降低继发于哮喘炎症的可能。而两者孰是始动因素,目前尚不得而知。

总之,AQP5 可能在哮喘状态发挥了重要作用。至于是否肺水的增多促进黏蛋白的生成释放或是黏蛋白的增多有益于肺水的形成,其因果关系尚不明。进一步研究地塞米松对 AQP5 的具体作用机制及 AQP5 与 MUC5AC 的相关性极为重要,期望其可为治疗哮喘肺水增多和气道黏液高分泌提供新的靶点。

#### [参考文献]

- [1] Rose M C, Voynow J A. Mucin genes and glycoproteins[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86: 245-278.
- [2] Williams O W, Sharafkhaneh A, Kim V, Dickey B F, Evans C M. Airway mucus from production to secretion[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34: 527-536.
- [3] Preston G M, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons; member of an ancient channel family[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 11110-11114.
- [4] Borok Z, Verkman A S. Lung edema clearance: 20 years of progress invited review; role of aquaporin, water channels in fluid transport in lung and airways[J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93: 2199-2206.
- [5] Edwan J H, Talmadge J E, Agrawal D K. Treatment with Flt3 ligand plasmid reverses allergic airway inflammation in ovalbumin-sensitized and -challenged mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5: 345-357.
- [6] Duan W, Aguinaldo Datiles A M, Leung B P, Vlahos C J, Wong W S. An anti-inflammatory role for a phosphoinositide 3-kinase inhibitor LY294002 in a mouse asthma model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5: 495-502.
- [7] Towne J E, Harrod K S, Krane C M, Menon A G. Decreased expression of Aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22: 34-44.
- [8] Gabazza E C, Kasper M, Ohta K, Keane M, D' Alessandro-Gabazza C, Fujimoto H, et al. Decreased expression of aquaporin-5 in bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse[J]. *Pathol Int*, 2004, 54: 774-780.
- [9] Nagai K, Watanabe M, Seto M, Hisatsune A, Miyata T, Isohama Y. Nitric oxide decreases cell surface expression of aquaporin-5 and membrane water permeability in lung epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354: 579-584.
- [10] Nomura J, Horie I, Seto M, Nagai K, Hisatsune A, Miyata T, et al. All-trans retinoic acid increases expression of aquaporin-5 and plasma membrane water permeability *via* transactivation of Sp1 in mouse lung epithelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 1048-1053.
- [11] Sidhaye V, Hoffert J D, King L S. cAMP has distinct acute and chronic effects on aquaporin-5 in lung epithelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 35903-596.
- [12] Chen Y, Nickola T J, DiFronzo N L, Colberg-Poley A M, Rose M C. Dexamethasone-mediated repression of MUC5AC gene expression in human lung epithelial cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34: 338-347.
- [13] Chen Z, Zhu R, Bai L, Bai C. Downregulation of aquaporin 5 induced by vector-based short hairpin RNA and its effect on MUC5AC gene expression in human airway submucosal gland cells[J]. *Resp Physiol Neurobiol*, 2006, 152: 197-203.
- [14] Chen Z, Wang X, Gao L, Bai L, Zhu R, Bai C. Regulation of MUC5AC mucin secretion by depletion of AQP5 in SPC-A1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342: 775-781.
- [15] Song Y L, Verkman A S. Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands[J]. *J Bio Chem*, 2001, 276: 41288-41292.

[本文编辑] 孙岩