

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00131

水通道蛋白 1、3、4、5 在内毒素性急性肺损伤小鼠肺组织中的表达

李波^{1,2}, 陈东², 王桂芳¹, 董春玲¹, 王向东^{1*}, 白春学^{1*}

1. 复旦大学附属中山医院呼吸内科, 上海 200032

2. 吉林大学基础医学院组织学与胚胎学教研室, 长春 130021

[摘要] **目的:** 研究脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)小鼠肺组织中水通道蛋白(AQP)1、3、4、5的表达变化, 探讨水通道蛋白1、3、4、5表达与急性肺损伤的关系。 **方法:** 40只健康雄性的C57BL/6小鼠随机分为LPS 4 h组、LPS 6 h组、LPS 8 h组、LPS 10 h组(以LPS诱导ALI模型)和对照组, 每组8只。采用实时定量PCR测定小鼠AQP-1、AQP-3、AQP-4和AQP-5 mRNA表达, 免疫组化和Western印迹法观察AQP-1、AQP-3、AQP-4和AQP-5蛋白表达, 同时进行肺湿/干重比值测定以及肺组织病理染色。 **结果:** LPS 4 h、6 h、8 h、10 h组肺湿/干重比值(4.39 ± 0.19 、 4.58 ± 0.17 、 4.87 ± 0.21 、 5.28 ± 0.16)明显高于对照组(3.99 ± 0.25 , $P < 0.05$)。LPS灌注后4 h AQP-1蛋白量减少至对照组的(74.1 ± 5.2)%, AQP-5降至对照组的(70.3 ± 7.1)%; LPS灌注后8 h AQP-1蛋白量减少至对照组的(45.2 ± 4.4)%, AQP-5降至对照组的(38.6 ± 8.9)%。AQP-3和AQP-4的表达没有明显变化。 **结论:** AQP-1和AQP-5可能参与ALI液体的异常转运, 可能与肺水肿的发病机制有关。AQP-3和AQP-4可能不参与ALI肺水肿的形成过程。

[关键词] 急性肺损伤; 肺水肿; 水通道蛋白; 脂多糖

[中图分类号] R 563

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)02-0131-05

Expression of AQP-1, AQP-3, AQP-4 and AQP-5 in pulmonary tissues of mice with endotoxin-induced acute lung injury

LI Bo^{1,2}, CHEN Dong², WANG Gui-fang¹, DONG Chun-ling¹, WANG Xiang-dong^{1*}, BAI Chun-xue^{1*}

1. Department of Respiratory Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021

[ABSTRACT] **Objective:** To study the expression of AQP-1, AQP-3, AQP-4 and AQP-5 in the pulmonary tissues of mice with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) and to clarify the relationship of ALI with the expression of AQP-1, AQP-3, AQP-4 and AQP-5. **Methods:** Forty healthy male C57BL/6 mice were evenly randomized into 5 groups: LPS 4 h group, LPS 6 h group, LPS 8 h group, LPS 10 h group and control group. ALI model was induced with LPS in all the LPS groups. Real-time PCR was used to observe the expression changes of AQP-1, AQP-3, AQP-4 and AQP-5 mRNA. Immunohistochemical method and Western blotting assay were used to determine the changes of AQP-1, AQP-3, AQP-4 and AQP-5 protein in the pulmonary tissues of all the animals. Meanwhile, measurement of lung wet/dry (W/D) weight ratio and pathological staining were performed in each group. **Results:** The W/D values of the LPS 4 h, 6 h, 8 h and 10 h groups (4.39 ± 0.19 , 4.58 ± 0.17 , 4.87 ± 0.21 and 5.28 ± 0.16 , respectively) were significantly higher than that of the control group (3.99 ± 0.25 , all $P < 0.05$). The expression of AQP-1 and AQP-5 protein in the lung of the LPS 4 h group decreased to (74.1 ± 5.2)% and (70.3 ± 7.1)% that of the control group; the expression of AQP-1 and AQP-5 protein in the lung of the LPS 8 h group decreased to (45.2 ± 4.4)% and (38.6 ± 8.9)% that of the control group, and the expression of AQP-3 and AQP-4 had no obvious changes. **Conclusion:** AQP-1 and AQP-5 may play important roles in the abnormal ALI fluid transportation and might

[收稿日期] 2007-10-19 **[接受日期]** 2007-12-03

[基金项目] 国家自然科学基金(30370611);上海市科学技术委员会资助项目(LJ06022);上海市重点学科建设项目(B115). Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370611), Foundation of the Science and Technology Committee of Shanghai Municipal Government(LJ06022) and Key Subject of Shanghai Municipal Government(B115).

[作者简介] 李波, 博士生, 讲师.

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 021-64041990-2445, E-mail: xiangdong.wang@telia.com; Tel: 021-64041990-3077, E-mail: exbai@zshospital.com

be associated with the development of pulmonary edema. AQP-3 and AQP-4 may not participate in the development of pulmonary edema during ALI.

[KEY WORDS] acute lung injury; pulmonary edema; aquaporins; lipopolysaccharide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2): 131-135]

急性肺损伤(ALI)是以通透性肺水肿为特征的一种临床综合征,目前其发病机制尚未完全阐明。以往人们普遍认为,肺水肿主要是由于肺微血管内皮细胞(LMECs)受损所致,而对肺组织存在的水通道蛋白(AQPs)在病理生理条件下的作用认识不足。水通道蛋白(AQPs)作为膜主体内在蛋白(major intrinsic protein, MIP)家族成员,具有增加细胞膜水通透力的功能,可以提供快速液体转运的途径。目前为止, AQPs在ALI或肺部炎症中作用的研究主要集中在AQP-1和AQP-5,对于AQP-3和AQP-4的相关研究较少。另外,对于ALI后AQPs在肺组织中的表达增高还是降低,目前仍然有争议;大多数的实验研究表明ALI后AQPs表达下降^[1],但近期Lai等^[2]应用细胞模型发现炎症因子可以促进AQP-1的表达, Jang等^[3]在博来霉素导致的肺损伤中发现AQP-5表达出现上调。为此,本研究主要从基因和蛋白质水平观察内毒素(LPS)致小鼠ALI时AQP-1、AQP-3、AQP-4和AQP-5表达的变化,进而探讨肺生理及病理条件下急性肺水肿与AQPs之间的关系。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 成年雄性C57BL/6小鼠,平均体重20g,由复旦大学上海医学院实验动物中心提供;LPS购自Sigma公司;抗AQP-1、AQP-3、AQP-4和AQP-5抗体购自Chemicon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;TRIzol试剂购自Invitrogen公司;逆转录酶购自Promega公司;SYBR Green购自ABI公司;

免疫印迹试剂盒购于康成生物公司。

1.2 动物模型及分组 40只健康雄性的C57BL/6小鼠随机分为LPS 4h组、LPS 6h组、LPS 8h组、LPS 10h组和对照组,每组8只。LPS各组经气管内滴注脂多糖(LPS) 5mg/kg(溶于生理盐水, 4ml/kg),而后将小鼠直立,垂直旋转小鼠,使药物均匀分布,从而建立内毒素性ALI动物模型,分别于造模后4h、6h、8h和10h收集样本。对照组经气管内滴注生理盐水(4ml/kg)。

1.3 肺湿/干质量比值测定 小鼠眼球放血致死,暴露气管并开胸,观察肺形态。取右肺下叶称湿质量后置于60℃恒温箱,72h后称干质量,计算肺湿/干质量比值。

1.4 肺组织病理形态观察 取左肺经4%多聚甲醛内、外固定后进行脱水、石蜡包埋, 5μm厚切片, H-E染色观察。

1.5 免疫组化法检测肺组织AQP蛋白分布 采用SP法,切片常规脱蜡、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。AQP-1,3,4,5抗体稀释浓度为1:400。细胞胞质呈棕黄色着染者为阳性表达细胞。

1.6 实时定量PCR检测肺组织AQP mRNA表达 取右肺中叶组织,采用TRIzol试剂参照说明书提取总RNA,取2μg RNA逆转录合成cDNA,其中2μl cDNA为模板扩增,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。引物序列见表1。

表1 实时PCR引物序列
Tab 1 Sequences of primers for real-time PCR

| Gene | Forward primer(5'-3') | Reverse primer(5'-3') | Gene No. | Site |
|---------|-------------------------|------------------------|-----------|----------|
| β-actin | ACGCCAGGTCATCACTATTG | TGGATGCCACAGGATTCCAT | X03672 | 811-904 |
| AQP-1 | CTGGCCTTTGGTTTGAGCAT | CCACACACTGGGCGATGAT | NM_007472 | 218-367 |
| AQP-3 | TGGCTTCCTACCATCAACTT | ATAGATGGGCAGCTTGATCCA | NM_016689 | 236-386 |
| AQP-4 | GGTGTGGGATCCA CCATAAACT | CAGTCACAGCGGGAT TGATG | NM_009700 | 208-357 |
| AQP-5 | GCGCTCAGCA ACAAC ACAAC | GTGTGACCGA CAAGC CAATG | NM_009701 | 854-1003 |

1.7 免疫印迹分析AQP蛋白的表达 取右肺上叶组织,常规提取肺组织蛋白质,BCA法定量,取20μg样品加入等体积的2×SDS-PAGE样品缓冲液,

沸水煮5min,进行SDS-PAGE蛋白电泳。其后转移至PVDF膜,按免疫印迹试剂盒说明步骤操作。暗室曝光、显影后用凝胶成像机测灰度,取均值。

1.8 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件对各组数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 肺湿/干质量比值 LPS 4 h、6 h、8 h、10 h 组肺湿/干质量比值 (4.39 ± 0.19 、 4.58 ± 0.17 、 4.87 ± 0.21 、 5.28 ± 0.16) 明显高于对照组 (3.99 ± 0.25 , $P < 0.05$)。

2.2 肺组织大体观察 LPS 损伤各组肺脏均有不同程度的肿胀,表面可见暗红色点状病灶,切面可有淡红或白色泡沫样液体溢出。对照组未见上述改变。

2.3 肺组织 H-E 染色 对照组肺组织结构清晰,间质血管无明显充血,肺泡腔内未见中性粒细胞浸润;LPS 损伤组肺间质增厚,肺泡结构破坏,肺泡腔内炎性细胞浸润和大量均质红染样渗出物(图 1)。

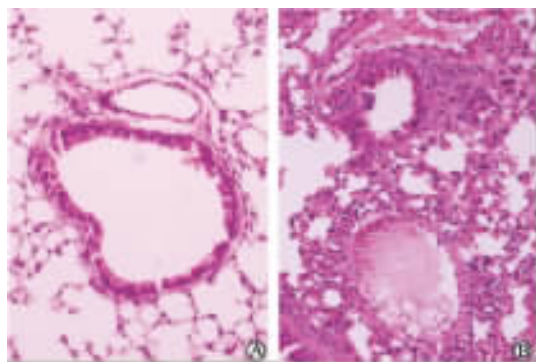


图 1 小鼠肺组织 H-E 染色

Fig 1 H-E staining of murine lung tissues

A; Control group; B; LPS 8 h group. Original magnification: $\times 400$

2.4 肺组织免疫组化染色 对照组正常肺组织表达高水平 AQP-1 蛋白,染色呈棕黄色颗粒,可见在气道周围毛细血管和肺泡毛细血管内皮细胞上呈明显棕黄色分布;LPS 损伤模型组肺组织 AQP-1 蛋白表达显著下降,可见 AQP-1 的染色与对照组相比变浅。对照组正常肺组织表达高水平 AQP-5 蛋白,染色呈棕黄色颗粒,可见在 I 型肺泡上皮细胞的肺泡腔面上呈环状分布;LPS 损伤模型组 AQP-5 蛋白与对照组相比表达显著下降,可见分布区域内染色变浅(图 2)。而 AQP-3 和 AQP-4 的分布位置及表达水平在肺损伤过程中无明显变化。

2.5 肺组织实时定量 PCR 分析 实时定量 PCR 结果表明,LPS 各组肺组织 AQP-1 和 AQP-5 mRNA 水平与对照组相比显著下降,有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 AQP-3 和 AQP-4 的表达没有显著变化。详见图 3。

2.6 Western 印迹分析 AQP 蛋白的表达 结果如图 4 所示。经半定量分析表明,与对照组相比,AQP-1 和 AQP-5 在 LPS 各组小鼠肺组织中的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。LPS 灌注后 4 h AQP-1 蛋白量减少至对照组的 (74.1 ± 5.2)% ($P < 0.05$, $n = 8$),AQP-5 降至对照组的 (70.3 ± 7.1)% ($P < 0.05$, $n = 8$)。LPS 灌注后 8 h AQP-1 蛋白量减少至对照组的 (45.2 ± 4.4)% ($P < 0.05$, $n = 8$),AQP-5 降至对照组的 (38.6 ± 8.9)% ($P < 0.05$, $n = 8$)。AQP-3 和 AQP-4 的蛋白表达没有显著变化。

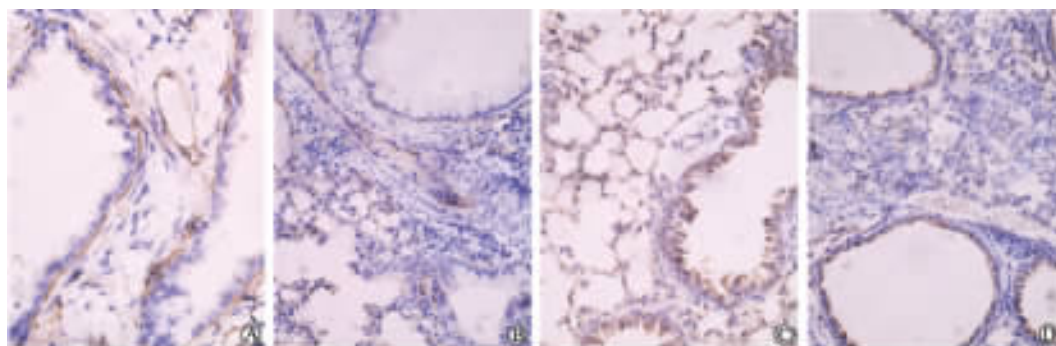


图 2 肺组织免疫组化染色

Fig 2 Immunohistochemical staining of murine lung tissues

A; AQP-1 expression in the control group; B; AQP-1 expression in the LPS 8 h group; C; AQP-5 expression in the control group; D; AQP-5 expression in the LPS 8 h group. Original magnification: $\times 400$

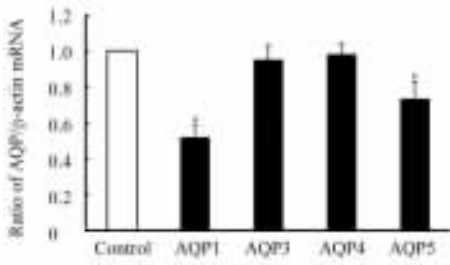


图3 肺组织 AQP mRNA 的实时定量 PCR 分析 (LPS 8 h 组)

Fig 3 Real-time PCR analysis of AQP mRNA expression in lung tissues(LPS 8 h group)

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

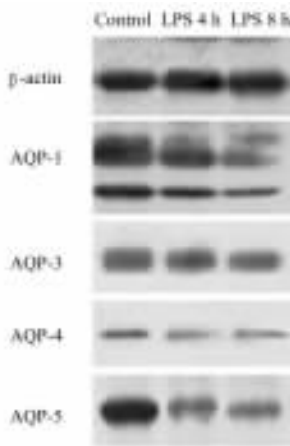


图4 AQP 蛋白的 Western 印迹分析

Fig 4 Western blotting analysis of AQP-1, AQP-3, AQP-4 and AQP-5 protein expression

3 讨论

LPS 所致 ALI 是临床上常见的危重病症,在此过程中,细菌 LPS 直接或间接地影响肺内一些酶(如白细胞弹性蛋白酶、中性粒细胞胶原酶、钠泵等)的活性;改变肺内很多蛋白(如内毒素结合蛋白、表面活性蛋白、水通道蛋白、CC16 等)的表达及含量;LPS 还通过复杂的信号转导从基因表达的水平上发挥其广泛生物毒性作用。LPS 性 ALI 的主要病理特征为肺毛细血管通透性增高性肺水肿(即渗透性肺水肿)^[4]。研究表明,在 LPS 所致 ALI 中,4~12 h 出现明显的肺水肿,12 h 后肺水肿开始逐步减轻^[1]。本研究以 4 h 作为初始时间点,观察 AQP-1、AQP-3、AQP-4 和 AQP-5 在各个时间点的变化,进而探讨 AQP-1、AQP-3、AQP-4 和 AQP-5 与肺水肿发生之间的关系。

AQP-1、AQP-3、AQP-4 和 AQP-5 作为水通道

蛋白家族(AQPs)的主要成员,在肺内液体的吸收及转运方面具有重要的作用^[5-6]。自从 1988 年 Agre 等^[7]发现 AQP-1,目前在哺乳动物中已发现 13 种 AQPs 亚型(AQP0~12),分布于肺组织中的 AQPs 有 6 种(AQP-1、AQP-3、AQP-4、AQP-5、AQP-8、AQP-9)^[8],其中 AQP-1、AQP-3、AQP-4 和 AQP-5 研究较多。AQP-1 主要在气道周围毛细血管、淋巴管及肺泡毛细血管内皮细胞和脏层胸膜间皮细胞上表达;AQP-3 除主要位于气道上皮的基底膜上以外,在小气道的顶膜区上也有表达;AQP-4 主要位于气道上皮的基底膜上;AQP-5 定位于 I 型肺泡上皮细胞的肺泡腔面,气道分泌上皮顶质膜上也有分布^[9]。

AQPs 功能均不受温度和脂质膜成分影响,而且不存在开放和关闭的功能状态,只要有渗透压梯度就有水分子顺渗透压梯度通过水孔通道。AQP-1 主要负责清除支气管和脉管周围组织的内水分^[10],AQP-3 和 AQP-4 的作用主要是清除大小气道内的水分,AQP-5 的作用主要是清除肺泡腔内水分^[11]。实验发现,体外转录合成的 AQP-1 cDNA 转染到爪蟾卵母细胞,可使卵母细胞在低渗溶液中迅速膨胀,并于 5 min 内破裂。在嵌入 AQP-1 后,脂质体的水转运速度也明显加快。Bai 等^[12]还发现,小鼠敲除 AQP-1 基因后,肺泡-毛细血管膜屏障水通透性下降了 10 倍左右。AQP-5 基因敲除小鼠水通透性亦降低了 10 倍,同时敲除 AQP-1 和 AQP-5 基因降低约 25~30 倍^[13],AQP-1、AQP-4 同时敲除小鼠水通透性降低 14~16 倍^[12]。以上实验均说明 AQPs 选择性通透水分子,介导自由水分子跨膜转运,与肺平衡关系密切,同时对于肺水肿的发生也具有重要意义。

本实验结果显示,LPS 灌注后,随着 ALI 模型的建立以及肺水肿程度的加重,AQP-1 和 AQP-5 的表达均降低,且以 8 h 结果最为明显,但 AQP-3 和 AQP-4 的表达却没有发生太大的变化。肺泡周围毛细血管 AQP-1 的表达与肺泡 I 型上皮细胞 AQP-5 表达在 4 h 后出现持续性的降低,表明 AQP-1 和 AQP-5 的合成而不是转移受到影响,可能与肺泡-毛细血管膜屏障受损有关。肺泡和血管内皮在肺损伤过程中大量受到破坏,从而使 AQP-1、AQP-5 在总量上表达减少,而对于 AQP-3 和 AQP-4 而言,由于它们的分布位置在肺损伤过程中没有受到太大的影响,所以其表达相对恒定。另外,AQP-1 和 AQP-5 的表达减少不仅局限于损伤较严重的部位,全肺均能观测到,且 AQP-1 及 AQP-5 减

少的程度相似,提示炎性细胞可能不是直接介导 AQP-1 和 AQP-5 表达减少的原因。由于 AQP-1 和 AQP-5 的表达或功能下降减少了肺水肿时机体清除过多水肿液的能力,导致过多液体在肺泡腔、肺间质的积聚,从而加重肺泡和间质水肿^[14],同时 AQP-1 和 AQP-5 也可能参与了肺水肿时液体的异常转运,这些均对肺水肿的形成和消除具有重要意义。以上说明 AQP-1 和 AQP-5 在调节肺内液体平衡中起到明显作用,可能参与了 ALI 肺水肿的发病机制,而 AQP-3 和 AQP-4 与其无明显相关。

现已证明,绝大多数 ALI 患者的肺泡水清除率受到损害,水清除率高的患者预后也好^[15]。人体实验也证实,肺功能正常的呼吸机通气患者,其肺泡水清除率完整者呼吸机支持时间缩短,死亡率降低;肺泡水清除率大者死亡率低且呼吸机辅助呼吸时间也短^[16]。因此,通过提高 AQPs 含量或者活性,增强肺水肿患者肺泡水清除率,可能是治疗肺水肿的有效途径。

[参考文献]

- [1] Jiao G, Li E, Yu R. Decreased expression of AQP-1 and AQP-5 in acute injured lung in rats [J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115: 963-967.
- [2] Lai K N, Leung J C, Metz C N, Lai F M, Bucala R, Lan H Y. Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome [J]. J Pathol, 2003, 199: 496-508.
- [3] Jang A S, Lee J U, Choi I S, Park K O, Lee J H, Park S W, et al. Expression of nitric oxide synthase, aquaporin 1 and aquaporin 5 in rat after bleomycin inhalation [J]. Intensive Care Med, 2004, 30: 489-495.
- [4] Ackland G L, Mythen M G. Negative pressure pulmonary edema as an unsuspected imitator of acute lung injury/ARDS [J]. Chest, 2005, 127: 1867-1868.
- [5] 王贵民,王银萍,赵雪俭,佟伟华,王蒙,赵航,等. AQP-1 蛋白在重症胰腺炎急性肺损伤中的表达[J]. 中华普通外科杂志, 2006, 21: 301-302.
- [6] 岳冬梅,薛辛东. 水通道蛋白 1,5 与新生鼠高氧肺损伤肺水肿的关系研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8: 147-150.
- [7] Saboori A M, Smith B L, Agre P. Polymorphism in the Mr 32,000 Rh protein purified from Rh(D) -positive and -negative erythrocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85: 4042-4045.
- [8] Matsuzaki T, Tajika Y, Tserentsoodol N, Suzuki T, Aoki T, Hagiwara H, et al. Aquaporins: a water channel family [J]. Anat Sci Int, 2002, 77: 85-93.
- [9] 谭利平,许峰,匡凤梧. 水通道蛋白 5 在高氧肺损伤中的表达及调节机制[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18: 462-466.
- [10] Song Y, Yang B, Matthay M A, Ma T, Verkman A S. Role of aquaporin water channels in pleural fluid dynamics [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 279: C1744-C1750.
- [11] King L S, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels [J]. Ann Rev Physiol, 1997, 58: 619-648.
- [12] Bai C, Fukuda N, Song Y, Ma T, Matthay M A, Verkman A S. Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice [J]. J Clin Invest, 1999, 103: 555-561.
- [13] Ma T, Fukuda N, Song Y, Matthay M A, Verkman A S. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice [J]. J Clin Invest, 2000, 105: 93-100.
- [14] 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.
- [15] Ware L B, Matthay M A. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163: 1376-1383.
- [16] Matthay M A. Alveolar fluid clearance in patients with ARDS: does it make a difference [J]. Chest, 2002, 122: 340-343.

[本文编辑] 孙岩

• 书 讯 •

《病理生理学学习指南》已出版

本书由贾彦、金莉主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0663-8,16开,定价48.00元。

本书每章分3部分内容。第一部分为“重点难点提要”,以文字概括或图表归纳或框架图示的方法精炼了病理生理学的重点、难点内容,突出了大纲要求,使读者对重点、难点一目了然,便于理解和记忆。第二部分为“自测题”,题型包括多选题(A型题、B型题、C型题、X型题)、概念题、填空题、判断是非题、简答题和论述题,注重将理论与临床实际相结合,适当增加了病例分析题。第三部分为“参考答案”。全书内容简明新颖,实用性强,既可作为医药院校研究生、本科生教学用书,又可作为医药卫生工作者案头参考书,对学生复习、预习和考试以及执业医师资格考试、研究生入学考试均有帮助。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>