·实验研究·

不同发育阶段大鼠肺水通道蛋白表达的变化

陈国兵[1],许峰[2],卢仲毅[2],匡凤梧[2]

(1. 福建医科大学附属厦门第一医院儿科,福建 厦门 361003; 2. 重庆医科大学附属儿童医院 PICU,重庆 400014)

[摘 要] **目的** 近年来研究发现组织发育与液体转运密切相关,水通道蛋白(AQPs)是一组与水主动转运有关的细胞膜转运蛋白,该文通过对 AQPs 在不同发育阶段大鼠肺脏表达变化的研究,探讨了 AQPs 在肺发育中的意义。**方法** 将 Wistar 大鼠分为 4 组:胎鼠组、新生鼠组、幼鼠组和成年鼠组,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组化(SABC)方法分别检测 AQP1,AQP3,AQP4 和 AQP5 mRNA 及其蛋白在肺细胞膜上的表达变化和分布;同时对肺发育相关指标进行对比分析。**结果** 大鼠肺发育连续不断,从胎鼠至新生鼠期增长最快,以后增速减慢,为一个动态的连续过程。肺 AQPs mRNA 在胎鼠时即有微量表达,出生后 AQPs mRNA 及蛋白含量迅速增加,呈增量表达至成年期;AQPs 在肺组织的分布互不重迭,各有其独特的分布区域。AQPs 变化与肺发育指标相关性分析显示它们间存在正相关($P<0.05$)。**结论** AQPs 不仅涉及肺上皮的水转运,而且可能与肺组织发育有关。

[中国当代儿科杂志,2008,10(4):523-526]

[关 键 词] 水通道蛋白;发育;水转运;肺脏;大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2008)04-0523-04

Changes of aquaporin expression during lung development in rats

CHEN Guo-Bing, XU Feng, LU Zhong-Yi, KUAN Feng-Wu. Department of Pediatrics, First Hospital of Xiamen Affiliated to Fujian Medical University, Xiamen, Fujian 361003, *China* (*Xu F, Email: xufeng9899@yahoo.com.cn*)

Abstract: Objective Many studies have shown that tissue development is closely correlated with fluid transport. Aquaporins (AQPs) are a group of cell membrane proteins that actively and selectively transport water. This study aimed to investigate the changes of AQPs expression during lung development in rats in order to elucidate the role of AQPs in the rat lung development. **Methods** AQP1, AQP3, AQP4 and AQP5 proteins and mRNA in the lung cell membrane were measured by immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively in the 20-day-old embryo (E20), 7-day-old newborn rat, and one-month-old young and adult rats. The correlation between AQPs expression and lung development was studied. **Results** With increasing age, the lung development showed a dynamic and successive course, with the most rapid from the fetus to the newborn rat, and then a slowed down afterwards. AQPs mRNA was weakly expressed in the lung of the E20 group. Lung AQPs mRNA and protein increased rapidly after birth until adulthood. The AQPs distribution patterns in the lung were unique with no duplication. There was a positive correlation between AQPs expression and lung development ($P<0.05$). **Conclusions** In addition to being involved in the transepithelial transport of water in the lung, AQPs is also related to its development.

[**Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (4):523-526**]

Key words: Aquaporin; Development; Water transport; Lung; Rats

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是发生于新生儿(特别是早产儿)持续用高浓度氧机械通气后的一种肺损伤性疾病,死亡率极高,存活者常伴有明显肺发育障碍和肺功能低下,其早期特征性改变是肺泡炎性水肿[1],预示肺液体的转运调节机制可能参与了 BPD 的发生、发展进程。水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是近年来发现的一组与水通透有关的细胞膜转运蛋白,主要介导自由水被动跨生物膜转运,对保持细胞内外水平衡起重要作用[2]。AQPs 与组织发育间的关系研究不多,Liu 等[3]报道了 AQPs 对脑脊液的形成进而对脑正常发育是至关重要的,但 AQPs 和肺发育之间的关系,尚未见文献报道。本研究以不同发育阶段大鼠为研究对象,选取肺组织苏木精-伊红染色形

[收稿日期]2008-01-11;[修回日期]2008-02-28
[基金项目]重庆市教委科研基金资助项目(渝教科 2002-18)
[作者简介]陈国兵,男,硕士,主治医师。主攻方向:儿科急救。
[通讯作者]许峰,教授,重庆医科大学附属儿童医院 PICU,400014。

态学观察结合肺组织蛋白质、DNA 和肺含水量的变化作为肺发育相关指标;同时采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组化(SABC)方法分别检测肺组织中 4 种主要 AQPs[4](AQP1, AQP3, AQP4, AQP5)的 mRNA 表达和蛋白质分布的动态变化,分析它们间的相关性,以探讨 AQPs 在大鼠肺发育不同阶段的变化和意义。

1 材料与方法

1.1 动物的分组与检测指标

随机取 4 组清洁型 Wistar 大鼠:孕 20 d 胎鼠组(E20,一般足月妊娠 21 天)、7 日龄新生鼠组、1 月龄幼鼠组和成年鼠组,每组 8 只。采用免疫组织化学(SABC)方法观察 AQP1, AQP3, AQP4, AQP5 在各组肺细胞膜上的分布和含量变化;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定各组 AQP1, AQP3, AQP4, AQP5 mRNA 在肺组织的含量。此外对肺发育指标[蛋白质、DNA 含量、肺含水量(湿/干重比,W/D)、组织形态学变化]也进行相关测定。

1.2 标本取材

各组大鼠先后用 3.5% 的水合氯醛(10 mL/kg)腹腔注射麻醉,约 1 min 后自大鼠剑突下由皮肤至皮下向上剪开胸腔,迅速取下肺组织,生理盐水漂洗干净,吸水纸拭干,留测。左下肺置 -70℃ 冰箱保存,待测 AQPs mRNA 含量。

1.3 肺发育指标的测定

1.3.1 形态学变化　取右上肺,4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,5μm 切片,苏木精-伊红染色,光镜下观察;部分切片行免疫组化检测肺 AQPs 蛋白表达。

1.3.2 肺总蛋白含量测定　取右中肺,彻底匀浆,一定比例稀释,采用 Lowry 法,722 分光光度计测定 A_{750} 吸光度值,绘出蛋白质标准曲线,计算肺总蛋白含量。

1.3.3 肺总 DNA 含量测定　取右下肺,彻底匀浆,酚/氯仿抽提、纯化,紫外分光光度计测定 A_{260} 吸光度值,依公式 DNA 浓度(μg/mL) = A_{260}/0.02 计算。

1.3.4 肺含水量测定　取左上肺,吸水纸吸干表面,立即称重记作肺湿重。然后置于 80℃ 烤箱内,48 h 后(重量不再减轻)称重记为肺干重,计算湿/干重比值(W/D),以此了解不同发育时期肺组织含水量。

1.4 肺 AQPs mRNA 及其蛋白质表达

1.4.1 免疫组织化学方法观察 AQPs 在肺细胞膜的分布　采用链霉亲和素-过氧化物酶复合物(SABC)法。AQP1, AQP3, AQP4, AQP5 一抗(兔抗大鼠 IgG 5μg/mL)购自美国 ALPHA DIAGNOSTIC 公司,SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。5μm 切片脱蜡至水,3% 的过氧化氢(H_2O_2)灭活内源性过氧化物酶 5 ~ 10min,热修复抗原,血清封闭 20 min,滴加 AQPs 一抗,4℃ 过夜,加生物素化山羊抗兔 IgG(二抗),37℃ 20 min,滴加 SABC,37℃ 20 min,各步后均在磷酸盐缓冲液(PBS)中漂洗数次。二氨基联苯胺(DAB)显色,蒸馏水洗涤,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,电子显微镜观察,照相。阴性对照组滴加 PBS 代替 AQPs 一抗,处理同前。染色结果判定:肺组织出现明确的棕黄或棕褐色颗粒为阳性。

1.4.2 RT-PCR 检测肺 AQPs mRNA 表达水平　取肺组织 100 mg,采用异硫氢酸胍一步法抽提总 RNA,并在 RNA/DNA 机上检测其浓度和纯度。引物来源于参考文献[5],并由上海生物工程有限公司合成。AQP1 引物上链:5′-GGA GAT GAA GCC CAA ATA GAG-3′,下链:5′-CAG GAA ACA GAA AGA AAG ACA G-3′,长度 202 bp;AQP3 引物上链:5′-AAA CTA GCA GCT CAA GGG AAC-3′,下链:5′-TCC CAC CCC TAT TCC TAA AAC-3′,长度 367 bp;AQP4 引物上链:5′-AGC ATG AAT CCA GCT CGA TCC-3′,下链:5′-TCC TTC CCC TTC TTC TCG TCT C-3′,长度 311 bp;AQP5 引物上链:5′-TCC AGG ACC ACA CCA GAA AG-3′,下链:5′-ATA AAA TAG CAC TCC GTG AGC C-3′,长度 151 bp;β 肌动蛋白(β-actin)为内对照,上链:5′-GAC TAC CTC ATG AAG ATC-3′,下链:5′-GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3′,长度 513 bp。在反转录酶(MMLV)作用下,总 RNA 1μg 37℃ 水浴 1 h 反转录成互补脱氧核糖核酸(cDNA)。PCR 反应条件:25μL cDNA 反应体系,94℃ 预变性 4 min,随即 94℃ 变性 40 s,58℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 75 s,循环 30 次,循环最后 72℃ 终末延伸 7 min。PCR 完成后,扩增产物 10 μL 在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙淀染色,紫外灯下观察,可见与设计片段大小相同的单一条带。AQPs 扩增产物与 β-actin 扩增产物的吸光度比值表示每个样本的 mRNA 相对含量。

1.5 统计学处理

检测结果均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理分析。4 组比较采用完全随机方差分析,组间两两比较采用 q 检验。$P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 肺发育指标的变化

肺组织苏木精-伊红染色形态学变化：从 E20 胎鼠、7 d 新生鼠、1 月幼鼠至成年鼠，组织结构逐渐发育完善（图 1）。

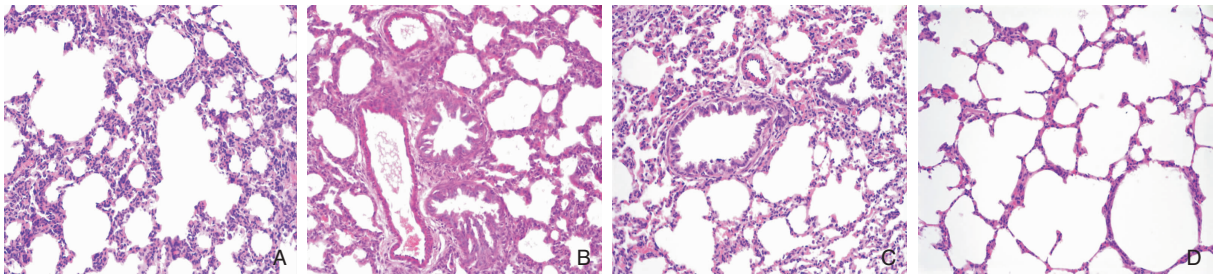

图 1 各年龄组大鼠肺组织形态学观察（苏木精-伊红染色 200 ×） **A**：E20 胎鼠肺实质成分少，以间质成分为主，组织结构疏松。 **B**：7d 新生鼠血管已张开，肺泡开始发育，可见较完善的支气管和肺血管。 **C**：1 月幼鼠肺泡大量分裂增生，可见较多的肺泡管和部分肺泡，支气管发育完好。 **D**：成年鼠可见广泛的肺泡结构和肺泡间的毛细血管网。

随着大鼠日龄增长，肺总蛋白质和 DNA 含量逐渐增加，从胎鼠至新生鼠期增长最快，以后增速减慢，表现为动态的连续发育过程，各组间两两比较差异均有显著性（$P<0.01$）。肺含水量在胎鼠时期很高，出生不久迅速降至成年水平。胎鼠组分别与 7 d、1 月和成年鼠组比较差异均有显著性（$P<0.01$），而 7 d、1 月和成年鼠组间两两比较差异均无显著性（图 2,3）。

2.2 肺 AQPs mRNA 及其蛋白表达的变化

RT-PCR 显示：AQPs mRNA 在胎鼠时均有微量转录，出生后快速增加，呈增量表达进入成年（图 4）。

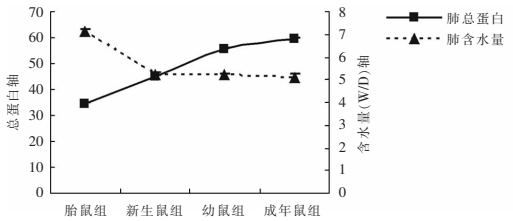

图 2 大鼠肺总蛋白、肺含水量随年龄的变化

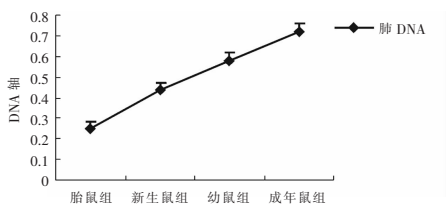

图 3 大鼠肺 DNA 含量随年龄的变化

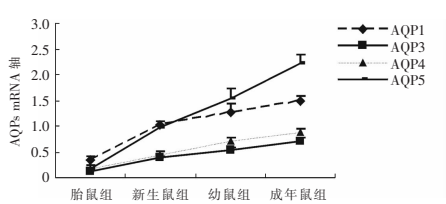

图 4 大鼠肺 AQP1，3，4，5 mRNA 含量随年龄的变化

免疫组化显示：胎鼠时仅有 AQP1 蛋白质表达，出生后 4 种 AQP 蛋白均出现表达，呈增量表达至成年期。AQP1 表达在肺间质，主要分布在肺血管内皮细胞和肺间质细胞膜；AQP3 、AQP4 表达在气管、支气管上皮细胞基质膜；AQP5 表达在Ⅰ型肺泡上皮细胞顶膜面和黏膜下腺体的腺泡细胞膜。

2.3 AQPs 表达与肺发育指标变化的相关性分析

AQP1 mRNA 与肺蛋白质、DNA 含量随年龄变化的直线相关系数 r 值分别为 0.976 和 0.979；AQP3 为 0.988 和 0.99；AQP4 为 0.995 和 0.997；AQP5 mRNA 与它们含量变化的 r 值分别为 0.98 和 0.99（均 $P<0.05$）。结果表明，AQPs mRNA 表达变化与肺蛋白质和 DNA 含量变化趋势有很好的一致性，呈显著正相关。

3 讨论

动物个体的生长发育一直是基础和临床工作者研究的热点。出生前胎肺是一个分泌旺盛的器官，胎儿期间，肺气腔充满了由肺上皮分泌的液体，此时气道液体维持着肺的扩张状态，这对肺发育起到了重要作用；出生后肺转变为一个吸收组织，生后 1 d 内远端肺液体被迅速清除，这为出生后肺与外界进行气体交换创造了条件，其中，任何一个过程出现水转运障碍都会影响到肺的正常发育[2]。可见肺内液体的正常转运在肺发育中扮演着重要的角色。

水通道蛋白（AQPs）是一种细胞膜通道蛋白，对水具有选择性主动转运功能，AQPs 都有增加浆膜面水通透性的特性，具有低抗肺水肿形成的因素。至今在哺乳动物已发现 13 种[2] AQPs（AQP0、AQP1 ~ 12），它们广泛分布于全身各组织，目前确认在肺组

织至少有 4 种 AQPs[4]（AQP1，AQP3，AQP4，AQP5）表达并参与肺液体转运。Ruiz-Ederra[6] 在对 AQPs 基因敲除小鼠的研究中发现敲除 AQP1 致小鼠生长发育落后；近来一个功能的糖皮质激素反应元件在 AQP1 启动子中被发现，糖皮质激素受体缺乏的鼠，肺发育被严重延缓，出生前糖皮质激素的使用可减少早产儿的呼吸功能不全[7]。种种迹象表明肺 AQPs 的变化可影响肺组织发育。

我们研究发现，肺 AQP1，3，4，5 mRNA 在 E20 时均出现微量转录，而只有 AQP1 蛋白出现表达，出生后几种 AQP mRNA 含量及其蛋白表达均快速增加，连续不断，从胎鼠至新生鼠期增长最快，之后增速减慢。这个增长趋势与肺蛋白质和 DNA 含量变化的生理学过程惊人的相似，AQPs 变化与肺组织发育有很好的一致性，存在正相关。本研究结果说明 AQPs 与肺发育过程相关联。

研究显示，胎鼠时期肺 AQPs 的表达相当微弱，肺含水量（W/D）很高，出生后 AQPs 表达均快速增加，迅速达很高水平，而肺含水量与之相反很快下降至成年水平，推测肺内液体的快速转运和吸收与 AQPs 的表达增加有关，AQPs 可能参与了新生鼠出生后肺内液体的快速清除过程，这为其在围生期维持肺部相对干燥的功能环境，迅速建立肺泡与外界的气体交换创造了条件。Ramirez 等[8] 在实验中发现甲状旁腺素（PTH）/PTH 相关肽（PTHrp）受体缺乏的小鼠出生时死于呼吸衰竭，其肺内 AQP5 mRNA 显著减少，而肺泡表面活性物质浓度正常。该研究为我们提供了较好的反面佐证。

众所周知，肺泡和间质的水肿液是跨Ⅰ型肺泡上皮细胞和组织间隙而重吸收入血循环。本研究发现，AQP1 主要分布在肺间质细胞的顶膜和基底膜、AQP5 分布在Ⅰ型肺泡细胞上皮顶膜面，AQP1、AQP5 随年龄的增长变化暗示它可能参与了出生后远端肺的液体转运（如肺水肿清除）乃至肺发育过程。岳冬梅等[9] 曾报道 AQP1、AQP5 在高氧肺损伤时表达降低，并与肺水肿的严重程度相关；卢红艳等[10] 研究认为 AQP5 通过调节肺水平衡，在早产大鼠肺泡化形成的关键时期发挥重要作用，与我们的推测相吻合。

气道的主要功能是维持呼吸道通畅，同时分泌少量液体，温暖、湿润进入气腔的气体。本研究显示 AQP3 和 AQP4 主要表达在气管、支气管部位，根据 AQPs 功能性转运水的特点，推测 AQP3 和 AQP4 可能参与了气道表面的液体调节和气体湿化过程。

随着对 AQPs 研究的深入，我们了解到，AQPs 在“干燥综合征、囊性纤维化、哮喘”等涉及水转运的疾病中都扮演了重要的角色[11]。支气管肺发育不良的发生、发展机制尚未完全阐明，其早期特征性改变表现为肺泡炎性水肿，试想，如果对肺水肿进行早期干预，就有可能阻断 BPD 的发生、发展进程。目前 BPD 的治疗和预防仍是临床工作者较棘手的课题之一，AQPs 在肺水转运乃至肺发育方面的研究为我们开辟了一条可能的治疗新途径。

[参 考 文 献]

[1] Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia [J]. Lancet, 2006, 367(9520):1421-1431.
[2] Zelenina M, Zelenin S, Aperia A. Water channels (aquaporins) and their role for postnatal adaptation [J]. Pediatr Res, 2005, 57(5 Pt 2):47-53.
[3] Liu H, Wintour EM. Aquaporins in development - a review [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 3:18.
[4] Verkman AS. Role of aquaporins in lung liquid physiology [J]. Respir Physiol Neurobiol [J]. 2007, 159(3):324-300.
[5] Huebert RC, Splinter PL, Garcia F, Marinelli RA, LaRusso NF. Expression and localization of aquaporin water channels in rat hepatocytes. Evidence for a role in canalicular bile secretion [J]. J Biol Chem, 2002, 277(25):22710-22717.
[6] Ruiz-Ederra J, Verkman AS. Accelerated cataract formation and reduced lens epithelial water permeability in aquaporin-1-deficient mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(9):3960-3967.
[7] Cole TJ, Solomon NM, Van Driel R, Monk JA, Bird D, Richardson SJ, et al. Altered epithelial cell proportions in the fetal lung of glucocorticoid receptor null mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30(5):613-619.
[8] Ramirez MI, Chung UI, Williams MC. Aquaporin-5 expression, but not other peripheral lung marker genes, is reduced in PTH/PTHrP receptor null mutant fetal mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22(3):367-372.
[9] 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(2)：147-150.
[10] 卢红艳，常立文，李文斌，姜娜，彭琼玲，蔡成，等. 高氧下调早产大鼠肺组织 AQP5 的表达 [J]. 基础医学与临床，2007，27(5)：553-556.
[11] 孟淑珍，辛颖，韩晓华，韩玉昆，薛辛东. 水通道蛋白 4 表达减少与新生大鼠缺氧缺血脑水肿的关系[J]. 中国当代儿科杂志，2005，7(4)：349-353.

（本文编辑：吉耕中）