

## · 论著 ·

## 低渗液体外培养对气道上皮黏液分泌的影响及与水通道蛋白-5 表达的相关性研究

闫霞 曹官铭 王晓龙 周向东

**【摘要】** 目的 探讨体外气液界面培养气道上皮在低渗液条件下黏液分泌与水通道蛋白-5(AQP5)表达间的关系,以进一步阐明渗透浓度、AQP5 在慢性气道黏液高分泌过程中的地位和作用。方法 利用体外气液界面细胞培养模型,进行兔气道上皮细胞原代培养。培养 1 周后,培养液渗透浓度换为 235 mmol/L(实验 A 组)、255 mmol/L(实验 B 组)、270 mmol/L(实验 C 组)和 282 mmol/L(对照组)。培养 12 h 后,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组 AQP5 mRNA 表达,采用蛋白质免疫印迹法检测上清液中黏蛋白 5AC(MUC5AC)分泌量。结果 倒置显微镜下各培养组细胞成多层生长。各实验组中 MUC5AC 分泌量均高于对照组( $P < 0.001$ ),其中以实验 A 组为最高;而 AQP5 mRNA 均明显低于对照组( $P < 0.001$ ),以实验 A 组为最低;实验组 AQP5 mRNA 表达与 MUC5AC 呈显著负相关( $r = -0.77, P < 0.001$ )。结论 在气液界面细胞培养模型中,低渗液条件下 MUC5AC 分泌量显著增加,较好地模拟了慢性气道炎症黏液高分泌的体内环境;AQP5 mRNA 表达与 MUC5AC 呈显著负相关。低渗环境以及由此引起的 AQP5 mRNA 表达可能参与慢性阻塞性肺疾病黏液高分泌的形成过程。

**【关键词】** 水通道蛋白; 黏蛋白; 气液界面; 低渗液

## Study of mucus secretion and aquaporin - 5 expression of bronchial epithelium cultured in hypotonic medium

YAN Xia\*, CAO Guan-ming, WANG Xiao-long, ZHOU Xiang-dong.\* Department of Respiratory Medicine, Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400014, China

Corresponding author: ZHOU Xiang-dong (Email: zxd999@263.net)

**【Abstract】** **Objective** To study mucus secretion and aquaporin - 5 (AQP5) expression of bronchial epithelium cultured at the air - liquid interface of hypotonic medium, and to elucidate the role of AQP5 and osmotic pressure in airway mucus hypersecretion process. **Methods** With the air - liquid interface culture model, rabbit tracheal epithelium was cultured at the air - liquid interface. One week after culture, media of 235, 255 and 270 mmol/L were used for experimental groups, and that of 282 mmol/L for culture in control group. Twelve hours after the culture, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT - PCR) was used to detect AQP5 mRNA in each experimental group, and Western blotting to determine mucin5AC (MUC5AC) in the supernatant. The same procedures were done in control group. **Results** Multilayers of cultured cells were observed with inverted microscope in each group. MUC5AC expressions in experimental groups were significantly higher, whereas AQP5 mRNA levels were obviously lower compared with those in control group (all  $P < 0.001$ ), the changes in 235 mmol/L group were most obvious. Moreover, AQP5 mRNA and MUC5AC in experimental groups were notably negatively correlated ( $r = -0.77, P < 0.001$ ). **Conclusions** The model of air - liquid interface culture could increase MUC5AC expression, which provides an environment closely resembles that in the body is an ideal framework for the research of mucus hypersecretion of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Expressions of AQP5 mRNA and MUC5AC are negatively correlated. Hypotonicity and reduction of AQP5 mRNA may play critical roles in airway mucus secretion process in COPD.

**【Key words】** aquaporin; mucin; air - liquid interface; hypotonic medium

气道黏液高分泌在慢性阻塞性肺疾病(COPD)病情恶化过程中的作用已成共识,但其机制不十分清楚,也缺乏有效的治疗手段。众所周知,水、无机盐离子和黏蛋白(MUC)等大分子蛋白质是气道黏液的主要成分。目前,对 MUC 的研究已较为深入,在

已发现的 18 种 MUC 中,MUC5AC 是 COPD 气道黏液高分泌的主要成分<sup>[1]</sup>。然而,从理论上讲,水、无机盐离子对 MUC 的性状及分泌量应该是有影响的。随着水通道蛋白(AQP)的发现及其研究的深入,AQP 在气道黏液高分泌过程中的地位也日益受到重视。本实验借助能较好模拟气道微环境的气液界面培养模型,探讨低渗液条件下 MUC 分泌和 AQP5 表达变化及其二者的相关性,以期阐明在气道黏液高分泌过程中的作用,为寻求有效治疗措施

作者单位:400014 重庆市急救医疗中心呼吸科(闫霞,曹官铭);  
400010 重庆医科大学附属第二临床学院呼吸科(王晓龙,周向东)

通讯作者:周向东,教授,博士生导师(Email:zxd999@263.net)

作者简介:闫霞(1962-),女(汉族),四川省人,副主任医师。

奠定基础。

## 1 材料与方 法

1.1 气管上皮细胞分离:清洁级纯种大白兔,体重 2~3 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。空气栓塞致死动物,取气管置于磷酸盐缓冲液(PBS)中备用。上皮细胞分离参照文献[2]方法。

1.2 气管上皮细胞培养:按以下方案配制培养基: Dulbecco 改良 Eagle 培养基/F12(DMEM/F12)中加入 10 mg/L 胰岛素、5 mg/L 转铁蛋白、20 μg/L 三碘甲状腺氨酸、25 μg/L 表皮生长因子、7.5 mg/L 内皮生长因子、1 mmol/L 谷氨酰胺、0.36 mg/L 氢化可的松、100 kU/L 青霉素、50 mg/L 链霉素。多聚乙烯支架膜(英国 Corning Costar)涂人胎盘胶原 20 μg/cm<sup>2</sup>(HPC, Sigma 公司),室温下晾干 18 h 备用。以培养基中加入体积分数为 5% 的胎牛血清(FCS, Sigma 公司)配制成的重悬液重悬分离细胞。苔盼蓝拒染法检测活细胞数。将 6 ml 细胞悬液加入 T25 培养瓶中,37 ℃、体积分数为 5% 的二氧化碳(CO<sub>2</sub>)条件下培养 1 h。按 2.5×10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> 转入支架膜上,支架膜下方加入 2 ml 培养液。37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,12 h 后换为无血清培养基。隔日换底层培养基 1 次。1 周后待上皮细胞长满支架膜,去除膜上方培养液继续培养 72 h。实验分为对照组和实验 A、B、C 组,每组重复细胞孔数为 6。实验 A、B、C 组分别按 235、255 和 270 mmol/L 无血清低渗培养基置换常规培养基,对照组为常规培养基(渗透浓度 282 mmol/L)。低渗液以新鲜 DMEM+去离子水配制,用渗透压计调节配制。培养 12 h 后,离心进行后续步骤。

1.3 AQP5 mRNA 检测:用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 AQP5 mRNA。根据 Gene Bank 中 AQP5 的序列用 Primer 5.0 设计引物,上游:5'-GGT GTG CTC CGT GGC CTT CCT-3',下游:5'-CTT CCG CTC TTC CCG CTG CTC-3'。β-actin 作为内参照物,上游:5'-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3';下游:5'-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3'。以一步法总 RNA 提取试剂(Trizol)提取总 RNA,焦碳酸二乙酯(DEPC)为 Roche 公司产品,参照莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶(MMLV)试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)说明书以两步法行 RT-PCR 检测。合成的 cDNA 加入 25 μl 反应体系中,按下列参数行 PCR:96 ℃ 变性 4 min,65 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环。PCR 产物经质量分

数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,利用凝胶分析系统(英国 UVP 公司)对扩增产物条带进行扫描,记录积分光密度值,以 AQP5/β-actin 为 AQP5 mRNA 的相对含量。

1.4 蛋白质免疫印迹法检测 MUC5AC:上清液置冰浴中 20 min,11 400×g 离心 5 min,取上清液加等体积十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)样品缓冲液×2,沸水煮 5 min,进行 80 g/L SDS-PAGE 蛋白电泳,每个样品上样量一致,转移至硝酸纤维素膜(PVDF)上,用 Tris 缓冲液(TBS)洗膜 2 次,每次 5 min。按 BM 公司蛋白质免疫印迹试剂盒说明步骤操作,MUC5AC 单克隆抗体为武汉博士德公司产品,曝光、显影后用凝胶成像机(英国 UVP 公司)测灰度值,取均值作为结果。

1.5 统计学方法:采用 SPSS 软件进行统计分析。MUC5AC、AQP5 mRNA 组内比较采用完全随机设计的方差分析,MUC5AC、AQP5 mRNA 之间相关性用相关分析; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

表 1 结果显示,与对照组比较,各实验组 AQP5 mRNA 表达均明显下降,差异均有显著性( $F = 117.86, P < 0.001$ ),各实验组中以 A 组 AQP5 mRNA 表达量最低,与 B 组和 C 组比较差异均有显著性( $P$  均  $< 0.05$ )。各实验组 MUC5AC 分泌量较对照组增加十分明显,差异有显著性( $F = 14.32, P < 0.001$ );各实验组中 A 组最高,与 C 组比较差异有显著性( $P < 0.05$ )。AQP5 mRNA 与 MUC5AC 呈显著负相关( $r = -0.77, P < 0.001$ )。

表 1 低渗液、气液界面培养上皮 MUC5AC、AQP5 mRNA 表达量分析( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Analysis of expression of AQP5 mRNA and MUC5AC on epithelium cultured at air-liquid interface in hypotonic medium( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	AQP5 mRNA	MUC5AC	组别	AQP5 mRNA	MUC5AC
实验 A 组	0.39±0.07*	12.05±2.08*	实验 C 组	0.69±0.07* <sup>#</sup> △	8.69±1.35* <sup>#</sup> △
实验 B 组	0.42±0.04* <sup>#</sup>	10.96±2.19*	对照组	0.79±0.04	5.97±1.09

注:与对照组比较:\* $P < 0.001$ ;与实验 A 组比较:<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与实验 B 组比较:△ $P < 0.05$

## 3 讨 论

水分子的跨膜转运是生命活动的最基本现象之一,长期以来,它被认为以单纯扩散方式进行,但大量水分子快速穿过质膜却是单纯扩散不能解释的。因此,人们设想细胞膜上存在一种水通道。直到 1988 年, Preston 等<sup>[3]</sup>对 Rh 抗原进行研究时,偶然发现红细胞膜上一种分子质量为 28 ku 的蛋白质,将其 cDNA 重构于人工合成的脂质体后,表现出对

水分子极高的通透性。AQP 由此命名,迄今已发现 10 种 AQP,分别命名为 AQP0~9。呼吸系统存在活跃的液体分泌、吸收和转运,且与 AQP 关系密切。目前利用原位杂交及免疫荧光技术已确定 AQP1、AQP3、AQP4、AQP5 在呼吸系统的定位分布<sup>[4]</sup>,其中 AQP5 主要分布于黏膜下腺上皮和 I 型肺泡上皮细胞顶部的膜上,与气道黏液分泌关系最为密切。

对 AQP 结构的进一步研究发现,AQP 以四聚体形式存在于细胞膜上,每一亚单位以  $\alpha$  螺旋方式跨膜 6 次,三维结构类似“沙漏”状<sup>[3]</sup>。每一亚单位形成一独立的水孔,但四聚体结构对稳定每一单体的构象有重要意义。除了少数小分子物质(如甘油)外,AQP 对水分子的通透性具有高度选择性,水分子可通过 AQP 由低渗向高渗方向移动。而且,AQP 一般是激活的,不需“门控”或其他调节。

由此可见,渗透浓度是 AQP 发挥功能的动力所在。然而,人们至今尚未找到精确测定体内气道黏液离子浓度的合适方法。我们借助能较好模拟气道内环境的气液界面模型,检测低渗液条件下 MUC 分泌,结果发现较对照组明显增加,这与文献<sup>[5]</sup>报道的结果一致。与此同时,低渗液明显抑制了 AQP 表

达,AQP 表达与 MUC 分泌之间存在显著负相关。有关低渗条件下促进 MUC 分泌及抑制 AQP 表达机制仍不清楚,但我们推测,COPD 患者体内气道黏液有可能成低渗状态,这种条件一方面促进 MUC 分泌,另一方面抑制 AQP 表达,使黏液清除发生障碍,加重黏液滞留。因此,改善气道局部渗透浓度有可能为气道黏液高分分泌治疗带来新手段。

#### 参考文献:

- 1 周向东,童瑾,兰箭.慢性阻塞性肺疾病患者气道黏蛋白分子表型的研究[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(7):437.
- 2 Davidson D J, Kilanowski F M, Randell S H, et al. A primary culture model of differentiated murine tracheal epithelium[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(4): L766-778.
- 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(24): 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(6): 2199-2206.
- 5 周向东, 郭海桥, 李升锦. 雾化吸入液渗透压对痰液外排的影响[J]. 临床肺科杂志, 2004, 9(2): 104-105.

(收稿日期:2006-12-25 修回日期:2007-03-02)

(本文编辑:李银平)

## • 启事 •

### 第四次全国危重病与机械通气治疗学术交流会

#### 暨全国机械通气规范化操作与机械通气治疗新进展高级学习班征文及报名通知

中华医学会继续教育部、空军总医院呼吸科承办的国家级 I 类继续医学教育项目(2007-03-02-078, 10 学分)第四次“全国危重病与机械通气治疗学术交流会”暨“全国机械通气规范化操作与机械通气治疗新进展高级学习班”定于 2007 年 7 月 27 日—8 月 1 日在山东省烟台市召开。欢迎各级医院从事呼吸科、急诊科、ICU、神经内科、心血管内科、内分泌科、外科及睡眠医学临床及科研的医师、护士参加。

**会议内容:**就机械通气(有创与无创)领域有关问题进行深入细致的研讨,重点讲述不同疾病机械通气治疗时的规范化操作和临床工作中遇到的各种困惑问题,采用授课与实践操作(示范和演练相结合),使参会人员能够真正掌握呼吸机规范操作技能,同时进行学术交流、疑难病例和热点问题沙龙讨论。会议拟邀请刘又宁、俞森洋、陈良安、杜彬、张波、曹德森等专家授课,报告内容由四部分组成:①呼吸衰竭基础理论部分;②无创正压通气部分;③有创机械通气部分;④疑难危重病讨论。(注:会议通知及详细课程内容请电话索取)

**征文内容及要求:**呼吸及其他危重病的管理、诊断与治疗,机械通气的有关问题,疑难病例报道等内容。要求:①寄 600~1 000 字大摘要 1 份,题目下注明省、市、工作单位、科室、姓名及邮编;②来稿请寄:100710 北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“机械通气会议”梁鸿收,Email: jxy@vip.163.com, Email 发稿时务必注明会议名称;③征文截止日期:6 月 26 日前,参会报名请于 7 月 10 日前办理。会议通知单发放及报名电话:010-88820399, 51798200(Tel/Fax)杨桂芳 梁鸿 刘智明, 空军总医院呼吸科 张波主任, 电话:13331161076。

### 2007 年全国内科急危重病医学学术交流会暨高级学习班通知

为提高危重病医学的发展,交流各地先进经验,我部定于 2007 年 5 月 19—23 日在安徽屯溪召开“全国内科急危重病医学学术交流会”暨“全国内科急危重病医学新进展高级学习班”。国家级继续教育项目(项目编号 2007-10-00-001, 10 学分)。

**会议地点:**花溪饭店(三星级,黄山市屯溪区西镇街 1 号),电话:0559-2328000(总机)

**会议内容:**会议期间举办高级学习班,拟邀请胡大一、王爱霞、孙宁玲、王佩燕、邱海波、孟庆义、何忠杰等专家作专题报告。

**征文内容及要求:**内容:有关内科急危重病的基础研究;各专科急危重病的临床诊断和治疗;严重感染、休克的诊断与治疗;急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、多器官功能障碍综合征(MODS)、弥散性血管内凝血(DIC)等危重病的诊治;心肺脑复苏;重症监护;各类中毒的诊治;营养支持;抗菌药物合理应用;内镜、介入治疗在急危重症中的应用;新技术、新业务在急危重病中的应用等内容。征文可以是综述、论著、病例总结、病案报道等形式。要求:①邮寄 800~1 800 字论文打印稿 1 份,或 800 字左右摘要 1 份;②注明省市、工作单位、科室、姓名和邮编;③来稿请寄:北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“内科急危重病会议”梁鸿同志收,并同时邮寄审稿费 20 元;④Email: jxy@vip.163.com;⑤寄稿或发稿及汇款单上务必注明会议名称及会议地点;⑥征文截止日期:邮局为 4 月 27 日前(当地时间);Email 为 5 月 7 日前。

**联系人及电话:**杨桂芳 010-88820399, 88820383;梁鸿 010-85158402。

(中华医学会继续教育部)