

· 基础研究 ·

高压氧对急性高原肺水肿大鼠水通道蛋白 1 和水通道蛋白 5 的影响

吕春风 尤春景 高春锦 李茁 武连华

【摘要】目的 观察高压氧(HBO)对急性高原肺水肿(HAPE)模型大鼠水通道蛋白 1(AQP1)和水通道蛋白 5(AQP5)的影响。**方法** 56 只 Wistar 大鼠按随机数字法分为正常对照组、高原肺水肿组(HAPE 组)、高压氧治疗 1 次组(1HBOT 组)、高压氧治疗 2 次组(2HBOT 组)和常压氧治疗组(NOT 组)。正常对照组大鼠 8 只,其余每组 12 只大鼠。除正常对照组外,余各组制作 HAPE 模型后分别给予 HBO 干预。使用 Western Blot 定量检测各组大鼠肺组织 AQP1、AQP5 蛋白水平的表达,同时观察肺组织病理变化。**结果** 正常对照组的损伤评分为 0,HAPE 组、1HBOT 组、2HBOT 组和 NOT 组的损伤评分分别为 (4.46 ± 1.54) 、 (3.17 ± 1.83) 、 (1.30 ± 0.73) 和 (3.29 ± 2.27) 分;HAPE 组较其它各组肺组织损伤程度严重,与正常对照组和 2HBOT 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);2HBOT 组与 NOT 组和 1HBOT 组比较,肺组织损伤程度减轻($P < 0.05$)。正常对照组 AQP1 和 AQP5 的灰度值为 1.00,HAPE 组、1HBOT 组、2HBOT 组和 NOT 组 AQP1 的相对灰度值分别为 (0.58 ± 0.20) 、 (0.76 ± 0.16) 、 (0.87 ± 0.11) 和 (0.75 ± 0.27) ,其 AQP5 的相对灰度值分别为 (0.75 ± 0.12) 、 (0.80 ± 0.14) 、 (0.96 ± 0.14) 和 (0.84 ± 0.18) ;HAPE 组 AQP1 和 AQP5 蛋白水平均较其它各组低,且与正常对照组和 2HBOT 组间的差异有统计学意义($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);2HBOT 组 AQP1 和 AQP5 蛋白水平与 1HBOT 组比较,均有提高,且 2 组间比较,AQP5 蛋白水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** HAPE 模型大鼠肺组织内 AQP1、AQP5 蛋白水平表达降低;HBO 能够上调 AQP1、AQP5 的表达,减轻肺水肿;对于减轻肺水肿,行 2 次 HBO 治疗比行 1 次 HBO 治疗及 NOT 效果更明显。

【关键词】 水通道蛋白; 高原肺水肿; 高压氧

Effects of hyperbaric oxygen exposure on the expression of aquaporin-1 and aquaporin-5 in rats with high-altitude pulmonary edema LYU Chun-feng*, YOU Chun-jing, GAO Chun-jin, LI Zhuo, WU Lian-hua.

*Department of Hyperbaric Oxygen, Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China

Corresponding author: YOU Chun-jing, Email: cjoyou@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the effects of hyperbaric oxygen (HBO) exposure on the expression of aquaporin-1 (AQP1) and aquaporin-5 (AQP5) in rats with simulated high-altitude pulmonary edema (HAPE). **Methods** Fifty-six rats were randomly divided into five groups: control (normal), HAPE (high altitude pulmonary edema model), 1 HBOT (HAPE model and HBO therapy for 1 time), 2 HBOT (HAPE model and HBO therapy twice) and NOT (normal pressure oxygen therapy) groups, and was intervened accordingly. Western blotting and real-time PCR techniques were used to analyze the expression of AQP1 and AQP5 in their lungs. The wet-to-dry (W/D) weight ratio and morphology of the lungs was also examined. **Results** The protein and gene expression of AQP1 and AQP5 in the HAPE group decreased significantly compared with the control group. There were obvious differences in the protein and mRNA expression of AQP1 and AQP5 between the 2 HBOT group and the HAPE group and between the 2 HBOT group and the 1 HBOT group. Compared with the control group and the 1 HBOT group, marked lung injury could be seen in the HAPE group. Compared with the NOT group and the 1 HBOT group, lung injury in the 2 HBOT group was relieved significantly. **Conclusions** HAPE in rats is associated with down-regulation of the expression of AQP1 and AQP5 in the lungs. This down-regulation can be attenuated and lung injury can be alleviated by HBOT. Two sessions of HBOT could be more helpful than one for promoting this improvement.

【Key words】 Aquaporins; Pulmonary edema; Hyperbaric oxygen

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.01.001

作者单位:100076 北京,北京航天总医院高压氧科(吕春风);华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科(尤春景);首都医科大学附属北京朝阳医院高压氧科(高春锦、李茁、武连华)

通信作者:尤春景, Email: cjoyou@tjh.tjmu.edu.cn

急性高原病(acute high altitude disease, AHAD)^[1]是高原地区特有的常见病与多发病,高原肺水肿(high altitude pulmonary edema, HAPE)是重型 AHAD 之一。HAPE 形成机理比较复杂,有研究表明^[2],水通道蛋白 1(aquaporins 1, AQP1)和水通道蛋白 5(aquaporins 5, AQP5)分别构成肺泡周围毛细血管内皮细胞及肺泡 I 型细胞膜上的水分子通道,在调节肺泡与间质、毛细血管间水的转运中发挥重要作用,参与肺水肿的发病过程。陈真英^[3]报道,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗重型 AHAD 能提高治愈率,降低病死率。本实验观察 HBO 对 HAPE 模型大鼠肺组织 AQP1 和 AQP5 的影响,旨在探讨 HBO 治疗 HAPE 的作用机制。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物:雄性 Wistar 大鼠 59 只,体重 220 ~ 250 g,由军事医学科学院提供。按随机数字表法选取 8 只大鼠作为正常对照组,其余 51 只用于制作 HAPE 模型,将 HAPE 制模成功的 48 只大鼠再按随机数字法分为高原肺水肿组(HAPE 组)、高压氧治疗 1 次组(1HBOT 组)、高压氧治疗 2 次组(2HBOT 组)和常压氧治疗组(NOT 组),每组 12 只。在室温(25 ± 2)℃,相对湿度为 25% 条件下饲养,标准鼠饲料及纯净水喂养。

2. 仪器和试剂:DDC-2 型动物低压舱(空军航空医学研究所研制),YLCO 0.5/0.8 型婴儿高压氧舱(替代动物舱,上海七零一研究所杨园医用氧舱厂生产),5% 水合氯醛溶液,10% 甲醛溶液。AQP1 抗体和 AQP5 抗体(Santa Cruz 生物技术公司,美国),Western Blot 实验试剂。

二、实验方法

除正常对照组外,其余各组均制作 HAPE 模型。HAPE 组:将制模后大鼠置于常温常压下呼吸空气 2 h,即刻取肺组织标本。1HBOT 组:制模出舱后立即给予 HBO 治疗 2 h,出舱后即刻处置。NOT 组:制模出舱后立即给予常压吸氧,温、湿度不变,氧浓度 30%,吸氧 2 h,即刻取肺组织标本。正常对照组:不做任何治疗,与以上三组同时取标本。2HBOT 组:HBO 治疗每日 1 次,治疗 2 次,2 次治疗后即刻取标本。

1. HAPE 模型制备^[4-6]:将大鼠置于动物低压舱中,温度和湿度分别保持在(25 ± 2)℃和 25% 左右,自由进食和饮水。匀速减压 30 min 至海拔 6000 m 水平[即大气压为 354 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),氧分压为 74 mmHg],持续低氧 24 h,然后匀速增压至常压后出舱。本实验大鼠出现呼吸急促,100 ~ 130 次/分;

口唇、耳缘及尾部均出现紫绀;活动减少,少食、嗜睡,则认为 HAPE 大鼠制模成功,本次实验制模成功率约为 94.1%。3 只死亡大鼠解剖见肺出血,故剔除。

2. HBO 治疗方法:将大鼠置于实验动物高压氧舱内。温度、湿度及喂养条件不变;纯氧洗舱 10 min,匀速增压 30 min 至 0.2 MPa(2 ATA),稳压吸氧 60 min,氧浓度维持于 95% ~ 99%,持续通风;匀速减压 30 min 出舱。

3. 动物处置和标本留取:予 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉(6 ml/kg 体重),断头放血法处死后取新鲜肺组织,右肺上中叶置于液氮中保存,用于 Western Blot 检测;右肺下叶置于 4% 多聚甲醛中固定,观察病理变化。

三、测定指标

1. Western Blot 定量检测 AQP1 和 AQP5:取 20 mg 冷冻组织,将每 10 mg 组织加入 200 μ l 蛋白裂解液,用玻璃研磨器在冰上匀浆。向预冷的 1.5 ml 试管中加入匀浆液,放在冰上 15 min,待其充分裂解。选择温度 4℃,12 000 r/min,离心半径 8 cm,离心 10 min。离心结束后,将上清液分装到 0.5 ml 的离心管中,在冰箱内 -20℃ 保存。

严格按照细胞蛋白提取试剂盒说明书操作,电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、显色或曝光,将显色后的膜或底片照相,并用 LabWorks 软件对图像进行灰度分析。以正常对照组的灰度值为 1.00,计算其它各组的相对灰度值。

2. 肺组织病理观察及病理损伤评分:右肺下叶肺组织予 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、组织切片、HE 染色。普通光学显微镜下观察肺组织病理。参照文献方法^[7]就下述 4 项进行肺病理损伤评分:肺间质水肿、肺泡水肿、炎症细胞浸润和肺泡出血。评分标准:0 分,无病理损伤;1 分,病理损伤占整个视野 25%;2 分,病理损伤占整个视野 50%;3 分,病理损伤占整个视野 75%;4 分,病理损伤全视野。在高倍镜($\times 40$ 倍)下每张切片随机选定 3 个视野,观察上述表现,取其平均值为该大鼠肺病理损伤积分。

四、统计学处理

使用 SPSS 15.0 版统计软件包进行统计学处理,计数资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验进行组间差异比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、肺组织 AQP1 和 AQP5 的表达

1. AQP1 的表达:HAPE 组 AQP1 表达较正常对照组显著降低($P < 0.01$);2HBOT 组较 HAPE 组的 AQP1 表达增强($P < 0.05$);NOT 组与 2HBOT 组比较,

AQP1 表达均降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 5 组大鼠损伤评分及 AQP1 和 AQP5 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	损伤评分(分)	相对灰度值	
			AQP1	AQP5
正常对照组	8	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
HAPE 组	12	4.46 ± 1.54 ^{ab}	0.58 ± 0.20 ^{ac}	0.75 ± 0.12 ^{ac}
1HBOT 组	12	3.17 ± 1.83 ^c	0.76 ± 0.16	0.80 ± 0.14 ^c
2HBOT 组	12	1.30 ± 0.73	0.87 ± 0.11	0.96 ± 0.14
NOT 组	12	3.29 ± 2.27 ^c	0.75 ± 0.27	0.84 ± 0.18

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与 2HBOT 组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$

2. AQP5 的表达:HAPE 组 AQP5 表达较正常对照组显著降低($P < 0.01$);2HBOT 组较 HAPE 组的 AQP5 表达增强($P < 0.05$);2HBOT 组较 1HBOT 组的 AQP5 表达亦增强,且差异有统计学意义($P < 0.05$);NOT 组 AQP5 表达较 1HBOT 组稍有增高,但较 2HBOT 组降低,组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

二、病理学改变比较

肉眼观察模型组大鼠肺肿胀饱满,肺膜下点、片状瘀血及出血;HAPE 组较正常对照组、1HBOT 组、2HBOT 组、NOT 组变化显著。光镜下可见肺泡间隔增宽,间质疏松水肿,毛细血管扩张、充血,淋巴细胞、中性粒细胞浸润等间质型肺水肿表现。肺组织损伤程度:除正常对照组外,光镜下可见 HAPE 组、NOT 组、1HBOT 组和 2HBOT 组大鼠的肺泡间隔增宽、毛细血管扩张充血、炎性细胞浸润等间质型肺水肿表现依次减轻(详见图 1)。

讨 论

一、水通道蛋白与 HAPE

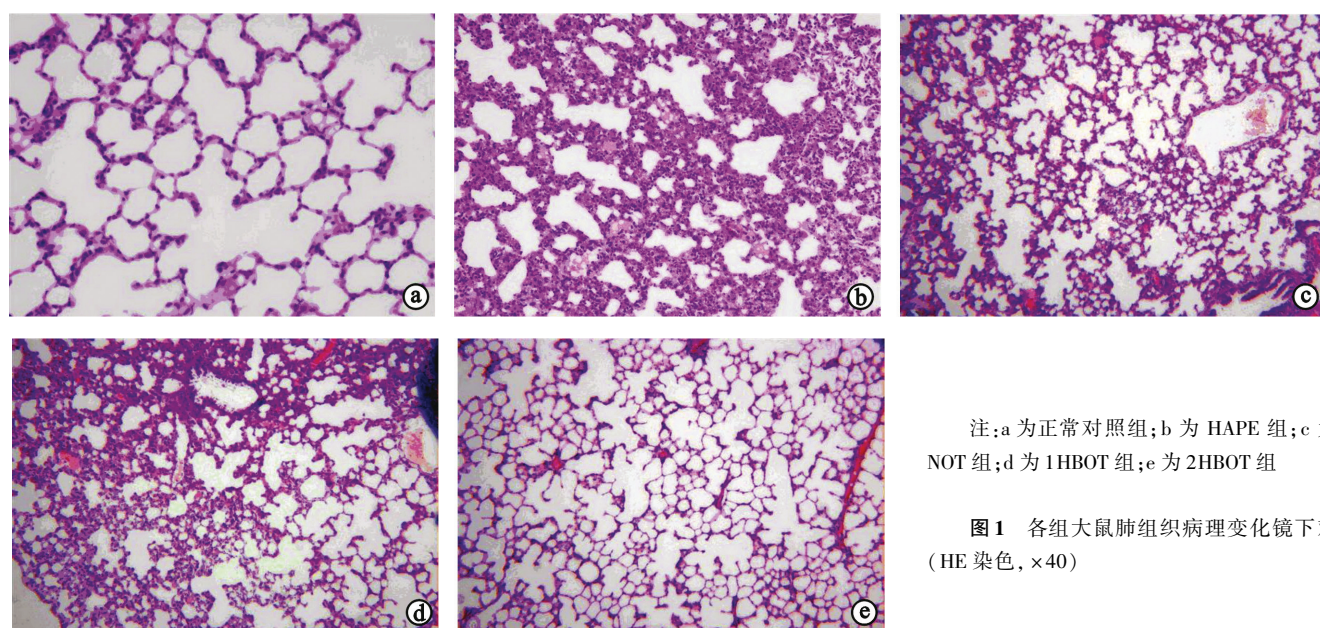
HAPE 形成机制尚不明确,很多报道^[8-10]认为,HAPE 与肺动脉高压、肺血管渗透性增加、肺泡对钠水贮留的清除障碍等关系密切。在肺组织,肺泡内水的转运主要有 2 种途径:①伴随钠主动转运的被动转运;②经肺泡上皮水通道的跨细胞膜转运,通过肺毛细血管内皮细胞、肺泡 I 型上皮细胞来完成。肺毛细血管内皮细胞和肺泡 I 型上皮细胞膜上主要分布 AQP1 和 AQP5,清除间质和肺泡内的液体,使肺泡毛细血管间水的转运达到平衡。高原低氧可损伤上述细胞,使得 AQP1 和 AQP5 表达降低,渗出增加,导致肺水肿。本研究结果也证实,HAPE 组的 AQP1 和 AQP5 表达明显低于正常。

二、HAPE 模型的建立

本研究通过应用动物低压舱模拟 6000 m 高原,制作急性 HAPE 大鼠动物模型。肺水肿分为间质型和肺泡型两种类型,是 HAPE 从轻到重的 2 个发展阶段。间质型肺水肿临床表现较为常见,模型制作相对成熟,所以本实验采用间质型肺水肿模型^[5]。光镜下 HAPE 组肺泡间隔增宽,可见有较多的淋巴细胞、中性粒细胞、蛋白渗出,毛细血管扩张充血,呈典型的间质型肺水肿表现;NOT 组、HBOT 组的上述表现减轻,也说明大鼠模拟高原 HAPE 模型是成功的。

三、HBO 对 HAPE 模型大鼠肺组织 AQP1 和 AQP5 表达的影响及可能机制

本研究结果显示,HBO 治疗能够上调肺 AQP1 和



注:a 为正常对照组;b 为 HAPE 组;c 为 NOT 组;d 为 1HBOT 组;e 为 2HBOT 组

图 1 各组大鼠肺组织病理变化镜下观(HE 染色, ×40)

AQP5 的表达,减轻 HAPE。文献报道,HBO 治疗能够显著降低低氧肺损伤的程度^[6,11]。HBO 调节水通道蛋白(aquaporins,AQPs)表达的可能机制:①通过提高血氧分压、血氧含量和氧储量,调控细胞的信号转导和代谢,星形胶质细胞培养中,低氧会下调 AQP4 和 AQP9 的 mRNA 和蛋白表达,氧浓度提高后,AQPs 水平迅速恢复^[6],脑梗死组织中,AQP4 的免疫反应也增加,推测是低氧到复氧过程促发 AQP4 的转录和表达^[11];②刺激垂体分泌促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone,ACTH),进而刺激肾上腺皮质分泌肾上腺皮质激素^[12],后者可在转录水平诱导肺内 AQPs 的表达^[2];③通过下调 TNF- α 而增强 AQPs 的表达。Towne 等^[13]证实 TNF- α 与 TNF- α 受体 1 结合激活了 NF- κ B 途径,下调 AQP5 的 mRNA 和蛋白表达水平。

目前,急性肺损伤在临床治疗方面,用 HBO 和 NOT 是否存在明显不同尚有争议。本研究结果显示,2HBOT 组与 NOT 组的病理损伤比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 2 组的 AQPs 比较,差异没有统计学意义,分析可能因素如下:①与低压舱内暴露时间短有关,形成的模型肺水肿程度较轻,模拟高原环境的大鼠在 2~3 d 肺含水量明显增加,而后 4~7 d 呈减少趋势^[4];而本研究模型制作时间仅为 24 h;②采集标本需在大鼠出舱后进行,而出舱的过程实际为一个加压过程,这可能使已形成低压低氧肺损伤甚至 HAPE 的大鼠肺损伤有所减轻,本研究没有设置 HAPE 组与 2HBOT 组对照,需在进一步研究中观察;③样本数量较小。

本研究表明,HAPE 大鼠行 2 次 HBO 治疗比行 NOT 和 1 次 HBO 治疗的效果更好,有利于减轻肺水肿。但长程 HBO 是否比短程治疗更有效,有待大样本对比研究和临床研究进一步证实。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会第三次全国高原医学学术讨论会. 我国高原病命名、分型及诊断标准. 高原医学杂志, 2010, 20:9-11.
- [2] 陈有,高钰琪,李素芝. 肺水通道蛋白与高原肺水肿动物模型复制研究进展. 西南国防医药, 2009, 19:357-358.
- [3] 陈真英. 高压氧治疗重症急性高原病并发 MODS 的疗效分析. 高原医学杂志, 2008, 18:29-30.
- [4] Itoh T, Rai T, Kuwahara M, et al. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatix acinar cells. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330:832-838.
- [5] 徐登云,王之贤,杨惠彬,等. 大白鼠模拟低氧性间质肺水肿的形态学研究. 解放军预防医学杂志, 1996, 14:246-250.
- [6] 刘丽红,程波. 高压氧治疗高原肺水肿 90 例疗效观察. 西南军医, 2008, 10:49-50.
- [7] Su X, Bai C, Hong Q, et al. Effect of continuous hemofiltration on hemodynamics, lung inflammation and pulmonary edema in a canine model of acute lung injury. Intensive Care Med, 2003, 29:2034-2042.
- [8] 罗德成,王仁鹏,罗刚,等. 实验性高原肺水肿发病机制的初步研究. 中国应用生理学杂志, 1994, 10:209-212.
- [9] 高明东,加永泽培. 高原肺水肿发病机制研究进展. 西藏医药杂志, 2005, 26:14.
- [10] 李素芝,王洪斌,蔡志翔,等. 高原肺水肿治疗研究进展. 西南军医, 2008, 10:99-100.
- [11] 山見信夫,鈴木一雄,合志清隆,他. 高気圧酸素療法における適応疾患の見直しと再編 - 特に国内の臨床報告と基礎研究及び国外のランダム化比較試験などからの提案 -. 日本高気圧環境・潜水医学会雑誌, 2009, 44:1-38.
- [12] 张德良,李宇胜. 高压氧舱治疗急性高原肺水肿 124 例临床分析. 医学理论与实践, 2005, 18:1302-1303.
- [13] Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, et al. Tumor necrosis factor- α inhibits Aquaporin-5 expression in mouse lung epithelial cells. J Biol Chem, 2001, 276:18657-18664.

(修回日期:2012-09-10)

(本文编辑:汪 玲)

《中华物理医学与康复杂志》第七届编辑委员会通讯编委名单

(按姓氏笔画排序)

马 超	尹 勇	王俊华	王楚怀	王蓓蓓	白玉龙	刘雅丽	孙乐蓉	毕 胜
许 涛	许光旭	余 茜	张载福	李 丽	李铁山	李雪萍	杨卫新	汪 萍
汪 琴	汪军民	陆 敏	陈 刚	陈 翔	范晓华	姜志梅	胡昔权	胥方元
商晓英	舒 彬	谢 明	虞乐华					