

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.03.001

文章编号: 1005-8982 (2021) 03-0001-05

呼吸系统疾病专题·论著

水孔蛋白-5在机械通气致急性肺损伤大鼠肺组织中的表达研究*

陈美羽, 赵毓静, 张新日

(山西医科大学第一医院 呼吸与危重症学科, 山西 太原 030001)

摘要: 目的 探讨水孔蛋白-5(AQP-5)在不同机械通气时间致大鼠急性肺损伤(ALI)肺组织中的表达。**方法** 将30只SD大鼠,按照机械通气时间不同,完全随机分为对照组、0.5 h组、1.0 h组、1.5 h组和2.0 h组,每组6只。通过肺组织大体标本图、肺系数、HE染色,观察肺组织水肿及损伤程度;采用病理切片染色评分法评估各组肺组织中AQP-5表达量。**结果** 5组肺系数、AQP-5染色强度评分和AQP-5阳性细胞占比评分比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肺系数与AQP-5染色强度评分呈负相关($r_s = -0.925$, $P < 0.05$);肺系数与AQP-5染色阳性细胞占比评分之间呈负相关($r_s = -0.951$, $P < 0.05$)。**结论** 随着机械通气时间延长,肺水肿程度逐渐加重,肺组织中AQP-5表达量逐渐减少,表明AQP-5参与机械通气致肺水肿的发生、发展。

关键词: 急性肺损伤;肺水肿;水孔蛋白-5;机械通气

中图分类号: R563

文献标识码: A

Expression of aquaporin-5 in lung tissue of rats with acute lung injury induced by different mechanical ventilation times*

Mei-yu Chen, Yu-jing Zhao, Xin-ri Zhang

(Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, The First Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Aquaporin-5 (AQP5) in the lung tissues of rats with acute lung injury (ALI) induced by different mechanical ventilation times. **Methods** 30 male SD rats were selected and randomly divided into 5 groups according to different hours of mechanical ventilation, namely the control group, 0.5 h group, 1.0 h group, 1.5 h group, and 2.0 h group, with 6 rats in each group. Observation indicators, such as lung tissue edema and injury degree by gross specimen of lung tissue, lung coefficient, and HE staining, were detected. Immunohistochemistry was used to evaluate the expression of AQP5 in lung tissue of each group with pathological section staining and scoring. **Results** Five groups of lung coefficient, AQP5 staining intensity score, and AQP5 positive cell proportion score were compared respectively. After analysis of variance, the differences were statistically significant ($F = 376.693$, 207.522 and 216.311 , all $P < 0.05$). Lung coefficient was negatively correlated with AQP5 staining intensity score ($r_s = -0.925$, $P < 0.05$); lung coefficient was negatively correlated with AQP5 staining positive cell proportion score ($r_s = -0.951$, $P < 0.05$). **Conclusion** With the extension of mechanical ventilation time, the degree of pulmonary edema gradually increased and the expression of AQP5 in lung tissue gradually decreased, which indicated AQP5 is involved in the occurrence and development of pulmonary edema induced by mechanical ventilation.

Keywords: acute lung injury; pulmonary edema; aquaporin 5; respiration, artificial

收稿日期: 2020-08-03

* 基金项目: 山西省重点研发计划项目 (No: 201803D31093); 中央引导地方科技发展专项资金项目 (No: YDZX20191400002737)

[通信作者] 张新日, E-mail: ykdzxr61@163.com

慢性阻塞性肺疾病、哮喘、呼吸衰竭等疾病是呼吸系统常见病,临床通过机械通气进行呼吸支持治疗,维持患者血氧饱和度。但机械通气时间过长,通气量过大,可出现机械通气相关性肺损伤,对肺组织造成二次打击,严重时可导致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)或急性呼吸窘迫综合征发生。ALI主要病理生理特征是弥漫性肺泡水肿和肺泡液清除率下降,肺泡上皮细胞损伤和肺毛细血管内皮细胞通透性升高,肺泡腔内富含蛋白和炎症细胞因子的水肿液,破坏肺泡细胞表面气液交换屏障的平衡,导致急性呼吸窘迫综合征发生^[1-2]。

水孔蛋白-5(Aquaporin-5, AQP-5)位于I型肺泡上皮细胞,是调节水分子转运的功能性蛋白,生理状态下可协助清除肺泡腔内多余水分,保持肺泡腔干燥环境^[3]。但AQP-5在ALI过程中对水肿液清除作用的机制仍不明确。多项研究显示^[4-7],不同类型损伤因素致ALI条件下,AQP-5表达趋势不稳定。本研究通过大潮气量机械通气快速复制大鼠ALI模型^[8],观察在不同的机械通气时间下,AQP-5在肺组织中表达的变化,探讨其在机械通气致ALI中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级健康雄性SD大鼠30只,体重270~320 g,均由山西医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号[SCXK(晋)2015-0001]。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗鼠AQP-5一抗(武汉博士德生物公司,编号:BA2205),SABC免疫组织化学染色试剂盒[即用型SABC-POD(兔IgG),武汉博士德生物公司,编号:SA1022],RWD407型小动物呼吸机(深圳瑞沃德公司)。

1.3 方法

将30只大鼠按照不同的机械通气时间,完全随机分为对照组、0.5 h组、1.0 h组、1.5 h组和2.0 h组,每组6只。适应性饲养1周,实验前12 h禁食,自由饮水。大鼠称重并记录,用于计算麻醉剂量和肺系数。水合氯醛(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,仰卧位置于小动物实验台上,颈前剪毛备

皮消毒,沿颈部正中纵向切开约1.5 cm,逐层钝性分离皮肤及皮下肌肉组织,暴露气管。

对照组大鼠行气管切开,保持气道通畅,自由呼吸室内空气(吸氧浓度21%),不给予机械通气。2 h后行常规胸、腹部消毒,逐层打开腹腔并暴露腹主动脉,迅速放血处死,处置方法符合动物伦理学标准。快速打开胸腔,钝性分离组织取出肺脏,立即置于预冷的生理盐水中漂洗2、3次,用无菌纱布吸干肺表面水分。留取肺大体标本,用于观察肺组织大体形态损伤程度;取右肺称湿重,用于计算肺系数,评估肺组织水肿程度;取左肺于4%多聚甲醛溶液中固定24 h后进行HE染色和免疫组织化学染色,光镜下观察肺组织损伤程度和检测各组肺组织中AQP-5的表达。

0.5 h组、1.0 h组、1.5 h组和2.0 h组大鼠行气管切开后连接小动物呼吸机,呼吸室内空气(吸氧浓度21%),分别给予机械通气0.5 h、1.0 h、1.5 h和2.0 h,4组呼吸机参数设置一致: $V_T=30$ ml/kg, I:E为1:1, PEEP为0 cmH₂O, RR为60次/min。4组大鼠机械通气结束后立即处死留取标本,处置方法同对照组大鼠。

1.4 观察指标

1.4.1 HE和免疫组织化学 各组大鼠肺组织经过多聚甲醛固定,酒精梯度脱水,二甲苯透明石蜡包埋冷却,制成4 μ m厚切片,过夜烤片。HE染色:二甲苯、酒精梯度进行组织脱蜡,苏木精-伊红染色,酒精、二甲苯梯度脱水,风干后树胶封片,光镜下观察各组肺组织损伤程度。免疫组织化学:组织脱蜡,枸橼酸盐高压抗原热修复,5% BSA封闭液封闭,孵育兔抗鼠AQP-5一抗(1:100) 37℃ 1 h, SABC免疫组织化学染色试剂盒二抗孵育, DAB显色,苏木精复染,封片,光镜下观察并评估各组肺组织中AQP-5的表达。

1.4.2 肺系数 通过肺系数显示肺组织水肿损伤程度。分别称量机械通气前大鼠体重和右肺组织重量,计算肺系数:肺湿重(g)/体重(kg) × 100%,肺系数越大表示肺水肿程度越严重。

1.4.3 AQP-5免疫组织化学染色结果判定方法 采用染色强度评分和AQP-5阳性细胞占比评分^[9]判定AQP-5染色结果。每组取6张切片,每张切片随机选择3个视野,以肺泡上皮细胞顶膜出现棕黄

色颗粒为阳性细胞。首先按照染色强度评分:棕褐色为3分,棕黄色为2分,浅黄色为1分,无色为0分;再按阳性细胞占视野内细胞的百分比评分:>75%为4分,75%~>50%为3分,50%~>10%为2分,≤10%为1分,阴性为0分。评分越高表示肺组织中AQP-5表达越多。

1.5 统计学方法

数据分析采用SPSS 22.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验,相关分析用Spearman

法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织大体标本

对照组大鼠肺组织大体标本体积正常,表面光滑,色泽粉嫩,质软(见图1A);与对照组比较,0.5 h组、1.0 h组、1.5 h组和2.0 h组大鼠肺组织体积增大,肺叶边缘外翻,有弥漫性出血,质韧(见图1B~E中箭头所示)。表明机械通气时间的延长对肺组织大体形态改变有影响。

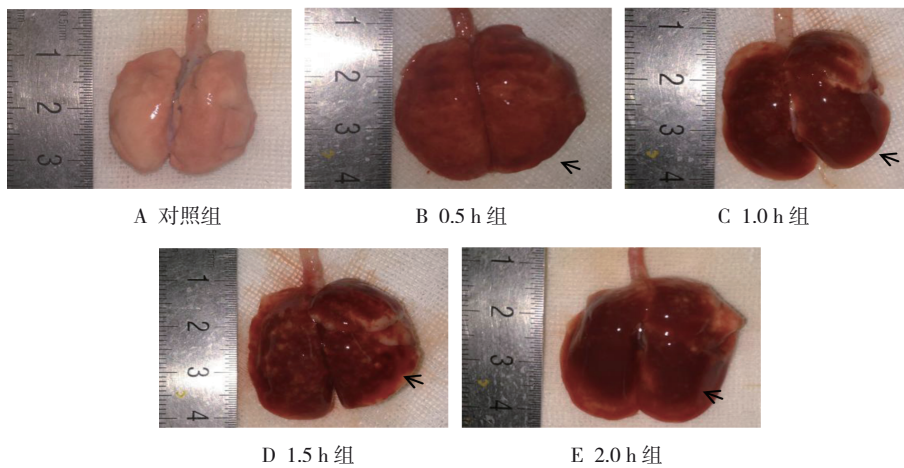


图1 各组大鼠肺组织大体标本

2.2 各组大鼠肺系数比较

各组大鼠肺系数比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);进一步两两比较,1.0 h组和1.5 h组大鼠肺系数差异无统计学意义($P > 0.05$);其余各组大鼠肺系数组间两两比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.3 各组大鼠肺组织HE染色结果

对照组大鼠肺泡腔大小正常,形态规整,肺泡壁完整、无炎症细胞浸润,肺间质无水肿(见图2A);与对照组比较,0.5 h组、1.0 h组、1.5 h组和2.0 h组大鼠肺泡壁可见不同程度破裂、肺大泡形成,肺泡腔内有红细胞及粉红色水肿液渗出,肺间质水肿、炎症细胞浸润(见图2B~E中箭头所示),为典型ALI病理形态学特征,表明机械通气致大鼠ALI模型复制成功。

2.4 各组大鼠肺组织免疫组织化学染色结果

对照组大鼠肺组织染色均匀一致、呈棕褐色

表1 各组大鼠肺系数比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	肺系数
对照组	1.18 ± 0.035
0.5 h组	2.24 ± 0.119 ^①
1.0 h组	3.33 ± 0.072 ^{①②}
1.5 h组	3.41 ± 0.202 ^{①②}
2.0 h组	4.03 ± 0.200 ^{①②③④}
<i>F</i> 值	376.693
<i>P</i> 值	0.001

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与0.5 h组比较, $P < 0.05$;③与1.0 h组比较, $P < 0.05$;④与1.5 h组比较, $P < 0.05$ 。

(见图3A);与对照组比较,0.5 h组、1.0 h组、1.5 h组和2.0 h组大鼠肺组织染色不均匀,呈现棕黄色、浅黄色,AQP-5表达逐渐减少甚至无(见图3B~E中箭头所示)。表明机械通气时间对肺组织中AQP-5表达有显著影响。

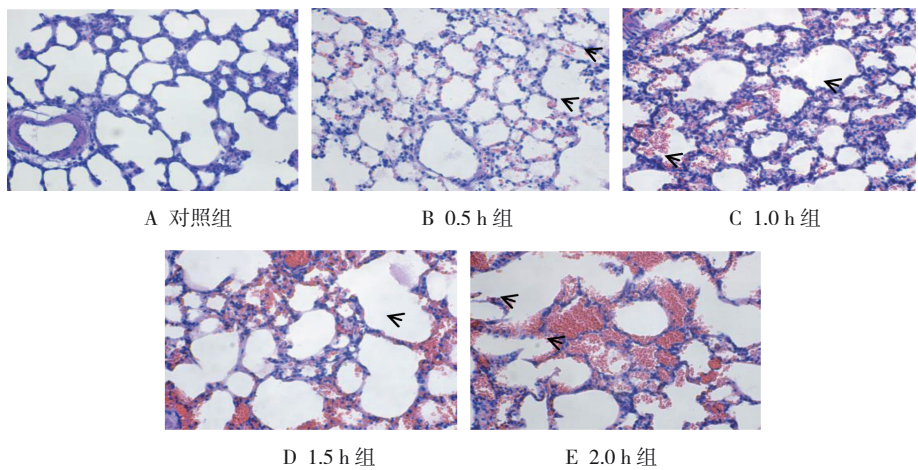


图2 各组大鼠肺组织病理切片HE染色图 (×100)

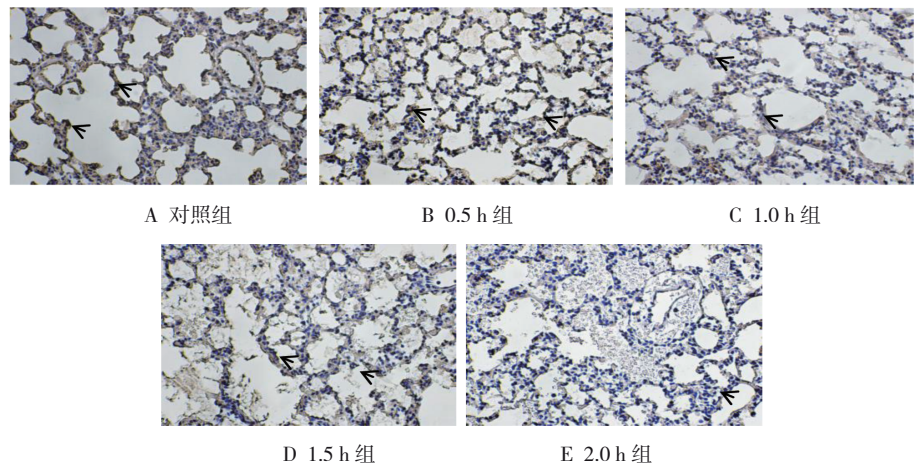


图3 各组大鼠肺组织病理切片免疫组织化学染色图 (×100)

2.5 各组大鼠肺组织 AQP-5 免疫组织化学染色强度评分与阳性细胞占比评分比较

各组大鼠肺组织 AQP-5 免疫组织化学染色强度评分和 AQP-5 阳性细胞占比评分比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；进一步两两比较，1.0 h 组和 1.5 h 组 AQP-5 染色强度评分和 AQP-5 阳性细胞占比评分比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；其余各组 AQP-5 染色强度评分和 AQP-5 阳性细胞占比评分两两比较，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

2.6 肺系数与 AQP-5 免疫组织化学染色强度评分和阳性细胞占比评分的相关性

肺系数与 AQP-5 免疫组织化学染色强度评分呈负相关 ($r_s=-0.925$, $P=0.001$)；肺系数与免疫组织化学 AQP-5 染色阳性细胞占比评分之间呈负相关 ($r_s=-0.951$, $P=0.001$)。

表 2 各组大鼠肺组织免疫组织化学 AQP-5 染色评分比较 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	染色强度评分	阳性细胞占比评分
对照组	2.80 ± 0.11	3.80 ± 0.13
0.5 h 组	2.50 ± 0.13 ^①	3.60 ± 0.18 ^①
1.0 h 组	1.40 ± 0.26 ^{①②}	2.40 ± 0.16 ^{①②}
1.5 h 组	1.30 ± 0.18 ^{①②}	2.20 ± 0.19 ^{①②}
2.0 h 组	0.40 ± 0.22 ^{①②③④}	0.70 ± 0.27 ^{①②③④}
F 值	207.522	216.311
P 值	0.001	0.001

注：①与对照组比较, $P<0.05$; ②与 0.5 h 组比较, $P<0.05$; ③与 1.0 h 组比较, $P<0.05$; ④与 1.5 h 组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

水孔蛋白家族被发现以来，已有 13 种 AQP 亚型，特异性分布于人体各器官组织中^[10]。AQP 的分子量约 28 kD，是一种含有胞质 N-始端和 C-末端的

跨膜通道蛋白,由H1~H6 6个跨膜片段组成,两两间相互靠近,共形成A~E 5个“环区”。B区和E区反向平行接近形成“沙漏模型”,即疏水孔。中心孔开关的活性由门控或细胞膜中AQP5的丰度来调节,这种狭窄性空间构型决定了水孔的渗透选择性^[11]。

在肺组织中,AQP-5表达于I型肺泡上皮细胞顶膜近换气侧,水分子的转移依赖跨肺泡上皮和肺微血管内皮细胞的渗透梯度完成^[3,11]。MA^[5]发现敲除AQP-5基因,肺泡透水性较生理状态下可降低10倍,表明AQP-5介导肺泡上皮细胞的水分子跨膜转运机制。刘洋等^[6]发现在不同潮气量机械通气中,大潮气量组肺组织中AQP-5表达量下调,可能与肺水肿发生机制有关。可见,AQP-5的表达与急性肺水肿互为因果,相互促进。PIRES-NETO等^[7]研究结果显示,AQP-5的表达量在不同病因致急性呼吸衰竭患者的肺组织中均增加,认为AQP-5对肺损伤的反应可能随时间波动,并与肺损伤的强度和类型有关。本研究采用大潮气量机械通气诱导大鼠ALI,研究结果显示,与对照组大鼠相比,随着通气时间延长,各机械通气组肺组织体积逐渐增大,光镜下可见肺泡壁破裂、肺泡腔及肺间质内水肿液渗出、炎症细胞浸润等细胞形态学的损伤程度逐渐加重,肺系数逐渐升高,提示肺水肿程度逐渐增加;而AQP-5在肺组织中的表达逐渐减少。相关性分析结果显示,肺系数与肺组织AQP-5免疫组织化学染色评分呈负相关。

FABREGAT等^[12]发现在低潮气量机械通气大鼠肺组织中,AQP-5表达随着暴露时间的延长而增加,肺水肿程度逐渐减轻,认为AQP-5对肺组织有保护作用。在本研究中值得关注的是,1.0 h组和1.5 h组肺系数结果比较,差异无统计学意义,可以反映出在持续机械通气过程中,肺水肿加重程度呈现短暂的缓慢趋势。结合免疫组织化学结果,1.0 h组和1.5 h组AQP-5染色强度评分比较,差异无统计学意义,AQP-5在1.0 h组和1.5 h组肺泡上皮细胞膜的表达仅占对照组肺组织细胞的50%左右,这部分肺组织中的AQP-5可能对肺泡水肿液清除存在代偿机制,减缓肺水肿的进一步发生。但这种代偿机制并非持续作用,随着通气时间延续到2 h,肺泡上皮细胞及血管内皮完整性破坏严重,AQP-5表达下降,AQP-5对水通量的调节超过正常转运限度,对肺水清除出现失代偿。由此可见,AQP-5参与机械通气致肺水肿的发生、发展,对肺泡水肿液的及时清除和吸收起到关

键作用。

综上所述,随着机械通气时间延长,肺水肿程度逐渐加重,肺组织中AQP-5表达逐渐减少,表明AQP-5参与机械通气致肺水肿的发生、发展。

参考文献:

- [1] DERWALL M, MARTIN L, ROSSAINT R. The acute respiratory distress syndrome: pathophysiology, current clinical practice, and emerging therapies[J]. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2018, 12(12): 1021-1029.
- [2] 凌亚豪,魏金锋,王爱平,等. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征发病机制的研究进展[J]. *癌变·畸变·突变*, 2017, 29(2): 151-154.
- [3] WITTEKINDT O H, DIETL P. Aquaporins in the lung[J]. *Pflugers Archiv*, 2019, 471(4): 519-532.
- [4] VASSILIOU A G, MANITSOPOULOS N, KARDARA M, et al. Differential expression of aquaporins in experimental models of acute lung injury[J]. *In Vivo*, 2017, 31(5): 885-894.
- [5] MA T H, NORIMASA FUKUDA, SONG Y L, et al. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(1): 93-100.
- [6] 刘洋,王月兰,宋秀梅,等. 机械通气相关性肺损伤大鼠肺组织水通道蛋白5表达的变化[J]. *中华麻醉学杂志*, 2010, 30(2): 234-237.
- [7] PIRES-NETO R C, BERNARDI F D, de ARAUJO P A, et al. The expression of water and ion channels in diffuse alveolar damage is not dependent on DAD etiology[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166184.
- [8] 赵毓静,曹大伟,张新日. Cav-1和TNF- α 在机械通气联合高氧致大鼠急性肺损伤中的表达研究[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(4): 258-262.
- [9] 田君才,杜国亮,张桂霞. 人工免疫组化判定结果与灰度值相关性[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010, 26(1): 112-113.
- [10] RUMP K, ADAMZIK M. Function of aquaporins in sepsis: a systematic review[J]. *Cell and Bioscience*, 2018, 8: 10.
- [11] DIREITO I, MADEIRA A, BRITO M A. Aquaporin-5: from structure to function and dysfunction in cancer[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(8): 1623-1640.
- [12] FABREGAT G, GARCÍA-de-la-ASUNCIÓN J, SARRIÁ B, et al. Increased expression of AQP 1 and AQP 5 in rat lungs ventilated with low tidal volume is time dependent[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114247.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 陈美羽,赵毓静,张新日. 水孔蛋白-5在机械通气致急性肺损伤大鼠肺组织中的表达研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(3): 1-5.

Cite this article as: CHEN M Y, ZHAO Y J, ZHANG X R. Expression of aquaporin-5 in lung tissue of rats with acute lung injury induced by different mechanical ventilation times[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(3): 1-5