

心衰鼠肺水通道蛋白表达变化及内皮素受体拮抗剂对其的影响

陈筱潮, 伍卫, 方昶, 罗年桑, 刘英梅, 张旭明

(中山大学附属第二医院心内科, 广东广州 510120)

摘要:【目的】观察充血性心力衰竭大鼠肺组织水通道蛋白(Aquaporins, AQP)表达的变化及选择性内皮素受体 A (endothelin receptor A, ETA)拮抗剂 FR139317 对其的影响。【方法】40 只行左冠状动脉结扎致心肌梗死的大鼠随机分为心衰组和心衰治疗组, 心衰治疗组予以 FR139317 每天 1 mg/kg 皮下注射, 共 6 周, 另 7 只接受假手术的大鼠组成空白对照组。测定血液动力学参数, 放射免疫法(RIA)测血浆内皮素-1 浓度, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法定量检测肺组织 AQP4 和 AQP5 mRNA 的表达。【结果】空白对照组、心衰组和心衰治疗组肺组织 AQP4 mRNA 的相对水平为(0.56 ± 0.12)、(0.20 ± 0.08)及(0.36 ± 0.14), $P < 0.001$; AQP5 mRNA 相对水平为(0.64 ± 0.17), (0.09 ± 0.03)及(0.38 ± 0.12), $P < 0.001$ 。AQP4、AQP5 mRNA 的表达与肺质量与体质量比值呈显著负相关, 与左心室舒张末压力也呈显著负相关。【结论】心力衰竭大鼠肺组织 AQP 的表达下降, 内皮素受体拮抗剂 FR139317 对 AQP 表达起一定的调节作用。

关键词: 心力衰竭, 充血性; 水通道蛋白; 内皮素受体

中图分类号: R541.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)05-0341-04

Expression of Aquaporins in Pulmonary Tissue of Rats with Congestive Heart Failure and the Effects of Endothelin Antagonist Treatment CHEN Xiao-chao, WU Wei, FANG Chang, LUO Nian-sang, LIU Ying-mei, ZHANG Xu-ming. (Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract 【Objectives】To investigate the expression of aquaporins in pulmonary tissue of rats with congestive heart failure and the effects of a selective endothelin subtype A receptor antagonist FR139317 on it. 【Methods】Forty rats received operation of left coronary artery obligation were randomly divided into congestive heart failure (CHF) group and congestive heart failure treatment (CHF+FR) group. The CHF+FR group was treated with FR139317 injection subcutaneously at the dose of 1 mg/kg per day for 6 weeks. Seven rats received sham operation served as the normal control group (Control). Hemodynamic parameters were measured at the end of study. Concentration of plasma endothelin-1 was detected by means of RIA, while the expression of AQP4 and AQP5 in lung was quantified via RT-PCR. 【Results】The expression of AQP4 mRNA in pulmonary tissue of the control group, the CHF group and the CHF+FR group were 0.56 ± 0.12 , 0.20 ± 0.08 and 0.36 ± 0.14 ($P < 0.001$) respectively, while that of AQP5 mRNA in the three groups above were 0.64 ± 0.17 , 0.09 ± 0.03 and 0.38 ± 0.12 ($P < 0.001$) respectively. Expression of both AQP4 and AQP5 were negatively correlated with the ratio of lung mass to body mass. There were also significant correlations between the left ventricular end diastolic pressure and the expressions of both AQP4 and AQP5. 【Conclusion】The study demonstrates that the expression of aquaporins in lung decreases in rats with congestive heart failure and treatment with a selective endothelin receptor A antagonist increases the level of aquaporins mRNA.

Key words: heart failure, congestive; aquaporins; endothelin receptor

肺水肿是充血性心力衰竭最常见和最严重的并发症之一, 但心功能衰竭影响肺组织内水平衡失调的分子机制目前知之不多。水通道蛋白(aquaporins, AQP)是一组位于细胞膜上具有高度选择性的同源蛋白质, 在维持机体水平衡中起重要的作用, 目前已知在肺组织中主要存在 4 种 AQP^[1]。内皮素在心力衰竭的发生和发展中起的作用已为多项研究所证实。我们既往的研究显示^[2], 在心衰

大鼠中予以内皮素受体 A 选择性拮抗剂 FR139317 治疗, 明显改善血液动力学并提高心衰大鼠的生存率。对于心力衰竭过程中肺组织 AQP 的变化规律及其可能的影响因素, 目前知之不多。为此, 本研究建立了大鼠充血性心力衰竭模型, 观察水通道蛋白 4(AQP4)和水通道蛋白 5(AQP5)在肺组织中表达的变化, 研究选择性内皮素受体 A (endothelin receptor A, ETA)拮抗剂 FR139317 对其的影响。

收稿日期: 2001-12-10

基金项目: 卫生部国际交流中心默沙东科研基金资助项目(1997)

作者简介: 陈筱潮(1967-), 男, 浙江上虞人, 博士, 副教授。

1 材料和方法

1.1 动物模型

雄性 Wistar 大鼠(Ⅱ级,证书号:99A004), 质量 200~300 g。采用结扎大鼠左冠状动脉致心肌梗死心力衰竭的动物模型^[3]。方法简述如下:戊巴比妥钠(30 g/L)30 mg/kg 腹腔内麻醉,气管插管,机械通气,左侧第四肋间开胸,充分暴露心脏,结扎左冠状动脉近端后逐层缝合。术后 24 h 内死亡率 40%。

1.2 动物分组与处理

左冠状动脉结扎术后 1 周存活的 40 只大鼠随机分成 2 组,每组 20 只。其中一组接受 FR139317 (日本 Fujisawa Pharmaceutical Co, Ltd 生产,第一军医大学南方医院心内科吴平生教授惠赠),每天 1 mg/kg 皮下注射,共 6 周,称为心衰治疗组(CHF+FR);另一组予以生理盐水皮下注射,共 6 周,为心衰组(CHF);另 7 只接受假手术的大鼠组成空白对照组(Control),饲养 7 周。

1.3 血液动力学及血浆内皮素浓度测定

末次给药后 24 h 测定血液动力学参数。戊巴比妥钠麻醉,分别经右颈总动脉和颈外静脉内插入 PE50 左、右心导管,测左心室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, p_{LVED})、平均动脉压和右房压。在动物达到稳定状态后记录血液动力学参数并在 20 min 内完成。内皮素放免检测药盒由中国人民解放军总医院提供,具体方法按制造商之操作指示。

1.4 AQP4 和 AQP5 在肺组织中表达的检测

采用 RT-PCR 法。异硫氰酸胍一步法提取肺组织总 RNA 并测定 RNA 的浓度和纯度。从 GenBank 下载大鼠 AQP4 (AF144082) 和 AQP5 (U16245) 基因序列,以 DNASIS 7.21 版本软件分析设计引物,其中 AQP4 的一对引物为: Sense, 631-652, 5'-AGCATGAATCCAGCTCGATCC-3'; Anti-sense, 1071-1092, 5'-GATGTGAAACAAGAAACCCGC-3', 产物 461 bp。AQP5 的一对引物为: Sense, 761-782, 5'-GCCATCCTCTATTCTACCTGC-3'; Anti-sense, 958-978, 5'-GCTTCAAACCTCTTCGTCTTCC-3', 产物 218 bp。以 β -actin 为内参照(β -actin 引物序列 Sense, 5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGA C-3', Anti-sense, 5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3'), 引物由 Roche

公司试剂部生产的 Titan™ One Tube RT-PCR 试剂盒提供,产物 587 bp。RT-PCR 采用 Titan™ One Tube RT-PCR 试剂盒(Roche 公司试剂部)。每个反应加总 RNA 1 mg,上、下游引物各 50 pmol,逆转录酶、Taq 酶, RNasin、dNTP 及 Buffer 均按照试剂盒说明加样。45 °C 逆转录 1 h, 94 °C 变性 2 min, 继以 PCR 扩增,扩增条件如下:变性 94 °C, 30 s, 退火(AQP4 62 °C, AQP5 58 °C)30 s, 延伸 68 °C, 1 min, 共 35 个循环。RT-PCR 产物以 20 g/L 琼脂糖电泳,以目的基因 cDNA 与 β -actin cDNA 质量的比值表示目的基因 mRNA 表达的相对强度。

1.5 统计学处理

所有计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间计量资料的比较采用 ANOVA 方法,计数资料采用卡方检验,两个变量之间的相关性分析采用直线相关法。以 SPSS 8.0 统计软件统计。

2 结果

2.1 动物生存情况

治疗 6 周后,心衰组 15 只大鼠存活,心衰治疗组 16 只存活,空白对照组 7 只全存活。

2.2 心肌梗死面积的估算和动物剔除标准

心脏置 100 mL/L 甲醛溶液中保存。大体估算法计算心肌梗死面积^[4],以占左心室重量的百分比表示。心衰组中,存活的 15 只大鼠心肌梗死面积与 p_{LVED} 呈显著的线性正相关($r = 0.98$, $P < 0.001$), 直线方程为: $p_{LVED} = 2.0 + 36.9 \times S_I$ (infarct size)。以 $p_{LVED} \geq 15$ mmHg 为充血性心力衰竭的标准^[3],按单侧 95% 可信区间预测心肌梗死面积超过 35.2% 者可达到充血性心力衰竭的标准,心衰组有 7 只、心衰治疗组中有 9 只大鼠心肌梗死面积超过 35.2%。心肌梗死面积不足 35.2% 者予以剔除,不作统计学处理。2 组大鼠心肌梗死面积无统计学差异[(39±12)% vs (41±14)%]。

2.3 体质量、心、肺质量

3 组大鼠间体质量无差异。心脏质量与体质量的比值,心衰组高于空白对照组,也高于心衰治疗组,均 $P < 0.05$ 。肺脏质量与体质量的比值心衰组高于空白对照组,心衰治疗组低于心衰组,均 $P < 0.05$ (表 1)。

2.4 血液动力学参数及血浆内皮素浓度

心衰组的心率、平均动脉压、左心室舒张末压和平均右房压等均与空白对照组存在明显差异。心

表1 各组体质量及心、肺质量与体质量的比值

Table 1 The ratios of heart mass and lung mass to body mass and body mass in various groups

Group	n	m_B/g	$m_H \times 10^3 / m_B$	$m_L \times 10^3 / m_B$
Control	7	256 ± 51	3.1 ± 0.5	6.4 ± 1.2
CHF	7	240 ± 68	4.1 ± 0.9 ¹⁾	8.5 ± 1.4 ¹⁾
CHF+FR	9	231 ± 48	3.4 ± 0.8 ^{1,2)}	7.5 ± 1.3 ^{1,2)}

1) $P < 0.05$ vs control group; 2) $P < 0.05$ vs CHF group. m_B :

Body mass, m_H : Heart mass, m_L : Lung mass

表2 各组血液动力学参数及血浆内皮素水平

Table 2 Hemodynamic parameters and plasma ET-1 level in various groups

Group	n	n_{HR}/min^{-1}	p_{MA}/mmHg	p_{LVED}/mmHg	p_{MRA}/mmHg	$\rho_{ET-1}/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$
Control	7	374 ± 21	114 ± 11	3.4 ± 1.5	2.6 ± 1.0	2.3 ± 0.8
CHF	7	399 ± 18 ¹⁾	102 ± 10 ¹⁾	22 ± 9.0 ¹⁾	4.5 ± 1.6 ¹⁾	5.8 ± 1.3 ¹⁾
CHF+FR	9	380 ± 16 ²⁾	106 ± 16 ¹⁾	14 ± 7.0 ^{1,2)}	3.1 ± 1.4 ²⁾	4.9 ± 1.5 ^{1,2)}

n_{HR} : heart rate; p_{MA} : mean artery pressure; p_{LVED} : left ventricular end diastolic pressure; p_{MRA} : mean right atrial pressure, 1 mmHg = 0.133

kPa; c_{ET-1} : concentration of plasma ET-1; 1) $P < 0.05$ vs control group, 2) $P < 0.05$ vs CHF group

表3 各组大鼠肺组织 AQP4、AQP5 mRNA

Table 3 Ratio of AQP4 and AQP5 mRNA in lung tissue in various groups

Group	AQP4 cDNA/ β -actin cDNA	AQP5 cDNA/ β -actin cDNA
Control	0.56 ± 0.12	0.64 ± 0.17
CHF	0.20 ± 0.08 ¹⁾	0.09 ± 0.03 ¹⁾
CHF+FR	0.36 ± 0.14 ^{1,2)}	0.38 ± 0.12 ^{1,2)}

1) $P < 0.01$ vs control group, 2) $P < 0.01$ vs CHF group

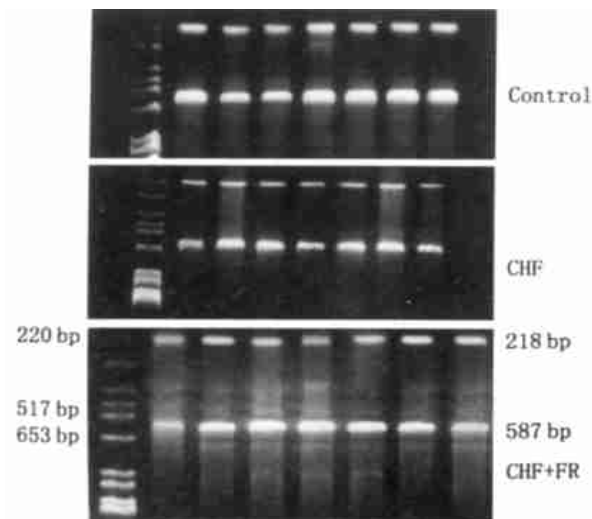


图1 心衰大鼠肺组织 AQP4 基因 mRNA 的表达

Fig. 1 Expression of AQP4 gene mRNA in lung of rats (RT-PCR)

心衰治疗组心率、左心室舒张末压和平均右心房压力均较心衰组有明显改善。心衰组血浆内皮素-1水平明显高于空白对照组,心衰治疗组有所下降,但仍明显高于空白对照组(表2)。

2.5 AQP4、AQP5 的表达及 FR139317 对其的影响

心衰组肺组织 AQP4、AQP5 的表达均明显低于空白对照组,心衰治疗组则高于心衰组,但仍然显著低于空白对照组(表3,图1)。

质量比值的的关系

AQP4、AQP5 的表达与 p_{LVED} 呈显著负相关。其中 AQP4 与 p_{LVED} 负相关 $r = -0.71$, $P < 0.001$; AQP5 与 p_{LVED} 负相关, $r = -0.77$, $P < 0.001$ 。AQP4、AQP5 的表达与肺质量与体质量比值呈显著负相关。其中 AQP4 与肺质量与体质量比值负相关, $r = -0.755$, $P < 0.001$; AQP5 与肺质量与体质量比值负相关, $r = -0.66$, $P < 0.001$ 。

3 讨论

机体内多个重要脏器的生理功能和/或病理过程均涉及到水的转移和平衡,早期的理论认为,机体内不存在跨细胞或跨膜的水分转移,调节组织内水平衡的唯一途径是透过血管内皮或组织上皮的细胞连接间隙进行单纯扩散。近年来水通道蛋白系列的发现给水平衡分子机制的研究中带来了一些突破。目前已知在肺组织中存在4种水通道蛋白,其中 AQP4 分布于小气道上皮,而 AQP5 则分布于 I 型肺泡上皮细胞^[1]。

AQP 参与肺组织水平衡的证据来自以下研究:①在哺乳动物,胚胎肺泡内的大量水分在出生后迅速吸收以过渡到自主呼吸,与此同时,机体肺组织内的 AQP 蛋白表达显著上升^[3];②在转基因动物, AQP_s 基因缺损的动物肺泡-毛细血管之间的

水转移速度明显下降^[6]; ③在某些肺脏疾病的动物模型中, AQP5 的表达异常可能与肺水肿的发生有关^[7]。

本研究证实充血性心力衰竭中肺组织 AQP4、AQP5 mRNA 表达下降; 并与左心室舒张末压呈负相关, 与肺脏的相对质量(肺脏质量与体质量的比例)呈负相关。其结果提示, AQP4、AQP5 在心力衰竭肺水肿的形成或消散中起着一定的作用。AQP4、AQP5 在细胞膜上的分布具有一定的特点, AQP4 主要分布于小气道上皮细胞的顶质膜, AQP5 主要分布于肺泡 I 型上皮细胞的顶质膜, 而在细胞的基底膜和侧膜上并不存在^[1]。根据这种分布特点, 我们推测, 在充血性心力衰竭中肺组织 AQP4、AQP5 的表达下降, 可能导致小气道和肺泡上皮对肺泡内水分的清除功能下降, 从而使肺泡内水肿加重, 而这种变化对水分由肺间质向肺泡的转移并不产生明显的影响。

内皮素对心力衰竭的发生与发展起重要的作用。大量的研究显示拮抗内皮素的治疗可改善心衰的症状和预后。本研究中, 选择性 ETA 受体拮抗剂 FR139317 明显改善心衰大鼠的血液动力学, 降低血浆内皮素-1 浓度, 减轻肺质量, 显示其治疗心衰有良好疗效。本研究结果显示, FR139317 使心力衰竭大鼠肺组织 AQP4 和 AQP5 的表达上升,

提示内皮素系统对心衰肺组织 AQP5 表达起一定的调节作用。

参考文献:

- [1] Beitz E, Schultz J E. The mammalian aquaporin water channel family: a promising new drug target[J]. *Curr Med Chem*, 1999, 6(6): 457.
- [2] Chen X C, Zhang X M, Luo N S, *et al*. Effects of ETA antagonist FR139317 on rats with congestive heart failure[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2001, 22(10): 896.
- [3] Pfeffer M A, Pfeffer J M, Fishbein M C, *et al*. Myocardial infarction size and ventricular function in rats[J]. *Cir Res*, 1979, 44(2): 503.
- [4] Donald B H, Norman B. A technique to estimate the quantity of infarcted myocardium post mortem[J]. *Am J Clin Pathol*, 1974, 61(2): 242.
- [5] Ruddy M K, Drazen J M, Pitkanen O M, *et al*. Modulation of aquaporin 4 and the amiloride-inhibitable sodium channel in perinatal rat lung epithelial cells[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(6 Pt 1): L1066.
- [6] Song Y, Ma T, Matthay M A, *et al*. Role of aquaporin-4 in airspace-to-capillary water permeability in intact mouse lung measured by a novel gravimetric method[J]. *J Gen Physiol*, 2000, 115(1): 17.
- [7] Towne J E, Harrod K S, Krane C M, *et al*. Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22(1): 34.

(编辑 刘清海)

(上接第 340 页 from page 340)

性^[7], 是鉴定成肌细胞有效的方法; 抗肌萎缩蛋白是骨骼肌细胞膜的特异框架蛋白^[8]。实验通过对第 1、6 次培养的成肌细胞, 在差速贴壁纯化后, 进行鉴定, 见有 96% 以上的细胞 desmin 免疫染色呈阳性, 同时有 96% 以上的细胞抗肌萎缩蛋白单克隆抗体荧光反应阳性, 提示多重肌块法培养成肌细胞纯度高, 是高效的细胞培养方法, 为进一步研究肌营养不良和其他疾病的治疗研究以及成肌细胞特性研究提供了简便途径。

(本文图 1~3 见封 2. Fig. 1~3 Shown in inside front cover)

参考文献:

- [1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 62~72.
- [2] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1995. 92~93.

- [3] 周菲, 秦永文, 荆清, 等. 成年大鼠成肌细胞的原代培养[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2001, 3(1): 43.
- [4] Snyder K A, Costantini L C, Graber D J. Development of striatal patchy matrix organization in organotypic co-cultures of perinatal striatum, cortex and substantia nigra[J]. *Neuroscience*, 2001, 103(1): 97.
- [5] 张烁, 邱良秀, 沈远平. 各类滴眼剂对角膜上皮细胞的毒性组织培养法研究[J]. *眼科新进展*, 1999, 19(3): 158.
- [6] 王训, 张成, 刘焯霖, 等. 小鼠成肌细胞的培养纯化和鉴定方法[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(1): 6.
- [7] Fishchman D A. Monoclonal antibodies to desmin; evidence for stage dependent intermediate filament immunoreactivity during cardiac and skeletal muscle development[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1985, 455(2): 167.
- [8] Koenig M, Monaco A P, Kunkel L M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein[J]. *Cell*, 1988, 53(2): 219.

(编辑 刘清海)