

膜迷路破坏动物模型中水通道蛋白 -1 的表达及其意义

李琦¹, 黄德亮²(解放军总医院¹耳鼻咽喉研究所,²耳鼻咽喉-头颈外科,北京 100853)

摘要:目的 检测水通道蛋白-1在膜迷路破坏豚鼠耳蜗及内淋巴囊中的表达情况。方法 以氯仿鼓室注射制造豚鼠膜迷路破坏的动物模型,运用免疫组化二步法在不同的时间点上检测膜迷路破坏豚鼠耳蜗及内淋巴囊中水通道蛋白-1的表达。结果 耳蜗中AQP-1的表达表现出一种波动性过程,即随螺旋韧带细胞形态的破坏出现下调,而后当螺旋韧带细胞出现再生时AQP-1的表达出现上调。在内淋巴囊处水通道蛋白-1的表达则无明显改变。结论 水通道蛋白-1可能参与维持耳蜗螺旋韧带处结构的稳定性。

关键词:膜迷路破坏;免疫组织化学;水通道蛋白

中图分类号:Q437;Q95-33 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)05-0664-03

Expression of aquaporin-1 in a guinea pig model of labyrinth destruction

LI Qi¹, HUANG De-liang²

¹Institute of Otolaryngology, ²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: Objective To study the expression of aquaporin-1 (AQP-1) in the cochlea and endolymphatic sac in guinea pigs with labyrinth destruction. **Methods** Chloroform was injected into the tympanum to establish the animal model of labyrinth destruction in guinea pigs, and two-step immunohistochemical method was used to examine the expression of AQP-1 in the cochlea and endolymphatic sac at different time points. **Results** AQP-1 expression was fluctuant in accordance with the morphological changes of the spiral ligament fibrocytes in the cochlea: destruction of the spiral ligament cells was followed by AQP-1 expression down-regulation, and AQP-1 up-regulation occurred with the cell regeneration. But no such changes were observed in the endolymphatic sac. **Conclusion** AQP-1 may take part in the maintenance of the structural stability of the spiral ligament.

Key words: labyrinth destruction; immunohistochemistry; aquaporin

自从1988年水通道蛋白(aquaporins, AQPs)家族被发现以来,关于其功能的研究一直是医学领域的一大热点^[1]。在目前已知的11种水通道蛋白家族成员中,已发现在不同种属动物的内耳中存在除AQP-0、AQP-8及AQP-10以外的各型AQP家族成员。但是关于其确切功能始终未明确。曾有假设认为AQP-1可能具有参与维持骨质及基底膜结构的稳定性的功能^[2]。本文拟通过对膜迷路破坏动物模型中AQP-1的表达情况进行研究以明确是否存在这种可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

25只白色红目豚鼠购自解放军总医院实验动物中心,体质量300~400g,雌雄不拘,耳廓反射灵敏,电耳镜检测双侧鼓膜完整。氯仿购自北京化工厂。麻醉药采用速眠新(解放军军需大学畜牧研究所提供,主要成分氟哌啶醇、新眠灵、氯胺酮)。兔抗鼠AQP-1多

克隆抗体购自Chemicon公司,免疫组化二步法试剂盒购自北京中杉生物制品公司。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 参考冯勃等^[3]膜迷路破坏方法,并加以改进。具体方法:以速眠新(0.1 ml/100 g)肌肉麻醉行全身麻醉,麻醉成功后,在电耳镜观察下,以微量注射器抽取20 μl氯仿行鼓室内注射。清醒后,所有动物均出现急性单侧迷路功能破坏症状,表现为:头倾向注射侧,步态不稳。所有动物均以右侧为实验耳,左侧为对照耳。

1.2.2 切片方法 动物随机分5组,每组5只。分别于造模后48 h,1,2,3,4周处死取双侧颞骨标本。取材方法:以速眠新麻醉后,开胸以0.01 mol/L PBS及4%多聚甲醛行心脏灌注。至头颈及双上肢完全僵硬后快速断头取双侧听泡。将听泡充分修剪,保留耳蜗及内淋巴囊部分,4%多聚甲醛固定24 h,10%EDTA溶液脱钙10 d(常温),20%蔗糖溶液浸泡过夜,OCT包埋过夜,常规冰冻切片。

1.2.3 冰冻切片 H.E 染色 冰冻切片65℃烤箱烤片60 min后水洗去除OCT溶液,流水冲洗2 min,苏木素染色3 min,盐酸酒精分化,水漂洗变蓝,伊红染色

收稿日期:2005-11-21

作者简介:李琦(1973-),男,在读博士研究生,主治医师、讲师,E-mail: hxlq@126.com

20 s, 水洗, 80%, 90%, 90%, 95%, 95%, 100%乙醇脱水各 2 分钟, 二甲苯透明 5 min 2 次, 中性树胶封片。

1.2.4 免疫组织化学(DAB)染色 冰冻切片烤片 60 min 后水洗去除 OCT 溶液, 2% H_2O_2 溶液阻断内源性过氧化氢酶, 滴加 AQP-1(1:200)后 37℃ 水浴 2 h, 多聚螯合物(二抗)室温孵育 30 min, DAB 现色, 苏木素复染细胞核, 盐酸酒精分化后中性树胶封片。

1.2.5 计算机辅助图像分析 应用图像软件 pImage Tool 对免疫组化染色结果进行分析, 对染色面积及染色强度进行量化比较。

1.2.6 统计分析 采用 SPSS11.0 统计软件的 Fisher 精确概率法对数据进行处理。

2 结果

2.1 耳蜗及内淋巴囊 HE 染色

耳蜗组织在 48 h 呈急性出血性及渗出性炎性表

现, 鼓阶、前庭阶、蜗管及血管纹均见大量红细胞, 螺旋韧带结构尚正常; 1 周时呈坏死性炎性表现, 螺旋韧带结构开始出现破坏; 2 周时炎症加重, 耳蜗正常结构基本消失; 3 周开始出现纤维化, 表现为螺旋韧带内结构为纤维组织代替; 4 周时表现浸润增生性炎症表现, 螺旋韧带纤维化加重, 蜗管内为增生纤维组织充填, Corti' 器结构消失。在这一过程中, 蜗管内始终没有出现内淋巴积水表现。内淋巴囊处结构则没有明显异常表现。

2.2 耳蜗 AQP-1 免疫组化染色结果

耳蜗 AQP-1 阳性染色主要位于螺旋韧带基部。48 h 与正常对照侧无明显改变(图 1); 1 周时着色强度及阳性面积减小(图 2); 2 周时染色减弱达最大强度, 基本无阳性着色部位(图 3); 3 周后开始出现部分恢复(图 4); 4 周时恢复更加明显(图 5)。内淋巴囊处 AQP-1 染色水平无明显改变(图 6)。

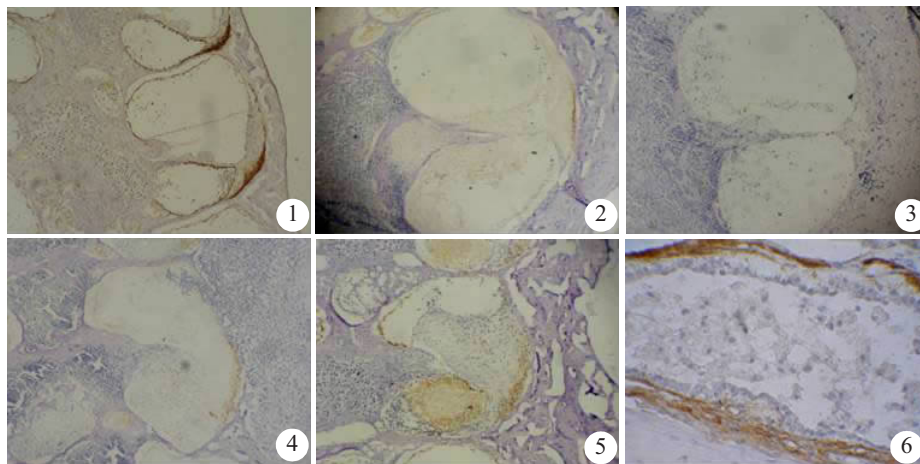


图 1 造模 48 h 耳蜗 AQP-1 表达

Fig.1 Expression of AQP-1(cochlea,48 h) (Original magnification: $\times 200$)

图 2 造模 1 周耳蜗 AQP-1 表达

Fig.2 Expression of AQP-1(cochlea, 1 week) (Original magnification: $\times 200$)

图 3 造模 2 周耳蜗 AQP-1 表达

Fig.3 Expression of AQP-1(cochlea,2 week) (Original magnification: $\times 200$)

图 4 造模 3 周耳蜗 AQP-1 表达

Fig.4 Expression of AQP-1(cochlea, 3 week) (Original magnification: $\times 200$)

图 5 造模 4 周耳蜗 AQP-1 表达

Fig.5 Expression of AQP-1(cochlea, 4 week)(Original magnification: $\times 200$)

图 6 造模动物内淋巴囊 AQP-1 表达

Fig.6 Expression of AQP-1(endolymphatic sac)(Original magnification: $\times 200$)

2.3 耳蜗螺旋韧带部位 AQP-1 染色情况的比较

从表 1 可见, 耳蜗螺旋韧带处 AQP-1 染色在造模耳 48 h 及 4 周时表达水平与正常对照耳比较无统计学差异, 在 1, 2, 3 周表达下降。造模耳 AQP-1 表达在造模过程中出现先下降而后上升的波动性改变, 这

一过程与耳蜗结构的破坏及再生过程相对应。

3 讨论

Stankovic^[4] 在成年豚鼠内耳的研究中, 发现 AQP-1 在基底膜下的间充质细胞、临近骨迷路的成

表 1 耳蜗螺旋韧带部位 AQP-1 染色情况

Tab.1 AQP-1 expression in the spiral ligament (Mean±SD)

group	Positive staining area	Positive staining intension
Normal	94787±5672	356±23.6
48h	93885±4378*	325±18.9*
1w	43276±3425**	146±21.9**
2w	5234±466**	28±7.5**
3w	32564±2383**	125±16.9**
4w	90768±4876*	318±32.8*

* P>0.05 vs normal control; ** P≤0.05 vs normal control

纤维细胞、螺旋韧带及接近鼓阶的间皮细胞呈强阳性表达。Zhong^[5]在对花斑豚鼠研究中发现,AQP-1 分布于耳蜗血管纹、螺旋韧带、螺旋缘、内沟细胞、外沟细胞、螺旋神经节、前庭膜、Corti 器的内、外毛细胞和支持细胞。在内淋巴囊 AQP-1 均匀表达于上皮细胞及上皮下组织。在我们前期对白色红目豚鼠耳蜗及内淋巴囊中 AQP-1 表达情况的研究中已发现 AQP-1 主要表达部位位于螺旋韧带基底膜,Corti's 器基底膜及鼓阶内侧上皮面。在内淋巴囊(中间部)其阳性部位位于上皮细胞下的基质组织中,上皮细胞未见阳性着色。在血管纹处无明显表达^[6]。由于螺旋韧带基底膜主要存在 III 型纤维细胞,其主要功能在于维持组织结构的稳定性,因此这种结果提示 AQP-1 可能主要参与维持骨质及基底膜结构的稳定性,并且由于其在 Corti's 器基底膜及鼓阶内侧粘膜面出现强阳性表达而提示可能参与外淋巴的代谢。

本实验中,发现造模动物在术后 1 周内肢体反应最为严重,术后 2 周开始基本得到代偿,症状基本恢复。在术后 48 h、1 周、2 周、3 周及 4 周进行连续观察后发现,术后 1 周和 2 周 AQP-1 表达明显下降,考虑这种情况是由于氯仿引起的急性毒性作用所致。这种毒性作用破坏纤维细胞因此引起存在于纤维细胞上的 AQP-1 表达下降。术后 3 周由于螺旋韧带处发生纤维化,正常结构为大量新生纤维细胞所代替,在这一过程中,AQP-1 的表达呈进行性增长的过程。到术后 4 周增生过程基本结束,此时 AQP-1 的表达基本恢复至正常水平。在造模 48 h 耳蜗主要出现急性出血性炎症表现,此时螺旋韧带结构完整,细胞可能尚未受到氯仿破坏,因此 AQP1 的表达无明显改变。随着炎症的进展,造模 1 周时螺旋韧带处纤维细胞受到破坏,出现细胞碎解,胞核消失,细胞正常结构消失,

此时 AQP1 的表达出现明显下调,表明随着纤维细胞结构的破坏,存在于其胞膜上的 AQP1 蛋白同样受到破坏。这种破坏作用在造模后 2 周达到最大,表现为螺旋韧带处几乎无 AQP1 表达。造模 3 周时观察到纤维细胞出现再生,表明此时进入增生性炎症过程,与此同时发现 AQP1 在螺旋韧带基底膜出现较之 2 周时明显的表达上调,说明 AQP1 可能是纤维细胞膜的结构蛋白,其在细胞增生的早期即已出现。到造模后 4 周,再生的纤维细胞完成对耳蜗的结构重建,蜗管及鼓阶为增生的纤维细胞所充填,此时螺旋韧带基底膜的 AQP1 达到一个新的稳定表达。本实验中所发现的 AQP1 在耳蜗破坏及再生过程中表达的改变佐证 AQP1 具有参与维持细胞及组织结构稳定性的功能。而在内淋巴囊处由于不存在这种病理性改变的过程,因此 AQP-1 的表达始终没有出现明显改变。据此推论:AQP-1 可能参与维持纤维细胞结构的稳定性,因此当纤维细胞结构出现异常改变时,其表达量存在相应的改变。

参考文献:

[1] 江荣炎,许顶立,赖文岩等.卡托普利和洛沙坦对大鼠肾脏水道蛋白-2mRNA 和尿液水道蛋白-2 的影响[J].第一军医大学学报,2005,25(4):391-4.
Jiang RY, Xu DL, Lai WY, et al. Effects of captopril and losartan on expression of kidney aquaporin-2 mRNA and urine aquaporin-2 excretion in rats [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2005, 25(4): 391-4.

[2] Beitz E, Zenner HP, Schultz JE. Aquaporin-mediated fluid regulation in the inner ear[J]. Cell Mol Neurobiol, 2003, 23(3): 315-29.

[3] 冯勃,陈恩德,周定蓉,等.化学性迷路破坏动物模型及前庭代偿过程的定量观察 [J]. 中华航空航天医学杂志, 1997, 8 (1): 27-30.

[4] Stankovic KM, Adams JC, Brown D. Immunolocalization of aquaporin CHIP in the guinea pig inner[J]. Am J Physiol, 1995, 269: C1450-6.

[5] Zhong SX, Liu ZH. Expression of aquaporins in the cochlea and endolymphatic sac of guinea pig[J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2003, 65: 284-9.

[6] 李琦,林琳,胡吟燕,黄德亮.水道蛋白-1,3 在豚鼠耳蜗及内淋巴囊的表达[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2005,19(23):1085-7.
Li Q, Lin L, Hu YY, et al. Expression of aquaporin-1,3 in the cochlea and endolymphatic sac of guinea pig [J]. J Clin Otorhinolaryngol, 2005, 19(23): 1085-7.

(责任编辑:吴锦雅)