

# 大鼠烫伤早期心肌组织水通道蛋白 1 表达及其与心肌水肿的关系

李志清 肖德权 王甲汉 黄跃生



**【摘要】 目的** 了解水通道蛋白 1 (AQP-1) 在大鼠烫伤早期心肌组织中的表达变化及其与心肌水肿的关系。 **方法** 选取 36 只 Wistar 大鼠按照随机数字表法分为正常对照组 (6 只, 不行任何处理)、烫伤组 (30 只), 烫伤组大鼠在麻醉后于其背部造成 30% TBSA III 度烫伤, 伤后腹腔注射林格平衡盐溶液抗休克。于伤后 2、8、12、24、48 h 收集烫伤组大鼠左心室心肌组织和血清标本 (各时相点取 6 只大鼠), 采用干湿质量法检测心肌组织含水率, 免疫组织化学染色观察 AQP-1 在心肌组织中表达分布, 实时定量 PCR 检测心肌组织 AQP-1 mRNA 表达, ELISA 法测定血清心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 含量。正常对照组大鼠行相同检测。对数据进行单因素方差分析和 LSD 检验, 分别对烫伤组大鼠伤后各时相点 AQP-1 mRNA 表达量与相应时相点的心肌组织含水率、血清 cTnI 含量进行相关性分析。

**结果** 与正常对照组大鼠比较, 烫伤组大鼠伤后 8~48 h 心肌含水率均明显增加 ( $P$  值均小于 0.01), 其中伤后 12 h 达峰值 [(80.79 ± 0.12)%]。免疫组织化学染色显示, AQP-1 主要表达于正常对照组和烫伤组大鼠心肌组织的毛细血管内皮细胞和心肌细胞膜, 其中烫伤组大鼠伤后 2~48 h 心肌组织中 AQP-1 表达明显增多。与正常对照组大鼠比较, 烫伤组大鼠伤后 2~48 h 心肌组织 AQP-1 mRNA 表达明显增加 ( $P$  值均小于 0.01), 其中伤后 12 h 达峰值 (6.2 ± 0.7)。与正常对照组大鼠比较, 烫伤组大鼠血清 cTnI 含量伤后 2~48 h 均明显增加 ( $P$  值均小于 0.01), 其中伤后 12 h 达峰值 [(5.83 ± 0.51) μg/L]。烫伤组大鼠心肌组织 AQP-1 mRNA 表达量与心肌组织含水率、血清 cTnI 含量均呈显著正相关 ( $r$  值分别为 0.849、0.973,  $P$  值均小于 0.01)。 **结论** 大鼠烫伤后 AQP-1 可能参与心肌组织水肿的形成。

**【关键词】** 烧伤; 心肌; 水通道蛋白 1; 水肿

**Expression of aquaporin-1 in myocardium of rats in the early stage after scald and its relationship with myocardial edema** LI Zhi-qing, XIAO De-quan, WANG Jia-han, HUANG Yue-sheng. Department of Burns, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: HUANG Yue-sheng, 400038, Email: yshuang1958@163.com, Tel: 023-68766023

**【Abstract】 Objective** To investigate the changes in aquaporin-1 (AQP-1) expression in myocardium of scalded rats in early stage of a burn injury, and to analyze its relationship with myocardial edema.

**Methods** Thirty-six healthy Wistar rats were divided into normal control ( $n = 6$ , without scald) and scald ( $n = 30$ ) groups according to the random number table. Rats in scald group were inflicted with 30% TBSA full-thickness scald on the back, and intraperitoneally injected with Ringer's solution for antishock treatment. Myocardium tissue from left ventricle and serum specimen in rats of scald group were collected at post scald hours (PSH) 2, 8, 12, 24, and 48 (with 6 rats at each time point). Myocardial water ratio was determined by dry-wet weight method. The distribution of AQP-1 protein in myocardium was observed with immunohistochemical staining. The expression of myocardial AQP-1 mRNA was assessed with quantitative real-time PCR. The serum content of cardiac troponin-I (cTnI) was determined with ELISA. The rats in normal control group were detected with above-mentioned method. Data were processed with one way analysis of variance and LSD test. Correlation analysis was performed between AQP-1 mRNA and myocardial water ratio, AQP-1 mRNA and the serum content of cTnI in scald group at each time point. **Results** Compared with that in normal control group, the myocardial water ratio in scald group was markedly increased during PSH 8-48 ( $P$  values all below 0.01), and it peaked at PSH 12 [(80.79 ± 0.12)%]. In both groups, AQP-1

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2013.03.006

基金项目:创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题基金(SKLKF201210)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院烧伤科(李志清、肖德权、王甲汉);第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(黄跃生)

通信作者:黄跃生,400038,Email:yshuang1958@163.com,电话:023-68766023

was mainly expressed in endothelial cells of capillaries and pericellular membrane of myocardial cells. The expression of AQP-1 in scald group was markedly increased from PSH 2 to PSH 48. The expression of myocardial AQP-1 mRNA in scald group was markedly higher from PSH 2 to PSH 48 than that in normal control group ( $P$  values all below 0.01), and it peaked at PSH 12 [(6.2 ± 0.7)%]. The serum content of cTnI in scald group was obviously higher from PSH 2 to PSH 48 than that in normal control group ( $P$  values all below 0.01), and it peaked at PSH 12 [(5.83 ± 0.51) μg/L]. There were statistically positive correlations between AQP-1 mRNA expression and myocardial water ratio ( $r = 0.849$ ,  $P < 0.01$ ), AQP-1 mRNA expression and the serum content of cTnI ( $r = 0.973$ ,  $P < 0.01$ ) in scald group. **Conclusions** AQP-1 may play a key role in the development of myocardial edema in rats with scald.

**【Key words】** Burns; Myocardium; Aquaporin 1; Edema

严重烧伤后可迅速出现心肌组织水肿等心肌损害,并持续到烧伤休克期后<sup>[1]</sup>。心肌水肿可进一步加重心肌组织缺血缺氧性损害和心功能障碍,诱导或加剧烧伤后休克及其他脏器缺血缺氧损害的发生。烫伤后心肌水肿的机制较为复杂,有研究显示水通道蛋白(aquaporin, AQP)参与了心肌组织中水的转运<sup>[2-3]</sup>,大鼠烧伤早期心肌组织匀浆中 AQP-1 蛋白表达明显增多<sup>[2]</sup>。笔者制作了大鼠 30% TBSA Ⅲ度烫伤模型,观察烫伤早期心肌组织 AQP-1 mRNA 表达变化,及其与心肌水肿、损害的关系,进一步分析 AQP-1 在大鼠烫伤后心肌水肿中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂、仪器与动物来源

兔抗大鼠 AQP-1 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗均购自广州齐云生物科技有限公司,免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司,心肌肌钙蛋白 I(cTnI)ELISA 试剂盒购自美国 USCN LIFE 公司,反转录试剂盒购自广州莱德尔生物科技有限公司。Lightcycler 480 II 型 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司。36 只清洁级健康成年 Wistar 大鼠,体质量(210 ± 20)g,雌雄不拘,由南方医科大学实验动物中心提供。

### 1.2 实验动物模型与分组

将 36 只 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常对照组 6 只和烫伤组 30 只。烫伤组大鼠用 30 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将其背部脱毛区浸入 100 °C 水中 15 s 造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤(经病理切片证实),腹腔注射(4 mL · kg<sup>-1</sup> · % TBSA<sup>-1</sup>)林格平衡盐溶液抗休克,于伤后即刻和伤后 4 h 共注入总量的一半,伤后 8、12、16 和 24 h 共注入总量的另一半。正常对照组大鼠不进行任何处理。大鼠分笼喂养,自由进食。伤后 2、8、12、24、48 h 麻醉烫伤组大鼠(每时相点取 6 只),取左心室心肌组织并留取血清标本待测。正常对照组大鼠行

相同检测。

### 1.3 检测指标

**1.3.1 心肌组织含水率** 采用电子分析天平称取大鼠心肌组织标本湿质量,然后将其置于 80 °C 恒温干燥箱内 24 h 至恒定质量(任意 2 次所称质量之差小于或等于 0.2 mg)称取干质量。心肌组织含水率(%) = (湿质量 - 干质量) ÷ 湿质量 × 100%。

**1.3.2 心肌组织 AQP-1 蛋白表达** 免疫组织化学染色检测。取大鼠左心室的心肌组织,采用 4 g/L 多聚甲醛固定,脱水,常规石蜡包埋、切片,再经脱蜡、水化、抗原修复后,滴加稀释比为 1:500 的兔抗大鼠 AQP-1 多克隆抗体,37 °C 孵育 1 h,滴加辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,按照试剂盒说明书进行,37 °C 孵育 30 min。二氨基联苯胺显色,苏木素复染,封片,光学显微镜下观察。

**1.3.3 心肌组织 AQP-1 mRNA 表达** 实时定量(qRT)-PCR 检测。提取大鼠左心室心肌组织总 RNA,进行反转录。PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。AQP-1 上游引物:5'-CTC-CGGCTGTCATGTATATCA-3',下游引物:5'-ATG-GCGGAGGCAACGA-3',大小为 58 bp。内参照基因 GAPDH 上游引物:5'-CCGAGGGCCCACTAAAGG-3',下游引物:5'-GCTGTTGAAGTCACAGGAGACAA-3',大小为 68 bp。反应条件为:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s,60 °C 20 s,共计 40 个循环。采用比较循环阈值法计算 AQP-1 mRNA 相对表达量。

**1.3.4 血清 cTnI 含量** 取血清标本,用 ELISA 法测定 cTnI 含量。具体实验操作按照试剂盒说明书进行。

### 1.4 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析及 LSD 检验(软件自动略去该统计量值)。分别对烫伤组大鼠伤后各时相点 AQP-1 mRNA 表达量与相应时相点的心肌组织含水率、血清 cTnI 含量进行相关性分析。 $P < 0.05$  为差异有统

计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠心肌组织含水率的变化

正常对照组及烫伤组大鼠伤后 2~48 h 心肌组织含水率分别为 (73.29 ± 0.04)%、(75.67 ± 0.14)%、(79.63 ± 0.13)%、(80.79 ± 0.12)%、(78.24 ± 0.21)%、(76.93 ± 0.11)%，差异有统计学意义 ( $F = 41.32, P < 0.01$ )。烫伤组大鼠心肌组织含水率于伤后 8 h 起明显高于正常对照组，伤后 12 h 达高峰，伤后 48 h 仍显著高于正常对照组 ( $P$  值均小于 0.01)。

### 2.2 大鼠心肌组织 AQP-1 蛋白表达变化

免疫组织化学染色结果显示，正常对照组和烫伤组大鼠 AQP-1 蛋白主要表达于心肌组织的毛细血管内皮细胞和心肌细胞膜 (图 1)。与正常对照组比较，烫伤组大鼠伤后 2 h 心肌组织 AQP-1 蛋白表达增多，伤后 12 h 表达最强 (图 2)，伤后 48 h 仍呈高表达。

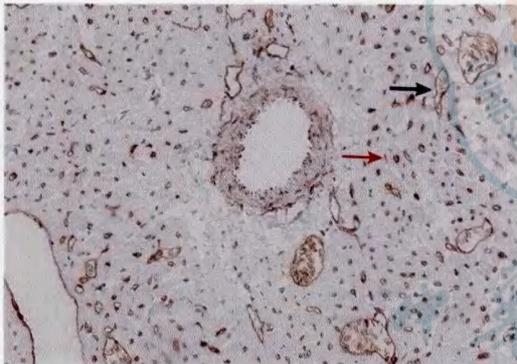


图 1 正常对照组大鼠心肌组织的毛细血管内皮细胞 (→) 和心肌细胞膜 (→) 表达水通道蛋白 1 辣根过氧化物酶 × 400

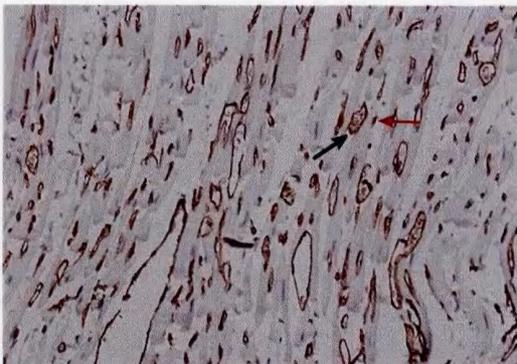


图 2 烫伤组大鼠伤后 12 h 心肌组织毛细血管内皮细胞 (→) 和心肌细胞膜 (→) 水通道蛋白 1 呈高表达 辣根过氧化物酶 × 400

### 2.3 大鼠心肌组织 AQP-1 mRNA 表达变化

qRT-PCR 检测结果显示，正常对照组及烫伤组大鼠伤后 2~48 h 心肌组织 AQP-1 mRNA 表达量分别为  $1.0 \pm 0.3$ 、 $2.3 \pm 0.4$ 、 $4.6 \pm 0.5$ 、 $6.2 \pm 0.7$ 、 $5.2 \pm 0.6$ 、 $4.4 \pm 0.4$ ，差异有统计学意义 ( $F = 28.56, P < 0.01$ )。烫伤组大鼠心肌组织 AQP-1 mRNA 表达量于伤后 2 h 即显著高于正常对照组，伤后 12 h 达高峰，伤后 48 h 表达量仍高于正常对照组 ( $P$  值均小于 0.01)。

### 2.4 大鼠血清 cTnI 含量变化

正常对照组及烫伤组大鼠伤后 2~48 h 血清 cTnI 含量分别为 (1.38 ± 0.15)、(2.56 ± 0.13)、(5.76 ± 0.46)、(5.83 ± 0.51)、(3.42 ± 0.31)、(3.15 ± 0.28) μg/L，差异有统计学意义 ( $F = 23.90, P < 0.01$ )。烫伤组大鼠伤后 2~48 h 血清 cTnI 含量均显著高于正常对照组 ( $P$  值均小于 0.01)。

### 2.5 烫伤大鼠 AQP-1 mRNA 表达与心肌组织含水率及血清 cTnI 含量的相关性分析

以烫伤组大鼠伤后各时相点 AQP-1 mRNA 表达为自变量，以烫伤组大鼠伤后各时相点心肌组织含水率或血清 cTnI 含量作因变量，应用 SPSS 13.0 统计软件分析系统进行相关性分析。AQP-1 mRNA 表达量与心肌组织含水率及血清 cTnI 含量，均呈显著的正相关 ( $r$  值分别为 0.849、0.973， $P$  值均小于 0.01)。

## 3 讨论

严重烧伤可导致机体“休克心”的发生，不仅表现为心肌功能减退，也伴有心肌组织水肿等器质性损害的改变，且心肌组织水肿常遗留至休克期后。心肌组织水肿可限制心肌血流及心肌营养供应；延长氧弥散至细胞内的距离，减少心肌摄氧量，使线粒体受损，产生能量代谢障碍，加剧心肌缺血缺氧性损害。因此，心肌水肿是加剧或导致心肌缺血和各种继发性损伤的重要环节之一。严重烧伤后心肌组织水肿的形成机制较为复杂，不但毛细血管通透性增加，使间质与血管的水转运增多，细胞内与间质的水转运可能也相对增加。水的跨细胞转运有穿越细胞膜脂质双层的简单弥散和通过介导的水转运 2 种基本形式，后者是水跨细胞转运的主要形式。

AQP-1 是人类及大鼠心肌组织中最主要的 AQP 亚型<sup>[3]</sup>。Ogura 等<sup>[4]</sup>通过对 Arrhenius 激活能量的测定及动态显微摄像的观察，显示豚鼠和大鼠的心脏细胞中 AQP 是主要的水转运通道，参与了心肌水肿

的形成;应用二价汞离子(AQP 蛋白非特异性抑制剂)能够抑制心肌间质水肿的程度,进一步证实大鼠心肌细胞中 AQP 蛋白是水跨细胞转运的主要途径,尤其对渗透压梯度作用下水的转运起重要作用。

本研究证实,在正常大鼠和烫伤后大鼠心肌组织中的毛细血管内皮细胞和心肌细胞膜上均存在 AQP-1 表达;30% TBSA III 度烫伤大鼠伤后 2 ~ 48 h 心肌组织 AQP-1 mRNA 表达显著高于正常大鼠,且与 AQP-1 蛋白表达变化趋势基本一致。进一步证实严重烫伤可以导致大鼠心肌组织 AQP-1 mRNA 以及蛋白表达增多。AQP-1 可介导水分子的跨膜转运,参与心肌水肿的形成。

本实验结果显示,烫伤后大鼠心肌组织 AQP-1 mRNA 表达变化分别与心肌水肿及血清 cTnI 含量变化呈显著正相关,提示 AQP-1 也可能参与了烫伤大鼠早期心肌水肿和心肌损害的形成。其可能的机制为机体严重烫伤后血管通透性迅速增高,伤后 4 h 达高峰,引发间质水肿或由于缺血缺氧导致细胞间质内乳酸积聚等引起细胞内外渗透压梯度改变,继而诱发心肌组织中的血管内皮细胞和心肌细胞 AQP-1 表达增强,介导水的跨细胞转运,加重心肌水肿。同时,烧伤后心肌组织 AQP-1 较长时间的高表达,可能是机体在烫伤后心肌血管通透性逐渐恢复情况下,心肌水肿仍继续加重的重要机制。既往多项研究也证实,在心肌缺血或急性心肌缺血再灌注损伤等条件下大鼠心肌 AQP-1 表达增多,AQP-1 参与了心肌水肿的形成<sup>[5-7]</sup>。此外,有研究指出在烧伤导致的脊髓水肿及脑水肿发生过程中,AQP 起重要作用<sup>[8-9]</sup>。

近年来调节 AQP-1 的表达或活性成为抑制心肌水肿的一个重要策略<sup>[10]</sup>,如乙酰唑胺对肺组织 AQP-1 的表达就有明显的抑制作用<sup>[11]</sup>,并可减轻肺

组织水肿。随着小干扰 RNA 技术的发展,可通过降低水分子的通透性和抑制血管内皮细胞增殖,达到沉默 AQP-1 蛋白表达的目的,从分子水平改善心肌缺血再灌注损伤、心肌水肿和微血管通透性。

参考文献

- [1] 黄跃生. 烧伤后早期心肌损害与防治. 中华烧伤杂志, 2008, 24(5):369-371.
- [2] 肖德权, 王甲汉, 李志清, 等. 严重烧伤后大鼠心肌组织水通道蛋白-1 表达变化及其意义. 南方医科大学学报, 2010, 30(5): 1111-1113.
- [3] Au CG, Cooper ST, Lo HP, et al. Expression of aquaporin 1 in human cardiac and skeletal muscle. J Mol Cell Cardiol, 2004, 36(5):655-662.
- [4] Ogura T, Matsuda H, Imanishi S, et al. Sarcolemmal hydraulic conductivity of guinea-pig and rat ventricular myocytes. Cardiovasc Res, 2002, 54(3):590-600.
- [5] 王浩宇, 陈玉成, 郑蓉, 等. 缺血预适应后心肌水肿与水通道 Aquaporin-1 蛋白表达变化的关系. 四川医学, 2007, 28(5): 464-467.
- [6] 程栋梁, 王志维, 刘平, 等. 水通道蛋白-1 在大鼠急性心肌缺血再灌注损伤中的表达. 武汉大学学报: 医学版, 2009, 30(5):599-602.
- [7] Jonker S, Davis LE, van der Bilt JD, et al. Anaemia stimulates aquaporin 1 expression in the fetal sheep heart. Exp Physiol, 2003, 88(6):691-698.
- [8] Yeo SI, Ryu HJ, Kim JE, et al. The effects of electrical shock on the expressions of aquaporin subunits in the rat spinal cords. Anat Cell Biol, 2011, 44(1):50-59.
- [9] Luo SF, Sun SQ, Ran JH, et al. Aquaporin-4 in the formation of cerebral edema following severe burns; what role do arginine vasopressin levels play? Neural Regeneration Research, 2010, 5(7): 531-537.
- [10] 魏晓, 李香营, 田毅, 等. AQP1 在心肌缺血组织中的作用. 中国热带医学, 2012, 12(2):243-244, 248.
- [11] Xiang Y, Ma B, Li T, et al. Acetazolamide suppresses tumor metastasis and related protein expression in mice bearing Lewis lung carcinoma. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(8):745-751.

(收稿日期:2013-01-06)

(本文编辑:莫愚)

· 消息 ·

本刊近期重点号预告

- 2013 年第 4 期 代谢营养 组稿专家:彭曦, Email:Pxlrmm@163.com, 责任编辑:谢秋红, Email:qiuhong703@163.com
- 2013 年第 5 期 创面处理 组稿专家:黄晓元, Email:huxzhong@yahoo.com.cn, 责任编辑:贾津津, Email:jiajinjin609@163.com
- 2013 年第 6 期 烧伤康复 组稿专家:吴军, Email:junwupro@126.com, 责任编辑:莫愚, Email:moyu48@163.com
- 2014 年第 1 期 烧伤感染 组稿专家:廖镇江, Email:zjliao@yahoo.com, 责任编辑:谢秋红, Email:qiuhong703@163.com

欢迎广大作者朋友结合上述专题内容踊跃投稿!

本刊编辑部