

AQP1 在 CD-1 纯系野生型孕鼠胎盘组织的表达

吴颖怡¹ 许文静¹ 谢静颖¹ 廖宝平² 吴学诗²

(1 广州市妇女儿童医疗中心 广东 广州 510180 ;2 广州医学院附属第三医院 广东 广州 510000)

摘要 目的:研究水通道蛋白 1(Aquaporin 1, AQP1)在小鼠胎盘组织的分布及表达,初步探讨 AQP1 在羊水循环及母胎液体平衡中的作用。方法:各取四只雌雄成年健康野生型 CD1 小鼠(wild type, AQP1^{+/+})及 AQP1 基因敲除小鼠(AQP1-KO, AQP1^{-/-})。将纯合子 AQP1 基因敲除雌雄小鼠等数量合笼交配,第二日检出阴道栓者记为妊娠第 1 天(1 gestational day, 1GD)。野生型小鼠同样合笼记录。分别取两组 13GD 孕鼠的胎盘组织各一个,应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术及免疫组织化学技术检测 AQP1 胎盘组织中的表达,并确定 AQP1 在小鼠胎盘组织的定位。结果:1. RT-PCR 结果表明 AQP1 在 CD-1 野生型孕鼠胎盘组织表达, AQP1 基因敲除鼠无表达。2. 免疫组织化学方法发现 AQP1 表达于小鼠胎盘血管内皮细胞和滋养细胞, AQP1 基因敲除鼠无表达。结论:在 mRNA 水平和蛋白水平均发现 AQP1 在 CD-1 纯系野生型孕鼠胎盘组织的表达,提示 AQP1 可能在羊水循环及母胎液体平衡中发挥作用。

关键词 水通道蛋白 1 胎盘 母胎液体平衡

中图分类号:Q95-3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)14-2647-03

Expression and Distribution of Aquaporin 1 in Placenta of Pure Wild-Type Pregnant Rats

WU Ying-yi¹, XU Wen-jing¹, XIE Jing-ying¹, LIAO Bao-ping², WU Xue-shi²

(1 Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510180 ;

2 The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000)

ABSTRACT Objective: To detect expression and distribution of AQP1 in mouse placenta, and try to suggest the role of AQP1 in homeostasis of maternal-fetal fluid exchange. **Methods:** Homozygous AQP1 knockout mice (n=4) and wild type mice (n=4) were mated respectively. The day a copulation plug was found was designated as gestational day 1 (1GD). Four cases of placenta from 13GD were acquired after surgery respectively. The expression of AQP1 in placenta was examined by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). The slides of placenta were tested by immunohistochemical staining for the expression of AQP1 in placenta tissue. **Results:** 1). AQP1 expressed in placenta tissues of wild type mice at RNA and protein levels, without expression in AQP1-KO mice. 2). AQP 1 was located at the vascular endothelial cell and trophocyte of placenta, no staining in negative group. **Conclusion:** In this study AQP1 is indicated to be expression in placenta tissues in RNA and protein level. It is suggested that AQP1 may play an important role in amniotic fluid circulation and maternal-fetal fluid balance.

Key words: AQP1; Placenta; Maternal-fetal fluid balance

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)14-2647-03

前言

胎盘是维持正常妊娠的重要器官,每天有大量的液体及营养物质在母体与胎儿及其附属物(胎盘、胎膜)之间发生交换,而正常的羊水量对妊娠及围生结局尤为重要。水通道蛋白(Aquaporins, AQPs)是否参与此过程中的液体循环,及发挥怎样的作用?这一系列问题激发了众多学者在此领域的研究,使 AQP 在母胎液体平衡的作用得到了深入研究。本研究建立在动物模型的基础上,观察 AQP1 在 CD-1 野生型孕鼠胎盘组织表达,探讨 AQP1 可能在羊水循环及母胎液体平衡中发挥作用,为临床治疗提供实验和理论的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

作者简介:吴颖怡(1980-),女,硕士研究生,研究方向:妇产科临床
电话:86-20-38076210, Email: wingsums@msn.com
(收稿日期:2011-04-03 接受日期:2011-04-27)

1.1.1 主要生化和分子生物学试剂:辣根过氧化物酶(HRP)、兔抗鼠β-Actin 抗体(Sigma)、兔抗大鼠 AQP1 抗体(Chemicon)、兔抗人 AQP1 多克隆抗(SantaCruz)、标记的羊抗兔 IgG 二抗(Sigma)。

1.1.2 主要实验仪器:Microfuge 22R 高速冷冻离心机(Beckman Coulter Inc)、PTC100PCR 仪(MJ Reseach, Inc)、TM-250 电泳系统(大连捷迈科贸有限公司)

1.1.3 实验动物:健康雌性、雄性 CD-1 纯系野生小鼠和相同遗传背景的 AQP1 基因敲除鼠,6-8 周龄。AQP1 基因敲除小鼠由东北师范大学膜通道实验室(国家重点实验室)提供,麻彤辉教授在美国加州大学旧金山分校(UCSF)制作。所有试验动物由东北师范大学膜通道实验室 SPF 级动物室繁殖和饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 RT-PCR 样本制备及引物设计、合成:6-8 周龄 CD-1 纯系野生小鼠按雌雄 1:1 的比例合笼交配,第二日检出阴道栓者记为妊娠第 1 天(1 gestational day, 1GD),取孕 13 天小鼠四只

备用。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测水通道蛋白1在胎盘组织的表达。总RNA提取 断髓法处死孕鼠后开腹游离并切除子宫,剖开子宫随机取出一个妊娠囊快速分离出胎盘组织,快速PBS液漂洗干净去除血液,投入溶液D中,匀浆器充分匀浆后移入EP管按顺序加入实验试剂离心、沉淀、提取。逆转录合成cDNA(RT-PCR试剂盒二步法)

注:①所有样本处理及保存条件相同,并在上述相同条件下进行反应。②按上述PCR反应体系和反应条件分别扩增AQP1 mRNA、 β -actin mRNA。

图像采集 琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物:制备1.5%琼脂糖凝胶,核酸样品中加入1/5体积的6 $\times$ 核酸上样缓冲液,混匀后用移液器将DNA样品加入凝胶加样孔中,每孔加10 μ l样品,电泳结束后,采用美国Bio-Rad公司凝胶成像系统电泳结果,保存图像。

1.2.2 免疫组化 1)、样本的制备 2)、AQP1染色 3)、图像采集 图像信息由尼康显微镜及全自动图像采集系统采集。

2 实验结果

2.1 RT-PCR

RT-PCR结果提示AQP1在CD-1纯系野生型小鼠胎盘组织表达。

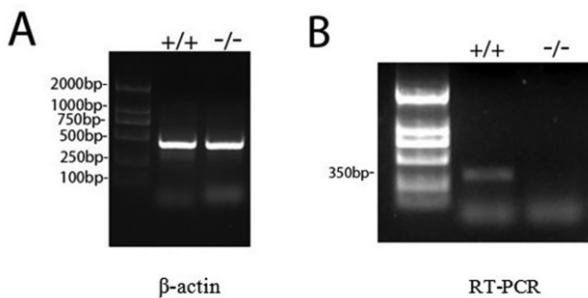


图 2.1 RT-PCR 结果

2.2 免疫组化

AQP1在CD-1纯系野生型小鼠胎盘血管内皮细胞和胎盘合体滋养细胞表达。

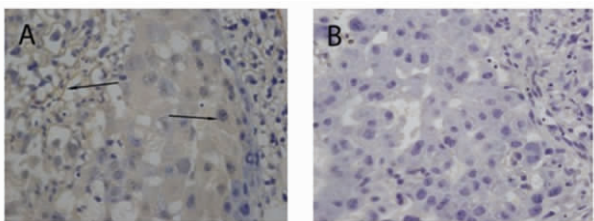


图 2.2 胎盘血管内皮细胞和胎盘合体滋养细胞

3 讨论

水通道蛋白家族中的部分成员已被证实在哺乳动物生殖系统中表达^[1-10] AQP亚型(AQP1-9)在女性生殖系统,如卵巢,输卵管,子宫及妊娠期胎盘,胎膜中的表达也已被证实^[1-4, 7-10]。综

上研究结果提示AQP在排卵,受精,胚胎植入及早期胚胎发育过程中发挥重要作用,进一步成为妊娠期母胎液体平衡的基础。

水通道蛋白(Aquaporins, AQP)家族是在原核和真核细胞的细胞膜上表达的快速转运水的特异性蛋白孔道。AQP1是最早发现的亚型,主要分布于与液体吸收与分泌有关的上皮细胞及可能协同跨细胞转运的内皮细胞,参与机体多个水代谢相关脏器的生理和病理过程,大量研究显示AQP1在这些细胞和脏器的液体平衡中发挥关键作用。胎盘是维持正常妊娠的重要器官,每天有大量的液体及营养物质在母体与胎儿及其附属物(胎盘、胎膜)之间发生交换,而正常的羊水量对妊娠及围生结局尤为重要。AQP是否参与此过程中的液体循环,及发挥怎样的作用?这一系列问题激发了众多学者在此领域的研究,使AQP在母胎液体平衡的作用得到了深入研究。

Beall等研究证实孕10天小鼠的胎盘胎膜有AQP1的表达,且随孕周的增加,AQP1的表达量下降^[1]。羊胎盘绒毛小叶和绒毛膜也发现有AQP1的表达,更准确定位到血管内皮细胞尤其是绒毛膜滋养细胞层内的毛细血管内皮细胞^[12]。Liu等的研究结果表明在孕27天的羊胎盘就已经检测AQP1的表达,其表达量在妊娠100d时最高,随孕期进展AQP1表达下降,接近足月时表达略有增加^[11]。已有研究表明AQP1在人类足月胎膜中表达^[13]且定位于羊膜绒毛膜板(顶膜)血管内皮细胞^[14]。本课题组前期研究同样发现胎盘血管内皮细胞和合体滋养细胞、羊膜上皮细胞、平滑绒毛膜细胞滋养细胞均有AQP1表达^[15]。这些结果均提示AQP1在液体跨胎盘和胎膜运输过程,即羊水循环及母胎液体平衡中可能发挥作用。

Mann SE等对正常及异常羊水量的妊娠妇女进行了对比研究,结果发现羊水过多病例组胎膜组织中尤其是羊膜中AQP1的表达显著增加^[14]。Zhu XQ等人也证实在羊水过少病例组,羊膜中AQP1的表达明显下降^[16]。本课题组在临床羊水过少异常病例AQP1表达变化的研究中发现:与正常羊水量病例组相比,羊水过少临床病例胎盘和胎膜组织中AQP1 mRNA含量均明显降低^[17]。以上研究结果进一步提示了AQP1在羊水循环及母胎液体平衡中可能发挥重要作用。

本研究应用免疫组化及RT-PCR技术检测到CD1野生型孕鼠胎盘组织中AQP1的表达及在胎盘血管内皮细胞和滋养细胞的定位,与Beall等^[1]的研究结果一致。AQP1在CD1野生型孕鼠胎盘组织滋养细胞的定位为本研究进一步研究AQP1在胎盘滋养细胞中水通透性的功能奠定了基础。

4 结论

CD-1纯系野生型孕鼠胎盘组织中有AQP1在mRNA和蛋白水平的表达;AQP1表达于胎盘血管内皮细胞和胎盘滋养细胞,提示AQP1可能在母胎液体平衡中发挥作用。

参考文献(Reference)

- [1] Beall MH, Wang S, Yang B, Chaudhri N, Amidi F, Ross MG. Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition[J]. Placenta, 2007, 28(5-6): 421-428
- [2] Mann SE, Ricke EA, Torres EA, Taylor RN. A novel model of polyhydramnios: amniotic fluid volume is increased in aquaporin 1 knockout

- mice[J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 192(6): 2041-2044
- [3] Wang S, Chen J, Au KT, Ross MG. Expression of aquaporin 8 and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in human WISH cells[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 188(4): 997-1001
- [4] Anderson J, Brown N, Mahendroo MS, Reese J. Utilization of different aquaporin water channels in the mouse cervix during pregnancy and parturition and in models of preterm and delayed cervical ripening[J]. Endocrinology, 2006, 147(1): 130-140
- [5] Yeung CH, Callies C, Rojek A, Nielsen S, Cooper TG. Aquaporin isoforms involved in physiological volume regulation of murine spermatozoa[J]. Biol Reprod, 2009, 80(2): 350-357
- [6] Yeung CH, Callies C, Tüttelmann F, Kliesch S, Cooper TG. Aquaporins in the human testis and spermatozoa--identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance [J]. Int J Androl, 2010, 33(4): 629-641
- [7] McConnell NA, Yunus RS, Gross SA, Bost KL, Clemens MG, Hughes FM Jr. Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins [J]. Endocrinology, 2002, 143(8): 2905-2912
- [8] Brañes MC, Morales B, Ríos M, Villalón MJ. Regulation of the immunexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(5): C1048-1057
- [9] Jablonski EM, McConnell NA, Hughes FM Jr, Huet-Hudson YM. Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement[J]. Biol Reprod, 2003, 69(5): 1481-1487
- [10] Wang S, Kallichanda N, Song W, Ramirez BA, Ross MG. Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 185(5): 1226-1231
- [11] Liu H, Koukoulas I, Ross MC, Wang S, Wintour EM. Quantitative comparison of placental expression of three aquaporin genes [J]. Placenta, 2004, 25(6): 475-478
- [12] Liu H, Wintour EM. Aquaporins in development - a review [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 3:18
- [13] Mann SE, Ricke EA, Yang BA, et al. Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187:902-907
- [14] Mann SE, Dvorak N, Gilbert H, et al. Steady-state levels of aquaporin 1 mRNA expression are increased in idiopathic polyhydramnios [J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194:884-887
- [15] Liu HS, Song XF, Hao RZ. Expression of aquaporin-1 in human placenta and fetal membranes [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008, 28(3): 333-336
- [16] X.Q. Zhu, S.S. Jiang, X.J. Zhu, et al. Expression of Aquaporin 1 and Aquaporin 3 in Fetal Membranes and Placenta in Human Term Pregnancies with oligohydramnios[J]. Placenta, 2009, 30:670-676
- [17] Hao RZ, Liu HS, Xiong ZF. Expression of aquaporin-1 in human oligohydramnios placenta and fetal membranes [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2009, 29(6): 1130-1132

(上接第 2614 页)

- [13] 朱健琦, 刘志刚. 粉尘螨 类变应原(Der f)的克隆表达、纯化及免疫学特性[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(6):472-474
- [14] Hamida Hammad, Marcello Chieppa, Frederic Perros, et al. House dust mite allergen induces asthma via TLR4 triggering of airway structural cells[J]. Nat Med, 2009, 15(4): 410-416
- [15] Karin Yeatts, Peter Sly, Stephanie Shore, et al. A Brief Targeted Review of Susceptibility Factors, Environmental Exposures, Asthma Incidence, and Recommendations for Future Asthma Incidence Research[J]. Environ Health Perspect, 2006; 114(4): 634-640
- [16] Shin-ichiro Narita, Randall M. Goldblum, Cheryl S. Watson, et al. Environmental Estrogens Induce Mast Cell Degranulation and Enhance IgE-Mediated Release of Allergic Mediators[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(1): 48-52