

人胸膜间皮细胞水通道蛋白 1~10 mRNA 的表达

王洪峰¹⁾ 刘宏博¹⁾ 曲文秀¹⁾ 何平¹⁾ 王志云²⁾ 李胜岐^{1)*}

¹⁾中国医科大学附属第二医院(盛京医院)呼吸内科, 沈阳 110004;

²⁾河南省鹤壁肿瘤医院胸外科, 鹤壁 458000)

摘要 体外培养人胸膜间皮细胞(HPMC), 检测人胸膜间皮细胞水通道蛋白 1~10 mRNA 的表达, 探讨其在胸腔内液体平衡中的意义. 从胸腔积液中分离人胸膜间皮细胞, 进行培养, 用形态学和免疫组化染色进行细胞鉴定. 用 RT-PCR 检测水通道蛋白 1~10 (AQP₁₋₁₀) mRNA 在人胸膜间皮细胞上的表达. 成功建立人胸膜间皮细胞体外培养模型, 鉴定证实为间皮细胞, 人胸膜间皮细胞上 AQP₁₋₁₀ mRNA 均有表达, AQP₁、AQP₉、AQP₁₀ 表达丰富. 人胸膜间皮细胞存在 AQP₁₋₁₀ mRNA 的表达, 结合已知水通道蛋白的功能, 证实人胸膜间皮细胞参与胸腔内液体转运.

关键词 人胸膜间皮细胞, 培养, 水通道蛋白

学科分类号 R332.2

水和水跨细胞膜转运对生物体是至关重要的. 为了适应水转运的要求, 细胞膜上存在选择性水转运蛋白家族: 水通道蛋白. 水通道蛋白已有 13 种亚型被发现, 即 AQP₀₋₁₂, 参与水及非极性小分子物质跨细胞膜的转运^[1,2]. 研究发现, 间皮细胞不仅是完整浆膜腔的组成部分, 它参与液体的转运, 有干细胞的功能, 参与炎症反应, 参与损伤的修复, 防止浆膜腔内的粘连与肿瘤转移^[3]. 研究发现, 小鼠脏层胸膜上有 AQP₁ 丰富表达^[4], 水通道蛋白及其 mRNA 在人胸膜间皮细胞上表达的情况未见报道. 体外培养原代人胸膜间皮细胞, 检测其 AQP₁₋₁₀ mRNA 表达, 对于探讨胸膜腔内液体的转运机理有一定价值.

1 材料和方法

1.1 人胸膜间皮细胞的分离与培养

取人的良性胸腔积液 10 ml, 4℃ 1 000 r/min 离心 10 min. 弃上清, 用含有 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液(购于 Hyclone 公司)重悬, 重复离心. 细胞沉淀用 5 ml 培养液重悬, 接种于 25 cm² 的一次性培养瓶(购于 Corning costar 公司), 放入培养箱 30 min. 待部分细胞贴壁后, 轻轻转动培养瓶使不贴壁的红细胞和白细胞悬浮, 重新换液. 倒置显微镜下可见胸膜间皮细胞和少量的巨噬细胞.

补充青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 mg/L, 放入 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养. 24 h 和 72 h 各换液一次, 换液时转动培养瓶, 洗去不贴壁的红细胞和白细胞. 经反复换液和自然纯化可得较高纯度的人胸膜间皮细胞(巨噬细胞 4~5 天后开始出现裂解). 见有细胞汇合, 于第 5 天传代.

1.2 人胸膜间皮细胞的鉴定及细胞纯度、活力检测

鉴定方法: 倒置相差显微镜下观察活细胞的形态, 二代细胞进行扫描电镜和透射电镜观察细胞的超微结构. 二代细胞爬片进行免疫组化染色, 分别做抗人波形蛋白、抗人角蛋白、抗人白细胞 CD₄₅、抗 V III 因子相关抗原的单克隆抗体 4 种染色(免疫组化试剂购于博士德公司). **细胞纯度检测:** 二代细胞爬片进行抗人角蛋白免疫组化染色, 每 100 个细胞查着色阳性细胞, 计算其纯度. **活力观察:** 细胞消化脱落后离心, 制备细胞悬液, 调整细胞数为 1×10⁵ 个/ml, 吸取 100 μl 细胞悬液移入 0.5 ml 的 EP 管中, 加入等量的 0.4 g/L 台盼蓝溶液, 混匀, 在 5 min 内用血球计数板分别计数活细胞和死细胞, 计算活细胞率.

* 通讯联系人. Tel: 024-38956366, E-mail: hfwang626@sohu.com

收稿日期: 2006-06-09, 接受日期: 2006-07-28

1.3 人胸膜间皮细胞水通道蛋白 1~10 mRNA 表达检测

1.3.1 标本的收集与保存. 第三代细胞长满瓶壁 80%时, 吸出培养液, 用 PBS 液洗去残留的培养液. 每瓶中加入 TRIZOL (购于 Invitrogen 公司) 1~1.5 ml, 用细胞刮子刮下细胞, 收集于 1.5 ml EP 管中(上述操作在冰上进行). -70°C 冻存待测.

1.3.2 总 RNA 提取及引物的合成. 提取细胞总

RNA, 操作按 TRIZOL 试剂说明进行. 紫外分光光度计测定总 RNA 纯度并计算其浓度, 总 RNA 纯度: $1.65 < A_{260}/A_{280} < 1.90$. Medline 基因库中检索 AQP_{1~10} mRNA 全基因序列, 采用 Primer 5.0 软件设计引物, 由北京三博远志生物技术公司合成引物 (2.5 OD/支). PCR 扩增引物终浓度为: 5 nmol/L. 预期扩增产物长度和引物序列 (表 1).

Table 1 Primer sequence and expecting amplification product length

AQPs-human-mRNA	Primer	Product length/bp	TA/ $^{\circ}\text{C}$
AQP ₁	F: 5' GAC CCG CTC GGA CTT ACT 3' R: 5' CTT CTG GAC CCA TGC TGT 3'	140	54
AQP ₂	F: 5' AGG CTA AGG GAC TGG TCT A 3' R: 5' GTG GGA GTA TGG GAC AGC 3'	391	53.5
AQP ₃	F: 5' CAC AGC CTC CCT TAT CGT 3' R: 5' AAT GAC CAG GAC CAC CAG 3'	106	54.2
AQP ₄	F: 5' CAT GGA GGT GGA GGA CAA 3' R: 5' TGG GTG GAA GGA AAT CTG 3'	206	52
AQP ₅	F: 5' TGA ACC CAG CCC GCT CTT T 3' R: 5' GCT CCT CCC AGT CCT CGT CA 3'	204	58
AQP ₆	F: 5' AGT GTC CAC AGC GTC CTT 3' R: 5' AAC CTC CTA CGA TGA TTT 3'	366	54.1
AQP ₇	F: 5' CGT GCC CTG GAG GAA GTT 3' R: 5' GGT CAG CCA CGC CTC ATT 3'	220	56.2
AQP ₈	F: 5' CCC GAG TTG GAC AAG GAG 3' R: 5' TGA GAA GCA AGG AAG TGG C 3'	104	52.7
AQP ₉	F: 5' TTC CAG TTC CCG CTA TGC 3' R: 5' ATG CCA CAA TGT CCT CCC 3'	114	50.5
AQP ₁₀	F: 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3' R: 5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'	150	55.7
β -actin (human)	F: 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3' R: 5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'	498	55.5

1.3.3 cDNA 合成. 应用 RT-PCR 试剂盒(购于 TaKaRa 大连宝生物有限公司)逆转录合成 cDNA. 每个反应体系中加入总 RNA 4 μl (约 1 μg), 2 \times 缓冲液 20 μl , MgSO_4 (25 mmol/L) 8 μl , dNTPs (10 mmol/L) 2 μl , AMV(逆转酶: 22 U/ μl) 2 μl , Oligo-dT₁₅ (50 $\mu\text{mol/L}$) 2 μl , RNase -inhibitor

(40 U/ μl) 1 μl , 双蒸水 1 μl . 将上述反应物放入 PCR 仪(BIOMETRA 型): 65°C 1 min; 30°C 5 min; $30^{\circ}\text{C} \rightarrow 65^{\circ}\text{C}$, 15~30 min 匀速升温; 65°C 30 min; 98°C 5 min; 5°C 5 min. cDNA 存于 -20°C 备用.

1.3.4 半定量 PCR. 内参为 β -actin, 分子质量标准为 DL2000 (购于大连宝生物工程有限公司); PCR

反应体积中, 分别吸取 cDNA 3 μ l, 双蒸水 17.1 μ l, 10 \times 缓冲液 2.5 μ l, dNTP (10 mmol/L) 2 μ l, Taq 酶 (5 U/ μ l) 0.2 μ l, 上游引物 0.1 μ l, 下游引物 0.1 μ l, 放入 PCR 仪内扩增, 共 35 个循环. AQP₁、AQP₃ 和 AQP₆ 反应条件为: 93 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s; 54 $^{\circ}$ C 1 min; 70 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 7 min. AQP₄ 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s; 52 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 7 min. AQP₅ 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s; 58 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 7 min. AQP₇ 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s; 56.5 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 7 min. AQP₈ 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s; 52.7 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 7 min. AQP₉ 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s; 50.5 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 7 min. AQP₂、AQP₁₀ 和 β -actin 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s; 55.5 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 72 $^{\circ}$ C 7 min. 在不同人样品及不同培养瓶内培养所得细胞, 每种水通道蛋白检测 6 次, 证实可靠性和验证可重复性.

1.3.5 扩增产物检测. PCR 产物行 2% 的琼脂糖凝胶电泳 (电泳仪为: DYY-III33A 型), 在紫外凝胶扫描仪观察拍照, 存入 1D Kodak 成像分析系统, 分别读取 AQP_{1~10} 和相应 β -actin 的吸光度值, 其比值用于统计学分析. 并对 PCR 扩增产物进行基因测序 (上海生物工程公司), 以确认扩增产物为目的基因序列.

1.4 统计学分析

用 SPSS13.0 统计软件进行两独立样本的 *t* 检验.

2 结 果

2.1 细胞鉴定和纯度、活力

倒置相差显微镜下可见: 人胸膜间皮细胞融合后呈多边形铺路石样 (图 1a、图 1b). 透射电镜下可见: 细胞表面有大量的微绒毛, 细胞浆内有丰富的内质网和线粒体 (图 2). 免疫组化染色显示: 抗人波形蛋白、抗人角蛋白阳性 (图 1c、图 1d), 抗人白细胞 CD₄₅、抗 V III 因子相关抗原的单克隆抗体阴性, 证实为间皮细胞. 间皮细胞纯度为 98%, 活细胞率为 97%.

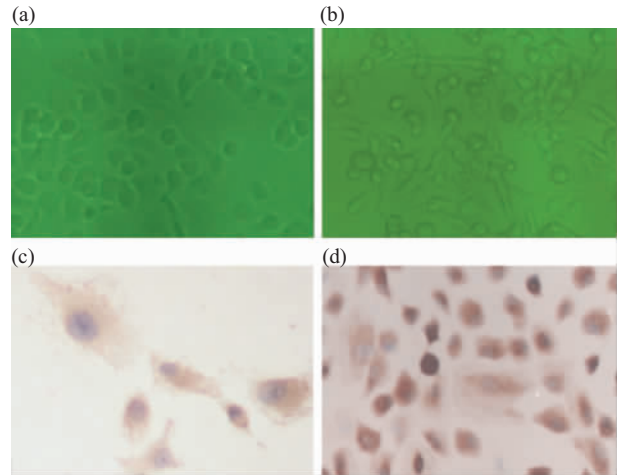


Fig. 1 Cell character under inverted phase contrast microscope and immunocytochemistry result

(a) Character of passage human pleural mesothelial cell (20 \times). (b) Character of primary human pleural mesothelial cell (20 \times). (c) Immunocytochemistry result of vimentinin in human pleural mesothelial cell (40 \times ; S-P procedure); (d) Immunocytochemistry result of cytokeratin in human pleural mesothelial cell (40 \times ; S-P procedure).

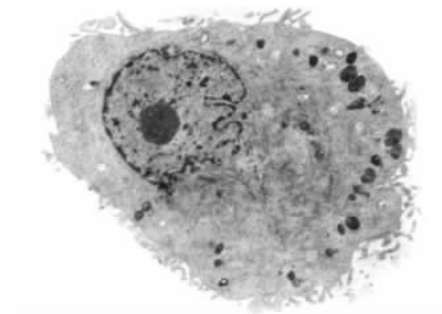


Fig. 2 Character of human pleural mesothelial cell under transmission electron microscope (430 \times)

2.2 人胸膜间皮细胞水通道蛋白 1~10 mRNA 的表达情况

人胸膜间皮细胞上 AQP_{1~10} 均有表达 (图 3, $\bar{x} \pm s$ 见表 2). 基因测序证实扩增产物为目的基因序列. AQP₁、AQP₉、AQP₁₀ mRNA 表达丰富, 其表达量与 AQP₂、AQP₃、AQP₇、AQP₈ 的表达量相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 与 AQP₄、AQP₅、AQP₆ 比无显著性差异 ($P > 0.05$). 而 AQP₄、AQP₅、AQP₆ 与 AQP₂、AQP₃、AQP₇、AQP₈ 比也无显著性差异 ($P > 0.05$).

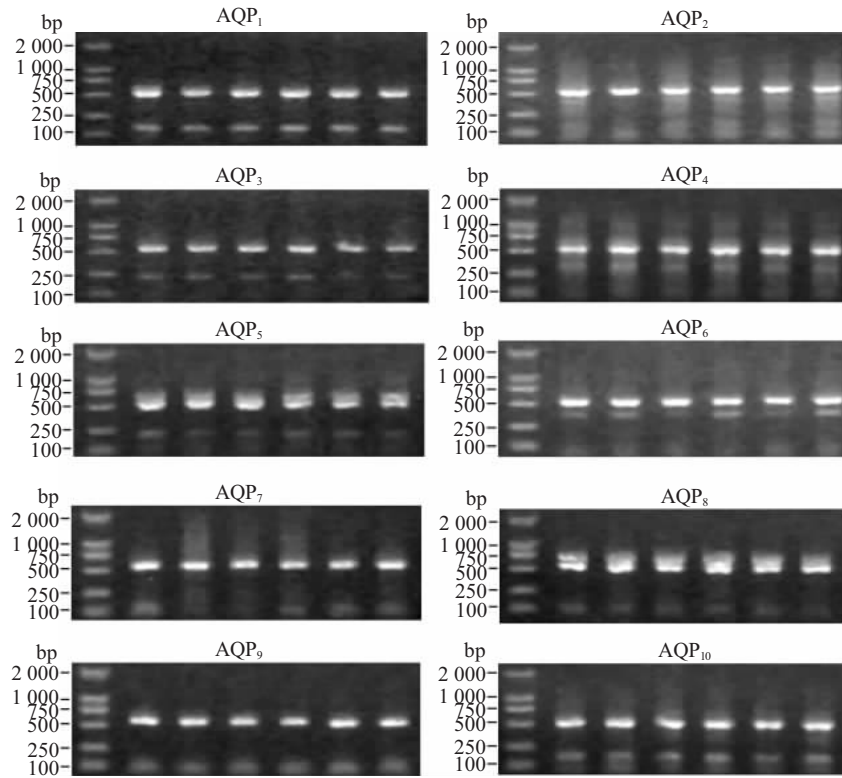


Fig. 3 Electropherogram of AQP₁₋₁₀ mRNA amplification product

Marker is DL2000. Interior *confer* is β-actin.

Table 2 The expression quantity of AQP₁₋₁₀ mRNA in human prural mesothelial cell

AQP _s mRNA	$\bar{x} \pm s$	AQP _s mRNA	$\bar{x} \pm s$
AQP ₁	1.298 ± 0.241	AQP ₆	1.129 ± 0.408
AQP ₂	0.866 ± 0.362	AQP ₇	0.607 ± 0.478
AQP ₃	0.892 ± 0.217	AQP ₈	0.995 ± 0.110
AQP ₄	1.046 ± 0.138	AQP ₉	1.340 ± 0.269
AQP ₅	1.074 ± 0.140	AQP ₁₀	1.376 ± 0.316

3 讨 论

从人良性胸腔积液分离培养原代人胸膜间皮细胞，经形态学和免疫组化鉴定，证实为间皮细胞^[3]。间皮细胞纯度为 98%，活细胞率为 97%。第三代细胞用于实验，细胞有较好的纯度和活性。体外培养人胸膜间皮原代细胞，为研究间皮细胞的功能提供了较好的载体^[5]。应用 RT-PCR 检测水通道蛋白 1~10 mRNA 在人胸膜间皮细胞上表达的情况，在不同人样品和不同代细胞上检测 6 次，进行对比，

结果均一致。基因测序证实扩增产物为目的基因序列。发现水通道蛋白 1~10 mRNA 在人胸膜间皮细胞上均有表达，AQP₁、AQP₉、AQP₁₀ mRNA 在人胸膜间皮细胞上表达丰富。

研究对比了胸腔积液和手术标本脏层胸膜上分离培养的间皮细胞水通道蛋白 mRNA 表达情况，未发现差异，因人壁胸膜和膈胸膜无法取材或取材难度较大未进行对比。研究结果与报道的某种组织和器官只是特有表达几种或一种水通道蛋白及其 mRNA 的情况不相符^[9]，而只是表达量的不同。存在这种情况的原因：一是以前少有对全部水通道蛋白及其基因表达的研究，二是实验方法灵敏度的限制。以人胸膜间皮细胞作为研究载体可以最大限度去除其他细胞与组织的干扰，可以定位于间皮细胞，应用 RT-PCR 检测有较高的灵敏性。以往研究多以组织标本为研究对象，要用免疫组化等方法进行定位。对胸膜间皮细胞水通道研究存在不足之处是没能从蛋白质水平来进行检测，但对研究胸膜间皮细胞的功能有很好的提示和指导作用。

几种机制共同作用控制胸膜腔内液体的容量和组分. 细胞机制在胸腔内液体转运中的作用逐渐受到重视, 间皮细胞同血管内皮细胞一样是有通透性的屏障系统, 胸膜间皮细胞在水的吸收及溶质主动转运中有重要作用, 也有囊泡转运蛋白的功能^[7]. 水的跨细胞膜转运有两种方式, 即通过细胞膜磷脂双层的简单扩散和细胞膜上选择性 AQP 快速转运. 水通道蛋白在哺乳动物中已发现有 13 种亚型, 即 AQP₀₋₁₂, 是水选择性通道, 也参与一些非极性分子的跨细胞膜转运, 如甘油等^[1,2]. 水通道蛋白中 AQP₁、AQP₂、AQP₄、AQP₅ 和 AQP₈、主要参与水的选择性转运. AQP₃、AQP₇、AQP₉、AQP₁₀ 参与水和非极性小分子的转运, 如甘油、尿素、嘌呤、嘧啶^[8], AQP₇ 基因敲除的小鼠, 血浆中的甘油三酯明显下降^[9], AQP₆ 也参与卤离子的跨膜转运^[10]. AQP₁₁ 和 AQP₁₂ 功能尚不清楚^[2,11]. 以往研究发现: AQP₁ 存在于多处微血管的内皮, AQP₁ 表达缺乏的人可以出现尿缩障碍、肺内毛细血管和肺间质之间的液体交换障碍^[12], AQP₁ 基因敲除的小鼠肿瘤组织血管生成减少, 可以抑制肿瘤转移^[13], 小鼠脏层胸膜微血管的内皮及间皮细胞上有 AQP₁ 丰富表达, 在鼠胸膜腔内渗透压增高时对水的转运起主要作用^[4,14]. 检测水通道蛋白 mRNA 在人胸膜间皮细胞上的表达, 对于研究人胸膜间皮细胞对胸膜腔内液体转运和其他功能有重要意义. 人胸膜间皮细胞上有 AQP₁、AQP₉、AQP₁₀ mRNA 丰富表达, 且有中等量 AQP₄、AQP₅、AQP₆ mRNA 的表达. 可以推断胸膜间皮细胞在控制胸膜腔内液体质量和量上起着重要作用. 可以更好地理解胸膜间皮细胞在胸腔内液体转运中的作用. 对水通道蛋白及其基因表达的干预可能会为胸腔积液治疗提供新的理论依据. 间皮细胞上存在 AQP₉ 和 AQP₁₀ mRNA 丰富表达, AQP₉ 和 AQP₁₀ 作为脂质通道, 乳糜性胸腔积液的形成是否与它们的功能障碍有关, 有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Kozono D, Yasui M, King L S, *et al.* Aquaporin water channels: atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest*, 2002, **109** (11): 1395~1399
- 2 Verkman A S. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci*, 2005, **118** (15): 3225~3232
- 3 Mutsaers S E. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36** (1): 9~16
- 4 Song Y, Yang B, Matthay M A, *et al.* Role of aquaporin water channels in pleural fluid dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, **279** (6): 1744~1750
- 5 王洪峰, 刘宏博, 曲文秀, 等. 人胸膜间皮细胞的分离与培养. *细胞生物学杂志*, 2006, **28** (6): 904~907
Wang H F, Liu H B, Qu W X, *et al.* *Chinese Journal of Cell Biology*, 2006, **28**(6): 904~907
- 6 Zelenina M, Zelenin S, Aperia A. Water channels (aquaporins) and their role for postnatal adaptation. *Pediatr Res*, 2005, **57** (5~2): 47R~53R
- 7 Zocchi L. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J*, 2002, **20**: 1545~1558
- 8 Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem*, 2004, **39** (1): 1~83
- 9 Maeda N, Funahashi T, Hibuse T, *et al.* Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (51): 17801~17806
- 10 Liu K, Kozono D, Kato Y, *et al.* Conversion of aquaporin 6 from an anion channel to a water-selective channel by a single amino acid substitution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (6): 2192~2197
- 11 Itoh T, Rai T, Kuwahara M, *et al.* Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330** (3): 832
- 12 King L S, Yasui M, Agre P. Aquaporins in health and disease. *Mol Med Today*, 2000, **6** (2): 60~65
- 13 Verkman A S. Aquaporins in endothelia. *Kidney Int*, 2006, **69** (7): 1120~1123
- 14 Jiang J J, Bai C X, Hong Q Y, *et al.* Effect of aquaporin-1 on pleural fluid transport. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, **24** (4): 301~305

The Expression of AQP₁₋₁₀ mRNA in The Human Mesothelial Cells

WANG Hong-Feng¹⁾, LIU Hong-Bo¹⁾, QU Wen-Xiu¹⁾, HE Ping¹⁾, WANG Zhi-Yun²⁾, LI Sheng-Qi¹⁾*

¹⁾Department of Respiratory Medicine, Second Hospital (Shengjing Hospital), China Medical University, Shenyang 110004, China;

²⁾Hebi Cancer Hospital Chest Surgery, Hebi 458000, China)

Abstract Aquaporins (AQP) are integral membrane proteins that serve as channels in the transfer of water, and in some cases, small solutes across the membrane. In order to detect the expression of AQP₁₋₁₀ mRNA in the human pleural mesothelial cells, culture reproducible model of human pleural mesothelial cells was established *in vitro*. The value of aquaporin water channels was investigated in pleural fluid dynamics. Mesothelial cells were isolated from pleural effusion fluid of nonmalignant pleural effusion patients and cultured *in vitro*. The mesothelial cells were identified by morphology and streptomycetes protein-peroxidase(S-P) procedure. RT-PCR was used to detect the expression of AQP₁₋₁₀ mRNA in human pleural mesothelial cells. Establishment of culture reproducible model achieved success of human pleural mesothelial cells *in vitro*. Immunocytochemistry revealed that cytokeratin and vimentin expressed positive, V III factor associated antigen and CD₄₅ was negative. Confluent human pleural mesothelial cells appeared multipolar and like cabbblestone. Under electron microscopy numerous surface microvilli and abundant endoplasmic reticulum were observed. The cells was identified that it was mesothelial cells. The cells isolated from human pleural effusion fluid have higher purity quotient. RT-PCR studies showed that all of the AQP₁₋₁₀ mRNA expressed in mesothelial cells. AQP₁, AQP₉, AQP₁₀ mRNA have abundant expression in mesothelial cells and significant deviation was found between AQP₁, AQP₉, AQP₁₀ and AQP₂, AQP₃, AQP₇, AQP₈. Human pleural mesothelial cells expressed AQP₁₋₁₀ mRNA, all of them have relation with the function of human pleural mesothelial cells. It was confirmed that mesothelial cells have important contribution in pleural fluid dynamics. Aquaporins (AQP) are involved in rapid and active gating of water across biological membranes. Expression of aquaporins was intervened, new treat method may be found of pleural effusion.

Key words human mesothelial cell, culture, aquaporins

*Corresponding author. Tel: 86-24-38956366, E-mail: hfwang626@sohu.com

Received: June 9, 2006 Accepted: July 28, 2006