

塔里木兔与家兔胰腺水通道蛋白表达的比较

张建萍^① 邓芳^① 沙爱龙^{②*} 黄振^①

① 塔里木大学生命科学学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 阿拉尔 843300;

② 塔里木大学动物科学学院 阿拉尔 843300

摘要: 通过检测塔里木兔 (*Lepus yarcandensis*) 胰腺中水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 1 和 4 的表达及分布情况, 以探讨水通道蛋白在塔里木兔适应干旱缺水环境中的作用。采用常规 H. E 染色观察塔里木兔胰腺组织学结构, 采用免疫组织化学法检测 AQP1 和 AQP4 在胰腺中的分布位置及表达, 并与家兔 (*Oryctolagus curiculus*) 进行比较。结果显示, AQP1 在胰腺微血管内皮细胞、血细胞、泡心细胞和小叶内导管上皮细胞均有表达; AQP4 在小叶间导管基底膜和胰岛细胞膜上有表达。与家兔相比, AQP1 在塔里木兔胰腺外分泌部的表达较弱, 而在小叶内导管的表达较强; AQP4 在塔里木兔胰腺内分泌部的表达较低。以上结果说明, AQP1 在塔里木兔胰腺小叶内导管的表达上调, 推测可能加强了浓缩胰液的能力, 以尽量保住体内的水分, 这是塔里木兔对于干旱缺水环境的适应性调节。与家兔相比, 塔里木兔胰腺 AQP1 和 AQP4 的表达均较低, 说明塔里木兔胰腺水液代谢能力比家兔低, 这可能与塔里木兔所食食物营养匮乏有关。

关键词: 塔里木兔; 水通道蛋白 1; 水通道蛋白 4; 胰腺; 免疫组织化学

中图分类号: Q495 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2013)06-958-06

Aquaporin Expression in Pancrease of Yarkand Hares and Domestic Rabbits

ZHANG Jian-Ping^① DENG Fang^① SHA Ai-Long^{②*} HUANG Zhen^①

① *College of Life Science, Tarim University, Xinjiang Production & Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Alar 843300;* ② *College of Animal Science, Tarim University, Alar 843300, China*

Abstract: We investigated the expression of aquaporins (AQP) 1 and 4 in pancrease of Yarkand hares (*Lepus yarcandensis*) to understand the role of AQP in adaptation to the drought environment. We observed the histological structure of pancrease in Yarkand hares by using H. E staining, detected expressions of AQP1 and AQP4 in pancrease by using immunohistochemistry, and compared these data with those domestic rabbits (*Oryctolagus curiculus*). Results showed that AQP1 was localized in microvascular endothelial cells, blood cells, centroacinar cells and intralobular ducts basal membrane. AQP4 was localized in the acinus and tralobular duct basal membrane, and pancreatic islet cell membrane. Compared with domestic rabbits, except for intralobular ducts, the expression of AQP1 was lower in the pancreas of Yarkand hares. And the expression of AQP4 was lower in the endocrine portion. These results indicate that the Yarkand hare has increased expression of AQP1 in intralobular ducts of pancrease, which may improve the ability for adaptation to the arid

基金项目 塔里木大学校长基金项目 (No. TDZKSS201108);

* 通讯作者, E-mail: lyshaailong@163.com;

第一作者介绍 张建萍, 女, 讲师; 研究方向: 动物生理生态; E-mail: jpz2008@126.com。

收稿日期: 2013-04-23, 修回日期: 2013-07-26

environment, and strengthen the ability for concentrating the pancreatic juice, so as to keep body water. Compared with domestic rabbits, expression of AQP1 and AQP4 is lower in the pancreas of Yarkand hares, indicating that the level of water metabolism in the pancreas of Yarkand hares is lower than in domestic rabbits, which may be related to insufficient food.

Key words: Yarkand Hare (*Lepus yarcandensis*); Aquaporin 1; Aquaporin 4; Pancreas; Immunohistochemistry

塔里木兔(*Lepus yarcandensis*)又叫南疆兔、莎车兔,没有亚种分化,是中国的特有物种(高耀亭 1985)。分布于新疆塔里木盆地及罗布泊地区的阿克苏、若羌、米兰、阿拉尔、尉犁、库尔勒、巴楚、且末、莎车、和田、喀什等地(高康军 1996)。夏霖等(2004)在塔里木生态考察记中指出塔里木兔是世界上最独特的兔形目动物之一,娇小玲珑,是中国所有野兔中个体最小的一种。许可芬(1986)发现该种的染色体数 $2n = 48$,与兔属已报道各种的染色体数相等,而与兔科其他各属已知染色体数相差很大。高康军等(1998)对塔里木兔和新西兰兔(*Oryctolagus curiculus*)同时进行部分生化指标的测定,发现塔里木兔血液中 Na^+ 含量显著高于新西兰兔, Ca^{2+} 显著低于新西兰兔,两种离子之间含量差异比新西兰兔大,说明它对水具有很强的调节能力。王惠娥(2009)观察发现塔里木兔的毛色和食性会发生季节性的变化。随着分子生物学的发展,近年来,有学者通过分子生物学手段对塔里木兔进行了年龄鉴定(古丽米拉·艾泽孜等 2010)、性别鉴定(阿尔孜古力·沙塔尔等 2010)、种群遗传结构(Zhang et al. 2010, 单立娟 2011)等方面的研究。以上学者的研究表明,塔里木兔由于长期生存在干旱的生态环境中,和家兔、其他野兔之间产生了较大差异,对干旱有很强的适应能力。而水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一族细胞膜上高效转运水分子的特异孔道蛋白,其种类和表达与水的分泌、吸收及细胞内外渗透压的平衡有非常密切的关系(才丽平等 2003)。迄今为止,在哺乳动物体内已经发现了 13 种 AQP (AQP0 ~ AQP12),在各种与水液代谢有关的组织器官表达,其中 4 种(AQP 1、4、5、8)在胰腺表达(张宇等 2004, 汪克建 2007)。张宇等(2004)研究发

现 AQP1 在胰液分泌和浓缩过程中起重要作用;汪克建等(2007)报道 AQP4 参与了胰岛内分泌细胞合成和分泌激素过程中水及电解质平衡的精细调节。以上研究提示, AQP1 和 AQP4 在胰腺外分泌部和内分泌部的表达具有重要意义,而胰腺是动物最重要的器官之一。为了研究 AQP 在野生动物适应干旱环境中的作用,本研究以分布在新疆干旱地区的塔里木兔为对象,检测其胰腺中 AQP1 和 AQP4 的分布及表达,并与家兔进行比较。

1 材料与方法

1.1 实验动物 塔里木兔 6 只,于 2012 年 10 月捕于塔里木盆地西北部阿克苏地区沙雅县境内($81^{\circ}45' E, 39^{\circ}31' N$),平均年龄 8 个月左右。年龄相近的健康家兔 6 只,由塔里木大学动物科技学院试验站提供。兔在自然条件下饲养,自由采食和进水。饲养 1 周后,耳缘静脉注射 20% 乌拉坦溶液麻醉,剂量按体重计 0.4 ml/kg ,迅速解剖取出胰腺,用锋利的双面刀片将胰腺切成小块,组织块大小为 $3 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$,放入预冷的 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(pH 7.4)进行固定,中间换 1 次固定液,固定 24 h 后进行常规脱水、透明、包埋,连续切片($6 \mu\text{m}$)存放于 4°C 冰箱备用。

1.2 实验试剂与仪器设备 SABC 试剂盒、AQP1 和 AQP4 抗兔多克隆抗体、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)、Poly-L-Lysine 均购自武汉博士德生物工程有限公司;生物素化山羊抗兔 IgG,即用型苏木素染液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。实验用旋转切片机构自德国徕卡公司,BA600 Mot 显微镜购自厦门麦克奥迪实业集团有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 组织结构观察 对连续切片的组织采用常规苏木素-伊红(H. E)染色,观察塔里木兔胰腺组织结构。

1.3.2 免疫组织化学检测蛋白的表达位置 获得胰组织连续切片,置烘箱 60℃烘烤 20 min 后,进行常规脱蜡至水,按照免疫组化(即用型 SABC)试剂盒步骤进行染色,其中在有些步骤中适当地增加了 PBS 漂洗的时间和次数。切片用 3% H₂O₂ 离子水室温(25℃左右)孵育 20 min,双蒸水漂洗 3 次,每次 3 min;用 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)在微波炉中热修复抗原,反复 4 次,自然冷却至常温;PBS 漂洗 5 min 3 次;5% BSA 室温孵育 30 min,甩去多余液体,不洗;将切片放入一抗(工作浓度 1:200)室温孵育 2 h,取出切片 PBS 漂洗 5 min 5 次;加入生物素化山羊抗兔 IgG 液中室温孵育 30 min, PBS 漂洗 5 min 5 次;加入 SABC 室温孵育 20 min, PBS 漂洗 5 min 4 次,后入自配 DAB 显色液中室温显色,显微镜下控制反应时间,双蒸水漂洗;苏木素轻度复染 30 s,自来水流水冲洗 15 min;然后脱水,透明,封片。自然晾干后在显微镜下观察,拍照。阴性对照采用 PBS 代替一抗孵育。

1.4 体视学测量 使用 BA600 Mot 显微镜进行观察,并进行图像采集。每种类型水通道蛋白免疫组化检测的切片,每只动物选取 3 张,每

张切片选择 6 个视野(×400)。采用方格测试系统(测试面积 15 120 mm²,测试线总长为 7 808 mm,测试线包括纵线 36 条和横线 28 条,每小格长为 4 mm,相当于实际长度的 10 μm)。两种测线的交点为测试点,采用交点计数法分别测算外分泌部和内分泌部阳性表达的面密度值,公式为: $S_v = 2Ix/Lc$ ($Lc = \sum Pc \cdot a$),式中 I_x 为阳性表达的细胞与测试方格的交点数, P_c 为测试系统落在参照系的点数, a 为方格两点间的距离(Liu et al. 2006)。

1.5 统计学分析 将数据导入 Excel 软件,采用 *t-test* 双尾双样本进行显著性分析,最后数据用均数 ± 标准差(Mean ± SD)表示。 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 塔里木兔胰腺组织结构观察 塔里木兔胰表面覆有一薄层结缔组织被膜。结缔组织深入实质,将胰分割成许多界限不明显的小叶。血管、神经和淋巴管与结缔组织同时进入胰内反复分支,走行于小叶间。H. E 染色可见,塔里木兔胰腺外分泌部(exocrine portion)主要为浆液性复管泡状腺(图 1a)和导管(图 1b,c)组成。而内分泌部(endocrine portion)即胰岛(图 1d),是分散在外分泌部腺泡之间的内分泌细胞团,染色浅淡,大小不等,直径为 68 ~ 400 μm。

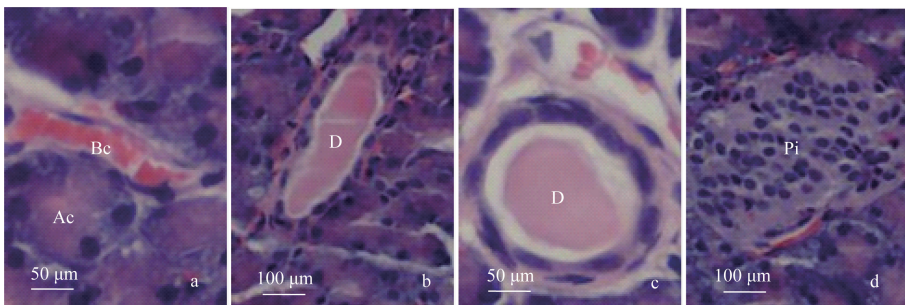


图 1 塔里木兔胰腺组织学结构

Fig. 1 Histological structure of pancrease in *Lepus yarcandensis*

a. 腺泡(×400); b. 导管(×200); c. 导管(×400); d. 胰岛(×200)。

a. Acinus(×400); b. Duct(×200); c. Duct(×400); d. Pancreatic islet(×200)。

Ac. 腺泡; Bc. 血细胞; D. 导管; Pi. 胰岛。Ac. Acinar cell; Bc. Blood cell; D. Duct; Pi. Pancreatic islet.

2.2 免疫组化检测 AQP1 和 AQP4 在胰腺中的分布位置 AQP1 阳性信号定位于细胞质中,呈浅黄色或棕黄色,塔里木兔和家兔胰腺中,AQP1 在泡心细胞(图 2a,b),血细胞(图 2c,d),和小叶内导管的基底膜(图 2e)均有表达,随着小叶间导管向远端延伸,AQP1 的表达逐渐减弱,在大的小叶间导管不表达。胰腺腺泡和胰岛细胞内无 AQP1 的表达(图 f)。AQP4 阳性信号定位于细胞膜上,呈浅黄色,塔里木兔胰腺中,AQP4 在外分泌部的小叶间导管细胞和内分泌部胰岛细胞有表达(图 2g,h),小叶内导管细胞(图 2i)未见表达。家兔胰腺中,AQP4 阳性着色分布在导管基底膜(图 2j),腺泡细胞基底膜(图 2k)和胰岛细胞基底侧膜(图 2l)。与家兔相比,AQP1 在塔里木兔胰腺外分泌部的表达较弱,而其在小叶内导管的表达较强(图 2e);AQP4 在塔里木兔胰腺内分泌部的表达较低(表 1)。

3 讨论

塔里木兔的胰腺由外分泌部和内分泌部构成。外分泌部分泌胰液,内含胰淀粉酶、胰脂肪酶和胰蛋白酶等多种消化酶。内分泌部分泌激素,参与体内的糖代谢。目前对 AQP 在胰腺的分布进行了研究,在大鼠(*Rattus norvegicus*)胰腺的导管部有 AQP1 和 AQP5 表达,腺泡观察到 AQP8 的表达(Ishibashi et al. 1994),提示 AQP1 参与了胰液的合成和分泌过程中的水转运。AQP4 在大鼠胰腺的内分泌部有较强表达,在外分泌部腺泡的表达较弱(Hurley et al. 2001)。这些研究提示,AQP1

和 AQP4 对胰腺组织水分子的转运起重要作用。本研究免疫组化结果显示,AQP1 在塔里木兔胰腺泡心细胞、血细胞和小叶内导管的基底膜表达,在大的小叶间导管不表达。这与 Burghardt 等(2003)报道的 AQP1 在人类(*Homo sapiens*)胰腺中的表达部位相似,提示胰液是在在导管系统的末端分枝部(闰管和小的导管)被浓缩加工,而较大的导管仅起到运输的作用。AQP4 在塔里木兔胰腺外分泌部有较弱表达,在内分泌部有明显表达。这与汪克建等(2007)报道 AQP4 在大鼠胰腺的表达相似,不同之处在于,本实验发现 AQP4 在塔里木兔和家兔胰腺大的导管也有表达,这可能与研究的物种不同有关。根据 AQP1 和 AQP4 的分布情况(图 2)可以看出,塔里木兔胰腺 AQP1 参与胰液的浓缩加工,AQP4 参与激素合成和分泌过程中的水转运。

环境压力可以加速特定压力敏感蛋白的进化速率,针对这种特定环境,压力敏感蛋白产生新的功能或加强原有功能,从而提高动物对这种压力环境的适应能力(Nei 2005)。高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)在寒冷压力环境的作用下,其瘦素蛋白发生了适应性的功能进化,产生了新的功能或原有功能的加强(Yang et al. 2008)。与家兔相比,AQP1 在塔里木兔胰腺小叶内导管的表达上调,推测可能加强了浓缩胰液的能力,是塔里木兔对干旱缺水环境的适应性调节。塔里木兔的生存环境是塔里木盆地,该盆地四周为昆仑山、帕米尔、天山和阿尔金山等高大山系所环绕,湿润的海洋气流难以抵达,在盆地中部形成塔

表 1 免疫组化检测 AQP1 和 AQP4 在胰腺表达的面密度(1/μm)

Table 1 The surface area density of AQP1 and AQP4 expression in pancreas as revealed by immunohistochemistry

物种 Species	组织 Organ	AQP1	AQP4
塔里木兔	胰腺外分泌部 Exocrine portion in pancreas	0.010 7 ± 0.001 9*	0.001 0 ± 0.002 1*
<i>Lepus yarcandensis</i>	胰腺内分泌部 Endocrine portion in pancreas	0.000 6 ± 0.002 8	0.009 9 ± 0.001 5 ^Δ
家兔	胰腺外分泌部 Exocrine portion in pancreas	0.019 1 ± 0.001 4	0.018 7 ± 0.000 7
<i>Oryctolagus curriculus</i>	胰腺内分泌部 Endocrine portion in pancreas	0.000 9 ± 0.001 1	0.020 4 ± 0.001 3

* $P < 0.05$, 塔里木兔胰腺外分泌部与家兔胰腺外分泌部比较; $\Delta P < 0.05$, 塔里木兔胰腺内分泌部与家兔胰腺内分泌部比较。

* $P < 0.05$, the exocrine portion of Yarkand hares compared with that of domestic rabbits; $\Delta P < 0.05$, the endocrine portion of Yarkand hares compared with that of domestic rabbits.

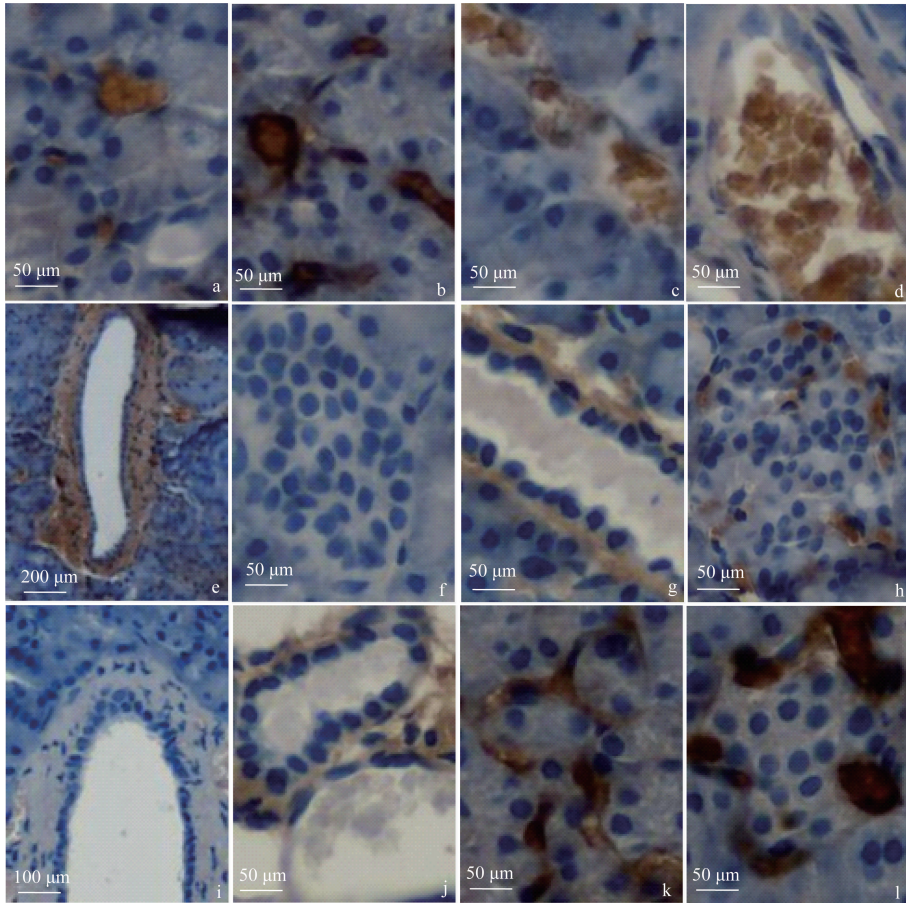


图2 AQP1 和 AQP4 在塔里木兔与家兔胰腺的表达

Fig.2 Expressions of AQP1 and AQP4 in pancreas of Yarkand hares and Domestic rabbits

a. AQP1 在塔里木兔胰腺泡心细胞表达(×400); b. AQP1 在家兔胰腺泡心细胞表达(×400); c. AQP1 在塔里木兔血细胞表达(×400); d. AQP1 在家兔血细胞表达(×400); e. AQP1 在塔里木兔胰腺小叶内导管的基底膜表达(×100); f. AQP1 在塔里木兔胰岛未见表达(×400); g. AQP4 在塔里木兔胰腺导管细胞基底膜表达(×400); h. AQP4 在塔里木兔胰岛表达(×400); i. AQP4 在塔里木兔小叶内导管未见表达(×200); j. AQP4 在家兔胰腺导管细胞基底膜表达(×400); k. AQP4 在家兔腺泡细胞基底膜表达(×400); l. AQP4 在家兔胰岛表达(×400)。

a. AQP1 is localized in centroacinar cells of Yarkand hares (×400); b. AQP1 is localized in centroacinar cells of domestic rabbits (×400); c. AQP1 is localized in blood cells of Yarkand hares (×400); d. AQP1 is localized in blood cells of domestic rabbits (×400); e. AQP1 is noticed in intralobular duct basal membrane of Yarkand hares (×100); f. AQP1 is not noticed in pancreatic islets of Yarkand hares(×400); g. AQP4 is localized in duct basal membrane of Yarkand hares (×400); h. AQP4 is localized in pancreatic islets of Yarkand hares (×400); i. AQP4 is not noticed in intralobular ducts of Yarkand hares (×200); j. AQP4 is localized in duct basal membrane of domestic rabbits (×400); k. AQP4 is localized in the acinar cells basal membrane of domestic rabbits (×400); l. AQP4 is localized in pancreatic islets of domestic rabbits (×400).

克拉玛干沙漠,这里具有极度干旱的大陆性特点,年降水量不足 100 mm,大多在 50 mm 以下,降水稀少,蒸发强烈,空气十分干燥,冬季干旱程度更严重。严酷的气候环境使得塔里木盆地的植物贫乏,夏季塔里木兔还可以以杂草、灌

丛、苜蓿(*Medicago sativa*)、瓜类等为食。到了冬季仅有的植物也已干枯,只能以芦苇(*Phragmites australis*)根、甘草(*Glycyrrhizae*)根、树皮、树根为食(王惠娥 2009)。实验对照动物家兔,生活条件较优越,水源充足,食物营

养丰富。塔里木兔由于长期生活在干旱缺水、食物营养匮乏的环境中,与家兔相比,其胰腺 AQP1 和 AQP4 的表达较低,可能是为了降低水的代谢以便更好地适应严酷的生存环境。

参 考 文 献

- Burghardt B, Elkaer M L Jr, Kwon T H, et al. 2003. Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut*, 52(7): 1008 - 1016.
- Hurley P T, Ferguson C J, Kwon T H, et al. 2001. Expression and immunolocalization of aquaporin water channels in rat exocrine pancreas. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(4): 701 - 709.
- Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, et al. 1994. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14): 6269 - 6273.
- Liu M J, Guo M. 2006. Expression of AQP-2 and AQP-4 in mouse kidney during development and maturation. *Acta Anatomica Sinica*, 37(5): 588 - 591.
- Nei M. 2005. Selectionism and neutralism in molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12): 2318 - 2342.
- Yang J, Wang Z L, Zhao X Q, et al. 2008. Natural selection and adaptive evolution of leptin in the ochotona family driven by the cold environmental stress. *PloS One*, 3(1): e1472.
- Zhang Q, Xia L, He J B, et al. 2010. Comparison of phylogeographic structure and population history of two *phrynocephalus* species in the Tarim Basin and adjacent areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(3): 1091 - 1104.
- 阿尔孜古力·沙塔尔, 迪力夏提·阿不力孜, 孜比尔妮莎·吾不力, 等. 2010. 扩增 SRY 基因鉴定塔里木兔性别的研究. *新疆农业科学*, 47(5): 992 - 995.
- 才丽平, 赵金茹, 林庶茹, 等. 2003. 水通道蛋白研究进展. *解剖科学进展*, 9(2): 167 - 170.
- 高康军, 燕顺生, 孙玉华, 等. 1996. 新疆特有野生动物——塔里木兔. *中国实验动物学杂志*, 6(4): 255.
- 高康军, 燕顺生, 孙玉华, 等. 1998. 塔里木兔部分生物学特性的研究. *中国比较医学杂志*, 8(2): 85 - 87.
- 高耀亭. 1985. 中国塔里木兔考察简报. *兽类学报*, 5(1): 77 - 79.
- 古丽米拉·艾泽孜, 马合木提·哈力克. 2010. 塔里木兔牙齿鉴别年龄的初步研究. *地方病通报*, 25(4): 44 - 45.
- 单立娟. 2011. 新疆兔属物种的群体遗传学及系统发育关系. 乌鲁木齐: 新疆大学博士学位论文, 45 - 55.
- 王惠娥. 2009. 塔里木兔的生物学特性和开发利用. *中国草食动物*, 29(4): 65 - 65.
- 汪克建, 孙善全, 冉建华, 等. 2007. 水通道蛋白4在胰腺的表达. *重庆医科大学学报*, 32(7): 673 - 675, 745.
- 夏霖, 杨奇森. 2004. 塔里木生态考察记. *大自然探索*, (8): 4 - 11.
- 许可芬. 1986. 塔里木兔的核型分析. *兽类学报*, 6(4): 249 - 253.
- 张宇, 才丽平, 王德山. 2004. 胰腺外分泌部水通道蛋白的研究进展. *山西医科大学学报*, 35(1): 63 - 65.