

高声压脉冲超声空化作用对兔肝细胞水通道蛋白4及钠钾ATP酶表达的影响

皋月娟 王 菲 董小小 高文宏

摘 要 **目的** 探讨高声压脉冲超声空化作用对兔肝细胞水通道蛋白4(AQP 4)及钠钾ATP酶($\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase)表达的影响。**方法** 将健康新西兰大白兔41只随机分为空白对照组($n=5$)及不同辐照时间组:T1组(辐照时间1 min, $n=12$)、T5组(辐照时间5 min, $n=12$)及T10组(辐照时间10 min, $n=12$);T1、T5及T10组采用高峰值负压($P=2.0$ MPa)脉冲超声联合经静脉脂质微泡注射行肝脏超声辐照,随后获取肝脏组织标本;空白对照组仅行开腹手术获取肝脏组织标本。免疫组织化学法观察各组AQP 4及 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase蛋白表达分布情况;蛋白免疫印迹法检测各组AQP 4及 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase蛋白表达量。**结果** 超声辐照后T1、T5及T10组AQP 4及 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase强阳性表达细胞均较空白对照组数量增多、分布范围广泛;AQP 4蛋白表达量均较空白对照组显著增高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),且T1、T10组与T5组AQP 4蛋白表达量比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),T1组与T10组比较差异无统计学意义;T5组和T10组 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase蛋白表达量明显高于空白对照组及T1组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),T5组与T10组比较差异有统计学意义($P<0.05$),T1组与空白对照组比较差异无统计学意义。**结论** 高声压脉冲超声空化作用在引起正常兔肝脏组织水肿的同时可引起AQP 4及 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase蛋白表达量的增加,超声辐照时间的长短可影响蛋白表达量。

关键词 超声空化;微泡;水通道蛋白;钠钾ATP酶;肝脏,兔

[中图分类号]R445.1;R-33

[文献标识码]A

Effects of acoustic cavitation on the expression of aquaporin 4 and sodium potassium ATP enzyme in rabbit hepatocytes

GAO Yuejuan, WANG Fei, DONG Xiaoxiao, GAO Wenhong

Department of Ultrasound, the 5th Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of acoustic cavitation on the expression of proteins-aquaporin 4 (AQP 4) and sodium potassium ATP enzyme($\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase) in normal rabbit hepatocytes.**Methods** Forty-one healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into the control group ($n=5$) and three different irradiation time groups: T1 group (irradiation time was 1 min, $n=12$), T5 group (irradiation time was 5 min, $n=12$) and T10 group (irradiation time was 10 min, $n=12$). Animals in T1 group, T5 group and T10 group were treated with high peak negative pressure ($P=2.0$ MPa) ultrasound irradiation combined with microbubble. Liver tissue specimens were obtained after ultrasound irradiation. Liver tissue specimens were taken by laparotomy in the control group. Distribution of AQP 4 and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase in each group was observed by immunohistochemical method, and expression of both protein was detected by Western blot. **Results** AQP 4 and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase positive cells of treatment groups were more than those of control group. AQP 4 protein expression of T1 group, T5 group and T10 group were significantly higher than that of control group (all $P<0.05$). Comparison between groups showed that the expression of AQP 4 of T5 group was significantly higher than that of T1 group and T10 group (both $P<0.05$), while the difference between T1 group and T10 group was not statistically significant. The expression of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase of T5 group and

基金项目:国家自然科学基金项目(81301239);湖北省卫生健康科研基金项目(WJ2019H091)

作者单位:100039 北京市,中国人民解放军总医院第五医学中心超声科(皋月娟);昆明医科大学第一附属医院超声科(王菲);中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院超声科(董小小);中国人民解放军中部战区总医院超声科(高文宏)

通讯作者:高文宏, Email: 165367865@qq.com

T10 group were significantly higher than that of control group and T1 group (all $P < 0.05$), while the difference between T1 group and control group was not statistically significant. Expression of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase in T5 group was significantly higher than that of T10 group ($P < 0.05$). **Conclusion** Microbubble enhanced cavitation could increase expression of AQP 4 and $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase in normal rabbit liver while induce liver edema, and ultrasonic irradiation time is closely related to protein expression.

KEY WORDS Cavitation; Microbubble; Aquaporin; Sodium potassium ATP enzyme; Liver, rabbit

肝脏是血管丰富且质脆易碎的腹腔实质性脏器,严重的肝脏损伤引起的失血性休克致死率高达 4.0%~11.7%。有效控制损伤肝脏的出血可降低手术治疗的难度,为临床医师和患者提供更好的治疗条件。本课题组前期研究^[1-2]发现,在高声压超声辐照的同时辅以血池内脂质微泡灌注,可引起肝细胞急性水肿,继发的肝窦闭塞可显著降低甚至暂时性阻断肝脏局部的血流灌注,使出血量及出血速率显著下降。上述高声压脉冲超声辐照联合血管内微泡引起的超声空化效应致肝细胞水肿的病理改变明确,但其与肝细胞水肿相关蛋白之间的关系尚不明确。国内外超声治疗研究^[3-4]证实,低能量超声治疗可引起兔关节软骨及滑膜上水通道蛋白(AQP)表达的降低、抑制兔骨骼肌 ATP 酶的活性。但上述研究均未采用微泡增强超声作用,关于微泡增强的超声空化作用对肝脏水分子转运相关蛋白表达的影响,目前尚未见相关研究。本实验以此为基础,采用高声压脉冲超声联合血管内微泡注射对兔肝脏组织进行超声辐照后,检测兔肿胀肝脏组织中 AQP 4 及钠钾 ATP 酶($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase)表达量的变化,探索其与超声辐照时间之间的关系,从而进一步了解超声空化效应对肝脏组织水肿影响的作用机制。

材料与方 法

一、实验动物及分组

健康新西兰大白兔 41 只,由陆军军医大学第二附属医院动物实验中心提供[许可证号:SYXK(渝)2017-0010],雌雄不限,体质量 2~3 kg,3 个月龄。将其随机分为空白对照组($n=5$)及不同辐照时间组:T1 组(辐照时间 1 min, $n=12$)、T5 组(辐照时间 5 min, $n=12$)及 T10 组(辐照时间 10 min, $n=12$)。本实验经陆军军医大学第二附属医院实验动物伦理委员会批准。

二、仪器与试剂

1. 主要仪器:使用 CZ 960 定制型脉冲式超声发射仪(深圳市威尔德医疗电子有限责任公司),由主机、连接电缆及声波发射探头组成,发射脉冲式超声波。

2. 主要试剂:盐酸塞拉嗪注射液(陆眠宁 II,吉林省华牧动物保健品有限公司),2% 戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司, P3761),兔抗 AQP4 多克隆抗体(ab156924)、鼠抗 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 单克隆抗体(ab7671)及辣根过氧化物酶标记二抗(ab205718、ab205719)均由美国 Abcam 公司生产,“脂氟显”脂质包膜微泡(陆军军医大学第二附属医院超声科自制)。

三、实验方法

1. 辐照前准备:将健康新西兰大白兔称重后采用复合麻醉方法麻醉。肌注盐酸塞拉嗪注射液 0.3 ml/kg,待动物肌肉松弛后,经耳缘静脉建立静脉通道,静脉注射 2% 戊巴比妥钠溶液约 0.4 ml/kg,待动物角膜反射基本消失后,将其仰卧位固定于动物手术台。腹部备皮,上至胸骨柄水平,下至剑突下 10 cm 处,两侧至腋前线处。局部皮肤以医用碘伏溶液消毒,铺一次性无菌手术巾。于剑突下沿腹中线逐层切开皮肤及腹壁肌肉宽约 4 cm。将肝叶由腹壁切口轻轻拖出,置于腹壁上。

2. 超声辐照:选取暴露良好肝叶,将脉冲式超声发射仪治疗头置于肝叶表面,探头与肝叶间置充足无菌耦合剂并排出空气以保证良好耦合。经耳缘静脉通道缓慢推注稀释的脂质微泡(0.2 ml/kg 微泡以无菌生理盐水稀释至 3 ml),同时按照分组分别辐照肝脏 1 min、5 min、10 min。脉冲超声参数设置为:工作波形采用正弦波,探头频率 1.07 MHz,脉冲重复频率 100 Hz,有效脉冲宽度 50 μs ,峰值负压 2 MPa,工作/间歇时间 6 s/6 s。治疗结束后取适量肝叶组织于 -80°C 冰箱保存。空白对照组动物仅采用相同方法麻醉后,开腹取适量肝叶组织于 -80°C 冰箱保存。

3. 免疫组织化学法观察 AQP 4 及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 蛋白表达:取待检测肝组织,抗原修复后加入 3% 过氧化氢溶液避光孵育 20 min,磷酸盐缓冲溶液(PBS)漂洗后加入 3% 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 30 min,先后加入一抗及二抗,PBS 漂洗,DAB 显色液显色,复染、脱水封片。低倍($\times 100$)及高倍($\times 400$)显微镜下观察 AQP 4 及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 蛋白表达分布情况,以细胞膜

和/或胞质出现棕黄色颗粒为阳性。

4. 蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 检测 AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量: 取 -80° 保存待检测肝组织, 研磨后加入匀浆液提取总蛋白, 蛋白质定量法进行蛋白浓度测定, 蛋白上样量为 10 μg, 行十二烷基硫酸-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转至 PVDF 膜, 加入含 5% BSA 封闭液, 室温摇床摇动封闭 1 h, 加入一抗 4℃ 过夜, 抗体稀释液洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗室温作用 1 h, 抗体稀释液再次洗膜后, 曝光及扫描。以 GAPDH 为参照, 定量计算各组 AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量。

四、统计学处理

应用 SPSS 23.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较行独立样本 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、超声辐照后各组兔肝脏 AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白分布

超声辐照后, T1、T5、T10 组肝细胞出现不同程度肿胀, 表现为肝窦间隙变窄、消失, AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量均较空白对照组增加, 表现为小叶边缘及汇管区强阳性表达细胞数量增多、分布范围广泛。见图 1, 2。

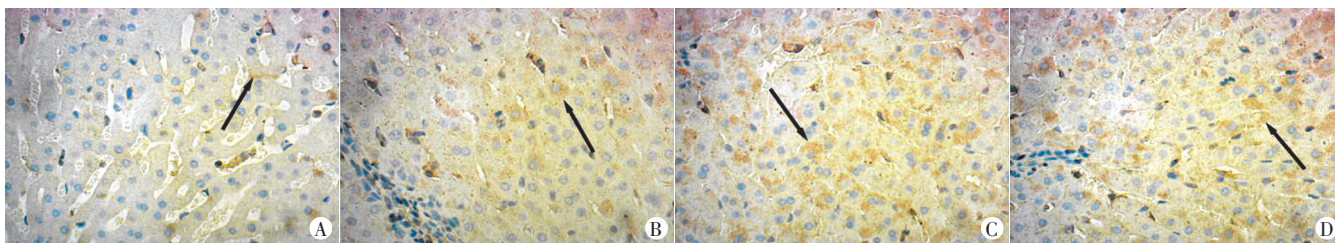


图1 超声辐照后各组兔肝脏组织中 AQP 4 蛋白(箭头示)表达情况(免疫组织化学染色, ×400)

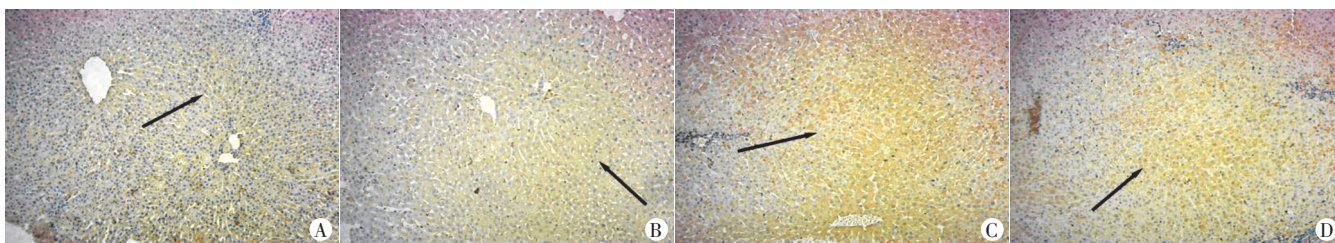


图2 超声辐照后各组兔肝脏组织中 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白(箭头示)表达情况(免疫组织化学染色, ×100)

二、超声辐照后各组兔肝脏 AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量比较

超声辐照后, T1、T5、T10 组 AQP 4 蛋白表达量均明显高于空白对照组, 差异均有统计学意义(均 P < 0.05), 且 T1、T10 组 AQP 4 蛋白表达量与 T5 组比较差异均有统计学意义(均 P < 0.05), T1 组与 T10 组比较差异无统计学意义; T5 组和 T10 组 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量明显高于空白对照组和 T1 组, 差异均有统计学意义(均 P < 0.05), T5 组与 T10 组比较差异有统计学意义(P < 0.05), T1 组与空白对照组比较差异无统计学意义。见表 1 和图 3。

表1 超声辐照后各组兔肝脏 AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	AQP 4/GAPDH	Na ⁺ -K ⁺ ATPase/GAPDH
空白对照组	0.20±0.01	0.23±0.03
T1 组	0.26±0.03*	0.26±0.04
T5 组	0.34±0.04*#	0.34±0.05*#
T10 组	0.27±0.05*△	0.30±0.03*#△
F 值	13.751	9.425
P	<0.05	<0.05

与空白对照组比较, *P < 0.05; 与 T1 组比较, #P < 0.05; 与 T5 组比较, △P < 0.05。AQP 4: 水通道蛋白 4; Na⁺-K⁺ ATPase: 钠钾 ATP 酶; GAPDH: 内参

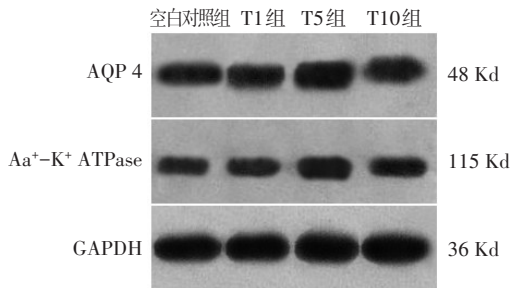


图 3 Western Blot 检测超声辐照后各组兔肝脏 AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量

讨 论

空化效应是超声的主要生物学效应之一,指液体中的微气泡在声压作用下产生的周期性震荡、膨胀甚至内爆的过程^[5]。当体内含有大量外源性空化核(如微泡造影剂)时,空化的阈值降低、强度增加^[6]。微泡增强超声空化效应已引起国内外研究者的广泛关注,目前相关研究方向包括超声空化溶栓^[7]、止血^[8]、肿瘤物理疗法^[9]、基因转染^[10]等。Zhao 等^[2]研究证实,高声压脉冲超声辐照联合血管内脂质微泡注射可产生血流阻断效应,引起辐照区域肝细胞急性水肿及继发性肝窦闭塞,该效应对肝脏的急性止血效果佳。在此基础上,本课题组前期研究^[1]对空化效应致肝细胞肿胀的相关声脉冲参数进行了深入探讨,发现高峰值声压(2 MPa)脉冲超声辐照正常兔肝脏后,辐照区域肝组织肿胀,超声造影显示其血流灌注量下降、血流速度减缓,该处血流下降效应随时间延长逐渐恢复。

值得注意的是,上述实验设置了 1 min、5 min 及 10 min 3 个不同时间的超声辐照组,其辐照时间最长相差 10 倍,然而造影结果却证实,超声辐照时间的长短对血流下降效应无显著影响。考虑到各组间累积声能量有显著差异,因此本实验进一步观察了微观层面上细胞水分子转运相关蛋白的表达情况。

AQP 和 Na⁺-K⁺ ATPase 均为维持细胞内外水平衡的重要分子。AQP 是一组对水有高选择性的细胞跨膜转运蛋白,在细胞膜上形成四聚体,每个单体均包含一个独立的水性孔道^[11],其所介导的自由水快速被动的跨生物膜转运是水进出细胞的主要通道,缺血及细胞内外离子分布的失衡均可上调组织内 AQP 4 蛋白的表达^[12],从而引起水分子进入细胞内增多,导致细胞水肿。Na⁺-K⁺ ATPase 存在于真核细胞膜上,主要功能为调节钠离子、钾离子的跨膜转运,维持正常情况下细胞内外钠、钾离子的浓度梯度,从而保持细胞内外

渗透压的平衡^[13]。本实验经免疫组织化学观察及 Western Blot 检测结果显示,微泡注射联合高声压脉冲超声辐照后,辐照区域肝细胞均表现为不同程度的肿胀,且各超声辐照时间组 AQP 4 蛋白表达量,以及 T5 组和 T10 组 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量均较空白对照组显著升高(均 $P < 0.05$),提示高声压脉冲超声空化作用可引起肝细胞水平衡相关蛋白表达量的增加。推测其原因为在高声压脉冲超声辐照下,血池内微泡产生的强烈瞬态空化作用会引起邻近细胞膜的空化损伤,导致声孔形成,引起细胞内外渗透压和离子浓度的失衡,从而上调 AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 的蛋白表达量。

进一步的组间比较结果显示,当辐照时间仅为 1 min 时(T1 组),AQP 4 蛋白表达量(0.26 ± 0.03)较空白对照组(0.20 ± 0.01)即已显著升高($P < 0.05$);辐照时间延长为 5 min 时(T5 组),其表达量进一步升高(0.34 ± 0.04),与 T1 组和空白对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);而当辐照时间为 10 min 时(T10 组),AQP 4 表达量(0.27 ± 0.05)较 T5 组反而有所降低,与 T1 组比较差异无统计学意义,其蛋白表达随辐照时间延长呈先升后降的趋势。与 AQP 4 相似,Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量也随辐照时间延长呈先升后降的趋势,在辐照时间为 5 min 时(T5 组)蛋白表达量(0.34 ± 0.05)较对照组显著升高($P < 0.05$),辐照 10 min 时(T10 组)其表达量(0.30 ± 0.03)亦有所降低,且与 T5 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明超声辐照时间的长短对 AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量的影响不同。结合前期研究^[1]结果发现,辐照仅 1 min 的高声压脉冲超声辐照不仅可引起肝脏组织显著肿胀、血流灌注量下降、血流速度减缓,同时可上调 AQP 4 的表达。随着辐照时间的延长,肝脏组织血流灌注量变化无显著差异,但 AQP 4 及 Na⁺-K⁺ ATPase 蛋白表达量有显著变化,在辐照 5 min 时(T5 组)蛋白表达量较空白对照组及 T1、T10 组均显著升高(均 $P < 0.05$)。推测可能与肝脏特殊的组织结构有关。声孔效应动力学研究^[14]表明,微泡震荡所诱导的声孔效应程度取决于微泡到细胞之间的距离,且当微泡与细胞间距离 $< 5.5 \mu\text{m}$ 时,微泡的数量与声孔效应的程度呈正相关,随着微泡空化数量的增多,声孔效应由可逆转为不可逆。肝脏作为人体重要的代谢器官,为了保证快速充分的物质交换与代谢,肝细胞排列为肝板,每个肝细胞均有两个面紧邻肝血窦的毛细血管,使得进入血液循环的微泡可以与血管

内皮细胞及肝细胞紧邻,因此空化效应容易在肝细胞膜上产生声孔,短时间的超声辐照即可引起肝细胞内外的离子失衡,从而引起显著的水平衡相关蛋白表达上调和肝细胞肿胀。然而由于肝细胞排列紧密、组织间质成分少,因此其肿胀程度有限,即使辐照时间延长,其肿胀程度及组织血流灌注量亦无显著差异。然而对于水平衡相关蛋白而言,长时间的组织灌注缺血状态可能导致细胞进一步缺氧,反而使蛋白表达量降低。提示长时间的高声压脉冲超声辐照可能引起组织代偿调节能力的下降。

综上所述,微泡联合高声压脉冲超声辐照可显著上调肝脏组织内两种水分子转运相关蛋白AQP 4和 Na^+-K^+ ATPase表达量,且辐照时间对蛋白表达量有影响,辐照1 min即可显著上调水通道蛋白表达量,随着辐照时间的进一步延长,AQP 4及 Na^+-K^+ ATPase蛋白表达量呈先升后降的趋势。但本实验未进一步探索上述水平衡相关蛋白表达量与肝脏组织肿胀程度间的关系;此外,未检测肝细胞凋亡相关蛋白的表达,且未进一步阐述辐照时间长短对肝细胞损伤的影响作用。待以后实验研究的进一步完善。

参考文献

- [1] 皋月娟,董小小,王菲,等.不同超声辐照时间空化作用对降低兔肝血流灌注效应影响的实验研究[J].临床超声医学杂志,2017,19(6):361-366.
- [2] Zhao X, Li L, Zhao H, et al. Liver haemostasis using microbubble-enhanced ultrasound at a low acoustic intensity [J]. Eur Radiol, 2012,22(2):379-386.
- [3] 唐进,黄良库,彭李华,等.低频脉冲超声干预膝骨关节炎模型兔关节软骨及滑膜水通道蛋白3的表达[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(11):1941-1944.
- [4] Medyns'ka KO, Nuryshchenko Nle, Peliukh LI, et al. ATPase activity of rabbit skeletal muscles actomyosin complex under ultrasound effect[J]. Ukr Biokhim Zh, 2012,84(4):54-60.
- [5] 冯若.超声空化与超声医学[J].中华超声影像学杂志,2004,13(1):63-65.
- [6] Miller DL, Gies RA. The influence of ultrasound frequency and gas-body composition on the contrast agent-mediated enhancement of vascular bioeffects in mouse intestine [J]. Ultrasound Med Biol, 2000,26(2):307-313.
- [7] Gao S, Zhu Q, Dong X, et al. Guided longer pulses from a diagnostic ultrasound and intraclot microbubble enhanced catheter-directed thrombolysis in vivo [J]. J Thromb Thrombolysis, 2017, 44(1):48-56.
- [8] Gao Y, Gao S, Zhao B, et al. Vascular effects of microbubble-enhanced, pulsed, focused ultrasound on liver blood perfusion [J]. Ultrasound Med Biol, 2012,38(1):91-98.
- [9] Li P, Zhu M, Xu Y, et al. Impact of microbubble enhanced, pulsed, focused ultrasound on tumor circulation of subcutaneous VX2 cancer [J]. Chinese Med J, 2014,127(14):2605-2611.
- [10] Geis NA, Katus HA, Bekeredjian R. Microbubbles as a vehicle for gene and drug delivery: current clinical implications and future perspectives [J]. Curr Pharm Des, 2012,18(15):2166-2183.
- [11] Kourghi M, Pei JV, De Ieso ML, et al. Fundamental structural and functional properties of Aquaporin ion channels found across the kingdoms of life [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2018, 45(4):401-409.
- [12] Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema [J]. Pediatr Nephrol, 2007,22(6):778-784.
- [13] 刘晶,陈复辉,陈淑芳,等.钠钾ATP酶的临床研究进展[J].现代医学,2016,44(6):914-917.
- [14] Qin P, Xu L, Han T, et al. Effect of non-acoustic parameters on heterogeneous sonoporation mediated by single-pulse ultrasound and microbubbles [J]. Ultrason Sonochem, 2016,31(7):107-115.

(收稿日期:2020-11-06)

《临床超声医学杂志》征订启事

《临床超声医学杂志》是经国家科委批准,集超声影像诊断、治疗、工程及基础研究为一体的科技刊物。国内外公开发行,月刊。为“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”、“中国科技论文统计源期刊”、“中国科技核心期刊”。设有临床研究、实验研究、综述、经验交流、病例报道、述评、专家讲座及译文等栏目,报道超声医学领域影像诊断与治疗的先进技术和前沿进展,为广大临床超声医师和研究人员提供良好的学术交流平台。

本刊刊号:ISSN 1008-6978;CN 50-1116/R。邮发代号:78-116。

每期定价:19元,全年228元(含邮寄费)。请到全国各地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅。

地址:重庆市渝中区临江路74号,重庆医科大学附属第二医院内,临床超声医学杂志编辑部。邮编:400010

电话:023-63811304,023-63693117。Email:lccscq@vip.163.com