

文章编号: 1007-1482 (2022) 01-0074-0079

· 形态结构定量研究 ·

DOI: 10.13505/j.1007-1482.2022.27.01.010

微波辐射后大鼠肺组织中 VEGF 和 AQP5 表达改变特点研究

董红艳¹, 胡向军², 彭瑞云², 王丽峰², 段昕好³

(1. 61886 部队门诊部, 北京 100084; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850;
3. 中国人民解放军总医院第八医学中心消化科, 北京 100093)

摘要:目的 探讨微波辐射后大鼠肺组织中 VEGF(血管内皮生长因子, vascular endothelial growth factor) 和 AQP5(水通道蛋白 5, aquaporin5) 的表达改变。方法 采用 10 mW/cm²、30 mW/cm²和 100 mW/cm²微波辐射 162 只二级 Wistar 雄性大鼠, 于辐射后 6 h、1 d、3 d、7 d 和 14 d 取肺组织, 用 Western Blot 和 RT-PCR 技术探讨 VEGF 和 AQP5 辐射后在大鼠肺组织中的改变。结果 ① 10~100 mW/cm²辐射后大鼠肺组织中 VEGF 的表达均减少, 改变与辐射剂量呈正相关, 在三个辐射剂量组中的表达具有量效关系和时效性关系。② 10~100 mW/cm²辐射后, 30 mW/cm²和 100 mW/cm²组均观察到了 AQP5 的表达减少, 30 mW/cm²组与 100 mW/cm²组相比, 开始发生肺水肿的时间、程度相同, 但 100 mW/cm²组恢复较慢, 具有明显的量效关系和时效性关系。结论 VEGF、AQP5 均参加了微波辐射肺水肿的发生、发展过程。

关键词: 微波; 大鼠; 肺; VEGF; AQP5

中图分类号: R88.02 文献标识码: A

The characteristics of expression changes of vascular endothelial growth factor and Aquaporin5 in lung tissues of rats after microwave radiation

DONG Hongyan¹, HU Xiangjun², PENG Ruiyun², WANG Lifeng², DUAN Xinyu³

(1. Clinic of Unit 61886 PLA, Beijing 100084, China;
2. Academy of Military Medical Sciences, Institute of Radiation and Radiation Medicine, Beijing 100850, China;
3. Gastroenterology of the Eighth Medical Centre of the Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100093, China)

Abstract: Objective To research the expression changes of vascular endothelial growth factor (VEGF)

收稿日期: 2022-02-08

基金项目: 后勤科研重大项目 (AWS18J002)

作者简介: 董红艳 (1975-), 女 (汉), 副主任医师, 硕士。研究方向: 病理学。

通信作者: 胡向军, 博士研究生导师。E-mail: xjhu2003@vip.sina.com

and aquaporin5 (AQP5) in the rat lung tissues after microwave radiation and their correlation with pulmonary edema. **Methods** A total of 162 Grade II Wistar male rats were exposed to microwave radiation with average power densities of 10 mW/cm², 30 mW/cm² and 100 mW/cm² respectively. Lung tissues taken at 6 h, 1 d, 3 d, 7 d and 14 d after the exposures were examined by Western Bolt and RT-PCR methods to detect the changes of VEGF and AQP5 in the rat lung tissues. **Results** ① The expression of VEGF in rat lungs exposed to 10~100 mW/cm² microwave radiations decreased, and the changes are positively correlated with radiation dose. The decrease of VEGF expressions in the three radiation dose groups shows dose-to-effect and time-to-effect relationship. ② After microwave radiation, the expression of AQP5 decreased in both group 30 mW/cm² and group 100 mW/cm². The start time and the extent of pulmonary edema are same in both groups, but the recovery is slower in group 100 mW/cm² showing obvious dose-to-effect and time-to-effect relationship. **Conclusions** Both VEGF and AQP5 contribute to the development of pulmonary edema after exposure to microwave radiation.

Key words: microwave; rat; lung; VEGF; AQP5

0 引言

微波是指频率在 300 MHz~300 GHz, 波长在 $1\sim 10^{-3}$ m 之间的电磁波。微波辐射所属的电磁波区域是辐射产生生物学效应的关键区域^[1], 微波辐射广泛存在于人们的日常生活和工作环境之中, 因其已成为一种新的环境污染因素而倍受关注。微波对肺脏影响的研究, 主要集中在间质性肺炎, 有学者认为肺脏是微波损伤的敏感靶器官之一^[2]。

前期实验微波模拟源辐射大鼠后, 在形态学上观察到肺组织水肿及毛细血管通透性增加中的表达改变, VEGF 表达增加, AQP5 表达减少, 并且有时效性和量效性关系, 二者可能参与了微波辐射致血-气屏障损伤的病理生理过程^[3-4]。VEGF、AQP5 和 Occludin 等参与了多种原因引起的肺部炎症和肿瘤的发生、发展及治疗过程, 是引起肺组织损伤、通透性增加、水肿的重要因素^[5]。为此, 我们采用 Western Blot、RT-PCR 等技术, 通过对大鼠肺组织中 VEGF、AQP5 的检测, 进一步探讨不同功率微波辐射对大鼠肺组织影响的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

二级雄性 Wistar 大鼠 162 只, 体重(200±20)g, 由军事医学科学院实验动物中心提供并统一饲养, 室内温度 21~23℃, 相对湿度 60%, 随机分为假辐射组和 10 mW/cm²、30 mW/cm²和 100 mW/cm²辐射组, 其中假辐射组 12 只, 10 mW/cm²、30 mW/cm²和 100 mW/cm²辐射组各 50 只。

1.2 微波辐射方法

采用军事医学科学院微波辐射源进行全身均匀辐射。大鼠在辐射盒中为固定体位。辐射台旋转以保证全身均匀辐射。平均功率密度为 10 mW/cm²、30 mW/cm²和 100 mW/cm², 辐射时间为 5 min。假辐射组仅将装有大鼠的辐射盒放于辐射台上, 不进行辐射。

1.3 检测大鼠肺组织中 VEGF 和 AQP5 表达

各组动物分别于辐射后 6 h、1 d、3 d、7 d 和 14 d 称重后, 经腹腔注射 1% 戊巴比妥钠

(30 mg/kg)麻醉后,取肺组织置液氮中冻存,备做蛋白提取及 AQP5 mRNA。兔抗 VEGF 抗体、兔抗 AQP5 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; AQP5 和 β -actin PCR 扩增的成对引物序列购自上海生工生物工程技术有限公司;兔抗 actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; PVDF 膜、Western 发光底物试剂盒购自北京普利来基因技术有限公司。

1.3.1 免疫印迹(Western Blot)方法检测大鼠肺组织中 VEGF、AQP5

制备肺组织总蛋白后,测定蛋白浓度、上样、电泳、转膜、用 PBsT 清洗 PVDF 膜、100 g/L 脱脂奶粉常温封闭 2 h;分别加入兔抗 VEGF 抗体(1:200)和兔抗 AQP5(1:100),4℃ 过夜, PBST 清洗 3×10 min;加入生物素标记的二抗(PBS-T 液 1:4000 稀释),摇床常温孵育 1 h; PBST 清洗 3×10 min;在硝酸纤维素膜上滴加酶的作用底物 ECL(带有化学发光剂),作用 1 min 后滤纸吸干,塑料保鲜膜包裹后放入暗匣,压 X 光底片曝光 2~30 min,显影,定影。将目的条带扫描后应用 CMIAS-II 图像分析仪,测目的条带的积分光密度(IOD),将扫描值与 β -actin 扫描值相比,然后以样本/内参照的比值表示 AQP5 mRNA 表达水平、VEGF 和 AQP5 蛋白表达水平。

1.3.2 RT-PCR 方法检测大鼠肺组织中 AQP5

AQP5 上游引物 mRNA5'-TCCAGGACCACAC-CAGAAAG-3',下游引物 5'-ATAAAATAGCACTC-CGTGAGCC-3'; β -actin 上游引物 5'-CTGTGC-CCATCTATGAGGGTTAC-3',下游引物 5'-AATC-CACACAGACTTGCCT-3'。参照 TRIzol 试剂说明书方法提取总 RNA,其 A260/280 在 1.7~2.0 之间。各组各时间点 RNA 提取物每 1.5 μ g 中加入 Oligo-P(dT)18Primer 0.5 μ L,无 RNA 酶的水补充至 6 μ L、70℃、5 min;再加入 5×反应液 2 μ L, RNA 酶抑制剂 0.5 μ L 和 dNTP 混合物 1 μ L、37℃,水浴 5 min 后加入 0.5 μ L AMV-RT、42℃、60 min;之后 70℃ 反应 10 min、4℃ 或冷冻保存。以 β -actin

为内参照进行 PCR,突触素 AQP5 扩增条件为 94℃、5 min;94℃、30 s;52℃、30 s(β -actin,54℃、30 s),72℃、30 s;72℃、5 min;均为 25 个循环。取 5 μ L PCR 产物与 1 μ L DNA 上样缓冲液混匀后在 10 g/L 的凝胶上电泳,用凝胶成像系统扫描分析。

1.4 数据统计处理

统计学分析文中数据以均数和标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SAS 软件进行单因素方差分析, $P<0.05$,具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺组织 VEGF 免疫印迹的变化

可见 10 mW/cm² 组辐射后 6 h,肺组织中 VEGF 含量与假辐射组相比无明显改变,在 1 d、3 d 时含量减少($P<0.05$),7 d 时见基本恢复;30 mW/cm² 组大鼠肺组织 VEGF 的改变和恢复时间基本与 10 mW/cm² 组相似;100 mW/cm² 组于辐射后 6 h 即见减少,1 d、3 d 和 7 d 持续减少($P<0.05$),至第 14 d 基本恢复。表明 10 mW/cm²、30 mW/cm² 和 100 mW/cm² 微波辐射后大鼠肺组织 VEGF 蛋白的表达变化呈先降低后恢复的过程,具有明显的量效关系,即辐射剂量越大,其表达减少越明显,且出现早、恢复迟。

结果见表 1 及图 1。

表 1 微波辐射后大鼠肺组织 VEGF 与 β -actin MOD 比值变化

辐射后 时间(d)	MOD _{VEGF/β-actin}			
	0	10	30	100
0.25	—	0.70±0.10	0.72±0.14	0.41±0.20*
1	0.68±0.12	0.53±0.11*	0.46±0.16*	0.44±0.18*
3	—	0.55±0.09*	0.58±0.18*	0.48±0.11*
7	—	0.71±0.08	0.74±0.16	0.50±0.16*
14	—	0.65±0.15	0.71±0.13	0.70±0.19

*: $P<0.05$

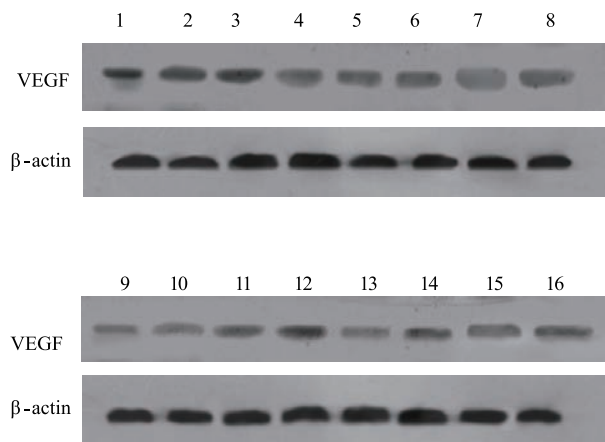


图1 微波辐射后大鼠肺组织 VEGF 蛋白变化 Western Blot 结果

1. 假辐射组; 2. 10 mW/cm²-6 h; 3. 30 mW/cm²-6 h;
4. 100 mW/cm²-6 h; 5. 10 mW/cm²-1 d; 6. 30 mW/cm²-1 d;
7. 100 mW/cm²-1 d; 8. 10 mW/cm²-3 d; 9. 30 mW/cm²-3 d;
10. 100 mW/cm²-3 d; 11. 10 mW/cm²-7 d; 12. 30 mW/cm²-7 d;
13. 100 mW/cm²-7 d; 14. 10 mW/cm²-14 d;
15. 30 mW/cm²-14 d; 16. 100 mW/cm²-14 d

2.2 大鼠肺组织 AQP5 免疫印迹的变化

辐射后 10 mW/cm²、30 mW/cm²组大鼠肺组织中 AQP5 与假辐射组相比未见显著改变; 100 mW/cm²组大鼠肺组织中 AQP5 与假辐射组相比降低, 其中在辐射后 1 d 显著降低 ($P < 0.05$), 持续至辐射后第 3 d、7 d 基本恢复。表明 100 mW/cm² HPM 辐射后大鼠肺组织 AQP5 蛋白的表达呈先降低后恢复的过程。结果见表 2 及图 2。

表 2 微波辐射后大鼠肺组织 AQP5 与 β -actin MOD 比值变化

辐射后 时间(d)	MOD _{AQP5/β-actin}			
	0	10	30	100
0.25	—	0.45±0.05	0.48±0.08	0.50±0.10
1	0.46±0.06	0.42±0.04	0.39±0.12	0.26±0.03*
3	—	0.45±0.13	0.41±0.14	0.38±0.02
7	—	0.47±0.15	0.48±0.07	0.45±0.11
14	—	0.49±0.16	0.50±0.12	0.45±0.13

*: $P < 0.05$

2.3 大鼠肺组织 AQP5 mRNA 的变化

10 mW/cm²、30 mW/cm²组各时间点未见明显

异常, 100 mW/cm² HPM 辐射后 6 h~3 d 大鼠肺组织 AQP5 mRNA 表达减少, 1 d 时减少最为明显 ($P < 0.05$), 辐射后 7 d 见恢复, 14 d 见基本恢复。表明 100 mW/cm² HPM 辐射后大鼠肺组织 AQP5 mRNA 表达呈先减少后恢复的过程。结果见图 3 及图 4。

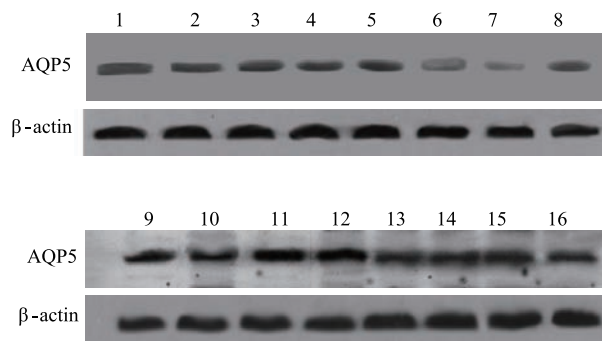


图 2 微波辐射后大鼠肺组织 AQP5 蛋白变化 Western Blot 结果

1. 假辐射组; 2. 10 mW/cm²-6 h; 3. 30 mW/cm²-6 h;
4. 100 mW/cm²-6 h; 5. 10 mW/cm²-1 d; 6. 30 mW/cm²-1 d;
7. 100 mW/cm²-1 d; 8. 10 mW/cm²-3 d; 9. 30 mW/cm²-3 d;
10. 100 mW/cm²-3 d; 11. 10 mW/cm²-7 d; 12. 30 mW/cm²-7 d;
13. 100 mW/cm²-7 d; 14. 10 mW/cm²-14 d; 15. 30 mW/cm²-14 d;
16. 100 mW/cm²-14 d

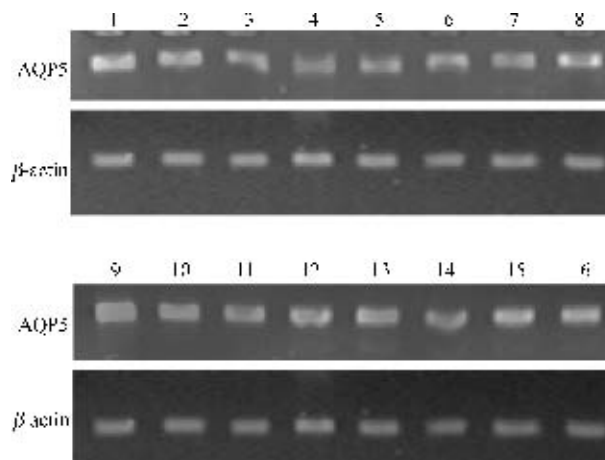


图 3 微波辐射后大鼠肺组织 AQP5 mRNA 的 RT-PCR 检测结果

1. 假辐射组; 2. 10 mW/cm²-6 h; 3. 30 mW/cm²-6 h; 4. 100 mW/cm²-6 h;
5. 10 mW/cm²-1 d; 6. 30 mW/cm²-1 d; 7. 100 mW/cm²-1 d; 8. 10 mW/cm²-3 d; 9. 30 mW/cm²-3 d;
10. 100 mW/cm²-3 d; 11. 10 mW/cm²-7 d; 12. 30 mW/cm²-7 d;
13. 100 mW/cm²-7 d; 14. 10 mW/cm²-14 d; 15. 30 mW/cm²-14 d;
16. 100 mW/cm²-14 d

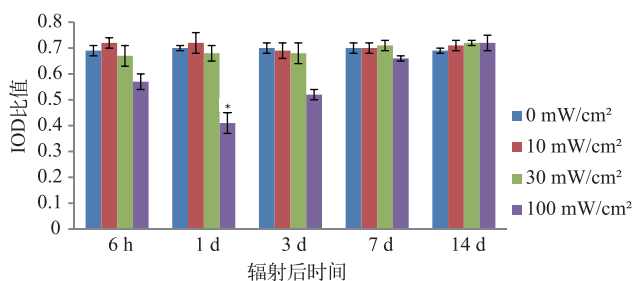


图4 微波辐射后大鼠肺组织 AQP5 mRNA 与 β-actin mRNA IOD 比值变化

3 讨论

VEGF 是血管内皮细胞的专用肽丝裂原, 其家族成员 VEGF-A 是调节血管功能的最关键因子^[6], 有关射线对肺组织 VEGF 的影响, 已有研究表明, 肺属于对辐射中度敏感的器官, 较高剂量的辐射易造成放射性肺损伤, 放射性肺损伤早期表现为组织充血水肿、渗透增加等炎症反应^[7]。VEGF 是一类促血管生成因子, 分为 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和 VEGF-F 六大类型。VEGF-A 是目前研究最多, 能在一定程度上影响血管新生^[8]。放射线可损伤血管内皮细胞, 从而导致管腔狭窄或闭塞。而 VEGF 可以激活血管内皮细胞的活性, 增加血管的渗透性, 促进血管的新生^[9-10]。

水通道蛋白 5 位于 I 型肺泡上皮细胞, 是调节水分子转运的功能性蛋白, 生理状态下可协助清除肺泡腔内多余水分, 保持肺泡腔干燥环境^[11]。MA 发现敲除 AQP5 基因, 肺泡透水性较生理状态下可降低 10 倍, 表明 AQP5 介导肺泡上皮细胞的水分子跨膜转运机制^[12]。可见, AQP5 的表达与急性肺水肿互为因果, 相互促进。但 AQP5 在 ALI 过程中对水肿液清除作用的机制仍不明确。多项研究显示^[13-14], 不同类型损伤因素致 ALI 条件下, AQP-5 表达趋势不稳定。辐射损伤作用的关键靶点是细胞核内的 DNA, 射线作用于细胞内水分子产生 HO, DNA 断裂是辐射损伤的主要机制, 水分子被认为是辐射损伤的关键介质^[15]。

在前期研究中, 观察到一定剂量微波辐射后大鼠肺组织, 表现为以出血、水肿为其主要的急性肺损伤的病理改变^[3]。VEGF、AQP5 在微波辐射致肺损伤中的生物效应和机制未见公开报道, 肺组织内 VEGF、AQP5 的表达非常丰富。那么 VEGF、AQP 在微波辐射致急性肺损伤时发挥着怎样的作用? 肺损伤时的出血、水肿是否与 VEGF、AQP 有关? 为此, 本研究采用 Western Blot、RT-PCR 方法观察 VEGF、AQP 在微波辐射后大鼠肺组织中的动态变化规律, 可见 VEGF 表达改变与辐射剂量呈正相关, 三个辐射剂量组中的表达具有量效关系和时效性关系; AQP5 蛋白及基因表达显著下降, 与肺水肿的形成相一致, 提示肺损伤后 AQP5 表达下调与肺泡上皮液体转运功能降低有关, 可能是导致肺泡水肿形成的重要因素之一。

辐射后, 肺水肿发生可能与 VEGF、AQP5 共同的作用、相互促进有关^[16]。VEGF 水平会升高并引起高渗透肺水肿。AQP5 位于器官细胞膜表面, 可参与水转运及腺体分泌, 属于肺泡上皮细胞分化的重要标志, 当肺泡 I 型上皮细胞受损时, AQP5 水平会明显升高, 本研究为辐射防护提供一定的资料, 仍需继续深入研究, 深层次探究放射性肺水肿的发生、发展机制。

参考文献(References)

- [1] 王观筠, 吴琼, 姜云升, 等. 强电磁环境长期暴露对人体血液细胞因子含量的影响[J]. 解放军医学院学报, 2020, 41(7): 715-718.
Wang Guanjun, Wu Qiong, Jiang Yunsheng, et al. Effect of long-term exposure to strong electromagnetic environment on cytokines level in human blood [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2020, 41(7): 715-718.
- [2] Yahyazadeha, Altunkaynakbz, Kaplans. Biochemical, immunohistochemical and morphometric investigation of the effect of thymoquinone on the rat testis following exposure to a 900-MHz electromagnetic field[J]. Acta Histochemical, 2019, 122(1): 151467.
- [3] 董红艳, 胡向军, 彭瑞云, 等. 微波辐射对大鼠肺脏组

- 织结构和血气屏障通透性的影响[J]. 解放军预防医学, 2017, 35(10): 1206-1208.
- Dong Hongyan, Hu Xiangjun, Peng Ruiyun, et al. The change of structure and blood-air barrier permeability of rat lung induced by microwave exposure [J]. *Pmv Med Chin PLA*, 2017, 35(10): 1206-1208.
- [4] 董红艳, 胡向军, 彭瑞云, 等. 微波辐射后大鼠肺组织中 VEGF 和 AQP5 的表达变化[J]. 中国体视学与图像分析, 2007, 12(3): 202-206.
- Dong Hongyan, Hu Xiangjun, Peng Ruiyun, et al. The express changes of VEGF and AQP5 of rat lung after microwave radiation [J]. *Chinese Journal of Stereology and Image Analysis*, 2007, 12(3): 202-206.
- [5] Taveiradasilv, Jones, Julien Williams, et al. Long-term effect of sirolimus on serum vascular endothelial growth factor D levels in patients with lymph angio leiomyomatosis [J]. *Chest*, 2018, 153(1): 124-132.
- [6] Park S A, Jeong M S, Ha K T, et al. Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system[J]. *BMB Rep*, 2018, 51(2): 73-78.
- [7] Li J, Lin J, Ren Y, et al. Roles of the WWOX in pathogenesis and endocrine therapy of breast cancer [J]. *Exp Biol Med*, 2015, 240(3): 324-328.
- [8] 向本旭, 刘婷婷, 孙芳玲, 等. VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展[J]. 中国比较医学, 2015, 25(12): 81-86.
- Xiang Benxu, Liu Tingting, Sun Fangling, et al. Advances in research on VEGF-related signaling pathways in angiogenesis [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2015, 25(12): 81-86.
- [9] Hu Wanhui, Wang Hanya, et al. Polydatin suppresses VEGF-induced angiogenesis through binding with VEGF and inhibiting its receptor signaling[J]. *FASEBJ*, 2018, 33(1): 532-544.
- [10] Quittet, Touzani O, Sindji L, et al. Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat [J]. *Acta Biomater*, 2015: 15: 77-88.
- [11] Wittekindt O H, diel P. Aquaporins in the lung [J]. *Pflugers Archiv*, 2019, 471(4): 519-532.
- [12] Direito I, madeira A, Brito M A. Aquaporin-5: From structure to function and dysfunction in cancer [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(8): 1623-1640.
- [13] Vassiliou A G, Manitsopoulos N, Kardara M, et al. Differential expression of aquaporins in experimental models of acute lung injury[J]. *In Vivo*, 2017, 31(5): 885-894.
- [14] Piresneto R C, Bernardi F D, de Araujo P A, et al. The expression of water and ion channels in diffuse alveolar damage is not dependent on DAD etiology [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): 166-184.
- [15] Yu Huan. Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extra nuclear damage[J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(2): 83-89.
- [16] Zhang Jing. T. Expression and clinical significance of AQP1, HPA and VEGF in non-small cell lung cancer [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2009, 19(18): 2750-2749.