

## EXPRESIÓN DE AQUAPORINAS EN TEJIDO PULMONAR DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

C. Gutiérrez<sup>1</sup>, C. Calero<sup>1,2,3</sup>, L. Gómez Izquierdo<sup>4</sup>, R. Sánchez-Silva<sup>2</sup>, J. L. López-Villalobos<sup>1,2</sup>, F. J. Sáenz Coronilla<sup>2</sup>, E. Arellano-Orden<sup>1,2</sup>, A. Montes-Worboys<sup>1,2,3</sup>, M. Echevarría<sup>2,3</sup>, J. L. López-Campos<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias, H. U. Virgen del Rocío, Sevilla. <sup>2</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBIS, H.U. Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Sevilla. <sup>3</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias CIBERES, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. <sup>4</sup>Departamento de Anatomía Patológica, H. U. Virgen del Rocío, Sevilla.

Financiado por Fundación Neumour Beca 11/2008.

### Resumen

**Introducción:** Estudio de la expresión de aquaporinas (AQP1 y AQP5) en el tejido bronquial y parénquima pulmonar de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fumadores sin la enfermedad.

**Método:** Utilizando un diseño caso-control, se seleccionó un grupo de 15 pacientes con EPOC (93,3% varones, con una edad media de 68 años, una media de FEV<sub>1</sub> del 72% y 26,7% con corticosteroides inhalados) y 15 fumadores sin la enfermedad, a los cuales se les sometió a cirugía de resección pulmonar por neoplasia pulmonar. Se estudió la expresión de AQP1 y AQP5 en el tejido bronquial y en parénquima pulmonar mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

**Resultados:** No encontramos diferencias en la expresión génica de estas AQPs en ambos territorios pulmonares entre los pacientes con EPOC y los fumadores sin la enfermedad. Sin embargo, en los pacientes EPOC, la expresión de AQP1 era 2,41 veces mayor en el parénquima comparado con los controles, mientras que la AQP5 mostraba un patrón inverso, con 7,75 veces mayor expresión en el tejido bronquial de los sujetos control.

**Conclusión:** Los resultados del presente trabajo proporcionan evidencia inicial respecto a la expresión de AQP1 y AQP5 en pacientes con EPOC.

**Palabras clave:** Aquaporinas 1, aquaporinas 5, EPOC.

### AQUAPORIN EXPRESSION IN THE LUNG TISSUE OF COPD PATIENTS

#### Abstract

**Introduction:** Study of aquaporin expression (AQP1 and AQP5) in the bronchial tissue and lung parenchyma of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and smokers without the disease.

**Method:** Using a case-control design, a group of 15 patients with COPD was selected (93.3% males, with an average age of 68 years, an average FEV1 of 72% and 26.7% with inhaled corticosteroids) and 15 smokers without the disease, who underwent lung resection surgery due to lung neoplasm. The expression of AQP1 and AQP5 in the bronchial tissue and in lung parenchyma was studied using real-time polymerase chain reaction (PCR).

**Results:** No differences were found in the gene expression of these AQPs in either lung territories between the patients with COPD and the smokers without the disease. Nevertheless, in the COPD patients, the expression of AQP1 was 2.41 times greater in the parenchyma compared with the controls, while the AQP5 showed an inverse pattern, with 7.75 times greater expression in the bronchial tissue of the control subject.

**Conclusion:** The results of this study provide initial evidence regarding the expression of AQP1 and AQP5 in patient with COPD.

**Key words:** Aquaporin 1, aquaporin 5, COPD

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por una limitación al flujo aéreo como consecuencia a una respuesta inflamatoria anormal del pulmón a partículas nocivas, siendo la más común de ellas en nuestro medio el humo del tabaco. Aunque el tabaco es el principal factor de riesgo para la EPOC, no todos los fumadores desarrollan la enfermedad, en este grupo se encuentran

los fumadores EPOC-resistentes, o fumadores sin la enfermedad. En la actualidad la EPOC se considera una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, con una alta prevalencia en la población general<sup>1</sup>.

En los últimos años, se han dedicado muchos esfuerzos en el estudio de la expresión de marcadores de inflamación en los pacientes con EPOC, con el fin

Recibido: 19 de octubre de 2012. Aceptado: 7 de julio de 2013.

Juan Jose Garrido Romero  
juan2238@separ.es

de encontrar marcadores biológicos con valor diagnóstico y pronóstico, que nos den la posibilidad de crear nuevas dianas terapéuticas en el futuro<sup>2</sup>.

La aquaporinas (AQP) constituyen un grupo de proteínas que forman canales específicos para el transporte de agua en las células, descubiertas en 1990<sup>3</sup>. Se ha descrito la presencia de varios miembros de esta familia en animales, levaduras, bacterias y plantas, con al menos 13 AQPs diferentes presentes en seres humanos<sup>4</sup>. Entre estas proteínas, la AQP5 es la que tiene mayor expresión en pulmón. Además de contribuir a la permeabilidad del agua en la membrana celular, las AQPs participan en la señal de transducción nerviosa, flexibilidad de la piel, metabolismo de la grasa, permeabilidad de la membrana a los gases, y en la migración y proliferación celular<sup>5</sup>. Aunque hasta el momento, ningún estudio ha evaluado la expresión de AQP5 en el tejido pulmonar de los pacientes con EPOC, se ha asociado a un polimorfismo del gen de la AQP5 con pérdida de función pulmonar, el signo de progresión de la EPOC, lo que sugiere que la expresión de esta proteína podría estar involucrada en la expresión inflamatoria y en la patogénesis de la enfermedad<sup>6</sup>. En este sentido Nig Young et al demostró que un polimorfismo de la AQP5 estaba relacionado con la disminución de la función pulmonar, medida por el FEV<sub>1</sub>, en pacientes que padecen EPOC<sup>7</sup>, dejando así abierta la posibilidad de encontrar en el estudio de las AQPs una nueva diana terapéutica. Por otro lado parece ser que la expresión de AQP5 está disminuida en el epitelio alveolar en parénquima pulmonar expuesto a daño crónico y fibrosis<sup>8</sup>.

Recientemente, nuestro grupo estudió la expresión de AQP1 en el carcinoma pulmonar y mesotelioma pleural, encontrando un aumento en la expresión de esta proteína en adenocarcinomas y mesoteliomas pleurales, pero conocemos su expresión en otros tipos histológicos de tumores. Nuestro trabajo también mostró un aumento de expresión de AQP1 en el endotelio de pequeños vasos de nueva aparición en el entorno del tumor, lo que sugiere un importante papel de AQP1 en la angiogénesis tumoral<sup>9</sup>.

A pesar de estas observaciones, la expresión tisular de AQP1 y AQP5 en pacientes con EPOC es desconocida.

Utilizando un diseño de caso-control, se seleccionó un grupo de fumadores con EPOC y un grupo de fumadores sin la enfermedad. Todos los sujetos incluidos fueron sometidos a cirugía de resección pulmonar por una neoplasia pulmonar, y en ellos se estudió la expresión de AQP1 y AQP5 en el tejido bronquial y parénquima pulmonar por transcripción

inversa de una reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

Los recientes estudios con respecto a la expresión de estos canales (aquaporinas) en el bronquio y epitelio alveolar nos invitan a pensar que jugarían un papel importante en la patogenia de la EPOC, ya sea como marcadores del daño celular o como respuesta al mismo. Por este motivo nos centramos en determinar y analizar la expresión de AQP1 y AQP5 en pacientes con EPOC frente a sujetos fumadores que no desarrollan la enfermedad encaminados al mejor entendimiento de la patogenia de la enfermedad, como estudio preliminar para posteriores investigaciones dirigidas a buscar nuevas dianas terapéuticas a nivel molecular.

## MÉTODO

El presente trabajo se diseñó como un estudio piloto observacional de casos y controles, en el cual se seleccionaron 15 pacientes fumadores con EPOC y 15 sujetos fumadores sin la enfermedad (fumadores no EPOC). Todos fueron sometidos a cirugía de resección pulmonar (lobectomía o neumectomía) debido a un tumor primario pulmonar. El estudio siguió los principios de la Declaración de Helsinki para los estudios con seres humanos. Fue aprobado por nuestro consejo de revisión institucional, y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes.

Los pacientes, siempre que fueran mayores de 40 años, fueron seleccionados de forma consecutiva en el día de su ingreso antes de la cirugía pulmonar hasta que se obtuvieron 15 casos por grupo. Se pasó un cuestionario estándar a cada paciente para la identificación de los criterios diagnósticos clínicos y funcionales de la EPOC. De acuerdo con las directrices internacionales<sup>10</sup>, los pacientes con una historia tabáquica > 10 paquetes-año y una espirometría postbroncodilatador que mostrara una relación entre el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>) y la capacidad vital forzada (FVC) por debajo de 0,7, se consideraron diagnóstico de EPOC, mientras que aquellos pacientes con un FEV<sub>1</sub>/FVC  $\geq$  0,7 se consideraron fumadores resistentes o sin la enfermedad. La gravedad de la EPOC se determinó por el FEV<sub>1</sub>, expresado como porcentaje del valor predicho de acuerdo con la guía Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD)<sup>10</sup>. Fueron excluidos los pacientes con cualquier otra enfermedad inflamatoria crónica y aquellos pacientes en los que el tiempo de la cirugía excedió las tres horas (desde la apertura del plano cutáneo hasta la extracción de la muestra quirúrgica). Una vez extraída la pieza completa, se

seleccionó una porción de bronquio macroscópicamente sano y una de parénquima pulmonar lo más lejano posible a la lesión tumoral, pasando ambas muestras a una mesa estéril sobre hielo para iniciar el procesamiento de la muestra que se describe a continuación.

### Expresión de genes

La expresión de AQP en las muestras de tejido se analizó por RT-PCR cuantitativa, incluyendo tres fases consecutivas: extracción del RNA, retrotranscripción a cDNA y amplificación del gen. A partir del tejido fresco se aisló el ARN con el kit TriSure siguiendo el protocolo del fabricante (Bioline, Reino Unido). El ARN se trató con RNasa libre de DNasa I utilizando un kit comercial (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) para eliminar cualquier ADN genómico residual, que pueda estar presente en el ARN. El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado utilizando un kit de iScript (Bio-Rad, CA,EE.UU). Cada reacción se llevó a cabo por duplicado utilizando un volumen final de reacción de 25 l:2 l de ADNc (40ng/l), 12,5 l SYBR Green PCR (Stratagene, CA,EE.UU) y 10,5 l primers/H<sub>2</sub>O. La RT-qPCR se realizó utilizando un sistema MX3005P (Stratagene, CA,EE.UU) a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos. La amplificación génica se normalizó a 18S rRNA. El análisis de los datos se realizó mediante el método 2<sup>-ΔΔCt</sup><sup>11</sup>. Los primers utilizados se enumeran en la tabla 1.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico para Ciencias Sociales (SPSS, corporación IBM, en Somers, NY, EE.UU), versión

19.0. Las variables categóricas se describieron mediante frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas se describieron con la mediana y el rango intercuartil. La comparación de las variables de cada paciente entre casos y controles se realizó con la prueba de Mann-Whitney o el test de la chi-cuadrado, según correspondiera. La expresión de los genes de AQP1 y AQP5 fue comparada entre grupos utilizando la prueba de Mann-Whitney. Se fijó el error alfa en 0,05 (dos colas).

### RESULTADOS

La muestra se compuso de 15 pacientes con EPOC (93,3% varones, con una edad media de 67 años, y una media de FEV<sub>1</sub> del 72%) y 15 fumadores sin la enfermedad (66,7% varones, con una edad media de 62 años, y un FEV<sub>1</sub> medio de 92%). En la tabla 2 se resumen las principales características de los casos y los controles con sus diferencias. Ambos grupos fueron homogéneos excepto por el consumo acumulado y el FEV<sub>1</sub>. La distribución por grupos GOLD de los casos fue: 4 casos GOLD 1 y 11 casos en GODL 2. De los pacientes con EPOC, un 26,7% tenían como terapia una combinación fija de corticosteroides inhalados y beta2 agonistas de acción larga, y un 20% con tiotropio.

Las resecciones pulmonares practicadas incluyeron cinco neumectomías derechas, una neumectomía izquierda, 14 lobectomías derechas, 9 lobectomías izquierdas y una resección atípica derecha. Con respecto a la naturaleza de la lesión neoplásica presente en cada grupo de estudio no hubo diferencias significativas y el tipo histológico más frecuente fue el carcinoma de células escamosas en 14 casos seguido de 12 adenocarcinomas y 4 dentro del grupo de otros tipos de tumores (Tabla 2).

Tabla 1: Oligonucleótidos usados en la PCR

	Oligo sentido	Oligo antisentido
18S rRNA	5'-TGAAATATCCAGAACATCTTA-3'	5'-GCAAAATTTATTGTCCCATCAT-3'
Aquaporina-1	5'-GGACACCTCCTGGCTATTGACTAC-3'	5'-GTTGCTGAAGTTGTGTGTGATCAC3'
Aquaporina-5	5'-CTGGCTGCCATCCTTTACTTCT-3'	5'-CCATGGTCTTCTTCCGCTCTT-3'

Tabla 2: Características por grupos

	Control (n=15)	Casos (n=15)	Valor p
Edad (años)	62 (9)	67 (7)	NS
Sexo (hombres)	10 (66,7)	14 (93,3)	NS
Fumadores activos (n)	3 (20)	3 (20)	NS
Tabaquismo (paq-año)	38,7 (25,9)	68,5 (35,3)	0,029
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,1 (4,4)	26,5 (4,2)	NS
FVC (%)	92,8 (15,9)	86,7 (20,9)	NS
FEV <sub>1</sub> (%)	92,8 (33,1)	72,1 (13,1)	0,031
Intervención			NS
- Neumectomías	4 (26,7)	2 (13,3)	
- Lobectomías	11 (73,3)	12 (80,0)	
- Atípicas	0 (0)	1 (6,7)	
Histología			NS
- Epidermoide	6 (40,0)	8 (53,3)	
- Adenocarcinoma	5 (33,3)	7 (46,7)	
- Otros	4 (26,6)	0 (0)	

Datos expresados en media (desviación estándar) o frecuencias absolutas (relativas) según proceda. Valor p calculado por el test de Mann-Whitney o la chi-cuadrado.

### Expresión génica

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica en ambos territorios pulmonares entre los pacientes con EPOC y los fumadores sin la enfermedad. Existió una expresión similar de AQP1 y AQP5 en tejido bronquial y en parénquima pulmonar. Al comparar la expresión del parénquima respecto al bronquio, se observó diferente expresión según la presencia o no de la enfermedad. En los pacientes fumadores con EPOC, la expresión

de AQP1 era 2,41 veces mayor en el parénquima comparado con los controles (Figura 1a), mientras que la AQP5 tenía un comportamiento inverso (Figura 1b), con una expresión en bronquio 7,75 veces mayor en los controles (fumadores sin enfermedad). No se encontraron diferencias significativas en la expresión génica entre los pacientes que reciben tratamiento y los casos que no lo reciben, ni entre fumadores activos o exfumadores de ambos grupos.

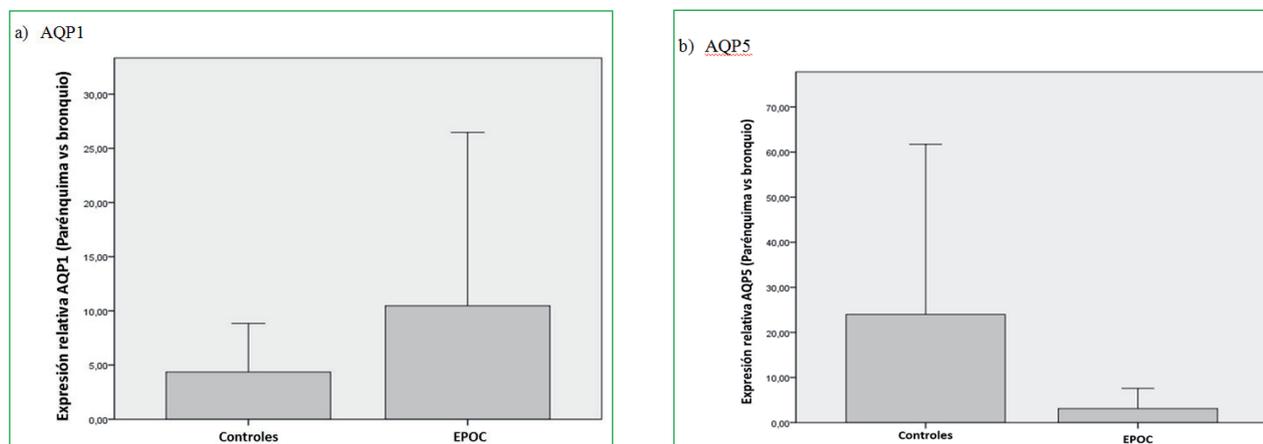


Figura 1. Expresión relativa de AQP1 y AQP5 en parénquima y bronquio de pacientes EPOC.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se describe la expresión de AQP1 y AQP5 en pacientes con EPOC y en sujetos fumadores sin la enfermedad (fumadores no EPOC), observando una sobre-expresión de AQP1 en el parénquima pulmonar de los pacientes EPOC, así como una disminución de la expresión pulmonar de AQP5.

La EPOC es una patología compleja en la que influyen no solamente factores demostrados como el tabaco sino que está influenciada por la expresión de múltiples genes. El descubrimiento de las AQPs, familia de proteínas de los canales de agua, ha dado una nueva visión del mecanismo de la permeabilidad de membrana al agua en el tejido pulmonar<sup>12</sup>. Las células que expresan AQPs en su superficie celular tienen aumentada la permeabilidad al agua hasta en 50 veces respecto a las células que no las expresan<sup>13</sup>. Las AQPs tienen un papel importante en la patogénesis de la enfermedad pulmonar. A pesar de que el cáncer de pulmón es la patología más estudiada, disponemos de diversos trabajos sobre otras enfermedades respiratorias. Recientemente en un modelo de ratón con asma inducido por ovalbúmina, se estudió el ARNm y la expresión de las proteínas AQP1 y AQP5<sup>14</sup>. Los autores encontraron que ambas AQPs se incrementaron significativamente tras tratamiento con dexametasona, ambroxol y terbutalina, indicando con ello que tanto la AQP1 como la AQP5 están estrechamente relacionadas con edema pulmonar, pero no con la infiltración eosinofílica o la secreción de moco en pacientes con asma. Sin embargo, la inflamación es cualitativamente diferente entre el asma y la EPOC, con un predominio eosinofílico en el primero y un predominio de los neutrófilos en el segundo<sup>15</sup>. Esta diferente infiltración de células no sólo es un fenómeno descriptivo de cada enfermedad, sino que también se asocia con una terapéutica diferente<sup>16</sup>.

La EPOC se ve influenciada por factores genéticos y ambientales, las interacciones entre estos factores pueden ser importantes en su patogénesis<sup>17</sup>. El tabaquismo es el principal determinante del medio ambiente de la EPOC, y las interacciones genéticas-tabaco se han asociado con la función pulmonar en las enfermedades pulmonares crónicas entre las que se encuentra la EPOC<sup>18</sup>. En este sentido es importante recordar que la mayoría de las AQPs se expresan de forma constitutiva en la membrana plasmática y la regulación de su función se produce principalmente a nivel de la transcripción<sup>3</sup>. Encontramos como la expresión de AQP1 fue mayor en el parénquima que el bronquio, sólo que en AQP1 esta mayor ex-

presión es más llamativa para la EPOC mientras que en AQP5 lo es para los controles. Por el momento desconocemos las implicaciones clínicas que esto pueda tener, pero sin duda constituye un avance en el estudio del comportamiento de estos marcadores biológicos y su relación con la EPOC.

Hasta el momento no disponemos de trabajos previos sobre la expresión de AQP1 en la EPOC. Sin embargo, en pacientes con EPOC se ha estudiado su relación con la AQP5 habiéndose publicado dos trabajos que estudian como objetivo principal la relación entre polimorfismos de la AQP5 y la EPOC. Se ha descrito una relación entre algunos polimorfismos de AQP5 y la presencia de la enfermedad. En un primer trabajo, realizado en China, los autores estudiaron la relación entre dos polimorfismos de AQP5 (rs3736309 y rs41308104) en una muestra de más de 700 individuos. Los autores observaron una relación entre el polimorfismo rs3736309 y la EPOC, estableciendo un menor riesgo de padecer la enfermedad en los portadores del alelo mutado<sup>7</sup>. Posteriormente, se estudió la asociación de 5 polimorfismos, entre los que estaba el rs3736309, en una muestra de 429 pacientes de EPOC en EE.UU con objeto de evaluar su relación con la progresión de la enfermedad. Los autores observaron una asociación entre el declive del FEV<sub>1</sub> y la presencia de tres polimorfismos (rs2878771, rs3736309 y rs296763), pero sólo en los pacientes que eran fumadores activos<sup>6</sup>.

Existe tan sólo un trabajo previo que profundiza en la expresión de AQP5 en el tejido pulmonar de paciente con EPOC. En este trabajo estudiaron a 45 sujetos chinos con EPOC y controles en el que los autores constataron la menor expresión de AQP5 en tejido bronquial obtenido por broncoscopia, que a su vez se relacionó con una mayor hipersecreción mucosa medida mediante la expresión génica del MUC5AC y corroborado por inmunohistoquímica<sup>19</sup>. Este hallazgo está en la línea de los aportados en el presente trabajo y abre la puerta a la cuestión de la fenotipación de los pacientes para la correcta evaluación de los resultados. La fenotipación del paciente con EPOC precisa un comentario especial en lo relativo a la expresión de AQP y la presencia de fibrosis pulmonar. La asociación entre los cambios morfológicos de la fibrosis pulmonar y la EPOC está siendo comúnmente descrita<sup>20</sup>. En nuestro grupo, hemos observado un aumento constante de AQP1 en los neumocitos tipo 2. Aunque algunos biomarcadores se han asociado con este fenotipo, como la proteína KL-6, el papel de la AQP1 en este contexto es desconocido<sup>21</sup>.

Una de las limitaciones importantes que presentó

nuestro trabajo es sin duda el reducido número de pacientes incluidos en cada grupo de estudio, esto es debido a la dificultad de cumplir los criterios de inclusión para el estudio. Otra limitación importante es el tipo de paciente en el que se realiza el estudio con una neoplasia pulmonar activa, que podría condicionar cambios en la expresión de las AQP's en el tejido pulmonar. En este sentido, creemos que, de ser así, se afectarían ambos grupos por igual reduciendo el potencial efecto confusor de este hecho. No obstante, siendo estrictos, nuestros resultados y las conclusiones del presente trabajo, deben ponerse en este contexto clínico. Existen trabajos previos que han utilizado muestras en similares condiciones que las nuestras sin que sus resultados finales se vean afectados<sup>22</sup>.

En resumen, nuestras observaciones proporcionan una evidencia preliminar en relación con la expresión de AQP1 y AQP5 en pacientes con EPOC comparada con fumadores sanos, con una sobreexpresión en parénquima frente al bronquio con matices de esta diferencia según el marcador estudiado. Futuros estudios deberán avanzar en el estudio de esta relación con objeto de dilucidar la relevancia clínica y biológica de este hallazgo.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, et al. BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370:741-50.
2. Rosenberg SR, Kalhan R. Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Transl Res* 2012; 159(4):228-37.
3. Moon C, Preston GM, Griffin CA, et al. The human aquaporin-CHIP gene. Structure, organization, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1993; 268(21):15772-8.
4. Verkman AS. Aquaporins at a glance. *J Cell Sci* 2011; 124(13):2107-12.
5. Saadoun S, Papadopoulos M C, Hara-Chikuma et al. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 2005; 434: 786-792.
6. Hansel NN, Sidhaye V, Rafaels NM, et al. Aquaporin 5 polymorphisms and rate of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2010; 5(12): 14226.
7. Ning Y, Ying B, Han S, et al. Polymorphisms of aquaporin 5 gene in chronic obstructive pulmonary disease in a Chinese population. *Swiss Med Wkly* 2008; 138 (39-40): 573-578.
8. Gabazza E, Kasper M, Ohta K, et al. Decreased expression of aquaporin - 5 in bleomycin - induced lung fibrosis in the mouse. *Pathology International* 2004; 54 : 774 - 780.
9. López-Campos JL, Sánchez Silva R, Gómez Izquierdo L, et al. Overexpression of Aquaporin-1 in lung adenocarcinomas and pleural mesotheliomas. *Histol Histopathol* 2011; 26(4):451-9.
10. Global Initiative for Obstructive Lung Disease, 2010. Available at [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com).
11. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6):1101-8.
12. Wang K, Feng Y, Wen F, et al. Decreased expression of human aquaporin - 5 correlated with mucus overproduction in airways of chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28 (8): 1166 - 1174.
13. Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278(1):F13-28.
14. Dong C, Wang G, Li B, et al. Anti-asthmatic agents alleviate pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in the lungs of mice with OVA-induced asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 2012; 181(1):21-8.
15. Balzano G, Stefanelli F, Iorio C, et al. Eosinophilic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. Relationship with neutrophils and airway function. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1486-92.
16. Kaur M, Smyth LJ, Cadden P, et al. T lymphocyte insensitivity to corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2012; 13:20.
17. Sandford AJ, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease. Susceptibility factors for COPD the genotype-environment interaction. *Thorax* 2002; 57(8): 736-741.
18. Collaco JM, Vanscoy L, Bremer L, et al. Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *JAMA* 2008; 299(4): 417-424.
19. Wang K, Feng YL, Wen FQ, et al. Decreased expression of human aquaporin-5 correlated with mucus overproduction in airways of chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28(8):1166-74.
20. Washko GR, Hunninghake GM, Fernandez IE, et al. COPD Gene Investigators. Lung volumes and emphysema in smokers with interstitial lung abnormalities. *N Engl J Med* 2011; 364(10):897-906.
21. Kishaba T, Shimaoka Y, Fukuyama H, et al. A cohort study of mortality predictors and characteristics of patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema. *BMJ* 2012; 2: 988.
22. Yao S, Xun W, Yuehong W, et al. Lipopolysaccharide decreases aquaporin 5, but not aquaporin 3 or aquaporin 4, expression in human primary bronchial epithelial cells. *Respirology* 2012; 17: 1144-1149.