

大鼠脑缺血/再灌注后 AQP4 的表达与脑水肿的关系

王秀辉^{1,2}, 郑咏秋¹, 姚明江¹, 宋文婷¹, 高俊峰¹, 张鹏^{1*}, 刘建勋¹

(1. 中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京 100091;

2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨在大鼠脑缺血/再灌注脑水肿中水通道蛋白-4(AQP4)表达水平的动态变化与脑含水量之间的关系。方法:50 只 SD 大鼠,随机分为假手术组和 6,12,24,48 h 脑缺血/再灌注模型组,Western blot 法测定 AQP4 的表达,干湿重法测定脑含水量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧脑含水量和 AQP4 的表达水平随着时间的推移不断增加,均在 24 h 时达到最高峰;12~24 h 时间段脑含水量显著增加($P < 0.01$),以及 AQP4 表达水平升高,48 h 时两者均稍有下降。而健侧脑含水量和 AQP4 的表达水平各时间点之间差异不显著。采用 Spearman 相关性分析结果显示,脑含水量和 AQP4 表达水平相关性显著($P < 0.05$)。结论:大鼠脑缺血/再灌注后脑含水量和 AQP4 表达水平变化趋势基本一致,两者呈时相正相关性。

[关键词] 水通道蛋白-4; 脑缺血/再灌注; 脑水肿

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)15-0182-04

[doi] 10.11653/syfy2013150182

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130527.1141.007.html>

[网络出版时间] 2013-05-27 11:41

Relationship between AQP4 Expression and Brain Water Content after Cerebral Ischemic/Reperfusion in Rats

WANG Xiu-hui^{1,2}, ZHENG Yong-qiu¹, YAO Ming-jiang¹, SONG Wen-ting¹,
GAO Jun-feng¹, ZHANG Peng^{1*}, LIU Jian-xun¹

(1. Center of Experiment, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

[收稿日期] 20121127(032)

[基金项目] 国家科技部“重大新药创制”项目(2009ZX09103-317, 2009ZX09502-014, 2009ZX09301-005-007)

[第一作者] 王秀辉, 硕士研究生, 从事中药复方药效物质基础研究, E-mail: demon_new@sina.cn

[通讯作者] * 张鹏, 副研究员, 从事中药复方药效物质基础研究, Tel:010-62835640, E-mail: onflow@sina.com

- [6] 李玉琴, 贾宝秀, 姚晓军, 等. 光谱法与分子模拟对左旋紫草素和人血白蛋白键合作用的研究[J]. 分析测试学报, 2009, 28(12):1396.
- [7] Ge F, Chen C Y, Liu D Q, et al. Study on the interaction between theasinesin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. J Luminescence, 2010, 130(1):168.
- [8] 王帅, 王海, 王日为. 天竺葵素与人血清白蛋白相互作用的光谱学研究[J]. 分析科学学报, 2011, 27(5):627.
- [9] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions; forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11):3096.
- [10] 刘彩虹, 李玉琴, 贾宝秀, 等. 黄芩苷与人血清白蛋白的相互作用研究[J]. 分析测试学报, 2011, 30(5):532.
- [11] 尚永辉, 李华, 孙家娟. 荧光光谱法研究木犀草素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析科学学报, 2011, 27(2):179.
- [12] Förster T, Sinanoglu O. Modern quantum chemistry [M]. Newyork:Academic Press,1966.
- [13] 陈国珍, 黄贤智, 许金钧. 荧光分析法[M]. 北京:科学出版社, 1990.
- [14] 王宁, 刘忠英, 胡秀丽, 等. 黄芩类药物与人血清白蛋白的相互作用[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(2):241.

[责任编辑 邹晓翠]

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] Objective: To investigate the relationship between aquaporin-4 (AQP4) expression and brain water content in brain edema after cerebral ischemic/reperfusion (I/R) in rats. **Method:** Total 50 adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham group and 6, 12, 24, 48 h cerebral ischemic/reperfusion groups. Brain water content was measured by the Wet-dry method and the expression of AQP4 was observed by Western blot. **Result:** Brain water content and AQP4 expression of ischemic side in model group was increased with delayed I/R period, and at 24 h the change was most marked, brain water content increased significantly and AQP4 expression increased from 12 h to 24 h, There was a slight decrease at 48 h. The difference of brain water content and AQP4 expression in contralateral side was not significant among different time points. The data were analyzed by method of Spearman, the results showed that the correlation was significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The consistency is obvious between the change of AQP4 expression and brain edema in ischemic side after cerebral ischemic reperfusion.

[Key words] aquaporin-4; cerebral ischemic/reperfusion; brain edema

脑水肿是缺血/再灌注引起的脑损伤的病理生理机制之一,是导致脑中风患者病情加重、恶化甚至引起患者死亡的主要原因。水通道蛋白-4 (aquaporin-4, AQP4) 是一种双向水转运通道蛋白,在脑组织中表达最丰富,与脑水肿的发生发展关系密切。本文旨在研究 AQP4 与缺血/再灌注脑水肿的关系。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 210 ~ 230 g, 维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK (京)2011-0004。

1.2 试剂 AQP4 抗体 (Abcam, 货号 ab46182); β -actin (Cell Signaling, 货号 4970); 山羊抗兔二抗 (Sigma, 货号 A6154); 苯甲基磺酰氟 (PMSF, 世纪银丰, 货号 Amresco 0754)。

1.3 仪器 电热恒温鼓风干燥箱 (DGG-9240A, 上海森信实验仪器有限公司); 电泳仪 (Powerpac Universal), 显影仪 (Molecular ImagerR ChemiDOCTM XRS+) 均为 Bio-Rad; 电子天平 (ES-1100, 长沙湘平科技发展有限公司); 大脑中动脉梗死 (MCAO) 栓线 (产品号 2432-A, 北京沙东生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 雄性 SD 大鼠,随机分为假手术组和 MCAO 后 6, 12, 24, 48 h 模型组, 每组 10 只大鼠,共 50 只大鼠。

2.2 模型的制备和模型成功的评估 大鼠采用 ip 1% 戊巴比妥钠麻醉,参照 Longa^[1] 方法制备 MCAO 模型。2 h 后提拉栓线实现脑缺血再灌注。在缺血 2 h 和再灌注后 1 h 内用电热毯维持大鼠的体温。

假手术组只分离血管,不结扎不插栓线。本实验采用 TTC 染色对模型成功与否进行评估。TTC 可与活细胞线粒体内脱氢酶反应,生成深红色脂溶性物质,坏死细胞由于线粒体脱氢酶失活而不显色。梗死组织被染成白色,正常组织被染成红色 (图 1)。TTC 染色阳性示 MCAO 造模成功,且选择缺血面积在 30% ~ 40% 的大鼠,否则弃之不用。

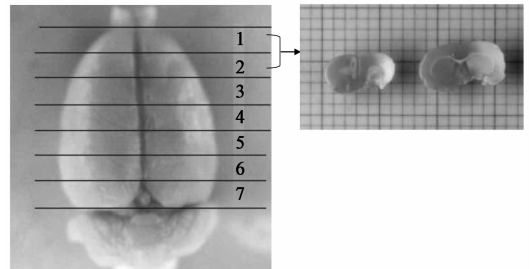


图 1 脑组织切片示意图

2.3 取材 模型组分别在 MCAO 后 6, 12, 24, 48 h 断头取脑,用实验室自制磨具刀片,取冠状面将脑均匀切为 7 片 (图 1), 从前往后第 1, 2 片用于 TTC 染色。取第 3 片脑组织,每片沿中线纵向切开,分为缺血侧和健侧脑组织,用于 Western blot 测定 AQP4 的表达。剩余第 4 ~ 7 片,每片沿中线纵向切开,分为缺血侧和健侧脑组织测定脑含水量。

2.4 脑含水量的测定 用滤纸吸干脑组织表面水分,干湿重法^[2]测定脑组织含水量。脑组织含水量计算公式为

$$\text{脑组织含水量} = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

2.5 脑组织中 AQP4 表达的测定 取出 -80 °C 冰箱中冻存的大鼠脑组织,按 RIPA 裂解液: PMSF 100:1 的比例加入 PMSF,提取总蛋白。Western blot

法测定 AQP4 表达, 每组取 3 个样本测定, 结果用 Image lab 软件计算目的蛋白和内参 β -actin 条带的体积, 目的蛋白的表达量用目的条带与内参的比值表示, 并计算平均值进行半定量分析。

2.6 数据统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 版软件包对数据进行统计处理。数据采用单因素方差分析。数据的相关性分析采用 Spearman 相关分析方法。 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同时间点的脑含水量 结果显示缺血侧各时间点之间脑含水量差异显著 ($P < 0.001$)。与假

表 1 大鼠脑缺血/再灌后不同时间点脑含水量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

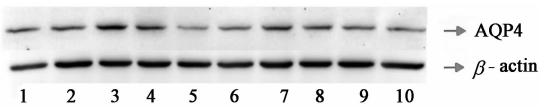
组别	Sham	6 h	12 h	24 h	48 h
缺血侧	78.47 \pm 0.37	79.71 \pm 0.15 ^{1, 2)}	79.96 \pm 0.97 ^{1, 2)}	80.95 \pm 0.46 ¹⁾	80.57 \pm 0.31 ¹⁾
健侧	78.56 \pm 0.31	79.27 \pm 0.22	78.99 \pm 0.75	79.02 \pm 0.46	79.15 \pm 0.34

注: 与 sham 组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与缺血侧 24 h 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 大鼠脑缺血/再灌后不同时间点脑组织中 AQP4 的表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Sham	6 h	12 h	24 h	48 h
缺血侧	0.039 \pm 0.024	0.046 \pm 0.026 ²⁾	0.041 \pm 0.029 ²⁾	0.124 \pm 0.053 ¹⁾	0.101 \pm 0.059
健侧	0.039 \pm 0.027	0.038 \pm 0.015	0.039 \pm 0.029	0.047 \pm 0.023	0.046 \pm 0.026

注: 与 sham 组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与缺血侧 24 h 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。



1, 3, 5, 7, 9 为缺血侧, 2, 4, 6, 8, 10 为健侧, 分别在 48 h (1, 2), 24 h (3, 4), 12 h (5, 6), 6 h (7, 8), 0 h (9, 10) AQP4 的表达

图 2 AQP4 在脑组织中的表达 (Western Blot)

3.3 脑组织中 AQP4 的表达与脑含水量的相关性 分析上述结果, 笔者发现大鼠 MCAO 后, 缺血侧的脑含水量和 AQP4 表达水平均在 24 h 内随着时间的推移呈现上升趋势, 均在 24 h 达到高峰, 48 h 稍有回落, 两者变化趋势基本一致。两组数据采用 Spearman 方法进行相关性分析, 结果显示, 脑含水量和 AQP4 表达水平呈时相正相关性 ($P = 0.05$), 相关性显著。

4 讨论

AQP4 是一种双向水转运通道, 主要分布于胶质细胞膜区及室管膜细胞的亚群, 尤其在与毛细血管和软膜直接接触的胶质细胞膜上表达强烈^[3], 它是胶质细胞与脑脊液以及血管间的水调节和转运的重要结构基础。AQP4 主要生理功能是介导水分子的跨生物膜转运, 维持体液及渗透压平衡, 调节脑

手术组相比, 6, 12, 24, 48 h 各时间点脑含水量显著增加 ($P < 0.01$); 缺血侧脑含水量随着时间的推移不断增加, 在 24 h 时达最高峰, 其中 6, 12 h 组与 24 h 组相比差异显著 ($P < 0.01$), 12 ~ 24 h 时间段脑含水量显著增加; 48 h 时脑含水量稍有下降。而健侧脑含水量各时间点之间差异不显著, 见表 1。

3.2 不同时间点的 AQP4 表达 与假手术组相比, 缺血侧各时间点脑组织中 AQP4 的表达增加; 缺血侧脑组织中 AQP4 表达水平随着时间的推移呈上升趋势, 在 24 h 时达到最高峰, 48 h 时 AQP4 表达稍有下降。而健侧脑组织各组之间 AQP4 表达水平差异不显著。见表 2, 图 2。

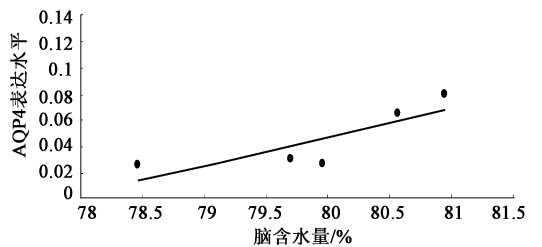


图 3 脑含水量和 AQP4 表达水平相关性散点图 脊液的形成^[4]。

AQP4 与脑内水液平衡的维持关系密切, 参与了缺血再灌注脑水肿的发生和发展。研究显示, 在由细菌性脑膜炎^[5]和水中毒、早期局部脑缺血^[6]诱导的细胞毒性脑水肿模型中, 与正常小鼠比较, AQP4 基因敲除小鼠脑水肿程度减轻。另一项研究显示^[7], 在急性水中毒模型中, 与正常小鼠比, 神经胶质细胞高表达 AQP4 的转基因小鼠加速脑水肿的发展, 颅内压显著升高。在细胞毒性水肿发生发展的过程中, AQP4 参与了水从血管内向细胞内的转运。而在由局部脑皮质冻伤和脑肿瘤引起的血管源性脑水肿模型中^[8], 与正常小鼠比较, AQP4 基因敲除小鼠脑水肿程度更严重。AQP4 基因敲除可降低脑中水液清除的速率^[9]。

脑缺血发生后,对于 AQP4 的表达变化的报道并不一致。一部分研究报道脑缺血可以诱导 AQP4 的表达。Lu Hong 等^[10]观察到 MCAO 后 AQP4 在 24 h 呈不断增加趋势(免疫组化法)。在缺血/再灌注模型中缺血侧脑组织中 AQP4 在 24 h 内^[11]的表达不断升高(免疫组化法),且与缺血侧脑含水量变化趋势一致。另有研究显示脑缺血后脑组织 AQP4^[12](免疫组化法)和 AQP4mRNA^[13](northern blot 法)的表达变化与脑水肿的动态变化存在时间上的一致性。由此可以推断 AQP4 可能参与了早期脑缺血/再灌注后脑水肿形成的病理生理过程。另一部分报道则显示^[14]脑缺血发生后缺血区周边脑组织中的 AQP4 表达有两个高峰分别在 1,48 h,而在 6,24 h 则降到基础水平(免疫组化和 Western blot 法);在缺血区中心只在 1 h 达到高峰,1 h 后一直保持在基础水平以下,48 h 时与缺血区周边比 AQP4 表达降低。可能是因为样本取材部位、实验手法等人为因素,以及试剂和蛋白质的构象等客观因素导致了不同报道的结果不同。

本部分实验采用线栓法制备脑缺血/再灌注脑水肿模型,利用 TTC 染色来判断模型成功与否,以保证每个样本脑组织缺血/再灌注损伤程度相似。另外利用本实验室自制磨具刀片组,把整脑均匀切为 7 片,待测样本的脑组织同样都取第 3 片,以保证样本之间取材的均一性。这样尽可能的保证组间的一致性,减少系统误差。以此为前提,研究了脑含水量和 AQP4 表达水平之间的时相相关性。观察了 6,12,24,48 h 4 个时间点脑含水量和脑组织中 AQP4 的表达。结果显示,0~24 h 内随着时间的推移,AQP4 表达水平不断升高,24 h 达到最高峰,48 h 有轻微的下降;而脑含水量同样随着时间的推移而不断升高,并在 24 h 到达最高峰,48 h 也有稍许下降,两者变化趋势基本一致。采用 Spearman 方法进行相关性分析,显示脑含水量和 AQP4 表达水平呈时相正相关性($r=0.9, P=0.037$),相关性显著。

AQP4 与脑内水液平衡的维持关系密切,在细胞毒性脑水肿中抑制 AQP4 的表达或活性可控制水肿的形成,在血管源性脑水肿中升高 AQP4 的表达或活性可促进水液的重吸收。通过调节 AQP4 的表达或活性有可能会为脑水肿的治疗提供新的思路和方法。

[参考文献]

[1] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20:84.

- [2] 刘斌,蔡梅芝,李爱华,等. 参芎化瘀胶囊对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(11):229.
- [3] Nielsen S, Nagelhus E A, Amiry-Moghaddam M, et al. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain[J]. *J Neuroscience*, 1997, 17(1):171.
- [4] 李妍,崔向宁,陈泽涛,等. 活血化痰中药对脑出血大鼠脑组织含水量及 AQP4 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(19):153.
- [5] Papadopoulos M C, Verkman A S. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis [J]. *J Biological Chemistry*, 2005, 280(14):13906.
- [6] Manley G T, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke[J]. *Nat Med*, 2000, 6(2):159.
- [7] Baoxue Yang, Zsolt Zador, A SVerkman. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling [J]. *J Biological Chemistry*, 2008, 283(22):15280.
- [8] Papadopoulos M C, Manley G T, Krishna S, et al. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema [J]. *FASEB J*, 2004, 18(11):1291.
- [9] Papadopoulos M C, Verkman A S. Aquaporin-4 and brain edema[J]. *Pediatr Nephrol*, 2007, 22(6):778.
- [10] Lu Hong, Sun Shanquan. A correlative study between AQP4 expression and the manifestation of DWI after the acute ischemic brain edema in rats[J]. *Chinese Medical J*, 2003, 116(7):1063.
- [11] 狄楠,张祥建,胡明,等. 脑缺血再灌注大鼠脑组织水孔蛋白 4 的动态表达及其与脑水肿的关系[J]. *中国卒中杂志*, 2008, 3(5):315.
- [12] 鲁宏,孙善全. 水通道蛋白-4 在早期缺血性脑水肿中的表达[J]. *解剖学杂志*, 2003, 26(4):347.
- [13] Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, et al. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat[J]. *Molecular Brain Research*, 2000, 78(1/2):131.
- [14] Ribeiro M C, Hirt L, Bogousslavsky J, et al. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice [J]. *J Neuroscience Research*, 2006, 83(7):1231.