

· 论 著 ·

## 水通道蛋白-4 在大鼠创伤性脑水肿中的表达及其意义\*

陈 通<sup>1</sup>, 孙善全<sup>2△</sup>

(重庆医科大学:1. 解剖学教研室;2. 神经科学研究中心 400016)

**摘要:**目的 探讨水通道蛋白-4(AQP4)在大鼠创伤性脑水肿形成过程中的表达变化及其意义。方法 选择健康成年 Wistar 大鼠随机分为实验组( $n=60$ )和对照组( $n=15$ ),实验组采用改进的 Feeney 氏法,造成大鼠右侧大脑半球局部脑损伤;对照组仅切开头皮,不造成大鼠脑损伤。分别进行脑组织形态学观察、脑含水量检测、免疫组织化学方法检测各组 AQP4 的表达水平。结果 实验组 72 h 病灶区域脑组织含水量百分率 $[(80.18 \pm 0.55)\%]$ 较对照组 $[(78.10 \pm 0.52)\%]$ 高( $P < 0.05$ )。实验组 1、3 h AQP4 平均吸光度值 $(0.210 0 \pm 0.029 4, 0.186 0 \pm 0.016 5)$ 较对照组 $(0.143 3 \pm 0.053 8)$ 高( $P < 0.05$ )。结论 在脑创伤早期, AQP4 强烈表达,可能与脑创伤后的应激反应有关。在脑创伤后期,由于 AQP4 表达呈下调趋势,其活性降低,出现混合性脑水肿。

**关键词:**水通道蛋白-4;脑水肿;脑损伤;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.13.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)13-1249-03

## Expression and its significance of aquaporin-4 in rat brain injury model\*

Chen Tong<sup>1</sup>, Sun Shanquan<sup>2△</sup>

(1. Department of Anatomy; 2. Neuroscience Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the changes of aquaporin-4(AQP4) expression after traumatic brain injury(TBI) in rats and its correlation with cerebral edema. **Methods** Healthy Wistar rats were randomly divided into the control group( $n=15$ ) and the experimental group( $n=60$ ). The experimental group adopted the improved Feeney method for establishing local TBI model of right cerebral hemisphere. The control group received the scalp incision without cerebral injury. The morphological observation of cerebral tissues and the brain water content(BWC) determination were performed. AQP4 expression was detected by the immunohistochemistry(IHC) method. **Results** The percentage of BWC in cerebral injury area at 72 h in the experimental group was $[(80.18 \pm 0.55)\%]$ , which was higher than $[(78.10 \pm 0.52)\%]$  in the control group( $P < 0.05$ ). The average absorbance value at 1, 3 h in the experimental group were $(0.210 0 \pm 0.029 4), (0.186 0 \pm 0.016 5)$ , which were higher than $(0.143 3 \pm 0.053 8)$  in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** At the earlier stage of TBI, the expression of AQP4 is strongly increased, which may be related with the stress reaction after TBI. At the later stage of TBI, the expression of AQP4 is down-regulated and its activity is reduced, resulting in mixed cerebral edema.

**Key words:** aquaporin-4; brain edema; brain injuries; rats

随着社会的发展,交通事故、意外伤害等原因导致的颅脑创伤越发多见。颅脑创伤也是引起脑水肿的最常见的原因之一,脑水肿是颅脑创伤后继发性脑损害的重要因素。目前,有关创伤性脑水肿的发生机制尚不清楚,有研究表明,水通道蛋白-4(aquaporin-4, AQP4)与脑水肿密切相关<sup>[1]</sup>。现将本研究采用形态学、免疫组织化学等方法对 AQP4 在创伤性脑水肿发生、发展过程中的表达变化报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 选择健康成年 Wistar 大鼠 75 只(重庆医科大学实验动物中心提供),体质量 200~250 g,雌雄不限,随机分为实验组( $n=60$ )和对照组( $n=15$ ),分别进行脑组织形态学观察、脑含水量检测、免疫组织化学方法检测各组 AQP4 的表达。

**1.2 模型制作** 实验组采用改进的 Feeney 氏法<sup>[2]</sup>,按自由落体原理做一打击器,由导杆、下落击锤、撞钉及固定架构成。击锤质量 20 g,下落高度 30 cm,落体致伤的冲击力为 $(20 \times 30)$  g/cm,属中型颅脑损伤<sup>[3]</sup>。大鼠称体质量后以 3.5% 水合氯醛按 1 mL/100 g 剂量腹腔内注射麻醉,俯卧位固定于立体定位

仪上,头顶去毛后,碘酒、乙醇消毒,取头皮正中切口,剪开骨膜,暴露颅骨,在人字缝前方 2 mm、中线旁右侧 2 mm 处钻 1 小孔,骨窗直径 5 mm,将撞钉置于右颅骨骨窗硬膜外,将导杆对准撞钉固定于支架上,用击锤沿导杆从 30 cm 高度自由落下冲击撞钉,从而造成大鼠右侧大脑半球局部脑损伤。止血后用骨蜡封闭骨窗,缝合头皮,分笼喂养。在大鼠脑创伤后 1、3、24、72 h 测量脑组织含水量和 AQP4 免疫组化图像分析。对照组仅切开头皮,不造成大鼠脑损伤。

## 1.3 方 法

**1.3.1 脑组织含水量的测定** 采用干-湿质量法<sup>[4]</sup>检测脑组织含水量。将大鼠断头处死,迅速取出大脑,锐性切取伤灶部位及伤灶对侧相应部位脑组织,分别称湿质量后,置于 110 ℃ 恒温干燥箱内烘烤 48 h 至恒质量,称干质量后,按 Elliot 公式计算脑组织含水量:脑组织含水量 = (湿质量 - 干质量) / 湿质量  $\times 100\%$ 。

**1.3.2 超微结构的观察** 将大鼠经左心室灌注生理盐水冲洗,再以 2.5% 戊二醛灌注固定,迅速开颅取脑,于伤灶处取 1 mm<sup>3</sup> 大小脑组织浸泡于 2.5% 戊二醛中,送重庆医科大学电镜

室用透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)检测,观察超微结构的改变。

**1.3.3 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 检测 AQP4 的表达水平** 大鼠用 3.5%水合氯醛(1 mL/100 mg)腹腔注射麻醉,开胸经左心室插管,剪开右心耳,用电子蠕动泵以 0.9%的生理盐水进行灌注,直至从右心耳流出清亮液体。术毕,迅速取出脑组织,作连续冠状冰冻切片,以 5%牛血清清蛋白(bovine serum albumin,BSA)封闭液封闭 20 min; I 抗为兔抗大鼠 AQP4(美国 Chemion 公司),按 1:400 配制,4℃过夜; II 抗为生物素化兔抗大鼠 IgG,置 37℃孵育 2 h;底物为链霉亲和素-碱性磷酸酶,37℃孵育 1 h;应用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(1:20),室温下显色 20~30 min,片干后,水溶性封片剂封片。

**1.3.4 图像分析** 普通光学显微镜下,随机选取同一部位切片的 10 个不同视野(10×10 倍)进行观察。采用北航 CM-2000B 生物医学图像分析系统进行自动分析。分析结果以细胞平均吸光度值表示。

**1.3.5 统计学处理** 应用 SPSS10.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

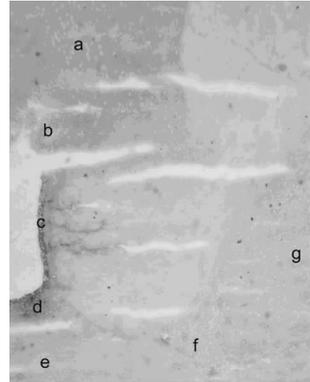
**2 结 果**

大鼠脑创伤后 1、3、24、72 h 脑组织含水量和 AQP4 免疫组织化学分析结果见表 1~2。伤后 3、24、72 h 脑组织超微结构见图 1。正常大鼠脑组织 AQP4 的表达水平见图 2。伤后 1、3、24、72 h 免疫组织化学检测 AQP4 的表达水平见图 3~6。

**表 1 大鼠脑创伤后 1、3、24、72 h 脑组织含水量比较(%,  $\bar{x} \pm s, n=15$ )**

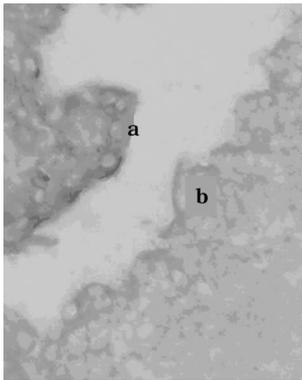
组别	伤灶部位	伤灶对侧
对照组	78.10±0.52	78.83±0.68
实验组		
1 h	79.42±0.86	79.40±0.86
3 h	79.03±0.21	79.17±0.79
24 h	79.44±0.41	79.46±0.39
72 h	80.18±0.55*	79.64±0.23

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。



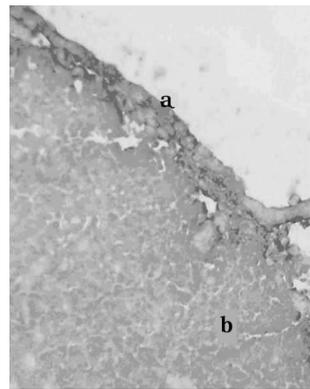
a: 背侧丘脑; b: 室旁核; c: 室管膜细胞; d: 视交叉上核; e: 视交叉; f: 视上核; g: 基底核。

**图 4 大鼠脑创伤后 3 h AQP4 的表达水平(IHC ×40)**



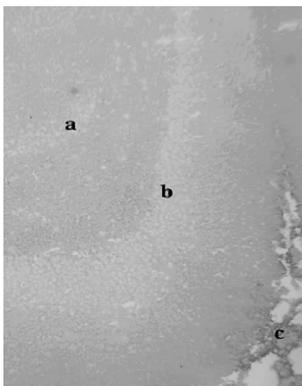
a: 脉络丛上皮细胞; b: 室管膜细胞。

**图 2 正常大鼠脑组织 AQP4 的表达水平(IHC ×100)**



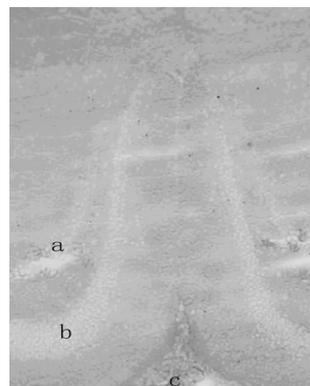
a: 大脑皮质软脑膜下胶质细胞; b: 大脑皮质颗粒层胶质细胞。

**图 5 大鼠脑创伤后 24 h AQP4 的表达水平(IHC ×100)**



a: 海马; b: 齿状回; c: 室管膜细胞。

**图 3 大鼠脑创伤后 1 h AQP4 的表达水平(IHC ×100)**



a: 海马; b: 齿状回; c: 脉络丛上皮细胞。

**图 6 脑创伤后 72 h AQP4 的表达(IHC ×40)**

表 2 大鼠脑创伤后 1、3、24、72 h AQP4 免疫组织化学分析结果( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

组别	平均吸光度值
对照组	0.143 3±0.053 8
实验组	
1 h	0.210 0±0.029 4*
3 h	0.186 0±0.016 5*
24 h	0.146 0±0.012 7
72 h	0.148 0±0.011 4

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

### 3 讨 论

有研究显示,在脑创伤早期,脑干蓝斑去甲肾上腺素能系统以及下丘脑-垂体-肾上腺系统功能明显增强,NA 合成增加,促肾上腺皮质激素与糖皮质激素大量释放,使机体处于脑创伤后应激状态<sup>[5]</sup>。而另一方面,当大脑受到创伤时,大鼠脑干和下丘脑受到外力的强烈刺激,通过脑干、下丘脑与大脑半球的广泛投射联系,使神经细胞电兴奋性瞬间变化,开启了膜上电压依赖性  $Ca^{2+}$  离子通道,使  $Ca^{2+}$  离子内流增加,从而激活了钙依赖性  $K^+$  离子通道<sup>[6]</sup>,使胞内  $K^+$  离子大量外流,到达细胞间隙,造成细胞内、外  $K^+$  离子分布严重失衡,引起细胞内、外渗透压及电化学梯度变化<sup>[7]</sup>。由于 AQP4 兼有水运输平衡及渗透压感受器的双重功能<sup>[8]</sup>,当细胞内、外渗透压发生急剧变化时,AQP4 可适时地表达,加速  $K^+$  离子和水分子向星形胶质细胞转运,以缓冲细胞间过量的  $K^+$  离子,使细胞内、外  $K^+$  离子浓度达到相对的平衡<sup>[9]</sup>。

本研究发现,在脑创伤早期(伤后 1、3 h),AQP4 表达迅速增强,几乎涉及全脑,而此时,脑组织含水量虽有增高,但与对照组比较差异无统计学意义。超微结构显示,在伤后 3 h,胶质细胞的胞质内线粒体肿胀,神经元结构并无明显改变。本研究结果表明,AQP4 在脑创伤早期的高表达,可能与脑创伤后的应激反应有关,参与了细胞内外水、电解质的调节。AQP4 可清除细胞间过量水分而减轻脑水肿<sup>[10]</sup>。

超微结构显示,在创伤后期(伤后 24 h)细胞内线粒体明显肿胀、细胞器结构模糊、胞质呈均质化、胞核溶解等细胞器水肿的表现;伤后 72 h,线粒体仍然肿胀,但较伤后 24 h 减轻。在伤后 72 h,AQP4 的表达水平较创伤早期呈下调趋势,其吸光度有所下降,AQP4 表达水平范围虽较早期有所缩小,但在海马、齿状回、皮质下颗粒细胞层等处仍有表达(图 6),与对照组比较,其表达范围明显扩大。此时脑组织含水量较对照组明显升高( $P < 0.05$ )。Badaut 等<sup>[11]</sup>认为,当脑组织受到创伤后,细胞间隙中的  $K^+$ 、 $H^+$  以及以谷氨酰胺等一系列兴奋性氨基酸浓度增高,激活了胶质细胞内信号传导系统,导致蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 活性升高。而激活的 PKC 可引起 AQP4 的磷酸化反应,AQP4 磷酸化后丧失其生物活性,从而在一定程度上减少了细胞间水分子的清除<sup>[12]</sup>。由于细胞外过量水分子的聚积,造成细胞内、外渗透压的变化,引起星形胶质细胞 AQP4 的表达水平上调,导致细胞外水分子进入细胞内,在清除细胞间水分子的同时,却加重了星形胶质细胞的细胞内

水肿,提示脑创伤后期脑水肿的性质,从早期的血管性水肿,过渡到混合性水肿。这可能是脑创伤后期,AQP4 表达水平呈下调趋势,但脑含水量却相对较高的原因。

综上所述,在脑创伤早期,脑组织中 AQP4 表达水平明显上调,以调节中枢神经系统水、电解质平衡,维持中枢神经系统正常功能,AQP4 的表达水平上调与脑创伤后的应激反应有关。而在脑创伤后期,AQP4 表达水平逐渐下调,水、电解质调节处于失代偿状态,从而导致脑水肿加重。由此可见,AQP4 在脑创伤早期和晚期的表达水平变化,有着不同的作用。在进行干预性治疗时,应根据脑创伤不同阶段的病理、生理特点,采取不同的治疗策略。

### 参考文献:

- [1] Papadopoulos MC, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin water channels and brain edema[J]. Mt Sinai J Med, 2002,69(4):242-248.
- [2] Feeney MD, Boyeson MG, Linn RT, et al. Response to cortical injury: Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. Brain Res, 1981,211(1):67-87.
- [3] 王清华,徐如祥,李良平,等.大鼠不同程度脑损伤模型的建立[J].创伤外科杂志,2000,2(1):42-44.
- [4] Gotoh O, Sano A, Koide T, et al. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat[J]. Stroke, 1985,16(1):101-109.
- [5] 余维华,孙善全,汪克建,等.大鼠脑外伤后蓝斑去甲肾上腺素能神经元变化的研究[J].中国急救医学,2007,27(3):232-234.
- [6] 姚泰.人体生理学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2001.
- [7] 吕健.创伤性脑水肿的发生机制[J].陕西医学杂志,1995,24(8):478-481.
- [8] 李燕华,孙善全,李吕力,等.低渗状态下星形胶质细胞 AQP4 mRNA 的表达和  $Ca^{2+}$  浓度的关系[J].中风与神经疾病杂志,2005,22(4):292-295.
- [9] Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain[J]. Nat Rev Neuro Sci, 2003,4(12):991-1001.
- [10] Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, et al. Increased brain edema in aqp4-null mice in an experimental model of subarachnoid hemorrhage[J]. Neuroscience, 2010,167(1):60-67.
- [11] Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, et al. Aquaporin in brain: Distribution, Physiology, and Pathophysiology[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002,22(4):367-378.
- [12] Zelenina M, Zelenin S, Bondar AA, et al. Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002,283(2):309-318.

(收稿日期:2011-12-08 修回日期:2012-01-28)