

· 实验研究 ·

水通道蛋白4表达减少与新生大鼠缺氧缺血脑水肿的关系

孟淑珍¹, 辛颖¹, 韩晓华¹, 韩玉昆², 薛辛东¹

(1. 中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 深圳市妇幼保健院新生儿科, 深圳 518133)

[摘要] 目的 目前,有关水在细胞内外或跨过血脑屏障的转运机制尚不清楚。水通道蛋白4(AQP4)是水通道蛋白家族中在脑表达最丰富的一个亚型,该文旨在探讨新生大鼠脑缺氧缺血后AQP4表达的改变及其与磁共振(MR)显示的脑水肿的关系。**方法** 7日龄新生大鼠24只,在缺氧前,缺氧后0 h,1 h和24 h行MR扫描获得T2加权成像和表面弥散系数(ADC),应用免疫组化染色观察脑内AQP4表达和血脑屏障通透性的改变,并用蛋白质印迹行AQP4半定量分析。**结果** 缺氧后0 h,整个缺血半球ADC值明显下降,缺氧后1 h时ADC部分恢复,缺氧后24 h时ADC改变与1 h时类似。缺氧后缺血半球T2值增高,其动态变化类似ADC变化。缺氧后0 h时可见IgG渗出脑血管外,随着缺氧后时间延长,IgG渗出逐渐加重。缺氧后缺血半球AQP4免疫染色减弱,其变化在缺氧后各时间点与ADC和T2改变相对应。蛋白质印迹分析显示仅缺氧后24 h时AQP4减少。**结论** 新生大鼠脑缺氧缺血后AQP4表达减少,其减少可能参与了急性缺氧缺血性脑水肿的形成。缺氧后AQP4表达的快速减少可能与AQP4蛋白质构像改变或分布异位有关。

[中国当代儿科杂志,2005,7(4):349-353]

[关键词] 水通道蛋白4; 缺氧缺血; 脑水肿; 磁共振; 大鼠, 新生

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)04-0349-05

Relationship between the decrease in aquaporin-4 expression and hypoxic-ischemic cerebral edema in neonatal rats

Shu-Zhen MENG, Ying XIN, Xiao-Hua HAN, Yu-Kun HAN, Xin-Dong XUE. Department of Pediatrics, Second Affiliate Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: shuzhenmeng@yahoo.com)

Abstract: Objective Aquaporin-4 (AQP4) is a member of a family of water-selective channel proteins that is highly expressed in the brain. This study investigated the alterations of AQP4 expression and its relationship with cerebral edema monitored by magnetic resonance (MR) imaging in neonatal rats following hypoxia-ischemia (HI). **Methods** Seven-day-old neonatal rats were subjected to right carotid artery occlusion plus hypoxia in 8% oxygen. T2 values and apparent diffusion coefficient (ADC) were acquired by MR imaging before HI, and 0, 1 and 24 hrs after HI. AQP4 expression in the brain and permeability of blood brain barrier were examined by immunohistological staining. Semiquantitative analysis of AQP4 protein was done by Western blotting. **Results** ADC significantly decreased in almost entire cerebral hemisphere ipsilateral to the occlusion at 0 hr after HI, recovered partially at 1 hr after HI, and at 24 hrs after HI the changes remained similar to that at 1 hr after HI. T2 values increased in the ipsilateral hemisphere at 0 hr after HI, recovered partially at 1 hr after HI, and then remained unchanged until 24 hrs after HI. IgG extravasation was observed at 0 hr after HI, and gradually increased after HI. AQP4 immunoreactive expression in the ipsilateral hemisphere to the occlusion decreased at 0 hr, 1 hr or 24 hrs after HI. The areas of AQP4 immunoreactive expression decrease coincided well with the regions of ADC and T2 changes after HI. Western blotting analysis demonstrated that AQP4 protein was not significantly reduced until 24 hrs after HI. **Conclusions** AQP4 expression in the brain decreased in the neonatal rats following HI and the decrease of AQP4 expression may be involved in the development of acute HI cerebral edema. The rapid decrease in AQP4 immunoreactive expression following HI is likely due to conformational changes or translocation of AQP4 protein.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(4):349-353]

Key words: Aquaporin-4; Hypoxia-ischemia; Brain edema; Magnetic resonance imaging; Rats, newborn

脑水肿是缺氧缺血性脑损伤最常见的病理改变。缺氧缺血性脑水肿包括早期细胞性水肿和血脑屏障损伤引起的血管源性水肿。目前,有关水在细

胞内外或跨过血脑屏障的转运机制尚不清楚。水通道蛋白4(Aquaporin-4, AQP4)是水通道蛋白家族中在脑表达最丰富的一个亚型,它在小血管周围星

[收稿日期] 2004-12-31; [修回日期] 2005-02-25

[作者简介] 孟淑珍(1962-)女,博士,副教授。主攻方向:缺氧缺血性脑损伤。

形胶质细胞足突、脑室管膜细胞和脉络丛等的分布提示 AQP4 可能在脑水平平衡和中枢胶体渗透压调节中起作用。最近有研究显示, AQP4 在成鼠脑缺血以及急性水中毒引起的脑水肿产生或消退中起重要作用^[1~4]。新生大鼠脑 AQP4 含量较低, AQP4 是否参与新生大鼠急性缺氧缺血性脑水肿的形成尚未见报道。本文探讨新生大鼠脑缺氧缺血后 AQP4 表达的改变及其与磁共振(MR)成像显示的脑水肿的关系。

1 对象与方法

1.1 实验动物及分组

7日龄 Wistar 鼠共 24 只, 体重 11~12 g 左右, 每窝随机分配到对照组($n=6$)和实验组($n=18$), 实验组又分为缺氧后 0 h, 缺氧后 1 h 和缺氧后 24 h 组(均 $n=6$)。

1.2 动物模型的制作

脑缺氧缺血模型制作方法如下^[5]: 乙醚吸入麻醉, 取颈部正中切口, 分离并结扎右颈总动脉。术后恢复 2 h 后将鼠置于密闭氧舱内, 给予吸入 8% 氮氧混合气体 1.5 h。对照组只分离而不结扎右颈总动脉。

1.3 磁共振(MR)扫描

应用 9.4 T 超导 MR 扫描仪对实验鼠在缺氧前, 缺氧后 0 h, 1 h 和 24 h 行头部扫描。动物麻醉后, 将其固定在一小箱里, 放入磁场中行弥散加权成像(DWI)和 T2 加权成像(T2WI), 层厚 1.5 mm, 共取 5 个断层。经成像软件处理获得表面弥散系数(Apparent Diffuse Coefficient, ADC)和 T2 图。

1.4 脑标本的处理

MR 扫描结束后, 在不同的时间点, 即缺氧后 0 h, 1 h 和 24 h 处死动物。假手术而无缺氧的动物作为对照。将取出的脑切为二部分, 前部分放 -80℃ 冰箱储存, 留做蛋白质印迹分析, 后部分放入 10% 福尔马林 2 周后石蜡包埋, 留做组织学检查。

1.5 组织学染色

选与测定 ADC 和 T2 层面相对应的 7 mm 厚冠状面切片, 按常规脱石蜡, 复水, PBS 液漂洗, 行苏木精-伊红染色。采用过氧化物酶法, 分别用兔抗鼠 AQP4 多克隆抗体(Alpha Diagnostic International 公司, 1:100)和羊抗鼠 IgG 抗体(Jackson ImmunoResearch 公司, 1:200)行免疫组化染色, 光镜下观察结果。

1.6 AQP4 蛋白质印迹

冰冻脑组织匀浆后, 4℃ 离心留取富含浆膜的

沉淀物, 缓冲液混悬沉淀物, 测其蛋白质浓度。用 12% SDS-PAGE 胶电泳, PVDF 膜转膜后, 3% 小牛血清室温封闭 1 h, 然后, 用兔抗鼠 AQP4 抗体(1:500) 4℃ 孵育一夜, 羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h。最后用 ECL 荧光显色系统(Amersham 公司)显色压片。扫描显色片, 用凝胶分析软件测显色带灰度值(Bio-Rad, USA)。每张片测 3 次, 取平均值。不同时间点相对 AQP4 蛋白水平用对应灰度值除以对照组灰度值后百分比表示。为证明蛋白质印迹分析的特异性, 用预先被 AQP4 对照肽吸附的 AQP4 抗体行蛋白质印迹分析。

1.7 测量与统计分析

用 NIH 图像分析软件选中丘脑水平的层面测缺血半球 ADC 下降和 T2 增高面积, 以及 AQP4 和 IgG 染色减弱或增强的面积。其改变的面积用面积百分比(改变的面积/对侧半球面积)表示。测得的所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 左右半球间均数比较用配对 t 检验, 不同时间点间均数比较采用单因素方差分析, 线性关系采用直线回归分析, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 脑缺氧缺血后 ADC 的改变

对照组: 在两侧半球均未见异常信号。实验组: 缺氧后 0 h 时, 几乎整个缺血半球, 包括大脑皮质、纹状体、海马、丘脑或下丘脑 ADC 值明显下降, 缺氧后 1 h ADC 值部分恢复, 其 ADC 值下降的面积也减小, 缺氧后 24 h 时 ADC 的变化与缺氧后 1 h 比较, 无明显变化(图 1, 2)。

2.2 脑缺氧缺血后 T2 的改变

对照组: 在两侧半球均未见异常信号。实验组: 缺氧 1.5 h 时, T2 值在几乎整个缺血半球, 包括大脑皮质、纹状体、海马、丘脑或下丘脑均增高, 其动态变化类似 ADC 变化, 即缺氧后 1 h 时 T2 部分恢复, 缺氧后 24 h 时 T2 与缺氧后 1 h 比较, 无明显变化(图 1, 2)。

2.3 脑缺氧缺血后病理改变

对照组: 未见异常改变。实验组: 缺氧后 0 h 时和 1 h, 缺血半球除细胞水肿外, 未见其它形态学改变。缺氧后 24 h 时在缺血半球出现梗塞坏死, 可见细胞核固缩、核裂解或嗜酸性变, 其损伤面积与缺氧后 24 h 时 T2 增高面积相对应。

2.4 脑缺氧缺血后血脑屏障损伤、IgG 渗出

对照组: 除脑室管膜周围和脑膜外, 在脑其它部

位未见阳性 IgG 免疫染色。实验组:缺氧后 0 h 时,除脑室管膜周围和脑膜外,在缺血半球皮质、海马和纹状体可见阳性 IgG 免疫染色,在缺氧后 1 h 和 24

h,缺血半球 IgG 免疫染色逐渐增强。另外,在一些脑的对侧半球皮质或海马也可见弱阳性 IgG 免疫染色(图 1,2)。

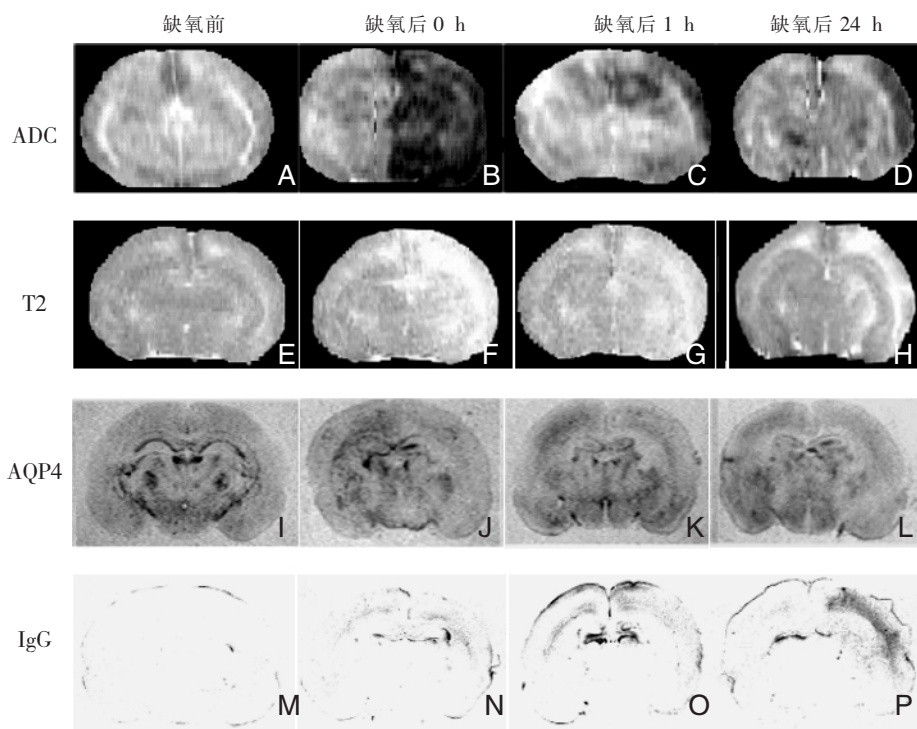


图 1 脑缺氧缺血后不同时间点 ADC, T2, AQP4 和 IgG 免疫染色的改变

图 1 示缺氧缺血后不同时间点 ADC (A-D) 和 T2 图 (E-H), 及 AQP4 (I-L) 和 IgG (M-P) 免疫组化染色的脑切片。缺氧缺血后脑内 AQP4 免疫反应表达的减少在各时间点和分布区域均与 ADC 和 T2 的变化相对应。缺氧后 0 h 时在缺血半球可见阳性 IgG 免疫染色, 缺氧缺血后 1h 和 24h 逐渐加重。

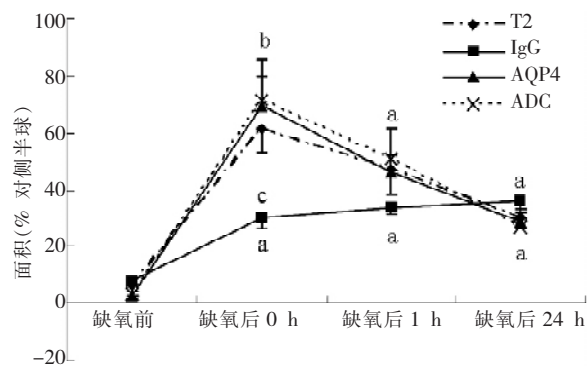


图 2 脑缺氧缺血后 ADC, T2 值, AQP4 和 IgG 免疫染色改变的面积

AQP4 免疫反应表达减少的面积在各时间点与 ADC 和 T2 变化的面积密切相对应。与缺氧前比较 a $P < 0.05$; b $P < 0.001$; c 缺氧后 0 h 时 IgG 免疫染色的面积与 ADC, T2 和 AQP4 免疫染色变化的面积比较 $P < 0.05$ 。

2.5 脑缺氧缺血后 AQP4 表达的变化

2.5.1 AQP4 免疫染色 对照组:在整个脑灰质和白质小血管或毛细血管周围均可见阳性 AQP4 染色,其表达在两半球间无差别。实验组:缺氧后 0 h 时,在所有大鼠几乎整个缺血半球可见 AQP4 染色轻度减弱;缺氧后 1 h 时缺血半球 AQP4 染色中度减弱,但染色减弱的面积缩小;缺氧后 24 h 时缺血

半球 AQP4 染色明显减弱,其面积无明显变化(图 1-4)。

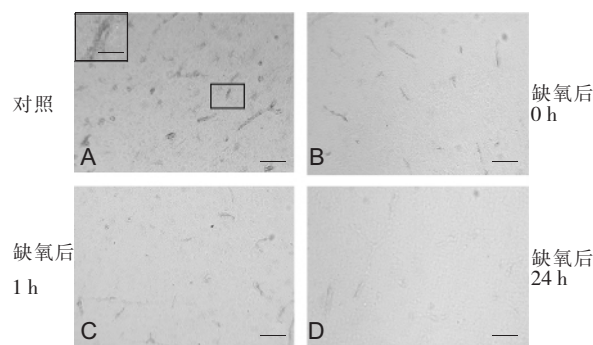


图 3 新生鼠脑皮质 AQP4 免疫染色 (Scale bar = 40 mm)

AQP4 免疫染色主要分布在小血管周围 (A, 插图 Scale bar = 12.5 mm), 在缺氧后 0 h 时可见 AQP4 免疫染色减弱 (B), 缺氧缺血后 1 h 和 24 h, 染色进一步减弱 (C, D)。

2.5.2 AQP4 蛋白质印迹 在分子量近 31.0 kDa 和 34.0 kDa 处可见显色带。另外,在分子量近 52.0 kDa 处也显示一条较强的带,因在用预先由 AQP4 对照肽吸附抗体的蛋白质印迹分析中此带仍存在,故它可能是一条非特异带,而在 31.0 kDa 和 34.0 kDa 处二条带消失,故它们为特异性带(图 5)。

对近 31.0 kDa 处带进行半定量分析,对照组左右半球 AQP4 蛋白质水平无差异(图 4)。缺氧后 0 h 时, AQP4 蛋白质水平与对照组类似,缺氧后 1 h 时,缺血半球 AQP4 蛋白质水平减少 14% ($P=0.056$),缺氧后 24 h 时, AQP4 蛋白质水平减少 24.4% ($P=0.0357$)。

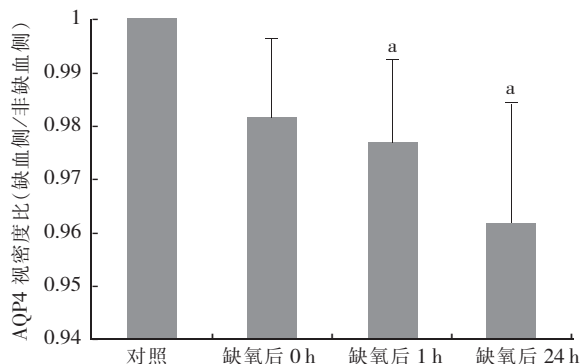


图 4 缺氧缺血后顶部脑皮质 AQP4 免疫染色的视密度比变化

缺氧后 0 h 时 AQP4 免疫染色的视密度比已下降,缺氧缺血后 1 h 和 24 h 时 AQP4 免疫染色的视密度比与对照比较明显下降, a 示与对照组比较 $P<0.05$ 。

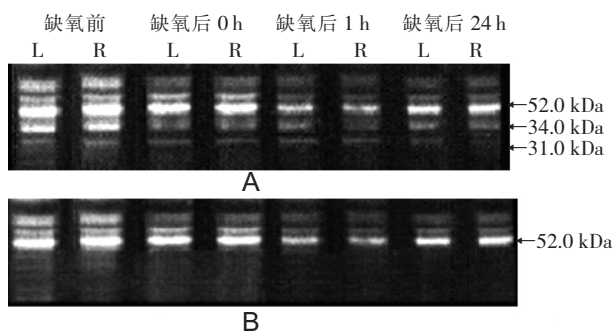


图 5 缺氧缺血后不同时间点 AQP4 蛋白质印迹分析

A: 典型 AQP4 蛋白质印迹分析; B: 预先由 AQP4 对照肽吸附抗体的蛋白质印迹分析; L: 左半球, R: 右半球; B 中在近 31.0 和 34.0 kDa 处二条带消失, 提示它们为特异性带。

2.6 相关性分析

2.6.1 AQP4 表达与 ADC 改变的关系 缺氧缺血后脑缺血半球 AQP4 免疫反应表达减少,缺氧后各时间点 AQP4 表达减少的区域与 ADC 值下降的区域相对应(图 1,2), 直线回归相关性分析显示二者密切相关($r=0.95, P<0.001$)。

2.6.2 T2 改变与 AQP4 表达的关系 缺氧缺血后脑缺血半球 AQP4 免疫反应表达的减少,在缺氧后各时间点与 T2 增加的区域相对应(图 1,2), 直线回归相关性分析显示二者密切相关($r=0.91, P<0.001$)。

3 讨论

近年来 ADC 和 T2 已广泛用于缺氧缺血性脑损伤的诊断,一般认为:早期 ADC 值下降与细胞肿胀和细胞外间隙减小有关,而 T2 变化与血脑屏障损害引起的血管源性水肿有关^[5,6]。本实验结果显示:缺氧后 0 h 时细胞水肿已很明显,血管源性水肿也已形成,随着缺氧后时间的延长,水肿逐渐加重。缺氧后 0 h 时 AQP4 免疫染色减弱,缺氧后 AQP4 免疫反应表达的减少在时程、分布区域和面积均与 ADC 和 T2 的变化密切相对应,提示 AQP4 可能参与了急性缺氧缺血性脑水肿的形成。缺氧缺血后 AQP4 的减少,可能引起水从胶质细胞或细胞外间隙跨过血脑屏障向血管腔转运减少,导致脑水肿形成。

有关缺氧缺血后脑内 AQP4 改变有不同的报道,且对 AQP4 在脑水肿形成中的作用解释不同^[1-4,7,8]。Manley 等^[3]在 AQP4 基因敲除的小鼠进行脑缺血和水中毒实验,结果显示:敲除 AQP4 基因鼠缺血后脑水肿减轻,神经功能缺陷程度也轻^[3]。包仕尧等^[4]研究显示:脑缺血 2 h 后,1 h AQP4 水平降低,24 h 降至最低点,随后开始逐渐恢复,7 d 正常。二者认为 AQP4 水平降低起减轻脑水肿的作用, AQP4 的逐渐恢复会加重脑水肿形成。然而,Amiry-Moghaddam 等^[7]的研究显示:成年鼠脑短暂缺血后 23 h,小血管膜周围和胶质细胞末端足突 AQP4 明显减少,这个减少与缺血中心严重的血管周围水肿有关。他在 a-syntrophin 基因敲除的小鼠研究中也发现:小血管周围 AQP4 丢失,胶质细胞末端足突肿胀。这些研究支持 AQP4 在组织水清除中起重要作用, AQP4 减少可能促进脑水肿形成。

缺氧缺血后脑内 AQP4 表达减少的机制尚不十分清楚。本研究显示:缺氧后 0 h,1 h AQP4 免疫反应表达减少,但蛋白质定量结果显示 AQP4 并无明显减少。类似的 AQP4 免疫染色和蛋白质半定量分析之间的差别在其它研究中也观察到,这可能与 AQP4 在细胞膜上的分布异位有关^[9]。另外,脑缺氧缺血后蛋白质构象的改变可能影响 AQP4 免疫反应表达^[10]。有研究显示:成年鼠脑缺血后 24 h AQP4 mRNA 明显减少^[11]。所以,缺氧后 24 h AQP4 减少可能与 AQP4 转录合成减少有关。

总之,新生鼠脑缺氧缺血后 AQP4 表达减少,其减少可能参与了急性缺氧缺血性脑水肿的形成。然而,要充分理解 AQP4 在脑水肿形成的机制,还需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Sato S, Umenishi F, Inamasu G, Sato M, Ishikawa M, Nishizawa M, et al. Expression of water channel mRNA following cerebral ischemia [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2000, 76: 239-241.
- [2] Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, Tamatani M, Kobayashi A, Yokawa T, et al. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat [J]. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000, 78(1-2): 131-137.
- [3] Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke [J]. *Nat Med*, 2000, 6(2): 159-163.
- [4] 包仕尧,石向群,张志琳,王运良. 大鼠脑缺血再灌注损伤过程中水通道蛋白4表达水平的变化[J]. *国外医学脑血管疾病分册*, 2004, 12(2): 122-126.
- [5] Qiao M, Malisza KL, Del Bigio MR, Tuor UI. Correlation of cerebral hypoxic-ischemic T2 changes with tissue alterations in water content and protein extravasation [J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 958-963.
- [6] Qiao M, Malisza KL, Del Bigio MR, Tuor UI. Transient hypoxia-ischemia in rats: changes in diffusion-sensitive MR imaging findings, extracellular space, and $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -adenosine triphosphatase and cytochrome oxidase activity [J]. *Radiology*, 2002, 223(1): 65-75.
- [7] Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, et al. An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(4): 2106-2111.
- [8] 鲁宏,孙善权. 水通道蛋白-4在急性脑缺血组织中的表达与MR扩散加权成像的相关性研究[J]. *中华放射学杂志*, 2003, 37(6): 508-513.
- [9] Vajda Z, Pedersen M, Fuchtbauer EM, Wertz K, Stodkilde-Jorgensen H, Sulyok E, et al. Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(20): 13131-13136.
- [10] Zelenina M, Zelenin S, Bondar AA, Brismar H, Aperia A. Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(2): F309-F318.

(本文编辑:王霞)

· 消息 ·

欢迎订阅《中国当代儿科杂志》

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)和国际权威检索机构俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EMBASE)收录期刊,是《中国医学文摘·儿科学》引用的核心期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》和《万方数据——数字化网络期刊》全文收录。已被复旦大学、中南大学和中国医科大学等国内著名大学认定为儿科核心期刊。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为双月刊,大16开本,80页,亚光铜版纸印刷,逢双月15日出版,向国内外公开发行人。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价12元,全年72元。邮发代号:42-188。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008

电话:0731-4327402 传真:0731-4327922 Email: ddek7402@163.com 网址: www.cjcp.org