论著

文章编号:1000-5404(2008)03-0220-03

大鼠轻度脑外伤后水通道蛋白9在大脑皮质及海马的表达变化

刘 辉,孙善全,杨 美,余维华 (重庆医科大学基础医学院解剖学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 研究轻度脑外伤(traumatic brain injury,TBI)后水通道蛋白9(AQP9)在脑组织中的表达变化规律,初步探讨AQP9对脑外伤的作用。方法 采用Feeney自由落体法制作大鼠轻度脑外伤模型。用TTC法、免疫组织化学法、RT-PCR分别检测脑组织缺血程度、AQP9的表达及双侧大脑皮质和海马AQP9 mRNA的变化。结果 TTC染色结果显示,损伤早期脑缺血灶不明显,但随时间的推移,逐渐扩大,于72 h达最大面积。AQP9及AQP9 mRNA表达变化基本一致:TBI后1 h,所测区AQP9 mRNA的含量均无明显变化,至3 h,双侧大脑皮质及对侧海马AQP9 mRNA的含量明显增高,6 h后降低;24 h后,双侧大脑皮质及海马均再次明显增高,并于48~72 h达峰值。结论 TBI早期和继发性损伤期AQP9表达的上调可能分别与TBI应激和能量代谢调节有关。

关键词:水通道蛋白9;脑外伤
中图法分类号:R322.81;R329.26;R651.150.2 文献标识码:A

AQP9 expression in rat cerebral cortex and hippocampus after moderate traumatic brain injury

LIU Hui, SUN Shan-quan, YANG Mei, YU Wei-hua (Laboratory of Anatomy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the expressions of AQP9 and AQP9 mRNA in cerebral cortex and hippocampus of rats after moderate traumatic brain injury (TBI). Methods The moderate TBI model was established according to Feeney's method. At different time points after TBI, the degree of cerebral ischemia by TTC staining, the expressions of AQP9 and its mRNA in brain by immunohistochemistry and RT-PCR respectively were performed. Results No obvious ischemia in brain was found 6 h after TBI, but gradually the ischemic focus enlarged, and reached the maximum 72 h after TBI. The expressions of AQP9 and its mRNA were similar, increasing significantly 3 h after TBI, decreasing 6 h after TBI, then increasing again at 24 h in bilateral cerebral cortex and the hippocampus and reaching the maximum 48 h or 72 h after TBI. Conclusion The increased expression of AQP9 after TBI is involved in the stress of early TBI and in later brain energy metabolism.

Key words: aquaporin-9; traumatic brain injury

脑外伤后,大脑组织将发生一系列病理生理变化。其中能量代谢的变化以及水电解质平衡的紊乱始终贯穿于脑外伤的原发损伤期和继发损伤期。有研究表明,水通道蛋白9(AQP9)与大脑能量代谢、水电解质平衡密切相关[1]。因此研究轻度脑外伤(traumatic brain injury,TBI)后AQP9的表达变化规律,探索其在脑外伤各阶段中的作用,将为进一步阐明脑外伤后的病理生理机制提供实验依据,并期望对临床治疗脑外伤提供新的思路。

基金项目:国家自然科学基金(30470608);教育部博士点学科基金(20040631002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470608) and the Ph. D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (20040631002)
作者简介:刘 辉,女,陕西省商洛市人,博士研究生,助教,主要从事神经生物学方面的研究。电话:(023)62006818
通信作者:孙善全,电话:(023)68485763
收稿日期:2007-05-16;修回日期:2007-10-08

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年SD大鼠102只,雄性,体质量200~350 g,由本校实验动物中心提供。实验动物按随机数字表分为假手术组($n=46$)和脑外伤组($n=56$)。两组分别于术后1、3、6、24、48、72 h、1周取材。

1.2 动物模型制作及选入标准

采用Feeney自由落体法[2],制作轻度脑外伤模型。动物称体质量后,3.5%水合氯醛10 ml/kg腹腔注射麻醉,固定于立体定位仪上。沿正中线切开头皮并剥离骨膜,切口长2 cm。用骨钻于前囟后3.5 mm,中线右边3.5 mm处钻开颅骨,以此为中心,用蚊式血管钳咬开直径为4.5 mm的圆形骨窗,保持硬脑膜完整。将钝头铜钉置于骨窗上,使钉体刚好伸入骨窗内(钉体长5 mm,直径4 mm,钉帽直径10 mm)。垂直悬空的光滑铜杆头端正对圆形钉帽,中央有孔的硬塑料击锤重40 g,铜杆穿过击锤的中央孔,使得击锤沿铜杆从15 cm处自由落下撞击钉帽,下陷深度5 mm,造成右顶叶局部脑损伤,硬脑膜保持完整,

缝合头皮。对照组除不用击锤打击钉帽外,其余步骤相同。依据 Feeney 等[2] 的平衡木实验选择建模成功的大鼠作为脑外伤组。

1.3　实验方法

1.3.1　脑组织缺血程度的测定　　采用 TTC(Biosharp,美国)染色检测 TBI 后大脑缺血程度的变化:大鼠于相应时相点以 3.5% 水合氯醛麻醉,取脑,-80 ℃冷冻 2 min,等间距冠状切 5~6片,移入 2% TTC 溶液中,37.5 ℃水浴 15~30 min,之后用 4% 多聚甲醛固定 30 min。

1.3.2　免疫组化检测 AQP9 蛋白的表达变化　　大鼠于相应时相点以 3.5% 水合氯醛麻醉,250 ml 生理盐水经心脏灌注后,开颅取脑。移入冰冻切片机中速冻,OCT 包埋,连续冠状切片,片厚 10 μm。吹风机吹干切片后,用 AFA 液(4% 多聚甲醛 15 ml,95% 乙醇 80 ml,冰醋酸 5 ml)固定 30 min,0.01 mol/L PBS(15 min×3 次)洗片。按 SAP-9100(中杉金桥)免疫组化试剂盒说明书,先加 A 液 37 ℃封闭 20 min,再加 AQP9 兔抗鼠多克隆抗体(1∶400,美国 Chemico),4 ℃过夜,随后按说明书完成操作。用 NBT/BCIP(碱性磷酸酶显色试剂盒,中杉金桥)显色,适时终止反应,水溶胶封片,光镜下观察并拍照。阴性对照以 0.01 mol/L PBS 置换一抗,其他步骤不变。

1.3.3　RT-PCR 检测脑组织 AQP9 mRNA 的含量变化　　动物模型于各时相点以 3.5 % 水合氯醛麻醉,冰生理盐水快速心脏灌注,快速取脑,于冰袋上分别取双侧皮质、海马,各 50 mg。按 Trizol(TaKaRa)试剂说明书提取组织总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA 含量,分装后 -80 ℃保存备用;按 AMV 逆转录试剂盒(上海生工)操作说明将组织总 RNA 中的 mRNA 逆转录合成 cDNA。用以下引物对 AQP9 及 β-actin 的 cDNA 进行扩增:AQP9 上游 5′-GAAAGGACGGTGCCAAGAAG-3′,下游 5′-GTGATGATCCCGCCAAAAC-3′,扩增片段长 165 bp。β-actin 上游 5′-CTGCCGCATCCTCTTCCTC-3′,下游 5′-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3′,扩增片段长 398 bp。PCR 产物行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外分析仪下观测并照相,电泳结果用 Bandscan 5.0 软件进行光密度分析,计算 AQP9 产物与 β-actin 产物光密度的比值,作为 AQP9 mRNA 的表达水平。

1.4　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件对 RT-PCR 结果进行两组完全随机设计的方差齐性检验和两样本均数比较的 t 检验。

2　结果

2.1　脑组织的缺血程度

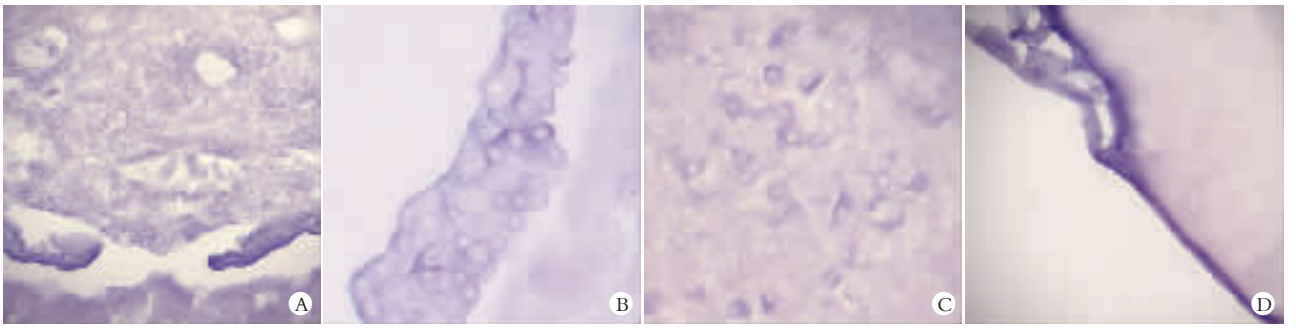
TTC 染色表明,TBI 后 1~6 h,脑缺血灶并不明显,24 h 后脑缺血灶仅局限在脑组织打击处,至 72 h 局部缺血灶达最大面积,但直至 1 周时,未出现大面积缺血灶。

2.2　AQP9 的表达变化

免疫组化结果显示,脑外伤组中,AQP9 在术后 1 h 呈低水平表达,至 3 h,AQP9 广泛表达于双侧大脑皮质、海马、脑室和导水管系统的室管膜、软脑膜和脉络丛的星型胶质细胞上。6 h 皮质、海马表达减弱,脉络丛仍有较强的表达。24 h 及其以后各时相点全脑表达广泛上调,48~72 h 表达最强,随后略有减弱,但至 1 周时仍明显高于正常水平。此时穹隆下器官的胶质细胞、下丘脑神经元也有较强的表达(图 1)。假手术组呈低水平表达,各时相点没有明显差别($P>0.05$)。

2.3　AQP9 mRNA 含量的变化

结果显示对照组各时相点均与正常大鼠无显著差异($P>0.05$),故对照组以各时相点的均值表示。脑外伤组双侧皮质和对侧海马 AQP9 mRNA 含量于 1~3 h 开始明显增加,其中对侧皮质于 1 h,伤侧皮质及对侧海马于 3 h 出现显著增加($P<0.05$,$P<0.01$),至 6 h 基本又降至正常水平,其中伤侧海马明显低于正常水平($P<0.05$)。24 h 及以后各时相点均明显高于正常水平($P<0.05$),其中伤侧皮质于 48 h 达峰值,对侧皮质及双侧海马均于 72 h 达峰值。见表 1。



A:伤后 24 h 穹隆下器官 (×400);B:伤后 48 h 伤侧侧脑室脉络丛 (×400);C:伤后 24 h 下丘脑神经元 (×200);D:伤后 48 h 侧脑室室管膜 (×200)

图 1　TBI 后大鼠脑组织 AQP9 的表达变化 (S-P)

表 1　外伤后大脑皮质及海马的 AQP9 mRNA 含量的变化($\bar{x} \pm s$)

部位	对照组	脑外伤组						
		1 h	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h	1 周
伤侧皮质	0.271±0.155	0.302±0.070	0.508±0.028[a]	0.115±0.027	0.496±0.112[b]	0.866±0.058[a]	0.570±0.214[b]	0.577±0.103[a]
对侧皮质	0.113±0.020	0.260±0.118[b]	0.499±0.044[a]	0.140±0.061	0.369±0.106[a]	0.290±0.081[a]	0.637±0.088[a]	0.352±0.060[a]
伤侧海马	0.220±0.054	0.195±0.033	0.264±0.022	0.127±0.027[a]	0.670±0.062[a]	0.894±0.074[a]	1.495±0.167[a]	0.614±0.058[a]
对侧海马	0.153±0.045	0.184±0.129	0.337±0.041[a]	0.133±0.059	0.489±0.134[a]	0.631±0.168[a]	0.724±0.453[b]	0.341±0.098[a]

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

3 讨论

水通道蛋白家族(AQPs)是一组与水电解质运输平衡相关的膜通道蛋白。根据其功能的差异,AQPs 可分为仅对水通透的水通道以及对水和甘油通透的水甘油通道。AQP9 属于水甘油通道,且在脑组织中含量丰富,其主要分布在脑组织星型胶质细胞、血管内皮细胞和儿茶酚胺类神经元的细胞膜上[1,3-6]。除水分子外,AQP9 对尿素、甘油、多元醇、乳酸等多种小分子溶质均有通透性,可能与组织中水的转运,水电解质的平衡调节、渗透压的感知及能量代谢有关[6-9]。

本实验结果显示,在 TBI 原发性损伤期,TBI 后 3 h双侧大脑皮质及对侧海马 AQP9 mRNA 的含量明显增高,AQP9 在皮质、海马、穹隆下器官、脉络丛的胶质细胞均有广泛表达。于伤后 6 h,AQP9 mRNA 表达下降,其蛋白表达也随之减弱。在损伤早期,一方面由于 TBI 造成组织损伤和血脑屏障的破坏,使得血管内大量蛋白、血浆及其他物质进入细胞间隙,使得细胞间液增多,渗透压增高。另一方面,当大脑遭受外力打击时,大鼠脑干和下丘脑受到外力的强烈刺激,可通过脑干、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+} 通道,使 Ca^{2+} 内流增加,从而激活了钙依赖性 K^+ 通道[10,11],细胞内 K^+ 大量外流,到达细胞间隙,造成细胞内外 K^+ 分布失衡,引起细胞内外渗透压及电化学梯度变化。由于 AQP9 与水电解质平衡有关,此时 AQP9 的适时高表达可能参与细胞内外水电解质平衡的调节。

本课题组对 TBI 的相关研究表明[11],在 TBI 后脑干蓝斑去甲肾上腺素(NA)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,促肾上皮质腺素(ACTH)与糖皮质激素(GC)大量释放,使机体处于 TBI 应激状态。在此应激状态下,细胞能量代谢加快,神经内分泌活动加强。研究表明,AQP9 与能量代谢平衡、应激及分泌调节有关[6,8]。因此,我们认为 AQP9 在原发损伤期的表达上调,可能是 TBI 应激反应的一部分;AQP9 参与了能量代谢调节和神经内分泌的精细调节。而 TBI 6 h 后 AQP9 表达的下调,可能与应激反应的逐渐减弱有关。

以上表明,在 TBI 的原发损伤期 AQP9 及 AQP9 mRNA 表达的上调,可能与 TBI 应激时的水电解质、渗透压平衡调节以及能量代谢有关,是 TBI 应激时的一种保护性反应。

本实验结果显示,在 TBI 继发损伤期(24 h 以后),AQP9 mRNA 含量继早期 6 h 低谷之后再次升高,至 24 h 及以后各时相点,无论伤侧还是对侧、海马还是皮质,AQP9 mRNA 的含量均明显增加,除伤侧皮质于 48 h 达峰值外,其余区域均于 72 h 达峰值。在 TBI 继发损伤期,由于血管的破坏以及原发损伤期的病理生理变化,使大脑处于持续的缺血缺氧状态。加之各种继发性损伤因子的大量释放,使得缺血、缺氧进一步加重;而缺血缺氧的加重又引起更多继发性损伤因子的释放。这种恶性循环造成大脑能量供应不足,加之损伤早期能量的过度消耗,糖的无氧酵解增加,乳酸堆积,促使组织内环境酸化。在生理条件下,AQP9 可以介导水分子和乳酸根的转运;在酸性环境下,AQP9 对乳酸根的通透性可增加 4 倍;AQP9 还可通过乳酸穿梭机制,将乳酸从星型胶质细胞传递给神经元,使乳酸作为神经元能量代谢的供能物质[6]。因此,在 TBI 继发损伤阶段,AQP9 及 AQP9 mRNA 在胶质细胞及神经元的表达上调,可能是将乳酸从胶质细胞传递给神经元,以维持神经元能量代谢平衡。综上所述,TBI 后 AQP9 mRNA 含量及 AQP9 表达增高,可能与 TBI 后渗透压及水电解质平衡、能量代谢调节有关。然而,目前对于 TBI 后 AQP9 表达上调的调控机制以及它与 AQPs 其他成员间的关系,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Badaut J, Petit J M, Brunet J F, *et al*. Distribution of Aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells[J]. Neuroscience, 2004, 128(1): 27-38.

[2] Feeney D M, Boyeson M G, Linn R T, *et al*. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. Brain Res, 1981, 211(1): 67-77.

[3] Guerin C F, Regli L, Badaut J. Roles of aquaporins in the brain[J]. Med Sci (Paris), 2005, 21(8-9): 747-752.

[4] Iandiev I, Biedermann B, Reichenbach A, *et al*. Expression of aquaporin-9 immunoreactivity by catecholaminergic amacrine cells in the rat retina[J]. Neurosci Lett, 2006, 398(3): 264-267.

[5] Rojek A M, Skowronski M T, Fuchtbauer E M, *et al*. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(9): 3609-3614.

[6] Badaut J, Regli L. Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain[J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 971-981.

[7] Warth A, Mittelbronn M, Hulper P, *et al*. Expression of the water channel protein aquaporin-9 in malignant brain tumors[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(2): 193-198.

[8] Dibas A, Yang M H, Bobich J, *et al*. Stress-induced changes in neuronal Aquaporin-9 (AQP9) in a retinal ganglion cell-line[J]. Pharmacol Res, 2007, 55(5): 378-384.

[9] Badaut J, Hirt L, Granziera C, *et al*. Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(5): 477-482.

[10] 姚 泰. 人体生理学(上册)[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2001: 87-104.

[11] 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.

(编辑 邓强庭)