论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0402-04

AQP9在脑出血大鼠脑组织中的表达变化

邱国平,孙善全,刘 辉,杨 美,卓 飞 (重庆医科大学基础医学院解剖教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 研究大鼠脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)后水通道蛋白9(aquaporin 9,AQP9)在脑组织中的表达变化,初步探讨AQP9在脑出血脑组织病理变化中的作用。**方法** 采用定量胶原酶注入大鼠尾状核建立脑出血模型,运用HE染色、免疫组化、免疫荧光双标、RT-PCR等方法检测脑出血大鼠脑组织AQP9表达的变化。**结果** HE染色显示,脑出血面积随着时间的延长而逐渐增大,24 h达到峰值,24 h后无明显变化。RT-PCR结果显示,除ICH 1 h外,ICH早期,AQP9 mRNA含量较假手术组降低,于6 h降至最低;24 h及以后各时段明显增高,于48 h达到峰值,7 d仍明显高于对照。免疫组化和免疫荧光双标显示,AQP9在脑内表达部位随时段变化而变化,其中,ICH后48 h,AQP9强表达于脑室周围器官和渗透压感受器。**结论** ICH早期AQP9表达降低可延迟细胞内水肿的形成,而ICH后期AQP9表达上调,可能与水电解质平衡调节和能量代谢调节有关。

关键词:水通道蛋白9;脑出血;水平衡;能量代谢
中图法分类号:R-332;R451;R743.340.2 **文献标识码**:A

Changes of AQP9 expression in rat brain after intracerebral hemorrhage

QIU Guo-ping, SUN Shan-quan, LIU Hui, YANG Mei, ZHUO Fei (Laboratory of Neurobiology, Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the changes of aquaporin 9 (AQP9) expression and its role in rat brain after intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** Collagenase was infused into the right caudate nucleus to establish ICH model in adult Wistar rats. HE staining was used to detect the pathological changes. The protein expression of AQP9 was detected by immunohistochemical method and immunofluorescence, and the content of AQP9 mRNA was detected by RT-PCR. **Results** The area of ICH was gradually increased, and reached the peak at 24 h, then showed no more change. The content of AQP9 mRNA increased in 1 h after ICH, then decreased in 2-6 h and reached the lowest at 6 h, dramatically increased again after 24 h and reached the maximum at 48 h, compared with normal controls and sham operation group. The areas where AQP9 expressed were various in different time periods, especially at 48 h the content of AQP9 in circumventricular organs and osmoreceptor was excessive. **Conclusion** In the early stage of ICH, the decreased expression of AQP9 delays the cytotoxic edema, and in the later stage the increased expression of AQP9 is involved in water-ion homeostasis and energy metabolism.

Key words: aquaporin-9; intracerebral hemorrhage; water homeostasis; energy metabolism

脑出血是一类常见病、多发病,其病死率、病残率都很高。脑出血后,大脑组织将发生诸如水电解质平衡紊乱、能量代谢改变等病理生理变化。研究表明[1,2],AQP9与水电解质调节、能量代谢有关。至于AQP9在脑出血脑组织中表达变化如何,目前尚少见相关报道。故我们制作了大鼠脑出血模型,并运用一系列研究方法,探索AQP9在脑出血脑组织中的表达变化规律,及其在脑出血各阶段中的作用,以期为临床治疗脑出血提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年Wistar大鼠114只,雄性,体质量200~250 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。动物分为正常组($n=6$)、假手术组($n=45$)和脑出血组($n=63$)。假手术组和脑出血组分别于术后1、2、3、6、12、24、48、72 h和7 d取材。每一时间点,脑出血组用于免疫组织化学(immunohistochemistry IHC)及免疫荧光双标、RT-PCR检测的大鼠数量分别为3、4只,假手术组为2、3只。

基金项目:国家自然科学基金(30470608)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470608)
作者简介:邱国平,女,四川省荣县人,硕士研究生,助教,主要从事神经生物学方面的研究。E-mail: qiugp@126.com
通信作者:孙善全,电话:(023)68485763,E-mail: sunsq2151@sohu.com
收稿日期:2008-06-24;**修回日期**:2008-07-16

1.2　动物模型制作及入选标准

大鼠经 3.5% 水合氯醛(1 ml/100 g)腹腔注射麻醉，参照 Rosenberg 等[3]的方法，向右侧尾状核位置(即前囟后 1 mm，向右旁开 3 mm，垂直进针 5.9 mm)处缓慢注射胶原酶Ⅶ 0.5 U，术后给予正常进食饮水。假手术组大鼠除不注射药物外，其余操作同手术组。大鼠苏醒后立即按 Zausinger 法[4]进行神经功能障碍评分，选择苏醒后评分小于等于 4 分，并经取脑证实有明确血肿者，视为脑出血模型制作成功，否则弃之不用。假手术组大鼠未见明显神经功能障碍。

1.3　实验方法

1.3.1　组织切片的准备　　麻醉大鼠，经心脏灌注生理盐水 300 ml，断头取脑，移入冰冻切片机内，OCT 包埋，速冻，连续冠状位切片，片厚 10 μm，晾干，做常规 HE 染色、IHC 及免疫荧光双标。

1.3.2　IHC 检测 AQP9 的表达变化　　切片经 4 % 多聚甲醛固定 30 min，0.01 mol/L PBS(10 min × 3 次)洗片。按照 SAP-9100(中杉金桥)免疫组化试剂盒的说明，先加 A 液 37 ℃封闭 20 min，再加 AQP9 兔抗大鼠多克隆抗体(1∶400，美国 Chemicon)，4 ℃过夜，随后按说明完成操作。用 BCIP/NBT(碱性磷酸酶显色试剂盒，中杉金桥)显色，光镜下观察，适时终止反应。水溶性封片剂(中杉金桥)封片，光镜下观察并拍照。阴性对照以 0.01 mol/L PBS 代替一抗，其余步骤不变。

1.3.3　免疫荧光双标检测 AQP9 的表达变化　　切片固定方法同上。10 % 马血清封闭 2 h，加兔抗大鼠 AQP9 多克隆抗体(1∶300 alpha diagnosis)和小鼠抗大鼠 GFAP 单克隆抗体(1∶400，Santa cruz)，4 ℃过夜，0.01 mol/L PBS(15 min × 3 次)洗片，加 FITC 标记的山羊抗兔荧光二抗(1∶400，Santa cruz)和 Cy5 标记的山羊抗小鼠荧光二抗(1∶400，Chemicon)，常温下 6 h，0.01 mol/L PBS(15 min × 3 次)洗片，50 % 甘油封片，激光共聚焦扫描成像。

1.3.4　RT-PCR 检测 AQP9 mRNA 含量的变化　　麻醉动物，经心脏灌注冰生理盐水约 300 ml，断头取脑，取血肿周围组织 50 mg，假手术组和正常组取相应部位脑组织 50 mg。按 Trizol (Takara 公司)试剂说明书提取组织总 RNA，并用紫外分光光度仪测定总 RNA 含量。按 AMV 逆转录试剂盒(杭州博日)的操作说明将 mRNA 逆转录为 cDNA。用以下引物对 AQP9 及 β-actin 的 cDNA 进行扩增：AQP9(165 bp)上游 5′-gaaggacggtgc-caagaag-3′，下游 5′-gtgatgatcccgccaaaac-3′；β-actin(398 bp)上游 5′-ctgccgcatcctcttcctc-3′，下游 5′-ctcctgcttgctgatccacat-3′。PCR 产物经 2 % 琼脂糖凝胶电泳检测，紫外分析仪下观察并照相。

1.3.5　图像分析　　免疫组化结果在光镜下进行分析，按系统抽样原则随机选取同一部位切片的 10 个不同视野进行观察，采用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统进行自动分析，结果以细胞平均灰度值表示；RT-PCR 结果用 Bandscan5.0 分析软件进行光密度分析，将 AQP9 与 β-actin 光密度的比值作为 AQP9 mRNA 的表达水平。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件对实验数据进行两个独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　脑组织病理变化

光镜下，假手术组脑组织结构完整，神经元和胶质细胞形态正常。于脑出血组，ICH 后 1 h，仅于尾状核见血管周围组织疏松，之后随着时间的延长，出血区逐渐向周围扩散；ICH 后 6 h，血管周围间隙、细胞间隙增宽，但细胞形态尚正常；ICH 后 24 h，于出血区见神经细胞数量减少、胞体肿胀，胶质细胞数量增多，此时出血面积达到峰值，之后的时段面积未再见明显变化；ICH 后 48 h 组织疏松最为明显，出血区细胞变性坏死，核固缩、核碎裂、核溶解；至 7 d，细胞肿胀减轻，可见明显胶质细胞增生(图 1)。

2.2　AQP9 表达变化

IHC 结果显示，AQP9 于正常组双侧大脑皮质、海马、下丘脑呈弱表达，假手术组各时段与正常组基本一致，而 ICH 组的表达则呈一动态变化过程：ICH 后 1 h ，AQP9 强表达于出血侧大脑皮质、海马、室管膜、脉络丛、下丘脑室旁核和视上核($P < 0.05$)；ICH 后 2 ~ 6 h，AQP9 表达逐渐降低，至 6 h 降至最低($P < 0.05$)，仅脉络丛可见较强表达；24 h 后 AQP9 于双侧大脑广泛表达，48 h 尤为明显($P < 0.05$)，于双侧室管膜、脉络膜、穹窿下器等脑室周围器官(circumventricular organs，CVOS)、大脑皮质、海马、背侧丘脑、血肿中心区及血肿周围组织、下丘脑视上核、室旁核均可见 AQP9 表达；随后有所减弱，但 7 d 时仍明显高于假手术组($P < 0.05$)(图 2、3)。荧光双标结果显示，ICH 后 1、24、48、72 h 和 7 d 时段内，可见 AQP9 与 GFAP 共表达于软脑膜、大脑皮质、血肿中心区和血肿周围区、CVOS、下丘脑视上核、室旁核，且表达明显强于假手术组(图 4、5)。

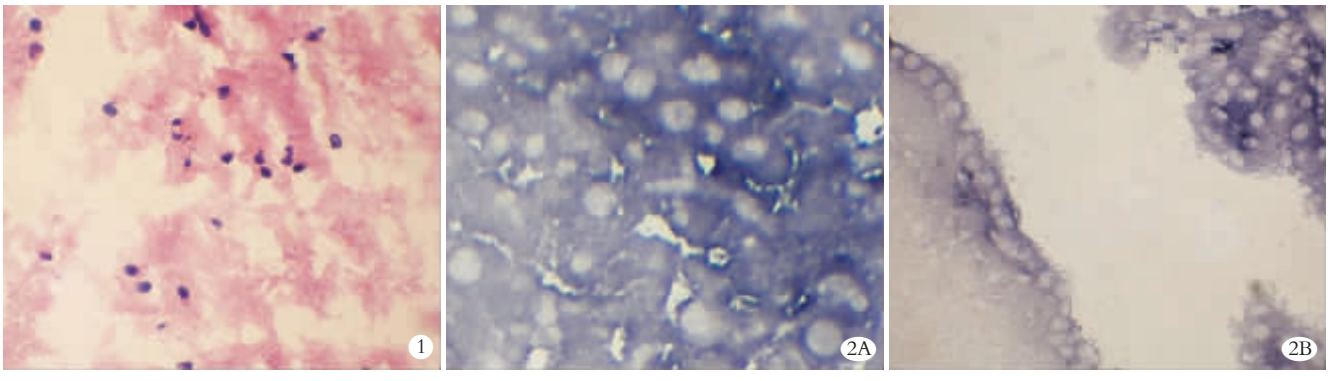
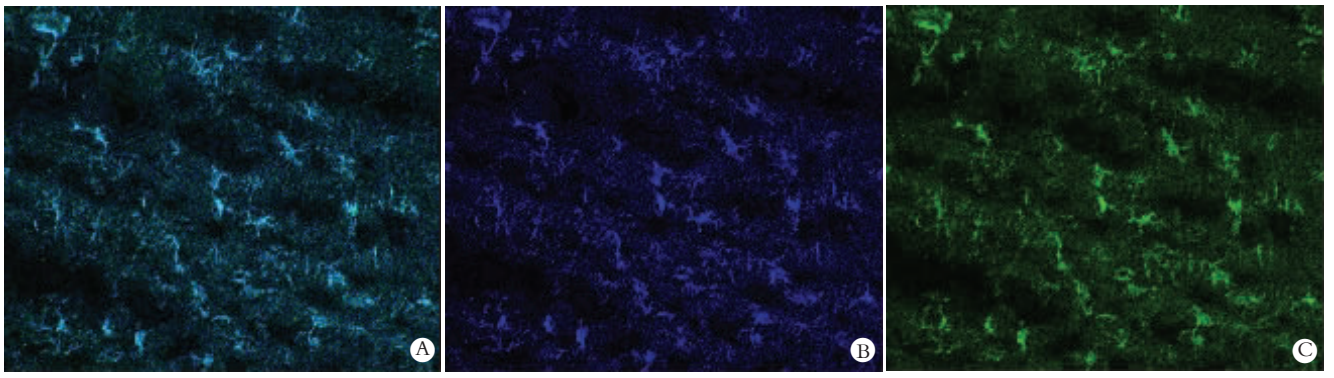


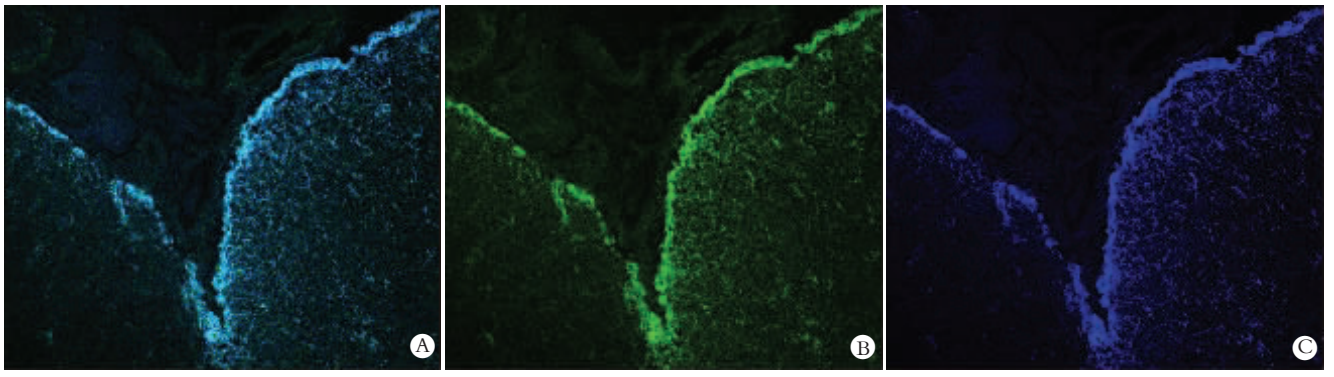
图 1　ICH 48 h 血肿中心区组织变化　(HE × 400)

图 2　ICH 后大鼠脑组织 AQP9 表达变化　(S-P × 400)　A：ICH 后 1 h 视上核；B：ICH 后 24 h 室管膜及脉络丛



A:GFAP 荧光标记;B:AQP9 荧光标记;C:GFAP/AQP9 双重标记

图4 激光共聚焦显微镜下 ICH 后 48 h 下丘脑 GFAP(蓝色)与 AQP9(绿色)免疫荧光标记结果 (×200)



A:GFAP 荧光标记;B:AQP9 荧光标记;C:GFAP/ AQP9 双重标记

图5 激光共聚焦显微镜下 ICH 后 72 h 软脑膜 GFAP(蓝色)与 AQP9(绿色)免疫荧光标记结果 (×100)

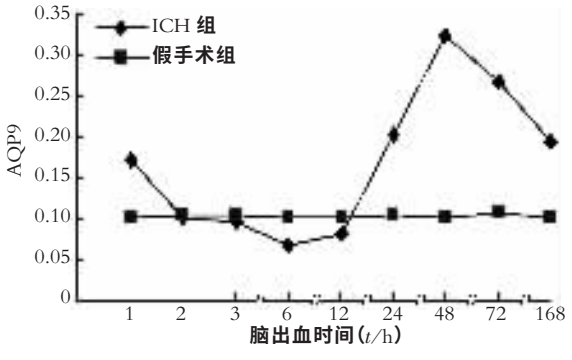


图3 脑出血脑组织中 AQP9 的表达变化 (IHC)

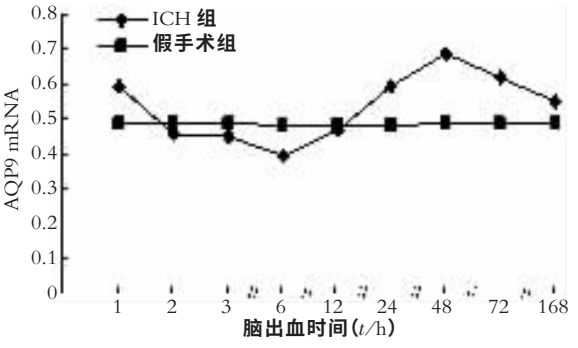


图6 脑出血脑组织中 AQP9 mRNA 的表达变化 (RT-PCR)

2.3 AQP9 mRNA 含量的变化

本实验分别检测了正常大鼠、假手术组组和脑出血组血肿周围脑组织 AQP9 mRNA 的含量。结果显示:假手术组 AQP9 mRNA 含量与正常组无明显变化,出血组 AQP9 mRNA 的表达则呈一动态变化过程:ICH 后 1 h, AQP9 mRNA 的含量已明显高于假手术组($P<0.05$);随后逐渐降低,于 6 h 降至最低,且明显低于假手术组($P<0.05$);随后再逐渐升高,至 ICH 24 h 及以后各时段, AQP9 mRNA 含量均明显高于假手术组($P<0.05$),且于 48 h 达到峰值,7 d 时 AQP9 mRNA 含量仍明显高于假手术组($P<0.05$)(图6)。

3 讨论

水通道蛋白家族(aquaporins, AQPs)是一组与水电解质运输平衡密切相关的细胞膜转运蛋白。迄今为止,人类已经从哺乳动物体内分离克隆出 13 种水通道蛋白,即 AQP0-AQP12,其中,鼠脑组织中检测到 6 种水通道蛋白,即 AQP1、AQP3、AQP4、AQP5、AQP8、AQP9。根据其对水和其他溶质通透性的不同,AQPs 可分为水通道(aquaporins)和水甘油通道(aquaglyceroporins)2 个亚族[5]。前者仅对水通透,而后者除对水

通透外,还对甘油、尿素、乳酸等通透[6]。AQP9 属水甘油通道,在脑组织中含量丰富,正常情况下,其主要分布于:星形胶质细胞和儿茶酚胺能神经元细胞胞膜上[6,7]。

本实验采用胶原酶注入大鼠尾状核建立脑出血模型。胶原酶是一种金属蛋白酶,主要作用是分解血管基底膜上的胶原蛋白[3]。在脑出血早期,由于脑血管基底膜受到破坏,导致血管内大量血细胞、血浆蛋白和水渗出,进入细胞间隙,最终导致水电解质平衡紊乱。实验结果显示,脑出血早期,除 ICH 1 h 外,AQP9 mRNA 含量较假手术组降低,以 3、6 h 最明显;并且光镜下见此期血管周围间隙、细胞间隙明显增宽,而细胞形态却未见明显异常。由此推测,脑出血早期,在细胞间液增多的情况下, AQP9 表达降低可以减少细胞间液进入细胞内,延迟细胞内水肿的形成,从而保持细胞形态、功能的相对稳定。而 ICH 1 h,AQP9 及其 mRNA 含量增高,则可能与手术应激有关[8,9]。

实验结果显示,0.5 U 胶原酶注入大鼠尾状核后,随着时间的延长,出血面积逐渐增大,至 24 h 达到峰值,其后面积未见明显变化,由此推测 24 h 后脑出血已经停止。虽然 24 h 及以后各时段脑出血已经停止,但是由于此期血肿已经形成,血肿的占位效应、凝血酶和血红蛋白等影响因子作用于脑组织,使其处于严重缺血、缺氧状态。缺血、缺氧又会引起自由基、兴奋性神经递质等继发性损伤因子的释放,从而进一步加重脑缺血、缺氧。如此恶性循环一方面导致脑内水电解质平衡极度紊乱,另一方面使脑组织能量供应严重不足,引起脑内无氧酵解增加,乳酸大量产生,导致组织内环境酸化。研究[10]表明,当 pH 值低于 5.5 时,AQP9 对乳酸的通透性比生理情况下增加 4 倍,另一方面,AQP9 可表达于儿茶酚胺能神经元细胞上[6,7],而儿茶酚胺能神经元上的 AQP9 可优先将乳酸转移到神经元内,作为神经元的能量底物[11]。因此,众多学者推测[6-9],AQP9 可能跟能量代谢相关。实验结果显示,ICH 24 h 及以后各时段,AQP9 mRNA 含量明显增高,而 IHC 见 AQP9 于全脑表达广泛上调,尤其是 ICH 后 48 h,AQP9 不仅在与水平衡代谢密切相关的 CVOS 中有表达,而且在与渗透压调节密切相关的下丘脑视上核、室旁核有表达,免疫荧光双标也发现,这一时段内,AQP9 与星形胶质细胞的特异性标记物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)共表达,且阳性表达量明显增强。由此推测,此期高表达的 AQP9,一方面调节水电解质平衡紊乱,另一方面,通过“乳酸穿梭”机制[6],将乳酸从星形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,进而调节能量代谢平衡。

综上所述,脑出血早期,AQP9 及其 mRNA 表达降低,可在细胞间液急剧增加的情况下,延迟细胞内水肿的形成,进而对胶质细胞具有保护作用;而脑出血后期,AQP9 及其 mRNA 表达上调,则可能与水电解质平衡调节、能量代谢调节有关。然而,目前对于 ICH 后 AQP9 表达的调控机制尚不清楚,还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 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.

[2] Badaut J, Brunet J F, Petit J M,*et al*. Induction of brain aquaporin 9 (AQP9) in catecholaminergic neurons in diabetic rats[J]. Brain Res, 2008,1188:17 - 24.

[3] Rosenberg G A, Mun-Bryce S, Wesley M, *et al*. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke,1990,21(5):801 - 807.

[4] Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A,*et al*. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms[J]. Brain Res,2000,863 (1 - 2):94 - 105.

[5] Schrier R W, Chen Y C, Cadnapaphornchai M A. From finch to fish to man: role of aquaporins in body fluid and brain water regulation[J]. Neuroscience, 2004, 129(4):897 - 904.

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

[7] 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.

[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] 刘　辉,孙善全,杨　美,等. 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[J]. 第三军医大学学报,2008, 30 (3): 220 - 222.

[10] Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, *et al*. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel[J]. J Biol Chem, 1998,273(38):24737 - 24743.

[11] Nguyen N H, Brathe A, Hassel B. Neuronal uptake and metabolism of glycerol and the neuronal expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase[J]. J Neurochem, 2003,85(4):831 - 842.

(编辑　龙　亮)