文章编号:1000-5404(2010)13-1387-04

论著

水通道蛋白 4 在缺氧缺糖后水肿星形胶质细胞中的作用

唐兆华,廖正步,蒋光元,支兴刚,石全红,何朝晖,詹 彦 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 探讨水通道蛋白 4(aquaporin 4,AQP4)在缺氧缺糖培养后水肿星形胶质细胞中的表达变化与作用。**方法** 星形胶质细胞分为正常组和缺氧缺糖组,缺氧缺糖组细胞经过 5 h 缺氧缺糖后恢复正常条件培养至 0.5、2、8、24 h 和 48 h 5 个时间点时,用光镜观察细胞形态变化,RT-PCR 及免疫荧光法测定 AQP4 的 mRNA 及蛋白的表达变化。**结果** ①在缺氧缺糖后 0.5 h,细胞肿胀逐渐形成并继续加重,2 h 肿胀达到高峰,至 8 h 和 24 h 时肿胀逐渐消退,48 h 细胞基本恢复正常形态。②RT-PCR 和免疫荧光检测:在缺氧缺糖后 0.5 h,AQP4 mRNA 和蛋白的表达均较正常组明显下降($P<0.05$),2 h 回升,8 h 明显超过正常水平,达最高值($P<0.05$),24 h 有所下降,但仍明显高于正常水平($P<0.05$),至 48 h 时 mRNA 和蛋白的表达均基本恢复正常水平。**结论** 缺氧缺糖后星形胶质细胞水肿形成及消退期 AQP4 的不同表达变化可能都是细胞的一种自身保护机制,从而尽量维持细胞的正常形态和功能。

[关键词] 水通道蛋白 4;细胞水肿;星形胶质细胞;缺氧缺糖

[中图法分类号] R322.8; R329.27; R362 **[文献标志码]** A

Role of aquaporin 4 in swollen rat astrocytes after oxygen-glucose deprivation

Tang Zhaohua, Liao Zhengbu, Jiang Guangyuan, Zhi Xinggang, Shi Quanhong, He Zhaohui, Zhan Yan (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of aquaporin 4 (AQP4) in swollen astrocytes after oxygen-glucose deprivation (OGD). **Methods** Astrocytes primarily cultured from 2-day-old SD rats were divided into normal group and OGD group. Five hours after OGD, the cells were cultured for 0.5, 2, 8, 24 and 48 h in normal culture medium, respectively. Morphological alterations of astrocytes were observed under a light microscope. Expression of AQP4 mRNA and protein in astrocytes was detected by RT-PCR and immunofluorescence assay, respectively. **Results** Swelling of astrocytes occurred in 0.5 h after OGD, reached its peak in 2 h after OGD, gradually disappeared in 8 – 24 h after OGD, and became almost normal in 48 h after OGD. RT-PCR and immunofluorescence assay showed that the expression level of AQP4 mRNA and protein in astrocytes began to decrease, increase and return to normal, respectively, in 0.5, 8, and 48 h after OGD. **Conclusion** The expression level of AQP4 is decreased in swollen astrocytes in 5 h after OGD possibly by preventing the entry of it-mediated water into astrocytes, and is increased during the recovery stage of cell swelling by promoting excretion of water from swollen astrocytes.

[Key words] aquaporin-4; cell edema; astrocyte; oxygen-glucose deprivation

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30801182). Corresponding author:Liao Zhengbu,Tel:86-23-89011150, E-mail:liaozhengbu@hotmail.com

脑水肿是众多神经系统疾病共同的病理过程,它的发生与发展严重威胁着患者的生命健康,但其防治及分子机制的研究目前仍是一个难题。脑水肿主要由星形胶质细胞的肿胀引起[1],星形胶质细胞肿胀的程度决定着脑水肿的严重程度。水通道蛋白 4(aquaporin4,AQP4)在星形胶质细胞胞体和足突中均大量表达,具有特异的水转运功能。目前大量研究结果表明,AQP4 与各类脑水肿的发生或转归密切相关[2-5],为脑水肿分子机制的研究提供了新的途径。然而各型脑水肿发生、发展的过程中均伴有脑细胞不同程度的缺氧缺血。所以本研究旨在观察缺氧缺糖后星形胶质细胞水肿形成及消退的过程中,AQP4 的动态表达变化,并初步探

[基金项目] 国家自然科学基金(30801182)

[通信作者] 廖正步,电话:(023)89011150,E-mail:liaozhengbu@hotmail.com

讨 AQP4 在脑水肿发生和转归过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

新生 2 d 内的 SD 大鼠 20 只,雌雄不拘(重庆医科大学实验动物中心提供),胎牛血清(美国 Gibco),无糖 DMEM 培养基(北京钮因华信),神经胶质原纤维酸性蛋白(美国 Sigma),RT-PCR 试剂盒(美国 Ferments),羊来源 AQP4 多克隆抗体(美国 Santa Cruz),兔抗羊 IgG 抗体(美国 KPL)。

1.2 星形胶质细胞原代培养及鉴定

星形胶质细胞原代培养参照文献[6]改进。取新生大鼠大脑皮层,剪碎并通过 200 目网筛,0.25% 胰酶和 0.025% EDTA 消化 10 min,加含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基(正常培养基)和 D-Hanks 液,离心,去上清液,加正常培养基吹打并接种到有多聚赖氨酸涂底的培养瓶,于 37 ℃,20% O_2,5% CO_2 的孵箱 1 h,将细胞悬液换至另一培养瓶,隔 2 ~ 3 d 换液 1 次,7 d 后 37 ℃,200 r/min 水平振荡 18 h,换液,细胞长满至 90% ~ 95% 瓶底后传代,至第 3 代时得到成熟纯化的原代星形胶质细胞,用神经胶质原纤维酸性蛋白进行细胞免疫荧光鉴定。

1.3 实验分组及缺氧缺糖模型的建立

将成熟纯化的原代星形胶质细胞分为:①正常组;②缺氧缺糖组。缺氧缺糖模型的制作[7]:去掉星形胶质细胞的培养基,用 PBS 冲洗 2 次,换为不含血清的无糖 DMEM 培养基,置于 1% O_2,5% CO_2 的孵箱(美国 Thermo)缺氧培养 5 h 时再换回正常培养基,并于 20% O_2,5% CO_2 的孵箱常氧培养至 0.5、2、8、24 h和 48 h 5 个时间点时进行后续观察检测。

1.4 星形胶质细胞形态及超微结构观察

用倒置显微镜(德国 Leica)直接观察缺氧缺糖后各时间点星形胶质细胞的形态变化。

1.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 AQP4 mRNA 的表达

按 Trizol 试剂说明提取正常组细胞和缺氧缺糖组不同时间点的细胞总 RNA,采用 MMLV 逆转录试剂盒按操作说明逆转录为 cDNA,产物进行 PCR。AQP4 引物:上游:5′-CCTACAGAACCAAGGCGTAA-3′,下游:5′-TCCCTGGAAATGACTGAGAA-3′,扩增片段 261 bp;β-肌动蛋白引物:上游:5′-ACCTCCAACACCCCAGCCATG-3′,下游:5′-CTGATCCACATCTGCTGGAAGGTGG-3′,扩增片段 691 bp。反应体系 25 μl,PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,共循环 30 次,最后 72 ℃再延伸 10 min。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,长波紫外灯下观测照相,电泳结果以 Quantity One(美国 Bio-Rad)图像分析系统进行电泳条带光密度分析,计算 AQP4 与 β-肌动蛋白产物的光密度积分比值,作为 AQP4 mRNA 的表达水平(引物合成由上海生工提供)。

1.6 免疫荧光染色检测 AQP4 蛋白的表达

爬片细胞分别在缺氧缺糖后不同时间点用 4% 多聚甲醛固定 15 min;PBS 清洗 3 次 ×5 min,Triton X-100 处理 5 min;PBS 清洗,封闭用兔血清 37 ℃封闭 30 min;加入羊来源 AQP4 多克隆抗体(1∶50)37 ℃孵育 1 h,4 ℃冰箱过夜;PBS 清洗,加 FITC 标记的兔抗羊 IgG(1∶100)及 DAPI(1∶800),37 ℃孵育 1 h;PBS,甘油缓冲液封片。使用正置荧光显微镜(德国 Leica)观察。每一样本随机取 3 个视野的细胞用 Image-Pro plus 软件对荧光图像进行分析,得到的免疫反应产物平均光密度值作为 AQP4 蛋白的表达水平。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行组间比较的单因素方差分析。

2 结果

2.1 星型胶质细胞的原代培养及鉴定

原代成熟的星形胶质细胞用 GFAP 荧光染色鉴定,细胞纯度 >98%(图 1)。倒置显微镜下观察:原代成熟的星形胶质细胞成片生长,呈多边不规则形,有细长突起,细胞间连接紧密(图 2A)。

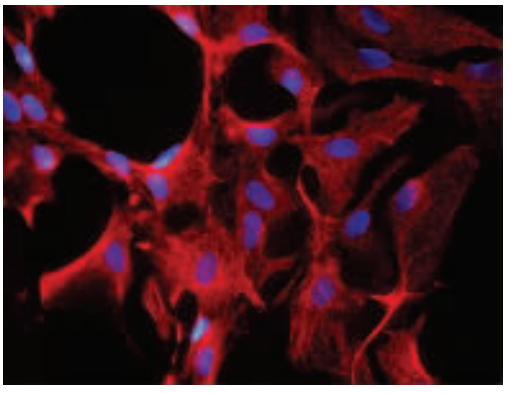


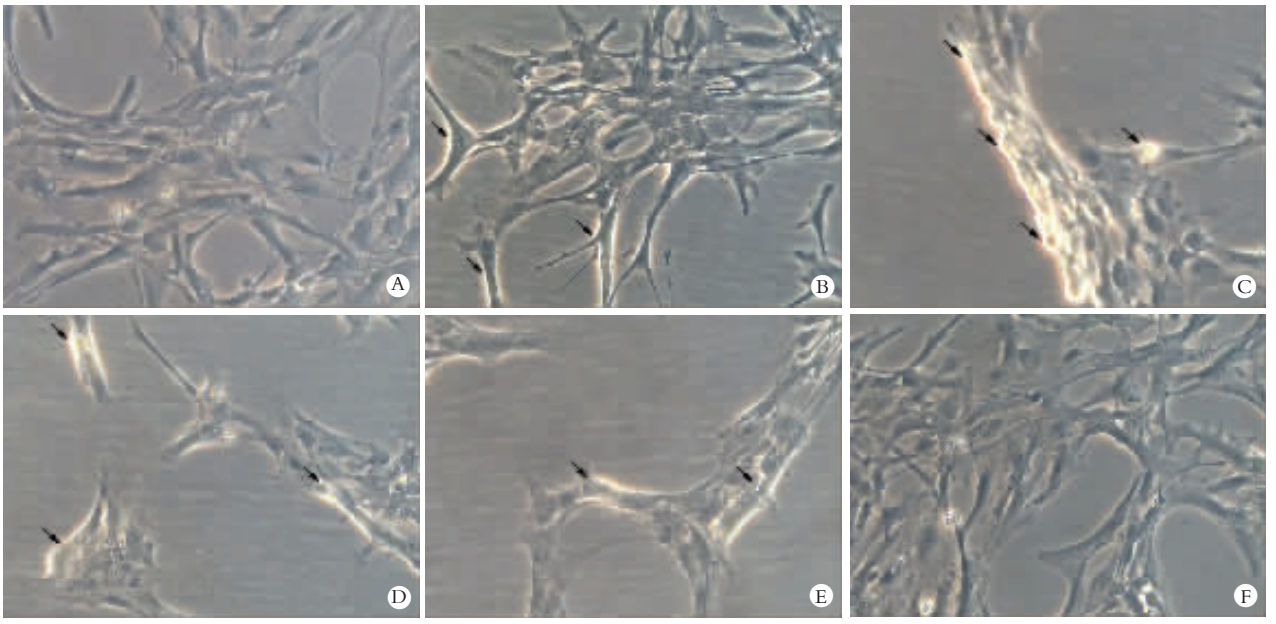
图 1 GFAP 细胞免疫荧光染色观察原代成熟星形胶质细胞
(荧光显微镜 ×400)

2.2 缺氧缺糖培养后星形胶质细胞的形态变化

倒置显微镜下星形胶质细胞经缺氧缺糖后 0.5 h 时开始出现边缘皱缩,轮廓加强,胞体略增大,细胞质内出现较多颗粒样物质,2 h 时形态变化加重,细胞明显肿胀变圆,折光率明显增高,突起增粗缩短,有细胞间紧密连接断裂,少量细胞呈凝固性坏死,8 h 时细胞形态变化有所减轻,肿胀的细胞稍缓解,部分坏死细胞已脱落悬浮,细胞数量减少,24 h 时肿胀虽继续缓解,但较正常细胞仍有明显肿胀,至 48 h 时,细胞基本恢复扁平,多边形,有细长突起的正常形态(图 2B ~ F)。

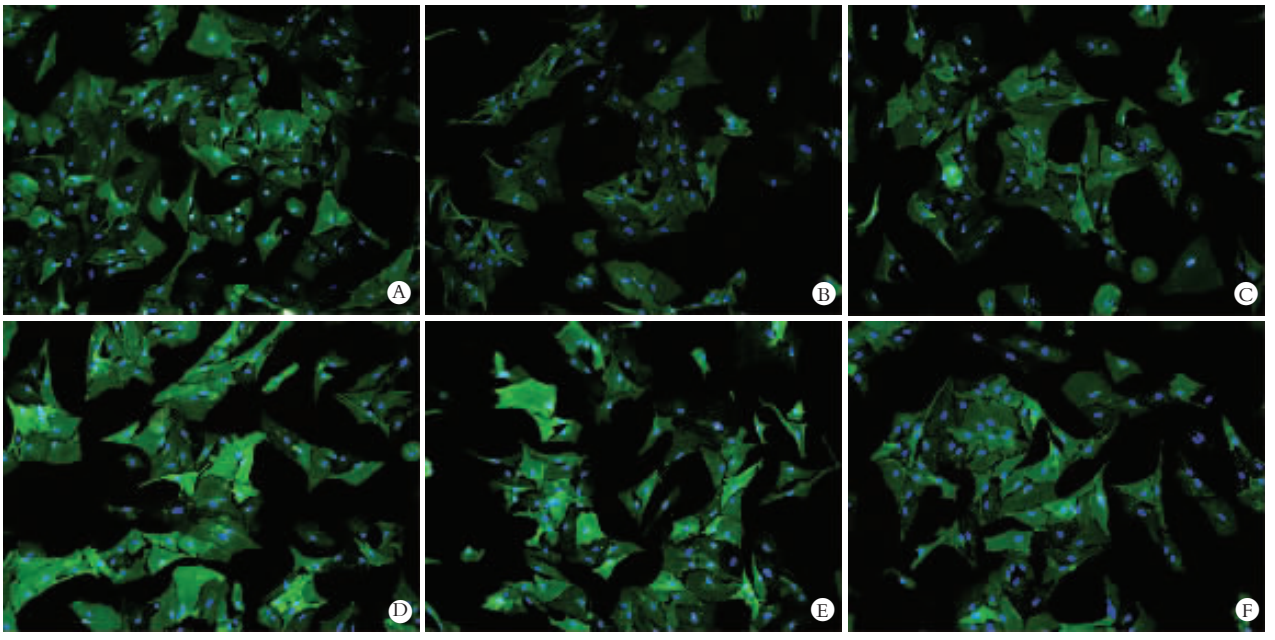
2.3 RT-PCR 检测缺氧缺糖后 AQP4 mRNA 的表达变化

RFR-R($n=5$)与正常组(0.78 ± 0.05)相比,星形胶质细胞 AQP4 mRNA 在 5 h 缺氧缺糖后 0.5 h 时表达先下降[(0.47 ± 0.04),$P<0.05$],2 h 时开始回升[(0.73 ± 0.06),$P>0.05$],至 8 h 时明显高于正常并达最高值[(1.37 ± 0.07),$P<0.05$],24 h 时有所下降,但仍高于正常水平[(1.25 ± 0.05),$P<0.05$],至 48 h 基本恢复正常水平[(0.84 ± 0.07),$P>0.05$]。见图 3。



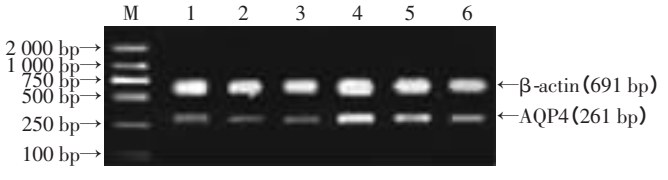
A：正常组；B～F：分别为缺氧缺糖组 0.5、2、8、24、48 h　↑：肿胀细胞及其突起

图 2　星形胶质细胞缺氧缺糖后的形态观察　（倒置显微镜　×200）



A：正常组；B～F：缺氧缺糖组 0.5、2、8、24、48 h

图 4　星形胶质细胞缺氧缺糖后不同时间点其 AQP4 蛋白的表达变化　（荧光显微镜　×200）



M：DNA 标准（DL 2000）；1：正常组；2～6：分别为缺氧缺糖组 0.5、2、8、24、48 h

图 3　星形胶质细胞缺氧缺糖后不同时间点其 AQP4 mRNA 的表达变化

2.4　免疫荧光检测 AQP4 蛋白的表达变化

免疫荧光染色示 AQP4 蛋白阳性产物主要分布于细胞膜和细胞质内，呈绿色荧光，细胞核由 DAPI 染成蓝色荧光。与正常组（0.161 ± 0.007）相比，星形胶质细胞 AQP4 蛋白在 5 h 缺氧缺糖后 0.5 h 时表达先下降［（0.103 ± 0.009），$P < 0.05$］，2 h 时开始回升［（0.154 ± 0.007），$P > 0.05$］，至 8 h 时明显高于正常并达最高值［（0.234 ± 0.009），$P < 0.05$］，24 h 时有所下降，但仍高于正常水平［（0.211 ± 0.008），$P < 0.05$］，至 48 h 基本恢复正常水平［（0.175 ± 0.010），$P > 0.05$］。见图 4。

3 讨论

脑水肿是颅脑创伤、脑卒中和颅内肿瘤等许多神经系统疾病共同的病理过程,严重的脑水肿可致患者瘫痪甚至危及生命,但其临床防治和分子机制的研究都是目前的难题。

AQP4是水通道蛋白家族(已发现10种)中的一种,具有特异的水转运功能。它是存在于脑内的最主要水通道蛋白,在脑内水电解质平衡的调节上发挥着重要作用[8,9]。Papadopoulos等[4]和Manley等[10]在细胞毒性脑水肿模型中,研究发现AQP4缺陷小鼠的脑水肿程度明显轻于野生小鼠。但Papadopoulos等[11]和Bloch等[3]在血管源性脑水肿模型和梗阻性脑积水模型中,发现AQP4敲除小鼠的脑水肿程度却明显重于野生小鼠。这说明AQP4在脑水肿的发展和转归过程中均发挥了重要作用,而且可能发挥着双重作用。

体外缺氧缺糖模型引起了星形胶质细胞明显肿胀、足突和细胞间紧密连接的破坏,它可模拟体内各种神经系统疾病中星形胶质细胞因缺血再灌注损伤引起的脑水肿,并且避开了体内各种复杂的干扰因素,为脑水肿的相关机制研究提供了重要的体外模型。所以本实验分别在缺氧缺糖后星形胶质细胞的形成期和消退期观察AQP4的表达变化,从而探讨AQP4在脑水肿发展及转归过程中发挥的作用。

在本实验星形胶质细胞缺氧缺糖模型中:光镜下观察,缺氧缺糖后0.5 h时,细胞肿胀逐渐形成并继续加重,AQP4 mRNA和蛋白的表达较正常组明显降低;在2 h时,细胞肿胀加重到顶峰,开始逐渐转为消退,AQP4 mRNA和蛋白的表达反而逐步上升;在8 h时,细胞肿胀虽得有一定程度消退,但肿胀仍很明显,AQP4 mRNA和蛋白表达继续增加,并明显超过正常组达到高峰;至24h时,细胞肿胀进一步消退,水肿形态明显好转,AQP4 mRNA和蛋白的表达开始有所下降;至48 h时,肿胀细胞已基本恢复正常形态,AQP4 mRNA和蛋白的表达也回到正常水平。

AQP4介导的细胞内外水分的转运是随着渗透梯度被动转运的[12]。在缺氧缺糖后星形胶质细胞水肿的形成过程中有能量障碍等许多机制参与,最终出现细胞内外电解质平衡紊乱,伴随细胞内Na^+增高,细胞内出现高渗,水分通过AQP4向细胞内高渗方向转移,细胞水肿形成期,星形胶质细胞AQP4此时表达下降,可能是细胞的一种自身保护机制,抑制水分的异常内移,以免细胞肿胀过度。恢复正常条件培养后,随着细胞能量障碍等病理因素解除,细胞内外水电介质紊乱逐渐恢复平衡,细胞内高渗状态解除,水分随着渗透梯度变化,通过AQP4介导向细胞外排出,细胞肿胀随即达到高峰并逐渐进入消退期,星形胶质细胞AQP4此时表达升高,亦可能是细胞的一种自身保护,以促进肿胀细胞内水分的排出。星形胶质细胞细胞内外水电介质逐渐达到平衡后,细胞基本恢复正常形态,细胞不需要AQP4高表达来介导细胞内水分的排出,AQP4表达达到高峰后,逐渐下降至正常水平。

总之,在缺氧缺糖培养后星形胶质细胞水肿的整个过程中,AQP4在细胞肿胀形成期表达降低,可能是保护性抑制此时细胞外水分过多地进入细胞内,AQP4在细胞肿胀消退期表达升高,可能是保护性促进肿胀细胞内的水分向外排出,从而尽量使细胞内外达到水电介质平衡,维持细胞正常的形态和功能。

参考文献:

[1] Kimelberg H K. Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy[J]. Glia, 2005, 50(4): 389-397.

[2] Kitaura H, Tsujita M, Huber V J, *et al*. Activity-dependent glial swelling is impaired in aquaporin-4 knockout mice[J]. Neurosci Res, 2009, 64(2): 208-212.

[3] Bloch O, Auguste K I, Manley G T, *et al*. Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(12): 1527-1537.

[4] Papadopoulos M C, Verkman A S. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 13906-13912.

[5] Tourdias T, Dragonu I, Fushimi Y, *et al*. Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: a combined MRI-histological study[J]. Neuroimage, 2009, 47(2): 659-666.

[6] McCarthy K D, de-Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. J Cell Biol, 1980, 85(3): 890-902.

[7] Panickar K S, Polansky M M, Anderson R A. Cinnamon polyphenols attenuate cell swelling and mitochondrial dysfunction following oxygen-glucose deprivation in glial cells[J]. Exp Neurol, 2009, 216(2): 420-427.

[8] Taya K, Marmarou C, Okuno K, *et al*. Effect of secondary insults upon aquaporin-4 water channels following experimental cortical contusion in rats[J]. J Neurotrauma, 2010, 27(1): 229-239.

[9] Nico B, Mangieri D, Tamma R, *et al*. Aquaporin-4 contributes to the resolution of peritumoural brain oedema in human glioblastoma multiforme after combined chemotherapy and radiotherapy[J]. Eur J Cancer, 2009, 45(18): 3315-3325.

[10] 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): 159-163.

[11] 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): 1291-1293.

[12] Hasegawa H, Ma T, Skach W, *et al*. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues[J]. J Biol Chem, 1994, 269(8): 5497-5500.

(**收稿**:2009-12-02;**修回**:2009-12-24)

(编辑 张 维)