文章编号:1000-5404(2014)16-1647-04

论著

幼年大鼠脑膜炎脑水肿模型中水通道蛋白4的表达变化及内化

黄 娟[1,2],陆蔚天[1,2],杨致邦[1,3],徐 进[1,2],甘胜伟[1,2],邱国平[1,2],孙善全[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:神经科学研究中心[1],人体解剖学教研室[2],病原微生物与免疫学实验室[3])

[摘要] **目的** 观察在幼年大鼠脑膜炎脑水肿模型中水通道蛋白4(aquaporin-4, AQP4)的表达变化及内化现象,探讨AQP4及其内化在脑膜炎脑水肿发生中的作用。**方法** 采用幼鼠延髓小脑池注入B族溶血性链球菌建立细菌性脑膜炎模型,采用干湿质量法、伊文思蓝含量测定法、免疫印迹法分别检测脑膜炎幼年大鼠脑含水量、血脑屏障通透性以及AQP4的表达水平,运用免疫荧光双标的方法检测AQP4分别与早期内涵体标记物EEA1和晚期内涵体标记物MPR的共表达。**结果** ①实验组脑含水量(81.4±2.3)%较对照组(77.3±1.6)%明显增加($P<0.05$);②实验组AQP4表达水平(57.41±7.00)%较对照组(44.50±7.45)%明显增加($P<0.05$);③实验组依文思蓝含量(4.35±0.21)μg/g较对照组(4.27±0.33)μg/g无统计学差异($P>0.05$);④脑膜炎模型中,AQP4分别与EEA1和MPR共表达。**结论** 在幼年大鼠脑膜炎脑水肿模型中,脑内AQP4表达上调,同时存在AQP4内化的现象。

[关键词] 脑膜炎;脑水肿;水通道蛋白4;内化;内涵体
[中图法分类号] R341;R512.302;R742 [文献标志码] A

Upregulation and internalization of AQP4 in infant rat brains with bacterial meningitis

Huang Juan[1,2], Lu Weitian[1,2], Yang Zhibang[1,3], Xu Jin[1,2], Gan Shengwei[1,2], Qiu Guoping[1,2], Sun Shanquan[1,2]([1]Center of Neuroscience, [2]Department of Anatomy, [3]Laboratory of Pathogenic Microorganism and Immunology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To examine the alteration of aquaporin-4 (AQP4) expression and investigate the occurrence AQP4 internalization in rat brains with bacterial meningitis, so as to explore the possible role of AQP4 and its internalization in the brain edema of meningitis. **Methods** Group B hemolytic Streptococcus was injected into the cerebellar medulla pool of rat brain to establish a bacterial meningitis model. The brain water content, integrity of blood-brain barrier and expression of AQP4 were measured by wet and dry weight methods, Evans blue (EB) staining and Western blotting, respectively. Double immunofluorescence labeling was applied to detect the co-expression of AQP4 with early endosome antigen 1 (EEA1) as well as mannose-6-phosphate receptor (MPR), respectively. **Results** Compared with control group, the brain water content in the model group increased [(81.4±2.3)% *vs* (77.3±1.6)%], AQP4 expression increased [(57.41±7.00)% *vs* (44.50±7.45)%], and Evans Blue content had no significant change (4.35±0.21 *vs* 4.27±0.33 μg/g). The co-expression of AQP4 with EEA1 and that of AQP4 with MPR were observed in meningitic rat brains. **Conclusion** AQP4 in rat brains is up-regulated in the bacterial meningitis model. Meanwhile, the internalization of AQP4 occurs in the model.

[**Key words**] bacterial meningitis; brain edema; aquaporin-4; internalization; endosome

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31300911) and the Natural Science Foundation Project of Chongqing (CSTC2012jjA10022, CSTC2011jjA10003). Corresponding author: Sun Shanquan, E-mail: sunsq2151@cqmu.edu.cn

细菌性脑膜炎(bacterial meningitis)是常见的小儿中枢神经系统感染性疾病。炎症引起的脑水肿可导致神经细胞损伤和颅内压增高[1],危害严重。但是,脑膜炎患者中脑水肿的发生机制并不十分清楚。水通道

[基金项目] 国家自然科学基金(31300911);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10022, CSTC2011jjA10003)
[通信作者] 孙善全,E-mail:sunsq2151@cqmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140621.0851.009.html(2014-06-21)

蛋白(aquaporins,AQPs)的发现为研究脑水肿的发生机制开辟了新领域。AQPs成员中,水通道蛋白4(aquaporin-4,AQP4)在脑内表达最丰富,它是一种静水压和渗透压依赖的双向水通道膜蛋白[2],呈极性分布于星形胶质细胞在微血管周围形成的细胞终足膜上和在软脑膜内表面形成的胶质界膜上,以及室管膜细胞的基底部等部位[3]。有研究发现,在肺炎链球菌所致的小鼠脑膜炎脑水肿模型中,脑内AQP4表达增高[4],提示AQP4的表达变化与小鼠脑膜炎脑水肿的发生存在一定关系。内化(internalization)是指在某些生理或病理条件下,细胞的部分胞膜、跨膜蛋白以及受体或受体-配体复合物等通过胞吞、胞饮作用进入胞内的过程。有研究表明,在生理和病理情况下,很多细胞膜上的通道蛋白可发生内化,以调节其转运功能[5-6]。那么,在大鼠脑膜炎模型中,是否也存在AQP4内化的现象呢?为探讨在大鼠脑膜炎的病程中,AQP4在脑水肿发生中的作用,本研究观察幼年大鼠细菌性脑膜炎模型脑内AQP4的表达变化以及是否存在AQP4内化的现象。

1 材料与方法

1.1 材料

B族溶血性链球菌(group B hemolytic streptococcus,GBS)菌株由重庆医科大学病原微生物和免疫学实验室提供,小鼠抗AQP4单克隆抗体、兔抗早期内涵体1(early endosome antigen 1,EEA1)多克隆抗体、小鼠抗甘露糖-6-磷酸受体(mannose-6-phosphate receptors,MPR)单克隆抗体购自Abcam,兔抗AQP4多克隆抗体购自Santa Cruz,小鼠抗β-actin一抗购自北京中杉,相应荧光二抗购自康为世纪、碧云天及北京中杉,蛋白裂解液、BCA试剂盒、DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒购自碧云天,羊抗小鼠Western二抗购自Bio-Rad公司,其他均为国产分析纯。

1.2 制备B族链球菌混悬液

B族溶血性链球菌菌株接种于血琼脂糖培养基,37 ℃培养过夜,移种至血清肉汤培养基,生长至对数生长中期收菌,生理盐水冲洗2次。紫外分光光度仪检测菌液的浊度,调整菌液浓度为10^8 CFU/L。

1.3 脑膜炎模型诱导

3周龄SD大鼠34只(体质量约50 g,雌雄不限,购自重庆医科大学实验动物中心),分为2组:生理盐水($n=18$)对照组和实验组(细菌感染组,$n=16$)。脑膜炎模型的诱导参照文献[7-8]的方法。3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉,小脑延髓池穿刺进针,回抽50 μL脑脊液(CSF)弃去,实验组注入GBS菌悬液50 μL,生理盐水组注入50 μL无菌生理盐水。术后置笼于室温23 ℃,观察临床表现。

1.4 检测脑含水量(brain water content,BWC)

接种细菌24 h后迅速取脑称量湿质量,95 ℃真空干燥箱烤干至恒重,称量得干质量,按以下公式计算脑含水量:BWC=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.5 血脑屏障(blood brain barrier,BBB)通透性的测定

幼鼠在处死前2 h经颈外静脉注射2%伊文思蓝(EB)溶液(20 mL/kg),2 h后经心灌注生理盐水冲洗.处死后迅速取脑,按3 mL/100 mg脑组织加入甲酰胺,37 ℃恒温水浴箱避光提取72 h。提取液用N725型分光光度计(波长620 nm)测其光密度值[$D(620)$],用倍比稀释法制作标准曲线,再求得脑组织EB含量。

1.6 Western blot检测

接种细菌24 h后左心室灌注0.9%生理盐水冲洗,迅速取脑,分离大脑皮质,细胞裂解液提取蛋白;BCA法测定蛋白浓度,调节蛋白浓度一致,取等量蛋白样品(30 μg),SDS-PAGE电泳分离蛋白,湿转将蛋白条带转移至PVDF膜上。Western封闭液封闭1 h;1∶500小鼠抗AQP4单克隆抗体4 ℃过夜,1∶3 000 HRP标记的羊抗小鼠IgG 37 ℃孵育1 h;1∶1 000小鼠抗β-actin单克隆抗体4 ℃过夜,1∶3 000 HRP标记的羊抗小鼠IgG 37 ℃孵育1 h;DAB显色。应用Quantity One软件半定量分析,结果以AQP4和β-actin的比值表示。

1.7 标本制备、HE染色及免疫荧光检测

接种细菌24 h后用3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉,左心室灌注0.9%生理盐水冲洗,4%多聚甲醛灌流固定,取全脑,4%多聚甲醛固定过夜,30%蔗糖脱水至沉底,冰冻切片连续冠状切片。HE染色:常规HE染色。免疫荧光检测:PBS漂洗,0.3% Triton X-100作用30 min,0.1% BSA 37℃封闭90 min,适当稀释的一抗混合液4 ℃过夜,PBS漂洗,相应的二抗37 ℃孵育90 min,PBS漂洗,5% DAPI-甲醇溶液孵育5 min,PBS漂洗,50%甘油封片。空白对照采用0.1% BSA代替一抗孵育。激光共焦显微镜(LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkoc hen, Germany)下观察皮质部分并拍照。

1.8 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS 10.0统计软件分析。对实验数据进行两样本均数比较的t检验。

2 结果

2.1 行为表现及HE染色结果

实验组幼鼠接种细菌24 h后,2只死亡,其余16只轻者表现为精神差,进食少,运动减少,重者表现为反应迟钝、嗜睡,体温低等体征;对照组幼鼠无上述表现。实验组感染24 h后HE染色见脑膜增厚及大量炎性细胞浸润;对照组细胞排列整齐,形态规则,未见炎性细胞浸润(图1)。

2.2 脑含水量测量结果

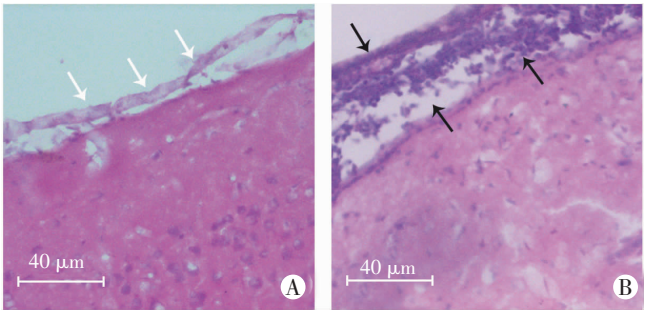
对照组和实验组脑含水量分别为(77.3±1.6)%、(81.4±2.3)%,实验组较对照组明显增高($P<0.05$)。

2.3 BBC通透性测定结果

对照组和实验组EB含量分别为(4.27±0.33)、(4.35±0.21)μg/g,两组间无统计学差异($P>0.05$)。

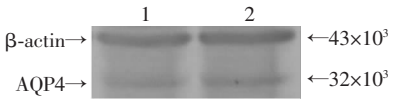
2.4 Western blot检测AQP4蛋白的表达

实验组AQP4表达量(57.41±7.0)%较对照组(44.49±7.45)%增加,差异具有统计学意义($P<0.05$,图2)。



↑:示脑膜　A:对照组;B:实验组

图 1　各组大鼠脑膜和大脑皮质病理学变化　(HE)



a: $P<0.05$,与对照组比较

图 2　对照组和实验组 AQP4 的表达水平

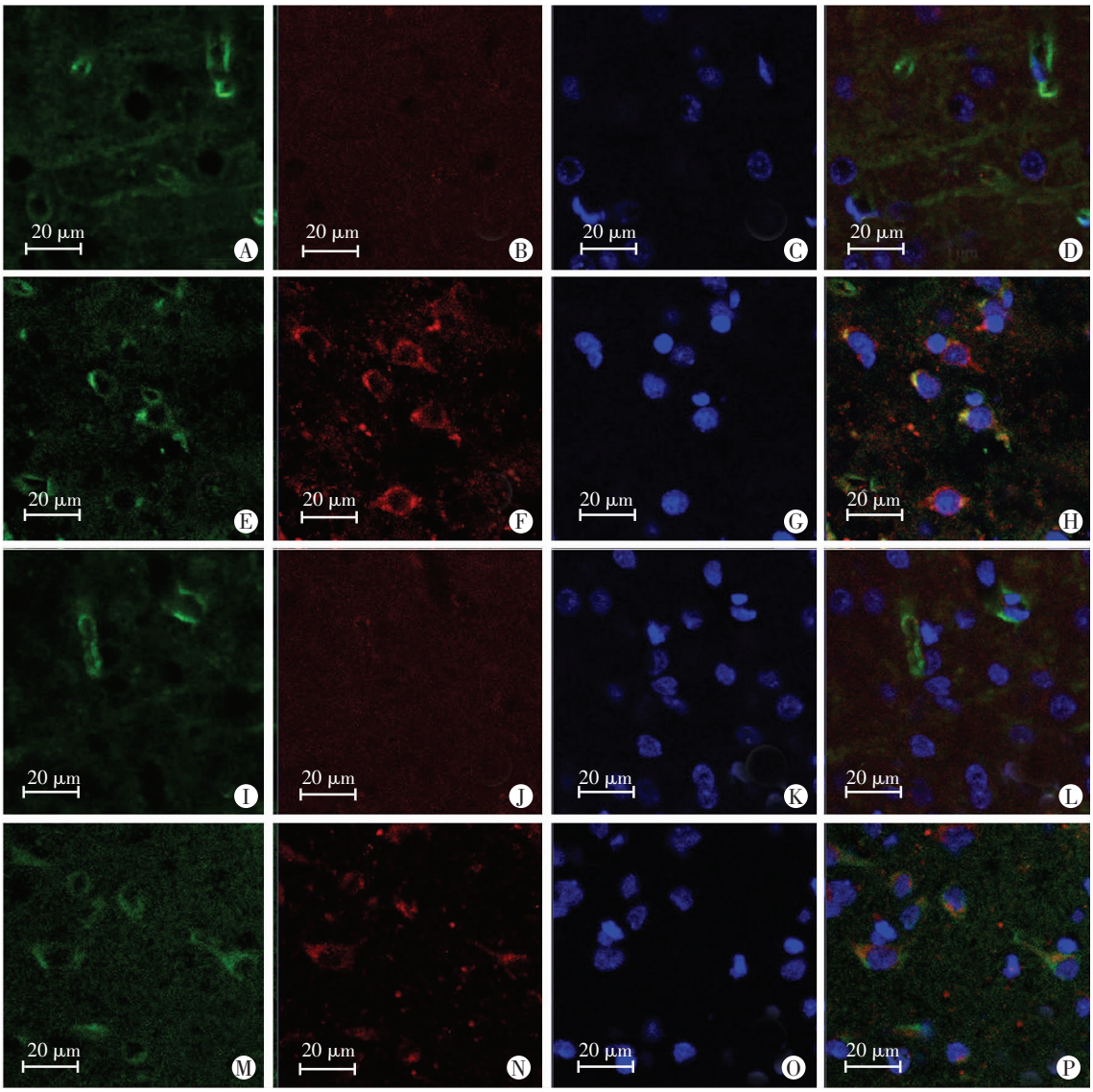
2.5　免疫荧光检测 AQP4 与 EEA1 或 AQP4 与 MPR 的共表达

对照组大脑皮质中早期内涵体标记物 EEA1 及晚期内涵体标记物 MPR 表达微弱,未见明显 AQP4 与 EEA1 或 AQP4 与 MPR 的共表达;实验组大脑皮质中 EEA1 及 MPR 表达增多,同时 AQP4 分别与 EEA1 和 MPR 共表达比例增多(图 3,表 1)。

表 1　各组大鼠 EEA1 和 MPR 表达的荧光强度及 AQP4 分别与 EEA1 及 MPR 的共表达比例 ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	EEA1 荧光强度	MPR 荧光强度	AQP4 与 EEA1 共表达的比例(%)	AQP4 与 MPR 共表达的比例(%)
对照组	2563 ± 367	2990 ± 667	0.34 ± 0.01	3.81 ± 2.27
实验组	52349 ± 7339[a]	41607 ± 14261[a]	65.85 ± 6.74[a]	31.56 ± 15.80[a]

a: $P<0.05$,与对照组比较



A、E、I、M:AQP4; B、F:EEA1; J、N:MPR; C、G、K、O:DAPI; D、H:AQP4, EEA1 与 DAPI 三者共标; L、P:AQP4, MPR 与 DAPI 三者共标; A ~ D、I ~ L:对照组;E ~ H、M ~ P:实验组

图 3　免疫荧光观察各组大脑皮质中 AQP4 分别与 EEA1 和 MPR 的共表达情况

3 讨论

本研究用GBS注入幼鼠延髓小脑池,实验组幼鼠出现脑膜炎症状,HE染色显示脑膜及脑实质有炎性细胞浸润,同时脑水含量较对照组增加。因此,我们成功地用GBS诱导出幼鼠细菌性脑膜炎脑水肿模型。

脑水肿按发生机制主要分为细胞毒性水肿(cytotoxic edema)和血管源性水肿(cytotoxic edema)两类[9]。本实验中血脑屏障通透性的检测结果显示实验组和对照组EB含量无统计学差异,提示在GBS接种24 h后诱导的细菌性脑膜炎的模型中脑水肿的类型以血脑屏障保持完整为特点的细胞毒性水肿为主。这一结论被Papadopoulos等[4]通过电镜观察所证实,他们发现肺炎链球菌感染36 h后形成的小鼠脑膜炎脑内呈现典型的细胞毒性脑水肿的形态特征:胶质细胞肿胀,血脑屏障完整。

有研究发现AQP4在不同类型的脑水肿的发生、发展过程中发挥的作用不同:在细胞毒性脑水肿的发生过程中,AQP4表达增高,可促进水分进入细胞内,加重细胞水肿;在血管源性的脑水肿中,AQP4则有利于细胞间隙多余水分的清除[10]。本实验在脑膜炎脑水肿的发生、发展中,AQP4的表达较对照组增高。文献[11]认为,在细胞毒性脑水肿发生、发展过程中,AQP4表达上调在清除细胞间过量水分的同时,星形胶质细胞却发生了水肿,因此,AQP4的表达增高对细胞毒性脑水肿而言是一种不利因素(maladaptation reaction)。抑制AQP4的功能将有利于减轻脑膜炎病程中出现的细胞毒性脑水肿。

有研究显示,在转染AQP4的人胃腺癌细胞系(human gastric epithelial,HGT-1)中,AQP4可在组胺的作用下发生内化[12]。本课题组在大鼠的脑缺血模型和眼内高压模型中,也分别观察到AQP4内化的现象[13-14]。而在脑膜炎导致脑水肿的发生过程中,在AQP4表达增高的同时是否存在脑内AQP4内化的现象,少见文献报道。本研究观察到在脑膜炎脑水肿模型中AQP4分别与早期内涵体标记物EEA1和晚期内涵体标记物MPR共表达,提示AQP4内化进入早期内涵体和晚期内涵体。AQP4在细胞膜上的极性分布是其发挥水转运功能的重要结构基础。有离体实验显示[12],AQP4内化可以引起细胞膜水通透性发生改变,从而导致细胞内、外水的分布变化。在本实验中,AQP4内化进入早期内涵体和晚期内涵体导致其亚细胞定位发生改变,其水转运功能也随之改变,将对脑水肿的发生、发展过程产生影响。由于AQP4表达增高可加重细胞水肿,因此,我们认为AQP4内化使得细胞膜上分布的AQP4表达减少,在细胞毒性脑水肿的发生过程中,对细胞而言可能是一种自我保护性调节。通过促进AQP4的内化以控制脑水肿,可能是治疗脑水肿的有效策略之一。

参考文献:

[1] Gerber J, Nau R. Mechanisms of injury in bacterial meningitis [J]. Curr Opin Neurol, 2010, 23(3): 312-318.

[2] Amiry-Moghaddam M, Ottersen O P. The molecular basis of water transport in the brain [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(12): 991-1001.

[3] Frigeri A, Gropper M A, Turck C W, *et al*. Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(10): 4328-4331.

[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] Sun A Q, Zhu L, Luo Y, *et al*. Human Organic Solute Transporter (hOST): protein interaction and membrane sorting process [J]. Int J Biochem Mol Biol, 2012, 3(3): 290-301.

[6] Su H, Chen M, Sands J M, *et al*. Activation of the cAMP/PKA pathway induces UT-A1 urea transporter monoubiquitination and targets it for lysosomal degradation [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 305(12): F1775-F1782.

[7] 李玲, 水泉祥, 赖爱娣,等. 幼龄大鼠细菌性脑膜炎模型的研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(3): 237-238.

[8] 赵玲玲, 殷萍, 邹华芳, 等. 新生SD大鼠细菌性脑膜炎动物模型的建立[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(19): 2891-2896.

[9] Klatzo I. Presidental address. Neuropathological aspects of braix edema [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1967, 26(1): 1-14.

[10] Papadopoulos M C, Verkman A S. Aquaporin-4 and brain edema [J]. Pediatr Nephrol, 2007, 22(6): 778-784.

[11] Arima H, Yamamoto N, Sobue K, *et al*. Hyperosmolar mannitol simulates expression of aquaporins 4 and 9 through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes [J]. J Biol Chem, 2003, 278(45): 44525-44534.

[12] Carmosino M, Procino G, Nicchia G P, *et al*. Histamine treatment induces rearrangements of orthogonal arrays of particles (OAPs) in human AQP4-expressing gastric cells [J]. J Cell Biol, 2001, 154(6): 1235-1243.

[13] Gan S W, Ran J H, Chen H, *et al*. Lysosomal degradation of retinal glial AQP4 following its internalization induced by acute ocular hypertension[J]. Neurosci Lett, 2012, 516(1): 135-140.

[14] Huang J, Sun S Q, Lu W T, *et al*. The internalization and lysosomal degradation of brain AQP4 after ischemic injury [J]. Brain Res, 2013, 1539: 61-72.

(**收稿**:2014-01-19;**修回**:2014-03-21)

(编辑 王小寒)