DOI:10.16016/j.1000-5404.201909112

抑制补体 C3/C3aR 信号可改善新生大鼠脑生发基质出血后脑积水

耿军军[1],唐 俊[1],王莉莉[2],谭 强[1],张建波[1],张 波[1],王 玲[1],魏林节[1],陈 志[1],朱 刚[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)附属第一医院神经外科[1];710032 西安,空军军医大学附属第一医院急诊科[2]

[**摘要**] **目的** 研究补体 C3/C3aR 信号介导的小胶质细胞-星型胶质细胞交互作用对新生大鼠脑生发基质出血(germinal matrix hemorrhage,GMH)后脑积水的影响。**方法** 检测胶原酶(Ⅶ-S 型)诱导新生大鼠 GMH 后脑室周围 C3 和 C3aR 的表达。给予 GMH 大鼠 C3aR 拮抗剂(complement C3 receptor antagonist,C3aRA)处理,观察 C3aRA 对大鼠脑积水(MRI 检查)、学习记忆功能(水迷宫实验)和炎症反应(IL-1β、IL-6、TNF-α、TGF-β1 和水通道蛋白 4)的影响。**结果** GMH 后脑室周围补体 C3 和 C3aR 表达上调,炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α、TGF-β1 表达增加,星形胶质细胞表面的水通道蛋白 4 异位表达且表达增加,脑室扩张,脑皮质和海马受压,大鼠学习记忆功能下降。阻断 C3/C3aR 信号后,相应 C3、C3aR 表达减低,炎症因子分泌减少,脑室扩张程度及皮层/海马受压减轻,大鼠神经功能明显改善。**结论** GMH 后星形胶质细胞上调并释放 C3, C3 与小胶质细胞表面的 C3aR 结合促进炎症反应,加重脑积水。星形胶质细胞表面水通道蛋白 4 的异位表达可能对 GMH 后脑积水产生起重要作用。

[**关键词**] 生发基质出血;脑积水;C3/C3aR 信号;星形胶质细胞;小胶质细胞;水通道蛋白 4;大鼠,新生

[**中图法分类号**] R-322; R392.32; R722.151 [**文献标志码**] A

Inhibition of complement C3/C3aR alleviates hydrocephalus following germinal matrix hemorrhage in neonatal rats

GENG Junjun[1], TANG Jun[1], WANG Lili[2], TAN Qiang[1], ZHANG Jianbo[1], ZHANG Bo[1], WANG Ling[1], WEI Linjie[1], CHEN Zhi[1], ZHU Gang[1] [1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Emergency, First Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of astrocyte-microglia crosstalk mediated by complement C3/C3aR signaling on hydrocephalus after germinal matrix hemorrhage (GMH) in newborn rats. **Methods** GMH was induced in post-natal day 7 SD rats by collagenase Ⅶ-S injection into the ganglionic eminence. We detected the changes in the expression of periventricular C3 and C3aR over time after GMH, and observed the effect of intraperitoneal injection of C3aRA (a selective C3aR antagonist) on hydrocephalus using magnetic resonance imaging (MRI). The learning and memory functions of the rats were tested after the treatment using Morris water maze test, and the expression of interleukin-1β (IL-1β), IL-6, tumor necrosis factor-α (TNF-α), transforming growth factor-β1 (TGF-β1) and aquaporin 4 in the brain tissues were detected using Western blotting at different time points after GMH. **Results** The neonatal rats with GMH showed significantly up-regulated expression of C3 and C3aR around the cerebral ventricles and increased expression of IL-1β, IL-6, TNF-α and TGF-β1 in the brain, presenting also with obvious lateral ventricle

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(81601356)、面上项目(81571116);军事医学科技创新计划(SWH2017YBXM-19)

[**通信作者**] 朱 刚,E-mail: gangzhu6666@sina.com

dilation, compression of the cortex and hippocampus, and impairment of the learning and memory functions. Treatment of the rats with C3aRA obviously decreased C3 and C3aR expression, alleviated hydrocephalus, improved the neurological deficits, and reduced the expression of the inflammatory factors in the brain. GMH caused obvious ectopic expression of aquaporins 4 and increased its expression level on the astrocytes, and C3aRA treatment significantly improved the abnormal expression of aquaporins 4. **Conclusion** GMH causes the astrocytes to up-regulate and release C3, which binds to C3aR on the microglia to promote inflammation and aggravate hydrocephalus. The ectopic expression of aquaporin 4 in astrocytes may play an important role in the occurrence of hydrocephalus following GMH.

[**Key words**] germinal matrix hemorrhage; hydrocephalus; C3/C3aR; astrocytes; microglias; aquaporin 4; rats, newborn

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81601356), the General Program of National Natural Science Foundation of China(81571116) and the Innovation Military Medical Science and Technology (SWH2017YBXM-19). Corresponding author: ZHU Gang, E-mail: gangzhu6666@sina.com

脑生发基质出血(germinal matrix hemorrhage, GMH)是指未成熟脑组织室管膜下区或脑室周围区域的胚性出血[1]。早产儿(<37 周)和低体质量儿(<1 500 g)GMH 发生率约为 3.5‰,是新生儿严重的神经系统疾病之一。出血性脑积水(post-hemorrhagic hydrocephalus,PHH)是新生儿 GMH 最常见、最严重的并发症,可引起严重的、长期的精神运动和认知功能障碍,预后不良[2]。目前,脑室分流术是脑积水的主要临床治疗方法,但其治疗效果还远不能令人满意[3]。炎症在 PHH 中起重要作用[4]。GMH 后炎症因子,如 IL-1β、IL-6、TNF-α、TGF-β1 上调,促进神经胶质增生,引起血脑屏障(blood-brain barrier,BBB)损伤和蛛网膜下腔广泛纤维化,增加水通道蛋白 4(aquaporin 4, AQP4)表达,最终加重脑积水[5-6]。作为目前发现的最强促炎因子,脑卒中后,补体 C3 能够促进小胶质细胞活化和中性粒细胞浸润,从而增强炎性反应,加重脑水肿,预后不良[7]。另外,补体 C3 在正常压力脑积水患者的脑脊液中被发现激活[8]。众多权威研究表明:脑组织中 C3 主要表达于星形胶质细胞,C3aR 主要表达于小胶质细胞[9-10]。然而,GMH 后 C3 是否上调?星形胶质细胞表达的 C3 与小胶质细胞表面的 C3aR 的交互作用是否加重 PHH?目前尚不清楚。本研究以新生大鼠 GMH 模型为基础,探索补体 C3/C3aR 信号在 GMH 后脑积水的作用,希望能为 GMH 后脑积水提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生第 7 天 SD 大鼠由陆军军医大学实验动物中心提供的大鼠繁殖获取,体质量为 15~17 g。实验均按照陆军军医大学动物伦理委员会批准的动物保护指南实施。每组使用同等数量的雄性和雌性幼鼠。除 6 只大鼠在注射胶原酶(Ⅶ-S 型)后 24 h 内死亡外,其余 144 只被用于本研究。

1.2 GMH 模型建立和实验分组

GMH 模型由胶原酶(Ⅶ-S 型)注射到大脑右侧基底神经节诱导[11]。用 3%异氟醚麻醉动物后,俯卧位固定于立体定位仪。头皮区域消毒,暴露前囟。以前囟为参照点向前 1.8 mm、向右 1.5 mm 在颅骨钻孔(1 mm),直至硬脑膜。Hamilton 微量注射泵吸入 3 个单位胶原酶(Ⅶ-S 型,美国 Sigma 公司),然后以 1 mm/min 的速度插入硬脑膜下 2.8 mm 深,以 0.05 μL/min 的速度推注胶原酶。注射后保持针头在位 10 min,以防止药物返流。取出针后,用骨蜡封住钻孔,缝合切口,37 ℃复温箱复温后放回母鼠身边。

为检测 C3aR 拮抗剂(complement C3 receptor antagonist,C3aRA)的效果,将新生大鼠按随机数字表法分为假手术组、安慰剂组和 C3aRA 组,每组每个时间点 6 只。C3aRA 组于 GMH 后 6 h 开始腹腔注射 1 mg/kg C3aRA(Merck Millipore 公司,德国,SB 290157-CAS 1140525-25-2-Calbiochem),每日 1 次,连续 1 周[12],安慰剂组接受等量的磷酸盐缓冲液(PBS),假手术组动物只进针不给胶原酶。

1.3 免疫荧光染色和细胞计数

麻醉大鼠后,先用 0.9%生理盐水心脏灌注,接着用 4%多聚甲醛灌注。剥离脑组织并浸泡于 4%多聚甲醛,4 ℃条件固定 24 h,转入 30%蔗糖溶液脱水 3~5 d。冰冻切片机将脱水后的脑组织沿冠状位切成层厚 30 μm 的切片,放入预先配好的防冻液中,置于

-20 ℃存储备用。游离切片在 PBS 中广泛洗涤后,用 5%牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h,然后用如下一抗孵育,4 ℃过夜:兔来源 Iba-1 抗体(Wako 公司,日本,019-19741)与小鼠来源 C3aR 抗体(Thermo Fisher 公司,美国,MA5-17473)共标;鸡来源 GFAP 抗体(Abcam 公司,美国,ab81355)与 C3aR 抗体双标;GFAP 抗体与兔来源 AQP4 抗体(Abcam 公司,ab81355)共标。第 2 天用 PBS 清洗切片,对应二抗室温下孵育 1 h。最后用 DAPI 对细胞核进行染色。共聚焦荧光显微镜(Zeiss,LSM780)观察染好的切片,每个随机视野统计细胞数(荧光显微镜 ×200)。

1.4 Western blot 分析

取大鼠各时间点脑室周围组织 100 mg,在加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液中匀浆(13 000 r/min,20 min)。收集上清液,然后用紫外分光光度法测蛋白浓度。提取蛋白按比例加入上样缓冲液,在 95 ℃条件下煮 5 min,分装后-80 ℃储存备用。将 30 μg 蛋白样品用移液枪注入 SDS-PAGE 凝胶孔,电泳后转移到聚偏氟乙烯膜,然后用 5%的脱脂奶粉封闭 1 h。封闭后的膜分别用如下一抗孵育,4 ℃摇床过夜:鸡来源 GFAP 抗体(Abcam 公司,ab4674);兔来源 C3 抗体(Abcam 公司,ab200999);小鼠来源 C3aR 抗体(Thermo Fisher 公司,MA5-17473);兔来源 AQP4 抗体(Abcam 公司,ab81355);兔来源 IL-1β 抗体(Gene Tex 公司,美国,55675);小鼠来源 IL-6 抗体(Santa Cruz 公司,美国,sc-57315);兔来源 TNF-α 抗体(Affinity 公司,美国,AF7014);兔来源 TGF-β1 抗体(Abcam 公司,ab92486)。洗膜缓冲液(TBST)洗膜后 37℃条件下用对应的辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗孵育 1 h,TBST 再洗膜 3 次。ECL+化学发光试剂盒(Thermo Fisher 公司,32106)显影目的条带。Image Lab 软件对条带进行密度定量。

1.5 MRI 检查

GMH 后 1 d 和 28 d 的大鼠麻醉后俯卧位置于 MRI 球管中,7.0 T/200 mm Varian 核磁共振扫描仪(Bruker 公司,美国)中,采用 T_2 快速自旋回波序列(TR/TE = 3 000/45 ms)扫描。扫描视野为 3.5 cm×3.5 cm,矩阵是 256×256。取 11 个冠状面切片(厚度 1.0 mm)覆盖整个侧脑室轴。将血肿、侧脑室和海马区勾画出来,用 ImageJ 软件测量其面积。所有切片的面积和乘以层扫厚度计算体积[13]。每张包含侧脑室的 MRI 照片中,测量 6 个固定位置软脑膜表面到皮质下白质的距离,得到平均值,即皮质厚度。图像分析均采用双盲法观察。

1.6 水迷宫实验

大鼠在 GMH 后第 23~28 天接受 Morris 水迷宫测试,以评估学习和记忆功能。从测试前 5 d 起,每天 2 次,将大鼠放在 1 个水迷宫池(深 50 cm,直径 200 cm)装满水(25 ℃),训练 120 s 内从 4 个象限的任意起始点中找到水下平台(直径 15 cm)。跟踪监测,记录找到平台前的逃避潜伏期时间和距离。测试当天撤掉水下平台,进行 120 s 探针实验,每只大鼠测试 2 次,统计其穿越平台次数和目标象限内的时间和距离百分比。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组织学染色和细胞计数由 2 名不知分组及给药情况的研究人员进行。采用单因素方差分析或独立样本 t 检验,然后进行 post hoc 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

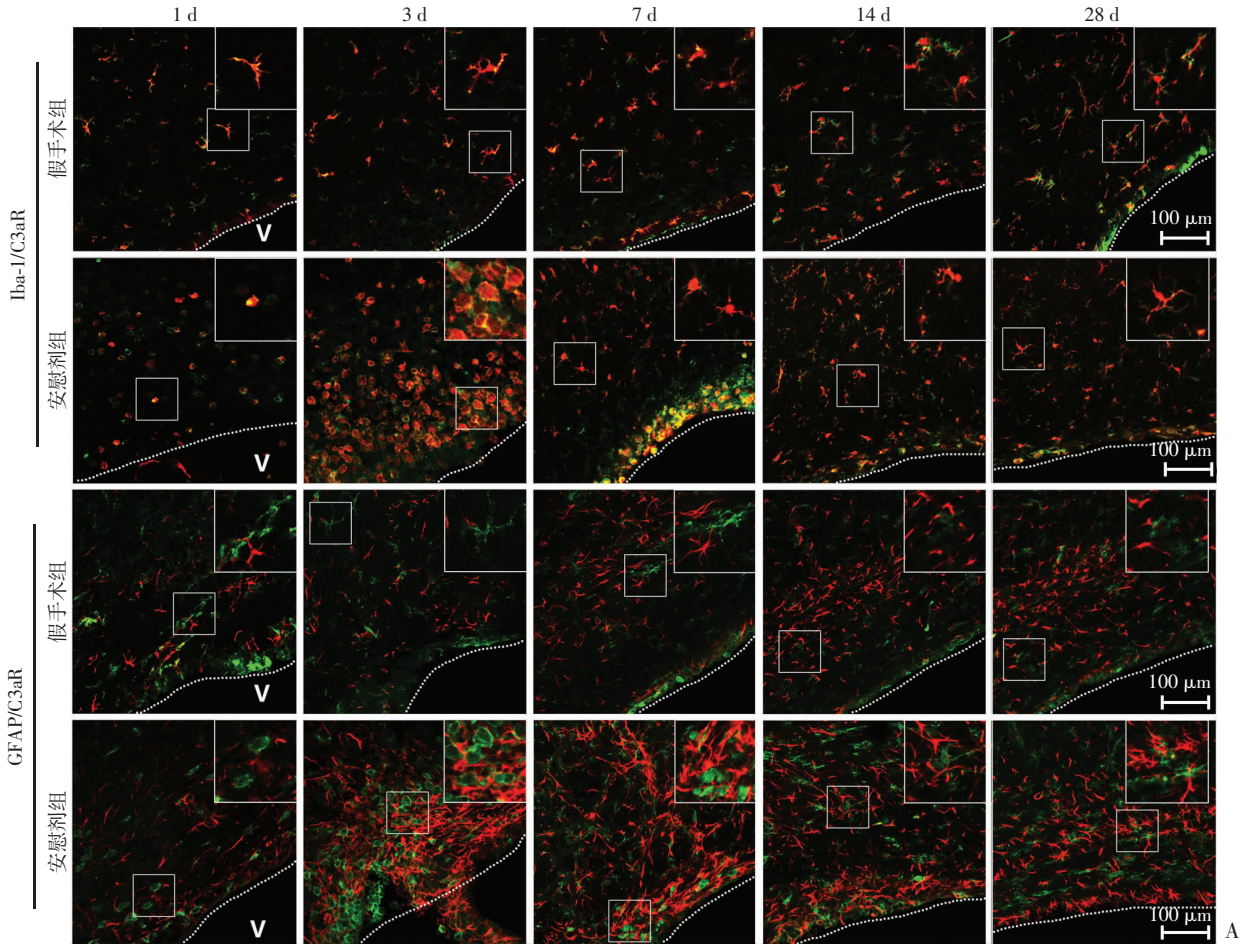
2 结果

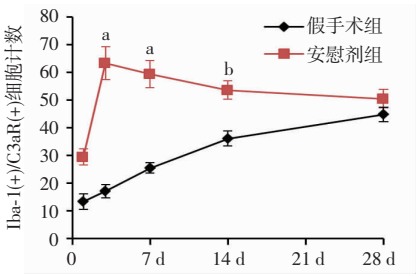
2.1 新生大鼠 GMH 后 3 d 脑室周围补体 C3、C3aR 表达上调

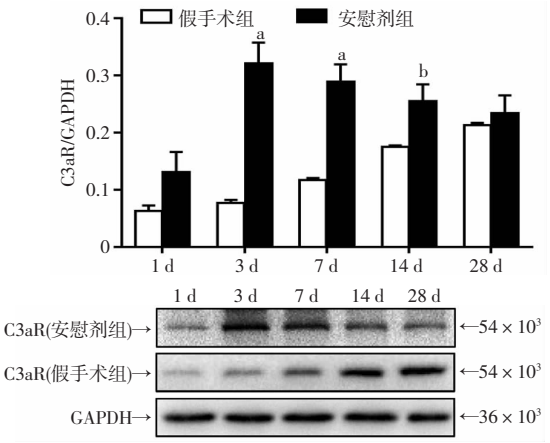
免疫荧光染色结果显示:GMH 后 3 d 脑室周围小胶质细胞和星形胶质细胞被激活,数量显著增加。C3aR 主要表达在小胶质细胞表面,但几乎不与 GFAP 共标(图 1A)。统计 C3aR/Iba-1 共标记细胞的数量,发现 GMH 后,C3aR/Iba-1 共标细胞数量显著增加,3 d 达到高峰,并逐渐回归,28 d 时与假手术组差异无统计学意义(图 1B)。C3aR 的 Western blot 检测结果与免疫荧光结果一致(图 1C)。在不同时间点对 C3 进行 Western blot 检测,结果显示:C3 在 GMH 后显著上调,在 3 d 达到峰值,然后缓慢下降,28 d 时恢复(图 1D)。说明 GMH 后补体 C3 和 C3aR 明显上调,在 3 d 达到高峰。

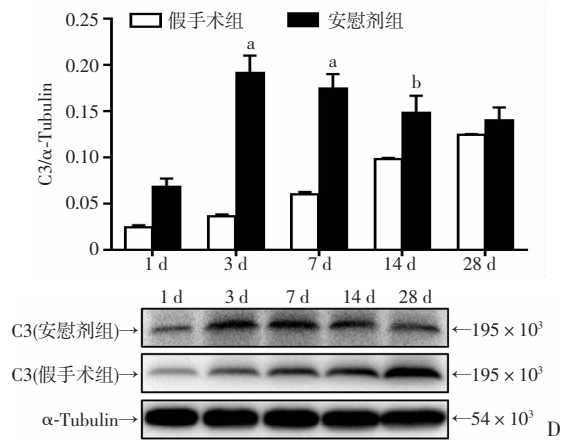
2.2 C3aRA 能够减轻新生大鼠 GMH 后脑积水

GMH 后 1 d,安慰剂组和 C3aRA 组血肿体积基本一致,差异无统计学意义(图 2A、B),3 组动物的侧脑室均未见扩张。GMH 后 28 d,C3aRA 组侧脑室扩张程度明显小于安慰剂组($P<0.01$,图 2C)。C3aRA 干预可减轻脑积水对海马体积($P<0.01$,图 2D)和皮层厚度($P<0.01$,图 2E)的压迫。



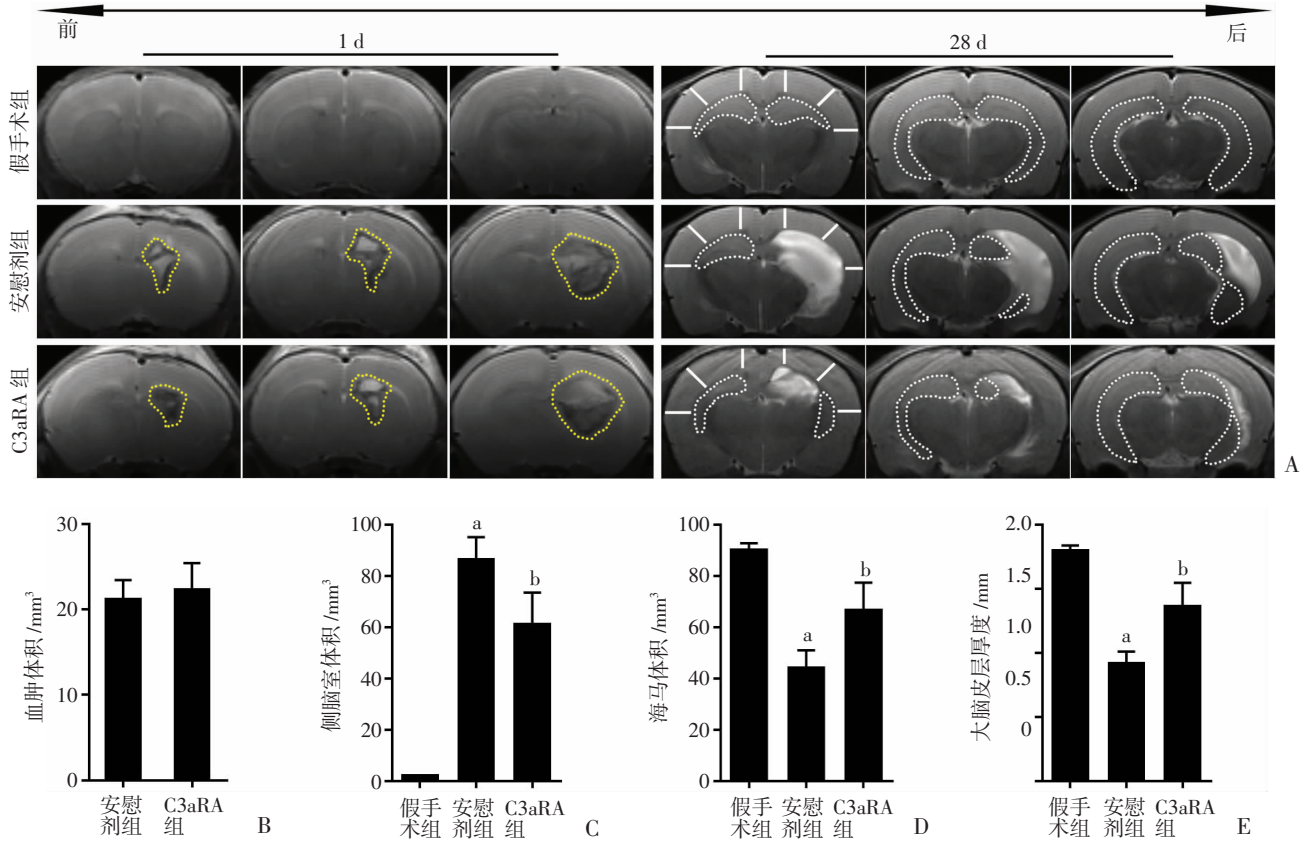






A：免疫荧光染色；B：细胞计数；C：Western blot 检测 C3aR 表达；D：Western blot 检测 C3 表达　a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与假手术组比较；V 示侧脑室

图 1　补体 C3 和 C3aR 在新生大鼠 GMH 后脑室周围的表达趋势



A:MRI 表现 T_2WI 图像(冠状位),黄色虚线表示血肿,白色虚线表示海马,白色实线表示皮层厚度;B:血肿体积;C:侧脑室体积;D:海马体积;E:大脑皮层厚度 a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与安慰剂组比较

图 2 C3aRA 对新生大鼠 GMH 后脑积水的影响

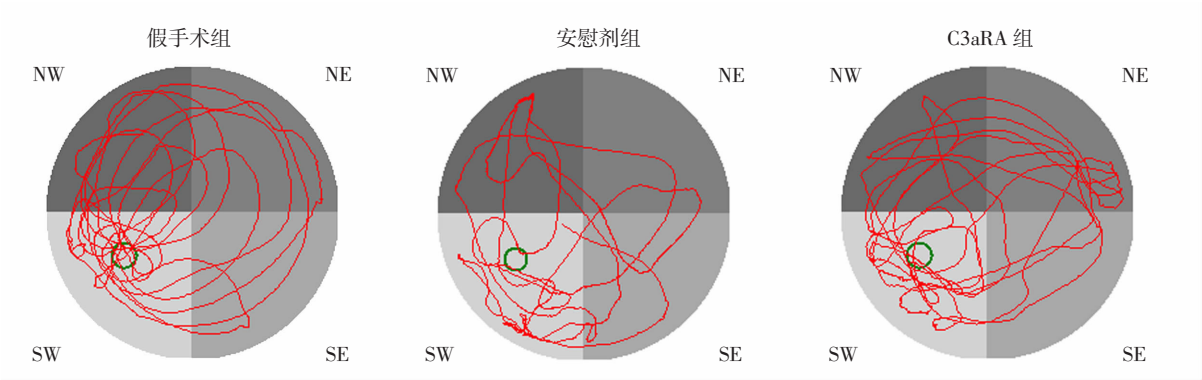
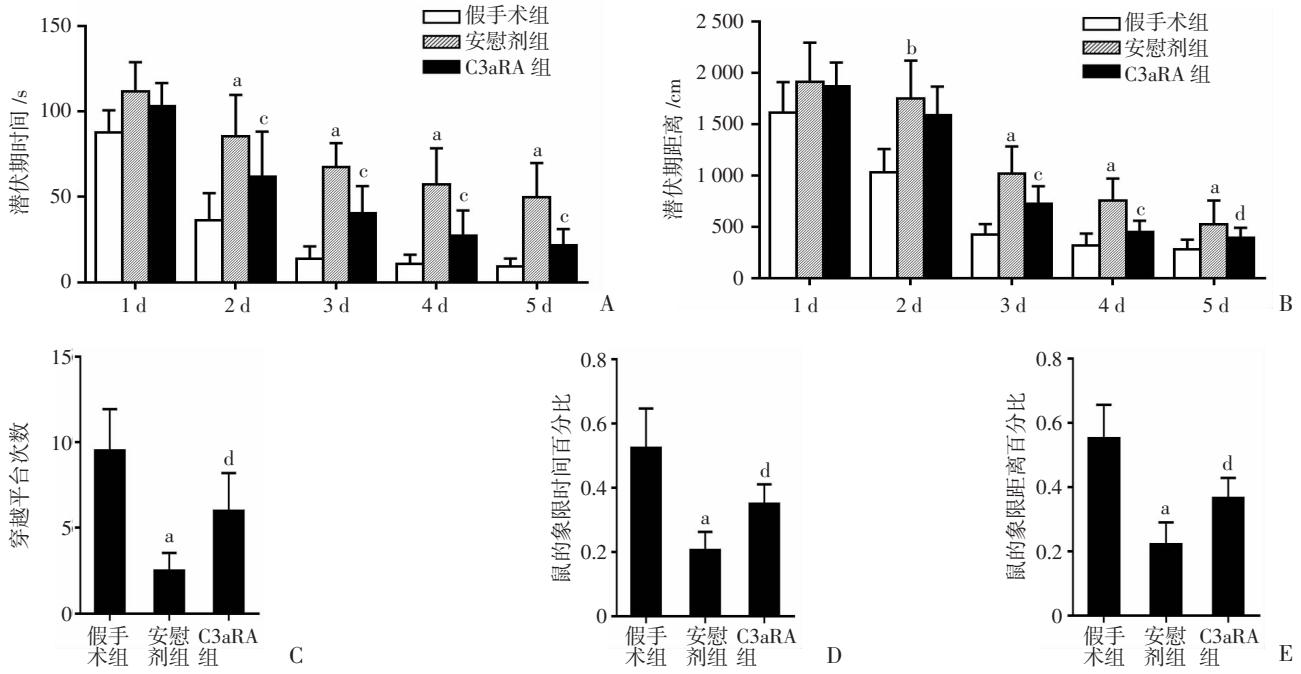


图 3 各组新生大鼠 Morris 水迷宫实验

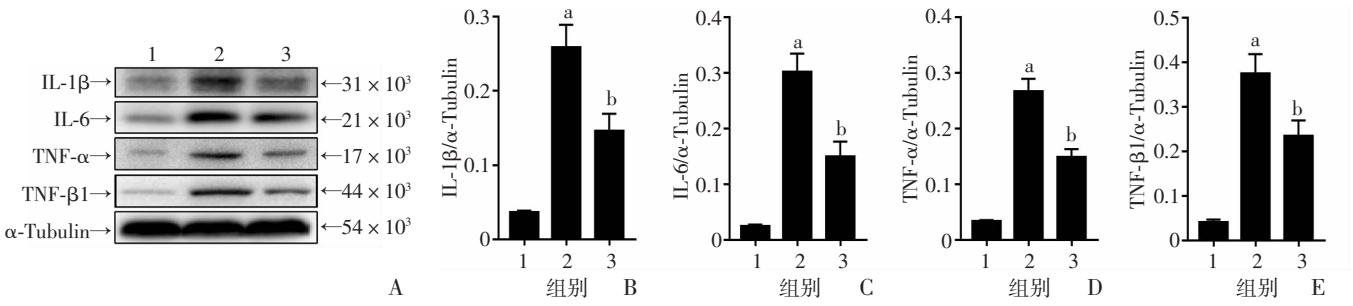
2.3 C3aRA 能改善 GMH 新生大鼠的认知功能障碍

Morris 水迷宫实验结果显示:在连续 5 d 的学习中,C3aRA 治疗显著降低了潜伏期的时间和距离(图 3,图 4A、B),说明 C3aRA 可以减轻 GMH 引起的学习障碍。探针试验中,C3aRA 组比安慰剂组在目标象限穿越平台的次数更多($P<0.05$,图 4C),花费时间更多($P<0.05$,图 4D),游泳距离更长($P<0.05$,图 4E)。表明 C3aR 拮抗剂能够改善 GMH 诱导的神经功能缺陷。



A:潜伏期时间;B:潜伏期距离;C:穿越平台次数;D:目的象限时间百分比;E:目的象限距离百分比 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与假手术组比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.05$,与安慰剂组比较

图 4 C3aRA 对新生大鼠 GMH 后认知功能的影响



A:Wester blot 检测炎症因子表达;B:半定量分析 1:假手术组;2:安慰剂组;3:C3aRA 组;a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与安慰剂组比较

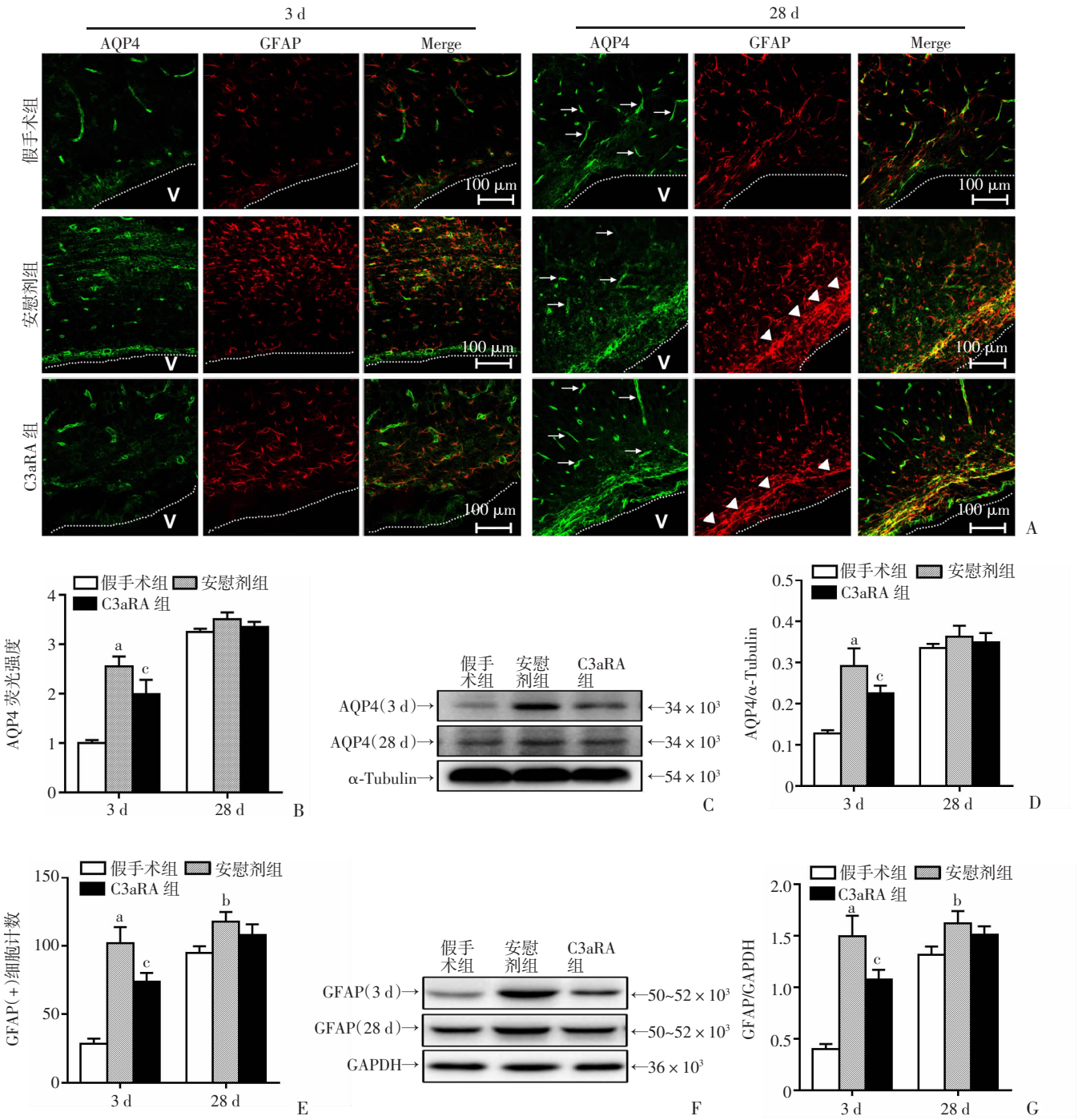
图 5 C3aRA 对新生大鼠 GMH 后急性炎症的影响

2.4 C3aRA 可以减轻新生大鼠 GMH 后脑室周围的神经炎症

Western blot 结果显示:与安慰剂组比较,GMH 后假手术组脑室周围 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 TGF-β1 的表达明显增加($P<0.01$),C3aRA 能够减少这些炎症因子表达($P<0.01$,图 5)。

2.5 C3aRA 可以降低 GMH 后急性期 AQP4 的表达,抑制 GMH 后慢性期 AQP4 异位表达

免疫荧光结果显示:GMH 后 3 d,脑室周围星形胶质细胞和 AQP4 表达明显增加($P<0.01$),C3aRA 有效抑制了 AQP4($P<0.05$,图 6A、B)和星形胶质细胞($P<0.05$,图 6A、E)表达增加。Western blot 检测结果显示了相似的结果(图 6C、D、F、G)。GMH 后第 28 天,3 组间 AQP4 表达差异无统计学意义(图 6A~D)。星形细胞增多、胶质瘢痕、AQP4 异位表达导致脑脊液循环受阻,可能在 GMH 后脑积水形成中发挥重要作用。GMH 后 28 d 时脑室周围可见明显的星形细胞增多症、胶质瘢痕和 AQP4 表达错位,即血管周围 AQP4 表达明显降低,而非血管区域 AQP4 表达增加,C3aRA 可以减少上述改变。



A:免疫荧光染色 ↑示血管壁 AQP4,▲示胶质瘢痕;B 荧光强度分析;C:Western blot 检测 AQP4 表达;D:AQP4 表达半定量分析;E:GFAP 细胞计数;F:Western blot 检测 GFAP 表达;G:GFAP 表达半定量分析 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,与安慰剂组比较;V 示侧脑室

图 6 C3aRA 对新生大鼠 GMH 后 3、28 d 时脑室周围星形胶质细胞增殖及其表达 AQP4 的影响

3 讨论

GMH 患儿常出现脑瘫、认知障碍、脑积水等严重并发症,其中 PHH 最常见,且最严重[2]。脑室分流术是目前临床上治疗脑积水的主要方法。但由于脑室分流术的频繁阻塞和感染,脑积水的复发率较高[14],常需再次手术。其他方法,如连续腰椎穿刺、脑室外引流、脑室内接入装置、脑室帽状腱膜下分流术、内镜下脉络膜丛凝固术等治疗效果均不佳[15]。因此,迫切需要一种非侵入性治疗方法来改善 GMH 患者的长期生活质量。

炎症反应与 PHH 形成密切相关。文献[16-17]报道 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 能够增加反应性星形胶质细胞增生,过量的 TGF-β 可直接导致 PHH[18]。本研究发现 C3aRA 能显著降低 GMH 后脑室周围炎性因子的表达,这或许可以解释 GMH 后 C3aRA 干预可减轻脑积水。补体 C3 作为目前公认的最有效的促炎因子,能够促进 IL-1、IL-6、TNF-α 等促炎因子的表达,诱导中性粒细胞浸润,导致脑出血急性期促炎反应加重[19]。另外,补体 C3 在常压脑积水患者的脑脊液中被发现激活[13],提示补体 C3 可能参与 PHH 的形成和发展。有研究报道 C3 和 C3aR 分别在星形胶质细胞和小胶质细胞中表达[9-10]。LIAN 等[9]研究发现阿尔兹海默症模型小鼠中星形胶质细胞和小胶质细胞通过 C3/C3aR 信号交互作用损害了小胶质细胞吞噬 β-淀粉样蛋白(Aβ)的能力。本研究结果表明:GMH 后小胶质细胞 C3aR 表达增加与星形胶质细胞 C3 表达上调趋势一致,提示星形胶质细胞-小胶质细胞通过 C3/C3aR 信号交互作用可能在 PHH 中发挥重要作用,需要进一步研究。

AQP4 是脑内最丰富的水通道蛋白,主要表达于星形胶质细胞足突,参与脑脊液循环调节[20-21]。在 GMH 后急性期,炎性因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 通过 NF-κB 或 MAPK 信号通路调控 AQP4 的表达[22-23]。AQP4 表达增加可促进炎症反应,加重脑水肿[24]。在 GMH 后慢性期,反应性星形胶质细胞增多可导致 AQP4 异位表达(从足突转移到整个胶质细胞膜),组织液清除受阻,脑脊液潴留,脑积水形成[25]。本研究中,GMH 后 3 d,AQP4 在脑室周围星形胶质细胞中的表达显著增加,28 d 时 AQP4 的分布发生改变,这与前期研究一致[26]。C3aRA 干预显著降低了 GMH 后急性期(第 3 天)星形胶质细胞中 AQP4 的表达,降低了 AQP4 慢性期(第 28 天)异位表达,可能在减轻 GMH 后脑积水中发挥重要作用。

本研究结果表明:脑室周围星形胶质细胞-小胶质细胞交互作用是 GMH 后脑积水发生、发展的关键过程;C3/C3aR 信号是星形胶质细胞和小胶质细胞之间交互作用的一个新的“桥梁”;C3aR 拮抗剂可抑制 C3/C3aR 信号,改善 GMH 后脑积水及神经功能障碍。本研究为新生儿 GMH 后脑积水的治疗提供了新的靶点和治疗策略。

参考文献:

[1] BALLABH P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease[J]. Pediatr Res, 2010, 67(1): 1-8. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3181c1b176.

[2] ELLENBOGEN J R, WAQAR M, PETTORINI B. Management of post-haemorrhagic hydrocephalus in premature infants[J]. J Clin Neurosci, 2016, 31: 30-34. DOI: 10.1016/j.jocn.2016.02.026.

[3] WU Y, GREEN N L, WRENSCH M R, *et al*. Ventriculoperitoneal shunt complications in California: 1990 to 2000[J]. Neurosurgery, 2007, 61(3): 557-562; discussion 562-3. DOI: 10.1227/01.NEU.0000290903.07943.AF.

[4] KARIMY J K, ZHANG J W, KURLAND D B, *et al*. Inflammation-dependent cerebrospinal fluid hypersecretion by the choroid plexus epithelium in posthemorrhagic hydrocephalus[J]. Nat Med, 2017, 23(8): 997-1003. DOI: 10.1038/nm.4361.

[5] GIMSA U, MITCHISON N A, BRUNNER-WEINZIERL M C. Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 320519. DOI: 10.1155/2013/320519.

[6] WANG C, YAN M Y, JIANG H, *et al*. Mechanism of aquaporin 4 (AQP4) up-regulation in rat cerebral edema under hypobaric hypoxia and the preventative effect of puerarin[J]. Life Sci, 2018, 193: 270-281. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.10.021.

[7] YANG S X, NAKAMURA T, HUA Y, *et al*. The role of complement C3 in intracerebral hemorrhage-induced brain injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(12): 1490-1495. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600305.

[8] SEELE J, KIRSCHFINK M, DJUKIC M, *et al*. Cisternolumbar gradient of complement fractions in geriatric patients with suspected normal pressure hydrocephalus[J]. Clin Chim Acta, 2018, 486: 1-7. DOI: 10.1016/j.cca.2018.07.008.

[9] LIAN H, LITVINCHUK A, CHIANG A C, *et al*. Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates amyloid pathology in mouse models of Alzheimer's disease[J]. J Neurosci, 2016, 36(2): 577-589. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016.

[10] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, *et al*. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. Nature, 2017, 541(7638): 481-487. DOI: 10.1038/nature21029.

[11] TANG J, CHEN Q W, GUO J, *et al*. Minocycline attenuates neonatal germinal-matrix-hemorrhage-induced neuroinflammation and brain edema by activating cannabinoid receptor 2[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(3): 1935-1948. DOI: 10.1007/s12035-015-9154-x.

[12] RYNKOWSKI M A, KIM G H, GARRETT M C, *et al*. C3a receptor antagonist attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(1): 98-107. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.95.

[13] OKAUCHI M, HUA Y, KEEP R F, *et al*. Effects of deferoxamine on intracerebral hemorrhage-induced brain injury in aged rats[J]. Stroke, 2009, 40(5): 1858-1863. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.535765.

[14] KAHLE K T, KULKARNI A V, LIMBRICK D D Jr, *et al*. Hydrocephalus in children [J]. Lancet, 2016, 387(10020): 788-799. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60694-8.

[15] TULLY H M, DOBYNS W B. Infantile hydrocephalus: a review of epidemiology, classification and causes[J]. Eur J Med Genet, 2014, 57(8): 359-368. DOI: 10.1016/j.ejmg.2014.06.002.

[16] GIMSA U, MITCHISON N A, BRUNNER-WEINZIERL M C. Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 320519. DOI: 10.1155/2013/320519.

[17] FUKUDA S, ABEMATSU M, MORI H, *et al*. Potentiation of astrogliogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-smad signaling in neural stem cells [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(13): 4931-4937. DOI: 10.1128/MCB.02435-06.

[18] LIPINA R, REGULI S, NOVÁCKOVÁ L, *et al*. Relation between TGF-beta 1 levels in cerebrospinal fluid and ETV outcome in premature newborns with posthemorrhagic hydrocephalus[J]. Childs Nerv Syst, 2010, 26(3): 333-341. DOI: 10.1007/s00381-009-1011-7.

[19] YANG S X, NAKAMURA T, HUA Y, *et al*. The role of complement C3 in intracerebral hemorrhage-induced brain injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(12): 1490-1495. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600305.

[20] YASUI M. Roles of aquaporins in the central nervous system [J]. Masui, 2008, 57(Suppl): S28-S33.

[21] MCALLISTER J P 2nd, MILLER J M. Aquaporin 4 and hydrocephalus[J]. J Neurosurg, 2006, 105(6 Suppl): 457-458. DOI: 10.3171/ped.2006.105.6.457.

[22] ASAI H, KAKITA H, AOYAMA M, *et al*. Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced aquaporin-4 expression in cultured astrocyte[J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(3): 393-400. DOI: 10.1007/s10571-013-9905-z.

[23] WANG C, YAN M Y, JIANG H, *et al*. Mechanism of aquaporin 4 (AQP 4) up-regulation in rat cerebral edema under hypobaric hypoxia and the preventative effect of puerarin [J]. Life Sci, 2018, 193: 270-281. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.10.021.

[24] FUKUDA A M, BADAUT J. Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation [J]. J Neuroinflamm, 2012, 9: 279. DOI: 10.1186/1742-2094-9-279.

[25] 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. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2009.04.070.

[26] DING Y, ZHANG T Y, WU G Y, *et al*. Astrogliosis inhibition attenuates hydrocephalus by increasing cerebrospinal fluid reabsorption through the glymphatic system after germinal matrix hemorrhage[J]. Exp Neurol, 2019, 320: 113003. DOI: 10.1016/j.expneurol.2019.113003.

(**收稿**:2019-09-15;**修回**:2019-10-11)

(编辑 黄 超)