大鼠缺氧缺血脑组织 AQP-4 蛋白和 AQP-4mRNA 表达的研究

付学锋[1],张新宇[1],万东君[1],林 宏[2],李柱一[2] (1. 兰州军区兰州总医院干三科,甘肃 兰州 730050;2. 第四军医大学唐都医院神经内科,陕西 西安 710038)

[摘 要] **目的** 探讨 SD 大鼠缺氧缺血过程中脑组织水通道蛋白-4(aquaporin-4, AQP-4)和 AQP-4mRNA 的表达情况及意义。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 60 只,分为缺氧缺血性脑损伤(HIBD)组和对照组。HIBD 组经右侧颈总动脉结扎后建立模型,对照组仅行假手术,不结扎颈总动脉缺氧。HIBD 组和对照组于模型制成后 0 h、6 h、1 d、2 d 和 3 d 分别处死动物,对两组动物脑组织进行病理学观察,并检测脑组织中 AQP-4 蛋白和 AQP-4mRNA 表达。**结果** HIBD 组在模型建立后 6 h、1 d、2 d 和 3 d 均出现脑水肿并发生组织病学改变,随时间延长病理改变加重。与对照组比较,HIBD 组脑组织 AQP-4 蛋白和 AQP-4mRNA 表达从 HIBD 后 6 h 即开始下降,2 d 内下降至最低,3 d 出现恢复。**结论** AQP-4 可能参与了大鼠脑内渗透平衡的维持,AQP-4 表达下降可能与 HIBD 脑组织水肿和病理学变化的发生发展相关。

[关键词] 脑损伤;脑水肿;水通道蛋白-4;缺血

[中图分类号] R651.15;R743.31 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)06-0601-03

The expression of AQP-4 protein and AQP-4 mRNA in the brain tissues of rats with HIBD

FU Xue-feng, ZHANG Xin-yu, WAN Dong-jun, LIN Hong, LI Zhu-yi (Department of Elderly Patient, Lanzhou Military General Hospital, Lanzhou Gansu 730050, China)

Abstract: **Objective** To study the expressions of AQP-4 protein and AQP-4mRNA in brain tissue for SD rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD), and discuss the significance. **Methods** 60 SD rats were divided into HIBD group and control group. HIBD group were subjected to the ligation of right carotid artery (ischemia), then they were put into a box full for an hour (hypoxia). The SD rats with HIBD model were divided into 5 groups ($n=6$), including 0 h, 6 h, 1 d, 2 d and 3 d after establishment of HIBD. The normal control groups were also divided into 5 groups the same as HIBD groups. The Western Blot was used to detect the AQP-4 protein expression and RT-PCR was used to detect the AQP-4 mRNA expression in the brain tissue of both HIBD and the control groups. **Results** The brain edema and infarction was present pathologically in brain tissues in HIBD groups after 6 h, 1 d, 2 d and 3 d of HIBD and become more severe with time going compared with that in the control groups. The expressions of AQP-4 protein and mRNA were significantly decreased in HIBD groups during the period of 6 h to 3 d compared with the control groups in the SD brain tissues. **Conclusion** The results show that the decreased expression of AQP-4 is associated with brain edema and brain damage in SD rats with HIBD, and AQP-4 may play an important role in such brain damage conditions.

Keywords: HIBD; brain edema; AQP-4; ischemia

水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是细胞屏障中膜转移通道的蛋白质,溶于水并在细胞和它周围环境间运动。脑水肿是围生期缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)的病理生理发生过程中最基本和重要的改变,而水通道蛋白-4(AQP-4)在组织器官水肿发生的分子机制中发挥重要作用[1-3]。我们用大鼠建立 HIBD 动物模型,检测大鼠脑组织AQP-4 蛋白和 AQP-4mRNA 表达情况,以探讨 AQP-4 在 HIBD 脑水肿病理生理发生发展中的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

选用体质量为 210 ~ 240 g 健康雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为 HIBD 模型组和对照组,每组 30 只。HIBD 组采用手术方法结扎右颈总动脉进行缺氧处理,对照组不结扎右颈总动脉,其余同 HIBD 组。于术后 0 h、6 h、1 d、2 d 和 3 d 时间点,用 10% 水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉动物,开胸后,用注射器于左心室注入生理盐水 10 mL,同时剪断颈外静脉直至流出液变清,再注入 4% 多聚甲醛(pH = 7.4)10 mL 后,立即断头取出全脑置于 4% 多聚甲醛固定 7 d 后备用。

1.2 方法

将固定后的鼠脑从垂体水平沿冠状位分成前后两部分并

[收稿日期] 2012-06-04 [修回日期] 2012-06-19

用全自动脱水机脱水,石蜡包埋后进行冠状位切片,经 HE 染色后进行光镜观察病理变化。于 0 h、6 h、1 d、2 d 和 3 d 分别取对照组和 HIBD 脑组织并进行适当改良提取蛋白备用[4]。采用 Western Blot 方法测定蛋白,先进行蛋白质单向 SDS 凝胶电泳,然后进行图像采集,测定其光密度(IOD)值。目的基因 cDNA 片断的扩增:引物由上海生物工程公司合成并经质量检测,采用上海申能博彩公司的 Two-Step RT-PCR kit,在 PE-9600 PCR 仪上进行目的基因扩增,得到模板 cDNA。荧光定量 PCR 检测:制备标准动力学曲线确定目的基因在脑组织中的表达,检测待测样品的 Ct 值。

1.3 统计学处理

分别用 IOD 值和 Ct 值作为 AQP-4 蛋白和 AQP-4mRNA 表达的参数进行统计分析。数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 13.0 软件进行分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理变化

开颅后,可见 HIBD 组的右侧脑组织向左膨出,并有肿胀,脑回增宽和脑沟变浅,而对照组无变化。光镜下观察结果见图 1。HIBD 组 6 h ~ 1 d 可见少量神经元胞体肿胀,少量胶质细胞增生,细胞间隙增宽,2 ~ 3 d 上述病变更加明显,同时有细胞排列杂乱,神经元变性,一些神经细胞核固缩且有强嗜碱性,胞质红染加深,胶质细胞明显增生,在 3 d 时可见明显梗死灶。

2.2 蛋白表达

与对照组比较,HIBD 组脑组织 0 h 时 AQP-4 蛋白表达无变化,6 h 后开始逐渐下降,其中 2 d 下降明显,3 d 后开始回升。HIBD 在 6 h、1 d、2 d 和 3 d 各时间点 IOD 值均较对照组低,结果见表 1。

2.3 AQP-4mRNA 表达

常规 PCR 测定 AQP4mRNA 扩增产物,脑组织中各时间点 AQP-4mRNA 表达结果见表 2,结果显示 0 h 变化不明显,6 h、1 ~ 3 d 均较对照组低,2 d 时最低,3 d 开始回升。

3 讨论

脑创伤、脑肿瘤和脑缺血继发性脑水肿的病理生理过程均有 AQP-4 参与[5-7]。无 AQP-4 基因大鼠脑缺血引起的脑水肿不明显,提示抑制 AQP-4 表达可能达到治疗脑水肿的目的[6-9]。脑组织周围的缺血缺氧可破坏血脑屏障,导致细胞外大量兴奋性谷氨酸的积累,从而激活谷氨酸受体引起大量 Ca_2^+ 的细胞内流,促使 Ca_2^+ 敏感酶活性增加,产生大量自由基导致线粒体损

a:大鼠脑缺血缺氧后 6 h; b:大鼠脑缺血缺氧后 1 d;c:大鼠脑缺血缺氧后 2 d;d:大鼠脑缺血缺氧后 3 d

图 1 HIBD 不同时间 AQP-4 表达的免疫组化染色(×400)

表 1 脑组织 AQP-4 蛋白条带的 IOD 值($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	AQP-4(IOD)				
	0 h	6 h	1 d	2 d	3 d
HIBD 组	1 378 ± 131	1 166 ± 126 *	997 ± 135 *	876 ± 145 *	1 012 ± 132 *
对照组	1 406 ± 149	1 418 ± 138	1 397 ± 129	1 419 ± 125	1 409 ± 137

*:与对照组比较,$P < 0.01$

表 2 脑组织 AQP-4mRNA 表达($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	0 h	6 h	1 d	2 d	3 d
HIBD 组	22.91 ± 5.49	11.03 ± 4.18 *	6.83 ± 2.34 *	4.33 ± 1.87 *	7.68 ± 2.84 *
对照组	23.06 ± 6.53	23.20 ± 6.34	23.06 ± 6.74	23.66 ± 7.02	23.19 ± 7.48

*:与对照组比较,$P < 0.01$

伤,细胞发生凋亡或坏死[10]。艾芬地尔和硫酸镁可减轻谷氨酸对血脑屏障的破坏,下调 AQP-4 的表达,使局灶性缺血和创伤性脑损伤面积减少,减轻脑水肿,从而认为减轻水肿可能是通过下调 AQP-4 表达实现的。

AQP-4 在保持中枢神经系统水、电解质平衡中起重要作用[8-10]。我们发现 HIBD 早期 AQP-4 表达减少,3 d 后 AQP-4 表达出现回升趋势,这一过程同时伴有脑损伤、脑水肿改变,提示大鼠 HIBD 脑水肿与脑组织中 AQP-4 表达有一定关系,AQP-4 可能对 HIBD 脑水肿的发生发展起调控作用[1-3]。脑组织缺氧缺血时 AQP-4 表达降低,多数研究认为 AQP-4 可能通过调节依赖蛋白激酶 C 和 A(PKC,PKA)而发挥作用。脑组织缺血缺氧时,通过氧化磷酸化和激活 PKC 和 PKA 使 AQP-4 磷酸化失活、表达降低[10]。PKC 和 PKA 被激活后,可从胞质转移到胞膜,并使 AQP-4 蛋白磷酸化,这时水的渗透性发生改变,形成或加重脑水肿。但真正的调控机制尚不清楚,还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 赵应敏,宋 波,许予明. AQP4 与脑水肿[J]. 临床和实验医学杂志,2007,6(5):164 - 165.

[2] 摩驭国. 水通道蛋白 4 在大鼠外伤性脑损伤的表达及意义[J]. 湖南中医药大学学报,2010,30(6):7 - 8.

[3] 谭美芸. 水通道 AQP1 的研究进展[J]. 中国实用医药,2010,5(9):241 - 243.

[4] 张志灯,曹治云,郑 腾,等. 改良的大鼠脑组织总 RNA 抽提方法[J]. 生物技术通讯,2006,17(5):760 - 761.

[5] 何 玲,王 键,胡建鹏. 活血利水法对大鼠缺血性脑水肿脑组织内 AQP-1 和 AQP-9 表达的影响[J]. 中国中医急症,2011,20(4):580 - 581.

[6] 陈宝智,王宇田,赵建农,等. 颅脑外伤早期与 AQP4 表达的研究进展[J]. 中国热带医学,2010,10(3):380 - 381.

[7] Zhang YW, Li HT, Hu J, et al. Correlation analysis between the expression of aquaporin 4 and magnetic resonance imaging of brain tissue in severely scalded rabbit with brain edema during early stage[J]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2011, 27(6): 441 - 445.

[8] 孟 飞,衣服新,叶志军,等. 艾芬地尔对大鼠局灶性脑缺血损伤后脑水肿和 AQP4 表达的影响[J]. 神经解剖学杂志,2010,26(2):192 - 196.

[9] 李 琴,张 红,毕明俊,等. 神经调节素对大鼠脑缺血再灌注损伤 AQP-4 及 GFAP 表达的影响[J]. 神经解剖学杂志,2009,25(1):30 - 36.

[10] Wang LQ, Zhu SM, Zhou HJ, et al. Expression of aquaporin-4 during brain edema in rats with thioacetamide-induced acute encephalopathy [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2011, 91(36): 2573 - 2577.

(编辑:兰阳军)

(上接第 600 页)

关闭胆囊窝时,应尽量贴近胆囊壁游离,如有胆囊下肝管存在,需予以结扎,并妥善缝合胆囊窝浆膜,不留死腔,术后放置引流,防止术中误损伤胆囊下肝管,造成术后胆漏。

本组胆囊管与肝总管汇合方式有角形和平行型。平行型胆囊管和肝总管相遇后(相遇点为假汇合点)在结缔组织中下行一段距离再汇合(此点为真汇合点),故在胆囊切除术时应紧靠真汇合点 0.5 cm 左右切断胆囊管,防止在假汇合点处切断,使胆囊管残端遗留过长,可遗留结石感染或再扩大形成“假胆囊”,须再次手术。临床医生读 CT 片,寻找胆囊影像困难时,可在 CT 片上经脊柱椎体中心画一水平线,再通过此椎体中心画一偏左斜线,与水平线成角约 45°,通常在此斜线上可寻找到胆囊影像。临床医生通过本组测得胆总管相关数据,了解胆总管外径、各段长度及可能出现的变异,对于判断胆管扩张和行胆管切开取石探查、EPRC 等手术具有重要意义。近年来,随着腹腔镜手术的逐渐普及,微创手术为病人减少了不少手术痛苦,但其医源性胆道损伤率并没有明显下降,主要在于术者胆囊三角解剖结构辨认不清、盲目钳夹分离处理不当,其次在手术器械产生的热电效应或放置钛夹不当等导致的胆管损伤。总之,注意肝外胆道的变异,术中适当运用胆道造影、超声或胆道镜,掌握副肝管、胆囊下肝管、胆囊管与肝外胆道的局部解剖位置关系,了解肝左、右管汇合形态,仔细处理胆囊三角结构,对肝外胆道手术有重要的指导意义。

[参考文献]

[1] 蔡昌平. 胆囊床内肝管的应用解剖[J]. 川北医学院学报,2005,20(3):244 - 245.

[2] 彭裕文. 局部解剖学[M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:106.

[3] 李彦明,张莲香,文玉军,等. 肝门部肝蒂内结构主要分支的形态学观测及临床意义[J]. 宁夏医科大学学报,2009,31(3):300.

[4] 牛朝诗,韩 卉,余宏铸,等. 肝管的观测及其临床意义[J]. 安徽医科大学学报,1997,32(2):108.

[5] 韩永坚,刘牧之. 临床解剖学丛书,腹、盆部分册[M]. 北京:人民卫生出版社,1992:287.

[6] 雷海燕,杨 毅,沈钧康. 术前 MRCP 对肝外胆管变异评估的临床价值[J]。中华消化外科杂志,2010,9(3):200 - 202.

[7] 李先贵,孟 镔,张 宇,等. 32 例胆囊后三角入路腹腔镜胆囊切除术临床分析[J]. 局解手术学杂志,2010,19(3):215.

(编辑:左艳芳)