维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0901-06

水通道蛋白 9 表达与大鼠缺血性脑水肿形成的关系

冉建华[1],孙善全[1],汪克建[1],毕 恣[2],陈 海[1],杨 美[1]

(1. 重庆医科大学基础医学院解剖学教研室神经生物研究室,重庆 400016;
2. 重庆医科大学应用技术学院附属医院,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究水通道蛋白 9(Aquaporin9,AQP9)在大鼠缺血性脑组织中的表达及其与脑水肿形成之间的关系。方法:采用线拴法制作大鼠局灶性脑缺血模型,通过光镜、电镜技术观察脑水肿区的病理变化,干湿重法检测脑含水量,采用原位杂交、免疫组化方法观察 AQP9 及其 mRNA 在脑组织中的表达。结果:缺血后细胞及血管周围间隙明显扩大,部分细胞坏死,胶质细胞增生;大鼠穹隆下器官、脉络丛、大脑皮质、视上核、海马等部位 AQP9 及其 mRNA 的表达上调,48~72h 达峰值;脑组织含水量亦在 72h 达高峰。结论:随缺血性脑水肿的出现,AQP9 及其 mRNA 表达上调,提示 AQP9 可能在缺血性脑水肿的形成中发挥重要作用。

【关键词】AQP9;大鼠;缺血性脑水肿
【中国图书分类法分类号】R74 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-01-30

Relationship between AQP9 expression and formation of ischemic cerebral edema in the rats

RAN Jianhua, et al

(*Department of Neurobiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the role of AQP9 and its mRNA expression in the formation of ischemic cerebral edema in the rats. *Methods*: MCAO models were established by occluding unilateral middle cerebral artery (MCA) of the rats with the suture method. The morphological changes were observed with HE stain and transmission electron microscope (TEM). Brain water content (BWC) was measured by using wet-dry weighing method. The expression of AQP9 and its mRNA in the edema brain tissue were detected with in situ hybrilization (ISH) and immunohistochemistry (IHC). *Results*: The space around the neurons and perivascular space became larger. Some neurons showed necrosis phenotype, and the number of the neurogliocyte increased. The expression of AQP9 and its mRNA were up-regulated in subfornical organ (SFO), choroid plexes, brain cortex, supraoptic nuclei, hippocampus and other regions, and reached its peak at 48~72h after MCAO. The brain water content(BWC) in ischemic cerebral tissue reached its peak at 72h. *Conclusions*: the expression of AQP9 and its mRNA were up-regulated following the brain edema. The results imply that AQP9 might play an important role in the formation of ischemic cerebral edema.

【Key words】 AQP9; Rat; Ischemic cerebral edema

脑水肿是缺血性脑血管病最常见的并发症之一,其形成机制的研究一直是神经科学重点探讨的课题。近年来,水通道蛋白(Aquaporins,AQPs)在脑水肿形成中的作用引起了人们的关注[1,2]。目前在哺乳动物体内发现 AQPs 有 13 个成员,其中,AQP9 在脑组织中的分布广泛,含量丰富,可能参与了脑组织水的运输平衡调节及能量代谢[3]。Badaut[4]观察到,AQP9 在缺血再灌注后小鼠梗塞灶周围脑组织中的表达显著增高,推测其与脑水肿的形成和发展有关。然而,目前对于 AQP9 在大鼠缺血性脑损伤组织中的表达及与脑水肿形成的关系尚缺乏相关研究。为此,我们制作大鼠局灶性脑缺血模型,通过光镜、电镜技术观察脑水肿区的病理变化,干湿重法检测脑含水量,采用原位杂交、免疫组化方法,分别从转录和翻译水平观察 AQP9 及其 mRNA 在脑组织中的表达,探讨大鼠脑缺血后 AQP9 的表达及其与脑水肿形成的关系,为脑水肿形成机制的研究提供实验依据。

作者介绍:冉建华(1974-),女,博士,
主要研究方向:脑水肿形成机制。

基金项目:国家自然科学基金项目资助(NO:30470608、30500171)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 主要仪器、试剂及动物 主要仪器:冰冻切片机(CM 1850,Leica)、石蜡切片机(RM 2135,Leica)、多通道电子蠕动泵(DDB-300,浙江象山石浦海天电子仪器厂)、生物研究显微镜(BM-E,Leica)、透射电子显微镜(H-600,Hitachi)、原位杂交专用载玻片和盖玻片(武汉博士德生物有限公司)。

主要试剂:AQP9 多克隆抗体(美国 Sigma 公司)、免疫组化试剂盒(通用型 SABC 试剂盒,北京中山生物有限公司)、BCIP/NBT 和 AEC 试剂盒(北京中山生物有限公司)、AQP9 cRNA 探针(上海生工生物技术公司)、原位杂交专用试剂盒(武汉博士德生物有限公司)等。

实验动物:健康成年 Wistar 大鼠 160 只,雌雄不拘,质量 200~280g,由重庆医科大学实验动物中心提供,符合国家二级实验动物标准。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的制作 Wistar 大鼠术前禁食 12h、禁水 6h,随机分为大脑中动脉栓塞(MCAO)组和假手术对照组。大鼠麻醉后,取颈部正中切口,分离右侧颈总、颈内和颈外动脉,结扎颈总动脉和颈外动脉,在颈总动脉近分杈处剪一"V"字形切口,将多聚赖氨酸处理过的 d=0.26mm 的鱼线经切口插入颈内动脉约 18~20mm(根据动物大小调整插入鱼线的深度),阻塞右侧大脑中动脉,固定外端的鱼线,缝合皮肤,腹腔注射青霉素预防感染,假手术组除不插鱼线外,其余操作与手术组相同。大鼠清醒后回笼自由进饮食,给予正常进食饮水,观察神经症状和体征,依据 Zea longa 5 分制评分标准,神经缺损评分大于 2 分者判为造模成功,分别于脑缺血后 3h、6h、24h、48h、72h 后取脑。

1.2.2 病理组织学观察(光镜及电镜) 到达预定时相点的大鼠经左心室生理盐水冲洗,4%多聚甲醛灌注固定,迅速取脑,4%多聚甲醛后固定,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,观察病变区及附近脑组织病理变化。

到达预定时相点的大鼠经左心室生理盐水冲洗,2.5%戊二醛灌注固定,迅速取脑,于水肿组织处取 1mm³ 大小脑组织,分别经 2.5% 戊二醛、1% 锇酸后固定,系列丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋,超薄切片,双铅染色,置于透射电镜下观察、照相。

1.2.3 脑组织含水量(Brain water content, BWC)的测定 采用干湿重法。不同时相点大鼠处死后迅速取脑,去除皮质表面的软脑膜、小脑、脑干,取梗死侧大脑半球置于称量杯中称湿重(W),然后放入电热恒温箱中 100℃烘烤至恒重,再称干重(D)(两次干重之差≤0.2mg)。按如下公式计算:

脑组织含水量(%)=(湿重−干重)/湿重×100%

1.2.4 免疫组化检测 AQP9 蛋白的表达变化 造模成功的大鼠在各相应时间点经灌流固定、后固定后,在冰冻切片机上作连续冠状切片,片厚 20μm,室温晾干备用,采用 SABC 法检测 AQP9 表达变化。实验操作步骤按试剂盒说明书进行,用 PBS 代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照。

1.2.5 原位杂交检测 AQP9 mRNA 的表达 用 Primer Premier 5 软件设计寡核苷酸探针,序列为:5'-CATGCAGAGGCTGGCCCTGAAGAGC-3',经 DNA 合成仪合成探针,采用地高辛标记试剂盒(上海生工产品)作末端标记。

造模成功的大鼠在各相应时间点经灌流固定、后固定后,在冰冻切片机上作连续冠状切片,片厚 20μm,室温晾干备用,原位杂交实验的操作步骤按试剂盒说明书进行,用 PBS 代替 AQP9 探针作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照。

注:杂交前所用容器、液体及其它物品均经高温高压消毒和 0.1%DEPC 处理。杂交前操作时每一步均戴口罩和无菌手套,以避免外源性 RNA 酶的污染。

1.2.6 图像分析及统计学处理 光学显微镜下,随机选取原位杂交和免疫组化同一部位切片的 10 个不同视野进行观察。采用北航 CM-2000B 生物医学图像分析系统进行自动分析。分析结果以细胞平均光密度值(A)表示。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SAS 8.1 统计分析程序对各组数据进行重复测量数据的方差分析和相关性检验,$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 MCAO 后大鼠生理行为和活动的改变

MCAO 后大鼠活动减少,精神萎靡,右侧 Horner's 征阳性,不能伸左前肢;行走时向左侧转圈;爬板时,向左侧跌落;提尾时,左前肢内收,头弯向左上。有的大鼠完全不能自主运动,甚至出现大小便失禁。

2.2 MCAO 后大鼠脑组织形态学的病理观察

肉眼观察可见手术组动物缺血侧的脑组织不同程度的肿胀,对照组无明显变化。光镜下,对照组的脑组织结构完整,神经元和胶质细胞形态正常。MCAO 3h 可见缺血组织中星形胶质细胞胞质淡染;MCAO 6h 组织水肿明显,星形胶质细胞和血管内皮细胞肿胀,细胞间隙、血管周围间隙明显增宽;MCAO 24h 脑组织变得疏松,部分肿胀的星形胶质细胞胞膜破裂。MCAO 48~72h 脑组织疏松更加明显,病灶中心坏死区可见少量残存的神经元和大量增生的胶质细胞,其边缘仍可见肿胀的神经细胞。

MCAO 3h,电镜下可见水肿区星形胶质细胞的胞浆和胞核出现轻度肿胀,神经元结构无明显改变。MCAO 6h 后,毛细血管周围星形胶质细胞的足突肿胀明显,但仍与毛细血管基底膜相连,毛细血

维普资讯 http://www.cqvip.com

管管腔受压变小;MCAO 24~72h，脑组织肿胀明显加重，星形胶质细胞足突与毛细血管基底膜已分离,间隙明显扩大,血管内皮细胞肿胀明显,有少量神经元和胶质细胞坏死、崩解(图 1)。



(▲示肿胀的星形胶质细胞终足)

图 1 MCAO 后 6h 脑水肿区毛细血管周围间隙增宽(TEM ×12000)

2.3 脑组织含水量的变化

假手术组脑组织含水量随时间延长,没有明显变化。MCAO 3h 后,手术组缺血侧脑组织含水量较假手术组相比明显增加($P<0.05$),随缺血时间的延长,脑组织含水量增加显著($P<0.05$)。其中 3~24h 脑含水量增加较快,48~72h 增加放缓,72h 达到峰值(表 1、图 2)。

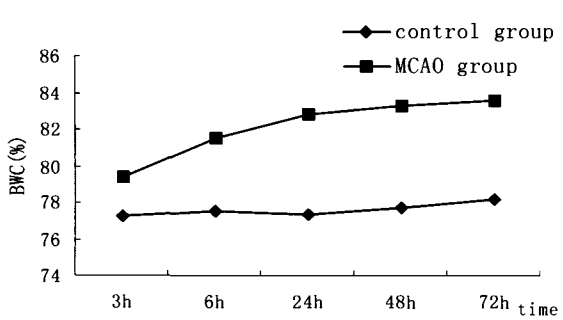


图 2 MCAO 后不同时间段脑组织含水量

2.4 免疫组化染色检测 AQP9 蛋白

阴性对照未见 AQP9 蛋白表达。假手术组和 MCAO 组中,在海马、室旁核、视上核、皮质、脑室及脉络丛等处,都可以见到密集排列、轮廓清楚、胞膜呈紫蓝色或紫红色、胞浆及胞核不着色的 AQP9 表达阳性的细胞。AQP9 在假手术组的表达呈弱阳性,MCAO 3h 后,AQP9 表达开始上调($P<0.05$),并随缺血时间延长表达增加($P<0.05$),其中 MCAO48~72h 表达最强。在脑缺血组织中,AQP9 蛋白的表达与脑含水量的变化呈正相关,$r=0.9139$,$P<0.05$。见表 2 和图 3。



图 3 MCAO 后 3h 缺血侧脉络丛 AQP9 蛋白的表达(IHC, BCIP/NBT×100)→(示脉络丛)

2.5 原位杂交检测 AQP9 mRNA 的表达

阴性对照未见 AQP9 mRNA 阳性表达。假手术组和 MCAO 组 AQP9 mRNA 在脑组织中表达的部位(缺血灶周边的水肿区、血管周围及白质的星形胶质细胞、脉络丛、室管膜、视上核和室旁核、海马等)同免疫组化结果显示的部位基本一致。但 AQP9 mRNA 阳性产物主要分布在细胞的胞膜和胞浆,染色呈紫蓝色或紫红色,同时胞浆着色明显比胞膜浅,随缺血时间的延长,在缺血最为严重的组织中可见部分细胞的胞核着色。

假手术组 AQP9 mRNA 在脑组织表达为弱阳性。MCAO 3h 后,AQP9 mRNA 的表达与对照组相

维普资讯 http://www.cqvip.com

比开始增高($P<0.05$),并随时间的延长而染色逐渐增强($P<0.05$);其中,MCAO 后 24~48h 阳性表达增加较快,MCAO 后 48h 到达峰值开始缓慢降低,MCAO 后 72h 其表达水平仍保持在高表达水平。MCAO 后手术组脑组织中 AQP9 mRNA 与 AQP9的表达变化呈正相关,$r=0.9068$,$P<0.05$。见表 3、图 4 和图 5~9。

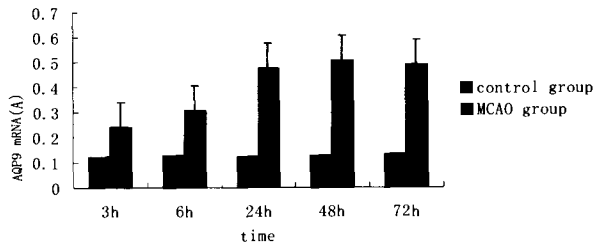


图 4 缺血脑组织 AQP9 mRNA 的表达变化 (ISH)

表 1 MCAO 后不同时段脑组织含水量(%)结果($\bar{x}\pm s$)

分组	例数	MCAO 3h	MCAO 6h	MCAO 24h	MCAO 48h	MCAO 72h
假手术组	15	77.21 ± 0.25	77.52 ± 0.64	77.37 ± 0.49	77.74 ± 0.58	78.22 ± 0.31
MCAO 组	25	79.43 ± 0.48△	81.54 ± 0.32△※	82.85 ± 0.26△※	83.26 ± 0.22△※	83.56 ± 0.13△※

△与假手术组比较 $P<0.05$; ※与 3h 组比较 $P<0.05$

表 2 缺血脑组织 AQP9 蛋白的表达变化 (IHC)

组别	n	AQP9 蛋白 (HC)				
		MCAO 3h	MCAO 6h	MCAO 24h	MCAO 48h	MCAO 72h
对照组	25	0.067 ± 0.013	0.071 ± 0.014	0.070 ± 0.016	0.075 ± 0.014	0.072 ± 0.012
缺血组	25	0.095 ± 0.011△	0.142 ± 0.034△※	0.199 ± 0.029△※	0.284 ± 0.024△※	0.320 ± 0.018△※

△与假手术组比较 $P<0.05$; ※与 3h 组比较 $P<0.05$

表 3 缺血脑组织 AQP9 mRNA 的表达水平(A 值) (ISH)

组别	n	AQP9 mRNA(ISH)				
		MCAO 3h	MCAO 6h	MCAO 24h	MCAO 48h	MCAO 72h
对照组	25	0.123 ± 0.016	0.126 ± 0.021	0.122 ± 0.018	0.125 ± 0.018	0.129 ± 0.015
缺血组	25	0.240 ± 0.029△	0.304 ± 0.028△※	0.475 ± 0.070△※	0.506 ± 0.024△※	0.488 ± 0.056△※

△与假手术组比较 $P<0.05$; ※与 3h 组比较 $P<0.05$

3 讨 论

脑水肿是继发于脑外伤、脑缺血、脑肿瘤、颅内感染等多种脑疾病之后出现的病理现象。近年来的研究[5]表明,脑水肿的关键问题是脑细胞膜内外水、电解质的分布失衡。但用传统的理论如:乳酸中毒、自由基损害、兴奋性氨基酸的神经毒性作用、细胞膜 Na^+-K^+-ATP 酶活性降低、内膜素的作用、脑细胞膜磷脂代谢障碍、细胞内 Ca^{2+}超载等理论[6]均无法完全合理解释脑组织中水、电解质的运输平衡。近十年来的研究表明,水的转运存在着一种由水通道蛋白[1,2]介导的主动运输和快速调节过程,为研究脑组织水代谢的分子机制提供了新的途径。

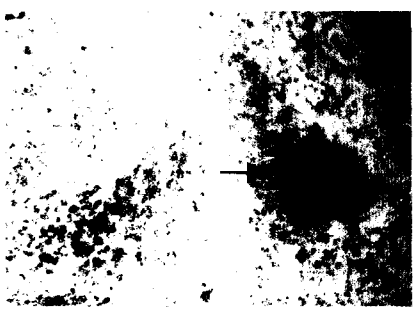
3.1 水通道蛋白 9(Aquaporin-9 ,AQP9)在脑组织中的分布及其生理意义

AQP9 是 1997 年进行人类脂肪组织基因序列分析过程中发现的一种水通道蛋白,随后的基因转染实验证实其具有增加细胞膜快速转运水及一些中性溶质的功能,并广泛分布于哺乳动物的脑、肝脏、生殖系统、外周白细胞等部位[3,7]。其中,AQP9 在脑组织中含量丰富,主要分布于脑组织中特殊类型的星形胶质细胞(包括室管膜细胞、伸长细胞、脉络丛上皮细胞)以及海马、隔核、杏仁核、视上核、室旁核部位的星形胶质细胞、血管内皮细胞和儿茶酚氨能神经元细胞的胞体和突起上[8~10]。

维普资讯 http://www.cqvip.com







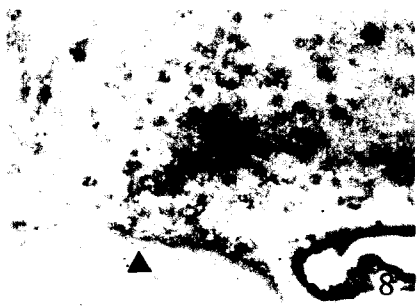




图 5 MCAO 后 24h 大脑皮质 AQP9 mRNA 的表达（ISH，BCIP/NBT×200）（→示皮质颗粒层细胞）

图 6 MCAO 后 48h 大脑皮质 AQP9 mRNA 的表达（ISH，BCIP/NBT×100）（→示皮质颗粒层细胞）

图 7 MCAO 后 72h 室旁核 AQP9 mRNA 的表达（ISH，BCIP/NBT×100）（→示室旁核）

图 8 MCAO 后 3h 视上核 AQP9 mRNA 的表达（ISH，BCIP/NBT×100）（→示视上核，▲示视交叉）

图 9 MCAO 后 48h 海马 AQP9 mRNA 的表达（ISH，BCIP/NBT×200）

本实验观察结果显示，AQP9 蛋白及其基因不仅在包括穹隆下器官（Subfornical organ，SFO）和脉络丛等脑室周围器官（Circumventricular organs，CVOs）、脑室周围实质的星形胶质细胞中有表达，而且在下丘脑视上核、室旁核、大脑皮质中强烈表达，这与国外研究报道的结果基本一致[8-10]。除此之外，我们还首次观察到 AQP9 及其 mRNA 在海马齿状回锥体细胞层中有表达。由于海马锥体层细胞富含心钠素（ANP），具有调节水、钠摄入的功能，提示 AQP9 可能与水、电解质的平衡调节密切相关[11]。由此可见，AQP9 可能在生理条件下脑组织水运输平衡、渗透压调节等过程中发挥重要的功能。

3.2 AQP9 在缺血性脑水肿组织中的表达规律及与病理变化的关系

随着研究的不断深入，AQP9 在脑水肿形成中的作用也引起人们的关注。Badaut 等[4]发现小鼠大脑中动脉缺血再灌注后，梗死灶周围星形胶质细胞 AQP9 的免疫标记明显增强，推测 AQP9 的过度表达与脑水肿的形成密切相关，但对其在脑水肿发生发展过程中表达变化的时空规律及与脑水肿病理变化的关系尚缺乏系统的研究。

本研究通过建立大鼠缺血性脑水肿模型，研究 AQP9 在缺血性脑水肿形成中的表达规律。结果显示，AQP9 在缺血性脑水肿中的表达为一动态变化过程。脑缺血 3h 后，脑水肿区 AQP9 mRNA 和蛋白质的表达均开始上调，随缺血时间的延长，AQP9 mRNA 和蛋白质的表达同时增加，在缺血性脑水肿形成和发展过程中，AQP9 mRNA 及其蛋白的表达呈正相关（r=0.9068，P < 0.05）。与此同时，脑含水量在 MCAO 3h 后开始增加，随着缺血时间的延长持续上升，直到 72h，这与临床上缺血性脑水肿的发展过程基本相符。脑含水量变化与 AQP9 的表达变化呈正相关（r=0.9139，P < 0.05），提示 AQP9 mRNA 及其蛋白的表达变化与脑水肿严重程度有密切的关系，其可能参与了缺血性脑水肿的发生和发展过程。

病理观察结果显示，脑水肿的形成是细胞毒性水肿和血管源性水肿共同发展的结果。由此推测，广泛分布在星形胶质细胞上的 AQP9 在缺血缺氧等

维普资讯 http://www.cqvip.com

病理因素的作用下，可能是导致细胞毒性脑水肿形成的主要原因之一；而大量分布于血管内皮细胞的AQP9可能通过促进水和某些渗透活性物质的转运导致血管源性脑水肿的发生。

3.3 AQP9在缺血性脑水肿中的作用

研究证实，AQP9在生理条件下可协助清除体内的乳酸盐[12]，当pH值降低到5.5时，AQP9对乳酸盐的通透性可提高4倍，同时伴随着水分子的大量转运，由此推测脑缺血引起的乳酸酸中毒可能导致AQP9表达异常上调，促进脑水肿的发生发展[13,14]。

实验结果显示，MCAO 3h后，AQP9在海马锥体细胞层、视上核、室旁核、大脑皮质等区域表达上调，并随缺血时间的延长而表达增加($P<0.05$)。其中，缺血灶周围的星形胶质细胞表达尤其强烈。同时还发现，在脑水肿的初期，缺血灶周围的脑组织水肿较轻，主要表现为星形胶质细胞肿胀和轻度缺血等可逆性变化；随着缺血时间的延长，星形胶质细胞发生不可逆损伤，并进一步引起神经元的功能障碍。由此可推测：缺血、缺氧发生时，脑组织的无氧糖酵解增加，细胞内外乳酸堆积，引起细胞H^+-Na^+交换、Cl^--HCO_3^-交换增加，细胞内Na^+、Cl^-聚集，导致渗透压发生改变[15]，激活胞膜上具有渗透压感受器功能的AQP9，通过细胞内信号转导机制大量转录、合成AQP9；持续的缺血、缺氧引起组织酸中毒加剧，PH值下降，导致AQP9合成增加，胞膜对乳酸盐的通透性大大提高，在转运乳酸的同时带动水分子的内流，造成细胞渗透性水肿的发生。同时，酸中毒可使血管内皮细胞肿胀，脑血管阻力增加，进一步加重组织缺血，形成恶性循环，最终导致内皮细胞破裂、BBB破坏，血液内的蛋白质、无机离子渗入组织间隙，组织液渗透压上升，带动水分子的转运，又导致血管源性脑水肿的形成。由此可见，在脑水肿的发生发展过程中，胶质细胞膜AQP9的表达上调具有双重作用：在脑缺血发生的早期，局部渗透压的改变导致AQP9适时表达，调节水分子和乳酸的转运以维持内环境的稳定及脑细胞的正常代谢；随着缺血、缺氧的持续发生，AQP9的表达增加，在转运乳酸的同时带动水进一步向细胞内转运，最终导致胶质细胞水肿的发生。

综上所述，AQP9表达的异常增高与缺血性脑水肿的严重程度密切相关，提示AQP9参与了缺血性脑水肿的形成，是导致脑水肿组织损伤的重要因素之一。因此，如果能在脑水肿形成的早期及时改善脑组织的血氧供应，控制AQP9的过度表达，将有利于减轻脑水肿的程度。在基因水平上对其表达进行调控，可能成为治疗脑水肿的新突破。然而，目前对其表达调控机制还知之甚少，有待于对其系统深入地研究。

（通讯作者：孙善全教授，电话：023-68485763，E-mail：sunsq2151@sohu.com，重庆医科大学解剖学教研室）

参 考 文 献

[1] Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: Member of an ancient channel family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88(24): 11110-11114.

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

[3] Elkjaer M, Vajda Z, Nejsum LN, et al. *Immunolocalization of* AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain[J]. Biochem Biophys Res commun, 2000; 276: 1118-1128.

[4] Badaut J, Hirt L, Granziera C, et al. Astrocyte-specific expression of Aquaporin-9 in the mouse brain is increased after transient focal cerebral ischchemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001; 21(5): 477-482.

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

[6] 韩济生，主编. 神经科学原理(下册)[M]. 北京：北京医科大学出版社，1999.1074-1082.

[7] Kuriyama H, Kawamoto S, Ishida N, et al. Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability[J]. Biochem Biophys Res Commum, 1997; 241(1): 53-58.

[8] Badaut J, Petit JM, Brunet JF, et al. Distribution of aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in gial cells[J]. Neuroscience, 2004; 128: 27-38.

[9] Badaut J, Petit JM, Brunet JF, et al. Aquaglyceroporin 9 in brain catecholaminergic neurons: involvement in glucose metablism[J]. Soc neurosci, 2003; 193: 13.

[10] Badaut J, Brunet JF, Grollimund L, et al. Aquaporin expression and distribution in human brain tissue[J]. Soc neurosci, 2002; 255: 16.

[11] Fukui S, Fazzina G, amorini AM, et al. Differential effects of atrial natriuretic peptide on the brain water and sodium after experimental cortical contusion in the rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003; 23(10): 1212-1218.

[12] Tsukaguchi H, Weremowicez S, Mortoon CC, et al. Functional

（下转第 950 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

径,并且其中一个重要的途径与肿瘤细胞增殖相同即 Ras/Raf/MAPK/途径[4]。有学者发现肿瘤细胞受照后,能使 c-raf-1 基因活化[5,6],从而激活 Ras/Raf/MAPK/途径导致放射疗效的改变。这为对有辐射抗性的肿瘤细胞进行有针对性的基因治疗提供了线索,对提高肿瘤细胞辐射敏感性,降低辐射剂量,从而减少放疗并发症开拓了思路。Jones HA 等学者用 raf 基因的上游基因 ras 的抑制物逆转肿瘤辐射抗性取得很好的效果[7]。已有研究明确了 c-raf-1 基因在肝细胞性肝癌辐射抗性产生过程中的作用[8]。目前有关抑制辐射信号和增殖信号转导途径中的枢纽元件 c-raf-1 用于放射增敏的研究较少。

本研究利用反义技术抑制 c-raf-1 基因,可使其在宫颈癌细胞中的基因表达率下降约 50%。抑制 c-raf-1 基因后,受照宫颈癌细胞集落形成率较正义寡核苷酸组及单纯照射组明显下降,其下降率大于单独转染反义寡核苷酸组与单独照射组集落形成下降率之和,提示转染 c-raf-1 反义寡苷酸对人宫颈癌 HeLa 细胞具有辐射增敏作用,这可能与 c-raf-1 反义寡核苷酸抑制了辐射抵抗信号转导途径及照射后癌细胞的凋亡增加有关,因为我们还观察到反义寡核苷酸组照射后细胞凋亡率明显增加,由 c-raf-1 正义寡核苷酸组和脂质体组的 12.82%、11.36%增加至 35.13%。癌基因 bcl-2 有抗凋亡的功能,我们使用免疫荧光试验测定 Bcl-2 蛋白在各实验组中的表达发现反义寡核苷酸组 Bcl-2 蛋白表达率明显低于其它各组,推测抑制 c-raf-1 基因后照射细胞凋亡率增加与 bcl-2 基因下调有关。至于抑制 c-raf-1 基因后可有效降低人宫颈癌细胞的辐射抗性的作用机制仍有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Zebisch A,Czernilofsky AP,Keri G,et al. Signaling Through RAS-RAF-MEK-ERK:from Basics to Bedside[J]. Curr Med Chem, 2007;14(5):601-623.

[2] 吴永忠,任庆兰,李少林. c-raf-1 反义寡核苷酸转染对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的抑制作用[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(1):19-22.

[3] Al-Mulla F,Hagan S,Behbehani AI,et al. Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients [J]. J Clin Oncol,2006;24(36):5672-5679.

[4] Gupta AK,Bakanauskas VJ,Cerniglia GJ,et al. The ras radiation resistance pathway[J]. Cancer Res, 2001;61(10):4278-4282.

[5] Kasid U. Raf-1 protein kinase,signal transduction, and targeted intervention of radiation response[J]. Exp Biol Med (Maywood),2001; 226(7):624-625.

[6] Kasid U,Suy S,Dent P,et al. Activation of raf by ionizing radiation[J]. Nature,1996;29(382):813-816.

[7] Johnes HA,Hahm SM, Bernhard E, et al. Ras inhibitors and radiation therapy[J]. Semin Radiat Oncol,2001;11(4):328-337.

[8] Tang WY,Chau SP,Tsang WP,et al. The role of Raf-1 in radiation resistance of human hepatocellular carcinoma Hep G2 cells [J]. Oncol Rep,2004;12(6):1349-1354.

(上接第 906 页)

and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9[J]. Am J Physiol,1999;277:F685-696.

[13] Rotta LN,Valle SC,Schweigert L,et al. Utilization of energy nutrients by cerebellar slices[J]. Neurochem Res,2002;27:201-206.

[14] Nguyen NH,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: 831-842.

[15] 郭国际,主编. 脑脊髓血管病基础与临床[M]. 北京:科学出版社,2003.212.