基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000877

β-DG 对脑内水通道蛋白 4 极性表达变化的影响

邱国平，孙善全，卓　飞，徐　进，杨　美，刘　辉
（重庆医科大学基础医学院解剖学教研室，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：观察脑出血（intracerebral hemorrhage，ICH）后大鼠脑组织中 β-肌营养不良聚糖（β-dystroglycan，β-DG）的表达变化，以探讨其对水通道蛋白 4（aquaporin 4，AQP4）极性表达变化的的影响。**方法**：健康雄性 SD 大鼠 68 只，随机分为假手术对照组（sham 组）、ICH 后 1、3 d 和 7 d 共 4 组，采用自体血注入法建立大鼠 ICH 动物模型，HE 染色和透射电镜检测组织结构病理变化，免疫印迹检测血肿周围组织中 β-DG 蛋白的表达变化，免疫荧光双标记检测 AQP4 与 β-DG 的共表达变化。每个时间点用于透射电镜检测、免疫印迹和组织切片的大鼠数量分别为 5、6 只和 6 只。**结果**：ICH 后 1 d 血肿周围组织结构破坏最为明显，可见毛细血管内皮细胞肿胀及血管周围间隙增宽等改变。ICH 后 1、3、7 d 的血肿周围组织中，β-DG 蛋白含量分别为（0.251 ± 0.038）、（0.396 ± 0.069）、（0.398 ± 0.086），与 sham 组（0.610 ± 0.121）比较，均明显降低，且差值均具有统计学意义（P=0.000）。与 sham 组中 AQP4 与 β-DG 严格的共表达不同，ICH 后脑组织中，伴随着 AQP4 极性表达缺失，β-DG 的表达明显降低。**结论**：β-DG 表达下调可能促进了 ICH 后脑组织中 AQP4 的极性表达缺失。

【关键词】水通道蛋白 4；极性表达；β-肌营养不良聚糖；脑出血
【中图分类号】R743.34　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-12-18

Effect of β-dystroglycan on the polarized expression of aquaporin 4 in brain

Qiu Guoping, Sun Shanquan, Zhuo Fei, Xu Jin, Yang Mei, Liu Hui
(*Teaching and Research Section of Anatomy, College of Basic Medical Sciences*)

【Abstract】***Objective***: To observe the changes of β-dystroglycan(β-DG) expression in the brain post intracerebral hemorrhage(ICH), and to explore its effect on the polarized expression of aquaporin4(AQP4). ***Methods***: Sixty-eight male SD rats were randomly divided into sham group and ICH group(including ICH post day 1, day 3, and day 7 groups). Autologous blood was injected into the right caudate nucleus to establish ICH model in rats. HE staining and transmission electron microscope(TEM) were used to observe the structure changes; Western blot was used to detect the changes of β-DG protein in the perihematomal tissue and the co-expression of AQP4 and β-DG were detected by immunofluorescence. ***Results***: In the perihematomal tissue, the organization structure was destroyed obviously, especially in the tissue of ICH post day 1 group; the endothelial cell of capillary was swollen and perivasicular gap was widened. In the perihematomal tissue, the β-DG protein of ICH post day 1, day 3, day 7 groups was (0.251 ± 0.038), (0.396 ± 0.069), (0.398 ± 0.086) respectively, signifantly different from that of (0.610 ± 0.121) in sham group(P=0.000). Different from the co-expression of AQP4 and β-DG in the sham group, the expression of β-DG was significantly decreased in the brain tissue post ICH, while the polarized expression of AQP4 was lost. ***Conclusion***: The decreased expression of β-DG may contribute to the loss of AQP4 polarized expression in the brain tissue post ICH.

【Key words】aquaporin 4; polarized expression; β-dystroglycan; intracerebral hemorrhage

水通道蛋白 4（aquaporin 4，AQP4）是脑内表达最丰富、功能最重要的一种水通道蛋白，其极性表达在与水转运密切相关部位的星形胶质细胞终足膜上，对维持脑内水平衡发挥了重要作用[1-3]。研究发现，脑出血（intracerebral hemorrhage，ICH）后脑组织中，AQP4 极性表达缺失，AQP4 极性表达缺失在出血性脑水肿的发生发展中发挥了重要作用[4]。

AQP4 在星型胶质细胞终足膜上的极性表达与

作者介绍：邱国平，Email：qiugp@126.com，
研究方向：神经生物学。
通信作者：孙善全，Email：sunsq2151@cqmu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：31300911）；重庆市自然科学基金资助项目（编号：cstc2012jjA10022）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160311.1713.006.html（2016-03-11）

肌萎缩蛋白-肌营养不良聚糖蛋白复合物(dystrophin-dystroglycan complex,DDC)密切相关[5-6]。DDC 复合物是连接细胞骨架与细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的一组相互作用蛋白,其核心成员为 β-肌营养不良聚糖(β-dystroglycan,β-DG)[5-6]。研究发现[7],脑内选择性的清除 DG,可引起星形胶质细胞终足膜的结构破坏。既然生理情况下 AQP4 极性表达在星形胶质细胞终足膜上,那么 ICH 后脑组织中,星形胶质细胞终足膜上 AQP4 的极性表达缺失是否与 β-DG 表达下调有关,这是一个值得探讨的问题。为此,本研究拟从 AQP4 的锚定蛋白入手,建立 ICH 动物模型,研究在 ICH 发生发展过程中,β-DG 表达变化与 AQP4 极性表达间的关系,以期初步探讨影响 AQP4 极性表达的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性 SD 大鼠 68 只,体质量 200~250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,符合无特定病原体级实验动物标准,大鼠分笼饲养在昼夜分明的房间中,自由进食,室温控制在 25 ℃左右。动物的饲养环境及实验相关的操作程序,均遵循重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。大鼠按照随机数字表分为假手术对照组(sham 组)与 ICH 组(包括 ICH 后 1、3、7 d 共 3 个亚组)。每个时间点用于透射电镜检测、免疫印迹和组织切片的大鼠数量分别为 5 只、6 只和 6 只。

1.2 大鼠 ICH 动物模型

参照 Nath 等[8]报导的方法,大鼠经 3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉后固定于脑立体定位仪上。将 50 μl 自体血注入右侧尾状核(前囟后 0.3 mm,向右旁开 3 mm,深 5.8 mm),停针 10 min 后退针即可。Sham 组除不将自体血注入到尾状核外,其余操作同手术组。术后待大鼠苏醒观察神经功能症状和体征,根据 Bederson 法[9]进行神经功能障碍评分。选择评分大于等于 2 分,经取脑证实有明确血肿者进下一步实验。

1.3 组织切片

sham 组与 ICH 后 1、3、7 d 4 组大鼠到达预定取材时间,麻醉后经心脏灌注冰生理盐水约 300 ml,断头取出完整脑组织,迅速移入冰冻切片机(Leica CM 1850,Leica 公司,德国),行冠状位连续切片,片厚 6 μm。切片晾干后在室温下放入4%多聚甲醛中后固定 30 min,晾干低温冰箱保存备用。

1.4 HE 染色

取上述各时段冰冻切片,经苏木精染细胞核,1%盐酸酒精分色,饱和碳酸锂对细胞核复蓝,95%酒精伊红染细胞质,梯度酒精快速脱水,梯度乙醇及二甲苯中浸透 2 次后,中性树胶封片,普通光镜下观察组织病理变化。

1.5 透射电镜检测血肿周围组织病理变化

各组大鼠到达预定取材时间,麻醉后经心脏灌注冰生理盐水约 300 ml,再灌注 2.5%戊二醛约 200 ml,至大鼠四肢明显僵硬为止。开颅取脑,取血肿周围组织 1 mm^3(偏皮质侧,sham 组取相应部位),依次在 4%戊二醛、1% 锇酸中后固定,梯度酒精丙酮脱水,环氧树脂 618# 原位包埋,镜下行超薄切片,用醋酸铀、橘掾酸铅进行双重染色,Hitachi-7500 型透射电镜下观察超微结构变化,采图成像。

1.6 免疫荧光标记

0.01 mol/L PBS 洗后,切片经 10%山羊血清在 37 ℃水浴箱中封闭 90 min,弃封闭液,滴加混合一抗(兔抗大鼠 AQP4 单克隆抗体,1:200,Abcam 公司;和小鼠抗大鼠 β-DG 单克隆抗体,1:50,Abcam 公司,英国),4 ℃下过 2 夜。0.01 mol/L PBS 洗片后,滴加二抗(Alexa Fluor 488-标记山羊抗兔 IgG 和 Cy3-标记山羊抗小鼠 IgG,1:100,碧云天),37 ℃水浴 2 h。洗片后,在室温下滴加 DAPI 染核 5 min。0.01 mol/L PBST 洗片后,50%甘油封片。切片经激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5,Leica 公司,德国)采图成像。

1.7 免疫印迹

严格按照碧云天公司提供的组织蛋白提取试剂盒说明,提取 sham 组与 ICH 后 1、3、7 d 大鼠血肿周围组织中的总蛋白质。采用 BCA 法进行蛋白浓度测定。各组均取 50 μg 总蛋白加入 5×蛋白上样缓冲液(碧云天),变性后在 10% SDS-PAGE 凝胶中电泳,分离出凝胶条带。在 250 mA,4 ℃下恒流电转 2 h,将目的蛋白转移至 PVDF 膜上。在 Western 专用封闭液中 37 ℃下封闭 1 h,分别放入一抗试剂盒中(小鼠抗大鼠 β-DG 单克隆 IgG,1:500,Abcam,英国;或小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆 IgG,1:2 000,碧云天),4 ℃下过两夜;洗膜后放入二抗试剂盒中(HRP 标记山羊抗小鼠 IgG,1:6 000,中杉金桥),37 ℃下反应 2 h;洗膜后在 DAB 显色液中显色成像。成像后的 PVDF 膜经扫描后应用 quantity one 软件对蛋白条带进行光密度计量分析,并计算目的蛋白表达量=β-DG 蛋白光密度值/GAPDH 光密度值×100%。

1.8 统计分析

采用 SPSS19.0 专用统计分析软件对数据进行处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差齐性检验后行单因素方差分析,组间均数两两比较采用 LSD-t 检验,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 血肿周围组织结构破坏明显

2.1.1 光镜结果 sham 组除针道周围结构有轻微改变外,各部位组织结构完整,细胞形态正常。而实验组各时段均可

见到大小不一的组织结构破坏区，即为“血肿核心区”，以ICH后1 d血肿核心区体积最大。低倍镜下见血肿核心区位于尾状核，组织结构疏松，细胞排列在紊乱；血肿周围区组织结构欠佳。高倍镜下见血肿核心区组织明显疏松，神经细胞坏死、崩解，细胞数量明显减少，部分细胞胞浆浓缩在一起；血肿周围区组织结构疏松、组织间隙明显增宽（图1）。



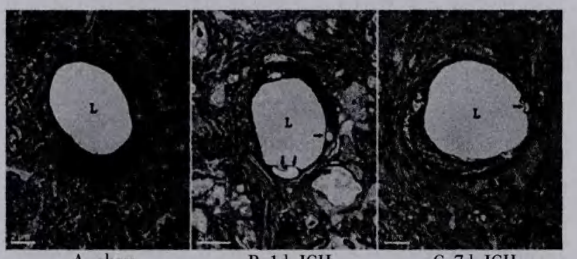
A. sham　　B. 1d-ICH　　C. 7d-ICH

C为血肿核心区；P为血肿周围组织

图1　HE染色结果（100×）

Fig.1　Results of HE staining（100×）

2.1.2　超微结构　透射电镜显示Sham组毛细血管管壁光滑、规则，周围组织结构完整。ICH后1 d的组织结构破坏最为明显，组织结构疏松，毛细血管内皮细胞胞浆肿胀，胞浆内出现小囊、小泡等改变，血管周围神经毡内膜性细胞器中度肿胀，血管周围间隙明显增宽。ICH后7 d的组织结构仍有破坏，但毛细血管已基本恢复正常，仅血管内皮细胞胞浆内见少量小泡，血管周围星胶细胞终足膜完整（图2）。



A. sham　　B. 1d-ICH　　C. 7d-ICH

注：长箭头示血管内皮细胞上小囊、小泡改变，三角箭头示细胞外间隙增宽；L为毛细血管管腔

图2　透射电镜显示ICH后组织结构变化

Fig.2　Results of transmission electron micrographs

2.2　血肿周围组织中β-DG蛋白表达下调

本研究应用免疫印迹检测血肿周围组织中β-DG蛋白的表达变化。结果显示，sham组血肿周围组织中β-DG蛋白的相对表达量为(0.610 ± 0.121)，ICH后1、3、7 d的β-DG相对表达量分别为(0.251 ± 0.038)、(0.396 ± 0.069)、(0.398 ± 0.086)。4组比较，差异有统计学意义（F=18.491，P=0.000）。进一步两两比较：与sham组比较，ICH后1 d的β-DG蛋白明显降低，差值具有统计学意义（P=0.000）。随后β-DG蛋白含量逐渐增加，但与sham组比较，ICH后3、7 d的β-DG蛋白仍明显低于sham组，差异均有统计学意义（P=0.000）（图3）。

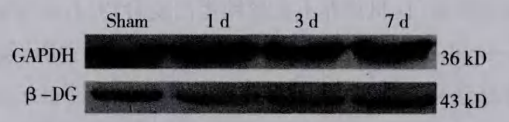
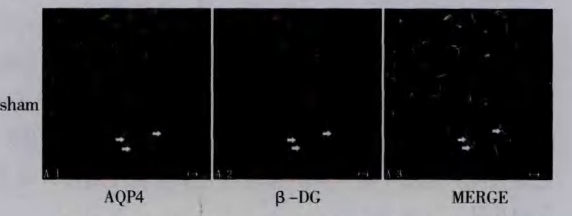


图3　Western blot检测血肿周围组织中β-DG蛋白表达变化

Fig.3　Western blot analysis of the changes of β-DG protein in the perihematomal tissue

2.3　AQP4极性表达缺失伴随着β-DG表达下调

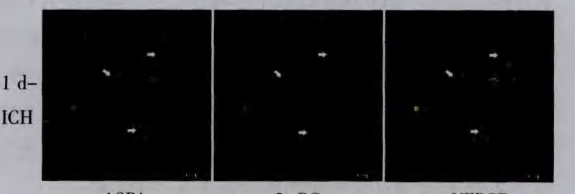
本研究应用免疫荧光双标记检测ICH后脑组织中AQP4（绿色荧光）与β-DG（红色荧光）的共表达（黄色荧光）变化。结果发现，sham组中，AQP4与β-DG共表达在脑实质毛细血管周围星形胶质细胞终足膜（图4A）、脑室室管膜细胞基底部及其下的内胶质界膜（图5A），以及软脑膜下外胶质界膜（图6A），即对照组中，两者在AQP4的极性表达部位严格共表达。而在ICH后脑组织，AQP4极性表达缺失，以ICH后1 d的改变最为明显。表现为：ICH后1 d，AQP4再分布到血肿周围星形胶质细胞胞体和突起上（图4B-1），弥散性的表达在整个室管膜细胞上（图5B-1），成团的聚集在外胶质界膜（图6B-1）。在上述部位，β-DG阳性表达明显降低，且不再与AQP4严格的共表达，而是仅可见稀疏的、散在的位于星形胶质细胞胞体上的阳性表达（图4~6B-2）。即ICH后脑组织中，伴随着AQP4极性表达缺失，β-DG表达明显下调。



AQP4　　β-DG　　MERGE

注：箭头示两者共表达于血管周围星形胶质细胞终足膜上

A. sham组尾状核中AQP4（绿色荧光）与β-DG（红色荧光）的共表达（黄色荧光）



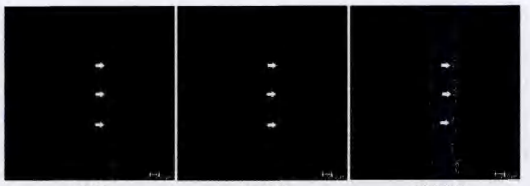
AQP4　　β-DG　　MERGE

注：箭头示血肿周围组织中AQP4再分布到星形胶质细胞胞体和突起上，而β-DG的表达则明显降低

B. ICH后1 d组血肿周围组织中AQP4（绿色荧光）与β-DG（红色荧光）的共表达（黄色荧光）

图4　sham组与ICH后1 d的尾状核/血肿周围组织中AQP4与β-DG的共表达变化（标尺=20 μm）

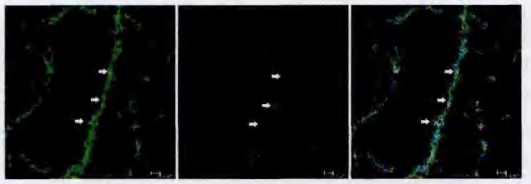
Fig.4　Changes of AQP4 and β-DG co-localization at the caudate nucleus/perihematomal tissue in sham group and day 1 post ICH group (scale bar=20 μm)



AQP4　　β-DG　　MERGE

注：箭头示两者共表达于脑室室管膜细胞基底部及其下的内胶质界膜

A. sham 组第三脑室室管膜细胞上 AQP4(绿色荧光)与 β-DG(红色荧光)的共表达(黄色荧光)



AQP4　　β-DG　　MERGE

注：箭头示 ICH 后 1 d，AQP4 弥散性的表达在整个室管膜上，而 β-DG 的表达则明显降低

B. ICH 后 1 d 组脑室室管膜细胞上 AQP4(绿色荧光)与 β-DG(红色荧光)的共表达(黄色荧光)

图 5　sham 组与 ICH 后 1 d 的脑室室管膜细胞及内胶质界膜上 AQP4 与 β-DG 的共表达变化(标尺 =20 μm)

Fig.5　Changes of AQP4 and β-DG co-localization at the glial limitans interna and the ependymocytes in sham group and d1 post ICH group(scale bar=20 μm)

sham



AQP4　　β-DG　　MERGE

注：箭头示两者共表达于软脑膜下外胶质界膜

A. sham 组软脑膜下外胶质界膜上 AQP4(绿色荧光)与 β-DG(红色荧光)的共表达(黄色荧光)

1 d-ICH



AQP4　　β-DG　　MERGE

注：箭头示 ICH 后 1 d，AQP4 成团的聚集在外胶质界膜，而 β-DG 的表达则明显降低

B. ICH 后 1 d 组软脑膜下外胶质界膜上 AQP4(绿色荧光)与 β-DG(红色荧光)的共表达(黄色荧光)

图 6　sham 组与 ICH 后 1 d 的软脑膜下外胶质界膜上 AQP4 与 β-DG 的共表达变化(标尺 =75 μm)

Fig.6　Changes of AQP4 and β-DG co-localization at the glial limitans externa beneath the pia mater in sham group and d1 post ICH group(scale bar=75 μm)

3　讨　论

肌萎缩蛋白-肌营养不良聚糖蛋白复合物(dystrophin-dystroglycan complex，DDC)是一组连接ECM分子与细胞骨架的相互作用蛋白[5-6,10]，其上有多个可供通道蛋白或信号通路蛋白结合的位点，从而将多种膜蛋白分子定位到相应细胞膜域。DDC 复合物的成员包括 dystroglycan(DG，包括 α-DG 与 β-DG 2 个亚基)、dystrobrevin 和 syntrophin，其中，核心成员是跨细胞膜的 β-DG[3]。β-DG 在细胞外借 α-DG 与 ECM 分子连接，而在细胞内则经 dystrobrevin、syntrophin 与 AQP4 C-末端结合[11-12]。因此，DDC 复合物各成员形成了一个大分子链，几者相互连接，进而将 AQP4 极性定位到星形胶质细胞终足膜上。

AQP4 通过 DDC 复合物极性锚定到星形胶质细胞终足膜上[11]，因此，AQP4 与 DDC 复合物之间可能存在直接的功能联系。研究发现，AQP4 与 DDC复合物连接障碍，可以导致星形胶质细胞极性减退，水平衡紊乱与血脑屏障破坏等改变[13]。α-syntrophin 基因敲除小鼠脑内，毛细血管周围星形胶质细胞终足膜上表达的 AQP4 明显降低，而非终足膜上 AQP4 的表达量则未受影响，甚至表达更强[12]；dystrophin 基因突变小鼠的血脑屏障破坏明显，血管周围终足膜肿胀以及星形胶质细胞终足膜上 AQP4 表达明显降低[13]。这些研究证实，DDC 复合物与 AQP4 之间存在着直接的功能联系，而 β-DG 是 DDC 复合物的核心分子，因此，β-DG 与 AQP4 之间也可能存在着某种功能上的联系。

有鉴于此，本研究检测了 ICH 后脑组织中AQP4 与 β-DG 的共表达变化。结果显示，sham 组中，AQP4 与 β-DG 共表达在脑实质毛细血管周围星形胶质细胞终足膜、软脑膜下外胶质界膜以及室管膜细胞基底部及其下的内胶质界膜，即在 AQP4 极性表达部位，β-DG 与 AQP4 严格的共表达。而在 ICH 后脑组织中，在血肿周围组织、室管膜细胞，以及外胶质界膜上，AQP4 不再表达到星形胶质细胞终足膜上，而是再分布到星形胶质细胞胞体和突起上，即 ICH 后脑组织中，AQP4 极性表达缺失。而在上述部位，β-DG 的表达明显下调，仅见少量阳性表达位于星形胶质细胞胞体上。即 ICH 后脑组织中，伴随着 AQP4 极性表达缺失，β-DG 的表达明显降低，提

示，AQP4 极性表达缺失与 β-DG 表达下调密切相关。

Steiner 等[6]研究发现，在大脑中动脉栓塞后的缺血缺氧脑组织中，星形胶质细胞终足膜上的 β-DG 表达降低，导致 AQP4 难于通过 β-DG 结合到细胞外基质成分 laiminin 上，最终引起 AQP4 极性表达缺失[2]。本研究超微结构观察发现，ICH 后血肿周围组织结构破坏明显，毛细血管内皮细胞外间隙明显增宽。推测 ICH 后血肿周围组织中，毛细血管周围星形胶质细胞终足膜肿胀，并且终足膜上表达的 β-DG 明显降低，导致 DDC 复合物所形成的大分子链断裂，进而 AQP4 难于借其锚定到星形胶质细胞终足膜，最终导致了 AQP4 再分布到星形胶质细胞胞体和突起上。

ICH 后脑组织中 β-DG 的表达下调可能与基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）有关。MMPs 是降解和重塑细胞外基质的重要酶类。MMP-2、MMP-9 是其中最重要的两个成员，生理情况下，它们以无活性酶原形式存在，病理情况下，两者活性增加，作用于细胞外基质成分，主要包括 IV 型胶原酶、纤维连接蛋白、弹性蛋白等[14]。研究[15]发现，在大脑皮质癫痫活动中，β-DG 因大量活化的 MMP-2、MMP-9 而降解，伴随着 AQP4 极性表达缺失和星形胶质细胞终足膜肿胀，而 MMP-2、MMP-9 被有效抑制时，脑组织中 β-DG 的降解也可中止。研究[16]显示，ICH 后脑组织中 MMP-2、MMP-9 的表达明显增加，其可能促进了 β-DG 的表达下调，进而引起AQP4 极性表达缺失。

综上所述，ICH 后脑组织中 AQP4 的极性表达缺失可能与 ICH 后组织中 β-DG 表达下调有关，而 β-DG 的表达下调则可能与 MMP-2、MMP-9 的激活相关。那么是否可以抑制 MMP-2、MMP-9 的激活，从而阻断 β-DG 的降解，恢复 AQP4 的极性表达，以维持 ICH 后脑组织的水平衡，还有待于下一步实验加以验证。

参 考 文 献

[1] Assentoft M, Larsen BR, MacAulay N. Regulation and function of AQP4 in the central nervous system[J]. Neurochemical Research, 2015, 40(12): 2615-2627.

[2] Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin water channels in the nervous system[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2013, 14(4): 265-277.

[3] Iacovetta C, Rudloff E, Kirby R. The role of aquaporin 4 in the brain[J]. Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology, 2012, 41(1): 32-44.

[4] 邱国平，孙善全，卓 飞，等. 脑出血脑组织中水通道蛋白 4 的极性表达缺失[J]. 重庆医科大学学报，2015，40(5)：666-670.

[5] Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack AF, et al. Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial end-feet[J]. European Journal of Neuroscience, 2011, 33(12): 2179-2186.

[6] Steiner E, Enzmann GU, Lin S, et al. Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation[J]. Glia, 2012, 60(11): 1646-1659.

[7] Moore SA, Saito F, Chen J, et al. Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy[J]. Nature, 2002, 418(6896): 422-425.

[8] Nath FP, Jenkins A, Mendelow AD, et al. Early hemodynamic changes in experimental intracerebral hemorrhage[J]. Journal of neurosurgery, 1986, 65(5): 697-703.

[9] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.

[10] Dmytrenko L, Cicanic M, Anderova M, et al. The impact of alpha-syntrophin deletion on the changes in tissue structure and extracellular diffusion associated with cell swelling under physiological and pathological conditions[J]. PLoS one, 2013, 8(7): e68044.

[11] Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, et al. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(24): 14108-14113.

[12] Amiry-Moghaddam M, Frydenlund DS, Ottersen OP. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport[J]. Neuroscience, 2004, 129(4): 999-1010.

[13] Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, et al. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice[J]. Glia, 2003, 42(3): 235-251.

[14] Tasaki A, Shimizu F, Sano Y, et al. Autocrine MMP-2/9 secretion increases the BBB permeability in neuromyelitis optica[J]. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 2014, 85(4): 419-430.

[15] Gondo A, Shinotsuka T, Morita A, et al. Sustained down-regulation of β-dystroglycan and associated dysfunctions of astrocytic endfeet in epileptic cerebral cortex[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(44): 30279-30288.

[16] 李晓峰，郭远瑾，王 郑，等. 褪黑素对脑出血大鼠基质金属蛋白酶表达及神经功能的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2014，16(6)：641-645.

（责任编辑：张辉洁）