

本文引用: 梁林, 杨术旺, 龚海英, 等. 高原脑水肿大鼠脑组织水通道蛋白-4 表达的变化及意义 [J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(2): 90-92.

【基础研究】

高原脑水肿大鼠脑组织水通道蛋白-4 表达的变化及意义

梁 林¹, 杨术旺², 龚海英³, 董化江⁴

(1. 武警后勤学院科研部, 天津 300162; 2. 武警后勤学院训练部研究生处, 天津 300162; 3. 武警后勤学院预防医学系药物化学教研室, 天津 300162; 4. 武警后勤学院临床医学系人体解剖学与组织胚胎学教研室, 天津 300162)

摘要: 目的 探讨高原脑水肿大鼠脑组织水通道蛋白-4 (AQP4) 表达的变化及意义。方法 16 只雄性 Sprague Dawley 大鼠随机分为缺氧水肿组和对照组, 每组 8 只, 制作大鼠高原缺氧损伤模型。检测 2 组大鼠脑组织水含量, 并采用实时定量聚合酶链反应、免疫组织化学法、Western blot 测定大鼠脑组织高原缺氧损伤 24 h 后 AQP4 mRNA 和蛋白表达变化。结果 与对照组比较, 缺氧水肿组大鼠脑组织水含量增加, 水肿明显, AQP4 mRNA 和蛋白表达量上调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 AQP4 在高原缺氧脑水肿的形成过程中发挥了重要作用, 提示对 AQP4 的干预可减轻高原脑水肿损伤。

关键词: 水通道蛋白 4; 大鼠; 高原缺氧; 脑水肿

中图分类号: R338 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)02-0090-03

Change of aquaporins-4 expression in brain tissues of rats with high altitude cerebral edema and its significance

LIANG Lin¹, YANG Shu-wang², GONG Hai-ying³, DONG Hua-jiang⁴

(1. Department of Scientific Research, Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; 2. Department of Graduated Students, Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; 3. Medical Chemistry Department, Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; 4. Department of Anatomy, Histology and Embryology, Clinical Medical School of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

Abstract: **Objective** To study the change of aquaporins-4 (AQP4) expression in brain tissues of rats with high altitude cerebral edema and its significance. **Methods** Sixteen Sprague Dawley rats were divided into anoxic edema group and control group randomly, with 8 rats in each group. The model of high altitude cerebral edema was established. The moisture capacity of brain tissue was detected. The expression of AQP4 mRNA and protein were measured by reverse transcription polymerase chain reaction, immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with control group, the moisture capacity of brain tissue increased, the edema was evident, and the expression of AQP4 mRNA and protein were up-regulated in anoxic edema group. The differences were significant ($P < 0.05$). **Conclusion** AQP4 might play an important role in the formation of high altitude cerebral edema, which indicates that interference of AQP4 may decrease the damage of high altitude cerebral edema.

Key words: aquaporins 4; rat; plateau hypoxia; brain edema

水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 是近年来发现的一组对水有特异性通透性的膜蛋白^[1], 参与水的跨膜转运, 在细胞内外环境平衡调节中起重要作用。AQPs 广泛分布于动、植物的组织细胞中, 目前, 已从哺乳动物组织中鉴定出 13 种水通道蛋白 (AQP0 ~ AQP12)^[2]。研究表明, AQP1 和 AQP4 主要分布于中枢神经系统, 以 AQP4 的分布最为广泛^[3]。在高

原低压缺氧状态时, 中枢神经系统由于缺氧会产生一系列病理改变, 其中最主要的病理学变化为高原脑水肿。本实验建立大鼠高原缺氧模型, 采用实时定量聚合酶链反应 (real time polymerase chain reaction, RT-PCR)、免疫组织化学、Western blot 等技术检测大鼠脑组织中 AQP4 在基因、蛋白水平的表达分布及变化, 初步探讨 AQP4 在高原缺氧脑损伤中的分子病理学机制。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性 Sprague Dawley 成年大鼠 16 只, 无特定病原体级, 体质量 (250 ± 10) g, 军事医学科学院提供。AQP4 抗体及免疫组织化学试剂盒购自

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.02.003
收稿日期: 2013-11-11
基金项目: 国家十一五科技支撑计划课题 (编号: 2007BAK38B05); 武警后勤学院院级科研基金项目 (编号: WYM201011, WHTD201308-2)
作者简介: 梁林 (1972-), 男, 天津人, 硕士, 副教授, 主要从事脑创伤分子病理学研究。
通信作者: 董化江 (1983-), 男, 山东淄博人, 硕士, 讲师, 主要从事缺血再灌注损伤的研究。

北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与模型复制 将16只大鼠随机分为缺氧水肿组和对照组,每组8只,常规饲养,自由饮食。参照文献[4]建立大鼠高原缺氧脑损伤模型,将密闭玻璃缸进气口连接真空泵抽气造成舱内缺氧环境,进气口连接气体流量计监测气流量,缸内放置温湿度表和探头,探头连接测氧仪监测舱内氧含量,缸底放适量干燥剂和无水氯化钙,制成缺氧舱。对照组放置在相同的容器中,连通空气,对照组与实验组大鼠均于24 h后断头处死。

1.2.2 脑组织水含量测定 脑组织水含量测定采用干湿质量法。各组动物处死后迅速分离脑组织,沿脑中线取一半脑组织,先用分析天平称湿质量,再放入80℃干燥烤箱中烘烤24 h后称干质量。水含量(%) = (湿质量 - 干质量) / 湿质量 × 100%。

1.2.3 病理学切片及苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色 取部分脑组织样本用体积分数4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)固定3 d。常规脱水、包埋,行冠状石蜡切片(4 μm),常规HE染色,显微镜下观察,记录结果。

1.2.4 RT-PCR检测脑组织AQP4 mRNA表达变化 分别提取对照组和缺氧水肿组大鼠脑组织细胞总RNA,反转录为cDNA。PCR反应体系为50 μL,扩增条件:94℃预变性8 min;94℃变性1 min,57℃退火1 min,72℃延伸1 min,共循环28次,最后72℃再延伸10 min。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像分析系统检测各扩增条带的光密度值,以β-actin为对照,计算出目的基因RT-PCR终产物的相对含量。

1.2.5 免疫组织化学法检测脑组织AQP4蛋白表达分布 免疫组织化学染色步骤如下:组织切片进行抗原修复后用PBS清洗3次,每次5 min;山羊血清室温封闭20 min后加入一抗(兔抗大鼠AQP4)4℃过夜,室温下复温45 min, PBS洗3次,每次5 min;滴加生物素化二抗工作液(山羊抗兔)37℃孵育1 h, PBS洗3次,每次5 min;滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育20 min, PBS洗4次(每次5 min);滴加二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)溶液,显色5~10 min,自来水浸洗15 min;苏木精复染,常规脱水、透明、封片,显微镜下观察染色结果。

1.2.6 Western blot检测脑组织AQP4蛋白表达变化 各组大鼠取部分脑组织,按说明书加入适当比例的放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)蛋白裂解液,电动匀浆器匀浆,充分裂解后4℃、12 000 r·min⁻¹离心30 min,取上清液,用二辛可酸(bicin choninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。体积分数10%聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白,湿法转至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,体积分数5%脱脂牛奶室

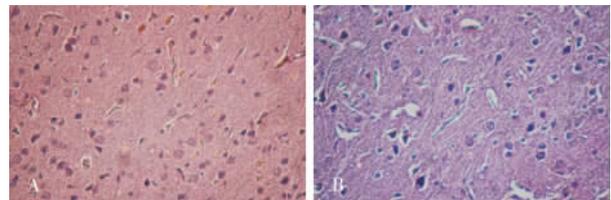
温封闭1 h,加入一抗4℃过夜后加入相应的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗,电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂盒显色,图像处理系统分析目标条带的光密度值。

1.3 统计学处理 应用SPSS 17.0软件进行统计分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组大鼠脑组织水含量比较 与对照组比较,缺氧24 h后缺氧水肿组大鼠脑组织水含量显著增加[(79.62 ± 1.26)% vs (75.37 ± 1.14)%],差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 2组大鼠脑组织形态学观察 与对照组比较,HE染色缺氧水肿组可见缺氧24 h后大鼠脑组织细胞呈水肿样改变,神经元出现肿胀或浓缩,胶质细胞开始增多。部分细胞核浓染,胞质呈嗜酸性,出现坏死(图1)。



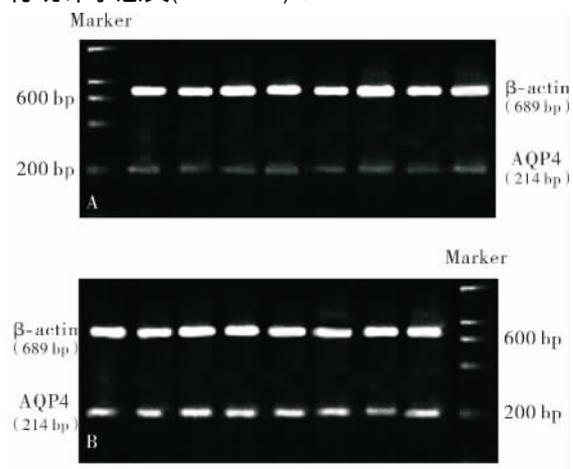
A: 对照组; B: 缺氧水肿组。

图1 2组大鼠脑组织HE染色结果(×400)

Fig.1 HE staining of cerebral tissue in the rats of the two groups(×400)

2.3 2组大鼠脑组织AQP4 mRNA水平表达变化

结果见图2。与对照组大鼠脑组织中AQP4 mRNA表达的光密度值(0.081 423 ± 0.008 765)比较,缺氧水肿组大鼠在缺氧24 h后脑组织中AQP4 mRNA表达的光密度值(0.187 000 ± 0.012 735)显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

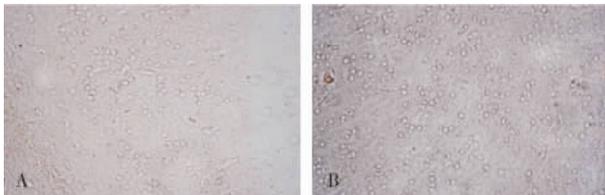


A: 对照组; B: 缺氧水肿组。

图2 2组大鼠脑组织AQP4 mRNA表达变化

Fig.2 Change of AQP4 mRNA of cerebral tissue in the rats of the two groups

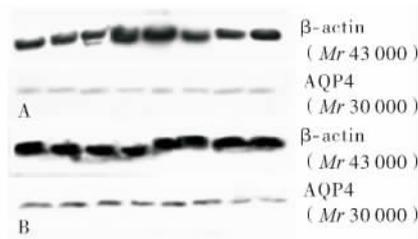
2.4 2组大鼠脑组织 AQP4 蛋白水平变化 免疫组织化学染色可见 AQP4 蛋白主要分布于细胞膜。与对照组比较,缺氧水肿组大鼠在缺氧 24 h 后 AQP4 染色阳性细胞数明显增多(图 3)。Western blot 结果表明,缺氧水肿组大鼠在缺氧 24 h 后 AQP4 蛋白的光密度值(0.218 430 ± 0.013 400)较对照组光密度值(0.130 237 ± 0.011 700)显著增加(图 4),蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



A: 对照组; B: 缺氧水肿组。

图 3 2组大鼠脑组织 AQP4 蛋白免疫组织化学染色结果(×400)

Fig. 3 Immunohistochemistry result of AQP4 protein of cerebral tissue in the rats of the two groups(×400)



A: 对照组; B: 缺氧水肿组。

图 4 2组大鼠脑组织 AQP4 蛋白 Western blot 结果

Fig. 4 Change of AQP4 mRNA in Western blot of cerebral tissue in the rats of the two groups

3 讨论

脑水肿是脑组织受到各种有害因素刺激而产生的一种非特异性的病理改变。关于脑水肿形成的机制尚不十分明确,目前普遍认为与细胞膜钠通道失调、兴奋性氨基酸的神经毒性作用、细胞膜磷脂代谢障碍以及 AQP_s 等有关。

AQP_s 是一类对水选择性通透的膜转运蛋白,其中 AQP4 具有较强的水转运能力,被认为是脑内最主要的 AQP。在调节脑内水分子的跨膜转运和维持水电解质平衡方面发挥着重要作用^[1-2]。

以往研究表明,AQP4 广泛分布在脑内,参与脑脊液的重吸收、脑内渗透压的调节等,在各种脑损伤和脑疾病继发的脑水肿形成过程中发挥了重要作用,是脑水肿形成的分子生物学基础。Manley 等^[3]最早验证了 AQP4 在细胞毒性脑水肿的形成过程中发挥了重要作用,他们利用 AQP4 基因敲除大鼠,通过低钠血症诱导的急性水中毒和局部缺血性脑梗死引发脑水肿,结果发现与正常大鼠相比,AQP4 基因

敲除的大鼠存活率高,脑水肿出现的较晚且程度轻。Hiroaki 等^[5]研究发现,在脑出血后期,由于细胞间隙离子浓度改变、渗透压升高,从而激活了第 1 信使,使胶质细胞蛋白激酶 A 活化,进一步使 AQP4 磷酸化,细胞膜对水的通透性增加,导致水肿发生。Sun 等^[6]利用自由落体导致大鼠创伤型脑损伤模型,发现 24 h 后在损伤造成的脑水肿区 AQP4 的表达比周边区明显上调,而在损伤远处则无明显变化,表明在损伤区 AQP4 的上调可能是引起脑水肿的主要原因。Guo 等^[7]利用脑创伤造成大鼠脑水肿,结果表明与采用黄体酮治疗相比,AQP4 基因敲除的大鼠脑组织的含水量明显减少。Ishida 等^[8]利用高血压脑出血倾向的大鼠研究发现,在脑脊液屏障功能损伤时,在脑出血后 12 h 后 AQP4 表达开始增高,在 1~3 d 达高峰,14 d 基本恢复正常,表明 AQP4 蛋白与脑脊液屏障功能的完整性密切相关。

本研究结果显示,缺氧水肿组大鼠在模拟高原低氧环境中缺氧 24 h 后,可见脑组织细胞发生明显水肿,AQP4 在 mRNA 水平和蛋白水平均显著升高,提示在缺氧环境下 AQP4 蛋白表达升高,可能与脑水肿的形成密切相关。

综上所述,AQP4 表达量的增加在缺氧导致脑水肿的过程中可能起到了重要作用。因此,通过抑制 AQP4 表达或降低其活性可能成为临床预防和治疗高原脑水肿的一种新思路。

参考文献:

- [1] Nico B, Mangieri D, Tamma R, et al. Aquaporin-4 contributes to the resolution of peritumoural brain oedema in human glioblastoma multiforme after combined chemotherapy and radiotherapy[J]. *Eur J Cancer* 2009, 45(18): 3315-3325.
- [2] Magni F, Sago C, Ticozzi D, et al. Proteomic knowledge of human aquaporins[J]. *Proteomics* 2006, 6(20): 5637-5649.
- [3] Manley G T, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke[J]. *Nat Med* 2000, 6(2): 159-163.
- [4] Lorente M, Mirapeix R M, Miguel M, et al. Chronic hypoxia induced ultrastructural change in the rat adrenal zona glomerulosa[J]. *Histol Histopathol* 2002, 17(1): 185-190.
- [5] Hiroaki Y, Tani K, Kamegawa A, et al. Implications of the aquaporin-4 structure on array for maturation and cell adhesion[J]. *J Mol Biol* 2006, 355(4): 628-639.
- [6] Sun M C, Honey C R, Berk C, et al. Regulation of aquaporin-4 in a traumatic brain injury model in rats[J]. *J Neurosurg*, 2003, 98(3): 565-569.
- [7] Guo Q, Sayeed I, Baronne L M, et al. Progesterone administration modulates AQP4 expression and edema after traumatic brain injury in male rats[J]. *Exp Neurol* 2006, 198(2): 469-478.
- [8] Ishida H, Takemori K, Dote K, et al. Expression of glucose transporter-1 and aquaporin-4 in the cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive rats in relation to the blood-brain barrier function[J]. *Am J Hypertens* 2006, 19(1): 33-39.

(本文编辑:王燕 英文编辑:王燕)