

本文引用:巴庆华.水通道蛋白-9在缺氧缺血性脑病新生小鼠认知功能障碍中的作用[J].新乡医学院学报,2022,39(7):606-611. DOI:10.7683/xyxyxb.2022.07.002.

【基础研究】

## 水通道蛋白-9在缺氧缺血性脑病新生小鼠认知功能障碍中的作用

巴庆华

(河南中医药大学附属人民医院/郑州人民医院神经内科,河南 郑州 450000)

**摘要:** **目的** 探讨水通道蛋白-9(AQP-9)在缺氧缺血性脑病(HIE)新生小鼠认知功能障碍中的作用及其机制。**方法** 将90只昆明新生小鼠随机分为对照组、模型组和AQP-9组,每组30只。对照组小鼠正常喂养,不建立HIE模型,模型组和AQP-9组小鼠采用电凝法闭合颈总动脉建立HIE模型;建模成功后30 min,AQP-9组小鼠给予单次腹腔注射20 μg AQP-9,对照组和模型组小鼠腹腔注射等量的生理盐水。分别于干预后第1、3、7天,每组选取10只小鼠颈椎脱臼处死,取海马组织。采用反转录聚合酶链反应法检测对照组和模型组小鼠海马组织中AQP-9 mRNA表达,免疫荧光法检测小鼠海马组织中AQP-9蛋白(对照组和模型组)和Ki-67蛋白(对照组、模型组和AQP-9组)表达,干预后第3~7天处死小鼠前进行Morris水迷宫实验检测3组小鼠空间学习记忆能力。**结果** 干预后第1、3、7天对照组小鼠海马组织中AQP-9 mRNA和蛋白的相对表达量比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。模型组小鼠干预后第3天时海马组织中AQP-9 mRNA和蛋白的相对表达量显著高于干预后第1、7天( $P<0.05$ ),模型组小鼠干预后第1天与第7天时海马组织中AQP-9 mRNA和蛋白的相对表达量比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );干预后第1、3、7天,模型组小鼠海马组织中AQP-9 mRNA和蛋白的相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ )。对照组小鼠干预后第1、3、7天海马组织中Ki-67蛋白相对表达量比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );模型组和AQP-9组小鼠干预后第7天时海马组织中Ki-67蛋白相对表达量显著高于干预后第1、3天( $P<0.05$ ),模型组和AQP-9组小鼠干预后第1、3天时海马组织中Ki-67蛋白相对表达量比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );干预后第1、3、7天,模型组小鼠海马组织中Ki-67蛋白相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ ),AQP-9组小鼠海马组织中Ki-67蛋白相对表达量显著高于对照组和模型组( $P<0.05$ )。干预后第3~7天,对照组和AQP-9组小鼠Morris水迷宫实验逃避潜伏期均逐渐缩短( $P<0.05$ ),而模型组小鼠Morris水迷宫实验逃避潜伏期无显著变化( $P>0.05$ );干预后第3、4、5天,3组小鼠Morris水迷宫实验逃避潜伏期比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );干预后第6、7天时,模型组小鼠Morris水迷宫实验逃避潜伏期显著长于对照组( $P<0.05$ );干预后第6天,AQP-9组与对照组小鼠Morris水迷宫实验逃避潜伏期比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );干预后第7天,AQP-9组小鼠Morris水迷宫实验逃避潜伏期显著短于模型组( $P<0.05$ )。**结论** HIE小鼠海马组织中AQP-9表达上调,外源性AQP-9蛋白可以改善HIE小鼠的空间学习记忆能力,其机制可能与外源性AQP-9蛋白促进Ki-67表达有关。

**关键词:** 缺氧缺血性脑病;水通道蛋白-9;海马;Ki-67;学习记忆能力

**中图分类号:** R722.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2022)07-0606-06

## Role of aquaporin-9 in cognitive dysfunction of neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy

BA Qinghua

(Department of Neurology, People's Hospital of Henan University of Chinese Medicine, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the role and mechanism of aquaporin-9 (AQP-9) in cognitive dysfunction of neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). **Methods** Ninety Kunming neonatal mice were randomly divided into control group, model group and AQP-9 group, with 30 mice in each group. The mice in the control group were fed normally, and the HIE model was not established. The mice in the model group and the AQP-9 group were used to establish HIE model by closing common carotid artery with electrocoagulation. Thirty minutes after the successful modeling, the mice in the AQP-9 group were given a single intraperitoneal injection with 20 μg AQP-9 for intervention, and the mice in the control group and the model group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline. On the first, third and seventh day after the intervention, 10 mice in each group were sacrificed by cervical dislocation, and the hippocampus were collected. The expression of AQP-9 mRNA in hippocampus of mice in the control group and model group was detected by reverse transcription polymerase chain reaction, and the expressions of AQP-9 protein (control group and model group) and Ki-67 protein (control group, model

DOI:10.7683/xyxyxb.2022.07.002

收稿日期:2021-10-20

作者简介:巴庆华(1979-),男,河南郸城人,硕士,副主任医师,研究方向:脑血管病、癫痫。

group and AQP-9 group) in hippocampus of mice were detected by immunofluorescence method. Before killing the mice, the spatial learning and memory ability of mice in the three groups was evaluated by the Morris water maze test from the third to seventh day after the intervention. **Results** There was no significant difference in the relative expressions of AQP-9 mRNA and protein in hippocampus of mice in the control group on the first, third and seventh day after the intervention ( $P>0.05$ ). The relative expressions of AQP-9 mRNA and protein in hippocampus of mice in the model group on the third day was significantly higher than those on the first and seventh day after the intervention ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the relative expressions of AQP-9 mRNA and protein in hippocampus of mice in the model group on the first day and the seventh day after intervention ( $P>0.05$ ). On the first, third and seventh day after the intervention, the relative expressions of AQP-9 mRNA and protein in hippocampus of mice in the model group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the relative expression of Ki-67 protein in hippocampus of mice in the control group on the first, third and seventh day after intervention ( $P>0.05$ ). The relative expression of Ki-67 protein in hippocampus of mice in the model group and AQP-9 group on the seventh day after intervention was significantly higher than that on the first and third day after intervention ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the relative expression of Ki-67 protein in hippocampus of mice in the model group and AQP-9 group on the first and third day after intervention ( $P>0.05$ ). On the first, third and seventh day after the intervention, the relative expression of Ki-67 protein in hippocampus of mice in the model group was significantly higher than that in the control group ( $P<0.05$ ), and the relative expression of Ki-67 protein in hippocampus of mice in the AQP-9 group was significantly higher than that in the control group and model group ( $P<0.05$ ). From the third day to the seventh day after the intervention, the escape latency of Morris water maze test of mice in the control group and AQP-9 group decreased gradually ( $P<0.05$ ), but there was no significant change in the escape latency of Morris water maze test of mice in the model group ( $P>0.05$ ). On the third, fourth and fifth day after the intervention, there was no significant difference in the escape latency of Morris water maze test of mice among the three groups ( $P>0.05$ ). On the sixth and seventh day after the intervention, the escape latency of Morris water maze test of mice in the model group was significantly longer than that in the control group ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in the escape latency of Morris water maze test of mice between the AQP-9 group and the control group on the sixth day after the intervention ( $P>0.05$ ). The escape latency of Morris water maze test of mice in the AQP-9 group was significantly shorter than that in the model group on the seventh day after the intervention ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression of AQP-9 is up-regulated in the hippocampus of HIE mice. Exogenous AQP-9 protein can improve the spatial learning and memory ability of HIE mice, and the mechanism may be related to exogenous AQP-9 protein promoting the expression of Ki-67.

**Key words:** hypoxic-ischemic encephalopathy; aquaporin-9; hippocampus; Ki-67; learning and memory ability

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是指围生期各种原因导致的新生儿缺氧缺血性脑部病变<sup>[1]</sup>。HIE 是新生儿死亡和继发性脑性瘫痪及智力障碍等的重要原因,发病机制复杂<sup>[2]</sup>。随着医疗技术的发展,HIE 患儿病死率逐年下降,但存活新生儿常遗留认知功能障碍,严重影响患儿的生存质量<sup>[3-4]</sup>。水通道蛋白-9(aquaporin-9, AQP-9)广泛存在于脑组织,在皮层和海马组织中均有表达<sup>[5-6]</sup>。有研究显示,AQP-9 对甘油、乳酸、尿素的强通透性不仅参与水的运输和平衡,而且参与脑组织能量代谢<sup>[7]</sup>。田培超等<sup>[8]</sup>研究发现,HIE 小鼠脑组织中 AQP-9 表达水平显著升高,提示 AQP-9 可能在 HIE 的发生和发展中发挥作用。有研究发现,小鼠海马组织损伤后 AQP-9 表达水平升高<sup>[9]</sup>,而海马是中枢神经系统中对空间记忆和学习至关重要的区域<sup>[10]</sup>,因此,APQ-9 可能与认知功能损害有关。陆蔚天等<sup>[11]</sup>建立了阿尔茨海默病小鼠模型,发现小鼠学习记忆能力明显下降,并且海马和齿状回组织中 APQ-9 表达明显上调,推测 APQ-9 与阿尔茨海默病小鼠的学习记忆损伤有关。本研究通过建立 HIE

小鼠模型,观察 HIE 小鼠空间学习记忆能力的变化和海马组织中 APQ-9 及增殖细胞核抗原 Ki-67 的表达,探讨 APQ-9 在 HIE 小鼠认知功能损伤中的作用及可能机制。

1 材料与方法

**1.1 实验动物** 90 只健康无特定病原级雄性昆明新生小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2021-0006,7 日龄,体质量( $6.25 \pm 1.02$ )g。

**1.2 主要试剂和仪器** 抗 AQP-9 和 Ki-67 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司,免疫荧光试剂盒购自上海卧宏生物科技有限公司,重组鼠 AQP-9 购自上海钰博生物科技有限公司,AQP-9 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物购自美国 Sigma 公司,生物素标记的羊抗兔免疫球蛋白 G、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)相关试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司,WD-9413C 型凝胶成像分析系统购自北京六一生物

科技有限公司,Champ Chemi™ Top 610 全自动化学发光荧光分析仪购自西安中团生物科技有限公司,CR22GⅢ高速离心机购自日本日立公司,Etho-Vision XT 7.0 行为影像采集系统购自荷兰 Noldus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组和 HIE 模型制备 将 90 只昆明小鼠随机分为对照组、模型组和 AQP-9 组,每组 30 只。对照组小鼠正常喂养,不建立 HIE 模型。模型组和 AQP-9 组小鼠参照 NEMETH 等<sup>[12]</sup>报道的方法构建 HIE 小鼠模型,模型制备方法:异氟烷吸入麻醉下行颈部正中切口,分离右侧颈总动脉,采用电凝法闭合颈总动脉,随后缝合伤口;术后将动物放置于 37 ℃ 密闭舱内,通入含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的氮气,将氧体积分数调至 8%,1.5 h 后取出,送回母鼠笼中继续喂养。建模成功后 30 min,AQP-9 组小鼠给予腹腔单次注射 20 μg AQP-9 进行干预,对照组和模型组小鼠腹腔注射等量的生理盐水。

1.3.2 脑组织取材 分别于干预后第 1、3、7 天,每组选取 10 只小鼠颈椎脱臼处死,剪下小鼠头部后立即在冰上解剖,分离并取出海马组织,标记后于 -70 ℃ 冰箱中保存备用。每次随机选取 5 只小鼠的海马组织制备石蜡切片,进行免疫荧光检测;另 5 只小鼠的海马组织分为 2 份,一份用于提取 RNA,另一份用于 Western blotting 检测。

1.3.3 反转录 PCR 法检测小鼠海马组织中 AQP-9 mRNA 表达 取对照组和模型组小鼠海马组织,采用 TRIzol 法提取总 RNA,以提取出的总 RNA 为模板,采用反转录试剂盒合成 cDNA,然后进行 PCR,反应条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,共计 40 个循环,以 GAPDH 为内参。AQP-9 上游引物序列为 5'-GCAGTAGCCATGTACAG-3',下游引物序列为 5'-TGACCATGACCATGAC-3';GAPDH 上游引物序列为 5'-ACCATAGCCATGGACATAG-3',下游引物序列为 5'-GTTACCATAGCCATGACA-3'。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶图像分析系统扫描条带的灰度值,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 AQP-9 mRNA 的相对表达量。实验重复 3 次,取均值。

1.3.4 免疫荧光法检测小鼠海马组织中 AQP-9 和 Ki-67 蛋白表达 取小鼠海马组织,40 g·L<sup>-1</sup> 多聚甲醛固定、水冲洗、梯度乙醇脱水、二甲苯中浸泡、石蜡包埋,制作 5 μm 厚的石蜡切片;将切片进行二甲苯浸泡脱蜡、抗原修复、体积分数 5% 山羊血清封闭;加 AQP-9(对照组和模型组)和 Ki-67(对照组、

模型组和 AQP-9 组)兔抗小鼠一抗(滴度 1:1 000),4 ℃ 孵育过夜;磷酸盐缓冲溶液清洗 3 次,每次 5 min;加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(滴度 1:500),室温孵育 1 h;4',6-二脒基-2-苯基吲哚染色 15 min,用 Tris 缓冲盐溶液洗涤 5 min;封片,荧光显微镜下观察并拍照。AQP-9、Ki-67 蛋白阳性表达为细胞质着红色,细胞核着蓝色,Merged 指 2 种染色同时出现。应用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析图像的吸光度值,以吸光度值表示 AQP-9 和 Ki-67 蛋白的相对表达量。

1.3.5 Morris 水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力 干预后第 3~7 天处死小鼠前进行 Morris 水迷宫测试。将 3 组小鼠分别从 4 个象限放入水中,记录小鼠爬上平台所用时间(平台置于第 3 象限,低于水位 2 cm),应用 EthoVision XT 7.0 行为影像采集系统记录小鼠 60 s 内爬上平台所需时间(逃避潜伏期)。逃避潜伏期越短,提示小鼠学习记忆力越好<sup>[13]</sup>。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,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 对照组和模型组小鼠海马组织中 AQP-9 mRNA 表达比较 结果见表 1。干预后第 1、3、7 天对照组小鼠海马组织中 AQP-9 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。模型组小鼠干预后第 3 天时海马组织中 AQP-9 mRNA 相对表达量显著高于干预后第 1、7 天,差异有统计学意义(*P* < 0.05);模型组小鼠干预后第 1 天与第 7 天时海马组织中 AQP-9 mRNA 相对表达量比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。干预后第 1、3、7 天,模型组小鼠海马组织中 AQP-9 mRNA 相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 1 对照组和模型组小鼠海马组织中 AQP-9 mRNA 相对表达量比较

Tab.1 Comparison of relative expression level of AQP-9 mRNA in hippocampus of mice between the control group and model group

组别	<i>n</i>	AQP-9 mRNA 相对表达量			<i>F</i>	<i>P</i>
		第 1 天	第 3 天	第 7 天		
对照组	5	0.65 ± 0.08	0.67 ± 0.10	0.66 ± 0.07	0.070	0.932
模型组	5	1.25 ± 0.08	2.54 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.21	65.779	0.000
<i>t</i>		11.859	16.673	39.396		
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000		

注:与第 1、7 天比较<sup>a</sup>*P* < 0.05。

**2.2 对照组和模型组小鼠海马组织中 AQP-9 蛋白相对表达量比较** 结果见图 1 和表 2。干预后第 1、3、7 天对照组小鼠海马组织中 AQP-9 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。模型组小鼠干预后第 3 天时海马组织中 AQP-9 蛋白相对表达量显著高于干预后第 1、7 天,差异有统计学意义( $P<0.05$ );模型组小鼠干预后第 1 天与第 7 天时海马组织中 AQP-9 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。干预后第 1、3、7 天,模型组小鼠海马组织中 AQP-9 蛋白相对表达量显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

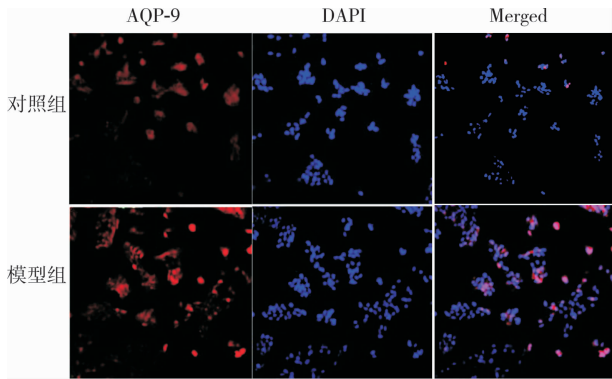


图 1 干预后第 3 天对照组和模型组小鼠海马组织中 AQP-9 蛋白表达(免疫荧光染色,×200)

Fig. 1 Expression of AQP-9 protein in hippocampus of mice in the control group and model group on the third day after intervention (immunofluorescence staining, ×200)

表 2 对照组和模型组小鼠海马组织中 AQP-9 蛋白相对表达量比较

Tab.2 Comparison of relative expression level of AQP-9 protein in hippocampus of mice between the control group and the model group

组别	n	AQP-9 蛋白相对表达量			F	P
		第 1 天	第 3 天	第 7 天		
对照组	5	785.26±101.23	780.26±124.31 <sup>a</sup>	783.33±118.94	0.002	0.998
模型组	5	1 042.31±185.36 <sup>a</sup>	1 424.35±201.34 <sup>a</sup>	1 124.36±214.35	5.021	0.026
t		2.722	6.087	3.111		
P		0.035	0.001	0.021		

注:与第 1、7 天比较<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

**2.3 对照组、模型组和 AQP-9 组小鼠海马组织中 Ki-67 蛋白相对表达量比较** 结果见图 2 和表 3。对照组小鼠干预后第 1、3、7 天海马组织中 Ki-67 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );模型组和 AQP-9 组小鼠干预后第 7 天时海马组织中 Ki-67 蛋白相对表达量显著高于干预后第 1、3 天,差异有统计学意义( $P<0.05$ );干预后第 1、3、7 天,模型组小鼠海马组织中 Ki-67 蛋白相对表达量显著高于对照组,AQP-9 组小鼠海马组织中 Ki-67 蛋

白相对表达量显著高于对照组和模型组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

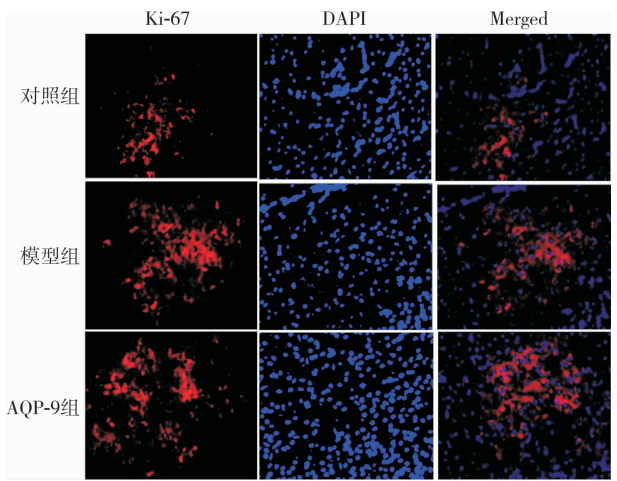


图 2 干预后第 7 天对照组、模型组和 AQP-9 组小鼠海马组织中 Ki-67 蛋白表达(免疫荧光染色,×200)

Fig.2 Expression of Ki-67 protein in hippocampus of mice in the control group,model group and AQP-9 group on the 7<sup>th</sup> day after intervention (immunofluorescence staining, × 200)

表 3 对照组、模型组和 AQP-9 组小鼠海马组织中 Ki-67 蛋白相对表达量比较

Tab.3 Comparison of relative expression level of Ki-67 protein in hippocampus of mice among the control group, model group and AQP-9 group

组别	n	Ki-67 蛋白			F	P
		第 1 天	第 3 天	第 7 天		
对照组	5	469.32±85.26	485.36±100.02	524.33±115.32	0.393	0.684
模型组	5	512.36±71.33 <sup>a</sup>	569.32±63.35 <sup>a</sup>	689.21±86.54 <sup>ab</sup>	4.403	0.026
AQP-9 组	5	639.21±96.54 <sup>ac</sup>	685.36±84.39 <sup>ac</sup>	836.25±96.32 <sup>abc</sup>	6.386	0.013
F		3.957	6.087	12.149		
P		0.041	0.009	0.001		

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与第 1、3 天时比较<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

**2.4 对照组、模型组和 AQP-9 组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期比较** 结果见表 4。干预后第 3~7 天,对照组和 AQP-9 组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期均逐渐缩短( $P<0.05$ ),而模型组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期无显著变化( $P>0.05$ )。干预后第 3、4、5 天,3 组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );干预后第 6、7 天时,模型组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期显著长于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。干预后第 6 天,AQP-9 组与对照组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );干预后第 7 天,AQP-9 组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期显著短于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 4 对照组、模型组和 AQP-9 组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期比较

Tab.4 Comparison of the escape latency in Morris water maze test of mice among the control group,model group and AQP-9 group

组别	n	逃避潜伏期/s					F	P
		第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天		
对照组	10	45.23 ± 9.32	42.30 ± 6.38	36.02 ± 7.03	33.28 ± 4.39	25.39 ± 6.12	10.265	0.009
模型组	10	46.25 ± 5.36	45.26 ± 7.14	42.36 ± 11.52	44.39 ± 8.07 <sup>a</sup>	43.25 ± 6.27 <sup>a</sup>	0.201	0.681
AQP-9 组	10	45.02 ± 10.00	43.29 ± 8.17	38.69 ± 13.07	36.32 ± 9.01	31.52 ± 5.01 <sup>b</sup>	6.352	0.039
F		0.536	0.496	2.025	4.021	7.021		
P		0.680	0.821	0.102	0.038	0.008		

注:与对照组比较<sup>a</sup>P < 0.05;与模型组比较<sup>b</sup>P < 0.05。

3 讨论

HIE 是新生儿死亡和发生神经系统后遗症的主要原因,近年来,随着医疗技术的发展,HIE 患儿存活率显著提高,但 HIE 患儿往往存在不同程度的神经系统后遗症,给患儿及其家庭、社会造成沉重的负担<sup>[14]</sup>。HIE 发病机制复杂,是一个多环节、多因素的病理生理过程。因此,阐明导致新生儿 HIE 的发病机制对降低 HIE 的伤残率具有重要意义。

学习和记忆是人类赖以生存、不可缺少的高级神经生理活动,缺血缺氧会导致局部脑组织损伤,损害大脑的学习记忆功能,海马主要负责长时记忆的存储转换和定向等功能,与学习和记忆功能密切相关<sup>[15]</sup>。AQP-9 广泛存在于细胞膜上,是具有促进水分子快速跨细胞膜转运作用的水通道蛋白<sup>[16]</sup>。AQP-9 在神经系统中的主要作用是参与水平衡和能量代谢,对脑内水转运和脑脊液循环有重要作用<sup>[17]</sup>。田培超等<sup>[8]</sup>研究发现,HIE 小鼠建模后 30、60、90、120 min,顶叶组织中 AQP-9 mRNA 和蛋白的相对表达量显著高于正常小鼠,提示 AQP-9 可能在 HIE 的发生、发展中发挥重要作用。本研究结果显示,干预后第 1、3、7 天,模型组小鼠海马组织中 AQP-9 mRNA 和蛋白的相对表达量显著高于对照组,模型组小鼠干预后第 3 天时海马组织中 AQP-9 mRNA 和蛋白的相对表达量显著高于干预后第 1、7 天,提示 AQP-9 在 HIE 小鼠海马组织中表达上调,且 AQP-9 的表达可能有时间窗,AQP-9 可能与小鼠 HIE 的发生、发展有关。小鼠脑部缺血缺氧可导致细胞膜上 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶功能障碍,上调蛋白激酶 A 的表达,激活 AQP-9 mRNA 表达,从而使 AQP-9 蛋白表达升高。本研究采用 Morris 水迷宫实验观察 3 组小鼠的空间学习记忆能力,结果显示,随着测试时间延长,对照组和 AQP-9 组小鼠逃避潜伏期均明显缩短,而模型组小鼠逃避潜伏期未见明显变化;干预后第 6、7 天,模型组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期显著长于对照组,提示 HIE 小鼠的空间学习记忆

能力受损。干预后第 7 天,AQP-9 组小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期显著短于模型组,提示外源性 AQP-9 可以显著改善 HIE 小鼠的空间学习记忆能力。HWANG 等<sup>[18]</sup>研究发现,沙鼠脑缺血缺氧 5 min 后海马 CA1 区胶质细胞中 AQP-9 mRNA 表达明显上调。JI 等<sup>[9]</sup>研究发现,缺血缺氧后小鼠海马神经元明显丢失,血管生成明显减少,且海马中 AQP-9 蛋白表达水平明显上升。

Ki-67 是细胞增殖的内源性标志物。王骅等<sup>[19]</sup>研究发现,HIE 新生小鼠脑组织中 Ki-67 表达水平明显下降,提示缺血缺氧损伤会降低神经细胞增殖。本研究结果显示,干预后第 1、3、7 天,模型组小鼠海马组织中 Ki-67 蛋白表达显著高于对照组,AQP-9 组小鼠海马组织中 Ki-67 蛋白表达显著高于对照组和模型组,提示外源性 AQP-9 蛋白可能通过上调 Ki-67 蛋白表达而诱导神经细胞增殖,从而改善 HIE 小鼠的空间学习记忆能力。

综上所述,AQP-9 在 HIE 小鼠海马组织中表达上调,且表达有时间窗;外源性 AQP-9 可能通过促进 Ki-67 蛋白的表达而诱导神经细胞增殖,从而改善小鼠的空间学习记忆能力。本研究尚存在不足之处,虽然发现外源性 AQP-9 可能通过促进 Ki-67 蛋白表达而诱导神经细胞增殖,但未明确其具体的机制;另外,本研究检测了海马组织中 AQP-9 的表达,未检测大脑皮层及基底节区 AQP-9 的表达,而这些脑区与认知功能密切相关;这些方面有待于后期实验进一步研究。

参考文献:

[1] MASSARO A N,WU Y W,BAMMLER T K,et al. Plasma biomarkers of brain injury in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *J Pediatr*,2018,194(1):67-75.

[2] YILDIZ E P,EKICI B,TATLI B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment [J]. *Expert Rev Neurother*,2017,17(5):449-459.

[3] GOREN B,CAKIR A,OCALAN B,et al. Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Brain Res*,2017,1659(1):81-87.

[4] 曹悦悦,王玉骁,李阳,等. 关于新生儿缺血缺氧性脑病的研究

进展[J]. 现代生物医学进展,2018,18(3):585-587.

CAO Y Y, WAN Y X, LI Y, *et al.* The research progress of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Prog Mod Biomed*, 2018, 18(3):585-587.

[5] BADAUT J. Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies[J]. *Neuroscience*, 2010, 168(4):1047-1057.

[6] CALAMITA G, PERRET J, DELPORTE C. Aquaglyceroporins: drug targets for metabolic diseases[J]. *Front physiol*, 2018, 9(1):851-859.

[7] LAFORENZA U, BOTTINO C, GASTALDI G. Mammalian aquaglyceroporin function in metabolism[J]. *Biochim Biophysica Acta*, 2016, 1858(1):1-11.

[8] 田培超,王怀立,罗强,等. 水通道蛋白-9 在小鼠脑缺氧缺血性脑病脑组织中的表达及意义[J]. 中华实验外科杂志,2013,30(9):1851-1852.

TIAN P C, WANG H L, LUO Q, *et al.* Expression and significance of aquaporin-9 in brain tissues of mice with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Chin J Exp Surg*, 2013, 30(9):1851-1852.

[9] JI W Y, WANG J, XU J, *et al.* Lack of aquaporin 9 reduces brain angiogenesis and exaggerates neuronal loss in the hippocampus following intracranial hemorrhage in mice[J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 61(3):351-358.

[10] CHEN H Y, IINUMA M, ONOZUKA M, *et al.* Chewing maintains hippocampus-dependent cognitive function[J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12(6):502-509.

[11] 陆蔚天,黄娟,李昱,等. AQP9 在 APP/PS1 双转基因小鼠海马中的表达变化[J]. 重庆医科大学学报,2017,42(1):120-124.

LU W T, HUANG J, LI Y, *et al.* Changes in expression of Aquaporin-9 in the hippocampus of APP/PS1 double transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2017, 42(1):120-124.

[12] NEMETH C L, DRUMMOND G T, MISHRA M K, *et al.* Uptake of dendrimer-drug by different cell types in the hippocampus after hypoxic-ischemic insult in neonatal mice: effects of injury, microglial activation and hypothermia [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(7):2359-2369.

[13] WANG Y Z, HAN S, HAN R Q, *et al.* Propofol-induced downregulation of NR2B membrane translocation in hippocampus and spatial memory deficits of neonatal mice[J]. *Brain Behav*, 2017, 7(7):e00734.

[14] 王鑫,姜泓. 新生儿缺氧缺血性脑病的病因和发病机制研究进展[J]. 新乡医学院学报,2019,36(2):194-197.

WANG X, JIANG H. Research progress in etiology and pathogenesis of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2019, 36(2):194-197.

[15] ZHAO Z H, ZHENG G, WANG T, *et al.* Low-level gestational lead exposure alters dendritic spine plasticity in the hippocampus and reduces learning and memory in rats[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):3533.

[16] HAN X J, HUANG Q, LIU L, *et al.* Changes in the expression of AQP4 and AQP9 in the hippocampus following eclampsia-like seizure[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1):300.

[17] SULYOK E, VAJDA Z, DOCZI T, *et al.* Aquaporins and the central nervous system[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2004, 146(9):955-960.

[18] HWANG I K, YOO K Y, LI H, *et al.* Aquaporin 9 changes in pyramidal cells before and is expressed in astrocytes after delayed neuronal death in the ischemic hippocampal CA1 region of the gerbil[J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(11):2470-2479.

[19] 王骅,王静成,王永祥,等. NEP1-40 对缺氧缺血性脑病新生大鼠的 Wnt 信号通路胞增殖的调控作用[J]. 实用临床医药杂志,2017,21(5):1-4.

WANG H, WANG J C, WANG Y X, *et al.* Role of NEP1-40 in regulation of Wnt signaling pathway and regeneration of neonatal cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *J Pract Clin Med*, 2017, 21(5):1-4.

( 本文编辑:徐自超 )

《新乡医学院学报》2022 年征订启事

《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University)创刊于 1984 年,是新乡医学院主管主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-7239,国内统一连续出版物号:CN 41-1186/R。现为月刊,每月 5 日出版,大 16 开本,每期 100 页。本刊设有专家论坛、专题报告、国家自然科学基金专题评述、基础研究、临床研究、综述等栏目。编辑部对来稿审理及时并严格执行“三审制”,对国家级、省部级科研基金项目资助的研究性论文优先发表。

本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国精品科技期刊、中国高校优秀科技期刊、河南省一级期刊、RCCSE 中国核心学术期刊(A),目前被《中国学术期刊(光盘版)全文数据库》《万方数据-数字化期刊群》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、英国《公共卫生数据库》(Global Health)、《中国学术期刊文摘》《中国医学文摘》《中国药科学文摘》等国内外权威性数据库、文摘期刊收录,标志着在本刊发表的论文将有机会被国内外著名检索系统收录,这对提高作者知名度及论文的影响力不无裨益。欢迎国内外医药工作者踊跃投稿。欢迎广大订户前往当地邮局订阅,邮发代号:36-145,每期定价 10.00 元,全年 120.00 元。编辑部地址:河南省新乡市金穗大道东段新乡医学院学报编辑部,邮政编码:453003。电话:0373-3029086,传真:0373-3831371,网址:www. xxyxyxb. com, E-mail: xxyxyxb@ 163. com。

本刊编辑部