

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000572

脑出血脑组织中水通道蛋白 4 的极性表达缺失

邱国平, 孙善全, 卓 飞, 徐 进, 刘 辉, 杨 美

(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)大鼠脑组织中水通道蛋白 4(aquaporin 4, AQP4)的极性表达变化情况,以初步探讨其在出血性脑水肿中的作用。**方法:**SD 大鼠随机分为 sham 组和 ICH 组,采用自体血注入法建立大鼠 ICH 动物模型,应用核磁共振成像检测血肿产生及发展情况,干湿重法检测脑水含量变化以及免疫荧光检测 AQP4 的极性表达变化情况。**结果:**ICH 后 1 d,血肿体积最大,脑水含量达到峰值,高达 $(79.769 \pm 0.710)\%$,差值具有统计学意义($P=0.000$);血肿周围组织中 AQP4 极性表达缺失, AQP4 表达在星胶细胞胞体和突起上,而 sham 组中 AQP4 则极性表达在星胶细胞终足膜上。**结论:**ICH 后血肿周围组织中 AQP4 极性表达缺失,后者可能促进了出血性脑水肿的发生。

【关键词】水通道蛋白;脑出血;脑水肿;极性表达

【中图分类号】R743.34

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-01-04

Loss of aquaporin 4 polarized expression in the brain following intracerebral hemorrhage

Qiu Guoping, Sun Shanquan, Zhuo Fei, Xu Jin, Liu Hui, Yang Mei

(Teaching and Research Section of Anatomy, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the changes of aquaporin 4 (AQP4) polarized expression in the brain following intracerebral hemorrhage (ICH), and to explore its roles in the brain edema following ICH. **Methods:** Rats were randomly divided into ICH group and sham group; and autologous blood was injected into the right caudate nucleus to establish ICH model in rats. The hematoma volume was measured by magnetic resonance imaging, the brain water content (BWC) was measured by the wet and dry weight methods, and the polarized expression of AQP4 was detected by immunofluorescence. **Results:** On d1 post ICH, the hematoma volume reached the peak, the BWC reached its maximal value $(79.769 \pm 0.710)\%$, and the difference between the sham group and the d1 post-ICH group was statistically significant ($P=0.000$). In the perihematomal tissue, the polarized expression of AQP4 was lost, and AQP4 was expressed in astrocytic soma. However, in the sham tissue, AQP4 was polarized expressing in astrocytic end-foot membrane. **Conclusion:** In the perihematomal tissue of brain following ICH, the polarized expression of AQP4 is lost, which may contribute to the formation of brain edema following ICH.

【Key words】 aquaporin; intracerebral hemorrhage; brain edema; polarized expression

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是临床上的常见病、多发病,其发病率,死亡率,致残率均较高^[1-2]。脑水肿是 ICH 最重要的并发症之一,严重

的脑水肿可引起颅内压增加,脑血流量减少,甚至脑疝引起病人死亡^[3]。因此,对出血性脑水肿形成机制进行深入研究,具有重要的理论意义和潜在的应用价值。

近年来,水通道蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4) 在脑内水电解质平衡中的作用受到广泛关注。研究发现, AQP4 只有极性表达在星胶细胞终足膜上,才能正确行使其水转运功能^[4],而病理情况下, AQP4 的极性表达变化则在病理性脑水肿的发生发展中发挥了重要作用^[5-7]。对于 ICH 这一常见病,多发病,目

作者介绍:邱国平, Email: qiuqp@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, cstc2011jjA10093)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150320.2123.003.html>
(2015-03-20)

前的研究^[8-9]集中在 ICH 后脑组织中 AQP4 表达量是否变化方面,而对 AQP4 极性表达是否变化,极性表达变化是否与出血性脑水肿相关,目前尚未见报导。为此,本研究拟采用自体血注入法建立大鼠 ICH 动物模型,并运用一系列研究方法,探索 ICH 脑组织中 AQP4 的极性表达变化情况,及其在出血性脑水肿中的作用,以期为临床治疗 ICH 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性 SD 大鼠 28 只,体质量 200~250 g,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。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。在动物饲养和实验过程中,本研究符合重庆医科大学实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。根据随机数字表,将大鼠随机分为 sham 组(7 只)和 ICH 组(21 只,分为 ICH 后 1、3、7 d)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 ICH 动物模型 参照 Nath 等^[10]报导的方法,大鼠经 3.5% 水合氯醛(1 ml/100 g 体质量)腹腔注射麻醉后,俯卧位固定于脑立体定位仪上。参照大鼠脑立体定位图谱,调整立体定位仪使大鼠门齿沟平面比耳间线平面低 2.4 mm,此时前后囟门在同一高度水平。去毛消毒后,行头皮正中矢状切口,分离骨膜,暴露前囟。在前囟后 0.3 mm,向右旁开 3 mm 位置钻一直径 1 mm 的小孔。断尾取大鼠自体血 50 μ l,将微量进样器固定到立体定位仪上,沿钻孔缓慢垂直进针 5.8 mm,即为右侧尾状核位置。在 2 min 内匀速的将自体血注射到尾状核,停针 10 min,缓慢退针,骨蜡封闭钻孔,缝皮后回笼饲养。sham 组除不将自体血注入到尾状核外,其余操作同手术组。术后待大鼠清醒以观察神经症状和体征,根据 Bederson 等^[11]的方法进行神经功能障碍评分,其中,没有症状者计 0 分,对侧前肢屈曲计 1 分,一侧肢体瘫痪但没有转圈的计 2 分,有转圈行为的计 3 分。只有评分大于 2 分的大鼠才可以进行下一步实验。

1.2.2 核磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI) sham 组与 ICH 后 1、3、7 d 共 4 组大鼠,每组 3 只,到达预定时间,麻醉后固定于 Signa Infinity Echo Speed Plus 1.5T MR 机(GE 公司,美国)上。采用 T2 加权成像(T2TWT)进行脑部扫描,扫描参数:反复时间(TR)4 000 ms,组织当量(TE)92.3 ms,层厚 1 mm,间距 1 mm,视野 4 cm $\times$ 4 cm,矩阵 512 $\times$ 256。

1.2.3 脑含水量(brain water content, BWC)检测 将 MRI 扫描后的大鼠直接断头取脑,剥去脑膜,称量出血侧大脑半球得湿重,然后将其置于 110℃ 烤箱中 48 h,称量得干重。BWC 按下面公式计算得出: $BWC = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$ 。

1.2.4 组织切片 sham 组与 ICH 后 1、3、7 d 共 4 组大鼠,每组 4 只,到达预定取材时间,麻醉后经心脏灌注冰生理盐水约 300 ml,断头取出脑组织,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 μ m。切片晾干后在室温下放入 4% 多聚甲醛中后固定 30 min,晾干备用。

1.2.5 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,滴加一抗(兔抗大鼠 AQP4 单克隆抗体,1:200, Abcam 公司;和小鼠抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)单克隆抗体,1:100, BD 公司,美国),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,放置 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。

1.3 统计分析

采用 SPSS19.0 专用统计分析软件对数据进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。对 BWC 结果经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 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MRI 结果

本研究对各组大鼠进行了 MRI 扫描,以检测 50 μ l 自体血注入大鼠尾状核后,脑组织中血肿的产生及其发生发展情况。图片显示的是每一组大鼠脑组织中血肿直径最大时的代表性影像。在 sham 组脑组织中,只能见到针道,见不到任何血肿影像;而在各 ICH 模型组中均可见到明确的血肿组织,其中,ICH 后 1 d,血肿最为明显,直径最大;ICH 后 3、7 d,血肿体积逐渐缩小(图 1)。

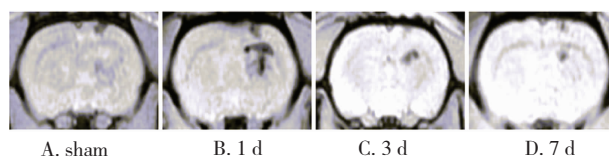


图 1 ICH 脑组织中 MRI 结果

Fig.1 MRI results of the brain post-ICH

2.2 BWC 结果

本研究利用干湿重法对大鼠出血侧脑组织进行了 BWC 检测,以观察 ICH 后脑组织的水肿情况。结果显示,4 组比较差异有统计学意义($F=13.844, P=0.002$)。进一步两两比较:与 sham 组($77.895 \pm 0.185\%$)比较,ICH 后 1 d 的 BWC 达到峰值,高达($79.769 \pm 0.710\%$),差值具有统计学意义($P=0.000$)。

ICH 后 3 d 的 BWC 为 $(78.883 \pm 0.459)\%$, 7 d 的 BWC 为 $(78.141 \pm 0.047)\%$, 均明显降低, 与 ICH 后 1 d 比较, 差值具有统计学意义 (1 d vs. 3 d $P=0.015$, 1 d vs. 7 d $P=0.001$)。具体结果见表 1。

表 1 ICH 后脑组织的 BWC 结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)
Tab.1 Results of BWC in the brain post-ICH ($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	BWC	整体比较
sham	77.895 ± 0.185	$F=13.844$
1 d	79.769 ± 0.710	$P=0.002$
3 d	78.883 ± 0.459	
7 d	78.141 ± 0.047	
两两比较	Sham vs. 1 d	$P=0.000$
	Sham vs. 3 d	$P=0.024$
	Sham vs. 7 d	$P=0.506$
	1 d vs. 3 d	$P=0.015$
	1 d vs. 7 d	$P=0.001$
	3 d vs. 7 d	$P=0.069$

2.3 AQP4 表达变化情况

本研究利用激光共聚焦扫描检测脑组织中 AQP4 的表达变化情况。结果显示, sham 组中 AQP4 极性表达在软脑膜下星胶细胞终足膜构成的外胶质界膜 (图 2A), 室管膜细胞底部及其下的内胶质界膜 (图 2B) 以及尾状核的毛细血管周围星胶细胞终足膜 (图 2C)。而在 ICH 脑组织中, AQP4 的极性表达缺失, 具体表现为, AQP4 断续的, 成团的聚集在软脑膜下 (图 2D); AQP4 弥漫性的表达在室管膜细胞上, 而非其基底部 (图 2E); 在血肿周围组织中, AQP4 不再表达在毛细血管周围星胶细胞终足膜上, 而是表达在星胶细胞胞膜上 (图 2F)。

本研究还检测了 AQP4 (绿色荧光) 与星形胶质细胞特异性标记物 GFAP (红色荧光) 的共表达 (黄色) 情况。结果发现, 在血肿周围的疏松组织中, AQP4 与 GFAP 共表达在星胶细胞胞体与突起上 (图 3B); 而 sham 组中, AQP4 与 GFAP 共表达在血管周围星胶细胞终足膜上, 星胶细胞胞体上未见 AQP4 的表达 (图 3A)。

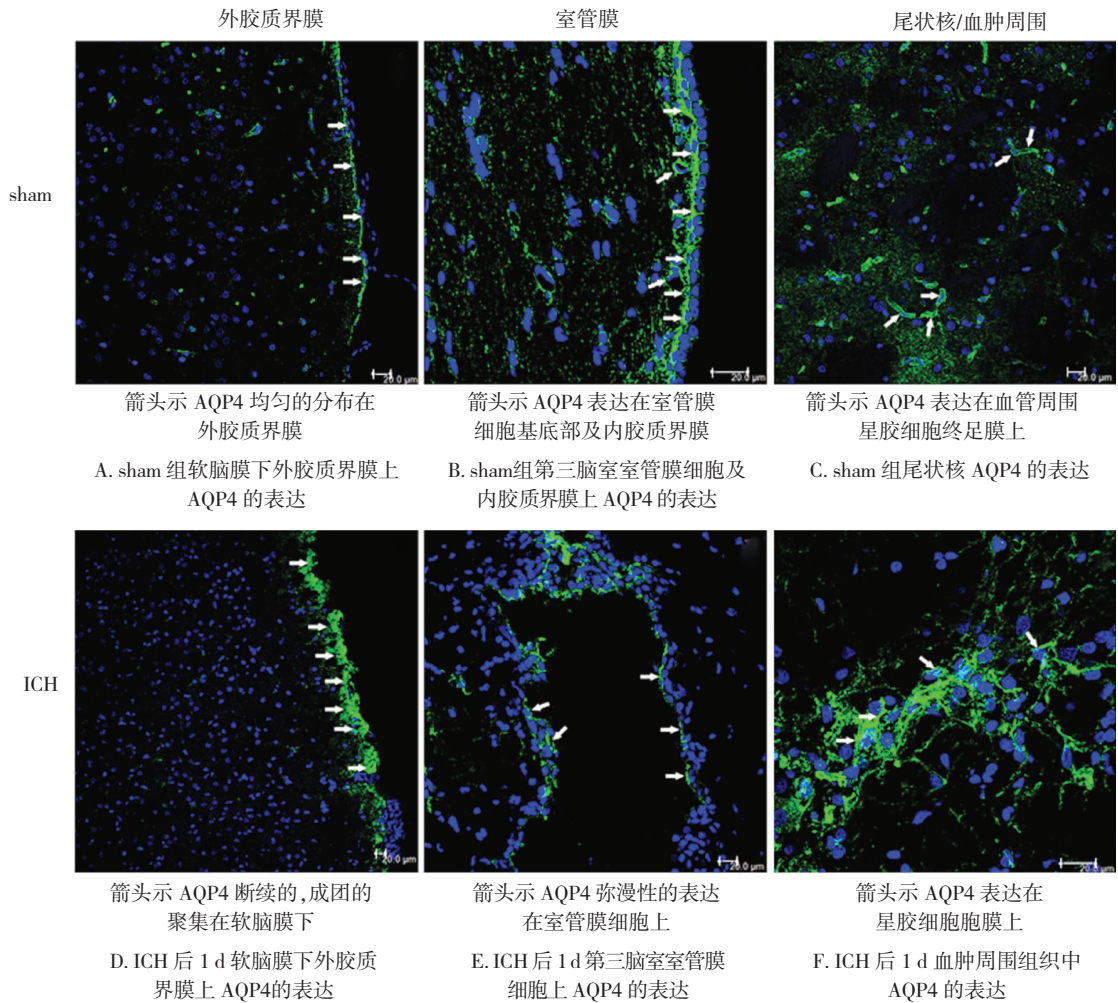


图 2 AQP4 表达部位变化 (免疫荧光, 标尺: 20 μm)
Fig.2 Changes of AQP4 localization (Immunofluorescence, scale bars: 20 μm)

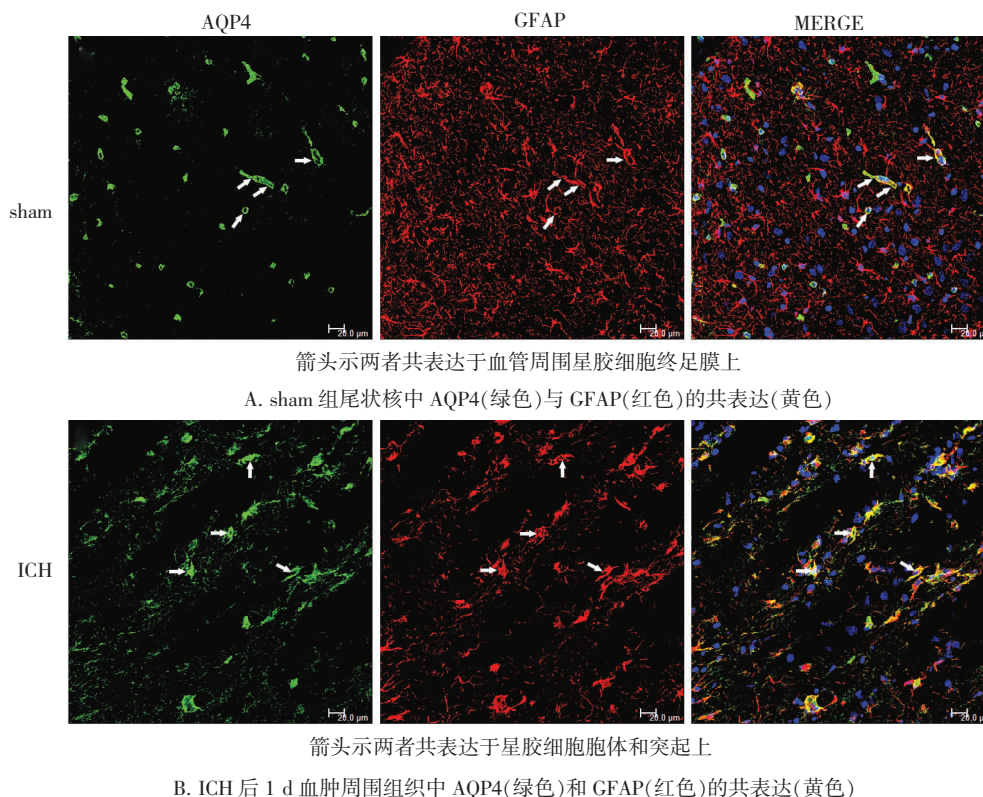


图 3 激光共聚焦成像显示 sham 组与 ICH 后 1 d 脑组织中 AQP4 与 GFAP 共表达情况 (标尺:20 μm)

Fig.3 Representative images showing the co-expression of AQP4 and GFAP in the brain of sham and d1 post-ICH (scale bars:20 μm)

3 讨 论

目前,越来越多的研究者利用自体血注入法建立实验性 ICH 动物模型^[12-13],该方法能有效的、可重复的模拟人类 ICH 后脑组织病理生理过程。本研究利用 50 μl 自体血注入大鼠尾状核建立 ICH 动物模型,MRI 扫描发现,ICH 后 1、3、7 d 的脑组织中均可见到明显的、边境清楚的血肿组织。其中,ICH 后 1 d 的血肿组织最为明显。伴随着血肿的发展,脑水肿出现,ICH 后 1、3 d 的 BWC 明显增高,其中 ICH 后 1 d 的 BWC 达到其峰值。这些结果表明,ICH 后脑组织存在着水平衡紊乱。

水通道蛋白家族(aquaporins, AQPs)的发现,为进一步研究脑内水电质平衡提供了新契机。AQPs 是一类介导水分子快速跨膜转运的细胞膜蛋白,广泛分布于植物、动物及微生物中与水代谢密切相关的各种器官^[14]。迄今为止,人类已经从哺乳动物体内分离克隆出 13 种水通道蛋白^[14],即 AQP0~AQP12。根据 AQPs 对水和其它溶质的通透性,AQPs 可以被

分为 3 个亚族^[14-15]:其中 AQP0、AQP1、AQP2、AQP4、AQP5、AQP6、AQP8 为一亚族,具有高度选择的水通透性;而 AQP3、AQP7、AQP9、AQP10 为第二亚族,不仅转运水,对尿素和甘油也具有较高的通透性,除此之外,AQP9 还对乳酸、甘油、多元醇具有通透性;第三个亚族则命名为超水通道家族,包括 AQP10 和 AQP11,其位于细胞内,具有特异性的门冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸盒式结构。

水在细胞、组织间隙、血管和脑室间的转运由 AQP4 顺着渗透压和流体静力压梯度而介导^[14]。作为脑内含量最多,表达最丰富,功能最重要的一种水通道蛋白,AQP4 密集表达在脑实质与脑脊液、血液交界处的胶质细胞终足膜上,参与形成胶质界膜^[16]。在本实验的 sham 组脑组织中,软脑膜下星胶细胞终足膜构成的外胶质界膜、脑室室管膜细胞基底部及其下星胶细胞终足膜构成的内胶质界膜以及脑实质内血管周围星胶细胞终足膜上,均可见到 AQP4 密集的表达,这些结果与既往研究一致^[14-15]。进一步研究^[17]发现,占星形胶质细胞体表面积 90% 的非终足膜上表达的 AQP4 约占 AQP4 总量的 10%,而仅

占星形胶质细胞体表面积 10% 的终足膜上则表达了约 90% 的 AQP4, 研究者将 AQP4 在星胶细胞终足膜上集中表达这一模式称之为 AQP4 的“极性分布”。AQP4 的极性分布是血脑/血脑脊液间水调节与转运的重要结构基础^[4], AQP4 只有极性表达在星胶细胞终足膜上, 才能正确发挥其水转运功能。

AQP4 的极性表达变化在病理性脑水肿的发生发展中发挥了重要作用。研究者在大脑中动脉栓塞模型中发现^[5], 缺血核心区脑组织中 AQP4 极性表达障碍, 表现为血管周围 AQP4 表达明显降低, 三维重建发现 AQP4 呈散在的, 斑点样的表达在毛细血管上。人颞叶癫痫组织中也发现毛细血管周围星胶细胞终足膜上近神经毡侧的 AQP4 表达明显降低, AQP4 的错误定位是癫痫发病过程中的必备要素^[18]。在脑肿瘤^[7], 脑挫伤或细菌性脑膜炎^[6]等病理情况下, AQP4 在血管周围星胶细胞终足膜的极性表达障碍, 最终促进了病理性脑水肿的发生。

本研究在大鼠 ICH 后脑组织中发现, 与 sham 组尾状核中 AQP4 极性表达在血管周围星胶细胞终足膜上不同, ICH 后 1 d 血肿周围组织中, AQP4 表达在星胶细胞胞体和突起上, 即星胶细胞非终足膜域; 在出血侧软脑膜下外胶质界膜, AQP4 呈断续的, 成团的聚集于此; 而在出血侧脑室室管膜细胞上, AQP4 不再局限于其基底部及内胶质界膜, 而是弥散的表达于室管膜细胞上。这些结果提示, ICH 后脑组织中 AQP4 极性表达缺失。结合 ICH 后 1 d 的 BWC 明显增高的结果, 本研究可以做出如下推测: 生理情况下, 组织细胞活动时产生的水分经终足膜上极性表达的 AQP4 介导到毛细血管, 此时, 极性表达的 AQP4 维持了脑内水电解质动态平衡; 而在 ICH 后脑组织中, AQP4 极性表达缺失, 即终足膜上表达的 AQP4 明显降低, 导致组织细胞活动时产生的水分得不到及时有效的排出, 水分积聚到组织间隙, 最终导致了出血性脑水肿的发生。

综上所述, ICH 脑组织中存在 AQP4 极性表达缺失, 后者促进了出血性脑水肿的发生。AQP4 的极性表达可能与肌萎缩蛋白-肌营养不良聚糖蛋白复合物相关, 这是本课题组下一步研究的方向。

参 考 文 献

[1] Sangha N, Gonzales NR. Treatment targets in intracerebral hemorrhage[J]. Neurotherapeutics, 2011, 8(3): 374-387.

[2] Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. Intracerebral haemorrhage[J]. The Lancet, 2009, 373(9675): 1632-1644.

[3] Qureshi AI, Palesch YY, Martin R, et al. Effect of systolic blood pressure reduction on hematoma expansion, perihematomal edema, and 3-month outcome among patients with intracerebral hemorrhage: results from the antihypertensive treatment of acute cerebral hemorrhage study[J]. Archives of neurology, 2010, 67(5): 570-576.

[4] Neely JD, Amiry MM, Ottersen OP, et al. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(24): 14108-14113.

[5] 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.

[6] Saadoun S, Papadopoulos M, Krishna S. Water transport becomes uncoupled from K⁺ siphoning in brain contusion, bacterial meningitis, and brain tumours: immunohistochemical case review[J]. Journal of clinical pathology, 2003, 56(12): 972-975.

[7] Wolburg H, Noell S, Fallier BP, et al. The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2012, 33(5-6): 579-589.

[8] Zhong Z, Wang B, Dai M, et al. Carvacrol alleviates cerebral edema by modulating AQP4 expression after intracerebral hemorrhage in mice[J]. Neurosci Lett, 2013(555): 24-29.

[9] Tang Y, Wu P, Su J, et al. Effects of Aquaporin-4 on edema formation following intracerebral hemorrhage[J]. Exp Neurol, 2010, 223(2): 485-495.

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

[11] 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.

[12] Knight RA, Han Y, Nagaraja TN, et al. Temporal MRI assessment of intracerebral hemorrhage in rats[J]. Stroke, 2008, 39(9): 2596-2602.

[13] MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(3): 516-525.

[14] Iacovetta C, Rudloff E, Kirby R. The role of aquaporin 4 in the brain[J]. Vet Clin Pathol, 2012, 41(1): 32-44.

[15] Zelenina M. Regulation of brain aquaporins[J]. Neurochem Int, 2010, 57(4): 468-488.

[16] Nozaki K, Ishii D, Ishibashi K. Intracellular aquaporins: clues for intracellular water transport? [J]. Pflugers Arch, 2008, 456(4): 701-707.

[17] Amiry MM, 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.

[18] Alvestad S, Hammer J, Hoddevik EH, et al. Mislocalization of AQP4 precedes chronic seizures in the kainate model of temporal lobe epilepsy[J]. Epilepsy Res, 2013, 105(1-2): 30-41.

(责任编辑: 关蕴良)