

· 基础研究 ·

# 新生大鼠持续缺氧条件下水通道蛋白 4 与脑水肿的关系

贾 佳<sup>1</sup>, 余加林<sup>1△</sup>, 孙善全<sup>2</sup>

(1. 重庆医科大学附属儿童医院新生儿科/儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室/  
儿科学重庆市重点实验室/重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际  
科技合作基地 400014; 2. 重庆医科大学神经科学研究中心 400016)

**摘要:**目的 探讨水通道蛋白 4(AQP4)在新生大鼠持续缺氧过程中与脑水肿的关系。方法 健康 10 d 龄 SD 大鼠,随机分为对照组和实验组。实验组结扎右侧颈总动脉,然后缺氧不同时间分为缺氧缺血(HI)2 h 组、HI 4 h 组、HI 8 h 组、HI 16 h 组 4 个亚组,对照组行假手术。观察每组动物神经行为学改变,各组实验取脑组织,行苏木精伊红(HE)染色、免疫组织化学染色、荧光定量 PCR,观察新生大鼠海马 CA1 区形态变化和 AQP4 表达水平。**结果** 实验组均出现不同程度的缺氧症状;实验组与对照组比较,有不同程度的水肿,且随着时间的延长,水肿加重,神经元呈现不可逆损伤;AQP4 蛋白和 RNA 的表达水平呈下降趋势。**结论** AQP4 表达水平下降参与新生大鼠持续缺氧缺血条件下脑水肿的形成。

**关键词:**水通道蛋白 4; 新生大鼠; 缺氧缺血, 脑; 脑水肿

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2959-03

## The relationship of AQP4 and brain edema under the condition of continue hypoxia in newborn rat

Jia Jia<sup>1</sup>, Yu Jialin<sup>1△</sup>, Sun Shanquan<sup>2</sup>

(1. Department of Neonatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University/Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing/Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China;  
2. Institute of Neurobiology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**Abstract:** **Objective** To determine the relationship of AQP4 and brain edema under the condition of continue hypoxia in newborn rat. **Methods** Healthy and 10-day-old SD rats were randomly divided into control and experimental groups. Experimental group, the right common carotid artery ligation and hypoxia at different times into 2 h, 4 h, 8 h, 16 h four sub-groups, the control group were sham-operated. Observed each animal nervous behavior change, and killed them at corresponding time points, hematoxylin-eosin staining to observe rat hippocampal CA1 region morphology, and calculated the relative expression of AQP4 by immunohistochemistry and fluorescence quantitative PCR. **Results** The experimental group showed different degrees of hypoxia symptoms; the experimental groups, compared with control group, had different degree of edema, and the degree of edema was serious with the extension of time, neurons exhibited irreversible damage; the expression of the AQP4 protein and AQP4 RNA were related downward trend. **Conclusion** The reduced expression of AQP4 participates the formation of cerebral edema in the neonatal rat hypoxic-ischemic conditions.

**Key words:** aquaporin 4; neonate rat; hypoxia-ischemia, brain; brain edema

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是指围产期窒息导致的缺氧缺血性脑损伤,是新生儿常见的死亡原因之一。其早期主要表现是脑水肿,水肿程度是决定 HIE 病情及预后的一个重要因素。目前, HIE 动物模型已经很成功地用于实验研究,但是, HIE 模型是短暂缺氧缺血后再复氧的过程,无法模拟长时间缺氧缺血的情况。本课题主要应用 HIE 模型的基础上,延长缺氧时间,以对缺氧缺血最敏感部位海马 CA1 区为主要观察点,通过比较不同缺氧时间研究水通道蛋白 4(aquaporin 4, AQP4)表达水平与脑水肿的关系。

### 1 材料与方法

**1.1 动物选择及分组** 新生 10 d 龄健康 SD 大鼠,雌雄不限,由重庆医科大学动物实验中心提供。随机分为对照组和实验组,实验组依据持续缺氧缺血(hypoxia-ischemia, HI)时间的不

同分为 HI 2 h 组、HI 4 h 组、HI 8 h 组、HI 16 h 组,每组 8 只。

**1.2 主要试剂及仪器** 主要试剂:小鼠抗大鼠 AQP4 单克隆抗体(sc-58612, Santa Cruz Biotechnology, Inc.); SAP 法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); RT-PCR 试剂盒(Promega 公司); AQP4 引物和探针(上海生工生物工程有限公司)。主要仪器:动物缺氧活动箱(深圳市瑞沃德生命科技有限公司定制);水浴恒温摇床(HS30);水浴箱(ZHWY-110X50);实时定量 PCR 仪(CFX-96Bio-Rad);普通 PCR 仪(C1000)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 模型制作** 借鉴足月 HIE 损伤大鼠模型的制作方法<sup>[1]</sup>,取新生 10 d 龄 SD 大鼠,无水乙醚吸入麻醉,医用胶布固定于手术板,75%乙醇消毒颈部皮肤,分离结扎右侧颈总动脉,缝合皮肤切口。投入缺氧箱中(氧浓度 8%,氧流量 2.5 L/

△ 通讯作者, Tel:13896069217; E-mail: yujialin486@sohu.com。

min), 分别 HI 2、4、8、16 h, 观察新生大鼠神经行为变化, 于不同缺氧时间点取材。对照组仅分离右侧颈总动脉, 缝合皮肤, 不予缺氧, 直接取材。

**1.3.2 灌注固定及石蜡切片** 各组于相应时间点, 依次心脏灌注 20 mL 生理盐水(37 °C 预热)、20 mL 4% 多聚甲醛(4 °C 预冷), 开颅取脑, 置 4% 多聚甲醛(4 °C) 中外固定 36~48 h。常规脱水透明, 石蜡包埋, 切片, 厚 5  $\mu$ m, 行苏木精伊红(HE) 染色、免疫组织化学染色。

**1.3.3 HE 染色** 石蜡切片常规脱蜡水化, HE 染色, 光镜下观察海马 CA1 区形态。

**1.3.4 AQP4 免疫组织化学染色** 石蜡切片常规脱蜡水化, 柠檬酸钠抗原修复液 95 °C 修复 30 min; 山羊血清工作液封闭 20 min(37 °C); 小鼠抗大鼠 AQP4 单克隆抗体(1:400 稀释)4 °C 孵育过夜; 生物素化二抗工作液 37 °C 孵育 20 min; 碱性磷酸酶标记链霉卵白素 37 °C 孵育 20 min; BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色; 水溶性封片剂封片。光镜下观察海马 CA1 区 AQP4 的表达, 每组 4 张片子, 每张片子 2 个高倍(40 $\times$ 10) 视野, 应用 Image-pro Plus 6.0 图像分析软件分析, 测定其平均光密度值(optical density value, OD 值)。

**1.3.5 AQP4 荧光定量 PCR** 应用 NCBI Genbank 和 Primer Express 3.0 设计引物, 并由上海生工生物工程有限公司合成。Aqp4\_F: CTT CTC CCA AGC ACA ATT CCA; Aqp4\_R: CAG ACA CAA AAC TGC CAT TAA CAA T; Aqp4\_TaqMan 探针: 5'-FAM-CTG CGT GTG ACT TC-TAMRA-3'; GAPDH\_F: TGG GTG TGA ACC ACG AGA A; GAPDH\_R: GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA; GAPDH\_TaqMan 探针: 5'-FAM-CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC-TAMRA-3'。各组于相应时间点, 无水乙醚麻醉, 直接断头取右脑, 置于匀浆器中用 Trizol 裂解组织细胞, 氯仿、异丙醇和 75% 乙醇依次萃取、沉淀, 提取总 RNA, 溶解于 DEPC-H<sub>2</sub>O 中, 测定其浓度和纯度。依据 RT-PCR 试剂盒说明书取 RNA 1 mg 进行逆转录获得 cDNA。PCR 反应条件: 95 °C $\rightarrow$ 3 min; 95 °C $\rightarrow$ 10 s $\rightarrow$ 55 °C $\rightarrow$ 30 s, 45 次循环。根据 PCR 仪直接获得的 ct 值, 应用相对定量 2<sup>- $\Delta\Delta$ ct</sup> 法计算对照组和实验组各时间点 AQP4 RNA 水平的相对差异。

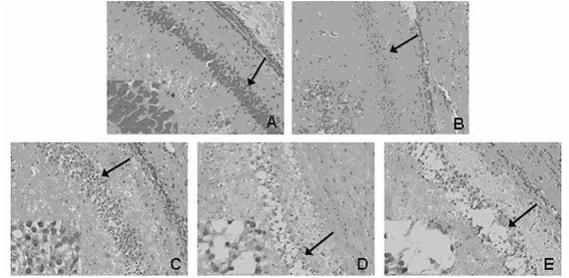
**1.3.6 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较应用独立样本 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 神经行为学评价** 对照组新生大鼠行为能力无异常改变。实验组模型制成后, 随着缺氧时间的延长, 全部发生不同程度的神经行为学改变, 缺氧 8~10 min 出现烦躁不安、翻滚, 偶见肢体抽搐; 缺氧 15~20 min 口周、右侧肢体末端发绀, 呼吸加深加快; 缺氧 20~30 min 站立不稳, 爬行时左后肢拖步并向右侧旋转或倾倒; 缺氧 35~60 min 活动开始减少, 嗜睡易激惹; 缺氧 10 h 后逐渐出现昏迷状态。

**2.2 HE 染色** 实验组新生大鼠大脑右半球均出现不同程度的水肿, 其中以海马 CA1 区最明显。光镜下对照组海马 CA1 区层次清楚, 细胞排列紧密, 外形规则, 胞浆丰富, 核大而圆, 核染色质均匀清晰, 间质无水肿。实验组神经元随着缺氧时间的延长, 呈现不可逆损伤, HI 2 h 组, 细胞排列紊乱, 胞浆着色浅, 核肿大明显, 可见核膜裂解; HI 4 h 组, 核固缩深染或消失, 胞

浆溶解、苍白, 空泡状, 间质疏松; HI 8 h 组, 可见双叶核或核消失, 胞浆溶解更严重, 残留部分呈现筛网状, 间质水肿更明显; HI 16 h 组, 呈现空洞状结构。各组海马 CA1 区形态见图 1。



A: 对照组; B: HI 2 h 组; C: HI 4 h 组; D: HI 8 h 组; E: HI 16 h 组。

图 1 海马 CA1 区 HE 染色(40 $\times$ 10 倍, 左下角为每图箭头处放大)

表 1 各组海马 CA1 区 AQP4 免疫组化表达平均光密度值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	光密度值(OD 值)	<i>t</i>	<i>P</i>
对照组	0.304 $\pm$ 0.023	—	—
HI 2 h 组	0.259 $\pm$ 0.031	3.337	0.005
HI 4 h 组	0.209 $\pm$ 0.040	-2.769	0.015
HI 8 h 组	0.141 $\pm$ 0.030	3.862	0.002
HI 16 h 组	0.109 $\pm$ 0.013	-2.713	0.017

—: 表示此项无数据。

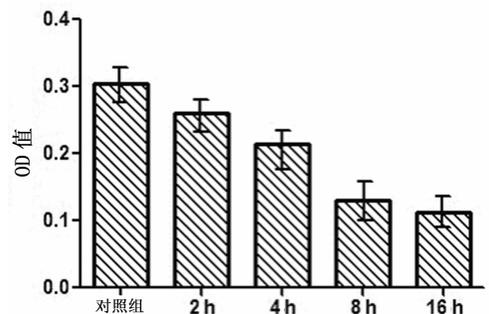
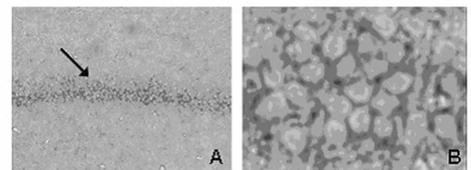


图 2 各组海马 CA1 区 AQP4 免疫组织化学表达平均光密度值比较

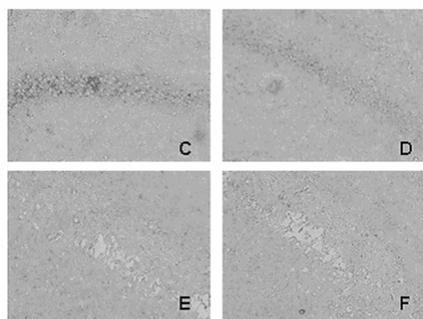


A: 对照组 B: A图箭头处放大

图 3 对照组海马 CA1 区 AQP4 免疫组织化学染色(40 $\times$ 10 倍)

**2.3 AQP4 免疫组织化学染色** AQP4 广泛表达于中枢神经系统, 以对缺氧缺血最敏感的海马 CA1 区为主要研究对象, 光镜下见海马 CA1 区 AQP4 主要表达于椎体细胞层, 呈现葡萄串状表达于胞膜。实验组与对照组比较, AQP4 表达下调, 差异有统计学意义。实验组随着缺氧时间的延长, AQP4 蛋白表达水平呈现下降趋势, 差异有统计学意义。见表 1, 图 2~4。

**2.4 AQP4 荧光定量 PCR** 实验组与对照组比较, AQP4 RNA 的表达下调, 且实验组随着缺氧时间的延长呈现下降趋势, 各时间点表达水平比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组 AQP4 RNA 的相对表达情况见表 2, 图 5。



C: HI 2h组; D: HI 4h组; E: HI 8h组; F: HI 16h组。

图 4 实验组海马 CA1 区 AQP4 免疫组织化学染色(40×10 倍)

表 2 对照组与实验组各时间点 AQP4 RNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$\Delta ct$ 值	$t$	$P$	RNA 相对值( $2^{-\Delta\Delta ct}$ )
对照组	8.62±0.19	—	—	1.000
HI 2 h 组	8.88±0.09	-2.458	0.049	0.835
HI 4 h 组	8.99±0.17	-2.940	0.026	0.768
HI 8 h 组	9.24±0.28	-3.686	0.010	0.650
HI 16 h 组	9.64±0.47	-4.067	0.007	0.493

—: 表示此项无数据。

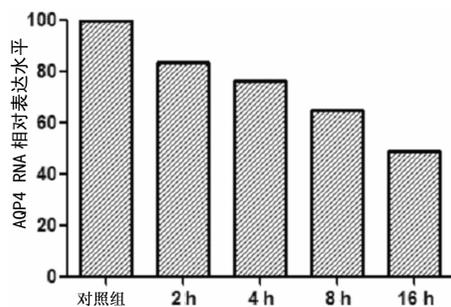


图 5 各组 AQP4 RNA 相对表达水平比较

### 3 讨论

水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是一组选择性水通透的跨膜通道蛋白, 目前共发现有 13 个成员, 具有共同的结构基础, 相对分子质量均在 30 KDa 左右, 由 6 条  $\alpha$  螺旋结构穿过细胞膜, 其氨基端和羧基端均位于细胞内, 天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸(Asn-Pro-Ala, NPA)组成的 NPA 结构是水通道蛋白家族形成跨膜孔道的共同结构基础<sup>[2]</sup>。AQPs 分布于哺乳动物的各个系统, 大脑中 AQP4 的表达最为丰富, 主要分布在脑实质与血液、脑脊液接触的界面<sup>[3]</sup>。在血-脑屏障界面, 主要表达在邻近血管内皮侧的星形胶质细胞足突上, 脑-脑脊液屏障界面, 表达在浆膜基侧的室管膜细胞<sup>[4]</sup>, AQP4 的分布特点与其功能密切相关, 可能是脑水肿形成的重要分子生物学基础<sup>[5]</sup>。

缺氧缺血早期, 在细胞毒性脑水肿过程中, 为了避免神经元受损, AQP4 使水由细胞间隙进入胶质细胞内, 从而加重了

胶质细胞水肿。新生大鼠脑内 AQP4 的表达较成年大鼠低, 新生大鼠缺氧缺血条件下胶质细胞水肿的程度可能比成年大鼠低, 但神经元的损伤较成年大鼠严重<sup>[6]</sup>。新生大鼠由于血-脑屏障发育不成熟, 缺氧缺血条件下, 血管源性脑水肿的发生可能更早, 更严重<sup>[7]</sup>。

本实验研究新生大鼠持续缺氧条件下, AQP4 与脑水肿的关系, 发现随着缺氧时间的延长, 脑水肿程度不断加重, 神经元呈现不可逆性损伤, AQP4 的表达呈动态下降趋势。提示缺氧缺血条件下脑水肿、脑损伤与 AQP4 的表达相关, AQP4 对其发生、发展起调控作用。AQP4 表达的变化是星形胶质细胞适应胞外环境改变做出的反应, 是一种内源性保护机制。

在不同形式脑血管疾病和其他急性脑损伤中, AQP4 对于脑水肿的形成和消退起着关键性作用。中风实验 AQP4 基因敲除模型提示 AQP4 促进缺血后细胞毒性脑水肿发生<sup>[8]</sup>。大脑中动脉暂时性闭塞致中风模型中, 与血管接触的星形胶质细胞足突上 AQP4 表达迅速上调, 起病 1 h 达高峰<sup>[9-10]</sup>。而大脑中动脉远端永久性闭塞致较严重的中风模型中, 并未出现早期的 AQP4 表达上调<sup>[11]</sup>。脑外伤模型中, 创伤 24 h 内 AQP4 表达下调<sup>[12]</sup>。提示严重的缺氧缺血刺激, 大脑组织不足以合成足量的 AQP4, 与本实验的结果是一致的。

AQP4 是处于持续开放状态的膜通道蛋白, 水分子通过水通道的移动方向仅由膜两侧渗透压差决定, 不需要消耗能量, 也不受门控机制影响。AQP4 对于水肿的调节具有特征性, AQP4 缺乏减轻细胞毒性脑水肿, 加重血管源性脑水肿<sup>[13-15]</sup>。AQP4 水导向性机制并未明确, 使 AQP4 与脑水肿的关系变得复杂。探索 AQP4 在不同水肿形式下的作用通路, 是以 AQP4 作为靶点治疗的关键, 也是今后研究的重点。

### 参考文献:

- [1] 李丽华, 屈艺, 刘红卫, 等. 足月新生儿缺氧缺血性脑损伤大鼠模型的制作与鉴定[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(4): 266-269.
- [2] Gonen T, Walz T. The structure of aquaporins[J]. Q Rev Biophys, 2006, 39(4): 361-396.
- [3] Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema[J]. Pediatr Nephrol, 2007, 22(6): 778-784.
- [4] Verkman AS, Binder DK, Bloch O, et al. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knock-out mice[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758(8): 1085-1093.
- [5] Nag S, Manias JL, Stewart DJ. Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema[J]. Acta Neuropathol, 2009, 118(2): 197-217.
- [6] Wen H, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, et al. Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel[J]. Eur J Neurosci, 1999, 11(3): 935-945.
- [7] Rodier PM. Developing brain as a target of toxicity[J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(1): 73-76.
- [8] Zador Z, Stiver S, Wang V, et al. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke[J]. Handb Exp Pharmacol, 2009(2): 159-170.

表 3 不同年龄组之间 SaO<sub>2</sub> 的差异(%, $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	SaO <sub>2</sub>
≤20 岁组	251	89.33±4.86
>20~25 岁组	774	89.90±4.33
>25 岁组	336	89.85±4.83

表 4 不同年龄组官兵之间心率的差异(次/分, $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	心率
≤20 岁组	251	82.82±15.22
>20~25 岁组	774	80.35±15.15
>25 岁组	336	78.46±15.55*

\*: P<0.05, 与≤20 岁组比较。

### 3 讨 论

张西洲和王引虎<sup>[2]</sup>研究认为,随着海拔高度的升高,大气氧分压逐渐下降,SaO<sub>2</sub>随之降低,机体缺氧更加严重,以上观点和本研究的结果一致。这主要是由于在高海拔地区,空气中的氧分压比较低,氧弥散的驱动力,即肺泡与肺毛细血管之间的氧分压差明显小于平原地区,以致在短时间内氧不能完全弥散到毛细血管中,造成 SaO<sub>2</sub>下降。

心率是评价机体高原缺氧程度和对高山低氧环境习服能力的重要指标<sup>[3]</sup>。随着海拔升高,SaO<sub>2</sub>降低,但是心率却明显增加,这是心血管系统为适应高原而发生的代偿性机能增强的表现。缺氧引起心率增快的机制尚未完全阐明,有人认为缺氧可刺激颈动脉和主动脉体化学感受器,反射性地引起心率增快;也有人认为缺氧引起的化学感受性反射的效应主要是呼吸加深加快<sup>[4]</sup>;还有学者临床试验证明,缺氧引起的心率加快,可能与抑制迷走神经张力有关。本研究与以往某些小样本研究虽然结论一致,但是心率却明显快于某些研究的数值<sup>[5]</sup>。

在本研究中,随着海拔的升高,心率逐渐加快,但 SaO<sub>2</sub>水平并未升高或者保持在低海拔地区的水平。在海平面地区,肺泡与毛细血管之间氧分压差为 8.0 kPa,海拔每升高 1 000 m,其数值下降 1.0 kPa<sup>[6]</sup>,这导致了氧弥散能力的下降,进而使 SaO<sub>2</sub>下降。而心率加快可使单位时间内肺泡的血流量增加,即等效地使单位时间内机体的摄氧量增加,从而提高 SaO<sub>2</sub>水

平。但经过负反馈调节后,SaO<sub>2</sub>并未达到低海拔的水平。这提示随着海拔的升高,冠状动脉的 SaO<sub>2</sub>下降,导致心肌功能减退,每搏输出量减少,心率加快并不能使单位时间摄氧量增加或保持不变,综合的结果是心率加快,但 SaO<sub>2</sub>仍下降。

由于官兵大都是 18 岁应征入伍进藏,所以,年龄越大,即官兵入藏时间的越长。随着年龄的增加,虽然 SaO<sub>2</sub>没有变化,但是心率逐渐减慢,提示机体对缺氧环境的适应。这与长时间在高原暴露后,机体发生的一系列生理学变化,改变了其对低氧环境的适应模式有关。对高原世居者、高原长期移居者的 Hb 类型调查发现,Hb 电泳图谱呈现 4 条带,即除了低海拔地区的 HbA1、HbA2 和 HbF 3 种类型的血红蛋白外,还有另外一种 Hb(HbX),HbX 类似于胎儿早期 Hb,对氧具有较强的亲和力,有利于机体对低氧的适应,这种蛋白的出现可能和上述现象有关<sup>[7]</sup>。但对于入藏时间长官兵的 Hb 结构的调查,作者尚需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 张西洲. 国外高原病防治研究概况[J]. 人民军医, 2008, 51(7):429-431.
- [2] 张西洲,王引虎. 高山生理与病理[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,2008:7-46.
- [3] 罗二平,申广浩,胡文东,等. 增氧呼吸器在模拟缺氧条件下对血氧饱和度和心率的影响[J]. 第四军医大学学报, 2005,17(1):68-70.
- [4] 朱峻,周兴文,刘世玉. 高原缺氧对窦房结、房室结功能的影响及迷走神经的作用[J]. 解放军医学杂志, 2000, 16(3):358-360.
- [5] 高钰琪,牛文忠. 高原病理生理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:36-40.
- [6] 姚泰. 生理学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,1978:56-61.
- [7] Storz JF, Moriyama H. Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia[J]. High Alt Med Biol, 2008,9(2):148-157.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-03-22)

(上接第 2961 页)

- [9] Castro Ribeiro M, Hirt L, Bogousslavsky J, et al. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. J Neurosci Res, 2006, 83(11): 1231-1240.
- [10] Hirt L, Price M, Terson B, et al. Early induction of AQP4 contributes the limitation of the edema formation in the brain ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(3):423-433.
- [11] Friedman B, Schachtrup C, Tsai PS, et al. Acute vascular disruption and aquaporin 4 loss after stroke[J]. Stroke, 2009, 40(18):2182-2190.
- [12] Ke C, Poon WS, Ng HK, et al. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats[J]. Neurosci Lett,

- 2001,301(1):21-24.
- [13] Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis [J]. J Biol Chem, 2005, 280(14):13906-13912.
- [14] 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.
- [15] 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.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-04-22)