

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-04-0330-03

大鼠实验性脑出血后水通道蛋白 4 mRNA 表达与
血脑屏障通透性的关系滕伟禹¹, 高 岩², 田 力³, 刘宏丽¹, 葛宇松¹, 张朝东¹

(中国医科大学 1. 附属第一医院神经内科; 2. 附属第二医院神经内科;

3. 附属第二医院老年病科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 神经病学; 脑水肿; 逆转录聚合酶链反应; 脑出血; 水通道蛋白; 血脑屏障通透性; 大鼠

[摘要] 目的 研究大鼠脑出血后水通道蛋白 4 mRNA 表达与血脑屏障通透性的关系。方法 采用自体非抗凝动脉血注入尾状核法制作大鼠脑出血模型, 逆转录聚合酶链反应法观察水通道蛋白 4 mRNA 的表达, 伊文思兰法检测血脑屏障通透性, 干湿重法计算脑含水量以代表脑水肿情况。结果 与对照组比较, 脑出血组水通道蛋白 4 mRNA 表达 6 h 即开始升高 (1.06 ± 0.12), 3 天时达到高峰 (1.34 ± 0.14), 7 天时仍高于正常组 ($P < 0.05$); 血脑屏障通透性于出血后 6 h 开始升高 (0.5955 ± 0.0956), 1 天~3 天最高 (0.8889 ± 0.0968 , 0.7914 ± 0.0520), 5 天~7 天逐渐降低 ($P < 0.05$)。水通道蛋白 4 mRNA 表达与血脑屏障通透性呈显著正相关 ($r = 0.686$, $P < 0.01$), 与脑水肿变化趋势相一致。结论 脑出血后可能通过上调水通道蛋白 4 mRNA 表达, 增加血脑屏障通透性, 参与脑水肿形成。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

The Relationship Between Aquaporin-4 mRNA Expression and Blood-Brain Barrier Permeability After Experimental Cerebral Hemorrhage in Rats

TENG Wei Yu, GAO Yan, TIAN Li, LIU Hong-Li, GE Yu-Song, and ZHANG Chao Dong

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Cerebral Hemorrhage; Aquaporin; Blood-Brain Barrier; Brain Edema; Permeability; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between aquaporin 4 (AQP4) mRNA expression and blood-brain barrier (BBB) permeability after experimental cerebral hemorrhage in rats. **Methods** The cerebral hemorrhage models were established by stereotaxic injection of autologous anticoagulant artery blood into the caudate nucleus. AQP4 mRNA expression was detected by RT-PCR, BBB permeability by Evans Blue method and brain water contents by dry-wet weight method. **Results** In contrast to the control group, AQP4 mRNA expression increased in cerebral hemorrhage group at 6 hours (1.06 ± 0.12), reached peak at 3 days (1.34 ± 0.14), then was still higher than normal at 7 days ($P < 0.05$); BBB permeability increased at 6 hours after cerebral hemorrhage (0.5955 ± 0.0956), reached peak at 1~3 days (0.8889 ± 0.0968 , 0.7914 ± 0.0520), and decreased at 5~7 days gradually ($P < 0.05$). There was a significantly positive correlation between AQP4 mRNA expression and BBB permeability ($r = 0.686$, $P < 0.01$), which was consistent with the change of cerebral edema. **Conclusion** Cerebral edema may be formed through the up-regulation of aquaporin 4 mRNA expression and the increase of BBB permeability after cerebral hemorrhage.

脑出血主要是由于长期高血压脑内细小动脉硬化引起血管破裂, 导致脑实质内出血。脑出血后继发的脑水肿是使患者病情恶化的主要原因之一, 但其发生机制尚未完全阐明。近年来水通道蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4) 在脑水肿发生中的作用逐渐受到重视^[1], 但脑出血后 AQP4 与血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 通透性关系的研究鲜有报道。本实验

通过动态观察大鼠脑出血后 AQP4 mRNA 的表达和 BBB 通透性的变化, 探讨它们之间的关系及其在脑水肿发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 脑出血模型制作及分组

Wistar 大鼠 (本校实验动物中心提供) 50 只 (雌雄不限), 体重 300~350 g, 随机分成对照组和脑出血组。每组按造模后 6 h、1 天、3 天、5 天和 7 天时间点分成 5 个亚组, 每个亚组各 5 只大鼠 ($n = 5$)。参照 Rosenberg 等^[2]方法: 将大鼠以 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔内注射麻醉后, 分离一侧股动脉备用; 将

[收稿日期] 2005-09-19 [修回日期] 2006-03-13

[作者简介] 滕伟禹, 博士, 副教授, 研究方向为出血性脑血管病的损伤机制与治疗, 联系电话为 13998896202, E-mail 为 tengweiyu@126.com。高岩, 硕士, 医师, 研究方向为脑血管病, 联系电话为 13079227172, E-mail 为 cmugy@sina.com。田力, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑血管病, 联系电话为 13591650790, E-mail 为 tianlicmu2@126.com。

大鼠固定于立体定位仪上,在颅骨前囟前 0.2 mm、中线旁 3 mm 处钻孔;用微量注射器从股动脉抽取适量鲜血,在立体定位仪引导下经钻孔垂直进针约 6 mm(相当于尾状核),缓慢注血 75 μ L。对照组步骤同上,注入 75 μ L 生理盐水。

1.2 标本采集与处理

分别在各预定时间点将大鼠快速断头处死取脑,在注血点作冠状切开,前半部分用于脑含水量的测定,后内侧部分用于 AQP4 mRNA 的测定,后外侧部分用于 BBB 通透性的测定。

1.3 脑组织水通道蛋白 4 mRNA 表达的测定

采用逆转录聚合酶链反应法进行,使用 Trizol 试剂盒和逆转录聚合酶链反应试剂盒(TaKaRa 公司)。电泳结果用凝胶图像分析系统进行电泳条带光密度分析,计算 AQP4 产物与 β -actin 产物的光密度积分的比值,作为 AQP4 mRNA 表达的量化指标。

1.4 血脑屏障通透性的测定

按 Belayev 等^[3]方法使用伊文思兰(evens blue, EB)作为示踪剂测定 BBB 通透性。在动物处死前 2 h,自股静脉注入 2%EB 溶液(20 mg/kg)。标本取出后加甲酰胺 3 mL 加盖避光在 54 $^{\circ}$ C 水浴箱中提取 24 h,在紫外分光光度计下测量提取液的光密度值(OD 值),波长为 632 nm。脑组织 EB 含量以 OD/g 湿脑组织表示,用 EB 含量(OD/g)代表 BBB 通透性。

1.5 脑含水量的测定

将各时间点脑组织分别用电子分析天平称湿重

后,置入 100 $^{\circ}$ C 恒温箱中,24 h 后取出称干重。以(湿重-干重)/湿重 $\times$ 100% 来计算脑含水量,以此代表脑水肿程度。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS10.5 及 Excel 软件进行统计处理。采用方差分析和 t 检验进行分析。

2 结果

2.1 各组脑组织水通道蛋白 4 mRNA 表达、血脑屏障通透性及脑含水量的比较

对照组大鼠脑组织有少量 AQP4 mRNA 表达;脑出血后 AQP4 mRNA 表达升高,6 h 即高于正常组,3 天时达到高峰,之后逐渐下降,7 天时仍高于正常组($P < 0.05$)。脑出血后 6 h 脑组织 EB 含量开始升高,1 天~3 天最高,5 天~7 天逐渐降低($P < 0.05$)。脑出血组脑含水量从 6 h 即开始上升,3 天时达到高峰,之后缓慢下降,7 天时仍高于正常水平($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 水通道蛋白 4 mRNA 表达与血脑屏障通透性、脑含水量的相关分析

水通道蛋白 4 mRNA 表达与血脑屏障通透性呈显著正相关($r = 0.686$, $P < 0.01$);AQP4 mRNA 表达与脑含水量的变化规律也趋于一致($r = 0.825$, $P < 0.01$)。

表 1. 脑出血后不同时间点大鼠脑组织水通道蛋白 4 mRNA 表达、血脑屏障通透性和脑含水量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	水通道蛋白 4 mRNA		血脑屏障通透性 (EB 含量)		脑含水量	
	对照组	脑出血组	对照组	脑出血组	对照组	脑出血组
6 h	0.79 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.12 ^a	0.3090 $\pm$ 0.0074	0.5955 $\pm$ 0.0956 ^a	77.72% $\pm$ 0.64%	78.81% $\pm$ 0.50% ^a
1 天	0.81 $\pm$ 0.02	1.17 $\pm$ 0.10 ^a	0.3084 $\pm$ 0.0464	0.8889 $\pm$ 0.0968 ^a	77.77% $\pm$ 0.68%	79.72% $\pm$ 0.50% ^a
3 天	0.81 $\pm$ 0.03	1.34 $\pm$ 0.14 ^a	0.3155 $\pm$ 0.0342	0.7914 $\pm$ 0.0520 ^a	77.74% $\pm$ 0.65%	82.13% $\pm$ 0.36% ^a
5 天	0.79 $\pm$ 0.03	1.13 $\pm$ 0.11 ^a	0.3094 $\pm$ 0.0287	0.5614 $\pm$ 0.0971 ^a	77.73% $\pm$ 0.58%	80.73% $\pm$ 0.40% ^a
7 天	0.79 $\pm$ 0.04	0.99 $\pm$ 0.07 ^a	0.3001 $\pm$ 0.0304	0.4470 $\pm$ 0.0708 ^a	77.74% $\pm$ 0.59%	79.14% $\pm$ 0.61% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

血肿周围脑组织水肿是脑出血后急性期和亚急性期常见的继发性损害,往往在出血后数分钟内出现,并在数天内达到高峰,以后逐渐消退。脑水肿的形成机制十分复杂,目前尚未研究清楚。脑水肿包括细胞毒性水肿和血管源性水肿。细胞毒性水肿是由于脑细胞膜通透性增加,水钠潴留而致细胞肿胀;

血管源性水肿是由于 BBB 开放、血管通透性增加导致血浆蛋白、水分和电解质等向血管外渗出引起的细胞间质水肿。BBB 是位于脑组织和血液之间的细胞系统,由毛细血管内皮细胞间紧密连接、毛细血管基底膜和星形胶质细胞终足构成。生理情况下 BBB 严格控制水溶性物质如电解质进入脑组织,脑出血后 BBB 的通透性如何变化是脑水肿形成机制研究的重要内容。

本实验通过将自身非抗凝动脉血注入尾状核制作脑出血模型,观察不同时间 BBB 通透性变化和脑水肿情况。结果发现脑组织内 EB 含量在出血后 6 h 即迅速上升,1 天~3 天时间段达到高峰(1 天与 3 天比较差异无显著性, $P > 0.05$),之后缓慢下降。表明脑出血后 BBB 的完整性受到破坏,通透性增加。造成这些病理改变的原因可能与脑出血后伴随血肿周围缺血、炎症反应和细胞因子、凝血酶使毛细血管内皮细胞收缩、基质金属蛋白酶降解细胞基底膜等多种因素有关^[4,6]。脑含水量在脑出血后 6 h 也开始升高,3 天时达到高峰,之后开始下降,7 天时仍然高于正常。可以看出脑水肿的变化规律与 BBB 通透性的改变趋向一致,虽然脑水肿的形成并非全部源于血管源性水肿,但 BBB 通透性的增加是参与脑水肿形成的重要因素。

水通道蛋白是近 10 年来发现的一组膜通道蛋白,广泛存在于各种生物的细胞膜上,介导水分子的跨膜转运,调节 BBB 对水分子、 K^+ 的通透和神经细胞外间隙的大小^[7]。目前在哺乳动物体内已发现 10 种 AQP(AQP0~AQP9),分布在体内不同的组织。AQP4 是中枢神经系统内分布最广泛的水通道蛋白,在大脑灰质和白质均有分布,在室管膜上皮细胞、软膜细胞、室旁核、视上核、齿状回的颗粒细胞层及小脑蒲肯野细胞层上也有表达,尤其在朝向血管及软膜面胶质细胞膜区 AQP4 选择性地高表达,表明 BBB 两侧的相关结构上分布着丰富的 AQP4,提示 AQP4 是胶质细胞与脑脊液及血管之间水调节和运输的重要结构基础^[8,9]。本实验观察到:在脑出血后 6 h AQP4 mRNA 表达开始升高,3 天时达到高峰,之后缓慢下降,7 天时仍高于正常水平。这种 AQP4 mRNA 表达的升高,同时伴随着脑水肿的规律变化,二者呈显著正相关($r = 0.825$, $P < 0.01$),即脑水肿程度随着 AQP4 mRNA 表达的增加而加重。文献[10]报道 AQP4 mRNA 与蛋白表达保持一致,因此有理由相信 AQP4 mRNA 表达的增加与脑水肿有关。许多研究也证实,AQP4 在各种原因(如缺血、出血、外伤、肿瘤等)引起的脑水肿的病理生理机制中均发挥重要作用^[7]。

相关分析显示 EB 含量与 AQP4 mRNA 表达二者呈显著正相关,表明 AQP4 水平高低与 BBB 通透

性的改变有密切联系。研究发现在伴有 BBB 破坏的脑水肿局部出现 AQP4 mRNA 表达变化,而在不伴有 BBB 破坏的弥散性脑损伤的脑水肿中,AQP4 mRNA 表达改变不明显^[11]。通过 AQP4 基因干预,可影响大鼠脑缺血再灌注损伤后 BBB 形态及功能^[12]。李燕华等^[10]观察到脑出血后神经胶质细胞线粒体肿胀、胞核溶解及足突与毛细血管基底膜分离等现象,并与 AQP4 mRNA 表达规律变化相符合。这些研究均说明 AQP4 可以改变 BBB 的结构与功能。

本实验观察到随着 AQP4 mRNA 表达上调,BBB 通透性升高、脑含水量增加,表明 AQP4 mRNA 表达上调参与脑出血后脑水肿的发生发展,提示如果控制 AQP4 的表达,将有可能减轻脑水肿的严重程度,成为脑出血治疗的新途径。

[参考文献]

- [1] Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, 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
- [2] Rosenberg GA, Murr Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 1990, **21** (5): 801-807
- [3] Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Brain Res*, 1996, **739** (1-2): 88-96
- [4] Lee KR, Colon GP, Betz AL, Keep RF, Kim S, Hoff JT. edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin[J]. *J Neurosurg*, 1996, **84** (1): 91-96
- [5] Wagner KR, Xi G, Hua Y, Kleinholz M, de Courten Myers GM, Myers RE, et al. Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs rapid edema development in perihematomal white matter[J]. *Stroke*, 1996, **27** (3): 490-497
- [6] Xue M, Del Bigio MR. Intracortical hemorrhage injury in rats: relationship between blood fractions and brain cell death[J]. *Stroke*, 2000, **31** (7): 1721-1727
- [7] Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, **22** (4): 367-378
- [8] Venero JL, Vizuet ML, Ilundain AA, Machado A, Echevarria M, Cano J. Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS: preferential expression in periventricular organs[J]. *Neuroscience*, 1999, **94** (1): 239-250
- [9] Badaut J, Verbavatz JM, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F. Presence of aquaporin-4 and muscarinic receptor in astrocytes and ependymal Cell in rat brain: a clue to a common function[J]. *Neurosci Lett*, 2000, **292** (2): 75-78
- [10] 李燕华, 孙善全. 实验性脑出血后水通道蛋白 4 的表达变化. *中华神经科杂志*, 2004, **37** (2): 144-148
- [11] Ke C, Poon WS, Ng HK, Pang JC, Chan Y. Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neuroscience*, 2001, **301** (1): 21-24
- [12] 石向群, 杨宝升, 张志琳, 王运良, 包仕尧, 等. 水通道蛋白 4 基因干预对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障形态及功能的影响. *中国临床康复*, 2004, **8** (31): 6928-930

(此文编辑 朱霞霞)