维普资讯 http://www.cqvip.com

· 研究报告 ·

地塞米松对大鼠脑水通道蛋白 4 表达的影响

李慧 陈圣刚 陈吉相

【关键词】 脑出血； 地塞米松； 水通道蛋白 4； 血脑屏障； 脑水肿

脑出血在临床上有极高的病死率，主要死因为大脑水肿后引起颅内压增高导致脑疝，因此，及时治疗脑水肿对降低脑出血病死率有重要意义。目前许多研究表明，水通道蛋白 4(AQP－4)与脑水肿的发生发展密切相关，脑出血后周围水肿区的 AQP－4 蛋白表达增加，3 d 达到高峰后逐渐下降[1]。而临床上用糖皮质激素(GC)治疗脑水肿一直存在争议。本实验通过缓慢输注自体血建立脑出血模型，比较地塞米松治疗后血肿周围水肿区脑含水量、血脑屏障(BBB)通透性及 AQP－4 表达的变化，以期为 GC 治疗脑水肿提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与器材：胶原酶Ⅶ(Sigma 公司)，免疫组化过氧化物酶标记的链霉卵白素法(SP)试剂盒(美国 Zymed 公司)，鼠抗 AQP－4 多克隆抗体(武汉博士得公司)，3,3′-二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)；立体定向仪(西安西北光电仪器厂)，微量进样器(上海高欣玻璃仪器厂)。

1.2 实验动物及分组：雄性成年 Wistar 大鼠 70 只，体重 250～350 g，由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。采用随机数字表法分为假手术组(尾状核注射 50 μl 生理盐水，$n=10$)、脑出血组(尾状核注射 50 μl 自体血，$n=30$)和地塞米松组(地塞米松干预脑出血模型大鼠，$n=30$)。脑出血组和地塞米松组每组再分成脑出血后 6 h、12 h 及 1、3、5 和 7 d 组，每组 5 只。

1.3 脑出血模型制备方法[1]：用体积分数为 10%的水合氯醛(3 g/kg)腹腔注射麻醉大鼠后，将大鼠俯卧位固定在立体定向仪上，头皮正中切口约 2 cm，剪开骨膜，暴露前囟及冠状缝，于前囟旁开 3.0 mm、前 0.2 mm 处钻孔，孔径约为 1.0 mm，将微量(100 μl)进样器固定在立体定向仪上，针尖对准颅孔，缓慢注射胶原酶Ⅶ 1 U，脑内进针 5.5 mm，该部位为尾状核位置，留针 15 min 防止血液反流，缓慢起针，骨蜡封颅孔，缝合头部及尾部伤口，单笼饲养。地塞米松组大鼠脑出血后腹腔注射地塞米松10 mg/kg，每日 2 次；脑出血组腹腔注射生理盐水 2 ml/kg，每日 2 次。

1.4 脑含水量的测定：各时间点处死动物后断头取脑，以针道为中心取 4 mm 厚的脑组织，称取湿重(W)后放入烤箱(100 ℃)干烤，24 h 后取出称干重(D)，按照下列公式计算脑含水量。

脑含水量(%)＝(W－D)/W×100%

1.5 BBB 通透性的测定：10%水合氯醛(3 g/kg)腹腔注射麻醉大鼠后，经尾静脉注射质量分数为 2%的伊文思蓝(EB，4 ml/kg)，大鼠眼球结膜、四肢变蓝表示注入成功。1 h 后，心脏灌注生理盐水 100 ml，断头取脑，取血肿周围脑组织约 300～500 mg，称重，放入 10 ml/kg 甲酰胺中，60 ℃恒温水浴 24 h。将浸泡过的脑组织先用甲酰胺过滤，在分光光度仪(λ＝632 nm)上测定吸光度(A)值，根据 EB 标准曲线计算脑组织中 EB 含量。

1.6 AQP－4 的免疫组化检测及图像分析：麻醉大鼠，用体积分数为 4%的多聚甲醛心脏灌注成功后断头取脑，以针道为中心，冠状切下约 2 mm 厚的脑组织块，固定 8 h 后，石蜡包埋、切片，片厚 7 μm，切片脱蜡至水，用体积分数为 3%的 H_2O_2 室温下孵育 5～10 min，消除内源性过氧化物酶活性，正常山羊血清封闭 10 min，滴加 AQP－4 多克隆抗体(1∶200)，37 ℃孵育 3 h，按照 SP 试剂盒说明书进行操作，DAB 显色。阴性对照组用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗。用 Imge－Pro Plus 图像分析软件进行图像分析，分析指标为 A 值。

1.7 统计学方法：采用 SPSS12.0 统计软件进行处理，数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组内比较采用单因素方差分析，组间比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血肿周围脑含水量的变化(表 1)：脑出血组脑含水量随时间逐渐增高，至 3 d 达高峰，后逐渐下降，可持续 7 d 以上；地塞米松组脑含水量亦逐渐增高至 3 d，1～5 d 地塞米松组脑含水量显著低于脑出血组(P 均<0.05)。

2.2 BBB 通透性的变化(表 1)：脑出血组 BBB 通透性在 1 d 内显著增高后缓慢

表 1 两组不同时间点脑含水量、BBB 通透性及 AQP－4 蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

指标	组别	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d
脑含水量(%)	脑出血组	79.81±0.23	81.12±0.53	82.52±0.41	83.63±0.31	81.34±0.45	80.26±0.35
	地塞米松组	79.22±0.53	80.99±0.31	81.15±0.42*	82.30±0.49*	79.66±0.17*	78.89±0.52
BBB 通透性(μg/g)	脑出血组	6.56±0.69	8.35±0.27	11.59±0.55	10.53±0.46	8.57±0.39	6.87±0.24
	地塞米松组	6.91±0.37	8.30±0.49*	11.23±0.49*	9.87±0.84**	8.10±0.63*	6.81±0.54
AQP－4 蛋白(A 值)	脑出血组	0.24±0.06	0.30±0.06	0.37±0.04	0.52±0.09	0.43±0.04	0.34±0.06
	地塞米松组	0.22±0.04	0.26±0.03*	0.33±0.05*	0.44±0.06**	0.35±0.02*	0.20±0.01**

注：假手术组脑含水量(76.69±0.48)%，BBB 通透性(6.42±0.51)μg/g，AQP－4 蛋白 0.23±0.05；与脑出血组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$

基金项目：湖北省科技基金资助项目(2004AA301C97)

作者单位：430022 湖北武汉，华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科

作者简介：李慧(1982－)，女(汉族)，湖北省人，硕士研究生，主要研究方向为脑出血后脑水肿(Email：helikezai@163.com)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

下降，7 d 后仍未达到正常水平；地塞米松组 12 h～5 d BBB 通透性均显著低于脑出血组（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。

2.3 血肿周围 AQP－4 蛋白的表达（表 1）：AQP－4 在星形胶质细胞膜上表达，以脑室上皮细胞、软膜上皮细胞较为显著（彩色插页图 1 显示，地塞米松组治疗 1 d 时 AQP－4 免疫组化染色阳性细胞呈棕色，表明侧脑室的室管膜上皮细胞上 AQP－4 大量表达）；在血肿周围水肿区域亦存在 AQP－4 的大量表达（彩色插页图 2 显示，地塞米松组 12 h 时 AQP－4 免疫组化染色阳性细胞呈棕色，血肿周围水肿区有大量 AQP－4 表达）。脑出血后 AQP－4 表达显著增强，3 d达高峰，地塞米松治疗后 3 d 的峰值较脑出血组显著降低（$P<0.01$）。

3 讨 论

AQP－4 在脑组织中含量很高，主要分布在星形胶质细胞、室管膜上皮细胞及软膜上皮细胞，视上核、视旁核也有分布，属于汞不敏感 AQP。近年来越来越多的研究表明，AQP－4 在脑水肿发生发展中起重要作用，Taniguchi 等[2]在脑梗死后脑水肿的研究中发现，梗死区周围 AQP－4 表达上调，3 d 后达高峰，可持续 7 d 以上，该变化与磁共振成像（MRI）显示的脑水肿形成和消散结果一致，提示 AQP－4 与缺血后脑水肿形成密切相关。Manley 等[3]用 AQP－4 基因敲除小鼠进行急性水中毒实验，发现 AQP－4－/－小鼠脑含水量减轻，神经功能缺损程度也减轻，而且成活率高于 AQP－4＋/＋小鼠。又有 Vajda 等[4]用肌营养不良小鼠进行水中毒实验，发现肌营养不良小鼠的脑水肿形成延缓，推测是由于小鼠缺乏肌营养不良蛋白（dystrophin），使得 AQP－4 不能正确极化定位于星形胶质细胞，导致由该通道进入细胞的水分减少，从而延缓了脑水肿的发生。Sun 等[5]在创伤后脑水肿研究中发现，自由落体致脑损伤模型大鼠损伤区肿胀的星形胶质细胞上 AQP－4 明显上调，在周边临近区域下调，远处无明显变化，说明 AQP－4 参与了各种原因引起的脑水肿的形成。

Marios 等[6]研究认为，AQP－4 在血管源性脑水肿和细胞毒性脑水肿中的作用机制并不相同。在血管源性脑水肿中，AQP－4 介导水分子的跨膜转运（由脑实质转运入血管）能清除水分；在细胞毒性脑水肿中，AQP－4 能促进脑水肿的形成，早期使用 AQP－4 抑制剂能减缓水分进入脑实质，但是一旦发展到以血管源性脑水肿为主时，使用 AQP－4 抑制剂会减少水肿清除。由于 AQP－4 的特殊分布（主要分布在星形胶质细胞与血液及脑脊液的交界面），其参与了 BBB 的形成。BBB 的完整性与 AQP－4 表达密切相关。Tomas-Camardiel 等[7]在脑肿瘤的研究中发现，随着 BBB 的破坏，AQP－4 表达上调，考虑 BBB 破坏是导致 AQP－4 增加的原因。Vizuete 等[8]在脑机械损伤或向纹状体注射喹啉酸（即天冬氨酸受体激动剂）的研究结果显示，AQP－4 mRNA 的表达与神经元损伤不相关，而与 BBB 的损伤有关。

GC 通过结合于细胞内的糖皮质激素受体（GR），形成复合物进入细胞核内，作用于 DNA 的糖皮质激素反应元件（GRE）调节基因的表达，Moon 等[9]在研究红白血病（MEL）细胞时发现，MEL 细胞的 AQP－1 启动子区域存在 GRE。同时 Tanaka 等[10]在气道上皮细胞 AQP－3 启动子区域发现皮质类固醇的 GRE，但是未见 GRE 存在于 AQP－4 启动子上的报道。

GC 在临床上用来治疗脑出血后脑水肿一直存在争议。本实验用 GC 治疗脑出血后脑水肿大鼠发现：随着 GC 治疗时间的延长，其减轻脑水肿的作用越为显著；同时，GC 在一定程度上保护了 BBB 免受血肿周围各种毒性因子的损伤，从出血后 1 d 起，BBB 的通透性均较脑出血组低；在 AQP－4 蛋白表达上，早期改变不明显，中晚期 AQP－4 蛋白表达较脑出血组增加。原因可能是在脑出血后脑水肿形成中，早期为血肿周围缺血、缺氧及血肿毒性物质释放引起的细胞毒性脑水肿，中晚期为血管源性脑水肿，是血肿毒性物质破坏了 BBB，导致水分子由血管内渗出到脑实质。我们认为，地塞米松通过降低 BBB 通透性，增加 AQP－4 表达，从而达到治疗血管源性脑水肿的目的。但是，究竟 GC 是直接上调 AQP－4 表达还是通过保护 BBB 从而间接上调 AQP－4 表达，有待进一步研究。假设 GC 能直接上调 AQP－4 表达，由于 GC 调节基因途径众多，GC 包括介导的基因效应、非基因的受体介导效应、非基因的生化效应等，究竟是哪条通路起作用仍不很清楚。而且星形胶质细胞的 AQP－4 基因启动子区域是否也存在 GRE，还无明确答案。如果 GC 是通过保护 BBB 来改变 AQP－4 表达，AQP－4 与 BBB 完整性的关系仍有待进一步研究。

参考文献：

1 李燕华，孙善全. 大鼠出血性脑水肿水通道蛋白 4 表达的研究[J]. 中国危重病急救医学，2003，15(9)：538－541.

2 Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, et al. Induction of aquaporin－4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2000, 78(1－2): 131－137.

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 Vajda Z, Pedersen M, Fuchtbauer E M, et al. Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin－4 in dystrophin－null transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(20): 13131－13136.

5 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.

6 Marios C, Papadopoulos, Geoffrey T, et al. Aquaporin－4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema[J]. Faseb J, 2004, 7(18): 1096－1114.

7 Tomas-Camardiel M, Venero J L, Herrera A J, et al. Blood－brain barrier disruption highly induce aquaporin－4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: protective effect by estradiol treatment in overienctomized animals[J]. J Neurosci Res, 2005, 80(2): 235－246.

8 Vizuete M L, Venero J L, Vargas C, et al. Differential upregulation of aquaporin－4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema[J]. Neurobiol Dis, 1999, 6(4): 245－258.

9 Moon C, King L S, Agre P. Aqp1 expression in erythroleulemia cells: genetic regulation of glucocorticoid and chemical induction[J]. Am J Physiol, 1997, 273(5 Pt 1): C1562－C1570.

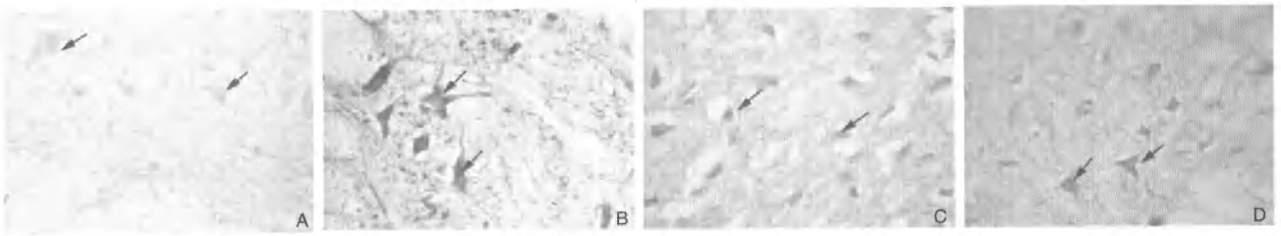
10 Tanaka M, Inase N, Fushimi K, et al. Induction of aquaporin 3 by corticosteroid in a human airway epithelial cell line[J]. Am J Physiol, 1997, 273(5 Pt 1): L1090－1095.

（收稿日期：2007－01－08）
（本文编辑：李银平）

维普资讯 http://www.cqvip.com

脑外伤后大鼠脊髓内去甲肾上腺素能神经元变化的研究

（正文见349页）



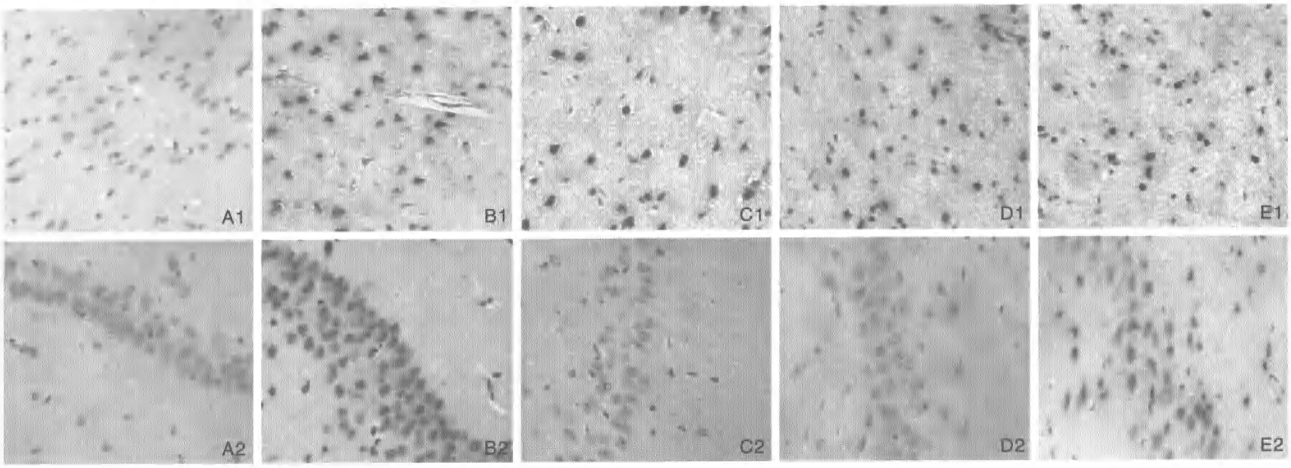
A：正常对照组脊髓前角；B、C、D：脑外伤组伤后24 h脊髓前角、侧角、后角；箭头示DBH阳性神经元胞体

图1 脑外伤24 h后大鼠脊髓内DBH阳性神经元表达(免疫组化，×400)

Figure 1 DBH-positive expression neurons in spinal cord of rats at 24 hours after brain injury (immunohistochemistry, ×400)

肾上腺髓质素对局灶性脑缺血/再灌注损伤大鼠神经元凋亡及早期生长反应基因-1的影响

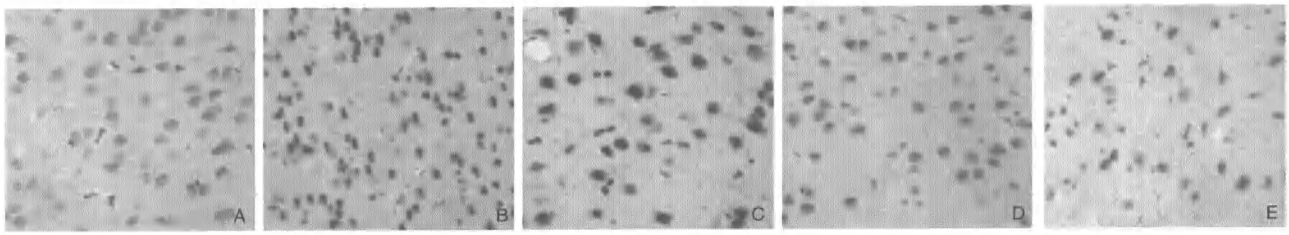
（正文见353页）



A：假手术组；B：I/R损伤组；C：ADM股静脉组；D：ADM颈内动脉组；E：ADM侧脑室组；1为脑皮质，2为脑海马CA1区

图1 各组大鼠脑皮质及海马CA1区神经元凋亡情况(TUNEL，×400)

Figure 1 Apoptosis of neurons in cerebral cortex and hippocampus CA1 zone of rats in each group (TUNEL, ×400)



A：假手术组；B：I/R损伤组；C：ADM股静脉组；D：ADM颈内动脉组；E：ADM侧脑室组

图2 各组大鼠脑组织Egr-1 mRNA表达(DAB，×400)

Figure 2 Expression of Egr-1 mRNA in brain tissues of rats in each group (DAB, ×400)

地塞米松对大鼠脑水通道蛋白4表达的影响

（正文见369页）

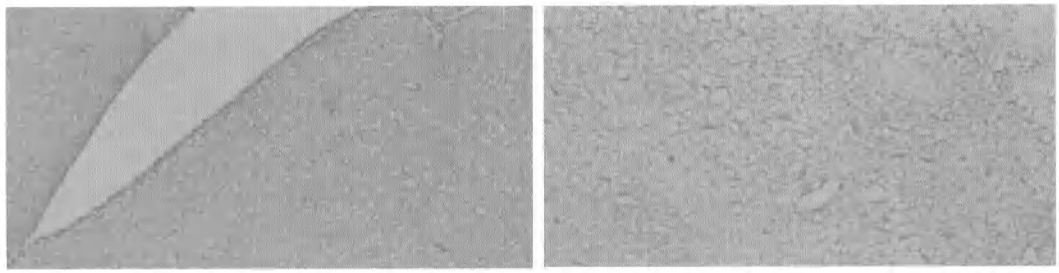


图1 地塞米松组治疗1 d时AQP-4阳性表达(免疫组化，×200)

Figure 1 Positive expression of AQP-4 on 1 day after treatment in dexamethasone group (immunohistochemistry, ×200)

图2 地塞米松组治疗12 h时AQP-4阳性表达(免疫组化，×400)

Figure 2 Positive expression of AQP-4 at 12 hours after treatment in dexamethasone group (immunohistochemistry, ×400)