

·基础研究·

# 高压氧对急性脑缺血再灌注小鼠 AQP-4 表达及血脑屏障通透性的影响\*

赵红<sup>1</sup> 曹士信<sup>2</sup> 卢晓梅<sup>3</sup> 张海鹏<sup>3</sup> 陈学新<sup>4</sup>

**摘要** 目的:探讨高压氧(HBO)对缺血再灌注小鼠脑组织中水通道蛋白-4 mRNA(AQP-4)的表达及血脑屏障通透性的影响。方法:复制清醒小鼠脑缺血再灌注模型,并于再灌注期间行 0.25MPa HBO 治疗 5 次,采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)方法、比色法及干湿法分别检测脑组织中 AQP-4 mRNA 的表达、伊文思蓝(EB)的含量及脑组织含水量。结果:脑缺血再灌注组 AQP-4 mRNA 的表达、EB 的含量及脑组织含水量明显高于假手术组,差异有显著性意义( $P<0.01$ )。高压氧组与假手术组相比,脑组织中 AQP-4 mRNA 的表达、EB 的含量及脑组织含水量变化无显著性差异。HBO+脑缺血再灌注组脑组织中 AQP-4 mRNA 的表达、EB 的含量及脑组织含水量较脑缺血再灌注组明显降低,差异有非常显著性意义( $P<0.01$ )。结论:高压氧可通过降低脑缺血再灌注中 AQP-4 mRNA 的表达,降低血脑屏障的通透性,减轻脑水肿。

**关键词** 高压氧;血脑屏障;缺血再灌注;水通道蛋白-4;脑水肿

中图分类号:R459.6,R743.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-10-0892-04

**Research on the effects of HBO on the expression of aquaporin-4 and permeability of blood brain barrier after acute cerebral ischemia-reperfusion in mice/ZHAO Hong, CAO Shixin, LU Xiaomei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(10): 892—895**

**Abstract Objective:**To investigate the effects of hyperbaric oxygen(HBO) on the expression of aquaporin-4(AQP-4) and permeability of blood brain barrier(BBB) after acute cerebral ischemia-reperfusion(IR)in mice. **Method:** Using conscious mice cerebral ischemia-reperfusion models, 0.25MPa HBO were applied 5 times during the reperfusion period. The expression of AQP-4mRNA,the contents of EB and brain water were determined by RT-PCR, spectrophotometer and wet and dry weight methods. **Result:** The expression of AQP-4mRNA,the contents of EB and brain water content increased significantly in ischemia-reperfusion(IR) group compared with sham surgery group ( $P<0.01$ ). The expression of AQP-4mRNA,contents of EB and brain water in HBO group were similar to sham surgery group ( $P>0.05$ ). The expression of AQP-4mRNA,the contents of EB and brain water in IR+HBO group decreased successively as compared with IR group ( $P<0.01$ ). **Conclusion:**HBO could alleviate cerebral edema via reducing permeability of blood brain barrier by the inhibition on expression of AQP-4 mRNA.

**Author's address** College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang, 110001

**Key words** hyperbaric oxygen;blood brain barrier;ischemia-reperfusion;aquaporin-4; cerebral edema

血脑屏障(brain blood barrier, BBB)破坏是缺血再灌注性脑损伤的重要病理生理基础<sup>[1]</sup>。在脑缺血再灌注损伤过程导致血脑屏障通透性增加,形成血管源性脑水肿是脑缺血再灌注损伤过程常见的后遗症。水通道蛋白-4(aquaporin, AQP-4)是分布在脑组织的主要水通道蛋白, AQP-4 对维持血脑屏障的完整性,在血管源脑水肿的病理生理变化中发挥着重要的作用<sup>[2-3]</sup>。

高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)作为治疗脑部疾病的一种有效的非创伤性方法,在临床广泛应用<sup>[4]</sup>,但高压氧在脑缺血再灌注损伤中对血脑屏障的作用机制有待于进一步研究。本实验通过动态检测经 HBO 治疗 5 次后脑缺血再灌注 AQP-4 mRNA 的表达,从基因水平进一步探讨高压氧在脑

缺血再灌注损伤中对 AQP-4 mRNA 的表达及血脑屏障通透性改变引起脑水肿形成的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

主要试剂:小鼠 AQP-4mRNA RT-PCR 一步法

\* 基金项目:辽宁省教育厅高等学校科研基金资助项目(2005L456)

1 中国医科大学基础医学院机能实验中心,沈阳市和平区北二马路 92 号,110001

2 沈阳炮兵学院制炮系战数教研室

3 中国医科大学基础医学院病理生理教研室

4 中国医科大学属第一临床医院高压氧科

作者简介:赵红,女,副主任,副教授,博士

收稿日期:2008-05-28

试剂盒(PROMEGA公司), DNA引物(上海生工有限公司), DNA marker(华美生物公司)TRIZOL Reagent(PROMEGER公司)。

## 1.2 主要实验设备

Wellscan MK2型酶标仪(芬兰 labssystem公司); Wellwash2型洗板机(芬兰 Labssystem公司); 三K30离心机(Sigma公司); PCR扩增仪(Sigma公司); 自动电泳凝胶成像分析仪(Alpha innotech corporation); 电泳仪; 高压氧舱(浙江)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 实验动物及分组:** 健康昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重为(30±0.5)g(由中国医科大学动物部提供)。动物随机分为假手术组(30只)、HBO组(30只)、HBO+脑缺血再灌注组(30只)、脑缺血再灌注组(30只)。

**1.3.2 脑缺血再灌注动物模型的复制:** 采用清醒小鼠颈部手术分离双侧颈总动脉, 用橡皮泥固定拉紧丝线阻断双侧颈总动脉30min, 松线后无菌缝合颈部皮肤<sup>①</sup>, 假手术组与HBO组只作颈部手术, 不阻断颈总动脉血流。

**1.3.3 实验鼠的高压氧处理:** HBO组与HBO+脑缺血再灌注组于术后第2、9、21、45、69小时进入HBO舱内, 待动物进舱后, 先用纯氧洗舱10min, 使舱内O<sub>2</sub>浓度>90%, 加压速率为0.0125MPa/min, 加压至0.25MPa, 在高压氧状态下停留60min, 其间用纯氧通气10min。停留毕, 以20min匀速减至常压。假手术组与脑缺血再灌注组亦置于舱内, 模拟除压力、氧浓度外的类同实验组的其他处理过程和环境条件。

**1.3.4 脑组织含水量测定:** 各组缺血后第4、11、23、24、48、72小时在相应时间点麻醉后快速断头取脑。采用干湿法脑组织约120mg(包括皮质和白质)称取湿重后<sup>②</sup>, 于85℃烤箱中烘烤至恒重后称取干重, 按Elliott公式:

$$\text{脑组织含水量}(\%) = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

**1.3.5 脑组织伊文思蓝(Evans Blue, EB)测定:** 参考Baskawa MK<sup>③</sup>甲酰胺测定皮肤EB含量的方法加以改进。在处死动物前1h经尾静脉注入2%EB生理盐水(1ml/kg), 在摘取脑组织前20min经心脏灌注生理盐水而直至流出清亮的液体为准。处死小鼠冰盘取脑组织用电子天平精确称其湿重后, 投入中试管中, 分别加入3ml甲酰胺, 加盖后于45℃水浴箱孵育48h轻轻摇匀, 离心15min(3000r/min), 取上清液在分光光度计比色( $r=623\text{nm}$ )。

**1.3.6 RT-PCR法检测脑组织中AQP-4mRNA的表达:** ①AQP-4引物使用Primer5.0设计。引物序列:

AQP-4引物: 上游: 5'-ACC CTG GCC TAT ACT AGG CG-3', 下游: 5'-CAT GCG CTA AGC GTT CTA TC-3', 扩增片段长度为292bp;  $\beta$ -actin内参照引物序列: 上游: 5'-GTG GGC CGG TGT AGG CAC CA-3', 下游: 5'-GGT TCG CCT TAG GGT TCA GG-3', 扩增片段长度为238bp。②脑组织细胞总RNA抽提: 取海马区脑组织0.1g/ml TRIzol 中于冰上匀浆后, 放置10min, 取上清加氯仿200 $\mu$ l, 轻摇混匀, 4℃离心10000rpm/min 15min后, 取上清液加500 $\mu$ l异丙醇, 室温下放置15min, 4℃离心12000r/min 15min, 弃上清加75%乙醇1ml, 4℃离心1200r/min 15min。室温干燥, 加无RNA酶水溶解。电泳扫描检测RNA含量, 置-70℃保存。逆转录总反应体积为25 $\mu$ l。

**1.3.7 RT-PCR检测结果的凝胶图像分析:** 以 $\beta$ -actin为内参对照, 对RT-PCR结果进行分析。扩增的产物在8%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 凝胶图像输入自动电泳凝胶成像分析仪, 应用chemi imager 5500 Analysis Software进行表达强度分析。结果判断以同时扩增的内参照 $\beta$ -actin的表达强度为基准, AQP-4mRNA表达的相对含量按下式计算:

$$\text{水通道蛋白-4相对含量} = (\text{水通道蛋白-4表达密度} / \beta\text{-actin表达密度}) \times 100$$

## 1.4 统计学分析

用SPSS12.0统计学软件进行统计学处理, 数据用均数±标准差表示, 组内比较采用重复测量数据的方差分析, 组间同时间点比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 对脑缺血再灌注小鼠脑组织中AQP-4 mRNA表达的影响

脑缺血再灌注4h后脑组织有少量AQP-4mRNA表达, 再灌注第11、23小时逐渐上升, 第48小时达到高峰, 72h后表达逐渐降低。脑缺血再灌注组AQP-4mRNA表达明显高于相应时间的假手术组, 差异有非常显著性意义( $P<0.01$ ); HBO+脑缺血再灌注组于第4、11、23、48、72小时AQP-4mRNA表达明显低于相应时间的脑缺血再灌注组, 差异有非常显著性意义( $P<0.01$ )。HBO组不同时间AQP-4mRNA表达与相应时间假手术组相比差异无显著性意义( $P>0.05$ )。见表1。

### 2.2 对脑缺血再灌注小鼠脑组织EB含量的影响

脑缺血再灌注后以第4小时脑组织EB渗出最多, 第11、23、48、72小时与第4小时相比脑组织EB渗出逐渐减少( $P<0.01$ ); HBO+脑缺血再灌注组于第

11、23、48、72 小时 EB 渗出明显低于相应时间的脑缺血再灌注组, 差异有非常显著性意义 ( $P<0.01$ ); HBO 组不同时间 EB 渗出与相应时间假手术组相比差异无显著性意义 ( $P>0.05$ ), 见表 2。

### 2.3 对脑缺血再灌注小鼠脑组织含水量的影响

脑缺血再灌注组于第 4、11、23、48、72 小时脑组

织含水量与相应时间的假手术组相比明显升高, 差异有显著性意义 ( $P<0.01$ ); HBO+脑缺血再灌注组于第 4、11、23、48、72 小时脑组织含水量明显低于相应时间的脑缺血再灌注组, 差异有显著性 ( $P<0.01$ ); HBO 组不同时间脑组织含水量与相应时间假手术组相比差异无显著性意义 ( $P>0.05$ ), 见表 3。

表 1 HBO 对脑缺血再灌注小鼠不同时间脑组织中 AQP-4 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	鼠数	再灌注时间				
		第 4 小时	第 11 小时	第 23 小时	第 48 小时	第 72 小时
假手术组	30	0.15±0.03	0.16±0.03	0.16±0.03	0.16±0.01	0.16±0.02
脑缺血再灌注组	30	0.17±0.02 <sup>①</sup>	0.33±0.02 <sup>①</sup>	0.82±0.05 <sup>①</sup>	1.04±0.04 <sup>①</sup>	0.91±0.05 <sup>①</sup>
HBO 组	30	0.15±0.04 <sup>②</sup>	0.15±0.01 <sup>②</sup>	0.16±0.03 <sup>②</sup>	0.16±0.03 <sup>②</sup>	0.15±0.02 <sup>②</sup>
HBO+脑缺血再灌注组	30	0.15±0.02 <sup>③</sup>	0.21±0.02 <sup>③</sup>	0.65±0.02 <sup>③</sup>	0.82±0.02 <sup>③</sup>	0.71±0.03 <sup>③</sup>

①与假手术组比  $P<0.01$ , ②与假手术组比  $P>0.05$ ; ③与脑缺血再灌注组比  $P<0.01$

表 2 HBO 对脑缺血再灌注小鼠不同时间脑组织中 EB 含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, \mu\text{g}/\text{prot}$ )

组别	鼠数	再灌注时间				
		第 4 小时	第 11 小时	第 23 小时	第 48 小时	第 72 小时
假手术组	30	10.14±3.87	10.21±3.18	10.09±3.02	10.06±3.10	10.12±3.04
脑缺血再灌注组	30	114.77±12.9 <sup>①</sup>	78.99±6.17 <sup>①</sup>	69.48±9.9 <sup>①</sup>	53.38±4.5 <sup>①</sup>	38.19±9.0 <sup>①</sup>
HBO 组	30	9.97±4.06 <sup>②</sup>	10.14±3.36 <sup>②</sup>	10.22±3.8 <sup>②</sup>	10.55±3.3 <sup>②</sup>	10.59±3.2 <sup>②</sup>
HBO+脑缺血再灌注组	30	94.52±12.7 <sup>③</sup>	62.13±7.38 <sup>③</sup>	50.34±4.7 <sup>③</sup>	44.82±2.0 <sup>③</sup>	30.62±8.3 <sup>③</sup>

①与假手术组比  $P<0.01$ , ②与假手术组比  $P>0.05$ ; ③与脑缺血再灌注组比  $P<0.01$

表 3 HBO 对脑缺血再灌注小鼠不同时间脑组织含水量的影响 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	鼠数	再灌注时间				
		第 4 小时	第 11 小时	第 23 小时	第 48 小时	第 72 小时
假手术组	30	60.14±0.51	60.13±0.63	60.12±0.73 <sup>①</sup>	64.15±0.72	62.12±0.62
脑缺血再灌注组	30	70.23±0.42 <sup>①</sup>	83.32±0.72 <sup>①</sup>	92.13±0.65 <sup>①</sup>	98.12±0.64 <sup>①</sup>	90.41±0.53 <sup>①</sup>
HBO 组	30	52.43±0.45 <sup>②</sup>	62.41±0.51 <sup>②</sup>	62.31±0.73 <sup>②</sup>	63.53±0.73 <sup>②</sup>	63.46±0.52 <sup>②</sup>
HBO+脑缺血再灌注组	30	56.51±0.62 <sup>③</sup>	69.32±0.62 <sup>③</sup>	85.62±0.52 <sup>③</sup>	85.42±0.62 <sup>③</sup>	81.23±0.63 <sup>③</sup>

①与假手术组比  $P<0.01$ , ②与假手术组比  $P>0.05$ ; ③与脑缺血再灌注组比  $P<0.01$

### 3 讨论

脑缺血再灌注过程中血脑屏障破坏是脑损伤加重的重要原因之一<sup>[8]</sup>。血脑屏障的通透性增加, 大量水溶性物质如电解质进入脑组织, 直接引起血管源性脑水肿, 导致疾病的病死率明显增加<sup>[9]</sup>, 所以探究在脑缺血再灌注损伤中血脑屏障通透性增加与脑水肿发生的关系是非常必要的。本实验通过复制脑缺血再灌注模型, 观察不同时间 BBB 通透性与脑组织含水量的变化。结果发现 BBB 通透性的增加与脑组织含水量增多相一致, 表明 BBB 破坏是参与脑水肿形成的重要因素之一。

水通道蛋白是近十年来发现的一系列具有同源性的内在膜蛋白家族成员, 迄今为止, 已克隆出 10 种 AQP, 它们广泛分布于动物、植物和微生物的细胞膜上。每种水通道蛋白都有组织分布特异性, 不同水通道蛋白具有相似结构, 均以四聚体形式存在, 每一个单体构成一个功能单位, 具有转运水的功能。其中 AQP-4 是中枢神经系统分布最广泛、含量最高的水通道蛋白。AQP-4 主要位于毛细血管内皮细胞接触的终足以及毛细血管内皮上, 即分布于 BBB 两侧, 因此 AQP-4 在介导水分子透过 BBB 过程中起

重要的作用<sup>[10-11]</sup>。实验研究表明脑缺血再灌注后第 4 小时 AQP-4mRNA 开始表达, 以后逐渐增加, 并与 EB 的渗出、脑组织含水量增多相一致, 提示 AQP-4 在脑缺血再灌注中导致血脑屏障的通透性增加及脑水肿的发生中有重要作用。AQP-4 在脑缺血再灌注中导致血脑屏障的通透性增加的机制可能为一方面 AQP-4 增高可使星形胶质细胞足突肿胀, 而肿胀的足突造成了血脑屏障的损伤; 另一方面脑缺血再灌注后星形胶质细胞内的某些基因和蛋白质合成障碍, 导致星形胶质细胞分泌某些活性物质异常<sup>[12-13]</sup>, 进一步影响内皮细胞内的 cAMP 磷酸激酶 A 介导的磷酸化改变, 加重了内皮细胞和紧密连接的损伤, 促进了血脑屏障的破坏<sup>[14]</sup>。AQP-4 表达增加导致脑水肿的机制可能是由于脑缺血再灌注损伤所致  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  泵活性下降, 使细胞内外渗透压失衡, 激活了细胞膜外的渗透压感受器, 通过信号转导机制使 AQP-4 基因表达增加, 导致 AQP-4 蛋白合成增加, 水通道开放, 大量水分子流入细胞内形成细胞内水肿<sup>[15]</sup>, 同时 AQP-4 增加导致血脑屏障的通透性增加, 也加剧了脑水肿的形成的另一重要因素。

高压氧疗法因其治疗效果确切被临床上广泛的

应用,但其治疗脑血管疾病相关方面的作用机制有待于进一步研究<sup>[16-18]</sup>。本实验观察了高压氧对脑缺血再灌注不同时间 AQP-4mRNA 的表达、血脑屏障的通透性及脑水肿的影响。实验研究结果表明,高压氧具有降低脑缺血再灌注后 AQP-4mRNA 表达,保护血脑屏障,减轻脑水肿的作用,其机制有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] Heo JH, Lucero J, Abumiya T, et al. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia [J]. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 1999, 19(6): 624—633.
- [2] Vajda Z, Pedersen M, Fuchtbauer EM, et al. Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice[J]. *PNAS*, 2002,99(4):13131—13136.
- [3] Ribeiro Mde C, Hirt L, Bogousslavsky J, et al. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. *J Neurosci Res*, 2006,83(7):1231—1240.
- [4] Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, et al. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2004,35(2):578—583.
- [5] 岑德意,周兰兰,明亮,等. 清醒小鼠反复脑缺血再灌注法致学习记忆障碍模型的建立[J]. *中国药理学通报*, 2000, 16(2): 220—223.
- [6] Stover JF, Beyer TF, Unterberg AW. Riluzole reduces brain swelling and contusion volume in rats following controlled cortical impact injury [J]. *J Neurotrauma*, 2000,17 (3): 1171—1175.
- [7] Baskawa MK, Dogan A, Rao AM, et al. Neurprotection effects of citicotine on brain edema and blood-brain barrier breakdown after traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg*, 2000, 92(4):448—452.
- [8] Hao HJ, Xiang J, Gao F, et al. Analysis of indexes of immune in cerebrospinal fluid with infection diseases of central nervous system [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2006,16 (5): 683—685.
- [9] 杨佳丹 董志. 脑缺血再灌注损伤的病因学研究进展[J]. *中国康复医学杂志*, 2006,21(10):935—938.
- [10] 刘佳, 王建平. 大鼠实验性脑出血后血肿周围水通道蛋白-4 动态变化的研究 [J]. *国际神经学神经外科学杂志*, 2006,33(2): 5—8.
- [11] Aoki K, Uchihara T, Tsuchiya K, et al. Enhanced expression of aquaporin-4 in human brain with infarction [J]. *Acta Neuropathol(Berl)*, 2003, 6(2):121—124.
- [12] 唐宇平,蔡定芳,刘军,等. 急性脑出血血肿周围组织水通道蛋白-4 表达与血脑屏障损伤的关系[J]. *中华神经科杂志*, 2005,38 (2):704—708.
- [13] 周敬华,曹学兵,孙圣刚. 大鼠尾壳核内注射凝血酶对 AQP4 蛋白表达的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2005,12(3):278—280.
- [14] 汪薇,张立新,张志强,等. 不同物理因子对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008,23 (8):694—696.
- [15] Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, et al. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2004,35(2):578—583.
- [16] Yang GY, Gong C, Qin Z, et al. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 19(1):135—143.
- [17] 侯燕芝,陈瑞,于培兰,等. 高压氧对急性损伤期全脑缺血再灌注大鼠脑内兴奋性氨基酸水平的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006,21(1):38—41.
- [18] 蒋杞英,霍本良. 高压氧对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死灶及 bcl-2 蛋白表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2006,21(10):890—892.

## 中国康复医学会第十届全国运动疗法学术会议征文通知

中国康复医学会第十届全国运动疗法学术会议定于 2009 年 8 月 21—23 日在四川省成都市召开。会议由中国康复医学会全国运动疗法专业委员会、四川省康复医学会主办,四川大学华西医院康复医学科承办。大会主题:运动康复、实践与提高。

会议将邀请国内外著名物理医学与康复专家作专题报告,并由资深治疗师主讲和示范,同时举行运动疗法专业委员会改选换届。会议授 I 类学分 10 分。

征文范围:神经系统伤病康复、运动系统伤病康复、内科疾病康复、假肢矫形技术、传统康复治疗技术、社区康复技术、康复护理技术、学科建设及康复教育等。

征文要求:论文应为未公开发表的文章,论文摘要按科技期刊的格式要求,字数在 1000 字以内,附个人简历(100 字以内)。参加优秀论文评选者,同时寄送 4 千字论文全文两份(信封注明优秀论文评选)。

投稿:gaoqiang\_hxkf@163.com。大会网址:http://www.hxkf.cn。优秀论文寄:成都市四川大学华西医院康复医学科 何红晨收,邮编:610041。截稿日期 2009 年 6 月 30 日。