

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.07.014

## 脑水肿时紧密连接蛋白 occludin 及 AQP4 的表达变化\*

常明秀<sup>1</sup> 陈丽霞<sup>2Δ</sup> 陈立杰<sup>2</sup> 孙 锋<sup>1</sup> 迟春玲<sup>1</sup>

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要 目的:**采用枕大池内注入脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)的方法建立大鼠脑水肿模型,观察脑组织病理形态学变化,脑组织含水量(brain water content, BWC),血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的紧密连接蛋白 Occludin 和水通道蛋白-4(aquaporin 4, AQP4)表达水平的动态变化,研究 AQP4 及 Occludin 与脑水肿形成的关系,及其可能的作用机制,为临床脑水肿的治疗提供理论依据。**方法:**选用 Wistar 健康成年大鼠,随机分为正常对照组,生理盐水组和脂多糖组,后两组的观察时间点选定于造模后 3 h、6 h、12 h、24 h、72 h。采用经皮穿刺枕大池内注入脂多糖的方法制备脑水肿动物模型,正常对照组、生理盐水组及脂多糖组分别于各时间点进行开颅取脑,测定脑组织含水量,通过 HE 染色法观察脑组织的病理形态学变化,应用 Western blot 方法检测 occludin 的表达变化。应用 RT-PCR 技术测定脑组织内 AQP4 mRNA 的表达变化。**结果:**生理盐水组各时间点中有少量 AQP4 mRNA 及 occludin 蛋白的表达,与正常对照组之间无显著性差异;脂多糖组在造模后 3 h AQP4 的 mRNA 表达开始增加,6-12 h 达高峰,此后明显下降,随后表达开始减弱,24-72 h 表达显著低于生理盐水组;occludin 蛋白表达下降出现于造模后 3 h,12-24 h 下降更明显,72 h 表达开始升高。**结论:**枕大池内注入脂多糖(LPS)所建立脑水肿模型中,脑组织含水量及血脑屏障通透性增加,病理学特点是血管源性脑水肿出现早且持久,后期伴有细胞毒性脑水肿的改变。AQP4 早期表达增强是胶质细胞的适应性反应,与血脑屏障的破坏有关,促进了血管源性脑水肿的发生。后期 AQP4 表达减弱是机体内在防御机制的表现,同时又促进细胞毒性脑水肿的形成。occludin 在脑组织中表达量随脑水肿的加重而降低,即与脑水肿的程度呈负相关,目前认为这与脑水肿时内皮细胞通透性增加,血脑屏障的通透性改变,导致 occludin 的表达下调有关,促进了血管源性脑水肿的发生。针对以上特点,我们可以进一步研究调控 AQP4 及 occludin 表达的药物,从而减轻脑损伤后脑水肿的程度,为脑水肿的治疗提供新的临床策略。

**关键词:**脑水肿; AQP4; 血脑屏障; occludin**中图分类号:** Q95-3, R741.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)07-1258-05

## The Relationship between the Expression of Tight Junction Protein Occludin and the Expression of AQP4 when Brain Edema Happened\*

CHANG Ming-xiu<sup>1</sup>, CHEN Li-xia<sup>2Δ</sup>, CHEN Li-jie<sup>2</sup>, SUN Feng<sup>1</sup>, CHI Chun-ling<sup>1</sup>

(1 The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

**ABSTRACT Objective:** To establish the rat models of brain edema by intracisternal administration of lipopolysaccharides (LPS), to observe the changes of brain pathology, brain water content (BWC), Tight Junctions (TJs) Occludin of blood brain barrier (BBB), the expression level of aquaporin-4 (AQP4), and to study the role and impossible mechanism of aquaporin-4 and Tight Junction Occludin of blood brain barrier in edema formation, and provide theoretical basis for the clinical therapy. **Methods:** Adult Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control (NC) group, normal saline (NS) group, and LPS group. The last two groups were examined at 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 72 h. Brain edema models were induced by intracisternal administration of LPS. Brain water content was measured according to the wet-dry weight method. Pathological changes were observed through light microscope after HE staining. AQP4 mRNA expression was detected by RT-PCR, and the expression of Occludin was measured by Western blot. **Results:** In NS group, brain water content, the expression of AQP4 mRNA and Occludin were no significant difference compared with those of NC group; in LPS group, cerebral edema was gradually increased after injected LPS and peaked during 6 h-12 h, AQP4 mRNA expression was up-regulated compared with NS group and peaked during 6 h-12 h then started to down-regulated. On the contrary, the expression of Occludin decreased obviously during 12-24 h, and increased at 72 h. **Conclusion:** In the animal model of brain edema established by intracisternal administration of LPS, the water content in brain and the blood brain barrier (BBB) permeability was increased. Vasogenic brain edema showed early and lasting in pathological characteristics, accompanied by cytotoxic brain edema later. The expression of AQP4 on the

\* 基金项目:黑龙江省青年基金项目(QC2010086)

作者简介:常明秀(1982-),女,硕士研究生,研究方向:脑血管病临床诊断与治疗,电话:13836178032,

E-mail:shiwang1126@163.com

Δ 通讯作者:陈丽霞,副主任医师,医学博士,硕士生导师,研究方向:脑血管病临床诊断与治疗,

电话:15804607125, E-mail: chenlx@sina.com

(收稿日期:2013-06-08 接受日期:2013-06-28)

early time is adaptation reaction of astrocytes, which is related to the breaking of BBB and accordingly induce the vasogenic edema. The expression of AQP4 which reduced rapidly latterly is the performance of body defense mechanism, at the same time, the formation of cytotoxic edema was. The expression of Occludin in brain tissue is reducing with the worse of the brain edema, which means negative correlation forms between the expression of Occludin and the extend of brain edema, it is currently believed that is related to the increasing permeability of BBB. Above all, we can do further research on drugs which regulate the expression of AQP4 and Occludin to decrease the edema after brain damage and provide new clinical strategy of therapeutic intervention in brain edema.

**Key words:** Brain edema; Aquaporin-4(AQP4); Blood-brain barrier (bbb); Occluding

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, R741.02 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)07-1258-05

## 前言

脑水肿是中枢神经系统疾病的一个重要病理过程,严重影响着预后,目前,脑水肿的发病机制还不是很明确,因此,研究脑水肿的发病病理机制以及防治措施具有重要意义。水通道蛋白4(aquaporin, AQP4)是脑内最主要的水通道蛋白,属特异性水通道蛋白,可介导自由水分子的跨膜转运,起着调节脑内水转运的重要功能,与脑脊液重吸收、渗透压调节、脑水肿形成等生理、病理过程密切相关<sup>[1]</sup>。血脑屏障是脑内各种物质转运与代谢的第一道屏障,对于维持脑内环境的动态平衡和生理状态有着重要的生物学意义。血脑屏障被破坏,毛细血管内血浆蛋白与水分渗出而引起脑组织细胞外液增多,引起血管源性脑水肿<sup>[2]</sup>。脑微血管内皮细胞及其间紧密连接(tight junction, TJ)是血脑屏障的核心结构<sup>[3]</sup>。紧密连接的主要功能蛋白是 occludin, 它的正常表达是紧密连接结构和功能稳定的前提<sup>[4]</sup>。研究证实, AQP4 与血脑屏障的功能密切相关<sup>[5]</sup>。本实验通过建立脂多糖诱导大鼠脑水肿模型,观察脑组织病理形态学变化,脑组织含水量, BBB 的紧密连接蛋白 Occludin 和 AQP4 表达水平的动态变化,研究 AQP4 及 Occludin 与脑水肿形成的关系,及其可能的作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料及仪器

用 Wistar 健康成年雄性大鼠 143 只,体重  $250 \pm 30$  g,由哈尔滨医科大学附属第二临床医学院动物实验中心提供。Trizol RNA Isolation 提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司,PCR 扩增试剂盒(TaKaRa Ex TaqTM)购自 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司,Lps(大肠杆菌 055:BS)购自美国 sigma 公司,兔抗鼠 AQP4 多克隆抗体购自美国 sigma 公司,兔抗大鼠 Occludin 多克隆抗体(Rabbit Anti-Occludin)及 HRp 标记羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司;GIS-2020 凝胶成像系统:上海 Tanon 公司。

### 1.2 动物分组

将动物随机分为:正常对照组(A组,  $n=13$ ,其中 5 只用于 Western blot 及 RT-PCR,5 只用于测量干湿重,3 只用于 HE 染色观察病理形态学变化),生理盐水组(NS组,  $n=65$ ,其中 25 只用于 Western blot 及 RT-PCR,25 只用于测量干湿重,15 只用于 HE 染色观察病理形态学变化),脂多糖组(LPS组,  $n=65$ ,其中 25 只用于 Western blot 及 RT-PCR,25 只用于测量干湿重,15 只用于 HE 染色观察病理形态学变化)。后两组的观察时间为造模后 3 h、6 h、12 h、24 h、72 h,每组均为 5 只。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 动物模型的制备** 取 Wistar 健康成年雄性大鼠,测体重后,用 10%水合氯醛按照 0.3 mL/100 g 体重腹腔注射麻醉后,取俯卧位固定于手术板上,于枕部及后颈部术区剪毛备皮,常规皮肤消毒,采用经皮穿刺枕大池内注入 0.85%生理盐水及 1 mg/ml 的 LPS 溶液,建立生理盐水组及脂多糖组,正常对照组:枕大池内只进针,不注药。正常对照组在术后 3 h 处死动物,并迅速取材,生理盐水组及脂多糖组分别根据不同观察时间点处死动物,并按不同实验要求迅速处理并取材。

**1.3.2 脑组织含水量测定** 至相应观察时间点,分别再次腹腔麻醉动物,迅速开颅取脑,用滤纸吸净脑组织表面血迹,沿中线切开,区分两侧大脑半球,取顶叶脑组织约 200 mg,用精密电子天平称重(wwt);然后置 107 °C 烤箱中,连续烘烤 48 h 至恒重(最后两次质量差  $\leq 0.2$  mg)后称干重(dw)。采用干湿重法,按 Elliott 公式计算脑组织含水量(%). 脑组织含水量% =  $(\text{wwt}-\text{dw})/\text{wwt} \times 100\%$ 。计算出各组不同时间段脑组织的含水量。

**1.3.3 脑组织病理形态学观察** 大鼠麻醉后,以 4 °C 冰生理盐水、4%多聚甲醛依次行心脏灌注,然后迅速开颅取脑,用 4%多聚甲醛常温下固定 24 h 以上,在视交叉处开始向后切取冠状切块,流水冲洗,然后梯度乙醇脱水(70%、80%、95%、100%),二甲苯透明 2 次,每次约 30 min,浸蜡共 3 h,石蜡包埋。用光学切片连续切取冠状石蜡切片(5  $\mu\text{m}$ ),常规苏木素-伊红(HE)染色,光学树脂封片,在光学显微镜下观察并拍照。

**1.3.4 Western blot 对 Occludin 表达进行定量检测** 造模后,将上述组织分别研磨匀浆后,加入蛋白裂解液,4 °C 放置 2 h,低温离心机 10000 $\times$  g 离心 10 min,收集上清分装。按考马斯亮蓝试剂盒操作过程检测蛋白含量。制备 100 g/L 的分离胶、50 g/L 的浓缩胶的聚丙烯酰胺凝胶,依次经上样,电泳,转印于 NC 膜上,封闭。分别加入兔抗大鼠 Occludin 多克隆抗体(Rabbit Anti-Occludin) 4 °C 过夜;TBST 缓冲液洗 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗,37 °C 摇床上孵育 1 h, TBST 缓冲液洗 3 次,每次 10 min。将显色剂按说明书比例配液,振荡器摇匀,显影,以  $\beta$ -actin 作为内参照。结果经 GIS-2020 凝胶处理系统进行照相分析。

**1.3.5 RT-PCR 方法检测脑组织 AQP4mRNA 的表达** 按 Trizol 试剂说明提取各组脑组织总 RNA;使用逆转录试剂盒(美国 Promega 公司),按操作说明合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。引物序列由加拿大上海生物工程公司合成,以  $\beta$ -actin 引物作为内参照进行 PCR 扩增。引物序列为:AQP4 上游 5'-ATCAGCCCTGGCCACATCAA-3';下游 5'-TCCAATTG-

CAACAGAAAACC-3'; β-actin 上游引物 :5'-GTGGGGCGCCC AGGCACCA-3'; 下游 5'-GCTCGGCCGTGGTGGTGAAGC-3'。PCR 扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 mim,94 ℃ 变性 30 s,59 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,30 个循环,72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 延伸 5~7 min 终止反应。凝胶图像系统照相分析,以 DNA Marker 作为标准分子量参照,结果以 AQP4 产物含量与同一样本 β-actin 产物含量的比值表示。

1.4 统计学处理

实验结果为计量资料,数据用  $\bar{X} \pm S$  表示。实验数据采用 SPSS13.0 for Windows 进行处理, 组间差异性比较采用成组 t

检验,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织含水量

正常对照组的脑组织含水量是 79.46± 0.42,NS 组脑组织含水量比较稳定,各时间点比较无显著性差异(P>0.05),各时间点与正常对照组比较无显著性差异(P>0.05)。LPS 组各时间点脑组织含水量较 NS 组显著增高(P<0.01),在 6 h 达高峰,比 3 h 明显增高(P<0.05),(见表 1)。

表 1 各时间点脑组织含水量变化(% , $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Changes of BWC in different groups(% , $\bar{x} \pm s$ )

|           | 3 h          | 6 h                       | 12 h         | 24 h         | 48 h         |
|-----------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Group A   | 79.46± 0.42  |                           |              |              |              |
| Group NS  | 79.52± 0.92  | 80.44± 0.12               | 79.24± 0.92  | 78.49± 0.44  | 78.14± 1.01  |
| Group LPS | 83.25± 0.82* | 86.28± 2.08* <sup>△</sup> | 84.94± 1.39* | 84.02± 1.07* | 83.65± 0.69* |

注:LPS 组与 NS 组相应时间点比较,\* P<0.01,同组与前一时间点比较,<sup>△</sup> P<0.05。

Note: Compared LPS groups with NS groups, \* P<0.01, compared with the front one in the same group, <sup>△</sup> P<0.05.

2.2 脑组织病理形态学变化

光学显微镜下观察各组变化,正常对照组脑组织切片未见明显病理性损伤(附图 1);NS 组未见明显的病理性损伤,偶见皮层神经元固缩(图 2)。LPS 组可见 3 h 时间点脑组织内神经元出现固缩,细胞和血管周围腔隙增宽,血管周围可见炎性细胞浸润;6~12 h 神经元固缩明显增多,血管周围腔隙明显增宽,

组织间隙可见大量水肿液,血管周围大量炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主,可见小胶质细胞增生(图 3,4)。24~72 h 血管周围腔隙增宽减轻,组织间隙仍有较多的水肿液,神经细胞水肿,核仁消失,核染色质边集,胶质细胞和内皮细胞肿胀明显,细胞外间隙减小。

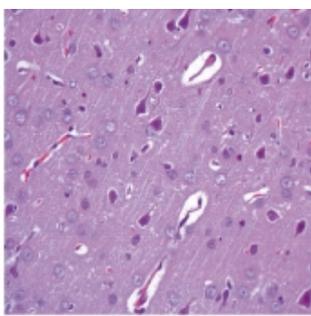
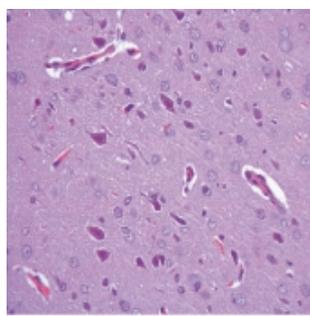
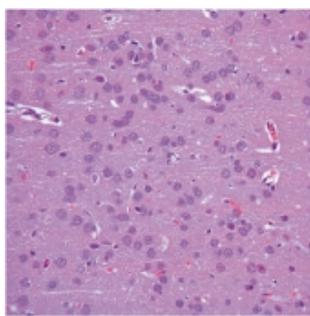
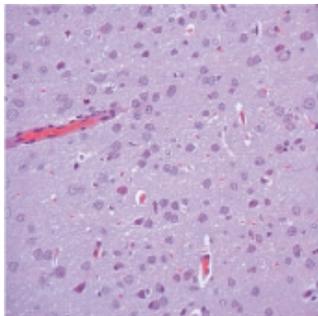


图 1 正常对照组脑组织切片未见明显病理性损伤(× 100)

图 2 NS 组未见明显的病理性损伤,偶见皮层神经元固缩(× 100)

图 3-4 LPS 组可见 3 h 时间点脑组织内神经元出现固缩,细胞和血管周围腔隙增宽,血管周围可见炎性细胞浸润;6~12 h 神经元固缩明显增多

Fig.1 There is no significant pathological lesion biopsy in brain tissue slice of normal control

Fig.2 There is no significant pathologic damage in NS group, but occasionally cortical neurons contracted

Fig. 3-4 Brain tissue neurons contracted, peripheral region of cell and perivascular space widened with the infiltration of inflammatory cells at 3 h in LPS; Neuronal pyknosis apparently increased at 6 ~ 12 h

2.3 各组脑组织 Western blot 检测 Occludin 表达结果

NS 组各时间点脑组织中 Occludin 蛋白有少量表达,与正常对照组之间无显著性差异;如图 5 所示,LPS 组 3 h Occludin 蛋白表达开始降低,6~12 h 持续降低,至 24 h 降至最低,72 h 开始上升,与 NS 组各个时间点相比有显著性差异(表 2)。

2.4 脑组织 AQP4mRNA 表达结果

参照 DNA Marker 条带,AQP4 和 β-actin 基因片段大小分别为 477 bp 和 312 bp,与目标片段大小一致,提示均为特异性扩增。NS 组各时间点脑组织中 AQP4mRNA 有少量表达,与正

常对照组之间无显著性差异;如图 6 所示 LPS 组 3 h AQP4mRNA 表达开始增加,显著高于 NS 组,至 6 h 达高峰,此后明显下降,24 h~72 h 显著低于 NS 组(表 3)。

3 讨论

3.1 脂多糖诱导大鼠脑水肿模型中 AQP4 的表达

AQP4 是水通道蛋白家族的一员,在中枢神经系统分布广泛,主要分布于脑和血管、蛛网膜下腔、脑室的基础面上,起着调节脑内水转运的重要功能,与脑水肿的形成与消除密切相关

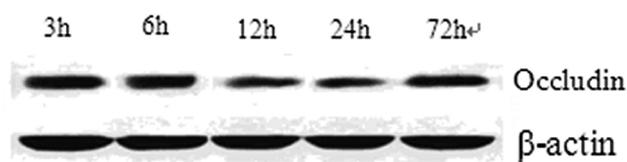


图 5 LPS 组脑组织 Occludin 蛋白表达的 Western blot 结果

Fig. 5 The Western blot results of Occluding protein expression in LPS group

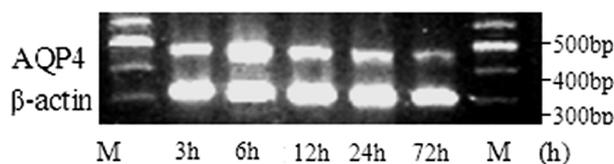


图 6 LPS 组脑组织 AQP4 mRNA RT-PCR 结果

Fig 6 The RT-PCR results of AQP4 mRNA expression in LPS group

表 2 各时间点脑组织 Occludin 蛋白表达变化( $\bar{x} \pm S$ )

Table 2 Changes of Occluding protein in different groups( $\bar{x} \pm S$ )

|           | 3 h         | 6 h                      | 12 h        | 24 h        | 48 h        |
|-----------|-------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Group A   | 0.62± 0.04  |                          |             |             |             |
| Group NS  | 0.61± 0.05  | 0.63± 0.01               | 0.60± 0.07  | 0.63± 0.02  | 0.59± 0.04  |
| Group LPS | 0.57± 0.05* | 0.51± 0.05* <sup>△</sup> | 0.49± 0.05* | 0.39± 0.05* | 0.50± 0.06* |

注:LPS 组与 NS 组相应时间点比较, \* P<0.01, 同组与前一时间点比较, <sup>△</sup>P<0.05。

Note: Compared LPS groups with NS groups, \* P<0.01, compared with the front one in the same group, <sup>△</sup> P<0.05.

表 3 各时间点脑组织 AQP4 mRNA 表达的变化

Table 3 Changes of AQP4 mRNA in different groups( $\bar{x} \pm s$ )

|           | 3h          | 6h                       | 12h         | 24h         | 48h         |
|-----------|-------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Group A   | 0.53± 0.24  |                          |             |             |             |
| Group NS  | 0.63± 0.09  | 0.72± 0.08               | 0.79± 0.11  | 0.78± 0.08  | 0.75± 0.16  |
| Group LPS | 0.77± 0.09* | 1.51± 0.25* <sup>△</sup> | 0.73± 0.08* | 0.48± 0.08* | 0.43± 0.07* |

注:LPS 组与 NS 组相应时间点比较, \* P<0.01, 同组与前一时间点比较, <sup>△</sup> P<0.01。

Note: Compared LPS groups with NS groups, \* P<0.01, compared with the front one in the same group, <sup>△</sup> P<0.01.

关<sup>[9]</sup>。AQP4 对水的通透作用呈特异性和高度选择性,对水的选择性转运表现在其孔道大小的合适性<sup>[7]</sup>。通本实验显示,脂多糖诱导的脑水肿模型中,正常对照组与生理盐水组中 AQP4mRNA 有少量表达,脂多糖组 AQP4mRNA 在造模后 3 h 开始增高,6 h 达到高峰,此后明显下降,造模后 24 h 显著低于生理盐水组。AQP4mRNA 表达变化与脑组织含水量的变化相一致,说明造模 6 h 内,AQP4 表达增强与脑水肿的发展过程相符,与血脑屏障的通透性变化有关。结合病理组织学变化,推测 AQP4 的表达增强与血管源性脑水肿的形成可能有着密切的联系。病理学研究表明,造模后 24 h 后血管源性脑水肿的程度略有减轻,细胞毒性脑水肿的改变明显,提示后期 AQP4 表达的显著减少与细胞毒性脑水肿的形成有关。

造模后 6 h AQP4 表达增加的机制还不是很明确,根据本实验研究结果及以往的发现<sup>[8]</sup>,我们推测,AQP4 表达增加的机制可能是脂多糖诱导的颅高压中,血脑屏障破坏,细胞外渗透压改变,胶质细胞为了保护神经元处于较适宜的外环境,维持酸碱平衡和渗透压平衡,摄取渗透性物质,造成自身高渗状态。AQP4 既是水通道,又是渗透压受体<sup>[9]</sup>,通过某一途径 AQP4 表达增加,使更多的水进入细胞,缓解细胞内渗透梯度,促进水肿液吸收。但是,AQP4 过度表达超过胶质细胞自身调节范围造成破裂自溶,细胞内的毒性物质释放,进一步加剧了血脑屏障的破坏,加重脑水肿的不良后果。由此可见,AQP4 表达增加是胶质细胞的适应性反应,同时,又促进了血管源性脑水肿的发

生。

Kiening 等研究发现<sup>[10]</sup>,AQP4 表达水平随着创伤性脑水肿的发展而下降,认为 AQP4 表达下降是细胞毒性脑水肿的原因。由此推测,AQP4 表达下调可在渗透压梯度和静水压促进水进入脑实质时,降低血脑屏障对水的通透性,使水转运功能下降,减轻胶质细胞水肿程度,延缓脑水肿的进展,反映了机体的内在防御机制。同时,AQP4 表达下调也导致液体在间质积聚,促进了细胞毒性脑水肿的形成。由此可见,AQP4mRNA 表达水平的这一时间规律可能是脂多糖诱导的颅高压中,血管源性脑水肿出现早而且持久,后期伴有细胞毒性脑水肿的缘故。目前,关于 AQP4 在脑水肿中的作用机制以及 AQP4 活性调节机制还知之甚少,若能探索针对调控 AQP4 的药物,在脑水肿的早期有效阻断其作用过程,可以减轻脑损伤,是今后脑水肿治疗的有效途径。

### 3.2 脂多糖诱导大鼠脑水肿模型中紧密连接蛋白 Occludin 的表达

血-脑屏障是分隔血液和脑组织的屏障,其相对不通透性保证了中枢神经系统的内环境的稳态;同时,血-脑屏障又是营养成分、代谢产物以及多种化学信号分子的进出通路。脑微血管内皮细胞及其间紧密连接是血脑屏障的核心结构,而 occludin 的正常表达是紧密连接结构和功能稳定的前提。Terry 等<sup>[11]</sup>证实,occludin 与脑血管内皮细胞的 "屏障" 作用密切相关。Yamamoto 等<sup>[12]</sup>认为 occludin 的正常表达对血脑屏障功能的稳

定具有积极作用。Occludin 是第一个被确定的定位于紧密连接的完整膜蛋白<sup>[13]</sup>。Occludin 在脑组织血管内皮的表达明显高于非神经组织的血管内皮,是血脑屏障通透性明显低于其它血组织屏障的重要原因<sup>[14]</sup>。本实验研究发现,脑水肿发展过程中, BBB 超微结构受损,且损伤程度随脑水肿的程度不同呈现动态变化趋势,此过程中 BBB 开放可能与小胶质细胞的超早期反应有关。BBB 结构受损,导致屏障作用减弱,通透性增加。生理状态下不能通透的物质穿越 BBB 进入组织间隙,继发血管源性脑水肿和中枢神经系统内环境紊乱,进一步加重脑水肿和脑组织损伤。

Wolburg<sup>[15]</sup>等认为 AQP4 是血脑屏障的重要组成部分,血脑屏障的破坏程度与 AQP4 表达上调密切相关。通过本实验结果我们可以看出,在脑水肿的发展过程中脑组织的含水量增加,至造模后 6-24 h 达高峰,这一动态变化与文献报道相一致<sup>[16]</sup>,说明 BBB 损伤是脑水肿过程中的主要病理基础,这与 Gasche 等研究发现:BBB 损伤是再灌注过程中脑水肿的主要病理基础<sup>[17]</sup>是一致的。本实验研究得出,脑水肿造模后 6 h AQP4 表达增加, Occludin 蛋白的表达水平呈下调趋势,因此,我们推断,脑水肿早期 AQP4 表达的增加促进了血管源性脑水肿的发生。造模后,即脑水肿 3 h, Occludin 蛋白表达开始下降,24 h 降至最低,72 h 开始升高,但未达到正常对照组水平,与 BBB 超微结构损伤程度的动态变化过程相符。结果提示 Occludin 表达在翻译水平均受到抑制, TJ 蛋白崩解, TJ 开放, BBB 完整性受损。我们认为 Occludin 表达水平能够代表 BBB 的结构状态,其下降程度可以作为 BBB 损伤程度的标志。可见, BBB 的结构变化与脑水肿脑组织损伤的发生发展密切相关, Occludin 表达的异常是脑水肿过程中 BBB 损伤的重要环节,为深入探讨脑水肿的病理生理机制提供了理论依据。

总之,通过本研究进一步阐明了,脂多糖诱导的脑水肿模型脑组织中 AQP4 与 Occludin 的表达变化与脑水肿的形成有关,可以进一步研究调控脑水肿药物的作用机制,以及针对上述指标的分子水平的脱水降颅压药物,从而为脑水肿的治疗提供新的理论基础以及研发新型对抗脑水肿药物,以求更好的控制脑水肿,降低中枢神经系统疾病的致死率及致残率。

#### 参考文献(References)

- [1] Amiry-Moghaddam M, Hoddevik EH, Ottersen OP. Aquaporins: multifarious roles in brain[J]. *Neuroscience*, 2010, 168(4): 859-861
- [2] Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development[J]. *Int J Dev Biol*, 2011, 55(4-5): 467-476
- [3] Abhor NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood-brain barrier[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(1): 13-25
- [4] Correale J, Villa A. Cellular elements of the blood-brain barrier [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(12): 2067-2077
- [5] Francesca B, Rezzani R, Aquaporin and blood brain barrier [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2010, 8(2): 92-96
- [6] Saadoun S, Papadopoulos MC. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience*, 2010, 168(4): 1036-1046
- [7] Yukutake Y, Yasui M. Regulation of water permeability through Aquaporin-4. *Neuroscience*, 2010, 168(4): 885-891
- [8] Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema [J]. *FASEB J*. 2004, 18(11): 1291-1293
- [9] Papadopoulos MC, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin water channels and brain edema[J]. *Mt Sinai J Med*, 2002, 69(4): 242-248
- [10] Kiening KL, van Landeghem FK, Schreiber S. Decreased hemispheric Aquaporin-4 is linked to evolving brain edema following controlled cortical impact injury in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 324(2): 105-108
- [11] Terry S, Nie M, Matter k, et al. Rho signaling and tight junction functions[J]. *Physiology(Bethesda)*, 2010, 25(1): 16-26
- [12] Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, et al. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(2): 521-533
- [13] Foster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease [J]. *Histochem Cell Bio*, 2008, 130(1): 55-70
- [14] 周其全, 高钰琪. 高原脑水肿时脑血管通透性改变与紧密连接蛋白的关系[J]. *中国微循环*, 2004, 8(1): 54-55  
Zhou Qi-quan, Gao Yu-qi. The relationship between cerebral vasopermeability and tight junction protein in highaltitude cerebral edema[J]. *Chinese Microcirculation*, 2004, 8(1): 54-55
- [15] Wolburg H, Noell S, Wolburg-Buchholz K, et al. Agrin, Aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier[J]. *J Neuroscientist*, 2009, 15(2): 180-193
- [16] 刘轲, 王明航, 李建生, 等. 老龄大鼠脑缺血再灌注血脑屏障损伤的变化及意义[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2005, 22(5): 413-415  
Liu Ke, Wang Ming-Hang, Li Jian-Sheng, et al. The significance of the changes in blood brain barrier during cerebral ischemic /reperfusion in the aged rats [J]. *J Apoplexy and Nervous Diseases*, 2005, 22(5): 413-415
- [17] Gasche Y, Copin JC. Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain edema[J]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2003, 22(4): 312-319