

人脑挫裂伤早期周围组织 AQP4 表达及血脑屏障超微结构观察

李新军¹, 韩杨云^{1,2}, 徐宏^{1*}, 孙中书¹, 周增俊¹, 龙晓东¹, 杨与敏¹, 邹林波¹

1. 四川省德阳市人民医院神经外科, 四川 德阳 618000

2. 四川大学华西医院神经外科, 四川 成都 610041

摘要: **目的** 观察人脑挫裂伤后 AQP4 和血脑屏障超微结构在脑水肿形成中不同时间点的变化特征, 探讨脑水肿的形成机制。 **方法** 取脑挫裂伤区组织标本 60 例 (观察组), 10 例非功能区正常脑组织标本 (对照组)。采用免疫组化和图像分析技术测定正常组及观察组伤后 2~72 h 相应时间点水肿区 AQP4 的表达水平, 同时观察脑水肿含水量, 血脑屏障指数, 血脑屏障超微结构的变化。 **结果** 与正常组相比较, 脑挫裂伤组在伤后 2 h 后 AQP4 表达开始增加 ($P < 0.05$), 6 h、8 h、12 h 明显增加 ($P < 0.01$), 24~72 h 达到最高 ($P < 0.01$)。AQP4 表达与脑含水量的变化趋于一致 ($r = 0.912, P < 0.01$); 血脑屏障 (BBB) 指数与脑含水量的变化趋于一致 ($r = 0.877, P < 0.01$); 水通道蛋白 4 表达与 BBB 指数呈显著正相关 ($r = 0.908, P < 0.01$)。伤后早期血脑屏障结构即发生改变, 随后血脑屏障结构被明显破坏, 24 h、72 h 血脑屏障破坏最为严重。 **结论** 脑挫裂伤后 AQP4 表达明显增强, BBB 的通透性增加, 提示 AQP4 在损伤后脑水肿的形成过程中起重要作用。

关键词: 脑挫裂伤; AQP4; 脑水肿; 血脑屏障; 超微结构

The expression of aquaporin-4 and the ultramicrostructure change of blood-brain barrier in human contusion brain tissue early after injury

LI Xin-jun¹, HAN Yang-yun^{1,2}, XU Hong^{1△}, SUN Zhong-shu¹, ZHOU Zeng-jun¹, LONG Xiao-dong¹, YANG Yu-mei¹, ZOU Lin-bo¹. 1. Department of Neurosurgery, The People's Hospital of Deyang City, Deyang, 618000, China; 2. Department of Neurosurgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: **Objective** To observe the expression of aquaporin 4 (AQP4) and the ultramicrostructure change of blood-brain barrier in human contusion brain tissue at different time points and investigate the mechanism of brain edema formation. **Methods** 60 cases brain contusion tissue (observation group) and 10 cases normal non-functional brain tissues (control group) were collected. The expression of AQP4 at different time point was detected by immunity histochemistry and image analytical technique at 2~72 h after injury, brain water contents, BBB index and ultramicrostructure were observed at the same time point. **Results** Compared with the normal control group, AQP4 expression increased in observation group at 2 h ($P < 0.05$), obviously increased at 6 h, 8 h, 12 h ($P < 0.01$), reached peak at 24~72 h ($P < 0.01$). The change of AQP4 expression and brain water content had same tendency ($r = 0.912, P < 0.01$) which also was displayed between BBB index and brain water content ($r = 0.877, P < 0.01$). The change of AQP4 expression and BBB index had significant positive correlation ($r = 0.908, P < 0.01$). Blood-brain barrier structure changed early after injury, and then destroyed, severely damaged at 24 h, 72 h. **Conclusions** The expression of AQP4 and the permeability of BBB significantly increased after brain contusion which suggesting AQP4 may play an important role in the brain edema formation after brain contusion.

Key words: brain contusion; aquaporin-4; brain edema; blood-brain barrier; ultramicrostructure

水通道蛋白 4 (aquaporin 4, 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

收稿日期: 2012-02-13; 修回日期: 2012-04-08

作者简介: 李新军 (1980-), 男, 主治医师, 硕士。主要从事脑血管疾病和肿瘤的基础和临床研究。

通讯作者: 徐宏, 主任医师, 四川省德阳市人民医院神经外科。

理、病理过程密切相关^[1]。血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 是存在于脑和脊髓内的毛细血管与神经组织之间的一个动态的调节界面。此界面具有保护性作用,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^[2]。研究证实 AQP4 与血脑屏障的功能密切相关^[3]。以往实验多基于动物实验对脑挫裂伤后脑水肿的形成机制进行研究,对人脑损伤后脑挫裂伤组织脑水肿的形成机制研究甚少。为了进一步明确早期人颅脑损伤脑水肿的形成机制,实验通过分析人颅脑损伤后脑挫裂伤后脑组织 AQP4 表达和 BBB 的通透性变化,且在电镜下直接观察 BBB 的变化特征,以期得到更加客观、直接的依据,进一步探讨人脑挫裂伤后脑水肿的形成机制。

1 资料和方法

1.1 资料

纳入标准:经颅脑 CT 证实为脑挫裂伤,年龄在 30~40 岁之间且需手术治疗的患者 92 例。排除由于年龄较大及年龄较小、存在其他器官复合伤的患者 22 例,70 例患者纳入实验样本,其中男 40 例,女 30 例,年龄 30~40 岁,平均年龄 31.34 ± 4.25 岁,致伤原因包括:交通伤 52 例,坠落伤 8 例,打击伤 10 例。手术过程切取小部分正常脑组织及挫裂伤脑组织,取脑挫裂伤区中心直径约 3 cm 范围内的脑组织标本 60 例(观察组),非功能区相对正常脑组织 10 例(对照组)。(10 例相对正常脑组织均因手术过程中需行内减压术而切除的额极或颞极脑组织)。实验经德阳市人民医院伦理委员会认证通过,且均征得患者家属同意,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 固定、包埋、切片、染色 样本经薄刀片切取 1 mm 脑组织,4% 多聚甲醛外固定 6 h,清水冲洗 12 h,梯度浓度酒精脱水,氯仿、二甲苯脱去酒精,浸蜡,软石蜡包埋制成蜡块备用。自动切片机连续切片,片厚 5 μm 。

1.2.2 脑含水量测定 取脑组织约 150 mg(精确到 1/1000 g),称湿重后,置入 100℃ 恒温箱中,24 h 后取出称干重。 $[(\text{湿重}-\text{干重})/\text{湿重}] \times 100\%$ 来计算脑含水量代表脑水肿程度。

1.2.3 AQP4 蛋白表达检测 切片常规脱蜡至水,经 3% H₂O₂ 孵育 10 min(室温),养血清室温孵育 20 min,一抗为兔抗鼠 AQP4 (1:50) 多克隆抗体,

4℃ 过夜, SABC 试剂盒严格按试剂使用说明书操作; DAB 显色,镜下控制。常规脱水、透明、封片和镜检。阳性结果为细胞膜染有黄色细颗粒。免疫组化结果图像分析:采用 Image-Pro-Plus 图像分析系统对 AQP4 蛋白染色结果进行半定量分析,每组每张切片随机选择 5 处大脑皮层,每张切片选 5 个高倍镜视野 (SABC $\times 400$),分析每组平均相对灰度值 (average comparative density, ACD),灰度值高,表明 AQP4 含量低,灰度值低,表明 AQP4 含量高。

1.2.4 BBB 通透性测定 血脑屏障 (BBB) 指数的测算作为 BBB 完整程度的指标。穿刺或腰穿取脑脊液检查,抽取静脉血行血清白蛋白检测。测定血清和脑脊液白蛋白及总蛋白应用 CX7 全自动生化分析仪,白蛋白采用溴甲酚绿比色法,总蛋白采用双缩脲比色法。血清 MBP 的测定采用双抗体夹心酶联免疫吸附法,药盒由四川大学华西医学中心重组 DNA 研究室提供。BBB 指数的计算按王拥军^[4]等介绍 BBB 指数计算公式即 BBB 指数 = 脑脊液白蛋白 (Albcsf) / 血清白蛋白 (Albs)。

1.2.5 血脑屏障超微结构观察 对照组和观察组各时间点灌注固定好的脑组织,取 1.0 mm \times 1.0 mm \times 1.0 mm 的组织块,经戊二醛固定,1% 锇酸后固定,系列丙酮脱水,环氧树脂 618 原位包埋,超薄切片 (60 nm),双铅染色,置于透射电镜下观察、拍片。

1.3 统计学处理

实验计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行统计分析,组间比较采用两样本 *t* 检验;两变量间相关性用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 表示差异有非常显著性统计学意义。

2 结果

2.1 AQP4 表达

AQP4 蛋白在星形胶质细胞和室管膜细胞内表达呈阳性,尤其在毛细血管和软脑膜直接接触的胶质细胞上及血管周。AQP4 的阳性产物仅分布于胞膜,胞浆和胞核未见阳性染色。正常对照组阳性表达稀少,观察组后 2 h (图 1) 阳性细胞及血管开始增多 ($P < 0.01$), 6 h (图 1b)、8 h (图 2)、12 h (图 3)、24 h (图 4)、72 h (图 5) 均高于正常对照组 ($P < 0.01$),其中 24 h 阳性细胞及血管最多 (图 6) ($P < 0.01$),72 h 开始下降但仍高于正常对照组 (图 6) ($P < 0.05$)。

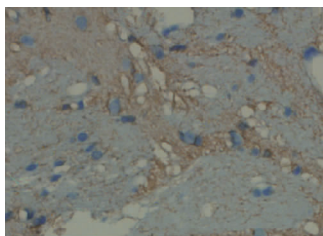


图 1 观察组 2h AQP4 的表达 (SABC × 400)

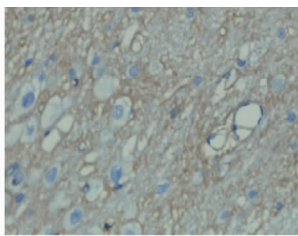


图 2 观察组 6 h 可见空泡 (SABC × 400)

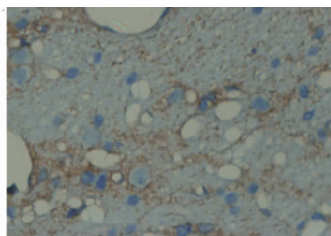


图 3 观察组 8 h 组织间隙增宽 (SABC × 400)

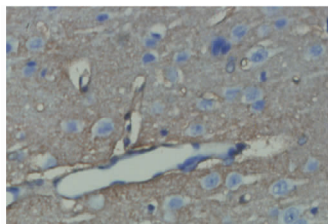


图 4 观察组 12 h 染色增强, 水肿加重 (SABC × 400)

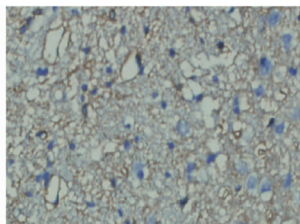


图 5 观察组 24 h 染色最强, 水肿达到最高峰 (SABC × 400)

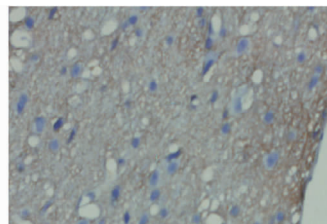


图 6 观察组 72 h 染色有所减弱, (SABC × 400)

2.2 脑含水量的检测

脑挫裂伤后 2 h 脑组织含水量已明显增加 ($P < 0.01$), 6 h、8 h、12 h 继续增加 ($P < 0.01$), 其中脑挫裂伤后 24-72 h 含量达到顶峰 ($P < 0.01$), 以后逐渐下降 (见表 1)。

2.3 BBB 通透性检测

脑挫裂伤后脑组织 BBB 指数增加, 2 h、6 h、8 h、12 h、24 h、72 h BBB 指数均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 其中 24-72 h 达到高峰 ($P < 0.01$), 72 h 后 BBB 指数虽有所下降; 但仍高于正常对照组 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.4 电镜观察

对照组 (图 7) 神经元的细胞核大而圆, 核仁、细胞膜清楚, 染色质密度均一, 核仁明显, 细胞器中可见线粒体、粗面内质网和高尔基体, 神经突起、微血管内皮细胞层、基底层结构正常。观察组初期 2 h (图 8) 毛细血管内皮细胞中吞饮小泡增多, 皱褶增多, 毛细血管周围星形胶质细胞足突肿胀出现水肿, 仍与毛细血管基底膜相连, 神经元和胞体开始萎缩, 但不明显。毛细血管基底膜基本保持完整。4-8 h (图 9) 毛细血管基底膜增厚, 可见肿胀的线粒体。12 h (图 10) 内皮细胞明显肿胀, 基底膜开始溶解, 可见神经纤维脱髓鞘改变。24 h、72 h (图 11、图 12) 星形胶质细胞皱缩, 细胞突起肿胀, 胶质细胞足突内大量空泡出现严重水肿, 胶质疏松, 核蛋白和胞浆蛋白成分松散丢失, 线粒体高

度肿胀、模糊、消失、空化, 毛细血管基底膜断裂模糊, 并开始消失。少量神经元和胶质细胞坏死、崩解。脑组织之间可见密度不均匀的渗出物, 及中性粒细胞的浸润

2.5 水通道蛋白 4 表达与血脑屏障通透性、脑含水量的相关分析

对 AQP4 与血脑屏障通透性、脑含水量进行相关分析结果提示: AQP4 的表达与患者的年龄、性别和手术方式及脑挫裂伤病情无关 ($r = 0.4524, P > 0.05$); AQP4 表达与脑含水量的变化规律趋于一致, 呈正相关 ($r = 0.912, P < 0.01$); BBB 指数与脑含水量的变化规律趋于一致, 呈正相关 ($r = 0.877, P < 0.01$); AQP4 表达与 BBB 指数也呈正相关 ($r = 0.908, P < 0.01$) (见表 1)。

3 讨论

AQP4 属于水通道蛋白家族的一员, 在中枢神经系统广泛分布, 主要分布在脑与液体腔隙 (如血管、蛛网膜下腔和脑室) 的接触面上, 起着调节脑内水转运的重要功能, 与脑水肿形成和消除密切相关^[5]。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^[6]。AQP4 通过对水的通透作用在中枢神经系统中的多种疾病的脑水肿中发挥了不可忽视的作用^[7]。实验应用免疫组化法观察脑挫裂伤后 AQP4 表达的动态变化规律, 观察组后 2 h AQP4 表达及血管开始增多, 随后逐渐增加, 达到高峰, 72 h

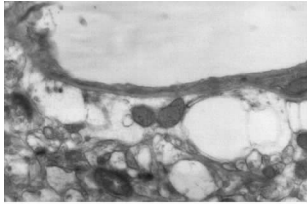


图7 对照组 BBB 结构完整 (TEM × 40000)

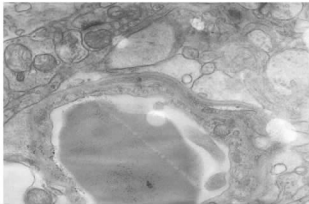


图8 观察组 2 h 吞饮小泡增多,毛细血管基底膜基本保持完整 (TEM × 40000)

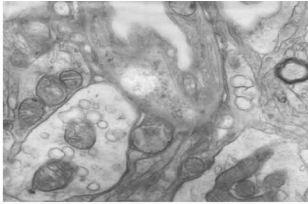


图9 观察组 4-8 h 毛细血管完整性破坏,足突和细胞可见肿胀的线内皮粒体 (TEM × 40000)

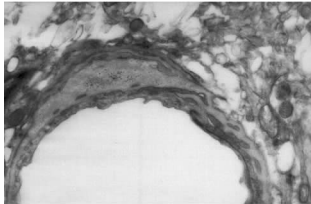


图10 观察组 12 h 渗出物,神经纤突触界线模糊、消失 (TEM × 40000)

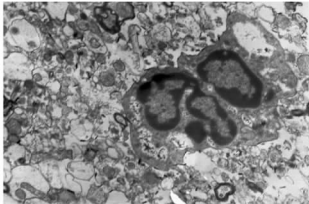


图11 观察组 24 h 中性粒细胞的浸润 (TEM × 40000)

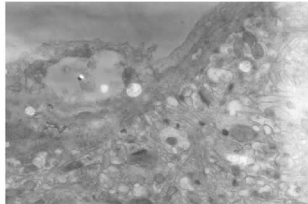


图12 观察组 72 h 胶质细胞足突内大量空泡,线粒体高度肿胀、毛细血管基底膜断裂 (TEM × 40000)

表1 脑挫裂伤后不同时间点的 AQP4 表达、脑含水量、BBB 指数 ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	2 h	6 h	8 h	12 h	24 h	72 h
AQP4 表达量 ACD($\bar{x} \pm s$) (n = 10)	对照组	1.25 ± 0.05	1.25 ± 0.05	1.25 ± 0.05	1.25 ± 0.05	1.25 ± 0.05	1.25 ± 0.05
	观察组	1.29 ± 0.01 ^a	1.40 ± 0.030 ^a	1.57 ± 0.04 ^a	1.65 ± 0.05 ^a	1.30 ± 0.03 ^a	1.26 ± 0.01 ^a
脑含水量($\bar{x} \pm s$) (n = 10)	对照组	77.46 ± 0.89	77.46 ± 0.89	77.46 ± 0.89	77.46 ± 0.89	77.46 ± 0.89	77.46 ± 0.89
	观察组	78.57 ± 0.68 ^b	79.50 ± 0.67 ^b	80.48 ± 0.49 ^b	82.60 ± 0.72 ^b	78.34 ± 0.37 ^b	77.47 ± 0.66 ^b
BBB 指数($\bar{x} \pm s$) (n = 10)	对照组	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01
	观察组	0.49 ± 0.03 ^c	0.68 ± 0.01 ^c	0.78 ± 0.01 ^c	0.88 ± 0.01 ^c	0.54 ± 0.01 ^c	0.32 ± 0.01 ^c

注:ACD 各时间点观察组与对照组比较均^a $P < 0.01$,脑含水量各时间点观察组与对照组比较均^b $P < 0.01$,BBB 指数各时间点观察组与对照组比较均^c $P < 0.01$ 。

开始下降。脑挫裂伤后脑组织含水量逐渐增加,伤后 24 ~ 72 h 达到顶峰,以后逐渐下降。AQP4 表达与脑含水量的变化规律趋于一致,呈正相关。证实脑挫裂伤早期 AQP4 即参与脑水肿形成、消退过程,伤后 2 h AQP4 表达开始增加,水肿也随之增加,24 ~ 72 h AQP4 表达的高峰期即为水肿的高峰期。这与 Taya 等^[8]、沈礼芹等^[9] 研究结果基本一致。

BBB 界面具有保护性作用,一旦破坏,可引起血管源性脑水肿。但 AQP4 的基因缺失是否会导致血脑屏障完整性的破坏,目前观点不一。Saadoun^[10] 等认为敲除成年小鼠水通道蛋白 4 基因不能改变血脑屏障的完整性。而 Zhou 等^[11] 认为敲除成年小鼠水通道蛋白 4 基因不能改变血脑屏障的完整性。Wolburg 等^[12] 认为 AQP4 是血脑屏障的重要组成,血脑

屏障的破坏程度与 AQP4 表达上调密切相关。实验应用 BBB 指数及电镜下直接观察血脑屏障的超微结构变化发现脑挫裂伤后脑组织 BBB 指数明显高于正常对照组,而同时在伤后初期血脑屏障结构即发生改变,随后血脑屏障结构被明显破坏,24 h、72 h 血脑屏障破坏最为严重。AQP4 表达与 BBB 指数呈正相关。提示 AQP4 与血脑屏障的完整性及功能有密切联系,与 Higashida 等^[13] 的研究结果相似。

脑挫裂伤后 AQP4 表达上调,这种现象是机体的一种保护性反应,还是 AQP4 增高直接或间接参与了血脑屏障的破坏和脑水肿的形成? 史文珍等^[14] 研究发现与野生型小鼠比较,AQP4 基因缺失加重 NMDA 诱导的皮层损伤,增加损伤区变性神经元密度,加重血脑屏障通透性的增高。提示 AQP4 在 NM-

DA 诱导的脑损伤中可能起保护作用。AQP4 表达增加导致血脑屏障损伤,形成血管源性水肿,相反,血脑屏障未损伤,细胞毒性脑水肿并未发现 AQP4 表达增加;实验结果提示 AQP4 是脑水肿的重要因素,尤其是与血脑屏障破坏所致血管源性水肿的形成有关。笔者认为 AQP4 可能通过 PKC 途径中自身发生磷酸化,调节内皮生长因子(VEGF)增加 BBB 通透性^[15]、增加 K⁺ 虹吸,加剧电解质紊乱、引起细胞内 Ca²⁺ 超载^[16]等来加重脑水肿。因此通过应用 AQP4 抑制剂(乙酰唑胺^[17]、TGN-020^[18]等)抑制 AQP4 过度表达,通过信号转导机制控制 AQP4 表达来调节水平衡,减轻 BBB 损伤程度,从而达到防治脑水肿和减轻脑损伤的目的。虽然部分学者已经在脑水肿的治疗药物的研究中取得了一定的进展^[19],但特异性的 AQP4 抑制剂及特异性靶点治疗仍不明确,AQP4 的分子作用机制仍不清楚,须更加深入研究,以求更好的控制脑水肿,降低颅脑损伤致残率及致死率。

虽然本研究取得了与其他实验相似的结果,本实验仅观察人颅脑损伤后早期(72 h)内脑挫裂伤后 AQP4 和血脑屏障超微结构在脑水肿形成中的不同时间点的变化特征,由于患者就诊时限、交通条件、手术准备时间等方面的限制,未对 2 h 前及 72 h 后期变化特征进行研究。另外由于样本的个体差异如年龄、性别等及手术及取材部位局限,不能对同一患者伤后不同时间脑组织中 AQP4 进行检测及对比,这些因素对实验结果的影响不能排除。因此笔者认为,需扩大标本收集时限、改进研究方法、减少个体差异(如性别、年龄、体质等),尽量选取同一患者脑组织样本(如患者存在脑挫裂伤需手术减压),进一步明细观察时间点,以期得到更加可靠客观的依据。

参 考 文 献

- [1] Amiry-Moghaddam M, Hoddevik EH, Ottersen OP. Aquaporins; multifarious roles in brain. *Neuroscience*, 2010, 28: 168 (4): 859-861.
- [2] Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H. Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol*, 2011, 55 (4-5): 467-476.
- [3] Francesca B, Rezzani R. Aquaporin and blood brain barrier. *Curr Neuroparmacol*, 2010, 8 (2): 92-96.
- [4] 王拥军. 神经病学实验室诊断技术. 北京: 科技文献出版社, 1998: 395-398.
- [5] Saadoun S, Papadopoulos MC. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience*, 2010, 168 (4): 1036-1046.
- [6] Yukutake Y, Yasui M. Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience*, 2010, 28: 168 (4): 885-891.
- [7] Romeiro RR, Romano-Silva MA, De Marco L, et al. Can variation in aquaporin 4 gene be associated with different outcomes in traumatic brain edema? *Neurosci Lett*, 2007, 426 (2): 133-134.
- [8] Tayak K, Marmarou CR, Okuno K, et al. Effect of secondary insults upon aquaporin-4 water channels following experimental cortical contusion in rats. *J Neurotrauma*, 2010, 27 (1): 229-239.
- [9] 沈礼芹, 蒋金泉, 郭建杰. 脑挫裂伤后脑组织中 AQP4 的表达变化及意义. *山东医药*. 2011, (26) 6-7.
- [10] Saadoun S, Tait MJ, Reza A, et al. AQP4 gene deletion in mice does not alter blood-brain barrier integrity or brain morphology. *Neuroscience*, 2009, 161 (3): 764-772.
- [11] Zhou J, Kong H, Hua X, et al. Altered blood-brain barrier integrity in adult aquaporin-4 knockout mice. *Neuroreport*, 2008, 19 (1): 1-5.
- [12] 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 Neuroscientist*, 2009, 15 (2): 180-193.
- [13] Higashida T, Kreipke CW, Peng C, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 2011, 114 (1): 92-101.
- [14] 史文珍, 赵春贞, 黄雪琴等. 水通道蛋白 AQP4 基因缺失加重 NMDA 诱导的小鼠脑损伤. *浙江大学学报(医学版)*. 2011, 40 (2): 145-149.
- [15] Wang P, Ni RY, Chen MN, et al. Expression of aquaporin-4 in human supratentorial meningiomas with peritumoral brain edema and correlation of VEGF with edema formation. *Genet Mol Res*, 2011, 10 (3): 2165-2171.
- [16] Thrane AS, Rappold PM, Fujita T, et al. Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca²⁺ signaling events elicited by cerebral edema. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (2): 846-851.
- [17] Katada R, Nishitani Y, Honmou O, et al. Expression of aquaporin-4 augments cytotoxic brain edema after traumatic brain injury during acute ethanol exposure. *Am J Pathol*, 2012, 180 (1): 17-23.
- [18] Igarashi H, Huber VJ, Tsujita M, et al. Pretreatment with a novel aquaporin 4 inhibitor, TGN-020, significantly reduces ischemic cerebral edema. *Neurol Sci*, 2011, 32 (1): 113-116.
- [19] 姜渭, 曹碗君, 邝芳. 甘露醇和高渗盐溶液在脑水肿治疗中的应用. *国际神经病学神经外科学杂志*. 2010, 37 (6): 551-554.