

Kir4.1 和 AQP4 在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤中的作用

孙伟 苏志强 刘建丰 盛利 杨鲲鹏 赵静奕 吴向阳

【摘要】 目的 观察大鼠局灶性脑缺血再灌注模型 Kir4.1 和 AQP4 的变化,探讨其在再灌注损伤中的作用。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 50 只,按照随机数字表法分成假手术组、缺血 2 h 再灌注 3 h 组、12 h 组、24 h 组和 72 h 组,每组 10 只。应用“线栓法”实现大鼠右侧大脑中动脉闭塞,2 h 后拔出线栓进行再灌注,并在相应时间点处死大鼠。利用免疫组化和实时定量 PCR(RT-PCR)法观察 Kir4.1 和 AQP4 蛋白表达及 mRNA 水平的变化。**结果** 与假手术组相比,缺血再灌注组大鼠梗死灶周围区皮质 Kir4.1、AQP4 的蛋白表达和 mRNA 水平明显升高,于再灌注后 3 h 开始升高,24 h 达到高峰,72 h 开始下降。假手术组、缺血再灌注 3 h、12 h、24 h 和 72 h 组 Kir4.1 mRNA 水平分别为 0.34 ± 0.02 、 0.47 ± 0.06 、 0.61 ± 0.08 、 0.83 ± 0.10 、 0.68 ± 0.09 , AQP4 的 mRNA 水平分别为 0.49 ± 0.05 、 0.66 ± 0.09 、 0.91 ± 0.09 、 1.12 ± 0.11 、 0.94 ± 0.08 。Kir4.1 与 AQP4 的 mRNA 水平呈正相关($r=0.780$, $P=0.000$)。**结论** Kir4.1 和 AQP4 相互作用,共同参与了脑缺血再灌注损伤的形成。

【关键词】 脑缺血; 再灌注损伤; 内部整流钾离子通道 4.1; 水通道蛋白

【中图分类号】 R743.31 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)05-0484-04

Role of Kir4.1 and aquaporin-4 in focal brain ischemia-reperfusion injury in rats SUN

Wei*, SU Zhi-qiang*, LIU Jian-feng*, SHENG Li*, YANG Kun-peng*, ZHAO Jing-yi, WU Xiang-yang.

*Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

【Abstract】 Objective To observe the expressions of Kir4.1 and aquaporin-4 (AQP4) in rats with focal brain ischemia-reperfusion (IR) injury and clarify the role of Kir4.1 and AQP4 in IR injury.

Methods Male Wistar rats were randomized into 5 groups, including a sham-operated group and 4 IR groups with focal brain IR injury induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO). In the 4 IR groups, the rats were subjected to a 2-hour ischemia and sacrificed after reperfusion for 3, 12, 24 or 72 h. Immunohistochemistry and RT-PCR were used to detect the expressions of Kir4.1 and AQP4 proteins and mRNAs in the brain tissues, respectively.

Results Compared with the sham-operated group, the IR groups showed significantly increased expressions of Kir4.1 and AQP4 in the peri-infarct cortex surrounding the primary infarct area ($P<0.05$), which began at 3 h after the reperfusion and reached the peak level at 24 h, subsiding at 72 h. The mRNA levels of Kir4.1 (represented as the absorbance) were 0.34 ± 0.02 , 0.47 ± 0.06 , 0.61 ± 0.08 , 0.83 ± 0.10 and 0.68 ± 0.09 in the sham-operated group and the 4 IR groups with reperfusion for 3, 12, 24 and 72 h, respectively. The mRNA levels of AQP4 were 0.49 ± 0.05 , 0.66 ± 0.09 , 0.91 ± 0.09 , 1.12 ± 0.11 and 0.94 ± 0.08 in the 5 groups, respectively. Kir4.1 expression was positively correlated to AQP4 expression at the mRNA level ($r=0.780$, $P=0.000$). **Conclusion** Kir4.1 and AQP4 react with each other in the course of focal brain ischemia-reperfusion, both playing roles in the mechanism of brain IR injury.

【Key words】 Brain ischemia; Reperfusion injury; Kir4.1; Aquaporin-4

内部整流钾离子通道 4.1 (inward rectifying K⁺

channel 4.1, Kir4.1) 和水通道蛋白 4(aquaporin-4, AQP4) 是中枢神经系统(CNS)内重要的膜通道蛋白,二者通过介导 CNS 与血液间 K⁺和水的转运实现神经元内外渗透平衡,是维持 CNS 正常功能的关键结构^[1]。Kir4.1 与 AQP4 的功能彼此耦联;Kir 离子流形

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.05.013

作者单位:150001 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科(孙伟、苏志强、刘建丰、盛利、杨鲲鹏);430019 武汉,武汉市空军雷达学院院务部卫生处(赵静奕、吴向阳)

成的渗透梯度是水分子经 AQP4 跨膜转运的动力,而水的转运又是 Kir 离子流持续存在的必要条件^[1]。近年来研究发现,脑缺血再灌注过程中 AQP4 表达异常,可能参与再灌注损伤的形成^[2-3]。就理论而言,AQP4 的功能变化必然影响 Kir4.1 的生理功能,且最新研究表明,在缺血再灌注条件下,神经胶质细胞的 Kir4.1 离子流强度明显减弱,并伴有细胞水肿,阻断 Kir4.1 通道同样诱导出胶质细胞肿胀,提示 Kir 4.1 功能障碍与水的转运异常相关,共同参与再灌注损伤形成^[4-5]。本研究利用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型探索 Kir4.1 和 AQP4 的相互作用及其在缺血再灌注损伤中的作用。

材料与方法

一、实验动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠若干只,3~4 月龄,体质量(250±30)g,由哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中心提供。按照随机数字表法分成假手术组,缺血 2 h 再灌注 3 h、12 h、24 h、72 h 组,每组 10 只,5 只用于免疫组化染色,5 只用于实时定量 PCR (RT-PCR)检测。

二、模型制备及神经功能评分

采用改良的 Longa 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型^[6]。动物苏醒后参照 Longa 等^[6]5 分制方法进行评分,1~3 分者为实验对象,因麻醉未清醒和经解剖证实为蛛网膜下腔出血者不计入实验组。

三、脑组织免疫组化切片制备

在相应时间点,依次以 4℃冰生理盐水、40 g/L 多聚甲醛对大鼠行心脏灌注,断头取脑,在视交叉前后 1.5 cm 处冠状位切片取材,常规固定、脱水、透明、浸蜡、包埋,在切片机上连续切片(片厚 5 μm),置于载玻片上。

四、免疫组化染色

采用 SP 法,操作按试剂盒说明书进行。兔抗大鼠 Kir4.1 多克隆抗体购自美国 Chemicon 公司(AB5818,1:300),兔抗大鼠 AQP4 多克隆抗体购自北京中杉金桥生物公司(BA1560,1:200),SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物公司(SPN9001),免疫组化染色阴性对照用 PBS 代替二抗。显微镜下观察,呈阳性表达的细胞膜为棕黄色。

五、RT-PCR 检测

取各组大鼠右侧半球额顶区皮质,按 Trizol 试剂说明提取组织总 RNA;使用逆转录试剂盒(美国 Promega 公司,A3800),按操作说明合成 cDNA;以

cDNA 为模板进行 PCR 扩增。Kir4.1 引物:上游 5'-GTAGACACAGCCTCTGATAGCC-3',下游 5'-AGCAGGTGTGAACTCGTAGC-3',扩增长度 225 bp;AQP4 引物:上游 5'-ATGGTGGCTTCAAAGGCGTC-3',下游 5'-ACCTCTCCA GACGACTCCTTC-3',扩增长度 890 bp;以 β-actin 作为内参照。反应体系 25 μL,PCR 条件:94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,30 个循环后 72℃ 延伸 8 min。PCR 产物以 1.8%琼脂糖凝胶电泳检测,利用 Quanti Scan(Biosoft 公司,法国)凝胶图像扫描分析软件测定电泳条带的吸光度(A)值,计算 Kir4.1 与 β-actin、AQP4 与 β-actin A 值之比。

六、统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方法采用单因素方差分析及 LSD-t 检验,相关分析采用 Spearman 法, $P \leq 0.05$ 示差异有统计学意义。

结 果

一、免疫组化染色结果

Kir4.1 和 AQP4 在各组大鼠脑组织中均围绕血管呈阳性表达;与假手术组相比,缺血再灌注组大鼠梗死灶周围区皮质 Kir4.1 和 AQP4 表达增强,并随再灌注时间不同呈现相似的动态变化:再灌注 3 h 表达略有增加,12 h 明显增强,24 h 达到高峰,72 h 开始减弱(图 1,2)。

二、RT-PCR 检测结果

与假手术相比,缺血再灌注组大脑皮质 Kir4.1 和 AQP4 的 mRNA 表达水平升高,并随再灌注时间不同呈现相似的动态变化:再灌注 3 h mRNA 水平略有升高,12 h 明显升高,24 h 达到高峰,72 h 开始下降(图 3,4,表 1)。Kir4.1 和 AQP4 的 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.780, P=0.000$)。

讨 论

Kir 家族是一类分布广泛、作用多样的钾离子通道,包括 7 个亚家族(Kir1.0~7.0)20 多个成员。Kir4.1 是 CNS 内表达最丰富的 Kir 通道,集中分布在星形胶质细胞围绕血管的足突膜上,是保持细胞膜对 K⁺的高度选择性、建立静息膜电位的结构基础。生理情况下,Kir4.1 通过“虹吸”作用实现对 K⁺的“空间缓冲”,迅速纠正神经元兴奋导致的细胞外 K⁺浓度升高,避免神经元因静息膜电路上调而兴奋性增高,进而异常“同步化”^[7]。本研究发现,大鼠局灶性脑缺血再灌注后,梗死灶周围区皮质 Kir4.1 蛋

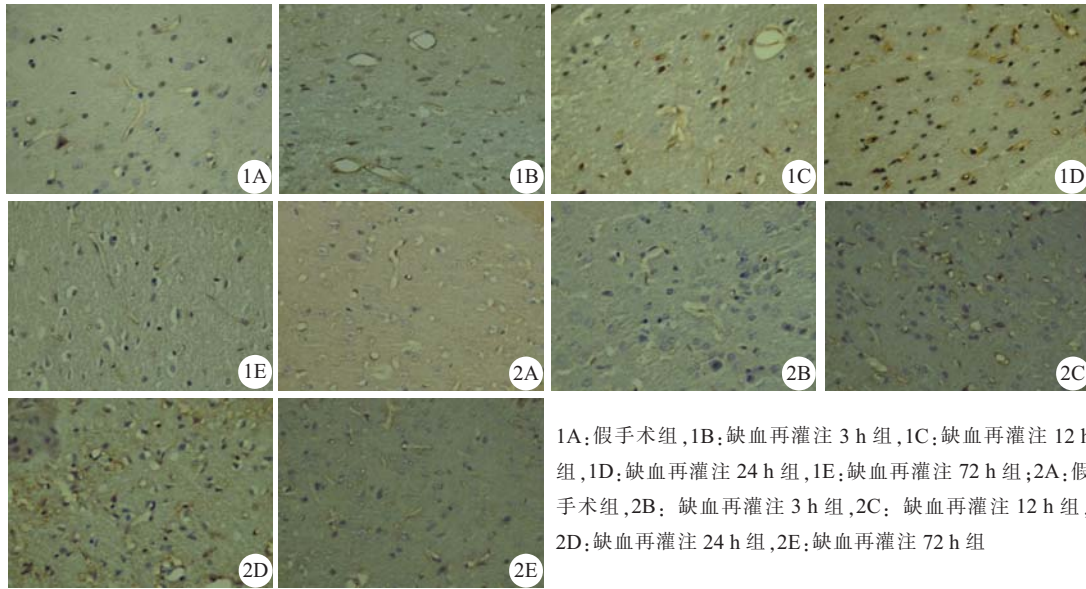
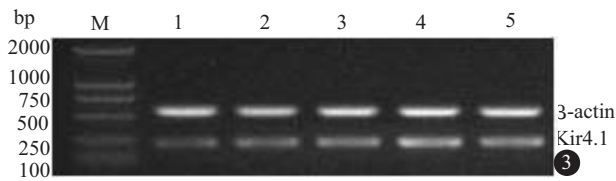


图 1 梗死灶周围区皮质 Kir4.1 的表达(SP 法,×400) 图 2 梗死灶周围区皮质 AQP4 的表达(SP 法,×400)

Fig.1 Immunohistochemistry for Kir4.1 expression in the peri-infarct cortex surrounding the primary infarct (SP method,×400)

Fig.2 Immunohistochemistry for AQP4 expression in the peri-infarct cortex surrounding the primary infarct (SP method,×400)



M:分子量水平标准;1:假手术组;2:缺血再灌注 3 h 组;3:缺血再灌注 12 h 组;4:缺血再灌注 24 h 组;5:缺血再灌注 72 h 组

图 3 额顶区皮质的 Kir4.1 mRNA 水平

Fig.3 Kir4.1 mRNA expression in the cortex of the fronto-parietal region



M:分子量水平标准;1:假手术组;2:缺血再灌注 3 h 组;3:缺血再灌注 12 h 组;4:缺血再灌注 24 h 组;5:缺血再灌注 72 h 组

图 4 额顶区皮质的 AQP4 mRNA 水平

Fig.4 AQP4 mRNA expression in the cortex of the fronto-parietal region

白表达增强,mRNA 水平上调,于再灌注早期(3 h)出现,随再灌注时间延长愈加明显,24 h 达到高峰。提示在缺血再灌注条件下,Kir4.1 功能受损,导致 K⁺清除过程受阻,进而通过升高神经元静息膜电位导致神经元兴奋性毒性损伤,以及升高 CNS 渗透压加重细胞毒性水肿等机制,参与再灌注损伤形成。Kir4.1 在转录及蛋白水平代偿性表达增强,以实现细胞外 K⁺的有效清除。上述变化贯穿于缺血再灌注的全过程,是再灌注损伤的重要机制之一。这与细菌性脑膜炎、脑挫裂伤等脑部疾病中 Kir4.1 的表达变化一致^[8]。

AQP4 是脑组织内最重要的水通道蛋白,分布与 Kir4.1 相似,主要表达于血管周围星形胶质细胞的突起上,介导水在血液和脑组织间的双向转运,其生理作用与清除脑代谢产生的水分有关^[9]。本研究表明,大鼠局灶性脑缺血再灌注后,梗死灶周围区皮质 AQP4 蛋白表达增强,mRNA 水平上调,于再灌注早期(3 h)出现,随再灌注时间延长愈加明显,24 h 达到高峰,与文献报道一致^[2]。提示 AQP4 在缺血再

表 1 Kir4.1 和 AQP4 的 mRNA 水平($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab.1 Absorbance for the mRNA expression of Kir4.1 and AQP4 at different time points reperfusion ($Mean\pm SD, n=5$)

项目	假手术组	缺血再灌注 3 h 组	缺血再灌注 12 h 组	缺血再灌注 24 h 组	缺血再灌注 72 h 组	F 值	P 值
Kir4.1	0.34±0.02	0.47±0.06 ^a	0.61±0.08 ^{ab}	0.83±0.10 ^{abc}	0.68±0.09 ^{abd}	29.781	0.000
AQP4	0.49±0.05	0.66±0.09 ^a	0.91±0.09 ^{ab}	1.12±0.11 ^{abc}	0.94±0.08 ^{abd}	40.362	0.000

与假手术组相比,^aP<0.05;与缺血再灌注 3 h 组比较,^bP<0.05;与缺血再灌注 12 h 组比较,^cP<0.05;与缺血再灌注 24 h 组比较,^dP<0.05

灌注过程中大量表达,为水分子跨越血脑屏障进入星形胶质细胞提供充足途径,促进细胞毒性脑水肿形成,加重神经元损伤。该变化贯穿于缺血再灌注的全过程,也是再灌注损伤的重要机制之一。Amiry-Moghaddam 等^[9]研究发现, α -*syntrophin* 基因缺陷模型在减少 AQP4 表达的同时有效抑制脑水肿形成和神经元损伤,支持本文的观点。

本研究还发现,脑缺血再灌注过程中 Kir4.1 与 AQP4 的 mRNA 水平呈正相关,说明二者不仅在生理条件下功能紧密相联,在缺血再灌注的病理条件下也存在密切联系。分析其机制可能有以下两个方面:(1)Kir4.1 功能障碍导致细胞外 K^+ 蓄积,血液中的水分在渗透压作用下向星形胶质细胞内流动,AQP4 通过增加自身表达为水分流入提供充足路径;由血液流入星形胶质细胞的水分越多, K^+ 渗透梯度就越无法建立,Kir4.1 的功能障碍越显著,Kir4.1 代偿性表达增加越明显。(2)水肿消散过程中,水分经 AQP4 向血液的转运与 K^+ 经 Kir4.1 的流动依旧伴行,二者表达水平的一致有利于二者功能的协调完成,以尽快恢复 CNS 内的渗透平衡。

综上所述,Kir4.1 和 AQP4 相互作用,共同参与了脑缺血再灌注损伤的形成,其作用机制是通过功能改变导致 CNS 内 K^+ 清除障碍、内环境失衡,促进神经元兴奋性毒性加重、细胞毒性水肿形成。

参 考 文 献

[1] Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, et al. Delayed

K^+ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(23): 13615-13620.

[2] 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.

[3] Kleindienst A, Fazzina G, Amorini AM, et al. Modulation of AQP4 expression by the protein kinase C activator, phorbol myristate acetate, decreases ischemia-induced brain edema [J]. Acta Neurochir Suppl, 2006, 96: 393-397.

[4] Pannicke T, Uckermann O, Iandiev I, et al. Altered membrane physiology in Müller glial cells after transient ischemia of the rat retina[J]. Glia, 2005, 50(1): 1-11.

[5] Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O, et al. A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina[J]. Mol Cell Neurosci, 2004, 26(4): 493-502.

[6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[7] Butt AM, Kalsi A. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(1): 33-34.

[8] Saadoun S, Papadopoulos MC, Krishna S. Water transport becomes uncoupled from K^+ siphoning in brain contusion, bacterial meningitis, and brain tumours: immunohistochemical case review [J]. J Clin Pathol, 2003, 56(12): 972-975.

[9] Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hum PD, et al. An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(4): 2106-2111.

(收稿日期:2008-11-20)

(本文编辑:张玲)

· 消息 ·

第三届亚洲癫痫外科大会

随着第一届(2007)、第二届(2008)亚洲癫痫外科大会分别在韩国和中国圆满落幕,大会对亚洲癫痫外科所产生的学术指导意义日益明朗,中国乃至亚洲各国癫痫外科的事业正在如火如荼的进行着。为巩固会议成果,第三届亚洲癫痫外科大会将于2009年6月18日至19日在日本大阪召开。本届大会主席由日本大阪大学医学部神经外科 Toshiki Yoshimine 教授担任。会议主题除涉及癫痫及相关专业内容外,还将增设“Standard Techniques in Epilepsy Surgery”等教学项目。详情可登陆会议网站查询 <http://www.aesc2009.jp/>。欢迎广大同仁积极参加,共同研究交流。