

JSK对糖-氧剥夺/复氧后大鼠脊髓星形胶质细胞体积及 AQP4 表达的影响

孙振刚¹, 王吉先¹, 范金山¹, 孙珍娟², 胡凌云³

(1 青岛西海岸新区中心医院骨三科 266555 青岛市; 2 青岛市第八人民医院信息科 266100;

3 南充市中心医院骨科 637000)

【摘要】目的:观察细胞骨架稳定剂(Jasplakinolide, JSK)对糖-氧剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation and reoxygenation, OGD/Reox)后大鼠脊髓星形胶质细胞体积及水通道蛋白-4(aquaporin-4, AQP4)表达的影响,并探讨其可能机制。**方法:**体外培养取自大鼠脊髓的星形胶质细胞,将传代 2~3 次后的星形胶质细胞行糖-氧剥夺 5h 后再复氧,复氧同时将不同浓度(20、50、100、200 和 400nM)的 JSK 分别加入培养液继续培养 12h,对照组用等量 DMSO 处理。用共聚焦显微镜和 Western blot 分析观测不同时间点(0.5h~12h)及不同浓度 JSK 作用下星形胶质细胞体积变化和 AQP4 表达情况,同时观察肌动蛋白微丝聚合(filament actin, F-actin)变化情况,分析其可能机制。**结果:**在 OGD/Reox 后,与对照组比较,0.5h 后星形胶质细胞的体积开始增加,1.5h 后达峰值(9.44±0.27 vs 5.06±0.26, $P<0.05$);50nM 浓度 JSK 可明显减轻星形胶质细胞肿胀的严重程度(5.72±0.96, $P<0.05$)。OGD/Reox 后 AQP4 蛋白表达明显增加,在复氧 1.5h 时达到峰值(1.21±0.029 vs 0.20±0.013, $P<0.01$)。JSK 处理显著降低了 AQP4 蛋白水平的升高(1.25±0.19 vs 2.01±0.26, $P<0.01$)。分析表明 JSK 聚合的 F-actin 微丝是导致细胞膜 AQP4 下调的原因。**结论:**应用 JSK 可以减轻 OGD/Reox 引起的大鼠脊髓星形胶质细胞肿胀,其保护作用可能与其能重组 F-actin 微丝和抑制 AQP4 蛋白表达有关。

【关键词】星形胶质细胞;肌动蛋白;水通道蛋白 4;脊髓损伤;水肿

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.10.07

中图分类号:R683.2, R364.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2019)-10-0911-08

Effects of JSK on the volume and AQP4 expression of the spinal astrocytes of rat after glucose-oxygen deprivation and reoxygenation/SUN Zhengang, WANG Jixian, FAN Jinshan, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(10): 911-918

【Abstract】 Objectives: To observe the effects of Jasplakinolide(JSK) on the volume of rat spinal cord astrocytes and the expression of aquaporin-4(AQP4) after glucose-oxygen deprivation and reoxygenation(OGD/Reox), and explore the possible mechanism. **Methods:** Astrocytes from the spinal cord of rats were cultured in vitro, and the astrocytes after passage for 2-3 times were given glucose-oxygen deprivation for 5h and reoxygenated(OGD/Reox). JSK with different concentrations(20, 50, 100, 200 and 400nM) was added to astrocytes for 12h after OGD/Reox. The control group was treated with equal amount of DMSO. The volume change and AQP4 expression of astrocytes at different time points(0.5h-12h) and different concentrations of JSK were observed by confocal microscope and Western blot. At the same time, the changes of filament actin (F-actin) were observed, and to analyze the possible mechanism. **Results:** After OGD/Reox, compared with the control group, the volume of astrocytes began to increase after 0.5h and reached a peak after 1.5h (9.44±0.27 vs 5.06±0.26, $P<0.05$). JSK at 50nM concentration could significantly reduce the severity of astrocyte swelling (5.72±0.96, $P<0.05$). AQP4 protein expression was significantly increased after OGD/Reox, and reached a peak value(1.21±0.029 vs 0.20±0.013, $P<0.01$) at 1.5h reoxygenation. JSK treatment significantly reduced the in

基金项目: 国家自然科学基金(81401839); 中山大学优秀青年教师科研资助计划(16ykp38); 广东省自然科学基金项目(S2013010015775)

第一作者简介:男(1979-),副主任医师,硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(0532)86882259 E-mail:szhg0707@163.com

通讯作者:王吉先 E-mail:wangjixianli@126.com

crease of AQP4 protein level(1.25 ± 0.19 vs 2.01 ± 0.26 , $P<0.01$). Analysis showed that the F-actin microfilament polymerized by JSK was the cause of the down-regulation of cell membrane AQP4. **Conclusions:** Application of JSK can reduce OGD/Reox induced astrocyte swelling in rat spinal cord, and its protective effect may be related to its ability to reprogram f-actin microfilament and inhibit AQP4 protein expression.

【Key words】 Astrocyte; Actin; Aquaporin-4; Spinal cord; Edema

【Author's address】 Department of Spine Surgery, Qingdao West Coast New Area Central Hospital, Qingdao, 266555, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种神经损伤的病理变化,与脊髓水肿有关^[1,2]。SCI时,激活脊髓组织的星形胶质细胞,细胞肿胀、体积增加,导致脊髓水肿,星形胶质细胞反应对SCI的修复至关重要^[3-6]。

星形胶质细胞体积改变可能与F-actin微丝网络的重组有关^[7,8]。推测,肌动蛋白聚合的重新排列,同时星形胶质细胞体积改变,是脊髓水肿的先决条件。JSK,一种促动素稳定剂,被有效地用于研究F-actin微丝的构象和动态特性,能够在体外结合并稳定F-actin微丝^[9,10]。目前尚不清楚JSK聚合和稳定F-actin微丝是否有助于脊髓水肿后细胞体积的缩小和星形细胞肿胀的减轻。

水通道蛋白4(Aquaporin-4, AQP4)是一种在中枢神经系统(CNS)水跨膜运动中起重要作用的通道蛋白^[11]。AQP4在SCI的星形胶质细胞中含量丰富^[12-14]。低渗溶液诱导细胞肿胀激活了星形胶质细胞AQP4的表达,降低了F-actin的含量^[12-15]。最近,RNA干扰技术在星形胶质细胞中的应用也有助于证明AQP4与细胞骨架和形态学的关系^[16],并激活细胞体积调节机制^[17]。推测病理条件下星形细胞肿胀后AQP4异常表达可能参与细胞肿胀和F-actin骨架重排之间的相互作用。

本实验模拟大鼠星形胶质细胞的糖-氧剥夺模型,与SCI细胞毒性水肿相似。研究以JSK促进F-actin聚合后,是否能减少OGD/Reox引起的星形胶质细胞肿胀,并且是否可以通过调控AQP4的表达来调节这种效应。

1 材料和方法

1.1 材料

3-O-甲基葡萄糖(3-OMG),Sigma公司;培养基、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸,Invitrogen公司;胎牛血清,GIBCO公司;培养材料,康宁公司;兔多克隆抗体GFAP、兔多克隆抗体AQP4,CST公司;山羊抗兔辣根过氧化物酶标记抗体,Invitrogen

公司。通用型Western Blot仪(美国Bio.Rad公司),DP71光学显微镜(Olympus公司,日本),激光共聚焦显微镜(尼康,TE200,日本)。

1.2 细胞培养

制备大鼠脊髓星形胶质细胞原代培养物。断头处死SD大鼠幼仔(新生1d)8只,雌雄不限;均由青岛大学医学部实验动物中心提供。取出脊髓置于加1%抗生素-抗真菌剂的用冰预冷的PBS中。切开脊髓,在37℃下用0.25%胰蛋白酶溶液处理10min。收集第二次提取的细胞。接种到含有10%胎牛血清和1%抗生素抗真菌剂的DMEM培养皿中。正常条件下培养:5%CO₂和95%空气中37℃孵育,培养基每周更换两次。第9天,清除未黏附的少突胶质细胞。将黏附的星形胶质细胞经胰蛋白酶处理后,置于12孔板中培养,更换培养基qod。采用经过2~3次传代的星形胶质细胞进行实验。用激光共聚焦显微镜对星形胶质细胞的形态学进行监测(图1a)。免疫荧光分析表明,>95%的胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)细胞积极染色(图1b)。

1.3 糖-氧剥夺再氧化模型制作

培养物用平衡盐溶液(BSS)冲洗两次,在无血清无葡萄糖的DMEM中培养。使用前,BSS与厌氧气体混合物(5%CO₂和95%N₂)通过鼓泡15min达到平衡,调节至pH7.4,加热至37℃。然后将细胞移入厌氧室,并在37℃下,用95%N₂和5%CO₂连续冲洗5h(氧-葡萄糖剥夺,OGD)。OGD结束后,用含葡萄糖的对照液替代细胞,37℃,95%空气加5%CO₂加湿条件下孵育24h(复氧,Reox)。

1.4 JSK治疗

星形胶质细胞密度为 1×10^3 个/ml,置于12孔板中,在DMEM中培养,加入10%热灭活FBS和抗生素,24h后改变生长培养基。星形胶质细胞培养液置于JSK(20、50、100、200和400nM)。复氧同时给予不同浓度JSK 12h。对照组用等量

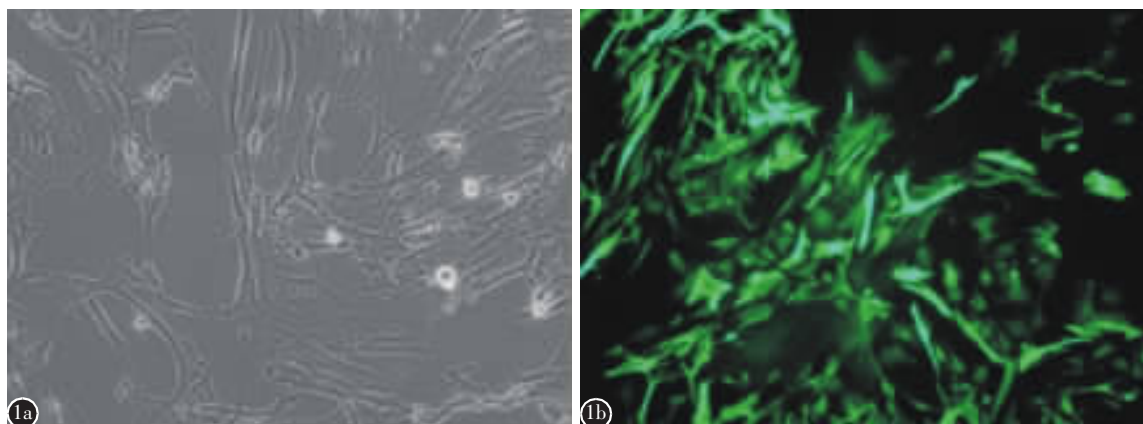


图 1 大鼠脊髓星形胶质细胞 ($\times 100$) a 培养星形胶质细胞的相衬图像 b 荧光免疫显示,本研究的细胞在荧光显微镜下均为 GFAP 阳性

Figure 1 The identification of rat spinal cord astrocytes($\times 100$). Phase-contrast image of cultured astrocytes(a). Immunofluorescence analysis showed that the cells in the present study were all GFAP-positive using a fluorescence microscope (b)

DMSO处理,细胞未暴露于 OGD/Reox 或 JSK。每组 5 个样品,在培养期间,这些培养物始终保存在同一个培养箱中。

1.5 测量细胞体积

细胞体积的评估是通过测量细胞内的水空间。基于以前的方法 Bender 和 Norenberg^[18],稍加修改。OGD/Reox 后,培养的星形胶质细胞用 1mm 3-OMG 和 0.5 μ ci/ml[3h]-3-OMG 孵化 12h,保留等分部分专门测定。用 290mM 蔗糖、1mM 三硝酸钙、0.5mM 硝酸钙和 0.1mM 根皮素(pH 7.4)组成的冷冻缓冲液快速冲洗细胞后,在 0.5ml 1N NaOH 中裂解。放射性物质转化为细胞内的水空间和表达为细胞蛋白质(μ l/mg)。用 BCA 检测试剂盒(Thermoscientific,IL)测定蛋白含量。

1.6 免疫荧光分析

为了评估抑制 AQP4 的增多是否与 JSK 聚合 F-actin 微丝介导的细胞体积减少有关,使用免疫荧光和共聚焦显微镜测定在 JSK 存在下 AQP4 在大鼠星形胶质细胞中的表达。用冷甲醇固定培养的星形胶质细胞,PBS 冲洗,用 0.3% Triton X-100 在 PBS 中渗透。抗体 AQP4 (1:400 稀释)或 GFAP(1:400 稀释)于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗涤三次后,用 Alexa 偶联的二抗和/或 trtc 偶联的 phalloidin 孵育细胞 30min 后,冷 PBS 洗涤两次,37 $^{\circ}$ C Hochest33258 染色缓冲液孵育 30min。安装载玻片上,使用共聚焦显微镜(Leica,Germany)检测。

1.7 Western blot 分析

用冷 PBS 洗涤三次,在 RIPA 缓冲液中溶解培养物,提取蛋白。匀浆在 12000 \times g,4 $^{\circ}$ C 离心 15min。收集上清液,使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定总蛋白含量。经 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白转移到 PVDF 膜上,在含有 2%脱脂奶粉的 PBST 缓冲液中室温保存 2h。然后用 AQP4 一抗 (1:1000 稀释)在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 洗涤三次后,用 HRP 偶联的第二抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育膜 2h。PBST 充分洗涤后,利用 ECL 系统进行检测。定量分析 AQP4 时,用 GAPDH 为内参,并进行 Western blots 评分。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 16.0 版统计软件分析。用 ANOVA 和 Dunnett's test 进行数据分析。结果 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有数据均以均数 \pm 标准差(SD)表示。

2 结果

2.1 JSK 对星形胶质细胞的作用

复氧同时给予 12h 不同浓度 JSK 后,观察到 JSK 对星形胶质细胞肌动蛋白分布有明显影响。在对照细胞中 F-actin 的分布呈密集的平行张力纤维网。当用 20nM JSK 处理后,肌动蛋白细胞骨架未见明显改变。用 50nM JSK 处理后,虽然可见张力纤维,但肌动蛋白团块仅在核周区域聚集。当 JSK 剂量提高到 100nM 时,细胞质中出现了较厚的肌动蛋白束和片状聚集。当给予高剂量 JSK

(200nM)时,细胞收缩,细胞质中看不到肌动蛋白束,核周区仅残留少量 F-actin 团块。给予 400nM JSK 后,在细胞质中几乎看不到 F-actin 束,被小 F-actin 团块取代(图 2a)。

2.2 JSK 对 OGD 诱导的细胞肿胀的作用

OGD 后 5h,培养物经过复氧处理,不同时间段(0.5h~12h)星形胶质细胞体积分别为 6.00 ± 0.23 、 6.34 ± 0.31 、 9.44 ± 0.27 、 9.25 ± 0.27 、 9.34 ± 0.31 、 9.25 ± 0.20 、 6.84 ± 0.29 及 $6.44 \pm 0.34 \mu\text{l}/\text{mg}$ 。与对照组($5.06 \pm 0.26 \mu\text{l}/\text{mg}$)相比,0.5h 和 1h 时细胞体积略有增加。从 1.5h~4h 星形胶质细胞体积增加明显($P < 0.05$),复氧 1.5h 时细胞体积达到峰值。细胞体积在 8h 和 12h 仍然较对照组高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),然而,与 1.5h 的体积相比,体积明显减小($P < 0.05$)(图 2b)。

将不同浓度(0、20、50、100、200、400nM)的 JSK 加入 OGD/Reox 诱导的培养液中 12h 后,星形细胞体积分别为 7.21 ± 0.76 、 6.58 ± 0.46 、 5.72 ± 0.96 、 6.06 ± 0.85 、 6.32 ± 0.79 、 $6.36 \pm 0.81 \mu\text{l}/\text{mg}$ 。与对照组($5.05 \pm 0.56 \mu\text{l}/\text{mg}$)相比,OGD/Reox 增加了星形细胞体积。所有剂量的 JSK 均能降低细胞体积的增加($P < 0.05$,图 2c)。在 50nM 剂量下,JSK 显著抑制了 OGD/Reox 后 5h 细胞体积增加和形态学变化,而其他剂量对这些变化无显著影响。不同剂量 JSK 处理的对照培养物在细胞体积上没有显著变化。

评估细胞形态学来研究 JSK 对 OGD/Reox 后星形细胞肿胀的保护作用。星形胶质细胞在 OGD 后再充氧后出现肿胀(图 2d)。在整个 OGD/Reox 损伤过程中,浓度 50nM JSK 作用 12h 可阻断细胞形态学改变。

2.3 JSK 可调控 OGD/Reox 诱导的 AQP4 的增多

采用 Western blot 法检测细胞膜 AQP4 蛋白表达量,明确增加的 AQP4 在星形细胞肿胀中的作用。OGD/Reox 后 AQP4 蛋白表达明显升高,在复氧 1.5h 时达到峰值($P < 0.01$;图 3a)。50nM JSK 处理 12h 后,OGD/Reox 后细胞膜 AQP4 蛋白量升高明显降低($P < 0.01$;图 3b)。

共聚焦显微镜分析显示,经 JSK 处理后星形细胞膜中的 AQP4 也减少(图 3c)。这些结果进一步支持了 F-actin 细胞骨架重排与细胞体积调节和细胞膜 AQP4 浓度有关的假设。

3 讨论

星形胶质细胞存在一些急性病理状态后,如 SCI^[3,19]。OGD/Reox-体外模拟缺血模型,类似于细胞毒性水肿,可观察到 SCI 引起缺血和再灌注病理状态^[20]。研究表明,缺血再灌注损伤后,星形细胞发生肿胀,与对照组相比,1.5h 细胞体积增加最大。在 50nM 剂量下,JSK 显著抑制了 OGD/Reox 后 5h 细胞体积的增加和形态学变化,而其他剂量对这些变化无显著影响。因此,推测选择合适的 JSK 剂量对 SCI 的治疗至关重要,50nM 剂量 JSK 可能跟我们培养的细胞数量、实验条件有关,并不一定是最佳剂量。由 OGD/Reox 引起的星形细胞的肿胀,是 SCI 患者细胞毒性水肿的主要组成部分,阻断 OGD/Reox 后星形细胞肿胀有助于 JSK 介导的肌动蛋白微丝稳定和聚合。此外,本研究也证实,治疗 50nM 的 JSK 显著降低血-脊髓屏障的渗透性。SCI 后 24h~48h,血-脊髓屏障渗透率的降低与水肿的清除率有关^[21],因此调控 JSK 减轻星形细胞肿胀的治疗越早越好。

多项研究表明 AQP4 在脊髓水肿的形成中起重要作用,SCI 后 AQP4 mRNA 或蛋白表达显著增加^[11,22]。AQP4 过度表达可加速细胞毒性肿胀,降低 AQP4 水平可导致 SCI 后水肿的消退和更好的神经生物学效果^[23]。本研究中,OGD/Reox 后 AQP4 蛋白表达显著升高,并在 1.5h 达到峰值,12h 后仍有变化,而 50nM JSK 处理后 AQP4 蛋白表达显著减弱,JSK 诱导的 AQP4 变化具有时间依赖性。此外,AQP4 在脊髓水肿区表达的量与细胞体积的增加有关^[24]。OGD/Reox 后,经 50nM JSK 处理的 F-actin 细胞骨架聚合后,星形胶质细胞体积显著减小,AQP4 表达降低。提示 JSK 对 AQP4 表达的影响可能与细胞体积调节和 F-actin 细胞骨架重排有关。这些结果进一步支持 AQP4 表达增加促进 SCI 肿胀形成的假说。可以推测,JSK 治疗可能下调了 AQP4 表达,有利于减轻脊髓水肿。

虽然我们发现了 JSK 在减轻脊髓水肿方面潜在的部分细胞和分子机制,但关于 JSK 如何调控脊髓细胞肿胀的激活信号转导通路仍不清楚。文献^[25,26]研究表明,激活的氧化应激和丝裂原激活蛋白激酶(MAPKs),它们被认为是脊髓水肿的重要因素。最近的研究报道 MPK 活化可能会增强缺血损伤后兴奋性毒性谷氨酸的释放,表明磷酸

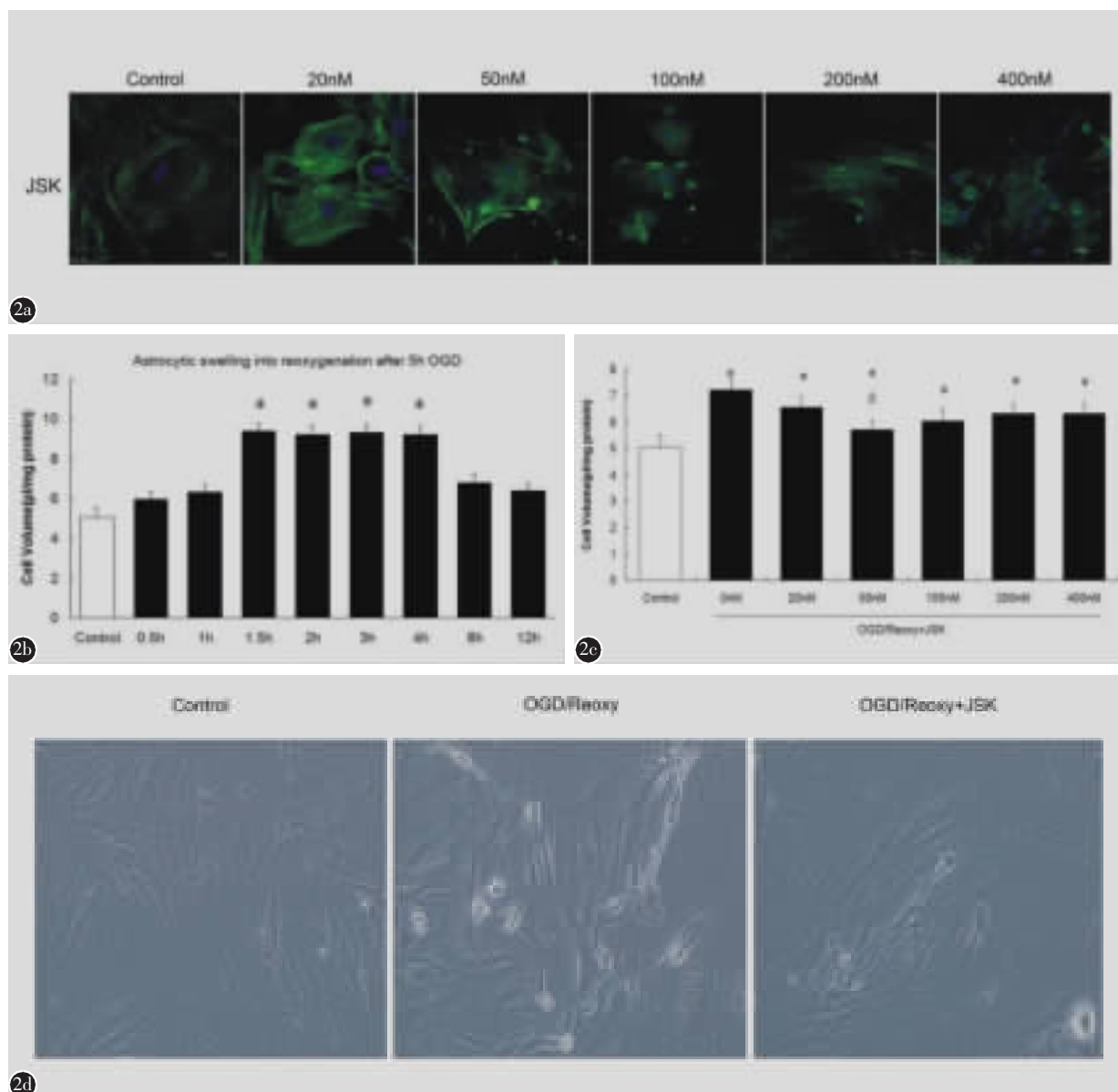


图 2 JSK 可显著抑制 OGD/Reox 后星形胶质细胞的肿胀 **a** 不同浓度 JSK 对细胞肌动蛋白分布的影响 **b** OGD/Reox 后细胞体积显著增加。OGD 后 5h 再充氧, 1.5h 细胞体积增加达峰值 **c** JSK 依赖剂量对抗星形细胞体积增加。JSK 的最大保护剂量为 50nM ($P < 0.05$ vs 对照组; $P < 0.05$ vs OGD/Reox) **d** 图像显示, 复氧后 2h 时 JSK 治疗可阻止星形胶质细胞体积增加

Figure 2 JSK significantly attenuated cell swelling after OGD/Reox **a** The effects of JSK with different concentrations on the actin distribution of astrocytes. The actin filaments were stained with Alexae phalloidin **b** Cell volume increased remarkably after OGD/Reox. Maximal cell swelling was observed at 1.5h after reoxygenation at the end of 5h OGD **c** Dose-dependent protection of JSK against the increase in astrocytic volumes. The maximum protective concentration of JSK was 50nM ($P < 0.05$ vs control; $P < 0.05$ vs OGD/Reox) **d** Phase-contrast images showing that treatment with JSK blocked swelling in astrocytes at 2h into reoxygenation

化的 MPK 这些有害作用参与了星形细胞肿胀的分子机制^[26,27]。因此, 我们下一步的工作需要研究 JSK 在脊髓水肿中的作用与这些信号转导通路的关系。

4 参考文献

1. Guzelkucuk U, Duman I, Yilmaz B, et al. Reversible post-pregabalin peripheral edema in a spinal cord injury patient[J]. *Spinal Cord*, 2012, 50(6): 472-473.

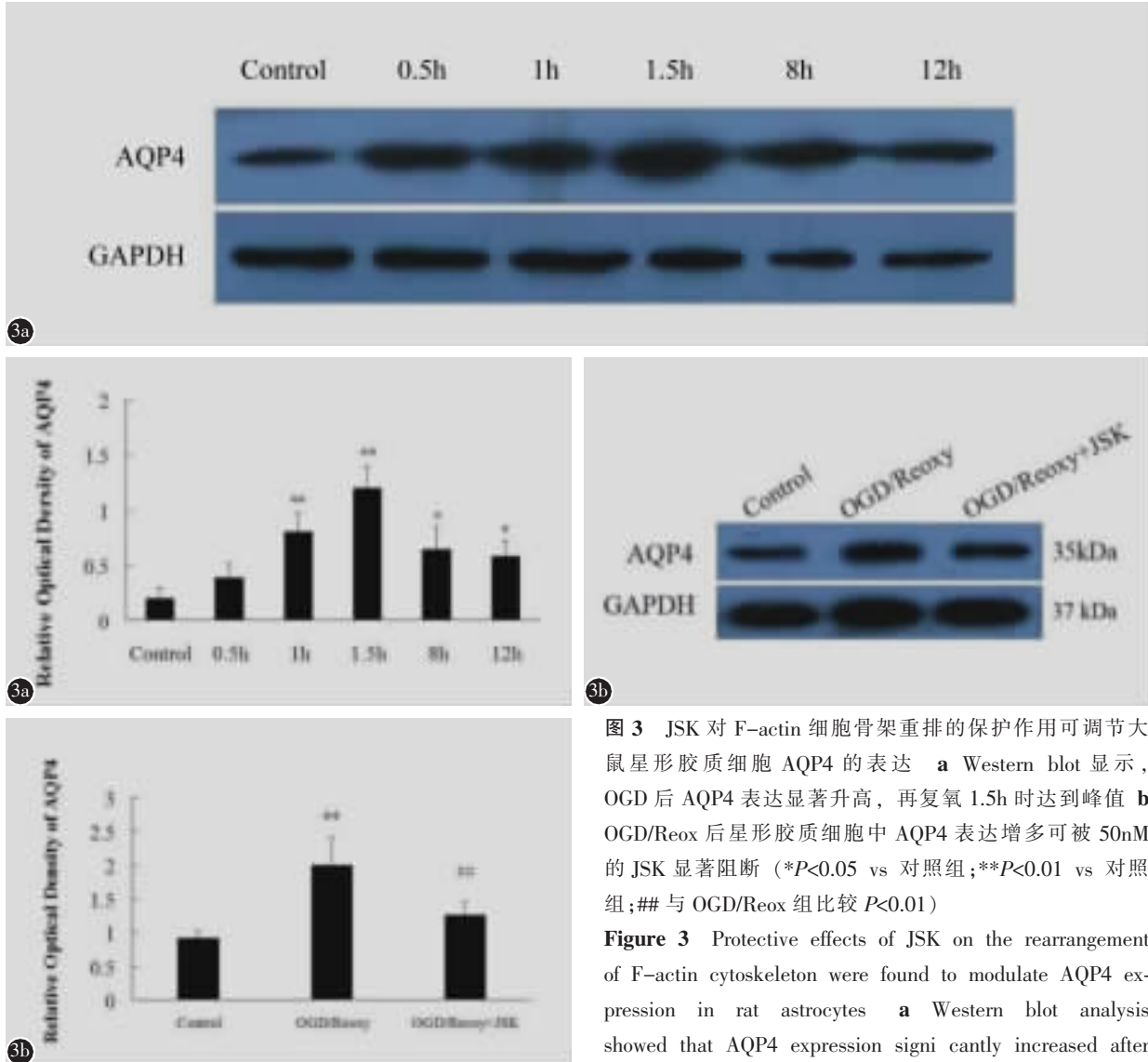


图 3 JSK 对 F-actin 细胞骨架重排的保护作用可调节大鼠星形胶质细胞 AQP4 的表达 **a** Western blot 显示, OGD 后 AQP4 表达显著升高, 再复氧 1.5h 时达到峰值 **b** OGD/Reox 后星形胶质细胞中 AQP4 表达增多可被 50nM 的 JSK 显著阻断 (* $P < 0.05$ vs 对照组; ** $P < 0.01$ vs 对照组; ## 与 OGD/Reox 组比较 $P < 0.01$)

Figure 3 Protective effects of JSK on the rearrangement of F-actin cytoskeleton were found to modulate AQP4 expression in rat astrocytes **a** Western blot analysis showed that AQP4 expression significantly increased after OGD and peaked 1.5h into reoxygenation **b** The enrichment of AQP4 expression by exposing to OGD/Reox was offered a remarkable blockage by JSK with 50nM in astrocytes (* $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$ vs control; ## $P < 0.05$ vs OGD/Reox)

- Sun Z, Hu L, Wen Y, et al. Adenosine triphosphate promotes locomotor recovery after spinal cord injury by activating mammalian target of rapamycin pathway in rats [J]. Neural Regen Res, 2013, 8(2): 101-110.
- Endo T, Suzuki S, Utsunomiya A, et al. Prediction of neurological recovery using apparent diffusion coefficient in cases of incomplete spinal cord injury[J]. Neurosurgery, 2011, 68(2): 329-336.
- Kumar R, Arora S, Mohapatra D. Cervical Spine Injury Recovery Prediction Scale: a means of predicting neurological recovery in patients with acute subaxial cervical spine injury[J]. J Orthop Surg(Hong Kong), 2011, 19(1): 25-29.
- Hu LY, Sun ZG, Wen YM, et al. ATP-mediated protein kinase B Akt/mammalian target of rapamycin mTOR/p70 riboso-

- mal S6 protein p70S6 kinase signaling pathway activation promotes improvement of locomotor function after spinal cord injury in rats[J]. Neuroscience, 2010, 169(3): 1046-1062.
- Vardjan N, Horvat A, Anderson JE, et al. Adrenergic activation attenuates astrocyte swelling induced by hypotonicity and neurotrauma[J]. Glia, 2016, 64(6): 1034-1049.
- Fernández P, Pullarkat PA. The role of the cytoskeleton in volume regulation and beading transitions in PC12 neurites[J]. Biophys J, 2010, 99(11): 3571-3579.
- Cruz-Ortega JS, Boucard AA. Actin cytoskeleton remodeling defines a distinct cellular function for adhesion G protein-coupled receptors ADGRL/atrophilins 1, 2 and 3 [J]. Biol Open, 2019, 8(4). pii: bio039826. doi: 10.1242/bio.039826.
- Watts KR, Morinaka BI, Amagata T, et al. Biostructural fea-

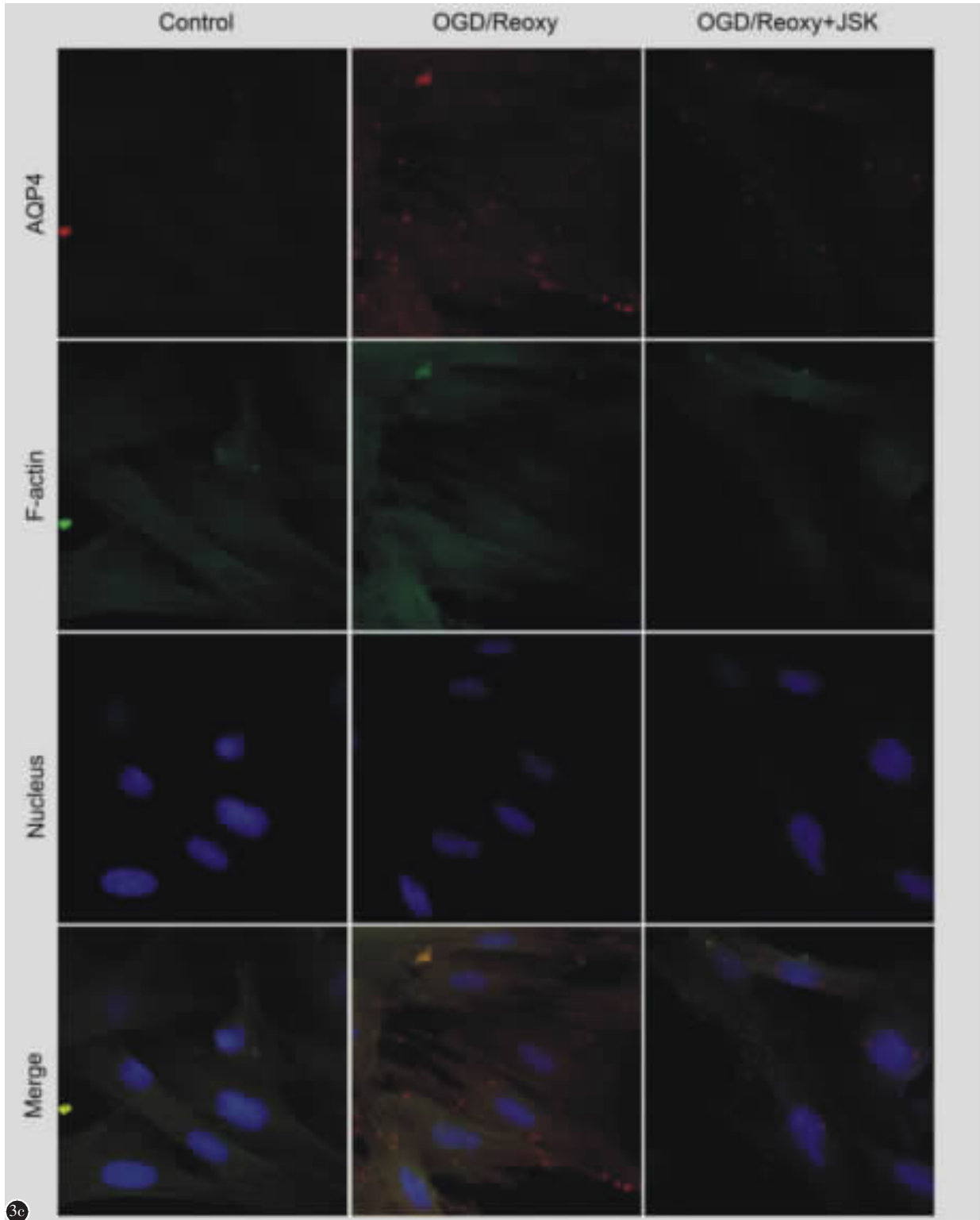


图 3 JSK 对 F-actin 细胞骨架重排的保护作用可调节大鼠星形胶质细胞 AQP4 的表达 **c** 共聚焦显微镜下观察:脊髓星形胶质细胞(绿色)的 F-actin 细胞骨架, Hoescht 33258(蓝色)的细胞核和抗体 AQP4(红色), 免疫荧光结果表明, JSK 治疗能抑制星形细胞膜 AQP4 表达

Figure 3 Protective effects of JSK on the rearrangement of F-actin cytoskeleton were found to modulate AQP4 expression in rat astrocytes **c** Confocal microscopy analysis of astrocytes from spinal cord incubated with Alexae phalloidin(green) for F-actin cytoskeleton, Hoescht 33258(blue) for nucleus and antibodies against AQP4(red). Immunofluorescence results showed that treatment with JSK inhibited AQP4 overclustering in astrocytic cytomembranes

- tures of additional jaspilkinolide (jaspamide) analogues[J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(3): 341-351.
10. Holzinger A. Jaspilkinolide: an actin-specific reagent that promotes actin polymerization [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 586: 71-87. doi: 10.1007/978-1-60761-376-3_4.
 11. Hemley SJ, Bilston LE, Cheng S, et al. Aquaporin-4 expression and blood-spinal cord barrier permeability in canalicular syringomyelia[J]. *J Neurosurg Spine*, 2012, 17(6): 602-612.
 12. Kimura A, Hsu M, Seldin M, et al. Protective role of aquaporin-4 water channels after contusion spinal cord injury [J]. *Ann Neurol*, 2010, 67(6): 794-801.
 13. Wang YF, Fan ZK, Cao Y, et al. 2-Methoxyestradiol inhibits the up-regulation of AQP4 and AQP1 expression after spinal cord injury[J]. *Brain Res*, 2011, 1370: 220-226.
 14. Oklinski MK, Lim JS, Choi HJ, et al. Immunolocalization of Water Channel Proteins AQP1 and AQP4 in Rat Spinal Cord[J]. *J Histochem Cytochem*, 2014, 62(8): 598-611.
 15. Nicchia GP, Rossi A, Mola MG, et al. Actin cytoskeleton remodeling governs aquaporin-4 localization in astrocytes [J]. *Glia*, 2008, 56(16): 1755-1766.
 16. Nicchia GP, Li W, Brosnan CF, et al. New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43[J]. *FASEB J*, 2005, 19(12): 1674-1676.
 17. Benfenati V, Nicchia G, Svelto M, et al. Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes [J]. *J Neurochem*, 2007, 100(1): 87-104.
 18. Bender AS, Norenberg MD. Effect of benzodiazepines and neurosteroids on ammonia-induced swelling in cultured astrocytes[J]. *J Neurosci Res*, 1998, 54(5): 673-680.
 19. Sun L, Li M, Ma X, et al. Inhibition of HMGB1 reduces rat spinal cord astrocytic swelling and AQP4 expression after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation via TLR4 and NF-kappaB signaling in an IL-6-dependent manner [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 231. doi: 10.1186/s12974-017-1008-1.
 20. Goux E, Buisson A, Nicoullon A, et al. Oxygen glucose deprivation-induced astrocyte dysfunction provokes neuronal death through oxidative stress[J]. *Pharmacol Res*, 2014, 87: 8-17.
 21. Fan ZK, Wang YF, Cao Y, et al. The effect of aminoguanidine on compression spinal cord injury in rats[J]. *Brain Res*, 2010, 1342: 1-10.
 22. Wu Q, Zhang YJ, Gao JY, et al. Aquaporin-4 mitigates retrograde degeneration of rubrospinal neurons by facilitating edema clearance and glial scar formation after spinal cord injury in mice[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(3): 1327-1337.
 23. Tang Z, Sun X, Huo G, et al. Protective effects of erythropoietin on astrocytic swelling after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation: mediation through AQP4 expression and MAPK pathway[J]. *Neuropharmacology*, 2013, 67: 8-15.
 24. Benfenati V, Caprini M, Dovizio M, et al. An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4(AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(6): 2563-2568.
 25. Fu J, Fan HB, Guo Z, et al. Salvianolic acid B attenuates spinal cord ischemia-reperfusion-induced neuronal injury and oxidative stress by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway in rats[J]. *J Surg Res*, 2014, 188(1): 222-230.
 26. Qu WS, Guo ZB, Fang J, et al. Inhibition of EGFR/MAPK signaling reduces microglial inflammatory response and the associated secondary damage in rats after spinal cord injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 178. doi: 10.1186/1742-2094-9-178.
 27. Dai H, Song D, Xu J, et al. Ammonia-induced Na, K-ATPase/ouabain-mediated EGF receptor transactivation, MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling and ROS formation cause astrocyte swelling[J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(6): 610-625.

(收稿日期:2019-05-23 修回日期:2019-09-25)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 彭向峰)