

• 研究报告 •

亚低温对心搏骤停大鼠大脑皮质水通道蛋白 4 基因表达的影响

周保纯 刘励军 郭梅凤 肖盐

【关键词】 心搏骤停； 脑水肿； 水通道蛋白 4； 基因表达； 亚低温

人工亚低温治疗已成为脑复苏的重要治疗措施之一^[1-4],但其促进神经功能恢复或脑保护的机制尚未完全阐明。多项研究表明,水通道蛋白 4(AQP-4)与脑水肿的形成关系密切,提示 AQP-4 蛋白表达水平下调可能是减轻脑水肿的机制之一^[4-6]。本研究中通过观察亚低温对复苏后大鼠脑皮质组织 AQP-4 mRNA 表达及皮质含水量变化的影响,旨在阐明 AQP-4 与脑水肿间的关系。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂:一步法 RNA 抽提试剂盒 TRIzol(美国 INVITROGEN 公司),M-MVL 反转录酶和核糖核酸酶抑制剂 Rnasin(普洛麦格(北京)生物技术有限公司),焦碳酸二乙酯(DEPC,加拿大 BBI 公司),Ex Taq™ R-PCR Version 2.1 试剂(大连宝生物)。

1.2 动物分组及模型制备:96 只健康雄性 SD 大鼠(由中国科学院上海动物实验研究所提供),体重(350±45)g。按随机数字表法分为对照组、常温复苏组和亚低温干预组,各组再分为自主循环恢复(ROSC)1、3、6、9 h 4 个亚组,每个亚组 8 只大鼠。对照组仅进行麻醉和气管插管,股动、静脉置管,不进行窒息及心肺复苏。对照组和常温复苏组大鼠肛温均控制在(36.5±1.0)℃;亚低温组在 ROSC 后即给予全身亚低温干预,维持大鼠肛温在 32~34℃。于机械通气 1、3、6、9 h 后参照经典窒息法制备心搏骤停后心肺复苏动物模型^[6]。整个实验过程按国际复苏实验 Utstein 模式^[7]进行。实验过程中动物处置方法均符合动物伦理学标准。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.02.020

基金项目:江苏省教育厅“211”工程资助项目(R2317054)

作者单位:215004 江苏,苏州大学附属第二医院急诊医学科

通信作者:刘励军,Email:lijunliusz@sina.com

1.3 检测指标及方法:常温复苏组和亚低温干预组分别于 ROSC 后 1、3、6、9 h,经静脉注射氯化钾处死大鼠后取标本待测。

1.3.1 脑皮质含水量测定:处死大鼠后立即开胸、暴露心脏,冰生理盐水灌注;断头取左半脑大脑皮质,称湿重,80℃干燥箱内烘烤 72 h 后称干重,计算脑皮质含水量。脑皮质含水量=[(湿重-干重)/湿重]×100%。

1.3.2 AQP-4 mRNA 表达测定:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定。用 TRIzol 抽提 RNA,逆转录 mRNA 至 cDNA;由上海生工生物工程技术有限公司合成引物。AQP-4 引物:上游 5'-TTG GAC CAT CAT AGG CGC-3',下游 5'-GCA TGT GAT CGA CAT TGA CC-3',扩增产物大小 250 bp;三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物:上游 5'-GCA AGT TCA ACG GCA CAG-3',下游 5'-GCC AGT AGA CTC CAC GAC AT-3',扩增产物大小 180 bp。反应条件:94℃变性 5 min;94℃变性 30 s,58℃退火 30 s;72℃延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72℃ 7 min。电泳后摄片,应用 UVIDoc 图像分析系统进行吸光度(A)扫描,以目的条带与 GAPDH 的积分 A 值比值表示 AQP-4 的相对表达量。

1.4 统计学分析:应用 SPSS 12.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用成组 t 检验或单因素方差分析,并进行相关性检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠复苏前后基本参数的比较(表 1):各组大鼠在窒息前基本生理参数[体温、心率、平均动脉压、pH 值、动脉血氧分压(PaO₂)、动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)]比较差异均无统计学意义。常温复苏组与亚低温组大鼠从窒息开始至心搏骤停时间、总窒息时间和复苏时间以及基础条件下和处死前动脉血气分

析比较差异也无统计学意义。

表 1 各组大鼠窒息至自主循环恢复相关参数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	窒息至心搏骤停时间(s)	总窒息时间(s)	复苏时间(s)
常温复苏组	8	210±15	390±19	60±15
亚低温组	8	215±11	395±17	65±19

2.2 各组大鼠脑皮质含水量的动态变化(表 2):常温复苏组大鼠 ROSC 后 1、3、6、9 h,脑皮质含水量均较对照组明显升高(均 P<0.05);亚低温组含水量均较常温组明显下降(均 P<0.05)。

2.3 各组大鼠脑组织 AQP-4 mRNA 表达变化(表 2;图 1~2):常温复苏组 AQP-4 mRNA 表达于 ROSC 后 1、3、6、9 h 均较对照组明显增加(均 P<0.01);亚低温组 AQP-4 mRNA 表达均较常温复苏组明显下调(均 P<0.01)。

2.4 复苏各组大鼠脑皮质含水量与 AQP-4 mRNA 表达的相关性:直线相关分析表明,常温复苏组及亚低温组大鼠脑皮质含水量与 AQP-4 mRNA 表达呈明显正相关($r_1 = 0.771, r_2 = 0.780$, 均 P<0.01)。

3 讨论

心搏骤停后脑水肿发生的病理机制比较复杂,不同于外伤、出血和缺血性脑卒中后脑水肿^[1]。心搏骤停后早期由于脑组织缺血、缺氧,迅速出现细胞性脑水肿。随着复苏后再灌注时间的延长,各种细胞因子、氧自由基及大分子物质如蛋白水解酶的释放,使血脑屏障受损而出现血管源性脑水肿^[2]。本研究结果表明,ROSC 后 1 h 大鼠大脑皮质含水量已开始增加,并随着复苏后再灌注时间的延长而升高;RT-PCR 结果显示,ROSC 后 1 h AQP-4 mRNA 表达已有增高,并随着复苏后时间的延长,相对表达量逐渐增高,持续至 ROSC 后 9 h;且其 AQP-4 mRNA 相对表达量与皮质含水量呈明显正相关。Yamamoto 等^[8]在大鼠星形

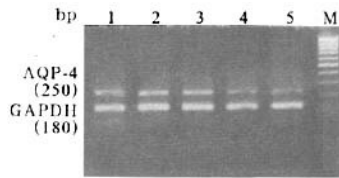
表2 各组大鼠心肺复苏后脑皮质含水量、AQP-4 mRNA 表达的变化比较(±s)

组别	动物数	脑皮质含水量(%)				AQP-4 mRNA			
		ROSC 1 h	ROSC 3 h	ROSC 6 h	ROSC 9 h	ROSC 1 h	ROSC 3 h	ROSC 6 h	ROSC 9 h
对照组	8	77.57±0.29	77.77±0.12	76.98±0.77	77.67±0.34	35.70± 9.10	34.70±12.10	36.90± 8.10	37.10± 5.14
常温复苏组	8	78.54±0.22 ^a	79.22±0.41 ^a	79.67±0.35 ^a	80.36±0.29 ^a	49.92± 8.04 ^b	58.23±10.00 ^b	70.46± 7.34 ^b	79.10±11.06 ^b
亚低温组	8	78.17±0.37 ^c	78.78±0.64 ^c	79.01±0.87 ^c	79.55±0.57 ^c	42.84±13.00 ^d	51.36±12.11 ^d	57.67±14.10 ^d	62.53± 9.04 ^d

注:AQP-4:水通道蛋白4,ROSC:自主循环恢复;与对照组比较,^aP<0.05,^bP<0.01;与常温复苏组比较,^cP<0.05,^dP<0.01

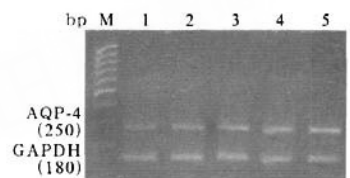
胶质细胞培养的研究中发现,低氧可使AQP-4、AQP-9的蛋白和mRNA表达下调,复氧后AQP-4表达水平迅速恢复。对大鼠脑缺血/再灌注(I/R)模型的研究也发现,AQP-4 mRNA表达与I/R后脑水肿的形成呈正相关,并且随再灌注时间延长,AQP-4 mRNA表达增加且脑水肿加重^[9]。提示,从低氧至复氧、从缺血到再灌注的初始阶段就促发了AQP-4 mRNA的转录。这个过程类似于本研究中从心搏骤停至ROSC过程中AQP-4 mRNA表达增加,并参与心搏骤停后脑水肿形成。最近研究发现,脑出血6 h后患者脑组织AQP-4 mRNA表达明显增加,除胶质细胞水肿外,毛细血管内皮细胞和神经细胞开始水肿,紧密连接逐渐开放,12~72 h AQP-4 mRNA表达达到高峰^[10],进一步证实了AQP-4 mRNA和脑水肿的相关性。

自Busto提出亚低温(32~34℃)概念以来^[11],研究已证实亚低温具有脑保护和减轻脑水肿的作用^[12]。近期的多中心临床试验也证实,亚低温不仅可明显改善心肺复苏后患者神经系统的转归,而且可以明显降低病死率^[3],但其具体的作用机制尚不明确。陈俊等^[13]应用七叶皂苷研究提示,复苏组ROSC后AQP-4 mRNA表达随脑皮质含水量的增加而显著上升且两者呈正直线相关。Xiao等^[4]研究发现,心搏骤停前预先给予亚低温治疗,可使心搏骤停后大鼠脑水肿减轻,脑组织AQP-4表达下调。另外,还有研究报道应用地塞米松、艾芬地尔及大剂量利多卡因可减少大鼠脑损伤后AQP-4的表达及减轻脑水肿^[14,16]。本研究结果显示,在大鼠心肺复苏ROSC后给予亚低温干预,1 h时脑皮质含水量和AQP-4 mRNA表达同步降低,且亚低温组ROSC后各时间点均较常温复苏组明显降低;相关分析发现,亚低温作用下,皮质含水量和AQP-4 mRNA表达仍保持良好的相关性,进一步表明,复苏后立即给予亚低温治疗也可得到相



1~5 分别为 ROSC 1、3、6、9 h,对照组, M:100 bp Marker;AQP-4:水通道蛋白4, GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶

图1 逆转录-聚合酶链反应检测常温复苏组心搏骤停大鼠脑组织 AQP-4 mRNA 表达



M:100 bp Marker,1~6 依次为对照组, ROSC 1、3、6、9 h;AQP-4:水通道蛋白4,GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶

图2 逆转录-聚合酶链反应检测亚低温组心搏骤停大鼠脑组织 AQP-4 mRNA 表达

似的治疗结果,且复苏后给予亚低温治疗更具临床意义。

参考文献

[1] 潘仁龙. 亚低温在重型颅脑损伤患者中的应用. 中国危重病急救医学, 2004, 16:650.

[2] Xiao F. Bench to bedside, brain edema and cerebral resuscitation: the present and future. Acad Emerg Med, 2002, 9: 933-946.

[3] Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. N Engl J Med, 2002, 346:549-556.

[4] Xiao F, Arnold TC, Zhang S, et al. Cerebral cortical aquaporin-4 expression in brain edema following cardiac arrest in rats. Acad Emerg Med, 2004, 11:1001-1007.

[5] 黄亮,李增攀,曹春水,等. NF-κB 信号通路对心肺复苏后大鼠 AQP-4 mRNA 表达的调控作用. 中国急救医学, 2008, 28:436-439.

[6] Fujioka M, Okuchi K, Sakaki T, et al. Specific changes in human brain following reperfusion after cardiac arrest. Stroke, 1994, 25:2091-2095.

[7] Idris AH, Becker LB, Ornato JP, et al. Utstein-style guidelines for uniform reporting of laboratory CPR research. Circulation, 1996, 94:2324-2336.

[8] Yamamoto N, Yoneda K, Asai K, et al. Alterations in the expression of the AQP family in cultured rats astrocytes

during hypoxia and reoxygenation. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 90:26-38.

[9] 任丽,孙善全. AQP4 基因表达与缺血再灌注后脑水肿的关系. 中国急救医学, 2003, 23:780-782.

[10] 郭富强,徐玉川,陈隆益,等. 脑出血患者血肿周围组织水通道蛋白-4 表达与脑水肿及病理超微结构变化的关系. 中国危重病急救医学, 2008, 20:674-677.

[11] Busto R, Dietrich WD, Globus MY, et al. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. J Cereb Blood Flow Metab, 1987, 7: 729-738.

[12] 孙志扬,李光,孙庆文,等. 亚低温对心肺复苏大鼠大脑海马神经元 N-甲基-D-天门冬氨酸受体 1 表达的影响. 中国危重病急救医学, 2006, 18:275-277.

[13] 陈俊,陈寿权,李章平,等. 七叶皂苷对心肺复苏后大鼠脑水肿期水通道蛋白 4 mRNA 变化的作用. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14:245-249.

[14] 李慧,陈圣刚,陈吉相. 地塞米松对大鼠脑水通道蛋白 4 表达的影响. 中国危重病急救医学, 2007, 19:369-370.

[15] 肖益,刘励军,周保纯,等. 艾芬地尔对大鼠心肺复苏后脑组织含水量和水通道蛋白-4 表达的影响. 中国急救医学, 2008, 28:139-142.

[16] 尹燕伟,宋建防,周赞官,等. 利多卡因对大鼠脑损伤后脑组织水通道蛋白 4 表达的影响. 中国临床康复, 2006, 10: 196-199.

(收稿日期:2009-09-15)

(本文编辑:李银平)

作者: 周保纯, 刘励军, 郭梅凤, 肖盐
作者单位: 苏州大学附属第二医院急诊医学科, 江苏, 215004
刊名: 中国危重病急救医学 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE
年, 卷(期): 2010, 22 (2)

参考文献(16条)

1. 任丽;孙善全 AQP4基因表达与缺血再灌注后脑水肿的关系[期刊论文]-中国急救医学 2003(11)
2. Yamamoto N;Yoneda K;Asai K Alterations in the expression of the AQP family in cultured rats astrocytes during hypoxia and reoxygenation 2001
3. 潘仁龙 亚低温在重型颅脑损伤患者中的应用[期刊论文]-中国危重病急救医学 2004(11)
4. 黄亮;李增攀;曹春水 NF- κ B信号通路对心肺复苏后大鼠AQP-4 mRNA表达的调控作用[期刊论文]-中国急救医学 2008(5)
5. Xiao F;Arnold TC;Zhang S Cerebral cortical aquaporin-4 expression in brain edema following cardiac arrest in rats 2004
6. Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest 2002
7. Xiao F Bench to bedside, brain edema and cerebral resuscitation:the present and future 2002
8. 尹燕伟;宋建防;周赞宫 利多卡因对大鼠脑损伤后脑组织水通道蛋白4表达的影响[期刊论文]-中国临床康复杂志 2006(10)
9. 肖盐;刘励军;周保纯 艾芬地尔对大鼠心肺复苏后脑组织含水量和水通道蛋白-4表达的影响[期刊论文]-中国急救医学 2008(2)
10. 李慧;陈圣刚;陈吉相 地塞米松对大鼠脑水通道蛋白4表达的影响[期刊论文]-中国危重病急救医学 2007(6)
11. 陈俊;陈寿权;李章平 七叶皂苷对心肺复苏后大鼠脑水肿期脑水通道蛋白4 mRNA变化的作用[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2007(4)
12. 孙志扬;李光;孙庆文 亚低温对心肺复苏大鼠大脑海马神经元内N-甲基-D-天门冬氨酸受体1表达的影响[期刊论文]-中国危重病急救医学 2006(5)
13. Busto R;Dietrich WD;Globus MY Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury 1987
14. 郭富强;徐玉川;陈隆益 脑出血患者血肿周围组织水通道蛋白-4表达与脑水肿及病理超微结构变化的关系[期刊论文]-中国危重病急救医学 2008(11)
15. Idris AH;Becker LB;Ornato JP Utstein-style guidelines for uniform reporting of laboratory CPR research 1996
16. Fujioka M;Okuchi K;Sakaki T Specific changes in human brain following reperfusion after cardiac arrest 1994