

# 沉默水通道蛋白4对脑创伤致大鼠学习记忆功能障碍的作用研究

熊翱 金戈 熊仁平 鲁宏

450001 河南郑州, 郑州大学临床医学系(熊翱), 基础医学院生物化学与分子生物学教研室(金戈); 400042 重庆, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室分子生物学中心(熊仁平); 400054 重庆市第七人民医院医学影像科(鲁宏)

通讯作者: 鲁宏, Email: 4714739847@qq.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.02.015

**【摘要】** 目的 通过观察与认知和学习记忆功能相关的蛋白表达, 探讨水通道蛋白4(AQP4)沉默对创伤性脑损伤(TBI)大鼠学习和记忆功能的影响及意义。方法 按随机数字表法将96只健康成年雄性Wistar大鼠分组。①48只大鼠被分为假手术(Sham)组、TBI组(采用改良Feeney法制模)、AQP4 RNA干扰(RNAi)阴性组[TBI+无意义的小干扰RNA(siRNA)-AQP4脂质体溶液10 μL]、AQP4 RNAi组(TBI+siRNA-AQP4脂质体溶液10 μL); 分别于伤后1、6、12 h各取4只大鼠脑组织, 采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测海马组织AQP4、一般性调控阻遏蛋白激酶2(GCN2)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)及其磷酸化(p-CREB)蛋白表达。②另外48只大鼠被分为正常组(Control组)、Sham组、TBI组、AQP4 RNAi组, 其中6只于伤后12 h测定脑含水量, 另外6只用于Morris水迷宫实验。结果 ①TBI组伤后海马组织AQP4和GCN2蛋白表达较Sham组明显增高, 并随时间延长呈逐渐升高趋势, 12 h出现统计学差异(AQP4蛋白:  $5.03 \pm 0.09$  比1, GCN2蛋白:  $4.01 \pm 0.13$  比1, 均  $P < 0.01$ ); CREB和p-CREB表达较Sham组明显降低, 并随时间延长呈逐渐下降趋势, 12 h出现统计学差异(CREB蛋白:  $0.38 \pm 0.03$  比1, p-CREB蛋白:  $0.38 \pm 0.03$  比1, 均  $P < 0.01$ )。与TBI组比较, AQP4 RNAi组伤后各时间点AQP4蛋白表达明显下降(1 h:  $1.02 \pm 0.04$  比  $2.23 \pm 0.05$ , 6 h:  $1.23 \pm 0.03$  比  $2.59 \pm 0.04$ , 12 h:  $2.20 \pm 0.08$  比  $5.03 \pm 0.09$ , 均  $P < 0.01$ ), 而GCN2、CREB和p-CREB表达则差异无统计学意义。AQP4 RNAi阴性组各蛋白表达变化与TBI组比较差异均无统计学意义。②TBI组脑含水量较Control组和Sham组明显升高[( $83.7 \pm 0.4$ )% 比 ( $76.2 \pm 0.2$ )%、( $76.2 \pm 0.3$ )%, 均  $P < 0.01$ ]; AQP4 RNAi组脑含水量[( $78.8 \pm 0.3$ )%]则较TBI组明显下降( $P < 0.01$ )。TBI组和AQP4 RNAi组伤后第11、13、15天Morris水迷宫实验潜伏期明显延长, 探索时间明显缩短; 与TBI组比较, AQP4 RNAi组第15天逃避潜伏期明显缩短( $s: 60.2 \pm 11.1$  比  $62.0 \pm 11.5$ ,  $P < 0.05$ ), 探索时间明显延长( $s: 37.0 \pm 8.5$  比  $32.7 \pm 9.2$ ,  $P < 0.05$ )。结论 TBI后大鼠认知和学习记忆功能受损, 与影响认知和学习记忆功能相关的CREB和GCN2蛋白表达变化显著相关; 经AQP4 RNAi处理后, 虽对大鼠认知和学习记忆功能改善不明显, 但可减轻脑水肿。

**【关键词】** 脑损伤, 创伤性; 水通道蛋白4; 一般性调控阻遏蛋白激酶2; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白

基金项目: 国家自然科学基金(81160181); 重庆市卫生计生委重点项目(2016ZDXM040)

## Effect of silencing aquaporin 4 on learning and memory dysfunction in rats with traumatic brain injury

Xiong Ao, Jin Ge, Xiong Renping, Lu Hong

Department of Clinical Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China (Xiong A); Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China (Xiong A, Jin G); Molecular Biology Center, the State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Research Institute of Surgery and Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China (Xiong RP); Department of Radiology, Chongqing No.7 Hospital, Chongqing 400054, China (Lu H)

Corresponding author: Lu Hong, Email: 4714739847@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To observe the protein expression related to cognitive and learning memory function, and to investigate the effect of aquaporin 4 (AQP4) silence on learning and memory function in traumatic brain injury (TBI) rats. **Methods** Ninety-six healthy adult male Wistar rats were divided into groups according to the random number table. ① Forty-eight rats were divided into sham operation (sham) group, TBI group (by using modified Feeney method), AQP4 RNA interference (RNAi) negative group [TBI+meaningless small interfering RNA (siRNA)-AQP4 liposome solution 10 μL], and AQP4 RNAi group (TBI+siRNA-AQP4 liposome solution 10 μL). In each group, brain tissues of 4 rats were harvested at 1, 6 and 12 hours respectively. The protein expressions of hippocampus AQP4, general control nonderepressible 2 kinase (GCN2), cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB) and phosphorylated CREB (p-CREB) were detected by Western Blot. ② In addition, 48 rats were divided into normal control

group (control group), sham group, TBI group and AQP4 RNAi group, brain water content were measured in 6 of them after 12 hours of injury, and 6 were used in Morris water maze test. **Results** ① The protein expressions of hippocampus AQP4 and GCN2 in TBI group were significantly higher than those in sham group, and increased gradually with time with statistical difference at 12 hours (AQP4 protein:  $5.03 \pm 0.09$  vs. 1, GCN2 protein:  $4.01 \pm 0.13$  vs. 1, both  $P < 0.01$ ); the protein expressions of hippocampus CREB and p-CREB were significantly lower than those in sham group, and decreased gradually with time with statistical difference at 12 hours (CREB protein:  $0.38 \pm 0.03$  vs. 1, p-CREB protein:  $0.38 \pm 0.03$  vs. 1, both  $P < 0.01$ ). Compared with TBI group, the protein expressions of AQP4 in AQP4 RNAi group was significantly decreased (1 hour:  $1.02 \pm 0.04$  vs.  $2.23 \pm 0.05$ , 6 hours:  $1.23 \pm 0.03$  vs.  $2.59 \pm 0.04$ , 12 hours:  $2.20 \pm 0.08$  vs.  $5.03 \pm 0.09$ , all  $P < 0.01$ ), but there were no significant difference in the expressions of GCN2, CREB or p-CREB. There was no significant difference in the expression of protein between AQP4 RNAi negative group and TBI group. ② The brain water content in TBI group was significantly higher than that in control group and sham group [ $(83.7 \pm 0.4)\%$  vs.  $(76.2 \pm 0.2)\%$ ,  $(76.2 \pm 0.3)\%$ , both  $P < 0.01$ ]. The brain water content in AQP4 RNAi group [ $(78.8 \pm 0.3)\%$ ] was significantly decreased as compared with that in TBI group ( $P < 0.01$ ). The latency of Morris water maze test was significantly prolonged in the day 11, 13 and 15 after the injury of the TBI group and AQP4 RNAi group, and the exploration time was significantly shortened. Compared with TBI group, the incubation period of AQP4 RNAi group was significantly shortened at 15 days (s:  $60.2 \pm 11.1$  vs.  $62.0 \pm 11.5$ ,  $P < 0.05$ ), and the exploration time was significantly prolonged (s:  $37.0 \pm 8.5$  vs.  $32.7 \pm 9.2$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The impairment of cognitive and learning memory function in rats after TBI was significantly related to the changes in CREB and GCN2 in cognitive and learning memory function. After RNAi treatment, the cognitive and learning and memory function of rats was not improved obviously, but the brain edema could be alleviated.

**【Key words】** Traumatic brain injury; Aquaporin 4; Geneal control nonderepressible 2 kinase; cAMP response element binding protein

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81160181); Chongqing Municipal Commission of Health and Family Planning Key Project (2016ZDXM040)

创伤性脑损伤(TBI)患者病死率高且后遗症严重<sup>[1]</sup>,尽管部分患者因救治及时有效而存活,但伤后常出现认知功能障碍、焦虑、抑郁、易怒,甚至自杀倾向等精神症状<sup>[2]</sup>。认知障碍是TBI最具代表性的后遗症,主要表现为学习记忆损害。近年来研究表明,水通道蛋白(AQP1、AQP4)、环磷酸腺苷/蛋白激酶A/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP/PKA/CREB)信号通路等与学习和记忆能力有着重要关系,一般性调控阻遏蛋白激酶2(GCN2)能够调控起始转录,抑制新的信息转化成长期记忆<sup>[3-4]</sup>。但有关TBI后AQP4、GCN2、CREB和磷酸化CREB(p-CREB)表达与认知障碍关系的研究较少。据此,本实验中通过改良Feeney法建立中度TBI大鼠模型<sup>[5]</sup>,采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测脑海马组织AQP4、GCN2、CREB和p-CREB蛋白表达,并结合脑含水量和Morris水迷宫实验,探讨AQP4沉默与学习、记忆功能的关系及意义。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂:** RNA干扰(RNAi)序列(GACAUU-UGUUUGCAAUCAATT; UUGAUUGCAAACAAA-UGCCTT)和无意义的RNAi(negative control)序列(UUCUCCGACGCGUCACGUTT; ACGUGACACG-UUCGGAGAATT)由上海百力格生物技术有限公司合成。兔抗CREB单克隆抗体(单抗,美国Abcam公司),兔抗p-CREB(ser133)单抗(美国Thermo公

司),兔抗AQP4多克隆抗体(多抗)、山羊抗GCN2多抗、山羊抗3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多抗(美国Santa Cruz公司),LipoFiter™脂质体转染试剂(上海汉恒生物科技有限公司)。

**1.2 实验动物及分组:**健康成年雄性Wistar大鼠96只,体重( $310 \pm 22$ )g,由重庆市第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供,许可证号:SYXK(渝)2012-0010。按随机数字表法将48只大鼠分为假手术(Sham)组、TBI组、AQP4 RNAi阴性组[TBI+无意义的小干扰RNA(siRNA)-AQP4脂质体溶液10 μL]、AQP4 RNAi组[TBI+siRNA-AQP4脂质体溶液10 μL],每组再按致伤后时间分为1、6、12 h亚组,每个亚组4只,用于检测脑组织AQP4、GCN2、CREB和p-CREB蛋白表达。另外48只大鼠按随机数字表法分为正常组(Control组)、Sham组、TBI组、AQP4 RNAi组(TBI+siRNA-AQP4脂质体溶液10 μL),每组12只,其中6只用于测定伤后12 h脑含水量,另外6只用于Morris水迷宫实验。

**1.3 中度TBI动物模型建立:**参照改良Feeney等<sup>[5]</sup>方法,使用PinPoint™颅脑损伤撞击器建立中度TBI大鼠模型。3%戊巴比妥钠1 mL/kg腹腔注射麻醉大鼠,俯卧位将头部固定于立体定位仪上,备皮,常规消毒,沿正中线切开头皮约2 cm。用牙科台式电钻机1.5 mm钻头于前后囟之间、中线右旁开2.5 mm处钻开颅骨并确保硬脑膜完整,以此为中心用蚊式

血管钳打开直径为 5 mm 的圆形骨窗。骨窗撞击参数: 撞击头直径 4 mm, 撞击速度 2.5 m/s, 撞击深度 4.0 mm, 撞击时间 0.85 ms。术后用骨蜡封闭骨窗。Sham 组除不进行撞击, 其余处理同 TBI 组。

1.4 建立 AQP4 RNAi-TBI 动物模型

1.4.1 siRNA-AQP4 脂质体溶液的配制: 分别将 AQP4-siRNA 正链和负链溶解于 10 mmol/L、pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)中, 浓度为 50 μmol/L, 取等量的 AQP4-siRNA 正链和负链溶液于无菌小离心管(EP管)中混匀, 70 °C 10 min, 再 45 °C 10 min, 使其恢复为双链 AQP4-siRNA, 取 18 μL 加入 2 μL 脂质体 2000, 4 °C 振荡混匀 10 min 即为脂质体包裹的 AQP4-siRNA。

1.4.2 脑创伤区域注入 siRNA-AQP4 双链 siRNA 片段: 在立体定向仪指引下, 于右侧脑室矢状缝旁 1.0 mm、冠状缝后 1.5 mm 处进行穿刺, 进针深达 1.5 mm。AQP4 RNAi 组大鼠于创伤后 10 min 内注射 siRNA-AQP4 脂质体溶液 10 μL, 防止颅内压升高过快, 骨蜡封闭骨窗, 局部止血后缝合头皮。AQP4 RNAi 阴性组则注射含无意义的 RNAi 片段的脂质体溶液 10 μL。

1.5 Western Blot 检测蛋白表达: 参照文献[7]方法, 取大鼠海马组织并于液氮中研碎, 置于含蛋白酶抑制剂的组织裂解液(RIPA)中提取蛋白并定量。电泳、转膜、封闭后, 加入一抗(AQP4、GCN2 和 GAPDH 抗体滴度 1:200, CREB 和 p-CREB 抗体滴度 1:800)室温杂交 1 h, 辣根过氧化物酶标记的二抗(工作浓度为 1:2000)室温孵育 1 h。化学发光底物试剂(ECL)检测, 扫描分析软件系统进行密度分析, 测定灰度值。校正上样量采取目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 的灰度值比值表示, 以 Sham 组为参照。

1.6 干湿重法测定脑含水量<sup>[8]</sup>: 伤后 12 h 断头处死大鼠取脑组织, 用滤纸吸尽表面血渍后称重, 然后置于 85 °C 恒温干燥箱内干燥 72 h 至恒重, 称干重后按 Elliot 公式计算脑含水量。脑含水量=(湿重-干重)/湿重 × 100%。

1.7 Morris 水迷宫实验<sup>[9]</sup>: Morris 水迷宫设备为直径 120 cm、高 50 cm 的水池。将大鼠面向池壁随机从 3 个象限(目标象限除外)中选择一个人水点放入水中, 让大鼠入水后能够找到平台。第 1 天让大鼠自由游泳 2 min; 第 2~3 天每天训练 3 次, 每次间隔 1 h; 第 4 天开始实验。

1.7.1 逃避潜伏期: 大鼠从入水到爬上隐匿平台所用的时间。若大鼠在 120 s 内未找到平台, 则将其引至平台上活动 20 s, 潜伏期记为 120 s。

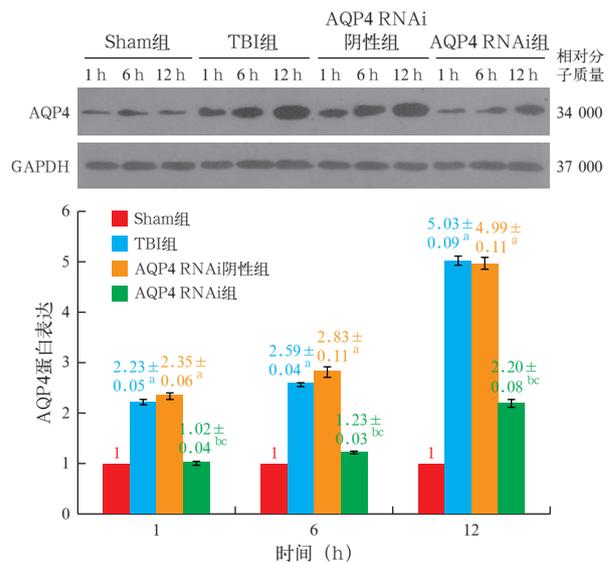
1.7.2 空间探索实验: 隐匿平台实验结束后第 2 天, 撤去原有平台, 将大鼠从同一入水点放入水中, 记录 120 s 内经过原平台所在象限停留时间(探索时间)。

TBI 后 7 d, 重复以上实验, 训练 3 d。第 11 天开始测定, 隔日测定 1 次。

1.8 统计学分析: 使用 Sigmaplot v12.5 软件, 数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间两两比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

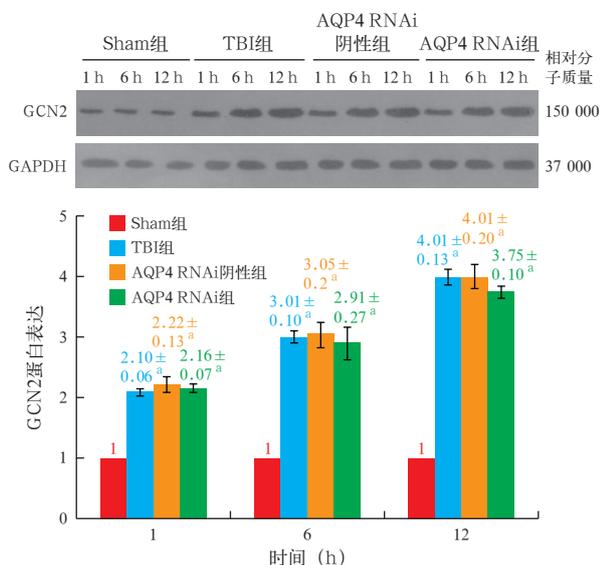
2.1 AQP4 蛋白表达(图 1): TBI 组伤后 1、6、12 h 海马组织 AQP4 蛋白表达均较 Sham 组明显增高, 并随时间延长呈逐渐升高趋势(均 *P* < 0.01)。与 TBI 组比较, AQP4 RNAi 组伤后各时间点 AQP4 蛋白表达明显下降(均 *P* < 0.01), AQP4 RNAi 阴性组变化不明显(均 *P* > 0.05)。



Sham 组为假手术组, TBI 组为创伤性脑损伤组, AQP4 RNAi 阴性组为 TBI 后注射无意义的小干扰 RNA (siRNA)-AQP4 脂质体溶液组, AQP4 RNAi 组为 TBI 后注射 siRNA-AQP4 脂质体溶液组; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01; 与 TBI 组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.01; 与 AQP4 RNAi 阴性组比较, <sup>c</sup>*P* < 0.01

图 1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠脑创伤后不同时间点海马组织水通道蛋白 4(AQP4)蛋白表达

2.2 GCN2 蛋白表达(图 2): TBI 组、AQP4 RNAi 阴性组、AQP4 RNAi 组伤后 1、6、12 h 海马组织 GCN2 蛋白表达均较 Sham 组明显增加, 并随时间延长呈逐渐升高趋势(均 *P* < 0.01)。而 TBI 组、AQP4 RNAi 阴性组、AQP4 RNAi 组间 GCN2 蛋白表达差异均无统计学意义(均 *P* > 0.05)。



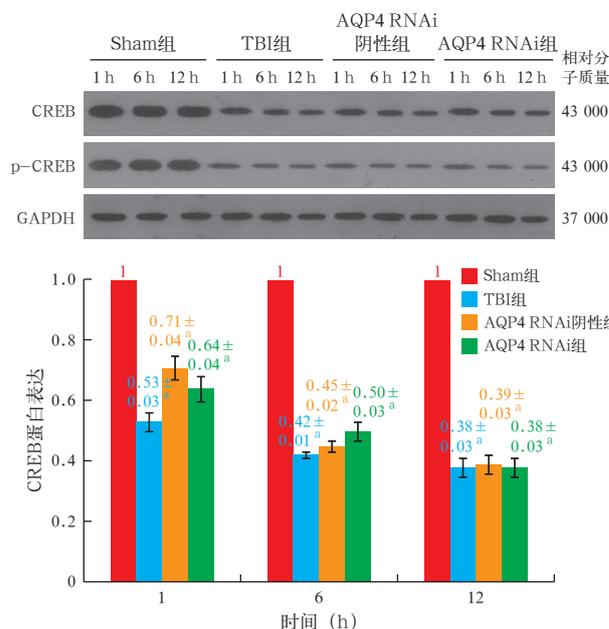
Sham 组为假手术组, TBI 组为创伤性脑损伤组, AQP4 RNAi 阴性组为 TBI 后注射无意义的小干扰 RNA (siRNA)-AQP4 脂质体溶液组, AQP4 RNAi 组为 TBI 后注射 siRNA-AQP4 脂质体溶液组; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01

图 2 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组大鼠脑创伤后不同时间点海马组织一般性调控阻遏蛋白激酶 2 (GCN2) 蛋白表达

**2.3 CREB 和 p-CREB 蛋白表达 (图 3):** TBI 组、AQP4 RNAi 阴性组、AQP4 RNAi 组伤后 1、6、12 h 海马组织 CREB 和 p-CREB 蛋白表达均较 Sham 组明显降低, 并随时间延长呈逐渐下降趋势 (均 *P* < 0.01), 而 3 组间 CREB 和 p-CREB 蛋白表达差异均无统计学意义 (均 *P* > 0.05)。

**2.4 脑含水量 (表 1):** 与 Control 组和 Sham 组比较, TBI 组和 AQP4 RNAi 组脑含水量均明显升高 (均 *P* < 0.01)。AQP4 RNAi 组脑含水量较 TBI 组明显减少 (*P* < 0.01)。

**2.5 行为学 (表 1):** 实验前大鼠学习记忆能力无差异。与 Control 组和 Sham 组比较, TBI 组和 AQP4 RNAi 组伤后第 11、13、15 天大鼠逃避潜伏期明显延长, 探索时间明显缩短 (均 *P* < 0.01)。与 TBI 组比较, AQP4 RNAi 组第 15 天大鼠逃避潜伏期缩短, 探索时间延长 (均 *P* < 0.05), 第 11、13 天大鼠逃避潜伏期和探索时间差异无统计学意义 (均 *P* > 0.05)。



Sham 组为假手术组, TBI 组为创伤性脑损伤组, AQP4 RNAi 阴性组为 TBI 后注射无意义的小干扰 RNA (siRNA)-AQP4 脂质体溶液组, AQP4 RNAi 组为 TBI 后注射 siRNA-AQP4 脂质体溶液组; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01

图 3 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组大鼠脑创伤后不同时间点海马组织环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (CREB) 及其磷酸化 (p-CREB) 表达

**3 讨论**

本实验中借鉴 Feeney 等<sup>[5]</sup>的成熟技术, 依据本课题组前期实验的骨窗撞击参数<sup>[6]</sup>, 用 PinPoint™ 颅脑损伤撞击器成功建立了中度 TBI 大鼠模型, 且重复性较好。大鼠 TBI 后 12 h 海马组织 AQP4 蛋白表达明显增高, 脑含水量明显升高; 注射 siRNA-

表 1 各组大鼠脑含水量及 Morris 水迷宫实验结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	伤后 12 h 脑含水量 (%)	逃避潜伏期 (s)				探索时间 (s)			
			实验前	第 11 天	第 13 天	第 15 天	实验前	第 11 天	第 13 天	第 15 天
Control 组	6	76.2 ± 0.2	35.8 ± 9.8	34.7 ± 6.8	30.5 ± 7.0	28.3 ± 7.6	62.5 ± 4.9	63.0 ± 3.7	70.3 ± 4.3	73.4 ± 4.4
Sham 组	6	76.2 ± 0.3	37.2 ± 12.4	37.6 ± 7.4	31.7 ± 6.8	30.1 ± 9.8	63.5 ± 5.9	62.7 ± 3.9	67.4 ± 7.1	71.3 ± 4.0
TBI 组	6	83.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	36.4 ± 6.9	61.2 ± 10.7 <sup>a</sup>	62.1 ± 6.9 <sup>a</sup>	62.0 ± 11.5 <sup>a</sup>	65.8 ± 4.3	32.3 ± 8.9 <sup>a</sup>	33.4 ± 8.2 <sup>a</sup>	32.7 ± 9.2 <sup>a</sup>
AQP4 RNAi 组	6	78.8 ± 0.3 <sup>ab</sup>	35.1 ± 8.8	61.7 ± 10.0 <sup>a</sup>	63.4 ± 4.5 <sup>a</sup>	60.2 ± 11.1 <sup>ac</sup>	64.7 ± 4.6	33.7 ± 9.8 <sup>a</sup>	40.9 ± 13.5 <sup>a</sup>	37.0 ± 8.5 <sup>ac</sup>

注: Control 组为正常组, Sham 组为假手术组, TBI 组为创伤性脑损伤组, AQP4 RNAi 组为 TBI 后注射小干扰 RNA-水通道蛋白 4 (siRNA-AQP4) 脂质体溶液组; 与 Control 组和 Sham 组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01; 与 TBI 组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.01, <sup>c</sup>*P* < 0.05

AQP4 脂质体溶液沉默 AQP4 蛋白后, AQP4 蛋白表达明显下调, 脑含水量明显降低, 说明该方法可减轻脑水肿, 对脑创伤起到了治疗作用。

Morris 水迷宫是用于鼠类空间学习记忆研究的装置, 广泛应用于动物行为学实验研究。本研究结果显示, 大鼠 TBI 后 Morris 水迷宫逃避潜伏期延长, 在原平台所在象限探索时间缩短, 提示 TBI 后大鼠空间记忆的获得和保持能力、参照物记忆能力和工作记忆能力减弱, 表明 TBI 可严重损害学习记忆功能; 沉默 AQP4 后大鼠学习记忆功能有所改善。

国内外学者研究显示, AQP4 在伤后 6 h 表达增强, 12 h 达峰值, 与细胞内水肿程度一致, 主要是相继发生的血管源性水肿和细胞内水肿<sup>[10-12]</sup>。本研究结果显示, 大鼠 TBI 后 1 h 海马组织 AQP4 蛋白表达增加, 6 h 增强, 12 h 达峰值, 与文献报道相符<sup>[9, 13]</sup>。经 AQP4 RNAi 处理后可降低 TBI 后 AQP4 蛋白表达<sup>[10, 14]</sup>, 同时减少脑含水量, 改善脑水肿, 进而改善组织缺血缺氧、细胞凋亡、氧化应激, 从而减轻继发性脑损伤<sup>[15-16]</sup>, 起到救治脑创伤的关键作用<sup>[17]</sup>。尽管 AQP4 RNAi 处理对 TBI 大鼠学习记忆的改善作用不明显, 但实验中个别大鼠改善作用较大。这是否预示着 AQP4 蛋白在学习记忆中的作用, AQP4 既可加重脑水肿, 亦可减轻脑水肿<sup>[5]</sup>, 存在双向调节功能? 如何找到一个点, 二者兼顾, 这可能是改善 TBI 预后的一个方向。

CREB 在长时记忆的分子机制中发挥着重要作用, 研究表明转录因子 CREB 在海马脑片长时程增强(L-LTP)模型中起着重要作用<sup>[13]</sup>。CREB 可以结合位于启动子位置的 CRE, 促进许多基因的转录, 如 c-fos 及早基因和脑源性神经营养因子等。多种蛋白激酶(如 PKA)可以直接或间接活化 CREB, 使 CREB 的 133 位丝氨酸磷酸化后成为有活性的形式, 选择性抑制小鼠海马 PKA。若 CREB 的 133 位丝氨酸不能被磷酸化, L-LTP 也不能被诱导产生<sup>[17]</sup>。研究显示, CREB 突变型小鼠的长时记忆受到明显的影响<sup>[14]</sup>。本研究显示, TBI 大鼠经 AQP4 RNAi 处理后海马组织 CREB 和 p-CREB 表达均明显降低, CREB 活化减少, 很难启动它负责的生物学功能; 结合动物行为学实验结果表明, TBI 后大鼠各种记忆能力均减弱, RNAi 沉默 AQP4 后也无显著改善。为了缓解和治疗 TBI 后认知障碍, 刺激 CREB 的表达和促使 CREB 的 133 位丝氨酸磷酸化, 促使新的突触链接的生成和提高神经元的存活率, 可能

是临床治疗的新思路。

GCN2 是一种蛋白激酶, 可能是将短期记忆变成长期记忆的一个主控调节因子。Costa-Mattioli 等<sup>[4]</sup>实验证明, GCN2 敲除小鼠获得的新信息没有像正常小鼠那样容易“褪色”, 即这种新信息更频繁地被转化成了长期记忆。因此推测 GCN2 可能阻止新信息被储存成长期记忆。本研究显示, TBI 大鼠经 AQP4 RNAi 处理后海马组织 GCN2 蛋白表达明显增加。GCN2 是一个调控阻遏蛋白, 结合 Morris 水迷宫实验结果表明, GCN2 表达升高可能阻止了大脑中长期记忆的形成。TBI 后引起的认知功能障碍越来越多见<sup>[2]</sup>, TBI 后, 沉默 GCN2 可能是提升和恢复学习记忆功能的有效途径之一。

综上所述, TBI 后影响认知和学习记忆功能的 CREB、GCN2 蛋白表达变化显著, 使认知和学习记忆功能受损, 尽管经 AQP4 RNAi 处理后对大鼠认知和学习记忆功能改善作用不明显, 但可减少脑含水量, 减轻脑水肿, 促进了有效救治。同时这为进一步研究 AQP4、GCN2、CREB 蛋白在突触可塑性以及学习记忆过程中可能发挥的重要作用 and 机制奠定了基础, 为 TBI 的临床研究和治疗提供了新思路。

## 参考文献

- [1] 袁佳, 王迪芬, 刘颖, 等. 富氢水对创伤性脑损伤大鼠 Nrf2 表达及氧化应激损伤的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (11): 911-915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.11.009.  
Yuan J, Wang DF, Liu Y, et al. Effects of hydrogen rich water on the expression of Nrf2 and the oxidative stress in rats with traumatic brain injury [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (11): 911-915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.11.009.
- [2] Ning YL, Yang N, Chen X, et al. Adenosine A2A receptor deficiency alleviates blast-induced cognitive dysfunction [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33 (11): 1789-1798. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.127.
- [3] 陈先俊, 王迪芬, 刘颖, 等. 富氢液对创伤性颅脑损伤大鼠大脑皮质水通道蛋白 1 表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (5): 460-464. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.016.  
Chen XJ, Wang DF, Liu Y, et al. Effects of hydrogen-rich water on the expression of aquaporin 1 in the cerebral cortex of rat with traumatic brain injury [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (5): 460-464. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.016.
- [4] Costa-Mattioli M, Gobert D, Harding H, et al. Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2 [J]. Nature, 2005, 436 (7054): 1166-1173. DOI: 10.1038/nature03897.
- [5] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat [J]. Brain Res, 1981, 211 (1): 67-77. DOI: 10.1016/0006-8993(81)90067-6.
- [6] Chen JQ, Zhang CC, Lu H, et al. Assessment of traumatic brain injury degree in animal model [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7 (12): 991-995. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60174-7.
- [7] 熊仁平, 周元国. 蛋白免疫印迹法在 G 蛋白检测中的应用[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20 (2): 145-148. DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.022.  
Xiong RP, Zhou YG. Use of Western blot for determination of guanine nucleotide-binding proteins in rats [J]. J Third Mil Med Univ, 1998, 20 (2): 145-148. DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.022.

- [8] 徐新,高伟伟,吕莉,等.小鼠颅脑创伤模型的构建及运动功能评估[J].中华实验外科杂志,2016,33(1):252-255. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.01.078.  
Xu X, Gao WW, Lyu L, et al. The establishment of traumatic brain injury model and evaluation of motor functions in mice [J]. Chin J Exp Surg, 2016, 33 (1): 252-255. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.01.078.
- [9] 陈岱莉,黄晓雷,齐晓非,等.右旋美托咪啶缓解内毒素休克大鼠海马炎症反应及认知功能损伤[J].中华实验外科杂志,2015,32(4):778-780. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.04.038.  
Chen DL, Huang XL, Qi XF, et al. Effects of dexmedetomidine on hippocampal inflammatory responses and cognitive impairment in rats with endotoxin-induced shock [J]. Chin J Exp Surg, 2015, 32 (4): 778-780. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.04.038.
- [10] 任欢欢,熊翱,鲁宏.大鼠脑创伤半暗带水肿与水通道蛋白-4表达的相关性[J].中华创伤杂志,2016,32(4):363-369. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-8050.2016.04.018.  
Ren HH, Xiong A, Lu H. Relationship of edema with expression of aquaporin 4 within traumatic penumbra of rats with brain trauma [J]. Chin J Trauma, 2016, 32 (4): 363-369. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-8050.2016.04.018.
- [11] Nicchia GP, Frigeri A, Liuzzi GM, et al. Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology, growth, and water transport and induces changes in ischemia-related genes [J]. FASEB J, 17 (11): 1508-1510. DOI: 10.1096/fj.02-1183fj.
- [12] Badaut J, Ashwal S, Adami A, et al. Brain water mobility decreases after astrocytic aquaporin-4 inhibition using RNA interference [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31 (3): 819-831. DOI: 10.1038/jcbfm.2010.163.
- [13] Frey U, Huang YY, Kandel ER. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons [J]. Science, 1993, 260 (5114): 1661-1664. DOI: 10.1126/science.8389057.
- [14] Abel T, Nguyen PV, Barad M, et al. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory [J]. Cell, 1997, 88 (5): 615-626. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81904-2.
- [15] 刘曼莉,王迪芬.丙泊酚及醒脑静预处理对大鼠离体脑片不同性质损伤的保护作用[J].中国中西医结合急救杂志,2014,21(2):126-130. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.02.013.  
Liu ML, Wang DF. The protective effects of pre-treatment with propofol and Xingnaojing on different characteristic injuries in rat cerebrocortical slices [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2014, 21 (2): 126-130. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.02.013.
- [16] 倪啸晓,刘志锋,谢秋幼,等.中暑脑损伤机制及高压氧治疗作用的研究进展[J].中华危重病急救医学,2017,29(6):572-576. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.06.020.  
Ni XX, Liu ZF, Xie QY, et al. Cerebral injury induced by heat stroke and the therapeutic effect of hyperbaric oxygen therapy [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (6): 572-576. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.06.020.
- [17] 刘颖,兰青,王迪芬,等.富氢水对创伤性脑损伤大鼠脑创伤区CD34表达的影响[J].中华危重病急救医学,2017,29(3):260-264. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.013.  
Liu Y, Lan Q, Wang DF, et al. Effect of hydrogen-rich water on the CD34 expression in lesion boundary brain tissue of rats with traumatic brain injury [J]. Chin Crit Care Med, 2017, 29 (3): 260-264. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.013.

(收稿日期:2017-06-08)

## • 科研新闻速递 •

### 氢化可的松并不能降低脓毒性休克患者的病死率

目前尚不清楚氢化可的松能否降低脓毒性休克患者的病死率,为此,澳大利亚学者进行了一项随机对照试验。研究人员将收住于重症加强治疗病房(ICU)的脓毒性休克患者随机分为氢化可的松治疗组(200 mg/d,连用7 d)和安慰剂组。主要评价指标为患者90 d全因病死率。结果显示:2013年3月至2017年4月共有3800例患者纳入了该研究,其中有3658例患者的主要评价指标得到了确认。氢化可的松治疗组有511例患者(27.9%)在90 d内死亡,而安慰剂组则有526例患者(28.8%)死亡〔优势比(*OR*)=0.95,95%可信区间(95%*CI*)=0.82~1.10,*P*=0.50〕。氢化可的松治疗组患者纠正脓毒性休克所需时间要短于安慰剂组〔*d*:3(2,5)比4(2,9);风险比(*HR*)=1.32,95%*CI*=1.23~1.41,*P*<0.001〕,起初的机械通气时间也短于安慰剂组〔*d*:6(3,18)比7(3,24);*HR*=1.13,95%*CI*=1.05~1.22,*P*<0.01〕,但两组患者后期再次使用机械通气的时间差异却无统计学意义。氢化可的松治疗组患者需要输血的比例低于安慰剂组(37.0%比41.7%;*OR*=0.82,95%*CI*=0.72~0.94,*P*=0.004),但两组间包括28 d病死率、脓毒性休克的再发率、ICU外和院外的患者存活天数、肾脏替代治疗比例等其他评价指标差异均无统计学意义。研究人员据此得出结论:氢化可的松治疗并不能降低脓毒性休克患者的病死率。

罗红敏,编译自《N Engl J Med》,2018-01-19(电子版)

### 急性呼吸衰竭相关肺炎的病毒负担:一个被低估的问题

呼吸机相关性肺炎(VAP)是患者死亡的主要原因,也是抗菌药物使用的一个重要原因,但病毒在该疾病中的作用尚不明确。明确VAP发生中的病毒作用可以促进抗菌药物的合理应用。最近,有研究人员对一项机械通气(MV)肺炎患者的前瞻性队列研究进行了二次分析。该研究纳入了364例社区和医院来源的肺炎患者,其中79例(21.7%)患者的唯一病原体是病毒,最常见的病毒有鼻病毒/肠道病毒(*n*=20)、流感病毒A(*n*=12)、呼吸合胞病毒(*n*=11)。病毒性肺炎的院内病死率高达37.2%,但与其他肺炎患者(36.5%)比较差异无统计学意义;同样,病毒性肺炎患者的MV时间、住院时间及30 d内再住院率相比其他肺炎患者差异也无统计学意义。研究者认为,病毒感染是导致需要MV的重症肺炎的一个主要原因,识别病毒感染可减少抗菌药物的使用,临床医生应该该系统评估需要MV的肺炎患者的病毒病原学证据。

朱万杰,喻文,编译自《Chest》,2017-12-20(电子版)