

The Effect of UC-MSCs on Aquaporins-4 Expression in High Altitude Cerebral Edema in Rats

Na Li¹, Xingyi Song², Jinghao Duan³, Huipeng Meng³, Wei Fang³, Yanlong Zhang³, Keqiang Wang³, Huajiang Dong², Bin Hao^{3*}, Jian Xv^{1,2}, Shuwang Yang^{2*}

¹Baoding Hospital, Peking Childrens Hospital, Baoding Hebei

²Logistics University of CAPF, Tianjin

³Tianjin School of Precision Instrument and Optoelectronic Engineering, Tianjin University, Tianjin
Email: *ysw022@163.com, *13920395907@139.com

Received: Apr. 7th, 2020; accepted: Apr. 23rd, 2020; published: Apr. 30th, 2020

Abstract

[Objective] To study the relationship between AQP4 and high altitude cerebral edema and effect of UC-MSCs. [Methods] The model of high altitude cerebral edema was established (N = 8). Brain edema was measured. The expression of AQP4 mRNA and protein were measured by RT-PCR, immunohistochemistry and Western Blot and to detect the effect of UC-MSCs in on Aquaporins-4 expression in high altitude cerebral edema in rats. [Results] The water content increased and the edema was evident. The expression of AQP4 mRNA and protein were up-regulated ($P < 0.05$) and UC-MSCs could inhibit the expression of AQP4 in mRNA and protein. [Conclusions] The expression of AQP4 mRNA and protein were up-regulated after hypoxia. UC-MSCs could inhibit the expression of AQP4 in mRNA and protein in high altitude cerebral edema.

Keywords

UC-MSCs, Aquaporins-4, Rat, Plateau Hypoxia, Brain Edema

脐带间充质干细胞对高原脑水肿大鼠水通道蛋白-4的影响

李娜¹, 宋星宜², 段敬豪³, 孟慧鹏³, 房伟³, 张艳龙³, 王克强³, 董化江², 郝彬^{3*}, 徐健^{1,2}, 杨术旺^{2*}

*通讯作者。

文章引用: 李娜, 宋星宜, 段敬豪, 孟慧鹏, 房伟, 张艳龙, 王克强, 董化江, 郝彬, 徐健, 杨术旺. 脐带间充质干细胞对高原脑水肿大鼠水通道蛋白-4的影响[J]. 临床医学进展, 2020, 10(4): 670-675. DOI: 10.12677/acm.2020.104105

¹北京儿童医院保定医院五官科, 河北 保定

²武警后勤学院, 天津

³天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津

Email: *ysw022@163.com, *13920395907@139.com

收稿日期: 2020年4月7日; 录用日期: 2020年4月23日; 发布日期: 2020年4月30日

摘要

[目的]探讨间充质干细胞对高原脑水肿大鼠水通道蛋白4表达的影响。**[方法]**成功制作大鼠高原缺氧损伤模型8只, 对照组及干细胞组各8只, 测脑组织含水量, 采用RT-PCR、免疫组织化学、Western Blot测定脑组织高原缺氧损伤24 h后水通道蛋白4 mRNA和蛋白表达变及间充质干细胞对其影响。**[结果]**高原缺氧损伤后, 脑组织含水量增加, 水肿明显, 水通道蛋白4 mRNA和蛋白表达量上调($P < 0.05$), 应用间充质干细胞可有效抑制水通道蛋白4的表达。**[结论]**水通道蛋白4在高原缺氧脑水肿的形成过程中可能发挥了重要作用, 应用间充质干细胞可有效抑制水通道蛋白4的表达, 减轻高原脑水肿损伤。

关键词

间充质干细胞, 水通道蛋白4, 大鼠, 高原缺氧, 脑水肿

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

Peter Agre 在红细胞膜上发现了一种对水有特异性通透的蛋白分子, 被定义为水通道蛋白(Aquaporins, AQP), 其作为水液代谢的重要蛋白参与了水肿等病理过程的发生发展[1]。目前, 已鉴定到多达 13 种之多的 AQP 亚型(AQP0~AQP12) [2]。AQP 分布于机体多种组织和器官内, 介导着多种类型的细胞膜跨膜水转运的过程, 在哺乳动物脑组织中的 AQP 主要亚型为 AQP4 [3]-[8]。研究发现: 在高原低压缺氧状态时, 中枢神经系统由于缺氧会产生一系列病理改变, 其中最主要的病理学变化为高原脑水肿, 脐带间充质干细胞(Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, UC-MSCs)因其强大的免疫调节功能和分化增殖的特性广泛应用于再生医学领域, 是许多疑难杂症治疗的曙光[9] [10], 本实验建立大鼠高原缺氧模型, 采用 RT-PCR、免疫组化、Western Blot 等技术检测 UC-MSCs 对 AQP4 在基因、蛋白水平的表达分布、变化的影响, 初步探讨 UC-MSCs 对 AQP4 的影响, 为高原缺氧脑损伤的治疗提供理论支持。

2. 材料和方法

2.1. 材料

健康成年雄性 SD 大鼠 24 只, (动物合格证号: SCXK(军) 2007-004), 军事医学科学院提供, 体质量 215 ± 10 g, 等级: 无特定病原体动物(Specific pathogen free, SPF)。AQP4 抗体试剂盒(购自北京博奥森生物技术有限公司)。

2.2. 方法

2.2.1. 动物分组与模型制备

按照成组设计随机分为对照组和缺氧水肿 24 h 组以及细胞干预组, 每组 8 只。根据 William 建立的大鼠高原缺氧损伤模型自制缺氧装置[11], 密闭玻璃缸内放置温湿度表, 连接进出气管和探头, 放置带孔托盘, 缸底放适量钠石灰(吸收二氧化碳)和无水氯化钙(吸湿), 制成缺氧舱, 连续 24 小时, 进气口连接气体流量计监测气流量, 出气口连接真空泵抽气造成舱内缺氧环境, 探头连接测氧仪监测舱内氧含量。本模型的制作和实验动物的处理符合动物伦理学要求。

2.2.2. 脑组织含水量测定

采用干湿重法。动物处死后迅速取脑, 手术分离大脑半球组织样本, 先称湿重, 然后放入 60℃ 烤箱中烤干至恒重再称干重。脑组织含水量(%) = (湿重 - 干重)/湿重 × 100%。

2.2.3. 常规病理学染色

4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定 3d 脑组织样本。常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 做冠状石蜡切片, 片厚 5 μm, 行常规苏木素 - 伊红染色, 于镜下观察、拍照记录结果。

2.2.4. RT-PCR 检测脑组织

AQP4 mRNA 表达变化: 按 Trizol 试剂说明提取正常组和缺氧水肿组细胞总 RNA, 采用逆转录试剂盒按操作说明逆转录为 cDNA。反应体系 50 μl, PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 8 min; 94℃ 变性 1 min, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共循环 28 次, 最后 72℃ 再延伸 10 min。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像分析系统检测各扩增条带的光密度值, 以同一样品目的基因扩增带的光密度与 β-actin 扩增带的光密度值计算出 RT-PCR 终产物的相对含量。

2.2.5. 免疫组化检测脑组织 AQP4 蛋白表达分布

按照免疫组化试剂盒使用说明, 组织切片 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 封闭用正常山羊血清工作液, 室温静置 20 min; 加入一抗(Rabbit Anti-AQP4), 4℃ 过夜后, 37℃ 复温 45 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加试剂 B (生物素化山羊抗兔二抗工作液), 37℃ 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加试剂 C (辣根酶标记链酶卵白素工作液), DAB 显色试剂盒显色 5~10 min, 自来水浸洗 15 min, 如上法常规脱水、透明、封片, 于镜下观察、拍照记录结果。

2.2.6. Western Blot 检测脑组织 AQP4 蛋白表达变化

取 -80℃ 冰冻脑组织解冻, 以适当比例 RIPA 蛋白裂解液于冰浴的玻璃匀浆器中研磨, 制得 10% 组织匀浆, 放入 4℃ 低温离心机中 3000 r/min, 离心 5 min, 取上清, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。采用化学发光显影定影, 图象处理系统分析目标条带的光密度值。

2.2.7. UC-MSCs 的获取及移植

脐带获取后常规消毒, 生理盐水反复冲洗, 以去除脐带内的红细胞。然后去除脐带表皮以及脐带内部的血管(2 条动脉和 1 条静脉), 留取华通氏胶。将华通氏胶剪碎, 冲洗、离心、培养, 约 10 d 后有较多的 UCMSCs 从华通氏胶组织块周围爬出。选取形态规则、活力旺盛的第 3 代 UCMSCs 用于后续实验。干预治疗组将 1×10^6 个 UC-MSCs 经尾静脉注射(分两次注射)。

2.2.8. 统计学处理

实验数据均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组之间均数的比较采用单因素方差分析。数据使用 EXCEL 统计软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3. 结果

3.1. 脑组织含水量

与对照组相比, 缺氧水肿组脑组织含水量明显增加, 差异具有统计学意义($P < 0.05$) (见表 1)。

Table 1. The content of water in brain (%), $\bar{x} \pm s$, $n=8$

表 1. 脑组织含水量(%), $\bar{x} \pm s$, $n=8$

	对照组	UC-MSCs	缺氧水肿组
脑组织	76.82 ± 0.95	75.99 ± 0.95	80.66 ± 1.38*
肺组织	78.11 ± 0.76	78.05 ± 0.95	80.63 ± 1.10*

*VS 对照组 $P < 0.05$ 。

3.2. RT-PCR 检测脑组织 AQP4 mRNA 表达变化

与对照组比较, 模型组 AQP4 mRNA 表达明显升高, 差异具有显著性($P < 0.05$); 干细胞组的 AQP4 mRNA 表达较模型组明显下降, 差异具有显著性($P < 0.05$) (见表 2)。

Table 2. The expression of AQP4 in each group (Mean ± SD)

表 2. 各组大鼠 AQP4 表达水平(Mean ± SD)

组别	<i>n</i>	AQP4mRNA	AQP4
对照组	8	0.32 ± 0.018	0.29 ± 0.009
模型组	8	0.46 ± 0.088 ^a	0.48 ± 0.016 ^a
干细胞组	8	0.35 ± 0.108 ^b	0.33 ± 0.104 ^b

注: AQP4, 水通道蛋白 4, ^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.01$ 。

3.3. Western Blot 检测脑组织 AQP4 蛋白表达变化

与对照组比较, 模型组 AQP4 蛋白表达明显升高, 差异具有显著性($P < 0.05$); 干细胞组的 AQP4 表达较模型组明显下降, 差异具有显著性($P < 0.05$) (见表 2)。

4. 讨论

水通道蛋白(Aquaporin, AQP)是一组构成水通道与水通透有关的细胞膜转运蛋白, 广泛分布于动物、植物和微生物的细胞膜。迄今为止, 已从哺乳动物组织中分离克隆出 11 种 AQP。分布于中枢神经系统的水通道蛋白主要为 AQP4 和 AQP1, 其中尤以 AQP4 分布最为广泛, AQP4 具有高度快速转运水的能力, 比其它的水通道蛋白对水的通透性高 3~4 倍, 在脑内水电解质平衡的调节上发挥着重要作用[1] [2]。

通过研究发现, AQP4 在脑创伤、脑肿瘤及脑出血继发脑水肿的形成过程中发挥了重要作用。Manley [3]等用两个实验直接验证了 AQP4 参与了细胞毒性脑水肿的形成: 一个为低钠血症诱导的急性水中毒, 另一个为局部缺血性脑卒中。两个实验均显示 AQP4 基因敲除大鼠比野生型鼠更易存活, 其脑水肿程度明显减轻, 尤其是在星形胶质细胞突触处; 而且 AQP4 基因敲除大鼠组的神经病理症状轻, 临床结局明显改善。Kiening [4] [5] [6] [7] [8]等对大鼠局灶性脑损伤后脑水肿形成与 AQP4 的表达、皮质的血流灌注关系进行了研究, 发现脑水肿在 24 h 达高峰, 同时双侧的大脑半球的 AQP4 蛋白的表达均降低, 但伤后 48 h 伤侧降低更明显, 而皮质的血流灌注在伤后 4~8 h 降低后。于 24 h 恢复正常。AQP4 蛋白的表达下降与脑水肿的发展同步进行, 反映了机体内在的防御机制, 有利于减轻胶质细胞的水肿。Sun [5]等发现,

自由落体致大鼠脑损伤 24 h 后, 损伤区脑水肿程度最显著, AQP4 的表达在损伤区肿胀的星形胶质细胞上明显上调, 在周边邻近区下调, 在远处无明显变化, 因此认为 AQP4 的上调可能是引起损伤区脑水肿的主要途径和原因。

Hiroyuki 等[6]对比高血压脑出血倾向组和正常组的大鼠, 发现 AQP-4 与血脑屏障功能的完整性密切相关, 血脑屏障功能损伤时周围终足细胞内的 AQP-4 高表达, 血肿周围 AQP-4 在脑出血后 12 h 表达开始增强, 1~3 d 达到高峰, 7 d 后略高于正常, 14 d 基本恢复正常。Hiroaki 等[7]发现, AQP-4 还参与了脑出血后期(3 d 后)细胞毒性脑水肿的形成, 可能是胶质细胞及细胞间隙多种离子浓度改变、渗透压升高而激活了第一信使, 继而活化了胶质细胞蛋白激酶 A, 使 AQP-4 磷酸化, 增加胞膜对水的通透性, 导致细胞内水肿。Qing 等[8]对脑出血后脑水肿大鼠模型第 1、3、7、14 天大脑含水量、铁沉积量、脑出血病灶周围脑组织中 AQP-4 含量的进行检测, 发现 AQP-4 在大鼠脑内毛细血管周围的神经胶质细胞高表达, 在观察期间, 脑出血病灶周围脑组织中 AQP-4 的表达上调, 在脑出血后 3~7 d 达到最大值, 脑水含量的变化与 AQP4 含量的变化相关, 铁过载和 AQP-4 在脑出血后脑水肿中可能起着至关重要的作用。

UC-MSCs 的治疗作用可能既包括损伤细胞的替代作用, 又包括细干细胞代谢产物的“旁观者效应”。MSCs 所分泌的生物活性物质可在促进血管再生及血管生成、免疫调节方面发挥强大的作用[9] [10] [11] [12] [13]。MSCs 外泌体在调节靶细胞功能中发挥重要作用, 外泌体囊泡内含 MSCs 源 mRNA、微 RNA、酶等成分, 这些物质均参与受损组织的修复[14] [15]。

本实验通过模拟高原低氧环境, 光镜下观察, 缺氧 24 h 后, 细胞水肿较为明显, AQP4 mRNA 和蛋白的表达较对照组明显升高, 提示 AQP4 可能与高原脑水肿的形成密切相关, 通过上调 AQP4 蛋白表达, 促进脑水肿的发生发展。而 UC-MSCs 可逆转 AQP4 蛋白表达, 因此, 如果在脑水肿形成的前期应用 UC-MSCs 能够抑制 AQP4 活性或表达, 则可能减缓脑组织中水分子的聚集, 达到治疗高原脑水肿的目的, 有可能为高原脑水肿的预防和临床治疗提供一个新的方法。

基金项目

国家自然科学基金资助项目(编号: 81801240), 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(No. 2018-12M-AI-012)。

参考文献

- [1] Nico, B., Mangieri, D., Tamma, R., *et al.* (2009) Aquaporin-4 Contributes to the Resolution of Peritumoural Brain Oedema in Human Glioblastoma Multiforme after Combined Chemotherapy and Radiotherapy. *European Journal of Cancer*, **45**, 3315-3325. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.09.023>
- [2] Taya, K., Marmarou, C., Okuno, K., *et al.* (2010) Effect of Secondary Insults upon Aquaporin-4 Water Channels Following Experimental Cortical Contusion in Rats. *Journal of Neurotrauma*, **27**, 229-239. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.0933>
- [3] Manley, G.T., Fujimura, M., Ma, T., *et al.* (2000) Aquaporin-4 Deletion in Mice Reduces Brain Edema after Acute Water Intoxication and Ischemic Stroke. *Nature Medicine*, **6**, 159-163. <https://doi.org/10.1038/72256>
- [4] Kiening, K.L., Landeghem, F.K., Schreiber, S., *et al.* (2002) Decreased Hemispheric Aquaporin-4 Is Linked to Evolving Brain Edema Following Controlled Cortical Impact Injury in Rats. *Neuroscience Letters*, **324**, 105-108. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00180-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00180-5)
- [5] Sun, M.C., Honey, C.R., Berk, C., *et al.* (2003) Regulation of Aquaporin-4 in a Traumatic Brain Injury Model in Rats. *Journal of Neurosurgery*, **98**, 565-569. <https://doi.org/10.3171/jns.2003.98.3.0565>
- [6] Hiroyuki, I., Kumiko, T., Kensaku, D., *et al.* (2006) Expression of Glucose Transporter-1 and Aquaporin-4 in the Cerebral Cortex of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats in Relation to the Blood-Brain Barrier Function. *American Journal of Hypertension*, **19**, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2005.06.023>
- [7] Hiroaki, Y., Tani, K., Kamegawa, A., *et al.* (2006) Implications of the Aquaporin-4 Structure on Array Formation and Cell Adhesion. *Journal of Molecular Biology*, **355**, 628-639. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.081>

-
- [8] Qing, W.G., Dong, Y.Q., Ping, T.Q., *et al.* (2009) Brain Edema after Intracerebral Hemorrhage in Rats: The Role of Iron Overload and Aquaporin 4. *Journal of Neurosurgery*, **110**, 462-468. <https://doi.org/10.3171/2008.4.JNS17512>
- [9] Caplan, A.I. (1991) Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*, **9**, 641-650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- [10] He, H., Zhao, Z.H., Han, F.S., *et al.* (2016) Overexpression of Protein Kinase C ϵ Improves Retention and Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Rat Acute Myocardial Infarction. *Cell Death & Disease*, **7**, e2056. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.417>
- [11] 江基尧, 朱波, 罗其中. 颅脑创伤临床救治指南[M]. 第3版. 北京: 上海第二军医大学出版社, 2007: 1-241.
- [12] Lee, R.H., Pulin, A.A., Seo, M.J., *et al.* (2009) Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice Because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-Inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell*, **5**, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>
- [13] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., *et al.* (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, **284**, 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- [14] Mareschi, K., Biasin, E., Piacibello, W., *et al.* (2001) Isolation of Human Mesenchymal Stem Cells: Bone Marrow versus Umbilical Cord Blood. *Haematologica*, **86**, 1099-1100.
- [15] Li, J.P., Wang, D.W. and Song, Q.H. (2015) Transplantation of Erythropoietin Gene-Transfected Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells as a Treatment for Limb Ischemia in Rats. *Genetics and Molecular Research*, **14**, 19005-19015. <https://doi.org/10.4238/2015.December.29.8>