

脑出血后水蛭素干预对水通道蛋白 4 表达的影响

朱加应^{1,2}, 伍国锋, 刘伯仁², 张 谦²

(1. 贵州省人民医院急诊科, 贵州 贵阳 550002;

2. 贵阳医学院附属医院急诊科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 在脑出血后不同时段应用凝血酶抑制剂水蛭素干预, 观察其对脑水肿、水通道蛋白 4 (aquaporin-4, AQP4) 及其 mRNA 表达的影响。方法: 将 40 只健康雄性大鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 采用自体动脉血注入尾状核法制成大鼠脑出血模型, 其中 1 组作为对照组, 造模后不予水蛭素干预, 另 3 组分别于造模后 6 h、12 h、18 h 在血肿内注入水蛭素进行干预, 32 h 后提取脑组织, 应用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 AQP4 mRNA 在脑水肿组织的表达, 并采用 Western blot 和免疫组化检测 AQP4 蛋白在脑水肿组织中的表达, 同时用干重、湿重法计算脑组织含水量来表示脑水肿程度。结果: 与对照组相比, 凝血酶抑制剂水蛭素能减轻脑出血后脑组织的水肿程度, 并降低脑组织中 AQP4 mRNA 及 AQP4 蛋白的表达, 在 6 h 和 12 h 干预组中其抑制作用最为明显 ($P < 0.05$), 且 AQP4 mRNA 及 AQP4 蛋白的表达减少与脑水肿变化趋势一致。18 h 干预组的脑水肿程度、AQP4 mRNA 及 AQP4 蛋白的表达虽有低于对照组的趋势, 但差异无统计学意义。结论: 脑出血后, 凝血酶抑制剂水蛭素能减少脑组织水肿的程度、降低 AQP4 mRNA 和 AQP4 蛋白的表达, 水蛭素干预组中以 6 h 及 12 h 干预组的作用最为明显。

关键词: 脑出血; 凝血酶抑制剂/治疗应用; 水通道蛋白 4

中图分类号: R453.9 文献标识码: A 文章编号: 1671-2870(2009)05-0510-05

Effect of hirudin intervention on expression of aquaporin-4 after intracerebral hemorrhage ZHU Jia-ying^{1,2}, WU Guo-feng¹, LIU Bo-ren², ZHANG Qian². 1. Department of Emergency, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang Guizhou 550002, China; 2. Department of Emergency, Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang Guizhou 550004, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of thrombin inhibitor, hirudin, on brain edema and expression of aquaporin-4 (AQP4) after intracerebral hemorrhage. **Methods** Forty male Wistar rats were randomly divided to 4 groups. Self nonheparinized fresh blood was injected into nucleus caudate to construct intracerebral hemorrhage model. No intervention was transected in the control group, while in the other three groups hirudin solution was injected into the hematoma at 6, 12 and 18 h, respectively, as intervention. The brain tissue was taken at 32 h and the expressions of AQP4 mRNA and AQP4 protein were determined by RT-PCR and Western blot, respectively; the wet and dry weight of the brain tissue was determined to assess the degree of brain edema. **Results** Compared with the control group, thrombin inhibitor hirudin intervention ameliorated the brain edema and decreased the expression of AQP4 mRNA and AQP4 protein after intracerebral hemorrhage. This effect was most prominent in 6 h and 12 h intervention groups ($P < 0.05$). Although difference was also seen between control group and 18 h intervention group, yet it was not statistically significant. **Conclusions** Hirudin intervention could reduce the brain edema and suppress the expression of AQP4 mRNA and AQP4 protein in brain tissues after intracerebral hemorrhage, especially given within 6 h and 12 h after formation hematoma.

Key words: Cerebral hemorrhage; Thrombin inhibitor/therapy use; Aquaporin-4 protein

脑出血是严重威胁人类健康的疾病, 其发病急、进展迅速。脑出血造成死亡及严重后遗症的原因是发病后血肿占位效应导致高颅压、脑疝形成和继发性脑损害, 而脑水肿是其最严重的并发症。由于社会不断发展, 医疗条件不断改善, 大部分脑出血患者可得到及时救治, 如通过手术、微创颅内血肿清除术等手段早期清除血肿、减少压迫。但目前

通讯作者: 伍国锋 E-mail: zhujiy321@163.com

对于继发性脑损伤, 临床治疗尚无有效措施, 脑水肿的发生机制亦尚未完全阐明。近年发现凝血酶、水通道蛋白 4 (aquaporin-4, AQP4) 等在脑水肿的形成中起重要作用, 且许多研究已证实脑水肿程度与 AQP4 蛋白的表达成正相关。本研究在大鼠脑出血后不同时间段应用凝血酶抑制剂水蛭素, 观察 AQP4 mRNA 和 AQP4 蛋白表达的变化, 为探讨水蛭素治疗脑水肿的机制及临床应用时间窗提供理

论依据。

资料与方法

一、资料

Wistar 大鼠由贵阳医学院实验动物中心提供。水蛭素购自天津泰德生物制品有限公司, Trizol 试剂和 Superscript 反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司, PCR 扩增试剂盒购自 Promega 公司, SDS 蛋白上样缓冲液购自上海生工生物工程有限公司, BCA 法蛋白浓度测定试剂盒购自 Pierce 公司, 兔抗人多克隆抗体 AQP4、GAPDH 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司, 蛋白分子量标记物和 ECL 蛋白印迹发光试剂盒购自 Amersham Bioscience 公司, PVDF 膜购自 Millipore 公司, 免疫组化试剂盒购自 GeneTech Co., DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

二、方法

1. 动物分组: 选择健康雄性大鼠 40 只 8 周龄, SCHK(黔)2002-0001, 体重 350~450 g, 将其随机分为 4 组, 每组 10 只。1 组为对照组, 造模后不予水蛭素干预, 另 3 组为水蛭素干预组, 即分别在大鼠造模后 6 h、12 h、18 h 于尾状核血肿内注入含 15 U 水蛭素药液 4 μ L。

2. 大鼠脑出血模型的建立: 用 10%水合氯醛腹腔麻醉大鼠(0.035 mL/kg), 将其固定在立体定位仪上, 头顶正中切口, 暴露前囟, 于前囟前 0.2 mm、中线向右旁 3 mm 处钻 1 个直径为 1 mm 进针孔, 用固定于立体定位仪上的微量加样器沿进针孔进针, 进针深度为 6 mm(即尾状核位置), 将 50 μ L 自体血(剪断尾部收集)以 5 μ L/min 的速度注入大鼠右侧尾状核, 留针 4 min 后缓慢退出。缝合切口, 术毕将大鼠放回笼中, 自由活动、进食。

3. 大鼠脑组织水肿的检测: 4 组大鼠均于造模后 32 h 开胸, 于心脏灌注生理盐水后断头取脑组织。电子天平分别称重脑组织的湿重后再将脑组织块置于 100 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤 24 h 至完全干燥, 再称其干重。利用公式 [脑组织含水量=(湿重-干重)/湿重 \times 100%] 计算出脑组织含水量。

4. 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 AQP4 mRNA 在大鼠脑组织中的表达: 用 Trizol 试剂提取脑组织中的 RNA, 然后利用 Superscript 反转录试剂盒将 RNA 转换为 cDNA。引物用 Primer 5 程序设计, 由上海生工生物工程有限公司合成, 序

列如下。 β -actin 引物为 5'-GCCAGCTCACCATGG ATGAT-3' (正义)、5'-AGAAGGTGTGGTGCCAGAT-3' (反义); AQP4 引物为 5'-GTCTTTCCCTTCTT CTCCTCTCC-3' (正义)、5'-TGCATTACATTTGT TGTGC-3' (反义)。PCR 反应体系(25 μ L)包含 10 \times 缓冲液 2.5 μ L, Mg_2^+ 1.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, Primer 1(300 ng/ μ L)0.5 μ L, Primer 2(300 ng/ μ L) 0.5 μ L, Taq (5 U/ μ L) 0.125 μ L, 模板 1 μ L, H_2O 18.375 μ L。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s、62 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。每组实验重复 3 次。PCR 产物用 12%琼脂糖凝胶电泳, 电压为 80 V, 时间为 30 min。用 Bio-Rad 图像分析系统照相, 用 Quantity One 软件分析, 以目的产物吸光度(A)值/GADPH A 值的比值表示最终结果。

5. Western blot 检测 AQP4 蛋白在大鼠脑组织中的表达: 脑组织匀浆后, 取 100 mg 加入 100 mL 的 1 \times SDS 凝胶加样液, 按 BCA 试剂盒方法测蛋白浓度。配制 12%聚丙烯酰胺分离胶及 5%积层胶, 取总蛋白 100 μ g 变性后加样, 在 120 V 条件下加样, 电泳 2 h, 电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸。在 180 mV、4 $^{\circ}$ C 下电转膜 1.5 h, 将硝酸纤维素膜置于 37 $^{\circ}$ C 封闭液中 2 h[含有 5%牛血清白蛋白(BSA)], 洗膜后加入 AQP4 兔抗人多克隆抗体 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 再分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:2 000), 用 ECL 法显色。

6. 免疫组化检测 AQP4 蛋白在大鼠脑组织中的表达: 采用免疫组化 SP 法, 检测步骤按试剂盒说明进行。载玻片防脱片处理后, 组织经 6 μ m 厚连续切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 予 3%过氧化氢室温下处理 5~10 min, 以阻断内源性过氧化物酶, 经磷酸缓冲液(PBS)(pH 7.2)振荡洗涤后置 0.01%柠檬酸(pH 6.0)中, 微波修复抗原 20 min, 滴加 5% BSA 封闭 20 min。玻片甩干后直接滴加一抗 AQP4(1:200), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 滴加生物素标记的二抗在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 min, 用 PBS 洗涤 3 次; 滴加试剂抗生物素-生物素-过氧化物酶复合物(avidin-biotin-peroxidase Complex, ABC), 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 20 min, PBS 洗涤 4 次, 二氨基联苯胺显色, 蒸馏水洗涤, 苏木精复染、脱水、透明、封片。在显微镜下读片并摄影, 应用美国 Image-Pro Plus 图像分析软件计数分析。每张切片用 0.01 mol/L PBS 代替一抗作为空白对照。免疫组化结果判定标准为观察棕黄或棕褐色颗粒的分布情况, 有棕黄或棕褐色颗粒且强

度高于背景的非特异性着色细胞为阳性,细胞内无棕黄或棕褐色颗粒为阴性细胞。

三、统计学处理

采用美国 SAS 6.12 软件进行数据分析, 计算均数用 Means 过程, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用方差分析(ANOVA)。

结 果

一、脑组织含水量的变化

6 h 干预组及 12 h 干预组大鼠脑组织中的含水量明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 18 h 干预组大鼠脑组织中的含水量较对照组有降低的趋势, 但差异尚无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。

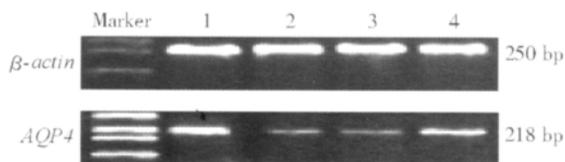
表 1 脑组织含水量 (%)

组别	脑组织含水量 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	78.33058 ± 0.01011
6 h 干预组	76.62401 ± 0.00591 ¹⁾
12 h 干预组	77.21002 ± 0.00756 ¹⁾
18 h 干预组	78.21028 ± 0.00449

1) 与对照组相比, $P < 0.05$

二、AQP4 mRNA 在大鼠脑组织中的表达

RT-PCR 结果显示, AQP4 mRNA 在 6 h、12 h 干预组大鼠脑组织中的表达明显低于对照组 ($P < 0.01$), 18 h 干预组大鼠脑组织中 AQP4 mRNA 表达明显高于 6 h 及 12 h 干预组 ($P < 0.05$), 6 h 干预组与 12 h 干预组大鼠脑组织中的 AQP4 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 1 和表 2)。



1: 对照组; 2: 6 h 干预组; 3: 12 h 干预组; 4: 18 h 干预组

图 1 RT-PCR 检测水蛭素对 AQP4 mRNA 表达的影响

表 2 AQP4 mRNA 在大鼠脑组织中的相对表达量

组别	AQP4 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	1.0000 ± 0.07864
6 h 干预组	0.2133 ± 0.01149 ¹⁾
12 h 干预组	0.2347 ± 0.02943 ¹⁾
18 h 干预组	0.7625 ± 0.06487

1) 与对照组比较, $P < 0.01$

三、Western blot 检测 AQP4 蛋白在大鼠脑组织中的表达

Western blot 结果显示, 与对照组相比, 水蛭素

干预后, 6 h 及 12 h 干预组大鼠脑组织中 AQP4 蛋白的表达明显低于对照组 ($P < 0.05$), 18 h 组 AQP4 蛋白表达略有减少, 但明显高于 6 h 及 12 h 干预组。6 h 干预组与 12 h 干预组间 AQP4 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 2、3 和表 3)。

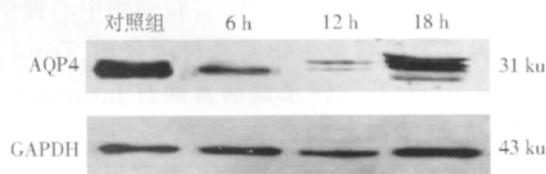


图 2 Western blot 检测水蛭素对 AQP4 蛋白表达的影响

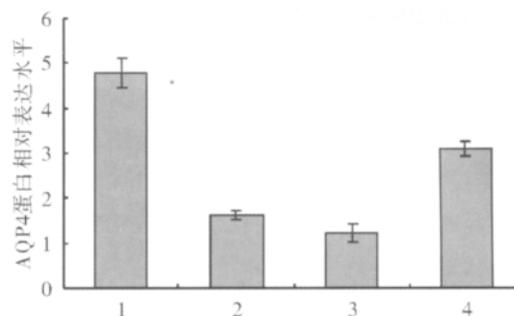


图 3 AQP4 蛋白在脑组织中的相对表达量

表 3 AQP4 蛋白在大鼠脑组织中的相对表达量

组别	AQP4 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	4.78600 ± 0.33980
6 h 干预组	1.61300 ± 0.10460 ¹⁾
12 h 干预组	1.23200 ± 0.20100 ¹⁾
18 h 干预组	3.11400 ± 0.16480

1) 与对照组比较, $P < 0.05$

四、免疫组化检测 AQP4 蛋白在大鼠脑组织中的表达

免疫组化检测显示, AQP4 蛋白在脑水肿组织中的表达结果如下 (见表 4、图 4)。经 Image-Pro Plus 软件分析, 6 h 干预组大鼠脑组织中 AQP4 蛋白表达量为 22.7 ± 10.6 , 12 h 干预组为 34.5 ± 12.9 , 18 h 干预组为 46.5 ± 16.7 , 对照组为 64.5 ± 19.8 。水蛭素可抑制 AQP4 蛋白在脑水肿组织中的表达 ($P < 0.05$), 并在 6 h、12 h 和 18 h 干预组中显示干预的时间越早其抑制脑水肿的效果越明显。

表 4 AQP4 蛋白在大鼠脑组织中的相对表达量

组别	AQP4 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)
对照组	64.5 ± 19.8
6 h 干预组	22.7 ± 10.6 ¹⁾
12 h 干预组	34.5 ± 12.9 ¹⁾
18 h 干预组	46.5 ± 16.7

1) 与对照组比较, $P < 0.05$

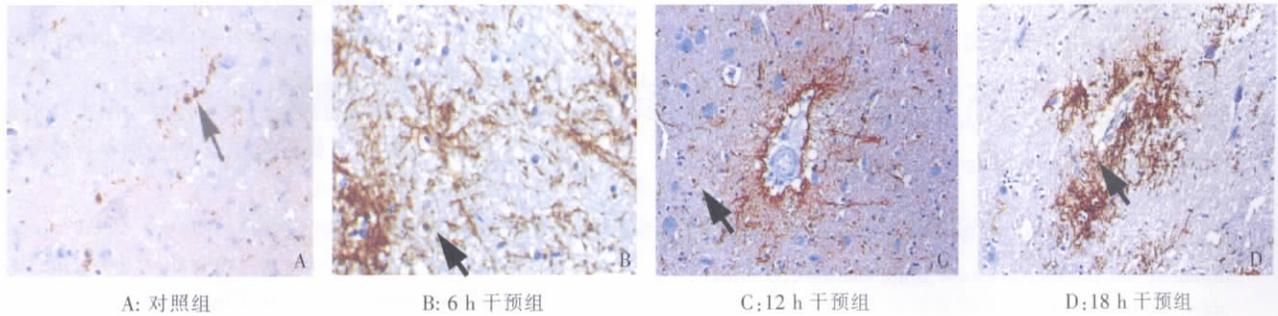


图 4 免疫组化显示水蛭素干预后大鼠脑组织中 AQP4 蛋白的表达 (DAB 显色×400)

讨 论

一、AQP 在脑组织中的表达及作用

脑出血后神经功能恶化的最重要原因是脑水肿形成、血肿周边神经细胞和轴突的损害及血肿扩大，其中脑水肿是患者病情恶化和死亡的主要原因。研究表明，血凝块产生的凝血酶在脑出血后脑水肿的形成中起重要作用^[1-8]，而凝血酶抑制剂水蛭素可抑制凝血酶诱发的脑水肿。

目前对于脑水肿的发生机制尚不完全清楚。近年研究认为，AQP4 在脑水肿的发生中起重要作用，而其表达增加是加重脑水肿的重要环节^[9-16]。

AQP4 是一种膜蛋白，广泛分布于机体的不同组织器官中，介导不同类型细胞膜的跨膜水转运^[17]。目前人们已从哺乳动物组织中鉴定出 10 种水通道蛋白^[18]，其中 AQP4 是脑组织中含最多、分布最广的水通道蛋白，其是由 4 个独立的、具有活性的亚基单位组成的异四聚体结构。AQP4 在脑内主要分布于星形胶质细胞、脑表面的软脑膜、脑室系统的室管膜、脉络丛、下丘脑的视上核和室旁核，特别是在靠近蛛网膜下腔位于血管周围的星形胶质细胞表面，尤其是星形胶质细胞的终足紧密包绕毛细血管壁形成的一层胶质界膜上有 AQP4 高表达，此界膜构成血脑屏障的第 2 道隔膜，故 AQP4 可能在脑内的水调节中发挥重要作用^[19-20]。

AQP4 在颅内出血后脑水肿组织中的表达是 1 个动态变化过程，脑出血后 6 h，血肿周围组织 AQP4 蛋白表达明显增强，于出血后第 3 天达到高峰，以后逐渐回落，但仍高于对照组，这与临床上脑出血患者病情多在 2~3 d 内恶化相一致，提示 AQP4 参与脑出血后脑水肿的损伤过程^[21-22]，且 Manley 等^[23]在敲除 AQP4 基因的小鼠上进行水中毒实验，结果显示敲除 AQP4 基因的小鼠其脑出血后脑组织内

水含量及星形胶质细胞周围毛细血管水肿明显较轻，成活率要高于对照组。Vajda 等^[24]在缺乏肌营养蛋白的肌营养不良小鼠上进行水中毒实验，结果亦发现该小鼠脑水肿形成具有延缓表现，究其原因可能是由于其脑内 AQP4 水平下降和 AQP4 不能正常定位在细胞膜上而丧失了相应的生物学活性，该结果证实了 AQP4 蛋白表达的增加是引起脑水肿程度加重的原因，而凝血酶是否是经上调 AQP4 的表达而加重脑水肿则仍有待证实。

二、本研究结果分析

本研究通过水蛭素干预阻断凝血酶的作用后，采用 RT-PCR 检测 AQP4 mRNA 在脑水肿组织中的表达及 Western blot、免疫组化检测 AQP4 蛋白在脑水肿组织中的表达，结果显示 6 h、12 h 水蛭素干预组 AQP4 mRNA 和相应蛋白的表达均减少，且与脑水肿的减轻程度呈正相关。由此推断，凝血酶可能通过某种途径上调 AQP4 mRNA 的表达，使 AQP4 蛋白的表达增加，而 AQP4 通过增加水的转运加重脑水肿的发生，水蛭素能阻断该过程从而减轻脑水肿的发生。

本研究中于脑出血大鼠模型造模后 6 h、12 h、18 h 采用水蛭素干预后能减轻脑水肿的程度，与其他学者的研究结果一致，但既往尚无相关水蛭素干预有效时间窗的研究。

本研究中 6 h、12 h、18 h 水蛭素干预组大鼠的脑组织含水量、AQP4 mRNA 及 AQP4 蛋白的表达量均低于对照组，其中 6 h 和 12 h 干预组表现明显，其大鼠脑组织含水量、AQP4 mRNA 及 AQP4 蛋白表达量与对照组间存在显著差异，而 6 h 与 12 h 干预组间比较，差异则无统计学意义，18 h 干预组与对照组间差异亦无统计学意义，提示在 12 h 内进行水蛭素干预能有效减轻脑水肿的发生。本结果为临床采用水蛭素治疗脑水肿时间窗提供了依据。

[参考文献]

- [1] Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage[J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5 (1) :53-63 .
- [2] Nakamura T, Xi G, Park JW, et al. Holo-transferrin and thrombin can interact to cause brain damage[J]. *Stroke*, 2005, 36(2):348-352.
- [3] Matsuoka H, Hamada R. Role of thrombin in CNS damage associated with intracerebral haemorrhage: opportunity for pharmacological intervention? [J]. *CNS Drugs*, 2002, 16 (8) :509-516.
- [4] Xi G, Reiser G, Keep RF. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? [J]. *J Neurochem*, 2003, 84(1):3-9.
- [5] Lee KR, Kawai N, Kim S, et al. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model[J]. *J Neurosurg*, 1997, 86(2): 272-278.
- [6] Figueroa BE, Keep RF, Betz AL, et al. Plasminogen activators potentiate thrombin-induced brain injury[J]. *Stroke*, 1998, 29(6):1202-1207.
- [7] Lee KR, Colon GP, Betz AL, et al. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin [J]. *J Neurosurg*, 1996, 84 (1): 91-96.
- [8] Hua Y, Keep RF, Hoff JT, et al. Thrombin preconditioning attenuates brain edema induced by erythrocytes and iron [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(12): 1448-1454.
- [9] Matsuoka H, Hamada R. Role of thrombin in CNS damage associated with intracerebral haemorrhage: opportunity for pharmacological intervention? [J]. *CNS Drugs*, 2002, 16(8): 509-516.
- [10] Bartha K, Dömötör E, Lanza F, et al. Identification of thrombin receptors in rat brain capillary endothelial cells [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(1): 175-182.
- [11] Lee KR, Kawai N, Kim S, et al. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model[J]. *J Neurosurg*, 1997, 86(2): 272-278.
- [12] Wang H, Reiser G. Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors[J]. *Biol Chem*, 2003, 384 (2) :193-202.
- [13] 刘佳,王建平.大鼠实验性脑出血后血肿周围水通道蛋白-4 动态变化的动态研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*,2006,33 (1) :5-8.
- [14] Lu H, Sun SQ. A correlative study between AQP4 expression and the manifestation of DWI after the acute ischemic brain edema in rats[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2003, 116(7) :1063-1069.
- [15] Aoki K, Uchihara T, Tsuchiya K, et al. Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction [J]. *Acta Neuropathol*,2003, 106(2):121-124.
- [16] Zelenina M, Zelenin S, Bondar AA, et al. Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*,2002, 283 (2):F309-F318.
- [17] Papadopoulos MC, Krishna S, Verkman AS. Aquaporin water channels and brain edema [J]. *Mt Sinai J Med*, 2002, 69 (4): 242-248.
- [18] Beitz E, Schultz JE. The mammalian aquaporin water channel family: A promising new drug target [J]. *Curr Med Chem*, 1999, 6 (6): 457-467.
- [19] King LS, Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels [J]. *Annu Rev Physiol*, 1996, 58:619-648
- [20] Venero JL, Vizuete ML, Machado A, et al. Aquaporins in the central nervous system [J]. *Prog Neurobiol*, 2001,63(3): 321-336.
- [21] 柯绍发,张可浩,蔡菊芳,等.急性脑出血后灶周脑组织水通道蛋白-4 的表达[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2007, (4):27-28.
- [22] 滕伟禹,田力,刘宏丽,等.水蛭素、尼膜同对大鼠实验性脑出血后 AQP4mRNA 表达及脑水肿的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2006,(09): 1290-1293.
- [23] Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke [J]. *Nat Med*, 2000, 6 (2): 159-163.
- [24] Vajda Z, Pedersen M, Füchtbauer EM, et al. Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20):13131-13136.

(收稿日期:2009-03-03)

(本文编辑:张宁)