

颅脑创伤模型小鼠海马水通道蛋白 1 表达及作用

仇波 李心国 王勇 王军 王运杰

【摘要】 研究背景 颅脑创伤后继发性脑损伤包括脑组织缺血、缺氧和脑水肿,可进一步加重原发性损伤,影响预后。作为选择性易损区,海马对缺血和水肿尤为敏感,易出现不可逆性损伤。水通道蛋白 1(AQP1)与脑水肿的发生关系密切,但迄今尚无颅脑创伤后海马 AQP1 表达变化及其相关作用的报道。本研究采用闭合性颅脑创伤小鼠模型对海马水肿过程进行观察,以探讨 AQP1 在相关病理生理学过程中的作用机制。**方法** 采用改良自由落体法建立 BALB/c 系小鼠闭合性颅脑创伤模型,于创伤后不同观察时间点(1、6、24 和 72 h)进行神经功能缺损程度评价和脑组织含水量测定,并通过 TUNEL 法观察海马神经元凋亡率、免疫组织化学染色和 Western blotting 法检测 AQP1 表达变化。**结果** 成功制备闭合性颅脑创伤小鼠模型,并经神经功能评价和脑组织含水量测定证实存在重型颅脑创伤和脑水肿。TUNEL 检测显示,模型组小鼠伤后 6 h 海马神经元凋亡率即升高[(44.26 ± 15.18)%对(8.61 ± 8.25)%; $t = -9.676, P = 0.002$],至 72 h 达峰值水平[(61.62 ± 26.55)%对(10.17 ± 6.08)%; $t = -5.018, P = 0.015$];免疫组织化学染色和 Western blotting 法观察,模型组小鼠创伤后各观察时间点海马 AQP1 表达水平均高于假手术组($P < 0.05$),以伤后 24 h 表达水平最高(0.69 ± 0.32 对 0.15 ± 0.07, $t = -4.335, P = 0.023$; 0.46 ± 0.19 对 0.14 ± 0.04, $t = -4.113, P = 0.004$)。**结论** 颅脑创伤后小鼠海马 AQP1 表达上调可能参与了脑水肿和迟发性神经元凋亡等病理生理学过程, AQP1 可能成为继发性脑损伤机制研究的新靶点。

【关键词】 脑损伤; 水孔蛋白质类; 海马; 脑水肿; 细胞凋亡; 免疫组织化学; 免疫印迹法; 疾病模型, 动物

Expression and roles of aquaporin 1 in hippocampus of mice model with traumatic brain injury

QIU Bo, LI Xin-guo, WANG Yong, WANG Jun, WANG Yun-jie

Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

Corresponding author: QIU Bo (Email: bo_qiu@msn.com)

【Abstract】 **Background** The "secondary brain insult" including ischemia, hypoxia and edema after primary traumatic brain injury (TBI) may deteriorate the brain damages and greatly influence the prognosis. As a selective vulnerable region, the hippocampus is especially sensitive to ischemia, hypoxia or edema and yields irreversible sequelae. Aquaporin 1 (AQP1) has been reported to be related to cerebral edema, but the expression and role of AQP1 in hippocampal edema after TBI have seldomly been investigated. In this study, we established BALB/c mouse closed craniocerebral injury models and investigated the changes of AQP1 expression in hippocampus of mouse models after TBI, thereby discussing its effects on relevant pathophysiological processes. **Methods** Seventy-five BALB/c mice were used to establish experimental closed TBI models with a free-falling weight drop device, and the equal numbers of mice were subject to sham operation and categorized as sham group. The neurological function of each mouse in either TBI group or sham group was scored at different time points (1, 6, 24 and 72 h) after TBI or sham operation, and brain edema formation of the mice in both groups was also evaluated accordingly at

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2014.03.016

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:31100770);辽宁省自然科学基金资助项目(项目编号:2013021075)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院神经外科

通讯作者:仇波(Email:bo_qiu@msn.com)

6, 24 and 72 h. The apoptotic hippocampal cells were stained in situ and detected using TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method at different time points (6, 24 and 72 h), then AQP1 expression in hippocampus was also correspondingly detected using immunohistochemistry and Western blotting. All the data were finally compared with those in sham operation group and analyzed. **Results** Experimental TBI models were successfully established and confirmed by the neurological function score and hippocampal edema evaluation. Six hours after craniocerebral injury, the apoptotic cells increased significantly in the hippocampus of mice in TBI group compared with those in sham group [(44.26 ± 15.18)% vs (8.61 ± 8.25)%, $t = -9.676$, $P = 0.002$]. The apoptotic rate increased gradually with the prolonging of time and was highest at 72 h [(61.62 ± 26.55)% vs (10.17 ± 6.08)%; $t = -5.018$, $P = 0.015$]. Determined at different time points by immunohistochemistry and Western blotting assays, the AQP1 expression in mouse hippocampus was constantly higher in TBI group than in sham group ($P < 0.05$), and reached the peak at 24 h (0.69 ± 0.32 vs 0.15 ± 0.07 , $t = -4.335$, $P = 0.023$ and 0.46 ± 0.19 vs 0.14 ± 0.04 , $t = -4.113$, $P = 0.004$, respectively). **Conclusions** The up-regulation of AQP1 in mouse hippocampus after TBI perhaps participates in edema formation and delayed apoptosis of hippocampus, and AQP1 may be a new therapeutic target to protect hippocampus from secondary injury after TBI.

【Key words】 Brain injuries; Aquaporins; Hippocampus; Brain edema; Apoptosis; Immunohistochemistry; Immunoblotting; Disease models, animal

This study was supported by Program of National Natural Science Fund for Youth Scientist (No. 31100770) and Liaoning Provincial Natural Science Foundation (No. 2013021075).

颅脑创伤(TBI)是严重威胁人类生命安全的疾病之一。原发性创伤后幸存的患者,病死率或病残率在很大程度上取决于继发性脑损伤之进展程度,尤其是继发性脑组织缺血、缺氧和脑水肿^[1-5]。海马组织对创伤性脑缺血、缺氧和脑水肿极为敏感,可导致神经元凋亡,引起认知功能障碍,进而影响患者生活质量^[6-8]。作为水通道蛋白(AQPs)家族中的重要成员,水通道蛋白1(AQP1)与创伤后脑组织缺血、缺氧和脑水肿,以及伴随的神经元凋亡密切相关^[9-14],但目前对颅脑创伤后海马组织AQP1表达变化的研究较少。在本研究中,我们通过自由落体法复制闭合性颅脑创伤小鼠模型,观察创伤后小鼠海马神经元凋亡和AQP1表达变化,探讨其在创伤后继发性脑损伤中的病理作用。

材料与方法

一、实验材料

1. 试剂与仪器 (1)试剂:主要免疫试剂中I抗工作液[含兔抗小鼠AQP1(1:200, 1:500)和兔抗小鼠 β -肌动蛋白(β -actin, 1:500)单克隆抗体]和II抗工作液[含山羊抗兔IgG多克隆抗体(1:20, 1:500)]均购自美国Sigma-Aldrich公司, Histostain-SP kit免疫组织化学检测试剂盒[含非免疫血清(山羊)、质量分数为0.6%过氧化氢、辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉菌卵白素工作液、浓缩底物缓冲液等]及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自美国

Invitrogen公司。原位细胞凋亡检测试剂盒和聚偏二氟乙烯(PVDF)膜由美国Roche公司提供。(2)主要仪器:AUX220型电子天平购自日本岛津公司。RM2235旋转式组织切片机为德国Leica公司产品。5810R台式高速大容量离心机购自德国Eppendorf公司。Gel Doc XR System凝胶成像分析系统为美国Bio-Rad公司产品。BX40型光学显微镜由日本Olympus公司提供。

2. 动物来源与分组 选择健康清洁级BALB/c系雄性小鼠150只,周龄8~10周,体重20~25g,由中国医科大学实验动物部提供,于12h昼-12h夜,常温、避免异常声光刺激条件下单笼饲养1周后进入实验。采用简单随机化方法分为假手术组和颅脑创伤模型组(模型组),根据伤后不同观察时间点,将每组小鼠进一步分为6、24和72h共3个亚组,每亚组25只小鼠。

二、实验方法

1. 闭合性颅脑创伤小鼠模型制备 (1)操作方法:用改良自由落体法制备闭合性颅脑创伤小鼠模型^[4,15-16],打击装置由脑立体定向仪、垂直导管、下落砝码、顶端涂有聚乙烯的撞针(撞针底端直径3mm)组成。小鼠经异氟烷吸入麻醉后,头部固定于脑立体定向仪、消毒,沿中线切开头皮,分离至骨膜下显露颅骨,致伤部位以前、后囟门中点偏左1mm处为中心,质量为40g的砝码自25cm高度沿垂直导管自由下落,撞击撞针造成颅脑创伤。伤后予体积分

数为 95% 氧气 2 min, 缝合头皮, 充足水和食物喂养。假手术组仅切开头皮显露颅骨, 不实施撞击。(2) 神经功能评价: 采用改良神经功能缺损评分 (mNSS) 于伤后不同观察时间点 (1、6、24 和 72 h) 评价小鼠神经功能^[4, 15, 17], 其中评分 13~18 分者视为重型颅脑创伤模型制备成功, 纳入本研究。分别于假手术组和模型组各亚组随机选择 20 只小鼠进行脑组织含水量 (4 只)、免疫组织化学染色 (4 只)、细胞凋亡 (4 只) 和 Western blotting (8 只) 检测。

2. 脑组织含水量检测 于伤后不同观察时间点采集小鼠创伤侧海马组织进行含水量测定^[4]。以质量分数为 0.8% 戊巴比妥 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 冰上断头取脑、快速切取左侧海马组织, 滤纸吸尽表面血渍, 置已烤干并称重的锡纸上, 电子天平称湿重、95 °C 恒温干燥箱烘烤 24 h 后称干重, 计算脑组织含水量 [脑组织含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%]。

3. 海马神经元凋亡和 AQP1 表达水平检测

(1) 组织切片制备: 分别于伤后 6、24 和 72 h 以 0.8% 戊巴比妥 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉小鼠, 冰上断头取脑、快速切取左侧海马组织。以体积分数为 4% 多聚甲醛溶液固定 12 h、30% 蔗糖溶液沉淀, 乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 连续冠状切片, 层厚 8 μm, -80 °C 保存备用。(2) 原位细胞凋亡检测: 严格按试剂盒说明书, 层厚 8 μm 组织切片常规脱蜡至水, 室温下以体积分数为 3% 过氧化氢处理 10 min, 灭活外源性过氧化物酶, 微波辐射修复抗原, 滴加原位末端标记 (TUNEL) 反应液, 37 °C 孵育 1 h, 加入转化剂 POD, 37 °C 孵育 30 min, 清洗后滴加 50 μl DAB 显色液, 室温下反应 10 min, 脱水、透明、封片。光学显微镜下观察, 以胞核出现棕褐色颗粒为阳性。(3) 免疫组织化学染色: 组织切片常规脱蜡至水, 严格按照 Histostain-SP kit 免疫组织化学检测试剂盒说明书, 98 °C 柠檬酸盐溶液修复抗原 20 min, 质量分数为 5% Triton X-100 破膜, 质量分数为 3% 胎牛血清白蛋白非特异性封闭抗原, 滴加兔抗小鼠 AQP1 单克隆抗体 (1:200); 4 °C 冰箱过夜, 37 °C 孵育 40 min, 磷酸盐缓冲液冲洗后滴加山羊抗兔 IgG II 抗 (1:20); 再次冲洗后滴加辣根过氧化物酶标记的链霉菌卵白素工作液, DAB 显色, 复染、封片, 光学显微镜下观察。假手术组 I 抗以正常山羊血清代替。实验结果以相对光密度 (OD) 值表示, 采用

Image-Pro Plus 6.0 软件 (美国 Media Cybernetics 公司) 处理。(4) Western blotting 法: 不同处理组小鼠麻醉方法同前, 冰上断头取脑、切取左侧海马组织, 超声粉碎, 4 °C、1000 × g 离心 15 min, 取上清液, 采用考马斯亮蓝 G250 结合法检测样品中 AQP1 表达水平。等量蛋白样品经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 转至 PVDF 膜, 体积分数为 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h; 分别与兔抗小鼠 AQP1 (1:500) 和兔抗小鼠 β-肌动蛋白 (1:500) 单克隆 I 抗反应, 4 °C 孵育过夜, 与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG II 抗 (1:500) 室温孵育 1 h; 暗室内 ECL 反应, X 线胶片显影、定影, 凝胶成像分析系统采集并分析 OD 值表达变化。

三、统计分析方法

采用 SigmaPlot 11.1 统计软件对实验数据进行处理与分析。所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同观察时间点均数的比较采用单因素方差分析, 两两比较行 LSD-*t* 检验; 同一观察时间点的组间比较采用两独立样本均数的 *t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、创伤后小鼠神经功能评价

改良自由落体法制备闭合性颅脑创伤模型后, 模型组绝大部分 (73 只) 小鼠 mNSS 评分 13~18 分, 模型制备成功。模型组小鼠伤后不同观察时间点 (1、6、24 和 72 h) mNSS 评分分别为 15.32 ± 0.90 、 14.23 ± 1.08 、 11.23 ± 0.58 和 10.60 ± 0.82 ; 假手术组小鼠 mNSS 评分均为零。

假手术组小鼠 6、24 和 72 h 左侧海马组织含水量无明显变化 ($P = 0.632$); 模型组小鼠伤后 6 h 海马即出现明显水肿 ($P = 0.001$), 并于伤后 24 h 达峰值水平 ($P = 0.000$), 至伤后 72 h 仍维持在较高水平 ($P = 0.002$), 且与同一观察时间点假手术组比较差异有统计学意义 (均 $P > 0.05$, 表 1)。提示模型组小鼠伤后海马组织出现急性水肿改变。

二、创伤后海马神经元凋亡检测

TUNEL 法检测显示, 模型组小鼠创伤后不同观察时间点 (6、24 和 72 h) 海马神经元凋亡率呈逐渐升高之趋势, 至伤后 72 h 达到较高水平 ($P = 0.015$), 明显高于相应观察时间点的假手术组 (均 $P < 0.05$; 表 2, 图 1)。

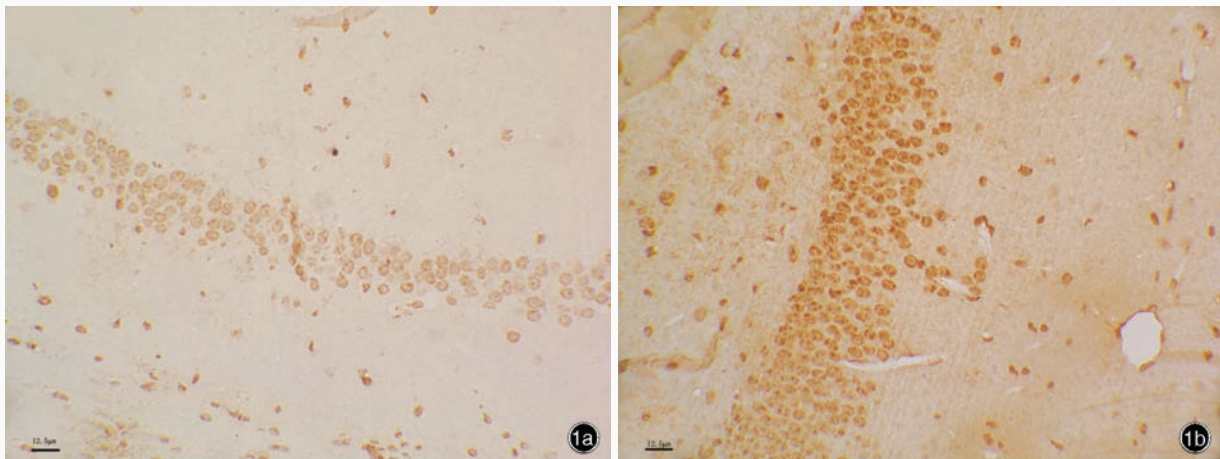
表1 模型组与假手术组小鼠不同观察时间点海马组织含水量的比较($\bar{x} \pm s, \%$)**Table 1.** Comparison of cerebral water contents in left hippocampus at different time points after TBI between 2 groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	N	6 h	24 h	72 h	F value	P value
Sham group	4	77.23 ± 0.46	77.51 ± 0.35	77.48 ± 0.51	0.483	0.632
TBI group	4	79.44 ± 0.36	81.28 ± 0.20	80.73 ± 0.34	37.595	0.000
t value		-12.069	-49.978	-10.602		
P value		0.001	0.000	0.002		

TBI, traumatic brain injury, 颅脑创伤。The same as tables below

表2 模型组与假手术组小鼠不同观察时间点海马神经元凋亡率的比较($\bar{x} \pm s, \%$)**Table 2.** Comparison of apoptotic rate of mouse hippocampal cells at different time points between 2 groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	N	6 h	24 h	72 h	F value	P value
Sham group	4	8.61 ± 8.25	7.55 ± 9.54	10.17 ± 6.08	0.106	0.900
TBI group	4	44.26 ± 15.18	53.35 ± 22.67	61.62 ± 26.55	0.624	0.557
t value		-9.676	-3.308	-5.018		
P value		0.002	0.000	0.015		

**图1** 光学显微镜观察不同处理组小鼠伤后72 h海马神经元凋亡变化 免疫组织化学染色(TUNEL法) ×200 1a 假手术组小鼠伤后72 h海马组织罕见凋亡神经元 1b 模型组小鼠伤后72 h海马组织凋亡神经元数目明显增加**Figure 1** Optical microscopy findings on the average apoptotic rate of hippocampal cells 72 h after TBI and sham operation. Immunohistochemical staining (TUNEL) ×200 Apoptotic cells were rarely seen in sham group (Panel 1a). Apoptotic cells increased obviously in TBI group (Panel 1b).

三、创伤后海马AQP1表达变化

1. 免疫组织化学染色 与假手术组相比,模型组小鼠伤后6 h海马AQP1表达水平即升高($P=0.025$),并于伤后24 h达峰值水平($P=0.023$),且持续至伤后72 h($P=0.030$;表3,图2)。

2. Western blotting法检测AQP1表达水平

Western blotting法显示,相对分子质量为 28×10^3 的电泳条带为非糖基化AQP1。模型组小鼠伤后6 h海马AQP1表达水平即升高,但与假手术组之间差异无统计学意义($P=0.074$);伤后24 h AQP1表达

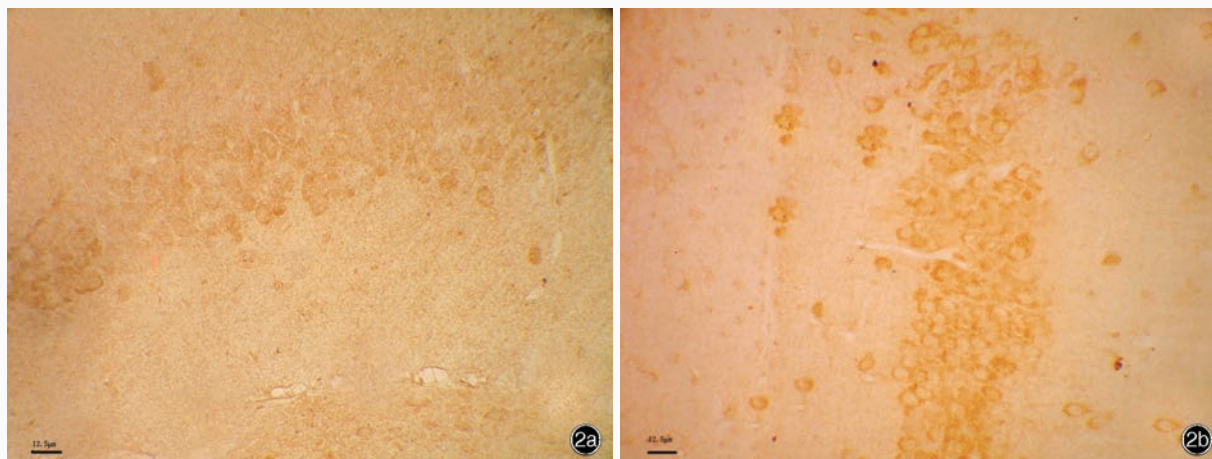
达峰值水平($P=0.004$);至伤后72 h降低,但仍高于同一时间点的假手术组($P=0.018$;表4,图3)。

讨 论

颅脑创伤后继发性脑组织缺血、缺氧和脑水肿包括一系列病理生理学变化,引起颅内压升高、细胞功能障碍等,但创伤后脑水肿的发生机制至今尚不十分清楚^[1,3,18-21]。目前认为,继发性脑水肿的主要类型是细胞毒性水肿,由于能量耗竭使细胞膜离子交换失衡,导致细胞肿胀,同时加重细胞功能障碍

表 3 模型组与假手术组小鼠不同观察时间点海马 AQP1 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, OD 值)**Table 3.** Comparison of AQP1 expression in mouse hippocampus at different time points between 2 groups ($\bar{x} \pm s$, OD value)

Group	N	6 h	24 h	72 h	F value	P value
Sham group	4	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.07	0.14 ± 0.04	0.087	0.917
TBI group	4	0.25 ± 0.06	0.69 ± 0.32	0.51 ± 0.22	3.825	0.063
t value		-4.184	-4.335	-3.900		
P value		0.025	0.023	0.030		

**图 2** 光学显微镜观察不同处理组小鼠伤后海马 AQP1 表达变化 免疫组织化学染色(SP 二步法) ×200 2a 假手术组小鼠伤后 72 h 海马 AQP1 表达维持在较低水平 2b 模型组小鼠伤后 72 h 海马 AQP1 表达水平显著升高**Figure 2** The AQP1 expression of hippocampus was observed under optical microscope 72 h after TBI and sham operation. Immunohistochemical staining (SP) ×200 AQP1 was expressed at uniformly low level in mouse hippocampus of sham group (Panel 2a). AQP1 expression increased significantly in mouse hippocampus of TBI group (Panel 2b).

碍,进一步加重脑水肿程度^[22-25]。近年研究发现,水通道蛋白与颅脑创伤和脑组织缺血、缺氧后的脑水肿密切相关,因此成为目前研究脑水肿分子机制的热点^[10-13,17,21,26-33]。AQP1 是最早发现的水通道蛋白亚型,目前有关颅脑创伤后海马 AQP1 表达变化的相关研究尚未见诸文献报道。本研究以小鼠海马 AQP1 表达水平作为研究项目,旨在观察该蛋白在颅脑创伤小鼠模型海马表达变化中的作用,以及可能的作用机制。

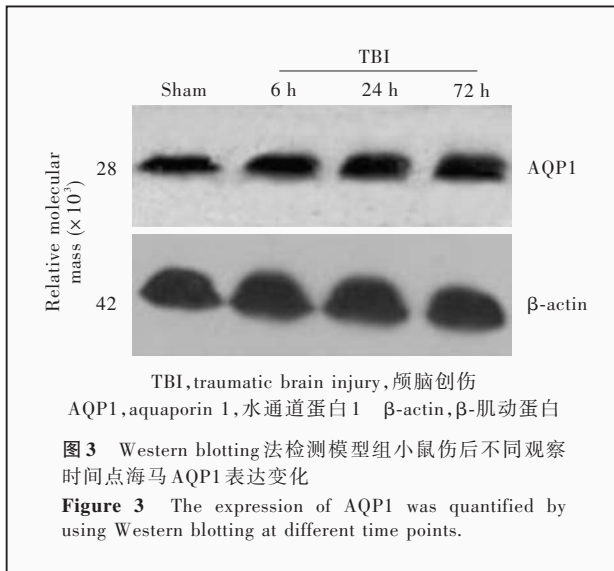
在本研究中,颅脑创伤小鼠模型建立后,通过神经功能评价和脑组织含水量测定证实存在重型颅脑创伤和脑水肿。TUNEL 法原位细胞凋亡检测显示,假手术组小鼠伤后 6、24 和 72 小时海马神经元凋亡率均低于 10%,维持在较稳定的低水平;而模型组小鼠各观察时间点海马神经元凋亡率均显著高于假手术组。提示创伤可激活小鼠海马神经元凋亡途径,随着伤后时间的延长其神经元凋亡率逐渐升高,推测可能与原发性颅脑创伤后继发性海

马损伤导致的神经元和神经胶质细胞延迟性死亡有关^[2,9]。早先的研究发现,创伤后 AQP1 mRNA 仅表达于脉络丛上皮细胞和室管膜层,但转录后的产物则广泛分布于脑组织,因此本研究未进行 AQP1 mRNA 水平检测,而是直接测定海马 AQP1 表达变化。该实验依据源于,在颅脑创伤、蛛网膜下隙出血或中枢神经系统肿瘤等病理状态下,AQP1 可表达于微血管内皮细胞或星形胶质细胞,从而导致脑水肿^[2,10-13,29-34],推测 AQP1 可能在颅脑创伤后海马组织中表达水平上调,并与其后的脑水肿形成相关。免疫组织化学染色和 Western blotting 检测表明,伤后 6 小时小鼠海马 AQP1 表达水平即显著升高,24 小时达高峰,至 72 小时仍维持在较高水平。有研究显示,AQP1 与海马 CA1 区细胞空泡化有关,可能参与细胞凋亡过程^[9];由 AQP1 介导的水分子流失则对下游神经元凋亡途径起重要作用,且细胞膜水分子通透性可以直接影响细胞凋亡率^[35]。进一步的研究证实,AQP1 部分介导了颅脑创伤后的

表 4 模型组与假手术组小鼠不同观察时间点海马 AQP1 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, 相对表达量)

Table 4. Comparison of AQP1 expression in mouse hippocampus at different time points between 2 groups by Western blotting assay ($\bar{x} \pm s$, relative expression)

Group	N	6 h	24 h	72 h	F value	P value
Sham group	8	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.407	0.671
TBI group	8	0.21 ± 0.11	0.46 ± 0.19	0.35 ± 0.17	5.243	0.014
t value		-2.097	-4.113	-3.066		
P value		0.074	0.004	0.018		



血管源性脑水肿, AQP1 通道还具有促进细胞膜转运二氧化碳和细胞内酸中毒的作用, 参与细胞毒性脑水肿的形成过程, 从而导致神经元和神经胶质细胞损伤和凋亡; 这一病理过程可能是通过脑组织缺血、缺氧后酸中毒激活血管内皮生长因子(VEGF)等旁分泌环路实现的, 酸中毒亦直接上调 AQP1 表达; 无论是细胞毒性还是血管源性脑水肿均可加重细胞代谢障碍和酸中毒, 进一步加重脑水肿, 形成恶性循环^[12, 21, 30, 33]。本研究结果显示, 海马水肿进展程度与 AQP1 表达趋势相一致, 提示 AQP1 可能参与了颅脑创伤后海马损伤的病理生理学过程, 与海马水肿和细胞凋亡具有一定关联性, 但其具体机制尚待进一步研究加以证实。推测颅脑创伤后 AQP1 表达水平升高, 使脑组织代谢紊乱、血-脑脊液屏障破坏、细胞内酸中毒和继发性脑组织缺血、缺氧共同导致的细胞代谢障碍和酸中毒进一步加重, 使脑水肿恶化; 海马神经元易感性增加, 损伤并凋亡, 故颅脑创伤后模型小鼠海马神经元凋亡率随着时间的延长而不断升高。

综上所述, 颅脑创伤后小鼠海马 AQP1 表达上调, 可能参与了创伤后海马组织水肿和细胞凋亡等病理生理学过程。因此, AQP1 可以作为颅脑创伤后脑水肿发生机制研究, 以及避免海马继发性损伤研究的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Shahlaie K, Gurkoff GG, Lyeth BG, Muizelaar JP, Berman RF. Neuroprotective effects of SNX-185 in an in vitro model of TBI with a second insult. Restor Neurol Neurosci, 2013, 31:141-153.
- [2] Stoica BA, Faden AI. Cell death mechanisms and modulation in traumatic brain injury. Neurotherapeutics, 2010, 7:3-12.
- [3] Adelson PD, Srinivas R, Chang Y, Bell M, Kochanek PM. Cerebrovascular response in children following severe traumatic brain injury. Childs Nerv Syst, 2011, 27:1465-1476.
- [4] Chen Y, Constantini S, Trembovler V, Weinstock M, Shohami E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. J Neurotrauma, 1996, 13:557-568.
- [5] Zhi DS, Zhang GB, Yan H. A review of fundamental and clinical study on traumatic brain injury in last 10 years. Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2010, 10:83-91. [只达石, 张国斌, 闫华. 颅脑创伤基础与临床研究十年回顾. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10:83-91.]
- [6] Jiang JY. Advances in fundamental and clinical studies on craniocerebral trauma. Zhongguo Xian Dai Shen Jing Ji Bing Za Zhi, 2004, 4:135-138. [江基尧. 颅脑创伤基础与临床研究新进展. 中国现代神经疾病杂志, 2004, 4:135-138.]
- [7] Song J, Christian KM, Ming GL, Song H. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. Dev Neurobiol, 2012, 72:1032-1043.
- [8] Mikelsaar AV, Sünter A, Mikelsaar R, Toomik P, Kõiveer A, Mikelsaar I, Juronen E. Epitope of titin a - band - specific monoclonal antibody Tit1 5 H1.1 is highly conserved in several Fn3 domains of the titin molecule: centriole staining in human, mouse and zebrafish cells. Cell Div, 2012, 7:21.
- [9] Kim JE, Ryu HJ, Yeo SI, Seo CH, Lee BC, Choi IG, Kim DS, Kang TC. Differential expressions of aquaporin subtypes in astroglia in the hippocampus of chronic epileptic rats. Neuroscience, 2009, 163:781-789.
- [10] Rutkovskiy A, Mariero LH, Nygård S, Stensløyken KO, Valen G, Vaage J. Transient hyperosmolality modulates expression of cardiac aquaporins. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425:70-75.
- [11] Badaut J, Ashwal S, Obenaus A. Aquaporins in cerebrovascular disease: a target for treatment of brain edema? Cerebrovasc Dis, 2011, 31:521-531.

- [12] Tran ND, Kim S, Vincent HK, Rodriguez A, Hinton DR, Bullock MR, Young HF. Aquaporin-1-mediated cerebral edema following traumatic brain injury: effects of acidosis and corticosteroid administration. *J Neurosurg*, 2010, 112:1095-1104.
- [13] Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22:367-378.
- [14] Kim J, Jung Y. Increased aquaporin-1 and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 expression in choroid plexus leads to blood-cerebrospinal fluid barrier disruption and necrosis of hippocampal CA1 cells in acute rat models of hyponatremia. *J Neurosci Res*, 2012, 90:1437-1444.
- [15] Albert-Weissenberger C, Varrallyay C, Raslan F, Kleinschnitz C, Sirén AL. An experimental protocol for mimicking pathomechanisms of traumatic brain injury in mice. *Exp Transl Stroke Med*, 2012, 4:1-5.
- [16] Qiu B, Wang Y, Qin XF, Wu PF, Wang YJ. The expression change of aquaporin 9 in hippocampus of mice after traumatic brain injury. *Jie Pou Xue Yan Jiu*, 2012, 34:100-103. [仇波, 王勇, 秦晓飞, 吴鹏飞, 王运杰. 脑外伤小鼠海马水通道蛋白-9 表达的变化. *解剖学研究*, 2012, 34:100-103.]
- [17] Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2001, 32:1005-1011.
- [18] Umschweif G, Alexandrovich AG, Trembovler V, Horowitz M, Shohami E. Hypoxia-inducible factor 1 is essential for spontaneous recovery from traumatic brain injury and is a key mediator of heat acclimation induced neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33:524-531.
- [19] Padayachy LC, Rohlwin U, Zwane E, Fieggen G, Peter JC, Figaji AA. The frequency of cerebral ischemia/hypoxia in pediatric severe traumatic brain injury. *Childs Nerv Syst*, 2012, 28:1911-1918.
- [20] Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka JI, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N. Attenuation of Notch signaling promotes the differentiation of neural progenitors into neurons in the hippocampal CA1 region after ischemic injury. *Neuroscience*, 2009, 158:683-692.
- [21] Marmarou A. A review of progress in understanding the pathophysiology and treatment of brain edema. *Neurosurg Focus*, 2007, 22:E1.
- [22] Greve MW, Zink BJ. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt Sinai J Med*, 2009, 76:97-104.
- [23] Sahuquillo J, Vilalta A. Cooling the injured brain: how does moderate hypothermia influence the pathophysiology of traumatic brain injury. *Curr Pharm Des*, 2007, 13:2310-2322.
- [24] Ito J, Marmarou A, Barzó P, Fatouros P, Corwin F. Characterization of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 1996, 84:97-103.
- [25] Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 2004, 129:1021-1029.
- [26] Adeva MM, Souto G, Donapetry C, Portals M, Rodriguez A, Lamas D. Brain edema in diseases of different etiology. *Neurochem Int*, 2012, 61:166-174.
- [27] Badaut J. Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies. *Neuroscience*, 2010, 168:1047-1057.
- [28] Liu H, Yang M, Qiu GP, Zhuo F, Yu WH, Sun SQ, Xiu Y. Aquaporin 9 in rat brain after severe traumatic brain injury. *Arq Neuropsiquiatr*, 2012, 70:214-220.
- [29] Badaut J, Brunet JF, Grollmund L, Hamou MF, Magistretti PJ, Villemure JG, Regli L. Aquaporin 1 and aquaporin 4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue. *Acta Neurochir Suppl*, 2003, 86:495-498.
- [30] Kim J, Jung Y. Different expressions of AQP1, AQP4, eNOS, and VEGF proteins in ischemic versus non-ischemic cerebropathy in rats: potential roles of AQP1 and eNOS in hydrocephalic and vasogenic edema formation. *Anat Cell Biol*, 2011, 44:295-303.
- [31] Kobayashi H, Minami S, Itoh S, Shiraishi S, Yokoo H, Yanagita T, Uezono Y, Mohri M, Wada A. Aquaporin subtypes in rat cerebral microvessels. *Neurosci Lett*, 2001, 297:163-166.
- [32] Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H. Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 in vitro and in vivo. *Neuropathology*, 2007, 27:245-256.
- [33] Suzuki R, Okuda M, Asai J, Nagashima G, Itokawa H, Matsunaga A, Fujimoto T, Suzuki T. Astrocytes co-express aquaporin-1, -4, and vascular endothelial growth factor in brain edema tissue associated with brain contusion. *Acta Neurochir Suppl*, 2006, 96:398-401.
- [34] Zelenina M. Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int*, 2010, 57:468-488.
- [35] Jablonski EM, Webb AN, McConnell NA, Riley MC, Hughes FM Jr. Plasma membrane aquaporin activity can affect the rate of apoptosis but is inhibited after apoptotic volume decrease. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286:975-985.

(收稿日期:2014-01-03)

· 读者·作者·编者·

《中国现代神经疾病杂志》编辑部关于稿件统计分析方法的要求

《中国现代神经疾病杂志》编辑部对来稿中的统计分析方法一律要求明确研究设计方法,以及详细描述资料性质和结果,具体要求如下:

1. 研究设计方法 要求交代研究设计的名称和主要方法。如调查设计应写明是前瞻性、回顾性还是横断面调查研究;实验设计应写明具体设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计或正交叉设计等;临床试验设计应写明属于第几期临床试验,采用何种盲法措施等。应围绕“重复、随机、对照、均衡”四项基本原则进行概要说明,尤其要说明如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料及结果的表达与描述 采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示近似服从正态分布的定量资料,采用中位数和四分位数间距 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示呈偏态分布的定量资料;采用相对数构成比(%)或率(%)表示计数资料,用相对数构成比时分母不能小于20。应写明所用统计分析方法的具体名称、统计量具体值,应尽可能给出确切的P值;当涉及总体参数时,在给出显著性检验结果的同时,给出95%可信区间。