

DKK-1 抑制剂对大鼠蛛网膜下腔出血后脑水肿影响的研究

张贵强 杨和平^{通讯作者}

广西壮族自治区民族医院 南宁 530001

〔摘要〕目的 明确 DKK-1 对大鼠蛛网膜下腔出血后水通道蛋白 (AQP-4 和 AQP-1) 表达的影响。方法 成年健康雄性 SD 大鼠 72 只, 按随机数字表法分为假手术组 (n=24)、SAH 模型组 (n=24) 和 DKK-1 抑制剂组 (n=24), SAH 模型组和 DKK-1 抑制剂组均采用枕大池二次注血法制作大鼠 SAH 模型, DKK-1 抑制剂组于造模前 15min 侧脑室注射 DKK-1 (2mg/kg, 100 μ L PBS), 而假手术组大鼠也经相同的手术过程, 假手术组和 SAH 模型组于造模前 15 min 侧脑室注射等量生理盐水。取相应时间点 (术后 1 周、2 周和 4 周) 的各组大鼠, 断头取脑, 根据脑组织干重测算脑组织含水量, 并采用免疫组化法 (Western blot) 检测 AQP-4 和 AQP-1, 观察各组大鼠各个时间点 AQP-4 和 AQP-1 的表达水平。结果 ①各组脑组织含水量比较: 假手术组未出现脑组织含水量变化, 其余各组脑组织含水量从第 1 周起均逐渐增多; 模型组和 DKK-1 抑制剂组于 1 周时脑组织含水量达到顶峰。DKK-1 抑制剂组 1 周、2 周、4 周时间点脑组织含水量均低于模型组 ($P < 0.05$)。②各组 AQP-4 的表达水平比较: 假手术组未出现 AQP-4 上调, 其余各组 AQP-4 从 1 周时均逐渐增高上调; 模型组和 DKK-1 抑制剂组于 4 周时 AQP-4 表达值达到顶峰。DKK-1 抑制剂组 1 周、2 周、4 周时间点 AQP-4 表达低于模型组 ($P < 0.05$)。③各组 AQP-1 的表达水平比较: 假手术组未出现 AQP-1 上调, 其余各组 AQP-1 从 1 周时均逐渐增高上调; 模型组和 DKK-1 抑制剂组于 4 周时 AQP-1 表达值达到顶峰。DKK-1 抑制剂组 1 周、2 周、4 周时间点 AQP-1 表达低于模型组 ($P < 0.05$)。结论 DKK-1 抑制剂可以减少蛛网膜下腔出血后大鼠脑组织含水量, 可抑制 AQP-4 及 AQP-1 表达, 减轻蛛网膜下腔出血后大鼠神经功能损害。

〔关键词〕蛛网膜下腔出血; DKK-1; AQP-4; AQP-1

〔中图分类号〕R74 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**2095-7165 (2023) 05-005-02

〔基金项目〕广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研项目 (Z20190542)

蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 是一种高病死率、高残疾率和持久性的全球健康难题, 严重威胁患者生命健康和生活质量^[1]。SAH 发生后引起严重的脑水肿和脑积水。在脑水肿发生过程中, AQP1 和 AQP4 作用至关重要, 是中枢神经系统中最主要的两种水通道蛋白^[2]。经典 Wnt/ β -catenin 信号通路具有阻止细胞凋亡、促进细胞再生的功能, 在中枢神经系统内环境稳定的维持中发挥着至关重要的作用^[3]。DKK-1 是调控 Wnt 通路的关键负性因子^[4]。已有研究表明, 应用 DKK-1 的拮抗剂或中和抗体诱导 Wnt 经典通路激活, 在缺血性脑卒中发挥了脑保护作用^[5]。而关于蛛网膜下腔出血后脑水肿影响未见相关报道, 为进一步深入研究, 本研究通过建立大鼠 SAH 模型, 检测不同时间点大鼠 AQP4 及 AQP1 变化, 探讨 DKK-1 对 SAH 后慢性脑水肿的影响及其作用机制, 为治疗提供新的思路及手段。

1 资料与方法

1.1 动物及实验材料

实验动物:成年健康雄性 SD 大鼠 72 只, 体重 180g-220g, 采购来源于广西医科大学动物实验中心。实验试剂: AQP-4 抗体 (aquaporin-4), Western blotting - 抗稀释液, Wnt/ β -catenin 抑制剂 DKK-1, 脑立体定位仪, 5 μ L、100 μ L 微量注射器, 电子分析天平。

1.2 研究方法

1.2.1 蛛网膜下腔出血大鼠模型

术前禁食 24h, 自来水饲养。用 10% 水合氯醛 300mg / kg 于右侧腹腔注射麻醉后, 头颈部备皮及左侧腹股沟区备皮。取俯卧位使用立体定位仪固定大鼠。颈部稍屈, 常规消毒铺巾, 在显微镜下沿头颈部交界处作一长约 3-4mm 的纵切, 暴露环枕筋膜, 垂直穿刺枕大池, 抽出清亮脑脊液 0.1ml 后, 从原

股静脉置管处抽 0.2ml 新鲜血缓慢注入枕大池, 缝合后头低位放置 30min。SAH 模型组操作与实验组完全相同, 但两次注射均以生理盐水代替自体血。

1.2.2 实验分组及实验模型建立

成年健康雄性 SD 大鼠 72 只, 体重 180g-220g, 按随机数字表法分为假手术组 (n=24)、SAH 模型组 (n=24) 和 DKK-1 抑制剂组 (n=24)。SAH 模型组和 DKK-1 抑制剂组均采用枕大池二次注血法制作大鼠 SAH 模型, DKK-1 抑制剂组于造模前 15min 侧脑室注射 DKK-1 (2mg/kg, 100 μ L, PBS), 而假手术组大鼠也经相同的手术过程, 假手术组和 SAH 模型组于造模前 15min 侧脑室注射等量生理盐水。3 组又分别分为术后 1 周、2 周和 4 周 3 个亚组, 每个亚组 8 只。

1.2.3 脑水肿的测定

利用干湿法测定大鼠脑组织含水量: 大鼠于相应时间点处死后, 取脑组织, 用滤纸轻吸去表面水分, 标记后称重, 置烘干箱 110 $^{\circ}$ C 24h 烘至恒重, 再称干重, 用电子分析天平称量。然后按 Eliot 公式计算: 脑含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 $\times 100\%$ 。

1.2.4 免疫组化法 (Western blot) 检测 AQP4 和 AQP-1 蛋白的表达

石蜡切片经 H: O: 处理 10min 后, 用 10% 正常羊血清封闭 30min, 一抗 (浓度为 1: 600) 为兔抗大鼠 AQP-4 多克隆抗体, 室温下孵育过夜, SABc 试剂盒 (武汉博士德公司) 按说明书进行操作, DAB 显色后光镜观察。阴性对照用 PBs 代替一抗进行孵育。

1.2.5 结果判定和统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数进行独立样本 t 检验。P < 0.05 为

差异有显著性意义。

2 研究结果

2.1 各组脑组织含水量比较

假手术组未出现脑组织含水量变化，其余各组脑组织含水量从第 1 周起均逐渐增多；模型组和 DKK-1 抑制剂组于 1 周时脑组织含水量达到顶峰。DKK-1 抑制剂组 1 周、2 周、4 周时间点脑组织含水量均低于模型组 ($P < 0.05$)。详见表 1。

2.2 各组 AQP-4 的表达水平比较

假手术组未出现 AQP-4 上调，其余各组 AQP-4 从 1 周时均逐渐增高上调；模型组和 DKK-1 抑制剂组于 4 周时 AQP-4 表达值达到顶峰。DKK-1 抑制剂组 1 周、2 周、4 周时间点 AQP-4 表达低于模型组 ($P < 0.05$)。详见表 2。

2.3 各组 AQP-1 的表达水平比较

假手术组未出现 AQP-1 上调，其余各组 AQP-1 从 1 周时均逐渐增高上调；模型组和 DKK-1 抑制剂组于 4 周时 AQP-1 表达值达到顶峰。DKK-1 抑制剂组 1 周、2 周、4 周时间点 AQP-1 表达低于模型组 ($P < 0.05$)。详见表 3。

表 1 各组大鼠脑组织含水量比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	1 周	2 周	4 周
假手术组	77.10 $\pm$ 7.19	77.11 $\pm$ 7.23	78.91 $\pm$ 7.01
SAH 模型组	83.87 $\pm$ 11.41	81.85 $\pm$ 10.02	79.02 $\pm$ 8.81
DKK-1 抑制剂组	80.31 $\pm$ 11.24	79.02 $\pm$ 11.43	76.31 $\pm$ 11.21

表 2 各组大鼠各个时间点 AQP-4 表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	1 周	2 周	4 周
假手术组	0.51 $\pm$ 0.11	0.47 $\pm$ 0.12	0.50 $\pm$ 0.11
SAH 模型组	0.97 $\pm$ 0.17	1.08 $\pm$ 0.24	1.20 $\pm$ 0.23
DKK-1 抑制剂组	0.78 $\pm$ 0.14	0.87 $\pm$ 0.16	0.98 $\pm$ 0.18

表 3 各组大鼠各个时间点 AQP-1 表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	1 周	2 周	4 周
假手术组	0.61 $\pm$ 0.21	0.50 $\pm$ 0.22	0.49 $\pm$ 0.12
SAH 模型组	0.98 $\pm$ 0.16	1.09 $\pm$ 0.21	1.21 $\pm$ 0.26
DKK-1 抑制剂组	0.79 $\pm$ 0.15	0.89 $\pm$ 0.17	0.97 $\pm$ 0.19

3 讨论

蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 是最常见的出血性脑血管病之一，而脑水肿是 SAH 后主要的神经损伤，它是一种脑细胞间质空间水量病态增加的现象^[6]。脑水肿的发生是一个十分复杂的病理过程，目前尚不清楚其分子水平的机制。在中枢神经系统中存在五种水通道蛋白，它们分别是 AQP1、AQP4、AQP7、AQP9 和 AQP11，其中 AQP1、AQP4 含量最高^[7]。DKK (Dickkopf) 是动物进化中很保守的一种分泌性的糖蛋白，其主要作用是抑制 Wnt 信号通路的传导，包括四个成员 (DKK1-4)^[8]。DKK-1 是 Wnt 信号通路中重要的拮抗分子之一，DKK-1 可以抑制 Wnt 蛋白与 LRP5/6 等受体的结合，从而抑制 Wnt 信号通路^[9]。同时也是 Wnt 通路的下游靶基因，从而形成了一个负反馈调节环，在维持成体组织的动态平衡中起到了重要作用^[10]。

本项目研究结果显示，假手术组未出现脑组织含水量变化，模型组和 DKK-1 抑制剂组大鼠脑组织含水量从第 1 周起均逐渐增多，并在 1 周时脑组织含水量达到顶峰，而此相应时间段的 AQP-4 及 AQP-1 的表达也随着脑含水量的升高而升高，AQP-4 及 AQP-1 表达值与脑含水量成正相关的关系，也与 Previch LE 的研究认为上调的 AQP-4 及 AQP-1 参与了脑水肿的形成的研究结果相一致，即脑水肿发生与 AQP-4 及 AQP-1 密切相关。在本实验研究中，DKK-1 抑制剂组的各个时间点的脑组织含水量低于模型组，与此同时，DKK-1 抑制剂组各个时间点的 AQP-4 及 AQP-1 表达低于模型组，由此可以得出以下结论：DKK-1 抑制剂可以减少蛛网膜下腔出血后大鼠脑组织含水量，可抑制 AQP-4 及 AQP-1 表达，减轻蛛网膜下腔出血后大鼠神经功能损害。

综上，蛛网膜下腔出血后，脑组织含水量增多，AQP-4 及 AQP-1 表达增多；DKK-1 抑制剂可以减少蛛网膜下腔出血后大鼠脑组织含水量，可抑制 AQP-4 及 AQP-1 表达，一方面揭示了蛛网膜下腔出血后脑水肿形成相关的分子机制，另一方面也为 DKK-1 抑制剂治疗蛛网膜下腔出血提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 黄清海, 杨鹏飞. 中国动脉瘤性蛛网膜下腔出血诊疗指南[J]. 中国脑血管病杂志. 2016.13(07):384-392.
- [2] 郭孝龙. AQP4 和 AQP1 的动态表达在小鼠蛛网膜下腔出血后脑水肿及脑积水中的作用及机制研究. (03), 2016.
- [3] 中亚辉, 刘新禹, 康晓燕等. Wnt/ β -catenin 信号通路在中枢神经系统发育、再生及变性性疾病中作用的研究进展[J]. 山东医药. 2018.58(26):84-87.
- [4] 柴文, 谢旭芳, 邹冬琴, 邹雪琴. miR-107 靶向 Dkk-1 调控 Wnt/ β -catenin 通路在颞叶癫痫中的作用及其机制研究. 第七届 CAAE 国际癫痫论坛. 其他: 江西省人民医院, 2017.64.
- [5] 丰凯成. 急性脑梗死患者血清 DKK-1、GDF-15 水平与颈动脉粥样硬化及 hs-CRP 的相关性研究. 见: 胡为民, 主编. (02), 2015.
- [6] 彭四维, 漆松涛, 刘忆等. 动脉瘤性蛛网膜下腔出血后急性脑积水的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志. 2014.11(11):611-616.
- [7] 于程. 水通道蛋白-4 及其对脑水肿作用的研究进展[J]. 国际儿科学杂志. 2019.46(3):190-193.
- [8] Reinhold S, Blankesteijn WM. Wnt/ β -Catenin Inhibitor Dickkopf 1. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2019. 39(2): 121-123.
- [9] 李燕, 熊志伟. Dickkopf-1、LINGO-1、caveolin-1 在脑出血中的表达水平变化及其与病情严重程度的关系[J]. 卒中与神经疾病. 2020.27(03):332-335+340.
- [10] 邹璐蔚, 李宗宇, 刘春萍, 杜晓玲, 吕湛. Dickkopf 家族蛋白在动脉粥样硬化发生机制中的作用[J]. 心血管病学进展. 2022.43(02):162-166.

(上接第 4 页)

[参考文献]

- [1] 徐谭. 边支球囊保护技术应用于冠状动脉分叉病变介入治疗中的效果观察[J]. 医学理论与实践, 2022, 31(08):1141-1142.
- [2] 陈宗宁, 赵渊, 庄莉. TAP 技术与单支架治疗冠状动脉分叉病变的中期效果对比[J]. 现代仪器与医疗, 2022,

24(01):32-33.

- [3] 杨长宝, 郑海军. 边支血管主球囊保护技术在冠状动脉分叉病变介入治疗中的应用分析[J]. 临床放射学杂志, 2021, 35(05):778-781.
- [4] 丁立成, 王继群, 石磊, 等. 冠状动脉分叉病变介入治疗策略及技术[J]. 中国老年学杂志, 2022, 36(06):1530-1533.