

知母皂苷B对缺氧/复氧损伤星形胶质细胞的保护作用及其机制研究[△]

丁玲^{1*}, 胡毅², 刘洁¹, 安瑞娣³, 张作文^{4#}(1.重庆市江津区中心医院药学部, 重庆 402260; 2.重庆市江津区中心医院消化科, 重庆 402260; 3.甘肃省人民医院医保处, 兰州 730000; 4.重庆市江津区中心医院神经内科, 重庆 402260)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0488-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.12

摘要 目的:探讨知母皂苷B对缺氧/复氧损伤星形胶质细胞的保护作用及其可能机制。方法:原代新生SD大鼠星形胶质细胞经培养、鉴定后,随机分为正常组、模型组、阳性对照组(尼莫地平, 10 μmol/L)以及知母皂苷B低、中、高剂量组(1、10、100 μmol/L)。正常组和模型组均给予完全培养基1 000 μL,给药组给予含相应药物的完全培养基1 000 μL。除正常组外,其余各组细胞均采用氧糖剥夺/再灌注法复制缺氧/复氧损伤模型。复氧后,采用比色法检测细胞中乳酸脱氢酶(LDH)的相对释放率;采用四甲基偶氮唑盐法检测细胞相对活力;采用酶联免疫吸附测定法检测细胞中水通道蛋白4(AQP-4)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1β、肿瘤坏死因子α(TNF-α)的含量。结果:与正常组比较,模型组细胞中LDH相对释放率以及AQP-4、IL-6、IL-1β、TNF-α的含量均显著升高,细胞相对活力显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组细胞中LDH相对释放率以及AQP-4、IL-6、IL-1β、TNF-α的含量均显著下降,细胞相对活力均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:知母皂苷B可明显降低细胞损伤程度、增强细胞活力,对缺氧/复氧损伤星形胶质细胞具有一定的保护作用,且这种作用可能与其下调AQP-4和IL-6、IL-1β、TNF-α的分泌有关。

关键词 知母皂苷B;星形胶质细胞;缺氧/复氧损伤;乳酸脱氢酶;水通道蛋白4;白细胞介素6;白细胞介素1β;肿瘤坏死因子α

Protective Effects and the Mechanism of Anemarsaponin B on Hypoxia/reoxygenation Injury Astrocytes

DING Ling¹, HU Yi², LIU Jie¹, AN Ruidi³, ZHANG Zuowen⁴(1. Dept. of Pharmacy, the Central Hospital of Jiangjin, Chongqing 402260, China; 2. Dept. of Gastroenterology, Chongqing Jiangjin District Central Hospital, Chongqing 402260, China; 3. Medical Insurance Office, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, China; 4. Dept. of Neurology, Chongqing Jiangjin District Central Hospital, Chongqing 402260, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the protective effects of anemarsaponin B on hypoxia/reoxygenation injury astrocytes and its possible mechanism. METHODS: The primary astrocytes of neonatal SD rats were cultured and identified, and then randomly divided into normal group, model group, positive control group (nimodipine, 10 μmol/L), anemarsaponin B low-dose, medium-dose and high-dose groups (1, 10, 100 μmol/L), respectively. Normal group and model group were given complete medium 1 000 μL. Administration group was given complete medium with relevant medicine 1 000 μL. Except for normal group, hypoxia/reoxygenation injury model was established by oxygen-glucose deprivation/reperfusion in other groups. After reoxygenation, relative release rate of lactate dehydrogenase (LDH) in cell was detected by colorimetry. MTT assay was used to detect the relative viability of the cells. The contents of aquaporin 4 (AQP-4), IL-6, IL-1β and TNF-α in cell were measured by ELISA. RESULTS: Compared with normal group, relative release rate of LDH, the contents of AQP-4, IL-6, IL-1β and TNF-α in cell were increased significantly in model group, while relative viability of the cells were decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, relative release rate of LDH, the contents of AQP-4, IL-6, IL-1β and TNF-α in cell were decreased significantly in administration groups, while relative viability of the cells were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Anemarsaponin B can significantly decrease cell injury degree, strengthen cell viability and protect hypoxia/reoxygenation injury astrocytes to certain extent. The effect may be related to the down-regulation of the secretion of AQP-4, IL-6, IL-1β and TNF-α.

△ 基金项目:重庆市教育委员会科学技术研究项目(No.KJ1600235)

* 副主任药师,硕士。研究方向:药事管理、神经药理学。电话:023-47225178。E-mail:626654306@qq.com

通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:脑血管疾病、多发性硬化、癫痫等疾病诊疗。电话:023-47217495。E-mail:396096156@qq.com

re-oxygenation injury astrocytes to certain extent. The effect may be related to the down-regulation of the secretion of AQP-4, IL-6, IL-1β and TNF-α.

KEYWORDS Anemarsaponin B; Astrocytes; Hypoxia/reoxygenation injury; Lactate dehydrogenase; Aquaporin 4; IL-6; IL-1β; TNF-α

脑卒中分为出血性卒中(占20%)和缺血性卒中(占80%),严重威胁人类的健康。脑水肿作为脑卒中的主要并发症之一,是导致患者残疾甚至死亡的主要原因^[1-3]。针对脑水肿,临床上大多采用手术清除、脱水等治疗方法,但疗效有限^[4]。故寻找有效治疗脑水肿的方法成为了目前研究的热点之一。在中枢神经系统(CNS)中,星形胶质细胞作为数量最多的神经胶质细胞,具有抗氧化应激、合成神经递质等多种重要功能,可作为治疗中枢性疾病的靶点^[5]。水通道蛋白4(AQP-4)是由星形胶质细胞分泌的一种蛋白质,其表达水平可影响细胞中水分的含量,与脑水肿的发生密切相关^[6-9];同时有研究发现,在发生脑缺血/再灌注损伤后,大脑组织(主要为星形胶质细胞)产生的大量炎症因子[如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)等]可影响脑水肿的形成与发展^[10-11],并可促使AQP-4过表达,进一步加重脑水肿^[12]。由此可见,AQP-4及相关炎症因子可能在脑水肿的发生发展过程中发挥重要作用。

知母皂苷是百合科植物知母(*Anemarrhena asphodeloides* Bge.)干燥根茎的主要成分。其中,知母皂苷B为主要活性成分,具有抑制自由基生成、修复神经元损伤等药理作用,具有很大的开发价值^[13]。为此,本课题组以缺氧/复氧损伤星形胶质细胞为对象,通过检测知母皂苷B对其AQP-4及IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量的影响,初步探索知母皂苷B对缺氧/复氧神经细胞的保护作用,以期为脑缺血/再灌注损伤提供治疗新策略。

1 材料

1.1 仪器

Heal Force型细胞培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司);HEPA Class 100型缺氧培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);CKX41型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);TGL-16G型高速冷冻离心机(日本Hitachi公司);Synergy 2型酶标仪(美国BioTek公司);TXT3型细胞离心机(北京汗紫星仪器仪表有限公司);NRV-200型摇床(上海南荣实验室设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

知母皂苷B原料药(上海信裕生物科技有限公司,批号:20160926,纯度: $>98\%$);尼莫地平注射液(青岛金峰制药有限公司,批号:20170105,规格:50 mL:10 mg);四甲基偶氮盐(MTT)试剂(郑州派尼化学试剂厂,批号:161201);0.25%胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS,美国Sigma公司,pH为7.4,批号分别为h0032、h0012);DMEM/F12培养基(美国Gibico公司,批号:h0010);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号:HB0204);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒和AQP-4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京

建成生物工程研究所,批号依次为:A1003、A0101、A0104、A0106、A0107);兔抗小鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP)一抗、经异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔荧光二抗(美国Abcam公司,批号分别为ab7261、ab150078);4',6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染料(江苏碧云天生物技术有限公司,批号:C1005);含糖Earle's平衡盐溶液(EBSS)、不含糖EBSS(国药集团化学试剂有限公司,pH分别为7.4、7.3,批号依次为:20160719、20160712);二甲亚砜(DMSO)等试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 动物

SPF级雄性SD大鼠,新生48 h内,由重庆医科大学实验动物中心提供[生产许可证号:SCXK(渝)2012-0001]。

2 方法

2.1 原代新生SD大鼠星形胶质细胞的培养、纯化、传代

2.1.1 原代培养 按照文献[14]方法进行原代培养。选择新生48 h内的乳鼠,断头、取脑,剥离海马体、脑膜,得大脑皮层,用PBS清洗后,置于干净培养皿中,剪碎,加入2~3倍体积的0.25%胰蛋白酶,于37℃下消化15 min后,用等体积完全培养基(即含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,下同)终止反应;过200目筛,1 000 r/min离心5 min,弃去上清液,沉淀以适量完全培养基重悬,经吹打、分散后,得单细胞悬液。用适量完全培养基重悬上述单细胞悬液,按约 2×10^6 个/mL的密度接种于玻璃培养瓶中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养,于接种后的1~2 d更换培养基,随后每周更换2次,并每天用倒置相差显微镜观察细胞形态。

2.1.2 细胞纯化 待细胞长满至融合(约接种后7~10 d),将其置于摇床中,于37℃下以250 r/min振荡24 h;弃去上清液,用0.25%胰蛋白酶消化,以1 000 r/min离心5 min;弃去上清液,沉淀用适量完全培养基重悬后,于37℃、5%CO₂培养箱中继续培养。为提高细胞的纯度,可待细胞再次融合时,重复上述操作。

2.1.3 细胞传代 取培养14 d左右的细胞,弃去培养基,用PBS清洗2次,用0.25%胰蛋白酶消化直至细胞间隙增加;用完全培养基终止消化,并摇动、吹打细胞悬液,分别将其接种至另外2个培养瓶中,于37℃、5%CO₂培养箱中继续培养。每天用倒置相差显微镜观察细胞生长状态,视情况添加、补充、更换培养基,并最终选用纯度较高的第二代星形胶质细胞进行后续试验。

2.2 星形胶质细胞的鉴定

将“2.1”项下经传代、纯化后的星形胶质细胞以 5×10^4 个/mL的密度接种至24孔板中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h后,进行标志蛋白GFAP染色,使用免疫

荧光法进行鉴定。将细胞置于4%多聚甲醛中固定15 min,以胎牛血清封闭2 h后,加入GFAP一抗(1:100),于4℃反应24 h后,用PBS反复冲洗4次,每次15 s;随后加入经FITC标记的相应二抗(1:100),于37℃下避光反应1 h,用DAPI染料60 μL染核3 min后,以中性树脂封片,于显微镜下观察并拍照,观察细胞的形态与分布[GFAP染色阳性(即发出绿色荧光),且细胞扁平,可见突起]。

2.3 分组、给药和造模

取对数生长期细胞,以 5×10^4 个/mL的密度接种至24孔板中,于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h后,随机分为正常组、模型组、阳性对照组(尼莫地平10 μmol/L)和知母皂苷B低、中、高剂量组(1、10、100 μmol/L),各给药组剂量均参照本课题组前期预试验结果。每组设置9个复孔。正常组和模型组细胞均加入不含药物的完全培养基1 000 μL,各给药组加入含相应药物的完全培养基1 000 μL,于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h。正常组细胞加入含糖EBSS 400 μL,于37℃、5% CO₂培养箱中培养2 h,随后更换为完全培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h。其余各组细胞均采用氧糖剥夺/再灌注法复制缺氧/复氧损伤模型:先加入不含糖EBSS 400 μL,于37℃、94% N₂、5% CO₂、1% O₂培养箱中培养2 h,进行缺氧处置;随后更换为完全培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h,进行复氧恢复。

2.4 知母皂苷B对细胞损伤的影响考察

按“2.3”项下方法分组、给药并复制缺氧/复氧损伤星形胶质细胞模型。复氧后,取各组细胞培养液20 μL,采用比色法以酶标仪检测其LDH漏出率,并计算各组LDH相对释放率以评价细胞损伤程度(LDH相对释放率=给药组或模型组细胞的LDH漏出量/正常组细胞的LDH漏出量×100%)。上述试验重复3次。

2.5 知母皂苷B对细胞活力的影响考察

按“2.3”项下方法分组、给药,并复制缺氧/复氧损伤星形胶质细胞模型。复氧后,各组细胞均加入MTT试剂(15 μL/孔),于37℃下培养4 h,弃去上清液,加入DMSO(150 μL/孔),于37℃下振荡10 min,采用酶标仪于570 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值,并计算相对细胞活力(细胞相对活力=给药组或模型组细胞的平均OD值/正常组细胞的平均OD值×100%)。上述试验重复3次。

2.6 知母皂苷B对细胞中相关指标含量的影响考察

按“2.3”项下方法分组、给药,并复制缺氧/复氧损伤星形胶质细胞模型。复氧后,取各组细胞培养液适量,采用ELISA法以酶标仪于450 nm波长处测定各孔的OD值,并计算其中AQP-4、IL-6、IL-1β、TNF-α的含量,

严格按照相关试剂盒说明书操作。上述试验重复3次。

2.7 统计学方法

采用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 星形胶质细胞鉴定结果

成熟星形胶质细胞胞体饱满、体形较大,胞质、突起清晰,胞核呈空泡状(见图1A);经DAPI染色后,胞核呈椭圆形、间隔均匀,胞质、突起、胞核清晰(见图1B);将图1A、图1B进行实时叠合后,可见细胞形态和分布均符合星形胶质细胞特征,且两者完全重合,提示其为星形胶质细胞,且纯度较高(见图1C)。

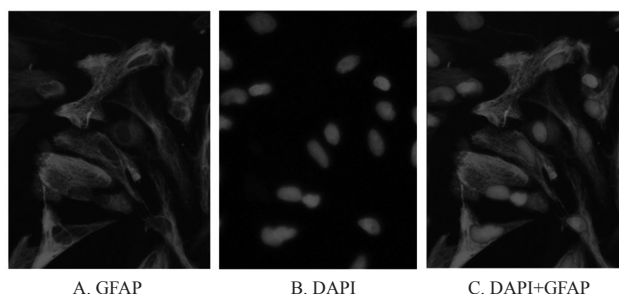


图1 星形胶质细胞荧光染色显微图(×200)

Fig 1 Micrograms of astrocyte fluorescence staining (×200)

3.2 知母皂苷B对细胞损伤的影响

与正常组比较,模型组细胞中的LDH相对释放率显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,知母皂苷B各剂量组和阳性对照组细胞中的LDH相对释放率均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表1。

表1 知母皂苷B对缺氧/复氧损伤星形胶质细胞LDH相对释放率和细胞相对活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effects of anemarsaponin B on relative release rate of LDH and relative viability in hypoxia/reoxygenation injury astrocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	LDH相对释放率,%	细胞相对活力,%
正常组	100.00±0.00	100.00±0.00
模型组	356.23±21.42**	15.12±3.49**
知母皂苷B低剂量组	259.72±15.48*	25.01±4.71*
知母皂苷B中剂量组	198.98±8.57**	44.99±8.15*
知母皂苷B高剂量组	154.77±13.62**	70.21±6.97**
阳性对照组	137.32±9.83**	82.54±8.36**

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 知母皂苷B对细胞活力的影响

与正常组比较,模型组的细胞相对活力显著减弱,

差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,知母皂苷B各剂量组和阳性对照组的细胞相对活力均显著增强,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表1。

3.4 知母皂苷B对AQP-4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量的影响

与正常组比较,模型组细胞中AQP-4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,知母皂苷B各剂量组和阳性对照组细胞中AQP-4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表2。

表2 知母皂苷B对缺氧/复氧损伤星形胶质细胞中AQP-4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$, pg/mL)

Tab 2 Effects of anemarsaponin B on the contents of AQP-4, IL-6, IL-1 β and TNF- α in hypoxia/reoxygenation injury astrocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, pg/mL)

组别	AQP-4	IL-6	IL-1 β	TNF- α
正常组	198.73 \pm 20.17	128.87 \pm 20.01	67.36 \pm 6.92	92.77 \pm 18.03
模型组	401.22 \pm 23.62**	478.38 \pm 13.92**	510.33 \pm 31.55**	562.87 \pm 16.98**
知母皂苷B低剂量组	355.17 \pm 18.81*	399.91 \pm 31.23*	470.11 \pm 14.67*	367.89 \pm 15.58*
知母皂苷B中剂量组	297.34 \pm 24.80*	310.03 \pm 8.91*	329.22 \pm 41.01*	287.98 \pm 19.84**
知母皂苷B高剂量组	247.98 \pm 17.01**	247.91 \pm 10.93*	239.37 \pm 17.59**	217.21 \pm 22.18**
阳性对照组	221.87 \pm 12.47**	250.61 \pm 19.98**	179.38 \pm 21.44*	183.98 \pm 21.01**

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 讨论

在脑缺血/再灌注损伤的进展后期,作为其必然结局的脑水肿不仅可导致患者神经功能严重缺失,还可明显增高其颅内压,进一步加重脑水肿,从而形成一个不断反复加重的恶性循环^[15]。LDH是一种主要存在于细胞质内的重要的细胞内酶,当细胞膜受到损伤时,LDH立即迅速地向细胞外泄漏,并释放到培养基中。由于释放出来的LDH稳定且敏感,故其释放程度的高低可作为衡量细胞损伤程度的重要指标^[16]。AQP-4作为脑组织中最重要AQP,在脑水肿的发生发展中发挥着重要的作用^[6-9,17]。该蛋白可控制水分进出脑组织的通道,以维持脑组织的水平衡、炎症因子及星形胶质细胞的正常迁移等^[18]。AQP-4与脑水肿关系密切,其参与了多种疾病致脑水肿的病理过程^[19]。在中枢神经系统中,星形胶质细胞是体积最大、数量最多的神经胶质细胞,其不仅对维持大脑正常功能具有重要的支持和调节作用,还对缺血大脑具有一定的保护作用,且在众多神经细胞中,只有星形胶质细胞能够分泌、表达AQP-4^[6]。有研究指出,脑缺血卒中可能会导致星形胶质细胞等神经细胞产生

IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等一系列炎症因子,这些炎症因子的大量分泌可增加血脑屏障的通透性,并促进自由基释放,从而导致神经细胞受损等毒性反应的发生^[20]。其中,TNF- α 作为炎症的“始动因子”,可激活多核白细胞,从而进一步促进多种炎症因子的释放以激发炎症反应,参与诱发脑水肿;同时,TNF- α 可加重细胞损伤,并可调控早期炎症因子(IL-6、IL-1 β 等)的表达,以“瀑布式过度炎症级联反应”的方式破坏血脑屏障、加重脑水肿^[21]。由此可见,AQP-4和IL-6、IL-1 β 、TNF- α 在脑水肿发生发展的病理进程中均具有一定的调节作用,可作为相关研究的考察指标。

传统中药知母的活性成分知母皂苷B具有抗炎、解热、抗病毒等诸多药理活性^[13,22]。虽然也有研究证明知母皂苷对脑缺血/再灌注损伤具有一定的保护作用^[23],但涉及机制的研究却甚少,且尚未见其对星形胶质细胞的影响及作用机制的相关研究。尼莫地平对预防和治疗脑缺血/再灌注损伤具有很好的效果,是脑缺血/再灌注基础研究中的经典阳性药物^[24]。为此,本研究在已有文献报道的基础上,以尼莫地平为阳性对照,初步探讨了知母皂苷B对缺氧/复氧损伤星形胶质细胞的保护作用及其可能机制。

本研究结果显示,与正常组比较,模型组细胞中的LDH相对释放率以及AQP-4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量均显著升高,细胞的相对活力显著降低。这提示星形胶质细胞发生了缺氧/复氧损伤,模型复制成功。与模型组比较,知母皂苷B各剂量组和阳性对照组细胞中的LDH相对释放率以及AQP-4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量均显著降低,细胞的相对活力均显著升高。这提示细胞损伤减弱,且AQP-4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌受到明显抑制,表明知母皂苷B对缺氧/复氧损伤星形胶质细胞具有一定的保护作用,与本课题组前期在体研究结果^[25]基本一致。笔者分析其机制可能为:知母皂苷B通过抑制缺氧/复氧损伤星形胶质细胞的炎症始动因子TNF- α 的表达,从而延缓了炎症级联反应的发生;同时,其通过反馈性下调AQP-4的表达,进一步减轻了脑水肿的症状。

综上所述,知母皂苷B可明显降低细胞损伤程度、增强细胞活力,对缺氧/复氧损伤星形胶质细胞具有一定的保护作用,且这种作用可能与其下调AQP-4和IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌有关。但本研究仍然存在如下不足之处:(1)一般而言,应在离体研究的基础上进行在体研究,而本课题组前期先进行了在体研究,后续为排除实验动物个体差异等众多干扰因素的影响,再针对星形胶质细胞进行的离体研究;(2)除AQP-4外,分布于星形胶质细胞及神经细胞连接终末上的缝隙连接蛋白43(Cx43)对血脑屏障的内环境及稳定性也具有重要意

义^[26],而本研究并未对该蛋白进行相关考察,故仍有待后续研究进一步完善。

参考文献

- [1] 张亚洲,何前松,胡斐然,等.锦鸡儿总黄酮预处理对局灶性脑缺血再灌注损伤模型大鼠血脑屏障通透性的影响及机制研究[J].中国药房,2018,29(13):1793-1797.
- [2] 陈朝,刘泰,黄一挚,等.疏血通胶囊对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经保护作用研究[J].中国药房,2018,29(16):2184-2188.
- [3] MOZAFFARIAN D, BENJAMIN EJ, GO AS, et al. Heart disease and stroke statistics: 2015 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2015, 131(4):e29-e322.
- [4] ZHENG H, CHEN C, ZHANG J, et al. Mechanism and therapy of brain edema after intracerebral hemorrhage[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2016, 42(3/4):155-169.
- [5] COLANGELO AM, ALBER GHINA L, PAPA M. Astrogliosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases[J]. *Neurosci Lett*, 2014. DOI:10.1016/j.neulet.2014.01.014.
- [6] YAO XM, DERUGIN N, MANLEY GT, et al. Reduced brain edema and infarct volume in aquaporin-4 deficient mice after transient focal cerebral ischemia[J]. *Neurosci Lett*, 2015. DOI:10.1016/j.neulet.2014.10.040.
- [7] DENG J, ZHAO F, YU X, et al. Expression of aquaporin 4 and breakdown of the blood-brain barrier after hypoglycemia-induced brain edema in rats[J]. *PLoS One*, 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0107022.
- [8] RAO KV, VERKMAN AS, CURTIS KM, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces encephalopathy and brain edema in experimental acute liver failure[J]. *Neurobiol Dis*, 2014. DOI:10.1016/j.nbd.2013.11.018.
- [9] FAZZINA G, AMORINI AM, MARMAROU CR, et al. The protein kinase C activator phorbol myristate acetate decreases brain edema by aquaporin 4 downregulation after middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *J Neurotrauma*, 2013, 27(2):453-461.
- [10] YANG B, ZADOR Z, VERKMAN AS. Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling[J]. *J Biol Chem*, 2012, 283(22):15280-15286.
- [11] ZHANG X, LI H, HU S, et al. Brain edema after intracerebral hemorrhage in rats: the role of inflammation[J]. *Neurol India*, 2013, 54(4):402-407.
- [12] DING Z, ZHANG J, XU J, et al. Propofol administration modulates AQP-4 expression and brain edema after traumatic brain injury[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(2):615-622.
- [13] 冯菲.知母的药理作用研究进展[J].中医临床研究,2017,9(12):133-137.
- [14] 丁娟,丁敬宾,马小虎,等.一种改进的大鼠大脑皮质星形胶质细胞的培养方法[J].神经解剖学杂志,2017,33(3):349-353.
- [15] 隋海娟,马瑞国,刘佳颖,等.知母皂苷对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的皮层神经元突触损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2015,31(6):27-30.
- [16] 谢娜,杨建军,杨芳,等.CM-DiI 应用于标记大鼠牙髓干细胞的实验研究[J].山西医科大学学报,2018,49(6):627-631.
- [17] POTOKAR M, JORGAČEVSKI J, ZOREC R. Astrocyte aquaporin dynamics in health and disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2016. DOI:10.3390/ijms17071121.
- [18] IKESHIMA-KATAOKA H. Neuroimmunological implications of AQP4 in astrocytes[J]. *Int J Mol Sci*, 2016. DOI:10.3390/ijms17081306.
- [19] HAN D, SUN M, HE PP, et al. Ischemic postconditioning alleviates brain edema after focal cerebral ischemia reperfusion in rats through down-regulation of aquaporin-4[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(3):722-729.
- [20] 李小亮,刘文进,田书娟,等.脑出血大鼠血清炎症因子水平与脑水肿的相关性探讨[J].临床合理用药杂志,2016,9(3A):108-122.
- [21] VESPA P, MCARTHUR DL, STEIN N, et al. Tight glyce-mic control in creases metabolic distress in traumatic brain injury: a randomized controlled within-subjects trial [J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(6):1923-1929.
- [22] 李国龙.伴生物质对知母皂苷类成分体内过程的影响研究[D].咸阳:陕西中医药大学,2015.
- [23] 吴非,钟雷,程玉芳,等.知母皂苷对脑缺血再灌注损伤的保护机制[J].中国临床康复,2006,10(31):22-24.
- [24] 陈丹丹,谢晓芳,万峰,等.氢溴酸樟柳碱对急性脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织细胞凋亡及ERK1/2磷酸化水平的影响[J].中国药房,2017,28(28):3907-3910.
- [25] 丁玲,胡毅,刘洁,等.知母皂苷对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J].中国现代应用药学杂志,2018,35(12):1821-1825.
- [26] 王宇红,谭小雯,曾嵘,等.左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马血脑屏障精细结构AQP4、Cx43的影响[J].中成药,2015,37(10):2109-2114.

(收稿日期:2018-09-17 修回日期:2018-12-04)

(编辑:张元媛)