

13-甲基十四烷酸对大鼠脑皮层星形胶质细胞 氧反常的影响

何宏星¹, 翁绳美², 胡潇³, 林艳婷¹, 余涓^{3*}

(1. 福建医科大学实验动物中心, 福州 350108; 2. 福建医科大学药学院, 福州 350108; 3. 福建医科大学基础
医学院生理学与病理生理学系, 福州 350108)

【摘要】 目的 研究13-甲基十四烷酸(13-methyltetradecanoic Acid, 13-MTD)对大鼠脑皮质星形胶质细胞氧反常的保护作用。**方法** 传代培养新生SD乳鼠大脑皮质星形胶质原代细胞,以氧糖剥夺/再复氧糖(OGD/R)方法复制氧反常模型,OGD 10 h/R 24 h,于再复氧糖即刻分别给予13-MTD 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ (M20, M40, M80)干预,倒置显微镜动态观察星形胶质细胞形态,细胞免疫化学鉴定胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP),MTT法检测线粒体活性,免疫组化法检测星形胶质细胞的水通道蛋白4(aquaporin 4, AQP4)蛋白表达。**结果** OGD 10 h/R 24 h损伤后,体外培养的SD乳鼠脑皮质星形胶质细胞出现明显损伤,线粒体活性显著下降($P < 0.01$),星形胶质细胞膜AQP4蛋白表达量明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,13-MTD 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ 可减少损伤,使线粒体活性上升,AQP4蛋白表达减少,以80 $\mu\text{g/mL}$ 效果最好($P < 0.01$)。**结论** 13-MTD可通过降低AQP4的表达,提高线粒体活性,减轻细胞水肿,进而保护氧反常诱导的星形胶质细胞损伤。

【关键词】 13-甲基十四烷酸;脑缺血损伤;氧反常;星形胶质细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 04-0454-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.008

Effects of 13-MTD on cerebral ischemia and oxygen paradox in cultured astrocytes

HE Hongxing¹, WENG Shengmei², HU Xiao³, LIN Yanting¹, YU Juan^{3*}

(1. Laboratory Animal Center, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China. 2. School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108. 3. Department of Physiology and Pathophysiology, Fujian Medical University, Fuzhou 350108)

Corresponding author: YU Juan. E-mail: tune9@163.com

【Abstract】 Objective The aim of this work was to investigate the protective effects of 13-methyltetradecanoic acid (13-MTD) on focal cerebral ischemia in rats and oxygen paradox in cultured astrocytes *in vitro*. **Methods** Almost pure astrocytes were obtained after primary culture and subculture from cerebral cortex of neonatal rats, and then the OGD 10 h/R 24 h cell model was generated by treatment with oxygen-glucose deprivation for 10 h/reperfusion for 24 h. 13-MTD 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ was administered immediately after reperfusion. Microscopy was used to observe the changes of cell morphology dynamically. MTT assay was employed to detect mitochondrial activity, and immunohistochemistry was done to determine the expressions of GFAP and AQP4. **Results** After oxygen paradox, damages of the cerebral cortical astrocytes of neonatal rats were observed, the mitochondrial activity was decreased significantly ($P < 0.01$), and AQP4 protein

【基金项目】 福建省科技厅计划项目资助基金(No. 2010Y0027);福建医科大学教授基金(No. JS12001)。

Funded by the Science and Technology Project of Fujian Province (No. 2010Y0027), the Professor Development Fund of Fujian Medical University (No. JS12001)。

【作者简介】 何宏星(1976—)男,实验师,研究方向:实验动物和动物实验管理。Email: hhx761115@sina.com

【通信作者】 余涓(1959—)女,教授,硕士生导师。Email: tune9@163.com

expression was increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the vehicle control, 13-MTD 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ improved the above parameters ($P < 0.01$), with optimal effect being obtained at 80 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusions** 13-MTD can down-regulated AQP4 protein expression, improve the mitochondrial activity, decrease cell edema, and protected the astrocytes damage from oxygen paradox.

[Key words] 13-methyltetradecanoic acid; cerebral ischemia; oxygen paradox; astrocytes

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

13-甲基十四烷酸也称为 13-甲基肉豆蔻酸,是一种末端支链的中长链饱和脂肪酸,化学结构 $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$, 分子质量为 242.4,天然存在于某些细菌和真菌的细胞膜上,可利用这些细菌和真菌在大豆发酵中分离出来^[1-3]。本实验室以往研究发现,13-MTD 对大鼠脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)有保护作用,13-MTD 对 OGD/R 和 H_2O_2 诱导的 SH-SY5Y 神经细胞损伤亦有明确的保护作用^[4],不同剂量的 13-MTD 可保护体外 OGD/R(氧反常模型)诱导的大鼠脑皮质神经元和 SD 乳鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMEC)损伤^[5],并呈量效依赖关系。星形胶质细胞是脊椎动物大脑中的一种呈星状的胶质细胞,具有调节细胞外离子和化学环境、支持血脑屏障、为神经组织提供营养物质,并在大脑的瘢痕修复中起到重要的作用^[6]。星形胶质细胞作为中枢神经系统的主要支持部分,在遭受缺血缺氧后的反应对于脑损伤的结局起着关键作用。因此研究细胞水平星形胶质细胞的反应可为脑水肿的治疗和神经元保护提供依据。

本实验通过分离 SD 大鼠大脑皮层星形胶质细胞(astrocytes, AST),建立离体星形胶质细胞 OGD/R 损伤模型,进一步探讨 OGD/R 对体外培养星形胶质细胞的损伤作用以及 13-MTD 的保护效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

新生 1 ~ 3 d 清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重约 10 g 左右,福建医科大学实验动物中心提供【SCXK(闽)2012-0001】。

1.1.2 实验试剂

13-MTD 由福建医科大学药学院合成;一抗 GFAP 及 AQP4, Santa Cruz 公司;SABC-羊抗兔 IgG 及 SABC-AP-兔抗羊 IgG 试剂盒,武汉博士德生物工程公司;Triton-X, Sino-American Biotech 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT), Sigma 公司。

1.1.3 实验仪器设备

超净工作台(上海力申科学仪器有限公司); CO_2 培养箱(美国 Forma Scientific 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 星形胶质细胞的原代培养

选择出生 1 ~ 3 d 的 SD 乳鼠,经过处理后获取大脑皮层组织,放入预冷的 PBS 液中漂洗 4 ~ 5 次,用眼科剪尽量剪成糜状,转移至离心管中加入适量 0.25% 胰蛋白酶消化 30 min,每隔 10 min 轻轻吹打使其成为细胞悬液,再以含有 10% FBS 高糖 DMEM 培养基终止消化,离心 800 r/min 5 min 弃上清,加入新鲜培养基吹打后静置 10 min,再离心 800 r/min 5 min 弃上清,加入新鲜培养基吹打成初细胞悬液,经 100 目、200 目筛网过滤,接种到玻璃培养皿中进行差速粘附处理,于 CO_2 培养箱中培养 30 ~ 60 min,吸出初细胞悬液,离心 800 r/min 5 min 弃上清,加入新鲜培养基吹打成次细胞悬液,将过滤液以培养基稀释后接种于左旋多聚赖氨酸包被的细胞培养瓶中,以后每隔 2 ~ 3 d 用含有 10% FBS DMEM 培养基换液一次,连续培养 9 ~ 14 d,换液时稍加震荡并用倒置显微镜观察细胞生长情况,细胞汇合度 80% ~ 90% 进行传代。

1.2.2 星形胶质细胞的传代纯化

待细胞长满瓶底后弃去旧的培养液,消化细胞,将细胞悬液转入离心管中,离心(1000 r/min)5 min,弃去上清液后加入培养基制成细胞悬液,重复差速粘附处理,将细胞悬液接种于预先置有盖玻片的培养板中,进行细胞爬片,放入 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 5 ~ 7 d。传代培养 3 次后进行星形胶质细胞的鉴定。

1.2.3 GFAP 免疫化学方法鉴定星形胶质细胞

星形胶质细胞的鉴定:细胞爬片于包被有左旋多聚赖氨酸的盖玻片上,培养至长满盖玻片后吸弃培养液,再 PBS 冲洗 2 次;4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 冲洗 3 次;0.5% TritonX-100 破膜处理 30

min, PBS 冲洗 3 次; 3% H_2O_2 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次; 滴加 1:10 正常山羊血清室温封闭 30 min, 倾去勿洗; 滴加 GFAP 一抗 (1:100), 阴性对照片滴加 PBS 代替一抗, 湿盒内 20~37℃ 1 h, PBS 冲洗 3 次; 滴加羊抗兔 IgG 二抗 (1:100), 20~37℃ 孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次; 滴加 SABC 液 (1:100), 20~37℃ 孵育 20 min, PBS 冲洗 4 次; DAB 显色, 镜下控制反应时间, 自来水冲洗终止反应; 苏木素轻度复染, 自来水冲洗, 酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。普通显微镜下观察拍照。

1.2.4 细胞实验分组

按实验需要将细胞分组: 对照组 (Control), 模型组 (Model), Model + 13-MTD 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ 组 (M20, M40, M80), 每组设 6 个复孔。

1.2.5 OGD/R 模型制备及药物干预

将传代纯化的细胞接种于 96 孔板或 6 孔板, 待细胞生长融合至 90% 左右时, 复制 OGD 10 h/R 24 h 模型。即将正常培养基换无糖的 DMEM 培养基置 37℃ 恒温密闭的缺氧盒内, 持续通入 95% N_2 + 5% CO_2 培养 10 h, 结束后换正常高糖 DMEM 培养

基置 CO_2 培养箱内培养 24 h; 给药组在再复氧糖同时分别给予不同剂量的 13-MTD; 正常组细胞正常培养 34 h。

1.2.6 MTT 法测定星形胶质细胞线粒体活性

用 96 孔板接种的细胞复制 OGD 10 h/R 24 h 模型后, 加 MTT 50 $\mu\text{L/孔}$ (终浓度 5 mg/mL), 37℃ 孵育 4 h; 小心吸弃 MTT, 加 DMSO 150 $\mu\text{L/孔}$, 震荡溶解; 用酶标仪检测各样本 OD 值。

1.2.7 细胞免疫化学法检测星形胶质细胞内 AQP4 蛋白表达

实验方法参考 1.2.3 进行, 并采用 Image Pro-Plus 6.0 图像分析处理系统, 统计其 IOD 值^[9]。

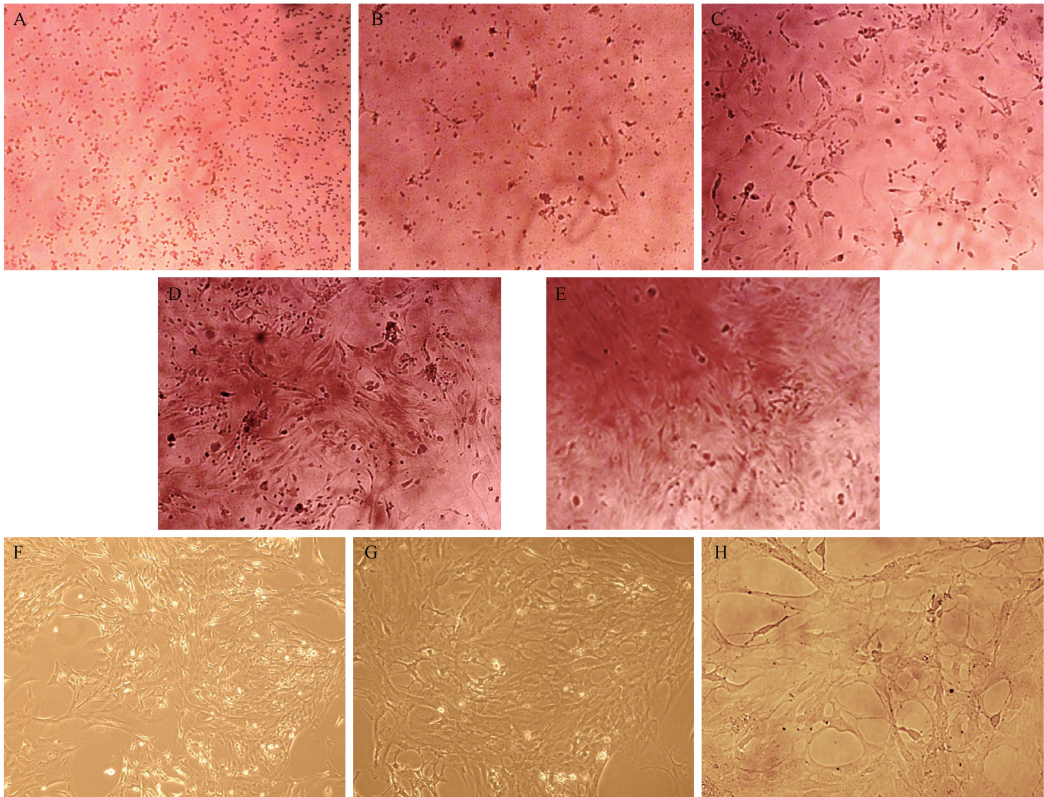
1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计软件分析, 实验数据以 ($\bar{x} \pm s, n=6$) 表示。组间比较用单因素方差分析, 当方差分析差异有显著性时, 进一步进行 q 检验作两两比较。

2 结果

2.1 原代及传代星形胶质细胞形态观察

倒置显微镜下观察到原代培养的星形胶质细



注: A~E: 分别为 1、2、4、6、10 d ($\times 200$); F~H: 星形胶质细胞 (分别为 $\times 100$ 、 $\times 200$ 、 $\times 400$)。

图 1 原代培养的新生大鼠大脑皮层星形胶质细胞形态

Note. A-E, 1, 2, 4, 6, 10 d ($\times 200$). F-H, Astrocytes ($\times 100$, $\times 200$, $\times 400$).

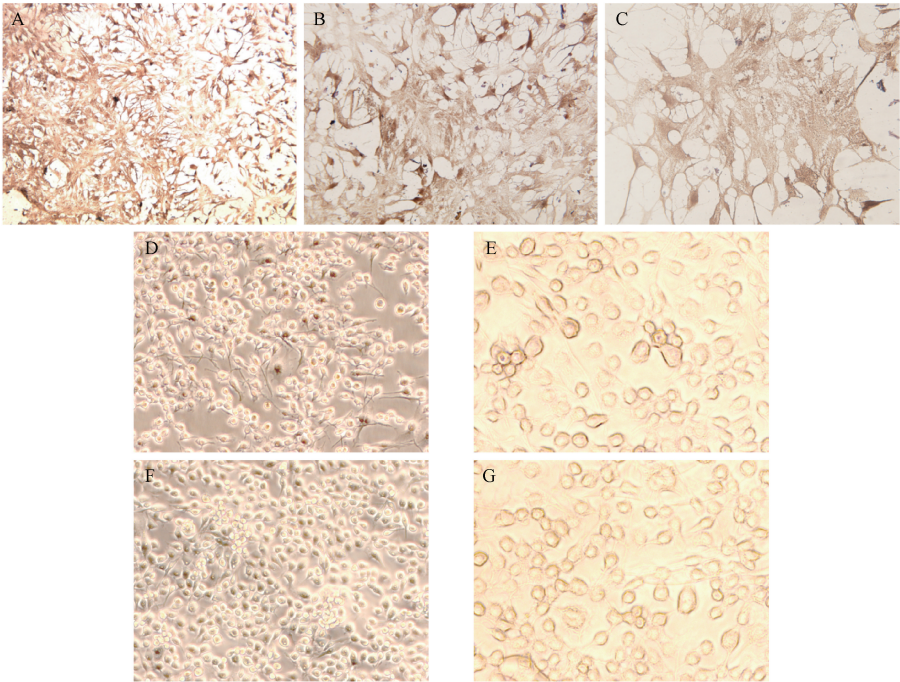
Figure 1 Morphology of the primary cultured neonatal rat cerebral cortical astrocytes

胞的生长情况与文献报道一致^[7]。分离的星形胶质细胞在接种后的 3 ~ 5 h 内就能贴壁生长,呈椭圆形、梭形等,1 d 后所有细胞均已贴壁生长,培养 2 ~ 4 d 观察可见细胞长出细小的胞突,5 ~ 6 d 时细胞数量逐渐增多。培养至 9 ~ 14 d 时星形胶质细胞已完全融合,观察可见大量的星形胶质细胞铺满培养瓶的底部且融合成单层,对其进行传代培养。传代培养的星形胶质细胞具有较强的分裂能力,在传代后的 4 ~ 5 d 可融合,传代的星形胶质细胞胞体较大形状不规则,最后细胞突起相连成星形胶质细胞典型的网络状结构,连续传代 3 ~ 4 次可得到

纯度较高的星形胶质细胞。(图 1)

2.2 细胞鉴定

GFAP 为成熟星形胶质细胞的特异性标记物,是骨架蛋白。GFAP 鉴定结果显示:阳性产物呈棕黄色,主要分布于胞质中,胞核未着色。随机选择 6 个视野,分别计数 200 个细胞,阳性细胞数 95% 以上,证明采用上述方法获得的为星形胶质细胞,纯度较高可用于后续试验。如图 2 所示,A-C 为星形胶质细胞的 GFAP 鉴定结果,D 与 E 为 RSC96 细胞的 GFAP 鉴定结果,F 与 G 为 RSC96 添加 PBS 的鉴定结果。



注:A~C:星形胶质细胞(×100、×200、×400);D~G:大鼠雪旺细胞(×200、×400、×200、×400)。

图2 免疫组织化学鉴定 GFAP 染色的传代星形胶质细胞

Note. A-C, Astrocytes (×100, ×200, ×400). D-G, RSC96 cells (×200, ×400, ×200, ×400).

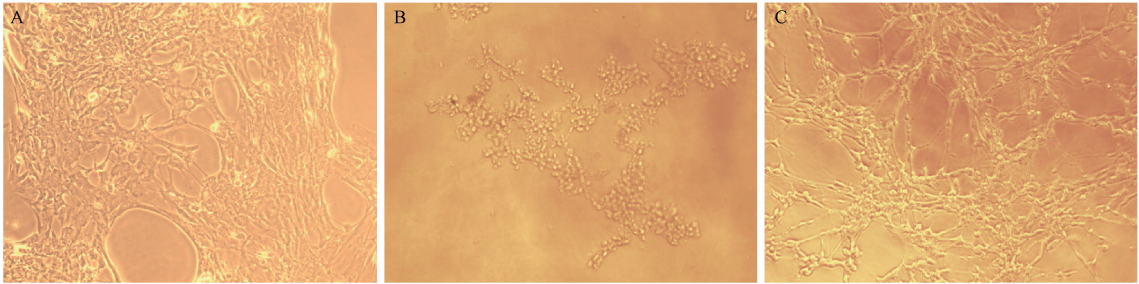
Figure 2 Subcultured astrocytes identified by immunohistochemistry GFAP staining

2.3 13-MTD 对 OGD/R 模型处理后星形胶质细胞形态影响

对照组星形胶质细胞经传代培养 4 ~ 5 d 后,细胞突起相连成星形胶质细胞典型的网络状结构;模型组星形胶质细胞胞体肿胀、缩小,折光性下降,突起收缩,甚至脱落、崩解,存活率明显下降;13-MTD 处理组细胞的损伤程度明显减轻,细胞形态基本完整,星形胶质细胞胞突出现轻度收缩,细胞存活率提高。(图 3)

2.4 13-MTD 对星形胶质细胞线粒体活性影响

MTT 结果显示:与对照组相比,模型组星形胶质细胞的 MTT 代谢率明显降低($P < 0.01$),表明线粒体活性降低;与模型组相比,13-MTD 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ 均可显著增加星形胶质细胞的 MTT 代谢率($P < 0.01$),表明细胞线粒体活性增高,并存在剂量依赖性($P < 0.01$),以 M80 组的 MTT 代谢率最高,线粒体活性最高($P < 0.01$)。(图 4)

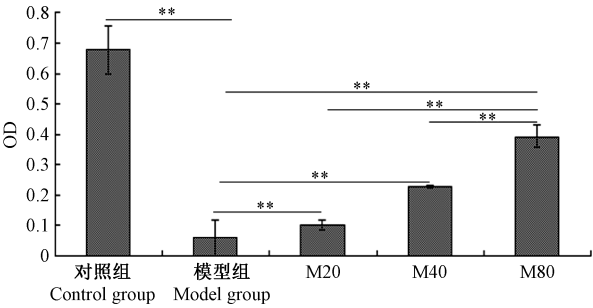


注:A:对照组;B:模型组;C:M80 组。

图 3 OGD/R 处理后,不同培养组新生大鼠大脑皮层星形胶质细胞形态比较 (×200)

Note. A, Control group. B, Model group. C, M80 group.

Figure 3 Comparison of the morphology of subcultured neonatal rat cerebral cortical astrocytes in different groups after treatment with OGD/R (×200)



注:各分组相比较, ** $P < 0.01$ 。

图 4 比较不同 OGD/R 损伤后新生大鼠大脑皮质星形胶质细胞线粒体还原性的 OD 值 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with each groups, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Comparison of the OD values of the mitochondrial reducibility of subcultured neonatal rat cerebral cortical astrocytes injured by OGD/R ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.5 13-MTD 对 AQP4 蛋白表达影响

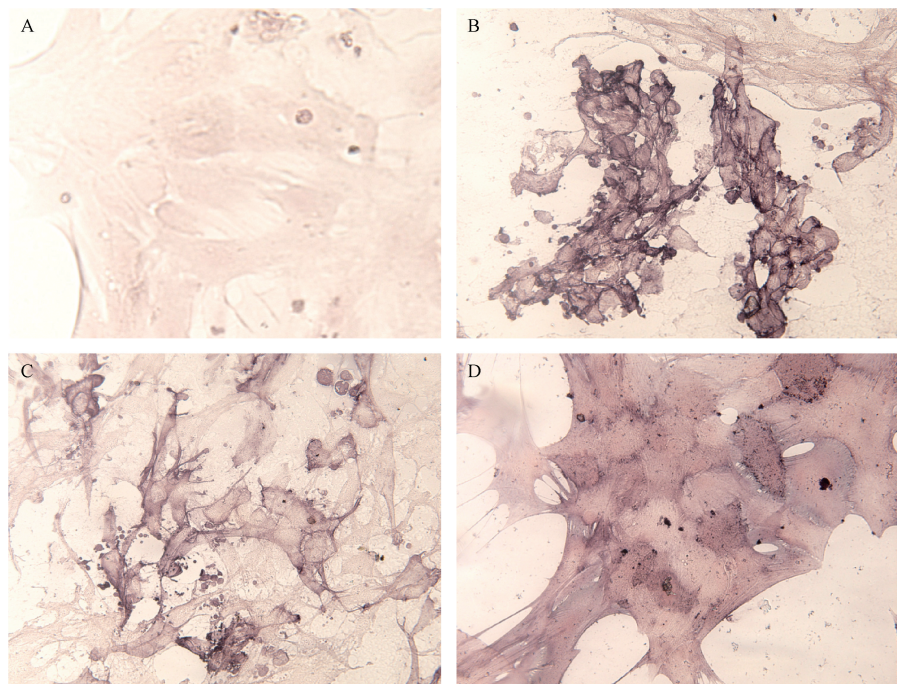
AQP4 蛋白表达呈阳性的细胞呈黑色,主要分布在细胞膜上,胞质未着色。对照组未见阳性细胞;模型组 AQP4 蛋白阳性细胞 IOD 值显著增强 ($P < 0.001$);与模型组比较, M40, M80 组均可使 AQP4 蛋白阳性细胞 IOD 值降低 ($P < 0.001$),提示 AQP4 蛋白表达减少,以 M80 改善效果为好,存在显著剂量依赖性 ($P < 0.001$)。(图 5,6)

3 讨论

本课题组前期实验已证明 13-MTD 对于 ICRI 有保护作用^[4-5,8],而星形胶质细胞作为神经血管单元的重要组成部分,维持着整个中枢神经系统正常运转。在缺血性脑损伤时,对维持脑组织正常功能十分重要。AQP4 是脑内分布最广的水通道蛋白^[9],对于脑内水的代谢和调节起着重要作用,主要在星形胶质细胞终足和室管膜区高度表达而在

神经元上未见,血管内皮生长因子可诱导星形胶质细胞分布在受损部位的中心和周围,提示星形胶质细胞在受损部位调节水分子出入^[10],减少星形胶质细胞上 AQP4 蛋白的表达可能会有有效的减轻因缺血缺氧引起的细胞水肿。Nicchia 等^[11]应用 RNA 干扰技术抑制培养的星形胶质细胞上 AQP4 的表达,发现可以延迟星形胶质细胞的水中毒时间,并且 RNA 干扰 AQP4 的表达时间与缺血相关基因葡萄糖转运体 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 和己糖激酶相关,说明 AQP4 可能参与缺血诱导的脑水肿。目前对缺血缺氧损伤后 AQP4 与脑水肿发生的关系研究大多都集中在体内,由于体内环境较复杂并受到多种因素的影响,个体差异性较大,难以观察单因素对 AQP4 表达与脑水肿关系的准确结果。

本实验反复摸索星形胶质细胞的培养条件,通过对星形胶质细胞标志蛋白 GFAP 进行鉴定,成功分离并培养出了新生 SD 大鼠脑皮层星形胶质细胞,并建立体外培养的星形胶质细胞的 OGD 10 h/R 24 h 模型,通过观察星形胶质细胞氧反常损伤后的形态、线粒体活性改变,以及星形胶质细胞胞膜上 AQP4 蛋白的表达变化,探讨 13-MTD 的保护作用。复制 OGD 10 h/R 24 h 模型后,采用 MTT 法测定 13-MTD 对各实验组星形胶质细胞的线粒体活性的影响,结果显示,与对照组相比,模型组星形胶质细胞的 MTT 代谢率明显降低 ($P < 0.01$),表明线粒体活性降低;与模型组相比,13-MTD20,40,80 $\mu\text{g/mL}$ 均可显著增加星形胶质细胞的 MTT 代谢率 ($P < 0.01$),表明细胞线粒体活性增高,并存在剂量依赖性 ($P < 0.01$),以 M80 组的 MTT 代谢率最高,线粒体活性最高 ($P < 0.01$)。细胞免疫组化结果显示,对照组未见 AQP4 表达阳性的细胞,模型组可见细

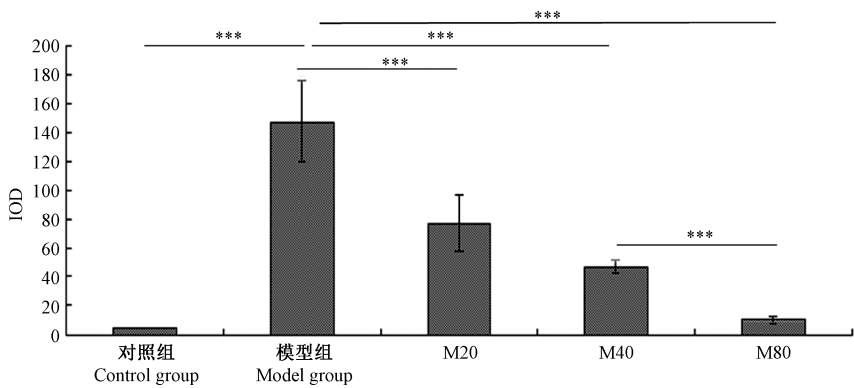


注:A:对照组;B:模型组;C:M40 组;D:M80 组。

图 5 OGD/R 损伤后,培养的新生大鼠大脑皮质星形胶质细胞 AQP4 蛋白阳性染色比较($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, $\times 400$)

Note. A, Control group. B, Model group. C, M40 group. D, M80 group.

Figure 5 Comparison of the AQP4 protein-positive subcultured neonatal rat cerebral cortical astrocytes injured by OGD/R. ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, $\times 400$)



注:各分组相比较,*** $P < 0.001$ 。

图 6 OGD/R 损伤后,比较培养新生大鼠大脑皮质星形胶质细胞缺血再灌注后 AQP4 蛋白的 IOD 变化($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Note. Compared with each groups, *** $P < 0.001$.

Figure 6 Comparison of the IOD values of AQP4 proteins in the subcultured neonatal rat cerebral cortical astrocytes injured by OGD/R($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

胞膜上 AQP4 大量表达的阳性细胞,给予 13-MTD 20,40,80 $\mu\text{g/mL}$ 干预后,AQP4 表达阳性细胞 IOD 值降低,以上结果提示我们,13-MTD 对星形胶质细胞的氧反常损伤均有保护作用,各剂量间存在明显差异性,以 80 $\mu\text{g/mL}$ 效果最好。可见不同剂量的

13-MTD 可有效维持体外培养的星形胶质细胞正常形态、下调星形胶质细胞胞膜上 AQP4 表达。

上述结果提示我们,13-MTD 可通过降低 OGD/R 后 AQP4 蛋白的表达减轻星形胶质细胞水肿,提高线粒体活性,维持星形胶质细胞正常形态,并呈

剂量依赖性。

参 考 文 献(References)

- [1] Cummins CS, Moss CW. Fatty acid composition of *Propionibacterium propionicum* (*Arachnia propionica*) [J]. Int J Syst Bacteriol, 1990, 40(3): 307–308.
- [2] Faung ST, Chiu L, Wang CT. Platelet lysis and functional perturbation by 13-methyl myristate. The major fatty acid in *Flavobacterium ranacida* [J]. Thromb Res, 1996, 81(1): 91–100.
- [3] 曹会兰, 权美平. 13-甲基肉豆蔻酸药理活性研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(4): 57–59.
Cao HL, Quan MP. Research progress on pharmacological activity of 13-methyltetradecanoic acid [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2013, 35(4): 57–59.
- [4] 余涓, 胡桂芳, 翁绳美, 等. 13-甲基十四烷酸对氧反常诱导大鼠胚胎皮质神经元凋亡和形态学损伤的保护作用 [J]. 解剖学报, 2015, 46(1): 25–31.
Yu J, Hu GF, Weng SM, et al. Protective effects of 13-methyltetradecanoic acid on the apoptosis of rat embryonic cortical neurons and the morphological damage induced by oxygen paradox [J]. Acta Anat Sin, 2015, 46(1): 25–31.
- [5] 余涓, 胡桂芳, 翁绳美. 13-MTD 对氧反常诱导的 SH-SY5Y 神经细胞损伤的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2010, 26(4): 347–352.
Yu J, Hu GF, Weng SM. Effects of 13-MTD on the injury of cultured SH-SY5Y neural cells in vitro induced by the oxygen paradox [J]. Chin J Neuroanat, 2010, 26(4): 347–352.
- [6] 李玲, 陶玉倩, 李扬, 等. 尿激酶型纤溶酶原激活物及其抑制物-1 表达于脑微血管改变的实验研究 [J]. 中华老年医学杂志, 2005, 24(6): 453–456.
- Li L, Tao YQ, Li Y, et al. The changes in brain microvasculature and the expression of uPA and PAI-1 in ischemic foci and perifocal areas after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. Chin J Geriatr, 2005, 24(6): 453–456.
- [7] 于秀菊, 高淑媛, 程笏琪, 等. HGF/c-met 在小鼠毛囊生长周期中的表达 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(4): 406–409
Yu XJ, Gao SY, Cheng JQ, et al. Expression of hgf/c-met in the hair follicle growth cycle in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(4): 406–409
- [8] Yu J, Yang LN, Wu YY, et al. 13-Methyltetradecanoic acid mitigates cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2016, 11(9): 1431–1437.
- [9] Simard JM, Kent TA, Chen M, et al. Brain oedema in focal ischaemia: Molecular pathophysiology and theoretical implications [J]. Lancet Neurol, 2007, 6(3): 258–268.
- [10] Suzuki R, Okuda M, Asai J, et al. Astrocytes co-express aquaporin-1, -4, and vascular endothelial growth factor in brain edema tissue associated with brain contusion [J]. Acta Neurochir Suppl, 2006, 96: 398–401.
- [11] Nicchia GP, Frigeri A, Liuzzi GM, et al. Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology, growth, and water transport and induces changes in ischemia-related genes [J]. FASEB J, 2003, 17(11): 1508–1510.

[收稿日期] 2018-03-13