

微丝聚合剂重构大鼠脊髓星形胶质细胞骨架对水通道蛋白 4 与 K⁺通道蛋白 4.1 基因表达的影响

杜文佳¹, 党跃修¹, 汪玉良¹, 雷栓虎¹, 黄良增², 汪静², 马靖琳², 安丽萍²

(1 兰州大学第二医院骨科; 2 甘肃省骨关节病重点实验室 730030 甘肃省兰州市)

【摘要】目的:探讨不同浓度微丝聚合剂(Jasplakinolide, JSK)对大鼠脊髓星形胶质细胞水通道蛋白 4(aquaporins-4, AQP4)和 K⁺通道蛋白 4.1(potassium ion channel protein-4.1, Kir4.1)基因表达的影响。**方法:**分离培养原代大鼠脊髓星形胶质细胞并鉴定, 采用浓度为 0.05 μg/ml、0.10 μg/ml、0.20 μg/ml、0.40 μg/ml 的 JSK 干预细胞 2h。噻唑蓝比色法(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium brom, MTT)检测细胞的增殖情况, 激光共聚焦显微镜观察细胞骨架的变化和 Real-time PCR 法检测 AQP4 和 Kir4.1 mRNA 表达的变化。**结果:**0.05 μg/ml、0.10 μg/ml、0.20 μg/ml 和 0.40 μg/ml 浓度的 JSK 在干预细胞 2h 时与空白对照组相比对细胞的增殖无明显差异($P>0.05$), 各浓度间相比无统计学意义。激光共聚焦显微镜观察 0.05 μg/ml、0.10 μg/ml 和 0.20 μg/ml 浓度的 JSK 可以使得微丝空间结构发生重构, 而 0.40 μg/ml 浓度则使细胞微丝发生破坏。Real-time PCR 检测显示, 0.05 μg/ml、0.10 μg/ml、0.20 μg/ml 和 0.40 μg/ml 浓度的 JSK 均能显著降低 AQP4 和 Kir4.1 基因的表达, 并与对照组相比有统计学意义($P<0.05$), 且 0.05 μg/ml、0.10 μg/ml、0.20 μg/ml 和 0.40 μg/ml 浓度间相比也有统计学意义。**结论:**0.05 μg/ml、0.10 μg/ml 和 0.20 μg/ml 浓度的 JSK 可使大鼠脊髓星形胶质细胞微丝发生重构且可以下调 AQP4 和 Kir4.1 基因的表达。

【关键词】星形胶质细胞; 微丝; 增殖

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.06.12

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2014)-06-0555-06

Effects of gene expression of aquaporins-4 and K⁺ ion channel protein-4.1 after cytoskeleton reconstruction by jasplakinolide in rat spinal cord astrocytes/ DU Wenjia, DANG Yuexiu, WANG Yuliang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(6): 555-560

【Abstract】Objectives: To investigate the mRNA expression of aquaporins-4(AQP4) and potassium ion channel protein-4.1(Kir4.1) by different concentration of jasplakinolide(JSK), a microfilament polymerization agent, in spinal cord astrocytes of rats. **Methods:** The primary spinal cord astrocytes from new born rats were extracted and cultured. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium brom(MTT) was used to measure the cytotoxicity of JSK by different concentrations(0.05 μg/ml, 0.10 μg/ml, 0.20 μg/ml and 0.40 μg/ml). The changes of cytoskeleton were monitored under the Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM). The mRNA levels of AQP4 and Kir4.1 were measured after JSK with different concentrations by real-time PCR. **Results:** MTT assay showed no significant difference in 0.05 μg/ml, 0.10 μg/ml, 0.20 μg/ml and 0.40 μg/ml groups compared with control group at 2h. LSCM showed that JSK of 0.05 μg/ml, 0.10 μg/ml and 0.20 μg/ml could remodel the spinal cord astrocyte cytoskeleton, nevertheless, 0.40 μg/ml could damage cytoskeleton. Real-time PCR analysis showed that JSK of 0.05 μg/ml, 0.10 μg/ml, 0.20 μg/ml and 0.40 μg/ml concentrations could significantly decrease the gene expression of AQP4 and Kir4.1, which was statistically significant compared with control group($P<0.05$). Furthermore, there were significant differences among 0.05 μg/ml, 0.10 μg/ml, 0.20 μg/ml and 0.40 μg/ml groups. **Conclusion:** JSK of 0.05 μg/ml, 0.10 μg/ml and 0.20 μg/ml can remodel the cytoskeleton and decrease the mRNA expression of AQP4 and Kir4.1.

基金项目: 甘肃省技术研究与开发专项计划项目(编号 1004TCYA028), 兰州大学第二医院 2010 年度院内科研项目(编号 YJ2010-48)

第一作者简介: 男(1980-), 医学硕士, 研究方向: 脊髓损伤与骨肿瘤

电话: (0931)8942077 E-mail: dwj780515@163.com

通讯作者: 党跃修 E-mail: dangyuexiu@sohu.com

【Key words】Astrocytes; Microfilament; Proliferation

【Author's address】Department of Orthopedics, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, 730030, China

脊髓损伤后损伤区组织中的星形胶质细胞 (astrocytes, AST) 会发生肥大和水肿^[1], 并且此过程中水通道蛋白 4 (AQP4) 与 K⁺通道蛋白 (Kir4.1) 的高表达发挥了重要作用^[2,3]。近期有学者报道细胞骨架的重构也参与了 AST 的水肿过程, 但目前尚无 AST 细胞骨架重构与 AQP4 和 Kir4.1 表达关系的报道。本研究应用微丝聚合剂 (Jasplakinolide, JSK) 重构 AST 细胞微丝结构后, 研究细胞骨架重构对 AQP4 和 Kir4.1 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级新生 2~3d SD 大鼠, 由甘肃中医学院动物实验中心提供 (动物质量合格证号 SCXK 甘 2004-0006-152)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12 (Dulbecco's modified eagle medium containing F12) 培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和胰蛋白酶 (Gibco 公司); 青/链霉素 (华北制药股份有限公司); 阿糖胞苷 (上海华联制药有限公司); Jskplakinolide (美国 Enzo 公司); 胶质细胞原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 兔多克隆抗体 (美国 Proteintech Group 公司); 羊抗兔 IgG-FITC (北京中杉公司); 多聚赖氨酸和 Triton-X 100 (Sigma 公司); Trizol、逆转录试剂盒、实时定量 PCR 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司); 实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司); 二氧化碳培养箱 (Sanyo 公司)。

1.3 星形胶质细胞的培养

取新生 SD 大鼠 10 只, 用 75% 的酒精浸泡 5min 后移至超净工作台, 在无菌条件下分离出脊髓组织, DMEM 培养液清洗 1 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶, 在 37℃ 下消化 15min, 用完全培养液终止消化。反复吹打后, 1500rpm, 离心 10min, 弃上清, 200 目筛网过滤后加入 DMEM-F12 培养基 (含 10% FBS), 加入完全培养基, 重悬细胞, 将其接种至 25cm² 培养瓶中, 差速贴壁以除去成纤维细胞。将细胞转移至 5% CO₂、37℃ 培养箱中, 培养 48h

后换液, 以后每隔 3d 换液 1 次, 待细胞融合成单层并铺满瓶底后, 传代培养。

1.4 星形胶质细胞的鉴定

取 P2 代细胞, 以每孔 3×10³ 个细胞接种于 96 孔板, 培养 12h 后, 弃培养液, PBS 清洗 2 次, 加 200μl 预冷甲醛, 37℃ 固定 20min; PBS 清洗 3 次, 加入 200μl PBS-T, 4℃ 处理细胞 10min 后移除 PBS-T 液, PBS 清洗细胞 5min; 加入 200μl PBS-B 液, 37℃ 下处理细胞 30min。加入 GFAP 一抗 100μl, 4℃ 下孵育过夜, PBS 清洗 5min; 加 150μl 羊抗兔 FITC 标记二抗, 37℃ 孵育 1h; 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5min; 封片, 于荧光显微镜下观察并拍照, 阳性信号为绿色荧光。

1.5 不同浓度 JSK 对细胞增殖的影响

将第 2 代星形胶质细胞以 3×10³/ml 浓度接种于 96 孔板, 培养 24h 后, 分别换入含不同浓度微丝聚合剂 JSK (0.05μg/ml、0.10μg/ml、0.20μg/ml 和 0.40μg/ml) 的完全培养液, 同时设立空白对照组。继续培养 2h, 弃去上清液, 每孔加入无血清的 DMEM/F12 培养液 100μl, 0.5% MTT 10μl, 每孔加入 100μl 的 DMSO, 振荡 10min, 酶标仪 570nm 波长检测吸光度值 (OD)。存活率 (%) = (干预组 OD 值 - 空白组 OD 值) / 空白组 OD 值 × 100%。

1.6 不同浓度 JSK 对细胞骨架的影响

将第 2 代星形胶质细胞以每孔 5×10⁵ 接种于 24 孔细胞培养板内进行细胞爬片, 24h 后分别换含有浓度为 0.05μg/ml、0.10μg/ml、0.20μg/ml 和 0.40μg/ml 微丝聚合剂 JSK 的完全培养基, 空白对照孔正常换液, 继续培养 2h 后弃培养液, PBS 清洗 3 次, 每孔加入 4% 多聚甲醛 1ml, 室温固定 20min。采用 10μg/ml 的鬼笔环肽, 37℃ 下染色 1h, PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5min, 加入 10μg/ml 的 Hoechst 33342 室温染色 15min, PBS 清洗 3 次, 抗荧光淬灭封片剂封片后, 激光共聚焦显微镜下观察, 拍照。

1.7 不同浓度 JSK 对基因表达的影响

0.05μg/ml、0.10μg/ml、0.20μg/ml 和 0.40μg/ml 浓度的 JSK 处理第 2 代大鼠脊髓星形胶质细胞 2h 后提取细胞总 RNA, 测定其在 260nm、280nm、

320nm 处的吸光度值,计算浓度,并用 2%琼脂糖电泳检测其完整性。调整总 RNA 的浓度至 50ng/ μ l,按照美国 Invitrogen 公司提供的 RT reagent Kit 配制 20 μ l 反应体系将其反转录为 cDNA;使用 Real-time PCR 试剂盒配制 20 μ l PCR 反应体系,采用实时荧光定量 PCR 法检测 AQP4 和 Kir4.1 基因的表达。反应条件:95℃预变性 30s,95℃变性 5s,60℃退火 31s,共进行 40 个循环,每次延伸结束后采集荧光信号,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对基因表达进行定量分析,所有实验重复三次,引物序列详见见表 1。

1.8 统计学分析

检测结果以均数 $\pm$ 标准差 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组均数比较采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析(ONE-WAY ANOVA)方法,组间比较选用 LSD 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

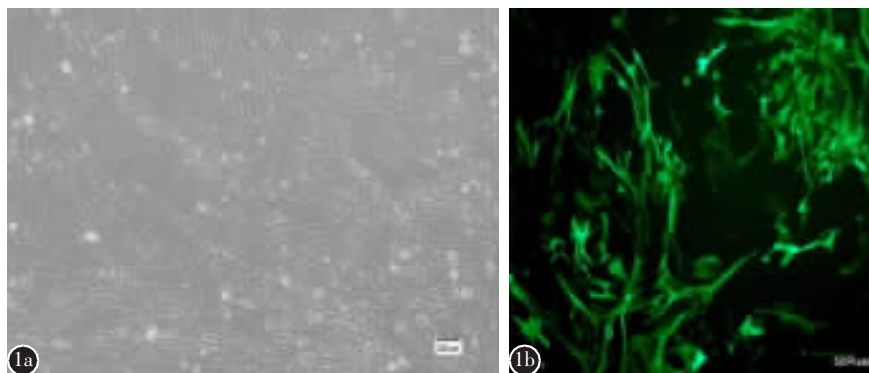


图 1 大鼠星形胶质细胞体外培养及鉴定(10 $\times$ 10) **a** 大鼠星形胶质细胞倒置相差显微镜观察示细胞胞体较大,具有短而粗大的突起,形态不规则,轮廓较清晰($\times$ 100) **b** GFAP 免疫荧光染色鉴定为阳性绿色荧光($\times$ 400)

Figure 1 The identification and culture of rat astrocytes (10 $\times$ 10) **a** The morphology of rat astrocytes under the phase contrast microscope showed: cell body was big, with short and thick, irregular shape and with a clear contour($\times$ 100) **b** The identification of rat astrocytes stained by von Kossa showed positive green fluorescent($\times$ 400)

0.40 μ g/ml、0.80 μ g/ml 和 1.00 μ g/ml 组与空白对照组比较,星形胶质细胞的存活率均有降低,且 0.80 μ g/ml 和 1.00 μ g/ml 浓度组与空白对照组比较有统计学差异($P<0.05$);JSK 作用 12h 和 24h 时,0.05 μ g/ml、0.10 μ g/ml、0.20 μ g/ml、0.40 μ g/ml、0.80 μ g/ml 和 1.00 μ g/ml 组与空白对照组比较,星形胶质细胞的存活率又显著降低,与空白对照组比较均存在统计学差异($P<0.05$,表 2)。

2.3 JSK 对星形胶质细胞骨架的影响

倒置相差显微镜下观察,空白对照组细胞胞体较大,呈星形或多角形,胞突较多较长,胞核圆

2 结果

2.1 大鼠星形胶质细胞的培养及鉴定

P2 代大鼠脊髓星形胶质细胞,GFAP 蛋白经细胞免疫荧光染色,鉴定证实为星形胶质细胞,阳性率达 95% 以上。倒置相差显微镜观察发现 GFAP 阳性细胞胞体较大,具有短而粗大的突起,形态不规则,轮廓较清晰(图 1)。

2.2 JSK 对星形胶质细胞增殖的影响

JSK 作用 2h 时,0.05 μ g/ml、0.10 μ g/ml、0.20 μ g/ml、

表 1 引物序列表
Table1 Primer Sequences

Gene	Primer Sequences	Length
AQP4	Forward:5'-AGAGCATCATGCTGGCTTTC-3' Reverse:5'-CAAAGCAGAGGGAGATGAGG-3'	205bp
Kir4.1	Forward:5'-CAAAGAAAGAGGCTGAGACG-3' Reverse:5'-TTGAGCCGAATATCCTCACC-3'	211bp
GAPDH	Forward:5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3' Reverse:5'-ATGCTGCTGAAGACGCCAGTA-3'	143bp

表 2 不同浓度 JSK 对星形胶质细胞存活率的影响(%)

Table 2 Effects of survival rate on JSK with different concentration in astrocytes($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

分组 Group	存活率(%) Survival rate(%)
对照组 Control group	1.000 $\pm$ 0.012
0.05 μ g/ml	0.973 $\pm$ 0.044 ^①
0.1 μ g/ml	0.948 $\pm$ 0.036 ^①
0.2 μ g/ml	0.928 $\pm$ 0.104 ^①
0.4 μ g/ml	0.908 $\pm$ 0.071 ^①

注:①与对照组比较 $P>0.05$

Note: ①Compared with control group, $P>0.05$

形或椭圆形,常偏于胞体一侧;JSK 干预组星形胶质细胞体积明显减小,呈梭形,胞突数量减少并缩短,胞核区域不明显。对细胞骨架进行荧光然后色后发现,空白对照组细胞微丝骨架排布呈明显极

性,分布均匀;JSK 可使星形胶质细胞微丝骨架发生聚集,呈团状或梭状,但未丧失排布极性(图 2)。

2.4 JSK 对 AQP4 及 Kir4.1 基因的表达的影响

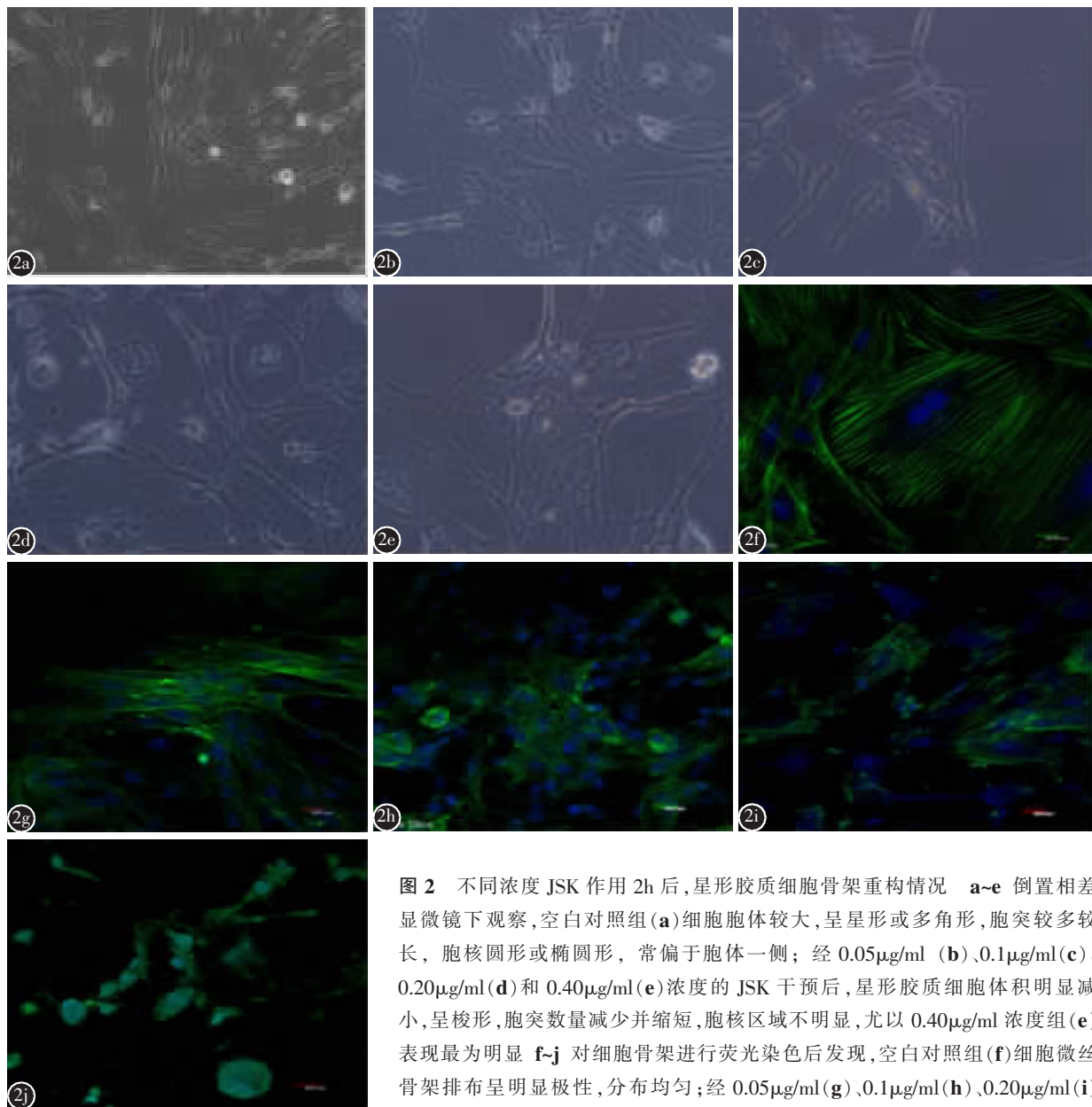


图 2 不同浓度 JSK 作用 2h 后,星形胶质细胞骨架重构情况 a~e 倒置相差显微镜下观察,空白对照组(a)细胞胞体较大,呈星形或多角形,胞突较多较长,胞核圆形或椭圆形,常偏于胞体一侧;经 0.05 μ g/ml (b)、0.1 μ g/ml (c)、0.20 μ g/ml (d) 和 0.40 μ g/ml (e) 浓度的 JSK 干预后,星形胶质细胞体积明显减小,呈梭形,胞突数量减少并缩短,胞核区域不明显,尤以 0.40 μ g/ml 浓度组(e) 表现最为明显 f~j 对细胞骨架进行荧光染色后发现,空白对照组(f)细胞微丝骨架排布呈明显极性,分布均匀;经 0.05 μ g/ml (g)、0.1 μ g/ml (h)、0.20 μ g/ml (i) 和 0.40 μ g/ml (j) 浓度的 JSK 干预后,细胞微丝骨架随浓度聚集逐渐加剧,呈团

状或梭状,但尚未丧失排布极性(×400)

Figure 2 Cytoskeleton remodel by JSK with different concentrations at 2h. Microfilament cytoskeleton arrangement appeared polarity and uniform(a), however, with the increase of JSK concentration, microfilament cytoskeleton gathered, appeared as clumps or fusiform, commonly sited at one side of cell, after intervention by 0.05 μ g/ml (b), 0.1 μ g/ml (c), 0.20 μ g/ml (d) and 0.40 μ g/ml (e) of JSK, the volume of stellate cells decreased significantly, appeared as shuttle type, cell process decreased and shortened, especiallt in 0.40 μ g/ml concentration group, f~j After fluoerescent staining on cell skeleton, the arrangement of microfilament in group f appeared as polarity and even distribution, but decreased significantly after intervention by 0.05 μ g/ml (g), 0.1 μ g/ml (h), 0.20 μ g/ml (i) and 0.40 μ g/ml (j) of JSK, and appeared as shuttle type, but still remained their distribution polarity(×400)

0.05 μ g/ml、0.10 μ g/ml、0.20 μ g/ml 和 0.40 μ g/ml 浓度的 JSK 作用星形胶质细胞 2h 后, AQP4 和 Kir4.1 基因的表达式均显著下调。0.05 μ g/ml、0.10 μ g/ml、0.20 μ g/ml 和 0.40 μ g/ml 浓度的 JSK 组和空白对照组相比有统计学意义 ($P<0.05$), 且 0.20 μ g/ml 浓度 JSK 组与其他组之间相比也具有显著统计学差异 ($P<0.05$, 表 3)。

表 3 不同浓度 JSK 对星形胶质细胞 AQP4 和 Kir4.1 基因表达的影响

Table 3 Effects of gene expression of AQP4 and Kir4.1 by JSK with different concentration ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

	AQP4	Kir4.1
对照组 Control group	1.000 $\pm$ 0.028	1.000 $\pm$ 0.061
0.05 μ g/ml	0.25 $\pm$ 0.017 ^{①②}	0.58 $\pm$ 0.011 ^{①②}
0.10 μ g/ml	0.47 $\pm$ 0.012 ^{①②}	0.71 $\pm$ 0.012 ^{①②}
0.20 μ g/ml	0.53 $\pm$ 0.008 ^{①②}	0.76 $\pm$ 0.014 ^{①②}
0.40 μ g/ml	0.71 $\pm$ 0.007 ^{①②}	0.81 $\pm$ 0.007 ^{①②}

注: ①与对照组比较 $P<0.05$; ②与其他浓度组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with other group, $P<0.05$

3 讨论

细胞骨架不仅可以维持细胞的特定形状和细胞内部结构的有序性, 而且还在细胞的物质运输、能量与信息传递、基因表达、细胞分裂分化及凋亡中担任重要作用^[4]。肌动蛋白微丝构成了细胞骨架的结构基础, 微丝的聚合/解聚对细胞内力学过程具有重要意义。微丝聚合剂 (jasplakinolide, JSK) 主要通过 F-肌动蛋白的一种不可逆稳定剂 Phalloidin 竞争结合 F-肌动蛋白, 而促进肌动蛋白的丝状装配, 进而参与了细胞的诸多功能过程。星形胶质细胞是中枢神经组织中体积最大、数量最多、分布最广的一种神经胶质细胞, 不仅具有在损伤后能够自我修复和再生的能力, 同时还有许多重要的生理功能^[5,6]。

近年的研究发现水通道蛋白 (AQPs) 在组织器官水肿发生的分子机制中可能起着重要作用, 迄今为止已从哺乳动物细胞中发现了 11 种 AQP, 并且 AQP4 被认为是中枢神经系统最主要的 AQP, 不仅大量存在于脑组织中, 同时脊髓组织含量也很高^[2]。目前有学者报道 AQP4 表达异常参与了星形胶质细胞的水肿过程, 并在调节脑的水平衡和脑脊液代谢中起重要作用^[7-9]。内向整

流性钾通道 (Kir4.1) 是钾离子 (K^+) 通道的一个亚类, 其具有强大的 K^+ 内向整流作用, 可以使细胞外的 K^+ 向细胞内转运。在生理状态下 AQP4 介导的水的运输和 Kir4.1 参与的 K^+ 的转运相互协同, 调节细胞内外水分子、 K^+ 的浓度, 两者共同参与维持中枢神经系统内水电解质平衡以及内环境的稳定。大量资料表明, 在病理状态下两者的表达发生了变化。Nagelhus 等^[10]发现在高度恶性肿瘤组织中 Kir4.1 的表达明显增强而 AQP4 不表达或低表达, 并将这一现象称之为“再分布” (redistribution); 而在脑外伤、细菌性脑膜炎和脑肿瘤患者脑组织中, AQP4 与 Kir4.1 的表达部位及表达量也发生了改变; Ding 等^[11]发现, 视网膜缺血后, 组织中 AQP4 与 Kir4.1 的表达降低, 但两者降低幅度并不一致。而上述病变均同时存在脑水肿发生, 提示 AQP4 和 Kir4.1 的再分布可能是病理状态下水肿发生的重要原因。但目前尚无 AST 细胞骨架重构与 AQP4 和 Kir4.1 表达关系的报道。

本研究采用体外实验的方法, 观察 JSK 使得细胞骨架重构, 是否能够调节大鼠脊髓星形胶质细胞水通道蛋白和离子通道基因表达水平的作用, 从而为研究脊髓水肿发生的分子机制提供一定的实验依据。研究结果显示, 促微丝聚合类药物 JSK 对星形胶质细胞的体外增殖具有一定的抑制作用。通过光镜及激光共聚焦显微镜观察, JSK 可使星形胶质细胞体积缩小, 伪足缩短; 并且 JSK 可使星形胶质细胞骨架聚合而发生骨架重构, 但机理尚未阐明。目前, 研究较多的是细胞骨架与心肌 INa 的关系。临床上使用一些作用于细胞骨架的化学物质时, 但常伴随有心血管系统副作用; Berdiev 等^[12]报导, 微丝的长度与 rENaC 的激活时间有关, 因此, 他们认为 PKA 介导的通道磷酸化激活与减慢短肌动蛋白微丝延长速度有关。细胞膜蛋白与胞浆骨架蛋白的相互作用对于维持细胞正常形态, 细胞粘附与信号传导有重要作用。已有文献^[13]报导, ERM 蛋白家族成员 EBP50 (ERM 50kDa) 结合磷酸蛋白, 后者在上皮细胞皮层骨架中的作用是连接膜蛋白与 Ezrin-肌动蛋白骨架。我们推测, JSK 使星形胶质细胞体积缩小的可能机制是通过调整水通道蛋白以及 K^+ 通道基因的表达水平来实现的。实时荧光定量 PCR 结果显示, JSK 可以下调 AQP4 以及 Kir4.1 基因的表达水平。因此, 我们推测细胞骨架对离子通道及膜蛋

白具有调节作用。

本研究是通过微丝聚合剂 JSK 重构星形胶质细胞的细胞骨架,应用形态学及 Real-time PCR 等方法检测了星形胶质细胞 AQP4 以及 Kir4.1 基因表达水平。研究结果提示,应用聚合剂 JSK 后,AQP4 和 Kir4.1 基因表达水平较空白对照组明显下调,并且聚合剂 JSK 使细胞骨架发生了重构。实验还发现,各浓度 JSK 可在 2h 内实现对大鼠脊髓星形胶质细胞 AQP4 和 Kir4.1 表达水平的调控作用,并存在量效关系。因此我们推测,细胞骨架的状态可能影响水通道蛋白以及 K⁺通道基因表达水平重要因素;通过调节细胞骨架状态干预水通道蛋白以及 K⁺通道基因表达水平从而调节水在中枢神经系统细胞内的跨膜运输是有可能的。这些为临床治疗脊髓损伤、脊髓水肿提供了基础实验资料,但相关机制还需利用大鼠星形胶质细胞的氧糖剥夺模型进行进一步的研究。

4 参考文献

1. Sharma G, Vijayaraghavan S. Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intra-cellular stores[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(7): 3631-3632.
2. Emsley JG, Arlotta P, Macklis JD. Star-cross'd neurons: astroglial effects on neural repair in the adult mammalian CNS[J]. *Trends Neurosci*, 2004, 27(5): 238-240.
3. Eddlestone M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes: implications for their role in neurological disease [J]. *Neuroscience*, 1993, 54(1): 15-36.
4. Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling[J]. *Physiol Rev*, 1998, 78(3): 763-781.
5. Adams JC, Watt FM. Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes[J]. *Nature*, 1989, 340(6231): 307-309.
6. Victor VM, Rocha M, De L, et al. N-acetyl cysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells[J]. *Free Radic Res*, 2003, 37(9): 919-929.
7. McConnell NA, Yunus RS, Gross SA, et al. Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(8): 2905-2922.
8. Gohara T, Ishida K, Nakakimura K, et al. Temporal profiles of aquaporin 4 expression and astrocyte response in the process of brain damage in fat embolism model in rats [J]. *J Anesthesia*, 2010, 24(2): 225-233.
9. Zeng HK, Wang QS, Deng YY, et al. Hypertonic saline ameliorates cerebral edema through downregulation of aquaporin-4 expression in the astrocytes[J]. *Neuroscience*, 2010, 166(3): 878-885.
10. Nagelhus EA, Mathiesen TM, Ottersen OP. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with Kir4.1 [J]. *Neuroscience*, 2004, 129(4): 905-913.
11. Ding C, Nandokar P, Lu M, et al. Changes of aquaporins in the lacrimal glands of a rabbit model of Sjögren's syndrome[J]. *Curr Eye Res*, 2011, 36(6): 571-578.
12. Berdiev BK, Prat AG, Cantiello HF, et al. Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments [J]. *Biol Chem*, 1997, 271(30): 17704-17710.
13. Reczek D, Berryman M, Bretscher A. Identification of EBP50: a PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family [J]. *Cell Biol*, 1997, 139(1): 169-179.

(收稿日期:2013-09-01 修回日期:2014-05-05)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)