

·基础研究·

不同介入时间高压氧治疗对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白-4表达的影响*

牛蕾蕾¹ 李红玲^{1,2} 陈玉燕¹ 赵 龙¹

摘要

目的: 观察不同介入时间的高压氧(HBO)治疗对实验性脑出血大鼠出血(ICH)灶周围水肿及水通道蛋白-4(AQP4)表达的影响。

方法: 应用胶原酶诱导法建立大鼠脑出血模型,将185只雄性Wistar大鼠随机分为正常组(5只)、假手术组(60只)、脑出血对照组(60只)和高压氧治疗组(60只),高压氧治疗组按高压氧介入时间不同分为6h介入组、1d介入组、2d介入组和3d介入组4个亚组,每组15只,再按不同的治疗次数分为高压氧治疗后1d、3d、5d组,每个时间点各5只鼠,高压氧治疗压力2.0ATA,稳压吸氧60min,1次/d,与末次高压氧治疗结束后24h处死。所有大鼠饲养在相同环境中,正常组饲养3d后处死,脑出血对照组与假手术组大鼠不进行任何治疗,参照高压氧治疗组进行分组,并于相应时间点断头取脑,采用干湿比重法测定脑组织的水含量,免疫组化法测定AQP4的表达。

结果: 高压氧治疗组及脑出血对照组大鼠脑组织的水含量均高于正常组及假手术组($P<0.05$);高压氧治疗组较脑出血对照组大鼠脑水含量减少($P<0.05$);高压氧治疗组间比较6h介入组较其他治疗组明显减少($P<0.05$);高压氧治疗组及脑出血对照组大鼠出血灶周围AQP4的表达均高于正常组及假手术组($P<0.05$);高压氧治疗组较脑出血对照组大鼠出血灶周围AQP4表达减少($P<0.05$),高压氧治疗组间比较6h介入组较其他组减少明显($P<0.05$)。

结论: HBO治疗可减少出血灶周围脑组织水含量及AQP4表达,介入治疗时间以6h为最优。

关键词 高压氧;介入时间;脑出血;脑水肿;水通道蛋白-4

中图分类号:R743.3,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-09-0810-06

Effects of different therapeutic intervention time of hyperbaric oxygen on perihematomal edema and expression of aquaporin-4 in rats with experimental intracerebral hemorrhage/NIU Leilei, LI Hongling, CHEN Yuyan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(9): 810—815

Abstract

Objective: To study the effect of different therapeutic intervention time of hyperbaric oxygen(HBO) on perihematomal edema and expression of aquaporin-4(AQP4) in rats with intracerebral hemorrhage(ICH).

Method: A total of 185 male Wistar rats were randomly divided as normal group($n=5$), sham operation group($n=60$), ICH control group ($n=60$) and HBO therapy group($n=60$). The collagenase-induced method was used to set up the intracerebral hemorrhage rat models. The HBO therapy was applied at different intervention times (6h,1d,2d or 3d in 4 intervention time subgroups, each subgroup 15 rats) after operation. The HBO therapy was administered by using 100% oxygen at 2.0 ATA in a steady pressure for 60min, once daily. Rats were sacrificed at 24h after 1,3,5 sessions of HBO therapy. The other groups hadn't any treatment. Each intervention time point had 5 rats. The water content of brain tissue was measured by dry-wet method, the expression of AQP4 was detected by immunohistochemical staining.

Result: The brain water content and AQP4 level in the perihematomal area in HBO therapy group and ICH

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.09.003

*基金项目:河北医科大学第二医院内科研基金

1 河北医科大学第二医院,石家庄市,050000; 2 通讯作者

作者简介:牛蕾蕾,女,硕士研究生; 收稿日期:2014-02-26

control group were higher than that in the normal group and the sham group($P<0.05$). HBO therapy group significantly reduced the brain water content and AQP4 level in the perihematomal area compared with ICH control group ($P<0.05$), however, the effect of HBO, which applied at 6h intervention time point, was superior to that applied at 1d, 2d, and 3d intervention time points after ICH($P<0.05$).

Conclusion: HBO therapy can decrease the brain water content and AQP4 level in the perihematomal area. The effect of HBO, intervention 6h, was superior to that at 1d, 2d and 3d.

Author's address The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang City, 050000

Key word hyperbaric oxygen; intervention time; intracerebral hemorrhage; brain edema; aquaporin-4

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是脑卒中的一种类型,世界范围内每年约2百万人发病,在亚洲脑出血占脑卒中的20%—30%,且具有高死亡率^[1](发病1个月内约40%),即使幸存的患者常存在严重的神经功能障碍,因此,脑出血的治疗是目前临床脑卒中治疗的重点。脑水肿是ICH后神经元经受第2次打击的中心环节,也是ICH后继发性脑损伤的主要标志,通过恶化脑组织的血供和神经细胞内环境紊乱等加重神经细胞损伤,因而脑水肿是脑出血患者病情恶化的关键因素^[2]。因此,减轻脑水肿是临床上脑出血治疗的关键环节^[3]。目前脑出血的临床治疗主要包括药物治疗和手术治疗,特别是早期手术减压治疗作为脑出血后挽救患者生命的一种治疗手段已广泛被大家接受,但并没有明确的循证医学证据证明药物及手术对脑出血的治疗是明确有效的^[4-5]。因此,脑出血的治疗成为当今医学面临的一项难题。

1994年,美国科学家Agre教授分离发现了水通道蛋白-4(aquaporin-4, AQP4)^[6]。在中枢神经系统中水通道蛋白4主要分布在星形胶质细胞和室管膜细胞的细胞膜上,其次,也丰富的表达在下丘脑的室旁核、视上核以及口渴中枢的区域^[7]。AQP4主要功能是参与脑组织内水的转运过程^[8],在脑水肿中起着重要作用^[9]。Yan-ting Gu^[10]等通过自体血建立大鼠脑出血模型,发现AQP4参与脑出血后脑水肿的形成,应用AQP4抑制剂可以减轻血肿周围的脑水肿。

高压氧治疗脑出血在临床和基础研究方面已经取得了较好的效果,但其具体的作用机制仍不清楚^[11]。临床研究显示,HBO治疗ICH有肯定疗效,可明显减轻脑出血后患者脑水肿的程度,促进了患者神经功能的恢复,提高了患者的生存质量^[12],是ICH临床

辅助治疗重要手段。研究显示^[13],高压氧治疗对缺血再灌注模型大鼠最佳时间窗为6h,但高压氧介入治疗脑出血的时机问题尚存在争议。大多数学者主张出血2周后开始治疗。目前关于高压氧介入治疗脑出血的时机问题基础研究较少。

本课题组前期研究显示^[14-15],高压氧预处理和不同压力的高压氧治疗均可通过调节AQP4减轻脑水肿,但目前有关高压氧不同介入时间对脑出血后出血灶周围脑水含量和AQP4表达的影响尚未见报道。本实验通过建立大鼠的脑出血模型,研究不同时间点介入高压氧治疗对脑水含量及AQP4变化的影响,以探讨高压氧治疗脑出血的最佳介入时间,并探寻其可能的作用机制,为高压氧治疗脑出血的时机选择提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 主要器材及试剂

大鼠脑立体定向仪(美国Stoelting公司)、高压氧舱(烟台冰轮高压氧舱有限公司YC3200/22VII)、尖头改锥(自制)、Ⅶ型胶原酶(美国Sigma公司)、兔抗大鼠多克隆AQP4抗体(博奥森生物工程有限公司)、免疫组化试剂盒及DAB显色试剂盒(中杉金桥)、医用光学显微镜及BX41显微照相仪。

1.2 实验动物与分组

成年健康雄性Wistar大鼠185只(模型未成功者已除外),体重230—250g,由河北医科大学动物实验中心提供,分笼饲养于河北医科大学第二医院神经病学实验室动物房内,以标准饲料喂养并饮用自来水。185只大鼠于相同环境中饲养3d后随机分为正常组(5只)、假手术组(60只)、脑出血对照组(60只)和高压氧治疗组(60只)。假手术组、脑出血对照组与高压氧治疗组,按不同的高压氧治疗介入

时间分为6h介入组、1d介入组、2d介入组、3d介入组4个亚组,每组15只,再按不同的治疗次数分为高压氧治疗后1d、3d、5d组,每个时间点各5只,制模成功后按不同的介入时间放入高压氧舱内进行治疗,高压氧组进行吸氧治疗,1次/d。余各组不进行任何治疗。正常组大鼠于饲养3d后处死,余各组大鼠分别于不同时间点高压氧治疗结束24h后断头取脑。

1.3 大鼠脑出血模型制备

采用胶原酶Ⅶ定位注射诱发大鼠尾壳核脑出血模型^[16]。大鼠称重后,10%水合氯醛(0.4ml/100g)腹腔内注射麻醉,保证手术操作期间大鼠有自主呼吸,俯卧固定于立体定位仪上,使前后囟位于同一水平。头顶常规备皮消毒,于颅正中矢状切开约1.5cm,盐水棉球擦拭使前囟清晰暴露。依照立体定位图谱进行定位,于前囟后1mm、矢状线右侧3mm处(尾壳核定位处)以尖头改锥于颅骨上钻一直径约1mm的小孔,深达骨膜。将含有0.6U胶原酶Ⅶ/3μl生理盐水微量注射器垂直固定于立体定位仪上,使针头与小孔在同一直线上,进针约6mm(尾壳核位置),然后缓慢匀速推注5min,留针10min,缓慢出针5min,共20min。骨蜡封住颅孔,缝合皮肤切口,再次消毒创处,置于空笼内待大鼠苏醒。假手术组大鼠制备同脑出血大鼠,右侧尾壳核只注入3μl生理盐水。

在大鼠脑出血模型制备后6h观察大鼠行为学变化,按Longa FZ评分法进行评分^[17]:0分,无体征;1分,不能完全伸展进针对侧肢体(左侧);2分,进针对侧肢体瘫痪,向进针对侧转圈,有追尾现象;3分,不能站立向进针对侧倾倒;4分,有意识障碍。2分以上认为造模成功。同时有大鼠脑出血大体标本和病理学证据。见图1—2。

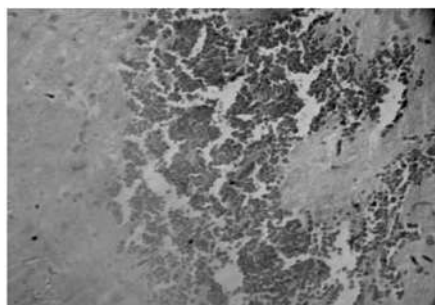
1.4 高压氧治疗

高压氧治疗组大鼠于术后6h评分确定造模成功后于相应的介入时间进舱治疗。将动物置入特制木箱(为便于观察动物,上盖为玻璃)中,箱底设供氧管入口,对角箱底设出气口,采用直排式给氧,流量为10L/min,实验前给氧5min后在出气口测得氧浓度为90%。将木箱置于舱内,压力设定为2.0ATA,加压30min,稳压吸氧60min,吸氧减压30min,匀速加减压,速率约为0.01MPa/min,1次/d。通过观察

图1 大鼠右侧基底核区出血灶



图2 脑出血6h后,大鼠脑出血灶有大量红细胞浸润 (HE,×400)



窗观察舱内动物行为。

1.5 脑组织含水量测定

采用干湿比重法测定出血灶周围脑组织含水量:去除额极后,取病变侧2mm厚脑组织,①将脑组织放入事先称重的锡纸(A)中,然后立即称重,将其重量用(B)表示,B-A即是脑组织湿重;②将脑组织用锡纸包裹,放入烤箱内120℃烘干8h后取出,恢复到室温称重(C),用C-A即是其干重;③将数据代入公式:脑组织含水量=(脑组织湿重-脑组织干重)/湿重×100%,用字母表示为:(B-C)/(B-A)×100%。

1.6 AQP4的测定

各组大鼠于相应时间点处死,断头取脑,经脑表面穿刺点冠状切开标本,取穿刺点后3mm厚脑组织制备石蜡切片,采用免疫组化法观察AQP4的表达,阳性细胞为细胞膜或细胞浆呈棕黄色。采用Image Pro Plus 6.0全自动图像分析系统,测每高倍镜(10×40倍)视野内AQP4的吸光度,每只大鼠选择3张脑组织片,每张切片选3—5个视野,计算各组的平均光密度值OD。

1.7 统计学分析

实验结果用SPSS13.0统计软件进行分析处理。计量资料所有数据以均数±标准差表示,检验水准取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 即认为有显著性意义,应用t检验对两组间的计量资料间均数进行检验,应用

ANOVA对多组计量资料间均数进行方差分析。

2 结果

2.1 大鼠脑组织水含量的变化

假手术组各时间点虽较正常组脑组织水含量(73.49%±0.89%)有升高趋势,但无显著性意义($P>0.05$)。而脑出血(对照组和高压氧组)后各时间点大鼠脑组织水含量均高于正常组(73.49%±0.89%),差异有显著性意义($P<0.05$)。脑出血对照组可观察到脑出血后大鼠的脑组织水含量在脑出血1d开始升高,3d达到高峰,之后逐渐下降。高压氧治疗组较脑出血对照组各时间点脑水含量减少,比较差异有显著性意义($P<0.05$)。高压氧治疗组之间的比较:6h介入组在高压氧治疗1d后,脑组织水含量明显减轻,且这种差异一直持续到高压氧治疗3d、5d后,与1d介入组、2d介入组、3d介入组比较差异均有显著性意义($P<0.05$);1d介入组在高压氧治疗1d后,脑组织水含量同样明显减轻,并持续到高压氧治疗3d和5d后,与2d介入组、3d介入组比较差异均有显著性意义($P<0.05$);但2d介入组与3d介入组脑组织水含量虽然整体有减轻趋势,但两组间差异不明显($P>0.05$)。见表1。

表1 不同组别脑水含量在高压氧治疗不同时间点比较 ($\bar{x}\pm s, n=5, \%$)

组别	高压氧治疗1d	高压氧治疗3d	高压氧治疗5d
HBO 6h组	77.02±0.53 ^②	78.17±0.47 ^②	76.33±0.76 ^②
control+6h	81.17±0.56 ^①	85.38±0.59 ^①	83.30±0.59 ^①
假手术6h组	74.35±0.46	74.41±0.63	74.27±0.57
HBO 1d组	80.57±0.56 ^③	79.36±0.87 ^③	77.92±0.71 ^③
control+1d组	84.80±0.57 ^①	84.16±0.69 ^①	82.01±0.65 ^①
假手术1d组	74.39±0.46	74.36±0.66	74.19±0.64
HBO 2d组	82.74±0.78	80.58±0.52	78.76±0.38
control+2d组	85.26±0.61 ^①	83.81±0.63 ^①	81.54±0.55 ^①
假手术2d组	74.41±0.61	74.28±0.63	74.07±0.38
HBO 3d组	83.03±0.60	81.07±1.09	79.35±0.61
control+3d组	84.28±0.72 ^①	82.42±0.58 ^①	80.60±0.77 ^①
假手术3d组	74.35±0.54	74.19±0.73	73.87±0.80

①与相应高压氧治疗组比较 $P<0.05$; ②与 HBO+1d, HBO+2d 及 HBO+3d 比较 $P<0.05$; ③HBO+2d 及 HBO+3d 比较 $P<0.05$

2.2 大鼠脑组织 AQP4 表达的变化

假手术组各时间点虽较正常组 AQP4 表达 OD 值(0.0758±0.0108)有升高趋势,但无显著性意义($P>0.05$)。而脑出血(对照组和高压氧组)后各时间点大鼠正常组 AQP4 表达 OD 值均高于正常组

(0.0758±0.0108)及假手术组,差异有显著性意义($P<0.05$)。由脑出血对照组可观察到脑出血后大鼠的脑组织 AQP4 表达在脑出血术后1d开始升高,3d达到高峰,之后逐渐下降(图3)。高压氧治疗组各时间点 AQP4 的表达较对照组减少,差异有显著性意义($P<0.05$)。

高压氧治疗组之间比较:6h介入组在高压氧治疗1d后, AQP4 表达明显减少,且这种差异一直持续到高压氧治疗3d、5d后,与1d介入组、2d介入组及3d介入组比较差异均有显著性意义($P<0.05$);1d介入组在高压氧治疗1d后, AQP4 表达明显减少,并持续到高压氧治疗3d、5d后,与2d介入组、3d介入组比较差异均有显著性意义($P<0.05$);但2d介入组与3d介入组比较 AQP4 的表达减少,差异无显著性意义($P>0.05$)。高压氧治疗3d后,各高压氧治疗组间的 AQP4 表达的变化见图4。见表2。

表2 不同组别 AQP4 表达 OD 值在高压氧治疗不同时间点比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	高压氧治疗1d	高压氧治疗3d	高压氧治疗5d
HBO 6h组	0.1525±0.0124 ^②	0.2033±0.0113 ^②	0.1569±0.0121 ^②
control+6h	0.2311±0.0112 ^①	0.3055±0.0112 ^①	0.2742±0.0114 ^①
假手术6h组	0.0780±0.0127	0.0796±0.0119	0.07815±0.0105
HBO 1d组	0.2220±0.0137 ^③	0.2164±0.0158 ^③	0.1727±0.0100 ^③
control+1d组	0.2959±0.0130 ^①	0.2917±0.0126 ^①	0.2569±0.0111 ^①
假手术1d组	0.0790±0.0112	0.0785±0.0114	0.0778±0.0105
HBO 2d组	0.2821±0.0127	0.2460±0.0129	0.1958±0.0113
control+2d组	0.3036±0.0134 ^①	0.2714±0.0140 ^①	0.2409±0.0127 ^①
假手术2d组	0.0792±0.0114	0.0772±0.0113	0.0762±0.0113
HBO 3d组	0.2845±0.0154	0.2497±0.0102	0.1980±0.0105
control+3d组	0.2938±0.0120 ^①	0.2561±0.0139 ^①	0.2291±0.0144 ^①
假手术3d组	0.0787±0.0123	0.0779±0.0104	0.0763±0.0106

①与相应高压氧治疗组比较 $P<0.05$; ②与 HBO+1d, HBO+2d 及 HBO+3d 比较 $P<0.05$; ③HBO+2d 及 HBO+3d 比较 $P<0.05$

3 讨论

本研究显示,假手术组与正常组比较脑水含量及 AQP4 表达有升高趋势但无显著性差异。表明假手术组大鼠的脑组织虽有一定创伤,但未形成明显脑水肿。而脑出血对照组大鼠脑水含量从脑出血后第1天开始升高,出血后3d达到峰值,之后逐渐下降。AQP4 表达与脑组织水含量有较好的一致性,各组于脑出血后1d开始升高,出血后3d达到峰值,之后逐渐下降。进一步验证了 AQP4 参与脑出血后脑水肿的形成,并与脑水肿密切相关。而高压氧治

图3 脑出血对照6h组大鼠脑出血灶周围AQP4免疫组化图片

(×400)

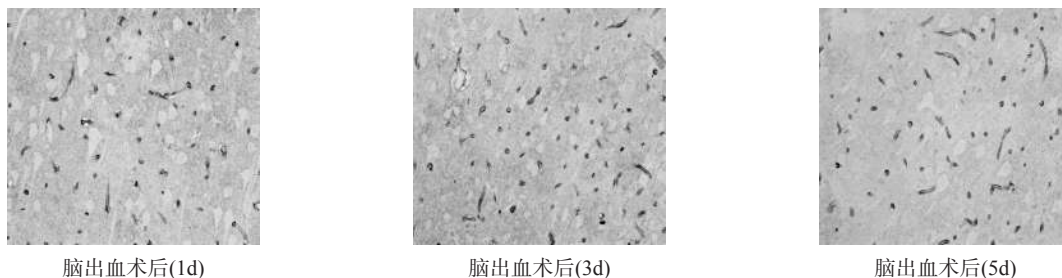
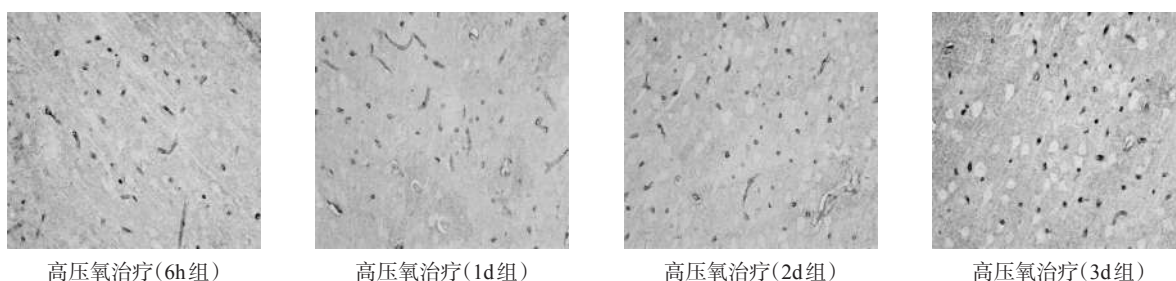


图4 高压氧治疗3天后,高压氧治疗组间大鼠出血灶周围AQP4免疫组化图片

(×400)



疗组较脑出血对照组的脑组织水含量及AQP4表达明显减少($P<0.05$)。表明高压氧治疗可以抑制脑出血大鼠模型出血灶周围AQP4的表达,减轻出血灶周围脑组织的水含量,有利于减轻脑出血后脑水肿。Qin等^[9]通过动物实验发现,高压氧治疗可以减轻脑出血灶周围的脑水肿,考虑其机制可能与热休克蛋白表达水平有关。而Qing WG等^[18]则认为可能与HBO抑制出血灶周围AQP4的表达水平有关。本实验结果进一步验证了高压氧对脑出血后脑水肿有明显的治疗作用,支持上述研究。

本实验发现早期(6h)介入高压氧治疗可明显减轻脑出血后脑水含量,降低AQP4的表达水平,减轻脑水肿。Wang等^[19]关于脑外伤大鼠模型的研究中,发现在脑外伤后3h和6h后分别开始单次高压氧治疗,压力为3.0ATA,吸氧时间为60min,可明显减轻脑损伤,延长到12h后开始高压氧治疗减轻脑损伤的作用较3h和6h开始高压氧治疗的治疗作用减弱,而在脑外伤1d、2d或3d后开使单次高压氧治疗未见明显脑保护作用,因此,脑外伤后进行高压氧治疗时间越早越好。本实验发现,HBO 6h介入组及HBO 1d介入组脑水含量及AQP4表达量较HBO 2d介入组及3d介入组明显减少,且6h组减少较1d组更明显,说明脑出血后6h介入高压氧治疗较脑出血后

1d、2d或3d介入高压氧治疗对脑出血后脑水肿的治疗效果好。本实验结果亦显示早期介入高压氧治疗效果明显优于晚期介入治疗组,其机制可能是早期高压氧治疗抑制AQP4的表达,降低AQP4对血脑屏障的破坏作用^[20],减轻因血脑屏障破坏而引起的血管源性脑水肿有关。因此早期介入高压氧治疗有利于减轻脑出血后的二次损伤。此外,本研究还发现,高压氧2d介入组与3d介入组在高压氧治疗1d、3d和5d后其脑水含量及AQP4表达无明显差别,表明脑出血2d后介入高压氧与脑出血后3d介入高压氧治疗减轻脑水肿的作用基本相同,说明随着高压氧介入时间的延长,其作用效果逐渐减弱。其机制可能随着介入时间的延长,AQP4的大量表达引起血脑屏障的破坏,导致血管源性脑水肿形成^[21],此时高压氧治疗减轻脑水肿的作用减弱。研究发现^[22-23]早期高压氧治疗可以抑制脑组织损伤急性期促炎因子的释放,抑制凋亡基因的表达,增加超氧化物歧化酶的含量,加快自由基的清除,同时还可以增加血管内皮生长因子的生成,促进血管和神经的再生,减轻神经的损伤,促进脑损伤后的神经功能的恢复。另外,高压氧治疗可有效提高脑出血后血肿周围缺血半暗带的氧供,增加线粒体有氧氧化的能力,减轻因无氧代谢增加产生的酸中毒,有利于逆转神经细胞

的损伤^[24]。Wang等^[19]研究发现脑外伤1d,2d后进行高压氧治疗,可通过增加高压氧治疗的疗程,明显增加神经元的数量,改善脑外伤大鼠的受损的神经功能。在脑梗死模型中Jun Mu等^[25]研究发现即脑梗死后48h开始高压氧治疗,增加治疗次数,可以减少梗死灶的体积,提高神经功能评分,并且提高了大鼠的空间记忆能力。因此在脑损伤的治疗中,如开始高压氧治疗的时间较晚可通过增加高压氧的治疗次数,增加高压氧治疗的疗效。

综上所述,AQP4参与了脑出血后脑水肿的形成过程,高压氧作为脑出血的辅助治疗,特别是对于脑出血后继发的脑水肿的治疗方面疗效肯定,且早期介入高压氧治疗可明显减轻脑出血后脑水肿,其机制可能与降低了出血灶周围AQP4表达水平有关。关于HBO治疗脑出血的理想治疗疗程和稳压时吸氧时程本课题组将在后续研究中进行探讨,为临床上HBO在脑出血治疗中的应用提供循证医学证据。

参考文献

- [1] Van Asch CJ, Luitse MJA, Rinkel GJE. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral hemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9: 167—176.
- [2] 陆晖, 肖俊峰. 脑出血后继发血管源性脑水肿的机制研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2007, 5(5): 427—429.
- [3] Staykov D, Wagner I, Volbers B, et al. Natural course of perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2011, 42(9): 2625—2629.
- [4] Adeoye O, Broderick JP. Advances in the management of intracerebral hemorrhage[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 6: 593—601.
- [5] Morgenstern LB, Hemohill JC, Anderson C. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2010, 41: 2108—2129.
- [6] Jung JS, Bhat RV, Preston GM, et al. Molecular characterization of aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (26): 13052—13056.
- [7] Yang M, Gao F, Liu H, et al. Immunolocalization of aquaporin in rat brain[J]. *Anat Histol Embryol*, 2011, 40: 299—306.
- [8] 芮登俊, 赵永波. 水通道蛋白4与脑水肿[J]. *医学教育探索*, 2010, 9(10): 1425—1430.
- [9] Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke[J]. *Nat Med*, 2000, 6(2): 159—163.
- [10] Yan-ting GU, Hua Zhang, Yi-xue Xue. Dexamethasone treatment modulates aquaporin-4 expression after intracerebral hemorrhage in rats. *Neuroscience Letters*, 2007, 413: 126—131.
- [11] Qin Z, Xi G, Keep RF, et al. Hyperbaric oxygen for experimental intracerebral hemorrhage[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 105: 113—117.
- [12] 吕云利, 姚向荣, 廖军, 等. 高压氧治疗高血压脑出血临床疗效[J]. *中国误诊医学杂志*, 2010, 10(19): 4646—4647.
- [13] Min Lou, Christoph C, Eschenfelder. Therapeutic Window for Use of Hyperbaric Oxygenation in Focal Transient Ischemia in Rats[J]. *Stroke*, 2004, 35: 578—583.
- [14] 李红玲, 房金勇, 纪庆红. 高压氧预处理对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白-4 表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2012, 27(3): 211—215.
- [15] 陈玉燕, 李红玲, 牛蕾蕾, 等. 不同压力高压氧对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白4 表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2013, 28(5): 413—417.
- [16] 张磊. 采用Ⅶ型胶原酶构建大鼠脑出血模型[J]. *江汉大学学报 (自然科学版)*, 2009, 37(2): 82—84.
- [17] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20: 84—91.
- [18] Qing WG, DYQ, Ping TQ, et al. Brain edema after intracerebral hemorrhage in rats: the role of iron overload and aquaporin-4[J]. *J Neurosurg*, 2009, 110(3): 462—468.
- [19] Wang GH, Zhang XG, Jiang ZL. Neuroprotective Effects of Hyperbaric Oxygen Treatment on Traumatic Brain Injury in the Rat[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2010, 27: 1733—1743.
- [20] Verkman AS. More than just water channels unexpected cellular roles of aquaporins [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118: 3225—3232.
- [21] Warth A, Simon P, Capper D, et al. Expression pattern of the water channel aquaporin-4 in human gliomas is associated with blood brain barrier disturbance but not with patient survival[J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85: 1336—1346.
- [22] Lin KC, Niu KC, Tsai KJ, et al. Attenuating inflammation but stimulating both angiogenesis and neurogenesis using hyperbaric oxygen in rats with traumatic brain injury[J]. *J Trauma*, 2012, 72(3): 650—659.
- [23] Lim SW, Wang CC, Wang YH. Microglial activation induced by traumatic brain injury is suppressed by postinjury treatment with hyperbaric oxygen therapy. *Journal of surgical research*, 2013, 184: 1076—1084.
- [24] Sun L, Strelow H, Mies G, et al. Oxygen therapy improves energy metabolism in focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res*, 2011, 1415: 103—108.
- [25] Mu J, Ostrowski RP, Soejima Y, et al. Delayed hyperbaric oxygen therapy induces cell proliferation through stabilization of cAMP responsive element binding protein in the rat model of MCAO-induced ischemic brain injury[J]. *Neurobiology of Disease*, 2013, 51: 133—143.