

· 基础研究 ·

陇中消肿止痛合剂对脊髓损伤后大鼠脊髓中水通道蛋白 4 表达的影响

郭铁峰¹ 刘晓雪² 杜凯然³ 张彦军¹ 罗林钊¹ 李家明² 马平怡² 江翔轩² 邓 强¹

摘要 目的 探索陇中消肿止痛合剂对脊髓损伤后大鼠脊髓中水通道蛋白 4 (AQP-4) 的表达情况及其作用机制。方法 选取成年雄性清洁级 SD 大鼠 175 只, 按照 Allen's 法建立脊髓损伤大鼠模型。造模成功后将其随机分为 7 组, 分别为对照组、假损伤组、模型组、七叶皂苷钠组及陇中消肿止痛合剂高、中、低剂量组 (简称陇中高、中、低剂量组), 每组各 25 只。采取灌胃给药的方式, 根据巴索、比蒂和布雷斯纳汉运动评级 (BBB) 法评分标准, 每隔 3 天观察评分并记录, 总计观察 15 天。在上述 7 组随机分别选取 SD 大鼠 15 只, 提取损伤脊髓样本, 分别采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)、蛋白质免疫印迹 (Western Blot) 及免疫组织化学染色检测 AQP-4 蛋白及基因表达, 并进行统计分析。结果 模型组大鼠 BBB 评分各时间段均低于对照组和假损伤组 ($P<0.05$); 第 3、6、9、12、15 天于七叶皂苷钠组及陇中高、中、低剂量组 BBB 评分均高于模型组 ($P<0.05$); 第 6、9、12、15 天陇中高剂量组 BBB 评分高于七叶皂苷钠组及陇中低剂量组 ($P<0.05$, $P<0.01$); 且第 15 天陇中低剂量组 BBB 评分低于七叶皂苷钠组 ($P<0.05$); 陇中高剂量组第 9、12、15 天 BBB 评分高于陇中中剂量组 ($P<0.01$); 模型组 AQP-4 蛋白及 mRNA 表达高于对照组及假损伤组 ($P<0.05$); 与模型组比较, 七叶皂苷钠组及陇中高、中剂量组 AQP-4 蛋白及 mRNA 表达明显降低 ($P<0.05$); 与七叶皂苷钠组比较, 陇中高、中、低剂量组 AQP-4 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 与陇中高剂量组比较, 陇中中、低剂量组 AQP-4 蛋白及 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。结论 陇中消肿止痛合剂通过抑制 AQP-4 在脊髓组织中的表达, 从而减轻脊髓水肿, 促进神经功能恢复。

关键词 陇中消肿止痛合剂; 脊髓损伤; 水通道蛋白 4; 中药

Effect of Longzhong Xiaozhu Zhitong Mixture on Aquaporin 4 Expression in Spinal Cord of Rats after Spinal Cord Injury

GUO Tie-feng¹, LIU Xiao-xue², DU Kai-ran³, ZHANG Yan-jun¹, LUO Lin-zhao¹, LI Jia-ming², MA Ping-yi², JIANG Shuo-xuan², and DENG Qiang¹ 1 Department 2 of Spinal Bone, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou (730050); 2 Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou (730000); 3 Department of Spinal Surgery, Sanmenxia Hospital of Yellow River, Henan (472000)

ABSTRACT Objective To study the expression of aquaporin 4 (AQP-4) in spinal cord of rats after spinal cord injury with Longzhong Xiaozhu Zhitong Mixture (LXZM) and its mechanism. **Methods** Totally 175 adult male SD rats of clean grade were selected to establish spinal cord injury model according to Allen's method. After successful modeling, the rats were randomly divided into 7 groups: control group, sham-injury group, model group, sodium aescinate saponin group, high, medium, and low dose LXZM groups, 25 rats in each group. The drugs were administered by gastrogavage. According to Basso, Beatty, and Bresnahan Exercise Rating (BBB) criteria, the scores were observed and recorded every 3 days, with a total of 15 days. Fifteen SD rats were

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82060879, No.81860860); 甘肃省重点研发计划项目 (No.20YF3FA014)

作者单位: 1. 甘肃省中医院脊柱骨二科 (兰州 730050); 2. 甘肃中医药大学中医临床学院 (兰州 730000); 3. 黄河三门峡医院脊柱外科 (河南 472000)

通讯作者: 邓 强, Tel: 0931-2687728, E-mail, dengqiang11576@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20221125.345

randomly selected from the above seven groups to extract injured spinal cord samples. AQP-4 protein and gene expressions were detected by RT-PCR, Western Blot, and immunohistochemical staining, and statistical analyses were conducted. **Results** BBB score of model group was lower than that of control group and sham-injury group ($P<0.05$). On the 3rd, 6th, 9th, 12th, and 15th day, BBB scores in sodium aescinate saponin group and each dose LXZM groups were higher than those in model group ($P<0.05$). On the 6th, 9th, 12th, and 15th day, BBB score in high dose LXZM group was higher than that of sodium aescinate saponin group and low dose LXZM group ($P<0.05$, $P<0.01$). On the 15th day BBB score of low dose LXZM group was lower than that of sodium aescinate saponin group ($P<0.05$). BBB score of high dose LXZM group was higher than that of middle dose LXZM group on the 9th, 12th, and 15th day ($P<0.01$). The expressions of AQP-4 protein and mRNA in model group was higher than that in control group and sham-injury group ($P<0.05$). Compared with the model group, the expressions of AQP-4 protein and mRNA in sodium aescinate saponin group and high and middle dose LXZM groups decreased significantly ($P<0.05$). Compared with sodium aescinate saponin group, the expressions of AQP-4 protein and mRNA in high, medium, and low dose LXZM groups decreased ($P<0.05$). Compared with high dose LXZM group, the expressions of AQP-4 protein and mRNA in medium and low dose LXZM groups decreased ($P<0.05$). **Conclusion** LXZM attenuated spinal edema and promoted the recovery of nerve function by inhibiting the expression of AQP-4 in spinal cord tissue.

KEYWORDS Longzhong Xiaozhong Zhitong Mixture; spinal cord injury; aquaporin 4; Chinese herbal medicine

脊柱脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种高致残率、高致死率、低治愈率及高严重并发症的疾病, 被视为是临床常见的外科创伤, 至今仍是医学难题^[1]。SCI 对中枢神经系统的损害最为严重, 历来被认为是世界范围内无法治愈的损伤。目前, 全球 SCI 的患病率每年约为 93 万人^[2], 并且数字仍在上升。目前临床证明有效的 SCI 主要治疗策略首选手术减压治疗; 保守治疗包括传统药物治疗, 细胞疗法^[3]、基因治疗与组织工程^[4, 5]。然而, 这些策略并不能完全修复 SCI, 只可能改善症状和减少并发症。近年来, 中医药辨证施治在治疗 SCI 中体现出自身的优势, 周雨昕等^[6]发现马勇教授经验方脊髓康可通过抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体途径, 减轻脊髓损伤后炎症反应, 从而改善脊髓损伤大鼠运动功能; 林庆宾等^[7]证实了补肾活血汤可通过抑制 Tau 蛋白表达, 增加脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、髓内神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 和神经营养素 3 (neurotrophin-3, NT-3) 蛋白的表达来改善 SCI 大鼠肢体功能, 减轻脊髓组织病理损伤。这些学者的研究体现了中医药治疗 SCI 的优势, 弥补了现阶段 SCI 治疗药物单一的问题, 以此为基础, 在“通督脉, 补气血”中医学理论指导下, 运用甘肃省中医院自制药剂—陇中消肿止痛合剂治疗脊髓损伤。通过既往研究结果证实, 陇中消肿止痛合剂可有效缓解脊髓水肿、改善血液循环、减轻神经根水

肿^[8-10]。有研究证实, SCI 中血脊髓屏障损伤所致连续毛细血管内皮及星形胶质细胞膜上水通道蛋白 4 (aquaporin-4, AQP-4) 的表达变化^[11, 12], AQP-4 是发生血管源性水肿、细胞毒性水肿的主要分子生物学机制之一^[13]。由于大鼠在 SCI 发生后与人类存在相似的症状, 故拟通过巴索、比蒂和布雷斯纳汉运动评级 (Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating, BBB) 法 (功能性通用指标), 观察给予大鼠一定剂量的陇中消肿止痛合剂, 通过与七叶皂苷钠比较及 AQP-4 表达量的相互比较, 探索其临床疗效及作用机制。

材料与方法

1 动物 选择 175 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 200~300 g, 8 周龄, 购自中国农业科学院兰州兽医研究所, 实验动物许可证号: SYXK (甘) 2021-0005。按照标准自由饮食, 温度: 18~22 °C, 湿度: 40%~70%, 适应性喂养 1 周后开始实验。本实验经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准 (No. 2021-045)。

2 药物 陇中消肿止痛合剂组成: 泽兰 75 g 红花 50 g 川芎 50 g 桃仁 50 g 生地黄 50 g 赤芍 50 g 青皮 49 g 木香 30 g 甘草 30 g 水蛭 15 g, 制成母液浓度为 100 mg/mL 的水煎剂, 甘肃省中医院制剂科, 批号: 210713; 七叶皂苷钠片组成: 主要成分为七叶皂苷钠, 30 mg/片, 山东绿叶制药股份有限公司, 生产批号: 2234789。

3 主要试剂及仪器 主要试剂: AQP-4 抗体 (Cell Signaling, 批号: 59678); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (ImmunoWay, 批号: YM3029); 山羊抗鼠 IgG 抗体 (赛默飞世尔科技中国, 批号: A32723); RIPA 裂解液 (Biosharp, 批号: BL509A); 逆转录试剂盒 (TaKaRa, 批号: AHG1528A); Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM; GIBCO, 批号: 8121624); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技股份有限公司, 批号: 21100705); 胰酶 (GIBCO, 批号: 2322962); DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: K225405E); BSA 封闭液 (武汉卡诺斯科技有限公司, 批号: PHYGENE); BCA 蛋白定量试剂盒 (Boster 公司, 批号: AR1350); 二甲苯 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 10023418); 3% 双氧水 (H_2O_2 , 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 10011218); 等渗缓冲液 (tris buffered saline tween, TBST; 北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20220804); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS; 赛默飞世尔科技中国, 批号: 69010707)。

主要仪器: 恒温振荡培养箱 (BJPX-SG170 II, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); 生物光学显微镜 (CX33, 日本 Olympus 公司); 超净工作台 (SW-CJ-2F, 苏州净化设备厂); 电子天平 (FA2204B, 日本岛津产品); 高压蒸汽灭菌器 (BKQ-B50 II, 广州藤佳医疗器械); 漩涡振荡器 (DMT-2500, 江苏金华仪器厂); 数显恒温水浴锅 (HH-80, 江苏金坛宏华仪器厂); 高速冷冻离心机 (KH22R, 美国 Heraeus 公司); 分光光度仪 (752N, 赛默飞世尔科技中国); 冷冻切片机 (3000A, 深圳达科为医疗设备有限公司); 显微器械 (76454, 江苏常州医疗器械有限公司)。

4 方法

4.1 动物分组及 SCI 模型建立 将 SD 大鼠称重编号后, 按随机数字法分为对照组、假损伤组、模型组、七叶皂苷钠组及陇中消肿止痛合剂高、中、低剂量组 (简称陇中高、中、低剂量组), 每组 25 只。除对照组和假损伤组外, 其余大鼠采用 10% 水合氯醛溶液 (0.2 mL/100g) 腹腔注射麻醉。麻醉成功后, 取俯卧位固定在固定台上, 通过计数肋骨定位 T10 胸椎, 剃毛刀剔除术部范围毛发 (面积: 3 cm × 3 cm), 碘伏消毒, 铺无菌手术巾。采用改良 Allen's 法^[13]建立大鼠 T10 脊髓急性挫伤动物模型, 开创暴露脊柱

等步骤的操作手法暴露 T8~10 完整的脊柱节段后, 将事先消毒击打器安装合适, 使用湿棉片覆盖于暴露的脊髓上, 既可以保护硬膜与空气长间接接触, 又可以使击打的力量均匀, 避免一点集中受力。安装撞针再次检验撞针是否可以与脊髓表面充分接触, 然后选择 10 g 的砝码在 14 cm 的高度自由落体 (以上选择的高度和重量均在预实验中得到最优)。以大鼠出现痉挛性摆尾及双下肢不自主猛然跳动, 去掉撞针后发现脊髓表面颜色转变为暗黑色, 并发生水肿作为击打成功标准^[15]。造模后, 冲洗创口, 逐层缝合筋膜、肌肉和表皮, 伤口处涂抹头孢他啶以预防伤口感染。假损伤组大鼠不打击脊髓, 其余手术操作同模型组。将处理好的 SD 大鼠放置在清洁笼子内, 每只笼子放置 3 只老鼠且麻醉醒来时间间隔 <30 min。然后使用暖灯以保持大鼠体温。待大鼠完全清醒后, 观察双下肢的活动度, 对大鼠进行 BBB 评分, 若评分 10 分以下则证实造模成功^[16]。术后 5 天内模型组死亡 2 只, 七叶皂苷钠组死亡 1 只, 陇中高、中剂量组各死亡 1 只, 陇中低剂量组死亡 2 只。根据实验中动物死亡情况再次造模补齐各组数量。

4.2 药物干预方法 陇中消肿止痛合剂按人和动物体表面积折算的等效剂量比值法^[17]计算大鼠的用药剂量。临床中, 每 60 kg 成人每日用量为 60 mL, 根据公式大鼠剂量 (mg/kg) = 系数 (6.25) × 人的剂量 (mg/kg) 得出每 100 g 大鼠每日灌胃剂量为 0.625 mL, 因本实验选用大鼠重量均为 200~300 g, 故将 1.7 mL 灌胃量设置为预实验剂量组, 根据预实验量效曲线, 以 1: 2: 4 为基准, 最终设定陇中高、中、低剂量组。每次将陇中消肿止痛合剂药物剂量和盐水配比达 2 mL, 陇中高、中、低剂量组每天灌胃 3.375、1.70、0.85 mL/kg; 七叶皂苷钠组按照《药理实验方法学》^[18]每天给予七叶皂苷钠片 2.7 mg/kg (加等渗盐水 2 mL 溶解); 对照组、模型组、假损伤组均给予生理盐水 2 mL, 每组灌胃每天 2 次, 连续 15 天。手术操作均在严格无菌条件下进行, 术后大鼠饲养于完全 SPF 级环境中 (甘肃中医药大学 SPF 动物实验室), 温度 18~22℃, 湿度 40%~70%。给予正常食物及水, 均在其彻底苏醒后第 2 天给予膀胱排尿 1~3 天, 直至恢复膀胱建立自主排尿反射。并随时观察是否有伤口感染及死亡的情况, 连续 3 天给予大鼠头孢他啶 0.02 g/kg 腹腔注射, 死亡鼠立即用相同操作建造模型后, 继续观察评分。未完全苏醒的 SD 大鼠分开放置, 以避免互咬导致死亡。每 3 天更换 1 次敷料。

5 观察指标及检测方法

5.1 标本采集 持续灌胃 15 天后, 在 7 组中随机分别选取 SD 大鼠 15 只, 提取脊髓样本。将大鼠用 10% 水合氯醛 (0.2 mL/100g) 腹腔麻醉后, 手术刀从背部切开 3 cm 切口, 用弯钳提起棘突, 剪刀顺着棘突剪开, 逐步剥离脊髓后分别采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)、蛋白质免疫印迹 (Western Blot)、免疫组织化学染色检测脊髓组织中 AQP-4 含量。

5.2 大鼠脊髓组织中 AQP-4 蛋白表达水平 采用 Western Blot 法检测。取冻存于 -80℃ 冰箱中已提取的脊髓组织, 称重 30 mg 于研钵中, 充分研磨后加入 300 μ L RIPA 裂解液, 置于冰块上静置 20 min, 离心 30 min (4℃, 12 000 r/min) 取上清。依据说明书进行蛋白定量及变性。常规电泳、转膜、室温封闭 2 h, AQP-4 一抗 (1:1 000) 4℃ 下孵育 12 h, 1 $\times$ TBST 洗涤 3 次, 山羊抗鼠 IgG 抗体 (1:8 000) 室温孵育 1 h, 1 $\times$ TBST 洗涤 3 次后显影液, 进行曝光, 以 GAPDH 为内参, 所得图片采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行采集并分析图片。

5.3 大鼠脊髓组织中 AQP-4 mRNA 表达 采用实时荧光 PCR 法检测。将所需检测的脊髓组织从 -80℃ 冰箱取出。依据说明书, 运用 Trizol 法提取总 RNA, 依据 RNA 浓度计算方法算出 RNA 浓度 [RNA 样品浓度 (μ g/mL) = OD₂₆₀ $\times$ 40 μ g/mL $\times$ 稀释倍数]。参考所购买的逆转录试剂盒进行逆转录反应, 合成相应 cDNA, 使用荧光定量 PCR 试剂盒进行实时荧光 PCR 反应。内参照基因为 GAPDH。所有的标本都已经被重复检测 3 次。反应结束后使用荧光定量 PCR 仪进行数据处理, 算出各组脊髓组织中 AQP-4 mRNA 相对的表达量。各基因名称、序列及引物长度见表 1。

5.4 大鼠脊髓组织中 AQP-4 表达 采用免疫组化检测。处死大鼠后取脊髓组织, 并将脊髓组织固定于 10% 甲醛中, 24 h 后进行包埋。将包埋好的组织

表 1 基因名称、序列及引物长度

基因名称	序列 (5' $\rightarrow$ 3')	引物长度 (bp)
AQP-4	上游: GGAGACTATTCAGAAGCTAA	20
	下游: GAAGAGCCTGAAGACTGACT	20
GAPDH	上游: GGAGACTATTCAGAAGCTAA	20
	下游: GAAGAGCCTGAAGACTGACT	20

块切成厚度约 4 μ m, 常规脱蜡复水。3% H₂O₂ 去除内源性过氧化物, 滴加枸橼酸盐缓冲液进行抗原修复后加入 5% BSA 封闭液封闭 1 h。滴加 AQP-4 抗体 (稀释比例 1:200), 放置 4℃ 冰箱孵育过夜, PBS 溶液冲洗 3 次, 每次 5 min。加入生物素标记的山羊抗鼠 IgG 抗体, 37℃ 孵育 30 min, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素-生物素复合物 (strept avidin-biotin complex, SABC), 37℃ 孵育 30 min 后用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 用 DAB 试剂显色, 苏木素液复染及中性树胶封片, 封片放置光学显微镜 ($\times$ 200) 下观察蛋白表达变化。

6 统计学方法 应用 SPSS 25.0 统计软件进行统计分析, 计量资料均均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 7 组大鼠 BBB 评分比较 (表 2) 模型组大鼠 BBB 评分各时间段均低于对照组和假损伤组 (P<0.05); 第 3、6、9、12、15 天于七叶皂苷钠组及陇中高、中、低剂量组 BBB 评分均高于模型组 (P<0.05); 第 6、9、12、15 天陇中高剂量组 BBB 评分高于七叶皂苷钠组及陇中低剂量组 (P<0.05, P<0.01); 且第 15 天陇中低剂量组 BBB 评分低于七叶皂苷钠组 (P<0.05); 陇中高剂量组第 9、12、15 天 BBB 评分高于陇中中剂量组 (P<0.01)。

表 2 7 组大鼠 BBB 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	BBB 评分					
		1 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d
对照	15	21.40 $\pm$ 0.05*	21.32 $\pm$ 0.48*	21.36 $\pm$ 0.49*	21.24 $\pm$ 0.44*	21.26 $\pm$ 0.42*	21.12 $\pm$ 0.44*
假损伤	15	21.40 $\pm$ 0.51*	21.36 $\pm$ 0.51*	21.55 $\pm$ 0.52*	21.41 $\pm$ 0.51*	21.55 $\pm$ 0.60*	21.72 $\pm$ 0.60*
模型	15	7.32 $\pm$ 1.55	6.68 $\pm$ 1.86	6.44 $\pm$ 2.77	6.68 $\pm$ 3.17	7.20 $\pm$ 3.75	7.76 $\pm$ 4.17
七叶皂苷钠	15	8.16 $\pm$ 1.95	8.92 $\pm$ 2.47*	9.36 $\pm$ 2.51*	10.84 $\pm$ 2.30*	12.20 $\pm$ 2.12*	13.80 $\pm$ 2.66*
陇中高剂量	15	7.88 $\pm$ 1.01	9.24 $\pm$ 1.83*	11.20 $\pm$ 1.89*	13.36 $\pm$ 2.25* Δ	15.52 $\pm$ 2.50* $\Delta\Delta$	17.20 $\pm$ 2.45* $\Delta\Delta$
陇中中剂量	15	8.28 $\pm$ 1.90	8.48 $\pm$ 2.39* Δ	9.60 $\pm$ 2.55*	10.25 $\pm$ 3.16* $\Delta\Delta$	11.48 $\pm$ 3.28* $\Delta\Delta$	12.40 $\pm$ 3.54* $\Delta\Delta$
陇中低剂量	15	8.58 $\pm$ 1.96	8.88 $\pm$ 2.33*	9.16 $\pm$ 2.61* Δ	9.52 $\pm$ 2.90* $\Delta\Delta$	9.88 $\pm$ 3.09* $\Delta\Delta$	10.16 $\pm$ 3.39* $\Delta\Delta\Delta$

注: 与模型组同期比较, *P<0.05; 与七叶皂苷钠组同期比较, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01; 与陇中高剂量组同期比较, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01

2 7 组大鼠脊髓组织中 AQP-4 mRNA 的表达比较 (表 3) 模型组 AQP-4 mRNA 相对表达高于对照组和假损伤组 ($P<0.05$); 与模型组比较, 七叶皂苷钠组、陇中高、中剂量组 AQP-4 mRNA 相对表达量下降 ($P<0.05$); 与七叶皂苷钠组比较, 陇中高、中、低剂量组 AQP-4 mRNA 相对表达量亦下降, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与陇中高剂量组比较, 陇中中、低剂量组 AQP-4 mRNA 相对表达量升高, 差异亦有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 3 7 组大鼠脊髓组织 AQP-4 mRNA 表达水平

组别	n	AQP-4 mRNA 比较 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $\bar{x} \pm s$)
对照	15	$1.01 \pm 0.20^*$
假损伤	15	$0.93 \pm 0.21^*$
模型	15	2.07 ± 0.51
七叶皂苷钠	15	$1.63 \pm 0.39^*$
陇中高剂量	15	$1.18 \pm 0.19^{*\Delta}$
陇中中剂量	15	$1.42 \pm 0.26^{*\Delta\Delta}$
陇中低剂量	15	$1.47 \pm 0.25^{\Delta\Delta}$

注: 与模型组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与七叶皂苷钠组比较, $\Delta P<0.05$; 与陇中高剂量组比较, $\Delta\Delta P<0.05$

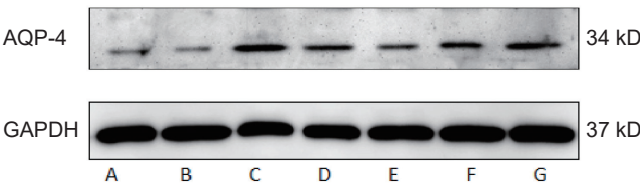
3 7 组大鼠脊髓组织中 AQP-4 蛋白表达比较 (表 4, 图 1) 模型组中的 AQP-4 蛋白相对表达量高于对照组和假损伤组 ($P<0.05$); 与模型组比较, 七叶皂苷钠组及陇中高、中、低剂量组 AQP-4 蛋白相对表达量均下降 ($P<0.05$); 与七叶皂苷钠组比较, 陇中高、中、低剂量组差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 陇中高剂量组 AQP-4 蛋白相对表达量低于七叶皂苷钠组, 陇中中、低剂量组 AQP-4 蛋白相对表达量高于七叶皂苷钠组; 与陇中高剂量组比较, 陇中中、低剂组 AQP-4 蛋白相对表达量差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

4 7 组大鼠脊髓组织中 AQP-4 的免疫组化结果 (图 2) 在显微镜下观测染色的阳性为深色褐色,

表 4 7 组大鼠脊髓组织 AQP-4 蛋白表达比较 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	AQP-4
对照	15	$0.36 \pm 0.04^*$
假损伤	15	$0.33 \pm 0.04^*$
模型	15	0.79 ± 0.05
七叶皂苷钠	15	$0.39 \pm 0.01^*$
陇中高剂量	15	$0.26 \pm 0.02^{*\Delta}$
陇中中剂量	15	$0.50 \pm 0.04^{*\Delta\Delta}$
陇中低剂量	15	$0.53 \pm 0.06^{*\Delta\Delta}$

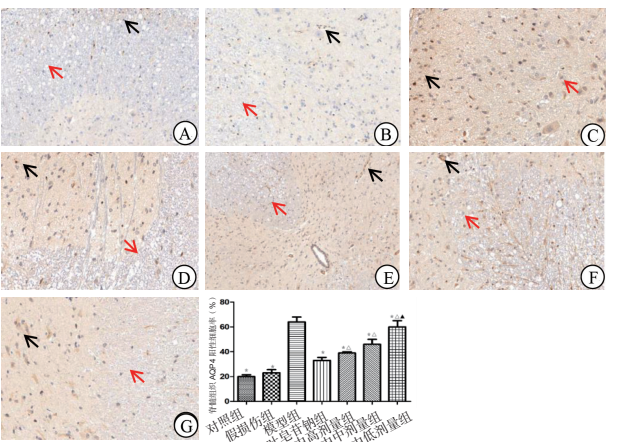
注: 与模型组比较, $*P<0.05$; 与七叶皂苷钠组比较, $\Delta P<0.05$; 与陇中高剂量组比较, $\Delta\Delta P<0.05$



注: A: 对照组; B: 假损伤组; C: 模型组; D: 七叶皂苷钠组; E: 陇中高剂量组; F: 陇中中剂量组; G: 陇中低剂量组

图 1 7 组大鼠 AQP-4 蛋白在脊髓组织内的相对表达量电泳图

细胞核为蓝色。AQP-4 表达由高到低依次为对照组、假损伤组、陇中高剂量组、七叶皂苷钠组、陇中中、低剂量组及模型组。模型组 AQP-4 的蛋白表达明显低于对照组和假损伤组 ($P<0.05$); 与模型组比较, 七叶皂苷钠组和陇中高、中、低剂量组 AQP-4 的蛋白表达均降低 ($P<0.05$); 与七叶皂苷钠组比较, 陇中消肿止痛合剂高、中、低剂量组 AQP-4 的蛋白表达均增高 ($P<0.05$); 陇中高剂量组 AQP-4 的蛋白表达明显高于陇中低剂量组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。



注: A: 对照组; B: 假损伤组; C: 模型组; D: 七叶皂苷钠组; E: 陇中高剂量组; F: 陇中中剂量组; G: 陇中低剂量组; 红色箭头为阴性细胞; 黑色箭头为阳性细胞; 与模型组比较, $*P<0.05$; 与七叶皂苷钠组比较, $\Delta P<0.05$; 与陇中高剂量组比较, $\Delta\Delta P<0.05$

图 2 7 组大鼠脊髓组织 AQP-4 蛋白表达比较 (免疫组化, $\times 400$)

讨论

SCI 是因为外伤、肿瘤等因素导致脊髓组织及神经受到破坏, 血-脊髓屏障 (blood-spinal cord barrier, BSCB) 通透性障碍, 脊髓水肿及神经细胞凋亡, 最终导致人体的运动、感觉等功能丧失。SCI 分为原发性脊髓损伤和继发性脊髓损伤, 前者主要发生在外伤后 20 min 至数小时之内, 导致血管受损、局部缺血、瘀血形成甚至神经胶质细胞、神经元细胞凋亡以及 BSCB 功能紊乱。SCI 主要发生在损伤后

数小时至 48 h 之间, 导致 BSCB 障碍加重, 脊髓水肿、局部缺血坏死, 及炎性浸润, 瘢痕组织形成, 致使细胞功能紊乱甚至细胞凋亡, 最终人体的功能丧失^[19]。目前针对 SCI 治疗仍是困扰世界临床医生的重大难题。SCI 属中医学“体惰”“痿痹”等范畴,《灵枢·寒热病》:“身有所伤, 血出多, 若有所堕坠, 四肢懈惰不收, 名曰体惰”。由此中医学认为 SCI 的病因病机主要是“督脉受损, 气血瘀滞, 枢机不利, 经脉运行受阻, 各脏腑、经络功能联系障碍, 肌肉活动受限”^[20]。遵循治病求因之原则:“疏通督脉, 活血化瘀, 补气行血”^[21]。随着现代科学研究技术在中医药的应用更加印证其准确性和科学性, 中医名家已探索出补阳还五汤、血府逐瘀汤等在治疗 SCI 的临床疗效取得独特的优势, 切实解决患者的病痛。再次证实, 相比于西医治疗, 中医治疗 SCI 具有较大的潜力。

本实验采用甘肃省中医院院内自制药——陇中消肿止痛合剂, 该方为甘肃省中医院的经验方, 运用于临床已达 20 余年, 其活血化瘀、消肿止痛、行气通脉的功效显著。此方以泽兰为君药, 取其活血化瘀、行水消肿之效, 配以当归、川芎化瘀活血, 止痛消肿; 佐之红花、桃仁增强其生新破瘀之功; 合用水蛭逐瘀破血; 配伍青皮、木香, 发挥其行气、止痛、散结之功效; 又因脊髓损伤早期组织渗出、脊髓水肿等病理改变, 辅生地、赤芍凉血消瘀, 减少组织渗出, 消除肿胀; 诸药合用, 各司之功, 行活血化瘀、消肿止痛、行气通督脉之功。现代药理学研究发现, 当归注射液及当归提取物阿魏酸钠能够促进 SCI 大鼠神经干细胞增殖、聚集和分化, 从而诱导 SCI 后神经再生^[22]。敬晓鹏等^[23]研究发现, 川芎素对慢性坐骨神经压迫损伤神经病理性痛有良好的镇痛作用, 其机制可能与上调 γ -氨基丁酸 (γ -amino-butylic acid, GABA) 通路中 GABA、谷氨酸脱羧酶蛋白表达和下调 γ -氨基丁酸转运体-1 蛋白表达相关。研究表明, 三七的活性成分三七总皂苷不仅可以通过上调 SCI 后突触分化诱导基因 1 的表达, 激活突触分化因子, 修复神经系统^[24], 还能通过抑制诱导型一氧化氮合酶及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 蛋白的表达, 减轻细胞损伤, 抑制细胞凋亡^[25]。

水肿是 SCI 后一个重要临床特征^[26]。随着病情的进展, 受损区域的水平衡被破坏, 使受损区域的积水量显著增加, 从而形成组织水肿。有证据^[12]显示 SCI 后数分钟内即可出现细胞水肿, 24 h 内可达高峰, 超过 14 天可导致细胞凋亡、BSCB 破裂及渗漏。AQP-4 在 SCI 中具有重要作用, 其蛋白水平呈双相

变化^[25]。周立亚等^[28]的研究显示, 脊髓急性水肿后 24~48 h 内 AQP-4 表达上调; 药物干预后 AQP-4 表达下降, 脊髓水肿减轻。说明 AQP-4 与 SCI 后脊髓水肿的发生密切相关。以上研究结果提示, AQP-4 转运功能的恢复, 可以增强神经细胞对缺氧、缺血、水肿的耐受性, 维持神经细胞内环境的稳定, 从而抑制神经细胞凋亡^[29]。

在本研究中, 陇中消肿止痛合剂及七叶皂苷钠均改善了大鼠双下肢运动功能障碍, 显著下调了 AQP-4 蛋白的表达, 表明 SCI 后, 损伤处的 AQP-4 mRNA 高表达, 转录加强, 而陇中消肿止痛合剂能够降低损伤处 AQP-4 mRNA 的表达, 抑制其转录, 说明陇中消肿止痛合剂可能通过抑制 AQP-4 的表达, 从而减轻脊髓水肿, 促进大鼠神经功能恢复, 改善 SCI 大鼠的脊髓损伤恢复情况。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Wang HD, Wei ZJ, Li JJ, et al. Application value of biofluid-based biomarkers for the diagnosis and treatment of spinal cord injury[J]. *Neur Regen Res*, 2022, 17 (5): 963-971.
- [2] GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18 (1): 56-87.
- [3] Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, et al. Traumatic spinal cord injury-repair and regeneration[J]. *Neurosurgery*, 2017, 80 (3S): S9-S22.
- [4] Lai BQ, Bai YR, Han WT, et al. Construction of a niche-specific spinal white matter-like tissue to promote directional axon regeneration and myelination for rat spinal cord injury repair[J]. *Bioact Mater*, 2022, 11: 15-31.
- [5] Guo S, Redenski I, Levenberg S. Spinal cord repair: from cells and tissue engineering to extracellular vesicles[J]. *Cells*, 2021, 10 (8): 1872-1878.
- [6] 周雨昕, 马勇, 吴承杰, 等. 基于 NLRP3 炎症小体途径探究脊髓康促进脊髓损伤大鼠修复的机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37 (9): 5385-5389.

- [7] 林庆宾, 陈鹏, 刘宇, 等. 补肾活血汤对脊髓损伤大鼠 Tau 蛋白及神经营养因子表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41 (12): 1851-1856.
- [8] 郭铁峰, 罗林钊, 邓强, 等. 陇中消肿止痛合剂辅助治疗术后不完全性脊髓损伤的回顾性研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49 (8): 5-8.
- [9] 周明旺, 李盛华, 柳海平, 等. 陇中消肿止痛合剂预防全膝关节置换术后深静脉血栓的临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19 (3): 13-15.
- [10] 邓强, 许伟, 李盛华, 等. 消肿止痛合剂对大鼠急性脊髓损伤后 NOS 及 MMP-9 表达的影响 [J]. 西部中医药, 2012, 25 (10): 40-43.
- [11] 陈铁戈, 郭永强, 王明, 等. 微管蛋白、水通道蛋白 4 和 K⁺ 通道蛋白 4.1 在大鼠脊髓损伤后不同时间的表达变化 [J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24 (10): 1151-1158.
- [12] Halsey AM, Conner AC, Bill RM, et al. Aquaporins and their regulation after spinal cord injury [J]. Cells, 2018, 7 (10): 174-179.
- [13] 郭铁峰, 邓强, 杜凯然, 等. 脊髓损伤对血-脊髓屏障水代谢机制的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41 (23): 5418-5421.
- [14] 张超, 冯世庆, 刘桑, 等. 改良 ALLEN 法胸椎开窗制备大鼠脊髓损伤模型 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, (7): 1529-1531.
- [15] 范筱, 吴杨鹏, 汪今朝, 等. 活血通督汤对脊髓损伤后 BDNF/TrkB 信号表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32 (5): 2115-2120.
- [16] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12 (1): 1-21.
- [17] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9 (9): 1069-1072.
- [18] 魏伟, 吴希美, 李元建主编. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 9-10.
- [19] 齐英娜. 补阳还五汤对督脉瘀阻型脊髓损伤内质网应激和血小板活化因子的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [20] 罗联忠, 周逸敏, 张俐. 基于督脉枢机不利探讨脊髓损伤与血脊髓屏障 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36 (8): 4515-4518.
- [21] 齐英娜, 吴鑫杰, 王延雷, 等. 从督论治脊髓损伤的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29 (6): 1425-1427.
- [22] 文捷. 当归注射液及其提取物阿魏酸钠对大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞的影响 [D]. 长沙: 中南大学, 2009.
- [23] 敬晓鹏, 保森竹. 基于 GABA 通路研究川芎素对神经病理性痛大鼠模型的保护作用 [J]. 山西医科大学学报, 2019, 50 (6): 734-739.
- [24] 徐纪伟, 孙丹华, 陈旭东. 大鼠脊髓损伤后三七总皂苷治疗增强脊髓损伤区突触分化诱导基因 1 (SynDIG1) 的表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32 (3): 356-359.
- [25] 赵玉鑫, 王洪, 杨述华, 等. 三七总皂苷干预脊髓损伤大鼠诱导型一氧化氮合酶及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 表达的变化 [J]. 中国临床康复, 2006, (31): 31-33.
- [26] 杨俊松, 郝定均, 刘团江, 等. 急性脊髓损伤的临床治疗进展 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28 (4): 368-373.
- [27] Shiao R, Lee-Kubli CA. Neuropathic pain after spinal cord injury: challenges and research perspectives [J]. Neurotherapeutics, 2018, 15 (3): 635-653.
- [28] 周立亚, 邹季, 周立文. 黄芪注射液对大鼠脊髓缺血再灌注模型 AQP-4、Ca²⁺ 与神经细胞凋亡表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30 (5): 1841-1844.
- [29] Gao ZX, Rao J, Li YH. Hyperbaric oxygen preconditioning improves postoperative cognitive dysfunction by reducing oxidant stress and inflammation [J]. Neur Regen Res, 2017, 12 (2): 329-336.

(收稿: 2022-06-06 在线: 2023-01-05)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶