

·方药研究·

本文引用:李心亮,李柯,刘月平,杜青,李若存.基于水通道蛋白 AQP1/AQP3 的表达探讨石膏对急性软组织损伤大鼠模型的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(1):9-13.

基于水通道蛋白 AQP1/AQP3 的表达探讨石膏对急性软组织损伤大鼠模型的影响

李心亮¹,李柯^{1*},刘月平²,杜青¹,李若存¹

(1.湖南省中医药研究院,湖南长沙 410013;2.湖南省儿童医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 研究生石膏和煅石膏对急性软组织损伤大鼠模型水通道蛋白 AQP1、AQP3 表达的影响,对石膏消肿的作用机制进行初步研究。**方法** 采用砵码自由落体运动制备急性软组织损伤大鼠模型,造模成功后将动物随机分为模型组,阳性药组(双氯芬酸 0.75 g/kg),煅石膏高、中、低剂量组(1.0、0.5、0.25 g/kg)、生石膏高、中、低剂量组(1.0、0.5、0.25 g/kg),另设空白对照组,每组 10 只。除模型组与空白对照组外,其余各组均给予相应药物,每天换药 1 次,连续 7 d。采用 Western blotting 和免疫组化法检测各组大鼠损伤组织中 AQP1/AQP3 表达变化。**结果** 与空白对照组比较,模型组大鼠损伤骨骼肌中 AQP1/AQP3 表达明显下降($P<0.01$);与模型组比较,煅石膏高、中、低剂量组和阳性药组大鼠损伤骨骼肌中 AQP1/AQP3 表达明显增加($P<0.01$),生石膏组无明显差异。**结论** 石膏煅制后可能通过调节急性软组织损伤模型骨骼肌中 AQP1/AQP3 的表达从而发挥消肿的作用。

[关键词] 急性软组织损伤;煅石膏;生石膏;AQP1;AQP3

[中图分类号]R285.5;R648

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.01.003

Exploring the Effects of *Gypsum Fibrosum* on Rat Model of Acute Soft Tissue Injury Based on the Expression of Aquaporin AQP1/AQP3

LI Xinliang¹, LI Ke^{1*}, LIU Yueping², DU Qing¹, LI Ruocun¹

(1. Hunan Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410013, China;

2. Hunan Children's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of raw *Gypsum Fibrosum* and calcined *Gypsum Fibrosum* on Aquaporin AQP1 and AQP3 expression in acute soft tissue injury rats, and to preliminarily explore the swelling alleviating mechanism of *Gypsum Fibrosum*. **Methods** Acute soft tissue injury rat model was prepared by free-fall weight. After successful modeling, animals were randomly divided into a model group, a positive drug group (Diclofenac 0.75 g/kg), a calcined *Gypsum Fibrosum* high, medium and low dose group (1.0, 0.5, 0.25 g/kg), a raw *Gypsum Fibrosum* high, medium and low dose group (1.0, 0.5, 0.25 g/kg). Another blank control group was set, with 10 rats in each group. In addition to the model group and the blank control group, the other groups were given corresponding drugs, dressing once a day for 7 days. Western blotting and immunohistochemistry were used to detect the expression changes of AQP1/AQP3 in the rats injured tissue of each group. **Results** Compared with the blank control group, the expression of AQP1/AQP3 in skeletal muscle of model rats decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, the expression of AQP1/AQP3 in injured skeletal muscle of calcined *Gypsum Fibrosum* high, medium and low dose groups and

[收稿日期]2019-01-21

[基金项目]湖南省自然科学基金项目(2016JJ6085)。

[作者简介]李心亮,男,硕士,助理研究员,主要从事中药药理及新药开发工作。

[通讯作者]*李柯,男,副研究员,E-mail:17848689@qq.com。

positive drug group rats were significantly increased ($P < 0.01$), and there was no significant difference in the raw *Gypsum Fibrosum* group. **Conclusion** Calcined *Gypsum Fibrosum* may play a role in eliminating swelling by regulating the expression of AQP1/AQP3 in skeletal muscle of acute soft tissue injury model.

[**Keywords**] acute soft tissue injury; calcined *Gypsum Fibrosum*; raw *Gypsum Fibrosum*; AQP1; AQP3

急性软组织损伤是指机体在遭受外力下引发的皮下、肌肉组织或韧带等局部毛细管破裂出血和细胞内液渗透的运动系统常见疾病^[1]。临床主要表现为损伤处局部肿胀、疼痛、瘀斑等,严重影响了患者身心健康。中药外敷治疗急性软组织损伤历史悠久,且疗效显著。石膏在临床上生、煅兼用,功效各异,但其缓解创伤性软组织肿胀的具体作用机理尚未明确。骨骼肌富含水分,约占整体的76%,水的代谢对于骨骼肌正常生理功能的维持具有重要作用^[2]。现代研究证明,水分子的跨膜运输主要是通过膜上一类水通道蛋白(Aquaporins, AQPs)进行^[3]。AQPs家族中,AQP1是体内分布最广泛的水通道蛋白,并高度表达于骨骼肌微血管内皮细胞上,AQP3作为水甘油通道部分在骨骼肌上表达,与组织和细胞的水平衡及调节有着密切关系^[4]。石膏的消肿作用是否与调节AQP1/AQP3的表达相关有待进一步探讨。基于此,本实验通过研究急性软组织损伤后骨骼肌中AQP1/AQP3的变化,探讨石膏发挥消肿作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠,SPF级,体质量180~220 g,90只,雌雄各半,购自湖南长沙斯莱克景达动物实验公司。在光/暗周期为12 h/12 h(光照时间7:00~19:00),温度为18~22 ℃的条件下饲养于笼中,自由获得饲料和饮水。实验动物许可证:SYKX(湘)2015-0008,动物合格证号:43006700010860。

1.2 药物与试剂

煅石膏用大豆油(煅石膏66%:大豆油34%)配制,由湖南省中医药研究院中药研究所课题组提供,生产批号:20151026;生石膏用大豆油(生石膏66%:大豆油34%)配制,由湖南省中医药研究院中药研究所制剂室提供,批号:20151026;双氯芬酸,北京诺华制药有限公司生产,规格:20 g/支,批号:X4447;AQP1一抗,美国RD公司,批号:154131;AQP3一抗,

美国RD公司,批号:150925;山羊抗鼠IgG二抗,赛默飞世尔,批号:150725。

1.3 主要仪器

正置荧光显微镜及图像分析系统(Carl Zeiss),垂直电泳槽、转膜槽(美国Bio-Rad公司),核酸蛋白浓度测定仪(BioDrop),WD-9405B型水平摇床(沃德生物医学仪器公司),Bio-Rad凝胶成像系统(美国伯乐)。

1.4 造模

参考文献[5]的方法建立急性软组织损伤大鼠模型,取SD大鼠适应性喂养3 d后,采用10%硫化钠溶液脱除大鼠小腿鼠毛,将大鼠固定于动物台上,用自制质量为160 g的撞击器,固定高度,撞击大鼠小腿中部外侧,连续打击7次,接触面直径0.8 cm,造成打击处肿胀,皮下瘀血,局部软组织挫伤;其中,打击处皮肤无破损,手触无骨折,无其他异常者视为造模成功。

1.5 分组及干预

造模成功后将动物随机分为模型组,阳性药组(双氯芬酸0.75 g/kg)、煅石膏高、中、低剂量组(1.0、0.5、0.25 g/kg)、生石膏高、中、低剂量组(1.0、0.5、0.25 g/kg),另设空白对照组,每组10只。模型组与空白对照组不作处理,其余各组在受创部位经皮肤给予相应的药物,每天换药1次,连续给药7 d。

1.6 样本采集

实验结束后,各组大鼠禁食不禁水24 h,采用10%水合氯醛(0.3 mL/kg)麻醉动物,剪取损伤部位肌肉组织约1 g,放入生理盐水中清洗掉表面血迹后,立即剪取一半组织放入冻存管中,放入液氮速冻,-80 ℃冰箱保存备用;剩余组织放入4%的多聚甲醛溶液中固定保存备用。

1.7 Western-blotting 实验

将50 mg肌肉组织放入研钵中,加入液氮不断研磨成粉状,然后将粉末置入1 mL的组织裂解液中,混匀后置于冰上裂解30 min,离心(10 000 r/min、

4 ℃、5 min)。取上清液,BCA 法测蛋白浓度。配制 10%SDS-PAGE 凝胶,浓缩胶 5%,取 50 μg 蛋白质样品,加入等体积上样缓冲液中,100 ℃沸水中煮 5 min,上样,电泳 85 V、30 min,待染料前沿进入分离胶后,130 V 约 1.5 h。湿转 100 V、70 min;封闭 2 h,TBS-T 漂洗 2 次,加入一抗,4 ℃下反应过夜,TBS-T 漂洗 10 min×3 次,加入二抗,室温下孵育 60 min,TBS-T 漂洗 10 min×3 次,最后经 ECL 发光液显影。采用凝胶成像分析软件分析,Image J 软件扫描图片得出各蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参,进行半定量分析。

1.8 免疫组化实验

取出保存在 4%的多聚甲醛液中的样本,分别石蜡包埋,制成 5 μm 的切片;脱蜡至水,冲洗,滴加封闭液,37 ℃孵育 30 min,去除多余的液体;加一抗 4 ℃过夜,PBST 漂洗 3 次,每次 5 min;再加入二抗,37 ℃湿盒避光孵育 30 min,脱水封片。在光学显微镜下观察每张玻片上 3 个不重复视野中 AQP1 和 AQP3 的阳性细胞(阳性细胞为棕褐色),采用 ZEISS 图像分析软件计算各组免疫阳性细胞的数量。

1.9 数据处理

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理,计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较方差分析采用单因素分析。组间比较采用 *t* 检验。若 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Western-blotting 检测

与空白对照组比较,模型组大鼠肌肉组织中水通道蛋白 AQP1、AQP3 表达均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,阳性药组、煅石膏高、中、低剂量组大鼠肌肉组织中水通道蛋白 AQP1、AQP3 表达均显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);生石膏高、中、低剂量组大鼠肌肉组织中 AQP1、AQP3 的表达均无明显改变,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 1,图 1-2。

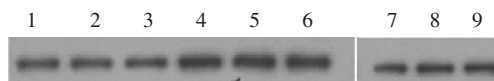
2.2 免疫组化检测

与空白对照组比较,模型组大鼠 AQP1 及 AQP3 的表达明显减少;与模型组比较,煅石膏高、中、低剂量组大鼠 AQP1 及 AQP3 的表达均显著升高差异有

表 1 Western-blotting 实验中各组大鼠损伤骨骼肌中 AQP1/AQP3 蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=10$,灰度值)

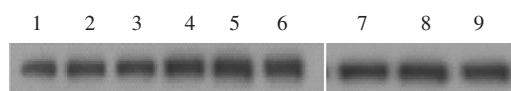
组别	AQP1	AQP3
空白对照组	37.1±1.1	46.3±4.1
模型组	21.7±2.6**	25.1±3.8**
阳性药组	56.6±5.1***	48.3±2.9**
煅石膏高剂量组	71.7±1.2***	71.3±6.5**
煅石膏中剂量组	64.7±2.4***	49.2±3.9**
煅石膏低剂量组	59.5±1.9***	44.2±4.5**
生石膏高剂量组	24.2±3.3*	26.1±4.1*
生石膏中剂量组	25.2±3.5*	24.8±3.0*
生石膏低剂量组	24.3±2.6*	23.7±2.5**

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$



注:1.空白对照组;2.模型对照组;3.阳性对照组;4.煅石膏高剂量组;5.煅石膏中剂量组;6.煅石膏低剂量组;7.生石膏高剂量组;8.生石膏中剂量组;9.生石膏低剂量组

图 1 各组大鼠损伤骨骼肌中 AQP1 蛋白表达



注:1.空白对照组;2.模型对照组;3.阳性对照组;4.煅石膏高剂量组;5.煅石膏中剂量组;6.煅石膏低剂量组;7.生石膏高剂量组;8.生石膏中剂量组;9.生石膏低剂量组

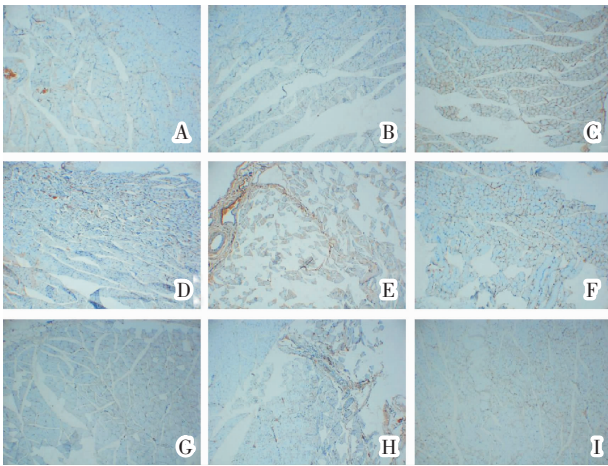
图 2 各组大鼠损伤骨骼肌中 AQP3 蛋白表达

统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),生石膏高、中、低剂量组大鼠肌肉组织中 AQP1、AQP3 的表达均无明显改变,差异无统计学意义。结果见表 2,图 3-4。

表 2 免疫组化实验中各组大鼠损伤骨骼肌中 AQP1/AQP3 蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=10$,灰度值)

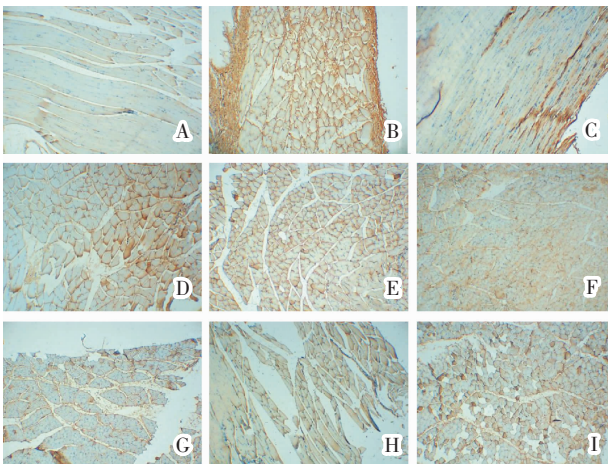
组别	AQP1	AQP3
空白对照组	18.3±1.1	33.3±2.7
模型组	9.6±1.6**	18.5±1.2**
阳性药组	16.6±1.9**	29.3±1.5**
煅石膏高剂量组	14.7±1.2**	28.6±2.5**
煅石膏中剂量组	12.7±2.4**	25.2±1.9*
煅石膏低剂量组	11.5±1.9**	22.2±2.5*
生石膏高剂量组	10.2±1.3**	20.1±2.1*
生石膏中剂量组	9.9±1.5**	19.8±2.0*
生石膏低剂量组	10.3±1.6**	19.7±1.8*

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$



注:A.空白对照组;B.模型组;C.阳性药组;D.煅石膏高剂量组;E.煅石膏中剂量组;F.煅石膏低剂量组;G.生石膏高剂量组;H.生石膏中剂量组;I.生石膏低剂量

图3 各组大鼠骨骼肌中 AQP1 表达(免疫组化,×400)



注:A.空白对照组;B.模型组;C.阳性药组;D.煅石膏高剂量组;E.煅石膏中剂量组;F.煅石膏低剂量组;G.生石膏高剂量组;H.生石膏中剂量组;I.生石膏低剂量

图4 各组大鼠骨骼肌中 AQP3 表达(免疫组化,×400)

3 讨论

急性软组织损伤是临床上常见的多发病,严重影响着我国约20%以上成年人、50%以上老年人的生活质量^[6]。因此,明确急性软组织损伤的分子机制,可以更好的为临床应用提供用药依据。研究发现,损伤处肿胀多因局部组织细胞等被破坏,瘀血停滞互结,血流不畅、微循环紊乱所致。中医临床常采用局部外用药,可降低药物的毒副作用,并通过维持皮肤表面相对稳定的血药浓度,延长药物作用时间而发挥显著疗效^[7]。石膏是中医临床最为常用矿物药之一,生品因其清热泻火、除烦止渴之功,多用于热病气分证,而煅制后性寒微弱,清热之力减弱,收

湿生肌作用增强。本课题组前期研究发现,石膏煅制后能够明显的改善急性软组织损伤模型大鼠证候积分,发挥明显的抗炎消肿作用^[8]。煅石膏除常用于外治溃疡不敛,湿疹瘙痒,水火烫伤,外伤出血外,外敷治疗跌打损伤引起的红、肿、热、痛,作为医院制剂已在多家医院生产使用^[9-12]。中医学认为“湿”就是由于水分不能畅通而滞留在组织所引起的病症,煅石膏能治疗软组织损伤的肿胀,是因其有收湿的作用,收湿作用可能为煅石膏的物理性质,因石膏煅后极易吸水。但这一推测并不能完全说明煅石膏的作用机制^[13]。

AQPs 是属于水或溶质通道家族的一类蛋白,广泛表达于上皮和内皮以及其他类型细胞如表皮、脂肪细胞和骨骼肌中,可以促进渗透细胞质膜的水分运输,从而响应渗透梯度^[14]。其中,AQP1 是 AQPs 家族中最早被鉴定出来的水通道蛋白,以三维结构四聚体形式选择性分布在上皮及内皮细胞中,维持液体平衡及协同水跨膜转运^[15]。文献报道,AQP1 在心肌水肿和缺血-再灌注损伤中起了重要的作用^[15];并参与了大鼠骨骼肌内液平衡及水代谢^[16]。AQP1 还代表了微血管壁整个通过细胞间的 10%~45%的液体渗透性,与血管的渗透性密切相关^[17]。AQP3 是皮肤中基底表皮细胞质膜强烈表达的水-甘油转运蛋白,在骨骼肌中位于细胞膜的表面,对于细胞正常生理状态的维持有着重要意义,其可促进皮肤水化,参与伤口愈合期间的细胞迁移^[18];AQP3 敲除小鼠的研究同样显示,AQP3 促进水和甘油转运以及损伤后伤口愈合^[19]。急性软组织损伤后,局部代谢微环境的改变,可能存在酸性代谢产物的堆积、渗透压的变化、微循环障碍,从而导致细胞肿胀,影响 AQP1 和 AQP-3 的表达。AQP1 和 AQP-3 表达的上调可能正是骨骼肌适应损伤后细胞代谢微环境改变以维持细胞正常生理活动的结果,二者可能通过参与水跨膜转运以达到减轻组织肿胀的目的^[12,20]。本实验采用生、煅石膏对急性软组织损伤模型大鼠进行干预,比较发现煅石膏可明显缓解损伤部位水肿症状,而生石膏作用不明显。Western-blotting 检测结果发现,模型组大鼠损伤组织中 AQP1 和 AQP3 积分光密度值降低,免疫组化法检测损伤组织中上述蛋白的免疫阳性细胞数结果与 Western-blotting 法检测结果

趋势相同,而给予煨石膏干预后可明显逆转这些变化。故实验结果可分别从蛋白定性、定量的不同维度说明:石膏煨制后改善急性软组织模型大鼠组织水肿,可能与调节细胞中 AQP1 和 AQP3 的表达,促进大鼠骨骼肌水代谢、维持骨骼肌液体环境平衡相关。本实验的结果为煨石膏临床治疗软组织损伤的作用机制提供了依据。

参考文献

- [1] LIONBERGER D R, BRENNAN M J. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain due to soft tissue injury: diclofenac epolamine topical patch[J]. *Journal of Pain Research*, 2010, 36(3): 223-233.
- [2] 邵先舫,刘志军,李 前,等.治伤巴布剂对大鼠创伤性软组织中水通道蛋白-3 表达的影响[J].*广州中医药大学学报*,2013,30(2):207-210.
- [3] JIANG Y, LIU H, LIU W, et al. Endothelial Aquaporin-1 (AQP1) expression is regulated by transcription factor Mef2c[J]. *Molecules and Cells*, 2016, 39(4): 292.
- [4] 严 望.AQPs 表达与骨骼肌肿胀的关系及治伤巴布剂干预其表达的研究[D].长沙:湖南中医药大学,2013.
- [5] 王玉忠,郑传莉.活血止痛胶囊对大鼠急性软组织损伤的修复作用研究[J].*中药材*,2015,38(6):1263-1265.
- [6] 张桂荣,李蜀平,刘冬平,等.跌打正骨软膏治疗急性软组织损伤的实验研究[J].*世界中西医结合杂志*,2013,8(7):679-682.
- [7] 程 玥,唐朝辉,曹 亮,等.金黄凝胶对大鼠急性软组织损伤的治疗作用研究[J].*现代药物与临床*,2015,30(7):768-773.
- [8] 李心亮,李 柯,刘月平,等.煨石膏外用对急性软组织损伤的治疗作用及其机制研究[J].*中国中医急症*,2015,24(7):1176-1178.
- [9] 李 妍.煨制温度对石膏理化性质及药理作用的影响研究[D].北京:北京中医药大学,2017.
- [10] 神油泽.外敷“白药膏”治疗骨折及软组织扭挫伤[J].*按摩与导引*, 1995, 15(3):21-22.
- [11] 何宝凝.白药膏的质量标准研究[J].*中国中医药现代远程教育*, 2012, 10(3):144-145.
- [12] 冯小映,李丽月,林静吟.石膏软膏的质量标准研究[J].*海峡药学*, 2017, 29(4):59-60.
- [13] 岳婧怡,张 玲.药用石膏的研究进展[J].*广州化工*,2016,44(6):4-6.
- [14] ZHAN Z Y, XU G X. Research progress in the relationship between aquaporins and age-related cataract[J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2011, 11(12):2122-2124.
- [15] YU-MEI Y, JU M, KUN S, et al. Research progress of aquaporin-1 and its role in heart[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 2011, 31(1):99-103.
- [16] SONG Z, XIANG-NAN L I. Expression of aquaporin-1 and aquaporin-3 in lung tissue of rat model with ischemia-reperfusion injury[J].*中华医学杂志(英文版)*,2010,123(24):3711-3713.
- [17] MINTS M, HILDENBRAND A, LALITKUMAR L P G, et al. Expression of aquaporin-1 in endometrial blood vessels in menorrhagia[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2007,19(3):407-411.
- [18] MARLAR S, JENSEN H, LOGIN F H, et al. Aquaporin-3 in Cancer[J]. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18(10): 2106.
- [19] LEVIN M H, VERKMAN A S. Aquaporin-3-dependent cell migration and proliferation during corneal re-epithelialization[J]. *Investigative ophthalmology & visual science*,2006,47(10):4365-4372.
- [20] 邵先舫,李 前,丁 青,等.水通道蛋白 1 在大鼠正常骨骼肌中的表达[J].*中华中医药杂志*,2013,28(3):819-820.

(本文编辑 杨 瑛)