

活血散对大鼠急性软组织损伤 PGE₂ 及 IL-6 影响的实验研究

孙欣¹ 尹宏² 卞勇¹ 钱卫庆²

(1 南京中医药大学, 南京, 210023; 2 南京中医药大学第三附属医院, 南京市中医院骨科, 南京, 210001)

摘要 目的: 观察活血散对大鼠急性软组织损伤模型血清 PGE₂ 及 IL-6 影响, 初步探讨其干预软组织损伤模型修复的可能机制。方法: 造模后, 随机分组, 给予相应药物, 动态观察大鼠损伤症候指数评分、组织形态学指标, 并测量大鼠血清中 PGE₂、IL-6 含量, 进行统计学分析。结果: 活血散软膏组在损伤症候指数、组织形态学方面优于模型组。活血散软膏可降低大鼠血清中 PGE₂、IL-6 含量。结论: 活血散软膏具有消肿、止痛、抗炎、促进软组织肌纤维修复的作用, 其作用发生机制可能与抑制损伤局部组织中的 PGE₂、IL-6 含量升高有关。

关键词 活血散; 软组织损伤; 实验; 大鼠; PGE₂; IL-6

Effect of Huoxuesan on PGE₂ and IL-6 in the Treatment of Rat Acute Soft Tissue Injury

Sun Xin¹, Yin Hong², Bian Yong¹, Qian Weiqing²

(1 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2 Nanjing Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine Hospital of Orthopaedics, Nanjing 210001, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Huoxuesan on PGE₂ and IL-6 level in rats with acute soft tissue injury so as to explore the possible mechanism of Huoxuesan in restoring soft tissue damage. **Methods:** After modeling, rats were randomized into two groups and given different drugs. Dynamic observation was conducted on the aspects of injury symptom index, histomorphology index, and serum level of PGE and IL-6 respectively, followed by statistical analysis. **Results:** The group used Huoxuesan performs better in injury symptom score and histomorphology score. Huoxuesan can also lower the levels of PGE₂ and IL-6 in rats' serum. **Conclusion:** Huoxuesan can diminish inflammation and swelling and relieve pain. It can also contribute to the restore of soft issue. This may due to its determent on the levels of PGE₂ and IL-6.

Key Words Huoxuesan; Soft tissue injuries; Experiment; Rats; PGE₂; IL-6

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2015.06.025

急性软组织损伤是骨伤科临床常见病, 临床主要表现为局部肿胀、疼痛、功能障碍、发绀瘀斑等。活血散(制剂批准文号: 苏药制字 Z04000807)是南京市中医院骨伤科自制制剂, 有活血散瘀、消肿止痛之功效, 该院在长期的临床工作中将活血散调制成软膏, 敷于患伤, 治疗急、慢性软组织损伤, 取得非常好的临床效果及患者的好评。通过临床研究^[1-2]证明活血散对患者软组织急性损伤的疼痛、压痛、肿胀、瘀斑及功能等临床症状、体征有比较显著的治疗效果, 但关于活血散对疾病疗效的治疗机制研究目前还处于缺失状态, 这些严重制约活血散对急性软组织损伤的治疗效果得到广泛的认可及推广应用。本实验以大鼠软组织损伤作为实验模型, 观察活血

散对动物模型的治疗作用, 并初步探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验药品 活血散软膏的主方与制备: 1) 药物组方刘寄奴 170 g, 地肤子 170 g, 半枝莲 170 g, 虎杖 170 g, 生天南星 170 g, 土鳖虫 75 g, 黄柏 75 g。全方药物混匀, 60℃干燥, 粉碎研磨成微细颗粒。2) 活血散凡士林软膏的制备由南京市中医院药剂科制备提供, 其中羊毛脂含量 10%, 药物含量 20%。3) 扶他林乳膏: 北京诺华制药有限公司, 批号: X3974。4) 白介素-6(IL-6) Elisa 试剂盒: 上海源叶生物科技有限公司, 批号: 14112801; 5) 前列腺素 E₂(PGE₂) Elisa 试剂盒: 上海源叶生物科技有限公司,

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31360629)

作者简介: 孙欣(1979—), 男, 汉族, 南京, 南京中医药大学第一临床医学院 2012 级中西医结合外科学(骨科方向)硕士研究生, 南京中医药大学第三附属医院骨伤科主治医师, 主要从事中西医结合骨伤病的临床及研究工作

通信作者: 尹宏(1960—), 男, 汉族, 南京, 硕士生导师, 南京中医药大学第三附属医院骨伤科主任医师, 研究方向: 关节及创伤骨科, Tel: (025) 52276204, E-mail: hongy6011@163.com

批号:14112802。

1.1.2 实验动物 SD 大鼠,64 只,SPF 级,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。

1.1.3 实验条件 给药前后,SD 大鼠分笼饲养,每笼 5 只,喂以全价颗粒鼠饲料(南京协同生物工程有限公司),自由饮水饮食,室温 20~25℃,人工光照 12 h/d,室内通风良好,实验室相对湿度:65%~70%。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备 根据中药药理实验学^[3]的实验方法适当调整造模,造模前 1 d,大鼠臀部及大腿后侧剃毛,并在距腘窝 1 cm 大腿后侧处做好标记。先用 10%的水合氯醛按体重(0.1 mL/100 g)腹腔注射将大鼠浅麻醉,大鼠反抗能力减弱即为麻醉显效;将大鼠右下肢平放,固定于软组织打击器底座台(硬木板)上,将 1 根内直径为 2.5 cm PVC 管置于右下肢软组织标记点处,在高 10 cm 处释放 50 g 砝码(直径 2 cm),撞击接触面直径 0.8 cm²,在大鼠大腿中部外侧连续打击 10 次,打击后肉眼即见打击部位肿胀、瘀血,但无明显皮肤破损及出血,单侧后肢跛行,用手触摸无明显骨折及脱位征,无其他异常情况发生者确定造模成功。打击后皮肤破损和明显骨折的大鼠予以剔除。

1.2.2 给药 选取造模成功大鼠分为 4 组,每组 16 只。正常对照组(不造模);模型组(造模后,不处理);扶他林乳膏组(给予扶他林乳膏);活血散软膏组(给予活血散软膏外涂)。造模成功后不做任何处理,1 h 后于软组织损伤处给予相应的药物。活血散软膏组和扶他林乳膏组根据损伤面积大小给药,涂布面积以超过受损区面积一半以上为度,外用特制胶布及卫生胶布固定、包扎,每天换药 1 次,连续给药 7 d。

1.2.3 检测指标

1.2.3.1 损伤症候指数 自造模后,从皮下瘀血、肌肉肿胀及肌肉颜色 3 方面每天观察患肢的症候表现,参照李敏^[4]等的评分标准进行评分:1)皮下瘀血:多量块状计 2 分,少量点状计 1 分,无瘀血者计 0

分;2)肌肉肿胀:明显肿胀计 2 分,稍有肿胀计 1 分,无肿胀者计 0 分;3)皮肤颜色:紫暗色深计 2 分,暗红色浅计 1 分,色泽正常计 0 分。

1.2.3.2 血清中炎性递质的测定 给药后第 3 天,每组取 8 只大鼠,眼眶取血,分离血清,备用。给药 7 d 后剩余大鼠眼眶取血,分离血清,备用。用 ELISA 法测定 PGE₂、IL-6 的含量,具体操作步骤严格按照试剂盒操作说明完成。

1.2.3.3 肌肉组织病理学检测 给药后第 3 天,取血结束后采用牵拉使颈椎脱臼的方法快速处死大鼠,然后沿大鼠臀、后侧距腘窝 1 cm 损伤部位为中心,切除肌肉(剔除干净皮肤、筋膜及骨组织),10%福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚 4~5 μm,HE 染色。给药 7 d 后剩余大鼠同样方法处死,切除肌肉,10%福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚 4~5 μm,HE 染色。

1.3 统计方法 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析,正态分布的计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活血散软膏对损伤症候指数的影响 造模后,模型组、扶他林乳膏组、活血散软膏组大鼠很快出现伤肢皮下瘀血、肌肉肿胀及肌肉颜色加深,且伤势呈逐渐加重的趋势,以伤后 24 h 最为严重,造模 1 d 后各组大鼠的损伤症候指数比较均无统计学意义($P < 0.05$),说明各组大鼠损伤症候之间具备可比性。由于正常对照组大鼠未造模,所以未发现这组大鼠伤肢肿胀、皮下出血的现象。给药 3 d 后,活血散软膏组、扶他林乳膏组大鼠损伤症候指数分值均明显降低,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 0.01)。给药 7 d 后,模型组的损伤情况明显好转,而活血散软膏组、扶他林乳膏组大鼠伤肢肿胀、皮肤瘀斑、皮下出血的症状都已基本消失。活血散软膏组、扶他林乳膏组大鼠损伤症候指数分值均明显降低,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 活血散软膏对损伤症候指数的影响($\bar{x} \pm s$)

时间	损伤症候指数			
	正常对照组	模型组	扶他林乳膏组	活血散软膏组
造模后(n=16)	0.00±0.00	4.81±0.54**	4.94±0.68**	4.88±0.72**
给药 3 d(n=16)	0.00±0.00	4.13±0.62**	3.63±0.62 [△]	3.56±0.63 ^{△△}
给药 7 d(n=8)	0.00±0.00	3.25±0.46**	1.63±0.52 [△]	1.50±0.53 ^{△△}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

表2 活血散软膏对大鼠血清 PGE₂、IL-6 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	PGE ₂ (pg)		IL-6 (pg)	
		给药 3 d	给药 6 d	给药 3 d	给药 6 d
正常对照组	8	466.39 ± 190.42	464.98 ± 68.18	561.01 ± 162.97	571.24 ± 139.99
模型组	8	776.79 ± 61.16**	660.55 ± 110.07**	870.21 ± 134.35**	896.00 ± 86.01**
扶他林乳膏组	8	627.07 ± 45.73 ^{△△}	531.00 ± 84.16 [△]	613.84 ± 187.20 ^{△△}	604.93 ± 205.00 ^{△△}
活血散软膏组	8	684.88 ± 47.44 ^{△△}	516.17 ± 88.64 [△]	612.79 ± 175.12 ^{△△}	643.28 ± 104.03 ^{△△}

注:与正常对照组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与模型组比较,[△]*P* < 0.05,^{△△}*P* < 0.01。

2.2 活血散软膏对大鼠血清 PGE₂、IL-6 的影响

给药 3 d、7 d 后,模型组大鼠血清中 PGE₂、IL-6 含量明显升高,与正常对照组比较差异有统计学意义(*P* < 0.01)。扶他林乳膏组、活血散软膏组大鼠血清中 PGE₂、IL-6 含量低于模型组大鼠,与模型组比较差异有统计学意义(*P* < 0.01)。结果见表 2。

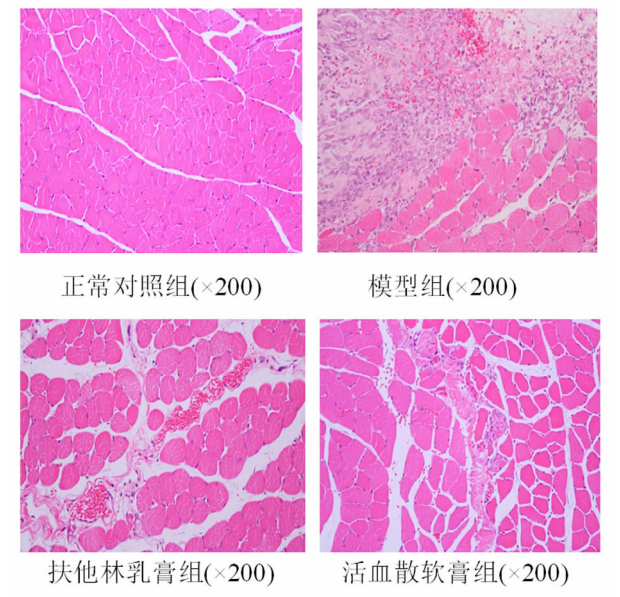


图1 给药 3 d 后

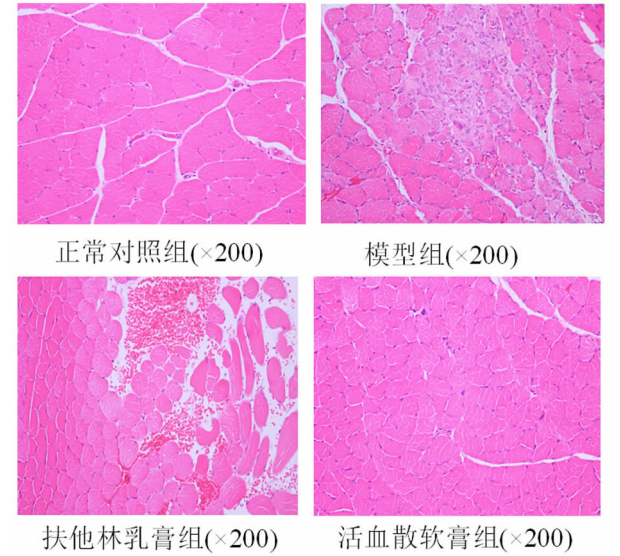


图2 给药 7 d 后

2.3 组织形态学观察 动物处死后,取其肌肉。

10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚 4 ~ 5 μm,HE 染色,病理专业人员阅片,根据病变轻重程度,依次半定量为轻度“+”,中度“++”,重度“+++”,无病变组织标记为“-”。病理组织学观察结果如下(见图 1、图 2)。

给药 3 d 后正常组肌肉:本组 8 例肌肉肌纤维清晰,未见颗粒变性、脂肪变性、嗜碱变性,间质血管无充血,间质无水肿及炎性反应细胞浸润。模型组肌肉:本组 2 例肌肉部分肌纤维轻度变性坏死(+),间质轻度充血水肿(+),大量炎性反应细胞浸润(++);余 6 例肌纤维清晰,间质血管轻度充血(+),少量出血。扶他林软膏组肌肉:本组 6 例肌纤维清晰,间质血管轻度充血(+),少量出血。余 2 例未见明显异常。活血散软膏组肌肉:本组 4 例肌纤维清晰,间质血管轻度充血(+),少量出血。余 4 例未见明显异常。

给药 7 d 后正常组肌肉:本组 8 例肌肉肌纤维清晰,未见颗粒变性、脂肪变性、嗜碱变性,间质血管无充血,间质无水肿及炎性反应细胞浸润。模型组肌肉:本组 2 例肌肉部分肌纤维轻度变性坏死(+),间质轻度充血水肿(+),大量炎性反应细胞浸润(++);2 例肌纤维清晰,间质血管轻度充血(+),少量出血。余 4 例未见明显异常。扶他林软膏组肌肉:本组 6 例肌纤维清晰,间质血管轻度充血(+),少量出血。余 2 例未见明显异常。活血散软膏组肌肉:本组 3 例肌纤维清晰,间质血管轻度充血(+),少量出血。余 5 例未见明显异常。

3 讨论

急性软组织损伤是临床骨科经常碰到的疾病之一,类似传统医学的“伤筋病”,在治疗上除了采取一些中药口服外,中药外治法也经常被广泛应用于一线临床,目前已经开展的大量的临床还有实验都报道证明它的疗效确切。本病病机为:气滞血瘀,络脉不和,治疗当消肿止痛、散瘀通络。

活血散方中用刘寄奴、土鳖虫活血化瘀;半枝莲、虎杖、黄柏、地肤子清热化瘀;生南星通络止痛。诸药合用,共奏活血去瘀、消肿止痛之功效。现代药

理研究证实处方中刘寄奴有显著抑制血小板聚集反应的作用,还有显著的血栓抑制作用^[5];土鳖虫可降低红细胞压积,降低全血高切黏度,全血低切黏度^[6-7],具有抗凝和抗血栓形成作用;半枝莲有解热、利尿消肿以及一定程度的抗菌作用^[8-9],虎杖现代药理研究证明有抗血小板聚集及降低全血黏度及红细胞聚集作用^[10],地肤子抗炎抗菌利尿消肿^[10],生南星镇痛明显^[11],黄柏解热抗炎^[11],诸药合用抑制血小板聚集、抗凝血、抗血栓、解热镇痛,利尿消肿抗炎,从而促进了局部微循环,对瘀血吸收产生促进作用,从而对机体炎性反应产生压制,利于机体软组织的自我修复。这些研究结果与中医学对软组织损伤(损伤)的辨证和治疗机理的认识是一致的。

现代医学认为创伤导致毛细血管破裂、出血和血管通透性增加,血管内液漏到组织间隙产生炎性反应^[12],基础研究也发现,炎性递质和细胞因子参与了许多软组织损伤修复过程中,起着对局部炎性反应和组织损伤修复的重要作用。实验中大多急性软组织损伤模型均由机械物理打击所得,主要表现为局部组织炎性反应(变性、渗出及增生),在这个过程中有大量的活性物质参加,通过作用 H_1 受体,使细动、静脉扩张,从而加快了炎性反应^[13]。IL-6 由淋巴、非淋巴细胞产生,是一种多功能的细胞因子^[14],在免疫反应尤其是急性期反应中起着重要的作用。PGE₂ 同样是重要的炎性递质,能够降低疼痛阈值,激活痛觉外周感受器,在创伤中起着重要作用。

在本次实验中,活血散软膏组在损伤症候指数、组织形态学方面优于模型组。在不同时间节点上活血散软膏均降低了血清中 PGE₂、IL-6 的含量,得出结论:活血散软膏具有消肿、止痛、抗炎、促进软组织肌纤维修复的作用,其作用发生机制之一就是抑制了血清中 PGE₂、IL-6 的表达来发挥其抗炎作用。本

次试验为临床使用活血散治疗急性软组织损伤提供了药理学依据。

参考文献

- [1] 孙欣,尹宏,李文,等. 不同基质活血散治疗急性软组织损伤(气滞血瘀型)临床研究[J]. 实用中医药杂志,2014,30(10):898-899.
- [2] 孙欣,俞宁,尹宏,等. 活血散凝胶剂治疗急性软组织损伤气滞血瘀型 30 例临床研究[J]. 江苏中医药,2014,46(4):33-35.
- [3] 李义奎,王钦茂. 中药药理实验[M]. 上海:上海科技出版社,1991:25-26.
- [4] 李敏,何朝勇,陈丽华,等. 奇正消痛贴膏治疗急性软组织损伤实验研究及其机制探讨[J]. 中华中医药杂志,2009,24(9):1241-1243.
- [5] 潘颖宜,孙文忠,郭忻,等. 南刘寄奴和北刘寄奴抗血小板聚集及抗血栓形成药理作用的比较研究[J]. 中成药,1998,20(70):45.
- [6] 周春风,莱萌,王秀华,等. 土鳖虫对大鼠血液流变学的影响[J]. 中草药,1994,25(1):28-29.
- [7] 周春风,莱萌,王秀华,等. 土鳖虫抗凝血作用研究[J]. 长春中医药大学学报,1999,15(4):47.
- [8] 蒋小刚,顾振纶. 半枝莲的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源,2004,23(1):3.
- [9] 佟继铭,陈光辉,高巍,等. 半枝莲的解热作用实验研究[J]. 中国民族民间医药杂志,1999,8(3):166.
- [10] 侯家玉. 中药药理学[M]. 北京:中国中医药出版社,2002:162-164.
- [11] 孔增科,周海平,付正良. 常用中药药理与临床应用[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,2004.
- [12] 王亦璠,孟继懋,郭子恒. 骨与关节损伤[M]. 北京:人民卫生出版社,1992:134-135.
- [13] 叶盛英,杨本明,高骥,等. 中药外用治疗软组织损伤的实验研究进展[J]. 华北国防医药,2009,21(2):29-31.
- [14] 任蕴芳. 白细胞介素 6 研究进展[J]. 解放军医学情报,1992,6(4):195-197.

(2015-04-30 收稿 责任编辑:王明)