

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.16.009

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190619.0854.002.html(2019-06-19)

## 活络效灵丹加减方对大鼠急性软组织损伤的保护作用及机制初探

鄢红玉<sup>1</sup>, 万飞<sup>2</sup>, 郭剑华<sup>3</sup>, 王建军<sup>4</sup>, 魏东华<sup>4△</sup>

(1. 重庆市江津区中医院中医科 402284; 2. 重庆医药高等专科学校中医学 401331;

3. 重庆市中医骨科医院筋伤中心 400010; 4. 重庆市江津区中医院骨科 402284)

**[摘要]** **目的** 探讨活络效灵丹加减方对大鼠急性软组织损伤的保护作用, 并对其可能机制进行初步探索。**方法** 采用随机数字表法将 72 只大鼠分为正常组、模型组、对照组(阿司匹林, 0.6 g/d)和活络效灵丹低、中、高剂量组(活络效灵丹剂量分别为 15、30、45 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 每组 12 只。除正常组大鼠外, 其余各组大鼠采用击打法建立急性软组织损伤模型, 模型建立后, 活络效灵丹低、中、高剂量组大鼠每天分别通过灌胃方式给予相应剂量的活络效灵丹加减方, 3 次/d; 对照组大鼠每天给予阿司匹林进行治疗, 1 次/d; 正常组和模型组大鼠均给予等量纯化水。在灌胃给药后 12 h、1 d、2 d、3 d、5 d、7 d 6 个时间点, 观察并记录各组大鼠患侧肢肿胀及瘀斑等相关症候表现, 评估损伤症候指数; 分别测定第 7 天灌胃给药前和给药后 30 min、1 h、2 h, 这 4 个时间点各组大鼠的基本痛阈值; 连续灌胃 7 d 后, 测定各组大鼠全血高切(150/s)、中切(60/s)、低切(10/s)、血浆粘度及红细胞比容(HTC)5 个血液粘度相关指标, Western blot 法检测组织中 Toll 样受体 2(TLR2)及核转录因子(NF-κB)的表达; 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测组织中 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-1β、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和 IL-10 的表达。**结果** 与模型组比较, 络效灵丹加减方可改善急性软组织损伤大鼠患肢肿胀、瘀斑等症状, 升高基本痛阈值、减轻疼痛, 降低血液粘度、活血散瘀, 降低 TLR2、NF-κB 及 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 的表达, 升高 IL-10 的表达, 差异均有统计学意义(P<0.05)。**结论** 活络效灵丹加减方, 对大鼠急性软组织损伤具有一定保护作用, 该作用可能与抑制 TLR2/NF-κB 信号通路, 调节下游炎症因子的表达有关。

**[关键词]** 活络效灵丹; 软组织损伤; 核因子-κB; Toll 样受体 2**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)16-2737-06**Protective effect and mechanism of Huo Luo Xiao Ling Dan Jia Jian recipe on acute soft tissue injury in rats**YAN Hongyu<sup>1</sup>, WAN Fei<sup>2</sup>, GUO Jianhua<sup>3</sup>, WANG Jianjun<sup>4</sup>, WEI Donghua<sup>4</sup>

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Jiangjin Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 402284, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China; 3. Department of Tendon Injury Center, Chongqing Traditional Chinese Medicine Orthopaedic Hospital, Chongqing 400010, China; 4. Department of Orthopedics, Jiangjin Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 402284, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the protective effect of Huo Luo Xiao Ling Dan Jia Jian recipe on acute soft tissue injury in rats, and to explore its possible mechanism. **Methods** Seventy-two rats were divided into the normal group, the model group, the control group (aspirin, 0.6 g/d) and the low-, medium- and high-dose groups (dose of Huo Luo Xiao Ling Dan was 15, 30, 45 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> respectively) by random number table method. Except for the normal group of rats, the other groups of rats were established acute soft tissue injury model through "hit method". After the the establishing of model, rats in the low-, medium-, and high-dose groups were given the corresponding dose of Huo Luo Xiao Ling Dan, three times a day at a fixed time point, by intragastric administration; Rats in the control group were given aspirin, once a day, and rats in the normal group and the model group were given the same amount of purified water. At the six time points of 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 5 d and 7 d after intragastric administration, the symptoms of swelling and ecchymosis of the injured limbs in each groups were observed and recorded, and the injury syndrome indexes were evaluated. Before the intragastric administration and 30 min, 1 h, and 2 h after administration at the time of seventh day, the basic pain thresholds of the rats in each group were determined. After 7 days of continuous gastric perfusion,

five blood viscosity-related indicators of whole blood high cut (150/s), medium cut (60/s), low cut (10/s), plasma viscosity and hematocrit (HTC) were measured. Western blot was used to detect the expression of TLR2 and NF- $\kappa$ B in the injured tissues. ELISA was used to detect the expression IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 in the injured tissues. **Results** Compared with the model group, Huo Luo Xiao Ling Dan could reduce the symptoms of swelling and ecchymosis in rats with acute soft tissue injury, increase the basic pain threshold, reduce pain, reduce blood viscosity, promote blood circulation, reduce the expression levels of TLR2, NF- $\kappa$ B and IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , increased the expression level of IL-10, and the results were significantly different ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Huo Luo Xiao Ling Dan Jia Jian recipe has the effect of "anti-inflammatory, expectorant and analgesic", which has a protective effect on acute soft tissue injury in rats. This effect may be related to inhibition of the TLR2/NF- $\kappa$ B signaling pathway and regulation of the expression of downstream inflammatory factors.

**[Key words]** Huo Luo Xiao Ling Dan; soft tissue injury; NF- $\kappa$ B; Toll-like receptor 2

在骨伤科中,急性软组织损伤是一种临床常见且多发的疾病,患者主要表现为疼痛、肿胀、青紫瘀斑和功能性障碍等,给患者的生活和工作带来不便<sup>[1]</sup>。中医学观点认为,急性软组织损伤属于“筋伤”的范畴。所谓“筋”,根据解剖学相关知识,主要指人体的皮肤、皮下的深浅筋膜、肌腱、肌肉、韧带、腱鞘、滑膜囊、关节囊、椎间盘及周围神经、血管等相关软组织。因各种急性外力造成上述“筋”发生病理性损害的统称为“筋伤”<sup>[2-3]</sup>,故中医治疗主要以“舒筋活络、活血消肿、祛瘀止痛”为主<sup>[4]</sup>。对这类疾病,西医药尚缺乏特效治疗方法,而中医药疗效较好且不良反应较小,故引起研究者们的关注。活络效灵丹加减方以“通络祛瘀”等中医理论作为指导,在当归、丹参、乳香、没药的基础上,酌加牛膝、地龙、赤芍、鸡血藤,诸药合用,共奏“抗炎、祛瘀、镇痛”之效。活络效灵丹出自张锡纯所著《医学衷中参西录》<sup>[5]</sup>,虽为名方,在临床有一定的应用,但基础研究甚少,具体机制研究就更为鲜有。

现代医学对软组织的认识已经到了细胞、分子水平,认为软组织损伤发生时,机体最初的自身保护性反应为炎症,而发生炎症的核心问题为机体微循环的改变,受外部因素和内部细胞损伤的激发会促使机体释放出一系列炎症相关介质,一起对抗损伤,完成结构、功能恢复<sup>[6]</sup>,从而诱发红肿、胀痛等一系列临床症状。缓解炎症为缓解急性软组织损伤患者疼痛的一个重要方向。Toll样受体(TLRs)信号通路是学者所公认的炎症调控通路,若TLRs受到刺激,可进一步活化核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、干扰素等通路<sup>[7]</sup>。故本实验通过建立大鼠急性软组织损伤模型,验证该方疗效,并从炎症相关因子及可能影响其分泌的TLR2/NF- $\kappa$ B信号通路出发,对其可能机制进行初步探索,为其在临床发挥更大价值而奠定理论依据。

## 1 材料与方

**1.1 试验药物** 活络效灵丹加减方:由当归、丹参、乳香、没药、牛膝、地龙、赤芍、鸡血藤组成,饮片来源于重庆医药高等专科学校附属江津区中医院的中药

房,使用时将以上药材,用水浸泡30 min后,武火煮沸,文火10 min后配成每组所需浓度。阿司匹林肠溶胶囊:规格为100 mg/粒,来源于永信药品工业(昆山)有限公司,生产批号为20161204,批准文号为国药准字H19990212。

**1.2 常用试剂** 白细胞介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和IL-10 ELISA试剂盒购自于碧云天生物技术有限公司,批号分别为20160910、20160730、20160721、20160812、20160719、20150912、20151209、20151201;TLR2及NF- $\kappa$ B抗体购自于武汉山鹰生物技术有限责任公司,批号分别为20160514、20160121;硫化钠购自苏州博贸物资有限责任公司,批号为20160728。

**1.3 动物** 从重庆医科大学实验动物中心选取体质量在180~220 g间的雄性SD大鼠,无特定病原体(SPF)级,共72只,许可证编号SCXK(渝)2012-0001。

**1.4 主要仪器** O-lympus BX51显微镜及成像系统HITMAS-30购自于日本O-lympus公司仪器厂;SC-04型离心机购自安徽中科中佳科学仪器有限责任公司;移液枪购自德国Sigma公司。

**1.5 分组和造模** 将用于实验的所有大鼠进行适应性喂养1周后,采用随机数字表法将72只大鼠分为正常组、模型组、对照组(阿司匹林,0.6 g/d)和活络效灵丹组,每组12只。根据临床一般用量,按照《中药药理研究方法学》<sup>[8]</sup>中提到的换算方法,再结合以往相关文献报道<sup>[9]</sup>和预实验结果,将活络效灵丹组细分为低、中、高剂量组,剂量分别为15、30、45 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。除正常组大鼠外,其余各组大鼠均建立急性软组织损伤模型,建模方法简要概括如下:建模前1 d,采用7%的硫化钠对大鼠右大腿进行腿毛处理备用;建立模型时,先将大鼠固定于软组织击打器上,选择大腿的软组织位置,做好记号后,再用两层棉布将大鼠右大腿覆盖以保护皮肤不被砸破,随后将准备好的砝码(150 g)从50 cm高处自由落下,重复3次。按照

以下方法验证模型是否建立成功:造模后 1 h,观察被击打大鼠右大腿内侧的肌肉组织,若皮下有出血点或瘀斑,局部皮肤未见破损,局部软组织呈现肿胀,通过触诊观察无骨折及脱位体征,苏醒后大鼠患侧肢体呈现跛行,满足以上条件的大鼠则视为急性软组织损伤模型建立成功<sup>[10]</sup>,可用于后续实验研究。

**1.6 给药方法** 模型建立后,活络效灵丹低、中、高剂量组大鼠每天分别给予相应剂量的活络效灵丹加减方,在固定时间点,通过灌胃方式给药,3 次/d;对照组大鼠每天给予阿司匹林进行治疗,先将对应剂量阿司匹林胶囊内容物溶于与活络效灵丹各剂量组等量的纯化水中,再进行灌胃给药,0.6 g · d<sup>-1</sup> · 次<sup>-1</sup>;正常组和模型组大鼠均给予等量纯化水。

**1.7 基本痛阈值检测** 恒温水浴锅的温度设置为 54 ℃,将容积 1 000 mL 的烧杯置于水浴锅进行预热,随后取出 1 只大鼠,将其放入预热的烧杯中,观察并记录每只大鼠双足接触烧杯底部后至发生第 1 次舔后足的时间,即为基础痛阈,每只大鼠连续测定 3 次,取平均值<sup>[11]</sup>。

**1.8 血液流变学检测** 连续灌胃 7 d 后,除正常组大鼠外,其余各组大鼠均于下午给药后 1 h(约为下午 6 点),通过皮下注射方式给予 1 mg/kg 的肾上腺素注射液,给药 2 h 后将大鼠放置进冰水中浸泡 5 min 后取出,2 h 后再次皮下给予 1 mg/kg 的肾上腺素注射液,随后禁食。第 2 天早晨 8:00,腹腔注射 40 mg/kg 的 3%戊巴比妥钠麻醉大鼠后,通过腹主动脉取出 5 mL 全血,加肝素抗凝,最后用全自动清洗旋转式血液粘度检测仪对大鼠全血高切(150/s)、中切(60/s)、低切(10/s)、血浆粘度及红细胞比容(HTC)进行检测<sup>[8]</sup>。

**1.9 Western blot 法检测损伤部位组织中 TLR2 及 NF-κB 的表达** 连续灌胃 7 d 后,处死大鼠,取各组大鼠损伤部位组织,按照如下方法检测 TLR2 及 NF-κB 蛋白的表达:组织中加入裂解液进行裂解,收集蛋白样品,用 BCA 法测定蛋白浓度,随后行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),具体实验操作步骤结合说明书和参考文献<sup>[12]</sup>进行,最后采用 ECL

试剂盒显影、日本 HITMAS-30 系统成像。每组实验均重复 3 次取均值。

**1.10 ELISA 法检测损伤部位组织中 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 和 IL-10 的表达** 连续灌胃 7 d 后,处死大鼠,取各组大鼠损伤部位组织,进行匀浆后,再按照 ELISA 试剂盒说明书和参考文献<sup>[13]</sup>的指示进行操作,检测各组大鼠损伤部位 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 和 IL-10 的表达。

**1.11 检测指标** 损伤症候指数测定:在灌胃给药后 12 h、1 d、2 d、3 d、5 d、7 d 6 个时间点,观察各组大鼠患侧伤肢肿胀及瘀斑等相关症候表现,并按照以下标准进行评分:(1)皮下淤血程度:块状出血多记 2 分,点状出血少记 1 分,无淤血记 0 分;(2)肌肉肿胀程度:明显肿胀记 2 分,稍有肿胀记 1 分,无肿胀记 0 分;(3)肌肉颜色情况:暗紫色记 2 分,浅暗红色记 1 分,颜色正常记 0 分。基本痛阈值:分别测定第 7 天灌胃给药前和给药后 30 min、1 h、2 h 4 个时间点各组大鼠的基本痛阈值。血液流变学检测:包括大鼠全血高切(150/s)、中切(60/s)、低切(10/s)、血浆粘度及 HTC。损伤部位组织中 TLR2、NF-κB、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 和 IL-10 的表达。

**1.12 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件分析数据,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,涉及多时间点测量数据组间比较采用重复测量方差分析法,其余两两比较采用 SNK 法,活络效灵丹低、中、高 3 个剂量组分别与正常组、模型组和对照组的比较采用 Dunnett' t 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 各组大鼠损伤症候指数检测情况** 观察及评估结果显示:(1)造模后,大鼠患侧伤肢即刻出现肿胀、瘀斑等症候,造模后 1~2 d 肿胀最为严重,随后有所减轻,于第 5 天肿胀逐渐消退,但伤处仍可见瘀斑;(2)与模型组比较,对照组和活络效灵丹组大鼠的损伤症候指数在给药后的第 1、2、3、5、7 天明显降低( $P < 0.05$ ),见表 1;(3)与对照组比较,活络效灵丹各剂量组大鼠,消肿、祛瘀效果明显更优,特别是在给药后的第 5、7 天( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠损伤症候指数检测情况( $\bar{x} \pm s$ ,分,  $n = 12$ )

组别	12 h	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
正常组	0 <sup>bcd</sup>	0 <sup>bcd</sup>	0 <sup>bcd</sup>	0 <sup>bcd</sup>	0 <sup>bcd</sup>	0 <sup>bcd</sup>
模型组	4.52 ± 0.91 <sup>acd</sup>	4.85 ± 0.25 <sup>acd</sup>	4.67 ± 0.38 <sup>acd</sup>	3.61 ± 0.41 <sup>acd</sup>	2.97 ± 0.18 <sup>ac</sup>	2.80 ± 0.12 <sup>ac</sup>
对照组	4.01 ± 0.28 <sup>ab</sup>	4.18 ± 0.37 <sup>ab</sup>	4.01 ± 0.28 <sup>ab</sup>	3.00 ± 0.13 <sup>ab</sup>	2.89 ± 0.09 <sup>ab</sup>	2.45 ± 0.07 <sup>ab</sup>
活络效灵丹低剂量组	4.23 ± 0.21 <sup>ab</sup>	4.08 ± 0.09 <sup>ab</sup>	4.07 ± 0.18 <sup>ab</sup>	2.98 ± 0.06 <sup>ab</sup>	2.94 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.21 ± 0.72 <sup>ab</sup>
活络效灵丹中剂量组	4.02 ± 0.17 <sup>ab</sup>	3.89 ± 0.20 <sup>ab</sup>	3.39 ± 0.10 <sup>abcd</sup>	2.34 ± 0.30 <sup>abcd</sup>	1.89 ± 0.12 <sup>abcd</sup>	1.70 ± 0.24 <sup>abcd</sup>
活络效灵丹高剂量组	3.90 ± 0.28 <sup>abd</sup>	3.70 ± 0.13 <sup>abcd</sup>	3.18 ± 0.04 <sup>abcd</sup>	2.10 ± 0.25 <sup>abcd</sup>	1.80 ± 0.21 <sup>abcd</sup>	1.69 ± 0.19 <sup>abcd</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与正常组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与模型组比较;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>d</sup>:  $P < 0.05$ ,与活络效灵丹低剂量组比较

表 2 各组大鼠基本痛阈值检测情况( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	给药前	给药后 30 min	给药后 1 h	给药后 2 h
正常组	21.11±8.23	18.79±3.91 <sup>cde</sup>	19.02±8.72 <sup>cde</sup>	20.01±5.69 <sup>cde</sup>
模型组	20.22±7.23	19.20±1.07 <sup>cde</sup>	20.24±3.49 <sup>cde</sup>	20.18±8.93 <sup>cde</sup>
对照组	21.21±6.09	26.09±6.00 <sup>ab</sup>	30.00±2.93 <sup>abd</sup>	29.01±3.89 <sup>abd</sup>
活络效灵丹低剂量组	19.99±3.29	24.00±4.11 <sup>ab</sup>	24.80±2.39 <sup>abc</sup>	24.99±6.01 <sup>abc</sup>
活络效灵丹中剂量组	20.08±5.89	25.43±6.09 <sup>ab</sup>	27.72±3.94 <sup>ab</sup>	28.09±5.13 <sup>ab</sup>
活络效灵丹高剂量组	21.27±7.45	26.98±6.71 <sup>ab</sup>	30.38±3.47 <sup>ab</sup>	31.86±2.34 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与正常组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与模型组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>d</sup>:  $P < 0.05$ , 与活络效灵丹低剂量组比较; <sup>e</sup>:  $P < 0.05$ , 与活络效灵丹中剂量组比较

表 3 各组大鼠血液流变学检测情况( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	全血粘度(mPa·s)			血浆粘度(mPa·s)	HTC(%)
	低切	中切	高切		
正常组	13.99±2.14 <sup>b</sup>	8.24±1.24 <sup>b</sup>	5.22±1.02 <sup>b</sup>	1.24±0.12 <sup>b</sup>	46.00±2.37 <sup>b</sup>
模型组	20.21±3.01 <sup>ac</sup>	12.23±3.22 <sup>ac</sup>	8.04±1.00 <sup>ac</sup>	1.40±0.11 <sup>ac</sup>	50.21±4.90 <sup>ac</sup>
对照组	14.52±3.25 <sup>b</sup>	8.29±1.25 <sup>b</sup>	5.37±0.92 <sup>b</sup>	1.27±0.07 <sup>b</sup>	46.92±3.92 <sup>b</sup>
活络效灵丹低剂量组	17.81±2.90 <sup>bc</sup>	9.23±1.01 <sup>bc</sup>	6.87±0.78 <sup>b</sup>	1.33±0.11 <sup>b</sup>	47.98±1.21 <sup>b</sup>
活络效灵丹中剂量组	16.34±3.45 <sup>b</sup>	8.99±1.02 <sup>b</sup>	6.13±0.83 <sup>b</sup>	1.29±0.19 <sup>b</sup>	47.09±3.21 <sup>b</sup>
活络效灵丹高剂量组	14.98±2.83 <sup>b</sup>	8.34±1.20 <sup>b</sup>	5.33±0.11 <sup>b</sup>	1.27±0.07 <sup>b</sup>	46.90±5.02 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与正常组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与模型组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

**2.2 各组大鼠基本痛阈值检测情况** 给药前, 各组大鼠的基本痛阈值相似, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 给药后, 活络效灵丹各剂量组大鼠的基本痛阈值较模型组明显升高, 其中活络效灵丹高剂量组升高最为显著, 且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 活络效灵丹中、高剂量组大鼠差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 2。

**2.3 各组大鼠血液流变学检测情况** 与正常组比较, 模型组大鼠的全血粘度、血浆粘度和 HTC 均明显升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 对照组和活络效灵丹各剂量组大鼠以上指标均明显下降(均  $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 活络效灵丹中、高剂量组大鼠以上指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 3。

**2.4 各组大鼠损伤部位组织中 TLR2、NF- $\kappa$ B 表达情况** 与正常组比较, 模型组大鼠 TLR2、NF- $\kappa$ B 蛋白表达均明显升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 活络效灵丹各剂量组大鼠 TLR2、NF- $\kappa$ B 蛋白表达均有明显下降, 其中, 以高剂量组下降最为明显( $P < 0.05$ ), 而对照组两种蛋白的变化较小( $P > 0.05$ ), 见表 4、图 1。

**2.5 各组大鼠损伤部位组织中 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-10 的表达情况** 与正常组比较, 模型组大鼠 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达均明显升高, 而 IL-10 的表达明显下降( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 对照组和活络效灵丹各

剂量组大鼠炎症状况均有改善( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 活络效灵丹高剂量组大鼠以上指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 5。

表 4 各组大鼠损伤部位组织中 TLR2、NF- $\kappa$ B 表达情况( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	TLR2	NF- $\kappa$ B
正常组	1.30±0.09 <sup>bc</sup>	1.21±0.19 <sup>bc</sup>
模型组	1.72±0.11 <sup>a</sup>	1.37±0.02 <sup>a</sup>
对照组	1.69±0.09 <sup>a</sup>	1.34±0.03 <sup>a</sup>
活络效灵丹低剂量组	1.56±0.05 <sup>abc</sup>	1.31±0.12 <sup>b</sup>
活络效灵丹中剂量组	1.26±0.06 <sup>bc</sup>	1.24±0.03 <sup>bc</sup>
活络效灵丹高剂量组	1.21±0.05 <sup>bc</sup>	1.18±0.06 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与正常组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与模型组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

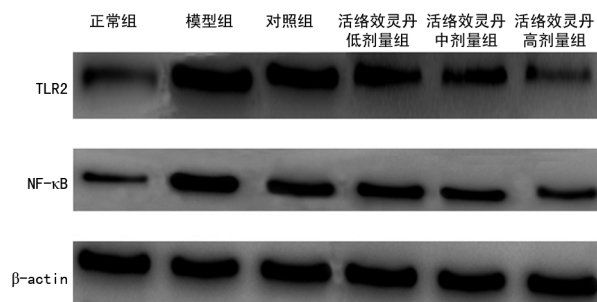
图 1 各组大鼠损伤部位组织中 TLR2、NF- $\kappa$ B 表达的 Western blot 图

表 5 各组大鼠损伤部位组织中炎症细胞因子表达情况( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL,  $n=12$ )

组别	IL-1	IL-2	IL-3	IL-6	IL-8	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-10
正常组	77 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	90 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	67 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	87 $\pm$ 24 <sup>b</sup>	78 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	65 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	112 $\pm$ 22 <sup>b</sup>	341 $\pm$ 20 <sup>b</sup>
模型组	253 $\pm$ 13 <sup>ac</sup>	505 $\pm$ 15 <sup>ac</sup>	342 $\pm$ 12 <sup>ac</sup>	495 $\pm$ 18 <sup>ac</sup>	621 $\pm$ 24 <sup>ac</sup>	311 $\pm$ 19 <sup>ac</sup>	1 356 $\pm$ 97 <sup>ac</sup>	119 $\pm$ 12 <sup>ac</sup>
对照组	109 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	200 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	118 $\pm$ 22 <sup>b</sup>	210 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	256 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	176 $\pm$ 24 <sup>b</sup>	543 $\pm$ 22 <sup>b</sup>	339 $\pm$ 19 <sup>b</sup>
活络效灵丹低剂量组	131 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	247 $\pm$ 11 <sup>bc</sup>	139 $\pm$ 16 <sup>bc</sup>	279 $\pm$ 21 <sup>bc</sup>	311 $\pm$ 26 <sup>bc</sup>	190 $\pm$ 25 <sup>bc</sup>	619 $\pm$ 23 <sup>bc</sup>	289 $\pm$ 23 <sup>bc</sup>
活络效灵丹中剂量组	121 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	231 $\pm$ 35 <sup>bc</sup>	131 $\pm$ 12 <sup>bc</sup>	241 $\pm$ 12 <sup>bc</sup>	278 $\pm$ 27 <sup>bc</sup>	185 $\pm$ 39 <sup>b</sup>	597 $\pm$ 23 <sup>bc</sup>	319 $\pm$ 21 <sup>b</sup>
活络效灵丹高剂量组	118 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	212 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	120 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	232 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	258 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	179 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	539 $\pm$ 35 <sup>b</sup>	337 $\pm$ 13 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与正常组比较; b:  $P < 0.05$ , 与模型组比较; c:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

### 3 讨 论

急性软组织损伤是一种外来或内在致病因素作用导致组织发生急性破坏、生理功能发生暂时紊乱而产生的损伤, 在日常生活中比较常见, 患者会产生一系列症候表现, 影响正常的工作生活。中医认为其病因病机主要为“气滞血瘀、脉络不通”, 认为其损伤之症, 多伤及气血, 伤气则气滞, 气滞则血淤, 血淤致气阻, 从而导致血滞留于肌肤表面, 使肌肤呈现肿痛和青紫色, 故发生软组织损伤后, 主要表现为局部的瘀斑、肿胀、疼痛且活动受限<sup>[2]</sup>。临床上也证明, 很多中医名方对急性软组织损伤确有疗效, 但具体机制却很模糊。本实验研究主体药物活络效灵丹具有“抗炎、祛瘀、镇痛”之效, 可改善肿胀、淤青、疼痛等相关症状, 本研究结果显示: 活络效灵丹加减方可加快改善急性软组织损伤大鼠患肢肿胀、瘀斑等症候, 提高基本痛阈值、行止痛之功效, 还可明显降低血液黏稠度、行活血散淤之功效, 证实了活络效灵丹加减方对急性软组织损伤大鼠的疗效。

现代医学认为急性软组织损伤发生时, 主要表现为炎症因子的不断释放, 因此, 抑制炎症因子的释放对急性软组织损伤有重要意义。而炎症因子主要分为致炎因子及抗炎因子。前者可促进炎症的发展进程, 后者可抑制炎症的发展进程, 两者共同作用于机体, 其动态平衡可影响炎症发生发展的结局及受损组织的康复。本研究中 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  属于促炎因子。在复杂的炎症反应中, IL-1 $\beta$  是整个炎症持续进展中一直存在的炎症因子, 它和 TNF- $\alpha$  是众多炎症因子中最先释放分泌的促炎前因子, 它们的分泌会刺激 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8 等其他促炎因子的释放, 从而形成瀑布式炎症级联反应。IL-8 因其敏感性较强, 在炎症局部组织中会大幅升高, 故在炎症疾病的诊断中, 可作为诊断依据<sup>[14]</sup>。同时, IL-8 还能特异性地趋化中性粒细胞侵入炎症组织, 促使脱颗粒释放炎症介质, 并可激活巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞等炎症细胞, 引起患者发热, 进一步促进炎症的病理性损伤<sup>[15]</sup>。本研究实验结果也显示: 模型组大鼠症候严重, 以上指标的表达显著增多; 活络效灵

丹则有效改善了相关症候, 降低了以上致炎因子的表达。本研究中的 IL-10 属于抗炎因子。研究发现, IL-10 有很强大的抗炎活性和免疫抑制作用<sup>[16]</sup>, 一方面, 能够一定程度抑制 IL-2、IL-3、TNF- $\alpha$  等细胞因子的释放, 并与其他抗炎介质具有协同作用<sup>[17]</sup>; 另一方面, 作为免疫调节因子, 可限制、终止炎症反应、调节免疫细胞分化、增殖, 从而防止发生过度免疫造成的损伤, 并通过抑制其他炎症细胞活化, 减少促炎因子释放, 抑制炎症发展<sup>[18]</sup>。本实验结果也显示模型组大鼠 IL-10 表达明显降低, 而活络效灵丹则可促进 IL-10 的表达。

TIRs 是新近发现的一类细胞表面受体, 不仅对病原体有一定感知作用, 可刺激细胞产生特异性免疫<sup>[19]</sup>, 作为连接特异性、非特异性免疫的纽带, 当微生物突破机体屏障时, 它还可以识别外物, 激活机体, 产生应答, 同时, TLRs 介导的信号通路在炎症进程中也起着重要的作用<sup>[20-21]</sup>, 当 TLRs 激活后, 可促使 NF- $\kappa$ B 等通路的活化, 在 TLRs/NF- $\kappa$ B 通路中, TLR2、NF- $\kappa$ B 作为两个关键蛋白, 对下游炎症因子的释放发挥了巨大的作用。抑制这两个关键蛋白, 可调控炎症反应的发生发展。本实验结果显示活络效灵丹加减方可抑制 TLR2、NF- $\kappa$ B 的表达。

综上, 活络效灵丹加减方对大鼠急性软组织损伤具有一定保护作用, 该作用可能与抑制 TLR2/NF- $\kappa$ B 信号通路, 调节下游炎症因子的表达有关。本研究首次从分子、细胞水平对活络效灵丹发挥药理效应的机制做了初步探索, 为其在临床发挥更大价值奠定了基础理论依据。但本研究仍存在一些不足: (1) 炎症因子的调控是一张巨大的网络, 通路错综复杂, 相互影响, 相互制约, 本研究只是进行了初步探索, 证明活络效灵丹的作用可能与此通路有关, 但不能直接下定论; (2) 由于本研究的研究重点为通过建立大鼠急性软组织损伤模型验证该方疗效, 并对其可能机制进行初步探索, 但并没有专门对活络效灵丹低、中、高 3 个剂量组进行两两比较。在统计方法上选用的 SNK 法和 Dunnett's t 法, 但因涉及多时间点测量数据组间比较采用的是重复测量方差分析法, 该方法得出的结果自

带有活络效灵丹低、中、高 3 个剂量组之间的比较,笔者也发现了在某些时间点,活络效灵丹低、高剂量组之间存在统计学差异。故在后期,本课题组会考虑加入针对此通路的拮抗剂,进一步深入探索。

## 参考文献

[1] 胡超伟. 超微针刀疗法[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2014.

[2] 袁建迪,朱少兵,沈彦,等. 中医外治急性软组织损伤的临床研究进展[J]. 中医外治杂志,2008,17(1):41-43.

[3] 韦贵康. 中医筋伤学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006.

[4] 章建华,丁伟国. 三黄软膏外敷治疗大鼠急性软组织损伤的实验研究[J]. 中医正骨,2010,22(3):6-9.

[5] 张锡纯. 河北新医大学《医学衷中参西录》修订小组修订. 医学衷中参西录[M]. 石家庄:河北人民出版社,1977.

[6] HONG Y Z, EUN M S, LISA Y G, et al. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonkiol is function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264. 7 macrophages via NF- $\kappa$ B, JNK and p38MAPK INACTIVATION[J]. Eur J Pharmacol,2018,24(586):340-349.

[7] 刘丽燕,倪秀雄. TLRs/MyD88 信号转导通路 with 树突状细胞的研究进展[J]. 海峡药学,2009,21(10):1-4.

[8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993.

[9] 徐卫东,罗红梅,喻建平. 加味活络效灵丹对啤酒诱发痛风模型大鼠关节组织中 IL-1 $\beta$  表达的影响[J]. 风湿病与关节炎,2017,6(3):12-14,63.

[10] 徐琳本,陈丽萍,肖梅英. 活血促愈胶囊对外伤血瘀证大鼠模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):270-273.

[11] 李进辉,魏威,陈鲜. 玄神活血消肿方对急性软组织损伤大鼠 IL-6、IL-1 $\beta$  和血液流变学的影响[J]. 河南中医,2016,36(12):2087-2089.

[12] XIE D Q, SUN G Y, ZHANG X G, et al. Osthole Preconditioning protects rats against renal ischemia-reperfusion Injury[J]. Transplant Proc,2016,47(6):1620-1626.

[13] 朱换平,许晓英,邱桐. 踝舒对急性软组织损伤动物模型 IL-1B 影响的实验研究[J]. 甘肃中医学院学报,2013,20(3):20-21.

[14] SONODA Y, KASAHARA T, YAMAGUCHI Y, et al. Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline[J]. Anesth Pain Med,2012,2(1):32-35.

[15] 苗雪,官杰. IL-8 的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2011,32(22):3693-3695.

[16] CASSATELLA M A, MEDA L, BONORA S, et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide[J]. J Exp Med,1993,78(6):2207-2211.

[17] 张道杰,段胡霞. IL-10 的研究进展[J]. 国外医学(免疫学分册),2003,26(1):40.

[18] MOSSER D M, ZHANG X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine[J]. Immunol Rev,2008,226(1):205-218.

[19] 刘丽燕,倪秀雄. TLRs/MyD88 信号转导通路 with 树突状细胞的研究进展[J]. 海峡药学,2009,21(10):1-4.

[20] ZHU Y G, QU J M. Toll like receptors and inflammatory factors in Sepsis and differential expression related to age [J]. Chin Med J,2011,120(1):56-61.

[21] FERRERO R L. Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, Helicobacter pylori [J]. Mol Immunol,2016,42(8):879-885.

(收稿日期:2019-03-01 修回日期:2019-04-14)

(上接第 2736 页)

[7] LIU X, WU X. Utilizing matrigel transwell invasion assay to detect and enumerate circulating tumor cells[J]. Methods Mol Biol,2017,1634:277-282.

[8] WOOD S L, PERNEMALM M, CROSBIE P A, et al. The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets [J]. Cancer Treat Rev,2014,40(4):558-566.

[9] LANGLEY R R, FIDLER I J. The seed and soil hypothesis revisited—the role of tumor-stromainteractions in metastasis to different organs [J]. Int J Cancer,2011,128(11):2527-2535.

[10] PAPASPYROU K, BROCHHAUSEN C, SCHMIDTMANN I, et al. Fascin upregulation in primary head and neck squa-

mous cell carcinoma is associated with lymphatic metastasis [J]. Oncol Lett,2014,7(6):2041-2046.

[11] HAN S Q, HUANG J Y, LIU B Q, et al. Improving fascin inhibitors to block tumor cell migration and metastasis [J]. Mol Oncol,2016,10(7):966-980.

[12] NADIR Y, BRENNER B. Heparanase procoagulant activity in cancer progression [J]. Thromb Res,2016,140(S1):S44-48.

[13] SANDERSON R D, ELKIN M, RAPRAEGER A C, et al. Heparanase regulation of cancer, autophagy and inflammation: new mechanisms and targets for therapy [J]. FEBS J,2017,284(1):42-55.

(收稿日期:2019-03-12 修回日期:2019-04-26)