

泽兰甲醇提取物对慢性软组织损伤模型大鼠的影响及其机制

高渐联^{1,2}, 李汉伟³, 邓智建¹, 卢乙众¹, 张鑫¹, 王金彩¹, 贾奎^{1*}
(1. 新乡医学院第一附属医院, 河南 新乡 453100; 2. 河南省神经修复重点实验室, 河南 新乡 453100;
3. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046)

摘要: **目的** 探讨泽兰甲醇提取物对慢性软组织损伤模型大鼠的影响。**方法** 采用机械冲击挫伤造模, 正常喂养 2 周复制慢性软组织损伤大鼠模型, 然后连续每天 1 次灌胃泽兰甲醇提取物高、中、低剂量 14 d, 在给药的第 1、2、3 周末, 通过测定受损肌肉组织中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及血清中白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 及组胺水平、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、I/Ⅲ 胶原蛋白 (Collagen-I/Ⅲ) 表达以及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 活性、内源性碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 活性, 探讨泽兰甲醇提取物对慢性软组织损伤大鼠模型的影响及其机制。**结果** 泽兰甲醇提取物可明显降低肌肉组织中 MDA、PGE₂ 及 NO 含有量和 TNF-α、IL-6 和组胺水平 ($P < 0.05$), 显著升高肌肉组织中 SOD ($P < 0.01$), 可显著抑制组织中 Collagen-I/Ⅲ 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 早期显著提高组织中 VEGF 和 bFGF 活性 ($P < 0.01$)。**结论** 泽兰甲醇提取物对慢性软组织损伤模型大鼠具有一定的治疗作用, 其机制与抑制损伤部位的炎症因子水平, 改善其氧化应激, 并与抑制 I/Ⅲ 胶原蛋白过度表达, 增强 VEGF 和 bFGF 活性加快修复速度有关。

关键词: 泽兰; 慢性软组织损伤; 炎症细胞因子; 氧化应激; Collagen-I/Ⅲ; VEGF; bFGF

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)03-0537-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.006

Effect and mechanism of methanolic extract of *Eupatorium* to model rats with chronic muscle injury

GAO Jian-lian^{1,2}, LI Han-wei³, DENG Zhi-jian¹, LU Yi-zhong¹, ZHANG Xin¹, WANG Jin-cai¹, JIA Kui^{1*}
(1. The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China; 2. Henan Key Laboratory of Neural Regeneration, Xinxiang 453100, China; 3. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effect and mechanism of methanolic extract of *Eupatorium* (MEOE) to model rats with chronic soft tissue injury. **METHODS** The model rats were established by mechanical injury and a subsequent two-week normal feeding for respective administration of high, medium and small dosage of MEOE once a day successively for 14 days. An array of indices, the level of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), prostaglandin E₂ (PGE₂), nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6) and histamine, the expression of tumor necrosis factor-α (TNF-α), nitric oxide (NO) and Collagen-I/Ⅲ, and the activity of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) were measured to analyze the effect of MEOE to model rats with chronic muscle injury. **RESULTS** MEOE resulted in apparent reduction of contents of MDA, PGE₂ and NO, and the levels of TNF-α and IL-6 in muscular tissue ($P < 0.05$), significantly increased of the SOD in muscular tissue ($P < 0.01$), a remarkably inhibited expression of the tissue Collagen-I/Ⅲ protein

收稿日期: 2017-10-11

作者简介: 高渐联 (1981—), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药药理及临床药学。Tel: (0373) 4404491, E-mail: gaolian2007@163.com

* 通信作者: 贾奎 (1977—), 男, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合防治心脑血管疾病的研究。Tel: (0373) 4403293, E-mail: jjkkjiakui@163.com

($P < 0.01$), and significantly improved activity of tissue VEGF and bFGF ($P < 0.01$). **CONCLUSION** The certain therapeutic effects of MEOE to rats with chronic muscle injury may correlate with its influence to the levels of inflammatory factors inhibition, the oxidative stress relief, the overexpression of collagen-I/Ⅲ inhibition, the VEGF and bFGF activity improvement, and the time spare from the repairing.

KEY WORDS: *Eupatorium*; chronic soft tissue injury; inflammatory cytokines; oxidative stress; Collagen-I/Ⅲ; VEGF; bFGF

泽兰为唇形科植物毛叶地瓜儿苗 *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel 干燥地上部分, 味苦、辛, 微温^[1]。泽兰含有多种活性成分, 主要含三萜类、酚酸类、黄酮类、挥发油等, 具有活血化瘀、行水消肿之功^[2]。泽兰的活血化瘀、行水消肿仅为临床经验总结, 缺乏基础研究, 泽兰甲醇提取物的基础研究又较少^[3]。为给泽兰甲醇提取物的临床疗效提供理论依据, 本实验通过建立慢性软组织损伤的大鼠模型, 测定丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、一氧化氮 (NO)、组胺、I/Ⅲ胶原蛋白 (Collagen-I/Ⅲ) 表达以及血管内皮生长因子 (VEGF) 活性、内源性碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 活性, 探讨泽兰甲醇提取物对慢性软组织损伤模型大鼠的影响及其机制。

1 材料

1.1 实验动物 Wistar 大鼠, 健康雄性, 清洁级, 体质量 180 ~ 200 g, 合格证 SCXK (冀) 2008-1-003, 由河北省医学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂 泽兰甲醇提取物, 泽兰经由新乡医学院药学院鉴定为唇形科植物地瓜儿苗 (*Lycopus lucidus* Turcz.), 泽兰采集后晾干、切碎, 于 60% 恒温干燥箱中干燥至恒重, 用粉碎机粉碎后过 40 目筛, 准确称取 50 g, 加约 10 倍量的甲醇浸提 48 h, 提取 2 次, 合并 2 次滤液, 过滤后减压浓缩至浸膏, 提取率为 6.53%, 4 ℃ 冰箱中保存备用^[4], 由新乡医学院药学院提供。云南白药粉 (4 g/瓶, 批号 20090521, 云南白药集团股份有限公司); MDA 试剂盒 (批号 20090324)、SOD 试剂盒 (批号 20090414)、NO 试剂盒 (批号 20090417), 均为南京建成生物工程研究所产品; PGE₂ 酶联免疫试剂盒 (批号 20090414, 上海活乐生物科技有限公司); 组胺酶联免疫试剂盒 (批号 20090521)、IL-6 酶联免疫试剂盒 (批号 200900502), 均购于上海巧伊生物科技有限公司; TNF- α 酶联免疫试剂盒 (批号 200900510, 南京建成生物工程研究所); Collagen-I、Collagen-Ⅲ免

疫组化抗体试剂盒 (批号 202004, Santa Cruz); VEGF/bFGF 免疫组化试剂盒 (批号分别为 2915CY15、2818CY21, Peprotech 公司)。

1.3 实验仪器 Model 680 型全自动酶标仪 (美国 BIO-RAD); FA (N) /JA (N) 系列电子天平 (上海民桥精密仪器有限公司); TGL-16G 高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂); UV-260 分光光度计 (日本岛津); 680 型酶标仪 (美国 BIO-RAD); CKX31 型倒置显微镜 (日本 Olympus); Image pro plus6.0 图像分析软件。

2 方法

2.1 造模、给药与取材 160 只实验性大鼠适应性喂养 1 周后, 按照随机数字表法分为 6 组, 分别为正常组 ($n = 10$), 模型组 ($n = 30$), 云南白药组 ($n = 30$), 泽兰甲醇提取物高 ($n = 30$)、中 ($n = 30$)、低 ($n = 30$) 剂量组。需造模大鼠脱去右后大腿鼠毛, 采用机械冲击挫伤的造模方法^[5], 将大鼠后肢置于伸膝、踝背屈 90° 位, 将 200 g 重的砝码垂直高处 (50 cm) 自由落体冲击大鼠外侧肌肉丰厚处, 连续击打 3 次, 打击面积约 1 cm², 打击处肿胀, 有散在出血点但无皮损, 手触无骨折及脱位, 已经解剖及组织学验证成功率为 100%。不做处理正常饲养 2 周, 形成慢性软组织损伤动物模型。造模各组分别灌胃高、中、低剂量泽兰甲醇提取物生理盐水溶液 (0.8、0.4、0.2 g/kg, 10 mL/kg), 云南白药生理盐水溶液 (0.18 g/kg, 10 mL/kg), 模型组与正常组给予同体积生理盐水, 1 次/d, 连续给药 14 d。于给药后第 1、2、3 周末, 造模各组随机选取 10 只处死, 以打击部位为中心, 沿损伤处切取肌肉组织, 取组织 0.3 g, 用冰生理盐水 (1 : 9) 制成匀浆, 3 500 r/min 4 ℃ 离心 10 min 后, 收集上清, 保存备用 (20 ℃)^[5]。沿损伤处切取肌肉组织, 生理盐水冲洗, 脱水, 石蜡包埋备用。

2.2 观察指标 采用亚硝酸盐抑制法测定 SOD 活性, 采用硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid reactive substance assay, TBARS) 法测定 MDA 的含有量, 采用酶联免疫法 (enzyme linked immunoassay,

ELISA) 法测组织中 PGE₂ 含有量, 采用硝酸还原酶法测定 NO 的含有量; 按 ELISA 试剂盒操作说明测定血清 IL-6、组胺、TNF-α 含有量, 步骤严格按照试剂盒操作说明进行。在各时间点沿损伤处切取肌肉组织, 生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 常规脱水, 透明, 石蜡包埋, 连续切片, 裱于涂有 APES 载玻片上, 烤片备用。采用免疫组织化学检测骨骼肌 Collagen- I、Ⅲ型胶原蛋白的表达。免疫组化后切片照 (×200), 采用 Image pro plus 6.0 图形分析系统, 对相同平面的切片进行积分光密度分析。兔抗鼠 VEGF (1:100) ABC 法常规程序进行免疫组化染色, 在光镜下 (400 倍) 随机选取 6 个视野计数, 计算 VEGF 和 bFGF 阳性细胞平均数^[6]。

2.3 统计方法 数据用 SPSS 22.0 统计软件, 采

表 1 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠组织中 SOD 含有量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Comparison of SOD contents in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)		
		第1周末	第2周末	第3周末
正常组	—	54.39 ± 1.89 **	—	—
模型组	—	48.96 ± 1.96	47.26 ± 4.33	49.66 ± 3.79
云南白药组	0.18	68.85 ± 4.28 **	63.98 ± 6.80 **	66.86 ± 4.96 **
泽兰甲醇提取物	0.8	62.63 ± 3.78 **	60.69 ± 2.66 **	61.28 ± 3.33 **
泽兰甲醇提取物	0.4	58.64 ± 4.42 **	60.39 ± 5.80 **	56.84 ± 4.95 **
泽兰甲醇提取物	0.2	59.75 ± 3.79 **	57.07 ± 4.56 **	59.17 ± 6.40 **

注:与模型组比较,** $P<0.01$

表 2 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠组织中 MDA 含有量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 2 Comparison of MDA contents in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	MDA/(μmol·g ⁻¹)		
		第1周末	第2周末	第3周末
正常组	—	3.57 ± 1.02 **	—	—
模型组	—	5.77 ± 1.16	5.93 ± 2.03	5.98 ± 2.74
云南白药组	0.18	3.96 ± 1.04 **	3.47 ± 1.33 **	2.81 ± 1.19 **
泽兰甲醇提取物	0.8	4.88 ± 0.63 *	4.63 ± 0.47 *	4.38 ± 0.56 *
泽兰甲醇提取物	0.4	4.76 ± 0.34 *	4.51 ± 0.49 **	4.68 ± 0.46 *
泽兰甲醇提取物	0.2	4.74 ± 0.81 *	4.80 ± 0.68 *	4.15 ± 1.04 **

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3.2 对慢性软组织损伤大鼠模型组织中 PGE₂ 与 NO 含有量的影响 由表 3~4 可见, 第 1 周末与正常组比较, 模型组可显著升高组织中 NO 和 PGE₂ 水平 ($P<0.01$)。各时间点, 泽兰甲醇提取物各组均可明显降低模型大鼠组织中 NO 含有量。云南白药组在各时间点均可显著降低模型大鼠组织中 NO 和 PGE₂ 水平 ($P<0.01$)。泽兰甲醇提取物中、低剂量组在第 2、3 周末可显著降低模型大鼠组织中 NO 水平 ($P<0.01$)。除泽兰甲醇提取物高剂量组在第 2 周末可明显降低模型大鼠组织中 PGE₂ 水平外

用单因素方差结合 SNK- q 检验进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P<0.05$ 认为有明显统计学差异, $P<0.01$ 认为有显著统计学差异。

3 结果

3.1 对慢性软组织损伤大鼠模型组织中 SOD 与 MDA 含有量的影响 由表 1~2 可见, 第 1 周末, 与正常组比较, 模型组可显著升高组织中 MDA 水平和显著降低 SOD 水平。各时间点用药各组与模型组比较, 均可显著升高组织中 SOD 含有量 ($P<0.01$)。各时间点与模型组比较, 云南白药组可显著降低组织中 MDA 含有量 ($P<0.01$), 泽兰甲醇提取物均可明显降低组织中 MDA 含有量。其中第 2 周末的泽兰甲醇提取物中剂量组、第 3 周末的泽兰甲醇提取物低剂量组均可显著降低组织中 MDA 含有量 ($P<0.01$)。

($P<0.01$), 其他泽兰甲醇提取物组在各时间点均可显著降低模型大鼠组织中 PGE₂ 水平 ($P<0.01$)。

3.3 对慢性软组织损伤大鼠模型组织中组胺、IL-6 和 TNF-α 含有量的影响 由表 5~7 可见, 第 1 周末, 与正常组比较, 模型组均可显著升高模型大鼠组织中组胺、IL-6 和 TNF-α 含有量 ($P<0.01$)。在第 1 周末, 泽兰甲醇中剂量组可明显降低模型大鼠组胺含有量 ($P<0.05$)。在各时间点, 其他用药各组均可显著降低模型大鼠组织中组胺、IL-6 和 TNF-α 含有量 ($P<0.01$)。

表 3 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠模型组织中 NO 含有量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 Comparison of NO contents in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	NO/(μmol·g ⁻¹)		
		第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末
正常组	—	9.42 ± 1.19 **	—	—
模型组	—	15.67 ± 2.88	16.68 ± 3.73	15.89 ± 3.16
云南白药组	0.18	10.47 ± 2.07 **	10.31 ± 3.10 **	11.02 ± 2.29 **
泽兰甲醇提取物	0.8	13.67 ± 1.18 *	12.93 ± 3.57 *	10.89 ± 2.91 **
泽兰甲醇提取物	0.4	13.26 ± 1.56 *	11.82 ± 4.53 **	12.55 ± 2.38 **
泽兰甲醇提取物	0.2	13.22 ± 2.76 *	12.61 ± 1.94 **	12.51 ± 3.35 **

注:与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01

表 4 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠模型组织中 PGE₂ 含有量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 4 Comparison of PGE₂ contents in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	PGE ₂ /(ng·L ⁻¹)		
		第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末
正常组	—	16.05 ± 0.69 **	—	—
模型组	—	29.04 ± 2.03	25.64 ± 3.34	25.67 ± 2.08
云南白药组	0.18	18.83 ± 2.82 **	17.33 ± 1.91 **	17.17 ± 1.81 **
泽兰甲醇提取物	0.8	23.30 ± 0.90 **	22.87 ± 2.19 *	21.45 ± 4.12 **
泽兰甲醇提取物	0.4	23.29 ± 3.32 **	21.16 ± 0.73 **	21.68 ± 3.94 **
泽兰甲醇提取物	0.2	23.90 ± 1.59 **	22.72 ± 3.64 **	22.06 ± 2.10 **

注:与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01

表 5 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠组织中组胺含有量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 5 Comparison of histamine levels in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	组胺/(ng·mL ⁻¹)		
		第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末
正常组	—	15.59 ± 0.89 **	—	—
模型组	—	39.34 ± 3.18	36.38 ± 1.48	34.7 ± 3.02
云南白药组	0.18	31.80 ± 0.90 **	26.57 ± 3.96 **	24.47 ± 2.58 **
泽兰甲醇提取物	0.8	35.82 ± 1.42 **	29.33 ± 2.44 **	26.64 ± 3.35 **
泽兰甲醇提取物	0.4	36.60 ± 1.79 *	31.91 ± 2.23 **	27.20 ± 3.12 **
泽兰甲醇提取物	0.2	36.44 ± 1.72 **	31.72 ± 2.68 **	27.81 ± 2.43 **

注:与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01

表 6 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠组织中 IL-6 含有量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 6 Comparison of IL-6 contents in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-6/(ng·mL ⁻¹)		
		第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末
正常组	—	3.45 ± 0.33 **	—	—
模型组	—	39.72 ± 2.06	36.38 ± 3.85	35.12 ± 4.12
云南白药组	0.18	34.23 ± 3.10 **	24.38 ± 2.59 **	22.88 ± 2.30 **
泽兰甲醇提取物	0.8	32.62 ± 3.06 **	30.70 ± 2.69 **	22.54 ± 2.99 **
泽兰甲醇提取物	0.4	35.60 ± 4.87 **	30.24 ± 2.66 **	23.87 ± 4.73 **
泽兰甲醇提取物	0.2	35.02 ± 3.23 **	29.94 ± 3.81 **	23.72 ± 2.70 **

注:与模型组比较,***P* < 0.01

表 7 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠组织中 TNF-α 含有量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 7 Comparison of TNF-α contents in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)		
		第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末
正常组	—	16.64 ± 4.30 **	—	—
模型组	—	162.28 ± 30.82	200.94 ± 23.67	211.56 ± 29.20
云南白药组	0.18	73.58 ± 27.46 **	67.39 ± 28.79 **	42.02 ± 11.49 **
泽兰甲醇提取物	0.8	80.92 ± 28.31 **	84.06 ± 28.89 **	75.03 ± 19.64 **
泽兰甲醇提取物	0.4	83.66 ± 20.30 **	74.88 ± 21.08 **	69.13 ± 26.27 **
泽兰甲醇提取物	0.2	83.13 ± 18.16 **	76.48 ± 30.68 **	57.64 ± 16.42 **

注:与模型组比较,** $P < 0.01$

3.4 对慢性软组织损伤大鼠模型组织中 Collagen-I/Ⅲ蛋白表达的影响 由表 8~9 可见,在第 1 周末,模型大鼠组织中 Collagen-I 和 Collagen-Ⅲ蛋白表达显著高于正常组 ($P < 0.01$)。在各时间点,用药各组均可显著降低模型大鼠组织中 Collagen-I 和 Collagen-Ⅲ蛋白表达 ($P < 0.01$),且呈逐渐下降趋势。

表 8 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠组织中 Collagen-I 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 8 Comparison of the expressions of Collagen-I protein in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Collagen-I 蛋白表达/积分光密度值(×10 ³)		
		第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末
正常组	—	2.047 ± 0.497 **	—	—
模型组	—	5.495 ± 0.819	5.458 ± 0.984	5.598 ± 0.993
云南白药组	0.18	3.748 ± 0.536 **	3.163 ± 0.897 **	3.139 ± 0.808 **
泽兰甲醇提取物	0.8	2.980 ± 0.471 **	3.211 ± 0.510 **	2.976 ± 0.353 **
泽兰甲醇提取物	0.4	3.271 ± 0.377 **	3.004 ± 0.263 **	2.955 ± 0.373 **
泽兰甲醇提取物	0.2	3.131 ± 0.476 **	3.220 ± 0.396 **	2.925 ± 0.314 **

注:与模型组比较,** $P < 0.01$

表 9 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠组织中 Collagen-Ⅲ蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 9 Comparison of the expressions of Collagen-Ⅲ protein in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Collagen-Ⅲ 蛋白表达/积分光密度值(×10 ³)		
		第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末
正常组	—	3.667 ± 0.829 **	—	—
模型组	—	7.172 ± 0.678	7.447 ± 0.413	6.829 ± 0.611
云南白药组	0.18	5.843 ± 0.883 **	5.257 ± 0.775 **	4.948 ± 0.932 **
泽兰甲醇提取物	0.8	5.901 ± 0.276 **	4.835 ± 0.336 **	5.324 ± 0.376 **
泽兰甲醇提取物	0.4	6.202 ± 0.475 **	5.061 ± 0.312 **	5.131 ± 0.316 **
泽兰甲醇提取物	0.2	5.952 ± 0.549 **	5.158 ± 0.365 **	5.003 ± 0.288 **

注:与模型组比较,** $P < 0.01$

3.5 对慢性软组织损伤大鼠模型组织中 VEGF 和 bFGF 活性的影响 由表 10~11 可见,在第 1 周末,与正常组比较,VEGF 和 bFGF 在模型组活性表达显著升高 ($P < 0.01$);其他用药组与模型组比较,VEGF 和 bFGF 表达亦显著升高 ($P < 0.01$)。在第 2 周末,用药各组 VEGF 和 bFGF 在模型大鼠的表达较模型组有显著升高 ($P < 0.01$)。在第 3 周末,用药各组 VEGF 和 bFGF 的表达较模型组显著下降 ($P < 0.01$)。用药各组对模型大鼠 VEGF 和 bFGF 的表达影响呈先升后降的趋势。

4 讨论

慢性损伤是机体受到钝性暴力使皮下组织受到损伤,由于伤后炎症反应期长,愈合差,解剖学结构破坏以及生理功能紊乱,肿胀,皮下淤血或血肿,严重可伤及筋膜,是临床常见病和多发病^[7],疼痛为其主要临床特征,无菌炎症是主要的病理特点^[8]。机械冲击挫伤的造模方法,属闭合性软组织损伤造模,符合临床所见软组织损伤特点,其发病原因与临床基本吻合,此造模方法在实验研究中大量使用,方法稳定可靠,重复性好^[9]。

表 10 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠组织中 VEGF 活性的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 10 Comparison of VEGF activities in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	VEGF		
		第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末
正常组	—	18.6 ± 1.5 **	—	—
模型组	—	39.0 ± 3.7	49.3 ± 3.4	48.5 ± 5.0
云南白药组	0.18	52.9 ± 3.5 **	65.9 ± 5.6 **	24.3 ± 5.3 **
泽兰甲醇提取物	0.8	48.5 ± 2.3 **	66.0 ± 10.3 **	22.8 ± 8.3 **
泽兰甲醇提取物	0.4	52.0 ± 3.6 **	69.7 ± 6.7 **	24.6 ± 7.7 **
泽兰甲醇提取物	0.2	48.6 ± 4.7 **	68.2 ± 7.4 **	24.8 ± 7.8 **

注:与模型组比较,** $P < 0.01$

表 11 各组在不同时间点慢性软组织损伤大鼠组织中 bFGF 活性的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 11 Comparison of bFGF activities in different groups' rats with chronic soft tissue injury at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	bFGF		
		第 1 周末	第 2 周末	第 3 周末
正常组	—	133.8 ± 30.2 **	—	—
模型组	—	168.8 ± 25.1	463.9 ± 24.9	363.6 ± 24.2
云南白药组	0.18	504.9 ± 49.4 **	715.4 ± 44.2 **	230.6 ± 28.6 **
泽兰甲醇提取物	0.8	508.2 ± 36.2 **	705.9 ± 15.5 **	238.6 ± 18.8 **
泽兰甲醇提取物	0.4	501.3 ± 21.4 **	713.8 ± 27.8 **	230.7 ± 16.2 **
泽兰甲醇提取物	0.2	501.6 ± 36.8 **	705.9 ± 29.5 **	244.3 ± 21.9 **

注:与模型组比较,** $P < 0.01$

氧自由基在炎症发生发展过程中起重要的作用,所形成的脂质过氧化物,具有强烈的趋化作用,可加重炎症反应。因此,阻断氧自由基的合成和释放将延缓和减轻炎症的病理过程^[10-11]。SOD 广泛存在于各组织中,是机体清除超氧阴离子自由基的重要酶,对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用^[4]。MDA 是脂质过氧化的最终产物,可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映细胞损伤程度^[12]。本研究中,各时间点泽兰甲醇提取物组均可显著升高 SOD 水平和明显降低 MDA 水平,提示泽兰甲醇提取物具有清除氧自由基,抑制过氧化物的作用,对慢性软组织损伤具有修复作用。研究表明,NO 是机体内一种具有生物活性的信使和效应分子,在炎症病理过程中,可在骨骼肌中产生过量的诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS),而 iNOS 可使局部组织的 NO 浓度剧升,还可与氧自由基等反应生成氮氧化合物,在软组织损伤过程中起着重要作用^[13-14]。NO 过量可产生较多细胞毒素;NO 通过激活环氧酶而促进 PGE₂ 产生,PGE₂ 在前列腺素中致痛作用强,二者均与慢性软组织损伤的无菌性炎症及疼痛密切相关^[15]。本研究中,泽兰甲醇提取物在各时间点可明显降低肌肉组织中 NO 含有量和显著降低 PGE₂

含有量,减少细胞毒素对组织的损伤,降低 PGE₂ 产生的痛感,提示泽兰甲醇提取物具有减少肌肉组织损伤和降低疼痛感的作用。TNF-α 和 IL-6 是多功能细胞因子。TNF-α 诱导炎症反应的重要介质,可产生“瀑布效应”或级联反应诱发 IL-6 释放^[16-17]。IL-6 由淋巴细胞或非淋巴细胞产生,能促进中性粒细胞的活化、聚集,催化和放大炎性反应和毒性作用,血清中 IL-6 水平可反映组织损伤的程度^[18]。组胺作为一种炎症介质,可通过 H₁ 受体起作用,血管通透性增加,从而加速炎症反应^[19]。IL-6 和组胺在炎症早期浓度较高,在慢性炎症期亦处在较高水平。本实验中泽兰甲醇提取物各组可显著降低组织中 TNF-α、IL-6 和组胺水平,减少炎性渗出,降低肌肉组织损伤,提示泽兰甲醇提取物对降低 TNF-α、IL-6 和组胺水平更有效,具有抗炎消肿的作用。

I、Ⅲ型胶原是肌肉组织中的主要胶原,主要存在于肌外膜、肌束膜、肌内膜处。肌肉损伤时,TNF-α、IL-6 诱导产生成纤维细胞迅速增生,进而导致瘢痕组织(主要由胶原蛋白组成)的过度形成,影响机械功能^[20]。在各时间点,泽兰甲醇提取物可显著降低模型大鼠组织中 Collagen-I、Collagen-Ⅲ蛋白过度表达,抑制瘢痕形成,其机制可

能与降低炎症因子水平有关。在组织损伤修复过程中, 炎症因子大量侵入, 血管肉芽组织再生。血管内皮细胞异常活跃, 其分泌的 VEGF、bFGF 为目前研究最清楚, 作用最明确的促血管生长因子^[21]。VEGF 对内皮细胞有较强促进有丝分裂的能力, 在血管新生的起始阶段及其后的血管形成、稳定过程中发挥着关键作用, 作为神经生长因子和趋化因子促进神经组织修复^[22]。bFGF 属于肝素结合的生长因子家族成员, 是具有强烈促增殖、分化作用的生长调节因子, 是血管和肉芽组织生成的必备条件^[6, 21]。在第 1 周末与第 2 周末, 泽兰甲醇提取物可显著提高慢性软组织损伤模型大鼠受损肌肉组织中 VEGF、bFGF 蛋白活性表达, 加速组织的修复。第 3 周末, 显著降低受损肌肉组织中 VEGF、bFGF 蛋白活性表达, 提示其具有受损修复速度快, 所需修复组织时间短的作用。

本研究通过泽兰甲醇提取物对慢性软组织损伤大鼠模型研究表明, 泽兰甲醇提取物可降低大鼠模型组织中的 MDA、PGE₂ 和 NO 含有量, 降低血清中 IL-6 和组胺水平, 升高组织中 SOD 含有量, 抑制 Collagen- I、Collagen-III 蛋白过度表达, 使前期 VEGF 和 bFGF 蛋白大量表达, 后期迅速下降, 提示泽兰甲醇提取物具有抗炎抗氧化、抗炎消肿, 加快受损肌肉组织修复, 缩短组织修复时间等作用。本研究不但为临床治疗慢性软组织损伤提供了治疗思路, 也为开发泽兰药理作用提供了理论基础。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 212.

[2] 辛卫云, 苗明三. 泽兰的化学、药理及临床应用[J]. 中医学报, 2015, 30(3): 418-420.

[3] 任 强, 王红玲, 周学刚, 等. 泽兰的化学成分、质量分析及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(18): 2588-2592.

[4] 刘永生, 李晓坤, 王金菊. 泽兰甲醇提物对实验性胃溃疡模型大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 123-125.

[5] 董 静. 青白散对慢性软组织损伤模型大鼠的抗炎和抗氧化作用[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6): 93-95.

[6] 张文玉, 高 谦, 王 刚, 等. 软组织内热针对大鼠慢性损伤后血管内皮生长因子及内源性碱性成纤维细胞生长因子的影响[J]. 中华保健医学杂志, 2012, 14(3):

193-196.

[7] 杨 威, 邓慧敏, 郭秋平, 等. 701 跌打镇痛膏对新西兰兔急、慢性软组织损伤的作用及机制研究[J]. 中药材, 2014, 37(7): 1222-1229.

[8] 裴国献, 陈孝平, 邱贵兴. 外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 1041-1048.

[9] 马忆南. 闭合性软组织损伤造模方法及存在问题的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(3): 20-23.

[10] 熊玉兰, 荆 宇, 尚明英, 等. 细辛非挥发性提取物抗炎镇痛作用研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17): 2252-2257.

[11] Yamamoto S, Tanaka K, Sakimura R, *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis or autophagy-associated cell death in chondrosarcoma cell lines[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(3A): 1585-1591.

[12] 冯毅翀, 赵自明, 陈 媛, 等. 人参皂苷 Re 对运动性疲劳模型大鼠 MDA 含量和 SOD 活性的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(6): 542-544.

[13] 邱 霓, 方伟进, 李 聪, 等. 内源性一氧化氮合酶抑制物上调 4 周运动大鼠骨骼肌收缩功能和线粒体生物合成[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(7): 1259-1265.

[14] Eghbalzadeh K, Brixius K, Bloch W, *et al.* Skeletal muscle nitric oxide (NO) synthases and NO-signaling in “diabesity” - what about the relevance of exercise training interventions? [J]. *Nitric Oxide*, 2014, 37: 28-40.

[15] Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂ [J]. *J Immunol*, 2012, 188(1): 21-28.

[16] 李玉吉, 赵振文, 吴锦秋, 等. 消肿止痛合剂对软组织损伤患者 TNF-α、IL-6 的影响[J]. 西部中医药, 2013, 26(4): 82-83.

[17] 董 静. 青白散抗炎作用及对损伤组织 TNF-α、IL-6、iNOS 和 NO 表达的影响[J]. 中药材, 2011, 34(11): 1771-1773.

[18] Alves A N, Ribeiro B G, Fernandes K P, *et al.* Comparative effects of low-level laser therapy pre- and post-injury on mRNA expression of MyoD, myogenin, and IL-6 during the skeletal muscle repair[J]. *Lasers Med Sci*, 2016, 31(4): 679-685.

[19] 赵振浩, 李风军, 李红伟, 等. 消肿止痛膏治疗运动所致急性软组织损伤 40 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3): 198-201.

[20] 李 森, 靳安民, 付国建, 等. 应力刺激下兔冈上肌腱急性断裂术后腱-骨修复 I、Ⅲ型胶原的表达变化[J]. 中国临床解剖学杂志, 2010, 28(3): 308-311.

[21] 谢 辉, 龙志江, 朱久宜, 等. 活血、破血药对急性脑缺血大鼠基底动脉内皮细胞 VEGF 和 bFGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 183-186.

[22] 段彦苍, 杜惠兰, 靳亚慈. 针药结合对乳腺增生大鼠血清及乳腺 VEGF、bFGF 含量的影响[J]. 中成药, 2010, 32(7): 1217-1219.