

## 伤痛宁片对大鼠急性软组织损伤的治疗作用及其机制研究

沈建成<sup>1</sup>, 艾国<sup>2,3\*</sup>, 黄正明<sup>2</sup>, 王志坚<sup>4</sup>

1. 北京市隆福医院, 北京 100010
2. 解放军 302 医院 药学部, 北京 100039
3. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850
4. 欧盟医学科技有限公司, 安徽 合肥 230093

**摘要:** **目的** 研究伤痛宁片对大鼠急性软组织损伤的治疗效果及其可能机制。**方法** 建立大鼠急性软组织损伤模型, 随机分为 6 组, 分别为对照组, 模型组, 云南白药组 (0.25 g/kg), 伤痛宁片低、中、高剂量 (0.3、0.6、1.2 g/kg) 组。治疗 7 d 后, 评估大鼠的损伤康复情况, 进行病理组织学检查, 分别检测超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 以及丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的含量。**结果** 伤痛宁片中、高剂量组对大鼠急性软组织损伤程度均有显著的修复作用 ( $P < 0.05$ )。伤痛宁片中、高剂量组大鼠血清 SOD 活性均有明显的提高, MDA 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。大鼠肌肉组织中 IL-1 $\beta$ 、NO 和 TNF- $\alpha$  均表现出不同程度的降低。**结论** 伤痛宁片对大鼠急性软组织损伤具有治疗作用, 其机制可能与伤痛宁片的抗炎和抗氧化作用有关。

**关键词:** 伤痛宁片; 急性软组织损伤; 治疗作用; 机制

中图分类号: R285.5; R286.7 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)12-1346-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.12.004

## Therapeutical effects and its mechanism of Shangtongning Tablets on acute soft tissue injury in rats

SHEN Jian-cheng<sup>1</sup>, AI Guo<sup>2,3\*</sup>, HUANG Zheng-ming<sup>2</sup>, Wang Zhi-jian<sup>4</sup>

1. LongFu Hospital of Beijing, Beijing 100010, China
2. Department of Pharmacy, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
3. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
4. The European Union Medical Technology Co., Ltd, Hefei 230093, China

**Abstract Objective** To investigate the therapeutical effects and mechanism of Shangtongning Tablets on the acute soft tissue injury in rat models. **Methods** Rat models with acute soft tissue injury were established and randomly divided into normal, model, Yunnan Baiyao (0.25 g/kg), low-, mid-, and high-dose Shangtongning Tablets (0.3, 0.6, and 1.2 g/kg) groups. After 7 d, the influence of Shangtongning Tablets on injury degree of rats and histopathology were observed. In addition, the activity of superoxide dismutase (SOD) and the levels of malonaldehyde (MDA), nitric oxide (NO), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected. **Results** The mid- and high-dose Shangtongning Tablets had favorable improvement of therapeutical effects on the acute soft tissue injury in rat models ( $P < 0.05$ ). The SOD activity of rats in the mid- and high-dose Shangtongning Tablets groups were increased significantly, but MDA levels were decreased significantly. Shangtongning Tablets showed inhibitory function on the levels of IL-1 $\beta$ , NO, and TNF- $\alpha$  in muscles. **Conclusion** Shangtongning Tablets possess therapeutical effects on acute soft tissue injury in rats, and this may be one of the mechanisms in regard to the anti-inflammatory properties and anti-oxidant activity.

**Key words:** Shangtongning Tablets; acute soft tissue injury; therapeutical effects; mechanism

软组织损伤是骨伤科最常见的疾患, 在劳动、运动及日常生活中经常发生。所谓软组织损伤就是人体的皮肤、皮下组织、肌肉、肌腱、筋膜、韧带、关节囊和神经、血管等受到暴力撞击, 强力扭转,

收稿日期: 2014-08-15

作者简介: 沈建成 (1985—), 男, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为脊柱及微创骨科学。

\*通信作者 艾国 (1976—), 男, 博士后, 研究方向为中药新药与药理。E-mail: guoair@163.com

牵拉压迫等所引起的损伤, 但无骨折、脱位。祖国传统医学认为软组织损伤的本质是血瘀, 损伤之后脉络破损, 血离经而成瘀, 瘀而化热, 故治则以活血化瘀、清热凉血为主<sup>[1]</sup>。伤痛宁片是由乳香(制)、没药(制)、甘松、延胡索(醋制)、细辛、香附(制)、山柰、白芷 8 味中药制成的中药制剂。药效学实验结果证实伤痛宁片能显著减轻锤击大鼠足爪肿胀程度, 减少冰醋酸所致的小鼠扭体次数, 能使动物血瘀模型之黏、浓、凝改变明显减轻, 说明其确实具有散瘀止痛之功效<sup>[2]</sup>。为了深入研究伤痛宁片的活血化瘀及治疗急性软组织损伤作用的机制, 为临床应用提供实验依据, 本研究建立大鼠急性软组织损伤模型, 观察伤痛宁片在软组织修复过程的抗炎和抗氧化作用, 进一步揭示其治疗软组织损伤的机制。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

生物显微镜(日本 Olympus 公司); BS—120 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); 全自动封闭脱水机(德国 Leica 公司); 病理切片机(德国 Leica 公司); BZM—100 型超薄工作台(苏州净化设备厂)。

### 1.2 药品与试剂

伤痛宁片(0.36 g/片, 批号 13110512, 开开援生制药股份有限公司), 实验前粉碎, 过 100 目筛, 溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液, 贮存于 4 °C 冰箱中备用; 云南白药粉(4 g/瓶, 批号 20100430, 云南白药集团股份有限公司); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )放射免疫试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )放射免疫试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

### 1.3 动物

健康 Wistar 雄性大鼠, 体质量 195~210 g, 军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证号为医动字 SCXK-(军)2002-2001。饲料购自北京市科澳协力饲料有限公司, 产品许可证号 SCXK-(京)2009-0012, 产品批号 12093211。

## 2 方法

### 2.1 造模及分组

Wistar 雄性大鼠 60 只, 随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为对照组, 模型组, 云南白药组(0.25

g/kg), 伤痛宁片低、中、高剂量(0.3、0.6、1.2 g/kg, 相当于人临床用药等效剂量的 2、4、8 倍)组。实验前 24 h, 用 8% 硫化钠于大鼠臀部及大腿后侧脱毛, 采用重物打击造模<sup>[3]</sup>。除对照组外, 造模时将大鼠左下肢弯曲平放, 固定于软组织打击器底座台(硬木板)上, 将 1 根高 150 cm 的空心管垂直置于大鼠左下肢标记点处, 然后把 1 块质量约 50 g、直径约 1 cm 的圆柱铁块松手使其从 150 cm 高度沿空心管自由落体击中大鼠左下肢软组织, 连续击打 3 次, 出现明显皮下出血及肿胀的非开放性软组织面积约 1 cm<sup>2</sup> 的损伤模型。经解剖及组织学验证成功率为 100%。造模后 24 h 开始给药, 各给药组 ig 相应药物的 0.5% CMC-Na 混悬液, 对照组和模型组大鼠 ig 0.5% CMC-Na 溶液。给药体积均为 20 mL/kg, 连续给药 7 d。

### 2.2 损伤康复情况评价

连续给药 7 d 后, 观察伤肢肿胀和瘀斑症候表现, 并对大鼠损伤的康复情况进行评价。大鼠损伤康复情况评估标准见表 1<sup>[4]</sup>。综合评价级别分别为: I 级, 总分为 4 分; II 级, 总分为 5~7 分; III 级, 总分为 8~9 分; IV 级, 总分为 10~12 分。

表 1 大鼠急性软组织损伤情况评估标准

Table 1 Assessment standard of acute soft tissue injury in rats

评价项目	评分		
	3 分	2 分	1 分
皮下瘀血	多量块状	少量点状	无瘀血
疼痛反应	反应明显	反应轻	无反应
跛行情况	明显	不明显	无
红肿范围	2~4 cm	0~2 cm	无

### 2.3 组织病理学观察

最后一次给药后 24 h, 将各组大鼠处死, 断头取血, 分取血清, -20 °C 保存, 备用于血清 SOD 和 MDA 的测定。以手术刀切开大鼠损伤部位皮肤, 分离皮下组织, 以打击点为中心, 切取直径约 2 cm 的肌肉组织, 其中一半做病理切片, 另一半用来检测 IL-1 $\beta$ 、NO、TNF- $\alpha$ 。于 10% 福尔马林中固定, 浸蜡包埋、切片、HE 染色、光学树脂封片、光学显微镜下观察、照相。

### 2.4 SOD、MDA、IL-1 $\beta$ 、NO 和 TNF- $\alpha$ 的测定

严格按照试剂盒说明, 采用分光光度法测定血清 SOD 活性和 MDA 含量。将另一半肌肉组织用生

理盐水漂洗 1 min, 滤纸吸干, 用分析天平称取 100 mg, 加入生理盐水 0.5 mL, 于组织匀浆器中缓慢而均匀地研磨 15 min, 至匀浆液呈均匀一致悬浊液, 倒入试管中, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 采用 ELISA 法测定 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量, 采用分光光度法测定 NO 的含量, 具体操作步骤严格按照试剂盒要求完成。

### 2.5 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行统计分析, 计

量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较用  $t$  检验, 等级处理用秩和检验。

## 3 结果

### 3.1 伤痛宁片对大鼠急性软组织损伤程度的影响

采用重物打击可造成大鼠实验性急性软组织损伤, 具体表现为损伤部位严重红肿、跛行、触之有疼痛反应, 同时皮下有瘀血。由表 2 可以看到, 伤痛宁片中、高剂量组及云南白药组对大鼠急性软组织损伤程度均有显著的修复作用 ( $P < 0.05$ )。

表 2 伤痛宁片对大鼠急性软组织损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effects of Shangtongning Tablets on acute soft tissue injury in rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	例数/只					总评分
		I 级	II 级	III 级	IV 级	合计	
对照	—	10	0	0	0	10	0
模型	—	0	0	6	4	10	4.84 ± 1.63 <sup>*</sup>
云南白药	0.25	4	3	2	1	10	2.72 ± 1.23 <sup>#</sup>
伤痛宁片	0.3	0	7	3	0	10	4.32 ± 1.65
	0.6	3	4	2	1	10	3.68 ± 1.38 <sup>#</sup>
	1.2	5	3	2	0	10	2.56 ± 1.77 <sup>#</sup>

与对照组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group

### 3.2 伤痛宁片对急性软组织损伤大鼠病理改变影响

实验发现, 模型组损伤大鼠肌纤维明显断裂, 严重扭曲, 大量中性粒细胞和红细胞渗出, 血管充血出血, 大量炎细胞浸润, 局部组织变性坏死, 与

对照组比较差异具有显著性, 见图 1。与模型组比较, 各治疗组肌纤维肿胀、肌组织内瘀血、水肿、出血灶明显减轻或部分消失, 血管增生、胶原纤维增生与对照组织比较均有所恢复。

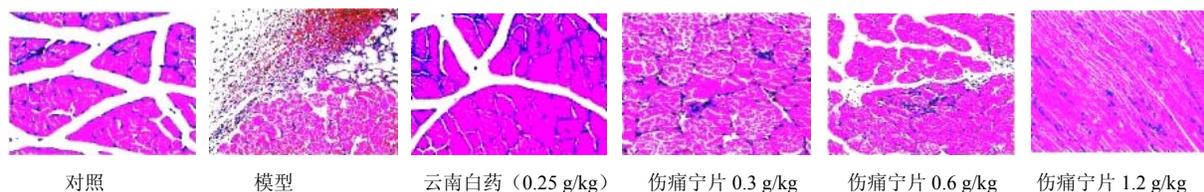


图 1 各组大鼠的肌肉组织病理切片

Fig. 1 Pathological morphology of muscular tissue of rats in each group

### 3.3 伤痛宁片对急性软组织损伤大鼠血清 SOD 和 MDA 的影响

伤痛宁片中、高剂量组及云南白药组的大鼠血清 SOD 活性均有明显的提高, MDA 含量与模型组比较显著降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

### 3.4 伤痛宁片对急性软组织损伤大鼠肌肉组织中 IL-1 $\beta$ 、NO 和 TNF- $\alpha$ 的影响

由表 4 可以看到, 急性软组织损伤后大鼠肌肉

组织中的 IL-1 $\beta$ 、NO 和 TNF- $\alpha$  的水平明显提高 ( $P < 0.05$ ), 经过各给药组治疗后, IL-1 $\beta$ 、NO 和 TNF- $\alpha$  均表现出不同程度的降低。

## 4 讨论

现代医学研究证实, 软组织损伤主要是受损组织的炎症反应, 血管活性物质和组胺等炎性介质的释放增加和酸性产物的积聚, 使损伤局部发生一系列微循环变化, 毛细血管通透性增加, 血管张力下

表 3 伤痛宁片对急性软组织损伤大鼠血清 SOD 和 MDA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effects of Shangtongning Tablets on SOD and MDA levels in serum ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(μmol·L <sup>-1</sup> )
对照	—	55.42 ± 12.33	5.87 ± 0.22
模型	—	23.65 ± 4.85*	8.44 ± 0.57*
云南白药	0.25	98.43 ± 21.62 <sup>#</sup>	4.93 ± 0.38 <sup>#</sup>
伤痛宁片	0.3	38.93 ± 6.74	7.85 ± 0.48
	0.6	53.77 ± 11.21 <sup>#</sup>	6.54 ± 0.31 <sup>#</sup>
	1.2	87.17 ± 16.54 <sup>#</sup>	5.11 ± 0.46 <sup>#</sup>

与对照组比较: \*P<0.05; 与模型组比较: <sup>#</sup>P<0.05

\*P<0.05 vs control group; <sup>#</sup>P<0.05 vs model group

表 4 伤痛宁片对急性软组织损伤大鼠肌肉组织中 IL-1β、NO 和 TNF-α 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effects of Shangtongning Tablets on IL-1β, NO, and TNF-α levels in muscle ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	IL-1β/(μg·L <sup>-1</sup> )	NO/(mol·L <sup>-1</sup> )	TNF-α/(μg·L <sup>-1</sup> )
对照	—	0.256 ± 0.042	25.44 ± 3.78	2.23 ± 0.12
模型	—	0.425 ± 0.037*	66.37 ± 11.32*	5.76 ± 0.24*
云南白药	0.25	0.267 ± 0.028 <sup>#</sup>	34.33 ± 7.24 <sup>#</sup>	2.88 ± 0.31 <sup>#</sup>
伤痛宁片	0.3	0.418 ± 0.022	62.11 ± 8.87	5.12 ± 0.56
	0.6	0.372 ± 0.018 <sup>#</sup>	50.28 ± 9.54 <sup>#</sup>	4.54 ± 0.49 <sup>#</sup>
	1.2	0.243 ± 0.031 <sup>#</sup>	42.16 ± 6.73 <sup>#</sup>	3.07 ± 0.42 <sup>#</sup>

与对照组比较: \*P<0.05; 与模型组比较: <sup>#</sup>P<0.05

\*P<0.05 vs control group; <sup>#</sup>P<0.05 vs model group

本研究观察到伤痛宁片可明显增加急性软组织损伤大鼠模型的 SOD 活性,降低 MDA 含量,通过消除自由基,抑制超氧自由基引起的膜脂质过氧化反应和自由基反应,降低 MDA 水平,从而抑制氧自由基引起的细胞和组织的炎症损伤。伤痛宁片治疗组的 IL-1β、NO 和 TNF-α 均有明显下降,提示急性软组织损伤大鼠的局部微循环改善,组织供氧增多,炎症吸收和组织再生能力增强。这些治疗作用从急性软组织损伤大鼠的康复情况评价以及肌肉组织病理观察结果也得以证实:伤痛宁片能明显改善急性软组织损伤大鼠的受伤部位的软组织肿胀,减轻机械刺激引起的受伤部位的软组织疼痛,对大鼠受伤部位的软组织损伤亦有明显的修复作用,以上作用都以中、高剂量(0.6、1.2 g/kg)组最为显著,提示伤痛宁片确实具有减轻外伤血瘀的作用。

降,血流缓慢甚至淤滞,从而加重炎症病变<sup>[6]</sup>。临床上,急性软组织损伤主要表现为局部的红、肿、热、痛,中医认为局部的血瘀在治则上大多采用活血化瘀、清热凉血的方药,均可取得了较好的疗效。伤痛宁片源于传统伤科名方,基于现代创伤理论,采用精良制备工艺而成,方中乳香活血、散瘀、止痛,没药散血祛瘀、消肿定痛,两药配合活血散瘀、消肿止痛,为主药;甘松理气止痛,延胡索活血、行气,细辛祛风散寒、通窍止痛,香附疏肝理气、调经止痛,山柰辅助活血散瘀、止痛,白芷辅助消肿透脓,诸药合用,可以起到活血散瘀、消肿止痛之功效。

综上所述,伤痛宁片具有良好的抗炎和抗氧化作用,可为其临床用于急性软组织损伤的治疗提供科学依据。

#### 参考文献

- [1] 张志强,刘 强. 中药治疗急性软组织损伤的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2008, 24 (1): 4-6.
- [2] 肖德华,郑 兵. 伤痛宁片的药效学研究 [J]. 湖南中医杂志, 2006, 22(2): 76-77.
- [3] 章建华,尹 华,刘云飞,等. 三黄散瘀巴布剂对急性软组织损伤大鼠的治疗作用 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(1): 216-218.
- [4] 于东安,杨士友,黄世福,等. 复方冰红软胶囊活血化瘀及治疗急性软组织损伤研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(11): 64-67.
- [5] 陈 杰. 中药治疗急性软组织损伤的研究进展 [J]. 中国医药导刊, 2012, 14(2): 217-219.