

# 桃红四物汤对兔肩袖损伤的修复作用及机制<sup>△</sup>

徐众华<sup>1\*</sup>, 许炯博<sup>2</sup>, 钱文武<sup>1</sup>, 阙云端<sup>1</sup>, 王秋平<sup>1</sup>, 陈建发<sup>3</sup>(1.南京市高淳人民医院骨科, 南京 211302; 2.广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 3.广州中医药大学第一附属医院四骨科, 广州 510405)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)24-2975-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.24.06



**摘要** 目的:研究桃红四物汤对兔肩袖损伤的修复作用及机制。方法:将新西兰兔随机分为空白对照组、模型组和桃红四物汤低、中、高剂量组(2.75、5.5、11 g/kg)以及桃红四物汤+LY294002组[5.5 g/kg 桃红四物汤+6.4 μg/kg LY294002(通路抑制剂)],每组11只。除空白对照组外,其余各组兔均行右侧肩胛下肌部分离断手术,复制肩袖损伤模型。造模成功后,空白对照组和模型组兔均灌胃生理盐水,桃红四物汤各剂量组兔均灌胃相应药液,桃红四物汤+LY294002组兔先灌胃桃红四物汤药液,再耳缘注射LY294002,每天1次,连续12周。末次灌胃(注射)后,观察兔腱骨界面组织的病理形态学变化,检测兔血清中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素10(IL-10)、IL-6水平,检测兔腱骨界面组织中磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的mRNA和蛋白表达水平以及自噬相关蛋白(Beclin1、LC3 II)的表达水平。结果:与空白对照组比较,模型组兔腱骨界面组织凹凸不平,内膜肿胀;血清中TNF-α、IL-6水平以及腱骨界面组织中PI3K、Akt、mTOR的mRNA和蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),IL-10水平以及Beclin1、LC3 II蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,桃红四物汤低、中剂量组兔腱骨界面组织仍存在一定的内膜破损,高剂量组兔腱骨界面组织光滑平整、内膜无明显撕裂;各剂量组兔血清和腱骨界面组织中大部分指标水平均显著逆转( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。桃红四物汤+LY294002组兔腱骨界面组织仍肿胀膨大,内膜撕裂明显;血清和腱骨界面组织中上述指标水平较模型组差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:桃红四物汤可修复兔的肩袖损伤,其作用机制与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路、激活自噬、抑制炎症反应有关。

**关键词** 桃红四物汤;肩袖损伤;PI3K/Akt/mTOR信号通路;自噬;兔

## Repair Effect and Mechanism of Taohong Siwu Decoction on Rotator Cuff Injury in Rabbits

XU Zhonghua<sup>1</sup>, XU Jiongbao<sup>2</sup>, QIAN Wenwu<sup>1</sup>, QUE Yunduan<sup>1</sup>, WANG Qiuping<sup>1</sup>, CHEN Jianfa<sup>3</sup>(1. Dept. of Orthopaedics, Nanjing Gaochun People's Hospital, Nanjing 211302, China; 2. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. Dept. of Four Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the repair effect and mechanism of Taohong siwu decoction on rotator cuff injury in rabbits. **METHODS:** New Zealand rabbits were randomly divided into blank control group, model group, Taohong siwu decoction low-dose, medium-dose and high-dose groups (2.75, 5.5, 11 g/kg), and Taohong siwu decoction+LY294002 group [5.5 g/kg Taohong siwu decoction+6.4 μg/kg LY294002 (pathway inhibitor)], with 11 rabbits in each group. Except for blank control group, other groups underwent right subscapularis muscle detachment to establish rotator cuff injury model. After modeling, blank control group and model group were given normal saline intragastrically; Taohong siwu decoction groups were given relevant medicine intragastrically; Taohong siwu decoction+LY294002 group was given Taohong siwu decoction intragastrically, and then injected with LY294002 at the ear edge, once a day, for 12 weeks. After last intragastric administration (injection), the pathological changes of tendon-bone interface was observed; the levels of TNF-α, IL-10 and IL-6 in serum were detected; mRNA and protein expressions of PI3K, Akt and mTOR in tendon-bone interface were detected; the expression of autophagy related protein (Beclin1, LC3 II) were detected. **RESULTS:** Compared with blank control group, the tendon-bone interface was uneven and the intima was swollen in model group. Serum levels of TNF-α and IL-6, mRNA and protein expressions of PI3K, Akt and mTOR in tendon-bone interface were increased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the level of IL-10 and protein expression of Beclin1 and LC3 II were decreased significantly ( $P<0.01$ ). Compared with model group, the tendon-bone interface of rabbits in Taohong siwu decoction low-dose and medium-dose groups still had certain intimal damage, while the tendon-bone interface of rabbits in high-dose group was smooth and flat without an obvious intimal tear; the levels of most indexes in serum and tendon-bone interface of rabbits were significantly reversed in each dose group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Swollen tendon-bone interface and obvious intimal

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81774339);广东省中医药局科研课题(No.20191101)

\* 副主任医师。研究方向:骨科学。电话:025-57311232。E-mail: Xzhws936@163.com

tear were observed in Taohong siwu decoction + LY294002 group; compared with model group, there was no significant difference in above indexes of serum and tendon-bone interface ( $P>0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Taohong siwu decoction may

repair the rotator cuff injury of rabbits, the mechanism of which may be associated with inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, activating autophagy and inhibiting inflammatory response.

**KEYWORDS** Taohong siwu decoction; Rotator cuff injury; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; Autophagy; Rabbit

肩袖损伤又称肩撞击综合征,是造成肩关节疼痛和肩关节活动受限的主要疾病,常表现为肌腱撕裂,并伴有肌肉萎缩以及炎症细胞浸润等现象<sup>[1]</sup>。肌腱损伤以及肌肉萎缩的本质是蛋白质过度降解,其中自噬-溶酶体系统是重要的蛋白质水解途径,可在受损的肩袖中被激活,从而引起自噬反应的发生<sup>[2]</sup>。磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是调控自噬的重要信号通路<sup>[3]</sup>。由此笔者推测,PI3K/Akt/mTOR通路可能是肩袖损伤修复的重要通路。

中医认为,瘀血内阻、气虚血瘀而成痹,是导致肩袖损伤发生的重要原因,因此临床上常以活血化瘀法治疗肩袖损伤<sup>[4]</sup>。桃红四物汤由桃仁、红花、生地、当归、赤芍、川芎等6味药材组成,具有活血祛瘀、养血补血的功效<sup>[5]</sup>。临床研究表明,桃红四物汤能有效修复受损肩袖,减轻患者疼痛并改善肩关节功能<sup>[6]</sup>。但桃红四物汤修复肩袖损伤的具体作用机制尚不明确。

基于此,本研究首先构建兔肩袖损伤模型,然后检测桃红四物汤对模型兔腱骨界面组织形态,血清中炎症相关因子[肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素10(IL-10)、IL-6]、PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白和mRNA以及自噬相关蛋白(Beclin1和LC3 II)表达的影响,并应用PI3K抑制剂LY294002验证桃红四物汤对PI3K/Akt/mTOR信号通路的激活作用,从而探讨该方对肩袖损伤的修复作用及机制,以期对肩袖损伤的临床治疗提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所使用的主要仪器包括IX81型透射电子显微镜(德国Leica公司),JS-Power300型电泳仪(上海培清科技有限公司),AllegraX-15R型离心机、MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Centrifuge 5424R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司),BioDoc-IT型凝胶成像系统(美国UVP公司),ABI 7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(q-PCR)仪(美国Bio-Rad公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

桃仁、红花、生地、当归、赤芍、川芎药材均购自康美药业有限公司(批号分别为3567、3789、3899、3421、3456、4421),经广州中医药大学第一附属医院四骨科陈建发教授鉴定为真品。青霉素注射液(批号2019103241315,规格0.48 g)购自中诺药业(石家庄)有限公司;戊巴比妥钠(批号20190112)购自天津市大茂化学试剂厂;TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(批号分别为ab224503、ab234503、ab224565)

均购自英国Abcam公司;山羊抗兔PI3K多克隆抗体、山羊抗兔Akt多克隆抗体、山羊抗兔mTOR多克隆抗体、山羊抗兔Beclin1多克隆抗体、山羊抗兔LC3 II单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗、山羊抗兔GAPDH单克隆抗体、山羊抗兔 $\beta$ -actin单克隆抗体、LY294002(纯度99.87%)、ECL显影液、q-PCR试剂盒(批号分别为4678、4352、5421、6542、7895、4126、5367、5912、9901s、IPVH00012、IPVH05013)均购自美国Millipore公司;BCA蛋白测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、脱脂奶粉、PVDF膜(批号分别为ST567、ST669、ST467、ST562)均购自上海碧云天生物技术有限公司;PCR引物由广州捷瑞生物科技有限公司设计合成(PCR引物序列及产物长度信息见表1);其余试剂均为实验室常用规格,水为纯净水。

表1 PCR引物序列及产物长度信息

Tab 1 PCR primer sequence and product length

基因	引物序列(5'-3')	产物长度, bp
PI3K	上游:GGATGCTGAATGGTACTGGG	226
	下游:TGTAAGAGTGAATCGCCGGT	
Akt	上游:ATGAACGACGTAGCCATTGTG	116
	下游:TTGTAGCCAATAAAGGTGCCAT	
mTOR	上游:TGTGAAAAGTGCTCGGAAG	218
	下游:GGATGGTGCTCTCGTTGATG	
GAPDH	上游:ATGATCGGTAGCTAGCGG	314
	下游:TACGGTGGATGTAGGCAT	

### 1.3 动物

本研究所用清洁级新西兰兔共66只,雄性,体质量约1.5 kg,由广东省医学实验中心提供,动物生产许可证号为SCXK(粤)2019-0035。

## 2 方法

### 2.1 桃红四物汤药液的制备

取桃仁10 g、红花5 g、生地12 g、当归12 g、赤芍10 g、川芎10 g,加水200 mL煎煮45 min,过滤,取续滤液进行浓缩,制得质量浓度为1 g/mL(以生药量计,下同)的药液。

### 2.2 分组、造模与给药

将66只兔随机分为空白对照组、模型组和桃红四物汤低、中、高剂量组(2.75、5.5、11 g/kg,剂量分别为临床等效剂量的1、2、4倍)以及桃红四物汤+LY294002组(5.5 g/kg桃红四物汤+6.4  $\mu$ g/kg LY294002,剂量参考文献[7]设置),每组11只。模型组和各药物组兔参考文献[8]方法进行右侧肩胛下肌部分离断手术,以构建肩袖损伤模型,具体方法如下:对兔腹腔注射3%戊巴比妥钠进行麻醉,再固定于动物手术台,经常规备皮、消毒后,对兔右肩关节外侧的三角肌进行钝性分离,然后内收、外

旋肱骨并将冈上肌肌腹提起,显露肩胛下肌肌腱,进行离断;缝合伤口,用无菌纱布覆盖,绷带固定。空白对照组兔同法操作,但不进行离断。各组兔缝合伤口后,于后肢肌肉注射青霉素( $4 \times 10^5$  u)以预防感染,连续3 d<sup>[9]</sup>。每组各取1只兔进行腱骨界面组织的病理形态学观察,当该组织出现凹凸不平、内膜肿胀时,则表明造模成功。造模成功后,空白对照组和模型组兔均灌胃生理盐水;桃红四物汤各剂量组兔均灌胃相应药液;桃红四物汤+LY294002组兔先灌胃桃红四物汤药液,再耳缘注射LY294002,均每天1次,连续12周。

### 2.3 样品采集

末次灌胃(注射)24 h后,对各组兔进行心脏取血。血样静置1 h后,以3 000 r/min离心10 min,取上层血清保存,备用。取血完成后,剖取兔腱骨界面组织,经pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,部分以2.5%戊二醛溶液固定,备用;部分于-80℃条件下保存,备用。

### 2.4 兔腱骨界面组织的病理形态学观察

取“2.3”项下固定于2.5%戊二醛溶液中的各组兔腱骨界面组织适量,以PBS清洗5 min $\times$ 3次,然后依次置于70%、80%、90%、100%乙醇中脱水,每次10 min;将脱水后的组织进行干燥处理后,置于真空镀膜仪中镀膜,采用透射电子显微镜观察兔腱骨界面组织形态。

### 2.5 兔血清中TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6水平的检测

采用ELISA法进行检测。取“2.3”项下各组兔血清样品,根据相应试剂盒说明书方法操作,采用酶标仪于510 nm波长下检测兔血清中TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6的水平。

### 2.6 兔腱骨界面组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA表达水平的检测

采用q-PCR法进行检测。取“2.3”项下冻存的各组兔腱骨界面组织适量(每组取3只),使用Trizol试剂进行裂解后,提取总RNA,再逆转录为cDNA,然后进行PCR反应。PCR反应体系为:cDNA模板2  $\mu$ L,上、下游引物各2  $\mu$ L,SYBR荧光染料10  $\mu$ L,无核酸酶水4  $\mu$ L。PCR反应条件为:94℃预变性5 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,循环40次。以GAPDH作为内参,生成扩增曲线和溶解曲线,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算PI3K、Akt、mTOR mRNA的表达水平。

### 2.7 兔腱骨界面组织中PI3K、Akt、mTOR、Beclin1、LC3 II蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。取“2.3”项下冻存的各组兔腱骨界面组织适量(每组取3只),经剪碎、RIPA裂解液裂解后,以10 000 r/min离心10 min,取上清液,提取总蛋白并采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白经变性后进行SDS-PAGE,转膜,以5%脱脂牛奶室温条件下封闭2 h;以TBST缓冲液洗膜5 min $\times$ 3次,加入PI3K、Akt、mTOR、Beclin1、LC3 II、GAPDH、 $\beta$ -actin一抗(稀释度均为1:1 000),4℃条件下孵育过夜;以TBST缓冲液洗膜5 min $\times$ 3次,加入二抗(稀释度为1:2 000),室温条件下孵育1 h;以TBST缓冲液洗膜5 min $\times$ 3次,滴加ECL显

影液,置于凝胶成像仪中成像。采用Image J v1.8.0软件进行分析,以PI3K、Akt、mTOR蛋白与内参GAPDH的灰度值比值,Beclin1、LC3 II蛋白与内参 $\beta$ -actin的灰度值比值表示相应蛋白的表达水平。

### 2.8 统计学方法

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 桃红四物汤对肩袖损伤模型兔腱骨界面组织形态的影响

空白对照组兔腱骨界面组织光滑平整,内膜排列整齐。模型组兔腱骨界面组织凹凸不平,内膜肿胀。桃红四物汤低、中剂量组兔腱骨界面组织仍存在一定的内膜破损,但高剂量组兔腱骨界面组织光滑平整,内膜无明显撕裂。桃红四物汤+LY294002组兔腱骨界面组织肿胀膨大,内膜撕裂明显,损伤情况类似模型组。结果见图1。

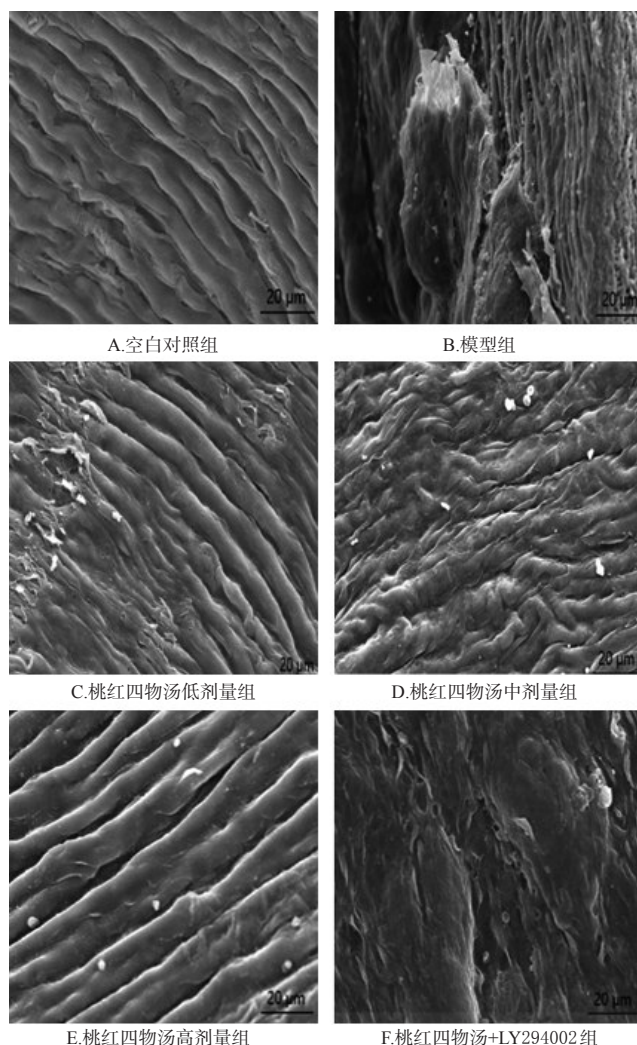


图1 各组兔腱骨界面组织形态的显微图

Fig 1 Morphological micrographs of tendon-bone interface of rabbits in each group

### 3.2 桃红四物汤对肩袖损伤模型兔血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 水平的影响

与空白对照组比较,模型组兔血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),IL-10 水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,桃红四物汤各剂量组兔血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),IL-10 水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );桃红四物汤+LY294002 组兔血清中上述指标水平较模型组差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与桃红四物汤低剂量组比较,相应中、高剂量组兔血清中上述指标(中剂量组 IL-6 水平除外)的改善更显著( $P<0.05$ );与桃红四物汤中剂量组比较,相应高剂量组兔血清中上述指标的改善更显著( $P<0.05$ )。结果见表 2。

表 2 各组兔血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-6 水平的检测结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab 2 Serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-6 in rabbits of each group( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	TNF- $\alpha$ , ng/mL	IL-10, ng/mL	IL-6, pg/mL
空白对照组	0.76 $\pm$ 0.18	19.31 $\pm$ 4.57	0.33 $\pm$ 0.05
模型组	2.27 $\pm$ 0.43**	13.59 $\pm$ 1.24**	0.71 $\pm$ 0.11*
桃红四物汤低剂量组	1.83 $\pm$ 0.45 <sup>#</sup>	15.26 $\pm$ 2.15 <sup>#</sup>	0.61 $\pm$ 0.10 <sup>#</sup>
桃红四物汤中剂量组	1.47 $\pm$ 0.57 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup>	16.47 $\pm$ 3.14 <sup>Δ</sup>	0.56 $\pm$ 0.12 <sup>#</sup>
桃红四物汤高剂量组	1.23 $\pm$ 0.32 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup> <sup>□</sup>	17.47 $\pm$ 3.27 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup> <sup>□</sup>	0.45 $\pm$ 0.09 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup> <sup>□</sup>
桃红四物汤+LY294002 组	2.27 $\pm$ 0.43	14.14 $\pm$ 1.56	0.73 $\pm$ 0.14

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与桃红四物汤低剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$ ;与桃红四物汤中剂量组比较,<sup>□</sup> $P<0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. Taohong siwu decoction low-dose group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ ; vs. Taohong siwu decoction medium-dose group, <sup>□</sup> $P<0.05$

### 3.3 桃红四物汤对肩袖损伤模型兔腱骨界面组织中 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达的影响

与空白对照组比较,模型组兔腱骨界面组织中 PI3K、Akt、mTOR mRNA 的表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模型组比较,桃红四物汤中、高剂量组兔该组织中 PI3K、Akt、mTOR mRNA 的表达水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),桃红四物汤低剂量组兔该组织中 PI3K mRNA 的表达水平显著降低( $P<0.05$ );桃红四物汤+LY294002 组兔该组织中上述指标水平较模型组差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与桃红四物汤低剂量组比较,相应中、高剂量组兔该组织中 PI3K、Akt、mTOR mRNA 的表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见表 3。

### 3.4 桃红四物汤对肩袖损伤模型兔腱骨界面组织中 PI3K、Akt、mTOR、Beclin1、LC3 II 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组兔腱骨界面组织中 PI3K、Akt、mTOR 蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),Beclin1、LC3 II 蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,桃红四物汤中、高剂量组

### 表 3 各组兔腱骨界面组织中 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达水平的检测结果( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Tab 3 mRNA expressions of PI3K, Akt and mTOR in tendon-bone interface of rabbits in each group( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	PI3K mRNA	Akt mRNA	mTOR mRNA
空白对照组	0.54 $\pm$ 0.14	0.84 $\pm$ 0.03	0.72 $\pm$ 0.08
模型组	1.18 $\pm$ 0.13**	1.21 $\pm$ 0.11*	1.17 $\pm$ 0.26*
桃红四物汤低剂量组	0.99 $\pm$ 0.11 <sup>#</sup>	1.13 $\pm$ 0.18	1.04 $\pm$ 0.11
桃红四物汤中剂量组	0.84 $\pm$ 0.12 <sup>Δ</sup>	0.97 $\pm$ 0.07 <sup>Δ</sup>	0.94 $\pm$ 0.08 <sup>Δ</sup>
桃红四物汤高剂量组	0.76 $\pm$ 0.09 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup>	0.94 $\pm$ 0.06 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup>	0.88 $\pm$ 0.07 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup>
桃红四物汤+LY294002 组	1.12 $\pm$ 0.12	1.15 $\pm$ 0.16	1.07 $\pm$ 0.16

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与桃红四物汤低剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. Taohong siwu decoction low-dose group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$

兔该组织中 PI3K、Akt、mTOR 蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),桃红四物汤低剂量组兔该组织中 mTOR 蛋白的表达水平显著降低( $P<0.05$ );桃红四物汤各剂量组兔该组织中 Beclin1、LC3 II 蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );桃红四物汤+LY294002 组兔该组织中上述指标水平较模型组差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与桃红四物汤低剂量组比较,桃红四物汤中、高剂量组兔该组织中 PI3K、Akt(中剂量组除外)、mTOR 蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.05$ ),Beclin1、LC3 II 蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。与桃红四物汤中剂量组比较,相应高剂量组兔该组织中 PI3K、mTOR 蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.05$ ),Beclin1、LC3 II 蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.05$ )。结果见表 4、图 2。

表 4 各组兔腱骨界面组织中 PI3K、Akt、mTOR、Beclin1、LC3 II 蛋白表达水平的检测结果( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Tab 4 Protein expressions of PI3K, Akt, mTOR, Beclin1 and LC3 II in tendon-bone interface of rabbits in each group( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	mTOR/GAPDH	Beclin1/ $\beta$ -actin	LC3 II/ $\beta$ -actin
空白对照组	0.53 $\pm$ 0.06	0.84 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.07	0.81 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.21
模型组	1.36 $\pm$ 0.17**	1.21 $\pm$ 0.11*	1.37 $\pm$ 0.08**	0.27 $\pm$ 0.06**	0.20 $\pm$ 0.05**
桃红四物汤低剂量组	1.19 $\pm$ 0.15	1.13 $\pm$ 0.18	1.14 $\pm$ 0.05*	0.45 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>	0.53 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>
桃红四物汤中剂量组	0.96 $\pm$ 0.04 <sup>Δ</sup>	0.97 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	0.92 $\pm$ 0.03 <sup>Δ</sup>	0.58 $\pm$ 0.07 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup>	0.82 $\pm$ 0.08 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup>
桃红四物汤高剂量组	0.82 $\pm$ 0.01 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup> <sup>□</sup>	0.92 $\pm$ 0.06 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup>	0.71 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup> <sup>□</sup>	0.76 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup> <sup>□</sup>	1.16 $\pm$ 0.18 <sup>##</sup> <sup>Δ</sup> <sup>□</sup>
桃红四物汤+LY294002 组	1.25 $\pm$ 0.13	1.15 $\pm$ 0.16	1.28 $\pm$ 0.16	0.34 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.05

注:与空白对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与桃红四物汤低剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$ ;与桃红四物汤中剂量组比较,<sup>□</sup> $P<0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. Taohong siwu decoction low-dose group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ ; vs. Taohong siwu decoction medium-dose group, <sup>□</sup> $P<0.05$

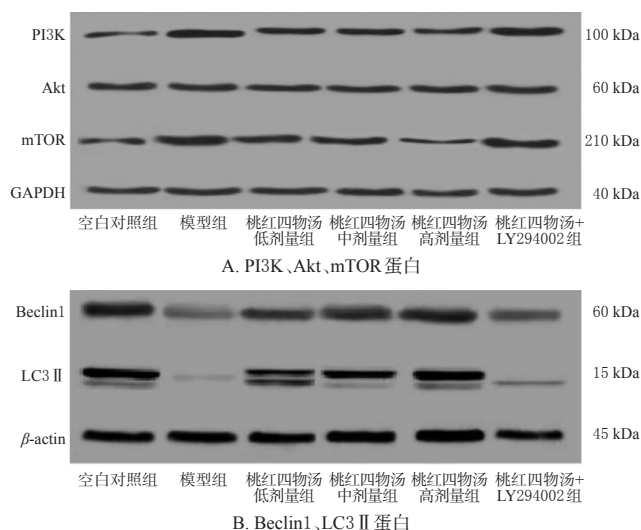


图2 各组兔腱骨界面组织中PI3K、Akt、mTOR、Beclin1、LC3 II蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of the protein expressions of PI3K, Akt, mTOR, Beclin1 and LC3 II in tendon-bone interface of rabbits in each group

#### 4 讨论

肩袖损伤是肩关节常见的病变之一,常表现为肌腱撕裂,并伴有肌肉萎缩、脂肪浸润以及炎症细胞浸润等现象<sup>[10]</sup>。本研究病理检查结果显示,经高剂量桃红四物汤干预后,兔腱骨界面组织光滑平整,内膜无明显撕裂,表明桃红四物汤对肩袖损伤具有一定的修复作用。

TNF- $\alpha$ 是由巨噬细胞生成的一种对细胞生长分化和功能具有多重效应的多肽细胞因子,可诱发炎症反应<sup>[11]</sup>;IL-6是促炎细胞因子,可通过体液和细胞免疫功能影响炎症程度<sup>[12]</sup>;IL-10是一种重要的抗炎细胞因子,可抑制炎症因子对细胞的刺激作用,从而抑制机体组织产生过度的病理改变<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,经不同剂量桃红四物汤干预后,兔血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平均显著降低,IL-10水平均显著升高,表明桃红四物汤可通过抑制炎症反应来修复肩袖损伤。

肌腱损伤以及肌肉萎缩本质上是蛋白质过度降解,而自噬-溶酶体系统是重要的蛋白水解途径,其在受损的肩袖组织中被激活,从而引起自噬反应的发生<sup>[2]</sup>。相关研究发现,PI3K、Akt及其下游信号mTOR的快速激活可促进蛋白质的合成,抑制自噬体的形成<sup>[8]</sup>。Beclin1、LC3 II基因在自噬溶酶体降解途径中具有抑制作用,对自噬体的形成至关重要<sup>[14]</sup>。LY294002是一种能够阻断PI3K信号通路的蛋白激酶抑制剂,目前已被广泛用于该通路的相关研究<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,经中、高剂量桃红四物汤干预后,兔腱骨界面组织中PI3K、Akt、mTOR mRNA和蛋白的表达水平均显著降低,Beclin1、LC3 II蛋白的表达水平均显著升高,且高剂量组上述指标的改善程度较低、中剂量组更显著;桃红四物汤+LY294002组上述指标相较于模型组均无显著改善。这表明桃红

四物汤修复兔肩袖损伤的作用可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路、激活自噬有关。

综上所述,桃红四物汤可修复兔的肩袖损伤,其作用机制与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路、激活自噬、抑制炎症反应有关。

#### 参考文献

- [1] 卫宏图,陆继收,刘艳华,等.中老年人原发“肩痛”流行病学调查[J].中国全科医学,2011,14(18):2066-2268.
- [2] SEVIVAS N, TEIXEIRA F G, PORTUGAL R, et al. Mesenchymal stem cell secretome: a potential tool for the prevention of muscle degenerative changes associated with chronic rotator cuff tears[J]. Am J Sports Med, 2017, 45(1):179-188.
- [3] 王和峰,翟纯刚,庞文会,等. PI3K/Akt/mTOR信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[J].中国病理生理杂志,2013,29(3):390-397.
- [4] 姜文晓,张亦军.舒筋活血中药定向透药结合非甾体类抗炎药对肩袖修复术后疗效的前瞻性随机对照研究[J].辽宁中医杂志,2017,44(12):2564-2566.
- [5] 李翊,彭代银.桃红四物汤的药理学研究进展[J].安徽医药,2011,15(5):529-531.
- [6] 万云峰,曹寅生,易强,等.玻璃酸钠联合桃红四物汤合六味地黄丸在肩袖修补术后的应用[J].中国当代医药,2020,27(5):162-165.
- [7] 罗智花.调控PI3K/Akt信号通路对新生兔缺氧缺血脑损伤神经修复作用的研究[D].合肥:安徽医科大学,2020.
- [8] ZHENG R, HUANG S, ZHU J, et al. Leucine attenuates muscle atrophy and autophagosome formation by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rotator cuff tears[J]. Cell Tissue Res, 2019, 378(1):113-125.
- [9] 闫明童,翟申浩,褚国庆,等.肩袖肌腱损伤动物模型的建立及初步研究[J].中国运动医学杂志,2019,38(5):406-411.
- [10] 赖艺伟,林石明.中医药治疗肩袖损伤研究进展[J].甘肃医药,2021,40(2):111-113.
- [11] 吕志敢,郭政.肿瘤坏死因子的研究进展[J].山西医科大学学报,2006,37(3):311-314.
- [12] 田中秋,邓立普.TNF- $\alpha$ 、IL-6在全身炎症反应综合征表达的研究进展[J].蛇志,2008,20(4):275-278.
- [13] 吕欣,李泉. IL-10与全身炎症反应综合征[J].国外医学:麻醉学与复苏分册,2002,23(4):224-226.
- [14] 方梦蝶,刘波,刘伟.自噬的分子细胞机制研究进展[J].中国细胞生物学报,2012,34(4):382-390.
- [15] BERND M R, CHRISTOPHE P. Inositol phospholipid metabolism in arabidopsis. characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C[J]. Plant Physiol, 2002, 130(1):22-46.

(收稿日期:2021-06-10 修回日期:2021-10-22)

(编辑:唐晓莲)