

三七活血片抗软组织损伤、镇痛与抗炎药理作用研究[△]

陈文学*,于德伟,杨 铭,杨 明[#](吉林省中医药科学院,长春 130012)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3482-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.09

摘要 目的:研究三七活血片的抗软组织损伤、镇痛与抗炎药理作用。方法:通过大鼠软组织损伤模型观察三七活血片(2.0、1.0、0.5 g/kg)的抗软组织损伤作用,进行损伤证候评分并测定大鼠血清中前列腺素E₂(PGE₂)、白细胞介素6(IL-6)含量;通过小鼠热板、扭体实验(2.0、1.0、0.5 g/kg)观察三七活血片的镇痛作用,测定小鼠舔足次数、扭体次数及痛阈值;通过小鼠足肿胀、耳肿胀实验观察三七活血片的抗炎作用,测定小鼠足肿胀度、耳肿胀度。结果:2.0、1.0 g/kg剂量下,三七活血片可降低模型大鼠损伤证候评分,可减少小鼠足肿胀度和耳肿胀度;2.0、1.0、0.5 g/kg剂量下,三七活血片可减少模型大鼠血清中PGE₂、IL-6含量与小鼠舔足次数、扭体次数,升高痛阈值。结论:三七活血片具有一定的镇痛、抗炎的作用,对软组织损伤有较好的修复作用。

关键词 软组织损伤;三七活血片;抗炎;镇痛

Study on the Anti-soft Tissue Injury, Antalgic and Anti-inflammatory Pharmacological Actions of Sanqi Huoxue Tablets

CHEN Wen-xue, YU De-wei, YANG Ming, YANG Ming (Jilin Institute of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study anti-soft tissue injury, antalgic and anti-inflammatory pharmacological actions of Sanqi huoxue tablets. METHODS: The anti-soft tissue injury of Sanqi huoxue tablets (2.0, 1.0, 0.5 g/kg) were observed with soft tissue injury model rat, the damage syndrome score was calculated, and the contents of prostaglandin E₂ (PGE₂) and interleukin 6 (IL-6) were determined. Mouse hot-plate test and mouse writhing test (2.0, 1.0 and 0.5 g/kg) were conducted to observe the antalgic effects of Sanqi huoxue tablets. Licking foot times, twisting times and the pain threshold value were determine. Mouse paw swelling test and mouse auricle swelling test were carried out to observe the anti-inflammatory effect. Paw swelling and auricle swelling were determined. RESULTS: 2.0 and 1.0 g/kg Sanqi huoxue tablets decreased the damage syndrome score, reduced paw swelling and auricle swelling. 2.0, 1.0 and 0.5 g/kg Sanqi huoxue tablets reduced the contents of PGE₂ and IL-6 in serum of rats and licking foot times and twisting times, and increased the pain threshold value of mice. CONCLUSIONS: Sanqi huoxue tablets have antalgic and anti-inflammatory effects and can repair the soft tissue injury.

KEYWORDS Soft tissue injury; Sanqi huoxue tablets; Anti-inflammatory effect; Antalgic effect

急性软组织损伤是在外力作用下皮肤、皮下深筋膜、韧带、关节囊、肌肉、肌腱、神经及血管受到的闭合性、病理性损害,临床主要表现为机体局部疼痛、肿胀、功能障碍及皮下出现青紫瘀斑或血肿^[1-2]。常见症状有急性腰扭伤、落枕、四肢关节扭伤等^[3]。急性软组织损伤由于其发病广泛,如医治不当,

往往进一步发展为折磨患者终生的慢性疾患,影响其身心健康及生活质量。笔者拟研究三七活血片的抗软组织损伤、镇痛与抗炎作用,旨在为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

hydrolase and respiratory symptoms in asthmatic children [J]. *J Clin Invest*, 2007, 82: 1 983.

[12] 刘俊娥,张继平,姚晖.补阳还五汤含药血清对缺氧缺糖损伤PC12细胞形态和活力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):186.

[13] 张继平,宫丽,姚晖,等.补阳还五汤大鼠含药血清对家兔血小板PAF受体活性的影响[J].临床医学工程,2009,16(9):14.

[14] 郭乐,周赛男,蔺晓源,等.补阳还五汤对脑缺血后大鼠NF-κB/P50表达的影响[J].中医药信息,2014,34(4):98.

[15] 谭峰,黄任锋,方美凤,等.补阳还五汤对气虚血瘀型脑梗死患者运动功能与基质金属蛋白酶-9表达的影响[J].中国中医基础医学杂志,2009,15(12):924.

[16] 吴甜,郭韧,张毕奎. CD40/CD40L基因及其多态性与动脉粥样硬化的研究进展[J].中南大学学报,2012,37(4):413.

[17] 曾秀丽,张存泰,徐仁德,等. CD40/CD40L系统在动脉粥样硬化发生发展中的作用[J].临床心血管病杂志,2011,27(9):649.

[18] 崔现军,鲁卫星.信号系统与缺血性冠状动脉疾病的关系[J].中国心血管杂志,2008,13(3):220.

[19] Nannizzi-Alaimo L, Rubenstein MH, Alves VL, et al. Cardiopulmonary bypass induces release of soluble CD40 ligand[J]. *Circulation*, 2002, 105(24): 2 849.

(收稿日期:2015-04-10 修回日期:2015-06-12)

(编辑:邹丽娟)

△ 基金项目:吉林省科技支撑计划(No.20130727005YY)

* 研究实习生,硕士。研究方向:中药药理学。E-mail: cwxue2011@163.com

通信作者:研究员。研究方向:中药药理学及新药开发。E-mail: 212876760@qq.com

GJ-8402型热板测痛仪(浙江宁海白石电子医疗器械厂); T6型紫外-可见分光光度计(北京普利生仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

三七活血片[吉林省中医药科学院,批号:20041201-h,规格:0.5 g/片,4.45 g(生药)/g];红药片(沈阳中药制药有限公司,批号:050216,规格:0.25 g/片);阿司匹林片(吉林恒和制药有限公司,批号:20031115,规格:25 mg/片);醋酸泼尼松片(天津太平洋制药有限公司,批号:030201,规格:5 mg/片);白细胞介素6(IL-6)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司);前列腺素E₂(PGE₂)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物

清洁级Wistar大鼠,♂,体质量200~250 g,购自吉林大学基础医学院[实验动物使用许可证号:SCXK(吉)2008-0005]。KM小鼠,♀♂兼用,体质量18~22 g,购自长春生物制品研究所[实验动物使用许可证号:SCXK(吉)2008-0005]。

2 方法

2.1 三七活血片的抗软组织损伤作用

120只♂大鼠随机均分为正常对照(等容蒸馏水)组、模型(等容蒸馏水)组、红药片(1.0 g/kg)组与三七活血片高、中、低剂量(2.0、1.0、0.5 g/kg)组,ig给药,每天2次,连续4 d。于给药前24 h,除正常对照组外,其余各组用8%硫化钠溶液去除大鼠右后小腿毛,用1 kg质量的砝码,40 cm高自由落体打击右后腿,连续3次,30 min后选取打击局部出现散在出血点、皮下瘀肿创面、皮肤完整无破损且无骨折的大鼠作为软组织损伤模型。于给药3 d和5 d后每组分别处死10只大鼠,腹主动脉取血,检测大鼠血清PGE₂与IL-6含量;取打击中心部位皮肤和肌肉组织,以10%中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋,切片,HE染色光镜下观察大鼠组织变化并进行损伤证候评分:0分为完全恢复,同正常组织;1分为表面无出血灶,切开软组织偶见失状出血或瘀血灶;2分为表面见小于0.5 cm的出血、瘀血水肿区;3分为表面见大于1 cm的出血、瘀血水肿区。

2.2 三七活血片的镇痛作用

2.2.1 对小鼠热板致痛的镇痛作用 60只♀小鼠随机均分为正常对照(等容蒸馏水)组、模型(等容蒸馏水)组、阿司匹林(0.2 g/kg)组与三七活血片高、中、低剂量(2.0、1.0、0.5 g/kg)组,一次性ig给药,于末次给药2 h后,除正常对照组外,其余各组将小鼠分别置于热板[(55±0.5)℃]上,记录小鼠自放在热板上出现舔足所需时间(s)作为痛阈值。如痛阈值超过60 s,即停止测试按60 s计。观察小鼠60 s内舔足次数及痛阈值。

2.2.2 对醋酸所致小鼠扭体反应的镇痛作用 60只♀♂兼用小鼠按“2.2.1”项下方法分组、给药。末次给药2 h后,除正常对照组外,其余各组ip 0.8%醋酸溶液(0.1 ml/10 g),观察小鼠10 min内出现扭体反应(腹部内凹、躯干与后腿伸展、臀部高起、爬行)次数及出现扭体反应的时间(痛阈值)。

2.3 三七活血片的抗炎作用

2.3.1 对角叉菜胶致小鼠足肿胀的抗炎作用 60只♂小鼠随机均分为正常对照(等容蒸馏水)组、模型(等容蒸馏水)组、醋酸泼尼松(0.2 g/kg)组与三七活血片高、中、低剂量(2.0、1.0、0.5 g/kg)。ig给药,每天2次,连续7 d。末次给药30 min后,除正常对照组外,其余各组于小鼠右后足掌腱膜下注入1%角叉菜胶(0.03 ml/只)致炎。于致炎6 h后将小鼠颈椎脱臼处死,剪下双侧后足,分别称定质量,左、右足质量之差即为肿胀度。

2.3.2 对二甲苯致小鼠耳肿胀的抗炎作用 60只♂小鼠按“2.3.1”项下方法分组及相同给药剂量ig给药,每天2次,连续7 d。末次给药2 h后,除正常对照组外,其余各组将0.05 ml二甲苯滴于小鼠右耳,左耳为对照。4 h后将小鼠颈椎脱臼处死,沿耳廓基线剪下两耳,用直径9 mm的打孔器分别在左、右耳同一部位打下圆耳片,称定质量,左、右耳片质量差即为肿胀度。

2.4 统计学方法

采用SPSS 13.0软件处理实验数据。各组数据均为计量资料,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用LSD、SNK检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠损伤证候评分测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠损伤证候评分升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);给药3 d和5 d后,与模型组比较,红药片组与三七活血片高、中剂量组大鼠损伤证候评分降低,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且具有剂量依赖关系。各组大鼠损伤证候评分测定结果见表1。

表1 各组大鼠损伤证候评分测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{分}$)

Table 1 Scoring results of subcutaneous and muscular tissue injuries of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{score}$)

组别	剂量,g/kg	3 d	5 d
正常对照组		0	0
模型组		2.5±0.7071*	2.0±0.4714*
红药片组	1.0	1.7±0.4830 [#]	1.4±0.5164 ^{##}
三七活血片高剂量组	2.0	1.6±0.5164 ^{###}	1.3±0.4830 ^{###}
三七活血片中剂量组	1.0	1.7±0.6749 [#]	1.5±0.5270 [#]
三七活血片低剂量组	0.5	1.8±0.9189	1.5±0.7071

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

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.2 各组大鼠血清中PGE₂与IL-6含量测定结果

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中PGE₂、IL-6含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,红药片组与三七活血片高、中、低剂量组大鼠血清中PGE₂、IL-6含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且具有剂量依赖关系。各组大鼠血清中PGE₂与IL-6含量测定结果见表2。

表2 各组大鼠血清中PGE₂与IL-6含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Determination results of the contents of PGE₂ and IL-6 in serum of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,g/kg	PGE ₂ ,pg/ml		IL-6,pg/ml	
		3 d	5 d	3 d	5 d
正常对照组		6.65±3.76	6.34±2.9	2.56±0.61	2.71±1.0
模型组		179.8±31.3*	142.6±15.7*	53.2±12.4*	44.9±9.5*
红药片组	1.0	140.5±37.2 [#]	117.4±12.9 ^{##}	40.1±10.5 [#]	35.2±8.9 [#]
三七活血片高剂量组	2.0	120.9±23.5 ^{###}	86.7±11.3 ^{###}	28.8±9.22 ^{###}	19.6±6.4 ^{###}
三七活血片中剂量组	1.0	124.9±33.4 ^{###}	106.1±13.7 ^{###}	33.8±8.68 ^{###}	20.1±7.0 ^{###}
三七活血片低剂量组	0.5	138.2±40.3 [#]	114.7±20.5 ^{##}	40.2±8.62 [#]	32.1±4.7 ^{##}

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

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.3 各组小鼠舔足次数、痛阈值测定结果

与模型组比较,阿司匹林组与三七活血片高、中、低剂量组小鼠舔足次数减少、痛阈值升高,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且具有剂量依赖关系。各组小鼠舔足次数、痛阈值测定结果见表3(正常对照组数据略,下同)。

表3 各组小鼠舔足次数、痛阈值测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Determination results of licking foot times and the pain threshold value of mice in all groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	舔足次数	痛阈值,s
模型组		6.2±2.78	19.4±9.51
阿司匹林组	0.2	2.3±2.41**	41.1±17.8**
三七活血片高剂量组	2.0	3.1±1.85**	34.3±11.8**
三七活血片中剂量组	1.0	3.5±1.35*	28.2±6.49*
三七活血片低剂量组	0.5	3.7±2.00*	28.5±4.20*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.4 各组小鼠扭体次数、痛阈值测定结果

与模型组比较,阿司匹林组与三七活血片高、中、低剂量组小鼠扭体次数减少、痛阈值升高,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且具有剂量依赖关系。各组小鼠扭体次数、痛阈值测定结果见表4。

表4 各组小鼠扭体次数、痛阈值测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 Determination results of twisting times and the pain threshold value of mice in all groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	扭体次数	痛阈值,s
模型组		9.0±5.94	290±77
阿司匹林组	0.2	3.3±1.64**	414±100**
三七活血片高剂量组	2.0	4.7±3.53**	358±122**
三七活血片中剂量组	1.0	5.1±1.45**	342±80*
三七活血片低剂量组	0.5	6.0±3.77*	335±130*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.5 各组小鼠足肿胀度、耳肿胀度测定结果

与模型组比较,醋酸泼尼松组与三七活血片高、中剂量组小鼠足肿胀度、耳肿胀度减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且具有剂量依赖关系。各组小鼠足肿胀度、耳肿胀度测定结果见表5。

表5 各组小鼠足肿胀度、耳肿胀度测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 Determination results of paw swelling and auricle swelling of mice in all groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	足肿胀度,mg	耳肿胀度,mg
模型组		38.8±9.60	13.32±3.344
醋酸泼尼松组	0.2	19.9±8.72**	7.00±2.787**
三七活血片高剂量组	2.0	23.2±9.14**	9.29±2.610**
三七活血片中剂量组	1.0	30.3±5.97*	10.29±2.721*
三七活血片低剂量组	0.5	38.4±13.5	10.46±4.332

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

4 讨论

三七活血片为吉林省中医药科学院院内制剂,具有行气活血、散瘀止痛的作用,用于软组织损伤气滞血瘀型损伤早期局部肿胀、疼痛,出现青紫瘀斑、关节活动受限、舌质紫暗或有瘀斑、脉弦涩等症状的治疗。本研究结果显示,复制模型成功

后,大鼠受打击局部均出现散在的出血点,皮下瘀肿创面出现毛细血管扩张、水肿等症状。三七活血片能明显减轻大鼠急性软组织损伤所致的组织出血、瘀血,促进血肿吸收和瘀斑的消散,提示三七活血片对大鼠急性软组织损伤有较好的修复作用。

软组织损伤后,大量的中性粒细胞和巨噬细胞等炎性细胞浸润到损伤的局部组织,并产生高水平的炎性细胞因子,如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6及PGE₂等,这些细胞因子导致了持久的炎症过程,并且参与了疼痛的传输。IL-6是主要由T、B细胞与单核巨噬细胞所分泌的细胞因子,能促进中性粒细胞活化和聚集,多在细胞受到TNF- α 、IL-1 β 刺激后产生,血清中IL-6水平可反映组织损伤的程度。PGE₂作为一种炎性细胞因子,存在于炎症组织中,可与缓激肽等炎症介质协同作用,加剧炎症的反应。当神经受到炎症刺激时,神经末梢及其所属区域的PGE₂释放增多,同时增强缓激肽的致痛效应,其通过扩张小血管增强微血管通透性,形成炎性水肿、痛觉过敏,发挥其致炎的效应^[4-6]。本研究结果显示,大鼠软组织损伤后局部炎症介质PGE₂与IL-6含量明显增加,三七活血片可明显抑制软组织损伤大鼠血清中PGE₂与IL-6含量,提示其可有效抑制伤后组织液中致痛因子浓度,从而抑制疼痛因子引起的一系列炎症反应,使痛觉感受器对致痛物质敏感性降低,痛阈值升高,机体感受到的疼痛程度减小。其机制可能是减少炎性介质的分泌,促进局部炎性细胞因子代谢,减少组织损伤,有效地抑制软组织损伤的炎症反应。

现代医学认为,软组织损伤的最初反应是炎症,消除炎性介质在抗炎过程中起到很重要的作用,而消除损伤伴随的疼痛也是临床治疗的重要方面。研究表明,三七活血片可明显降低热刺激引起的小鼠舔足次数和醋酸引起的小鼠扭体次数;可明显抑制角叉菜胶引起的小鼠足肿胀和二甲苯引起的小鼠耳肿胀。这提示其具有较好的镇痛和抗炎作用。

综合上述实验结果,三七活血片可通过镇痛、抗炎作用对急性软组织损伤产生一定的修复作用,但其确切的作用机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 汪涛,胡卫东,钟才进,等.龙藤筋骨片治疗急性软组织损伤的机制探讨[J].中国疗养医学,2014,23(5):407.
- [2] 陈贵珍,许云祥,刘颂豪.刺血疗法治疗急性软组织损伤的研究思路[J].辽宁中医杂志,2009,36(6):896.
- [3] 梁晓夏,王新春,李钦.正骨祛痛酊治疗急性软组织损伤的疗效观察[J].中国药房,2010,21(3):261.
- [4] 赵道洲,郑恒恒,李兴国.通络搽剂治疗软组织损伤的主要药理学研究[J].西部中医药,2012,25(9):8.
- [5] 杨懋颖,扈荣,沈丽美,等.治伤胶囊对软组织损伤小鼠炎症细胞因子的影响[J].中国中医药科技,2011,18(3):194.
- [6] 牛淑亮,刘凤霞,王水泉.消肿喷剂对急性软组织损伤大鼠血清PGE₂、IL-6影响的实验研究[J].陕西中医,2013,34(1):114.

(收稿日期:2015-02-03 修回日期:2015-04-03)

(编辑:张 静)