

伤科止痛膏对急性软组织损伤大鼠损伤组织中 一氧化氮及超氧化物歧化酶的影响

董静^{1,2*}

(1. 成都体育学院运动医学系, 成都 610041; 2. 成都体育学院运动医学与健康研究所, 成都 610041)

[摘要] 目的: 观察伤科止痛膏对大鼠急性软组织损伤后损伤组织中一氧化氮(NO)和超氧化物歧化酶(SOD)影响以及局部软组织的形态学改变。方法: 采用机械冲击挫伤的造模方法, 建立大鼠急性软组织损伤模型, 分别应用伤科止痛膏及扶他林乳膏涂布患处, 并于治疗后第 1, 3, 5 天取材, 测定大鼠损伤症候指数、组织学及形态计量学指标, 同时测定损伤组织中 NO 和 SOD 含量。结果: 伤科止痛膏对急性软组织损伤动物模型有良好的恢复作用, 给药组在损伤症候指数、组织学恢复方面优于模型对照组, 并能显著抑制损伤组织 NO 含量的升高($P < 0.01$), 增高损伤组织 SOD 活性($P < 0.01$)。结论: 伤科止痛膏治疗急性损伤的疗效机制之一与增高损伤组织 SOD 活性, 降低局部软组织细胞释放的自由基 NO 含量有关。

[关键词] 伤科止痛膏; 软组织损伤; 超氧化物歧化酶; 一氧化氮

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0120-03

Effect of Shangke Zhitong Plaster on Nitric Oxide and Superoxide Dismutase Level in Rat Model of Acute Soft Tissue Injury

DONG Jing^{1,2*}

(1. Faculty of Sports Medicine of Chengdu Sport University, Chengdu 610041, China;

2. Institute of Sports Medicine & Health, Chengdu Sport University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of Shangke Zhitong Plaster (SKZT) on nitric oxide (NO) and superoxide dismutase (SOD) level of the located soft tissue in rat model of acute soft tissue injury. **Method:** Model of acute soft tissue injury in rats was made, then they were divided into groups and given with drugs. Such dynamic items as index numbers of injury symptoms, parameters of histological anatomy and morphometry were investigated, and changes of NO and SOD in soft tissue were determined. **Result:** SKZT Plaster had favorable improvement on rat models of acute soft tissue injury, drug group was super to control group on index numbers of injury symptoms and histological anatomy recovery. SKZT Plaster could significantly decrease the elevation of NO in injured soft tissue and increase the contents of SOD in injured soft tissue in a dose-dependent way. **Conclusion:** SKZT Plaster could increase the level of SOD and inhibit the elevation of NO in injured soft tissue, this may be one of the mechanisms that SKZT Plaster can be used to treat acute soft tissue injury.

[Key words] Shangke Zhitong Plaster (SKZT Plaster); acute soft tissue injury; nitric oxide; superoxide dismutase

伤科止痛膏为我院的院内制剂, 由乳香、没药、

麝香、三七、儿茶等制成, 是我院已故著名武医专家郑怀贤教授的经验方, 几十年来许多医疗单位和专业运动队使用该方药, 对治疗各种软组织损伤消肿止痛效果显著, 在西南地区都享有盛誉, 为治疗运动损伤起了重要作用^[1]。本研究对伤科止痛膏进行了

[收稿日期] 20100621(001)

[基金项目] 四川省科技厅资助项目(07JY029-096)

[通讯作者] * 董静, 博士, 讲师, 研究方向: 中药药理, Tel: 13668181138, E-mail: dong_jing_2008@126.com

药理学方面的研究,为进一步精制提供试验依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,清洁级,雄性,体重 180 ~210 g,由四川大学华西医学中心动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(1117-10-2008)。

1.2 药物 伤科止痛膏,由成都体育学院附属医院药厂提供,本实验为方便动物用药,特制备成流浸膏,临用前再配制成所需浓度;赋形剂,由成都体育学院附属体育医院药厂提供;扶他林乳胶膏,北京诺华制药有限公司,批号 X0696;考马斯亮蓝试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,批号 20080808;一氧化氮(NO)试剂盒,批号 20081018,均购于南京建成生物研究所。

1.3 仪器 分析天平(上海天平制造厂);722 可见分光光度计(南京联创分析仪器制造有限公司);电子恒温水浴箱(广东汕头医用设备厂);80-2 台式低速离心机(上海手术器械厂)。

2 方法

2.1 造模 实验前 24 h,用 8% 硫化钠对大鼠臀部及大腿后侧脱毛,并在距腘窝 1 cm 处做好标记。将大鼠右下肢平放,固定于软组织打击器底座台上,将 1 根内直径为 1.5 cm,高 140 cm 的空心管置于大鼠右下肢软组织标记点处,然后把 1 块重 47 g,直径为 1.2 cm 的圆柱铁锤,用固定线固定于支架上,使其底端平行于空心管顶端平面。用剪刀剪断打击锤的固定线,使其从 140 cm 高度沿空心管自由落体击中大鼠右下肢软组织,连续击打 3 次,造成面积约 1 cm² 大小有明显皮下出血及肿胀的非开放性软组织损伤模型^[2]。受伤局部区域皮肤完整,已经解剖及组织学验证成功率为 100%。

2.2 分组与给药 将造模鼠随机分为 5 组:模型对照组,阳性对照药扶他林乳胶膏组和伤科止痛膏 3 个剂量(按生药量计为 0.21, 0.42, 0.84 g·kg⁻¹,分别为临床等效剂量、2 倍和 4 倍等效剂量)组。于损伤处涂抹赋形剂或相应药物 3 mL·kg⁻¹,然后覆盖透气薄膜,并用透气胶布、绷带包扎固定。每 12 h 换药 1 次,连续用药 5 d。于造模后 1, 3, 5 d 分 3 批处死大鼠,以打击部位为中心,沿损伤处切取肌肉组织。

2.3 损伤征候指数^[3] 自造模后定期观察伤肢肿胀和瘀斑等征候表现,并分级评分。皮下瘀血:多量块状计 2 分,少量点状计 1 分,无瘀血者计 0 分。

肌肉肿胀:明显肿胀计 2 分,稍有肿胀计 1 分,无肿胀者计 0 分。肌肉颜色:紫暗色深计 2 分,暗红色浅计 1 分,色泽正常计 0 分。

2.4 组织形态学观察^[4] 将取材组织进行石蜡切片,HE 染色并在光学显微镜下观察组织学形态,并分级评分。充血出血:血管大片充血计 3 分,血管中度充血或灶性出血计 2 分,个别血管轻度充血计 1 分,血管无充血计 0 分。炎症:大量炎细胞弥漫浸润计 3 分,较多炎细胞片状浸润计 2 分,少数炎细胞散在浸润计 1 分,无炎细胞浸润计 0 分。变性坏死:组织大片坏死计 3 分,组织广泛变性计 2 分,局部组织变性计 1 分,无变形坏死计 0 分。

2.5 NO, SOD 检测 采用 722 可见分光光度计,配套考马斯亮蓝、NO 试剂盒或 SOD 试剂盒,严格按操作说明书操作。

2.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件统计,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 LSD 法进行显著性检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 损伤征候指数观察 造模后大鼠伤肢迅速出现肿胀、皮肤瘀斑及皮下出血现象,伤势以伤后第 1 天最明显,随后渐轻,至第 5 天肿胀基本消退,局部或肢体远端残留皮肤瘀斑。伤科止痛膏中、高剂量和扶他林组与模型组比较,伤肢肿胀程度低,消退速度快,在伤后第 3 天已见明显消退,瘀斑的消散情况亦优于模型组。损伤征候指数评分伤科止痛膏中、高剂量和扶他林组低于模型组,结果见表 1。

表 1 伤科止痛膏对损伤征候指数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$) 分

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	1 d	3 d	5 d
模型对照	-	5.67 ±0.52	4.83 ±0.75	3.00 ±0.89
扶他林乳胶膏	0.10	5.00 ±0.63	3.00 ±0.89 ²⁾	1.83 ±0.75 ²⁾
伤科止痛膏	0.21	5.33 ±0.82	4.33 ±0.82	2.33 ±0.82
	0.42	4.17 ±0.75 ²⁾	3.00 ±0.89 ²⁾	1.00 ±0.89 ²⁾
	0.84	3.67 ±0.82 ²⁾	2.83 ±0.75 ²⁾	1.33 ±1.03 ²⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~4 同)。

3.2 光镜下组织学观察 治疗后第 1 d 模型组皮下及肌细胞间质中大量红细胞瘀积,肌纤维水肿,肌束间距增宽,部分肌纤维肌浆碎裂,周围微血管扩张、充血、血浆蛋白渗出。给药组与模型组病理变化近似,但红细胞瘀积,肌纤维水肿及微血管扩张程度较轻,多量白细胞浸润。治疗后第 3 天模型组见肌肉广泛的充血水肿,肌核增生,部分肌纤维肌浆碎

裂, 玻璃样团块状, 横纹消失, 较多中性白细胞浸润。给药组肌肉中充血, 出血、水肿均有消退, 少数肌纤维淡染, 偶见横纹肌消失或肌浆碎裂, 肌间质及血管周围可见少量中性细胞浸润。治疗后第 5 d 模型组部分肌纤维呈玻璃样团块状的均染红色, 部分肌纤维扭曲, 排列紊乱, 仍见红细胞瘀积现象, 白细胞呈弥漫性浸润。而给药组偶见少量充血水肿, 肌纤维间质中性白细胞浸润以及肌浆碎裂已不明显, 余肌纤维形态大致正常。损伤组织病理切片评分见表 2。

表 2 伤科止痛膏对损伤组织病理切片评分影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$) 分

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	1 d	3 d	5 d
模型对照	-	8.67 \pm 0.52	7.17 \pm 0.75	5.57 \pm 1.03
扶他林乳膏	0.10	6.67 \pm 0.52 ²⁾	4.83 \pm 0.75 ²⁾	3.67 \pm 0.82 ¹⁾
伤科止痛膏	0.21	8.67 \pm 0.52	7.33 \pm 0.52	6.33 \pm 0.52
	0.42	7.50 \pm 1.05 ¹⁾	5.17 \pm 1.17 ²⁾	3.33 \pm 1.03 ²⁾
	0.84	6.67 \pm 0.82 ²⁾	5.67 \pm 0.82 ²⁾	3.33 \pm 0.82 ²⁾

3.3 NO 含量的观察 伤科止痛膏和扶他林乳膏组均能降低损伤组织中 NO 含量, 与模型对照组比较 $P < 0.01$, 且伤科止痛膏降低小鼠损伤组织内 NO 含量呈剂量依赖方式。伤科止痛膏组损伤局部 NO 的含量与扶他林乳膏组相比较没有统计学意义。结果见表 3。

表 3 伤科止痛膏对损伤组织匀浆 NO 含量影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	1 d	3 d	5 d
模型对照	-	1.552 \pm 0.110	1.751 \pm 0.092	1.450 \pm 0.086
扶他林乳膏	0.10	1.346 \pm 0.082 ²⁾	1.474 \pm 0.081 ²⁾	1.172 \pm 0.120 ²⁾
伤科止痛膏	0.21	1.330 \pm 0.139 ²⁾	1.512 \pm 0.082 ²⁾	1.193 \pm 0.060 ²⁾
	0.42	1.324 \pm 0.070 ²⁾	1.455 \pm 0.062 ²⁾	1.171 \pm 0.066 ²⁾
	0.84	1.283 \pm 0.074 ²⁾	1.438 \pm 0.045 ²⁾	1.109 \pm 0.086 ²⁾

3.4 SOD 活性的观察 伤科止痛膏和扶他林乳膏组均能增高损伤组织中 SOD 活性, 与模型对照组比较 $P < 0.01$ 。伤科止痛膏组受伤局部 SOD 的含量与扶他林乳膏组相比较没有统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 4。

表 4 伤科止痛膏对损伤组织匀浆 SOD 含量影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	1 d	3 d	5 d
模型对照	-	41.86 \pm 2.94	46.97 \pm 1.09	54.36 \pm 1.56
扶他林乳膏	0.10	49.84 \pm 3.53 ²⁾	52.77 \pm 4.53 ²⁾	60.86 \pm 5.34 ²⁾
伤科止痛膏	0.21	50.13 \pm 1.77 ²⁾	52.95 \pm 1.72 ²⁾	59.49 \pm 0.89 ²⁾
	0.42	50.30 \pm 1.78 ²⁾	54.05 \pm 1.39 ²⁾	61.08 \pm 1.58 ²⁾
	0.84	50.38 \pm 1.13 ²⁾	53.74 \pm 1.51 ²⁾	61.15 \pm 1.12 ²⁾

4 讨论

伤科止痛膏是我院已故著名武医专家郑怀贤教授治疗软组织损伤的经验方, 本方本于首重气血, 筋骨并重, 标本兼治的原则, 以活血化瘀止痛之药为主, 辅以行气温里、祛风散寒之药, 并加入减少刺激又利于经皮吸收药品: 方中以芳香走窜, “上达肌肤, 内入骨髓”的麝香为君; 续断、红花、川芎等活血止痛为臣; 佐以行气止痛要药木香, 温里散寒止痛的肉桂, 祛风除湿, 舒筋活络的羌活、独活、白芷等, 又以冰片、薄荷脑等为使。组方药物虽多, 但配伍严谨, 剂型合理, 故为主治软组织损伤之良方。

急性软组织损伤为临床常见病, 属于中医“伤筋”范畴。在急性软组织损伤的病理状态下, 自由基生成增多, 且自由基清除酶活性降低, 动态平衡破坏, 启动自由基连锁反应, 引发膜的脂质过氧化反应, 造成组织损伤的进一步恶化。本试验的结果表明伤科止痛膏可以显著降低损伤局部肌纤维间质周围血管出血、充血、扩张, 减轻红细胞瘀积现象, 同时显著性缓解损伤局部肌间质及周围血管的中性粒细胞浸润, 加快损伤肌纤维的修复。伤科止痛膏能成剂量依赖性抑制损伤局部 NO 的产生, 使其维持在一定的浓度, 发挥其生理或保护作用, 避免其损伤作用, 推测其可能是通过抑制损伤组织 iNOS 的 mRNA 表达从而阻止 NO 的大量产生, 避免 NO 的组织病理损伤作用以达到减轻炎症反应。伤科止痛膏组 SOD 的升高与模型组相比有显著性差异($P < 0.01$), 说明伤科止痛膏能有效的刺激机体产生大量的 SOD, 从而有效的防治氧自由基的损害。其具体的作用机制有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 蓝肇熙, 熊若虹. 伤科中药与方剂[M]. 成都: 四川科技出版社, 2009: 122.
- [2] 李卫星, 谭大琦, 李秋华, 等. 消瘀止痛膏对大鼠急性软组织损伤的治疗作用[J]. 中医正骨, 2000, 12(11): 11.
- [3] 何朝勇, 李楠, 陈丽华, 等. 奇正消痛贴治疗急性软组织损伤实验研究[J]. 中医正骨, 2008, 20(11): 9.
- [4] 周国林, 姚全胜, 潘玉英, 等. 一种动物软组织损伤的实验方法[J]. 中国药理学通报, 1991, 7(5): 398.

[责任编辑 聂淑琴]