

扭伤散治疗大鼠急性软组织损伤的效果及作用机制研究

宋亦祺¹, 张彪¹, 陈阳¹, 沈为苟¹, 姜宏², 俞鹏飞², 曹峰¹

(1. 苏州市中西医结合医院, 江苏 苏州 215101;

2. 南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215009)

摘要 目的:观察扭伤散治疗急性软组织损伤的效果,并探讨其可能的作用机制。**方法:**将 36 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、扭伤散组和扶他林组,每组 9 只。空白组大鼠仅脱毛及麻醉,不造模,其余 3 组大鼠均采用重物打击股直肌中段构建急性软组织损伤模型。造模后次日开始给药,扭伤散组外敷扭伤散、扶他林组外涂扶他林(双氯芬酸二乙胺)乳胶剂,空白组和造模组不进行任何处理。记录干预 1 d、3 d、5 d、7 d 后各组大鼠伤肢损伤评分。末次给药 24 h 后,处死大鼠,暴露股直肌中段,切取打击部位中心的肌肉组织,进行组织病理学观察。采用实时荧光定量逆转录 PCR 检测肌肉组织中白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 的 mRNA 相对表达水平。采用免疫荧光染色法检测肌肉组织中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的蛋白荧光强度。**结果:**①大鼠伤肢损伤评分结果。模型组、扭伤散组、扶他林组大鼠不同时间点伤肢损伤评分随时间延长均呈下降趋势,但下降趋势不完全一致($F=538.942, P=0.000; F=633.208, P=0.000; F=586.374, P=0.000$)。干预 1 d 后,模型组、扭伤散组、扶他林组大鼠伤肢损伤评分均高于空白组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);模型组、扭伤散组大鼠伤肢损伤评分均高于扶他林组($P=0.028, P=0.028$);模型组与扭伤散组大鼠伤肢损伤评分的差异无统计学意义($P=1.000$)。干预 3 d、5 d、7 d 后,模型组、扭伤散组、扶他林组大鼠伤肢损伤评分均高于空白组($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.005, P=0.015$);扭伤散组、扶他林组大鼠伤肢损伤评分均低于模型组($P=0.002, P=0.001; P=0.001, P=0.005; P=0.015, P=0.005$);扭伤散组与扶他林组大鼠伤肢损伤评分的差异均无统计学意义($P=0.679; P=0.455; P=0.673$)。②大鼠损伤肌肉组织病理学观察结果。空白组大鼠肌纤维排列整齐,结构完整,形态无明显异常,细胞核均位于基底膜下。模型组大鼠肌束紊乱,肌纤维扭曲变形,部分断裂、变性坏死,细胞核内移且大小不均匀,肌间隙不规则增宽、水肿明显,可见瘀血或渗出,并有大量炎症细胞浸润。扶他林组和扭伤散组大鼠肌纤维的结构和形态接近正常,仅有部分轻度扭曲,细胞核位于基底膜下,无明显细胞核内移现象,核的大小相对均匀,肌间隙相对紧密,无明显水肿,仅有少量炎症细胞浸润。③大鼠损伤肌肉组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 相对表达水平检测结果。4 组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 相对表达水平总体比较,组间差异均有统计学意义($F=68.719, P=0.000; F=134.708, P=0.000; F=14.261, P=0.000$)。空白组、扭伤散组、扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 相对表达水平均低于模型组($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。扭伤散组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 相对表达水平与空白组的差异均无统计学意义($P=0.676, P=0.681, P=0.200$)。扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1 β 的 mRNA 相对表达水平高于空白组($P=0.001$), TNF- α 、IL-6 的 mRNA 相对表达水平与空白组的差异均无统计学意义($P=0.224, P=0.811$)。扭伤散组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1 β 的 mRNA 相对表达水平低于扶他林组($P=0.004$), TNF- α 、IL-6 的 mRNA 相对表达水平与扶他林组的差异均无统计学意义($P=0.415, P=0.293$)。④大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度检测结果。4 组大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度总体比较,差异有统计学意义($F=420.329, P=0.000$)。模型组、扭伤散组、扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度均高于空白组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。扭伤散组、扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度均低于模型组($P=0.000, P=0.000$)。扭伤散组大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度低于扶他林组($P=0.028$)。**结论:**扭伤散对大鼠急性软组织损伤具有显著的改善作用,且效果与扶他林接近,其作用机制可能与抑制巨噬细胞 M1 极化,从而减少炎症因子的释放有关。

关键词 软组织损伤;巨噬细胞;扭伤散;炎症;大鼠;动物实验

Efficacy and mechanism of Niushang San(扭伤散) in treatment of acute soft tissue injuries in rats: an experimental study

SONG Yiqi¹, ZHANG Biao¹, CHEN Yang¹, SHEN Weigou¹, JIANG Hong², YU Pengfei², CAO Feng¹

基金项目:苏州市科技发展计划项目(SYSD2020235);苏州市应用基础研究(医疗卫生)科技创新项目(SYWD2024331)

通讯作者:曹峰 E-mail:szmdcf@139.com

1. Suzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Suzhou 215101, Jiangsu, China

2. Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 215009, Jiangsu, China

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Niushang San(扭伤散, NSS) in treatment of acute soft tissue injuries in rats, and to explore its underlying mechanism. **Methods:** Thirty-six SD rats were selected and randomized into blank group, model group, NSS group and voltaren group, with 9 ones in each group. All rats but the ones in blank group were modeled by striking the mid-segment of the rectus femoris muscle with a heavy object for inducing acute soft tissue injuries, while the ones in blank group merely underwent hair removal and anesthesia. The next day after successful modeling, the rats in NSS group and voltaren group were treated with external application of NSS and voltaren(diclofenac diethylamine) emulgel, respectively, while the ones in blank group and model group were not given any treatment. The injury severity score of the injured limbs in each group were assessed and recorded after 1-, 3-, 5- and 7-day intervention, respectively. Twenty-four hours after the last medication, the rats were sacrificed and the mid-segment of their rectus femoris muscle were exposed. The muscle tissues in the center of the striked site were harvested and stained with hematoxylin-eosin(HE) for observing the histopathological changes. Furthermore, the relative mRNA expression levels of interleukin(IL)-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-6 in the injured muscle tissues were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR(qRT-PCR), and the fluorescence intensity of inducible nitric oxide synthase(iNOS) protein in the injured muscle tissues was detected by immunofluorescence staining. **Results:** ①The injury severity score of the injured limbs of rats. The injury severity score of the injured limbs presented a downward trend over time in model group, NSS group and voltaren group, while the downward trend was inconsistent with each other in the 3 groups($F = 538.942, P = 0.000; F = 633.208, P = 0.000; F = 586.374, P = 0.000$). After 1-day intervention, the injury severity score of the injured limbs was higher in model group, NSS group and voltaren group compared to blank group($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$), and was higher in model group and NSS group compared to voltaren group($P = 0.028, P = 0.028$), while, it was not significantly different from each other between model group and NSS group($P = 1.000$). After 3-, 5- and 7-day intervention, the injury severity score of the injured limbs was higher in model group, NSS group and voltaren group compared to blank group($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.005, P = 0.015$), and was higher in model group compared to NSS group and voltaren group($P = 0.002, P = 0.001; P = 0.001, P = 0.005; P = 0.015, P = 0.005$), while, it was not significantly different from each other between NSS group and voltaren group($P = 0.679; P = 0.455; P = 0.673$). ②The histopathological changes in the injured muscle tissues of rats. The HE staining results showed that the muscle fibers of the rats in the blank group were neatly arranged with intact structure and no obvious abnormality in morphology, additionally, the cell nuclei were all located beneath the basement membrane. In the model group, the rat muscle bundles were disordered, the muscle fibers were twisted and deformed, with some fractured, denatured, and necrotic. The cell nuclei shifted inward with uneven sizes, the muscle gaps were irregularly widened with obvious edema, besides, the stagnated blood or exudation, accompanied by a large number of inflammatory cell infiltration, were observed. The structure and morphology of muscle fibers in rats of voltaren group and NSS group were close to normal, with only some slightly twisted. The cell nuclei located beneath the basement membrane without obvious inward shifting, and the size of the nuclei was relatively uniform; besides, the muscle gaps were relatively tight without significant edema, moreover, a small amount of inflammatory cell infiltration were observed. ③The relative mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the injured muscle tissues of rats. There was statistical difference in the relative mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the injured muscle tissues of rats among the 4 groups in general($F = 68.719, P = 0.000; F = 134.708, P = 0.000; F = 14.261, P = 0.000$). The relative mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the injured muscle tissues of rats were lower in blank group, NSS group and voltaren group compared to model group($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000; P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$), while, they were not significantly different from each other between NSS group and blank group($P = 0.676, P = 0.681, P = 0.200$). The relative mRNA expression level of IL-1 β in the injured muscle tissues of rats was higher in voltaren group compared to blank group($P = 0.001$), while those of TNF- α and IL-6 were not significantly different from each other between the 2 groups($P = 0.224, P = 0.811$). The relative mRNA expression level of IL-1 β in the injured muscle tissues of rats was lower in NSS group compared to voltaren group($P = 0.004$), while those of TNF- α and IL-6 were not significantly different from each other between the 2 groups($P = 0.415, P = 0.293$). ④The fluorescence intensity of iNOS protein in the injured muscle tissues of rats. There was statistical difference in the fluorescence intensity of iNOS protein in the injured muscle tissues of rats among the 4 groups in general($F = 420.329, P = 0.000$). The fluorescence intensity of iNOS protein in the injured muscle tissues of rats was higher in model group, NSS group and voltaren group compared to blank group($P = 0.000, P =$

0.000, $P=0.000$), and was higher in model group compared to NSS group and voltaren group ($P=0.000, P=0.000$), and was higher in voltaren group compared to NSS group ($P=0.028$). **Conclusion:** NSS has a significant effect on improving acute soft tissue injuries in rats, and its efficacy is similar to that of voltaren. It may work by inhibiting the polarization of M1 macrophage, thereby reducing the release of inflammatory factors.

Keywords soft tissue injuries; macrophages; Niushang San; inflammation; rats; animal experimentation

急性软组织损伤是骨伤科常见的创伤类型,通常由直接或间接暴力作用于机体,造成肌肉、筋膜、肌腱或韧带等软组织的闭合性损伤,进而引起无菌性炎症和微循环障碍,导致损伤组织的生理功能暂时紊乱^[1]。急性软组织损伤的临床表现主要包括局部软组织肿胀、疼痛和功能障碍^[2],可严重影响患者的生活质量。目前,急性软组织损伤的治疗主要遵循保护、休息、冰敷、压迫和抬高患肢的原则^[1,3]。在药物治疗方面,非甾体抗炎药是首选^[4],但口服这类药物存在胃肠道不良反应等风险^[5]。外用非甾体抗炎药的安全性相对较高,但有可能增加皮肤刺激性,导致过敏反应的风险增高,而且不适用于老年人和合并肾功能不全的患者,因此仍需注意其潜在风险^[6-7]。与使用非甾体抗炎药治疗相比,中医外治法在治疗急性软组织损伤方面不仅安全性高,而且疗效显著。因此,深入开展这方面的研究具有重要意义。扭伤散是苏州地区民间治疗外伤的经验方,历史悠久。经过我们的改良后,扭伤散被广泛用于治疗各种软组织损伤和急慢性炎症,取得了满意的疗效,且不良反应较少。我们在前期研究^[8-9]中证实了扭伤散治疗急性踝关节扭伤的有效性,但其作用机制尚不明确。有研究^[10]表明,巨噬细胞极化在炎症反应中起着重要作用,因此调控巨噬细胞极化成为控制炎症发展的潜在策略。基于此,我们依据巨噬细胞极化理论,通过动物实验探究扭伤散治疗急性软组织损伤的疗效和作用机制,现报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只,体质量(220 ± 10)g,由上海吉辉实验动物饲养有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0009。动物实验在苏州市中西医结合医院中心实验室进行,实验方案由苏州市中西医结合医院医学伦理委员会审查通过,伦理批件号:2023 伦审(论文)批第 010 号。

1.2 实验药物

扭伤散所用药物均购自苏州市天灵中药饮片有

限公司,其药物组成为:栀子 20 g、桃仁 10 g、红花 10 g、三七粉 10 g、当归尾 20 g、木香 20 g、葶苈子 10 g。将上述药物研磨为细粉后加入白凡士林加热融化,均匀混合呈膏状备用。扶他林(双氯芬酸二乙胺)乳剂(葛兰素史克公司,批准文号:H20181225)。

1.3 实验主要试剂

硫化钠(上海麦克林生化科技股份有限公司),异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司),GD 肌肉固定液、放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液、荧光二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司),磁珠法 RNA 提取试剂盒(苏州麦迪蔻生物科技有限公司),实时荧光定量 PCR 预混液(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),逆转录试剂盒(翌圣生物科技上海股份有限公司),诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体(成都正能生物技术有限责任公司)。

1.4 实验主要仪器

组织脱水机(意大利 DIAPATH 公司),组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司),病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),数字病理切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH 公司),三维冷冻研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司),多功能酶标仪(美国 BioTek 公司),荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司),超微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司),正置荧光显微镜(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与干预

2.1.1 分组方法 将 36 只大鼠称重后按体重排序并编号,从随机数字表中选取 36 个连续随机数字,记录在大鼠编号下方。将所有随机数字从小到大排序,将排序为 1~9 的大鼠纳入空白组、10~18 的大鼠纳入模型组、19~27 的大鼠纳入扭伤散组、28~36 的大鼠纳入扶他林组。

2.1.2 造模方法 所有大鼠均适应性喂养 7 d。空白组大鼠仅脱毛及麻醉,不造模,其余 3 组大鼠均采

用文献[11-12]的造模方法构建急性软组织损伤模型。造模前 12 h 对大鼠进行禁食不禁水处理。使用异氟烷进行吸入麻醉。先将大鼠右后肢大腿处的毛发剃除,再用 6% 硫化钠溶液清除残余毛发,并将右后肢大腿处股直肌中段标记为打击点。将大鼠俯卧位固定于鼠板,右下肢稍外旋以充分暴露标记点,并在标记点下方垫上纱布,避免打击时悬空造成骨折。取 20 cm 长的塑料管垂直固定于标记点上方,将质量为 250 g 的铁球从塑料管顶部抛下,使其砸中大鼠标记点,接触面积约 1 cm^2 ,重复操作 6 次。造模后,大鼠伤处出现肿胀和瘀血,右后肢呈现跛行,查体确认无关节脱位、骨折、皮肤破损等异常情况,表明造模成功。

2.1.3 干预方法 造模完成后[图 1(1)],从次日开始给药。扭伤散组在大鼠右后侧大腿处外敷扭伤散[图 1(2)],扶他林组将扶他林乳胶剂涂抹于相同部位,2 组的给药厚度均约为 1 mm。给药后,局部用 2 层纱布覆盖并包扎,防止大鼠啃食。每日换药 1 次,持续 1 周。空白组和造模组不进行任何处理。

2.2 实验指标观察

记录干预 1 d、3 d、5 d、7 d 后各组大鼠伤肢软组织损伤情况,计算伤肢损伤评分。末次给药 24 h 后,处死所有大鼠。纵行切开大鼠损伤部位的皮肤和筋膜,沿肌间隙分离,暴露股直肌中段。切取打击部位中心的肌肉组织,并将其均分为两部分:一部分用 GD 肌肉固定液固定,以备后续进行组织病理学观察;另一部分则储存于液氮中,以备后续进行实时荧光定量逆转录 PCR 检测,检测指标包括白细胞介素(interleukin, IL)- 1β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 的 mRNA 相对表达水平,以及 iNOS 蛋白荧光强度。

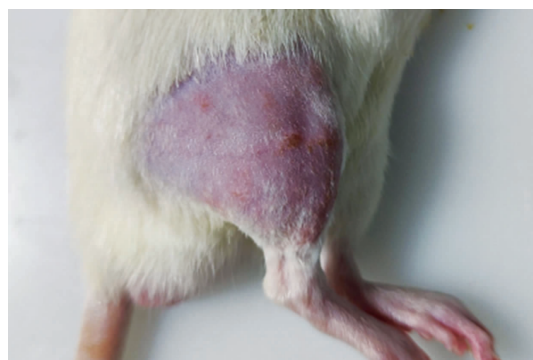
2.2.1 大鼠伤肢损伤评分 参考文献[12-14]制定

伤肢损伤评分标准:皮下瘀血,大量或片状计 2 分,少量或点状计 1 分,无出血计 0 分;肢体肿胀,肿胀明显计 2 分,轻度肿胀计 1 分,无肿胀计 0 分;肢体活动,伤肢悬空并拒绝触地计 2 分,伤肢跛行计 1 分,正常活动计 0 分;触痛反应,伤处触碰后反应强烈计 2 分,反应轻微计 1 分,无异常反应计 0 分。总分值越高,提示患肢损伤程度越重。

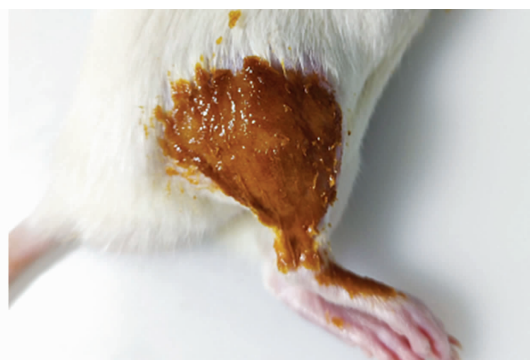
2.2.2 大鼠损伤肌肉组织病理学观察 将大鼠造模部位的肌肉组织固定 24 h 后进行脱水处理,并用石蜡包埋和切片,然后进行 HE 染色。在光镜下观察肌肉组织的损伤情况,包括肌纤维的排列顺序、形态及完整性,肌间隙是否有瘀血或水肿,以及是否有炎症细胞浸润等现象。

2.2.3 大鼠损伤肌肉组织中 IL- 1β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 相对表达水平检测 采用磁珠法 RNA 试剂盒提取大鼠肌肉组织的总 RNA,然后将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测,选取甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 IL- 1β 、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 相对表达水平。引物序列见表 1。

2.2.4 大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度检测 将大鼠造模部位的肌肉组织脱水处理后,进行石蜡包埋和切片。对切片进行脱蜡及抗原修复,并用 PBS 漂洗 3 遍,每次 5 min。用 3% 过氧化氢溶液漂洗 15 min,滴加 5% 牛血清白蛋白封闭液,在 37℃ 条件下反应 30 min。滴加 iNOS 一抗(稀释比例为 1:100),4℃ 条件下孵育过夜。滴加荧光二抗(稀释比例为 1:500),室温孵育 45 min。进行 DAPI 染色后,用抗荧光淬灭封片剂封片。在荧光显微镜下观察大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度,并使用 ImageJ 软件对结果进行定量分析。



(1) 造模后外观



(2) 外敷扭伤散后外观

图 1 大鼠急性软组织损伤图片

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'—3')
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	上游引物 GACATGCCGCTGGAGAAAC
	下游引物 AGCCCAGGATGCCCTTTAGT
白细胞介素-1β	上游引物 ATGCCTCGTGCTGTCTGACC
	下游引物 TTTGTCGTTGCTTGTCTCTCCTTG
肿瘤坏死因子-α	上游引物 CACGCTCTTCTGTCTACTGAAC TTC
	下游引物 GGGCTACGGGCTTG TCACTC
白细胞介素-6	上游引物 CTTCCAGCCAGTTGCCTTCTTG
	下游引物 TGCTCTGTTGTGGCTGCTATCC

2.3 数据统计

采用 SPSS27.0 软件对所得数据进行统计学分析。各组大鼠伤肢损伤评分的比较采用重复测量资料的方差分析,损伤肌肉组织中 IL-1β、TNF-α、IL-6 的 mRNA 相对表达水平,以及 iNOS 蛋白荧光强度的组间整体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验。检验水准 α=0.05。

3 结 果

3.1 大鼠伤肢损伤评分结果

时间因素和分组因素存在交互效应。4 组大鼠伤肢损伤评分总体比较,差异有统计学意义,即存在分组效应。不同时间点伤肢损伤评分的差异有统计学意义,即存在时间效应。空白组大鼠不同时间点伤肢损伤评分的差异无统计学意义。模型组、扭伤散组、扶他林组大鼠不同时间点伤肢损伤评分随时间延长均呈下降趋势,但下降趋势不完全一致。干预 1 d 后,模型组、扭伤散组、扶他林组大鼠伤肢损伤评分均高于空白组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$);模型组、扭伤散组大鼠伤肢损伤评分均高于扶他林组($P=0.028, P=0.028$);模型组与扭伤散组大鼠伤肢损伤评分的差异无统计学意义($P=1.000$)。干预 3 d、5 d、7 d 后,模型组、扭伤散组、扶他林组大鼠伤肢损伤评分均高于空白组($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.005, P=0.015$);扭伤散组、扶他林组大鼠伤肢损伤评分均低于模型组($P=0.002, P=0.001; P=0.001, P=0.005; P=0.015, P=0.005$);扭伤散组与扶他林组大鼠伤肢损伤评分的差异均无统计学意义($P=0.679; P=0.455; P=0.673$)。见表 2。

3.2 大鼠损伤肌肉组织病理学观察结果

空白组大鼠肌纤维排列整齐,结构完整,形态无明显异常,细胞核均位于基底膜下。模型组大鼠肌束紊乱,肌纤维扭曲变形,部分断裂、变性坏死,细胞核

内移且大小不均匀,肌间隙不规则增宽、水肿明显,可见瘀血或渗出,并有大量炎症细胞浸润。扶他林组和扭伤散组大鼠肌纤维的结构和形态接近正常,仅有部分轻度扭曲,细胞核位于基底膜下,无明显细胞核内移现象,核的大小相对均匀,肌间隙相对紧密,无明显水肿,仅有少量炎症细胞浸润。见图 2。

3.3 大鼠损伤肌肉组织中 IL-1β、TNF-α、IL-6 的 mRNA 相对表达水平检测结果

4 组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1β、TNF-α、IL-6 的 mRNA 相对表达水平总体比较,组间差异均有统计学意义。空白组、扭伤散组、扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1β、TNF-α、IL-6 的 mRNA 相对表达水平均低于模型组($P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。扭伤散组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1β、TNF-α、IL-6 的 mRNA 相对表达水平与空白组的差异均无统计学意义($P=0.676, P=0.681, P=0.200$)。扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1β 的 mRNA 相对表达水平高于空白组($P=0.001$),TNF-α、IL-6 的 mRNA 相对表达水平与空白组的差异均无统计学意义($P=0.224, P=0.811$)。扭伤散组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1β 的 mRNA 相对表达水平低于扶他林组($P=0.004$),TNF-α、IL-6 的 mRNA 相对表达水平与扶他林组的差异均无统计学意义($P=0.415, P=0.293$)。见表 3。

3.4 大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度检测结果

免疫荧光检测结果显示,4 组大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度总体比较,差异有统计学意义。模型组、扭伤散组、扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度均高于空白组($P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。扭伤散组、扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度均低于模型组($P=$

0.000, $P = 0.000$)。扭伤散组大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白荧光强度低于扶他林组 ($P = 0.028$)。见图 3、表 4。

4 讨论

急性软组织损伤多因软组织遭受外部打击引起,属于中医学“筋伤”范畴,辨证为气滞血瘀证。《医宗金鉴》载:“跌打损伤之证,专从血论。”局部软组织受损后,血液循环受阻,溢于脉外,导致经络瘀塞,气血运行不畅。《诸病源候论》载:“血气隔绝,不能周荣。”中医理论认为,气为血之帅,血为气之母,气行则血行,气滞则血瘀。因此,急性软组织损伤的病机可概括为血瘀气滞,脉络不和,不通则痛。可治以活血化瘀、消肿止痛、舒筋活络^[15-16]。中医外治法治疗急

性软组织损伤的历史悠久,疗效可靠^[17]。《医学源流论》载:“外治之法……用膏贴之,闭塞其气,使药性从毛孔而入其腠理,通经贯络,或提而出之,或攻而散之,较之服药尤有力。”这说明外用中药可以通过皮肤的吸收,达到治疗目的。

扭伤散是苏州地区民间常用的伤科药物,俗称栀子吊伤药。方中栀子泻火解毒、清热利湿、凉血散瘀,桃仁和红花活血通经、散瘀止痛,葶苈子泻肺、利水消肿,当归尾补血和血,木香行气止痛,三七粉散瘀止血、消肿定痛,诸药合用,共奏活血散瘀、消肿止痛之功。将扭伤散外敷于损伤部位,可以使药效直达病所,还避免了口服药物可能引起的胃肠道不良反应,因此具有较高的安全性。前期研究^[8-9]表明,外用扭

表 2 各组大鼠干预不同时间点伤肢损伤评分

组别	样本量/ 只	干预不同时间点伤肢损伤评分/ $(\bar{x} \pm s, \text{分})$					F 值	P 值
		1 d	3 d	5 d	7 d	合计		
空白组	9	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0	1.000
模型组	9	7.56 ± 0.53	6.33 ± 0.50	4.44 ± 0.73	1.44 ± 0.73	4.94 ± 2.41	538.942	0.000
扭伤散组	9	7.56 ± 0.53	5.44 ± 0.73	3.33 ± 0.71	0.78 ± 0.44	4.28 ± 2.61	633.208	0.000
扶他林组	9	7.11 ± 0.33	5.33 ± 0.71	3.56 ± 0.73	0.67 ± 0.71	4.17 ± 2.49	586.374	0.000
合计	36	5.56 ± 3.28	4.28 ± 2.59	2.83 ± 1.81	0.72 ± 0.74	3.35 ± 2.91	1 013.030 ¹⁾	0.000 ¹⁾
F 值		743.111	234.783	87.905	10.303	254.090 ¹⁾	$F = 114.929^{2)},$	
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 ¹⁾	$P = 0.000^{2)}$	

注:1)主效应的 F 值和 P 值;2)交互效应的 F 值和 P 值。

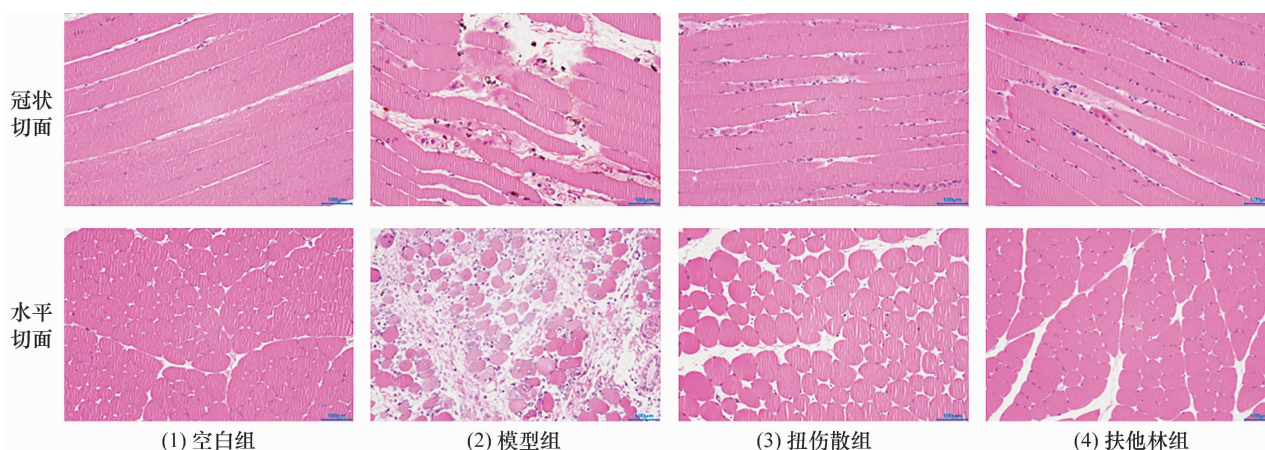
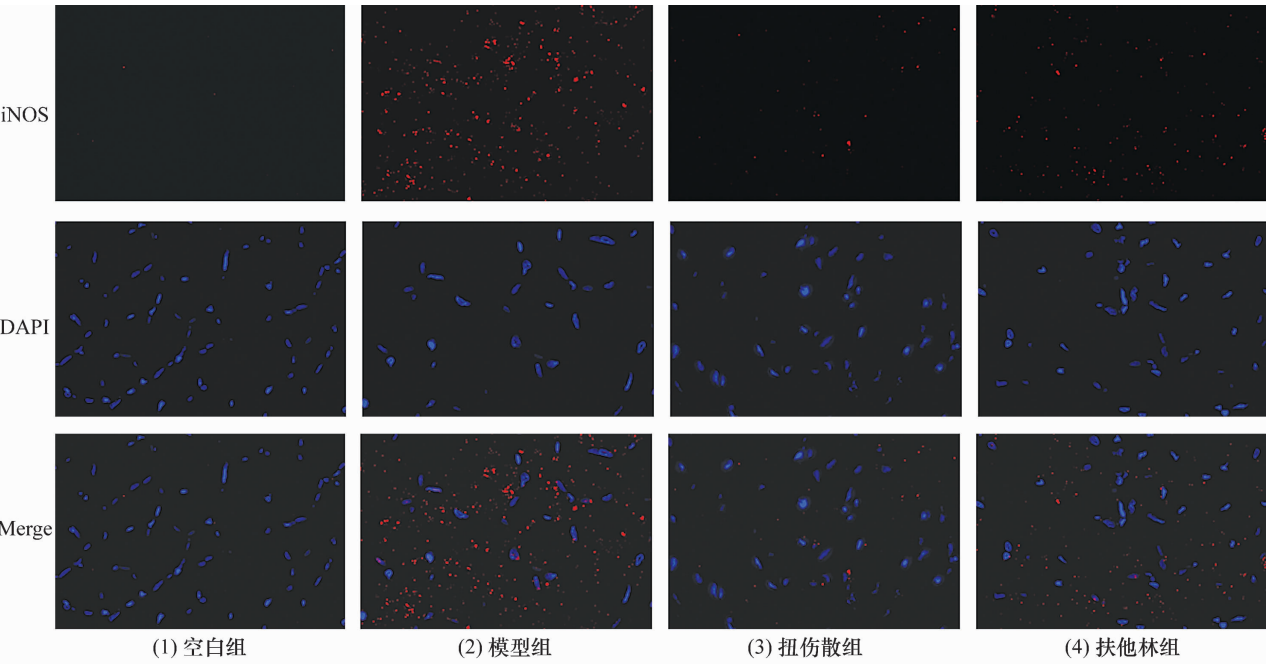


图 2 各组大鼠损伤肌肉组织 HE 染色图片 ($\times 200$)

表 3 各组大鼠损伤肌肉组织中白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 的 mRNA 相对表达水平

组别	样本量/只	白细胞介素-1 β ($\bar{x} \pm s$)	肿瘤坏死因子- α ($\bar{x} \pm s$)	白细胞介素-6 ($\bar{x} \pm s$)
空白组	9	1.05 ± 0.35	1.03 ± 0.28	1.00 ± 0.16
模型组	9	14.19 ± 4.03	5.10 ± 0.81	3.36 ± 0.99
扭伤散组	9	1.50 ± 0.66	1.13 ± 0.34	1.54 ± 1.16
扶他林组	9	4.71 ± 1.66	1.32 ± 0.45	1.10 ± 0.83
F 值		68.719	134.708	14.261
P 值		0.000	0.000	0.000



iNOS 为诱导型一氧化氮合酶,DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吲哚,Merge 为融合图片。

图 3 各组大鼠损伤肌肉组织中诱导型一氧化氮合酶免疫荧光染色图片(×100)

表 4 各组大鼠损伤肌肉组织中诱导型一氧化氮合酶蛋白荧光强度

组别	样本量/只	诱导型一氧化氮合酶蛋白荧光强度($\bar{x} \pm s$)
空白组	9	36.24 ± 3.66
模型组	9	154.14 ± 10.26
扭伤散组	9	62.07 ± 6.93
扶他林组	9	70.16 ± 7.53
F 值		420.329
P 值		0.000

伤散治疗急性软组织损伤具有良好的镇痛和消肿作用。我们在此基础上,通过建立大鼠急性软组织损伤模型,深入探究其具体作用机制。

本研究发现,与空白组相比,造模后大鼠伤肢迅速肿胀并伴有跛行,伤处拒按,局部出现皮下瘀血。HE 染色可见肌纤维结构被破坏,血管受损或破裂,红细胞外渗,并伴有炎症细胞浸润和组织水肿。与模型组相比,扭伤散组和扶他林组大鼠的上述症状明显减轻,伤肢损伤评分显著降低,肌纤维排列趋于整齐,组织水肿和炎症细胞浸润程度明显下降,表明外用扭伤散能有效改善急性软组织损伤模型大鼠的症状。急性炎症反应是急性软组织损伤的核心病理特征^[18-19],在这一过程中,IL-1β、TNF-α 和 IL-6 等炎症因子起着至关重要的作用^[20]。本研究还发现,与空白组相比,模型组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的 mRNA 相对表达水平升高,这表明急性软组织损伤会导致局部炎症反应增强。与模型组相比,扭伤散组和扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 IL-1β、

TNF-α 和 IL-6 的 mRNA 相对表达水平有所降低,且扭伤散组中 IL-1β 的 mRNA 相对表达水平低于扶他林组,这提示扭伤散能下调炎症细胞因子的水平,从而减轻损伤部位的炎症反应。

巨噬细胞在炎症反应中扮演着关键角色^[21],其表型和功能状态受其所处微环境的影响,具有显著的异质性和可塑性。静息状态下的 M0 型巨噬细胞可被极化为促炎的 M1 型或抑炎的 M2 型^[10]。在急性软组织损伤早期,巨噬细胞会迁移并浸润至损伤部位,首先极化为 M1 表型,并分泌大量的 TNF-α、IL-1β、IL-6 等促炎因子,参与损伤组织内细胞碎片及坏死组织的清除^[22-23]。随着炎症的逐步消退,巨噬细胞逐渐极化为 M2 表型,并释放 IL-10、转化生长因子-β 等抗炎因子,促进损伤组织的再生和修复^[24-25]。M1 型巨噬细胞的过度激活会加剧肌肉坏死和纤维瘢痕化^[26],甚至造成异位骨化,可严重影响软组织的修复^[27]。因此,抑制巨噬细胞向 M1 型极化能够有效治疗急性炎症反应造成的损伤^[28]。本研究发现,扭伤

散干预后, IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 在损伤肌肉组织中的表达低于模型组, 这提示扭伤散具有减轻肌肉组织急性炎症反应的作用。iNOS 蛋白是 M1 型巨噬细胞表面的特征性标志物^[23]。在本研究中, 通过免疫荧光测定 iNOS 在损伤肌肉组织中的表达情况, 结果发现, 与空白组相比, 造模后大鼠损伤肌肉组织中的 iNOS 蛋白荧光强度显著增加, 提示急性软组织损伤大鼠的损伤肌肉组织中巨噬细胞 M1 极化水平有所上升。与模型组相比, 扭伤散组和扶他林组大鼠损伤肌肉组织中 iNOS 蛋白的荧光强度显著降低, 且扭伤散组中 iNOS 蛋白的荧光强度低于扶他林组, 提示扭伤散可能通过抑制巨噬细胞的 M1 极化水平, 从而减轻损伤部位的炎症反应。

本研究结果表明, 扭伤散对大鼠急性软组织损伤具有显著的改善作用, 且效果与扶他林接近, 其作用机制可能与抑制巨噬细胞 M1 极化, 从而减少炎症因子的释放有关。

参考文献

- [1] 国家创伤医学中心, 中华医学会疼痛学分会, 中国医师协会创伤外科医师分会, 等. 急性闭合性软组织损伤诊疗与疼痛管理专家共识[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(21): 1553 - 1559.
- [2] YANG H, ZHOU J, WANG J, et al. Circulating exosomal microRNA profiles associated with acute soft tissue injury[J]. Cell J, 2021, 23(4): 474 - 484.
- [3] BLEAKLEY C M. Acute soft tissue injury management: past, present and future[J]. Phys Ther Sport, 2013, 14(2): 73 - 74.
- [4] JONES P, LAMDIN R, DALZIEL S R. Oral non-steroidal anti-inflammatory drugs versus other oral analgesic agents for acute soft tissue injury[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2020, 8(8): CD007789.
- [5] BJARNASON I, SCARPIGNATO C, HOLMGREN E, et al. Mechanisms of damage to the gastrointestinal tract from non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. Gastroenterology, 2018, 154(3): 500 - 514.
- [6] SHI C, YE Z, SHAO Z, et al. Multidisciplinary guidelines for the rational use of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for musculoskeletal pain (2022) [J]. J Clin Med, 2023, 12(4): 1544.
- [7] KATSUNO T, TOGO K, EBATA N, et al. Burden of renal events associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with osteoarthritis and chronic low back pain: a retrospective database study[J]. Pain Ther, 2021, 10(1): 443 - 455.
- [8] 王建斌, 严沫琦, 吉涛. 扭伤散和黄金散治疗急性踝关节扭伤效果比较[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(2): 119 - 122.
- [9] 陈阳, 仓挺松, 吴骏, 等. 扭伤散联合纸夹板外固定治疗急性踝关节扭伤的疗效及优势[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(11): 12 - 17.
- [10] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZIRI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425 - 6440.
- [11] JIANG S, CHEN Z, LAI W, et al. Decoction of heat-clearing, detoxifying and blood stasis removing relieves acute soft tissue injury via modulating miR-26b-5p/COX2 axis to inhibit inflammation[J]. Biosci Rep, 2020, 40(12): BSR20201981.
- [12] 雷蕾, 邓鑫, 郑尧, 等. 黄芩冷疗凝胶对急性软组织损伤大鼠治疗作用及不同理疗方法的对比[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2483 - 2486.
- [13] ZHANG B, LIANG J, FAN H, et al. Study on anti-inflammatory effect of Shangkehuangshui in vitro and in vivo based on TLR4/TLR2-NF- κ B signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 323: 117709.
- [14] 王青华, 唐映红, 朱敏丰, 等. 基于 OPG/RANKL/RANK 骨代谢通路探讨伤科黄水对急性软组织损伤模型大鼠的保护机制[J]. 中药材, 2020, 43(9): 2264 - 2268.
- [15] 李庆辉, 俞仲翔, 赵旭涛. 筋伤相关理论的探讨及筋伤的治法[J]. 中医正骨, 2023, 35(9): 62 - 64.
- [16] 司誉豪, 马勇, 郭杨, 等. 马勇运用活血利水法论治急性筋伤经验[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 3951 - 3954.
- [17] 朱文浩, 唐德志, 邬学群. 中医外治法治疗软组织损伤的研究进展[J]. 中医正骨, 2021, 33(2): 66 - 68.
- [18] KUDSI S Q, ANTONIAZZI C T D, CAMPONOGARA C, et al. Characterisation of nociception and inflammation observed in a traumatic muscle injury model in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 883: 173284.
- [19] DONG F, XUE C, WANG Y, et al. Hydroxysafflor yellow a attenuates the expression of inflammatory cytokines in acute soft tissue injury[J]. Sci Rep, 2017, 7: 40584.
- [20] MEGHA K B, JOSEPH X, AKHIL V, et al. Cascade of immune mechanism and consequences of inflammatory disorders[J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153712.
- [21] BUTTERFIELD T A, BEST T M, MERRICK M A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair[J]. J Athl Train, 2006, 41(4): 457 - 465.

(下转第 27 页)

- [3] ECCLESTON A. Cartilage regeneration for osteoarthritis[J]. Nat Rev Drug Discov, 2023, 22(2) :96.
- [4] ZENG C Y, WANG X F, HUA F Z. HIF-1 α in osteoarthritis: from pathogenesis to therapeutic implications[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 927126.
- [5] MAO L, WU W, WANG M, et al. Targeted treatment for osteoarthritis: drugs and delivery system[J]. Drug Deliv, 2021, 28(1) :1861 – 1876.
- [6] WOLFF D G, CHRISTOPHERSEN C, BROWN S M, et al. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. Phys Sportsmed, 2021, 49(4) :381 – 391.
- [7] CHANG M C, CHIANG P F, KUO Y J, et al. Hyaluronan-loaded liposomal dexamethasone-diclofenac nanoparticles for local osteoarthritis treatment[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2) :665.
- [8] HU P Y, YUE P F, ZHENG Q, et al. Pharmacokinetic comparative study of gastrodin after oral administration of gastrodia elata Bl. extract and its compatibility with the different ingredients of ligusticum chuanxiong Hort. to rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 191: 82 – 86.
- [9] ZHANG K, FANG K L, WANG T, et al. Chemical constituents from the rhizome of ligusticum chuanxiong hort. and their Nrf2 inducing activity[J]. Chem Biodivers, 2021, 18(11) :e2100302.
- [10] DONKOR P O, CHEN Y, DING L, et al. Locally and traditionally used ligusticum species—a review of their phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 194: 530 – 548.
- [11] BAI Y, WEI W, YAO C, et al. Advances in the chemical constituents, pharmacological properties and clinical applications of TCM formula Yupingfeng San[J]. Fitoterapia, 2023, 164: 105385.
- [12] HU S, WANG S, HE J, et al. Tetramethylpyrazine alleviates endoplasmic reticulum stress activated apoptosis and related inflammation in chondrocytes[J]. Mol Med Rep, 2022, 25(1) :12.
- [13] ZHANG X, SHI Y, ZHANG Z, et al. Intra-articular delivery of tetramethylpyrazine microspheres with enhanced articular cavity retention for treating osteoarthritis[J]. Asian J Pharm Sci, 2018, 13(3) :229 – 238.
- [14] HUANG Y F, WANG G, DING L, et al. Lactate-upregulated NADPH-dependent NOX4 expression via HCAR1/PI3K pathway contributes to ROS-induced osteoarthritis chondrocyte damage[J]. Redox Biol, 2023, 67: 102867.
- [15] DING D F, XUE Y, WU X C, et al. Recent Advances in reactive oxygen species (ROS)-responsive polyfunctional nanosystems 3.0 for the treatment of osteoarthritis[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 5009 – 5026.
- [16] PARK W H. Effects of antioxidants and MAPK inhibitors on cell death and reactive oxygen species levels in H(2)O(2)-treated human pulmonary fibroblasts[J]. Oncol Lett, 2013, 5(5) :1633 – 1638.
- [17] WU Y, JIA C, LIU W, et al. Sodium citrate targeting Ca(2+)/CAMKK2 pathway exhibits anti-tumor activity through inducing apoptosis and ferroptosis in ovarian cancer[J]. J Adv Res, 2024, 65: 89 – 104.
- [18] ARRA M, SWARNKAR G, KE K, et al. LDHA-mediated ROS generation in chondrocytes is a potential therapeutic target for osteoarthritis[J]. Nat Commun, 2020, 11(1) :3427.
- [19] ISHII T, ITOH K, TAKAHASHI S, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages[J]. J Biol Chem, 2000, 275(21) :16023 – 16029.
- [20] DONG Y, KANG H, PENG R, et al. A clinical-stage Nrf2 activator suppresses osteoclast differentiation via the iron-ornithine axis[J]. Cell Metab, 2024, 36(8) :1679 – 1695.

(收稿日期: 2024-05-14 本文编辑: 李晓乐)

(上接第 20 页)

- [22] WANG X, ZHOU L. The many roles of macrophages in skeletal muscle injury and repair[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 952249.
- [23] MURRAY P J. Macrophage polarization[J]. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 541 – 566.
- [24] 周琦, 孙慧娟, 于栋华, 等. 巨噬细胞 M1/M2 型极化在不同疾病中的作用机制[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11) :1502 – 1506.
- [25] 王馨慧, 王苏童, 吕穆杰, 等. 黄芪桂枝五物汤调节 M1/M2 巨噬细胞改善炎症反应的分子机制研究[J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(6) :801 – 810.
- [26] LUO Z, LIN J, SUN Y, et al. Bone marrow stromal cell-derived exosomes promote muscle healing following contusion through macrophage polarization[J]. Stem Cells Dev, 2021, 30(3) :135 – 148.
- [27] LI J, SUN Z, LUO G, et al. Quercetin attenuates trauma-induced heterotopic ossification by tuning immune cell infiltration and related inflammatory insult[J]. Front Immunol, 2021, 12: 649285.
- [28] SHEN X, SUN C, CHENG Y, et al. cGAS mediates inflammation by polarizing macrophages to M1 phenotype via the mTORC1 pathway[J]. J Immunol, 2023, 210(8) :1098 – 1107.

(收稿日期: 2024-02-23 本文编辑: 郭毅曼)