

青白散对慢性软组织损伤大鼠骨骼肌 I、Ⅲ型胶原蛋白表达的影响

董 静

成都体育学院运动医学系, 四川省成都市一环路西一段 19 号, 610041)

基金项目: 成都体育学院博士建设期专项基金资助项目 (BSZX1051)

通讯方式: cdykyc@163.com, (028)85093297

[摘 要] 目的 观察青白散对慢性软组织损伤大鼠骨骼肌中 I、Ⅲ型胶原蛋白表达的影响以及局部软组织的形态学改变。方法 54 只雄性 SD 大鼠随机分为自然愈合组、云南白药组、青白散组, 每组 18 只。采用慢性软组织损伤动物模型, 分别予以生理盐水 (10ml/kg)、云南白药 (0.18g/kg) 和青白散 (0.54g/kg) 灌胃, 每日 1 次, 连续 14d。给药后第 1 周末、第 2 周末、第 3 周末, 免疫组织化学方法检测大鼠慢性软组织损伤后骨骼肌中 I、Ⅲ型胶原蛋白的表达, 酶联免疫法检测骨骼肌中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 含量的动态变化。结果 青白散组肌肉再生速度、愈合质量显著优于自然愈合组, 在不同时间点的骨骼肌中 TNF- α 和 IL-6 的含量均较自然愈合组显著降低 ($P < 0.01$), I、Ⅲ型胶原蛋白的表达均较自然愈合组显著降低 ($P < 0.01$)。结论 青白散能阻止胶原纤维的过度生成, 降低致炎因子水平, 从而有利于损伤组织的修复。

[关键词] 青白散; 骨骼肌损伤; I 型胶原; Ⅲ型胶原; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6

Effect of Qingbai Powder on the Expression of Collagen-I and Collagen-III in Skeletal Muscle of Chronic Soft Tissue Injury Rats
DONG Jing

(Chengdu Sport University, Sichuan Province 610041)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Qingbai Powder on the expression of collagen-I and collagen-III in skeletal muscle of chronic soft tissue injury (CSTI) rats. **Methods** Fifty-four male SD rats were randomized into naturally healing group, Yunnan Baiyao group and Qingbai Powder group with 18 in each. The CSTI models were established. The naturally healing group, Yunnan Baiyao group and Qingbai Powder group were given 10ml/kg of normal saline, 0.18g/kg of Yunnan Baiyao and 0.54g/kg of Qingbai Powder respectively through gastric feeding once daily for 14 days. At the first, second and third weekend after the administration, the expression of Collagen-I and collagen-III in skeletal muscle of CSTI rats was detected by immunohistochemistry method, and the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by euzymelinked immunosorbent assay. **Results** Comparing with the naturally healing group, the speed of muscle regeneration and healing quality in the Qingbai Powder group promoted significantly. In the Qingbai Powder group, the contents of TNF- α and IL-6 and the expression of collagen-I and collagen-III were significantly decreased in comparing with those of the naturally healing group. **Conclusion** Qingbai Powder could inhibit the hyperplasy of collagen fibers, decrease the level of inflammatory factor and promote the reparation of injury issue.

Keywords Qingbai Powder; skeletal muscle injury; collagen-I; collagen-III; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6

软组织损伤是人们在体育锻炼和运动训练中常见损伤之一, 其发生率较高。由于伤后炎症反应期长, 愈合质量差, 易形成肌肉组织的血肿和修复性瘢痕, 降低了肌肉收缩性能, 使肌肉再损伤概率增加。青白散由三七、当归、白芷等制成, 为我院已故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, 对治疗慢性软组织损伤效果显著, 对治疗运动损伤起了重要作用^[1]。本研究旨在观察青白散对大鼠慢性软组织损伤修复的影响并探讨其机理。

1 材料与方

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 54 只, 雄性, 体重 180~210g,

购于四川大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(川) 2008-10。

1.2 药物和试剂

青白散由三七、当归、白术、白芍和白芷组成, 各等份, 共研细末, 1g 微粉等于 1g 原生药, 批号 20100303, 由成都体育学院附属医院药厂提供; 云南白药粉, 云南白药集团股份有限公司, 批号 20100430; I 型胶原蛋白 (Collagen-I)、Ⅲ型胶原蛋白 (Collagen-III) 免疫组化抗体试剂盒 (Santa Cruz, 批号: 201003); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 酶联免疫试剂盒 (R&D, 批号: 201004)。

1.3 主要仪器

Mias-2000 图形分析系统(四川大学电子信息学院图像信息研究所);全自动多功能酶标仪(Well-scan MK3 型,北京炳洋科技有限公司)。

1.4 模型制备

参照 Kami 等^[2]机械冲击挫伤的造模方法,将大鼠后肢置于伸膝、踝背屈 90°位,采用重物高空垂直下落造成打击伤,损伤部位为大鼠右下肢腓肠肌内侧。打击物质量为 335g,从 80cm 高空垂直下落,动能为 2.63J,打击面积为 1cm²,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%。不作任何处理,正常饲养,经过 14d 形成慢性软组织损伤动物模型^[3-4]。

1.5 给药与分组

将大鼠随机分为 3 大组:自然愈合组、云南白药组及青白散组,每组 18 只。依据不同的观察时间点,每组再分 3 小组(给药后 1 周末、2 周末、3 周末,每小组 6 只)。大鼠在造模成功后即开始给药,每日灌胃 1 次,云南白药组 0.18g/kg,青白散组 0.54g/kg,自然愈合组应用等容量生理盐水 10ml/kg,连续 14 天。

1.6 指标检测

在各时间点,每组随机选取 6 只处死,以打击部位为中心,沿损伤处切取肌肉组织,进行石蜡切片,HE 染色并在光学显微镜下观察组织学形态;采用酶联免疫法检测骨骼肌 TNF- α 和 IL-6 的含量;免疫组织化学检测骨骼肌 Collagen-I、Ⅲ型胶原蛋白

的表达。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计分析软件,计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 光镜下组织学观察结果

表 1 示,软组织损伤自然修复过程中,青白散组和云南白药组炎症细胞浸润现象较自然愈合组少见,肌纤维变性坏死均较自然愈合组轻,再生肌纤维的排列比自然愈合组更加规整,表明青白散组和云南白药组肌肉再生速度、愈合质量优于自然愈合组,损伤局部炎症反应及组织损伤程度明显减轻。

2.2 各组大鼠损伤骨骼肌中 TNF- α 与 IL-6 含量比较

表 2、表 3 示,青白散组和云南白药组大鼠损伤骨骼肌中 TNF- α 与 IL-6 的含量均明显低于自然愈合组($P<0.01$),两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠损伤骨骼肌中 Collagen-I 与 Collagen-Ⅲ蛋白表达

将染色后的切片拍照(放大倍数为 $\times 200$),采用 Mias-2000 图形分析系统对相同平面的切片进行分析。表 4、5 示,青白散组和云南白药组大鼠损伤骨骼肌中 Collagen-I 与 Collagen-Ⅲ蛋白表达水平均明显低于自然愈合组($P<0.01$),两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠给药后不同时间组织学观察结果

组别	1 周末	2 周末	3 周末
自然愈合组	肌纤维变性坏死较重,结缔组织呈斑块状修复	大片脂肪组织中残留少量孤岛状肌纤维,再生肌纤维排列方向紊乱	肌纤维变性坏死呈局灶状,再生肌纤维排列方向比较紊乱,有较多胶原纤维,可见疤痕灶
云南白药组	肌纤维损伤重,残留肌组织与新生结缔组织相间排列,炎细胞浸润	肌纤维变性坏死重,肌索周围可见纤维母细胞、结缔组织增生,小血管、毛细血管增生充血,炎症细胞浸润	肌纤维变性坏死,孤岛状,炎症反应轻,再生肌纤维排列比较整齐,基本未见胶原瘢痕。
青白散组	肌纤维广泛变性坏死,残留肌组织与新生结缔组织相间排列,炎细胞浸润	肌纤维变性坏死较重,肌索周围可见纤维母细胞、结缔组织增生,小血管、毛细血管增生充血,炎症细胞浸润	肌纤维变性坏死较轻,小灶状,炎症反应轻,再生肌纤维排列比较整齐,基本未见胶原瘢痕。

表 2 各组大鼠给药后不同时间慢性损伤骨骼肌 TNF- α 含量比较(ng/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	剂量(g/kg)	1 周末	2 周末	3 周末
自然愈合组	6	—	130.26 $\pm$ 22.80	229.56 $\pm$ 39.85	261.82 $\pm$ 43.67
云南白药组	6	0.18	73.16 $\pm$ 20.02*	50.84 $\pm$ 16.67*	45.24 $\pm$ 15.77*
青白散组	6	0.54	88.72 $\pm$ 24.75*	79.96 $\pm$ 34.20*	72.06 $\pm$ 33.30*

注:与自然愈合组比较, * $P<0.01$

表 3 各组给药后不同时间大鼠慢性损伤骨骼肌 IL-6 含量比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量 (g/kg)	1 周末	2 周末	3 周末
自然愈合组	6	—	167.71 ± 14.10	102.09 ± 13.27	107.77 ± 29.57
云南白药组	6	0.18	104.66 ± 14.22*	66.18 ± 18.44*	43.04 ± 23.75*
青白散组	6	0.54	97.78 ± 11.72*	66.96 ± 11.94*	55.88 ± 11.21*

注:与自然愈合组比较, * $P < 0.01$ 表 4 各组大鼠给药后不同时间损伤骨骼肌 Collagen-I 蛋白表达 [积分光密度值 ($\times 10^3$), $\bar{x} \pm s$]

组别	鼠数	剂量 (g/kg)	1 周末	2 周末	3 周末
自然愈合组	6	—	4.754 ± 0.603	5.144 ± 0.559	5.074 ± 0.548
云南白药组	6	0.18	3.171 ± 0.663*	2.928 ± 0.511*	2.858 ± 0.441*
青白散组	6	0.54	3.152 ± 0.768*	2.983 ± 0.571*	2.795 ± 0.430*

注:与自然愈合组比较, * $P < 0.01$ 表 5 各组大鼠给药后不同时间损伤骨骼肌 Collagen-III 蛋白表达 [积分光密度值 ($\times 10^3$), $\bar{x} \pm s$]

组别	鼠数	剂量 (g/kg)	1 周末	2 周末	3 周末
自然愈合组	6	—	6.743 ± 0.462	6.249 ± 0.478	6.037 ± 0.416
云南白药组	6	0.18	5.420 ± 0.409*	4.843 ± 0.328*	4.334 ± 0.386*
青白散组	6	0.54	5.227 ± 0.402*	4.582 ± 0.440*	4.235 ± 0.385*

注:与自然愈合组比较, * $P < 0.01$

3 讨论

创伤可激活体内单核/巨噬细胞系统,分泌 IL-6、TNF- α 等多种细胞因子,这些细胞因子在调控机体免疫和机体炎症反应中起重要作用^[5]。I、III 型胶原是肌肉组织中的主要胶原,主要存在于肌外膜、肌束膜、肌内膜处^[6]。在肌肉严重损伤时,较高水平的 IL-6 和 TNF- α 诱导大量肉芽成纤维细胞增生,细胞外基质成分合成也明显增加。成纤维细胞的迅速增殖能导致疤痕组织(主要由胶原蛋白组成)的过度形成,后者形成机械屏障而阻碍损伤区域肌肉的完全再生^[7]。

青白散以活血化瘀止痛之药为主,辅以补气益血、祛风燥湿之药;方中以祛瘀止血,活血定痛的三七为君;当归、白芍、白术补血、活血止痛为臣;佐以祛风除湿、舒筋活络的白芷。研究表明,当归能明显降低创面组织内成纤维细胞数量及胶原含量,明显减轻瘢痕纤维化^[8];三七具有止血活血及抗纤维化作用^[9]。本研究结果表明,青白散可抑制骨骼肌损伤后 Collagen-I、Collagen-III 的过度表达,从而阻止了损伤肌组织中的瘢痕形成。其机制可能与青白散降低致炎因子水平有关。

骨骼肌损伤后的修复涉及到骨骼肌再生与胶原纤维修复两个过程,这两个过程相互支持同时又相互竞争制约,共同影响骨骼肌损伤后修复的质量^[7]。因此,还需了解和分析青白散对肌肉损伤修复过程

中骨骼肌再生及其与胶原纤维修复相互的影响。

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,2009:120.
- [2] Kami K, Masuhara M, Kashiba H, et al. Changes of vinculin and extracellular matrix components following blunt trauma to rat skeletal muscle[J]. Med Sci Sports Exerc, 1993,25(7):832—840.
- [3] 吴峻,沈蓉蓉. 火针治疗慢性软组织损伤的实验研究[J]. 中国针灸,2002,22(1):31.
- [4] 董静,叶锐彬,钟睿. 伤科止痛膏抗炎作用及对损伤组织 PGE2 含量的影响[J]. 中药药理与临床,2010,26(4):52—54.
- [5] Pape HC, van Griensven M, Rice J, et al. Major secondary surgery in blunt trauma patients and perioperative cytokine liberation; determination of the clinical relevance of biochemical markers[J]. J Trauma, 2001,50(6):989—1000.
- [6] Bailey AJ. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues[J]. Mech Ageing Dev, 2001,122(7):735—755.
- [7] 朱文辉,陈世益. 肌球蛋白重链及 I、III 型胶原在骨骼肌损伤修复中的作用[J]. 中国运动医学杂志,2002,21(2):179—182.
- [8] 王刚,杜士明,杨光义,等. 当归多糖对表皮细胞促创面愈合的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):150—154.
- [9] 徐泉,周卫,孔焕宇,等. 三七透明质酸钠凝胶对家兔椎板切除术后硬膜外瘢痕中胶原成分的影响[J]. 中国骨伤,2010,23(4):278—281.

(收稿日期:2011-03-10;修回日期:2011-11-08)

[编辑:行之]