

# 二黄新伤凝胶膏治疗大鼠急性软组织损伤的效果研究

肖鹏<sup>1</sup> 刘显东<sup>1△</sup> 徐强<sup>1</sup> 秦天芝<sup>1</sup> 李胜吾<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究二黄新伤凝胶膏对急性软组织损伤疗效及作用机制。方法:“定量化重力打击法”造 SD 大鼠急性闭合性软组织损伤模型后,分别用二黄新伤凝胶膏(C 组)、二黄新伤止痛软膏(D 组)和云南白药膏(E 组)治疗。进行临床评分及组织病理学观察;检测用药第 1,4,7 天,大鼠血清 IL-1 $\beta$  和 bFGF 含量及对应 mRNA 在损伤部位新生肌肉中的表达。结果:二黄新伤凝胶膏可有效修复造模后的组织损伤;用药第 4 天,C,D 及 E 组大鼠血清 IL-1 $\beta$  含量及 C 和 E 组肌肉 IL-1 $\beta$  mRNA 表达水平均明显低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),C,D 及 E 组的大鼠血清 bFGF 含量及 C 和 E 组 bFGF mRNA 表达水平明显高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:二黄新伤凝胶膏能修复大鼠急性软组织损伤,改善炎症因子和损伤修复因子。

**[关键词]** 急性软组织损伤;二黄新伤凝胶膏;白介素-1 $\beta$ ;碱性成纤维细胞生长因子;大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)11-0013-04

## Effect of Erhuang Xinshang Gel on Acute Injury of Soft Tissue in Rats

XIAO Peng<sup>1</sup> LIU Xiandong<sup>1△</sup> XU Qiang<sup>1</sup> QIN Tianzhi<sup>1</sup> LI Shengwu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sichuan Provincial Orthopedic Hospital, Chengdu 610041, China.

**Abstract Objective:** To investigate the therapeutic effect and mechanism of Erhuang Xinshang gel in the treatment of acute injury of soft tissue. **Methods:** The closed acute injury of soft tissue model of SD rats was established by “quantitative gravity strike method” and then treated with Erhuang Xinshang gel (Group C), Erhuang Xinshang Zhitong ointment (Group D) and Yunnan Baiyao cream (Group E), respectively. The wound healing process and histopathology were monitored and the levels of IL-1 $\beta$  and bFGF in serum were detected by ELISA method, and the expression of IL-1 $\beta$  and bFGF mRNA in tissues were detected by RT-PCR method. **Results:** Clinical and histopathological observation showed that Erhuang Xinshang gel was effective on tissue repairing. On the 4th day of treatment, the serum IL-1 $\beta$  levels in group C, D and E group and IL-1 $\beta$  mRNA expression in group C and E group were significantly lower than those in model group ( $P<0.05$ ), and the serum bFGF levels in group C, D and E group and the expression of bFGF mRNA in group C and E group were significantly higher than those in model group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Erhuang Xinshang gel can repair acute injury of soft tissue, improve inflammatory and damage repair factors in rats.

**Keywords:** acute soft tissue injury; Erhuang Xinshang gel; IL-1 $\beta$ ; bFGF; rat

急性闭合性软组织损伤临床主要表现为肿胀、疼痛、青紫瘀斑以及功能障碍等,属于“伤筋”范畴,是骨伤科常见多发病<sup>[1]</sup>。本文研究的二黄新伤凝胶膏是在

原剂型二黄新伤止痛软膏基础上研发的新剂型,后者也是四川省骨科医院郑氏伤科中药制剂中治疗急性软组织损伤的代表性药物。临床运用多年,疗效显著,但偶有过敏反应,因此开发凝胶膏新剂型。该凝胶膏在前期应用中发现,其临床疗效与原剂型不相上下,但过敏人群数量却大大减少<sup>[2]</sup>。为了给后期临床大规模推广提供科研依据,开展本课题实验,研究该凝胶膏的作用效果及机制。

基金项目:2016 年度四川省中医药管理局常规专项课题  
(2016C044)

<sup>1</sup> 四川省骨科医院(成都,610041)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:liuxiandong@163.com

通过研究该药物在局部炎症反应和局部组织修复过程中的分子作用机制,有助于后续研究该药物对炎症因子介导通路调控机制;同时通过对新、老两种剂型的疗效比较,为治疗软组织损伤的新药物开发及剂型改良研究与应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验动物

SD 清洁级大鼠 90 只,雌雄各半,(190±10)g,购于成都中医药大学实验动物研究中心。

1.2 药物

二黄新伤凝胶膏、二黄新伤止痛软膏(川药制字 Z20080021),均由四川省骨科医院提供;云南白药膏(国药准字 Z20073015),购于云南白药公司。

1.3 试验方法及步骤

1.3.1 急性软组织损伤大鼠模型 采用“量化重力打击法”造模<sup>[3]</sup>。将大鼠腹腔注射麻醉后,右侧卧位,左大腿中段放于击平台上,扣及大鼠左股骨中段后,将髓内钉打拔器的尾端面紧贴股骨中段外侧皮肤约 1.0 cm 范围内,使用击打装置,以 1.4 kg 打拔锤从 15 cm 高度击打大腿中段外侧软组织。

验证造模成功的方法:造模后 1 h 观察打击部位皮下出现出血点或瘀斑(局部皮肤无破损),局部软组织肿胀,触诊观察,无骨折和脱位体征,苏醒后患肢跛行,如满足以上条件则表明造模成功。

1.3.2 试验分组 大鼠随机分为 5 组,每组 18 只,雌雄各半。A 组为空白对照;B 组为模型组;C、D 及 E 组成功造模后,分别采用二黄新伤凝胶膏、二黄新伤止痛软膏和云南白药膏治疗;先将药物涂擦于纱布绷带上,再将绷带覆盖患处并使用胶布缠绕加强固定,造模当日开始用药,1 次/d,每次 12 h,连续 7 d。A 和 B 组参照给药组操作,采用凡士林纱布进行假治疗。

1.3.3 临床观察 试验期间,每日观察各组大鼠打击部位处临床症状。参考覃博等<sup>[4]</sup>的软组织损伤治疗观察评分标准(见表 1),统计造模后未用药(0 d)及用药第 1、4、7 天各组大鼠分数。

表 1 软组织损伤评分标准

症状表现	0 分	1 分	2 分
皮下淤血	无瘀血	少量点状	大量块状
肌肉肿胀	无肿胀	轻微肿胀	肿胀明显
肌肉色泽	颜色正常	暗红浅色	暗紫深色

1.3.4 血清指标检测 于用药第 1、4、7 天,各组随机取 3 只雌性大鼠、3 只雄性大鼠,分别腹主动脉取血 2 mL,分离血清。ELISA 试剂盒(上海鑫乐),检测大鼠血清 IL-1 $\beta$  和 bFGF 含量。

1.3.5 肌肉组织 RT-PCR 检测 于用药第 1、4、7 天,以脱颈椎的方法将上节中用于采血的大鼠处死。以打击部位为中心,沿损伤组织边缘切取患处新鲜肌肉组织约 100 mg,TRIZOL(Invitrogen)提取大鼠总 RNA,检测 A260 和 A280 吸光度值,电泳确定 RNA 的完整性后,按照 PrimeScript RT reagent Kit(大连宝生物)说明书合成 cDNA 第一链。设计 IL-1 $\beta$  及 bFGF 上下游引物,以  $\beta$ -actin 作为内参基因,按照 SYBR Premix Ex Taq II Kit(大连宝生物)说明书,检测肌肉组织 IL-1 $\beta$  和 bFGF 表达情况。

1.3.6 病理组织学观察 用药第 4 天,以打击部位为中心,取损伤组织边缘处新鲜肌肉组织,10%甲醛固定,按常规方法制备石蜡切片,苏木精-伊红染色,镜检观察组织病理形态学改变。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 20.0 统计软件对所得数据进行统计处理,所有计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示。相同时间点组间比较采用单因素方差分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 软组织损伤临床治疗评分

造模后,大鼠打击部位皮肤肿胀,皮下可见出血点或瘀血,肌肉色泽由暗红逐渐至暗紫色。眼观大鼠患肢可出现跛行。用药至第 4 天时,药物组大鼠损伤已明显恢复,3 种药物评分均明显低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),至第 7 天,肿胀基本消退,各组差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠软组织损伤临床治疗评分( $\bar{x}\pm s$ )

组别	第 0 天( $n=18$ )	第 1 天( $n=18$ )	第 4 天( $n=12$ )	第 7 天( $n=6$ )
A	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
B	5.56±0.61 <sup>b</sup>	5.28±0.67 <sup>b</sup>	2.67±0.49 <sup>b</sup>	0.50±0.55
C	5.56±0.51 <sup>b</sup>	5.06±0.64 <sup>b</sup>	1.83±0.94 <sup>c</sup>	0.17±0.41
D	5.67±0.69 <sup>b</sup>	5.17±0.62 <sup>b</sup>	2.00±0.43 <sup>c</sup>	0.17±0.41
E	5.50±0.51 <sup>b</sup>	5.17±0.51 <sup>b</sup>	2.08±0.67 <sup>c</sup>	0.33±0.52
F	406.062	320.007	34.952	1.204
P	<0.01	<0.01	<0.01	0.033

注:同列数据上标不同字母差异有统计学意义( $P<0.05$ ),相同字母或者无字母表示差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.2 组织病理学检查

用药第 4 天,A 组肌肉组织的肌纤维束形态结构正常,无明显组织病理学改变;B 组可见大量的肌纤维变性、坏死断裂,同时炎性细胞浸润,伴有少量纤维组织增生;C 组肌纤维轻度水肿、血管扩张充血,毛细血

管增生,仅见散在嗜中性白细胞等炎性细胞浸润,较模型组有明显改善;D 组和 E 组肌纤维轻度或中度水肿,少量肌纤维变性坏死、断裂,可见少量炎性细胞浸润,毛细血管增生散在,较模型组肌肉损伤仍明显改善,见图 1.

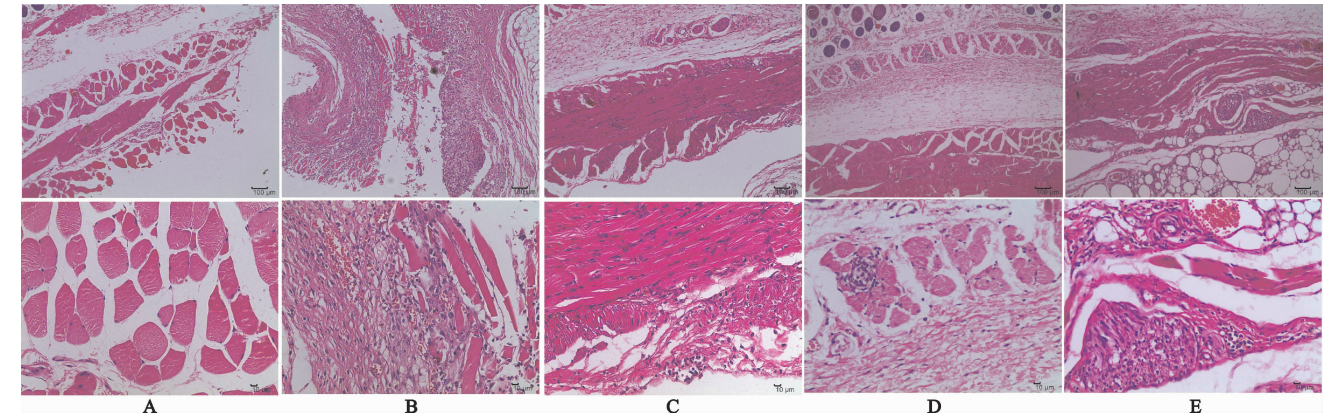


图 1 用药第 4 天各组肌肉组织病理变化(苏木精-伊红染色,100×(第一行) 400×(第二行))

2.3 IL-1β 和 bFGF 的血清含量及组织 mRNA 表达变化

用药第 4 天,C,D 及 E 组大鼠血清 IL-1β 含量及 C 和 E 组肌肉 IL-1β mRNA 表达水平均明显低于模

型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );C,D 及 E 组的大鼠血清 bFGF 含量及 C 和 E 组 bFGF mRNA 表达水平明显高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3.

表 3 IL-1β 和 bFGF 血清含量及组织 mRNA 水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

时刻	<i>n</i>	组别	IL-1β(ng/L)	bFGF(ng/mL)	IL-1β mRNA	bFGF mRNA
第 1 天	6	A	28.85±3.69 <sup>a</sup>	0.88±0.05	1.02±0.21 <sup>a</sup>	1.01±0.13 <sup>a</sup>
		B	55.34±4.98 <sup>b</sup>	0.93±0.08	1.79±0.27 <sup>b</sup>	1.31±0.40 <sup>ab</sup>
		C	50.46±3.72 <sup>b</sup>	1.03±0.06	1.53±0.23 <sup>b</sup>	1.68±0.46 <sup>b</sup>
		D	49.87±5.83 <sup>b</sup>	0.99±0.23	1.97±0.71 <sup>b</sup>	1.27±0.52 <sup>ab</sup>
		E	50.85±5.43 <sup>b</sup>	1.01±0.26	1.70±0.15 <sup>b</sup>	1.66±0.47 <sup>b</sup>
		<i>F</i>	28.110	0.907	5.628	2.798
第 4 天	6	<i>P</i>	<0.01	0.475	<0.01	0.048
		A	28.52±1.90 <sup>a</sup>	0.82±0.02 <sup>a</sup>	1.24±0.17 <sup>a</sup>	1.26±0.33 <sup>ab</sup>
		B	49.33±6.15 <sup>b</sup>	0.98±0.04 <sup>b</sup>	1.84±0.19 <sup>b</sup>	1.13±0.15 <sup>a</sup>
		C	37.30±3.01 <sup>c</sup>	1.15±0.11 <sup>c</sup>	1.48±0.20 <sup>c</sup>	1.66±0.39 <sup>bd</sup>
		D	38.57±1.68 <sup>c</sup>	1.18±0.07 <sup>c</sup>	1.52±0.20 <sup>bd</sup>	1.40±0.42 <sup>ad</sup>
		E	38.05±2.36 <sup>c</sup>	1.14±0.15 <sup>c</sup>	1.60±0.22 <sup>cd</sup>	1.78±0.41 <sup>cd</sup>
第 7 天	6	<i>F</i>	27.764	17.004	10.559	3.456
		<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.022
		A	27.22±2.89 <sup>a</sup>	0.85±0.12 <sup>a</sup>	1.12±0.13 <sup>a</sup>	1.21±0.28 <sup>ab</sup>
		B	42.66±5.30 <sup>b</sup>	1.14±0.18 <sup>b</sup>	1.73±0.46 <sup>b</sup>	1.20±0.27 <sup>a</sup>
		C	35.47±2.74 <sup>c</sup>	1.23±0.06 <sup>b</sup>	1.57±0.35 <sup>b</sup>	1.40±0.13 <sup>ab</sup>
		D	36.24±2.57 <sup>c</sup>	1.22±0.32 <sup>b</sup>	1.53±0.02 <sup>b</sup>	1.43±0.11 <sup>ab</sup>
第 7 天	6	E	35.79±2.42 <sup>c</sup>	1.18±0.04 <sup>b</sup>	1.65±0.03 <sup>b</sup>	1.46±0.23 <sup>b</sup>
		<i>F</i>	15.992	4.741	4.835	2.004
		<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.125

注:同一时间点的同列上标不同字母表示差异有统计学意义( $P<0.05$ ),相同字母或者无字母表示差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

3 讨论

二黄新伤凝胶膏临床用于治疗闭合性软组织损伤,改善红、肿、疼等症状。“二黄”指黄柏和大黄。黄柏具有抗菌、抗炎、抗病毒、免疫抑制等作用<sup>[5,6]</sup>,外用

治疗湿疹、软组织损伤、新生儿脓疱疹、创面术后愈合护理、关节扭伤等<sup>[7-9]</sup>。大黄具有清热解毒、凉血止血和活血化瘀<sup>[10,11]</sup>的药理作用,可治疗皮肤病。二黄新伤凝胶膏除了“二黄”,还有延胡索、赤芍、白芷、独活等

成分,辅料为甘油、海藻酸钠,整个复方具有清热消肿、祛风除湿、温散瘀血、暖筋散寒、消炎止痛等功效。本文首先建立急性软组织损伤大鼠模型,再药物治疗,考察用药后,大鼠血清 IL-1 $\beta$  和 bFGF 含量及对应 mRNA 在损伤部位新生肌肉中的表达。IL-1 $\beta$  是重要的炎性因子,主要由活化的巨噬细胞产生<sup>[12,13]</sup>。试验结果表明,用药第 4 天,3 个药物组大鼠血清 IL-1 $\beta$  含量以及二黄新伤凝胶膏和云南白药膏组肌肉 IL-1 $\beta$  mRNA 表达水平均明显低于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),表明三种药物均可明显减轻大鼠急性软组织损伤所致的炎性反应。bFGF 一种多功能的非特异性活性物质。bFGF 和细胞外基质成分及其他调节因子等均能促进 DNA 合成和促细胞分裂的作用,可以促进创伤修复<sup>[14,15]</sup>。在炎症的急性期,bFGF 一方面通过趋化作用诱导炎症细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞等向受损部位聚集并向血管外移动,增加血管通透性,改变血液流变学,激活巨噬细胞,吞噬局部坏死组织,降低受损组织感染几率;另一方面 bFGF 可诱发毛细血管新生,改善微循环,从而保障局部组织修复部位有充足的营养物质<sup>[16,17]</sup>。试验结果表明,用药第 4 天,3 个药物组大鼠血清 bFGF 含量及二黄新伤凝胶膏和云南白药膏组肌肉 bFGF mRNA 表达水平明显高于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),表明三种药物均可以明显提升机体 bFGF 的蛋白及核酸水平的表达,均可促进细胞微循环改善和局部损伤组织的修复。

本研究还从组织病理角度,考察了二黄新伤凝胶膏对损伤组织的修复作用。结果表明,用药第 4 天时,二黄新伤凝胶膏组的肌纤维轻度水肿、血管扩张充血,毛细血管增生,仅见散在嗜中性白细胞等炎性细胞浸润,较模型组有明显改善。与临观察评分一致,肯定了二黄新伤凝胶膏具有对损伤组织的修复功能。

综上所述,二黄新伤凝胶膏对于软组织损伤炎性因子具有明显抑制作用,同时可通过提升机体 bFGF 含量,促进损伤组织修复。结合临床及组织病理学考察,二黄新伤凝胶膏对大鼠急性软组织损伤具有良好治疗效果,本研究为临床应用提供科研基础。

## 参考文献

- [1] 胡超伟.超微针刀疗法[M].武汉:湖北科学技术出版社,2014.
- [2] 朱力阳,傅超美,罗妮妮,等.二黄新伤止痛凝胶膏剂与软膏剂体外透皮特性比较研究[J].时珍国医国药,2015(6):1374-1376.
- [3] 黄大祥.“损伤血瘀证”大鼠血清 TNF 家族调控骨骼肌凋亡研究[D].成都:成都中医药大学,2016.

- [4] 覃博,韦葛谨,潘小清.接活跌打膏对急性软组织损伤大鼠的影响及机制研究[J].中药药理与临床,2016,32(3):140-143.
- [5] 孙森凤,张颖颖,褚万春.黄柏药理作用的研究进展[J].山东化工,2017,46(14):99-100.
- [6] Fujii A, Okuyama T, Wakame K, et al. Identification of anti-inflammatory constituents in Phellodendri Cortex and Coptidis Rhizoma by monitoring the suppression of nitric oxide production[J]. Journal of Natural Medicines, 2017, 71(4):745-756.
- [7] 姚俊,赵霞.复方黄柏液最新临床应用进展[J].中国新药杂志,2014,23(3):308-312.
- [8] 白克运,谷超.复方黄柏液涂剂湿敷治疗湿热下注型肛门湿疹的临床观察[J].中国新药杂志,2017,26(23):2830-2833.
- [9] 张宏伟,王嘉琪,张婕,等.盐炙关黄柏拆分组分对佐剂型关节炎大鼠的影响研究[J].时珍国医国药,2017,28(7):1577-1580.
- [10] 颜永刚,王红艳,尹立敏,等.基于响应曲面分析法的不同配比桃仁-大黄活血化瘀效应相互作用研究[J].中草药,2017,48(17):3560-3567.
- [11] 张芳,孙丽霞.浅析“退黄以大黄为专功”[J].环球中医药,2016,9(4):450-452.
- [12] 曾乐,刘毅,熊华章,等.金骨莲胶囊对兔膝关节骨关节炎保护作用的实验研究[J].中国中医骨伤科杂志,2016,24(7):7-11.
- [13] D Sollazzo, D Forte, N Polverelli, et al. Abstract 4077: Crucial factors of the inflammatory microenvironment(IL-1 $\beta$ /TNF- $\alpha$ /TIMP-1) promote the selection of highly malignant hemopoietic clone of myelofibrosis[J]. Cancer Research, 2016, 76(14 Supplement):4077.
- [14] 王恒树,张冲,刘玉杰.碱性成纤维细胞生长因子对大鼠肩袖撕裂重建术后早期腱-骨界面愈合的影响[J].广东医学,2016,37(4):486-488.
- [15] Laplante P, Brillantmarquis F, Brissette MJ, et al. MFG-E8 reprogramming of macrophages promotes wound healing by increased bFGF production and fibroblast functions[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2017, 137(9):2005.
- [16] R Li, H Wu, J Xie, et al. Syndecan-4 regulates the bFGF-induced chemotactic migration of endothelial cells[J]. Journal of Molecular Histology, 2016, 47(5):1-7.
- [17] Wu J, Zhu J, He C, et al. Comparative study of heparin-poloxamer hydrogel modified bFGF and aFGF for in vivo wound healing efficiency[J]. Acs Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(29):18710-18712.

(收稿日期:2018-06-08)