

# 三七总皂苷对大鼠骨骼肌损伤后纤维瘢痕和血清前列腺素 E2 的影响

郑成<sup>1</sup> 王轩<sup>2</sup> 沈亚南<sup>3</sup> 王阳<sup>4</sup> 王广兰<sup>5△</sup>

**[摘要]** 目的:探讨大鼠骨骼肌急性钝挫伤后,应用三七总皂苷对肌组织纤维瘢痕形成和血清中前列腺素 E2 含量的影响。方法:78 只雄性 SD 大鼠,其中 72 只左侧腓肠肌中段建立钝挫伤模型后随机分为药物组和对照组(各 36 只),另 6 只不做处理(标记为空白组);药物组动物模型建立后即刻在损伤部位皮下注射三七总皂苷 100 mg/kg,对照组注射等量生理盐水,每 2 d 注射 1 次,直至损伤后的第 14 天。药物组和对照组在损伤后即刻及第 4,7,14,28 和 42 天收取标本,空白组在第 42 天时取材。采用 Masson 染色观察肌肉损伤处纤维瘢痕的形成,利用 Image pro plus 6.0 软件计算瘢痕的面积,并对大鼠血清 PGE2 的含量进行检测。结果:药物组纤维瘢痕面积在各时间点均明显小于生理盐水对照组;药物组血清 PGE2 含量的下降速度较对照组要快,至第 7 天及第 14 天明显少于生理盐水对照组。结论:三七总皂苷通过减少大鼠骨骼肌修复过程中纤维瘢痕面积的形成,同时降低血清 PGE2 的含量,可能起到抗炎镇痛的作用,从而提高大鼠骨骼肌损伤后修复的质量。

**[关键词]** 骨骼肌;急性钝挫伤;三七总皂苷;前列腺素 E2

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2019)09-0007-04

## The Effects of Panax Notoginseng Saponins Injection on Muscle Fiber Scar, Serum PGE2 in a Rat Skeletal Muscle Injury Model

ZHENG Cheng<sup>1</sup> WANG Xuan<sup>2</sup> SHEN Yanan<sup>3</sup> WANG Yang<sup>4</sup> WANG Guanglan<sup>5△</sup>

<sup>1</sup> Hospital of Wuhan Sports University, Wuhan 430079, China;

<sup>2</sup> Hubei Institute of Sports Science, Wuhan 430205, China;

<sup>3</sup> Department of Rehabilitation Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

<sup>4</sup> Graduate School, Wuhan Sports University, Wuhan 430079, China;

<sup>5</sup> College of Health Science, Wuhan Sports University, Wuhan 430079, China.

**Abstract Objective:** The aim of this study was to investigate the effects of Panax notoginseng saponins on muscle fiber scar, serum prostaglandin E2 (PGE2) after acute blunt trauma in rat skeletal muscle. **Methods:** 78 male Sprague-Dawley rats, 72 of which had a model of blunt contusion in the middle of the left gastrocnemius muscle, were randomly divided into a drug group and a control group, and the other 6 were not treated and they were marked as a blank group. After the establishment of the animal model of the drug group, the Panax notoginseng saponin injection was injected subcutaneously at the injury site immediately 100 mg/kg, and the control group was injected with the same amount of normal saline, once every 2 d until the 14th day after the injury. The drug group and the control group received the specimen immediately after the injury, 4, 7, 14, 28, and 42 d, and the blank group was taken at the 42 d. Masson staining was used to observe the formation of fibrous scars in muscle lesions. The area of scar was calculated by Image pro plus 6.0 software, and the serum PGE2 was detected. **Results:** The scar area of the drug group was significantly smaller than that of control group. The rate of descent of serum PGE2 in drug group was faster than that of control group, and obviously less than that of

control group at day 7 and day 14. **Conclusion:** Panax notoginseng saponins can reduce the formation of scar area in the repair process after skeletal muscle injury in a rat model, and may play an anti-inflammatory and analgesic role by reducing the content of serum PGE2, thereby improving the quality of repair after skeletal muscle injury in rats.

**Keywords:** skeletal muscle; contusion; panax notoginseng saponins; prostaglandin E2

基金项目:武汉体育学院青年教师科研基金项目(2017Z02)

<sup>1</sup> 武汉体育学院医院(武汉,430079)

<sup>2</sup> 湖北省体育科学研究所

<sup>3</sup> 中南大学湘雅医院康复医学科

<sup>4</sup> 武汉体育学院研究生院

<sup>5</sup> 武汉体育学院健康科学学院

△通信作者 E-mail:1608175918@qq.com

骨骼肌损伤是肌骨系统常见的损伤,并且给日常生活造成极大的困扰<sup>[1-3]</sup>,其损伤后的修复主要是纤维瘢痕修复,严重影响其收缩及柔韧性等生理功能<sup>[4,5]</sup>。有关传统中医药促进骨骼肌损伤修复的研究发现,活血生肌类中药能够减轻炎症反应,减少损伤后的愈合时间,从而提高愈合质量<sup>[6-8]</sup>,但相关机制仍不明确。三七总皂苷被认为具有免疫调节作用及抗炎镇痛作用<sup>[9,10]</sup>。本研究利用大鼠骨骼肌急性钝挫伤模型,采用三七总皂苷局部皮下注射干预,通过观察肌组织纤维瘢痕的形成和血清中前列腺素 E2 (Prostaglandin E2, PGE2) 含量的变化,探讨三七总皂苷对大鼠骨骼肌损伤后修复的作用效果,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

78 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 250 g 左右,购于湖北省实验动物中心,实验动物许可证号为 SCXX(鄂)2008-0005。按实验标准环境分笼饲养,自由饮水摄食。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 大鼠骨骼肌钝挫伤模型的建立** 动物模型建模方法参考 Kami 等<sup>[11]</sup>和张键等<sup>[12]</sup>的大鼠骨骼肌钝挫伤造模方法,按 50 mg/kg 标准,腹腔注射戊巴比妥钠将大鼠麻醉。再把大鼠仰卧,后肢伸膝,踝背屈 90° 位固定,打击物质量 370 g,从固定高度 66 cm 落下自制打击器(打击面积约 0.75 cm<sup>2</sup>)。打击部位为大鼠左后肢,腓肠肌肌腹中间内侧(打击损伤处取中心点标记,标记于跟骨距离约 1.15 cm,打击动能为 2.39 J)。模拟人体骨骼肌急性钝挫伤过程,重物下落使大鼠腓肠肌遭受打击,损伤局部皮肤没有破裂,打击损伤造模的实验大鼠置于鼠笼中,发现实验大鼠跛行明显。造模后将大鼠的颈椎进行脱位处理,取材过程看到大鼠腿部受打击部位的腓肠肌中端有明显的淤血,说明急性钝挫伤造模成功。

**1.2.2 实验分组** 记录实验 SD 雄性大鼠体质量。用记号笔标记为 1 至 78 号,随机分为药物组、对照组和空白组。药物组为三七总皂苷注射液组(36 只),对照组为生理盐水组(36 只),剩余 6 只不做任何处理,作为空白组。

**1.2.3 干预方法及取材** 大鼠骨骼肌损伤模型建立后,药物组在损伤处皮下注射三七总皂苷(纯度 ≥ 98%,上海一研生物科技)100 mg/kg,配置浓度为 25 mg/mL,对照组注射等量生理盐水,每 2 d 注射 1 次,直至损伤后第 14 天。

药物组和对照组在损伤后的即刻以及第 4, 7, 14, 28 和 42 天收取损伤腓肠肌,每个时间点 6 只。空白

组于第 42 天收取正常腓肠肌。

**1.2.4 Masson 染色** 收取的腓肠肌组织按常规固定、石蜡包埋,按腓肠肌横断面切片后进行 Masson 染色。在每个取材点 Masson 染色切片中随机选取 3 个切片,根据 Masson 染色法原理,肌组织中肌纤维和胞质被酸性品红和丽春红染色呈红色,而组织中胶原纤维被苯胺蓝染色呈蓝色。在显微镜(Olympus BX53)下选取观察切片中蓝色区域,通过 Image pro plus 6.0 软件计算分析纤维瘢痕面积。

**1.2.5 血清 PGE2 含量检测** 处死动物时收取血液通过竞争法 ELISA 检测大鼠血清中 PGE2 的含量(PGE2 ELISA Kit,武汉伊莱瑞特生物科技)。

### 1.3 统计学方法

所有计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行统计分析,组间各指标的比较采用独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 纤维瘢痕面积

Masson 三色染色法是利用两种或三种阴离子染料混合或先后作用而完成鉴别染色的。肌纤维被酸性品红和丽春红染色呈红色,而组织中胶原纤维被苯胺蓝染色呈蓝色。正常空白组大鼠骨骼肌 Masson 三色染色切片显示,肌束膜有很少部分呈蓝色,且蓝色部分没有聚集成团,分布比较均匀,且肌纤维排列比较整齐(见图 1)。经 Image pro plus 6.0 软件计算,空白组正常骨骼肌纤维瘢痕面积为  $(42\ 861 \pm 12\ 700) \mu\text{m}^2$ 。

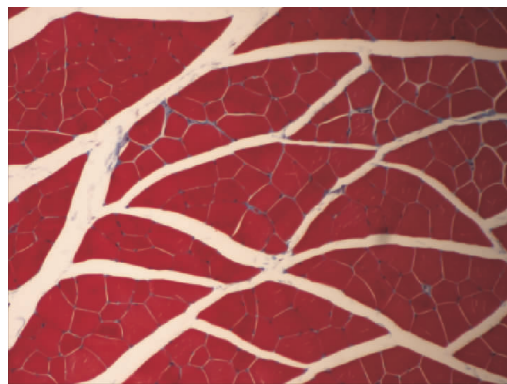


图 1 空白组正常骨骼肌 Masson 染色(400×)

大鼠腓肠肌急性钝挫伤后从第 4~42 天,药物组和生理盐水对照组的肌组织内纤维瘢痕面积在第 4 天最大,随愈合时间延长逐渐减少,且药物组的瘢痕面积在各时间点均小于生理盐水对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );至第 42 天,生理盐水对照组的瘢痕面积仍明显大于正常空白组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),但药物组的瘢痕面积在此时已与正常空白组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2-3。

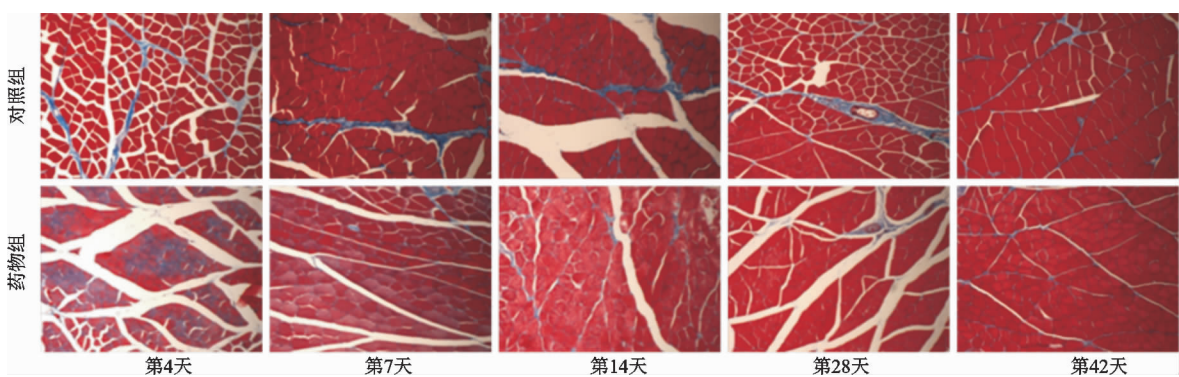


图 2 损伤骨骼肌 Masson 染色 (400×)

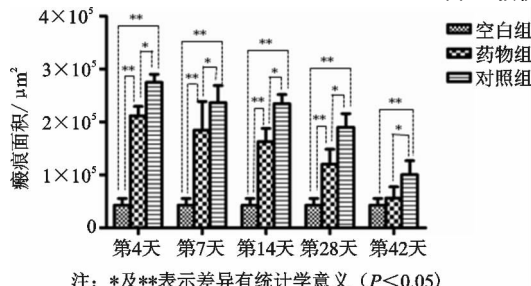


图 3 纤维瘢痕面积

## 2.2 血清 PGE2 含量

大鼠腓肠肌损伤后,两组血清 PGE2 水平在第 4 天上升到最高达到峰值,随后随时间延长逐渐降低。生理盐水对照组的血清 PGE2 在损伤后的 28 天内,均明显高于正常空白组,至第 42 天时下降到无明显差异;药物组血清 PGE2 的下降速度较对照组要快,第 1,4 天与生理盐水对照组无明显差异,至第 7,14 天下降到明显少于生理盐水对照组,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),且在第 14 天时已下降到与正常空白组无明显差异(见图 4)。

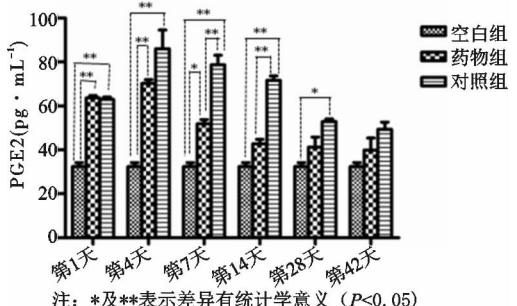


图 4 血清 PGE2 含量

## 3 讨论

在骨骼肌发生急性损伤后,正常的生理结构被破坏,其修复过程中瘢痕修复是非常重要的修复机制,但是会影响骨骼肌修复质量以及骨骼肌的功能。从本研究的切片染色图像可以看出,骨骼肌损伤处毛细血管破裂,其周围存在大量的蓝色胶原纤维,之前的很多研究报道发现骨骼肌损伤的转归,骨骼肌在遭受损伤之后修复过程可分为三个时期,分别为急性损伤期、重症修复期和塑形期<sup>[13,14]</sup>,符合正常的炎症反应。骨骼肌急性钝挫伤的治疗,现有的研究侧重于骨骼肌纤维的再生,但是却忽略了骨骼肌损伤后如何促进骨骼肌瘀血的消除及其生理结构的恢复<sup>[6,12]</sup>。三七已经被很多

研究证实不仅能够止血,其活血功效也非常突出,在损伤后注射三七总皂苷注射液,三七总皂苷在血小板激活及血栓形成过程中起着至关重要的作用<sup>[15]</sup>。

骨骼肌是由肌纤维和肌膜构成的,其肌膜对维持整个骨骼肌正常的生理收缩结构有着至关重要的作用。Masson 三色染色的意义在于可以弥补苏木精-伊红染色不能将骨骼肌纤维和胶原纤维区分染色的不足,故在多种疾病的病理诊断和研究运用中有实际价值<sup>[16]</sup>。骨骼肌受到打击导致的出血,出血点在 Masson 染色会呈现密集的蓝色区域,蓝色区域出现在肌膜,说明受打击处骨骼肌的肌膜也受到破坏。在修复时细胞核增多,细胞的分泌功能增强,骨骼肌的与修复相关的蛋白分泌增加,出血点的细胞密集增加,会引起在肌束膜的瘢痕过度增生。三七总皂苷可以在骨骼肌损伤前期减少瘀血的聚集,促进胶原纤维转化为正常的肌膜和肌纤维。本研究从两组切片蓝色部分面积发现,生理盐水对照组与三七总皂苷组从损伤后到第 42 天存在显著性差异,对照组的纤维瘢痕面积要大于三七药物组,且对照组从损伤后到第 28 天其纤维瘢痕溶解消失的速度较慢。骨骼肌发生损伤后,由于骨骼肌缺乏正常伸缩功能,这段时间很容易因为训练导致骨骼肌再次损伤,修复过程中同时发生肌纤维部分再生和一些疤痕组织形成,二者相互依赖、相互竞争,最终达到平衡状态,这是损伤骨骼肌恢复正常收缩功能的前提。而三七总皂苷药物组造模成功后至第 28 天,其纤维瘢痕面积明显少于对照组,在保持一定的骨骼肌强度时,更适合进行康复训练。

PGE2 是花生四烯酸在各种生理病理环境下经多种酶的作用转变而成的产物,已被证实可以诱发炎症反应,并增加机体的疼痛敏感性,非甾体抗炎药抑制 PGE2 的形成从而起到消炎镇痛的临床效果也是基于此药理作用<sup>[17,18]</sup>。研究发现 PGE2 可明显提高机体组织的痛觉感受器兴奋性,使神经的兴奋阈值降低,提高机体关于疼痛等相关刺激的反应敏感性<sup>[19]</sup>,PGE2 的分泌对中枢的疼痛感受起到至关重要的作用,是目前用来评估机体组织痛觉较好的标准<sup>[20,21]</sup>。且三七总皂苷可抑制炎症反应多个阶段,对多种炎性疾病具有干预作用<sup>[10]</sup>,还可拮抗急性损伤后局部毛细血管的扩张,并且能减少 PGE2 的含量,在组织急性炎症阶段

具有较强的抗炎镇痛作用。本研究中骨骼肌损伤后第7天和第14天,药物组血清PGE2明显低于对照组,提示在损伤后第7天三七总皂苷已经可以减轻疼痛水平;此外,药物组大鼠血清PGE2水平整体低于对照组,证明通过局部注射三七总皂苷可抑制骨骼肌钝挫伤后的炎症反应及疼痛水平。

#### 4 结论

三七总皂苷通过减少大鼠骨骼肌修复过程中纤维瘢痕形成的面积,同时降低血清PGE2的含量可能起到抗炎镇痛的作用,从而提高大鼠骨骼肌损伤后修复的质量。

#### 参考文献

- [1] HALLÉN A, EKSTRAND J. Return to play following muscle injuries in professional footballers[J]. J Sports Sci, 2014, 32(13):1229-1236.
- [2] HICKEY J T, TIMMINS R G, MANIAR N, et al. Criteria for progressing rehabilitation and determining return-to-play clearance following hamstring strain injury: a systematic review[J]. Sports Med, 2017, 47(7):1375-1387.
- [3] 卫宏图, 陈世益. 骨骼肌损伤的治疗研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2004, 23(5):572-576.
- [4] VALLE X, ALENTORN-GELI E5, TOL J L, et al. Muscle injuries in sports: a new evidence-informed and expert consensus-based classification with clinical application[J]. Sports Med, 2017, 47(7):1241-1253.
- [5] DUEWEKE J J, AWAN T M, MENDIAS C L. Regeneration of skeletal muscle after eccentric injury[J]. J Sport Rehabil, 2017, 26(2):171-179.
- [6] 孙燕, 廖怀章, 刘绪银, 等. 活血化瘀利水方对急性软组织损伤模型大鼠IL-1 $\beta$ 和PGE-2影响的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(12):6-8.
- [7] 肖鹏, 刘显东, 徐强, 等. 二黄新伤凝胶膏治疗大鼠急性软组织损伤的效果研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(11):13-16.
- [8] 曹深诚, 陈世益, 陈疾忤, 等. 中药黄芪、丹参注射液对急性腓绳肌损伤后等速肌力的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2007, 26(4):448-451.

- [9] 李青融, 王子好. 三七总皂苷药理作用的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(9):216-218.
- [10] 黄家林, 田代雄. 三七总皂苷抗炎免疫药理研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11):4657-4660.
- [11] 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.
- [12] 张健, 陈世益, 李云霞, 等. 黄芪皂甙、丹参酮IIA注射液对大鼠骨骼肌急性钝挫伤后骨骼肌组织形态的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2011, 30(3):270-274.
- [13] 于天水, 官大威, 刘力, 等. 大鼠骨骼肌损伤后不同时间的病理学变化[J]. 中国法医学杂志, 2014, 29(5):431-433.
- [14] 刘明晶. 研究骨骼肌损伤的病理进程及治疗措施[J]. 中国医药指南, 2016, 14(32):24-25.
- [15] 陈红艳, 陈安, 卢芳国, 等. 三七总皂苷的药理研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(1):154-157.
- [16] MARTINELLO T, PASCOLI F, CAPORALE G, et al. Might the masson trichrome stain be considered a useful method for categorizing experimental tendon lesions? [J]. Histo Histopathol, 2015, 30(8):963-969.
- [17] PARK J Y, PILLINGER M H, ABRAMSON S B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases[J]. Clin Immunol, 2006, 119(3):229-240.
- [18] 陶迎秋, 梁统, 周克元. 花生四烯酸三条代谢通路在炎症反应中的作用[J]. 国际免疫学杂志, 2010, 33(4):303-314.
- [19] 黄冰晴, 王兵丽. 前列腺素E2及其受体对炎性痛调制的研究进展[J]. 闽南师范大学学报(自然科学版), 2017, 30(2):65-70.
- [20] 胡斌, 吕伟, 王丹, 等. 高强度聚焦超声治疗对缓解胰腺腺疼痛的疗效观察[J]. 肝胆胰外科杂志, 2014, 26(2):105-108.
- [21] 丁洋洋, 丁呈彪, 张建湘, 等. 前列腺素E2在闭合性单纯性骨干骨折患者急性疼痛中的作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(30):5586-5590.

(收稿日期:2019-05-02)

(上接第6页)

- [16] JIA M, DAHLMAN-WRIGHT K, GUSTAFSSON J A. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015, 29(4):557-568.
- [17] 孙怡, 马将军, 潘旭枫, 等. 中药骨康方对骨质疏松大鼠血清及成骨细胞ER $\alpha$ 和ER $\beta$ mRNA表达水平的影响[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(9):1178-1181.
- [18] 鲁世金, 孙长英, 车艳军, 等. ER $\beta$ 通过抑制SOST表达补偿ER $\alpha$ 部分功能促进对成骨细胞增殖分化[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(3):309-320.

- [19] 李红明, 高原, 胡小雄. 淫羊藿苷促进骨膜细胞增殖及其机制[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(4):505-509.
- [20] TANG Y, LI C, SUN X, et al. Fructus ligustri lucidimodulates estrogen receptor expression with no uterotrophic effect in ovariectomized rats[J]. BMC Complementary & Alternative Medicine, 2018, 18(1):118-123.
- [21] 翁绳健, 吴立忠, 李炜明, 等. 肾虚与骨质疏松症关联性研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(12):85-88.

(收稿日期:2019-04-13)