

跌打万应膏治疗踝关节软组织损伤的实验研究

甄朋超^{1△} 阮安民² 周乔¹ 王磊¹ 赵环宇¹ 刘钢¹

[摘要] 目的:探讨跌打万应膏治疗踝关节软组织损伤的作用机制。方法:选取雄性大鼠 72 只,称重,随机分为 6 组,每组 12 只,分别为空白组、模型对照组、跌打万应膏高、中、低剂量组、对照组(冰敷),空白组不用药,其他组按体重各自给药。采用经典的重锤坠落法造模建立大鼠踝关节急性软组织损伤模型,观察各组大鼠第 3 天和第 7 天后血清炎症递质 IL-1 β 、TNF- α 的水平以及应用荧光聚合酶链式反应(PCR)及蛋白质免疫印迹技术(Western Blot)检测各组大鼠受损软组织 TLRs/MyD88/NF- κ B 通路表达水平的变化。结果:跌打万应膏可降低外周血中的 IL-1 β 、TNF- α 炎症因子水平,并显著抑制 TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路 TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B 基因及蛋白的激活和表达。结论:跌打万应膏外敷以中剂量疗效为佳,TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路可能是跌打万应膏的作用途径之一。

[关键词] 跌打万应膏;踝关节;软组织损伤;机制

[中图分类号] R685 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)08-0001-06

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.230801

Experimental Study of Diedawanying Ointment on the Treatment of Ankle Joint Soft Tissue Injury

ZHEN Pengchao^{1△} RUAN Anmin² ZHOU Qiao¹ WANG Lei¹ ZHAO Huanyu¹ LIU Gang¹

¹Huguo Temple Chinese Medicine Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100035, China;

²Beijing Longfu Hospital, Beijing 100005, China.

Abstract Objective: To investigate the mechanism of diedawanying ointment on the treatment of ankle soft tissue injury. **Methods:** 72 male rats were selected and weighed and randomly divided into 6 groups, with 12 rats in each group, which were blank group, model control group, diedawanying ointment high-dose, medium-dose and low-dose groups, and control group (ice compress). Blank group was not given medicine, and other groups were given medicine according to body weight. Acute soft tissue injury model of the ankle joint in rats was established by the classical hammer fall method. The levels of serum inflammatory transmitters IL-1 β and TNF- α were observed after 3 d and 7 d in each group, and the expression levels of TLRs/MyD88/NF- κ B pathway in the damaged soft tissues of rats were detected by PCR and Western Blot. **Results:** Diedawanying ointment could decrease the levels of IL-1 β and TNF- α inflammatory factors in peripheral blood, and significantly inhibit the activation and expression of TLR2, TLR4, MyD88 and NF- κ B genes and proteins in TLRs/MyD88/NF- κ B signaling pathway. **Conclusion:** Medium dose of diedawanying ointment has the best therapeutic effect. The action mechanism of diedawanying ointment is complex, and TLRs/MyD88/NF- κ B signaling pathway is one of the action pathways of diedawanying ointment.

Keywords: Diedawanying ointment; ankle joint; soft tissue injury; mechanism

基金项目:首都卫生发展科研专项(首发 2022-3-7029)

北京市第六批市级名老中医学术经验继承项目

¹北京中医药大学附属护国寺中医医院(北京,100035)

²北京市隆福医院

[△]通信作者 E-mail: pengchaozhen@163.com

跌打万应膏是清代上驷院绰班处传承下来的一种专门治疗跌打损伤的外用药膏,沿用至今已有上百年的历史,在本院使用也已有近 70 年历史。数据显示临床上踝关节急性软组织损伤发病率逐年升高,且有逐步年轻化的趋势,对患者的身心健康造成了很大的影响^[1]。通过前期临床研究及实验研究已证实跌打万应

膏具有很好的消肿、消炎、镇痛作用^[2]。本研究在前期研究的基础上进一步探讨跌打万应膏的作用机制,从血清炎性递质的测定以及从分子生物学角度出发,应用荧光聚合酶链式反应(PCR)及蛋白质免疫印迹技术(Western Blot)检测踝关节急性软组织损伤模型大鼠受损软组织中 TLRs/MyD88/NF-κB 炎症通路表达水平的变化来阐明和明确跌打万应膏的起效机制。

1 材料和方法

1.1 试验动物和分组

选取中国中医科学院实验动物中心体重在 180~220 g 间 2 个月龄的雄性 SD 大鼠,无特定病原体(SPF)级,共 72 只,许可证编号为 SKXK-京-2006-0008,随机分为 6 组,每组 12 只,分别为空白组、模型对照组、跌打万应膏高、中、低剂量组、对照组(冰敷),空白组不用药,其他组按体重各自给药。动物喂普通饲料,饲养于清洁柜中,饲养时湿度 50%左右,温度控制在(20±1)℃,噪音低于 60 dB,12 h/12 h 明暗循环照射,环境清洁、风速达标。

1.2 动物造模和干预

实验前 1 d SD 大鼠双腿去毛。实验当天用 3%戊巴比妥钠麻醉后,固定大鼠。采用经典的重锤坠落法建立皮肤无破损且无骨折的急性软组织损伤动物模型。剂量设置根据体重进行设计,设计低、中、高三个剂量平均给药,低剂量组相当于给生药 0.5 g/kg,中剂量组相当于给生药 1 g/kg,高剂量组相当于给生药

2 g/kg。

1.3 标本采集及检测指标

1.3.1 血清中炎性递质的测定 给药后第 3 天,每组取 6 只大鼠,40 mg/kg 3%戊巴比妥钠注射大鼠腹腔麻醉后,经腹主动脉取出全血 5 mL,分离血清,备用。给药后第 7 天剩余大鼠大鼠腹腔注射 40 mg/kg 3%戊巴比妥钠麻醉后,通过腹主动脉取出 5 mL 全血,分离血清,备用。采用 ELISA 法(反向竞争法)检测血浆中 IL-1β、TNF-α 含量,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.2 qPCR 法检测大鼠踝关节软组织中炎性因子 mRNA 表达量 使用 qPCR 法检测大鼠踝关节软组织中炎性因子 TLR2、TLR4、MyD88、NF-κB 炎性因子 mRNA 表达水平。各组大鼠分别于给药后第 3 天及第 7 天取 10 mg 踝关节软组织,眼科剪剪碎后加入 1 mL 的 TRIzol,匀浆机匀浆后于 4℃静置 10 min 并加入 200 μL 氯仿,混匀后 12 000 r/min 离心 15 min,取上层水相并加入相同体积的异丙醇,再次离心 15 min 后弃上清,加入 1 mL 的 85%乙醇,7 500 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 20 mL DEPC 水,混匀后 60℃金属浴 5 min,随后用分光光度仪检测各组软组织中 mRNA 浓度。按逆转录试剂盒(南京诺唯赞)说明书程序设定将 mRNA 逆转录为 cDNA,加入上下游引物、水及 mix 荧光染料(南京诺唯赞)后以 10 μL 体系上。所需引物序列见表 1 和表 2,使用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达值。

表 1 PCR 引物序列(治疗后第 3 天)

炎症因子	上游引物	下游引物
TLR2	CTGGATCTTGATGGCTGTG	CCGAGGGAATAGAGGTGAA
TLR4	GACTCCATTCAAGCCCAA	TCTCCCAAGATCAACCGA
MYD88	TGAGCAACCAGGACAGC	TAGGCATGTCAGGGGAGA
NF-KB P65	GGGGAAGGGAAGGAAGA	CGACTAAAAGGACCGCAA
β-Actin	CCATCTACGAGGGCTATGCT	CAAGAAGGAAGGCTGGAAAA

表 2 PCR 引物序列(治疗后第 7 天)

炎症因子	上游引物	下游引物
TLR2	AGTTGACGGACCCCAA	TCTTGTTGATGTGCTGCTG
TLR4	CAGCCAGGAGGGAGAAC	GTATGAGAGGGACGGAACC
MYD88	TTGAGTCTGCCCAGTTCC	TTTCTGCTTGAGAGGTGCT
NF-KB P65	CCCTCCTTCAGACACCCT	GGTTGCCAGCACTTCACT
β-Actin	GGGCTATGCTCCATCTACGA	CTGGAACAAGAAGGAAGGAA

1.3.3 Western Blot 法检测大鼠踝关节软组织中炎性因子蛋白表达变化 用 Western Blot 法检测各组大鼠踝关节软组织中炎性因子 TLR2、TLR4、MyD88、NF-κB 的蛋白表达水平。各组大鼠踝关节取 10 mg 滑膜及软骨组织,剪碎后加入 200 μL 蛋白裂解液和 PMSF 混合液(北京索莱宝),匀浆机匀浆后于 4℃静置 30 min,12 000 r/min 离心 15 min,取上清。使用

BCA 蛋白浓度试剂盒(ThermoScientific,美国)对各组滑膜蛋白浓度进行测定,向各组上清中加入四分之一体积的 Loading Buffer(ThermoScientific,美国),混匀后 95℃金属浴 5 min,分装保存。根据目的蛋白分子量大小选取合适浓度(8%~12%)的分离胶,加入各组蛋白进行电泳,随后进行半干转,5%奶粉封闭 1 h 后使用 TBS 清洗,加入一抗 4℃过夜,再次清洗后加

入二抗,随后加入 ECL 上机显影。

1.4 统计学方法

用 SPSS 19.0 统计软件进行数据的录入、管理和统计,数据均数以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。组间比较先检验各组数据是否符合正态分布,符合正态分布数据采用单因素方差分析和独立样本 t 检验分析,若不符合正态分布则采用非参数检验分析。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清炎症递质的测定

在血清炎症递质 IL-1 β 方面:治疗后第 3 天模型组与空白组相比, $t = 25.472, P < 0.01$;对照组与空白组相比, $t = 17.551, P < 0.01$;低剂量组与空白组相比, $t = 21.326, P < 0.01$;中剂量组与空白组相比, $t = 16.856, P < 0.01$;高剂量组与空白组相比, $t = 20.927, P < 0.01$;说明各组炎症反应明显,造模成功、合理。对照组与模型组相比, $t = 0.921, P = 0.002$;低剂量组与模型组相比, $t = 0.758, P = 0.033$;中剂量组与模型组相比, $t = 0.963, P = 0.001$;高剂量组与模型组相比, $t = 0.765, P = 0.037$,说明各组在炎症控制方面均有效。低剂量组与对照组相比, $t = 0.719, P = 0.039$;高剂量组与对照组相比, $t = 0.733, P = 0.035$,说明跌打万应膏低剂量组及高剂量组抗炎疗效不及对照组。中剂量组与对照组相比, $t = 0.673, P = 0.681$,说明两者疗效相当。治疗后第 7 天对照组与模型组相比, $t = 1.371, P < 0.01$;低剂量组与模型组相比, $t = 0.762, P = 0.031$;中剂量组与模型组相比, $t = 1.565, P < 0.01$;高剂量组与模型组相比, $t = 0.778, P = 0.029$,说明各组在炎症控制方面均有效。低剂量组与

对照组相比, $t = 0.713, P = 0.038$;高剂量组与对照组相比, $t = 0.727, P = 0.036$,说明跌打万应膏低剂量组及高剂量组抗炎疗效不及对照组。中剂量组与对照组相比, $t = 0.457, P = 0.831$,说明两者疗效相当。

在血清炎症递质 TNF- α 方面:治疗后第 3 天模型组与空白组相比, $t = 24.582, P < 0.01$;对照组与空白组相比, $t = 16.661, P < 0.01$;低剂量组与空白组相比, $t = 20.435, P < 0.01$;中剂量组与空白组相比, $t = 17.952, P < 0.01$;高剂量组与空白组相比, $t = 21.867, P < 0.01$,说明各组炎症反应明显,造模成功、合理。对照组与模型组相比, $t = 0.933, P = 0.002$;低剂量组与模型组相比, $t = 0.769, P = 0.033$;中剂量组与模型组相比, $t = 0.974, P = 0.001$;高剂量组与模型组相比, $t = 0.776, P = 0.036$,说明各组在炎症控制方面均有效。低剂量组与对照组相比, $t = 0.720, P = 0.038$;高剂量组与对照组相比, $t = 0.744, P = 0.035$,说明跌打万应膏低剂量组及高剂量组抗炎疗效不及对照组。中剂量组与对照组相比, $t = 0.684, P = 0.682$,说明两者疗效相当。治疗后第 7 天对照组与模型组相比, $t = 1.483, P < 0.01$;低剂量组与模型组相比, $t = 0.763, P = 0.031$;中剂量组与模型组相比, $t = 1.678, P < 0.01$;高剂量组与模型组相比, $t = 0.782, P = 0.028$,说明各组在炎症控制方面均有效。低剂量组与对照组相比, $t = 0.727, P = 0.039$;高剂量组与对照组相比, $t = 0.748, P = 0.035$,说明跌打万应膏低剂量组及高剂量组抗炎疗效不及对照组。中剂量组与对照组相比, $t = 0.426, P = 0.849$,说明两者疗效相当。各组血清炎症递质的测定数据见表 3。

表 3 各组血清炎症递质的测定数据表($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	IL-1 β		TNF- α	
	治疗后第 3 天	治疗后第 7 天	治疗后第 3 天	治疗后第 7 天
空白组	82.22 \pm 3.25	84.78 \pm 4.36	92.71 \pm 6.32	90.58 \pm 6.53
模型组	215.67 \pm 11.17 ¹⁾	132.69 \pm 10.82 ¹⁾	219.52 \pm 8.16 ¹⁾	141.57 \pm 14.17 ¹⁾
对照组	163.88 \pm 12.56 ¹⁾³⁾	90.51 \pm 5.77 ³⁾	171.19 \pm 13.72 ¹⁾³⁾	95.71 \pm 6.73 ³⁾
低剂量	185.43 \pm 13.63 ¹⁾⁴⁾⁵⁾	109.55 \pm 8.78 ²⁾⁴⁾⁵⁾	203.77 \pm 10.26 ¹⁾⁴⁾⁵⁾	121.43 \pm 9.74 ¹⁾⁴⁾⁵⁾
中剂量	158.63 \pm 13.72 ¹⁾³⁾	86.73 \pm 6.05 ³⁾	163.93 \pm 12.87 ¹⁾³⁾	93.27 \pm 6.69 ³⁾
高剂量	191.16 \pm 12.95 ¹⁾⁴⁾⁵⁾	105.83 \pm 7.91 ²⁾⁴⁾⁵⁾	205.17 \pm 11.33 ¹⁾⁴⁾⁵⁾	122.82 \pm 9.56 ¹⁾⁴⁾⁵⁾

注:各组与空白组比较,1) $P < 0.01$,2) $P < 0.05$;各组与模型组比较,3) $P < 0.01$,4) $P < 0.05$;各剂量组与对照组比较,5) $P < 0.05$ 。

2.2 荧光实时定量 PCR 检测结果

治疗后第 3 天 TLRs/NF- κ B 通路主要元件 TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 表达水平各组与空白组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$),说明各组造模成功、合理;各组与模型组数据比较差异均有统计学意义,说明各组在 TLRs/NF- κ B 通路主要元件改变方面均有效($P < 0.05$);跌打万应膏各剂量组与对照组相比,低剂量组及高剂量组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),且数据高于对照组,说明跌

打万应膏低剂量组及高剂量组疗效不及对照组;中剂量组与对照组数据差异无统计学意义($P > 0.05$),说明两者疗效相当;治疗后第 7 天各组与空白组相比,各组与空白组数据差异有统计学意义($P < 0.01$),说明病变仍然存在;对照组及跌打万应膏中剂量组数据略高于空白组,说明两种效果较好;各组与模型组比较数据差异均有统计学意义,说明各组均有效($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);跌打万应膏各剂量组与对照组相比,低剂量组及高剂量组与对照组相比差异有统计学意义

($P < 0.05$), 且数据高于对照组, 说明跌打万应膏低剂量组及高剂量组疗效不及对照组; 中剂量组与对照组数据差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明两者疗效

相当。

治疗后第 3 天和第 7 天 TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 表达水平见图 1 和图 2。

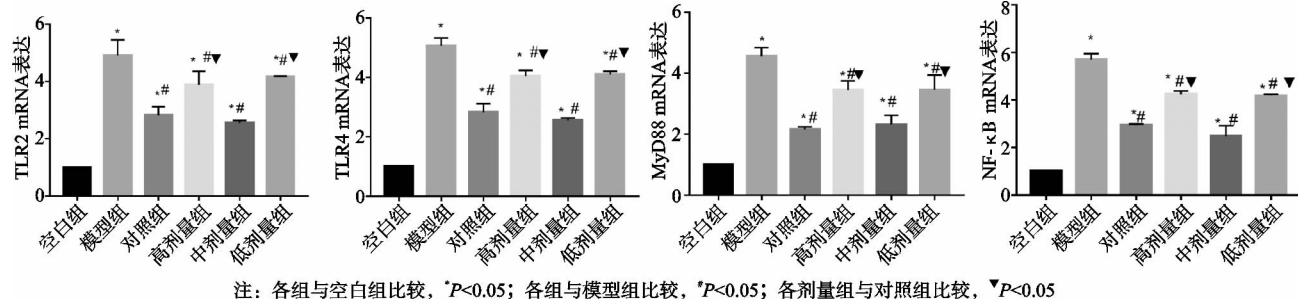


图 1 治疗后第 3 天 TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 表达水平

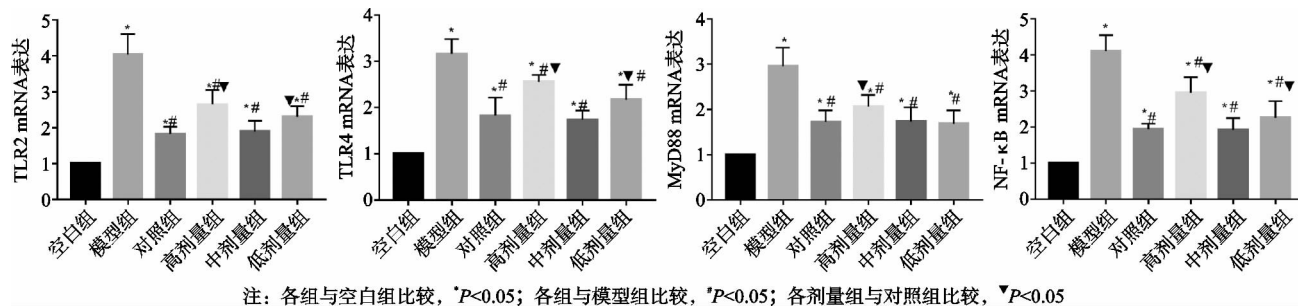


图 2 治疗后第 7 天 TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 表达水平

2.3 Western Blot 法检测结果

治疗后第 3 天 TLRs/NF- κ B 通路主要元件 TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B 的蛋白表达水平各组与空白组相比, 数据差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明各组造模成功、合理; 各组与模型组比较数据差异均有统计学意义, 说明各组在 TLRs/NF- κ B 通路主要元件改变方面均有效 ($P < 0.05$); 跌打万应膏各剂量组与对照组相比, 低剂量组及高剂量组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且数据高于对照组, 说明跌打万应膏低剂量组及高剂量组疗效不及对照组; 中剂量组与对照组数据差异无统计学意义 ($P < 0.05$), 说明两者疗效相当。治疗后第 7 天各组与空白组相比, 数据差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明病变仍然存在; 对照组及跌打万应膏中剂量组数据略高于空白组, 说明两种效果较好; 各组与模型组比较数据差异均有统计学意义, 说明各组均有效 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 跌打万应膏各剂量组与对照组相比, 低剂量组及高剂量组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且数据高于对照组, 说明跌打万应膏低剂量组及高剂量组疗效不及对照组; 中剂量组与对照组数据差异无统计学意义 ($P < 0.05$), 说明两者疗效相当。

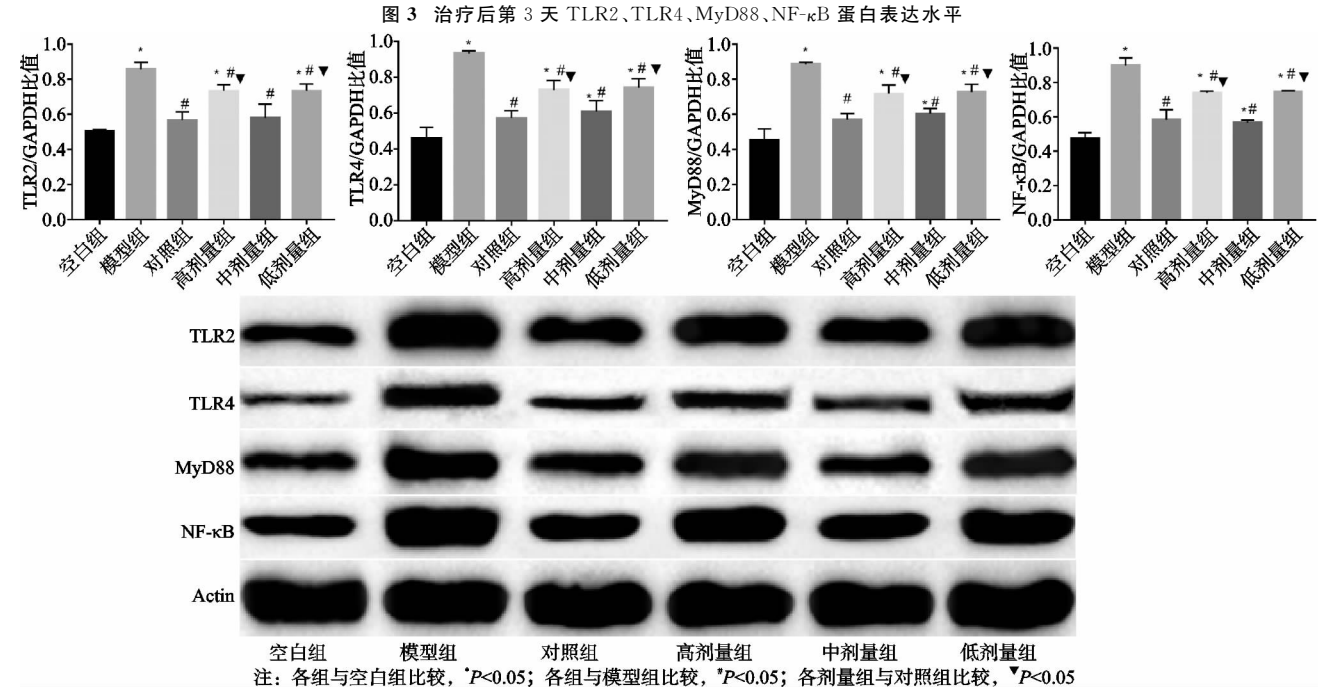
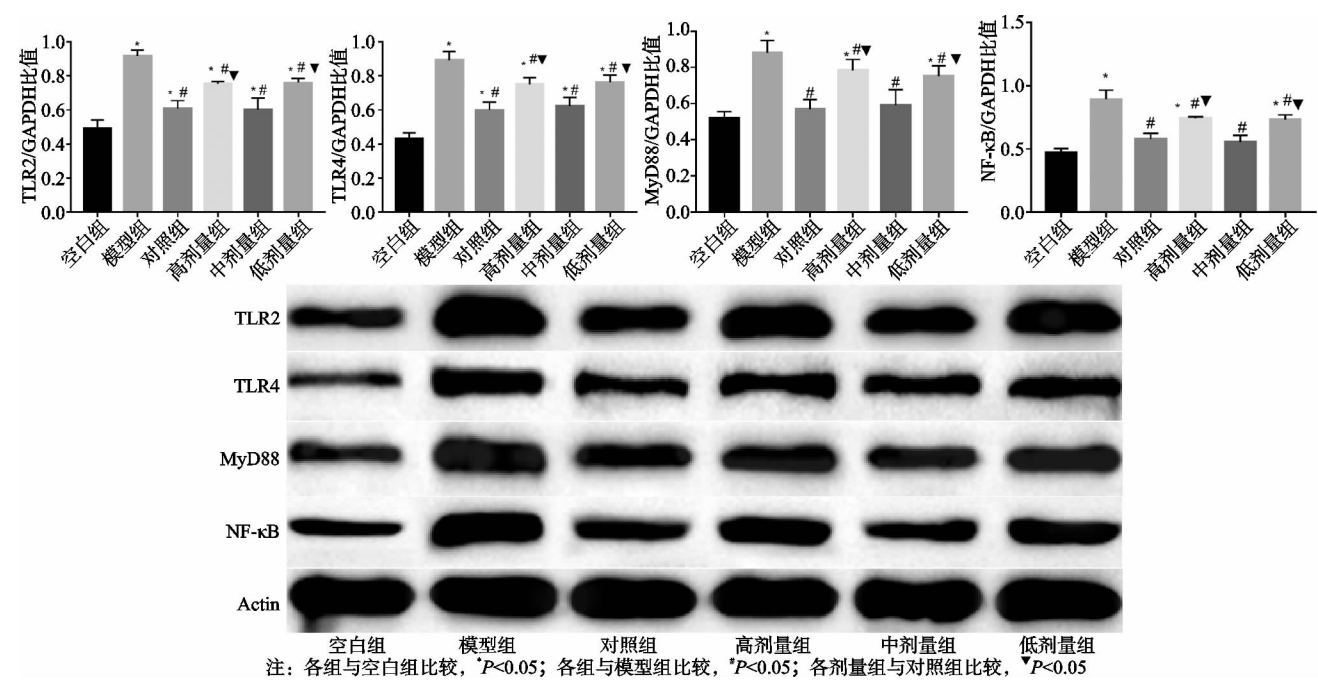
治疗后第 3 天和第 7 天 TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达水平见图 3 和图 4。

3 讨论

急性软组织损伤病理机制是无菌性炎症的改变,

炎症细胞因子在急性软组织损伤的病程发展中发挥重要的作用^[3], 其主要病理过程以局部组织坏死、炎性细胞膨胀、炎症介质释放、毛细血管扩张、组织水肿等为主要表现^[4]。

IL-1 β 和 TNF- α 是两个主要的促炎细胞因子, 参与炎症早期反应^[5], IL-1 β 是炎症反应中重要的促炎因子^[6], 在体内未受到损伤时的含量较低, 但当组织受到损伤时含量急剧上升, 经自分泌和旁分泌刺激细胞因子产生和炎症介质传递, 从而引起组织损伤^[7], 因此判断软组织损伤炎症的严重程度的标准可以依据血液及局部组织中的 IL-1 β 含量^[8]。TNF- α 是 TNF 家族的重要成员, 也是一类拥有多种生物效能的关键炎性介质^[9], 可以在细胞、亚细胞层次引发一连串炎症级联反应, 且可在血管内皮细胞起作用, 诱发血管壁通透性出现异常, 使得血栓生成和局部缺血; 还可以激活并诱导炎性细胞, 增加氧自由基、黏附分子、一氧化氮等介质从而破坏局部组织^[10]。TNF- α 具有广泛的生物学效应, 并可诱导细胞凋亡, 能使机体发热, 促进炎症反应和诱导炎性细胞因子产生 (如 IL-1 β 、IL-6 等的产生), 扩大和诱发炎症反应, 通过刺激、生成超氧化物, 溶酶体释放而损伤组织细胞, 聚集炎症介质, 进而引起连锁反应, 是多种信号通路的关键环节^[11], 使机体产生过度炎症反应, TNF- α 含量与创伤严重程度正相关^[12]。创伤、手术及术后感染等因素, 均可导致骨折患者血清炎症因子水平显著上升^[13]。本研究证实, 治疗后第 3



天和第 7 天各组血清 IL-1 β 、TNF- α 含量与模型组相比差异均有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明各组在炎症控制方面均有效,治疗后第 7 天跌打万应膏中剂量组与空白组数据差异无统计学意义 ($P>0.05$),说明跌打万应膏中剂量组是通过抑制局部损伤组织中 IL-1 β 、TNF- α 的产生,从而抑制局部炎症反应,起到治疗大鼠急性软组织损伤的效果。

TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路在免疫、炎症、肿瘤等疾病的发生发展中起着重要作用,是细胞中广泛存在的信号转导途径^[14],探讨中药对相关疾病治疗的分子基础,有大量研究通过中药对这一通路的调节作

用来分析^[15]。

中药具有多组分的物质基础和多环节、多靶点的作用特性,许多中药对于免疫系统具有调节作用和良好的刺激活性,研究证实多数中药发挥免疫调节作用,可以通过调节巨噬细胞分泌 TNF- α 、增强 NK 细胞活性及刺激 NK 细胞的增殖,以及促进巨噬细胞、中性粒细胞的吞噬功能和杀菌能力等起效。最近的研究表明,这些作用与 TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路密切相关,如发现桔梗根多糖可通过 TLR4 激活巨噬细胞^[16];红花多糖可通过 TLR4 激活转录因子 NF- κ B,诱导巨噬细胞合成细胞因子^[17];白芍有

效成分桂皮醛、白芍总苷可以抑制滑膜成纤维细胞中 TLR2、TLR4、IL-1 β 、MM-13 的表达从而起到抑制滑膜炎的作用^[18]。近年来对中药复方进行药理研究一直是中医药现代研究的热点,有关复方对 TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路的调节的研究报道也较丰富。

跌打万应膏方由乳香、没药、血竭、当归、川芎、红花、苏木、刘寄奴、土鳖虫、自然铜、制马钱子药味组成。诸药合用,既重活血散瘀,又兼消肿止痛。本方重用红花、当归各 30 g 为君药,研究表明当归和红花在剂量接近时活血效应较好^[19],前期中医古方数据挖掘的最常见配比 1:1 正好在这个范围内^[20],本组方也印证了这一结果。红花性温,味辛,具有散瘀止痛、活血通经等功效,其主要化学成分有黄酮、亚精胺、木脂素等,现代药理研究表明其有较好的调节改善血管作用^[21]。当归性温,味甘辛,有补血、活血之效。现代药理研究发现其含有水溶性物质和挥发油,其中当归挥发油部分中的最主要成分是藁苯内酯,水溶性的主要成分为阿魏酸及多糖等,阿魏酸能刺激中性白细胞向组织迁移,可以显著抑制各种致炎因子引起的多种急、慢性炎症^[22]。现代药理学研究发现当归能够在一定范围内缓解血流动力学的改变,从而减少缺氧对组织造成的损害,可在组织局部发挥抗组织纤维化、抗氧化、清除自由基和抗炎的作用,延缓疾病发展^[23]。

本研究结果表明,与空白组相比,模型组、对照组及跌打万应膏各剂量组在 TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路元件的 mRNA 和蛋白表达含量差异均有统计学意义,表明重锤造模成功模拟了急性软组织损伤过程中 TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路在软组织中的激活。对照组、跌打万应膏各剂量组中 TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路元件 TLR2、TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 和蛋白表达均显著低于模型组而高于空白组,表明该治疗方法均可以一定程度的抑制受损软组织中 TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路激活表达。跌打万应膏各剂量组与对照组相比显示,跌打万应膏中剂量组在 mRNA 和蛋白表达效果与对照组相当,跌打万应膏高、低剂量组在 TLRs/MyD88/NF- κ B 信号通路元件的 mRNA 和蛋白表达含量与对照组相比差异有统计学意义。

大量研究表明炎症和血瘀证在病理、病机及治疗方面存在密切的关系,炎症因子水平在一定程度上可以反映瘀血的轻重程度^[24],活血药还能明显抑制 TLRs/MyD88/NF- κ B 通路的表达^[25]。跌打万应膏君药以活血为主,本研究从 TLRs/MyD88/NF- κ B 炎症信号通路角度考虑,结果显示跌打万应膏治疗急性软组织损伤使得炎症得到缓解,TLR2、TLR4、MyD88、

NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低,使炎症通路的表达得到抑制,从而控制缓解软组织损伤的症状。研究结果从分子生物学层面阐释了跌打万应膏治疗急性软组织损伤的作用机制。

参考文献

- [1] 段戡,青恒臻,袁长深,等.十一方药酒治疗急性软组织损伤的临床研究[J].中国中医骨伤科杂志,2022,30(9):26-30.
- [2] 甄朋超,戚晴雪,王倩倩,等.跌打万应膏治疗小鼠急性软组织损伤的实验研究[J].中国中医急症,2021,30(7):1165-1168.
- [3] DAMLAR I, ESEN E, TATLI U. Effects of glucosamine-chondroitin combination on synovial fluid IL-1 β , TNF- α and PGE2 levels in internal derangements of temporomandibular joint[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2015, 20(3):e278-e283.
- [4] MOHAMMAD M, SEYED A M, ARMIN A, et al. Injury to skeletal muscle of mice following acute and sub-acute pregabalin exposure[J]. Iranian Journal of Basic Medical Science, 2017, 20(3):256-259.
- [5] 赵志军,李强,刘道忠,等.炎性细胞因子白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 与大骨节病关系的研究进展[J].中华地方病学杂志,2018,37(9):769-771.
- [6] 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.
- [7] DROR E, DALMAS E, MEIER D T, et al. Postprandial macrophage-derived IL-1 β stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation[J]. Nat Immunol, 2017, 18(3):283-292.
- [8] 陈瑶,王洪林,安莉君,等.千山活血膏治疗大鼠急性软组织损伤的作用研究[J].药学研究,2020,39(1):11-15.
- [9] 刘永利,邵先舫,李前,等.治伤巴布剂对急性软组织损伤患者血清 TNF- α 、IL-6 水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(3):377-380.
- [10] CUZZOCREA S, ESPOSITO E. TNF- α as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma[J]. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16(24):3152-3167.
- [11] 董有康,向勇,王春林,等.牵伸松调法对颈椎病模型兔 IL-6、TNF- α 及 Caspase-3 的影响[J].四川中医,2018,36(6):79-81.
- [12] 程延,赵晓芸,王敏娟,等.玄黄膏药对急性软组织损伤大鼠损伤组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量的影响[J].陕西中医,2019,40(1):9-11.
- [13] 付红英,李克群,李登凤,等.五水头孢唑林钠预防骨科术后切口感染效果及患者血清炎症因子变化分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(22):5183-5185.

- Amniotic suspension allograft modulates inflammation in a rat pain model of osteoarthritis[J]. *J Orthop Res*, 2020, 38(5):1141-1149.
- [8] 曾智,李浩,王晓旭,等. 罗汉果皂苷 VI 对膝关节炎大鼠模型的治疗作用及其机制探讨[J]. *免疫学杂志*, 2022, 38(9):804-809.
- [9] 秦娜,魏立伟,张虹. 桃仁膝康丸通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活软骨细胞自噬抗膝骨性关节炎的机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(4):165-169.
- [10] LI B, CHEN K, QIAN N, et al. Baicalein alleviates osteoarthritis by protecting subchondral bone, inhibiting angiogenesis and synovial proliferation[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(11):5283-5294.
- [11] 杜洋,李石头. 正骨紫金丸联合手术治疗桡骨远端骨折的临床效果[J]. *河南医学研究*, 2022, 31(6):1107-1110.
- [12] ANSARI M Y, AHMAD N, HAQQI T M. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis; Role of polyphenols[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129(1):1-24.
- [13] ZHAO Z, DAI X S, WANG Z Y, et al. MicroRNA-26a reduces synovial inflammation and cartilage injury in osteoarthritis of knee joints through impairing the NF- κ B signaling pathway[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(4):1-12.
- [14] GUAN T, DING L G, LU B Y, et al. Combined administration of curcumin and chondroitin sulfate alleviates cartilage injury and inflammation via NF- κ B pathway in knee osteoarthritis rats[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13(1):1-11.
- [15] ESTAKHRI F, REZA PANJEHSHAHIN M, TANIDEH N, et al. Efficacy of combination therapy with apigenin and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells on knee joint osteoarthritis in a rat model[J]. *Iran J Med Sci*, 2021, 46(5):383-394.
- [16] TANG Y, MO Y, XIN D, et al. β -ecdysterone alleviates osteoarthritis by activating autophagy in chondrocytes through regulating PI3K/AKT/mTOR signal pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(11):7174-7186.
- [17] JIANG L, ZHOU X, XU K, et al. miR-7/EGFR/MEGF9 axis regulates cartilage degradation in osteoarthritis via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):8622-8634.
- [18] GE X, ZHOU G. Protective effects of naringin on glucocorticoid-induced osteoporosis through regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(6):6330-6341.
- [19] CHEN Y, PAN X, ZHAO J, et al. Icariin alleviates osteoarthritis through PI3K/AKT/mTOR/ULK1 signaling pathway[J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1):204-215.
- [20] PAN X, SHAN H, BAI J, et al. Four-octylitaconate improves osteoarthritis by enhancing autophagy in chondrocytes via PI3K/AKT/mTOR signalling pathway inhibition[J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1):641-651.

(收稿日期:2022-12-11)

(上接第 6 页)

- [14] LAIRD M H, RHEE S H, PERKINS D J, et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85(6):966-977. [15] 张旭东,刘宏岩. 乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠 TLRs/NF- κ B/MyD88 信号通路影响的研究进展[J]. *吉林中医药*, 2019, 39(3):410-413.
- [16] YOON Y D, HAN S B, KANG J S, et al. Toll-like receptor 4 dependent activation of macrophages by polysaccharide isolated from the radix of platycodon grandiflorum[J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(13/14):1873-1882.
- [17] ANDO I, TSUKUMO Y, WAKABAYASHI T, et al. Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- κ B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(8):1155-1162.
- [18] 陈谱,阮安民,周俊,等. 通络止痛凝胶治疗膝骨性关节炎的实验研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2020, 28(9):1-5.
- [19] 金益,濮宗进,唐于平,等. 当归-红花药对活血功效相互作用研究[J]. *中草药*, 2017, 48(10):2087-2092.
- [20] 刘立,段金赓,朱振华,等. 当归-红花药物组合效应物质基础研究[J]. *中草药*, 2011, 42(5):929-934.
- [21] 礼梅,许世伟,苏玉娟. 红花药物分析、化学成分及现代药理研究进展[J]. *中医药信息*, 2017, 34(2):123-125.
- [22] 侯晓丽,孙铭学,高焕焕,等. 抗炎天然产物活性成分研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2015, 33(1):20-27.
- [23] 宋锦叶,孟立强,李晓玫. 黄芩与当归在肾脏微血管病变中的治疗应用前景[J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(9):859-861.
- [24] 马晓娟,殷惠军,陈可冀. 血瘀证与炎症相关性的研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(7):669-672.
- [25] 崔向宁,李玉波,李妍,等. 活血、利水中药对脑出血大鼠脑组织肿瘤坏死因子- α 、核转录因子- κ B 及水通道蛋白-4 表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(2):203-208.

(收稿日期:2023-01-06)