

## · 基础研究 ·

## 健脾益气法治疗严重软组织损伤的实验研究

陈逊文, 朱永展, 陈志维, 吴征杰, 何利雷

(广州中医药大学附属佛山中医院骨科, 广东 佛山 528000)

**【摘要】目的:**观察健脾益气法对严重创伤大鼠软组织修复过程中新生毛细血管和成纤维细胞的影响,进一步探讨依据“脾主四肢、肌肉”理论治疗严重创伤软组织损伤的作用机制。**方法:**采用股动脉放血结合刀割法制备严重创伤大鼠模型,然后将实验大鼠随机分为模型组、健脾组、活血化瘀组。在治疗后第 5、10、15 天于创面中心区取材,采用组织固定切片后行 CD31 和 PCNA 染色,运用多功能显微镜(ZEISS Axioskop2)观察肉芽组织中新生毛细血管和成纤维细胞,用 Image-ProPlus 图像分析软件对肉芽组织中新生的毛细血管和成纤维细胞进行定量分析。**结果:**治疗后第 5、10、15 天健脾组毛细血管和成纤维细胞的增殖明显高于模型组( $P < 0.05$ ),同时毛细血管和成纤维细胞的增殖速度和胶原化速度都比模型组和活血化瘀组快。**结论:**健脾益气法能有效促进严重创伤后肉芽组织的生长,加速伤口的愈合,且比传统疗法在创伤早期单纯应用活血化瘀药疗效更好。

**【关键词】** 软组织损伤; 伤口愈合; 益气健脾; 活血祛瘀药

**Experimental study on the treatment of serious soft tissue injuries with strengthening the spleen and replenishing qi**

CHEN Xun-wen, ZHU Yong-zhan, CHEN Zhi-wei, WU Zheng-jie, HE Li-lei. Department of Orthopaedics, the Foshan Hospital Affiliated to Guangzhou University of TCM, Foshan 528000, Guangdong, China

**ABSTRACT Objective:** To study the effects of Chinese drugs based on strengthening the spleen and replenishing qi treatment rule on neoformative capillaries and fibroblast during the soft tissue repair after serious trauma in rats, so as to explore the biological basis of the TCM theory “the spleen dominate extremities and muscles” applied to the treatment of soft tissue injuries. **Methods:** The model rats were established by bleeding from femoral artery and lancing method, and the rats were randomly divided into the control group, strengthening the spleen group and activating blood and resolving stasis group. The samples were got from the tissue of the wounded area at the 5th, 10th and 15th days after oral administration of the traditional Chinese medicine. After fixation and section, the tissues were stained by CD31 and PCNA staining. The amount of the capillaries and fibroblasts in the tissue of the wounded area were observed through multi-purpose microscope (ZEISS Axioskop2). Quantitative analysis was carried out on Image-ProPlus image analyzer. **Results:** The amount of the capillaries and fibroblasts in the wounded tissue in the strengthening the spleen group were larger than that in the control group at the 5th, 10th and 15th day. And the

基金项目:广东省中医药管理局资助项目(编号:101007)

通讯作者:何利雷 Tel:0757-82028597 E-mail:helilei\_2001\_0\_0@163.com

成过度的炎症反应和脓毒症,进而减轻由过度的炎症反应带来的局部或全身的伤害。因此,重楼总皂苷可能在一定程度上可以阻止多发骨折等严重创伤向脓毒症及 MODS 方向发展,从而减小其病死率,这有待于作进一步研究来证实。

**参考文献**

- Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. Surg Clin North Am, 1995, 75: 275-277.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature, 2002, 420: 885-891.
- Sikora JP. The role of cytokines and reactive oxygen species in the pathogenesis of sepsis. Pol Merkur Lekarski, 2000, 7(43): 47-50.
- 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展. 中草药, 2004, 35(3): 344-347.
- 周满红, 杜文胜, 龙盛双, 等. 重楼总皂苷对脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  的影响. 四川中医, 2008, 26(3): 14-16.
- Matsuda H, Pongpiriyadacha Y, Morikawa T, et al. Protective effects of steroid saponins from Paris polyphylla var. yunnanensis on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirement for activity and mode of action. Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13(6): 1101-1106.
- 乔治, 黎沾良, 李基业, 等. 严重多发伤后肠道细菌移位的临床研究. 中国危重病急救医学, 2006, 1: 13-15.
- 王辉, 陈海, 范琦, 等. 大鼠肠巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子的规律及复方大承气汤影响的研究. 中国中西医结合外科杂志, 2003, 9(1): 6-9.

(收稿日期: 2008-05-20 本文编辑: 连智华)

proliferation speed of capillaries and fibroblasts was faster than those in the control group or the activating blood and resolving stasis group. **Conclusion:** The Chinese drugs according to strengthening the spleen and replenishing *qi* treatment rule were effective to promote growth of the granulation tissue and facilitate healing of the wounded area. And it has better effect than the treatment of promoting blood circulation and removing stasis.

**Key words** Soft tissue injuries; Wound healing; Reinforcing *qi* strength spleen; Blood act stasis remove drugs

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(9): 664-666 www.zggszz.com

近年来随着工业和交通的快速发展,车祸、工伤也随之增加,严重复合伤造成大量的患者肢体出现软组织缺损、骨质外露、功能丧失,成为骨伤科中的难治之症。中医治疗此类疾病有着一定的优势,而“脾主四肢、肌肉”理论是中医理论的重要组成部分,目前临床已广泛应用基于此理论的疗法治疗各种疾病,其在骨伤科中的应用受到了一定的重视<sup>[1]</sup>。本文通过研究采用健脾益气法治疗对严重创伤大鼠模型软组织修复过程中新生毛细血管和成纤维细胞的影响,进一步探讨依据“脾主四肢、肌肉”理论治疗严重创伤软组织损伤的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 动物模型的制备与分组** 健康成年 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,2 月龄,体质量 120~140 g,由广州中医药大学动物实验中心提供(动物许可证号:SCXK 粤 2003-0001)。采用股动脉放血结合刀割法制作严重创伤模型,予 10%水合氯醛按每 100 g 体重 3.5 ml 腹腔注射麻醉,肝素抗凝。手术分离左侧颈总动脉并插管,压力信号用压力转换器输入 Nihon-Kohden 多导生理记录仪(日本 San Ei)记录平均动脉压(MABP),分离右侧颈外静脉并插管,以供补液用,分离右侧股动脉并插管,插管同贮血器相连。动物稳定 10 min 后,记录正常血压值。自股动脉快速放血,调整贮血器高度,使 MABP 降至 5.32 kPa,当代偿和失代偿时,通过放血或自动脉输血使 MABP 稳定在 5.32 kPa,维持 60 min 后回输动脉血并适当补液调整血压至正常。在大鼠的后腿部外侧,经脱毛后用 0.2%肥皂水清洁,再用 2%碘酒及 75%的乙醇消毒。用 0.25%普鲁卡因作局部麻醉后,在大鼠的后背部后腿外侧作一圆形创面,直径为 6 cm,去除表皮、真皮和皮下结缔组织,深至肌层,术后 43 只大鼠存活。术后大鼠按体重排序后,查随机数字表获取随机号,将大鼠分为模型组(13 只)、健脾组(15 只)和活血化瘀组(15 只)。常规饲养、观察,饲养环境安静,室温 18~30 ℃,自然照明。

**1.2 主要仪器及试剂** Nihon-Kohden 多导生理记录仪(日本 San Ei),多功能显微镜(ZEISS Axioskop2,德国),Image-Pro-Plus 图像分析系统(第 6 版),KD-202 轮转式切片机(浙江金华科迪仪器设备有限公司生产),CD31 染色试剂盒和 PCNA 染色试剂盒(美国 Santa Cruz 公司提供)。

**1.3 药物** 健脾组用药:参苓白术散加减,包括桔梗 15g,党参 20g,白术 20g,云苓 40g,甘草 6g,薏苡仁 30g,砂仁(后下)20g,扁豆 30g,淮山药 20g,黄芪 30g。将药物置于瓦质煮药罐中,加水适量,文火煎 30 min,煮 2 次,过滤后合并滤液,再进行浓缩,配制成 100%口服液(每毫升中含生药 1g)。活血化瘀组用药:桃红四物汤,按新世纪全国高等中医药院校教材药物组成及剂量配方,煎药法同前,其水煎液以蒸馏水稀释成浓度为每 20 ml 含生药 4.6 g 后再灌服。

**1.4 给药方法** 术后各组大鼠等条件下饲养。健脾组按每 10 g 体重 0.2 ml 药物灌服参苓白术散加减水煎液,活血化瘀组按每 10 g 体重 0.2 ml 药物灌服桃红四物汤水煎液,模型组按每 10 g 体重 0.2 ml 灌服蒸馏水。3 组均每天灌服 2 次,连续 15 d。

## 1.5 观察项目与方法

**1.5.1 大体观察法** 肉眼观察各组大鼠创面肉芽组织的颜色、色泽及表面渗液情况。

**1.5.2 组织学检测** 各组大鼠均在给药后第 5、10、15 天于创面中心区取材(用 16 号平针头取材),组织固定切片后应用 CD31 和 PCNA 染色。多功能显微镜 ZEISS(Axioskop2)下观察,每张片子取 2 个视野,用 Image-ProPlus 图像分析软件对肉芽组织中新生的毛细血管和成纤维细胞进行定量分析和阳性率分析。

**1.6 统计学处理** 用 SPSS 10.0 for Windows 统计软件,用方差分析比较 3 组新生毛细血管数和创面肉芽组织中成纤维细胞数,两组间数据比较采用 *q* 检验。

## 2 结果

**2.1 大鼠创面肉眼观察结果** 模型组大鼠创面渗液较多,创面色泽暗红、肿,周围红肿,肿胀消退慢,7 d 后组织仍为质软的肌肉组织,10 d 后组织出现少量质软、易碎的肉芽组织。健脾组大鼠创面鲜活,渗液少,周围红肿轻,7 d 后组织见质软、易碎的肉芽组织。而活血化瘀组大鼠创面渗液少,周围水肿,肿胀消退慢,7 d 后组织见少量质软、易碎的肉芽组织。

**2.2 大鼠创面肉芽组织中新生毛细血管数的变化** 见表 1。健脾组和活血化瘀组大鼠创面肉芽组织中新生毛细血管数在术后第 5、10、15 天均较模型组大鼠明显增多( $P < 0.01$ )。术后第 5 天健脾组与模型组比较, $P = 0.0001 < 0.01$ ;活血化瘀组与健脾组比较, $P = 0.0001 < 0.01$ 。术后第 10 天,健脾组大鼠创面肉芽组织中新生毛细血管数达到峰值( $4.40 \pm 0.50$ )个,较模型组( $0.85 \pm 0.30$ )个显著增多( $P = 0 < 0.01$ );活血化瘀组大鼠创面肉芽组织中新生毛细血管数( $1.92 \pm 0.15$ )个较模型组大鼠明显增多( $P = 0 < 0.01$ );活血化瘀组与健脾组比较, $P = 0 < 0.01$ 。术后第 15 天,健脾组大鼠创面肉芽组织中新生毛细血管数较术后第 10 天有减少的趋势,但仍较模型组大鼠多( $P = 0.0375 < 0.05$ );活血化瘀组与健脾组比较, $P = 0 < 0.01$ ;此时活血化瘀组大鼠模型创面肉芽组织中新生毛细血管数较术后第 10 天多。

**2.3 大鼠创面肉芽组织中成纤维细胞数的变化** 见表 2。健脾组与活血化瘀组大鼠创面肉芽组织中成纤维细胞数在术后第 5、15 天均较模型组大鼠多( $P < 0.01$ )。术后第 5 天健脾组与模型组比较, $P = 0.0009 < 0.01$ ;活血化瘀组与模型组比较, $P = 0.0042 < 0.01$ 。术后第 10 天,健脾组大鼠创面肉芽组织中成纤维细胞数达到峰值( $2.80 \pm 0.52$ )个,较模型组( $1.60 \pm 0.29$ )个多

**表 1 CD31 染色法观察各组大鼠创面肉芽组织中新生毛细血管数( $\bar{x}\pm s$ )**

**Tab.1 The numbers of capillaries in the granulation tissue at the wounded area( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	鼠数 (只)	创面肉芽组织中新生毛细血管数(个)		
		术后第 5 天	术后第 10 天	术后第 15 天
模型组	13	0.66±0.21	0.85±0.30	1.17±0.23
健脾组	15	1.68±0.75	4.40±0.50	1.79±0.33
活血化瘀组	15	0.69±0.07	1.92±0.15	2.31±0.22

**表 2 PCNA 染色法观察各组大鼠创面肉芽组织中成纤维细胞数( $\bar{x}\pm s$ )**

**Tab.2 The numbers of fibroblasts in the granulation tissue at the wounded area( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	鼠数 (只)	创面肉芽组织中新生成纤维细胞数(个)		
		术后第 5 天	术后第 10 天	术后第 15 天
模型组	13	1.50±0.07	1.60±0.29	1.73±0.22
健脾组	15	2.35±0.73	2.80±0.52	2.37±0.18
活血化瘀组	15	1.73±0.38	1.80±0.13	2.62±0.37

( $P=0<0.01$ ); 此时活血化瘀组大鼠创面肉芽组织中成纤维细胞数( $1.92\pm 0.15$ ) 个与模型组比较差异无统计学意义( $P=0.0656>0.05$ ), 且明显少于健脾组( $P=0<0.01$ )。术后第 15 天, 健脾组大鼠创面肉芽组织中成纤维细胞数较术后第 10 天有减少趋势, 但仍较模型组大鼠多( $P=0.0008<0.01$ ); 活血化瘀组与模型组比较,  $P=0.0004<0.01$ ; 而此时活血化瘀组大鼠模型创面肉芽组织中成纤维细胞数较术后第 10 天增多( $P=0<0.01$ )。

**3 讨论**

传统医学认为损伤应按三期辨证施治, 早期由于经脉受损、气机失调, 血不循经溢于脉外, 离经之血瘀滞于肌肤腠理致气滞血瘀, 需消肿止痛, 以活血化瘀为主。这一治法在临床中亦被广泛采用, 桃红四物汤为活血化瘀代表方, 有研究表明其对血管形成有促进作用<sup>[2]</sup>。但严重创伤后患者伤气、伤血, 气不足则脏腑组织功能低下或衰退, 修复能力下降, 血液亏虚则脏腑、形体、筋络、九窍的营养与滋润不足而渐渐枯萎。脾为后天之本, 脾胃为生化之源。人体的脾胃功能健全, 则能化生精、气、血、津、液, 提供足够的养料, 才能使经络、脏腑、全身的肌肉、筋肉、皮毛等组织得到充分的营养。《内经·素问》曰“脾、胃……仓■之本, 营之居”, “食气入胃, 散精于肝, 淫气于筋”, “脾病而四肢不用”, “脾主四肢、肌肉”。

创伤后骨断筋伤, 脉络破损, 血溢脉外, 气随血失, 致气虚。脾气虚则运化失司, 若创伤严重, 则脾气虚脱, 则有脾不统血之吐血、便血等症状。故对于严重创伤致脾虚的患者, 我们早期即应该补脾健脾以促使经络、脏腑、全身的肌肉、筋肉、皮

毛等组织得到充分的营养。

参苓白术散加减以四君子补脾胃气虚为主, 加黄芪补气升阳、益卫固表, 共奏健脾益气之功, 促进脾的运化功能。山药、薏仁、白扁豆健脾利湿清热, 调和肠胃; 砂仁行气醒脾, 使补而不滞; 桔梗开宣肺气, 载药上行, 使肺之布津而调养全身, 同时补肺则可克制肝木之偏旺, 并有益于脾虚之恢复。全方补中有泻, 燥湿相济, 标本同治, 达健脾益气、利湿和胃之功效, 为治疗脾虚气滞之良方。

本实验研究结果表明, 健脾干预可使严重创伤大鼠模型创面鲜活, 渗液减少, 周围红肿消退加快, 促进新生肉芽组织的生长。活血化瘀组大鼠较模型组大鼠创面鲜活, 渗液减少, 周围红肿减轻, 质软、易碎新生肉芽组织出现亦较早, 但肉芽组织多为水肿型。相比之下, 健脾组较活血化瘀组大鼠消肿更快, 新生肉芽组织出现更早。大鼠造模后, 创伤大鼠模型肿胀消退慢, 新生肉芽组织出现较慢, 创面肉芽组织中新生毛细血管和成纤维细胞数上升慢, 这可能是创伤大鼠模型脾虚的结果。肉眼观察结果表明健脾治疗可以促进创伤大鼠软组织修复, 且较活血化瘀组修复快。组织学观察结果表明未经健脾或活血化瘀处理的大鼠创面血管内皮细胞增长缓慢, 早期运用健脾或活血化瘀均能加快大鼠创面新生毛细血管数增长( $P<0.01$ )。健脾治疗可以促使创伤大鼠模型创面软组织迅速修复, 速度快于活血化瘀治疗( $P<0.01$ )。而且健脾治疗可以使创伤模型大鼠创面新生毛细血管和成纤维细胞快速达到峰值后(造模后第 10 天即达到峰值)又逐渐下降, 新生毛细血管和成纤维细胞逐渐转换成细小血管和成熟细胞, 从而使创面修复能够较早进入组织修复重建、瘢痕形成阶段。表明给予创伤大鼠健脾治疗, 纠正脾虚, 通过对全身多个系统的调整, 可促进创伤大鼠创面肿胀消退和新生肉芽组织生长。在健脾中药干预下, 严重创伤模型大鼠创口的肉芽组织中新生毛细血管和成纤维细胞数目在同一时间段内明显增多( $P<0.01$ ), 其数目增长速度明显快, 从而促进软组织修复, 这与临床观察结果<sup>[3]</sup>相符。综上, 应用健脾中药可以使严重创伤者伤口的肉芽组织生长迅速, 愈合时间明显缩短。《内经》提出“脾主四肢、肌肉”理论, 笔者认为这一脾胃理论在创伤骨科中有广泛的应用价值。故对于创伤后脾虚的患者, 在中医辨证施治的基础上早期即应予以健脾治疗, 这比传统的骨折早期单纯应用活血化瘀疗效更好。但其具体疗效的对比和作用机制还需要进一步研究探讨。

**参考文献**

- 1 陈逊文, 李伟强, 朱永展. 陈渭良教授岭南伤科治疗体系及其应用探要. 中医药学刊, 2004, 22(8): 1387-1397.
- 2 王淑美, 徐晓玉, 张文亮, 等. 桃红四物汤及其拆方对血管生成的影响. 中药药理与临床, 2005, 21(4): 4-7.
- 3 陈逊文, 朱永展. “脾主四肢、肌肉”的理论治疗开放损伤的临床观察. 中华中医药杂志, 2005, (增卷): 720.

(收稿日期: 2008-03-18 本文编辑: 连智华)