

## 基础研究 ·

# 活络效灵丹加味对兔肢体缺血再灌注损伤的影响

孙德舜, 李忠雯, 王小鹤, 邢攸军

(章丘市中医医院骨科, 山东 章丘 250200)

**摘要** 目的:探讨中药方剂活络效灵丹加味在兔肢体缺血再灌注损伤中对骨骼肌的保护作用。方法:健康成年兔 32 只,随机分为 4 组,每组 8 只。应用止血带环扎家兔后肢造成肢体缺血再灌注损伤模型。I 组(活络效灵丹加味预防和治疗)于造模前活络效灵丹加味灌胃 5 d,并于恢复血流再灌注始继续活络效灵丹加味灌胃 5 d; II 组(活络效灵丹加味治疗)、III 组(甘露醇治疗)及 IV 组(模型对照)于恢复血流再灌注始分别中药灌胃、静推 20%甘露醇、蒸馏水灌胃各 5 d。测定肢体缺血再灌注后 2 d 和 5 d 血清 MDA、SOD、NO、LDH 的含量;制备肢体缺血再灌注后 5 d 的骨骼肌切片,进行光镜观察并比较各组组织学变化。结果:再灌注 2 d 及 5 d 活络效灵丹加味预防和治疗组、活络效灵丹加味治疗组、甘露醇治疗组血清 MDA、LDH 值显著低于模型对照组;SOD、NO 值显著高于模型对照组 ( $P < 0.05$ )。光镜下活络效灵丹加味预防治疗组、活络效灵丹加味治疗组、甘露醇治疗组骨骼肌损害轻于空白对照组;活络效灵丹加味预防治疗组、活络效灵丹加味治疗组骨骼肌细胞再生现象较甘露醇治疗组、模型对照组明显,而以活络效灵丹加味预防治疗组为著。结论:活络效灵丹加味在肢体缺血再灌注损伤中对骨骼肌有保护作用且能促进骨骼肌细胞再生。

**关键词** 再灌注损伤; 兔; 医学,中国传统; 活络效灵丹

**Effect of Huoluo-Xiaoling Pellets (活络效灵丹) on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle in rabbits** SUN De-shun, LI Zhong-luan, WANG Xiaorhe, XING Youjun. Department of Orthopaedics, Zhangqiu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangqiu 250200, Shandong, China

**Abstract Objective:** To explore the effect of Huoluo-Xiaoling Pellets on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle in rabbits. **Methods:** Thirty-two healthy adult rabbits were randomly divided into 4 groups (8 rabbits in each group). The ischemia-reperfusion injury animal model was produced by prelum artery in rabbit hind limb. Rabbits of group I were fed with Huoluo-Xiaoling Pellets for 5 days before ischemia and while blood was recovered to reperfuse after ischemia respectively. Rabbits of group II were fed with Huoluo-Xiaoling Pellets for 5 days when blood was recovered to reperfuse after ischemia. Rabbits of group III were injected in vein with 20% manicol for 5 days and rabbits of group IV were fed with distilled water for the same time. After 2 days and 5 days of reperfusion, the contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), lactate dehydrogenase (LDH) and nitric oxide (NO) in serum were measured. Skeletal muscle section were observed under light microscope at the time of 5 days after reperfusion. **Results:** As compared with group IV, the contents of MDA, LDH in serum decreased significantly ( $P < 0.05$ ) and the contents of SOD, NO increased markedly ( $P < 0.05$ ) in group I, group II and group III. The skeletal muscle injury of group I, group II and group III were milder than that of group IV. As compared with group IV, group III, the skeletal muscle cell regenerated markedly in group I, group II, specially in group I. **Conclusion:** Huoluo-Xiaoling Pellets has protective action on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle and can promote the regenerate ability of skeletal muscle.

**Key words** Reperfusion injury; Rabbits; Medicine, Chinese traditional; Huoluo-Xiaoling Pellets

肢体缺血再灌注损伤后的骨骼肌再生现象国内目前研究较少。本实验通过设对照组比较,旨在探讨中药方剂活络效

灵丹加味对肢体缺血再灌注后骨骼肌的保护作用。

### 1 材料

1.1 动物分组 6~10 个月龄健康新西兰大白兔 32 只,体

质量 2.5 ~ 3.5 kg, 雌雄各半, 平均体重 3.1 kg, 正常饲养 1 周, 健康者入选, 按照体重随机分为 4 组, 每组 8 只。 组为活络效灵丹加味 (HXP) 预防治疗组, 组为 HXP 治疗组, 组为甘露醇治疗组, 组为模型对照组。兔由山东中医药大学小动物饲养室提供。

1.2 药物

1.2.1 中药组成及制备 采用活络效灵丹加味。由丹参 20 g、乳香 12 g、没药 12 g、当归 9 g、益母草 12 g、泽兰 9 g、泽泻 12 g、茯苓 9 g、白术 9 g、猪苓 9 g、木香 9 g 组成。所用药物购自山东中医药大学附属医院, 诸药混匀加水煎煮制成每毫升含生药 1 g 的药液, 水浴消毒, 封瓶备用。按成人与家兔用药量的换算方法, 家兔每日应用药 6 g/kg。

1.2.2 其他药品 20%甘露醇(山东长富洁晶药业有限公司 0204041231)、碘伏(济南艾达日用化工有限公司 20010523)、40%甲醛(淄博市临淄天德精细化工研究所 20010224)。

1.3 试剂

1.3.1 丙二醛 (MDA) 采用硫代巴比妥酸法测定血清中 MDA 的含量。试剂盒由南京建成生物工程研究所提供 (批号:20020511)。

1.3.2 一氧化氮 (NO) 采用硝酸还原酶法测定血清 NO 的含量。试剂盒由南京建成生物工程研究所提供 (批号:20020402)。

1.3.3 乳酸脱氢酶 (LDH) 采用南京建成生物研究所提供的试剂盒 (批号:20020511), 按说明书测定血清 LDH 含量。

1.3.4 超氧化物歧化酶 (SOD) 采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD (nU/ml)。试剂盒由南京建成生物工程研究所提供 (批号:20020511)。

1.4 实验仪器 电子天平(上海天平仪器厂), 721 分光光度计(上海分光仪器公司), 冷冻离心机(北京四环科学仪器厂), 组织切片机(美国 AO 公司), 恒温水浴(上海医疗器械厂), OLYMPUS 研究显微镜(日本), IPP 医学图像处理系统(美国), 弹簧秤(浙江永康太阳衡器厂), 手术器械、无菌巾、橡胶手套、输液器、注射器(使用前均已进行灭菌处理)。

2 方法

2.1 造模方法 采用橡皮止血带环扎兔后肢造模方法, 预实验应用弹簧秤测取可基本阻断动脉供血及静脉回流的橡皮带环扎力为 2.8 kg, 测得橡皮带力学系数  $K = 0.34 \text{ kg/cm}$ 。测量每只兔右后肢大腿(膝上约 2.5 cm 处)周长  $L_1$ , 按公式  $F = K(L_1 - L_2)$  分别计算取得环扎大腿的橡皮带原始长度  $L_2$ 。3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉麻醉, 双后肢股三角处脱毛剂脱毛, 以备抽取股静脉血, 用  $L_2$  长度的橡皮止血带环扎右后肢大腿(膝上约 2.5 cm 处), 4 h 后撤去止血带, 恢复血流, 制成肢体缺血再灌注模型。

2.2 给药方法 组造模前应用制备的 HXP 灌胃 5 d, 每日 1 次, 每次 6 g/kg; 自恢复血流再灌注始继续每日 1 次, 6 g/kg, HXP 灌胃 5 d。组造模后自恢复血流再灌注始 HXP 灌胃 5 d, 每日 1 次, 量同 组。组自造模后恢复血流再灌注始即按 2 g/kg 静推 20%甘露醇, 每日 1 次。组造模后自恢复血流再灌注始即蒸馏水灌胃, 每日 1 次, 量同 组。

2.3 取材与观察 全部动物于肢体缺血再灌注后 2 d 和 5 d

各抽取股静脉血 2 ml, 离心取血清, 置于干燥管内, -76 冻存, 集中检测。测定观察各组血清 MDA、SOD、LDH、NO 值的变化。再灌注后 5 d 全部处死动物, 立即取全部动物右侧小腿腓肠肌, 生理盐水冲洗后浸入 10%福尔马林 48 h 以上, 脱水、包埋, 5 μm 切片, HE 染色, 于光镜下观察病理变化。

2.4 统计学分析 实验数据均以均数 ±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 计量资料采用方差分析, 计数资料采用卡方检验, 以  $P < 0.05$  为差异具显著性。

3 结果

3.1 血清学指标

3.1.1 MDA MDA 值再灌注 2 d 和 5 d 各组差异均有显著性意义,  $P < 0.05$ 。MDA 值再灌注 2 d 时, 预防治疗组、甘露醇组与治疗组、模型对照组差异有显著性意义,  $P < 0.05$ ; 治疗组与模型对照组值差异也有显著性意义,  $P < 0.05$ 。MDA 值再灌注 5 d 时, 预防治疗组、治疗组、甘露醇治疗组与模型对照组差异有显著性意义,  $P < 0.05$ ; 预防治疗组、治疗组、甘露醇治疗组差异无显著性意义,  $P > 0.05$  (见表 1)。

表 1 肢体缺血再灌注后 2 d 和 5 d 血清 MDA 测得值

( $n = 8, \bar{x} \pm s, \text{nmol/ml}$ )

Tab. 1 The contents of MDA in serum after 2 and 5 days of ischemial-reperfusion ( $n = 8, \bar{x} \pm s, \text{nmol/ml}$ )

Groups	Count	After ischemial-reperfusion	
		2 d	5 d
Prevention and treatment	6 g/kg	8.62 ±1.12	6.45 ±1.34
Treatment	6 g/kg	8.81 ±1.20	6.85 ±1.16
Manicol	2 g/kg	8.25 ±0.97	6.63 ±1.08
Control	6 ml/kg	11.73 ±2.15	9.31 ±1.73

3.1.2 NO NO 值再灌注 2 d 和 5 d 各组差异均有显著性意义,  $P < 0.05$ 。NO 值再灌注 2 d 和 5 d 时, 预防治疗组、治疗组、甘露醇组与模型对照组差异有显著性意义,  $P < 0.05$  (见表 2)。

表 2 肢体缺血再灌注后 2 d 和 5 d 血清 NO 测得值

( $n = 8, \bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

Tab. 2 The contents of NO in serum after 2 and 5 days of ischemial-reperfusion ( $n = 8, \bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

Groups	Count	After ischemial-reperfusion	
		2 d	5 d
Prevention and treatment	6 g/kg	12.22 ±1.81	15.43 ±1.14
Treatment	6 g/kg	11.95 ±2.02	14.95 ±1.55
Manicol	2 g/kg	12.39 ±1.65	15.21 ±1.32
Control	6 ml/kg	7.35 ±1.33	10.51 ±2.05

3.1.3 SOD SOD 值再灌注 2 d 和 5 d 各组差异均有显著性意义,  $P < 0.05$ 。SOD 值再灌注 2 d 和 5 d 时, 预防治疗组、治疗组、甘露醇组与模型对照组差异有显著性意义,  $P < 0.05$  (见表 3)。

3.1.4 LDH LDH 值再灌注 2 d 和 5 d 各组差异均有显著性意义,  $P < 0.05$ 。LDH 值再灌注 2 d 时, 预防治疗组、甘露醇组与治疗组、模型对照组差异有显著性意义,  $P < 0.05$ ; 治

疗组、模型对照组值差异也有显著性意义,  $P < 0.05$ 。LDH 值再灌注 5 d 时, 预防治疗组、治疗组、甘露醇组与模型对照组差异有显著性意义,  $P < 0.05$ ; 预防治疗组、治疗组、甘露醇组差异无显著性意义,  $P > 0.05$  (见表 4)。

**表 3 肢体缺血再灌注后 2 d 和 5 d 血清 SOD 测得值**  
( $n = 8, \bar{x} \pm s, nU/ml$ )

**Tab. 3 The contents of SOD in serum after 2 and 5 days of ischemial-reperfusion ( $n = 8, \bar{x} \pm s, nU/ml$ )**

Groups	Count	After ischemial-reperfusion	
		2 d	5 d
Prevention and treatment	6 g/kg	110.8 ±12.4	183.1 ±17.9
Treatment	6 g/kg	106.9 ±15.2	174.2 ±20.1
Manicol	2 g/kg	118.7 ±17.5	180.9 ±16.2
Control	6 ml/kg	74.4 ±13.1	110.8 ±14.3

**表 4 肢体缺血再灌注后 2 d 和 5 d 血清 LDH 测得值**  
( $n = 8, \bar{x} \pm s, U/L$ )

**Tab. 4 The contents of LDH in serum after 2 and 5 days of ischemial-reperfusion ( $n = 8, \bar{x} \pm s, U/L$ )**

Groups	Count	After ischemial-reperfusion	
		2 d	5 d
Prevention and treatment	6 g/kg	2 050 ±13.8	1 654 ±131.2
Treatment	6 g/kg	2 408 ±102.5	1 709 ±109.7
Manicol	2 g/kg	1 950 ±160.7	1 681 ±127.8
Control	6 ml/kg	3 078 ±141.6	2 756 ±150.1

**3.2 光镜观察** 缺血再灌注后 5 d 组织形态学观察显示, 模型对照组骨骼肌细胞坏死严重, 呈片状, 范围超过 1 个低倍镜 ( $4 \times 10$ ) 视野, 少量纤维结缔组织增生及骨骼肌细胞增生。

甘露醇组骨骼肌细胞坏死明显轻于模型对照组, 呈散在片状, 范围低于 1 个低倍镜 ( $4 \times 10$ ) 视野, 纤维结缔组织增生明显, 少量骨骼肌细胞增生。

与模型对照组相比, 预防治疗组、治疗组骨骼肌细胞坏死明显减轻, 呈散在片状, 范围低于 1 个低倍镜 ( $4 \times 10$ ) 视野。

与模型对照组、甘露醇组相比, 预防治疗组、治疗组纤维结缔组织增生明显, 且骨骼肌细胞再生显著, 尤以预防治疗组为著, 而模型对照组、甘露醇组骨骼肌细胞再生较少。

#### 4 讨论

**4.1 实验指标的意义** MDA 是脂质过氧化作用的最终产物, 它的含量反映机体脂质过氧化的速率及强度。SOD 是歧化超氧阴离子的专一性酶, 其活性高低可反映体内抗自由基的水平。脂质过氧化使膜系统受损, 内皮源性 NO 合成下降; NO 显著下降与自由基大增有关<sup>[1-6]</sup>。本实验中, 预防治疗组、治疗组、甘露醇组 2 d 和 5 d 血清 MDA 含量较模型对照组低; 预防治疗组、治疗组、甘露醇组 2 d 和 5 d 血清 NO 值高于模型对照组, 说明预防治疗组、治疗组、甘露醇组自由基引发的脂质过氧化程度较模型对照组减轻; 血清 SOD 值高于模型对照组, 说明预防治疗组、治疗组、甘露醇组体内抗氧化能力较模型对照组增强。

骨骼肌对缺血损伤非常敏感<sup>[7]</sup>。当缺血再灌注过程损伤骨骼肌时, 细胞膜结构破坏, 细胞内酶大量进入血液内, LDH 为其中一种, 可作为再灌后骨骼肌损伤的一项指标<sup>[8,9]</sup>。本实验表明, 再灌注后 2 d 和 5 d 时, 预防治疗组、治疗组、甘露醇治疗组血清 LDH 的释放较模型对照组有显著下降, 说明骨骼肌细胞破坏减少。

虽然活络效灵丹加味及甘露醇均有保护作用, 但 2 d 时治疗组与甘露醇组 MDA、LDH 统计学处理有差异, 而 5 d 时没有统计学差异; 预防治疗组与甘露醇治疗组 2 d 和 5 d 无统计学差异。结果提示: 活络效灵丹加味的保护作用较甘露醇起效慢, 应尽早服用且服用时间应相对长。

**4.2 骨骼肌细胞再生及活络效灵丹加味对其的促进作用** 本实验中预防治疗组、治疗组形态组织学观察骨骼肌细胞再生现象较甘露醇组、模型对照组明显, 尤以预防治疗组为著。活络效灵丹加味促进骨骼肌细胞再生的机制尚待进一步研究, 我们认为与以下因素有关: 活血化瘀, 降低血液黏度, 改善微循环, 增加了血供, 有利于卫星细胞获得营养, 减轻骨骼肌受损伤程度; 丹参、当归、乳香、没药、茯苓、猪苓、白术均能增强吞噬细胞功能, 使清理坏死肌纤维的吞噬细胞增多, 吞噬细胞激活卫星细胞, 分裂增殖能力增强; 丹参促进组织的修复与再生功能等。由于本实验观察时间尚短, 还不能确定再生肌细胞的最终去向<sup>[10]</sup>, 待研究观察; 对活络效灵丹加味促进骨骼肌细胞再生这一现象及活血化瘀中药是否均有这一作用须通过进一步实验来得到明确。

#### 参考文献

- Sun JS, Lu FJ, Huang WC, et al. Antioxidant status following acute ischemic limb injury: a rabbit model. *Free Radical Res*, 1999, 31 (1) : 9-21.
- Farooq MM, Serra A, Newman PJ, et al. PECAM-1/ IgG attenuates peroxynitrite mediated extremity reperfusion injury. *J Vasc Surg*, 2001, 34(3) : 555-558.
- Harkin DW, Dsa AA, Yassin MM, et al. Reperfusion injury is greater with delayed restoration of venous outflow in concurrent arterial and venous limb injury. *Br J Surgery*, 2002, 89(2) : 245.
- 范里, 刘世清. 骨骼肌缺血再灌注损伤后的血液流变性及微循环变化. *微循环杂志*, 1999, 9(1) : 13-15.
- Pudupakkam S, Hamis KA, Jamieson WG, et al. Ischemic tolerance in muscle: role of nitric oxide. *Am J Physiol*, 1998, 275(2) : 94-99.
- 沈施仁, 陈瑾, 吴信华, 等. 肢体缺血再灌注时红细胞内 MDA 及血浆中 NO、TXB2 含量的变化. *中华麻醉学杂志*, 1999, 19(5) : 315.
- 谭春华. 骨骼肌缺血损伤与保护. *实用骨科杂志*, 2000, 6(2) : 90-93.
- 岑石强, 杨志明. 成肌细胞在基因治疗和组织工程中的应用综述. *中国修复重建外科杂志*, 1999, 13(3) : 22-24.
- Williams P, Simpson H, Kenwright J, et al. Muscle fibre damage and regeneration from surgical limb distraction. *Cells Tissue Organs*, 2001, 169(4) : 395-400.
- 唐休发, 刘宝林, 顾晓明, 等. 肌腱切断后骨骼肌的退变与再生. *华西口腔医学杂志*, 1998, 16(1) : 15-19.

(收稿日期: 2005 - 06 - 19 本文编辑: 连智华)