



•综合医学•

桃红四物汤对大鼠肢体缺血再灌注损伤模型骨骼肌细胞形态及微血管密度的影响

罗文兵¹, 向黎黎², 周彪³, 陆小龙², 熊辉^{4☆}

(1.湖南临澧县中医院, 湖南常德, 415200; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南长沙, 410208; 3.湘潭市人民医院, 湖南湘潭, 411101; 4.湖南中医药大学, 湖南长沙, 410005)

目的:探讨桃红四物汤对大鼠肢体缺血再灌注损伤骨骼肌细胞形态及微血管密度的影响。**方法:**45只SD大鼠随机分为A组5只、B组20只和C组20只,A组不阻断血流,后两组动物复制右后肢缺血再灌注损伤模型,A组不给予药物,B组和C组大鼠在缺血前12h、缺血时和再灌注时分别予生理盐水和桃红四物汤各灌胃一次,此后每日早晚分别灌胃一次。观察各组大鼠骨骼肌细胞形态学变化,并测定微血管密度含量。**结果:**A组骨骼肌细胞形状及排列规则与B组、C组差异明显。再灌注后3d、5d、7d,在骨骼肌微血管密度方面,B组与A组比较,其差异有统计学意义 $P<0.05$ 。C组与B组比较,再灌注后各时间点均具有统计学意义 $P<0.05$ 。**结论:**桃红四物汤可能是通过促进血管新生,加速微循环重建,增加肢体缺血再灌注损伤骨骼肌微血管数量,减轻LIRI严重程度。

关键词:桃红四物汤; 肢体缺血再灌注损伤; 血管密度**基金项目:**湖南省自然科学基金(2015JJ6083)**中图分类号:**R256.12**文献标识码:**A**文章编号:**1009-5187(2017)19-288-02

肢体缺血再灌注损伤(Limb Ischemia Reperfusion Injury, LIRI)是指肢体缺血恢复血供后肢体所受损伤不减轻反而加重的病理过程。患者伴有骨骼肌纤维化、挛缩等,严重的可导致肢体坏死、截肢、多器官功能衰竭等[1-4]。本研究在建立大鼠肢体缺血再灌注损伤模型基础上,运用桃红四物汤干预,观察骨骼肌形态学和微血管密度变化情况,从血管新生方面探讨桃红四物汤治疗LIRI的作用机理,为其临床应用提供客观依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 本实验选用2月龄清洁级SD雄性大鼠,体重约210-230g,由湖南中医药大学动物实验中心提供。

1.2 实验药物与试剂 桃红四物汤(组成:桃仁、红花、生地黄、赤芍、当归、川芎)由湖南中医药大学第二附属医院制剂室制备,250ml/瓶。水合氯醛、兔抗大鼠CD34抗体、苏木素、甲醛。

1.3 实验仪器 HHS-2电子恒温不锈钢水浴锅、JY3002型电子天平、LEICA DM LB2型双目显微镜、MIAS医学图象分析系统、Haier医用微波炉、DT5-3台式离心机、S2-93自动双重纯水蒸馏器、Shan-don325型石蜡切片机、DNP-9162型电热恒温培养箱、Motic B5显微摄像系统。

2 方法

2.1 动物分组与造模 45只SD大鼠随机分为A组5只、B组20只和C组20只,A组不阻断血流,仅以橡皮筋轻轻搭敷在右后肢上,后两组动物复制右后肢缺血再灌注损伤模型,再灌注后1d、3d、5d、

7d,每个时间点5只。均取SD大鼠右后肢为实验侧。大鼠造模前饲养7d,造模前禁食禁饮12h。参照Crawford[5]等痔结扎器扣环和口腔正畸橡皮圈模型方法,以及《生理科学实验教材》[6]记载的步骤,经过预实验完成复制大鼠肢体缺血再灌注实验模型。趾掌苍白冰凉代表阻断大鼠后肢血流成功。

2.2 给药方法 A组不给药,B组予生理盐水灌胃,C组予桃红四物汤灌胃。B组和C组大鼠在造成缺血前12h、造成缺血时和再灌注时各灌胃一次,此后每天早上8点,下午5点各灌胃1次。

2.3 实验方法 各组大鼠予水合氯醛行腹腔内麻醉。取仰卧位置于自制简易手术台上,固定四肢。去除SD大鼠右后肢鼠毛,常规消毒后,依次切开皮肤、皮下及筋膜。切取约3g腓肠肌,用冰盐水快速洗去血液,固定于甲醛溶液中。HE染色,观察骨骼肌细胞的形态学变化,行免疫组化染色,观察微血管变化情况。

2.4 统计学方法 采用SPSS20.0软件进行统计分析。计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。单组计量资料不同时间点比较,采用单因素方差分析,满足正态性和方差齐性,用LSD检验;满足正态性,不满足方差齐性,则用Dunnett's T3检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态比较 A组大鼠实验喂养期间,饮食、饮水、活动、毛质、大便均正常。B、C组造模后出现,大鼠右后肢趾掌苍白冰凉,出现肿胀、瘀紫,大鼠步态跛行,舔舐右后肢,情绪躁动,食水略减。造模后1天,B、C组右后肢未见明显变化,两组之间差异不明显。造模后3-7天,C组肿胀、瘀紫程度较B组减轻。

3.2 骨骼肌细胞形态学结果比较 A组:骨骼肌组织细胞形状及排列规则,细胞核大小均匀,染色均匀。B组:再灌注后1d骨骼肌细胞严重水肿,部分肌细胞破坏细胞核游离,炎症反应明显;再灌注后3d骨骼肌细胞破坏明显,肌细胞形态仅部分可见,细胞核排列紊乱;再灌注后5d骨骼肌细胞完全破坏,细胞核排列紊乱;再灌注后7d骨

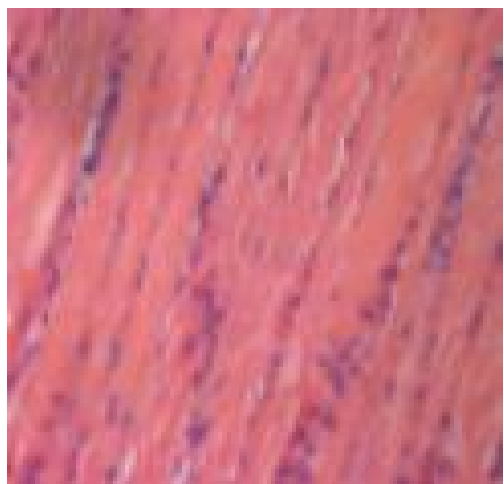
第一作者:罗文兵,男,副主任医师,科主任,硕士研究生,研究方向:中医药防治骨科疾病的研究

☆通讯作者:熊辉,男,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:骨病、筋伤疾病的中医药防治研究



•综合医学•

骨骼肌细胞完全破坏,细胞核较再灌注5d增多,排列紊乱。C组:再灌注后1d、3d、5d、7d骨骼肌细胞形态变化不如B组明显。见图1



A组

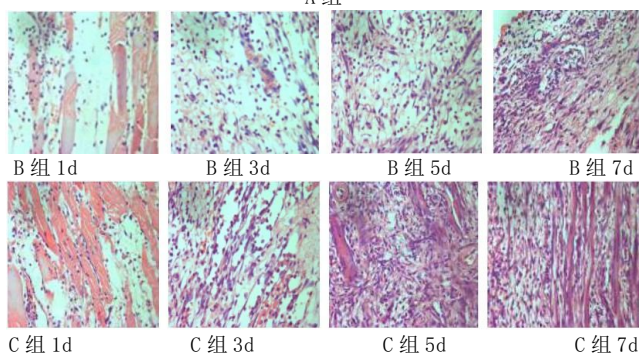


图1 药物干预后3组动物腓肠肌组织形态(HE染色×250)

3.3 血管密度比较

再灌注后3d、5d、7d, B组与A组比较,差异有统计学意义 $P<0.05$;再灌注后1d, B组与A组比较,差异无统计学意义 $P>0.05$ 。C组与A组、B组比较,再灌注后各时间点均具有统计学意义 $P<0.05$ 。见表1

表1 不同时间点各组大鼠微血管数量(CD34阳性细胞数)比较

($\bar{x} \pm s$)				
组别	1d	3d	5d	7d
A组	37.46±6.15	37.46±6.15	37.46±6.15	37.46±6.15
	6.15	6.15	6.15	6.15
B组	35.37±7.89☆	89.17±13.56☆	139.87±18.82☆	201.43±21.43☆
	7.89☆	13.56☆	18.82☆	21.43☆
C组	125.67±15.52▽☆	173.21±21.24▽☆	328.51±22.56▽☆	257.27±23.57▽☆
	15.52▽☆	21.24▽☆	22.56▽☆	23.57▽☆

注:与A组比较☆ $P<0.05$,与B组比较▽ $P<0.05$ 。

4 讨论

中医治疗损伤,多重气血,气滞血瘀是损伤的病机核心,损伤愈合是“瘀去、新生”的过程,明代以来的中医伤科医家反复阐述了“折伤专主血论”的治疗原则。桃红四物汤方出自《医宗金鉴》,为活血祛瘀的典型方剂,以祛瘀为核心,辅以养血、行气,方中桃仁、红花力主活血化瘀;当归滋阴补肝、养血调经;生地清热凉血、养阴生津;

赤芍清热凉血、散瘀止痛;川芎活血行气、调畅气血。全方共奏活血化瘀瘀生新之功效,瘀祛则新生,气机通畅,脉络无所阻,血有所循,瘀血自去[7]。

本实验选择观察骨骼肌在缺血再灌注损伤后的细胞形态和微血管的数量变化。结果显示, C组与B组在炎症反应和细胞肿胀等情况比较均较轻,再灌注后7天C组可见部分肌细胞形态,部分细胞核沿肌细胞排列,明显较B组好。说明肢体缺血再灌注损伤可以造成骨骼肌损伤,且随着再灌注损伤时间的延长进一步加重,桃红四物汤具有延缓损伤进程,改善细胞形态的作用。CD34是一种微血管标记物,特异性高,主要表达于毛细血管内皮细胞,是新生血管的主要标记物[8]。本实验中C组的CD34阳性细胞数在各时间点均高于B组,具有统计学意义。说明桃红四物汤能够促进肢体缺血再灌注损伤的微血管生成,加速微循环重建,减轻LIRI的严重程度。

肢体缺血再灌注损伤的治疗,目前临床上以西医治疗为主导,近些年,随着中药制剂和中药提取物对缺血再灌注损伤的治疗和干预研究,发现中药制剂在治疗上具有易吸收、分布广、不良反应少、无明显毒副作用、费用低等优点[9]。因此,中药制剂在治疗缺血再灌注损伤上具有广阔的前景,值得学者们进一步研究发掘。

参考文献:

- [1]黄卫,张应鹏,钟波,等.参附注射液对缺血再灌注肢体保护作用[J].中国病理生理杂志,2007,23(3):540-542.
- [2]周少朋,杨禄坤,肖笑雨,等.七氟醚对LIR大鼠肝损伤的影响[J].中华普通外科学文献,2012,6(6):18-20、44.
- [3]周洪波,刘燕,王银环,等.缺血预适应对LIR后肺组织细胞凋亡的影响[J].青岛医药卫生,2011,43(1):1-4.
- [4]李红梅,崔乃杰,崔德健.牛磺酸预防肢体缺血再灌注致远隔多器官的损伤[J].中国临床康复,2006,10(11):104-106.
- [5]Crawford RS, Hashmi FF, Jones JE, et al. A novel model of acute murine hindlimb ischemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292: H830-H837.
- [6]张连元,杨林.生理科学试验教材[M].北京:人民军医出版社,2001:29-30.
- [7]Sobhani R, Masoudpour H, Akbari M, et al. The histobiochemical effects of melatonin on ischemia reperfusion-related injuries in vascular trauma of lower limbs[J]. Ann Ital Chir, 2012, 83(1):49-54.
- [8]黄如林,梁杰,夏琼平,黄绮梨,吴志贤. CD34及CD105两种微血管标记物在瘢痕微血管构筑中的比较[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(11):1977-1980.
- [9]李瑞华,阙世廉,李津.骨骼肌缺血再灌注损伤研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2017,23(04):459-461.