

DOI:10.13350/j.cjpb.241006

• 论著 •

消瘀丸通过调控 MAPK/NF- κ B 信号通路减轻小鼠胫骨骨折后瘀肿损伤:一项基于 16S rDNA 测序技术肠道菌群研究^{*}

牛驰程¹, 曾平^{2**}, 刘金富², 王伟伟¹, 许青源¹, 李豪¹, 陶红成¹, 李佳侣¹, 丁强¹, 郭良¹

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530200; 2. 广西中医药大学第一附属医院骨二科)

【摘要】 **目的** 探讨消瘀丸对小鼠胫骨骨折后瘀肿损伤的作用机制。 **方法** 将小鼠随机分为假手术组、模型组、消瘀丸(XYW)低剂量组[2.0 g/(kg·d)]、消瘀丸(XYW)高剂量组[4.0 g/(kg·d)]和阳性药组[三七伤药片, 国药准字 Z61020090, 0.33 g, 0.4 g/(kg·d)]。假手术组小鼠制造伤口并缝合, 其余 4 组均进行小鼠胫骨骨折造模, 于造模前 7d 至造模后 5d 对各给药组给予灌胃给药, 假手术组、模型组给予等剂量蒸馏水灌胃, 消瘀丸组用“消瘀丸水溶液”灌胃, 阳性药组用三七伤药片水溶液灌胃。采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色检测胫骨骨折后瘀肿损伤的病理损伤, 并测量其瘀肿损伤。酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒检测各组小鼠化学趋化因子(MCP-1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的水平, 以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)以及还原型谷胱甘肽(GSH)。蛋白免疫印记(Western blot)技术检测小鼠肌肉组织中血红素氧合酶 1(heme oxygenase 1, HO-1)、醌氧化还原酶 NADH 1[NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1]、核转录因子 E2 相关因子 2(nuclear transcription factor E2-related factor 2, Nrf2)、核因子- κ B[(nuclear factor-kappa B)-p65, NF- κ B p65]、p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)蛋白表达水平。通过 16S rDNA 测序检测小鼠肠道菌群的变化, 进而挖掘出 XYW 治疗小鼠骨折后引起的瘀肿损伤潜在机制。 **结果** 与模型组相比, XYW 可明显改善小鼠瘀肿损伤程度; 降低血清炎症因子水平; 减轻氧化应激损伤。HE 染色结果表明, XYW 组小鼠瘀肿损伤肌肉组织中炎性浸润情况显著改善。Western blot 结果显示, 与模型组相比, XYW 可显著升高小鼠瘀肿损伤肌肉组织中 HO-1、NQO1、Nrf2 蛋白表达, 并显著降低 NF- κ Bp65、p38MAPK 蛋白表达。16S rDNA 测序结果表明, XYW 可以改善胫骨骨折后小鼠肠道菌群的紊乱。 **结论** 以上结果表明 XYW 能够保护小鼠骨折后引起的瘀肿损伤, 这种保护作用可能是通过调控 MAPK/NF- κ B 信号通路, 降低血清中炎症和氧化应激相关因子的表达水平, 减少肌肉氧化损伤, 改善瘀肿肌肉病理损伤, 改善肠道菌群紊乱实现的。

【关键词】 消瘀丸; 胫骨骨折后瘀肿损伤; 炎症; 氧化应激; 肠道菌群

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)10-1147-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Oct.; 19(10):1147-1152, 1157.]

Xiaoyu Pill alleviates post tibial fracture stasis injury in mice by regulating the MAPK/NF- κ B signaling pathway: a study on gut microbiota based on 16S rDNA sequencing technology

NIU Chicheng¹, ZENG Ping², LIU Jinfu², WANG Weiwei¹, XU Qingyuan¹, LI Hao¹, TAO Hongcheng¹, LI Jialv¹, DING Qiang¹, GUO Liang¹ (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. The second Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine)^{***}

【Abstract】 **Objective** Exploring the mechanism of Xiaoyu Pill on the injury of blood stasis and swelling after tibial fracture in mice. **Methods** Randomly divide the mice into a sham surgery group, a model group, a low-dose group of Xiaoyu Pill (XYW) [2.0 g/kg·d], a high-dose group of Xiaoyu Pill (XYW) [4.0 g/kg·d], and a positive drug group [Sanqi Shang Yao Pian, National Medical Standard Z61020090, 0.33 g, 0.4 g/kg·d]. The sham group of mice made wounds and stitched them up, while the other four groups were used to create models of tibial fractures in mice. From 7 days before modeling to 5 days after modeling, each treatment group was given gastric gavage. The sham surgery group

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 82160913)。

^{**} **【通讯作者】** 曾平, E-mail: zengp@gxcmu.edu.cn

【作者简介】 牛驰程(1995-), 男, 河南安阳人, 广西中医药大学硕士在读, 主要研究骨关节退变与缺血性疾病的中医防治研究。E-mail: niuchicheng2023@stu.gxcmu.edu.cn

and model group were given equal doses of distilled water by gastric gavage, while the Xiaoyu Pill group was given “Xiaoyu Pill Water Solution” by gastric gavage. The positive drug group was given Sanqi Shangyao Tablet Water Solution by gastric gavage. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect pathological damage and measure stasis injury after tibial fracture. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used to detect the levels of chemotactic factor (MCP-1), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (malondialdehyde), and superoxide dismutase (superoxide dismutase) (SOD) in various groups of mice. α (TNF- α) levels, as well as superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and reduced glutathione (GSH). Western blot (WB) technique was used to detect heme oxygenase 1 (HO-1), quinone oxidoreductase NADH 1 [NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1], nuclear transcription factor E2-related factor 2 (Nrf2), nuclear factor- κ B-p65 (NF- κ Bp65) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) protein expression levels in mouse muscle tissue. By using 16S rDNA sequencing to detect changes in mouse gut microbiota, potential mechanisms of stasis and swelling damage caused by XYW treatment of mouse fractures were explored.

Results Compared with the model group, XYW significantly improved the degree of contusion and swelling injuries in mice, reduced the levels of serum inflammatory factors, and alleviated oxidative stress damage. HE staining results indicated that the inflammatory infiltration in the muscle tissue of contusion and swelling injuries was significantly improved in the XYW group. Western blot results showed that, compared with the model group, XYW significantly increased the expression of HO-1, NQO1, and Nrf2 proteins, and significantly decreased the expression of NF- κ Bp65 and p38MAPK proteins in the muscle tissue of contusion and swelling injuries. 16S rDNA sequencing results indicated that XYW improved the gut microbiota dysbiosis in mice after tibial fractures.

Conclusion The above results indicate that XYW can protect against contusion and swelling injuries caused by fractures in mice. This protective effect may be achieved by regulating the MAPK/NF- κ B signaling pathway, reducing the expression levels of inflammation and oxidative stress-related factors in the serum, decreasing muscle oxidative damage, improving the pathological damage in contused muscles, and ameliorating gut microbiota dysbiosis.

【Keywords】 Xiaoyu Pill; stasis and swelling injury after tibial fracture; inflammation; oxidative stress; intestinal microbiota

骨折是各种暴力损伤导致的骨结构连续性部分甚至完全断裂的常见外伤性疾病^[1]。随着工业化进程和交通系统的发展,生产安全以及交通事故所导致的骨折发生率亦不断升高^[2]。多数骨折通常导致肿胀、疼痛以及功能障碍等局部表现,严重者可引起发热、内脏损伤、休克等全身反应^[3]。胫骨作为人体小腿双骨之一,其发生骨折为膝关节常见的骨折类型,发病率占全身骨折的 13.7%,主要由于外界直接或间接暴力造成,以胫骨干远端骨折最为常见^[4]。胫骨骨折常见临床表现有小腿局部肿胀、畸形明显、疼痛以及活动异常等。骨折最基本的治疗原则为复位、固定和功能锻炼,多数患者经恰当、及时的治疗能够恢复肢体功能^[5]。由于外科手术具有能够有效复位骨折端、可进行加强固定的优势,有利于患者恢复以及早期康复锻炼,因此,目前手术治疗仍作为骨折的主要治疗手段之一^[6]。对于胫骨骨折治疗的关键是快速恢复患肢的长度、持重和对线功能。目前,临床上治疗胫骨骨折的方法有复位内固定术、牵引以及石膏固定等,由于复位固定手术具有能够有效复位骨折端、可进行加强固定的优势,有利于患者恢复以及早期康复锻炼^[7]。但复位固定术也存在一定的不足,如并发皮肤切口感染、诱发关节僵硬等一系列并发症,影响患者术后康复及功能。因此,如何有效减少、避免术后并发症的发生、促进病人术后

关节功能恢复成为临床医师关注的热点和难点。

消瘀丸为广西中医药大学第一附属医院骨二科治疗胫骨骨折的常用方,具有活血化瘀、行气止痛的功效,基于此,本研究观察并分析消瘀丸对小鼠胫骨骨折后瘀肿损伤的作用机制,结果报告如下。

材料与方法

1 动物和仪器

1.1 实验动物 健康 2 月龄雄性 C57BL/6 小鼠 50 只,体质量(20 $\pm$ 2)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2019-0004。饲养于广西中医药大学科学实验中心动物房,每笼 10 只,适应性喂养 1 周。本研究经广西中医药大学伦理委员会审查(批号:DW-20220726-174)。

1.2 试剂与仪器 0.9%氯化钠注射液,南京正大天晴制药有限公司产品;丙二醛(MDA)ELISA 试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)ELISA 试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒、白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA 试剂盒、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1),上海酶联生物科技有限公司产品;血红素氧合酶 1(heme oxygenase 1, HO-1)抗体(货号 43934S)、醌氧化还原酶 NADH1 [NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1]抗体

(货号 62273S)、核转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear transcription factor E2-related factor 2, Nrf2) 抗体(货号 12746S)、核因子- κ B[nuclear factor- κ B]-p65, NF- κ B p65] 抗体(货号 64921S)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 抗体(货号 54470S), 美国 Cell Signaling Technology 公司产品; HRP 标记山羊抗兔二抗、HRP 标记山羊抗鼠二抗、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、苏木素-伊红(HE)染色液试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司产品。

全波长酶标仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 生产; 垂直电泳转印系统, 美国 Bio-Rad 公司生产; Excelsior ES 型全自动脱水机、美国 Thermo Fisher Scientific 生产; Histocentre 3 型石蜡包埋机、Finesse 325 型轮转式切片机、Varistain Gemini ES 型全自动染色机、X71 型自动光学照相生物显微镜, 日本 Olympus 公司生产; Leica EM FC6 冷冻超薄切片机, 德国 Leica 公司生产; Hermo Scientific LTQ-Oribitrap 高分辨质谱联用仪、Vanquish 超高效液相色谱仪, 美国 ThermoFisher 公司生产。

2 方法

2.1 动物分组及造模 将小鼠随机分为假手术组、模型组、消癥丸(XYW)低剂量组[2.0 g/(kg·d)]、消癥丸(XYW)高剂量组[4.0 g/(kg·d)]和阳性药组[三七伤药片, 国药准字 Z61020090, 0.33 g, 0.4 g/(kg·d)]。假手术组制造胫骨前肌肉、筋膜损伤并处理伤口, 其余 4 组均进行小鼠胫骨骨折模型, 于造模前 7 d 至造模后 5 d 对各给药组给予灌胃给药, 假手术组、模型组给予等剂量蒸馏水灌胃, 消癥丸组用“消癥丸水溶液”灌胃, 阳性药组用三七伤药片水溶液灌胃。胫骨骨折小鼠造模方法: 采用 1%戊巴比妥钠将小鼠进行腹腔注射麻醉, 剂量按照 1 mL/kg, 麻醉后备皮, 将小鼠右下肢进行消毒, 于右膝关节下纵向切开约 0.5 cm, 由髌腱处插入 4.5 号注射器针头, 于胫骨中上 1/3 处将肌肉、筋膜分离, 使用 11 号手术刀片切断胫骨并用 0.9%生理盐水冲洗胫骨表面, 将针头插入胫骨以进行髓内固并对合。逐层缝合切口, 制成胫骨骨折模型小鼠。

2.2 小鼠体质量变化测量 不同时间点(造模前 1 d 和造模后 1、3、5 d)小鼠体质量。

2.3 HE 染色检测 小鼠后肢肌肉组织病理学形态造模后 5 d 麻醉后处死小鼠, 取肌肉组织, 常规脱水、石蜡包埋切片、HE 染色以备光镜检测。

2.4 ELISA 检测 小鼠血清中炎症因子水平造模后 5 d 将小鼠麻醉, 打开腹腔取腹主动脉取血, 静置 30 min 后, 3 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min, 分

离血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清中 MCP-1、IL-1 β 及 TNF- α 水平。

2.5 ELISA 检测 小鼠血清中氧化应激因子水平方法同上, 按照 ELISA 试剂盒说明书对小鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)以及还原型谷胱甘肽(GSH)等氧化应激相关因子水平进行检测。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 小鼠患肢肌肉组织中 HO-1、NQO1、Nrf2、NF- κ Bp65、p38MAPK 蛋白的表达取患肢肌肉组织, 剪碎后装入 EP 管中, 并加入适量裂解液, 30 min 后, 10 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min, 取上层清液。按照 BCA 试剂盒说明书, 等比例加入 5 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液, 封口膜进行密封, 并于沸水中煮沸 10 min。取等量蛋白进行电泳, 转膜, 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 加入相应的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 第 2 d 用封闭液稀释 HRP 标记的二抗室温 2 h, 使用 ECL 发光液。采用凝胶图像分析系统对 Western blot 蛋白杂交条带进行扫描, 采用 ChemiScope Capture 图像采集系统采集图像, 并使用 ImageJ 软件分析条带灰度值。

2.7 16S rDNA 技术检测 小鼠肠道菌群处死前留取小鼠粪便, 于无菌冻存管内冷冻储存。根据 E. Z. N. A.[®] Stool DNA Kit 试剂盒说明书提取各组小鼠粪便总 DNA, 对选定的 V3~V4 可变区域进行扩增。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s、变性 10 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延展 45 s、最终延展 10 min, 4 $^{\circ}$ C 停火, 共循环 35 次。采用 AMPure XP 磁珠纯化扩增产物形成文库, 使用 Illumina Novaseq 测序平台进行 16S rDNA V3~V4 区测序。

3 统计分析

计量资料以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较符合正态分布采用 t 检验, 否则采用非参数检验。应用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般情况

各组小鼠造模后进食量明显减少, 精神萎靡, 毛发粗糙且缺少光泽, 活动受限, 其中模型组小鼠上述表现较明显, 体质量明显减轻($P < 0.05$)(图 1), 而消癥丸(XYW)低剂量组和消癥丸(XYW)高剂量组干预 5 d 后进食量增加, 精神状态、活跃程度以及毛色均得到改善。

2 小鼠患肢肌肉组织病理损伤情况

病理结果显示, 假手术组小鼠患肢肌肉组织可见少量炎性细胞浸润; 模型组小鼠可见大量炎性细胞浸润, 消癥丸(XYW)低剂量组、消癥丸(XYW)高剂量组

和阳性药组小鼠患肢肌肉组织中炎症细胞有所减少(图2)。表明消癭丸能够改善胫骨骨折模型小鼠患肢肌肉组织的病理损伤。

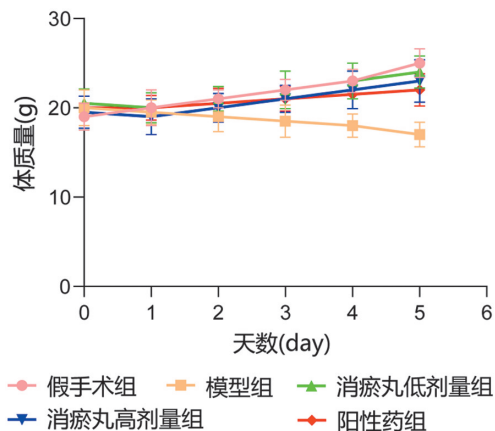
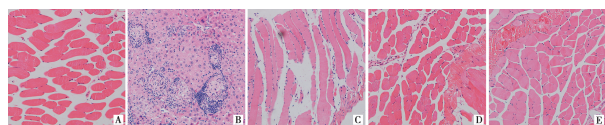


图1 各组小鼠体重变化

Fig. 1 Changes in body weight of mice in each group



A 假手术组 B 模型组 C 消癭丸低剂量组 D 消癭丸高剂量组 E 阳性药物组

图2 各组小鼠肌肉组织病理

A Sham-operated group B Model group C Low dose group of XYW D High dose group of XYW E Positive drug group

Fig. 2 Pathology of muscle tissue in each group of mice

3 各组小鼠血清炎症指标水平

干预5 d后,假手术组、模型组、消癭丸低剂量组、消癭丸高剂量组、阳性药物组 MCP-1、IL-1 β 及 TNF- α 水平分别为 11.53、20.14、14.62、15.73、17.39 pg/mL, 18.92、29.08、23.47、24.98、26.56 pg/mL, 6.73、13.42、8.10、9.24、10.44 pg/mL。

与假手术组比较,模型组小鼠血清中 MCP-1、TNF- α 以及 IL-1 β 水平均明显上调($P < 0.05$);与模型组比较,消癭丸(XYW)低剂量组、消癭丸(XYW)高剂量组和阳性药组小鼠血清中上述炎症因子水平均明显下调($P < 0.05$)。表明消癭丸能够抑制胫骨骨折模型小鼠血清中炎症因子的表达,具有显著的抗炎作用。

4 各组小鼠血清氧化应激指标水平

干预5 d后,假手术组、模型组、消癭丸低剂量组、消癭丸高剂量组、阳性药物组 SOD、GSH 及 MDA 水平分别为 1.13、0.56、0.81、0.94、0.77 ng/mL, 11.02、6.98、9.91、9.35、8.5 ng/mL, 110.49、189.06、156.82、145.05、169.12 mmol/L。

与假手术组比较,模型组小鼠血清中 SOD 以及 GSH 水平均明显下调,而 MDA 水平明显上调($P < 0.05$);与模型组比较,消癭丸(XYW)低剂量组、消癭

丸(XYW)高剂量组和阳性药组小鼠血清中 SOD 以及 GSH 水平均明显上调,而 MDA 水平明显下调($P < 0.05$)。表明消癭丸具有显著的抗氧化应激作用。

5 各组小鼠肌肉组织中抗氧化指标水平

假手术组、模型组、消癭丸低剂量组、消癭丸高剂量组、阳性药物组小鼠肌肉组织中 HO-1、NQO1、Nrf2、NF- κ Bp65、p38MAPK 蛋白表达水平分别为 0.91、0.49、0.59、0.71、0.79、1.12、0.69、0.85、0.89、0.95、0.88、0.56、0.69、0.72、0.79、2.65、3.72、2.56、2.45、2.55、2.83、3.89、3.34、3.41、3.58。

相较于假手术组,模型组小鼠肌肉组织中 HO-1、NQO1、Nrf2 蛋白表达均明显下调($P < 0.05$),NF- κ Bp65、p38MAPK 蛋白表达均明显上调($P < 0.05$);相较于模型组,消癭丸低剂量组、消癭丸高剂量组和阳性药组小鼠肌肉组织中 HO-1、NQO1、Nrf2 蛋白表达均明显上调($P < 0.05$),NF- κ Bp65、p38MAPK 蛋白表达均明显下调($P < 0.05$)(图3)。

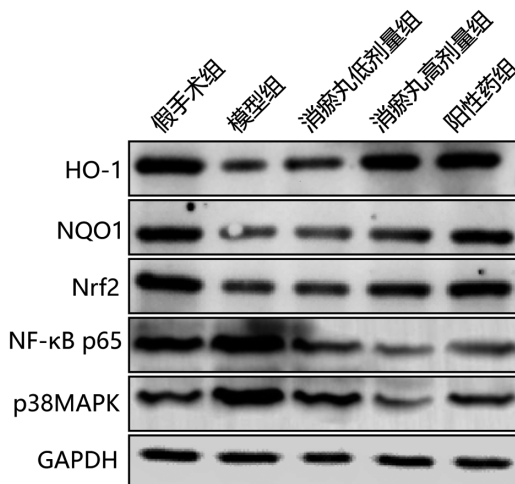


图3 各组小鼠肌肉组织中抗氧化指标水平

Fig. 3 Antioxidant index levels in muscle tissue of mice in each group

6 各组小鼠肠道菌群比较

干预5 d后,假手术组、模型组、消癭丸低剂量组、消癭丸高剂量组小鼠肠道菌群 Simpson 指数和 Shannon 指数分别为 0.83、0.65、0.69、0.72、1.17、0.80、0.85、0.89。模型组小鼠肠道菌群 Simpson 指数和 Shannon 指数相较于假手术组均明显降低($P < 0.01$);而消癭丸低剂量组、消癭丸高剂量组的 Simpson 指数和 Shannon 指数相较于模型组均有所增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

模型组小鼠的肠道菌群丰度和多样性较假手术组减少,消癭丸低剂量组、消癭丸高剂量组的 α 多样性相较于模型组回调;相较于假手术组,模型组小鼠肠道菌群 β 多样性发生变化,而消癭丸低剂量组、消癭丸高剂量组小鼠肠道菌群 β 多样性分布趋向于假手术组。见

图 6。在门水平上,各组小鼠主要由拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)组成。在属水平上,各组小鼠主要由乳酸菌属(Lactobacillus)、瘤胃球菌属(Ruminococcus)、拟杆菌属(Bacteroides)、颤螺菌属(Oscillospira)组成。在门水平丰度中,变形菌门和放线菌门在模型组丰度均升高,而在消癥丸低剂量组、消癥丸高剂量组丰度明显下降($P<0.05$)。在属水平丰度中,与假手术组比较,模型组中瘤胃球菌属、拟杆菌属的丰度相较于假手术组均有所升高($P<0.05$);消癥丸低剂量组、消癥丸高剂量组二者相较于模型组丰度均有所下降($P<0.05$)(图 4)。

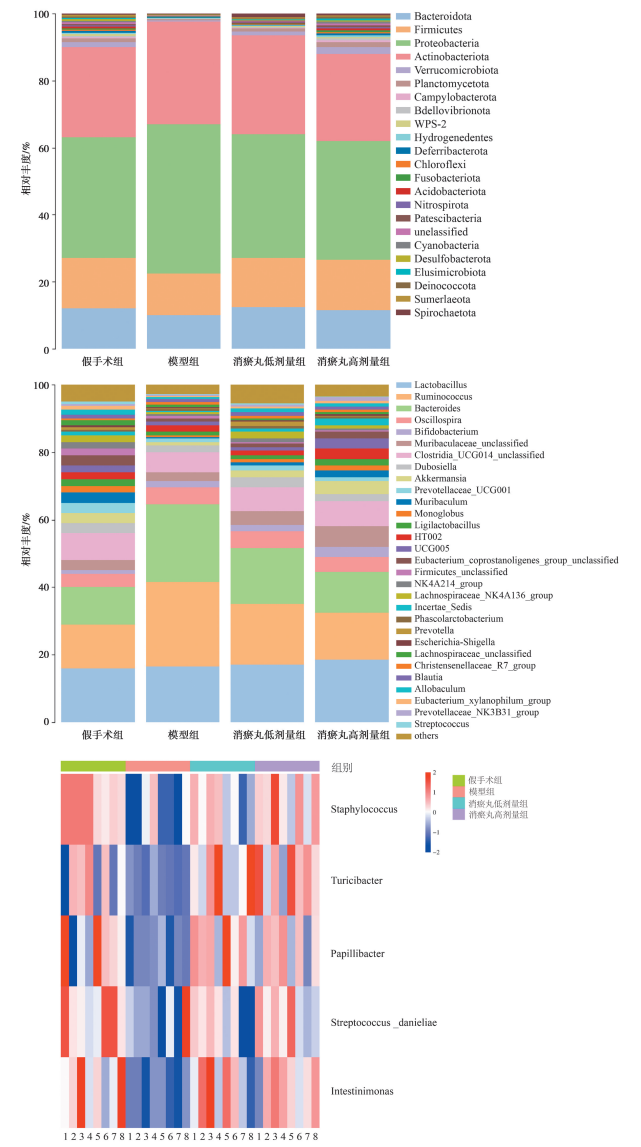


图 4 各组小鼠肠道菌群丰度和多样性比较
Fig. 4 Comparison of abundance and diversity of gut microbiota in different groups of mice

讨论

胫骨的解剖结构薄弱处在其中下段 1/3 交界位置,容易受暴力损伤,因此胫骨是四肢长骨中最易发生

骨折的位置^[8]。正常情况下,髓内滋养动脉供应胫骨干内层 2/3 的血液,而骨膜血管负责供应外层 1/3 的血液。当胫骨发生骨折时,通常会损伤滋养动脉,造成胫骨的血液供应减少,不仅不利于骨折的愈合,导致胫骨延迟愈合或者不愈合的发生,而且还会增加感染、关节僵硬粘连的机会^[9]。骨折愈合受多方面因素影响,是一个复杂的再生过程,且伴有不同程度的疼痛和功能障碍,因此寻求安全有效的方法以提高骨折愈合疗效、缩短愈合时间具有重要的临床意义^[10]。

传统医学认为骨折后的病理改变为气滞血瘀,气血不畅且瘀于肌肤腠理,则易令患肢青紫肿胀,瘀肿的消退则是“去瘀”、“新生”的过程,因此活血化瘀的治疗原则能够有效促进瘀肿的消退^[11]。本研究方选广西中医药大学第一附属医院骨二科消癥丸,由当归、红花、桃仁、瞿麦、生地、槟榔、血竭、甘草、荆芥、黄芩、木香、丹皮、乳香、没药、川芎、香附、神曲、苏木等药物组成。中药内服以活血化瘀、行气止痛为法,方中当归活血养血,祛瘀不伤正为君药。乳香,没药活血定痛,消肿生肌;桃仁破血行滞而润燥,红花活血祛瘀以止痛;合苏木活血祛瘀,消肿止痛;合血竭活血定痛,化瘀止血共为臣药。生地甘寒,清热凉血,滋阴养血;合丹皮清热凉血,活血化瘀;合黄芩清热燥湿,止血;合瞿麦清热活血通经;四者养血益阴,清热活血为佐药。槟榔行气利水;木香,香附行气止痛;川芎辛散温通;荆芥祛风消瘀;神曲消积化滞;亦为佐药。甘草调和诸药,为使药。合而用之,使血活瘀化气行。

核因子- κ B(nuclear factor-kappa B)家族主要由 P50、P52、P65(Rel A)、Rel B 及 c-Rel 等组成,它们两两结合可形成不同的转录因子,其中分布最为广泛的是由 p50 和 Rel A 组成的异源二聚体。其在细胞质中常和 NF- κ B 抑制性蛋白(Inhibitor of NF- κ B, I κ B)结合成三聚体复合物,两者结合时能够阻止 NF- κ B 进行核转位,使其处于无生物学活性状态^[12-13]。细胞受到信号刺激后, I κ B 激酶复合物(I κ B kinase complex, IKK)被激活,发生磷酸化的 I κ B 失去对 NF- κ B 的抑制作用,促使 NF- κ B 进入细胞核,并与目标基因增强子或启动子序列结合使其转录及表达^[14-15]。作为介导细胞内信号转导的核转录因子, NF- κ B 在氧化应激和炎症反应具有重要作用,能诱导下游多种炎症因子的目的基因转录,是炎症信号转导的主要通路。单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)属于 CC 趋化因子家族成员,又被称为趋化因子配体 2(C-C motif ligand 2, CCL2),是单核细胞有效的趋化因子^[16-17]。广泛表达于内皮细胞、上皮细胞、系膜细胞、单核细胞、纤维母细胞、平滑肌细胞以及星形胶质细胞和小胶质细胞等,这些细胞在末梢循环和组织中

发挥关键的抗病毒免疫反应作用^[18]。MCP-1 可通过调控单核细胞-巨噬细胞和 T 淋巴细胞等多种免疫细胞的迁移及募集参与炎症反应的发生发展。MCP-1 还可活化并募集嗜碱性粒细胞,提高游离钙水平,诱导嗜碱性粒细胞脱颗粒并释放组胺等多种生物因子,导致组织的免疫炎症损伤^[19-20]。因此,降低 MCP-1 在血清或组织中的活性或抑制其高表达可缓解炎症反应及免疫损伤。白介素-1(IL-1)存在 IL-1 α 和 IL-1 β 两种异构体,IL-1 β 通常被释放到细胞外,通过作用于其他细胞发挥生物效应,是炎症免疫反应的初始调控因子^[21-22]。IL-1 β 主要由单核-巨噬细胞受脂多糖的刺激而产生,此外被淋巴细胞、树突状细胞、NK 细胞等激活所有有核细胞也可产生^[23]。作为经典的炎症调节剂,可诱发机体防御反应及多种免疫炎症反应。研究表明,IL-1 β 能够活化巨噬细胞及粒细胞,诱导血管内皮细胞表达细胞黏附分子,并可刺激其他炎症因子的产生^[24-25]。TNF- α 是一种多肽激素,来源比较广泛,体内的多种细胞如淋巴细胞、平滑肌细胞、单核-巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞等均可产生,被认为是炎症细胞因子链锁中的第 1 个细胞因子^[26-27]。其不仅能够活化 T 细胞,促进 IL-1、IL-2、IL-6 的产生及分泌;激活单核-巨噬细胞使其分泌多肽细胞因子而发挥诸多生物活性;还可抗病毒及细菌、影响其他细胞的生长、分化。TNF- α 作为机体炎症反应和免疫应答的重要调节因子,能刺激机体表达多种黏附分子、过多的 ECM 和炎症介质^[28]。研究表明,外界损伤可刺激内皮细胞释放 TNF- α ;TNF- α 除了对血管内皮细胞具有直接细胞毒作用,引起内皮细胞的损伤^[29]。

α 多样性指数可以反映肠道菌群的丰富度和均匀度,主要包括 Shannon 指数和 Simpson 指数; β 多样性分析是指样本间物种差异性,本研究中,干预 5 d 后,模型组小鼠肠道菌群 Simpson 指数和 Shannon 指数相较于假手术组均明显降低($P < 0.01$);而消癍丸低剂量组、消癍丸高剂量组的 Simpson 指数和 Shannon 指数相较于模型组均有所增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。此外,模型组小鼠的肠道菌群丰度和多样性较假手术组减少,消癍丸低剂量组、消癍丸高剂量组的 α 多样性相较于模型组回调;相较于假手术组,模型组小鼠肠道菌群 β 多样性发生变化,而消癍丸低剂量组、消癍丸高剂量组小鼠肠道菌群 β 多样性分布趋向于假手术组,表明消癍丸能够调节胫骨骨折小鼠肠道菌群丰度和多样性。

综上所述,消癍丸能够通过调控 MAPK/NF- κ B 信号通路,抑制其下游氧化应激及炎症反应,并调节肠道菌群丰度和多样性,从而减轻小鼠胫骨骨折后瘀肿损伤。本研究存在不足,样本量较少,菌群分析方法简

单,虽然发现骨折小鼠与肠道菌群紊乱有关,但对临床骨折患者是否预防性进行维持肠道菌群稳定的治疗尚不足以下结论,仍需要进一步临床试验,以及更大样本、更精确的研究方法来验证和明确。

【参考文献】

- [1] 凌中华,冯金柱.胫骨干骨折合并隐匿性后踝骨折情况及危险因素[J].中国中医骨伤科杂志,2024,32(5):41-45,49.
- [2] 李文娟,潘美民,刘阳珍,等.益生菌调节肠道微生物群/Nrf2/HO-1 信号通路对高脂喂养大鼠非酒精性脂肪肝的影响[J].中国病原生物学杂志,2024,19(1):42-46.
- [3] 段锦涛,秦哈,牛金龙,等.关节镜下免打结锚钉结合双束高强度缝线重建前交叉韧带胫骨止点撕脱骨折[J].中国中医骨伤科杂志,2024,32(5):79-83.
- [4] 叶龙城,刘彬,廖伟斌,等.关节镜下不可吸收线“8”字缝合技术治疗前交叉韧带胫骨止点撕脱骨折的疗效分析[J].中国骨与关节杂志,2024,13(4):304-309.
- [5] 叶积飞,苏琳琳.Schatzker II、III 型胫骨平台骨折外侧关节面塌陷 X 线片表现与内侧副韧带损伤的相关性研究[J].中国骨与关节损伤杂志,2024,39(4):410-412.
- [6] 李鹏,郝建学,李正,等.全镜下单纯前入路与后内侧辅助入路治疗 Meyers-McKeever II 型后交叉韧带胫骨止点撕脱骨折的临床对比研究[J].生物骨科材料与临床研究,2024,21(2):48-52.
- [7] 陈黎明,赵云珍.改良前外侧联合后内侧入路内固定治疗胫骨平台骨折[J].临床骨科杂志,2024,27(2):261-264.
- [8] 王国胜,昝蓉莉,续斌.不同手术入路对复杂胫骨平台双髁骨折患者临床指标及功能恢复的影响[J].中国临床医生杂志,2024,52(4):441-444.
- [9] 郭华,黄凌岸,李皓乾,等.自体骨移植与骨替代物手术治疗胫骨平台骨折的 Meta 分析[J].中国骨伤,2024,37(3):300-305.
- [10] 何炜,许兆光,林蔚莘,等.锁定接骨板治疗胫骨中下段关节外骨折术后延迟愈合的危险因素分析[J].中国骨伤,2024,37(2):148-152.
- [11] 李启义,张江涛,常守亚.益气活血通络汤与低分子肝素抗凝对大鼠骨折愈合、血液流变学及 TGF- β 1 表达的影响[J].中国老年学杂志,2024,44(4):972-976.
- [12] 赵瑜潇,胡玉菲,王秀艳,等.缬草酸调控 Sirtuin1/NF- κ B 通路抑制骨折后深静脉血栓形成[J].生物技术,2023,33(6):772-777.
- [13] 方红育,黄涛,周少怀,等.川陈皮素通过抑制 STING/NF- κ B 信号通路促进骨质疏松大鼠的骨折愈合[J].免疫学杂志,2023,39(10):857-864.
- [14] 杨玉东,董东,阎文军.RIG-I/NF- κ B 信号通路在老龄小鼠围术期神经认知障碍中的作用[J].宁夏医科大学学报,2023,45(8):792-798,808.
- [15] 王布飞,陈聪,李建红.Lnc-NEAT1 吸附 miR-1224 激活 NF- κ B 通路促进 SCI 大鼠骨质流失[J].广东医学,2023,44(6):712-719.
- [16] 王小虎,赵波,喻少敏,等.开放性骨折患者术后血清 TLR-2、MCP-1、IL-6 水平与感染的关系[J].疑难病杂志,2023,22(03):305-310.
- [17] 谭荣雄,蔡杰钦,李健,等.单核细胞趋化蛋白-1 的形成及其在骨重建中的作用[J].海南医学,2021,32(10):1317-1320.

(下转 1157 页)

与常规治疗组,两组患者治疗前各项血脂水平对比无差异。治疗 6 个月后,联合治疗组患者 TC、TG、LDL-C、HDL-C 改变程度显著优于常规治疗组患者。与梁莹玲等^[9]研究结果相近。脂质代谢出现紊乱是冠状动脉粥样硬化斑块形成的重要机制之一,血脂水平可作为评估冠心病治疗效果的重要指标之一^[14]。研究发现,对于 Hp 感染的早期诊断和治疗可有效降低急性心脑血管疾病的发生率,根除 Hp 后可阻断患者炎症反应,冠脉发生再狭窄的情况显著减少^[15]。

综上所述,本次研究显示冠心病患者 Hp 感染率高于健康人群,Hp 阳性患者血脂、炎症因子水平高于 Hp 阴性患者,Hp 感染可能影响人体脂质代谢功能而导致冠心病的发病。通过对 Hp 冠心病患者联合进行抗幽门螺杆菌治疗,治疗后效果高于常规治疗,患者血脂水平得到明显改善,有效提升治疗效果。

【参考文献】

- [1] Bodkhe S, Jajoo SU, Jajoo UN, et al. Epidemiology of confirmed coronary heart disease among population older than 60 years in rural central India-A community-based crosssectional study[J]. Indian Heart J, 2019, 71(1): 39-44.
- [2] Moran A, Gu D, Zhao D, et al. Future cardiovascular disease in China: Markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model-China [J]. Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes, 2020, 13(3): 243-252.
- [3] Ellis RW. Infection and coronary heart disease [J]. J Med Microbiol, 2017, 46(7): 535-539.
- [4] Mandal AK, Kafle P, Puri P, et al. An association of *Helicobacter pylori* infection with endoscopic and histological findings in the Nepalese population[J]. J Family Med Prim Care, 2019, 8(3): 1227-1231.
- [5] 干汶, 宗力群, 胡荣, 等. 幽门螺杆菌感染与颈动脉斑块及心血管

病危险因素的关系[J].中国医药,2016,11(10):1442-1446.

- [6] Sun J, Rangan P, Bhat SS, et al. A meta-analysis of the association between *Helicobacter pylori* infection and risk of coronary heart disease from published prospective studies[J]. *Helicobacter*, 2016, 21(1): 11-23.
- [7] Shmueli H, Wattad M, Solodky A, et al. Association of *Helicobacter pylori* with coronary artery disease and myocardial infarction assessed by myocardial perfusion imaging[J]. *Israel Medical Association Journal*, 2014, 16(6): 341-346.
- [8] 魏保生. 心血管病学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 388-393.
- [9] 梁莹玲. 伴幽门螺杆菌感染的冠心病患者予以联合根除幽门螺杆菌的疗效评价[D]. 南华大学, 2018.
- [10] Waisberg DR, de Mello ES, Tustumi F, et al. A case report of diffuse hyperplastic gastropathy with multiple polypoid formations in a patient with pernicious Anemia, *Helicobacter pylori* infection, hypergastrinemia and hypoalbuminaemia; do not forget of Menetrier's disease[J]. *Int J Surg Case Rep*, 2020, 77: 498-502.
- [11] 李昭. 幽门螺旋杆菌感染与冠心病危险因素及冠状动脉狭窄程度的相关性研究[D]. 三峡大学, 2019.
- [12] Consolazio A, Borgia MC, Ferro D, et al. Increased thrombin generation and circulating levels of tumour necrosis factor- α in patients with chronic *Helicobacter pylori*-positive gastritis[J]. *Al Pharmacol Therap*, 2020, 20(3): 289-294.
- [13] 曾帮智, 张博, 袁博, 等. 幽门螺杆菌感染对冠心病患者血清炎症因子及颈动脉硬化的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(4): 444-447.
- [14] 王少君, 邹德玲, 任丽, 等. 幽门螺旋杆菌感染对老年急性冠状动脉综合征患者炎症因子、血脂指标和冠状动脉狭窄程度的影响[J]. *疑难病杂志*, 2018, 17(10): 1099-1103.
- [15] Kowalski M, Pawlik M, Konturek JW, et al. *Helicobacter pylori* infection in coronary artery disease[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2016, 57(12): 101.

【收稿日期】 2024-05-03 【修回日期】 2024-07-29

(上接 1152 页)

- [18] 叶林. 血管钙化患者血浆 TGFβ1、MCP-1 表达水平与腹主动脉钙化及骨密度之间的关系[D]. 石河子大学, 2023.
- [19] 陈余兴, 王贵, 黎尊成. 开放性骨折患者术后切口感染病原菌及血清 MCP-1、bFGF、miR-223 的预测价值[J/OL]. 中华医院感染学杂志, 2024(9): 1374-1378.
- [20] 苏哲. 间断 PTH 1-34 治疗绝经后骨质疏松症致血浆 MCP-1 的早期变化[D]. 天津医科大学, 2019.
- [21] 刘静, 姜明霞. 炎症细胞因子 IL-1β 和 IL-6 在老年 2 型糖尿病合并骨质疏松患者血清中的表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(3): 590-593.
- [22] 阮原芳, 林敏, 翁荔芳, 等. 不同入路 LCP 内固定术对 Fernandez III、IV 型桡骨远端骨折患者治疗效果及血清 IL-6、IL-1β 的影响[J]. 中国医学创新, 2022, 19(34): 134-139.
- [23] 姜万嵩, 韩庚奋, 刘成, 等. 踝关节骨折后创伤性骨性关节炎患者外周血 IL-1β 和 MMP-13 水平及其与关节功能的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(5): 171-175.
- [24] 李刚, 孙劲松, 李伟, 等. CRP、TNF-α、IL-1β 联合检测在创伤性肋骨骨折术后骨化性肌炎中的应用价值[J]. 解放军医药杂志,

- 2022,34(6):59-62.
- [25] 席水燕,亢向辉.前侧与外侧锁定钢板内固定踝关节融合术对创伤性踝关节骨性关节炎患者踝关节功能、IL-1 β 、IGF-1 水平的影响[J]. 临床医学研究与实践,2022,7(1):74-77.
- [26] 朱振华,左志城,周聚普,等. VEGF/Akt 信号通路在骨折大鼠愈合中作用机制及对炎症因子 IL-6、TNF- α 的影响[J]. 中国老年学杂志,2024,44(3):696-700.
- [27] 李莹,杨卓,汪涛,等. 治伤巴布剂对大鼠早期骨折愈合及对炎症因子 TNF- α 水平的影响[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2024,36(1):51-55.
- [28] 徐棒棒.活血止痛方辅助切开内固定手术治疗胫骨骨折的疗效及对 hs-CRP、TNF- α 和 IL-6 水平的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2023,33(19):2389-2392.
- [29] 韩金海,陈志远,杜伟强.股骨颈骨折术后骨折延迟愈合的危险因素及其相关性分析[J]. 中国烧伤创疡杂志,2023,35(4):306-309.

【收稿日期】 2024-05-27 【修回日期】 2024-08-19