

# 黑布药膏对兔耳增生性瘢痕胶原合成与降解的影响

赵丽<sup>1,2</sup>, 周晓宏<sup>2</sup>, 关洪全<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032; 2. 辽宁卫生职业技术学院, 沈阳 110101)

**[摘要]** **目的:**研究黑布药膏对兔耳增生性瘢痕 I, III 胶原及基质金属蛋白酶-1 mRNA 表达的影响。**方法:**成年大耳白兔 24 只, 随机分为正常对照组、瘢痕模型组和黑布药膏治疗组。瘢痕模型组和黑布药膏治疗组建立兔耳腹侧面增生性瘢痕动物模型, 21 d 后, 造模成功。在黑布药膏治疗组瘢痕局部和正常对照组对应皮肤涂抹黑布药膏, 每 3 d 1 次, 每次 1 g, 连续用药 56 d。在用药后第 2, 4, 6, 8 周分别切取两组瘢痕组织, 通过实时定量 PCR (RT-PCR) 法检测 I, III 胶原 mRNA 及基质金属蛋白酶-1 mRNA 的表达。**结果:**瘢痕模型组与正常对照组比较 I 胶原 mRNA 表达显著增强, III 胶原 mRNA 及基质金属蛋白酶-1 mRNA 表达显著减弱 ( $P < 0.01$ )。黑布药膏治疗组在用药后第 2, 8 周 I 胶原 mRNA 表达分别为  $(3.62 \pm 1.70)$ ,  $(1.34 \pm 0.52)$ ; 模型对照组第 2, 8 周 I 胶原 mRNA 表达分别为  $(3.15 \pm 1.24)$ ,  $(4.53 \pm 1.71)$ , 黑布药膏治疗组较模型组显著减弱 ( $P < 0.01$ ); 黑布药膏治疗组在用药后第 2, 8 周 III 胶原 mRNA 表达分别为  $(1.46 \pm 0.34)$ ,  $(2.59 \pm 0.35)$ , 模型对照组 III 胶原 mRNA 表达分别为  $(0.88 \pm 0.14)$ ,  $(0.37 \pm 0.08)$ , 黑布药膏治疗组较模型组显著增强 ( $P < 0.01$ ); 黑布药膏治疗组在用药后第 2, 8 周基质金属蛋白酶-1 mRNA 表达分别为  $(1.77 \pm 0.40)$ ,  $(4.76 \pm 0.77)$ , 模型对照组第 2, 8 周基质金属蛋白酶-1 mRNA 表达分别为  $(0.53 \pm 0.14)$ ,  $(0.34 \pm 0.04)$ , 黑布药膏治疗组较模型组显著增强 ( $P < 0.01$ )。**结论:**黑布药膏可以通过抑制 I 型胶原 mRNA 的表达, 促进 III 型胶原、基质金属蛋白酶-1 mRNA 的表达, 增加胶原酶含量, 降低瘢痕组织胶原含量, 从而抑制兔耳增生性瘢痕组织增生, 这可能是黑布药膏抑制兔耳增生性瘢痕增生的机制之一。

**[关键词]** 黑布药膏; 兔耳增生性瘢痕; I, III 胶原; 基质金属蛋白酶-1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0215-04

## Effect of Heibu Ointment on Synthetise and Degradation of Collagen in Hypertrophic Scar of Rabbit Ear

ZHAO Li<sup>1,2</sup>, ZHOU Xiao-hong<sup>2</sup>, GUAN Hong-quan<sup>1\*</sup>

(1. Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;

2. Liaoning College of Health Vocational Technology, Shenyang 110101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Heibu ointment on the expression of type I and type III collagen and MMP-1 mRNA in the hypertrophic scar of rabbit ear. **Method:** Twenty-four white rabbits were randomly divided into the normal control group, Heibu ointment treatment group and model group. Heibu ointment treatment group and model group were used to establish the models of hypertrophic scar in ears. After twenty-one days, Heibu ointment (1 g) was plastered on the hypertrophic scar in Heibu ointment treatment group and on the skin in the normal control group once every three days for 56 days. The tissue material was respectively taken on the second, the fourth, the sixth and the eighth week, the expression of type I and type III collagen and MMP-1 mRNA were detected by real time PCR (RT-PCR) technique. **Result:** Compare with the model group, the expression of type I collagen mRNA was obviously weaker ( $P < 0.01$ ), the expression of type III collagen and MMP-1 mRNA was

**[收稿日期]** 20110302(005)

**[第一作者]** 赵丽, 副教授, 博士研究生, 从事中医药美容的免疫学机制研究, Tel: 13478161671, 024-89801338, E-mail: ayouziyan@163.com

**[通讯作者]** \* 关洪全, 教授, 硕士学位, 博士研究生导师, 从事虚证免疫及其中医药调控, Tel: 024-31207071, E-mail: hongquanguan@sina.com

increased in the Heibu ointment treatment group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Heibu ointment could inhibit the expression of type I collagen mRNA and promote the expression of type III collagen and MMP-1 mRNA, thus it could inhibit the proliferation of hypertrophic scar of the rabbit ear. This maybe one of the mechanisms that the Heibu ointment inhibit the proliferation of hypertrophic scar of rabbit ear.

[**Key words**] Heibu ointment; hypertrophic scar of rabbit ear; type I and type III collagen; MMP-1

增生性瘢痕(HS)是病理性瘢痕的一种,以组织纤维化、胶原合成与降解平衡失调、胶原过度沉积为特征<sup>[1]</sup>。增生性瘢痕的形成、消长过程与胶原代谢失衡有着密切的关系。成纤维细胞增殖与活性增强导致胶原沉积及胶原降解代谢障碍是导致增生性瘢痕形成的主要机制,因此,研究胶原合成与降解的机制,寻找影响胶原合成与降解的药物是增生性瘢痕防治的研究方向。本实验用黑布药膏治疗兔耳增生性瘢痕,研究黑布药膏对兔耳增生性瘢痕胶原合成与降解的影响,探讨其对增生性瘢痕的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 大耳白兔 24 只,雌雄不拘,体重 1.5 ~ 2.0 kg,动物等级为清洁级,购于沈阳药科大学实验动物中心,许可证号 SCXK(辽)2009-6602。自由进食,实验前正常预养 1 周,实验期间为同一饲养条件及环境。

**1.2 药物** 黑布药膏(老黑醋 250 g,五倍子 100 g,蜈蚣 1.2 g,蜂蜜 100 g)购于辽宁中医药大学第一附属医院,按文献记载煎煮。将药物放入砂锅内,置于炭火上煎,熬成黑色稠膏,并在熬膏时,用玻璃棒搅匀,储存在玻璃罐中备用,并存放于 4 °C 冰箱备用,1 g 膏含生药 0.84 g。

**1.3 试剂与器材** Trizol Reagent(大连宝生物工程有限公司,批号为 RNAiso plus(D9108))、引物合成(北京华大基因公司)、荧光定量 PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司,批号为 DRR041A);小型台式离心机(美国 Sigma, 1-13)、高速冷冻离心机(美国 Sigma 31k5C 型)、PCR 扩增仪(德国 Biometra)、紫外分光光度计(英国 UV-visible Spectrometer, UV300)。

## 2 方法

**2.1 分组与造模** 大耳白兔 24 只,分笼饲养 7 d 后,将 24 只兔子随机分 3 组,即正常对照组(A 组)、瘢痕模型组(B 组)、黑布药膏治疗组(C 组),每组 8 只。A 组不施加任何处理因素,B,C 组进行 HS 造模,造模方法参照文献<sup>[2]</sup>,3% 戊巴比妥(30 mg ·

kg<sup>-1</sup>)麻醉下,用圆形钻刀在每只兔耳腹侧面沿长轴避开血管,各做 4 个直径 6 mm 的圆形全层皮肤缺损创面,深达软骨表面,每个创面间隔 2 cm 以上。术后常规抗感染,自由进食。术后 21 d,创面愈合,突出于皮肤表面,形成 HS。术后第 21 d 开始,B 组不治疗,C 组在瘢痕处涂抹黑布药膏 1 g,直径约 8 mm,厚约 2 mm,A 组在与 C 组瘢痕对应处皮肤上涂抹相同质量、面积和厚度的黑布药膏,A,C 组每 3 d 换药 1 次,连续用药 56 d。在用药后 2,4,6,8 周分别切除 B,C 组 HS 各 16 处及 A 组对应部位正常皮肤 16 处,共计取材 192 处。各组组织置于 1 mL Trizol 中,-70 °C 冻存。

**2.2 实时定量 PCR 检测 I, III 胶原及基质金属蛋白酶-1 mRNA 表达** ①抽提总 RNA 参照 Trizol 说明书采取一步法提取总 RNA,紫外分析及电泳测总 RNA 的纯度、浓度及完整性。②逆转录合成 cDNA 按照反转录反应试剂盒操作方法操作,反应条件:37 °C,15 min,85 °C,5 s。③PCR 扩增应用 ABI 7500 扩增仪。反应条件:95 °C,30 s(1 个循环)。95 °C,5 s;60 °C,34 s(40 个循环)。95 °C,15 s;60 °C,1 min;95 °C,15 s(1 个循环)。④PCR 反应设置检测文件,反应结束后,使用 Sequence Detection software version 1.2.3 软件(Applied Biosystems 公司)分析 PCR 过程每个检测样本的 Ct(Threshold cycle)值,得出 Ct 值,按公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  求出基因表达的相对变化量<sup>[3]</sup>,然后进行各组间比较。

**2.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 进行数据处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有显著意义。

## 3 结果

**3.1 大体观察** 在兔耳腹侧面形成创面后,伤口约 13 ~ 15 d 后愈合,即能触到硬块,此硬块不断高于皮面,淡红色,增生范围不超过原创沿,19 ~ 22 d 时增生到最高峰,厚度约为兔耳腹面皮肤厚度的 3 倍左右。而且随时间推移,模型组变化不大,一直处于增生状态。黑布药膏治疗组随着给药时间的延长,瘢

痕开始逐渐软化,体积逐渐缩小,趋于平复,色变淡。

**3.2 I型胶原 mRNA 表达** 与正常组比较,模型组 I型胶原 mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ ),并且随着上

皮化时间越长,降低愈明显。治疗组 I型胶原 mRNA 表达较模型组降低,从用药后 4 周开始有显著性差异( $P < 0.01$ ),并且呈明显时效关系。见表 1。

表 1 黑布药膏对兔耳增生性瘢痕 I 型胶原蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

与正常组比值

组别	剂量/g/只	用药后 2 周	用药后 4 周	用药后 6 周	用药后 8 周
正常	1	0.94 ± 0.34	1.03 ± 0.25	1.02 ± 0.20	1.13 ± 0.60
模型	-	3.15 ± 1.24 <sup>1)</sup>	9.57 ± 1.78 <sup>1)</sup>	8.81 ± 1.46 <sup>1)</sup>	4.53 ± 1.71 <sup>1)</sup>
黑布药膏	1	3.62 ± 1.70	2.68 ± 0.54 <sup>2)</sup>	2.28 ± 1.76 <sup>2)</sup>	1.34 ± 0.52 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

**3.3 III型胶原 mRNA 表达** 模型组 III型胶原 mRNA 表达较正常组降低,并且随着上皮化时间越长,降低愈明显,从上皮化后 4 周开始,与正常组比

较有显著性差异( $P < 0.01$ )。黑布药膏治疗组 III型胶原 mRNA 表达较模型组升高,并有显著性差异( $P < 0.01$ ),并且呈明显时效关系,见表 2。

表 2 黑布药膏对兔耳增生性瘢痕 III 型胶原蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

与正常组比值

组别	剂量/g/只	用药后 2 周	用药后 4 周	用药后 6 周	用药后 8 周
正常	1	1.01 ± 0.11	1.08 ± 0.44	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.18
模型	-	0.88 ± 0.14	0.77 ± 0.25 <sup>1)</sup>	0.45 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.37 ± 0.08 <sup>1)</sup>
黑布药膏	1	1.46 ± 0.34 <sup>2)</sup>	2.02 ± 0.79 <sup>2)</sup>	2.48 ± 0.31 <sup>2)</sup>	2.59 ± 0.35 <sup>2)</sup>

**3.4 基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) mRNA 的表达** 模型组 MMP-1 mRNA 表达较正常组降低,并且随着上皮化时间越长,降低愈明显,与正常组相比差异更

加显著( $P < 0.01$ )。治疗组 MMP-1 mRNA 表达较模型组明显增加,相比有显著性差异( $P < 0.01$ ),并且呈明显时效关系,见表 3。

表 3 黑布药膏对兔耳增生性瘢痕 MMP-1 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

与正常组比值

组别	剂量/g/只	用药后 2 周	用药后 4 周	用药后 6 周	用药后 8 周
正常	1	1.03 ± 0.28	1.00 ± 0.06	1.02 ± 0.24	1.01 ± 0.13
模型	-	0.53 ± 0.14 <sup>1)</sup>	0.45 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.39 ± 0.11 <sup>1)</sup>	0.34 ± 0.04 <sup>1)</sup>
黑布药膏治疗	1	1.77 ± 0.40 <sup>2)</sup>	2.91 ± 0.34 <sup>2)</sup>	3.29 ± 0.91 <sup>2)</sup>	4.76 ± 0.77 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

增生性瘢痕是组织创伤后过度修复的一种反应,表现为高出正常皮肤、发红、坚硬,有时伴有瘙痒、疼痛等不适症状。中医理论认为,瘢痕多为风火气郁,痰湿凝聚,气滞血瘀,余毒搏于肌肤所致。黑布药膏是赵炳南的经验方,其组成为:老黑醋 250 g,五倍子 100 g,蜈蚣 1.2 g,蜂蜜 100 g。方中老黑醋软坚解毒,五倍子收敛解毒,蜈蚣破瘀解毒,蜂蜜调和诸药,共奏破瘀软坚之功效。

胶原是主要的细胞外基质的主要成分,在人体皮肤中主要有 I 型和 III 型胶原,在皮肤间质结构中起着主要作用,其组成的改变将直接导致其生物学行为的异常<sup>[4]</sup>。在增生性瘢痕的形成过程中, I 型胶原的增加和 III 型胶原的减少都起着至关重要的作用,粗大的 I 型胶原是瘢痕组织的病理基础,由于 I 型胶原占据愈合创面的主体, III 型胶原网状纤维相

应减少并发生结构改变,使 I/III 型胶原的比例失调,愈合创面质地坚硬而缺乏弹性,导致增生性瘢痕的形成。胶原的降解是在机体的统一调控下由一系列酶作用降解的结果,其中 MMP-1,即胶原酶是胶原降解的关键酶,在胶原降解中起着重要的调控作用<sup>[5]</sup>,主要降解 I, II, III 型胶原。MMP-1 通过裂解胶原、改变胶原的结构以及细胞间的亲合力,使角质细胞在富含胶原的真皮上迁移覆盖创面。

本实验研究结果显示,模型组 I 型胶原 mRNA 的表达增强, III 型胶原 mRNA 的表达减弱, MMP-1 mRNA 表达降低,说明 I 型胶原纤维是瘢痕组织纤维化的物质基础,增生性瘢痕组织中胶原酶含量减少,胶原降解不足,导致胶原合成与降解失衡,胶原异常聚集,从而导致增生性瘢痕的形成。随着纤维化程度的不断加重, I 型胶原的相对表达量也越来越大; III 型胶原则越来越少, MMP-1 越来越少。经

# 钩藤对吗啡诱导的大鼠条件性位置偏爱效应的影响

王煜<sup>1</sup>, 王景霞<sup>2\*</sup>, 欧丽娜<sup>2</sup>, 李伟<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军 61716 部队门诊部, 福州 350003; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** 目的: 观察钩藤提取液对吗啡诱导的大鼠条件性位置偏爱效应的影响。方法: SD 雄性大鼠, 取经过基线测定合格的 40 只大鼠, 随机分为空白对照组、吗啡模型组(15 mg·kg<sup>-1</sup>, sc)、钩藤提取液低剂量(3 g·kg<sup>-1</sup>, ig) + 吗啡组、钩藤提取液高剂量(9 g·kg<sup>-1</sup>, ig) + 吗啡组, 每组 10 只动物, 给药 5 d。采用倾向性程序训练大鼠, 建立位置偏爱模型, 观察钩藤提取液对大鼠在伴药箱(白箱)逗留时间的影响。结果: 吗啡模型组训练 5 d 后, 大鼠在白箱的逗留时间明显延长(与空白对照组比较,  $P < 0.01$ ), 说明经过 5 d 训练, 大鼠对吗啡形成了位置偏爱。给予钩藤提取液高剂量组(9 g·kg<sup>-1</sup>)能显著缩短大鼠在白箱的逗留时间(与模型组比较,  $P < 0.05$ )。结论: 钩藤提取液能够抑制吗啡诱导的条件性位置偏爱效应的形成, 具有一定的抗药物精神依赖作用。

**[关键词]** 大鼠; 吗啡依赖; 钩藤; 条件性位置偏爱

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0218-03

## Effect of Uncariae Ramulus Cum Uncis on Conditioned Place Preference Induced by Morphine in Rats

WANG Yu<sup>1</sup>, WANG Jing-xia<sup>2\*</sup>, OU Li-na<sup>2</sup>, LI Wei<sup>2</sup>

(1. Unit 61716 Clinic, The Chinese People's Liberation Army, Fuzhou 350003, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Uncariae Ramulus Cum Uncis on the conditioned place preference (CPP) induced by morphine in rats. **Method:** Conditioned place preference was established by

**[收稿日期]** 20101208(001)

**[通讯作者]** \* 王景霞, 医学博士, 副教授, 从事疑难疾病防治的中药用药规律研究, Tel: 010-64287006, E-mail: wjx117@sohu.com

过黑布药膏治疗后, 增生性瘢痕组织块中 I 型胶原 mRNA 表达降低, III 型胶原 mRNA 表达升高, MMP-1 mRNA 表达升高, 说明黑布药膏通过增加胶原酶的含量, 加强胶原降解, 而减轻胶原聚集, 缓解瘢痕增生。另外, 可能是由于黑布药膏在其他未知因素下启动了 III 型胶原的基因调控水平, 使之能降解 I 型胶原, 但不降解 III 型胶原, 亦或者促使 I 型胶原转化为 III 型胶原, 使黑布药膏治疗后测得的 I 型胶原 mRNA 表达减弱, 而 III 型胶原表达增强, 其机制尚有待于进一步研究证实。

### [参考文献]

[1] Scott P G, Ghahary A, Tredget E E. Molecular and cellular aspects of fibrosis following the thermal injury [J]. Hand

Clin, 2000, 16(2): 271.

[2] 李荟元, 刘建波, 兰海. 建立增生性瘢痕动物实验模型 [J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(6): 655.

[3] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>[-Delta Delta C (T)] method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402.

[4] Di Cessare P E, Cheung D T, Perelman N, et al. Alternation of collagen composition and cross-linking in keloid tissue [J]. Matrix, 1990, 10(3): 172.

[5] Ghahary A, Shen Y J, Nedelec B, et al. Collagenase production is lower in post-burn hypertrophic scar fibroblasts and is reduced by insulin-like growth factor-1 [J]. J Invest Dermatol, 1996, 106(3): 476.

[责任编辑 聂淑琴]