

黑布药膏对兔耳增生性瘢痕成纤维细胞增殖与凋亡的影响

赵丽^{1,2}, 王莹¹, 关洪全^{1*}

(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:探讨黑布药膏对兔耳增生性瘢痕成纤维细胞增殖与凋亡的影响。方法:成年大耳白兔 24 只,建立兔耳增生性瘢痕动物模型,21 d 后,将瘢痕动物模型随机分为黑布药膏治疗组和瘢痕模型组,在黑布药膏治疗组瘢痕局部涂抹黑布药膏,每 3 d 1 次,连续用药 56 d。在用药第 2,4,6,8 周分别切取两组瘢痕组织,对比研究在瘢痕形成过程中黑布药膏对兔耳瘢痕成纤维细胞的影响,采用免疫组化方法检测增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达和细胞凋亡的原位检测。结果:按不同时间段取材进行免疫组化染色,高倍镜下观察,结果显示:黑布药膏治疗组和模型对照组比较,PCNA 蛋白表达明显减弱($P < 0.05$),细胞凋亡增加($P < 0.05$)。结论:黑布药膏可抑制兔耳增生性瘢痕成纤维细胞的增殖过程,诱导细胞凋亡。黑布药膏可抑制兔耳增生性瘢痕组织增生。

[关键词] 黑布药膏;兔耳增生性瘢痕;成纤维细胞;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0213-03

Effect of Heibu Ointment on Proliferative Activity and Apoptosis of Fibroblasts in Hypertrophic Scarring Model in Rabbit Ears

ZHAO Li^{1,2}, WANG Ying¹, GUAN Hong-quan^{1*}

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

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Heibu Ointment on proliferative activity and apoptosis of fibroblasts in the hypertrophic scarring model in rabbit ears. **Method:** Twenty-four white rabbits were used to establish the model of hypertrophic scar in ears. After twenty-one days, the model rabbits were randomly divided into Heibu Ointment treatment group and model group. In Heibu Ointment treatment group, Heibu Ointment was plastered on the hypertrophic scars once in every three days. The treatment course lasted for fifty-six days. The scar tissue was sampled on the second, the fourth, the sixth and the eighth week for the two groups. The changes in fibroblasts treated with Heibu Ointment were compared with that of the controls during the forming of hypertrophic scars. The expression of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) was measured by immunohistochemistry technique, and the apoptosis was measured by TUNEL. **Result:** The expression of PCNA in the Heibu Ointment treatment group was obviously weaker than that of the controls ($P < 0.05$), and the apoptosis was increased in Heibu Ointment treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Heibu Ointment can inhibit the proliferation of fibroblasts and accelerate cell apoptosis in hypertrophic scars in rabbit ears.

[Key words] Heibu Ointment; hypertrophic scarring in rabbit ear; fibroblast; apoptosis

[收稿日期] 20101112(007)

[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, 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研究, Tel:024-31207071, E-mail: hongquanguan@sina.com

增生性瘢痕(hypertrophicscar, HS)是病理性瘢痕的一种,是皮肤真皮损伤愈合后遗留的高出周围正常皮肤、发红、坚硬的病理结构,可以出现瘙痒、疼痛等不适症状,而且在不同的形成阶段有着不同的临床表现和发展趋势,不仅严重影响外貌和功能,也会对患者心理造成影响。目前,国内外治疗增生性瘢痕的药物,均因其严重的副作用而影响临床应用,而中草药具有药源广泛、价廉、副作用小的特点,容易被患者接受。临床用黑布药膏治疗增生性瘢痕疗效确切,但其作用机制一直未见报道,本实验用黑布药膏治疗兔耳增生性瘢痕,通过与对照组比较增殖细胞核抗原蛋白表达和细胞凋亡的变化来确定黑布药膏对兔耳增生性瘢痕形成过程的影响,探索其对增生性瘢痕的作用机制。

1 材料

1.1 动物 选大耳白兔 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,储存在玻璃罐中放于 4℃ 冰箱备用,1 g 膏含生药 0.84 g。

1.3 试剂与器材 鼠抗兔 PCNA 单克隆抗体(批号为 BM0104),SABC 试剂盒(批号为 SA1020),DAB 显色试剂盒(批号为 AR1020),细胞凋亡检测试剂盒(批号为 MK1020),均购于武汉博士德生物工程有限公司,Olympus 光学显微镜。

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 组不施加造模处理,B,C 组进行 HS 造模,造模方法参照文献[1],3% 戊巴比妥(30 mg·kg⁻¹)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。在上皮化后 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。进行各项指标的测定,各组织均 4% 多聚甲醛固定 48 h 后常规脱水,石蜡包埋,连续切片,厚度 3~5 μm。

2.2 观察指标

2.2.1 PCNA 蛋白测定 应用常规二步免疫组化法按试剂盒说明书操作。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,细胞核内含有棕黄色颗粒者为阳性细胞。在 400 倍光镜下观察结果,每张切片找 5 个阳性细胞最多的视野进行计数,结果取均数。

$$\text{阳性细胞反应率} = \frac{\text{阳性细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

2.2.2 细胞凋亡的原位检测 采用 TUNEL 法,按步骤操作。细胞核内含有淡棕黄色至深棕黄色颗粒为 TUNEL 阳性细胞,即凋亡细胞。400 倍光镜下观察结果,随机选择 3 个阳性细胞最多的高倍视野进行计数,结果取均数。

$$\text{凋亡率} = \frac{\text{凋亡细胞}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

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 PCNA 检测 分布特征:正常皮肤表皮基底细胞层 PCNA 阳性表达,真皮层阳性表达较少。模型组除基底细胞 PCNA 阳性表达及部分棘细胞层和颗粒细胞层呈阳性表达外,真皮层见大量 PCNA 阳性表达细胞,与正常皮肤相比差异有显著性($P < 0.01$),治疗组 PCNA 阳性细胞较模型组明显减少,相比有显著性差异($P < 0.05$),见表 1。

表 1 黑布药膏 3 天敷药 1 次对兔耳增生性瘢痕增殖细胞核抗原表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

%

组别	剂量/g/次	上皮化后 2 周	上皮化后 4 周	上皮化后 6 周	上皮化后 8 周
正常	1	14.88 ± 1.17	15.38 ± 1.21	14.88 ± 1.38	15.25 ± 1.16
模型	-	37.00 ± 0.73 ¹⁾	41.63 ± 3.84 ¹⁾	39.38 ± 0.73 ¹⁾	33.63 ± 0.84 ¹⁾
黑布药膏治疗	1	33.13 ± 0.52 ²⁾	36.63 ± 0.38 ²⁾	26.13 ± 0.30 ²⁾	22.88 ± 0.69 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 细胞凋亡原位检测 在成纤维细胞和血管内皮中可见凋亡小体,即凋亡细胞。在瘢痕形成的早期,仅有少量阳性细胞,随时间推移凋亡细胞逐渐增加,在上皮化4周时凋亡细胞较前明显增多,真皮中

见较多凋亡的成纤维细胞,而到了上皮化6周时才达到凋亡高峰,至上皮化8周时凋亡指数仍然持续很高。从上皮化后4周开始,黑布药膏治疗组与模型组瘢痕凋亡率有显著性差异, $P < 0.05$ 。

表2 黑布药膏3 d敷药1次对兔耳增生性瘢痕细胞凋亡原位检测结果的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g/次	上皮化后2周	上皮化后4周	上皮化后6周	上皮化后8周
正常	1	6.13 ± 0.88	5.88 ± 0.95	6.00 ± 0.80	4.63 ± 0.96
模型	-	14.00 ± 0.87 ¹⁾	28.13 ± 0.91 ¹⁾	39.13 ± 1.16 ¹⁾	33.00 ± 0.76 ¹⁾
黑布药膏治疗	1	19.00 ± 1.21	43.50 ± 1.04 ²⁾	56.25 ± 1.03 ²⁾	45.00 ± 1.09 ²⁾

4 讨论

瘢痕形成是机体创伤修复的必然产物,成纤维细胞大量增生并合成大量的胶原和基质,造成胶原代谢和排列异常,异常基质的沉着,加上微循环和自由基因素的影响,促进了瘢痕的形成^[2]。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。

HS是皮肤创伤后组织过度修复的表现,以大量结缔组织基质、尤其是胶原的过度合成与沉积为特征,而成纤维细胞是产生胶原等细胞外基质的功能性细胞,成纤维细胞增殖与凋亡失衡引起大量成纤维细胞及其分泌的细胞外基质堆积,进而导致HS的形成。如何从细胞数量上抑制其增殖、促进凋亡是本实验研究的重点。

PCNA是相对分子质量为32 736 ~ 35 712的核蛋白,是一种细胞周期调节蛋白,直接参与DNA的合成,PCNA的出现明显与细胞增殖有关,在静止细胞,其量很少,G₁期增加,S期达到高峰,G₂,M期明显下降^[3]。PCNA在DNA复制过程中起重要作用。PCNA的表达已证实与细胞的增殖状态密切相关^[4]。细胞凋亡又称为程序性细胞死亡,是由基因控制的、细胞自主的、有序的死亡过程。细胞凋亡不仅参与正常创伤愈合的组织重建,而且在HS的形成、消退过程中亦扮演十分重要的角色^[5-6]。当某些原因导致HS组织中的细胞凋亡数减少,则阻碍HS成熟;相反,若通过某种物理的或化学的手段来诱导或促进瘢痕组织中的细胞凋亡,则加快HS的消退。

本实验中,HS组织真皮层及表皮角质层见大量PCNA阳性表达细胞,其阳性细胞率较正常皮肤明显增高,表明HS的形成与创伤修复过程中成纤维细胞的增殖活性增高有关,大量增殖活跃的成纤维细胞及其所分泌的胶原等细胞外基质构成HS形成的物质基础。黑布药膏治疗组PCNA阳性细胞率较对照组明显减少,凋亡率较对照组明显增加,说明黑布药膏对可抑制呈增殖活性的HS成纤维细胞,使其DNA的合成明显减少,增殖受阻,并能促进其凋亡。为深入研究黑布药膏对HS的作用机制及临床应用提供了理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 蔡景龙,张宗学.现代瘢痕治疗学[M].北京:人民卫生出版社,1998:46.
- [3] Ogata K, Ogata Y, Nakamura R M, et al. Purification and N-terminal amino acid sequence of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) cyclin and development of ELISA for anti-PCNA antibodies [J]. J Immunol, 1985, 135(4):2623.
- [4] Prelich G, Tan C K, Kostura M, et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein [J]. Nature, 1987, 326(6112):517.
- [5] Peter M E, Herffler A E, Hengartner M O. Advances in apoptosis research [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(24):12376.
- [6] 夏国伟.创伤愈合与细胞凋亡[J].国外医学·生理、病理科学与临床分册,1999,19(3):201.

[责任编辑 聂淑琴]