

芦荟凝胶通过上调 bFGF 和下调 ICAM-1 的表达防治大鼠多柔比星外渗性损伤

刘艳萍^{1a}, 罗文², 夏红³, 艾小红^{1b}, 周秀田³, 董琳^{3*} (1.南华大学附属第一医院, a.神经内科, b.肿瘤内科, 湖南 衡阳 421001; 2.湖南环境生物职业技术学院护理学院, 湖南 衡阳 421001; 3.南华大学肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 探讨芦荟凝胶对多柔比星外渗性损伤的防治机制。方法 建立 SD 大鼠多柔比星外渗性损伤动物模型, 将 70 只 SD 大鼠随机分组: 未损伤对照组、假手术组、多柔比星外渗性损伤组、溶媒对照组、芦荟凝胶低浓度保护组(芦荟凝胶 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、芦荟凝胶中浓度胶保护组(芦荟凝胶 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和芦荟凝胶高浓度保护组(芦荟凝胶 $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。测量外渗性损伤的面积以观察损伤程度, HE 染色观察病理形态学改变, 免疫组化检测损伤部位的皮肤及皮下组织中的 bFGF、ICAM-1 表达和分布情况。结果 不同浓度的芦荟凝胶保护组的外渗性损伤面积均小于多柔比星外渗性损伤组, 且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。HE 染色结果显示: 不同浓度的芦荟凝胶保护组大鼠外渗性损伤处其损伤程度轻于多柔比星外渗性损伤组。免疫组化检测结果显示: 多柔比星外渗性损伤组与未损伤对照组比较, bFGF 表达减少, ICAM-1 表达增加。而不同浓度的芦荟凝胶保护组与多柔比星外渗性损伤组比较, bFGF 表达递增, ICAM-1 表达递减, 且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。结论 芦荟凝胶对大鼠多柔比星外渗性损伤有良好的防治作用, 促进伤口愈合的机制可能与其促进 bFGF 的表达和抑制 ICAM-1 的表达有关。

关键词: 芦荟凝胶; 多柔比星; 外渗性损伤; bFGF; ICAM-1

中图分类号: R931.71 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2010)04-0294-06

Aloe Gel Prevents and Cures Doxorubicin-Induced Extravasation Injury in Rats by Up-Regulating Expression of bFGF and Down-Regulating Expression of ICAM-1

LIU Yanping^{1a}, LUO Wen², XIA Hong³, AI Xiaohong^{1b}, ZHOU Xiutian³, DONG Lin^{3*} (1. The First Affiliated Hospital, Nanhua University, a. Department of Neurology, b. Department of Oncology, Hengyang 421001, China; 2. Department of Nursing, Hunan Environment and Biology Professional-Technology College, Hengyang 421001, China; 3. Institute of Oncology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the preventive effect of aloe gel on doxorubicin-induced extravasation injury and the underlying mechanism. **METHODS** Sprague-Dawley (SD) mice were used to establish the extravasation injury model induced by doxorubicin. Seventy SD mice were randomly divided into seven groups: non-injured control group, simulated operation group, doxorubicin-induced extravasation injured group, dissolvent control group, hyp-concentration ($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) aloe gel protected group, meta-concentration ($1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) aloe gel protected group, hypsi-concentration ($10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) aloe gel protected group. The areas of the extravasation injuries were measured to observe the degree of doxorubicin-induced extravasation injury. The pathological morphology was observed by optical microscopy. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and intercellular adhesion molecule (ICAM-1) in the exosmosis skin and subcutaneous tissues was detected by immunohistochemistry. **RESULTS** The areas

作者简介: 刘艳萍, 女, 副教授, 副主任护师 Tel: (0734)8279056 E-mail: juanjuan19830803 @sohu.com *通信作者: 董琳, 女, 硕士, 教授 Tel: (0734)8281510 E-mail: lind617@yahoo.com.cn

of extravasation injuries in aloe gel protected groups at different concentration were smaller than that in doxorubicin-induced extravasation injured group ($P<0.05$). The result of HE stain revealed that the degree of extravasation injuries in aloe gel protected groups at different concentration was obviously less severe than that in doxorubicin-induced extravasation injured group. The result of immunohistochemistry revealed that the expression level of bFGF was lower and ICAM-1 was higher in doxorubicin-induced extravasation injured group than that in non-injured control group, while the expression level of bFGF was gradually higher and ICAM-1 was gradually lower in aloe gel protected groups at different concentration than that in doxorubicin-induced extravasation injured group, in a dose-dependent manner. **CONCLUSION** Aloe gel prevents doxorubicin-induced extravasation injury. Its mechanism is related with the up-regulation of bFGF expression and down-regulation of ICAM-1 expression.

KEY WORDS: aloe gel; doxorubicin; extravasation injury; bFGF; ICAM-1

多柔比星作为一种常用抗肿瘤药物,其最为严重的不良反应是一旦药物渗漏出血管外后,可致局部组织严重坏死、溃疡可深及肌腱和关节,造成功能丧失。目前常用的治疗方法是局部封闭,硫酸镁外敷等,尽管临床报道有一定的疗效,但其机制尚不明,并缺乏足够的实验依据^[1]。有研究发现芦荟(aloe)具有调节机体免疫力、防辐射、促进伤口愈合的作用。最近有临床报道,芦荟对化疗药物外渗性损伤有良好的防护作用^[2-3]。笔者曾采用SD大鼠多柔比星外渗性损伤动物模型,评价了芦荟凝胶对大鼠多柔比星外渗性损伤的防治作用,发现芦荟对多柔比星外渗性损伤具有一定的保护作用^[4],但其具体机制并不很清楚。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、细胞间黏附分子(ICAM-1)在调控创面的发生过程中起到了重要的作用^[5]。因此,本研究将探讨芦荟凝胶是否可通过调节 bFGF 和 ICAM-1 的表达来防治多柔比星的外渗性损伤。

1 材料与方法

1.1 实验动物、药品及试剂

清洁级Sprague-Dawley (SD)大鼠70只,6周龄,♂,体重175~210 g,购于南华大学动物部(合格证号:2004-0013),并由该单位提供饲养环境。多柔比星(山西普德药业有限公司,规格:10 mg·支⁻¹),鼠抗人bFGF多克隆抗体、鼠抗人CD54 (ICAM-1)多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),SP试剂盒、DAB显色剂(北京中杉金桥公司)。芦荟株(湖南省衡阳市),芦荟冻干粉(100:1)(上海莱博生物科技有限公司,批号:46514),芦荟凝胶(南华大学药物研究室制备)。

1.2 芦荟凝胶制备^[6]

取10 g卡波姆934,使分散于60 mL 纯化水中,放置过夜使之充分溶胀。另取1 g薄荷脑溶于2 mL 无水乙醇中,备用。将放置过夜的卡波姆934研磨至颗粒消失,另称取芦荟干粉(100:1)10 g溶于热纯化水中,并与薄荷脑溶液、月桂氮卓酮20 mL,

5%羟苯乙酯溶液15 mL,一起加入到卡波姆934中,滴入20%氢氧化钠溶液(适量),加纯化水至1 000 g,研磨使成凝胶,芦荟凝胶浓度为10 g·L⁻¹。成品为乳白色半固体物质,质地细腻,稠度适宜,延展性好。然后分别用适量纯化水将浓度为10 g·L⁻¹的芦荟凝胶稀释至1.0 g·L⁻¹和0.1 g·L⁻¹。另取上述处方中除芦荟凝胶干粉外的其他辅料,按同样方法配制成空白凝胶,作为溶媒对照。

1.3 动物模型的建立

参照文献[7],将70只SD大鼠腹部长毛剪去,用脱毛剂(1份硫化钠与4份淀粉配制而成)脱毛,直径约4 cm,用清水洗净脱毛部位皮肤,观察48 h,脱毛部位皮肤完好。取50只SD大鼠用1%戊巴比妥按30 mg·kg⁻¹腹腔注射麻醉后,碘酒、乙醇常规消毒,用4.5号针头以10~15°角进针,皮下注射多柔比星(1 g·L⁻¹),每部位0.3 mL,每只大鼠所造模型在同一部位、大小、深度一致,作为外渗性损伤模型。另10只不注射多柔比星,而注射等量的生理盐水,作为假手术组,还有10只不作任何处理,作为未损伤对照模型。

1.4 实验分组及处理

将50只外渗性损伤模型大鼠随机分为5组,每组10只:腹部外渗处(10处)不用任何药品或试剂外涂,为多柔比星外渗性损伤组;腹部外渗处(10处)用空白凝胶外涂,为溶媒对照组;腹部外渗处(10处)分别用0.1, 1.0, 10.0 g·L⁻¹的芦荟凝胶敷于患处,为芦荟凝胶低、中、高浓度保护组。另取10只大鼠不注射多柔比星,而注射等量的生理盐水,作为假手术组;取10只大鼠不作任何处理,作为未损伤对照组。各组大鼠在损伤后第18天,腹腔麻醉后常规消毒,切除外渗性损伤部位的皮肤及皮下组织,镜下观察确定有无溃疡、坏死。免疫组化法检测损伤部位的皮肤及皮下组织中 bFGF、ICAM-1 的分布和表达情况。

1.5 外渗性损伤面积观察

肉眼观察损伤后第 18 天从各组抽取的大鼠注射局部外渗性损伤程度、面积并拍照。外渗性损伤面积的计算：外渗性损伤区域面积计算用 mm^2 表示，用数码相机拍摄外渗性损伤后不同时间点各组大鼠的创面，应用 Image Pro Plus 5.0 图像分析软件在计算机上测定所拍摄创面面积的大小；光镜下观察各组外渗性损伤的程度。

1.6 组织形态学观察和免疫组织化学观察

切除外渗性损伤部位的皮肤及皮下组织，固定于 10% 的中性福尔马林中 24 h 后，经脱水、常规石蜡包埋，切片。经 HE 染色在光学显微镜下观察组织的形态学变化。采用免疫组化 SP 法检测，操作步骤严格按照试剂盒说明书进行(皆为 1:100 稀释为工作液)，用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。应用 Image Pro Plus 5.0 专业图像分析软件对结果进行定量分析，测出阳性细胞的积分光密度(integrated optical density, IOD)，积分光密度是阳性细胞的平均光密度和其面积的乘积，可以反映蛋白表达量(IOD 值越高，其蛋白含量越高)。

1.7 统计学处理

计量资料数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SPSS 11.0 软件，单向方差分析进行样本均数间多重比较，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度芦荟凝胶对外渗性损伤面积的影响

多柔比星外渗性损伤 18 d 后，测量各组外渗性损伤面积，发现未损伤对照组和假手术组的损伤面积均为 0，说明生理盐水并不会引起外渗性损伤；溶媒对照组与多柔比星外渗性损伤组的损伤面积几乎相等($P > 0.05$)，表明空白凝胶对多柔比星外渗性损伤无保护作用。经处理后不同浓度的芦荟凝胶保护组与多柔比星外渗性损伤组比较，损伤面积均减少，并且随着芦荟凝胶浓度的逐渐增大，损伤面积递减，差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明芦荟凝胶对多柔比星外渗性损伤具有保护作用，且呈浓度依赖性，见图 1。

2.2 病理形态学观察不同浓度芦荟凝胶对外渗性损伤组织的改善作用

多柔比星外渗性损伤 18 d 后观察各组皮肤及皮下组织病理形态学的改变，结果见图 2。未损伤对照组和假手术组大鼠表皮完整，皮肤附件未见损伤，无炎细胞浸润，未发生溃疡，说明生理盐水并不会引起外渗性损伤；多柔比星外渗性损伤组和溶

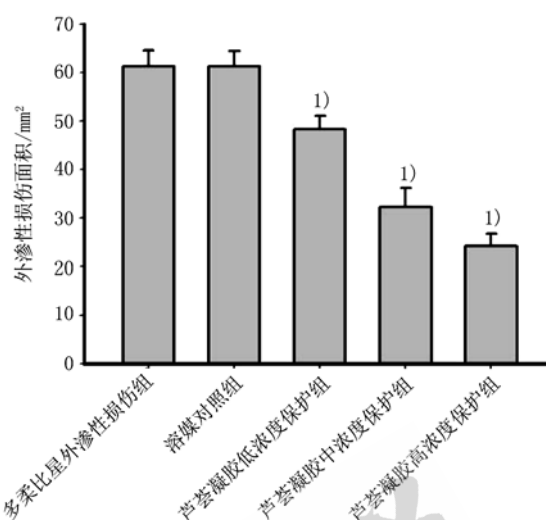


图 1 不同浓度芦荟凝胶对外渗性损伤面积的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

注：与多柔比星外渗性损伤组比较，¹⁾ $P < 0.05$

Fig 1 The influence on the areas of the extravasation injuries of aloe gel protected groups at different concentration($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Note: Compared with doxorubicin-induced extravasation injured group, ¹⁾ $P < 0.05$

媒对照组溃疡、坏死严重，水肿明显，大量炎细胞浸润，有纤维组织及毛细血管增生，表明空白凝胶对多柔比星外渗性损伤无保护作用；芦荟凝胶低浓度保护组血管扩张充血，真皮深层炎症细胞浸润，可见毛细血管及纤维增生；芦荟凝胶中浓度保护组真皮深层灶性炎症细胞浸润，纤维结缔组织增生，部分形成瘢痕，表皮及附件修复；芦荟凝胶高浓度保护组纤维结缔组织增生，瘢痕形成，表皮及皮肤附件修复。结果表明芦荟凝胶对多柔比星外渗性损伤具有改善作用，且随着浓度的递增，其改善作用呈增强的趋势。

2.3 不同浓度芦荟凝胶对损伤部位的皮肤及皮下组织中 bFGF、ICAM-1 表达的影响

用免疫组化法检测多柔比星外渗性损伤 18 d 后各组皮下及皮下组织中 bFGF 和 ICAM-1 的表达情况，见图 3。bFGF 表达于血管内皮细胞胞浆及间质组织中，阳性表达时呈棕黄色颗粒。结果显示：未损伤对照组纤维结缔组织增生，可见较多间质阳性细胞，bFGF 呈强阳性表达；多柔比星外渗性损伤组，少见间质阳性细胞；芦荟凝胶低浓度保护组小部分间质细胞着色，呈黄色，bFGF 呈弱阳性表达；芦荟凝胶中浓度保护组，部分间质细胞呈黄色或棕黄色颗粒状，bFGF 呈中等阳性表达；芦荟凝胶高浓度保护组大部分间质细胞呈黄色或棕黄色

颗粒状, bFGF 呈较强阳性表达。ICAM-1 广泛分布于上皮细胞表面及间质组织, 阳性表达时呈棕黄色颗粒。结果显示: 未损伤对照组少见间质阳性细胞, ICAM-1 呈阴性表达; 多柔比星外渗性损伤组大部分细胞核呈黄色或棕黄色颗粒状, ICAM-1 呈强阳性表达; 芦荟凝胶低浓度保护组大部分间质细胞呈黄色或棕黄色颗粒状, ICAM-1 呈较强阳性表达; 芦荟凝胶中浓度保护组, 部分间质细胞呈黄色或棕黄色颗粒状, ICAM-1 呈中等阳性表达; 芦荟凝胶高浓度保护组小部分间质细胞着色, 呈黄色, ICAM-1 呈弱阳性表达。

定量分析阳性细胞的积分光密度(OD)值, 亦表明多柔比星外渗性损伤可抑制 bFGF 的表达, 促进 ICAM-1 的表达($P<0.05$); 芦荟凝胶能浓度依赖性地增加 bFGF 的表达和抑制 ICAM-1 的表达

($P<0.05$)。

3 讨论

多柔比星是临床上最常用、最重要的抗生素之一, 它是细胞周期非特异性药物, 对细胞周期各阶段均有作用, 具有强烈的细胞不良反应。多柔比星外渗可导致局部组织坏死溃烂。笔者以往的工作表明芦荟凝胶对多柔比星外渗性损伤具有一定的保护作用^[4], 但其机制并不完全明确。本研究发现芦荟凝胶可上调 bFGF 和下调 ICAM-1 在多柔比星外渗性损伤后组织中的表达。故推测调节 bFGF 和 ICAM-1 的表达可能是芦荟凝胶抗多柔比星外渗性损伤的机制之一。

皮肤创面的愈合是一个复杂有序的过程, 其基础是炎性细胞、角质细胞、成纤维细胞、内皮细胞等组织修复的一系列活动, 这些活动受全身和局部

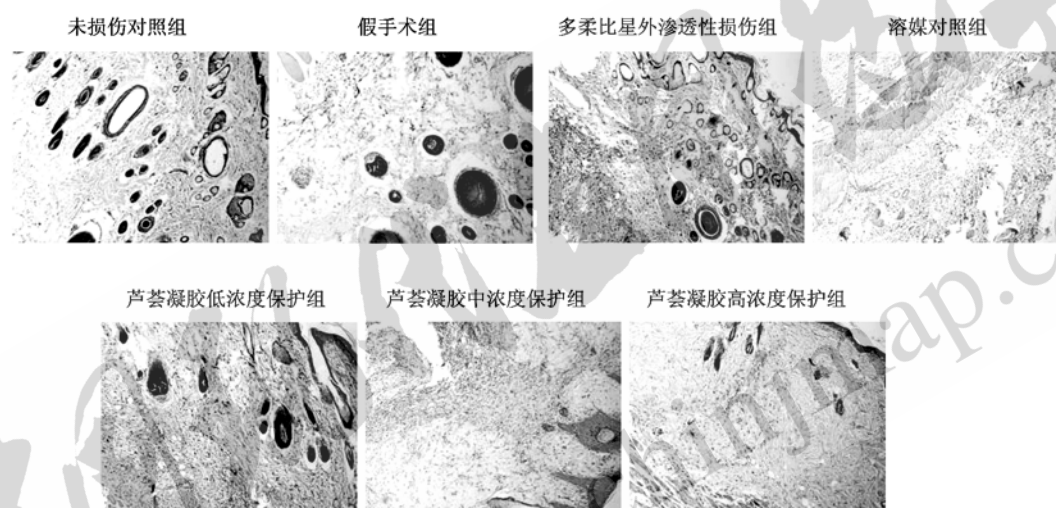


图2 多柔比星外渗性损伤 18 d 后各组皮肤及皮下组织病理形态学改变(HE 染色, SP × 100)

Fig 2 The morphological changes of the skin and subcutaneous tissues in each group (HE staining, SP × 100)

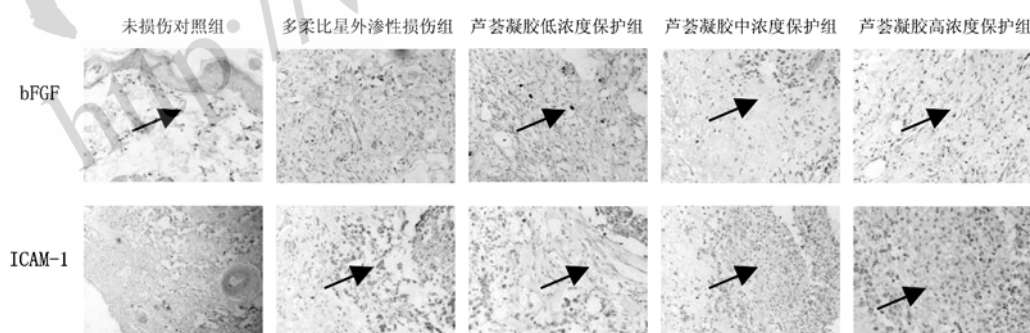


图3 各组皮肤及皮下组织中 bFGF、ICAM-1 的表达(SP × 400)

注: 箭头指示呈阳性表达的细胞

Fig 3 Expressions of bFGF and ICAM-1 in the skin and subcutaneous tissues(SP × 400)

Note: Arrows showed positive cells

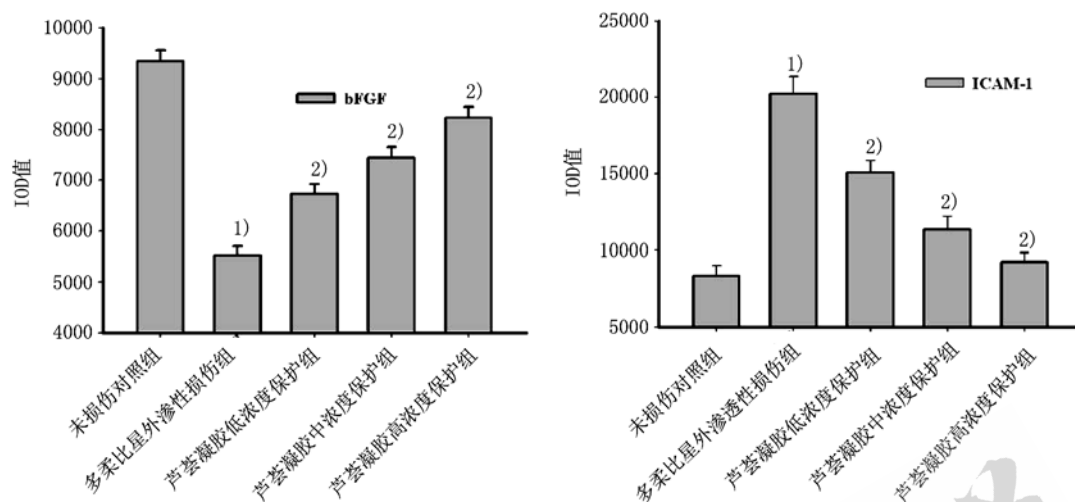


图4 定量分析bFGF和ICAM-1阳性细胞的积分光密度(IOD)($n=10, \bar{x} \pm s$)

注:与未损伤对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与多柔比星外渗性损伤组比较,²⁾ $P<0.05$

Fig 4 The IOD of bFGF and ICAM-1 in positive cells ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Note: Compared with non-injured control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with doxorubicin-induced extravasation injured group, ²⁾ $P<0.05$

因素的影响,局部因素更为重要。bFGF和ICAM-1在调控创面的发生过程中起到了重要的作用^[5]。bFGF广泛分布于人体组织中,内皮细胞是其主要来源。bFGF的生物学作用极其广泛,是重要的促有丝分裂因子,也是形态发生和分化的诱导因子。其主要生物学作用有:①作为血管生长因子诱导微血管的形成、增殖、分化;②促进创伤愈合与组织修复^[8];③促进组织再生^[9]等。本试验通过免疫组化证实bFGF在芦荟凝胶治疗组中表达呈现上调($P<0.05$)。

有学者认为,特定黏附分子及其相应配体的表达水平和结合的亲和力是不同类型炎症发生过程中重要的分子基础,在炎症起始阶段,黏附分子在炎症因子的刺激作用下活化,使白细胞黏附、穿越血管内皮细胞向炎症部位移行^[10]。ICAM-1是黏附分子免疫球蛋白超家族中的一个成员,可表达于血管内皮细胞、上皮细胞、淋巴细胞及组织细胞等细胞表面。ICAM-1的主要功能是介导细胞与细胞之间的黏附作用。ICAM-1在机体免疫系统和炎症反应中起着非常重要的作用,ICAM-1在细胞表面表达的量的多少代表炎症病变的程度。ICAM-1表达量的降低能阻断ICAM-1/LFA-1介导的细胞间黏附,减轻炎症病变的程度^[11]。本试验通过免疫组化证实芦荟凝胶治疗组中ICAM-1的表达呈现下调($P<0.05$)。

芦荟是百合科芦荟属多年生常绿肉质草本植物,广泛分布于热带、亚热带地区。它含有70多

种对人体有益的物质,具有消炎,抗菌,抗癌,愈伤等药理作用^[12]。张艺等^[2]报道芦荟对异长春花碱外渗所致的局部溃破伴剧痛,应用芦荟汁液外敷,效果显著。胡华莉等^[3]报道采用芦荟外敷710例使用诺维本加顺铂或吡柔比星(THP)、丝裂霉素(MMC)等联合治疗的肿瘤患者,发现芦荟对预防化疗药物所致的静脉损伤疗效满意。同时文献报道芦荟也具有促进肉芽组织合成的功能^[13]。

HE染色结果显示:不同芦荟凝胶保护组大鼠外渗性损伤处其损伤程度均轻于多柔比星外渗性损伤组。芦荟凝胶对多柔比星外渗性损伤具有改善作用,且随着浓度的递增,其改善作用呈增强的趋势。同时,本研究还通过免疫组化检测观察损伤部位的皮肤及皮下组织中的bFGF、ICAM-1的分布和表达情况。结果显示:不同浓度芦荟凝胶保护组与多柔比星外渗性损伤组比较:bFGF表达逐渐增加,ICAM-1表达逐渐减少,且呈浓度依赖性。本试验初步证实芦荟凝胶作为纯天然制剂,对大鼠多柔比星外渗性损伤具有良好的防治作用,其促进伤口愈合机制可能是通过抑制ICAM-1的表达,同时促进bFGF的分泌来完成的。这为进一步深入探讨芦荟凝胶治疗肿瘤化疗药物外渗性损伤提供了一定的理论基础和实验依据,对肿瘤化疗药物外渗性损伤的临床治疗、护理具有重要意义。

REFERENCES

- [1] MO W L, ZHOU H M, FENG Z Y, et al. Handling extravasation of chemotherapeutics [J]. J Chin Med Nurs (中

- 华医护杂志), 2007, 4 (11): 1008-1009.
- [2] ZHANG Y, JIANG X W, ZHAO S Q, et al. Observation on effect of aloe curing region extravasation injury caused by vinorelbine [J]. J Shaihai Nurs (上海护理), 2006, 6 (5): 39-41.
- [3] HU H L, WANG W J, SHI M C, et al. Observation on effect of external applying of aloe for patients to prevent venous injury caused by intravenously infusion of navelbine [J]. Chin Nurs Res (护理研究), 2006, 12 (1): 3159-3161.
- [4] LIU X H, XIA H, ZHOU X T, et al. Effects of aloe gel on doxorubicin-induced extravasation injury in rats [J]. Chin J Cancer(癌症), 2009, 28(4): 356-360.
- [5] LU J L, LIU X P, YANG F, et al. Study of aloe gel effect on expression of ICM-1 and EGF in dermatitis by radiation in rats [J]. Chin J Mod Med (中国现代医学杂志), 2006, 16 (22): 3377-3380.
- [6] ZHONG Z D, CHEN S L. Preparation and quality control of aloe gel [J]. Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志), 2006, 26 (11): 1419-1421.
- [7] ZHU Q C, LI A M, LUO R C, et al. Efficacy of chitosan and hyaluronidase on skin damage caused by docetaxel extravasation in rats [J]. Chin J Cancer (癌症), 2007, 26(4): 346-350.
- [8] GONG F L. Basic immunology (基础免疫学) [M]. Vol 10. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1998: 220.
- [9] CHEN J, LUO C Q. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and wound healing [J]. Chin J Burns Wounds Surf Ulcers (中国烧伤创疡杂志), 2005, 17 (1): 74-76.
- [10] DREPLER J, BACHMANN L, MÜLLER E, et al. Time depence of the expression of ICAM-1 (CD54) in human skin wounds [J]. Int J Legal Med, 1997, 110 (3): 299-302.
- [11] CHEN Z M, WANG D W, WU X, et al. The expression of ICAM-1 and P selectin in the healing process of incised wounds of rats [J]. Chin J Forensic Med (中国法医学杂志), 2003, 18 (4): 199-201.
- [12] NIE L H. Developing and using of aloe vera [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2006, 11 (27): 145-147.
- [13] CHITHRA P, SAJITHLAL G B, CHANDRAKASAN G. Influence of aloe vera on collagen in turnover in healing of dermal wounds in rats [J]. Indian J Exp Biol, 1998, 36(9): 896-901.

收稿日期: 2009-07-29