

加味小陷胸中药配方颗粒对兔耳增生性瘢痕的抑制作用及其机制研究

陈玲¹, 李泰平^{2*}, 连娜琦³, 王秋⁴, 王璐⁴, 唐安⁴, 祁钰⁴(1.南通大学附属医院药学部, 江苏 南通 226001; 2.南通市第六人民医院药剂科, 江苏 南通 226011; 3.南京中医药大学, 南京 210023; 4.南京医科大学友谊整形外科医院, 南京 210029)

摘要: 目的 研究加味小陷胸中药配方颗粒对兔耳增生性瘢痕的抑制作用及其机制, 为其临床应用提供实验依据。方法 取兔建立增生性瘢痕模型, 将建模成功的兔随机分为空白组、模型组、低剂量和高剂量给药组, 每组 4 只, 于手术后第 21 天起, 给予模型组生理盐水, 低、高剂量给药组相应药物, 每天 1 次。于术后第 60 天取材, 观察各组瘢痕组织的外观形态及病理学变化, 并检测瘢痕组织中转化生长因子- β (TGF- β)、血小板衍生生长因子(PDGF-BB)、结缔组织生长因子(CTGF)、胶原蛋白 I 型(Collagen I)和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达水平。结果 与模型组对比, 低剂量给药组瘢痕指数显著降低, 而高剂量给药组降低差异不明显; HE 和 Masson 染色显示模型组瘢痕增生明显, 胶原排列紊乱, 呈旋涡状, 药物干预组胶原排列整齐, 微血管数目相对较少; 与空白组对比, 模型组兔耳瘢痕组织中 TGF- β 、PDGF-BB、CTGF 的含量明显升高, Collagen I 蛋白和 mRNA 的表达也显著升高, MMP-2 蛋白的表达明显降低; 与模型组对比, 药物干预组 TGF- β 、Collagen I 蛋白的表达显著降低, MMP-2 蛋白的表达明显升高。结论 加味小陷胸中药配方颗粒能够抑制兔耳增生性瘢痕的形成, 其作用机制可能与抑制 TGF- β 、PDGF-BB、CTGF 的表达有关。

关键词: 加味小陷胸中药配方颗粒; 兔耳增生性瘢痕; 机制研究

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)03-0307-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.03.010

引用本文: 陈玲, 李泰平, 连娜琦, 等. 加味小陷胸中药配方颗粒对兔耳增生性瘢痕的抑制作用及其机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 307-311.

Inhibitory Effects of Jiawei Xiaoxianxiong Formula Granule on Hypertrophic Scar Tissue in Rabbit Ear and Its Mechanism

CHEN Ling¹, LI Taiping^{2*}, LIAN Naqi³, WANG Qiu⁴, WANG Lu⁴, TANG An⁴, QI Yu⁴(1.Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China; 2.Department of Pharmacy, The Sixth People's Hospital of Nantong, Nantong 226011, China; 3.Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 4.Nanjing Medical University Friendship Plastic Surgery Hospital, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the inhibitory effects and mechanism of Jiawei Xiaoxianxiong formula granule on hypertrophic scar tissue of rabbits and to provide experimental evidence for its clinical application. **METHODS** The hypertrophic scar model in rabbit ears was established. The rabbits were randomly divided into 4 groups including control, model, low-dose and high-dose groups four rabbits in each group. On the 21st day after the operation, the model group was given normal saline, and the corresponding drugs in the low- and high-dose administration groups were once a day. After 60 days, the morphological and pathological changes of the scar tissue were examined. And the levels of TGF- β , PDGF-BB, CTGF, Collagen I and MMP-2 were detected. **RESULTS** Compared with the model group, hypertrophic index(HI) in low-dose group was significantly decreased, while the difference of HI in high-dose group was not significantly. HE and Masson staining showed the obvious scar hyperplasia, disordered collagenous arrangement and rotation-like appearance in the model group, while orderly collagenous arrangement and a small amount of microvessels in drug intervention groups. Compared with the control group, the contents of TGF- β , PDGF-BB and CTGF in models were increased significantly, and the expression of Collagen I protein and mRNA were also significantly increased accompanied by significantly decreased expression of MMP-2. Compared with the model group, the expression of TGF- β and Collagen I was significantly decreased while the expression of MMP-2 was significantly increased in drug intervention groups. **CONCLUSION** Jiawei Xiaoxianxiong formula granule could inhibit the formation of hypertrophic scar in rabbit ears, and its mechanism may be related to the inhibition of the expression of TGF- β , PDGF-BB and CTGF.

KEYWORDS: Jiawei Xiaoxianxiong formula granule; hypertrophic scar in rabbit ear; mechanism research

基金项目: 南京医科大学科技发展基金重点项目(2014NJMUZD040)

作者简介: 陈玲, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0513)85052212 E-mail: chenling627@163.com *通信作者: 李泰平, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0513)80886611 E-mail: litaiping@126.com

增生性瘢痕是因皮肤损伤后过度修复而导致的病理产物,其发生机制至今尚未完全明确。相关研究表明^[1],成纤维细胞(fibroblast, FB)是参与瘢痕形成的主要效应细胞。皮肤过度修复导致增生性瘢痕,不仅影响患者的体表美观,而且可导致不同程度的功能障碍,对患者的身心健康造成双重影响。目前,对于瘢痕的治疗尚无特效办法,现代医学对增生性瘢痕的治疗主要是应用外科手术、加压、放射、冷冻、激光、激素注射和硅凝胶等疗法,但效果均不太理想。因而进一步研究增生性瘢痕的发生机制,探寻有效的防治方法是十分迫切的任务。传统中医药对瘢痕的治疗有着较丰富的经验,笔者所在医院在临床应用加味小陷胸中药配方颗粒经验性治疗人增生性瘢痕方面取得了较满意的疗效,本研究就其药效学基础和作用机制,应用兔耳模型进行探究,为进一步寻找防治瘢痕的中药新药提供参考^[2]。

1 材料

1.1 药品与试剂

黄连颗粒(规格:每袋 3 g;批号:1409042)、法半夏颗粒(规格:每袋 6 g;批号:1407046)、瓜蒌皮颗粒(规格:每袋 10 g;批号:1301042)、连翘颗粒(规格:每袋 10 g;批号:1504063)和醋莪术颗粒(规格:每袋 10 g;批号:1406111)均购自江阴天江药业。兔子转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β , 规格:48 T;编号:ml0028093)、兔结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF, 规格:48 T, 编号:ml027940)、兔血小板衍生生长因子 BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB, 规格:48 T;编号:ml0023006)ELISA 试剂盒均购自南京迅贝生物科技有限公司。TGF- β 、Collagen I、MMP-2 抗体(编号分别为 21898-1-AP, 14695-1-AP, 10373-2-AP)均购自美国 Proteintech 公司;实时定量 PCR 的预混合溶液试剂盒(编号:204057)和特异引物均购自美国 Thermo 公司。

1.2 仪器

光学显微镜(日本 Olympus 公司);超低温冰箱(日本 Sanyo 公司);超纯水仪(美国 Millipore 公司);核酸蛋白分析仪(美国 Beckman 公司);多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);电泳槽、多功能酶标仪、凝胶成像分析仪系统均来自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 动物

16 只普通新西兰大白兔,清洁级,兔龄 3~4

月,♀♂各半,体质量(2.5 ± 0.2)kg,购自南京市江宁区青龙山动物中心,许可证号:SCXK(苏)2012-0008,动物合格证号:No. 201603875。所有兔均混合分笼人工饲养,环境温度为 20~22℃、相对湿度为 50%,人工混合饲料饲养 1 周后进行实验。本实验按动物实验伦理学要求操作。

2 方法

2.1 兔耳腹创面造模

自从 Morris 首次在兔耳创面造模成功后,兔耳增生性瘢痕模型已广泛用于瘢痕研究^[3]。本实验将兔固定于专用固定箱,10%水合氯醛 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 经兔耳缘静脉麻醉后,于兔耳腹侧沿长轴避开血管,制作直径为 0.7 cm 的圆形创面,完整切除全层皮肤,彻底刮除软骨膜,保留软骨,创面不予任何处理,任其自然愈合。每只兔左右耳腹侧各制备 3 个创面,各创面间距约 1.0 cm。手术完毕后将兔放置笼中喂养,自由进食、饮水。造模 1 周内观察兔双耳,没有造模成功的再次在原位进行处理,待创面结痂后,用碘酊消毒后将痂皮去除,再用手术刀刮去表皮及过度生长的肉芽组织,再待创面自然愈合。若术后发现创面感染,局部给予碘伏消毒。

2.2 分组与给药

所有兔创面一般于 13~15 d 完全上皮化^[4]。16 只兔随机分为空白组(不做任何处理)、模型组(生理盐水)和高、低剂量给药组($4.6, 2.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,给予加味小陷胸中药配方颗粒相应剂量灌胃治疗)。每组 4 只兔、8 只耳朵、24 个创面。于术后第 21 天开始给药,每天 1 次,共给药 40 d。在术后第 20 天、给药后第 40 天取材,观察各组瘢痕组织的外观形态变化,切取各组瘢痕组织,将所取组织从顶部均分为 2 份,一份作 HE 染色,另一份作分子生物学检测。

加味小陷胸中药配方颗粒成人每剂处方常用剂量:黄连颗粒 3 g,法半夏颗粒 12 g,瓜蒌皮颗粒 15 g,连翘颗粒 10 g,醋莪术颗粒 10 g。参考徐叔云《药理实验方法学》根据人和动物间按体表面积折算的等效剂量换算,70 kg 成年人与 1.5 kg 兔之间的换算系数为 0.07,根据公式,人日剂量为 50 g,则兔给药剂量= $50\times 0.07/1.5$,计算出大白兔低剂量给药组给药剂量为 $2.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,高剂量组给药剂量为 $4.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。根据上述方剂配成 50 mL 的汤药,估算出每组大白兔的给药体积,一

般 ≤ 6 mL, 每天 1 次。

2.3 瘢痕指数的测量

分别在术后每周定期测量兔耳增生性瘢痕指数, 了解瘢痕增长趋势。用游标卡尺分别测量瘢痕处皮肤厚度及邻近空白组织的皮肤厚度, 精度为 0.01 mm。瘢痕指数(hypertrophic index, HI)=(兔耳瘢痕处皮肤厚度-邻近空白组织皮肤厚度)/邻近空白组织皮肤厚度。

2.4 病理组织观察

从兔耳取下瘢痕组织块(一般厚度 ≤ 0.5 cm)投入预先配好的 10%福尔马林溶液中, 使组织、细胞的蛋白质变性凝固, 常规石蜡包埋切片, 苏木素伊红(HE)染色和 Weigert 苏木精(Masson)染色, 行光镜观察成纤维细胞及胶原纤维。

2.5 指标检测

术后第 20 天及给药后第 40 天取材, 切割标本, 放入 10%福尔马林溶液, 置于 2~8 °C 冰箱保存。每 50 mg 的组织加入 1 mL 的 PBS(pH=7.4), 用匀浆机研匀, 并在 4 °C, 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 收集上清, 按照各 ELISA 试剂盒说明书测定瘢痕组织中 Collagen I、MMP-2 以及 TGF- β 的含量。另一部分标本置于液氮保存行 PCR 检测。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TGF- β 、Collagen I 和 MMP-2 的蛋白表达

将兔耳瘢痕组织用生理盐水洗净、称重, 然后用研钵粉碎, 加入 RIBA 缓冲液及 PMSF 混合, 匀浆后冰上孵育 30 min, 离心收集总蛋白。使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度, 计算各个样品总蛋白的上样量, 应用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶依次进行电泳、转膜, 5%脱脂奶粉室温摇床上封闭 1 h, 4 °C 孵育一抗过夜。然后取出 PVDF 膜回收抗体后, 用 TBST 洗净后加入以脱脂牛奶稀释的兔二抗, 孵育 1 h。滴加新鲜配制的 ECL 混合溶液到膜的蛋白面侧, 曝光, 根据不同的光强度调整曝光条件, 将 PVDF 膜置于凝胶成像系统分析。

2.7 实时荧光定量 PCR 法检测 TGF- β 、Collagen I 和 MMP-2 的 mRNA 表达

按试剂说明书提取各组细胞总 RNA, 按逆转录试剂盒说明书进行逆转录。方法以 1%焦碳酸二乙酯水配置浓度为 10 μ m, 加样在八连管中, 在冰上进行, 每组 2 个复孔, 检测基因 TGF- β 、Collagen I 和 MMP-2 的表达, 所用引物为特异引物, 依次加

入 2x 实时定量 PCR 的预混合溶液 10 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, cDNA 4 μ L, 1%焦碳酸二乙酯水 4 μ L, 各组加样完毕后, 置于冰盒中, 将样品置于荧光定量 PCR 仪中扩增, 扩增条件为 95 °C PCR 反应起始活化 5 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火、延伸 30 s, 共 40 个循环。依据各样本扩增曲线 Ct 值进行相对定量。采用相对定量, 对照组设为 1, 其他组 n 表示对照组的倍数(Fold), $\text{Fold}=2^{[Ct(1)-Ct(n)]}$ 。

2.8 统计学方法

采用 SAS 9.0 软件进行统计学分析。正态计量指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素分析, 组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 观察兔耳瘢痕组织外观

兔耳创面于术后第 20 天愈合, 完成上皮化。术后第 60 天, 模型组瘢痕增厚明显, 暗红色, 触之较硬, 形态不规则; 给药组瘢痕增厚不明显, 质较软, 颜色与周围皮肤较接近。

3.2 兔耳瘢痕组织增生指数

与兔耳术后第 20 天对比, 术后第 60 天(给药第 40 天)各组兔耳瘢痕指数均降低。在术后第 60 天, 与模型组比, 低剂量给药组 HI 指数显著降低 ($P < 0.05$), 而高剂量组降低不明显, 原因可能是术后兔耳瘢痕上皮化不均衡以及个体化差异造成的。结果见图 1。

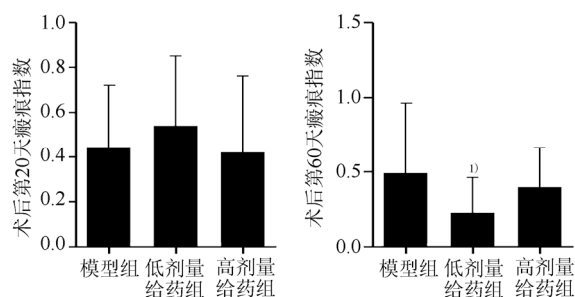


图 1 瘢痕指数对比($\bar{x} \pm s$, $n=24$)

与模型组比, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 HI comparison($\bar{x} \pm s$, $n=24$)

Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$.

3.3 病理切片 HE 染色和 Masson 染色观察

通过组织切片 HE 染色和 Masson 染色观察兔耳瘢痕的病理状态。模型组瘢痕增生明显, 胶原排列紊乱, 呈旋满状, 药物干预组胶原排列整齐, 微血管数目相对较少, 结果见图 2~3。

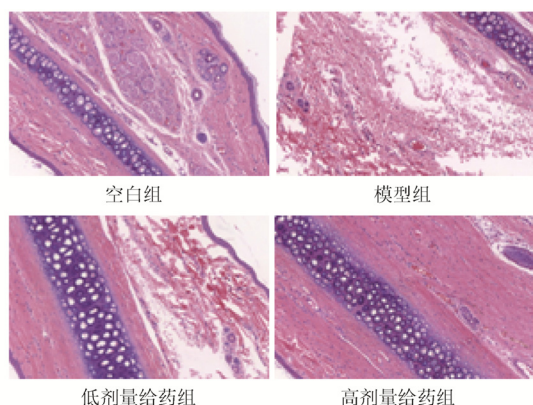


图2 HE染色结果(200×)
Fig. 2 Results of HE staining(200×)

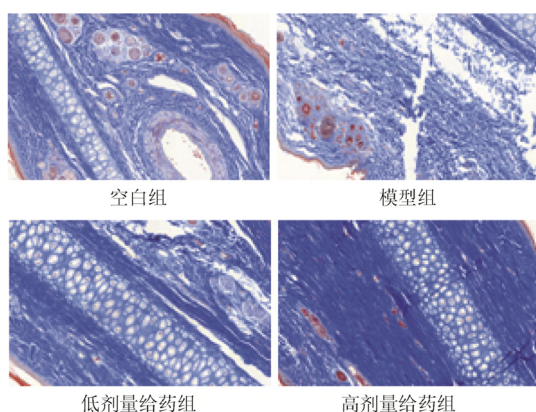


图3 Masson染色结果(200×)
Fig. 3 Results of Masson staining(200×)

3.4 指标检测结果

ELISA 结果显示,与空白组比,模型组兔耳瘢痕组织中 TGF- β 、PDGF-BB、CTGF 的含量明显升高($P<0.01$);与模型组比,药物干预组明显降低($P<0.05$),提示加味小陷胸中药配方颗粒能显著降低瘢痕组织中上述炎症因子的含量。结果见图4。

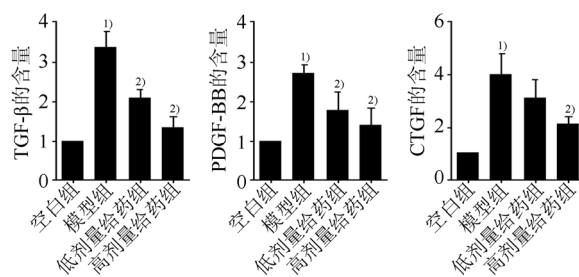


图4 ELISA检测兔耳瘢痕组织中 TGF- β 、PDGF-BB、CTGF 的含量

与空白组比, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Content of TGF- β , PDGF-BB and CTGF in rabbit ear scar tissue was determined by ELISA

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

3.5 瘢痕组织中 TGF- β 、Collagen I 和 MMP-2 表达的检测结果

与空白组对比,模型组中 TGF- β 、Collagen I 的表达显著升高($P<0.01$),MMP-2 的表达明显降低($P<0.01$);与模型组比,药物干预组 TGF- β 、Collagen I 的表达显著降低($P<0.05$ 或 <0.01),MMP-2 的表达明显升高($P<0.05$)。结果见图5~7。

4 讨论

增生性瘢痕始终是临床上的重大难题,尽管瘢痕形成的主要机制尚不清楚,但目前研究认为FB的过度增殖、凋亡和瘢痕形成有密切关系。随着瘢痕形成机制在细胞生物学和分子生物学层面的深入研究,发现来自创伤部位的多种细胞分泌和释放的细胞因子(如 TGF- β 、PDGF-BB、CTGF 等)均可影响 FB 的增殖数量和功能变化。伤口愈合早期, TGF- β 的释放促进炎症细胞聚集,促进细胞外基质蛋白关键成分的表达,比如纤维连接

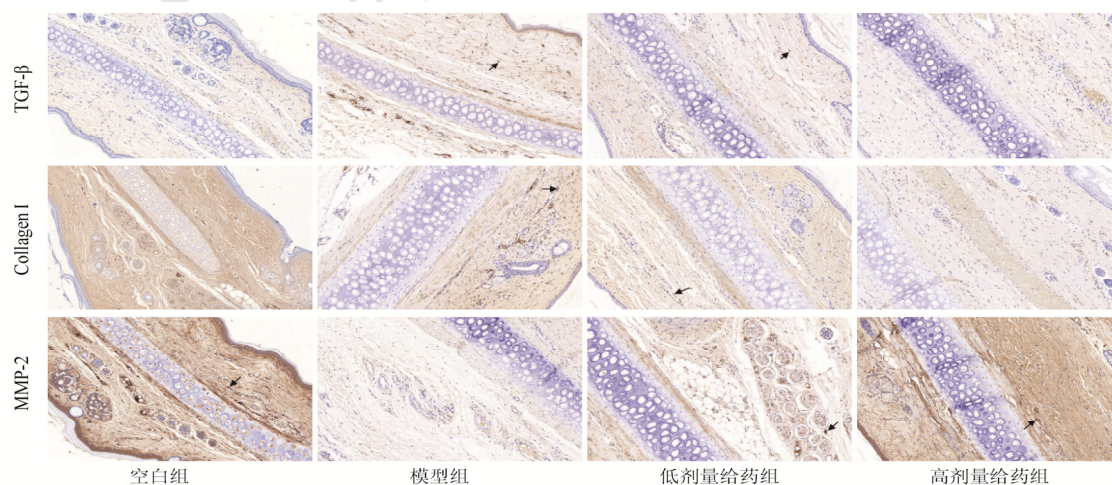


图5 瘢痕组织中 TGF- β 、Collagen I 和 MMP-2 的免疫组化检测结果

Fig. 5 Level of TGF- β , Collagen I and MMP-2 detected by immunohistochemistry in scar tissue

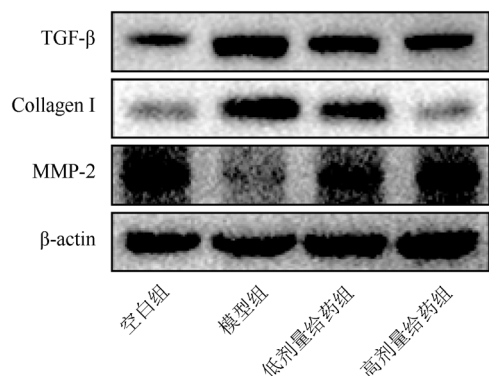


图6 Western blot 检测结果
Fig. 6 Results of Western blot

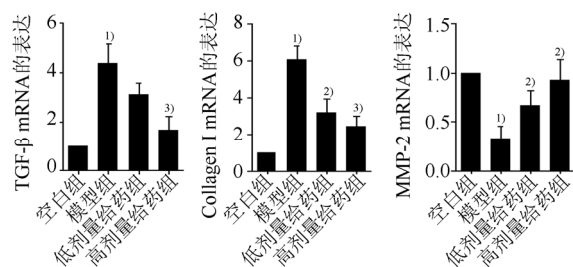


图7 瘢痕组织中 TGF-β、Collagen I 和 MMP-2 mRNA 的表达
与空白组比, ¹⁾P<0.01; 与模型组比, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01。
Fig. 7 Expression of TGF-β, Collagen I and MMP-2 mRNA in scar tissue
Compared with control group, ¹⁾P<0.01; compared with model group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01.

蛋白、Collagen I 和 III 及血管内皮生长因子等。PDGF-BB 通过对成纤维细胞的促分裂增殖、趋化及刺激纤维连接蛋白合成等作用参与创伤修复。CTGF 由转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 诱导, 是 TGF- β_1 下游调节因子, 通过促进胶原合成与沉积, 引起持续性纤维化反应。另外, 细胞外基质 (ECM) 在瘢痕形成过程中也发挥了关键作用, 其中参与 ECM 产生的有 FB、TGF- β 、MMP、纤维连接蛋白和骨形成蛋白等^[5]。实验发现兔耳瘢痕组织中 TGF- β 、PDGF-BB、CTGF 的水平增高, 揭示了瘢痕的形成与上述 3 种炎症因子密切相关, 这也与相关研究结论相符^[6-9]。

小陷胸汤出自东汉医学家张仲景《伤寒论》辨太阳病脉证并治太阳病变证篇, 为治疗痰热互结所致小结胸证而创制, 由黄连、半夏、瓜蒌组成, 具有清热化痰、宽胸散结的功效^[10]。瘢痕由外伤或外邪侵袭, 气滞血凝、痰热互结所致, 根据中医辨证论治的特点, 证同而治亦同, 故可应

用该方化痰理气活血清热, 以求异病同治。临床应用在小陷胸汤方剂基础上再加连翘和醋莪术, 连翘能够清热解毒、消肿散结; 醋莪术能够破血散瘀, 消症化积, 行气止痛。应用该方中药颗粒剂经验性治疗人增生性瘢痕取得了较满意的疗效。本研究就其作用机制进行探究, 应用加味小陷胸中药配方颗粒后, 兔耳瘢痕组织中 TGF- β 、Collagen I 的表达显著降低, MMP-2 的表达明显升高, 初步证实了加味小陷胸中药配方颗粒能够抑制增生性瘢痕的形成, 其作用机制可能与抑制 TGF- β 、PDGF-BB、CTGF 的表达有关, 具体的信号通路还有待进一步研究。本研究也为中医药治疗增生性瘢痕的研究和临床应用提供了一定的参考。

REFERENCES

- [1] LIAN N Q, LI T P. Growth factor pathways in hypertrophic scars: molecular pathogenesis and therapeutic implications [J]. Biomed Pharmacother, 2016(84): 42-50.
- [2] SUN Y, LIAN N Q. Advance in components of traditional Chinese medicine in treatment of pathological scar [J]. Chin J Aesthet Med(中国美容医学杂志), 2017, 26(6): 133-136.
- [3] ZHAO J C, ZHANG B R, SHI K, et al. Lower energy radial shock wave therapy improves characteristics of hypertrophic scar in a rabbit ear model [J]. Exp Ther Med, 2017, 15(1): 933-939.
- [4] CHEN F. Effect of imiquimod regulating Th1 and Th2 cell-associated chemokines on wound healing and scar proliferation in rabbits [J]. Chin J Aesthet Med(中国美容医学杂志), 2018, 27(3): 101-103.
- [5] NONG X L, GUO R, FENG J, et al. Research progress of natural products and compound medicines on the mechanism of skin scars inhibition [J]. Nat Product Res Develop(天然产物研究与开发), 2018, 30(1): 155-160.
- [6] ZHAO J C, ZHANG B R, SHI K, et al. Lower energy radial shock wave therapy improves characteristics of hypertrophic scar in a rabbit ear model [J]. Exper Therapeut Med, 2017, 15(1): 933-939.
- [7] PAN S C, LEE C H, CHEN C L, et al. Angiogenin attenuates scar formation in burn patients by reducing fibroblast proliferation and Transforming Growth Factor- β_1 secretion [J]. Ann plast surg, 2018, 80(1): S79-S83.
- [8] LI Y, REN H T. Endostatin inhibits fibrosis by modulating the PDGFR/ERK signal pathway: an *in vitro* study [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2017, 18(11): 994-1001.
- [9] JENSEN J, GENTZKOW G, BERMAN G, et al. Anti-CTGF oligonucleotide reduces severity of postsurgical hypertrophic scars in a randomized double-blind, within-subject, placebo-controlled study [J]. Plast Reconstruct Surg, 2018, 142(2): 192e-201e.
- [10] 张保国, 刘庆芳. 经方小陷胸汤药理学研究与临床应用[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2206-2210.

收稿日期: 2018-09-03
(本文责编: 曹粤锋)