

三七总甙对人增生性瘢痕成纤维细胞转分化的作用

姚恒 李世荣 刘剑毅 李喆 吴军



【摘要】 目的 观察三七总甙(PNS)对人增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)向肌成纤维细胞转分化的作用,探讨 PNS 抗瘢痕纤维化的机制。 **方法** 体外培养 HSF,采用不同浓度的 PNS 进行干预,根据细胞培养所加 PNS 浓度分为 400 μg/ml 组、800 μg/ml 组及空白对照组(不加 PNS)。采用细胞三维培养法检测 HSF 凝胶收缩情况,计算其收缩指数;免疫细胞化学染色法检测 HSF 中 α 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达;流式细胞仪检测 HSF 中 α-SMA 阳性细胞率。 **结果** 400 μg/ml、800 μg/ml 组各时相点的胶原凝胶块收缩程度明显减轻,其收缩指数均小于空白对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。HSF 中 α-SMA 阳性表达颗粒在细胞质内呈弥漫性分布;空白对照组 HSF 中 α-SMA 的阳性表达明显强于 400 μg/ml、800 μg/ml 组。400 μg/ml、800 μg/ml 组 α-SMA 的阳性细胞率(31.52%、24.28%)均明显低于空白对照组(45.74%, $P < 0.05$)。400 μg/ml、800 μg/ml 组 α-SMA 的阳性细胞染色强度积分均明显低于空白对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** PNS 能够抑制 HSF 向肌成纤维细胞的转分化,具有体外抗瘢痕纤维化的作用。

【关键词】 成纤维细胞; 肌动蛋白类; 三七总甙; 增生性瘢痕

Effects of Panax notogin seng on the transdifferentiation of fibroblasts in human hypertrophic scar in vitro
 YAO Heng, LI Shi-rong, LIU Jian-yi, LI Zhe, WU Jun. Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China
 Corresponding author: LI Shi-rong, Email: zhengxing@vip.163.com, Tel: 023-68754192

【Abstract】 Objective To observe the effects of Panax notogin seng on the transdifferentiation of the cultured human fibroblasts from hypertrophic scar in vitro, and explore its anti-fibrosis mechanism. **Methods** The fibroblasts from human hypertrophic scar were cultured in vitro. Different amount of Panax notogin seng was added into the medium, respectively(400 μg/ml and 800 μg/ml). A culture without addition of the drug served as control. The fibroblast-populated collagen lattice method was used to detect the gel contraction, and contraction ratio was calculated. The immunocytochemistry staining method was used to detect the expression of α-smooth muscle actin. The flow cytometry method was used to detect the positive rate of α-smooth muscle actin. **Results** The contraction degree of the fibroblasts after PNS administration was ameliorated at each time-point, with contraction index lower than that of controls ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Scattered distribution of α-SMA positive granules were observed in the cytoplasm, and the positive rate of α-SMA expression in 400 μg/ml(31.52%) and 800 μg/ml(24.28%) PNS groups were obviously lower than that in control group(45.74%, $P < 0.05$). The staining intensity of positive cells in 400 μg/ml and 800 μg/ml PNS groups was also obviously lower than that in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Panax notogin seng can inhibit the transdifferentiation of the cultured human fibroblasts from hypertrophic scar, and it exhibits an anti-fibrosis effect on hypertrophic scar in vitro.

【Key words】 Fibroblasts; Actins; Panax notogin seng; Hypertrophic scar

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是临床上常见的病理性瘢痕,其增生和挛缩常常导致患者外观畸形和功能障碍。虽然其发病机制尚不清楚,但寻找对其有效治疗的药物一直是研究者们努力的方向。我们在前期的研究中观察到,三七总甙(panax

notogin seng, PNS)具有体外抗瘢痕纤维化作用^[1,2],但对体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblast, HSF)的转分化是否具有作用尚少见文献报道。为此笔者通过观察 PNS 对体外培养的 HSF 转分化的作用,以探讨 PNS 抗瘢痕纤维化的机制。

1 对象与方法

1.1 主要试剂、仪器和标本来源

PNS 粉剂(纯度为 92.6%)购自云南金泰得制

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院整形科(姚恒、李世荣、刘剑毅、李喆),全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(吴军)

通讯作者:李世荣, Email: zhengxing@vip.163.com, 电话:023-68754192

药总公司, 胶原蛋白购自成都铭让生物科技有限公司, 大鼠抗人 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体购自北京中山生物技术有限公司, DMEM 细胞培养液、胎牛血清、胰蛋白酶购自华美生物工程公司。倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司), MD-20 型真彩医学图像分析仪 (德国 Leica 公司), Coulter Epics XL 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。HS 标本来源于西南医院整形外科 5 例烧伤创面愈合 3 个月以上瘢痕仍持续增生的患者 (均知情同意), 其瘢痕发红、充血、质硬、高出皮肤表面 1 cm 以上, 且瘢痕增生局限于皮损区, 局部伴瘙痒或疼痛等不适。

1.2 细胞培养及检测指标

1.2.1 HSF 的原代培养 采用组织块法进行, 实验时使用第 4 代细胞。根据细胞培养所加 PNS 浓度分为 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组及空白对照组 (不加 PNS)。

1.2.2 HSF 凝胶收缩的检测 参照文献 [3] 方法, 当细胞悬液呈凝胶状时, 加入含体积分数 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 使凝胶块与培养皿表面分离, 然后加入 PNS 继续培养, 培养液及 PNS 每 2 天更换 1 次。于实验开始后的第 1、2、3、4 天分别用透明坐标纸测定每一凝胶块的最大和最小直径, 取其均数计算凝胶块的收缩指数 (CI) = $[1 - (D/D_0)^2] \times 100\%$ 。其中 D 为凝胶块最大与最小直径的均数, 取 3 个重复样本的均值计算; D_0 为初始直径 (33 mm)。

1.2.3 HSF 中 α -SMA 的检测 加 PNS 24 h 后, 采用生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶法进行免疫细胞化学染色。其中大鼠抗人 α -SMA 抗体稀释度为 1:100。二氨基联苯胺显色。

1.2.4 α -SMA 阳性细胞率检测 加 PNS 24 h 后, 于不同时相点收集各组细胞, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 2 次, 离心, 细胞沉淀后, 以 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 离心, 弃上清液。用 1 g/L 皂素通透 10 min, 离心, 弃上清液。加入大鼠抗人 α -SMA 抗

体 (1:100) 300 μl , 室温孵育 1 h。PBS 洗涤 2 次后, 加入异硫氰酸荧光素标记的山羊抗大鼠 IgG, 室温孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次后, 重新悬浮于 300 μl PBS 溶液中, 上机检测。判定标准以细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性, 参照 Riaz 的计分方法以孔中细胞阳性反应率作为计分标准。未见棕黄色颗粒者为阴性 (-), 记 0 分; 略有棕黄色颗粒者为可疑阳性 (\pm), 记 1 分; 阳性率 $\leq 35\%$ (+), 记 2 分; 阳性率 $> 35\%$ 且 $\leq 75\%$ (2+), 记 3 分; 阳性率 $\geq 75\%$ (3+), 记 4 分。每孔计数 100 个细胞, 计算阳性率, 取 6 孔平均值。

1.3 统计学处理

部分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 率的比较采用 χ^2 检验, 所用软件为 SPSS 10.0。

2 结果

2.1 HSF 凝胶收缩情况

加入 PNS 后, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组各时相点 HSF 的胶原凝胶块收缩程度明显减轻, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 三七总甙对人增生性瘢痕成纤维细胞凝胶收缩指数的影响 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	标本数	加三七总甙后时间 (d)			
		1	2	3	4
空白对照组	5	58 \pm 3	65 \pm 3	72 \pm 3	78 \pm 3
400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组	5	30 \pm 3 ^a	32 \pm 4 ^a	38 \pm 3 ^a	45 \pm 3 ^a
800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组	5	16 \pm 3 ^a	20 \pm 3 ^{ac}	22 \pm 3 ^{bc}	25 \pm 3 ^{bd}

注: 与空白对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

2.2 HSF 中 α -SMA 的表达

光学显微镜下 α -SMA 蛋白表达以细胞质呈棕黄色为阳性细胞, 弥漫性分布。空白对照组的阳性表达明显强于 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组和 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组。空白对照组 HSF 胞质内棕黄色颗粒色深、量多, 呈强阳性; 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组和 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组细胞胞质内棕黄色颗粒色弱、量少, 呈弱阳性。见图 1。



图 1 各组 α 平滑肌肌动蛋白在人增生性瘢痕成纤维细胞中的阳性表达情况 生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶 $\times 400$ 。a 为空白对照组; b 为 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组; c 为 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组

2.3 α-SMA 的阳性细胞率

400 μg/ml 组和 800 μg/ml 组 α-SMA 的阳性细胞率分别为 31.52% 和 24.28%，均明显低于空白对照组的 45.74% ($P < 0.05$)。HSF 中 α-SMA 表达阳性染色的强度积分值见表 2。

表 2 三七总甙对人增生性瘢痕成纤维细胞中 α 平滑肌肌动蛋白表达的影响 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	加三七总甙后时间(d)			
		12	24	48	72
空白对照组	20	6.8 ± 0.9	6.8 ± 0.9	7.0 ± 0.8	7.1 ± 0.6
400 μg/ml 组	20	5.0 ± 0.7 ^a	5.5 ± 0.9 ^a	5.8 ± 0.5 ^a	5.9 ± 0.7 ^a
800 μg/ml 组	20	2.5 ± 0.7 ^{bc}	3.0 ± 0.8 ^{bc}	3.9 ± 0.8 ^{bc}	4.1 ± 0.6 ^{bc}

注:与空白对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与 400 μg/ml 组比较, c: $P < 0.01$

3 讨论

HS 是皮肤创面愈合后瘢痕持续增生的一种病理现象,其本质是以成纤维细胞为主的细胞成分过度增殖和以胶原为主的细胞外基质过度沉积,其中胶原等细胞外基质主要由成纤维细胞合成和分泌。

研究结果表明,在 HS 中存在着大量以 α-SMA 为细胞标志物的肌成纤维细胞,它在超微结构上兼有成纤维细胞与平滑肌细胞的特征^[4]。α-SMA 作为细胞骨架蛋白,通过跨膜复合物 Fibronexus 与成纤维细胞外纤维粘连蛋白相连,而后者可与细胞外基质或其他成纤维细胞相连,从而把肌成纤维细胞的收缩传导至整块组织,引起创面或瘢痕的收缩^[4,5]。在正常创面愈合过程中,肌成纤维细胞短暂性的表达可引起伤口的收缩,随着真皮结构再塑形,肌成纤维细胞因凋亡而逐渐消失。而在 HS 纤维化过程中,以 α-SMA 为细胞标志物的肌成纤维细胞持续长时间存在,且其合成分泌蛋白质(如胶原蛋白等)的功能极为旺盛。因此,肌成纤维细胞的数量和功能状态在很大程度上决定了 HS 纤维化的速度和程度,抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化是抗瘢痕纤维化的主要策略之一^[6,7]。

PNS 为中药三七的主要有效成分。有研究表明, PNS 具有抗肝、肾、肺等多种器官纤维化的作

用^[8-10]。我们在前期的研究中已观察到, PNS 对 HSF 的增殖、胶原合成、细胞周期及转化生长因子 β₁ 的表达均有抑制作用^[1,2]。本实验应用不同浓度的 PNS 干预体外培养的 HSF,观察到 PNS 能够显著抑制三维细胞培养的凝胶收缩,且具有剂量依赖效应,说明 PNS 具有体外抗瘢痕挛缩的作用。为了进一步验证以上作用是否由于肌成纤维细胞的减少引起,笔者对肌成纤维细胞标志物 α-SMA 表达强度以及阳性细胞率进行了检测,结果两者均随 PNS 浓度增高而下降,说明 PNS 在体外可抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化。但是 PNS 这种抑制转分化的作用,是直接抑制还是通过调控其他物质间接影响 α-SMA 的表达而发挥作用,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 刘剑毅,李世荣,纪淑兴,等. 三七总甙对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖及胶原合成的作用. 第三军医大学学报, 2003, 25(17):1562 - 1563.
- [2] 姚恒,李世荣,刘剑毅. 三七总甙对人增生性瘢痕成纤维细胞 TGF-β₁ 和细胞周期的作用. 中国实用美容整形外科杂志, 2005, 16(4):243 - 245.
- [3] 杨松林,何清濂,林子豪,等. 瘢痕成纤维细胞三维培养的实验研究. 中华整形烧伤外科杂志, 1996, 12(1):2 - 5.
- [4] 贾赤宇,陈璧. α-平滑肌肌动蛋白 N-末端肽对伤口收缩的影响. 中华烧伤杂志, 2002, 18(3):166 - 169.
- [5] Nakazono-Kusaba A, Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, et al. Staurosporine-induced cleavage of alpha-smooth muscle actin during myofibroblast apoptosis. J Invest Dermatol, 2002, 119(5): 1008 - 1013.
- [6] 刘勇,岑瑛,唐颖,等. 肌成纤维细胞在病理性瘢痕形成中的机制. 中国修复重建外科杂志, 2005, 19(1):39 - 41.
- [7] 毛志刚,青春,陆树良. 细胞外基质成分及空间形态结构对成纤维细胞生物学行为的影响. 中华烧伤杂志, 2005, 21(3):238 - 240.
- [8] 张荣华,周子成,洪多伦,等. 三七抗肝纤维化的实验研究. 第三军医大学学报, 2000, 22(4):307 - 309.
- [9] 韦颖,樊均明,潘丽萍. 三七总甙对人肾成纤维细胞的影响. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(1):47 - 49.
- [10] 李学军,崔社怀. 三七总甙及甲泼尼龙对实验大鼠肺纤维化的干预作用及机制的初步探讨. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(9):520 - 523.

(收稿日期:2006-06-26)

(本文编辑:张红)

· 广告目次 ·

- (一) 广州启源生物科技有限公司(插页一)
- (二) 珠海亿胜生物制药有限公司(插页二)
- (三) 南阳国防科技工业电器研究所(插页三)

- (四) 开封康复医用设备厂(插页四)
- (五) 兴运实业(成都)有限公司(封三)
- (六) 常熟汇涵医用材料厂(封底)