

· 皮肤科用药专栏 ·

积雪草苷对博来霉素诱导 小鼠皮肤瘢痕形成的抑制作用*

王莎丽¹, 杨琳¹, 刘勇², 姚超然¹, 宋爽¹, 刘洋¹, 袁晓环², 武艳²

(牡丹江医学院 1.2012 级药学专业; 2. 医药研究中心, 牡丹江 157011)

摘要 目的 探讨积雪草苷对博来霉素诱导的小鼠皮肤瘢痕形成的抑制作用及其可能的作用机制。方法 雄性 C57BL/6 小鼠 30 只, 随机分为阴性对照组、模型对照组以及积雪草苷组, 每组 10 只, 模型对照组和积雪草苷组小鼠每日于背部经皮下注射博来霉素($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL, 积雪草苷组于 4 h 后经皮下注射积雪草苷($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL, 模型对照组给予相同剂量的 0.9% 氯化钠溶液, 阴性对照组则在此两个时间点给予相同剂量 0.9% 氯化钠溶液, 21 d 后处死全部小鼠。进行皮肤组织形态学观察、肌成纤维细胞增殖以及炎症因子表达的检测。结果 病理组织学显示, 积雪草苷组皮肤瘢痕较薄, 纤维化程度较模型对照组明显减轻, 其真皮层胶原厚度显著小于模型对照组厚度; 皮肤纤维化程度指标 α -平滑肌肌动蛋白的表达也明显低于模型对照组, 并且炎症细胞浸润减少。结论 积雪草苷可抑制博来霉素诱导的小鼠皮肤瘢痕的形成, 其机制可能与调节肌成纤维细胞以及炎症细胞的表达相关。

关键词 积雪草苷; 博来霉素; 皮肤瘢痕

中图分类号 R285.5; R751

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)12-1363-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.12.007

Inhibitory Effect of Asiaticoside on Bleomycin-induced Skin Cicatrization in Mice

WANG Shali¹, YANG Lin¹, LIU Yong², YAO Chaoran¹, SONG Shuang¹, LIU Yang¹, YUAN Xiaohuan², WU Yan² (1. Grade 2012, Pharmacy Department; 2. Medical Research Center, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT Objective To evaluate the inhibitory effect of asiaticoside on bleomycin-induced skin cicatrization.

Methods Thirty male C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: negative control group, model control group, and asiaticoside group, ten in each group. In model control group and asiaticoside group, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ bleomycin was subcutaneously injected into the dorsal skin of mice every day; 4 h later, 1 mL 0.9% sodium chloride solution 1 mL asiaticoside ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) was injected into the lesion skin in the model control group and the asiaticoside group, respectively. In the negative control group, the same volume of 0.9% sodium chloride solution was subcutaneously injected into the dorsal skin of the mice at the two time points every day. After 21 days, skin specimens were harvested to observe the histomorphology and detect myofibroblast proliferation and expression of inflammatory factors. **Results** The skin scar was significantly attenuated in the asiaticoside group as compared with the model control group, and the dermal thickness measured exhibited a gradual decrease in asiaticoside group. The expression of α -antismooth muscle antisbody and infiltration of inflammatory cells were significantly lower in the asiaticoside group than in the model control group. **Conclusion** Asiaticoside inhibits the development of skin scar of mice by regulating proliferation and differentiation of myofibroblasts and down-regulating inflammatory cells.

KEY WORDS Asiaticoside; Bleomycin; Skin scar

积雪草苷为伞形科药用植物积雪草中提取的三萜类化合物, 具有抗氧化^[1], 抗炎^[2], 促进创伤愈合的作用^[1], 抑制过氧化物形成^[1]以及促进肿瘤细胞凋亡^[3]等作用。研究发现积雪草苷还具有抗纤维化的作用, 其主要是通过抑制成纤维细胞的增殖, 减弱胶原蛋白的表达, 提高基质金属蛋白酶的含量等达到目的。但在是否具有抑制皮肤瘢痕形成的作用报道较少^[1]。因此, 本研究拟将积雪草苷作用于博来霉素诱导的小鼠皮肤瘢痕模型, 旨在验证积雪草苷对于皮肤瘢痕形成的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取健康 SPF 级雄性 C57 小鼠 30 只,

8~10 周龄, 体质量(25 ± 3) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(京) 2012-0001。饲养于牡丹江医学院医药研究中心 SPF 级动物房, 在(25 ± 2)℃, 相对湿度 45%~65%, 分笼饲养, 普通饮食, 适应性饲养 1 周后开始实验^[4]。

1.2 主要试剂 博来霉素(批号: 91071)购自日本化药株式会社; 积雪草苷(16830-15-2)购自南京景竹生物科技有限公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA, 批号: ab18147)购自 Abcam 公司; DAB 显色剂(批号: PV-6000-D)购自北京中杉金桥公司; 逆转录试剂盒(批号: 998897)购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 主要仪器 倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司(型号:IX70-142);PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司(型号:5331)。

1.4 动物分组及给药方式 将 C57 小鼠按体重随机分为阴性对照组、模型对照组和积雪草苷组,每组 10 只。模型对照组和积雪草苷组小鼠每日于背部经皮下注射博来霉素 1 mL,浓度选取为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (经预实验结果和文献[5]报道显示,博来霉素浓度过大瘢痕形成不均匀,浓度过小则形成瘢痕不显著),积雪草苷组于 4 h 后经皮下注射积雪草苷 1 mL ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,预实验显示此浓度为最适浓度),模型对照组给予相同剂量的 0.9%氯化钠溶液,阴性对照组则在此两个时间点给予相同剂量 0.9%氯化钠溶液,21 d 后处死全部小鼠。

1.5 病理组织学观察 37%甲醛水溶液固定皮肤组织,石蜡包埋,常规切片,厚度为 $5 \mu\text{m}$,行苏木精-伊红(HE)和 Masson's Trichome 染色,在光学显微镜下进行观察。

1.6 免疫组化检测 石蜡包埋,常规切片,厚度为 $5 \mu\text{m}$,脱蜡,为灭活内源性过氧化物酶采用 3% H_2O_2 室温孵育 10 min,加入一抗(抗小鼠 α -SMA 单克隆抗体),4 ℃ 过夜,DAB 显色,苏木精染核,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

1.7 Real-time PCR 检测 采用 Trizol 法提取组织中的 mRNA,在进行 cDNA 转录及 PCR 检测。RT-PCR 的引物序列如下:肿瘤坏死因子(TNF- α)正义:5'-TGG AAC TGG CAG AAG AGG-3',反义 5'-AGA CAG AAG AGC GTG GTG-3';白细胞介素 6(IL-6)正义:5'-GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC-3',反义:5'-AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA-3';IL-10 正义 5'-GCC GCC GCG GTA CCA TGC CTG GCT CAG CAC TG-3',反义 5'-GCT AGC TTA GCT TTT CAT TTT GAT CAT CAT G-3'; β -actin 正义:5'-TGG AAT CCT GTG

GCA TCC ATG AAA C-3',反义:5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'。

1.8 统计学方法 采用 GraphPad Prism 软件进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果 阴性对照组皮肤组织结构完整,呈波纹状,胶原排列紧密、均匀且纤维较细;模型对照组皮肤组织不仅表皮层明显增厚,其真皮层的厚度也增加很多,镜下可见大量的胶原纤维,粗细不一,排列不规则;与模型对照组比较,积雪草苷组皮肤组织表皮和真皮厚度减少,胶原排列更规则一些。见图 1。

2.2 Masson's Trichome 染色结果 模型对照组胶原纤维与阴性对照组比较,明显增多,排列紊乱,成漩涡状或结节状排列,而积雪草苷组胶原纤维与模型对照组比较,排列较为规则,成条索状。见图 2。

2.3 α -SMA 蛋白的表达 免疫组织化学染色显示,在各组皮肤组织中呈棕黄色的为 α -SMA 阳性表达。阴性对照组 α -SMA 阳性表达主要存在于血管平滑肌细胞,每高倍视野为 (12 ± 3) 个,模型对照组 α -SMA 阳性表达主要存在于肌成纤维细胞,每高倍视野 (87 ± 9) 个,积雪草苷组 α -SMA 阳性表达明显低于模型对照组,每高倍视野为 (39 ± 7) 个($P < 0.01$)。见图 3。

2.4 炎症因子的表达检测 Real-time PCR 检测炎症因子 TNF- α 、IL-6 及 IL-10 的含量,与模型对照组比较,积雪草苷组明显降低了炎症因子的表达,尤其是对于 IL-10 表达的影响更为显著($P < 0.01$)。见图 4。

3 讨论

皮肤瘢痕是创伤或手术后皮肤组织的纤维化增生,其主要特征是成纤维细胞过度增殖、细胞外基质(extracellular matrix,ECM)多度沉积以及各种细胞因子和生长因子的不正常激活^[6-8]。当皮肤严重创伤或是感染较重时,往往会出现过度修复的现象,造成增生性瘢痕或是瘢痕疙瘩。瘢痕不仅影响患者的外在美观并造成关节、局部器官的功能障碍,还可能引起严重的心理问题,因此研究瘢痕的治疗问题具有重要意义^[6-7]。随着中医观念不断深入人心,中医药在瘢痕中的应用越来越受到关注。本研究结果显示,积雪草苷通过减弱胶原的沉积、减少肌成纤维细胞的增殖、抑制炎症因子的表达抑制了博来霉素诱导的小鼠皮肤瘢痕的形成。

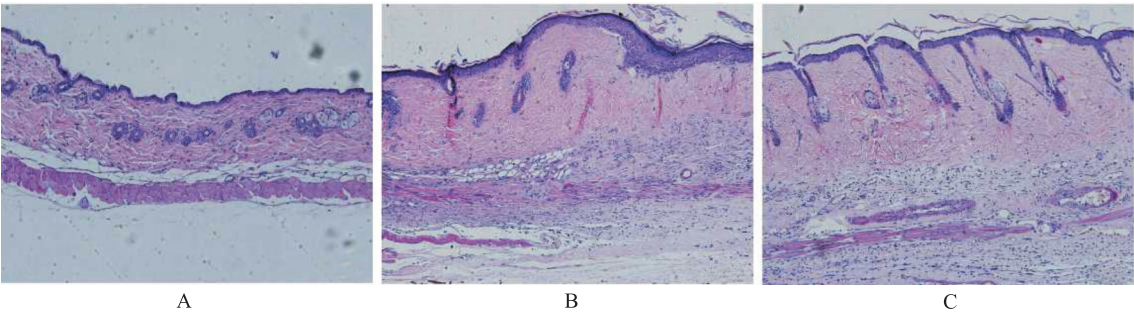
瘢痕的产生主要表现为真皮内胶原降解失衡、导致胶原大量沉积^[9]。本研究结果还显示,积雪草苷明

收稿日期 2016-07-14 修回日期 2016-10-27

基金项目 * 国家级大学生创新创业训练计划项目(201510229012);牡丹江医学院科学技术研究项目(ZS201519);黑龙江省普通高校组织损伤与修复重点实验室科学技术研究项目(zdsys 2012-10)

作者简介 王莎丽(1994-),女,贵州贵阳人,学士,研究方向:中药药理学。电话:0453-6984647,E-mail:516495711@qq.com。

通信作者 武艳(1982-),女,黑龙江牡丹江人,讲师,博士,研究方向:组织损伤与修复。电话:0453-6984647,E-mail:wuyannini@126.com。

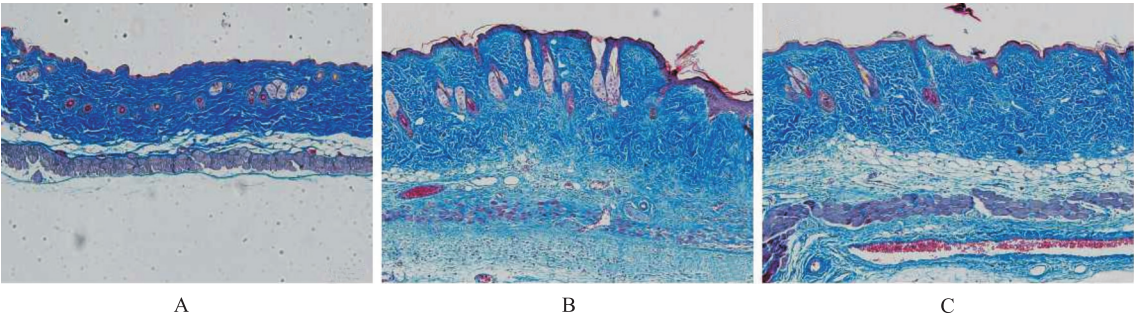


A. 阴性对照组;B.模型对照组;C.积雪草苷组

图 1 3 组小鼠皮肤的组织形态学 (HE 染色,×100)

A.negative control group;B.model control group;C. asiaticoside group

Fig.1 Cutaneous histomorphology of three groups of mice (HE staining ,×100)

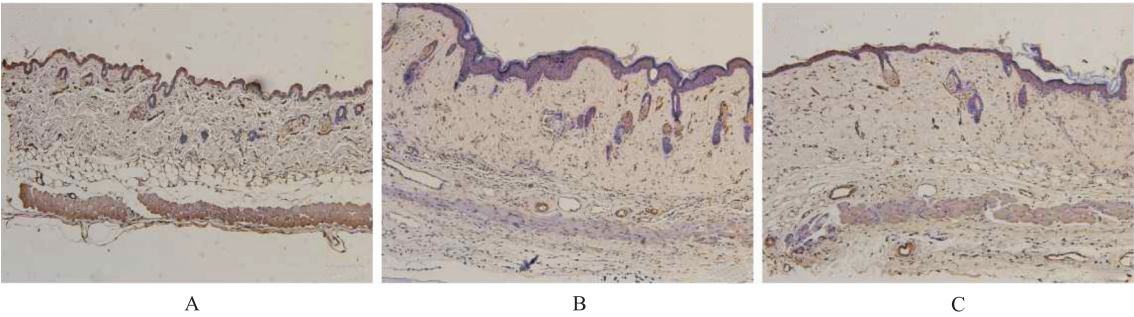


A. 阴性对照组;B.模型对照组;C.积雪草苷组

图 2 3 组小鼠皮肤的组织形态学 (Masson ' s Trichome 染色,×100)

A.negative control group;B.model control group;C.asiaticoside group

Fig.2 Cutaneous histomorphology of three groups of mice(Masson ' s Trichome staining ,×100)



A. 阴性对照组;B.模型对照组;C.积雪草苷组

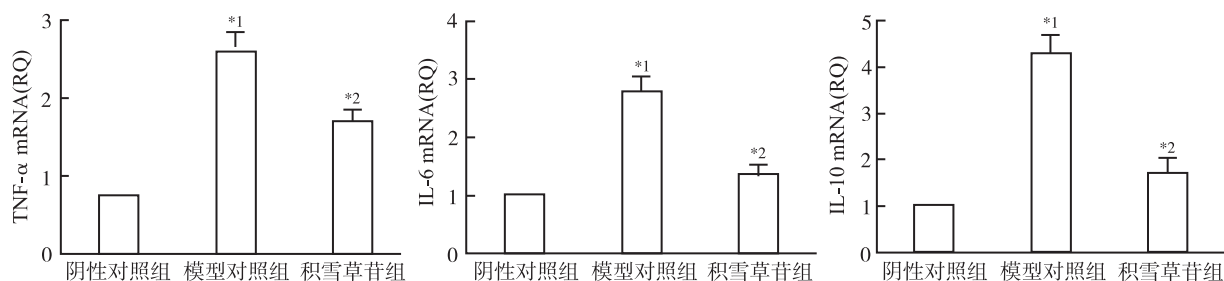
图 3 3 组皮肤组织中 α-SMA 蛋白表达检测(免疫组织化学染色,×100)

A.negative control group;B. model control group;C.asiaticoside groups

Fig.3 Detection on α-SMA protein expression in skin tissue of three groups of mice(immunohistochemical staining ,×100)

显抑制了瘢痕的形成,尽管不能完全阻止瘢痕的形成,但与模型对照组相比较,其表皮和真皮的厚度显著减少,胶原纤维排列疏松,更为规则。祁少海等^[10]在裸鼠上建立了增生性瘢痕动物模型也发现经过积雪草苷的治疗后,使整块瘢痕组织变软,体积变小,胶原纤维粗细更均匀。另外,在皮肤组织中,肌成纤维细胞是合

成 ECM(主要是胶原的产生)的主要细胞,在纤维化进程中起到关键的作用^[11]。因此笔者在研究中也检测了肌成纤维细胞的表达情况。从结果显示,在模型对照组中有很多成阳性表达的 α-SMA,而在积雪草苷组中,这种阳性表达明显较少。可以说积雪草苷在这种纤维化疾病中缓解了基质沉积并且也抑制了肌成纤维



与阴性对照组比较, ^{*1} $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^{*2} $P < 0.01$

图4 3组小鼠皮肤组织中炎症因子的检测

Compared with negative control group, ^{*1} $P < 0.01$; compared with model control group, ^{*2} $P < 0.01$

Fig.4 Detection on inflammatory cytokines in skin tissue of three groups of mice

细胞的增殖和分化。

在以往的研究中发现,炎症细胞在纤维化的发生发展过程中起到重大作用,它们不仅促进了成纤维细胞的增殖和迁移,并且在炎性环境还会影响成纤维细胞的功能和胶原合成^[12-13]。进一步研究发现,在胚胎的无瘢痕修复中几乎没有炎症细胞的参与。实验结果显示,博来霉素诱导皮肤瘢痕形成后,除了胶原大量沉积、肌成纤维细胞大量增殖外,还有大量的炎症因子的生成。而在瘢痕形成过程中给予积雪草苷后,积雪草苷发挥了显著的抗炎作用,明显降低了炎症细胞的表达,减轻局部炎细胞浸润,可能是其抑制皮肤瘢痕形成的病理机制之一。

综上所述,积雪草苷对博来霉素诱导的小鼠皮肤瘢痕具有抑制其形成的作用,主要是通过调节肌成纤维细胞的增殖和分化、胶原的沉积以及炎症因子的变化来实现,研究结果显示了对于小鼠皮肤瘢痕的预防性治疗是有效的。本研究深入了解积雪草苷在瘢痕发展过程中的调控作用,为临床寻找瘢痕防治手段提供了实验基础,但对于其分子机制还不清楚,值得进一步探讨。

参考文献

- [1] 丁元,张翥,王锁刚.积雪草苷的研究进展[J].时珍国医国药,2016,27(3):697-699.
- [2] YUN K J, KIM J Y, KIM J B, et al. Inhibition of LPS induced NO and PGE₂ production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(3): 431-441.
- [3] HUANG Y H, ZHANG S H, ZHEN R X, et al. Asiaticoside inducing apoptosis of tumor cells and enhancing anti-tumor activity of vincristine [J]. Cancer, 2004, 23(12): 1599-

1604.

- [4] 杨慧,戴军,陈尚卫,等.灵芝子实体多糖的分离纯化、组成及其免疫活性研究[J].食品与机械,2015,31(1):132-136.
- [5] YAMAMOTO T, KURODA M, NISHIOKA K. Animal model of sclerotic skin III: histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains [J]. Arch Dermatol Res, 2000, 292(11): 535-541.
- [6] SEIFERT O, MROWIETZ U. Keloid scarring: bench and bedside [J]. Arch Dermatol Res, 2009, 301(4): 259-272.
- [7] SHIH B, BAYAT A. Genetics of keloid scarring [J]. Arch Dermatol Res, 2010, 302(5): 319-339.
- [8] 刘漪沦,邓峰美,刘卫华,等.大黄素对增生性瘢痕成纤维细胞的作用[J].医药导报,2014,33(12):1566-1570.
- [9] JACKSON W M, NESTI L J, TUAN R S. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing [J]. Stem Cell Res Ther, 2012, 3(3): 20-22.
- [10] 祁少海,谢举临,利天增,等.积雪草甙对烧伤增生性瘢痕作用的实验研究[J].中华烧伤杂志,2000,16(1):53-56.
- [11] WANG Q, DONG Y, GENG S, et al. Photodynamic therapy inhibits the formation of hypertrophic scars in rabbit ears by regulating metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 [J]. Clin Exp Dermatol, 2014, 39(2): 196-201.
- [12] 张密霞,王景文,张德生,等.京万红软膏对烫伤及创伤大鼠创面愈合、瘢痕形成的影响[J].中华中医药杂志,2015,30(8):3007-3010.
- [13] ALVES C C, TORRINHAS R S, GIORGI R, et al. TGF-β₁ expression in wound healing is acutely affected by experimental malnutrition and early enteral feeding [J]. Int Wound J, 2014, 11(5): 533-539.