

积雪草苷对增生性瘢痕中转化生长因子- β mRNA及基质金属蛋白酶类表达的影响

积雪草始载于《神农本草经》，其主要成分包括积雪草苷(asiaticoside)和羟基积雪草苷(madecassoside) [1]。我们科于1995年开始应用于临床，发现积雪草苷具有良好的减轻瘢痕增生的作用，并以体外培养的增生性瘢痕成纤维细胞为研究对象发现积雪草苷能抑制瘢痕成纤维细胞的增殖，同时电镜观察发现成纤维细胞粗面内质网疏松，其内容物减少，可能与胶原合成有关 [2]。为进一步探讨积雪草苷对在体增生性瘢痕的作用机制。临床上收集了烧伤后5-8个月经积雪草苷治疗和非积雪草苷治疗的增生性瘢痕标本各9例，采用原位杂交和免疫组织化学方法，分别检测增生性瘢痕中TGF- β mRNA和MMPS、TIMPS及I、III型胶原的表达水平。

1 材料与方法

1.1 药品，试剂及仪器

积雪草苷(肤康霜，肤康片)上海现代浦东药厂有限公司，沪卫药准字(1995)第028019号。TGF- β mRNA原位杂交试剂盒和MMPS、TIMPS及I、III型胶原多抗购自武汉博士得公司，二抗为丹麦DAKO公司EnVision系统。德国KONTRON IBAS 2.5 全自动图象分析系统，日本 TVC ky-F30B 3-CCD 彩色图象摄录输入仪。

1.2 临床资料

临床上收集2003年5月-2004年7月间烧伤后增生性瘢痕整形术后标本，选取烧伤后5~8个月内经积雪草苷治疗(肤康霜外用3次/d，肤康片6~8片/d)和未经任何治疗的增生性瘢痕标本各9例。其中，男12例，女6例；火焰烧伤8例，热液烫伤10例；烧伤面积8%~96%，深II°烧伤14例，III°烧伤4例，主要位于头面部和四肢。瘢痕切取后立即置于液氮，然后-70℃冰箱保存，备用。

1.3 原位杂交

标本-70℃冰箱取出，集中冰冻10 μ m系列切片后，经40 g/L多聚甲醛-磷酸盐缓冲液固定15 min，内含0.4 g/L焦碳酸二乙脂(DEPC)，以消除外源性RNA酶污染，采用TGF- β_1 mRNA，TGF- β_2 mRNA，TGF- β_3 mRNA原位杂交试剂盒，操作按试剂盒说明书进行，操作中所有器皿均用1 g/L的DEPC水处理，并200℃高温4 h，灭菌灭酶，同时设不加探针的阴性对照。

1.4 免疫组织化学染色

标本经石蜡包埋，4 μ m系列切片，采用MMPS、TIMPS及I、III型胶原多抗。具体操作采用二步法免疫组织化学染色，石蜡切片常规脱蜡至水，3% H_2O_2 常温孵育20 min，以消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水洗3次，抗原微波修复3 min，磷酸盐缓冲液(PBS，0.1 mmol/L、pH7.2)洗涤3次，滴加一抗和二抗(分别应用1:300稀释的I型胶原一抗和1:200稀释的III型胶原一抗，37℃孵育2h，滴加生物素标记的二抗常温孵育30 min; 1:200稀释的MMP₁、MMP₂和1:100稀释的TIMP₁、TIMP₂一抗室温孵育1 h，4℃过液，滴加生物素标记的二抗常温孵育45 min)，PBS洗3次，二氨基联苯胺(DAB)显色，苏木素复染，常规封片。显微镜下观察，染

成棕黄色为阳性单位，同时设不加一抗的非特异性对照。

1.5 组织学观察

光镜下观察原位杂交及免疫组化结果，每张切片随机选取10个视野，采用德国KONTRON IBAS 2.5 全自动图象分析系统，进行定量分析，根据阳性面积和灰度来计算平均阳性单位(PU)值[3]。PU值越小阳性单位越大。

$$PU=100 \times \frac{G_{\alpha}-GA}{(AA\beta \cdot G_{\max})}$$

其中 G_{α} 为阳性反应产物 α 相的灰度级；GA为测试A区域(阳性反应产物区 α +背景区 β)的灰度级；AA β 为背景 β 在A区域面积密度； G_{\max} 为仪器的最大灰度分级，本仪器 $G_{\max}=256$ 。

1.6 统计学处理

所有数据均以 PU值表示，采用成组设计资料t检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 大体观察及组织学观察

所有标本均为烧伤后5~8个月增生性瘢痕整形术后标本，经积雪草苷治疗的增生性瘢痕色泽暗红，表面隆起，质地较软；而非积雪草苷治疗的瘢痕颜色较红，表面粗糙，质地较硬。组织学观察可见经积雪草苷治疗的增生性瘢痕胶原含量较少，排列整齐；而非积雪草苷治疗的增生性瘢痕胶原含量多，排列紊乱。

2.2 原位杂交染色观察

增生性瘢痕中TGF- β mRNA主要表达于成纤维细胞胞浆，少部分表达于基层细胞胞浆。图象分析结果显示经积雪草苷治疗的增生性瘢痕中TGF- β_1 mRNA表达明显减少，胞质淡染，统计学上与非积雪草苷治疗组TGF- β_1 mRNA表达有显著性差异($P<0.01$) (图1, 2)；而TGF- β_3 mRNA在积雪草苷治疗的增生性瘢痕中表达增多，明显高于非积雪草苷治疗组的TGF- β_3 mRNA表达($P<0.05$) (图3, 4)；但TGF- β_2 mRNA在上述两组中表达无显著性差异($P>0.05$ ，表1)。



图1 积雪草苷组TGF- β_1 mRNA表达于成纤维细胞胞质，胞质淡染

Fig.1 In situ hybridization of asiaticoside-treated hypertrophic scar showing weak TGF- β_1 mRNA expression in the fibroblast cytoplasm (Original magnification: $\times 200$)

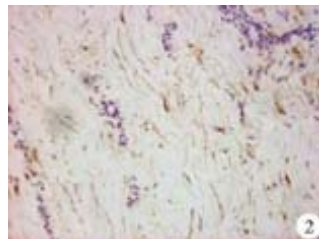


图2 非积雪草苷组TGF- β_1 mRNA表达于成纤维细胞胞质，胞质浓染

Fig.2 In situ hybridization of non-asiaticoside-treated hypertrophic scar showing strong TGF- β_1 mRNA expression in the fibroblast cytoplasm (Original magnification: $\times 200$)

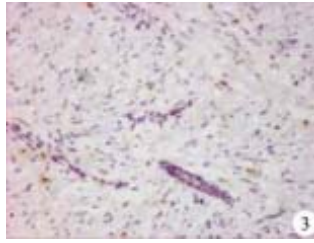


图3 积雪草苷组TGF-β₃ mRNA表达于成纤维细胞胞质，成纤维细胞分布稀疏

Fig.3 In situ hybridization of asiaticoside-treated hypertrophic scar showing strong TGF-β₃ mRNA expression in the cytoplasm of the loosely aligned fibroblasts (Original magnification: ×200)

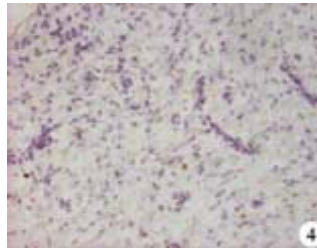


图4 非积雪草苷组TGF-β₃ mRNA表达于成纤维细胞胞质，成纤维细胞分布紧密

Fig.4 In situ hybridization of asiaticoside-treated hypertrophic scar showing weak TGF-β₃ mRNA expression in the cytoplasm of the densely distributed fibroblasts (Original magnification: ×200)

表1 TGF-β mRNA, MMPS/TIMPS 及 I, III型胶原图象分析及统计学结果

Tab.1 Results of image and statistic analysis of TGF-β mRNA, MMPS/TIMPs and type I and III collagens

	PU (asiaticoside group)	PU (non-asiaticoside group)	t*	P
MMP ₁	12.72±2.73	14.40±2.53	1.35	>0.05
MMP ₂	49.60±4.23	47.29±4.57	1.11	>0.05
TIMP ₁	31.28±5.21	24.64±4.16	2.99	<0.01
TIMP ₂	62.58±4.77	60.08±3.87	1.15	>0.05
I Cellagen	4.52±0.73	3.62±0.61	2.81	<0.05
III Cellagen	2.93±0.71	2.37±0.69	1.70	>0.05
TGF-β ₁ mRNA	11.20±2.39	8.04±1.36	3.45	<0.01
TGF-β ₂ mRNA	66.15±4.84	69.53±4.31	1.56	>0.05
TGF-β ₃ mRNA	18.57±2.60	22.03±3.27	2.48	<0.05

*By independent-sample t test

2.3 免疫组织化学观察

基质金属蛋白酶(MMPS)/金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPS)在增生性瘢痕中主要表达于成纤维细胞胞浆，经积雪草苷治疗的增生性瘢痕中TIMP₁表达明显减少，胞质淡染，统计学上与非积雪草苷治疗组TIMP₁表达有

显著性差异 ($P < 0.01$)；而 MMP_1 、 MMP_2 、及 $TIMP_2$ 在上述两组中表达无显著性差异 ($P > 0.05$)。(图5, 6)。积雪草苷治疗的增生性瘢痕中 I 型胶原的阳性表达淡染，图象分析结果显示 I 型胶原含量较少，而非积雪草苷治疗的增生性瘢痕中 I 型胶原的阳性表达浓染，胶原含量多(图7, 8)，这与积雪草苷组有显著性差异 ($P < 0.05$)；而 III 型胶原在上述两组增生性瘢痕中表达无显著性差异 ($P > 0.05$ ，表1)。

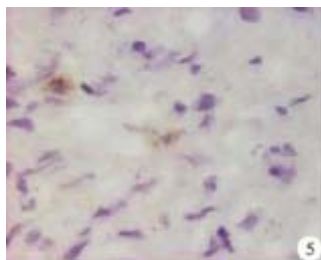


图5 积雪草苷组 $TIMP_1$ 表达，胞质淡染

Fig.5 Immunohistochemistry of asiaticoside-treated hypertrophic scars showing weak $TIMP_1$ expression (Original magnification: $\times 400$)

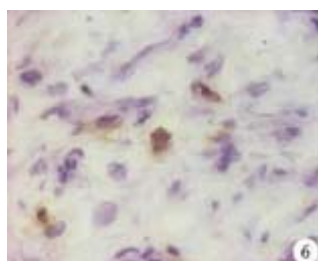


图6 非积雪草苷组 $TIMP_1$ 表达，胞质浓染

Fig.6 Immunohistochemistry of non-asiaticoside-treated hypertrophic scars showing strong $TIMP_1$ expression (Original magnification: $\times 400$)

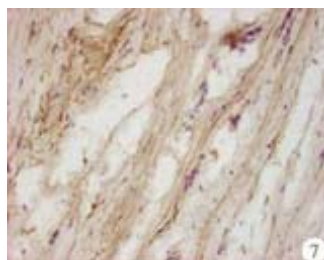


图7 积雪草苷组 I 型胶原表达，胶原含量少，排列整齐

Fig.7 Immunohistochemistry of asiaticoside-treated hypertrophic scars showing small amount of type I collagen in tidy alignment (Original magnification: $\times 200$)

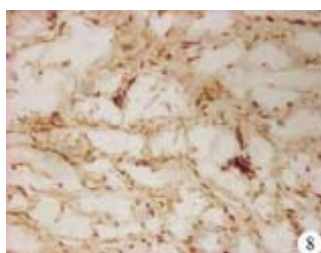


图8 非积雪草苷组 I 型胶原表达，胶原含量多，排列紊乱

Fig.8 Immunohistochemistry of non-asiaticoside-treated hypertrophic scars showing profuse and disorderly aligned type I collagen (Original magnification: $\times 200$)

转化生长因子 β 在哺乳动物可分为TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 三种亚型, 并通过与其受体结合而产生作用[4]。TGF- β_1 , TGF- β_2 具有促进瘢痕增生的作用, 而TGF- β_3 则起到抑制瘢痕增生的作用, 其中TGF- β_1 在增生性瘢痕形成过程中起重要作用[5][6]。本实验中, TGF- β_1 mRNA原位杂交结果及图象分析结果显示经积雪草苷治疗的增生性瘢痕中TGF- β_1 mRNA表达明显减少, 统计学上明显低于非积雪草苷治疗组TGF- β_1 mRNA表达($P < 0.01$), 这与我们先前实验积雪草苷降低体外培养的增生性瘢痕成纤维细胞中TGF- β_1 表达结果相一致[2]。因此, 从体内、体外两方面均证实了积雪草苷能下调TGF- β_1 mRNA在增生性瘢痕中的表达, 以达到减轻瘢痕增生的作用。本实验还观察到TGF- β_3 mRNA在积雪草苷治疗的增生性瘢痕中表达增多, 明显高于非积雪草苷治疗组的TGF- β_3 mRNA表达($P < 0.05$)。因此, 上调TGF- β_3 mRNA在增生性瘢痕中的表达也是积雪草苷减轻瘢痕增生的机制之一。

目前, TGF- β_1 被认为是导致细胞外基质(ECM)聚积的重要生长因子之一, 通过Smad3, 7 mRNA/AP-1信号途径和MMPS/TIMPS途径调节I、III型胶原的合成, TGF- β_1 主要上调 $\alpha_2(I)$ 型胶原启动基因表达, 刺激成纤维细胞产生I型胶原蛋白而引起瘢痕生成[7][8]。基质金属蛋白酶(MMPS)是一组锌依赖蛋白酶类, 对ECM有广泛的降解作用, 是调节ECM动态平衡的最重要的一大酶系[9]。本实验通过对增生性瘢痕中I、III型胶原进行染色, 图象分析结果证实经积雪草苷治疗的增生性瘢痕中I型胶原的阳性表达含量较少, 与非积雪草苷治疗组I型胶原表达有显著性差异($P < 0.05$), 这与积雪草苷治疗组增生性瘢痕中TGF- β_1 mRNA表达减少的结果相一致, 同时, 上述两组增生性瘢痕中MMPS与TIMPS的表达结果显示, 经积雪草苷治疗的增生性瘢痕中TIMP₁表达明显减少, 与非积雪草苷治疗组TIMP₁表达有显著性差异($P < 0.01$), 进一步证实了积雪草苷通过降低TGF- β_1 的表达, 引起TIMP₁表达明显减少, 从而MMP₁/TIMP₁相对比例增加, 达到促进I型胶原降解, 减轻瘢痕增生的作用机制。

参考文献:

- [1]何明芳, 孟正木, 沃联群. 积雪草化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31: 91-93.
- [2]祁少海, 谢举临, 利天增. 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: 53-56.
- [3]申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4: 89-91.
- [4]Chin D, Boyle GM, Parsons PG, et al. What is transforming growth factor-beta (TGF- β) [J]. J Plast Surg, 2004, 57, 215-21.
- [5]Shah M, Foreman DM, Ferguson MWJ, et al. Neutralisation of TGF- β_1 and TGF- β_2 or exogenous addition of TGF- β_3 to cutaneous rat wounds reduces scarring[J]. J Cell Sci, 1995, 108, 985-1002.
- [6]Soo C, Beanes SR, Hu FY, et al. Ontogenetic transition in fetal wound transforming growth factor-beta regulation correlates with collagen organization[J]. Am J Pathol, 2003, 163, 2459-76.
- [7]Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, et al. Smads regulate collagen gel contraction by human dermal fibroblasts[J]. Br J Dermatol, 2003, 149, 464-470.
- [8]Yamane K, Suzuki H, Ihn H, et al. Cell type-specific regulation of the TGF-beta-responsive $\alpha_2(I)$ collagen gene by CpG methylation[J]. J Cell Physiol, 2005, 202, 822-30.
- [9]Denis LJ, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: present achievements and future prospects[J]. Invest New Drugs, 1997, 15, 175-85.

