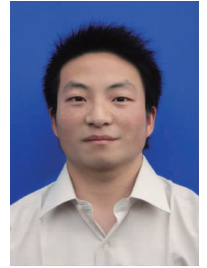


# 丹参酮 II A 磺酸钠对瘢痕成纤维细胞增殖及转化生长因子 $\beta_1$ 和 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白 mRNA 及蛋白表达的影响



刘华 杨华莲 周淑芳 蒙诚跃

**【摘要】** **目的** 研究丹参酮 II A 磺酸钠 (STS) 对人增生性瘢痕 (HS) Fb 增殖及 TGF- $\beta_1$  与  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) mRNA、蛋白表达的影响,探讨 STS 抑制瘢痕的可能机制。 **方法** 收集 8 例患者手术切除的烧伤创面愈合后 HS 组织进行 Fb 培养,取第 3~6 代细胞进行实验。按随机数字表法将细胞分为对照组和实验组,其中实验组又分为 0.050、0.075、0.100、0.125、0.150、0.200 mg/mL STS 亚组,各亚组分别加入含相应浓度的 STS 培养液,对照组加入等体积无血清培养液。各组培养 24、48 h 后,于倒置相差显微镜下观察细胞形态;应用噻唑蓝法检测 Fb 增殖情况并计算增殖抑制率。应用蛋白质印迹法检测培养 48 h 后各组细胞 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达量,RT-PCR 法检测各组 TGF- $\beta_1$  及  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量(此 2 个指标实验组未设 0.200 mg/mL STS 亚组)。对数据行析因设计方差分析,各组间数据比较采用 LSD 检验,方差不齐时应用 Games-Howell 检验。 **结果** (1) 对照组细胞生长良好;实验组细胞出现贴壁减少,排列紊乱,细胞变小、变圆,胞内颗粒增多,细胞坏死等现象。0.200 mg/mL STS 亚组可见大量细胞坏死碎片。(2) 实验组各亚组与对照组相比吸光度值显著降低,Fb 增殖受到明显抑制 ( $P$  值均小于 0.01)。随着 STS 浓度升高和作用时间延长,增殖抑制率同步增大,表现出时间及浓度依赖效应;STS 作用 24、48 h,各实验亚组增殖抑制率分别为 23.58%、32.11%、37.56%、57.98%、79.53%、96.69% 和 34.72%、38.48%、47.62%、64.40%、89.70%、98.01%。(3) 实验组中除 0.050 mg/mL STS 亚组外,其余各亚组 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达量均较对照组明显减少 ( $F$  值分别为 57.674、47.795,  $P$  值均小于 0.001);0.150 mg/mL STS 亚组 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达量降至最低,分别为  $0.34 \pm 0.06$ 、 $0.33 \pm 0.07$ 。各实验亚组 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA mRNA 相对表达量与对照组相比均明显降低 ( $F$  值分别为 68.548、47.522,  $P$  值均小于 0.001);0.150 mg/mL STS 亚组 TGF- $\beta_1$  mRNA ( $0.39 \pm 0.07$ ) 和  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量 ( $0.42 \pm 0.08$ ) 下降最为显著。 **结论** STS 能抑制瘢痕 Fb 增殖、减少 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白和 mRNA 表达,可能有利于减轻 HS 的形成和挛缩,成为治疗瘢痕的潜在药物。

**【关键词】** 瘢痕; 转化生长因子  $\beta_1$ ; 丹参酮 II A 磺酸钠;  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白

**Effects of sodium tanshinone II A sulfonate on proliferation of fibroblasts in scar and the mRNA and protein expressions of transforming growth factor beta 1 and alpha smooth muscle actin** LIU Hua, YANG Hua-lian, ZHOU Shu-fang, MENG Cheng-yue. Department of Burns and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: MENG Cheng-yue, Email: mcy8060@126.com, Tel: 15807713854

**【Abstract】 Objective** To study the effects of sodium tanshinone II A sulfonate (STS) on proliferation of fibroblasts (Fbs) in human hypertrophic scar (HS), the mRNA and protein expressions of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta_1$ ) and alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), and to investigate the scar inhibition mechanism of STS. **Methods** Fbs were isolated from HS tissues that were removed from eight patients after burn injury, and they were cultured in vitro. Cells from the 3rd to the 6th passages were used in the experiment. Fbs were divided into control group and experimental group according to the random number table, and cells in the experimental group was divided into 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.200 mg/mL STS subgroups. Cells in each subgroup were cultured with the corresponding concentration of

STS, and cells in control group were cultured in equal volume of serum-free medium. After being cultured for 24 and 48 h, cell morphology was observed with inverted phase contrast microscope; cell proliferation was determined with MTT method and the proliferation inhibition rate (IR) was calculated. After being cultured for 48 h, the protein levels of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA were determined with Western blotting; the mRNA expressions of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA were determined with RT-PCR (no 0.200 mg/mL STS subgroup was set for these two indicators). Data were processed with factorial analysis of variance; differences between groups were processed with LSD test or Games-Howell test for unequal variances. **Results** (1) Fbs grew well in control group, but reduction in adherence and disorderly arranged Fbs were observed in experimental group. The cells in experimental group became smaller and round, with increasing intracellular particles and necrosis. A large amount of necrotic debris of cells was observed in 0.200 mg/mL STS subgroup. (2) The absorbance value of Fbs in each experimental subgroup was significantly lower than that in control group (with *P* values all below 0.01). Along with the increase in the concentration of STS and extension of culture time, the IR value increased, showing a certain degree of time-concentration dependence. After being cultured with STS for 24 and 48 h, IR values of cells in the experimental subgroups were respectively 23.58%, 32.11%, 37.56%, 57.98%, 79.53%, 96.69% and 34.72%, 38.48%, 47.62%, 64.40%, 89.70%, 98.01%. (3) Except for the 0.050 mg/mL STS subgroup, the protein levels of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA in the other subgroups were significantly lower than those in control group (with *F* values respectively 57.674, 47.795, *P* values all below 0.001). The protein levels of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA reached the nadir in 0.150 mg/mL STS subgroup, respectively  $0.34 \pm 0.06$ ,  $0.33 \pm 0.07$ . The relative expression amounts of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA mRNA in the experimental subgroups were obviously decreased compared with those in control group (with *F* values respectively 68.548, 47.522, *P* values all below 0.001), which was most significant in 0.150 mg/mL STS subgroup, with TGF- $\beta_1$  mRNA and  $\alpha$ -SMA mRNA respectively  $0.39 \pm 0.07$  and  $0.42 \pm 0.08$ . **Conclusions** STS can inhibit the proliferation of Fbs, reduce the protein and mRNA expressions of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA, which may be beneficial to ameliorate the formation and contracture of HS, and it is assumed as a potential drug for treating scars.

**【Key words】** Cicatrix; Transforming growth factor beta 1; Sodium tanshinone II A sulfonate; Alpha smooth muscle actin

丹参酮 II A 是从中药丹参中分离出的主要活性物质,而丹参酮 II A 磺酸钠(STS)是丹参酮 II A 经磺酸化后得到的水溶性药物,药效更强,目前已广泛应用于心脑血管系统疾病的临床治疗。近年研究表明,丹参酮 II A 具有抑制肝、肾、心脏、腹膜等组织纤维化的作用,其可能机制是通过抑制纤维化相关细胞因子信号通路,如 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路从而抑制 I、III 型胶原产生及增加基质金属蛋白酶(MMP)的合成而发挥作用<sup>[1-4]</sup>。增生性瘢痕(HS)是皮肤真皮损伤上皮愈合后大量 Fb 增殖、胶原合成增加和 ECM 过度沉积所造成的一种病理改变,与组织纤维化疾病的病理变化十分相似。前期动物实验证实,早期注射 STS 可减轻兔耳瘢痕内 Fb 的增殖及胶原沉积,对瘢痕增生有较好的抑制作用<sup>[5]</sup>。亦有研究表明丹参酮 II A 具有抑制瘢痕 Fb 增殖和诱导其凋亡的作用<sup>[6]</sup>,但其抑制瘢痕的分子生物学机制少有报道,值得深入研究。

本实验中,笔者通过观察 STS 对人瘢痕 Fb 增殖、TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)蛋白及 mRNA 表达量的影响,试图进一步揭示 STS 抑制瘢痕作用的可能机制,以期 STS 用于临床治疗 HS 提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

STS(上海第一生化药业有限公司,国药准字 H31022558); DMEM 培养液、FBS(美国 Gibco 公司); 噻唑蓝、二甲基亚砷、胰蛋白酶、青(链)霉素(美国 Sigma 公司); 硝酸纤维素膜(美国 Bio-Rad 公司); 兔抗人 TGF- $\beta_1$  单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司), 兔抗人  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体(英国 Abcam 公司); 鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体、羊抗小鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司); Trizol 试剂、反转录试剂盒、PCR 引物(美国 Invitrogen 公司); 二辛丁酸法蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司)。Axiovert 200 型倒置相差显微镜(德国 Zeiss 公司), iMARK™ 型全自动酶标仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司), Thermo Scientific Hybaid MultiBlock Thermal Cycler 型 PCR 仪(美国 Thermo 公司)。

### 1.2 标本采集

瘢痕标本来源于笔者单位烧伤患者手术切除的创面愈合后 HS 组织,共 8 例,其中男 5 例、女 3 例,年龄 19~45(33±9)岁。瘢痕增生时间为 6~18 个月。样本均取自四肢靠近关节部位或颈部,色泽鲜红或略呈暗红色、质地偏硬、高于邻近正常皮肤。手

术前未使用任何抑制瘢痕增生的药物治疗,无其他严重全身性疾病及肿瘤。在本研究中,患者均签署知情同意书,经笔者单位医院伦理委员会审核同意,符合国务院《医疗机构管理条例》<sup>[7]</sup>规定。

### 1.3 Fb 体外培养

取手术切除的瘢痕组织小块,洗净血液,眼科剪修去表皮及皮下组织,将真皮组织剪成约  $1\text{ mm}^3$  大小颗粒,均匀种植于底面积  $25\text{ cm}^2$  规格的培养瓶中,底面朝上放置于体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$  细胞培养箱中,2 h 后加入适量 DMEM 完全培养基(含 L-谷氨酰胺,体积分数 15% FBS,100 U/mL 青霉素,100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素)静置培养。72 h 后行首次换液,之后每隔 2 d 换液 1 次,待 Fb 生长达 80% 融合时以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,传代培养,取第 3~6 代细胞进行实验。每例标本均单独培养,真皮组织块种植于多个  $25\text{ cm}^2$  规格培养瓶中。

### 1.4 细胞形态学观察

将浓度为  $5 \times 10^4$  个/mL 的 Fb 悬液接种于 24 孔板,每孔 1 mL,置细胞培养箱中 48 h,改用无血清培养液培养 2 h,弃培养液。按随机数字表法将细胞分为实验组和对照组,实验组分为 0.050、0.075、0.100、0.125、0.150、0.200 mg/mL STS 亚组,各亚组分别加入含相应浓度 STS 的无血清培养液 0.5 mL,对照组加入等体积的无血清培养液。每组均设 3 个复孔。培养 24、48 h 后于倒置相差显微镜下观察各组 Fb 形态变化。

### 1.5 细胞增殖活力检测

取对数生长期 Fb,胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,按每孔  $6 \times 10^3$  个接种于 96 孔培养板,培养 24 h 后弃培养液,PBS 洗涤 2 次。按随机数字表法将细胞分为实验组和对照组,实验组分为 6 个亚组,分组方法同 1.4。实验组各亚组分别加入 100  $\mu\text{L}$  含相应浓度的 STS 无血清培养液,对照组仅加入等体积无血清培养液,每组均设 8 个复孔。各组分别培养 24、48 h 后弃培养液,PBS 洗涤 2 次。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  无血清培养液及 20  $\mu\text{L}$  噻唑蓝(5 mg/mL),4 h 后终止培养,吸尽孔内上清液,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜,振荡 10 min。酶标仪 490 nm 波长下测定各孔吸光度值,计算平均值。细胞增殖抑制率(%) =  $(1 - \text{各实验亚组吸光度平均值} \div \text{对照组吸光度平均值}) \times 100\%$ 。

### 1.6 TGF- $\beta_1$ 和 $\alpha$ -SMA 蛋白表达量

采用蛋白质印迹法检测。取对数生长期 Fb,以每孔  $1 \times 10^6$  个接种于 6 孔板中。按随机数字表法

将细胞分为实验组和对照组,实验组分为 0.050、0.075、0.100、0.125、0.150 mg/mL STS 亚组。各组细胞培养 24 h 后弃培养液,分别加入含相应浓度 STS 的无血清培养液 2 mL 培养,48 h 后弃培养液,PBS 清洗 2 次。提取各组细胞总蛋白并测定蛋白含量。待测蛋白按每孔 40  $\mu\text{g}$  上样,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。经转膜、封闭后,分别加入稀释比为 1:800 的兔抗人 TGF- $\beta_1$  抗体和稀释比为 1:500 的兔抗人  $\alpha$ -SMA 抗体,4  $^\circ\text{C}$  孵育过夜。弃一抗,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗(稀释比为 1:8000 及 1:5000),室温孵育 1 h。洗膜后采用增强型化学发光试剂盒发光。应用凝胶成像系统分析条带灰度值,目的蛋白表达量以目的蛋白条带灰度值与内参照蛋白 GAPDH 条带灰度值之比表示。

### 1.7 TGF- $\beta_1$ 和 $\alpha$ -SMA mRNA 的表达量

采用 RT-PCR 法检测。细胞处理以及分组方法同 1.6。各组加入含相应浓度的 STS 培养 48 h 后,提取细胞总 RNA,取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 反转录合成互补 DNA。PCR 引物如下。TGF- $\beta_1$  引物:上游 5'-GTACCTGAACCCGTGTTGCT-3',下游 5'-GAACCCGTTGATGTCCACTT-3',产物 287 bp; $\alpha$ -SMA 引物:上游 5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3',下游 5'-GAAGGAATAGCCACGCTCAG-3',产物 367 bp;GAPDH 引物:上游 5'-GAGTCAACGGATTTGTCGT-3',下游 5'-TTGATTTT GGAGGGATCTCG-3',产物 263 bp。PCR 反应后,产物经 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,结果经凝胶成像系统扫描入计算机,应用 Band Scan 5.0 凝胶分析软件分析目的基因和 GAPDH 电泳条带灰度值,取二者的比值进行半定量分析。

### 1.8 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行析因设计方差分析,各组间数据比较采用 LSD 检验(软件自动略去该统计量值),方差不齐时应用 Games-Howell 检验分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组细胞形态学观察

对照组细胞贴壁良好,分布均匀,胞体透亮,呈长梭形、条索状或漩涡状排列,细胞轮廓清晰,分裂增殖旺盛(图 1a)。实验组细胞贴壁减少,排列紊乱,细胞变小、变圆,胞内颗粒增多(图 1b,c);随着

STS 浓度升高,细胞坏死、漂浮增多,0.200 mg/mL STS 亚组出现大量细胞坏死碎片(图 1d)。

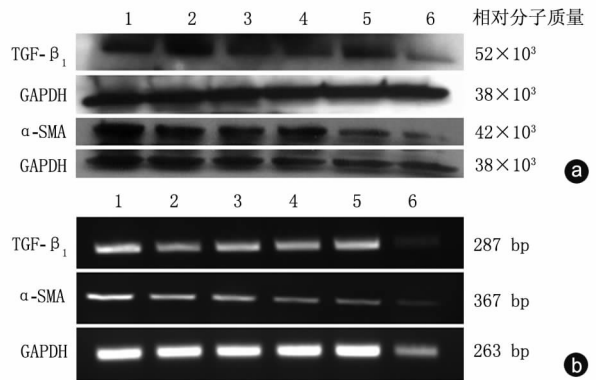
## 2.2 各组细胞增殖情况

STS 对细胞生长的抑制作用受药物浓度和作用时间的双重影响,且存在交互作用(时间因素主效应:  $F = 74.918$ ; 浓度主效应:  $F = 971.664$ ; 二者交互作用:  $F = 4.156$ ;  $P$  值均小于 0.01)。实验组各亚组培养 24、48 h 细胞吸光度值均较对照组细胞相应时相点明显降低( $P$  值均小于 0.01)。随着 STS 浓度升高,细胞增殖抑制率同步增大,表现出明显的浓度效应。0.200 mg/mL STS 亚组 Fb 培养 24、48 h 时细胞大量死亡, Fb 增殖几乎完全抑制,增殖抑制率分别为 96.69%、98.01%; 同一浓度组培养 24、48 h 的吸光度值比较差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),表现出明显的时间效应。见表 1。

## 2.3 各组 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 蛋白及 mRNA 表达

除 0.050 mg/mL STS 亚组外,其余各实验亚组细胞 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 的蛋白表达量均较对照组明显减少( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),以 0.150 mg/mL STS 亚组减少最为显著。

各实验亚组 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达量与对照组比较均显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),其中以 0.150 mg/mL 组下降最为显著。各组  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量与对照组比较均降低,且差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),其中 0.100 ~ 0.150 mg/mL STS 亚组  $\alpha$ -SMA mRNA 表达量降低趋势十分显著。见图 2,表 2。



注:  $\alpha$ -SMA 为  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白; 1. 对照组 [0 mg/mL 丹参酮 II A 磺酸钠 (STS)]; 2 ~ 6. 依次为 0.050、0.075、0.100、0.125 和 0.150 mg/mL STS 亚组

图 2 各组瘢痕 Fb 中 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 蛋白及 mRNA 表达。a. 各组 Fb 的 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达; b. 各组 Fb 的 TGF- $\beta_1$  及  $\alpha$ -SMA mRNA 表达

## 3 讨论

深度烧伤创面愈合后常出现明显的 HS, 导致四肢及颈部等功能部位发生挛缩, 造成患者外貌改变和关节功能障碍, 严重影响患者生活质量和劳动能力。由于 HS 发病机制尚不清楚, 目前仍缺乏有效的防治方法<sup>[8]</sup>。研究表明多种细胞与细胞因子参与了 HS 的形成和发展, 其中 Fb 和 TGF- $\beta_1$  在 HS 形成过程中起着重要作用<sup>[9-11]</sup>,  $\alpha$ -SMA 被认为与瘢痕挛缩密切相关<sup>[12]</sup>。因此, 创面修复过程中抑制 Fb 增殖, 减小 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 的产生, 对 HS 的防治具有积极作用。

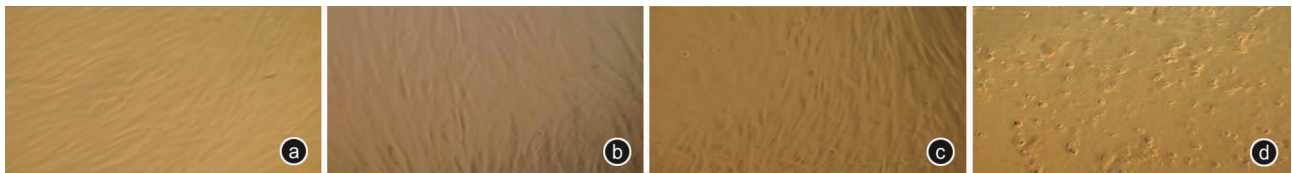


图 1 各组 Fb 培养 48 h 形态观察 倒置相差显微镜  $\times 100$ 。a. 对照组 Fb 贴壁良好, 呈长梭形、条索状或漩涡状排列; b. 0.075 mg/mL 丹参酮 II A 磺酸钠 (STS) 组细胞贴壁减少, 排列紊乱; c. 0.125 mg/mL STS 组 Fb 变小、变圆, 胞内颗粒增多; d. 0.200 mg/mL STS 组 Fb 坏死, 出现大量细胞坏死碎片

表 1 噻唑蓝法检测各组瘢痕 Fb 不同时相点增殖情况

组别	培养 24 h		培养 48 h		P 值
	吸光度值 ( $\bar{x} \pm s$ )	增殖抑制率 (%)	吸光度值 ( $\bar{x} \pm s$ )	增殖抑制率 (%)	
对照组	0.345 $\pm$ 0.015	0	0.341 $\pm$ 0.026	0	0.728
0.050 mg/mL STS 亚组	0.264 $\pm$ 0.022 <sup>a</sup>	23.58	0.223 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup>	34.72	< 0.001
0.075 mg/mL STS 亚组	0.234 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>	32.11	0.210 $\pm$ 0.015 <sup>a</sup>	38.48	0.004
0.100 mg/mL STS 亚组	0.215 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	37.56	0.179 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	47.62	< 0.001
0.125 mg/mL STS 亚组	0.145 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>	57.98	0.121 $\pm$ 0.017 <sup>a</sup>	64.40	0.005
0.150 mg/mL STS 亚组	0.071 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>	79.53	0.035 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	89.70	< 0.001
0.200 mg/mL STS 亚组	0.011 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	96.69	0.007 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	98.01	0.013

注: 各组样本数为 8; STS 为丹参酮 II A 磺酸钠; 与对照组 (0 mg/mL STS) 比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;  $P$  值为组内培养 24 h 与 48 h 的吸光度值比较所得

表 2 各组瘢痕 Fb 培养 48 h 后 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TGF- $\beta_1$		$\alpha$ -SMA	
	蛋白表达量	mRNA 表达量	蛋白表达量	mRNA 表达量
对照组	0.92 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.04	0.83 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.03
0.050 mg/mL STS 亚组	0.88 $\pm$ 0.07	0.84 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.77 $\pm$ 0.07	0.87 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
0.075 mg/mL STS 亚组	0.73 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.66 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
0.100 mg/mL STS 亚组	0.67 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.69 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
0.125 mg/mL STS 亚组	0.74 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
0.150 mg/mL STS 亚组	0.34 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
F 值	57.674	68.548	47.795	47.522
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:各组样本数为 5;数据以灰度值比值表示;STS 为丹参酮 II A 磺酸钠, $\alpha$ -SMA 为  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白;与对照组 (0 mg/mL STS) 比较,<sup>a</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>b</sup>  $P < 0.05$

本实验结果显示,体外培养的瘢痕 Fb 经 STS 干预后,实验组细胞的增殖能力较对照组明显降低,且呈现出时间及浓度效应,表现为高浓度组细胞出现大量死亡,与陈刚等<sup>[6]</sup>和肖小娜等<sup>[13]</sup>的研究结果一致,再次证明丹参酮 II A 在抑制 Fb 增殖及促进其凋亡方面有较好的作用。Fb 参与皮肤损伤后创面愈合和 HS 形成的全过程,是瘢痕形成的主要效应细胞,与胶原蛋白合成为主的 ECM 大量沉积关系密切<sup>[10]</sup>。笔者已在前期动物实验中证实,STS 不仅可抑制 Fb 的功能,还可减少 Fb 胶原合成<sup>[5]</sup>。有研究表明,丹参酮 II A 可通过下调抑癌基因 bcl-2,激活凋亡诱导基因 p53,抑制转录激活蛋白 3,激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 等多种途径,诱导多种肿瘤细胞凋亡<sup>[14-16]</sup>。故推测 STS 可能通过 2 个方面作用抑制 Fb 增殖及促进其凋亡:一是通过丹参酮 II A 自身对细胞的毒性作用抑制细胞生长,直接杀伤细胞;二是通过多种途径调节凋亡相关信号通路,诱导促凋亡基因高表达,进而促进凋亡相关蛋白的合成诱导凋亡。

TGF- $\beta_1$  是创伤愈合及瘢痕形成的主要影响因素之一,与 ECM 沉着及纤维化疾病密切相关<sup>[17]</sup>。皮肤损伤后组织中最早出现的 TGF- $\beta_1$  等细胞因子来源于血小板、巨噬细胞及中性粒细胞,在创面愈合过程中参与 Fb 活化,继而产生大量 TGF- $\beta_1$ <sup>[9,18]</sup>。HS 生长后期常会出现挛缩,可能原因是瘢痕组织中 Fb 分化为肌成纤维细胞,后者合成  $\alpha$ -SMA,又称肌动蛋白微丝,构成细胞内收缩系统,带动胞外胶原纤维移位使瘢痕发生挛缩<sup>[19]</sup>。因此,瘢痕内 TGF- $\beta_1$  持续高水平表达和  $\alpha$ -SMA 的合成与后期瘢痕挛缩关系密切。本实验用 STS 干预培养 HS 的 Fb 后,细胞 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 蛋白 mRNA 表达均受到抑制,其抑制效应呈浓度依赖关系,且二者降低趋势一致。

当药物剂量达 0.150 mg/mL 时,TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白表达量均明显下降,表明 STS 可以抑制 Fb 的 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白合成以及基因表达,提示其可能通过调节与之相对应的信号通路而发挥抑制瘢痕的作用。

有研究显示,丹参酮 II A 可通过干扰和阻塞鼠肾间质 Fb 的 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号转导通路改善大鼠肾间质纤维化<sup>[2]</sup>,能够抑制良性狭窄胆管 Fb 增殖,抑制胶原分泌及诱导 MMP-9 mRNA 的表达而促进胶原降解,从而抑制胆道瘢痕的形成<sup>[20]</sup>。冯俊等<sup>[21]</sup>认为,丹参酮 II A 具有降低血管紧张素 II 诱导 Fb 合成 I、III 型胶原的作用,可能机制是下调结缔组织生长因子水平;亦可通过作用于蛋白激酶 B 信号通路,防止心肌肥厚<sup>[22]</sup>。杨伟峰等<sup>[23]</sup>观察到,丹参酮 II A 可剂量依赖性地抑制肝星状细胞增殖,不同程度地抑制 I 型胶原、透明质酸和层粘连蛋白分泌,提示其在细胞水平有抗肝纤维化效应。另一方面,丹参酮 II A 是天然的抗氧化剂,可通过清除自由基,提高抗氧化酶(如 SOD、谷胱甘肽过氧化酶等)活性,抑制脂质过氧化反应,减少氧化损伤和氧自由基介导的信号通路异常激活,从而抑制细胞过度增殖和胶原大量合成<sup>[24-26]</sup>。综合上述观点及本实验结果,笔者认为 STS 可能通过抑制细胞增殖、调节 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路、降低  $\alpha$ -SMA 合成、减轻氧化损伤等多种途径抑制瘢痕增生和挛缩。本课题组将继续研究 STS 对瘢痕 Fb 胶原合成、氧自由基代谢平衡及 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号通路的作用,届时将根据研究结果综合评价 STS 对瘢痕 Fb 的影响,进一步揭示 STS 抗瘢痕作用的机制。

本实验中由于标本来源的个体差异、瘢痕生长位置及增生时间不同等因素,Fb 的生物学特性可能有一定差异,但在标本选择时已尽最大可能避免这

种差异对实验的影响,选择了四肢靠近关节及颈部外观差异较小的 HS 进行细胞体外培养,结果也是反复多次实验后的平均水平。本实验还观察到 STS 抑制细胞增殖和抑制 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白合成的趋势具有一致性,推测二者之间存在联系。细胞生长状态的下降在一定程度上会影响细胞内蛋白的合成和基因表达,但实验中所用检测方法具有高度特异性,所需样品也十分微量,其结果可以反映出总体情况,也能够确定 STS 对瘢痕 Fb 有抑制作用。

综上所述,在人瘢痕 Fb 体外培养中,STS 能够抑制细胞增殖、减少 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白合成,降低 TGF- $\beta_1$  及  $\alpha$ -SMA mRNA 表达,可能有利于减轻 HS 的形成和挛缩,成为治疗瘢痕的潜在药物。

## 参考文献

- [1] 兰海涛. 丹参酮 II A 抗肝纤维化的临床观察. 中国实用医药, 2008, 3(25): 135.
- [2] Tang J, Zhan C, Zhou J. Effects of tanshinone II A on transforming growth factor beta1-Smads signal pathway in renal interstitial fibroblasts of rats. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(5): 539-542.
- [3] Fang J, Xu SW, Wang P, et al. Tanshinone II-A attenuates cardiac fibrosis and modulates collagen metabolism in rats with renovascular hypertension. Phytomedicine, 2010, 18(1): 58-64.
- [4] Chunming J, Miao Z, Cheng S, et al. Tanshinone II A attenuates peritoneal fibrosis through inhibition of fibrogenic growth factors expression in peritoneum in a peritoneal dialysis rat model. Ren Fail, 2011, 33(3): 355-362.
- [5] 张建华, 欧斌贤, 蒙诚跃. 早期注射丹参酮 II A 磺酸钠可抑制兔耳增生性瘢痕. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(50): 9457-9461.
- [6] 陈刚, 梁奕敏, 李青峰. 丹参酮 II A 诱导瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡及细胞周期阻滞的实验研究. 组织工程与重建外科杂志, 2012, 8(2): 73-77.
- [7] 中华人民共和国国务院. 医疗机构管理条例. 1994-02-26.
- [8] 吴宗耀. 烧伤瘢痕的防治难点. 中华烧伤杂志, 2004, 20(2): 67-68.
- [9] van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MM, et al. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. Burns, 2009, 35(1): 15-29.
- [10] Wang J, Dodd C, Shankowsky HA, et al. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. Lab Invest, 2008, 88(12): 1278-1290.
- [11] 付小兵, 程颺, 盛志勇. 创面愈合与瘢痕形成的分子学研究. 中

- 国临床康复, 2002, 6(4): 464-466.
- [12] Agarwal C, Britton ZT, Alaseirlis DA, et al. Healing and normal fibroblasts exhibit differential proliferation, collagen production, alpha-SMA expression, and contraction. Ann Biomed Eng, 2006, 34(4): 653-659.
- [13] 肖小娜, 张培华, 罗少军, 等. 丹参酮 II A 对增生性瘢痕成纤维细胞凋亡的作用. 广东医学院学报, 2005, 23(4): 359-360.
- [14] Dong Y, Morris-Natschke SL, Lee KH. Biosynthesis, total syntheses, and antitumor activity of tanshinones and their analogs as potential therapeutic agents. Nat Prod Rep, 2011, 28(3): 529-542.
- [15] Kapoor S. Tanshinone II A: a potent, natural anti-carcinogenic agent for the management of systemic malignancies. Chin J Integr Med, 2009, 15(2): 153.
- [16] Tang C, Xue HL, Huang HB, et al. Tanshinone II A inhibits constitutive STAT3 activation, suppresses proliferation, and induces apoptosis in rat C6 glioma cells. Neurosci Lett, 2010, 470(2): 126-129.
- [17] Liu W, Wang DR, Cao YL. TGF-beta: a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy. Curr Gene Ther, 2004, 4(1): 123-136.
- [18] Chin D, Boyle GM, Parsons PG, et al. What is transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )?. Br J Plast Surg, 2004, 57(3): 251-221.
- [19] Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. Wound Repair Regen, 2005, 13(1): 7-12.
- [20] 战孝光, 崔乃强, 李忠廉, 等. 丹参酮 II A 对兔胆管成纤维细胞的影响. 中国中西医结合外科杂志, 2010, 16(3): 326-330.
- [21] 冯俊, 李树生, 屠恩远. 丹参酮 II A 通过下调 CTGF 抗血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞 I 型、III 型胶原合成. 中国中医急症, 2012, 21(4): 560-561, 573.
- [22] 屠恩远, 周亚光, 王照华, 等. 丹参酮 II A 对肥厚心肌信号转导系统蛋白激酶 B 通路的影响. 中国康复, 2008, 23(6): 374-376.
- [23] 杨伟峰, 陈厚昌, 夏笔军. 丹参酮 II A 对肝星状细胞增殖及分泌细胞外基质的影响. 实用医学杂志, 2003, 19(11): 1191-1192.
- [24] 王卉, 张中林, 马越娇, 等. 硒与丹参酮 II A 磺酸钠对兔心肌缺血再灌注损伤血浆 NO SOD GSH-Px MDA 的影响. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 634-636.
- [25] 王维蓉, 林蓉, 彭宁, 等. 丹参酮 II A 对过氧化氢损伤人血管内皮细胞的保护作用. 中药材, 2006, 29(1): 49-51.
- [26] Gao S, Liu Z, Li H, et al. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone II A. Atherosclerosis, 2012, 220(1): 3-10.

(收稿日期: 2012-11-02)

(本文编辑: 梁光萍)

## · 科技快讯 ·

### 普萘洛尔改善烧伤后肝脏磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路

重度烧伤能够诱发肝脏的内质网应激反应。内质网应激可以激活 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK), 并通过磷酸化胰岛素受体底物 1, 引起后续的胰岛素抵抗, 从而抑制胰岛素受体信号。烧伤后会引发儿茶酚胺类物质显著、持续性增加。研究者观察到, 给予非选择性的  $\beta_1$  和  $\beta_2$  肾上腺素能受体拮抗剂普萘洛尔, 能够减轻内质网应激并抑制 JNK 信号的激活。普萘洛尔改善内质网应激, 通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路显著增加胰岛素敏感性。因此, 研究者认为烧伤后儿茶酚胺的释放是引起内质网应激与胰岛素受体信号受损的主要原因。

江旭品, 编译自《Mol Med》, 2012, 9(18): 707-711; 黄跃生, 审校