

# 消癭酊对瘢痕疙瘩成纤维细胞 I、III 型胶原蛋白的影响

黄辉 李宇明<sup>①</sup> 陈东明 鲍卫汉

北京大学第三医院整形外科(北京,100083)

**【摘要】** 目的 研究复方中药制剂消癭酊对体外培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞(Keloid fibroblast, KFB) I、III 型胶原蛋白的影响。方法 6 例瘢痕疙瘩成纤维细胞为实验组, 6 例正常皮肤成纤维细胞(Normal fibroblast, NFB)为对照组, 采用成纤维细胞体外培养、ABC 免疫细胞化学染色技术及积分光密度( IOD )分析, 观察在  $10\mu\text{g/ml}$  消癭酊浓度作用下, 瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞 I、III 型胶原蛋白的表达。结果 瘢痕疙瘩成纤维细胞 I、III 型胶原阳性染色表达强度均显著高于正常皮肤成纤维细胞 ( $11113.1 \pm 1304.9$  vs  $3519.6 \pm 236.0$  与  $11157.7 \pm 1300.3$  vs  $2626.5 \pm 426.3$ ,  $t$  值分别为 14.42 和 13.47,  $P$  值分别为 0.00003 和 0.00004)。  $10\mu\text{g/ml}$  浓度的消癭酊作用 48 小时后: 1. 瘢痕疙瘩成纤维细胞 I、III 型胶原阳性染色表达强度均显著高于正常皮肤成纤维细胞 ( $7675.4 \pm 825.5$  vs  $2305.2 \pm 320.4$  与  $10595.2 \pm 1311.5$  vs  $2434.8 \pm 356.9$ ,  $t$  值分别为 13.37 和 12.66,  $P$  值分别为 0.00004 和 0.00005)。 2. 瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞呈阳性表达的 I、III 型胶原染色强度明显下降, 与未经药物处理的相应空白对照相比具有显著性差异 ( $7675.4 \pm 825.5$  vs  $11113.1 \pm 1304.9$  与  $10595.2 \pm 1311.5$  vs  $11157.7 \pm 1300.3$ ,  $t$  值分别为 10.31 和 4.68,  $P$  值分别为 0.0001 和 0.0054)。 瘢痕疙瘩组 I 型胶原蛋白合成抑制率 30.7%, III 型胶原蛋白合成抑制率为 5.1%。结论 在 I、III 型胶原蛋白表达方面, 体外培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞明显高于正常皮肤成纤维细胞; 消癭酊能显著抑制体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞和正常皮肤成纤维细胞 I、III 型胶原蛋白的表达, 并以抑制 I 型胶原表达为主。

**【关键词】** 瘢痕疙瘩; 成纤维细胞; 胶原蛋白

中图分类号: R619+.605.31

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2003)03-0249-03

**Effect of Xiao Ban Xu on the expression of collagen I and III of keloid fibroblasts in vitro** Huang Hui, Li Yuming, Chen Dongming et al. Department of Plastic Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of Xiao Ban Xu, a compound Chinese traditional medicinal prescription, on the expression of collagen I and III of keloid fibroblasts in vitro. **Methods** Six samples of keloid fibroblasts (KFB) and 6 samples of normal fibroblasts (NFB) entered the study as experimental and control groups, respectively. With the application of Xiao Ban Xu ( $10\mu\text{g/ml}$ ), the fibroblast culture system and the ABC immunocytochemical staining method were used to investigate the expression of collagen I and III of KFB and NFB. **Results** The density of the staining of collagen I and III in the experimental group was much higher than that in the control group, with ( $7675.4 \pm 825.5$  vs  $2305.2 \pm 320.4$  and  $10595.2 \pm 1311.5$  vs  $2434.8 \pm 356.9$ ;  $t = 13.37$  and  $12.66$ ,  $P = 0.00004$  and  $0.00005$ ) or without ( $11113.1 \pm 1304.9$  vs  $3519.6 \pm 236.0$  and  $11157.7 \pm 1300.3$  vs  $2626.5 \pm 426.3$ ;  $t = 14.42$  and  $13.47$ ,  $P = 0.00003$  and  $0.00004$ ) the addition of Xiao Ban Xu. Compared with blank control group, the density of the staining of collagen I and III was degenerated greatly in the experimental group after 48 hours of application of Xiao Ban Xu ( $7675.4 \pm 825.5$  vs  $11113.1 \pm 1304.9$  and  $10595.2 \pm 1311.5$  vs  $11157.7 \pm 1300.3$ ;  $t = 10.31$  and  $4.68$ ,  $P = 0.0001$  and  $0.0054$ ). Furthermore, the inhibition ratios of collagen I was 30.7%, and the one of collagen III 5.1%, in the experimental group. **Conclusions** The expression of collagen I and III of keloid fibroblasts in vitro may be significantly more intensive than the one of normal skin fibroblasts. It seems that the expression of collagen I and III, especially collagen I, in keloid fibroblasts and normal skin fibroblasts in vitro may be suppressed greatly by the application of Xiao Ban Xu.

**【Key Words】** Keloid; Fibroblast; Collagen

瘢痕疙瘩是异常增生的病理性瘢痕, 可因皮肤受到轻微损伤, 就能致使纤维组织过度增生而形成。与增生性瘢痕不同, 瘢痕疙瘩组织的生长超过最初损伤的边缘, 不断侵入周围正常皮肤, 不能自行退化<sup>[1]</sup>。到目前为止, 尚无特效疗法。已有的治疗方

法, 常常存在一定的副作用和较高的复发率<sup>[2]</sup>。本实验应用由白花蛇舌草等七味中草药制成的“消癭酊”, 探讨其对瘢痕疙瘩成纤维细胞(Keloid fibroblast, KFB) I、III 型胶原蛋白合成的影响。

一、标本 实验中所有瘢痕疙瘩和正常皮肤来自本院,术前均取得患者同意。瘢痕疙瘩 6 例,男 2 例,女 4 例。年龄(7~58)岁,病程(2~20)年。正常皮肤 6 例,男 1 例,女 5 例。年龄(21~53)岁。

二、主要试剂 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium;GIBCO-BRL);小牛血清(TBD);胰蛋白酶(DIFCO);HEPES(Hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid,羟乙基哌嗪乙磺酸;DNN);台盼蓝(Sigma);兔抗人 I、III 型胶原多克隆抗体(TBD,工作液浓度分别为 1:100 和 1:200);兔二抗免疫组化检测试剂盒(TBD);DAB(Sigma)。消癭酊(由江门市五邑中医院提供,主要由白花蛇舌草、生半夏、半枝莲、苦参、丹参、赤芍、莪术组成)。

### 三、方法

#### 1. 细胞培养

无菌条件下将手术切下的瘢痕疙瘩和正常皮肤,剪成 $<0.5\text{mm}^3$ 碎块,应用组织块法进行成纤维细胞原代培养。(3~4)周单层细胞长成后,用 0.25%胰蛋白酶消化,进行传代培养。

将第(3~5)代指数生长期瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞(Normal fibroblast,NFB)用 0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液,台盼蓝染色法测定细胞活力,调整细胞悬液浓度为 $5\times 10^5$ 个细胞/ml,1ml/孔接种于 6 孔板(内含消毒盖片),在 $37^\circ\text{C}$ 、5%二氧化碳、饱和湿度条件下孵育 24h 后,弃上清液。加入含 10%新生牛血清 DMEM 培养液。

实验分瘢痕疙瘩成纤维细胞组和正常皮肤成纤维细胞组,每组均设空白对照组,只加入 2ml 10% DMEM。消癭酊组加入 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 消癭酊工作液 2ml,继续培养 48h。

#### 2. ABC 免疫细胞化学显色法检测成纤维细胞中 I、III 型胶原蛋白含量

消癭酊作用 48h 后,用 PBS 漂洗 2 次, $-20^\circ\text{C}$ 丙酮固定 20min,0.5% $\text{H}_2\text{O}_2$ -甲醇室温孵育 10min,常规 ABC 法标记瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞中 I、III 型胶原蛋白,DAB 显色,逐级脱水、透明、封片。

#### 四、图像分析

每张细胞爬片按“米”字形选取 9 个视野( $\times 200$ ),进行图像分析。用 LEICA Q550IW 型图像分析仪对同一切片 9 个视野图像分析结果进行处理,获得积分光密度(Integrity of optical density,IOD)平均值。

#### 五、统计学分析

应用 SPSS 统计软件对实验数据进行统计学处理。采用配对  $t$  检验,分析瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞在“消癭酊”作用前后 I、III 型胶原蛋白表达量的差异, $P<0.05$  为差异有显著性。

1. 消癭酊对瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞 I 型胶原蛋白合成的影响,见表 1,图 1,图 2。

2. 消癭酊对瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞 III 型胶原蛋白合成的影响,见表 2,图 3,图 4。

表 1 消癭酊对瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞 I 型胶原含量(IOD)的影响( $\bar{x}\pm s$ )

	$0\mu\text{g}/\text{ml}$	$10\mu\text{g}/\text{ml}$	$t$ 值	$P$ 值	抑制率
KFB	$11113.1\pm 1304.9$	$7675.4\pm 825.5$	10.31	0.0001	30.7%
NFB	$3519.6\pm 236.0$	$2305.2\pm 320.4$	15.70	0.00002	34.7%
$t$ 值	14.42	13.37	—	—	—
$P$ 值	0.00003	0.00004	—	—	—

KFB 瘢痕疙瘩成纤维细胞

NFB 正常皮肤成纤维细胞

表 2 消癭酊对瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞 III 型胶原含量(IOD)的影响( $\bar{x}\pm s$ )

	$0\mu\text{g}/\text{ml}$	$10\mu\text{g}/\text{ml}$	$t$ 值	$P$ 值	抑制率
KFB	$11157.7\pm 1300.3$	$10595.2\pm 1311.5$	4.68	0.0054	5.1%
NFB	$2626.5\pm 426.3$	$2434.8\pm 356.9$	3.54	0.0166	7.0%
$t$ 值	13.47	12.66	—	—	—
$P$ 值	0.00004	0.00005	—	—	—

### 讨 论

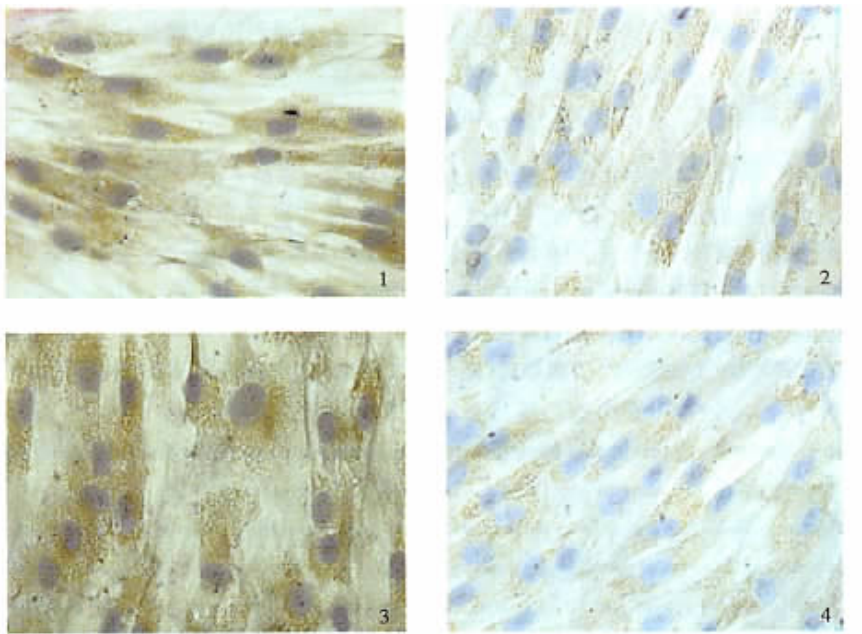
瘢痕疙瘩是人类特有的疾病<sup>[3]</sup>,以成纤维细胞增殖旺盛并分泌大量细胞外基质,尤其是胶原的过度合成(约为正常皮肤的 20 倍)与沉积为特征,是一种特殊的病理性瘢痕。与增生性瘢痕不同,瘢痕疙瘩具有种族特发性、部位易感性和家族遗传性等特点。除了炎症、外伤、手术以外,预防接种、蚊叮虫咬等原因均可引发瘢痕疙瘩,但通常情况下没有明确的发病原因<sup>[4]</sup>。与正常皮肤和正常瘢痕相比,瘢痕疙瘩组织是由大量漩涡状排列的胶原纤维和粘液样基质组成,其中含有功能异常的成纤维细胞和管腔闭塞的毛细血管<sup>[5]</sup>。瘢痕疙瘩的胶原纤维比增生性瘢痕更粗大,排列更不规则,胶原间距也较小,其胶原构成及胶原间交叉连接与新鲜肉芽组织和胚胎皮肤相似,表明瘢痕疙瘩的胶原组织与正常皮肤的胶原相比显得不成熟、不稳定<sup>[6]</sup>。瘢痕疙瘩的胶原组织主要由 I、III 型胶原组成。与正常皮肤组织相比,瘢痕疙瘩 I、III 型胶原含量大量增加<sup>[7]</sup>。

中医治疗瘢痕有着悠久的历史,最早可见于西汉《五十二病方》,明代《普济方》中亦有瘢痕疙瘩治疗的相关记载<sup>[4]</sup>。近年来,随着医药科技的发展,越来越多的中药应用于瘢痕疙瘩等病理性瘢痕的治疗。中药治疗瘢痕的机制研究,目前主要集中在丹参、川芎嗪、苦参等单味药<sup>[8-10]</sup>,由白花蛇舌草、生半夏、半枝莲、苦参、丹参、赤芍、莪术等中药配制而成的复方制剂消癭酊,在临床上已初见成效。应用消癭酊后,瘢痕疙瘩消退的机制是否与其抑制瘢痕

疙瘩成纤维细胞合成细胞外基质以及促进细胞外基质的降解有关,需要进一步的实验研究。

本实验中,体外培养的传代早期的瘢痕疙瘩成纤维细胞在胶原蛋白合成方面仍然保留其体内特性,I、III型胶原蛋白的含量明显高于正常皮肤成纤维细胞。应用消癭酯以后,瘢痕疙瘩成纤维细胞I、

III型胶原蛋白的含量明显下降,I、III型胶原蛋白合成抑制率分别为30.7%和5.1%。尽管瘢痕疙瘩成纤维细胞I、III型胶原蛋白的含量仍明显高于正常皮肤,但其合成的抑制率与正常皮肤相似(分别为34.7%和7.0%)。



I型胶原(图1、2) III型胶原(图3、4)多克隆抗体进行免疫细胞化学染色(ABC法,  $\times 200$ )

图1. 瘢痕疙瘩成纤维细胞中有大量棕黄色沉淀

图2. 正常皮肤成纤维细胞中有少量棕黄色沉淀

图3. 瘢痕疙瘩成纤维细胞中有大量棕黄色沉淀

图4. 正常皮肤成纤维细胞中有少量棕黄色沉淀

瘢痕疙瘩组织中I、III型胶原蛋白含量的增高可能与其mRNA水平升高有关,而转录活性的增强或mRNA转录子稳定性的提高与I、III型胶原蛋白mRNA水平升高密切相关。除了与转录、翻译水平调控有关以外,瘢痕疙瘩中I、III型胶原蛋白的过量沉积还与其蛋白修饰和降解有关。瘢痕疙瘩中,与胶原蛋白合成和前胶原三螺旋结构的稳定性密切相关的脯氨酸羟化酶活性明显升高,催化细胞内胶原合成半乳糖基羟赖氨酰葡萄糖转移酶活性也增高<sup>[4]</sup>。究竟消癭酯抑制I、III型胶原蛋白合成的作用发生在何种环节,还需要进一步研究。

在本实验中,消癭酯能显著抑制体外培养瘢痕疙瘩成纤维细胞I、III型胶原蛋白的表达,并以抑制I型胶原的表达为主。但是消癭酯治疗瘢痕疙瘩等病理性瘢痕的作用机制,还有待于进一步的实验探索和临床研究。

## 参 考 文 献

1 Berman B, Bielek HC. Keloids. J Am Acad Dermatol, 1995, 33: 117 - 123.

万方数据

2 Berman B, Flores F. The treatment of hypertrophic scars and keloids. Eur J Dermatol, 1998, 8: 591 - 595.

3 Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP. Keloids and hypertrophic scars: A comprehensive review. Plast Reconstr Surg, 1989, 84: 827 - 837.

4 鲍卫汉主编. 实用瘢痕学. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 133 - 137.

5 Blackburn WR, Cosman B. Histologic basis of keloid and hypertrophic scar differentiation. Arch Pathol, 1966, 82: 65 - 71.

6 Di Cesare PE, Cheung DT, Perelman N, et al. Alteration of collagen composition and cross-linking in keloid tissues. Matrix, 1990, 10: 172 - 178.

7 Friedman DW, Boyd CD, Mackenzie JW, et al. Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. J Surg Res, 1993, 55: 214 - 222.

8 商庆新, 张涤生, 关文祥, 等. 丹参和川芎嗪对瘢痕成纤维细胞生长的体外抑制实验. 中国修复重建外科杂志, 1998, 12: 321 - 324.

9 兰海, 王臻, 张琳西, 等. 川芎嗪抑制瘢痕成纤维细胞增殖及胶原的合成. 第四军医大学学报, 1999, 20: 964 - 965.

10 朱堃, 宋健, 张兴荣, 等. 苦参碱对成纤维细胞增殖、形态学及转化生长因子 $\beta_1$ 的影响. 中国新药与临床杂志, 2000, 19: 461 - 463.

(收稿日期 2002 - 04 - 22)

(修回日期 2002 - 07 - 04)