

· 基础研究 ·

丹参酮ⅡA 磺酸钠在低氧下对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和促纤维化因子表达的影响^{*}

康春福 陈 斌 秦泽莲^{**} 孙 艳^① 李艳芳^① 于东宁^② 安 阳 毕洪森

(北京大学第三医院成形外科, 北京 100191)

【摘要】 目的 研究常氧和低氧下, 丹参酮ⅡA 磺酸钠(sodium tanshinone ⅡA sulfonate, STS)对瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts, KFs)增殖和促纤维化因子表达的影响, 探讨 STS 治疗瘢痕疙瘩的可能作用。 **方法** 原代培养 5 例 KFs, 将细胞分组, 分别在常氧(21% O₂)和低氧(2% O₂)下用不同剂量的 STS(0、50、100、200、400、800 μmol/L)干预 48 h, 采用 CCK-8 方法检测细胞增殖活力, 同时在倒置相差显微镜下观察细胞的形态学变化。用不同剂量的 STS(0、100、200 μmol/L)同样干预 48 h, 实时定量 PCR 检测低氧诱导因子 1α(HIF-1α)、转化生长因子 β1(TGF-β1)、I 型胶原(Col I)、Ⅲ型胶原(Col Ⅲ)、血管内皮生长因子(VEGF)、成骨细胞特异因子 2(Periostin)的 mRNA 表达情况, 蛋白质印迹法检测 HIF-1α、TGF-β1 蛋白的表达情况。 **结果** 低氧与常氧下的 KFs 增殖活力无明显差异; STS 在常氧和低氧下明显抑制 KFs 增殖($P < 0.01$), 其有剂量依赖性, 在低氧条件下 STS 的起效剂量比常氧下的高。低氧能够引起 HIF-1α 的 mRNA 和蛋白分别增加 0.606($P = 0.037$)、0.950($P = 0.002$), VEGF mRNA 上调 7.256($P = 0.043$), Periostin mRNA 上调 6.285($P = 0.006$), TGF-β1 蛋白增加 1.641($P = 0.011$), 对 Col I 和 Col Ⅲ的 mRNA 的表达无明显影响。常氧下, 200 μmol/L 的 STS 增加 HIF-1α 和 Periostin 的 mRNA 表达分别为 0.750($P = 0.015$)和 8.553($P = 0.000$), 减少 TGF-β1、Col I 和 Col Ⅲ的 mRNA 表达分别为 0.349($P = 0.007$)、0.320($P = 0.006$)、0.453($P = 0.015$), 对 TGF-β1 蛋白和 VEGF mRNA 表达影响不明显。低氧 48 h, 200 μmol/L 的 STS 使 HIF-1α mRNA 和蛋白表达分别减少 0.548($P = 0.016$)、0.984($P = 0.001$), 对 TGF-β1 mRNA 和蛋白以及 Col I、Col Ⅲ、VEGF、Periostin 的 mRNA 表达影响不明显。 **结论** 常氧和低氧下 STS 对 KFs 的增殖均有抑制作用, 并能够影响促纤维化因子的表达, 可能作为治疗瘢痕疙瘩的潜在药物。

【关键词】 丹参酮ⅡA 磺酸钠; 瘢痕疙瘩成纤维细胞; 低氧; 增殖; 基因表达

中图分类号: R619⁺.6

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2015)07-0649-06

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2015.07.021

Effects of Sodium Tanshinone Ⅱ A Sulfonate Under Hypoxia on Proliferation of Keloid Fibroblasts and Expression of Pro-Fibrogenic Factors Kang Chunfu, Chen Bin, Qin Zelian, et al. Department of Plastic Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Corresponding author: Qin Zelian, E-mail: qinzl@bjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effects of sodium tanshinone Ⅱ A sulfonate (STS) under normoxia and hypoxia on proliferation of keloid fibroblasts (KFs) and expression of pro-fibrogenic factors, and to explore the potential therapeutic role of STS for keloid. **Methods** A total of 5 cases of KFs were cultured and then divided into different groups. The samples were treated with different doses of STS (0, 50, 100, 200, 400, and 800 μmol/L) for 48 h under normoxia (21% O₂) or hypoxia (2% O₂). The proliferation activity of KFs was detected with CCK-8 kit and the cell morphology was observed under inverted phase contrast microscope. After treatment of STS (0, 100, and 200 μmol/L, respectively), real time PCR assay was adopted to measure the mRNA expression of hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α), transforming growth factor β1 (TGF-β1), collagen type I (Col I), collagen type Ⅲ (Col Ⅲ), vascular endothelial growth factor (VEGF), and periostin (PN). The protein expressions of HIF-1α and TGF-β1 were examined by western blot assay. **Results** The proliferation activity of KFs was not significantly different between normoxia and hypoxia. The STS inhibited the proliferation of KFs in a dose-dependent manner in normoxia and hypoxia ($P < 0.05$). The minimal effective dose in hypoxia was higher than that in normoxia. Hypoxia for 48 h changed the expressions of pro-fibrogenic factors. The mRNA and protein expressions of HIF-1α were increased by 0.606 ($P = 0.037$) and 0.950 ($P = 0.002$), respectively. The mRNA expression of VEGF was increased by 7.256 ($P = 0.043$). The mRNA expression of periostin was increased by 6.285 ($P = 0.006$).

* 基金项目: 教育部博士点博导专项基金资助课题(20130001110095)

** 通讯作者, E-mail: qinzl@bjmu.edu.cn

① (北京大学第三医院中心实验室, 北京 100191)

② (北京积水潭医院烧伤科, 北京 100035)

The protein expression of TGF- β 1 was increased by 1.641 ($P=0.011$). However, the STS did not significantly effected on the mRNA expressions of Col I and Col III. Treated with STS under normoxia for 48 h, the mRNA expressions of HIF-1 α and periostin were increased by 0.750 ($P=0.015$) and 8.553 ($P=0.000$), respectively. The mRNA expressions of TGF- β 1, Col I, and Col III were decreased by 0.349 ($P=0.007$), 0.320 ($P=0.006$), and 0.453 ($P=0.015$), respectively. There were not significant changes in the expressions of TGF- β 1 protein and VEGF mRNA ($P>0.05$). Treated with STS under hypoxia for 48 h, the mRNA and protein levels of HIF-1 α were decreased by 0.548 ($P=0.016$) and 0.984 ($P=0.001$), respectively. There were no significant changes in the mRNA levels of TGF- β 1, Col I, Col III, VEGF, and periostin, as well as the protein level of TGF- β 1. **Conclusions** The STS inhibits KFs proliferation in a dose-dependent manner and affects the expressions of pro-fibrogenic factors under both normoxia and hypoxia. The STS could be used as a candidate of therapeutic treatment against keloid.

【Key Words】 Sodium tanshinone II A sulfonate; Keloid fibroblast; Hypoxia; Proliferation; Gene expression

瘢痕疙瘩(keloid)是以瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts, KFs)异常增殖和细胞外基质过度沉积为主要病理特征的皮肤纤维化疾病,常在皮肤损伤后发生,具有超出原损伤范围、不能自发消退、手术切除后易复发的表现。目前,其发病机制尚未阐明,也无满意的治疗药物,严重影响了包括微创手术在内的各种手术后伤口愈合质量,伤口瘢痕疙瘩的形成也给患者带来巨大的心理创伤。研究显示瘢痕组织中存在因血管闭塞等引起的血供不足及缺氧的微环境^[1,2],可能是引起创伤过度愈合、皮肤纤维化增生形成瘢痕疙瘩的机制之一^[3]。丹参及其有效成分丹参酮 II A 在多个器官(肝、心、肺、肾等)的抗纤维化作用已有报道^[4-7],研究表明其主要通过抑制成纤维细胞的增殖和胶原分泌等发挥作用。丹参酮 II A 磺酸钠(sodium tanshinone II A sulfonate, STS)是丹参酮 II A 经磺酸化后得到的水溶性药物,药效更强。本实验利用培养的 KFs,并尝试模拟瘢痕疙瘩体内低氧微环境,观察常氧和低氧下,STS 对 KFs 增殖及促纤维化因子的影响,探讨 STS 是否具有抑制瘢痕疙瘩形成的药理作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究经北京大学第三医院伦理委员会批准(批文号 IRB00006761-2014173),在患者知情同意下,取 5 例瘢痕疙瘩切除术后废弃的标本,患者术前均未使用过类固醇激素、抗肿瘤药物和放射治疗等,男 1 例,女 4 例,年龄分别为 4、19、30、52、54 岁,瘢痕位于耳部 3 例,胸部 2 例。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素/链霉素双抗(以色列 BioInd 公司),DMEM(dulbecco's modified eagle medium)高糖培养基(美国 GIBCO 公司),丹参酮 II A 磺酸钠注射液(上海第一生化药业有限公司),CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂盒(日本同仁),低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)/转化生长因子 β 1(TGF- β 1)抗体(abcam 公司),以上试剂均为市售;引物由上海生工公司设计合成。细

胞培养箱、自动酶标仪产自美国 Thermo 公司;DMIL 倒置显微镜产自德国 Leica 公司;Odyssey 双色红外荧光成像系统产自美国 LI-COR 公司;荧光定量 PCR 仪(IQ5)产自美国 Bio-Rad 公司,流式细胞仪为 BD 公司的 FACS Aria II 定制系统。

1.2.2 瘢痕疙瘩成纤维细胞的培养 严格按照无菌操作原则,用含有 5% 青霉素和链霉素双抗的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)将标本漂洗干净,再彻底去除标本的表皮和皮下脂肪组织,剪成约 0.5 mm \times 0.5 mm 大小的贴壁用组织块,均匀接种于培养瓶中进行原代及传代培养。5 例细胞分开培养,采用第 3~8 代进行实验。

1.2.3 STS 对 KFs 形态学的影响 将 KFs 传代接种于 6 孔培养板中,常氧下培养过夜,加入 STS,调整剂量为 0、50、100、200、400、800 μ mol/L,再分别置于常氧(21% O₂)或低氧(2% O₂)下培养 48 h,利用倒置显微镜直接进行观察。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞增殖活力 按每孔 1500 个/100 μ l 将 KFs 接种于 96 孔板,常氧条件下培养过夜,加入 STS,调整 STS 剂量为 0、50、100、200、400、800 μ mol/L,每个剂量设 5 个平行孔。分别置于常氧或低氧条件下培养 48 h,弃上清,每孔加入 100 μ l CCK-8 工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,用自动酶标仪测定 450 nm 的吸光度(OD)间接代表细胞数量。以常氧 STS 0 μ mol/L 为对照孔,无细胞及 STS 的等量无血清 DMEM 培养基为空白孔,细胞增殖活力 = $[(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}})/(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.2.5 实时定量 PCR 检测促纤维化基因表达 将 KFs 传代接种于直径 100 mm 培养皿中,常氧条件下培养过夜,加入不同剂量 STS(0、100、200 μ mol/L),再分别置于常氧和低氧下培养 48 h 后收集细胞。采用 Trizol 法(天根公司)提取总 RNA,微量核苷酸测定仪测定浓度后用反转录试剂盒(Thermo 公司)反转录 cDNA。采用实时定量 PCR 进行基因扩增,以 β -actin 为内参基因,常氧下 STS 0 μ mol/L 为对照组,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法或 $2^{-\Delta CT}$ (cycle threshold, 阈值循环数)计算待测基因的相对表达量, $\Delta CT = CT_{\text{目的}} - CT_{\text{内参}}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{实验组}} - \Delta CT_{\text{对照组}}$ 。所用引物见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因	引物序列		片段大小(bp)
	上游引物 5' - ... - 3'	下游引物 5' - ... - 3'	
HIF-1α	AGCCGAGGAAGAACTATGAAC	ATTTGATGGGTGAGGAATGGG	168
TGF-β1	CAAGACCACCCACCTTCTGG	GGGGGTGTCTCAGTATCCCA	71
VEGF	GGGCAGAATCATCACGAAGT	TGGTGATGTTGGACTCCTCA	211
Periostin	CACCTTGTCTGGCACCTGTGA	CGTTTCTCCCTTGCTTACTCC	239
COL1A1 (Col I)	AAAAGGAAGCTTGCTCCACT	GTGTGGAGAAAGGAGCAGAA	109
COL3A1 (Col III)	AGGGGAGCTGGCTACTTCTC	CCTCCTTCAACAGCTTCCTG	73
β-actin	GACTTAGTTGCGTTACACCCT	TTGGGGGATGCTCGCTCCAAC	185

1.2.6 蛋白质印迹法 (western blot) 检测 HIF-1α、TGF-β1 蛋白表达 组别设置同 mRNA 基因检测,收集细胞后提取细胞总蛋白,用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid,BCA) 法测定蛋白浓度。按常规方法进行电泳和转膜,电泳上样量为 60 μg,用 5% BSA 封闭 1 h,一抗 (TGF-β1、HIF-1α 1:1000,β-actin 1:500) 4 ℃ 孵育过夜,TBST 液 (Tris-Buffered Saline and Tween 20)洗膜后二抗 (1:10 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜后用双色红外荧光成像系统采集图像。用 Quantiy One 图像分析系统获得条带的积分光密度 (integral optical density,IOD)。以 β-actin 为内参蛋白,常氧下 STS 0 μmol/L 为对照组,目的蛋白相对表达量 = (IOD_{实验组目的} /IOD_{实验组内参})/(IOD_{对照组目的} /IOD_{对照组内参})。

1.2.7 统计学分析 采用 SPSS16.0 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,用单因素方差分析判断各组间的差异, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STS 对 KFs 形态学的影响

见图 1。常氧与低氧条件下培养的 KFs 细胞生物形态学无明显差异。加入 STS 后,随着剂量的增加,细胞开始出现相应的形态学变化,主要表现为细胞生长变慢、突起变得更细长、间隙增宽,部分细胞体积增大,细胞轮廓变淡。当 STS 剂量达到 800 μmol/L 时,细胞折光性增高,贴壁细胞稀少,几乎不生长。常氧和低氧下 STS 对 KFs 形态学的影响镜下观察无明显差异。

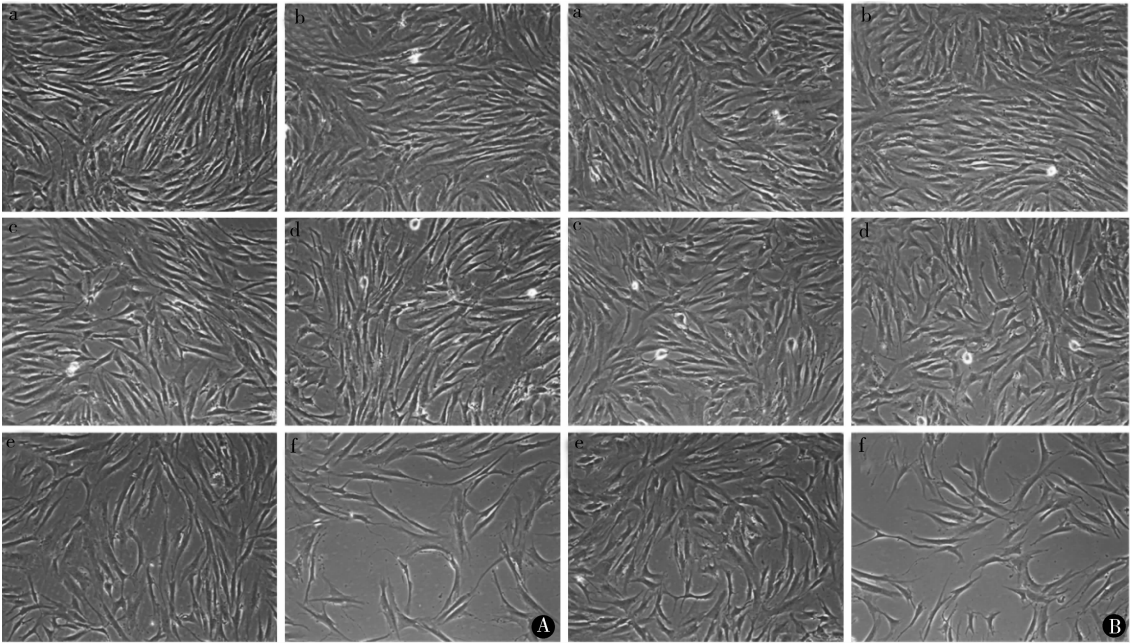


图 1 STS 对 KFs 干预 48 h 后倒置相差显微镜下的细胞形态变化 (×100) A:常氧条件;B:低氧条件;a:STS 0 μmol/L;b:STS 50 μmol/L;c:STS 100 μmol/L;d:STS 200 μmol/L;e:STS 400 μmol/L;f:STS 800 μmol/L

2.2 常氧和低氧下 STS 对 KFs 增殖的影响

见图 2。KFs 在常氧和低氧下培养 48 h 后其细胞增殖状况无显著差异。常氧下,STS 从 100 至 800

μmol/L 对 KFs 的增殖均有明显抑制 ($P < 0.01$)。低氧下,STS 的起效剂量高于常氧下,STS 从 200 至 800 μmol/L 可见明显抑制增殖作用 ($P < 0.01$)。因

此,后续实验在常氧和低氧下 STS 对 KFs 作用的剂量选用 100 及 200 $\mu\text{mol/L}$ 。

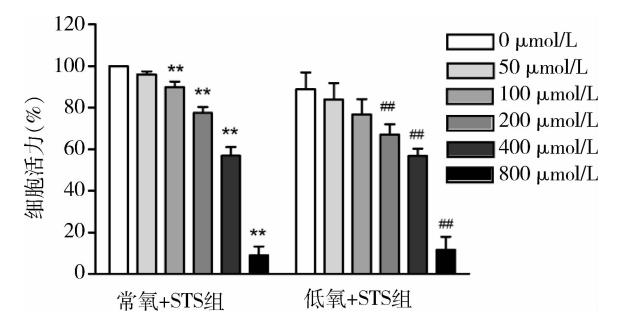


图2 常氧和低氧下 STS 干预 48 h 后 KFs 细胞增殖活力的变化 **与常氧对照组比较, $P < 0.01$;##与低氧对照组比较, $P < 0.01$; $n = 5$

2.3 常氧和低氧下 STS 对 KFs 促纤维化因子表达的影响

2.3.1 STS 对 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达的影响见

表 2。低氧培养 48 h,低氧组 HIF-1 α 相对常氧组表达增加,其中 mRNA 表达增加 0.606 ($P = 0.037$),蛋白表达增加 0.950 ($P = 0.002$)。常氧下,STS 组 HIF-1 α 表达相对常氧组有增加的趋势,STS 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,mRNA 表达增加 0.750 ($P = 0.015$),其他的增加趋势无统计学意义 ($P > 0.05$)。低氧下,STS 组 HIF-1 α 的表达较低氧组则有下降的趋势,STS 200 $\mu\text{mol/L}$ 时 mRNA 表达降低 0.548 ($P = 0.016$),蛋白表达降低 0.984 ($P = 0.001$)。

2.3.2 常氧和低氧下 STS 对 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达的影响 见表 2。相对常氧组,低氧下培养 48 h 低氧组 TGF- β 1 mRNA 表达下降 0.382 ($P = 0.002$),蛋白表达增加 1.641 ($P = 0.011$)。常氧下,STS 抑制 TGF- β 1 mRNA 表达,STS 200 $\mu\text{mol/L}$ 时表达下调 0.349 ($P = 0.007$); TGF- β 1 蛋白表达有增加趋势但无显著差异 ($P > 0.05$)。低氧下,STS 对 KFs 的 TGF- β 1 mRNA 及蛋白表达无明显影响 ($P > 0.05$)。

表 2 常氧和低氧下 STS 对 KFs 细胞 HIF-1 α 和 TGF- β 1 表达的影响

组别	相对表达量			
	HIF-1 α mRNA	HIF-1 α protein	TGF- β 1 mRNA	TGF- β 1 protein
常氧 + STS 0 $\mu\text{mol/L}$	1	1	1	1
常氧 + STS 100 $\mu\text{mol/L}$	1.433 \pm 0.296	1.394 \pm 0.247	0.777 \pm 0.161	1.372 \pm 0.185
常氧 + STS 200 $\mu\text{mol/L}$	1.750 \pm 0.338 *	1.398 \pm 0.295	0.651 \pm 0.078 **	1.385 \pm 0.346
低氧 + STS 0 $\mu\text{mol/L}$	1.606 \pm 0.323 *	1.950 \pm 0.478 **	0.618 \pm 0.061 **	2.641 \pm 1.123 *
低氧 + STS 100 $\mu\text{mol/L}$	1.482 \pm 0.125	1.751 \pm 0.598	0.701 \pm 0.079	2.671 \pm 1.006
低氧 + STS 200 $\mu\text{mol/L}$	1.058 \pm 0.041 #	0.966 \pm 0.370 ##	0.693 \pm 0.099	2.309 \pm 1.369
F,P 值	4.833,0.004	4.263,0.006	7.418,0.000	2.973,0.032

各个因子的相对表达量均是相对其各自常氧组的表达量来表示。与常氧组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低氧组比较# $P < 0.01$ 。HIF-1 α mRNA 的常氧 + STS 100 $\mu\text{mol/L}$ 、常氧 + STS 200 $\mu\text{mol/L}$ 、低氧 + STS 200 $\mu\text{mol/L}$ 组 $n = 4$;其余各组 $n = 5$

2.3.3 常氧和低氧下 STS 对 KFs 细胞 I、Ⅲ型胶原 mRNA 表达及其比值的影响 低氧培养 48 h,与常氧组比较,低氧组 I 型和Ⅲ型胶原 mRNA 表达及其比值未见显著变化。常氧下,相对于常氧组,STS 100、200 $\mu\text{mol/L}$ 组的 I 型胶原表达分别降低 0.339 ($P = 0.012$)、0.320 ($P = 0.006$),Ⅲ型胶原表达分别

降低 0.452 ($P = 0.015$)、0.453 ($P = 0.015$);STS 对 I、Ⅲ型胶原表达的抑制未见明显剂量依赖性。低氧下,相对于低氧组,STS 组的 I 型胶原和Ⅲ型胶原的表达无显著变化 ($P > 0.05$)。无论是常氧还是低氧下,各组 STS 对 KFs 细胞的 I、Ⅲ型胶原比值均无明显影响 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 在常氧和低氧下 STS 对 I、Ⅲ型胶原 mRNA 表达的影响

组别 Group	相对表达量		
	I 型胶原 COL1A1 (2 ^{-$\Delta\Delta\text{CT}$})	Ⅲ型胶原 COL3A1 (2 ^{-$\Delta\Delta\text{CT}$})	COL1A1/COL3A1 (2 ^{-$\Delta\Delta\text{CT}$})
常氧 + STS 0 $\mu\text{mol/L}$	1	1	6.952 \pm 2.390
常氧 + STS 100 $\mu\text{mol/L}$	0.661 \pm 0.087 *	0.548 \pm 0.183 *	9.377 \pm 4.802
常氧 + STS 200 $\mu\text{mol/L}$	0.680 \pm 0.069 **	0.547 \pm 0.144 *	9.455 \pm 4.497
低氧 + STS 0 $\mu\text{mol/L}$	1.105 \pm 0.313	1.313 \pm 0.360	5.807 \pm 1.699
低氧 + STS 100 $\mu\text{mol/L}$	1.288 \pm 0.191	1.150 \pm 0.209	7.841 \pm 2.504
低氧 + STS 200 $\mu\text{mol/L}$	1.116 \pm 0.261	0.985 \pm 0.268	7.804 \pm 2.292
F,P 值	5.970,0.001	6.613,0.001	0.935,0.476

COL1A1、COL3A1 的 mRNA 表达采用 2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 进行计算,I/Ⅲ型胶原比值则采用 2^{- ΔCT} 进行计算^[8]。与常氧组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。 $n = 5$

2.3.4 常氧和低氧下 STS 对 KFs 细胞 VEGF 和 Periostin mRNA 表达的影响 见图 3。低氧培养 48 h,低氧组相对常氧组 VEGF 和 Periostin 的 mRNA 表达分别增加 7.256 ($P=0.043$)、6.285 ($P=0.006$)。常氧下,STS 200 $\mu\text{mol/L}$ 组相对常氧组,Periostin

mRNA 表达增加 8.553 ($P=0.000$)。低氧下,STS 200 $\mu\text{mol/L}$ 组相对低氧组,Periostin 表达减少 2.139 ($P=0.310$),似乎有一定的抑制倾向。其他组 STS 对 KFs 的 VEGF 和 Periostin mRNA 表达未表现出显著作用 ($P>0.05$)。

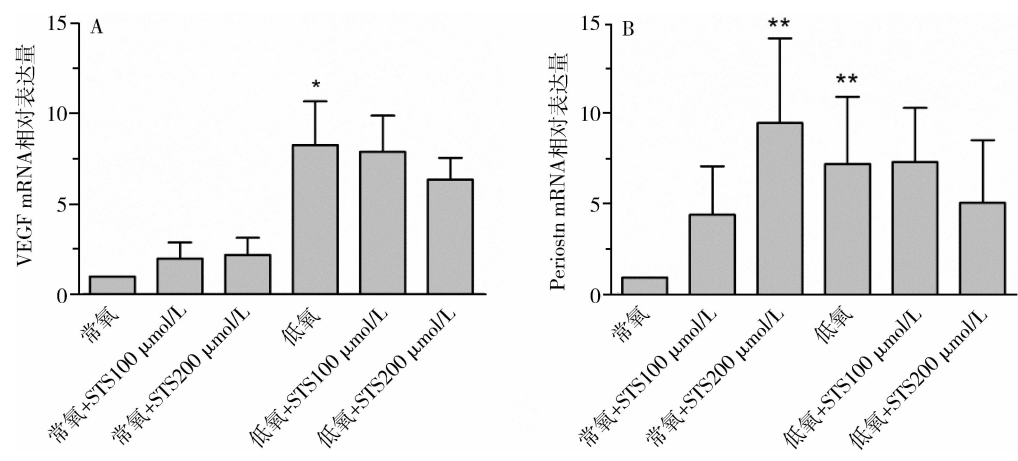


图3 常氧和低氧下 STS 对 KFs 细胞 VEGF 和 Periostin mRNA 表达的影响。A: VEGF 的实时定量 PCR 结果,低氧组 $n=4$,其余各组 $n=5$ 。B: Periostin 的实时定量 PCR 结果, $n=5$ 。与常氧组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

瘢痕疙瘩是一种创伤后组织过度修复的表现。在研究创伤与瘢痕疙瘩形成的过程中,学者们观察到与瘢痕疙瘩形成相关的低氧微环境的存在^[9]。研究表明,低氧微环境与 KFs 异常增殖及胶原合成、ECM 重塑紊乱密切相关^[10,11]。因此,寻找能够改善瘢痕组织低氧微环境、抑制 KFs 异常增殖及细胞外基质过度沉积药物,对治疗瘢痕疙瘩特别是有可能由低氧微环境引起的瘢痕疙瘩有着重要的意义。

活血化瘀类中药丹参及其有效成分具有明确的多种生物活性功能,包括抗氧化、抑制细胞增殖以及抗炎等,在瘢痕疙瘩等纤维化疾病的治疗方面得到越来越多的关注^[12]。丹参的有效成分主要包括丹参酮和丹酚酸两大类化合物,本研究所用的 STS 属于丹参酮类化合物。丹参酮类化合物以改善血液循环、抗菌和抗炎^[13]作用为主,另外还有抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、保护神经系统等作用^[14]。本实验模拟体内缺氧病理微环境,观察常氧和低氧下 STS 对 KFs 增殖及促纤维化因子的影响,进一步研究丹参酮类化合物在治疗瘢痕疙瘩方面可能的作用。

常氧下,左强等^[15]观察到丹参酮 II A 能够抑制增生性瘢痕成纤维细胞的增殖并诱导其调 STS 亡。本实验观察到,常氧下和低氧下 STS 对瘢痕疙瘩细胞的增殖均具有抑制作用,而且存在剂量依赖性。

另外,与常氧比较,低氧下 STS 抑制 KFs 增殖的起效剂量增高,同样剂量的 STS 对于 KFs 增殖抑制作用更小。常氧和低氧下 STS 对 KFs 作用的差异可能和 KFs 在低氧条件下细胞的增殖等功能状况改变有关。我们以前的研究^[16]表明,在适度低氧条件下成纤维细胞增殖力增强。在本实验中也观察到 KFs 在低氧培养 48 h,其 HIF-1 α 和 VEGF 的表达明显上调,表明低氧环境确实影响了细胞的功能。细胞的功能状态直接影响其对 STS 的药物反应性。通过本实验观察到 STS 对 KFs 在常氧和低氧下的增殖抑制作用存在剂量差异,对于临床上 STS 的可能应用需要考虑瘢痕疙瘩病变组织是否存在低氧微环境酌情适当调整药物剂量。

在低氧微环境中,有研究表明 KFs 细胞能够上调 HIF-1 α 调控相关信号通路产生适应性反应,使 periostin、TGF- β 1、VEGF、COL1、COL3 等表达增加, KFs 细胞增殖、迁移、侵袭、胶原分泌和 Akt 磷酸化水平均升高^[16,17],血管增殖^[18]。本实验结果表明,STS 能够显著抑制因低氧上调的 HIF-1 α 表达,对受 HIF-1 α 调控的、同样可被低氧上调的 Periostin(瘢痕疙瘩过度增生的重要促进因子)也表现出一定的抑制倾向,表明 STS 可能可以通过抑制 HIF-1 α 实现改善低氧微环境的作用。另外,在常氧下,我们却观察到 STS 能够促进 HIF-1 α 和 periostin 表达,对此,目前还没有相关的报道,需要进一步的研究探讨。

转化生长因子 β 1(TGF- β 1)是目前已知的与瘢

痕疙瘩形成最为密切的细胞因子,它能够促进 KFs 细胞增殖和胶原等细胞外基质的形成,同时还可抑制蛋白酶和基质酶的活性,从而促进 ECM 的沉积^[19]。抑制 TGF-β1 可以有有效的治疗病理性瘢痕。本实验结果显示,常氧下 STS 能够抑制 TGF-β1 表达,随着 TGF-β1 mRNA 的下降,Ⅰ、Ⅲ型胶原的 mRNA 也出现了下调;说明常氧下 STS 可以下调 TGF-β1 和 Ⅰ、Ⅲ型胶原的 mRNA,从而可能起到抑制瘢痕的作用。相关研究也有报道,黄芪和丹参提取物的混合物可以通过调节 TGF/Smad 信号通路抑制 KFs 的增殖、迁移和胶原分泌^[20]。低氧培养 48 h,我们观察到 KFs 的 TGF-β1 mRNA 出现下调,而 STS 对下调了的 TGF-β1 表达未见显著影响。有文献报道丹参酮的这一药理作用也并不明显,这可能是由于低氧刺激 KFs 的细胞生物学功能变化从而对 STS 不敏感所致。然而,这需要更多的实验研究证明。这也提示我们在用丹参等药物治疗瘢痕疙瘩时需考虑微环境在发病机制中的作用和相应的变化,以及这些变化对药物的药理作用的可能影响。

本实验结果说明,STS 能够抑制 KFs 增殖和促纤维化因子的表达,其在瘢痕疙瘩的治疗方面具有良好的应用前景。

致谢:感谢北京大学第三医院中心实验室老师们对本课题所提供的技术支持和帮助。

参考文献

1 Louw L. Keloids in rural black South Africans. Part 3: a lipid model for the prevention and treatment of keloid formations. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,2000,63(5):255-262.

2 Ueda K, Yasuda Y, Furuya E, et al. Inadequate blood supply persists in keloids. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg,2004,38(5):267-271.

3 Jumper N, Paus R, Bayat A. Functional histopathology of keloid disease. Histol Histopathol,2015 Apr 22;11624. [Epub ahead of print]

4 Ahn YM, Kim SK, Lee SH, et al. Renoprotective effect of tanshinone IIA, an active component of Salvia miltiorrhiza, on rats with chronic kidney disease. Phytother Res,2010,24(12):1886-1892.

5 Meng Z, Meng L, Wang K, et al. Enhanced hepatic targeting, biodistribution and antifibrotic efficacy of tanshinone IIA loaded globin nanoparticles. Eur J Pharm Sci,2015,73:35-43.

6 Hong HJ, Liu JC, Chen PY, et al. Tanshinone IIA prevents

doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through Akt-dependent pathway. Int J Cardiol,2012,157(2):174-179.

7 Wu H, Li Y, Wang Y, et al. Tanshinone IIA attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via modulating angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7) axis in rats. Int J Med Sci,2014,11(6):578-586.

8 Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, et al. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. Circulation,1999,99(21):2750-2756.

9 Lavan FB, Hunt TK. Oxygen and wound healing. Clin Plast Surg,1990,17(3):463-472.

10 Deschene K, Celeste C, Boerboom D, et al. Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1. J Dermatol Sci,2012,65(1):12-18.

11 Zhang Q, Wu Y, Chau CH, et al. Crosstalk of hypoxia-mediated signaling pathways in upregulating plasminogen activator inhibitor-1 expression in keloid fibroblasts. J Cell Physiol,2004,199(1):89-97.

12 Unahabhokha T, Sucontphunt A, Nimmannit U, et al. Molecular signalings in keloid disease and current therapeutic approaches from natural based compounds. Pharm Biol,2015,53(3):457-463.

13 Yagi A, Takeo S. Anti-inflammatory constituents, aloesin and aloemannan in Aloe species and effects of tanshinon VI in Salvia miltiorrhiza on heart. Yakugaku Zasshi,2003,123(7):517-532.

14 杜冠华,张均田.丹参现代研究概况与进展(续前).医药导报,2004,23(7):435-440.

15 左强,张培华,罗少军,等.丹参酮ⅡA对瘢痕成纤维细胞增殖及凋亡的影响.广东医学,2004,25(6):636-637.

16 Zhang Z, Nie FF, Kang CF, et al. Increased periostin expression affects the proliferation, collagen synthesis, migration and invasion of keloid fibroblasts under hypoxic conditions. Int J Mol Med,2014,34(1):253-261.

17 Zhang Z, Nie FF, Chen XL, et al. Upregulated periostin promotes angiogenesis in keloids through activation of the ERK 1/2 and focal adhesion kinase pathways, as well as the upregulated expression of VEGF and angiopoietin1. Mol Med Rep,2015,11(2):857-864.

18 张哲,康春福,陈斌,等.缺氧状态下瘢痕疙瘩成纤维细胞条件培养基对血管形成能力的影响.中华整形外科杂志,2014,30(4):283-288.

19 Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-beta signaling in fibrosis. Growth Factors,2011,29(5):196-202.

20 He S, Yang Y, Liu X, et al. Compound astragalus and salvia miltiorrhiza extract inhibits cell proliferation, invasion and collagen synthesis in keloid fibroblasts by mediating transforming growth factor-beta/Smad pathway. Br J Dermatol,2012,166(3):564-574.

(收稿日期:2015-04-27)

(修回日期:2015-05-07)

(责任编辑:王惠群)