

曲尼司特对兔增生性瘢痕组织的抑制作用及其机制研究

李宗枝^{1*}, 闫丰华², 张永臻³ (1.日照市皮肤病防治所医学美容科, 山东日照 276800; 2.日照市中医医院眼科, 山东日照 276800; 3.日照市人民医院心血管外科, 山东日照 276800)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0919-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.16

摘要 目的:研究曲尼司特对兔增生性瘢痕组织的抑制作用及其机制。方法:取兔建立增生性瘢痕模型,将建模成功的兔随机分为模型对照组(生理盐水)和曲尼司特低、中、高剂量组(0.3、0.5、0.7 mg/kg),每组6只,局部sc相应药物。各组兔分别于注射前1 h和注射后第1、3、5周测量瘢痕厚度,观察注射后第5周瘢痕病理学变化,并检测瘢痕组织中TGF- β_1 、 α -SMA mRNA和蛋白表达。结果:与注射前1 h比较,除模型对照组外,其余各组兔注射后各时间点瘢痕厚度均减小($P<0.05$)。注射后第5周,与模型对照组比较,其余各组兔注射后第5周的瘢痕厚度均减小,病理学变化均好转,瘢痕组织中TGF- β_1 、 α -SMA mRNA和蛋白表达均降低($P<0.05$),且与曲尼司特剂量呈正相关。结论:曲尼司特能够抑制增生性瘢痕的形成,其作用机制可能与抑制瘢痕组织中TGF- β_1 、 α -SMA mRNA和蛋白的表达有关。
关键词 曲尼司特;增生性瘢痕;转化生长因子 β_1 ; α -平滑肌肌动蛋白;兔

Inhibition Effects of Tranilast on Hypertrophic Scar Tissue of Rabbits and Its Mechanism Study

LI Zongzhi¹, YAN Fenghua², ZHANG Yongzhen³ (1.Dept. of Medical Cosmetology, Rizhao Prevention & Cure Institute of Skin Disease, Shandong Rizhao 276800, China; 2.Dept. of Ophthalmology, Rizhao Chinese Medicine Hospital, Shandong Rizhao 276800, China; 3.Dept. of Cardiovascular Surgery, Rizhao People's Hospital, Shandong Rizhao 276800, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibition effects of tranilast on hypertrophic scar tissue of rabbits and its mechanism. METHODS: Rabbits were selected to induce hypertrophic scar (HS) model, the HS model rats were randomly divided into model control group (normal saline), tranilast low-dose, medium-dose, high-dose groups (0.3, 0.5, 0.7 mg/kg), 6 rabbits in each group, local intradermally injected corresponding drugs. Scar thickness 1 h before injection and the first, third, fifth week after injection in each group were measured, pathological changes of scar (fifth week after injection) were observed, transforming growth factor β_1 (TGF- β_1), α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA and protein expression were detected. RESULTS: Compared with 1 h before injection, scar thickness of rabbits in other groups were decreased after injection except for model control group. In fifth week after injection, compared with model control group, scar thickness of rabbits in other groups were decreased, pathological changes were improved; TGF- β_1 , α -SMA mRNA and protein expression were decreased ($P<0.05$), showing positive correlation with tranilast dose. CONCLUSIONS: Tranilast can inhibit the formation of hypertrophic scar, and the mechanism may be related to inhibiting the TGF- β_1 , α -SMA mRNA and protein expression.
KEYWORDS Tranilast; Hypertrophic scar; Transforming growth factor- β_1 ; α -smooth muscle actin; Rabbit

增生性瘢痕(Hypertrophic scar, HS)是成纤维细胞产生的胶原蛋白等在组织中沉积后,难以被吸收或重塑而表现出的一种病理状态^[1]。张羽飞等^[2]研究发现,HS表现出持续性炎症反应和纤维异常增生,从而影响患者的形象和健康,并加重患者心理负担。曲尼司特属于新型糖皮质激素,对纤维化和瘙痒具有明显的抑制作用。本文研究了曲尼司特对兔瘢痕组织中转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响,探讨曲尼司特对增生性瘢痕的抑制作用及其可能的作用机制,旨在为其临床治疗提供实验依据。

1 材料

* 主治医师,硕士。研究方向:整形美容外科。电话:0633-8266669。E-mail:13963330656@163.com

1.1 仪器

YS100 普通光学显微镜(日本尼康公司);RT-6000 全自动酶标仪(雷杜生命科学股份有限公司);凝胶成像系统及图像分析软件(美国Bio-Rad公司);9700 聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司)。

1.2 药品与试剂

曲尼司特胶囊(中国药科大学制药有限公司,批号:150716,规格:0.1 g/粒);速眠新Ⅱ注射液(静松灵、氟哌啶醇、双氢埃托啡复合制剂,山东省农科院畜牧兽医研究所,批号:150401,规格:1.5 mL/支);免疫组化试剂盒(上海拜力生物科技有限公司);兔源TGF- β_1 、 α -SMA单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标

记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗、链脲佐菌素(STZ)(美国Sigma公司);Trizol试剂盒、反转录试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(美国Thermo公司)。

1.3 动物

35只日本大耳白兔,♂,体质量为2.1~2.6 kg,购自山东省日照市人民医院实验动物中心,动物合格证号:SCXK(鲁)2016-005。所有兔均混合分笼人工饲养,环境温度20~22℃、相对湿度50%,饲养1周后进行实验。本实验按动物实验伦理学要求操作。

2 方法

2.1 造模

将兔固定于手术台上,臀部im速眠新II注射液0.2 mL/kg,待麻醉生效后,将双侧兔耳腹侧毛发修剪,分别于双耳尖端2、5、7、10 cm处打4个直径约1 cm的圆孔(打孔时注意用力适度,如有软骨,则将软骨切开)。打孔完毕后将兔放置笼中喂养,自由进食、饮水。造模1周内观察兔双耳,待创面结痂后,乙醇消毒后将痂皮揭除,再用手术刀将表皮及过度生长的肉芽刮去,再待创面自然愈合。若术后发现创面感染,局部给予碘伏消毒。

2.2 分组与给药

所有兔创面于2~3周内完全上皮化,对兔双耳进行检查,剔除4只创面增生不均匀的兔,从剩余31只兔中选择24只,随机分为模型对照组(生理盐水)和曲尼司特低、中、高剂量组(0.3、0.5、0.7 mg/kg),每组6只兔、12只耳朵、48个创面。根据预实验结果确定给药剂量,以生理盐水制备质量浓度为1 mg/mL的相应药液,各组兔sc相应药物。

2.3 瘢痕厚度测量

分别于注射前1 h和注射后第1、3、5周采用游标卡尺对兔耳瘢痕厚度进行测量。于注射后第5周切除瘢痕全层及软骨,均匀分成两部分,一部分液氮冷冻保存,制成冰冻切片;另外一部分用10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋。

2.4 瘢痕组织病理学检查

采用苏木精-伊红(HE)染色法检测兔耳部瘢痕病理学变化。取注射后第5周的兔耳瘢痕组织的石蜡切片,脱蜡至水,二甲苯、乙醇梯度洗脱,蒸馏水冲洗,HE染色,自来水冲洗,甩干后透明、封固,显微镜下观察病理学变化。

2.5 瘢痕组织中TGF- β_1 、 α -SMA mRNA检测

采用实时荧光定量PCR法检测瘢痕组织中TGF- β_1 、 α -SMA mRNA表达。采用Trizol试剂盒按说明书操作提取瘢痕组织总RNA,将总RNA反转录成cDNA,再将cDNA进行实时荧光定量PCR检测。引物委托南京金

斯瑞生物科技有限公司设计合成,TGF- β_1 上游引物为5'-TTGACCGGTAAATGTCAACGTAAT-3',下游引物为5'-TGAGACTGGCACTGAGAGTGGTTG-3',扩增长度为226 bp; α -SMA上游引物为5'-GGGTCAAA-GATCAGTGCACAG-3',下游引物为5'-TTGTCAAAGCAGACGGAGGTC-3',扩增长度为304 bp;GAPDH上游引物为5'-GGTGAACGTGCGTCTCAAGC-3',下游引物为5'-GTCGGTGGTGAAGATCGTC-3',扩增长度为117 bp。PCR反应体系:ddH₂O 13 μ L,缓冲液2.5 μ L,dNTP 1 μ L,上、下游引物各0.5 μ L,cDNA 3 μ L,Taq酶0.5 μ L,总反应体系21 μ L;反应条件:95℃预变性2 min,95℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,40个循环后72℃延伸5 min。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目的基因的相对表达量, $\Delta C_t = C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参}}$ 。

2.6 瘢痕组织中TGF- β_1 、 α -SMA蛋白检测

采用Western blot法检测瘢痕组织中TGF- β_1 、 α -SMA蛋白表达。将瘢痕组织剪碎后充分研磨,加入RIPA裂解液,冰水浴上静置30 min,充分裂解后于4℃下12 000 r/min(离心半径:8 cm)离心10 min,提取总蛋白,BCA法检测总蛋白浓度。取50 μ g总蛋白,100℃水浴下变性5 min,采用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,37℃下加入5%脱脂奶粉封闭1.5~2 h,再分别加入1:1 000稀释的兔源TGF- β_1 单克隆抗体、1:500稀释的兔源 α -SMA单克隆抗体、1:5 000稀释的鼠源GAPDH单克隆抗体,4℃孵育过夜。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,待洗膜后再加入1:2 000稀释的HRP标记的羊抗兔IgG二抗,37℃振摇孵育1 h,PBS冲洗3次。采用增强化学发光(ECL)试剂显影、曝光,凝胶成像系统对条带进行分析,半定量分析灰度条带,以目的条带与GAPDH条带灰度值之比作为目的蛋白的相对表对量。

2.7 统计学方法

采用SAS 9.0软件进行统计分析。正态计量指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组兔不同时段瘢痕厚度比较

与注射前1 h比较,除模型对照组外,其余各组兔注射后各时间点瘢痕厚度均减小($P < 0.05$)。与注射后第1周比较,除模型对照组外,其余各组兔注射后第3、4周瘢痕厚度均减小($P < 0.05$)。注射后第5周,与模型对照组比较,其余各组兔耳瘢痕厚度均明显减小($P < 0.05$)。这表明曲尼司特能够减小瘢痕的厚度,且呈剂量依赖性。各组兔不同时段瘢痕厚度测定结果见表1。

表1 各组兔不同时段瘢痕厚度测定结果($\bar{x} \pm s, n=48, \text{mm}$)

Tab 1 Determination results of scar thickness of rabbits in each group in different periods ($\bar{x} \pm s, n=48, \text{mm}$)

组别	注射前1 h	注射后第1周	注射后第3周	注射后第5周
模型对照组	2.268 ± 0.109	2.209 ± 0.447	2.281 ± 0.381	2.097 ± 0.114
曲尼司特低剂量组	2.275 ± 0.106	2.169 ± 0.453*	2.100 ± 0.381**	1.881 ± 0.091**▲
曲尼司特中剂量组	2.271 ± 0.096	2.043 ± 0.331*▲	1.921 ± 0.259***▲	1.672 ± 0.089***▲
曲尼司特高剂量组	2.274 ± 0.104	2.098 ± 0.371*▲	1.847 ± 0.237***▲	1.583 ± 0.071***▲

注:与注射前1 h比较,* $P<0.05$;与注射后第1周比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,▲ $P<0.05$

Note: vs. 1 h before injection, * $P<0.05$; vs. 1 week after injection, * $P<0.05$; vs. model control group, ▲ $P<0.05$

3.2 各组兔耳瘢痕组织病理学变化

注射后第5周,模型对照组兔耳瘢痕组织较厚,胶原纤维无序;曲尼司特低剂量组兔耳瘢痕组织胶原纤维略有序,表皮层变薄,真皮结构仍紊乱无序;曲尼司特中剂量组兔耳瘢痕组织较薄,且真皮结构较为整齐;曲尼司特高剂量组兔耳瘢痕组织表皮厚度较曲尼司特中剂量组更薄,且真皮结构排列更为整齐。各组兔注射后第5周的瘢痕组织病理学变化见图1。

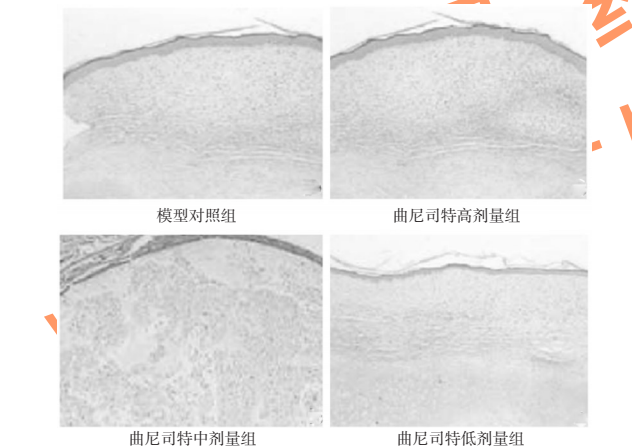


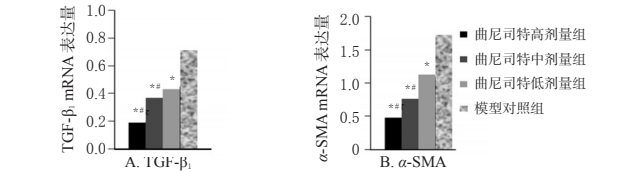
图1 各组兔注射后第5周的瘢痕组织病理学变化(HE, ×100)

Fig 1 Pathological changes of scar tissue of rabbits in each group in the fifth week after injection (HE, ×100)

3.3 各组兔耳瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA mRNA表达

注射后第5周,与模型对照组比较,其余各组兔耳瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA mRNA表达均明显降低($P<0.05$);与曲尼司特低剂量组比较,曲尼司特中、高剂量组兔耳瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA mRNA表达明显降低($P<0.05$)。这表明曲尼司特能够抑制瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA mRNA表达,且呈剂量依赖性。各组兔注射后第5周瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA mRNA表达的

测定结果见图2。



注:与模型对照组比较,* $P<0.05$;与曲尼司特低剂量组比较,# $P<0.05$

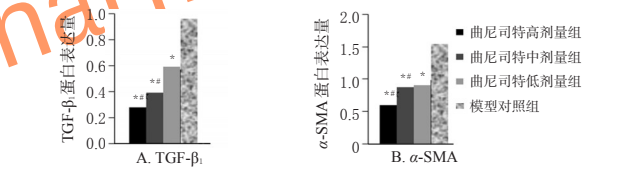
Note: vs. model control group, * $P<0.05$; vs. tranilast low-dose group, # $P<0.05$

图2 各组兔注射后第5周瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA mRNA表达的测定结果

Fig 2 Determination results of TGF-β₁, α-SMA mRNA expression in scar tissue of rabbits in each group in the fifth week after injection

3.4 各组兔耳瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA蛋白表达

注射后第5周,与模型对照组比较,其余各组兔耳瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA蛋白表达均明显降低($P<0.05$);与曲尼司特低剂量组比较,曲尼司特中、高剂量组兔耳瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA蛋白表达明显降低($P<0.05$)。这表明曲尼司特能够抑制瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA蛋白的表达,且呈剂量依赖性。各组兔注射后第5周瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA蛋白表达的测定结果见图3。



注:与模型对照组比较,* $P<0.05$;与曲尼司特低剂量组比较,# $P<0.05$

Note: vs. model control group, * $P<0.05$; vs. tranilast low-dose group, # $P<0.05$

图3 各组兔注射后第5周瘢痕组织中TGF-β₁、α-SMA蛋白表达的测定结果

Fig 3 Determination results of TGF-β₁, α-SMA protein expression in scar tissue of rabbits in each group in the fifth week after injection

4 讨论

在创面的愈合过程中,局部炎症反应会诱导间质细胞分化,促进成纤维细胞增殖^[3-4]。成纤维细胞能够分泌纤维连接蛋白和胶原蛋白,当肉芽组织成熟后,大量胶原蛋白沉积于细胞外基质,最终形成增生性瘢痕^[5-6]。国外有研究显示,曲尼司特能够抑制单核细胞趋化因子、转化生长因子等炎症因子,达到延缓和抑制脏器纤维化的作用^[7]。赵建华等^[8]也研究证实,曲尼司特能够抑制血管内皮细胞的活性,亦能降低动脉粥样硬化发生的风险。在治疗瘢痕方面,王建霞等^[9]对肉芽肿大鼠持续局

部给予曲尼司特,结果显示曲尼司特高剂量组肉芽肿增生程度明显减轻,且肉芽肿组织羟脯氨酸含量显著降低,提示曲尼司特能够通过抑制羟脯氨酸的表达从而改善肉芽肿的增生。本研究显示,曲尼司特高、中、低剂量组兔耳瘢痕厚度明显减小,说明曲尼司特能够有效控制增生性瘢痕的过度生长。

TGF- β_1 是瘢痕形成的关键因子之一,当创伤开始愈合时,TGF- β_1 大量分泌,导致胶原蛋白在细胞外基质过度沉积,这亦是增生性瘢痕形成的病理基础^[10]。Honardoust D等^[11]也研究证实,机体发生创伤时,创面TGF- β_1 /Smad3信号通路被激活,TGF- β_1 分泌增加,导致I型胶原合成增加,II、III型胶原合成降低,最终诱导瘢痕增生。 α -SMA是细胞内收缩系统主要蛋白,通过带动胶原纤维位置变化,导致瘢痕发生挛缩^[12]。据刘华等^[13]报道,在瘢痕生长后期,组织中 α -SMA表达上调,且 α -SMA表达水平与挛缩程度有关。本研究对各组兔瘢痕组织TGF- β_1 、 α -SMA mRNA表达进行检测,结果显示高、中、低剂量曲尼司特组兔耳瘢痕组织中TGF- β_1 、 α -SMA mRNA表达显著低于同时段模型对照组;Western blot法检测显示,TGF- β_1 、 α -SMA蛋白表达也表现出相似的趋势,提示曲尼司特可能是通过降低TGF- β_1 、 α -SMA mRNA和蛋白表达,达到抑制瘢痕增生的作用。

本研究的局限性:(1)由于兔的个体差异、瘢痕的位置、增生的时间点等因素存在差异,导致本研究中各组兔的生物学特性可能存在一定差异。(2)有报道称曲尼司特依然存在导致肝功能异常、神经系统症状等不良反应等风险^[14]。而在本研究中,仅单纯观察了曲尼司特的有效性,需要进一步观察其急、慢性毒性。(3)在研究中发现,TGF- β_1 、 α -SMA mRNA和蛋白表达趋势均表现出良好的一致性,两种指标之间是否有相同的信号通路调节值得深入研究。

综上所述,曲尼司特能够抑制HS的形成,其作用机制可能与抑制瘢痕组织中TGF- β_1 、 α -SMA mRNA和蛋白表达有关。

参考文献

[1] Soykan EA, Butzelaar L, de Kroon TL, *et al.* Minimal extracorporeal circulation (MECC) does not result in less hypertrophic scar formation as compared to conventional extracorporeal circulation (CECC) with dexamethasone [J]. *Perfusion*, 2014, 29(3):249-259.

[2] 张羽飞,李厚忠,王学勇,等.增生性瘢痕形态学观察及血管内皮生长因子和转化生长因子 β 激活活性激酶1表达的检测与意义[J].中国医学科学院学报,2015,37(4):446-450.

[3] Simon F, Bergeron D, Larochelle S, *et al.* Enhanced secretion of TIMP-1 by human hypertrophic scar keratinocytes could contribute to fibrosis[J]. *Burns*, 2012, 38(3):421-427.

[4] Varkey M, Ding J, Tredget EE. Differential collagen-glycosaminoglycan matrix remodeling by superficial and deep dermal fibroblasts: potential therapeutic targets for hypertrophic scar[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(30):7581-7591.

[5] Abdou AG, Maraee AH, Saif HF. Immunohistochemical evaluation of cox-1 and cox-2 expression in keloid and hypertrophic scar[J]. *Am J Dermatopathol*, 2014, 36(4):311-317.

[6] 方芳,张虹,赵雁,等.光动力法联合复方倍他米松注射在增生性瘢痕治疗中的应用[J].中华整形外科杂志,2015,31(5):343-346.

[7] E Y, Qipa Z, Hengshu Z. The expression of DNMT1 in pathologic scar fibroblasts and the effect of 5-aza-2-deoxycytidine on cytokines of pathologic scar fibroblasts[J]. *Wounds*, 2014, 26(5):139-146.

[8] 赵建华,乔少华,耿文军,等.左西替利嗪、曲尼司特联合卡介苗素治疗慢性荨麻疹的临床观察[J].中国皮肤性病学杂志,2010,24(7):683-684.

[9] 王建霞,符丽娟.曲尼司特对高糖培养心肌成纤维细胞增殖及表型转化的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,30(3):203-208.

[10] 韩方璇,肖云彬,林慧,等.银杏叶提取物对糖尿病模型大鼠肾脏ET-1、TGF- β_1 的影响[J].中国药房,2008,19(27):2101-2103.

[11] Honardoust D, Varkey M, Marcoux Y, *et al.* Reduced decorin, fibromodulin, and transforming growth factor- β_3 in deep dermis leads to hypertrophic scarring[J]. *J Burn Care Res*, 2012, 33(2):218-227.

[12] Shi J, Wan Y, Shi S, *et al.* Expression, purification, and characterization of scar tissue neovasculature endothelial cell-targeted rhIL10 in escherichia coli[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 175(1):625-634.

[13] 刘华,杨华莲,周淑芳,等.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 β_1 和 α 平滑肌肌动蛋白mRNA及蛋白表达的影响[J].中华烧伤杂志,2013,29(3):294-299.

[14] 张宏峰,武斌.曲尼司特治疗烧伤患者增生性瘢痕40例临床评价[J].中国药业,2015,24(20):60-61.

(收稿日期:2016-06-20 修回日期:2016-08-29)

(编辑:邹丽娟)