

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.24.010 [http://www.crter.org]
刘凯, 潘亮亮, 李婷, 刘树发. 三七总甙对增生性瘢痕的作用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(24): 4436-4443.

三七总甙对增生性瘢痕的作用★

刘凯, 潘亮亮, 李婷, 刘树发

佳木斯大学附属第二医院(口腔医院)颌面外科, 黑龙江省佳木斯市 154007

文章亮点:

- 1 当前采用活血化瘀类中药治疗增生性瘢痕已获得肯定的疗效, 且不良反应小。
- 2 实验创建兔耳增生性瘢痕模型, 以曲安奈德为阳性对照, 通过苦味酸酸性复红染色法、苏木精-伊红染色及相关基因检测的方法, 观察三七总甙对兔耳增生性瘢痕的作用以及对转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 表达的影响。
- 3 三七总甙及曲安奈德均能通过抑制转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 的表达, 降低转化生长因子 $\beta 1$ 在瘢痕组织中的含量, 从而抑制成纤维细胞的过度增殖及以胶原为主的细胞外基质过度沉积, 进而降低胶原纤维合成, 来达到有效抑制瘢痕组织过度增生的目的。
- 4 实验构建的动物模型建立方法成熟, 干预措施的中药成本低, 不良反应少。不足之处在于动物模型与人体仍有一定差别。

关键词:

组织构建; 皮肤组织构建; 三七总甙; 增生性瘢痕; 曲安奈德; 转化生长因子 $\beta 1$; 反转录 PCR; 基因检测; 苏木精-伊红; 苦味酸酸性复红; 成纤维细胞; 胶原纤维

摘要

背景: 增生性瘢痕的传统治疗手段如手术切除、类固醇激素、抗代谢药、免疫抑制剂和放射疗法等, 均易复发或有严重的不良作用而限制了其临床应用。近年来应用活血化瘀类中药提取成分治疗增生性瘢痕取得了较为理想的进展, 而且不良反应小。

目的: 通过组织染色及相关基因检测的方法, 观察三七总甙对兔耳增生性瘢痕的作用以及对转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 表达的影响。

方法: 创建兔耳增生性瘢痕模型, 术后 4 周, 按随机数字表法将 24 只大耳白兔分为 3 组, 三七总甙组、曲安奈德组及空白对照组每组 8 只。以曲安奈德为阳性对照, 分组分次瘢痕基底局部给药, 用药 5 次后取瘢痕组织, 以苦味酸酸性复红染色法、苏木精-伊红染色法对胶原纤维、成纤维细胞进行观察, 应用反转录 PCR 方法检测细胞内转化生长因子 $\beta 1$ 基因的表达情况。

结果与结论: 苏木精-伊红染色结果示三七总甙组兔耳瘢痕中成纤维细胞数量低于空白对照组, 与曲安奈德组无明显差异。苦味酸酸性复红染色结果示三七总甙组兔耳瘢痕中胶原纤维较空白对照组排列整齐, 与曲安奈德组无明显差异。基因检测结果显示三七总甙组、曲安奈德组转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 的表达显著低于空白对照组 ($P < 0.05$)。提示三七总甙及曲安奈德均能通过抑制转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 的表达, 降低转化生长因子 $\beta 1$ 在瘢痕组织中的含量, 从而抑制成纤维细胞的过度增殖及以胶原为主的细胞外基质过度沉积, 进而降低胶原纤维合成, 来达到有效抑制瘢痕组织过度增生的目的。

刘凯★, 男, 1980 年生, 黑龙江省佳木斯市人, 汉族, 2009 年佳木斯大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事瘢痕及颌面部软硬组织缺损修复治疗。
lkbx1980@163.com

通讯作者: 潘亮亮, 在读硕士, 佳木斯大学附属第二医院(口腔医院)颌面外科, 黑龙江省佳木斯市 154007
1115789160@qq.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)24-04436-08

收稿日期: 2012-11-26
修回日期: 2012-12-07
(20120922002/G · W)

Liu Kai★, Master, Attending physician, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Second Affiliated Hospital of Jiamusi University (Stomatological Hospital), Jiamusi 154000, Heilongjiang Province, China
lkbx1980@163.com

Corresponding author: Pan Liang-liang, Studying for master's degree, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Second Affiliated Hospital of Jiamusi University (Stomatological Hospital), Jiamusi 154000, Heilongjiang Province, China
1115789160@qq.com

Received: 2012-11-26
Accepted: 2012-12-07

Notoginseng glycosides effects on hyperplastic scar

Liu Kai, Pan Liang-liang, Li Ting, Liu Shu-fa

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Second Affiliated Hospital of Jiamusi University (Stomatological Hospital), Jiamusi 154000, Heilongjiang Province, China

Abstract

BACKGROUND: Traditional treatments for hypertrophic scars, such as surgical resection, steroid hormones, antimetabolite, immunosuppressants and radiotherapy, are prone to resulting in relapse or serious adverse effects that limit their clinical application. In recent years, extraction of Chinese medicine for invigorating blood circulation and eliminating stasis has made satisfactory progress in the treatment of hypertrophic scars, and causes little adverse reactions.

OBJECTIVE: To observe the effect of notoginseng glycosides on rabbit ear hyperplastic scar and mRNA expression of transforming growth factor beta 1 using histological staining and related gene detection methods.

METHODS: A rabbit ear model of hyperplastic scar was established. At 4 weeks after modeling, 24 model rabbits were randomly divided into three groups, eight rabbits in each group: notoginseng glycosides group, triamcinolone acetonide group (positive control group) and blank control group. Local administration was performed in the three groups, five times. Then, scar tissues were extracted and dyed with Van-Gieson staining and hematoxylin-eosin staining for observation of collagen fibers and fibroblasts. Expression of transforming growth factor beta 1 mRNA was detected using reverse transcription-PCR method.

RESULTS AND CONCLUSION: The number of fibroblasts number in the scar was lower in the notoginseng glycosides group than the blank control group, but there was no difference between the triamcinolone acetonide group and notoginseng glycosides group. Collagen fibers arranged more regularly in the notoginseng glycosides group as compared with the blank control group, and there was also no difference between the triamcinolone acetonide group and notoginseng glycosides group. Expression of transforming growth factor beta 1 mRNA was significantly lower in the triamcinolone acetonide and notoginseng glycosides groups than the blank control group ($P < 0.05$). These findings indicate that notoginseng glycosides and triamcinolone acetonide can inhibit fibroblast over-proliferation and reduce the synthesis of collagenous fibers by reducing expression of transforming growth factor beta 1 mRNA, and thereby, the excessive hyperplasia of scar is inhibited.

Key Words: tissue construction; skin tissue construction; notoginseng glycosides; hyperplastic scar; triamcinolone acetonide; transforming growth factor beta 1; reverse transcription-PCR; gene detection; hematoxylin-eosin; Van-Gieson; fibroblasts; collagen fibers

Liu K, Pan LL, Li T, Liu SF. Notoginseng glycosides effects on hyperplastic scar. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(24): 4436-4443.

0 引言

增生性瘢痕是由组织在愈合过程中胶原纤维等结缔组织过度沉积所形成的纤维化疾病^[1-3]。它是影响美观外貌的一大问题,治疗较为棘手,是外科研究的重要课题之一,因此探寻一种有效治疗增生性瘢痕的方法是医学研究价值较高的项目。

传统治疗手段如手术切除、类固醇激素、抗代谢药、免疫抑制剂和放射疗法等,均易复发或有严重的不良作用而限制了临床应用,近年来应用活血化癥类中药提取成分治疗增生性瘢痕取得较为理想的进展。三七总甙为中药五加科人参属植物三七的有效成分,具有滋补强壮、消肿止痛、活血化癥、改善血液循环、增强机体免疫力、抗炎、抗衰老及护肝等多方面生理活性,无其他类似药物的不良反应^[4]。张荣华等^[5-6]通过应用三七总甙治疗四氯化碳诱导的大鼠肝硬化模型,结果表明三七总甙可明显抑制肝组织中成纤维细胞及胶原纤维增生。刘健毅等^[7]在研究三七总甙对体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞增殖胶原合成的作用中发现,三七总甙能够显著抑制成纤维细胞增殖及胶原合成。

在增生性瘢痕的实验研究资料中, 主要途径有3种: 一是通过体外瘢痕组织培养的成纤维细胞, 来进行相关研究; 二是将人的病理性瘢痕组织移植到裸鼠的皮下, 借助对寄生状态下的瘢痕组织进行观察; 三是通过临床病例的观察及术后标本的分析研究。这些方法都有一定的缺陷: ①成纤维细胞体外培养体系是体外实验, 无法很好的模拟人体内环境和条件。②将人的增生性瘢痕组织移植于裸鼠皮下, 它并不是动物自身产生的瘢痕组织, 被移植的人类瘢痕组织脱离了人体环境, 是“寄生”于裸鼠身上, 对于这种处于非生理环境下的组织, 想要研究观察瘢痕的发生、发展及转归的全过程是不可能的; 其不能完整反映创面愈合至增生性瘢痕形成整个动态变化过程, 得出的实验结果可能会有一定的偏差。③临床观测无法细致的研究瘢痕的发生、发展及转归。然而, 只有在动物本身产生的瘢痕模型上, 才能更确切、更直接、更深入地研究瘢痕发生、发展及其转归。

为了能够更好的客观反映瘢痕在人体的发生、发展过程, 建立一个有效的瘢痕模型尤为重要, 2001年李荟元^[8]利用大耳白兔, 在兔耳腹侧作深及软骨层的缺损创面, 待其自然愈合, 结果发现大部分创面可产生与人体类似的增生性瘢痕包块。2001年舒彬等^[9]在进行兔耳瘢痕研究中证实, 术后21 d, 瘢痕增生率为76%; 35 d达瘢痕增生高峰期; 至50 d, 羟脯氨酸含量为正常值的3倍; 术后98 d, 仍高于正常皮肤值, 结论是兔耳增生块与人类增生性瘢痕有相似性。同一作者于2002年在一篇英文资料中验证了兔耳瘢痕模型的可用性。随着研究的深入, 已有不断改良优化瘢痕模型的建立方法^[10-11], 动物瘢痕模型的建立方法已渐成熟稳定。

曲安奈德, 作为一种皮质类固醇药物, 已广泛应用于瘢痕疙瘩及增生性瘢痕的防治, 有多方研究报道它能显著抑制瘢痕成纤维细胞的增殖及胶原的合成, 且作用机制明确, 所以本次实验将其做为阳性对照^[12-14]。实验以兔耳建立增生性瘢痕模型, 以广泛应用于瘢痕疙瘩及增生性瘢痕治疗的皮质类固醇药物曲安奈德为阳性对照, 通过组织学染色法及反转录PCR检测法来研究三七总甙对增生性瘢痕的作用。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物模型实验。

时间及地点: 于2012年3至8月在佳木斯大学动物实验中心开展实验。

材料:

实验动物: 健康大耳白兔24只, 体质量2.3-2.5 kg, 兔耳健全, 雌雄不拘, 购自佳木斯大学实验中心。实验过程中对动物的处置应符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

三七总甙抑制增生性瘢痕实验的主要试剂及仪器:

Main experimental reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
三七总甙注射液又名血塞通注射液	云南植物药业有限公司
曲安奈德注射液	昆明积大制药有限公司
苦味酸、酸性复红染色液、苏木精-伊红染色液、溴化乙锭、Total RNA提取试剂、PCR反应试剂	大连宝生物工程有限公司
凝胶电泳相关仪器	佳木斯大学实验室
实验动物处置平台	佳木斯大学动物实验中心

方法:

动物模型建立: 动物适应性饲养1周后, 瘢痕模型的制作参照李荟元等^[8-12]方法, 并加以改良, 用30 g/L戊巴比妥钠(30 mg/kg)作耳缘静脉麻醉, 兔耳腹侧面皮肤碘伏、乙醇消毒, 严格无菌操作技术下, 在兔耳腹侧中段沿长轴避开可见血管, 作1 cm×1 cm大小创面, 创面间隔1 cm以上, 去掉兔耳全层皮肤并用刮勺彻底刮除软骨膜, 创缘用电烙铁烧灼, 每耳6处, 共288个创面, 术后创面暴露, 待其自行愈合。

实验分组: 待兔耳创面瘢痕形成后, 约术后4周, 按随机数字表法将24只大耳白兔分为3组, 三七总甙组、曲安奈德组及空白对照组每组8只。

实验用药: 用微量注射器从创面周围的正常皮肤进针向创面基底及创面灶内局部注射, 注射浓度为1 g/L, 注射量50 μL/创面, 每3 d 1次, 共5次。三七总甙组、曲安奈德组分别注射三七总甙注射液、曲安奈德注射液, 空白对照组注射生理盐水。

标本的制取: 用药5次后, 用3%戊巴比妥钠1.5 mg/kg作耳缘静脉麻醉, 在无菌技术下切取标本。左耳瘢痕切取后用多聚甲醛固定, 作苦味酸酸性复红、苏木精-伊红染色; 右耳瘢痕切取后快速置于液氮中储存。

苦味酸酸性复红染色: 将1%酸性品红水溶液与1.22%的苦味酸饱和水溶液按1:9的比例混匀备用。因刚配置

好的溶液着色能力过强, 可能会影响观察的效果, 所以可静置数小时再用。石蜡切片, 常规脱蜡至水洗。用Weigert氏苏木精溶液染色10 min左右。自来水冲洗, 至蒸馏水中水洗蓝化隔夜。用配置好的苦味酸酸性复红染液染色5 min。倾去染液, 用体积分数95%的乙醇溶液急速分化数秒钟。无水乙醇脱水, 二甲苯透明后, 中性树脂封固, 电镜观察。

苏木精-伊红染色: 取标本切片放置高温中脱蜡水化处理, 至二甲苯(I)中脱蜡15 min, 再至二甲苯(II)中脱蜡15 min; 放入逐级降低浓度的乙醇中脱水, 经无水乙醇I(变为不透明)一至两分钟, 无水乙醇II一至两分钟, 体积分数95%乙醇一至两分钟, 体积分数80%乙醇一至两分钟; 蒸馏水冲洗3次, 1 min/次, 苏木精染色10 min并用自来水洗去多于染液, 再经蒸馏水水洗, 促蓝液反蓝, 伊红染色1 min, 至蒸馏水水洗3 s, 体积分数95%乙醇脱水10 min, 至二甲苯中透明, 使用中性树脂封固, 置电镜观察。

反转录PCR:

样本总RNA的提取及PCR产物的制备: TRIZOL法分别提取3组存储于液氮中的右耳瘢痕标本的总RNA, 步骤按说明书进行, 所得cDNA置-20℃保存。

转化生长因子 β 1引物由上海生工生物工程有限公司合成, 上游引物为5'-CGT GCT AAT GGT GGA CCG CAA CAA C-3', 下游引物为5'-GCC CTG TAT TCC GTC TCC TTG GTT C-3', 转化生长因子 β 1扩增片段长度为329 bp, 反应体系为10 μ L, 反应条件30℃变性5 min, 42℃反转录30 min, 99℃灭活反转录酶5 min, 5℃冷却5 min。PCR反应体系50 μ L, 反应条件为94℃预变性5 min, 94℃变性40 s, 64℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共循环35次。

产物的处理和分析: 取各组PCR反应产物10 μ L与2 μ L含溴酚蓝的Loading buffer混匀, 加入10 g/L的琼脂糖凝胶小孔中, 120 V电压下电泳30 min。待电泳完毕, 取出带有小孔的琼脂糖凝胶置于1 mg/L EB染色30 min后, 将琼脂糖凝胶置于UVI凝胶成像仪中, 紫外灯下观察结果, 凝胶成像系统成像保存并分析。

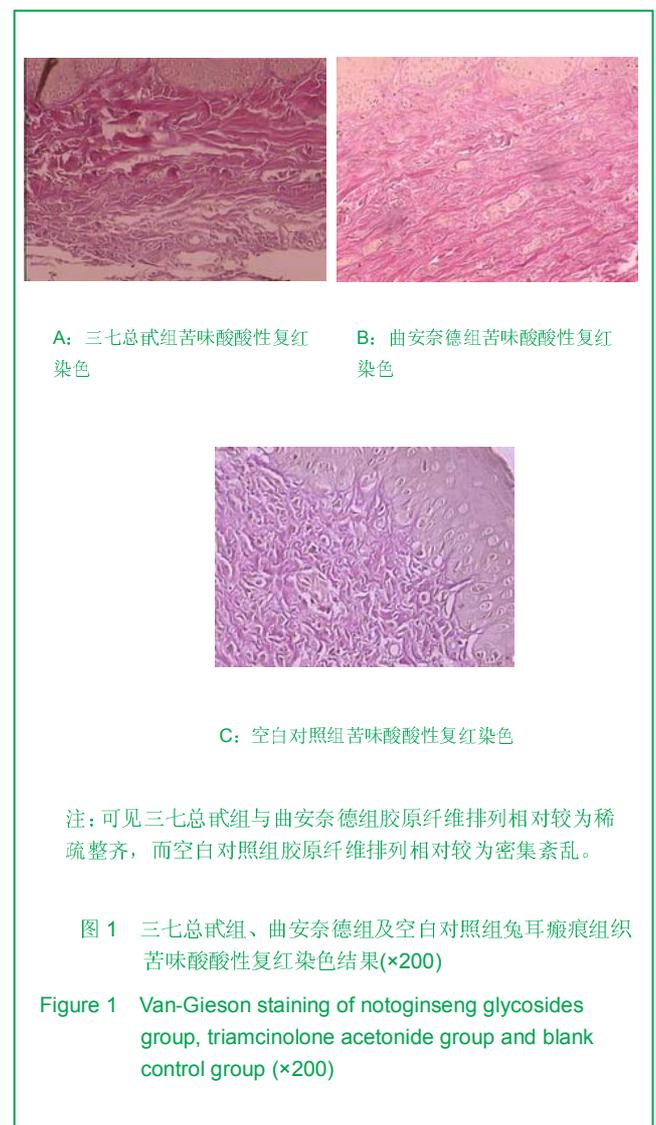
主要观察指标: 苦味酸酸性复红染色、苏木精-伊红染色后观察胶原纤维相对稀疏整齐程度及成纤维细胞相对数目, 细胞核体积大小。

统计学分析: 由本实验参与者共同进行数据整理分析, 所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间差异显著性分析采用临床医师统计学助手4.0.0.0软件包t检验方法, 检验水准为0.05。

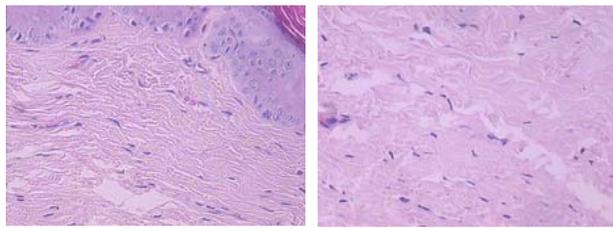
2 结果

2.1 实验动物数量分析 按随机数字表法将24只大耳白兔分为3组, 三七总甙组、曲安奈德组及空白对照组每组8只, 全部进入结果分析, 无脱失。

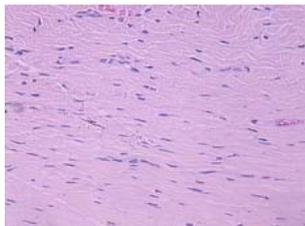
2.2 兔耳瘢痕组织苦味酸酸性复红染色、苏木精-伊红染色结果 苦味酸酸性复红染色可观察到三七总甙组与曲安奈德组胶原纤维排列相对较为稀疏整齐, 而空白对照组胶原纤维排列相对较为密集紊乱, 见图1。



苏木精-伊红染色可观察到三七总甙组与曲安奈德组成纤维细胞相对较少, 而空白对照组成纤维细胞相对较多, 见图2。



A: 三七总甙组苏木精-伊红染色 B: 曲安奈德组苏木精-伊红染色



C: 空白对照组苏木精-伊红染色

注: 可见三七总甙组与曲安奈德组成纤维细胞相对较少, 而空白对照组成纤维细胞相对较多。

图2 三七总甙组、曲安奈德组及空白对照组兔耳瘢痕组织苏木精-伊红染色结果($\times 100$)

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of notoginseng glycosides group, triamcinolone acetonide group and blank control group ($\times 100$)

2.3 反转录PCR检测结果 三七总甙组、曲安奈德组转化生长因子 $\beta 1$ mRNA的表达显著低于空白对照组, 经统计学分析, 三七总甙组及曲安奈德组转化生长因子 $\beta 1$ mRNA条带吸光度值(A)与空白对照组比较, 差异均有显著性意义($P < 0.05$); 三七总甙组与曲安奈德组比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 三七总甙组、曲安奈德组及空白对照组兔耳瘢痕转化生长因子 $\beta 1$ mRNA相对含量比较

Table 1 Relative contents of transforming growth factor beta 1 in the notoginseng glycosides group, triamcinolone acetonide group and blank control group ($\bar{x} \pm s, n=16$)

组别	A 值
三七总甙组	0.337 5 \pm 0.064 2 ^a
曲安奈德组	0.305 8 \pm 0.079 1 ^a
空白对照组	0.552 7 \pm 0.056 2

与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: A 值即吸光度值, 吸光度定量为相对定量, 需要对对照组, 测量时的系统误差对实验组和对照组而言是同样的, 不会对结果有影响。

3 讨论

以胶原为主的细胞外基质的过度沉积是增生性瘢痕的重要病理特征, 也是增生性瘢痕得以生长的主要物质。转化生长因子 $\beta 1$ 是成纤维细胞的强效趋化因子, 可以通过旁分泌和自分泌直接或间接、单独或协同、同时或不同时作用于炎症及修复细胞, 产生细胞的趋化性迁移、增生分化, 以及细胞外基质合成与分泌 3 类重要的生物学效应^[15]。转化生长因子 $\beta 1$ 对细胞外基质的作用中, 促进成纤维细胞中葡萄糖与氨基酸的转运和糖酵解的进行, 导致细胞外基质合成显著增加。同时, 通过抑制基质降解酶的产生, 促进该酶降解物的产生, 并加强基质与细胞的结合等, 导致局部纤维组织增生。

转化生长因子 $\beta 1$ 、转化生长因子 $\beta 2$ 促进人成纤维细胞白细胞介素 6 的产生, 其机制可能是通过对白细胞介素 6 基因转录的调节。转化生长因子 β 还能够抵抗特定细胞因子的致有丝分裂作用, 是成纤维细胞的有效趋化剂^[16]。转化生长因子 β 主要有 I、II、III 3 种类型的受体, 在创伤修复过程中, 转化生长因子 β 通过与 3 种受体的结合来影响瘢痕的形成, I 型受体主要促进细胞外基质的合成和沉积, II 型受体主要影响细胞的成长和增殖, 而 III 型受体则对增生性瘢痕的形成起到抑制作用, 有学者称之为抗瘢痕剂^[17-18], 它主要是将结合过来的转化生长因子 β 转移到其他受体。有研究发现转化生长因子 $\beta 1$ 是肝纤维形成过程中最重要的细胞因子, 具有促进肝星状细胞活化和增生, 促进细胞外基质合成, 抑制分解酶的合成等作用^[19]。

转化生长因子 $\beta 1$ 是强力的致纤维化因子^[20]。它不仅促使细胞外基质合成增多、降解减少, 还可以促上皮细胞转化, 能打破间质细胞外基质代谢的动态平衡, 使其向纤维化方向发展^[21]。转化生长因子 $\beta 1$ 是诱导上皮细胞转分化为成纤维细胞的中心环节^[22], 而成纤维细胞也表达转化生长因子 $\beta 1$, 转化生长因子 $\beta 1$ 反过来又调节成纤维细胞产生大量胶原及纤维连接蛋白、层粘连蛋白, 使细胞外基质合成增加、降解受抑制, 导致纤维化形成^[23], 因此, 转化生长因子 $\beta 1$ 、上皮细胞转分化与细胞外基质互相互促进, 导致纤维化。已有研究表明, 三七总甙能够抑制体外培养的成纤维细胞转化生长因子 $\beta 1$ 的表达^[24]。

三七总甙对细胞内信号传导的也一定作用,胞浆内游离 Ca^{2+} 可通过与其受体蛋白-钙调蛋白结合形成第二信使复合体,从而降低细胞内 cAMP 的水平,而 cAMP 水平的降低可增加细胞内胶原基因的表达,且可抑制胶原酶的活性,导致细胞外基质增多,促进纤维化。彭宝岗等应用 ^{45}Ca 示踪技术测定三七总甙对新鲜分离的大鼠肝细胞 Ca^{2+} 内流的影响^[25],肝细胞孵育在含 ^{45}Ca 生理液中,其细胞内 ^{45}Ca 浓度随孵育时间延长逐渐增高,20 nmol/L 垂体加压素使 ^{45}Ca 浓度增高 39%, Vempamil, Nifedipine 和三七总甙均能不同程度地阻断静息状态和垂体加压素激动下的肝细胞 ^{45}Ca 内流,三七总甙阻断效果明显优于 Vempamil 和 Nifedipine,且呈剂量依赖性关系。

研究表明将三七总甙作用于复制大鼠 CCl_4 中毒性肝纤维化模型后,肝细胞损害、肝脏脂肪变性、炎细胞浸润的程度均减轻,肝组织中成纤维细胞和胶原纤维增生程度也受到明显抑制^[26]。还有研究发现三七总甙可抑制 NIH/3T3 细胞 I 型胶原的生成与分泌,认为可能具有抗肝纤维化作用^[27-29]。另有人分别采用 MTT 法和 ELISA 法检测三七总甙对体外培养人肾成纤维细胞增殖和分泌 I 型胶原的作用,结果表明三七总甙可明显抑制人肾成纤维细胞增殖及 I 型胶原的分泌^[30-32]。有研究在一定的病理条件下,肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞转分化后均表达间充质细胞的标志蛋白 $\alpha\text{-SMA}$,异化为肌成纤维细胞并且分裂增生及分泌大量基质,此病理生理过程在肾组织纤维化过程中起重要作用^[33]。有研究发现三七总甙能明显软化肾小球,抑制肾小管-间质纤维化进程,改善肾功能^[34]。还有在三七总甙对大鼠肺纤维化及结缔组织生长因子表达的影响的研究中,表明三七总甙能够明显抑制肺泡炎和肺纤维化^[35]。三七总甙可促进肝细胞再生,抑制炎症反应,调节免疫反应,抑制肝星状细胞的活化,增强胶原酶和基质金属蛋白酶的活性,抑制胶原合成,促进胶原降解^[36-37]。有报道三七总甙具有调节细胞周期各时相 DNA 含量,促进肝细胞再生,抑制肝纤维化、肝硬化的形成等作用^[38]。

根据中医学理论,瘢痕发病机制主要有以下 4 方面:气血壅滞、湿热搏结,气亏阴虚、血燥筋急,经络痹阻,邪毒与体内浊气、淤血、痰湿搏结。理气活血、软坚散结为其治疗原则^[39]。因此应用三七总甙防治增生性瘢痕具有较为可靠的理论依据。有研究发现,三七可使血清中透明质酸、层粘连蛋白、羟脯氨酸显著降低,

病理观察提示三七可明显抑制肝组织中成纤维细胞及胶原纤维增生,说明三七确能抑制肝脏胶原纤维合成与沉积^[5]。

众多研究表明三七总甙具有延缓或阻止肝、肾和肺纤维化的作用,其作用机制可能是:①抗脂质过氧化作用,改善微循环。②抑制炎性细胞渗出与趋化,减少细胞因子产生和释放。③抑制成纤维细胞增殖,减少胶原合成和分泌。④调节免疫功能,减轻细胞损伤,增强胶原酶活性,促进已合成的胶原降解等^[40-43]。本实验通过建立与人体增生性瘢痕相似的兔耳瘢痕模型,进行苦味酸酸性复红、苏木精-伊红染色,反转录 PCR 的方法来研究三七对增生性瘢痕的作用。

作者的实验结果表明,三七总甙及曲安奈德均能通过抑制转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 的表达,降低转化生长因子 $\beta 1$ 在瘢痕组织中的含量,从而抑制成纤维细胞的过度增殖及以胶原为主的细胞外基质过度沉积,进而降低胶原纤维合成,来达到有效抑制瘢痕组织过度增生的目的。

致谢:感谢指导教师刘树发老师在实验进行期间的辛勤指导。

作者贡献:第一作者刘凯全程参与实验过程,主导实验进行方向及研究方法;潘亮亮为通讯作者,全程参与实验过程,并负责文章投稿编辑工作;李婷全程参与实验过程,并负责文章编辑整理,以及统计学分析工作;刘树发指导老师在实验进行中给予建设性意见及相关理论指导。

利益冲突:课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求:实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明:文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献

- [1] Bayat A, Bock O, Mrowietz U, et al. Genetic susceptibility to keloid disease and hypertrophic scarring: transforming growth factor $\beta 1$ common polymorphisms and plasma levels. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111:535-543.
- [2] Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996; 245(2):327-341.

- [3] Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A. Cutaneous wound healing: myofibroblasts differentiation and in vitro models. *Lower Extrem Wounds*. 2003; 2(2): 60-68.
- [4] Chen Y. *Guangxi Yixue*. 1998;20(6): 1109-1112.
陈英. 三七总甙的的药理研究及临床应用进展[J]. *广西医学*, 1998, 20(6): 1109-1112.
- [5] Zhang RH. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2000;22(4): 307-310.
张荣华. 三七抗肝纤维化的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2000, 22(4): 307-310.
- [6] Dong XQ, Duan L, Pang LB, et al. *Shandong Daxue Xuebao: Yixueban*. 2012;50(1).85-88.
董向前,段丽,平梁兵,等人参皂苷 Rg1 和 Rb1 抗肝纤维化的体视学研究[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2012, 50(1).85-88.
- [7] Liu JY, Li SR, Ji SX, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2003; 25(17);1562-1563.
刘剑毅,李世荣,纪淑兴,等.三七总甙对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖及胶原合成的作用[J].*第三军医大学学报*, 2003,25(17); 1562-1563.
- [8] Li HY. Xi'an: Fourth Military Medical University Press. 2005: 40-45.
李荟元.创伤研究动物模型兔耳瘢痕模型的建立与应用[M]. 西安:第四军医大学出版社, 2005: 40-45.
- [9] Shu B, Hao LL, Wu ZY, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2001;23(3):343-345.
舒彬,郝林林,吴宗耀,等.兔耳增生性瘢痕的形态学观察与羟脯氨酸含量变化[J].*第三军医大学学报*,2001, 23(3): 343-345.
- [10] Feng DC, Yang XM, Xue HB, et al. *Zhongguo Meirong Yixue*. 2009;18(2):191-194.
冯登超,杨喜明,薛宏斌,等.建立更加稳定和有效的兔耳瘢痕模型[J].*中国美容医学*, 2009,18(2):191-194.
- [11] Yu R, Song Y, Chen JJ, et al. *Huaxi Yixue*. 2010;25(7):1209-1212.
于蓉,宋焯,陈俊杰,等.一种兔耳中期增生性瘢痕动物模型的建立[J].*华西医学*,2010,25(7):1209-1212.
- [12] Li H, Liu M, Chen Z, et al. *Zhongguo Linchuang Yisheng Zazhi*. 2007;35(6):45-46.
李辉,刘民,陈织,等.曲安奈德局部注射治疗瘢痕疙瘩60例疗效观察[J].*中国临床医生杂志*, 2007,35(6):45-46.
- [13] Wang ZH, Wang DS, Gao GX. *Zhongguo Yiyao Zhinan*. 2010; 8(12):88-89.
王振华,王殿生,高国鑫.局部注射曲安奈德治疗耳垂瘢痕疙瘩[J].*中国医药指南*, 2010,8(12):88-89.
- [14] Xie J, Wang Y, Zhang XL, et al. *Linchuang Yixue yu Huli Yanjiu*. 2006;5(6):16.
谢俊,王宇,张晓龙,等.曲安奈德治疗增生性瘢痕的疗效观察[J].*临床医学与护理研究*, 2006,5(6):16.
- [15] Yu R, Cen Y. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue*. 2012; 26(3):331-336.
于蓉,岑琰. TGF- β 1/Smad3 信号转导通路与创伤后瘢痕形成[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012,26(3):331-336.
- [16] Abergei RP, Pizzurro D, Meeker CA. Biochemical composition of connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloids fibroblast cultures. *Invest Dermatol*. 1985;84(5):384.
- [17] Wang X, Smith P, Pu LL, et al. Exogenous transforming growth factor β 2 modulates collagen I and α 1(I) synthesis in proliferative scar tissue in nude rats. *J Surg Res*. 1999; 87(2):194-200.
- [18] Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF β 1 and TGF β 2 or exogenous addition of TGF β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*. 1995; 108(3):985-986.
- [19] Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16(2): 127-133.
- [20] Cheng J, Grande JP. Transforming growth factor β signal transduction and progressive renal disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(6):943-956.
- [21] Grande JP, Warner GM, Walker HJ, et al. TGF- β 1 is an autocrine mediator of renal tubule epithelial cell growth and α 1(I) production. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002; 227(3):171-181.
- [22] Ye X, Li H. A Study of Transforming growth factor β , vimentin and desmin gene expression in the renal cortex of diabetic rats during the early diabetic period. *J Zhejiang Univ: Med Sci*. 2004;34(1):55-59.
- [23] Goumenos DS, Tsamandas AC, Oldroyd DS, et al. Transforming growth factor beta1 and myofibroblasts: a potential pathway towards renal scarring in human glomerular disease. *Nephron*. 2001;87(2):240-248.
- [24] Yao H, Li SR, Liu JY. *Zhongguo Shiyong Meirong Zhengxing Waikexue*. 2005;16(4):243-245.
姚恒,李世荣,刘剑毅.三七总甙对人增生性瘢痕成纤维细胞 TGF- β 1 和细胞周期的作用[J].*中国实用美容整形外科杂志*, 2005, 16(4):243-245.
- [25] Peng BG, Lv MD, Xiao DZ, et al. *Zhongguo Yaolixue Tongbao*. 1997; 13(1): 70-72.
彭宝岗,吕明德,肖定璋,等.三七总皂甙对大鼠肝细胞钙内流的阻断作用[J].*中国药理学通报*, 1997, 13(1): 70-72.
- [26] Zhang R, Zhou ZC, Hong DL, et al. *Disan Junyi Daxue Xuebao*. 2002;22(4):307-310.
张荣华,周子成,洪多伦,等.三七抗肝纤维化的实验研究[J].*第三军医大学学报*,2002,22(4):307-310.
- [27] Xiong L. *Zhongcaoyao*. 1998;29(8):567-568.
熊磊.三七治疗肝病的实验研究进展[J].*中草药*, 1998,29(8): 567-568.
- [28] Cheng H, Xiong L, Liu P, et al. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Piwei Zazhi*. 1999;7(4):203-205.
成海,熊磊,刘平,等. MTT法观察三七总甙对 NIH/3T3 成纤维细胞毒性作用与增殖的影响[J].*中国中西医结合脾胃杂志*, 1999, 7(4): 203-205.
- [29] Shi XF, Xu M, Liu Q, et al. *Zhongguo Yaoli yu Linchuang*. 2010;17(2):7-8.
石小枫,徐曼,刘杞,等.三七总皂甙对肝纤维化大鼠 I、III 胶原及 TGF- β 1 的影响[J].*中药药理与临床*, 2010, 17(2):7-8.
- [30] Wei Y, Fan JM, Pan LP, et al. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi*. 2002;22(1): 47-49.
韦颖,樊均明,潘丽萍,等.三七总皂甙对人肾成纤维细胞的影响[J].*中国中西医结合杂志*, 2002, 22(1): 47-49.
- [31] Zhang GQ, Ye RG, Kong QY, et al. *Zhonghua Shenzangbing Zazhi*. 1998;14(2):93-95.
张国强,叶任高,孔庆瑜,等.三七总甙诱导间质纤维化人肾成纤维细胞凋亡及其分子机理初探[J].*中华肾脏病杂志*, 1998, 14(2):93-95.
- [32] Xu Q, Zhou W, Kong HY, et al. *Zhongguo Gushang*. 2010; 23(4):278-281.
徐泉,周卫,孔焕宇,等.三七透明质酸钠凝胶对家兔椎板切除术后硬膜外瘢痕中胶原成分的影响[J].*中国骨伤*, 2010, 23(4):278-281.

- [33] Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, et al. Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells. *Rheumatology*. 2004;43(4):448-452.
- [34] Tao JL, Guo M, Liu H, et al. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Shenbing Zazhi*. 2008;9(9):799-801.
陶静莉, 郭敏, 刘华, 等. 三七总皂对慢性肾衰竭大鼠模型肾纤维化的治疗作用及机制[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(9): 799-801.
- [35] Quan Y, Xia QM, Li FX, et al. *Xinan Guofang Yiyao*. 2009; 19(1): 23-25.
全燕, 夏前明, 李福祥, 等. 三七总皂苷对大鼠肺纤维化及结缔组织生长因子表达的影响[J]. *西南国防医药*, 2009, 19(1): 23-25.
- [36] Zhang XW, Li FX, Li H. *Zhongguo Xinyao Zazhi*. 2007; 16(4): 260-262.
张娴文, 李凤贤, 李辉. 三七皂苷抗肝纤维化作用的现状[J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(4): 260-262.
- [37] Lv WH, Xu S, Zhang HQ. *Zhongguo Yesheng Zhiwu Ziyuan*. 2009; 28(2): 1-4.
吕伟红, 徐姗, 张洪泉. 三七总皂苷抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2009, 28(2): 1-4.
- [38] Laxova A, Earley M, Farrell P, et al. Results of DNA-based cystic fibrosis newborn screening proficiency testing. *J Cystic Fibrosis*. 2008;6(2): S14.
- [39] Cai JL, Zhang ZX. Beijing: People's Medical Publishing House. 1998: 220-223.
蔡景龙, 张宗学. 现代瘢痕治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 220-223.
- [40] Li XJ, Cui SH. *Zhonghua Jiehe he Huxi Zazhi*. 2002; 25(9): 520-523.
李学军, 崔社怀. 三七总皂及甲泼尼龙对实验大鼠肺纤维化的干预作用及机制的初步探讨[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(9): 520-523.
- [41] Li Q, Yang LZ. *Yunnan Zhongyi Zhongyao Zazhi*. 2011; 32(5): 65-66.
李青, 杨梁梓. 三七总皂苷对肺纤维化大鼠Smad2/3表达的影响[J]. *云南中医中药杂志*, 2011, 32(5): 65-66.
- [42] Peng SL, Guo ZA. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Jijiu Zazhi*. 2008; 15(1): 63-64.
彭书玲, 郭兆安. 三七总皂苷的作用机制研究进展[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(1): 63-64.
- [43] Sun SJ, Xiang Y, Huang SL, et al. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. 2008; 33(24): 2882-2886.
孙淑君, 向阳, 黄世林, 等. 单味中药及其有效成分抗纤维化机制的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(24): 2882-2886.