

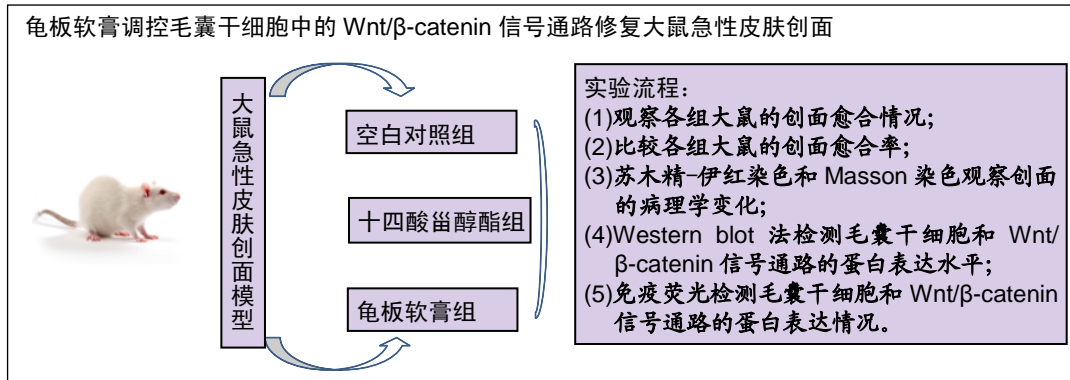
# 龟板软膏调控毛囊干细胞中的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路修复大鼠急性皮肤创面

申倩, 胡佩欣, 钟淑贤, 杨亚兰, 张赛霞, 李春(广州中医药大学, 广东省广州市 510006)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1772

ORCID: 0000-0002-8274-6054(申倩)

文章快速阅读:



申倩, 1994年生, 广东省梅州市人, 广州中医药大学硕士研究生, 主要从事皮肤损伤研究。

通讯作者: 李春, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 广州中医药大学, 广东省广州市 510006

文献标识码: B

稿件接受: 2019-03-15



## 文题释义:

**毛囊干细胞:** 位于真皮层皮脂腺开口处与立毛肌毛囊附着处之间的毛囊外根鞘隆突部, 具有自我更新和分化的能力, 它不仅以维持正常皮肤中毛囊的再生, 对恢复皮肤组织完整性和功能性中也起到关键的作用。毛囊干细胞在体内多处于静息状态, 当皮肤受损时, 毛囊干细胞被活化后从隆突部迁移出, 快速募集至创面中心, 通过增殖、迁移、分化形成表皮各层细胞和皮肤附属器, 参与受损部位的修复。

**Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路:** 是一类高度保守的信号通路, 广泛存在于多细胞真核生物中, 是皮肤发育过程中出现最早的分子信号, 调控毛囊的生长发育和毛囊干细胞的迁移分化。 $\beta$ -catenin 作为细胞内信号传导蛋白, 是 Wnt 信号通路激活的一种重要的上皮细胞表面黏附分子, 能够进入细胞核内传递 Wnt 信号, 进一步激活靶基因开始转录, 启动细胞增殖周期。

## 摘要

**背景:** 龟板散由龟板、黄连和冰片组成, 是治疗皮肤疮疡的有效方剂。中药单体机制明确, 龟板的有效单体十四酸甾醇酯可以激活并调控毛囊干细胞中的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路。

**目的:** 探讨龟板软膏对大鼠急性皮肤创面的修复效果, 以及其作用是否通过调控毛囊干细胞的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路实现。

**方法:** 取龟板散各组分中的有效单体十四酸甾醇酯(S8)、盐酸小檗碱及右旋龙脑制备龟板软膏。构建 SD 大鼠急性皮肤创面模型并随机分为 3 个药物组: 龟板软膏组、S8 组和空白对照组, 连续给药 10 d。造模后连续 3 d 注射 BrdU(50 mg/kg)标记增殖细胞。分别于修复第 3, 5, 7 及 10 天计算创面愈合率, 苏木精-伊红染色和 Masson 染色观察创面病理学变化, Western blot 法和免疫荧光检测 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路蛋白  $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc 及毛囊干细胞的表面标志物 CD34 和 Integrin  $\beta$ 1 的表达情况。实验方案经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 20190218001。

**结果与结论:** ①修复第 5, 7, 10 天, 龟板软膏组的创面愈合率均高于其他组( $P < 0.05$ ); ②龟板软膏组新生表皮与真皮连接紧密, 新生皮肤附属器较 S8 组和空白对照组多, 胶原纤维致密, 修复效果优于其他组; ③龟板软膏组和 S8 组 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路蛋白  $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc 及毛囊干细胞的表面标志物 CD34、Integrin  $\beta$ 1 的阳性表达量均高于空白对照组,  $\beta$ -catenin、CD34 和 Integrin  $\beta$ 1 的阳性表达均上调, LEF1 和 C-myc 的表达呈先上调后下降变化, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); ④龟板软膏组中 BrdU 标记的增殖细胞数量较其他组多, 且同时表达 CD34 阳性和 LEF1 阳性; ⑤结果提示: 龟板软膏可能通过调控毛囊干细胞中的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 加快大鼠急性皮肤创面的修复, 龟板软膏由 S8、盐酸小檗碱及右旋龙脑 3 种有效单体组成, 具有稳定性和安全性, 其对急性皮肤创面的促愈合效果优于单一有效单体。

## 关键词:

龟板软膏; 十四酸甾醇酯; 盐酸小檗碱; 右旋龙脑; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; 毛囊干细胞; 急性皮肤创面

## 中图分类号:

R459.9; R758.1; R318

## 基金资助:

国家自然科学基金(81403201), 项目负责人: 李春

Shen Qian, Master candidate, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Corresponding author: Li Chun, Master, Associate professor, Master's supervisor, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

## Tortoise shell ointment for acute skin wound in rats via Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway in hair follicle stem cells

Shen Qian, Hu Peixin, Zhong Shuxian, Yang Yalan, Zhang Saixia, Li Chun (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Traditional prescription *Guiban San* composed of tortoise shell, coptis chinensis and borneol is used for treating skin injury. As per the clear mechanism of traditional Chinese medicine monomer, the effective monomer cholesterol myristate of tortoise shell can activate and regulate the Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway in hair follicle stem cells.

**OBJECTIVE:** To explore the effect of tortoise shell ointment on acute skin wound in rats and the mechanism whether is by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway in hair follicle stem cells.

**METHODS:** Tortoise shell ointment was prepared with cholesterol myristate, berberine and borneol--the effective monomers from components of *Guiban San*. Acute skin wound model was made in Sprague-Dawley rats and rat models were then randomly divided into three groups: tortoise shell ointment group, cholesterol myristate (S8) group and control group. Medication in each group was administered continuously for 10 days. BrdU (50 mg/kg) for proliferative cell labeling was administered for 3 consecutive days. The healing rate of the wound was analyzed in different groups at 3, 5, 7, and 10 days after repair. Hematoxylin-eosin staining and Masson staining were conducted for histopathological observations. The expression of  $\beta$ -catenin, LEF1, C-myc in Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway and CD34, Integrin  $\beta$ 1 in hair follicle stem cells were detected by western blot and immunofluorescence. The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Guangzhou University of Chinese Medicine with an approval No. 20190218001.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) At days 5, 7, and 10 after repair, the wound healing rate in the tortoise shell ointment group was significantly higher than that in the other groups ( $P < 0.05$ ). (2) Compared with the S8 and control groups, tortoise shell ointment group showed better repair effect with more neoformative hair follicles and denser collagen fibers. (3) The expressions of  $\beta$ -catenin, LEF1, C-myc, CD34, Integrin  $\beta$ 1 in the tortoise shell ointment and S8 group were higher than those in the control group. The positive expression of  $\beta$ -catenin, CD34 and Integrin  $\beta$ 1 were increased during wound healing. LEF1 and C-myc were increased during the prophase and metaphase of wound healing but decreased during the later stage. The difference was statistically significant among three groups ( $P < 0.05$ ). The number of BrdU-labeled proliferative cells in the tortoise shell ointment group was higher than that in the S8 and control groups, with concurrent positive expressions of CD34 and LEF1. To conclude, tortoise shell ointment may stably and safely promote the repair of acute skin wound in rats via regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway in hair follicle stem cells, and the healing effect is superior to any single effective monomer.

**Key words:** tortoise shell ointment; cholesterol myristate; berberine; borneol; Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway; hair follicle stem cells; acute skin injury

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81403201 (to LC)

## 0 引言 Introduction

急性创面修复是一个高度复杂、精密调节和多种细胞参与的过程<sup>[1]</sup>。毛囊干细胞(hair follicle stem cells, HFSCs)具有自我更新和分化的能力,是皮肤组织再生的关键<sup>[2-3]</sup>,通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路进行调控<sup>[4-5]</sup>。当皮肤损伤时,Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路被激活,使毛囊干细胞内过表达 $\beta$ -catenin, $\beta$ -catenin进入细胞核内与LEF1形成转录复合体共同激活下游靶基因C-myc等,促进毛囊干细胞增殖,并快速募集至创面参与修复<sup>[6]</sup>。

基于中药有效成分单体的创伤新药研究成为当下的热点。传统方药龟板散主要由龟板、黄连、冰片组成,是治疗皮肤疮疡的有效方剂。课题组前期研究发现,龟板的提取物十四酸甾醇酯(cholesterol myristate, S8)可激活毛囊干细胞中的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路参与皮肤创面的修复<sup>[7-8]</sup>。此次研究将提取龟板散中龟板的有效单体S8、黄连的有效单体盐酸小檗碱和冰片的有效单体右旋龙脑制成龟板软膏(tortoise shell ointment, TSO)<sup>[9-10]</sup>,作用于大鼠急性皮肤创面,探讨龟板软膏是否是通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路和促进毛囊干细胞增殖,影响急性创面的愈合速度。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组,对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年4月至11月在广州中医药大学进行。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级健康雄性SD大鼠96只,体质量(200 $\pm$ 20) g,购自广州中医药大学实验动物中心,许可证号:SYXK(粤)2018-0085。动物在广州中医药大学实验动物中心SPF级实验室统一饲养,饲养环境温度、湿度、光照按照SPF级饲养条件实施。实验方案经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准,批准号为20190218001。

1.3.2 实验用主要试剂及仪器 十四酸甾醇酯(TCI,日本),盐酸小檗碱(Macklin,中国),右旋龙脑(源叶生物,中国),京万红软膏(达仁堂,中国),BrdU(Sigma,美国),I抗BrdU(Abcam,英国),LEF1(Santa cruz,美国),Integrin  $\beta$ 1(Cst,美国), $\beta$ -actin、 $\beta$ -catenin、CD34、C-myc(均购自Abclonal,中国),免疫荧光II抗FITC山羊抗鼠、Cy3(均购自Abclonal,中国),Alexa Fluor® 647(Abcam,英国)。全自动化学发光图像分析仪(天能,中国),超高分辨率激光共聚焦扫描显微镜(蔡司,德国),多功能染色机(徕卡,德国),低温离心机(Labogene,丹麦),病理图像分析系统(Olympus,日本)。

1.4 方法

1.4.1 药物制备 根据前期课题组研究及预实验结果,龟

板软膏遵循龟板散组方成分,按照1.5:2:1.5的比例取S8(1 g/L)<sup>[11]</sup>、盐酸小檗碱(1.35 g/L)和右旋龙脑(1 g/L)加入凡士林和液体石蜡(8:2)基质中,将3种有效单体加热混合调匀,制成软膏。

#### 1.4.2 药物质量控制

**稳定性试验:**①耐热试验:将龟板软膏放置于55℃6 h,无分层现象;②耐寒试验:将龟板软膏放置于-15℃24 h,无分层现象;③离心试验:将适量软膏放入离心管中,10 000 r/min离心30 min,无分层及硬化现象。

**皮肤刺激性试验:**取健康SD大鼠10只,于给药前1 d剃去背部毛发,在大鼠背部选择面积约9 cm<sup>2</sup>的皮肤,将大鼠分为健康皮肤组和破损皮肤组,每组5只;破损皮肤组采用针头在消毒皮肤上做“#”字样划痕数条,以出现轻微渗血为度;各组均涂抹1 g龟板软膏,涂药后1, 24, 48和72 h大体观察,受试皮肤局部未见红斑、水肿等现象,提示龟板软膏对健康皮肤及破损皮肤均无明显刺激性。药物在每次给药前现配现用,保证药物质量。

**1.4.3 造模、分组及给药** 将大鼠用乙醚吸入进行麻醉,剃去背部毛发,体积分数75%乙醇消毒,于大鼠背部脊柱两侧各标记2个直径约1.2 cm,面积约1.13 cm<sup>2</sup>的圆形区域(各圆形标记间距 $\geq$ 2 cm),用无菌手术刀沿圆形标记切除皮肤,创面深达真皮,未及筋膜层,大体观察可见创面表皮完全缺失,真皮部分缺失,创面呈血红色,如图1所示。造模后当天按照50 mg/kg剂量给大鼠腹腔注射5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)<sup>[12-13]</sup>,连续注射3 d,每日2次,进行大鼠体内增殖细胞标记。

SD大鼠随机分为3个药物组:龟板软膏组、十四酸甾醇酯组(S8组)和空白对照组,按照不同观察时间点将各药物组分为4个亚组:3 d、5 d、7 d和10 d组,每组8只。龟板软膏组予以龟板软膏外涂(厚度为1.0~2.0 mm),S8组予以S8溶液(1 g/L),空白对照组予以生理盐水,每日给药2次,连续给药10 d。各组分别于修复第3, 5, 7, 10天取材,进行组织学和分子生物学检测,评估皮肤创面修复效果。

#### 1.5 主要观察指标

**1.5.1 计算创面愈合率** 采集每组大鼠的创面图像,用ImageJ软件计算创面面积,得出创面愈合率。创面愈合率=(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积 $\times$ 100%。

**1.5.2 组织病理学检查** 取全层创面组织及少许周围正常组织,40 g/L多聚甲醛溶液固定,常规脱水、透蜡、包埋、切片。进行苏木精-伊红染色及Masson染色,观察创面治疗后的表皮、真皮、皮下组织、皮肤附属器和胶原纤维增生情况。

**1.5.3 Western blot法检测** 采用Western blot法检测Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路蛋白 $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc及毛囊干细胞的表面标志物CD34和Integrin  $\beta$ 1蛋白表达水平。提取组织总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度,SDS-PAGE电

泳,湿转仪转膜,5%脱脂牛奶封闭2 h,滴加I抗,4℃过夜,TBST洗涤5 min $\times$ 3次,加入II抗,室温孵育1 h,洗膜,ECL试剂显影成像。用ImageJ软件对目的条带进行灰度分析。

**1.5.4 免疫荧光检测** 采用免疫荧光检测 $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc、CD34、Integrin  $\beta$ 1蛋白的表达情况。石蜡切片37℃过夜,70℃烘片2 h,脱蜡至水,抗原修复,0.5% triton透膜15 min,PBS浸泡5 min $\times$ 3次,5% BSA封闭30 min;滴加I抗 $\beta$ -catenin、LEF1、CD34、C-myc和Integrin  $\beta$ 1,探讨龟板软膏是否激活并调控毛囊干细胞中Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路;采用免疫荧光三重标记法,滴加BrdU、CD34和LEF1,探讨龟板软膏是否通过激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进毛囊干细胞增殖;4℃过夜,PBST浸泡5 min $\times$ 3次,加相应荧光II抗FITC、Cy3、Alexa Fluor® 647,室温孵育30 min,PBST浸泡5 min $\times$ 3次,DAPI染核5 min,PBST浸泡5 min $\times$ 3次,防淬灭封片剂封固,用超高分辨率激光共聚焦扫描显微镜拍摄。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 19.0对数据进行统计分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较,用独立样本 $t$ 检验;多组间均数比较,方差齐则采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差不齐则采用秩和检验;以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 3组96只大鼠全部进入结果分析,无脱落。

**2.2 不同时间点创面愈合情况及愈合率比较** 随着治疗时间的增加,各组创面愈合情况好转。如图2所示,第5天,除空白对照组以外,龟板软膏组和S8组出现脱痂现象,龟板软膏组创面明显收缩;第7天,龟板软膏组和S8组创面修复明显好转;第10天,龟板软膏组创面完全修复,接近正常皮肤,愈合情况优于S8组和空白对照组。如表1所示,龟板软膏组第5, 7, 10天的创面愈合率高于其他两组,龟板软膏组和S8组不同时间点的愈合率均高于空白对照组,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

表1 不同时间点各组创面愈合率比较 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )  
Table 1 The wound healing rate in each group at different time points

组别	修复时间			
	3 d	5 d	7 d	10 d
龟板软膏组	0.43 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	1.00 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>
十四酸甾醇酯组	0.44 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.80 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
空白对照组	0.35 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.07	0.95 $\pm$ 0.03

表注:与空白对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与十四酸甾醇酯组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

#### 2.3 组织病理学检查结果

**2.3.1 苏木精-伊红染色结果** 如图3所示,根据不同时间

点描述各组典型表现如下。第3天, 各组均出现大量炎症细胞浸润。第5天, 龟板软膏组表皮增厚, 炎症细胞浸润减少; 空白对照组仍有炎症浸润, 开始出现表皮组织。第7天, 龟板软膏组创面基本愈合, 表皮与真皮连接紧密, 皮肤附属器增多; S8组见较厚表皮组织覆盖; 空白对照组仍有炎症浸润, 表皮组织较薄。第10天, 龟板软膏组和S8组表皮修复接近正常表皮, 表皮分层明显, 结构致密; 空白对照组仍有少许结痂覆盖。

**2.3.2 Masson染色结果** 如图4所示, 根据不同时间点描述各组典型表现如下。第3天, 各组胶原纤维生成较少。第5天, 各组胶原纤维厚薄不一, 龟板软膏组胶原纤维数量较其他组多。第7天, 龟板软膏组和S8组胶原纤维排列致密; 空白对照组较稀疏。第10天, 龟板软膏组较其他组更趋向正常皮肤组织胶原纤维的特性。

**2.4 不同时间点各组皮肤创面 $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc、CD34、Integrin  $\beta$ 1蛋白表达水平** Western blot结果如图5所示, 同一时间点龟板软膏组和S8组的 $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc、CD34、Integrin  $\beta$ 1表达水平均大于空白对照组。创面在修复过程中, 龟板软膏组和S8组 $\beta$ -catenin、CD34和Integrin  $\beta$ 1的表达水平均呈上升趋势, LEF1和C-myc的表达水平呈“抛物线式”变化, 在修复的早中期上调, 在修复后期下降。各组差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.5 各组皮肤创面 $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc、CD34、Integrin  $\beta$ 1的免疫荧光表达** 第3天各组免疫荧光表达如图6所示,  $\beta$ -catenin主要表达于表皮棘层和基底层, LEF1和C-myc主要表达于基底层, 龟板软膏组和S8组的 $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc、CD34和Integrin  $\beta$ 1的阳性表达均强于空白对照组。

如图7所示, 龟板软膏组BrdU标记的增殖细胞数量较S8组和空白对照组多, 且同时表达CD34、LEF1阳性。第5, 7和10天, 龟板软膏组和S8组 $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc、CD34和Integrin  $\beta$ 1的阳性表达强度与第3天的结果类似, 均大于空白对照组, 结果未显示。

### 3 讨论 Discussion

中药复方疗效的发挥往往是由多个有效成分通过不同途径实现多成分、多靶点的协同作用, 从而达到治疗疾病的目的, 因此以有效部位成药具有中医药理论基础和特色<sup>[14]</sup>。中医药及其有效单体对皮肤组织修复再生的研究越来越受到重视<sup>[15]</sup>。此次实验所配制的龟板软膏借鉴龟板散的组方成分和疗效, 提取君药龟板、臣药黄连及佐使药冰片中促进皮肤愈合的有效单体进行成分配伍与剂型改良。龟板中的有效单体S8调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路, 促进毛囊干细胞的增殖分化, 参与创面修复和皮肤附属器生成<sup>[9]</sup>。黄连中的有效单体盐酸小檗碱发挥抗菌、抗感染、抗氧化及抗肿瘤等多种药理作用<sup>[16-18]</sup>, 具有伤口愈合促进活性, 并且没有毒性作用<sup>[19]</sup>, 研究发现盐酸小檗碱可减轻伤口出

血, 防止伤口感染, 促进皮肤细胞生长<sup>[20]</sup>。冰片中的有效单体右旋龙脑具有抑菌镇痛透皮的作用, 促进皮肤对药物的吸收, 提高其他药物的生物利用度<sup>[21-23]</sup>。龟板软膏制备简单, 对正常皮肤和破损皮肤均无皮肤刺激性现象, 其成分中3种有效单体疗效确切, 具有稳定性和安全性。

创面修复过程要经历出血期、炎症期、增殖期和塑形期, 涉及多种细胞及细胞外基质协同参与重建和再生。实验结果显示, 龟板软膏组能加快急性皮肤创面的修复, 其促愈合效果优于单个有效单体S8。龟板软膏组在修复第5, 7和10天创面愈合率高于S8组和空白对照组。苏木精-伊红染色观察表明, 龟板软膏组能加快急性创面的修复, 尤其在创面的增殖期和塑形期, 龟板软膏组表皮与真皮连接较其他组紧密, 皮肤附属器生成较多, 可更快参与到表皮的修复中, 缩短愈合时间。胶原纤维是细胞外基质的基本结构, 能够调控局部微环境, 促进细胞的增殖与分化<sup>[24]</sup>。Masson染色结果显示, 龟板软膏组胶原纤维生成与其他两组相比较密集, 说明龟板软膏能加快胶原纤维的形成, 促进组织外基质的重建, 提高创面修复的质量。

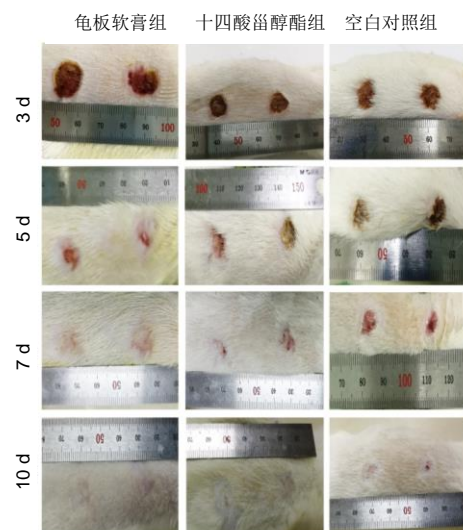
Wnt/ $\beta$ -catenin经典信号通路影响着皮肤创面的愈合<sup>[25]</sup>。 $\beta$ -catenin作为细胞内信号传导蛋白, 是Wnt信号通路激活的一种重要的上皮细胞表面黏附分子, 能进入细胞核内与LEF1转录因子结合, 进一步激活靶基因开始转录<sup>[26-27]</sup>。C-myc是编码转录因子的调节基因, 调控着细胞增殖周期、细胞分化与凋亡, 还控制着毛囊干细胞从G<sub>0</sub>到S期的增殖过程<sup>[28-29]</sup>。LEF1和C-myc在Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中起着精细的调控作用, 表达不足或表达太过都会影响创面修复。此次研究结果显示, 龟板软膏可能激活并调控Wnt/ $\beta$ -catenin经典信号通路参与急性皮肤创面的修复, 在创面修复的早中期,  $\beta$ -catenin、LEF1和C-myc表达上调, 在创面修复后期, LEF1和C-myc表达下调。毛囊干细胞具有修复受损创面、恢复皮肤组织的完整性和功能的重要作用<sup>[30]</sup>, 毛囊干细胞可增殖、迁移和分化为表皮各层细胞, 增强毛囊干细胞的增殖活性是加快皮肤创面愈合的关键。CD34和Integrin $\beta$ 1是毛囊干细胞的阳性标记物<sup>[31]</sup>, 实验表明, CD34和Integrin $\beta$ 1的表达在创面修复过程中呈上升趋势, 且龟板软膏组中BrdU标记的增殖细胞较多, 同时表达CD34、LEF1阳性, 提示龟板软膏可能通过调控毛囊干细胞中的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路, 促进毛囊干细胞增殖并参与创面组织重建, 加快急性创面的修复。

综上所述, 龟板软膏由S8、盐酸小檗碱和右旋龙脑组成, 成分机制明确, 单体疗效确切, 具有稳定性和安全性。龟板软膏能够调控毛囊干细胞中的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路, 促进毛囊干细胞增殖, 加快大鼠急性皮肤创面的修复, 并具有优于单一有效单体的疗效, 为基于中药有效单体成分治疗皮肤创面的新药研究提供思路。但此次研究仅证明了龟板软膏对急性创面的修复作用, 还需进一步研究龟板软膏是否适用于压疮、糖尿病溃疡等慢性伤口。





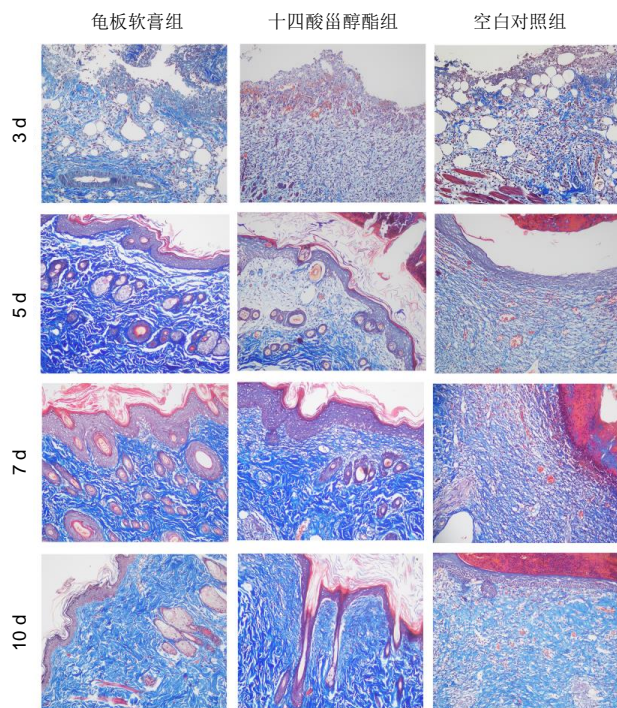
图 1 大鼠急性皮肤创面  
Figure 1 Rat acute skin wound



图注: 随着治疗时间的增加, 各组创面愈合情况好转, 龟板软膏组创面愈合情况优于十四酸甾醇酯组和空白对照组。

图 2 不同时间点各组创面愈合情况

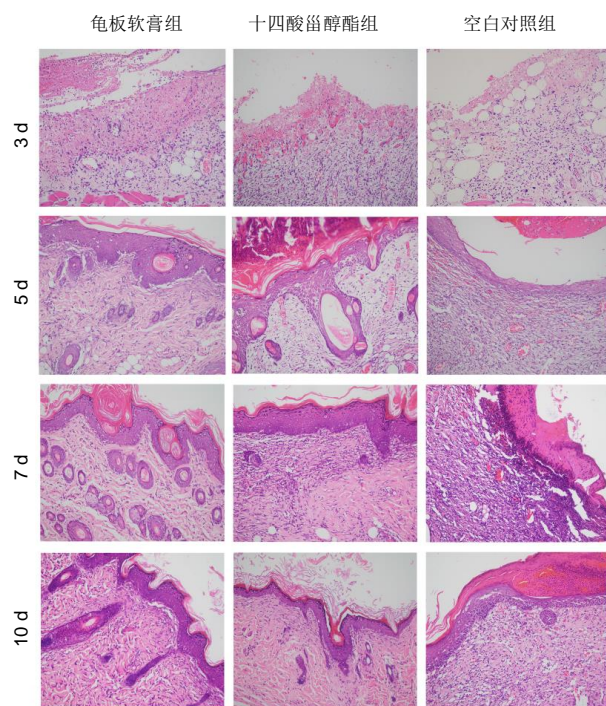
Figure 2 Wound healing of each group at different time points



图注: 随着治疗时间的增加, 各组创面胶原纤维生成逐渐增多, 至第 10 天, 龟板软膏组较十四酸甾醇酯组和空白对照组更趋向正常皮肤组织胶原纤维的特性。

图 4 不同时间点各组皮肤创面胶原纤维的生成情况(Masson 染色,  $\times 200$ )

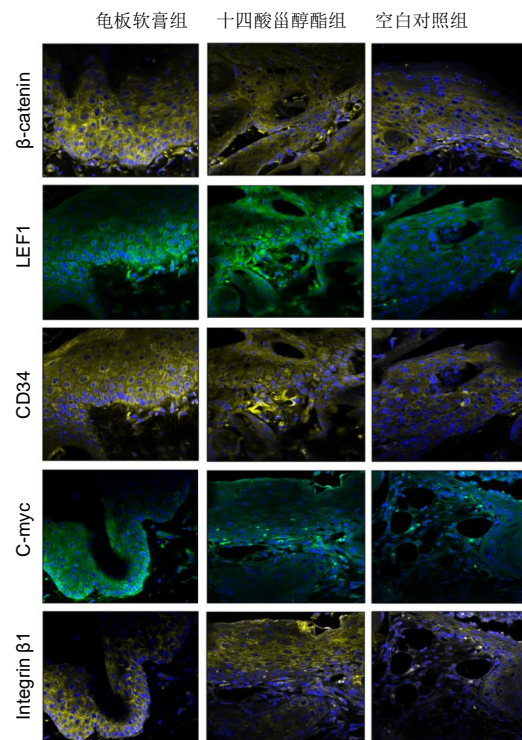
Figure 4 Formation of collagen fibers on skin wounds in each group at different time points (Masson staining,  $\times 200$ )



图注: 随着治疗时间的增加, 各组创面炎症浸润减少, 表皮组织增厚, 至第 10 天, 龟板软膏组和十四酸甾醇酯组表皮修复接近正常表皮, 空白对照组仍有少许结痂覆盖。

图 3 不同时间点各组皮肤创面修复情况(苏木精-伊红染色,  $\times 200$ )

Figure 3 Repair of skin wounds in each group at different time points (hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )

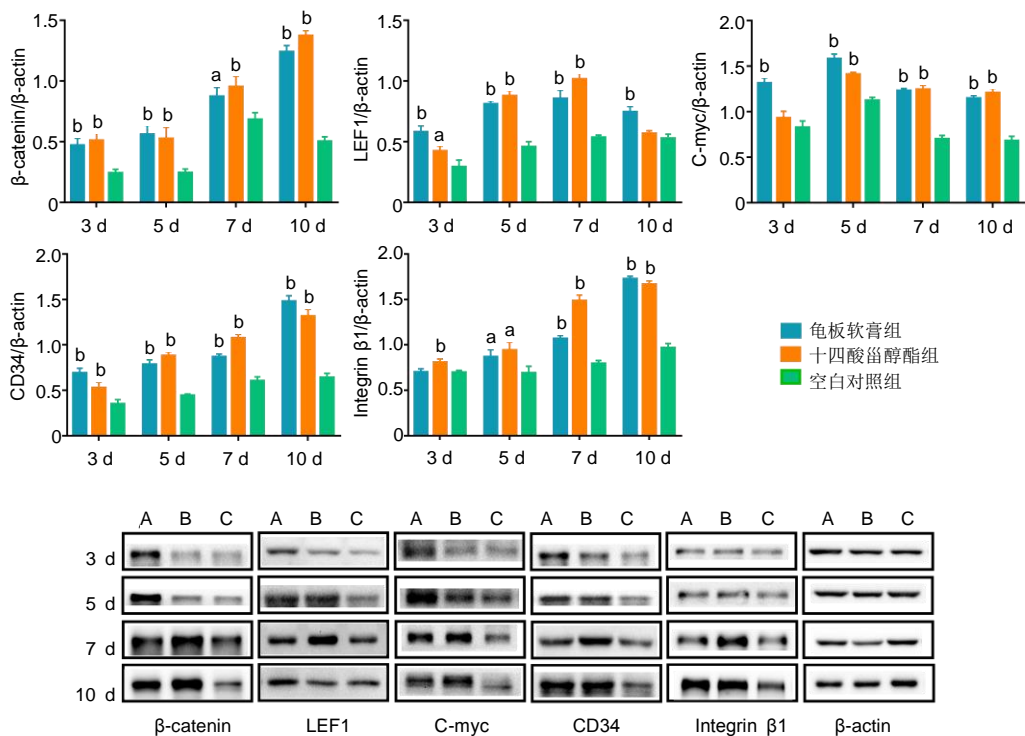


图注:  $\beta$ -catenin 用 Cy3 标记, LEF1 用 FITC 标记, CD34 用 Cy3 标记, C-myc 用 FITC 标记, Integrin  $\beta 1$  用 Cy3 标记。

图 6 第 3 天各组皮肤创面  $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc、CD34、Integrin  $\beta 1$  的免疫荧光表达( $\times 200$ )

Figure 6 The immunofluorescence results of  $\beta$ -catenin, LEF1, C-myc, CD34 and Integrin  $\beta 1$  on skin wounds at day 3 after repair ( $\times 200$ )

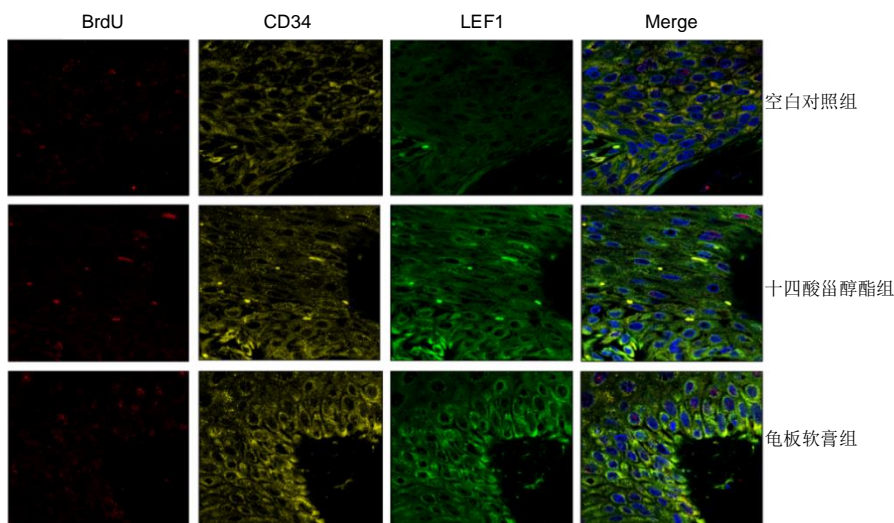




图注: A: 龟板软膏组; B: 十四酸甾醇酯组(S8)组; C: 空白对照组; 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

图 5 龟板软膏对皮肤创面  $\beta$ -catenin、LEF1、C-myc、CD34、Integrin  $\beta$ 1 蛋白表达量的影响

Figure 5 Effects of tortoise shell ointment on the expression of  $\beta$ -catenin, LEF1, C-myc, CD34 and Integrin  $\beta$ 1 on skin wounds



图注: BrdU 用 Alexa Fluor® 647 标记, CD34 用 Cy3 标记, LEF1 用 FITC 标记。图 7 BrdU 与 CD34、LEF1 免疫荧光标记结果( $\times 400$ )

Figure 7 The immunofluorescence labeling of BrdU, CD34 and LEF1 ( $\times 400$ )

**致谢:** 感谢广州中医药大学实验动物中心提供场地支持。

**作者贡献:** 实验设计为李春、申倩; 实验实施为申倩、胡佩欣、钟淑贤、杨亚兰; 实验评估为李春、张赛霞; 李春对文章负责和审核。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金(81403201)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 20190218001。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章

符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经广州中医药大学统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Li J, Zheng H, Wang J, et al. Expression of Kruppel-like factor KLF4 in mouse hair follicle stem cells contributes to cutaneous wound healing. PLoS One. 2012;7(6): e39663.

- [2] Pineda CM, Park S, Mesa KR, et al. Intravital imaging of hair follicle regeneration in the mouse. *Nat Protoc.* 2015;10(7):1116-1130.
- [3] Si Y, Bai J, Wu J, et al. LncRNA PlncRNA 1 regulates proliferation and differentiation of hair follicle stem cells through TGF  $\beta$ 1 mediated Wnt/ $\beta$  catenin signal pathway. *Mol Med Rep.* 2018;17(1):1191-1197.
- [4] Du KT, Deng JQ, He XG, et al. MiR-214 Regulates the Human Hair Follicle Stem Cell Proliferation and Differentiation by Targeting EZH2 and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Way In Vitro. *Tissue Eng Regen Med.* 2018;15(3):341-350.
- [5] Lim X, Nusse R. Wnt signaling in skin development, homeostasis, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2). pii: a008029. doi: 10.1101/cshperspect.a008029.
- [6] Nowak JA, Polak L, Pasolli HA, et al. Hair Follicle Stem Cells Are Specified and Function in Early Skin Morphogenesis. *Cell Stem Cell.* 2008;3(1):33.
- [7] Chen DF, Du SH, Zhang HL, et al. Autocrine BMP4 signaling involves effect of cholesterol myristate on proliferation of mesenchymal stem cells. *Steroids.* 2009;74(13-14):1066-1072.
- [8] 李瑜,魏刚,唐钰,等.十四酸甾醇酯调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促皮肤创面修复的研究[J].*中药新药与临床药理*, 2018,29(3):302-306.
- [9] Wang K, Feng X, Chai L, et al. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. *Drug Metab Rev.* 2017;49(2):139-157.
- [10] Chen J, Su JY, Li L, et al. A new source of natural d-borneol and its characteristic. *J Med Plants Res.* 2011;5(15):3440-3447.
- [11] 唐钰,李春,黎湘君,等.龟板提取物激活Wnt/ $\beta$ -catenin通路促大鼠触须部皮肤创面修复[J].*中药新药与临床药理*, 2017,28(3):298-303.
- [12] Ramírez E, Mendieta L, Flores G, et al. Neurogenesis and morphological-neural alterations closely related to amyloid  $\beta$ -peptide (25-35)-induced memory impairment in male rats. *Neuropeptides.* 2018;67:9-19.
- [13] J Martin Wojtowicz, Nohjin Kee. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1399-1405.
- [14] 杨鸣华,刘祎,孔令义.基于中药有效单体成分的新药研究[J].*世界科学技术-中医药现代化*,2016,18(3):329-336.
- [15] Das U, Behera SS, Pramanik K. Ethno-Herbal-Medico in Wound Repair: An Incisive Review. *Phytother Res.* 2017;31(4):579-590.
- [16] Chen G, Xu Y, Jing J, et al. The anti-sepsis activity of the components of Huanglian Jiedu Decoction with high lipid A-binding affinity. *Int Immunopharmacol.* 2017;46:87-96.
- [17] Ruan H, Zhan YY, Hou J, et al. Berberine binds RXR $\alpha$  to suppress  $\beta$ -catenin signaling in colon cancer cells. *Oncogene.* 2017;36(50):6906-6918.
- [18] Lin YH, Lin JH, Chou SC, et al. Berberine-loaded targeted nanoparticles as specific *Helicobacter pylori* eradication therapy: in vitro and in vivo study. *Nanomedicine (Lond).* 2015;10:57-71.
- [19] Pietra D, Borghini A, Bianucci AM. In vitro studies of antifibrotic and cytoprotective effects elicited by proto-berberine alkaloids in human dermal fibroblasts. *Pharmacol Rep.* 2015;67(6):1081-1089.
- [20] Bao J, Yang B, Sun Y, et al. A berberine-loaded electrospun poly-(epsilon-caprolactone) nanofibrous membrane with hemostatic potential and antimicrobial property for wound dressing. *J Biomed Nanotechnol.* 2013;9(7):1173-1180.
- [21] Wang S, Zhang D, Hu JS, et al. A clinical and mechanistic study of topical borneol-induced analgesia. *EMBO Molecular Medicine.* 2017; 9(6):802-815.
- [22] Zhou Y, Li W, Chen L, et al. Enhancement of intestinal absorption of akebia saponin by borneol and probenecid in situ and in vitro. *Environ.Toxicol.harmacol.* 2010;29(3):229-234.
- [23] Zhang QL, Fu BM, Zhang ZJ. Borneol, a novel agent that improves central nervous system drug delivery by enhancing blood-brain barrier permeability. *Drug Deliv.* 2017;24(1):1037-1044.
- [24] Mikesh LM, Aramadhaka LR, Moskaluk C, et al. Proteomic anatomy of human skin. *J Proteomics.* 2013;84:190-200.
- [25] Leavitt T, Hu MS, Marshall CD, et al. Scarless wound healing: finding the right cells and signals. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):483-493.
- [26] Gao C, Xiao G, Hu J. Regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell Biosci.* 2014;4(1):13.
- [27] Wang HD, Yang L, Yu XJ, et al. Immunolocalization of  $\beta$ -catenin and Lef-1 during postnatal hair follicle development in mice. *Acta Histochem.* 2012;114(8):773-778.
- [28] Wang N, Yang T, Li J, et al. The expression and role of c-Myc in mouse hair follicle morphogenesis and cycling. *Acta Histochem.* 2012;114(3):199-206.
- [29] Shen Q, Yu W, Fang Y, et al. Beta-catenin can induce hair follicle stem cell differentiation into transit-amplifying cells through c-myc activation. *Tissue Cell.* 2017;49(1):28-34.
- [30] Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, et al. Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):25476-25501.
- [31] 李佳,安恒庆,王峰,等.组织块法与酶消化法培养大鼠毛囊干细胞的比较[J].*中国组织工程研究*,2015,19(01):91-95.