

隐丹参酮抑制模型兔耳增生性瘢痕的作用及机制

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3221>

杨莉, 李雪莉, 宋静卉, 禹卉千, 王伟霞

2095-4344.3221

投稿日期: 2020-05-11

送审日期: 2020-05-15

采用日期: 2020-06-04

在线日期: 2020-12-04

中图分类号:

R459.9; R318; R242

文章编号:

2095-4344(2021)20-03150-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章亮点一

△将兔耳增生性瘢痕模型作为研究对象, 通过苏木精-伊红染色、Masson染色及相关蛋白检测方法, 观察隐丹参酮对增生性瘢痕的作用, 为增生性瘢痕防治药物的临床应用及开发提供理论和实验依据。

△实验结果显示, 隐丹参酮可能通过调控转化生长因子 β 1/Smad信号通路抑制增生性瘢痕的胶原沉积, 从而改善皮肤瘢痕。

动物分组

- (1) 对照组;
- (2) 兔耳增生性瘢痕组;
- (3) 隐丹参酮 27 mg/L组;
- (4) 隐丹参酮 81 mg/L组。

观察指标

- (1) 瘢痕指数、病理学观察;
- (2) α -平滑肌肌动蛋白水平、羟脯氨酸含量;
- (3) I, III型胶原蛋白表达;
- (4) 转化生长因子 β 1/Smads信号通路。

结论

- (1) 隐丹参酮对兔耳增生性瘢痕的形成有一定抑制作用;
- (2) 隐丹参酮对瘢痕的抑制机制与转化生长因子 β 1/Smads有关。

主题释义:

隐丹参酮: 是从丹参根及根茎中提取出的一种脂溶性醌类衍生物, 具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤细胞增殖等多种药理作用, 同时对心血管疾病、内分泌代谢疾病及慢性肾功能衰竭等疾病具有预防作用。近年研究发现隐丹参酮具有抗纤维化作用。

增生性瘢痕: 是各种烧、创伤后的常见并发症, 常伴有瘙痒、疼痛及关节活动受限等不适症状, 其病理特征主要表现为肌成纤维细胞的过度增殖及细胞外基质尤其是胶原的过度沉积。增生性瘢痕不仅影响组织外观, 还会干扰皮肤功能恢复, 严重影响患者的身心健康。

摘要

背景: 研究表明隐丹参酮对增生性瘢痕组织增生具有一定的抑制作用, 但具体机制尚不明确。

目的: 探讨隐丹参酮对兔耳增生性瘢痕组织的抑制作用及其对转化生长因子 β 1/Smads信号通路的影响。

方法: 建立增生性瘢痕兔耳模型, 随机分为模型组、隐丹参酮27 mg/L组和隐丹参酮81 mg/L组, 3组于建模后21 d分别局部注射生理盐水、27 mg/L及81 mg/L隐丹参酮, 1次/d, 共7 d; 同时以正常兔为对照组。给药结束后测量瘢痕指数, 取材后采用苏木精-伊红染色和Masson染色进行病理学分析, 免疫组化法检测 α -平滑肌肌动蛋白表达, 碱水解法检测羟脯氨酸含量, 免疫印迹法检测I, III型胶原及转化生长因子 β 1/Smads信号通路相关蛋白表达水平。

结果与结论: ①与对照组比较, 模型组瘢痕指数、成纤维细胞及胶原纤维数量明显升高, 瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白水平、羟脯氨酸含量及I, III型胶原、转化生长因子 β 1、p-Smad2、p-Smad3、Smad4的蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$); ②与模型组比较, 隐丹参酮27 mg/L组和隐丹参酮81 mg/L组瘢痕指数、成纤维细胞及胶原纤维数量明显降低, 瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白水平、羟脯氨酸含量及I, III型胶原、转化生长因子 β 1、p-Smad2、p-Smad3、Smad4的蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$), 且隐丹参酮81 mg/L组变化更明显($P < 0.05$); ③提示隐丹参酮对兔耳增生性瘢痕的形成具有一定的抑制作用, 其机制可能与转化生长因子 β 1/Smads信号通路有关。

关键词: 隐丹参酮; 增生性瘢痕; 胶原; 转化生长因子 β 1; Smads; 通路

Effect of cryptotanshinone on hypertrophic scar of rabbit ear and its related mechanism

Yang Li, Li Xueli, Song Jinghui, Yu Huiqian, Wang Weixia

Department of Dermatology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China
Yang Li, MD, Attending physician, Department of Dermatology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Corresponding author: Yang Li, Department of Dermatology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Cryptotanshinone (CTS) has been shown to have a certain inhibitory effect on hyperplastic scar hyperplasia, but the specific mechanism is still unclear.

OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effect of CTS on hypertrophic scar of the rabbit ear and its effect on transforming growth factor- β 1/Smads signaling pathway.

河南省人民医院皮肤科, 郑州大学人民医院, 河南省郑州市 450003

第一作者: 杨莉, 女, 1980年生, 河南省郑州市人, 2018年昆明医科大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事皮肤美容方面的研究。

通讯作者: 杨莉, 博士, 主治医师, 河南省人民医院皮肤科, 郑州大学人民医院, 河南省郑州市 450003

<https://orcid.org/0000-0003-3146-7247> (杨莉)

基金资助: 河南省医学教育研究项目 (Wjlx2018086), 项目负责人: 李雪莉

引用本文: 杨莉, 李雪莉, 宋静卉, 禹卉千, 王伟霞. 隐丹参酮抑制模型兔耳增生性瘢痕的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(20):3150-3155.



METHODS: The rabbit ear model of hypertrophic scar was established and then rabbit models were randomly divided into model group, low and high-dose CTS groups, followed by local injection of normal saline, 27 and 81 mg/L CTS respectively beginning at 21 days after modeling, once a day, for 7 days. Meanwhile, normal rabbits were used as the control group. Scar index was measured after administration. Pathological analysis was carried out by hematoxylin-eosin staining and Masson staining after sampling. The expression of α -smooth muscle actin was detected by immunohistochemistry. Hydroxyproline content was determined by alkaline hydrolysis. The expression of type I collagen, type III collagen and transforming growth factor- β /Smads signaling pathway related proteins were detected by western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the scar index, the number of fibroblasts and collagen fibers were significantly increased, the levels of α -smooth muscle actin and hydroxyproline in scar tissue, and the protein levels of type I collagen, type III collagen, transforming growth factor- β 1, p-Smad2, p-Smad3 and Smad4 were significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the scar index, the number of fibroblasts and collagen fibers were significantly decreased, the levels of α -smooth muscle actin and hydroxyproline in scar tissue, and the protein levels of type I collagen, type III collagen, transforming growth factor- β 1, p-Smad2, p-Smad3 and Smad4 were significantly decreased in the low and high-dose CTS groups ($P < 0.05$). The above-mentioned parameters changed more significantly in the high-dose CTS group compared to the low-dose CTS group ($P < 0.05$). To conclude, CTS has a certain inhibitory effect on the formation of hypertrophic scar in rabbit ears, and its mechanism may be related to transforming growth factor- β 1/Smads signaling pathway.

Key words: cryptotanshinone; hypertrophic scar; collagen; transforming growth factor- β 1; Smads; pathway

Funding: the Henan Medical Education Research Project, No. Wjlx2018086 (to LXL)

How to cite this article: YANG L, LI XL, SONG JH, YU HQ, WANG WX. Effect of cryptotanshinone on hypertrophic scar of rabbit ear and its related mechanism. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(20):3150-3155.

0 引言 Introduction

增生性瘢痕是皮肤创伤愈合过程中常见的并发症,常伴有瘙痒、疼痛及关节活动受限等不适症状,不仅影响组织外观,还会干扰皮肤功能恢复,严重影响患者的身心健康^[1-2]。

目前增生性瘢痕尚无特异性治疗措施,因此如何抑制瘢痕增生已成为皮肤美容领域的研究热点。隐丹参酮是丹参中主要的脂溶性成分,具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤细胞增殖等多种药理作用,同时对心血管疾病、内分泌代谢疾病及慢性肾功能衰竭等疾病具有预防作用^[3-5]。已有研究发现隐丹参酮对增生性瘢痕组织增生具有一定的抑制作用,但具体机制尚不明确^[6]。文章以兔耳瘢痕模型为研究对象,旨在探讨隐丹参酮局部创面注射对增生性瘢痕形成的影响及其可能作用机制,为增生性瘢痕防治药物的临床应用及开发提供理论和实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 于2019年6月至8月在河南省人民医院中心实验室开展完成。

1.3 材料

1.3.1 动物 12只健康雄性新西兰兔(体质量2.0-2.5 kg)及饲料均购自广东省医学实验动物中心,检疫合格证号:SYXK(粤)2019-0035,其中10只兔制备兔耳增生性瘢痕模型,2只兔作为对照组。此次研究方法经河南省人民医院医学伦理委员会批准。

1.3.2 主要试剂 隐丹参酮购自于四川微课奇生物科技有限公司,纯度大于98%; α -平滑肌肌动蛋白、转化生长因子 β 1、p-Smad2、Smad2、p-Smad3、Smad3、Smad4及 β -actin抗体均购自于美国Abcam。

1.4 实验方法

1.4.1 兔耳增生性瘢痕模型制备^[7] 将10只新西兰兔适应性饲养于室温20-25℃、相对湿度40%-70%环境中,1周后进行实验。将动物固定于手术台上,用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)注射耳缘静脉麻醉,而后用1 cm环钻在双侧兔耳腹侧面中下

部皮肤上(避开可见血管)垂直钻孔,钻透全层皮肤至软骨,沿软骨膜去除全层皮肤。每只兔耳制备4个创面,每个间距约1.5 cm,术后创面暴露于空气中,待其自行愈合形成瘢痕增生块。

组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的	隐丹参酮局部创面注射对增生性瘢痕形成的影响及其可能作用机制
选择动物的条件	体质量2.0-2.5 kg的健康雄性新西兰兔
模型与所研究疾病的关系	兔耳增生性瘢痕模型可以模拟创伤损伤后皮肤瘢痕的增生
动物来源及品系	广东省医学实验动物中心,新西兰白兔
造模技术描述	将动物固定于手术台上,用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)注射耳缘静脉麻醉,而后用1 cm环钻在双侧兔耳腹侧面中下部皮肤上(避开可见血管)垂直钻孔,钻透全层皮肤至软骨,沿软骨膜去除全层皮肤
动物数量及分组方法	10只模型兔中剔除2只创面增生不均匀的兔,剩下8只中选择6只随机分为模型组、隐丹参酮27 mg/L组及隐丹参酮81 mg/L组,同时以正常兔为对照组,每组2只
造模成功评价指标	瘢痕组织高度大于2 mm,硬度与兔耳软骨相似时即为增生性瘢痕
造模后观察指标	瘢痕指数,组织病理学分析, α -平滑肌肌动蛋白表达,羟脯氨酸含量,I型胶原、III型胶原及转化生长因子 β 1/Smads信号通路相关蛋白表达水平
造模后动物处理	于建模后21 d分别局部注射生理盐水、隐丹参酮27 mg/L和81 mg/L,1次/d,共7 d
伦理委员会批准	河南省人民医院伦理委员会(批准号:科研-2019042)

1.4.2 分组及给药 于建模后21 d(创面均出现上皮化)对兔耳进行检查,剔除2只创面增生不均匀的兔,从剩下8只兔中选择6只,随机分为模型组、隐丹参酮27 mg/L组及隐丹参酮81 mg/L组,同时以正常兔为对照组,每组2只。其中隐丹参酮27 mg/L组及隐丹参酮81 mg/L组于瘢痕内基底部分别注射27 mg/L和81 mg/L的隐丹参酮20 μ L,模型组同部位注射等体积生理盐水,1次/d,共7 d。对照组不做任何处理。

1.4.3 瘢痕指数的测定 给药结束后 24 h, 大体观察瘢痕的基本形态, 用游标卡尺测量兔耳瘢痕厚度 (自瘢痕表面至软骨表面) 及兔耳瘢痕邻近腹侧正常皮肤厚度 (自皮肤表面至软骨表面), 并计算瘢痕指数 = 瘢痕厚度 / 正常皮肤厚度。

1.4.4 病理组织观察 瘢痕指数测量结束后, 3% 戊巴比妥钠经耳缘静脉麻醉, 切取标本。其中 8 个创面组织标本置于体积分数 4% 的中性甲醛中固定, 脱水后石蜡包埋, 随后用切片机连续切片 (10 μ m), 用作苏木精 - 伊红、Masson 染色; 其余 8 个创面标本保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

苏木精 - 伊红染色: 切片用二甲苯脱蜡, 随后用梯度乙醇水化, 苏木精染色 5 min, 盐酸乙醇分化 30 s, 温水浸泡 15 min 后, 吸干水, 伊红染色 2 min, 梯度乙醇脱水后, 用中性树脂封固, 染色后于显微镜下观察结果。随机选取 10 个视野, 利用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算每视野成纤维细胞的数目, 即成纤维细胞密度, 结果取均值。

Masson 染色: 将切片脱蜡至水化, 用苏木精染色 5 min, 丽春红染色 5 min, 磷钼酸处理 3 min, 1% 冰醋酸处理 1 min, 最后脱水封固。置于显微镜下观察图片。随机取切片中 10 个视野, 利用 Image-Pro Plus 6.0 软件, 计算蓝染的胶原纤维面密度 = 胶原面积 / 总面积 $\times 100\%$ 。

1.4.5 免疫组化法检测 α -平滑肌肌动蛋白 取石蜡切片, 经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化。在柠檬酸盐缓冲液中于 95 $^{\circ}$ C 进行抗原修复 15 min, 加入过氧化酶阻断剂孵育 30 min。PBS 洗涤后, 加入正常非免疫血清孵育 30 min, 除去血清, 于载玻片上滴加 α -平滑肌肌动蛋白抗体, 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 1 h, 以 PBS 孵育的切片作为阴性对照。载玻片上滴加生物素化二抗孵育 30 min, 用链霉素抗生物素 - 过氧化物酶孵育 15 min。PBS 洗涤后, 加入 DAB 溶液显色。自来水冲洗后, 苏木精复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封固。以阳性面积与总面积比例表示 α -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达。

1.4.6 碱水解法检测羟脯氨酸含量 称取部分瘢痕组织, 制成匀浆, 消化, 水解, 取上清, 使用多功能酶标仪检测其在 550 nm 波长处的吸光度值, 并计算羟脯氨酸含量。

1.4.7 免疫印迹法检测蛋白表达 取部分瘢痕组织匀浆经 PMSF 裂解后, 提取其总蛋白。将蛋白在聚丙烯酰胺凝胶上分离, 随后进行转膜, 转膜结束后将膜取出, PBST 冲洗后, 加入脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, PBST 冲洗后分别加入 I, III 型胶原、转化生长因子 β 1、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3、Smad4 及 β -actin 抗体孵育 2 h, 随后用带有 HRP 的二抗继续孵育 2 h, 最后使用凝胶成像系统拍照并计算其相对表达量。

1.5 主要观察指标 ①瘢痕指数测定; ②瘢痕组织病理学形态观察; ③瘢痕组织羟脯氨酸含量的测定; ④瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白、I 型胶原、III 型胶原及转化生长因子 β 1/Smads 通路相关蛋白的表达。

1.6 统计学分析 所有数据均采用 SPSS 19.0 进行分析。服从正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有

显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 10 只兔耳增生性瘢痕模型中 2 只创面增生不均匀 (剔除), 从剩下 8 只中选择 6 只, 随机分为模型组、隐丹参酮 27 mg/L 组及隐丹参酮 81 mg/L 组, 同时以正常兔为对照组, 每组 2 只。

2.2 隐丹参酮对兔耳瘢痕形成效果及瘢痕指数影响 给药结束后大体观察发现, 模型组瘢痕组织出现挛缩, 颜色较红, 瘢痕高出皮肤平面, 增生范围未超出原创缘; 隐丹参酮组瘢痕颜色较淡, 厚度有所减小。

与对照组相比, 模型组瘢痕指数明显升高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 隐丹参酮 27 mg/L 组及隐丹参酮 81 mg/L 组瘢痕指数显著降低, 且隐丹参酮 81 mg/L 组显著低于隐丹参酮 27 mg/L 组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 | 各组瘢痕指数比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=2$)
Table 1 | Comparison of scar index among groups

组别	瘢痕指数
对照组	1.00 \pm 0.11
模型组	2.12 \pm 0.23 ^a
隐丹参酮 27 mg/L 组	1.78 \pm 0.16 ^{ab}
隐丹参酮 81 mg/L 组	1.51 \pm 0.14 ^{ab}

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

2.3 隐丹参酮对兔耳瘢痕组织影响 苏木精 - 伊红染色结果 (图 1) 显示, 与对照组相比, 模型组皮肤有明显瘢痕现象, 真皮组织中成纤维细胞数量明显增多, 组织排列紊乱, 胶原含量丰富; 隐丹参酮 27 mg/L 组及隐丹参酮 81 mg/L 组相较于模型组, 其瘢痕厚度明显变薄, 成纤维细胞数量减少。

Masson 染色结果 (图 2) 显示, 对照组皮肤的真皮组织中胶原纤维呈蓝色, 肌纤维、胞质呈红色, 排列较为整齐; 模型组胶原纤维异常堆积, 含量较多且排列紊乱; 隐丹参酮 27 mg/L 组及隐丹参酮 81 mg/L 组相较于模型组, 胶原纤维数量及密度均降低, 排列紊乱有一定程度改善。

各组成纤维细胞密度、胶原纤维面密度比较见表 2, 结果显示, 与对照组相比, 模型组的成纤维细胞密度及胶原纤维面密度均明显高于对照组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 隐丹参酮组成纤维细胞密度及胶原纤维面密度均明显降低, 且隐丹参酮 81 mg/L 组变化更明显, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

2.4 隐丹参酮对 α -平滑肌肌动蛋白的影响 免疫组化结果显示 (图 3), 与对照组相比, 模型组瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白的阳性表达率明显升高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 隐丹参酮组瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白的阳性表达率明显降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.5 隐丹参酮对胶原合成、I / III 型胶原蛋白表达的影响 与对照组相比, 模型组瘢痕组织中羟脯氨酸含量、I, III 型胶原蛋白表达水平均明显升高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$);

表 2 | 各组成纤维细胞密度、胶原纤维面密度比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=2$)

Table 2 | Comparison of fibroblast density and collagen fiber areal density among groups

组别	成纤维细胞密度 (细胞 / 视野)	胶原纤维面密度 (%)
对照组	295.82±15.02	22.51±6.35
模型组	459.78±32.16 ^a	59.37±9.07 ^a
隐丹参酮 27 mg/L 组	422.54±28.79 ^{ab}	48.42±8.61 ^{ab}
隐丹参酮 81 mg/L 组	374.39±19.63 ^{ab}	36.55±7.13 ^{ab}

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

表 3 | 各组瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=2$)

Table 3 | Comparison of α -smooth muscle actin level in scar tissue among groups

组别	α -平滑肌肌动蛋白 (%)
对照组	6.82±1.31
模型组	22.78±2.79 ^a
隐丹参酮 27 mg/L 组	18.54±2.43 ^{ab}
隐丹参酮 81 mg/L 组	15.39±1.92 ^{ab}

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

与模型组比较, 隐丹参酮组瘢痕组织中羟脯氨酸含量、I, III型胶原蛋白表达水平均显著降低, 且隐丹参酮 81 mg/L 组变化更明显, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

2.6 隐丹参酮对瘢痕组织中转化生长因子 β /Smads 通路的影响 免疫印迹检查结果显示, 与对照组相比, 模型组瘢痕组织中转化生长因子 β 1、p-Smad2、p-Smad3 和 Smad4 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 隐丹参酮组瘢痕组织中转化生长因子 β 1、p-Smad2、p-Smad3 和 Smad4 的表达水平均明显降低, 且隐丹参酮 81 mg/L 组变化更明显, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 5。

3 讨论 Discussion

增生性瘢痕是一种皮肤纤维增生性不良反应, 目前的治疗方法主要有外用药物、手术、物理压迫及激光等, 但治疗效果均不够理想^[8], 部分药物也由于严重的不良反应而限制了其临床应用。目前从天然药物中筛选出更安全、有效的皮肤美容药物, 越来越受到重视^[9], 有研究发现, 山奈酚、龙血素 B 及柚皮素等多种天然化合物对瘢痕增生均有一定的抑制作用^[10-12]。

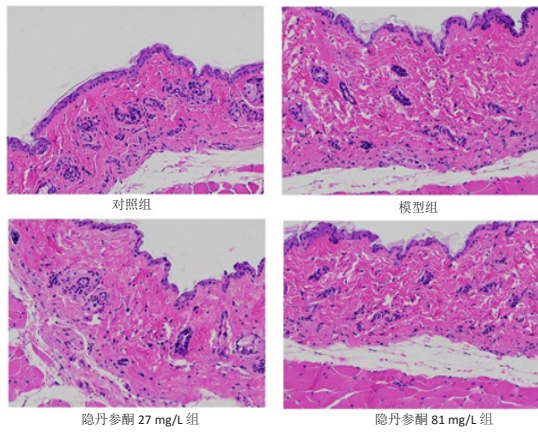
隐丹参酮是从丹参根及根茎中提取出的一种脂溶性醌类衍生物, 近年研究发现其具有抗纤维化作用。MA 等^[13]研究发现隐丹参酮通过上调和激活心室心肌中的基质金属蛋白酶 2 改善异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化。LO 等^[14]研究发现, 在链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病高血糖模型大鼠中, 隐丹参酮通过抑制 STAT3 信号通路来抑制心肌纤维化并改善心功能, 可作为治疗心肌纤维化的替代药物。LI 等^[6]研究发现隐丹参酮能够抑制增生性瘢痕成纤维细胞的迁移和收缩, 改善成纤维细胞胶原网格, 促进伤口愈合, 减少细胞外基质成分的过度沉积。此次研究采用隐丹参酮对兔耳瘢痕动物模型进行局部干预, 结果显示隐丹参酮能明显抑制瘢痕的增生, 降低成纤维细胞密度、胶原纤维面密度, 提示隐丹参酮能够有效控制增生性瘢痕的过度生长, 与现有关于隐丹参酮抑制纤维化

生成的研究结论一致^[6]。

α -平滑肌肌动蛋白是细胞骨架蛋白, 也是肌肉成纤维细胞收缩功能的特征蛋白, 可通过跨膜复合物与纤维粘连蛋白连接, 进而把收缩信号传导至所有组织^[15]。在病理性的愈合过程中, 成纤维细胞被激活分化为肌成纤维细胞, 产生过多的 α -平滑肌肌动蛋白, 并伴随创伤区域高水平的机械应力, 导致组织过度痉挛, 分泌 I, III型胶原蛋白及纤维蛋白等细胞外基质, 因此 α -平滑肌肌动蛋白水平在肌成纤维细胞的增殖活性及瘢痕的收缩中发挥重要作用^[16-17], 因此抑制 α -平滑肌肌动蛋白的过度增殖和细胞外基质沉积是减轻增生性瘢痕的重要机制。此次研究采用隐丹参酮干预兔耳瘢痕组织后发现, 瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白阳性表达强度及 I, III型胶原蛋白表达水明显降低, 提示隐丹参酮可以抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞的转分化及增殖, 并抑制肌成纤维细胞分泌过度的细胞外基质, 从而抑制瘢痕组织增生。

转化生长因子 β 1 是促进纤维化疾病发生的重要因子之一^[18], Smads 是转化生长因子 β 1 受体的胞内激酶底物, 它可将转化生长因子 β 1 与受体作用的信号由胞浆转导至胞核^[19]。大量证据显示转化生长因子 β 1 可通过转化生长因子 β 1/Smad 通路调控启动成纤维细胞的增殖分裂, 导致胶原蛋白的大量合成并在细胞外基质过度沉积, 最终形成纤维化的组织病理学改变^[20-21]。目前研究发现转化生长因子 β 1/Smad 信号通路异常传导与增生性瘢痕形成密切相关^[22], 因此抑制转化生长因子 β 1/Smad 信号通路的激活是减轻增生性瘢痕的重要机制。近年研究发现隐丹参酮可通过调控转化生长因子 β 1/Smads 信号通路改善哮喘模型小鼠气道炎症^[23]; 同时 WANG 等^[24]研究证实, 隐丹参酮可通过抑制转化生长因子 β 1/Smad3/integrin β 1 信号通路, 改善肾纤维化及上皮细胞转化。因此推测, 隐丹参酮对瘢痕的抑制作用可能与其对转化生长因子 β 1/Smad 信号通路的调控有关。此次研究通过检测转化生长因子 β 1/Smad 信号通路相关蛋白来探究隐丹参酮改善增生性瘢痕的分子机制, 结果显示, 瘢痕组织中转化生长因子 β 1、p-Smad2、p-Smad3、Smad4 蛋白表达水平明显降低, 提示隐丹参酮能抑制转化生长因子 β 1/Smad 信号通路的激活。同时已有研究证实, 机体发生创伤时创面转化生长因子 β 1/Smad 被激活, 转化生长因子 β 1 分泌增加, 导致胶原蛋白合成增加^[25], 说明隐丹参酮可能是通过调控转化生长因子 β 1/Smad 信号通路抑制增生性瘢痕的胶原沉积, 从而改善皮肤瘢痕。

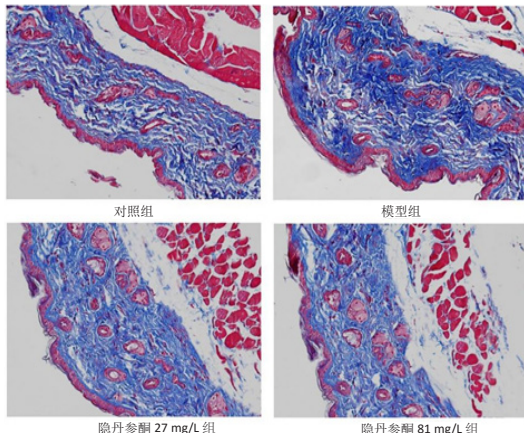
综上所述, 此次研究认为隐丹参酮对皮肤瘢痕形成具有一定的抑制和改善作用, 其作用机制可能与转化生长因子 β 1/Smads 通路相关。但由于瘢痕增生过程非常复杂, 可涉及多种信号级联反应, 且转化生长因子 β 1/Smads 信号通路与其他信号通路存在广泛的交叉对话效应, 因此在后续研究中还需要探究隐丹参酮对瘢痕增生性成纤维细胞的干预功能及作用机制, 深入探讨其抗纤维化的作用。



图注：对照组皮肤的真皮组织中成纤维细胞的数量较少，密度较低；模型组皮肤有明显瘢痕现象，真皮组织中成纤维细胞数量明显增多，组织排列紊乱，胶原含量丰富；隐丹参酮 27 mg/L 组及隐丹参酮 81 mg/L 组相较于模型组，其瘢痕厚度明显变薄，成纤维细胞数量减少

图 1 | 各组兔耳皮肤组织形态 (苏木精-伊红染色, ×200)

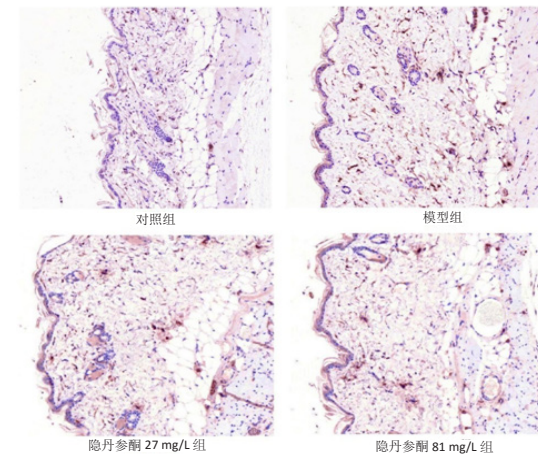
Figure 1 | Skin morphology of rabbit ears (hematoxylin-eosin staining, ×200)



图注：对照组皮肤的真皮组织中胶原纤维呈蓝色，肌纤维、胞质呈红色，排列较为整齐；模型组胶原纤维异常堆积，含量较多且排列紊乱；隐丹参酮 27 mg/L 组及隐丹参酮 81 mg/L 组相较于模型组，胶原纤维数量及密度均降低，排列紊乱有一定程度改善

图 2 | 各组兔耳皮肤胶原改变 (Masson 染色, ×200)

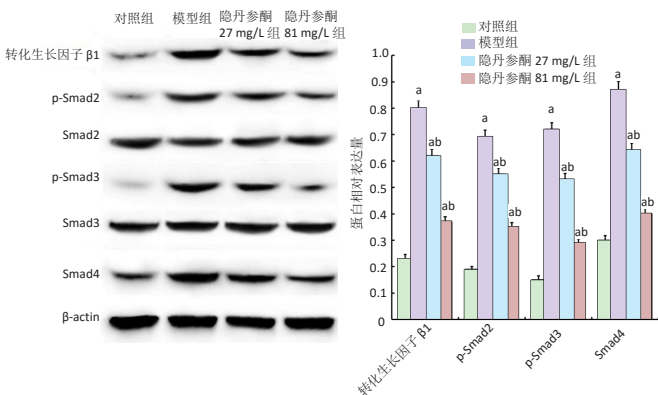
Figure 2 | Changes of collagen in rabbit ear skin (Masson staining, ×200)



图注：呈棕色的斑点为 α -平滑肌肌动蛋白的阳性表达。与对照组相比，模型组瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白的阳性表达明显升高；与模型组相比，隐丹参酮组瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白的阳性表达明显降低

图 3 | 各组瘢痕组织中 α -平滑肌肌动蛋白水平比较 (免疫组化染色, ×200)

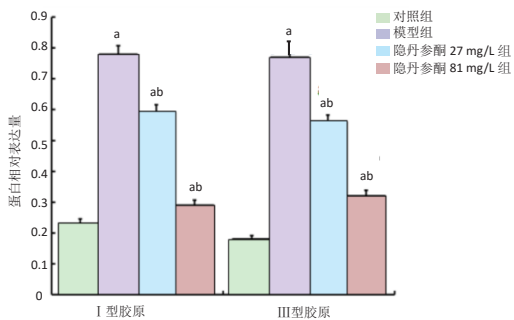
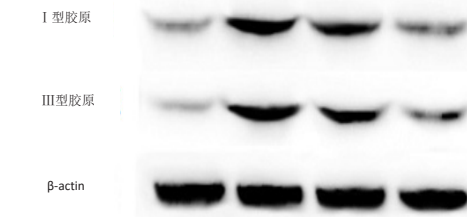
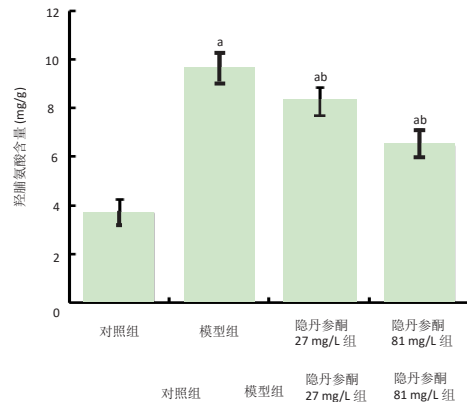
Figure 3 | Comparison of α -smooth muscle actin level in scar tissue (immunohistochemical staining, ×200)



图注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$

图 5 | 各组瘢痕组织中转化生长因子 β 1/Smads 通路相关蛋白的表达

Figure 5 | Expression of transforming growth factor- β 1/Smads signaling pathway related proteins in scar tissue



图注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$

图 4 | 各组瘢痕组织中羟脯氨酸含量及 I、III 型胶原蛋白表达水平比较

Figure 4 | Comparison of hydroxyproline content and type I and III collagen levels in scar tissue

致谢: 感谢河南省人民医院皮肤科简晓清和李慧对此次研究的支持和幫助。

作者贡献: 实验设计为杨莉, 实验实施为杨莉、李雪莉、宋静卉、禹卉千、王伟霞, 实验评估为李雪莉。

经费支持: 该文章接受了“河南省医学教育研究项目 (Wjlx2018086)”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不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经河南省人民医院医学伦理委员会批准, 批准号: 科研-2019042。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本刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经郑州大学生物统计学专家审核。

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] ZHANG J, LI Y, BAI X, et al. Recent advances in hypertrophic scar. *Histol Histopathol.* 2017;33(1):27-39.
- [2] 徐志山, 陶凯, 郭冰玉. miRNA 在病理性瘢痕中作用的研究进展 [J]. *中国美容整形外科杂志*, 2018,29(1):63-64, 后插 1.
- [3] ZHAO W, WU C, CHEN X. Cryptotanshinone Inhibits oxidized LDL-Induced Adhesion Molecule Expression via ROS Dependent NF- κ B Pathways. *Cell Adh Migr.* 2016;10(3):248-258.
- [4] 陈伟达, 罗成华, 苗成利. 隐丹参酮对人纤维肉瘤 HT-1080 细胞增殖和凋亡影响 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019,26(7):457-462.
- [5] 邹伟, 钱程, 张婷婷, 等. 隐丹参酮对小鼠下肢缺血的保护作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2019,35(2):40-45.
- [6] LI Y, SHI S, GAO J, et al. Cryptotanshinone downregulates the profibrotic activities of hypertrophic scar fibroblasts and accelerates wound healing: A potential therapy for the reduction of skin scarring. *Biomed Pharmacother.* 2016;80:80-86.
- [7] 宋雅娟, 余州, 王彤, 等. 中草药单体松萝酸抑制兔耳增生性瘢痕的作用研究 [J]. *中国美容整形外科杂志*, 2019,30(7):401-403, 后插 2.
- [8] 王斐, 赖林英, 梁黎明. 脂肪组织移植抑制体表瘢痕形成的临床研究进展 [J]. *中国美容医学*, 2018,27(10):170-173.
- [9] BERMAN B, MADERAL A, RAPHAEL B. Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment. *Dermatol Surg.* 2017;43(Suppl 1):S3-S18.

- [10] LI H, YANG L, ZHANG Y, et al. Kaempferol inhibits fibroblast collagen synthesis, proliferation and activation in hypertrophic scar via targeting TGF- β receptor type I. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:967-974.
- [11] HE T, BAI X, YANG L, et al. Loureirin B Inhibits Hypertrophic Scar Formation via Inhibition of the TGF- β 1-ERK/JNK Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(2):666-676.
- [12] SHAN S, ZHANG Y, WU M, et al. Naringenin attenuates fibroblast activation and inflammatory response in a mechanical stretch-induced hypertrophic scar mouse model. *Mol Med Rep.* 2017;16(4):4643-4649.
- [13] MA S, YANG D, WANG K, et al. Cryptotanshinone attenuates isoprenaline-induced cardiac fibrosis in mice associated with upregulation and activation of matrix metalloproteinase-2. *Mol Med Rep.* 2012;6(1):145-150.
- [14] LO SH, HSU CT, NIU HS, et al. Cryptotanshinone Inhibits STAT3 Signaling to Alleviate Cardiac Fibrosis in Type 1-like Diabetic Rats. *Phyther Res.* 2017;31(4):638-646.
- [15] 张文夺, 邓呈亮, 郭常敏, 等. 人真皮间充质干细胞对增生性瘢痕成纤维细胞 α -SMA 和 DCN 表达的影响 [J]. *中华整形外科杂志*, 2016,32(4):285-292.
- [16] 孙玉娇, 王俊卿, 焦卉朵, 等. 超声对兔耳瘢痕组织形态学及 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2014, 36(1):63-65.
- [17] 孙桂芳, 张晓芬, 李红昌, 等. 生肌玉红膏对增生性瘢痕的抑制作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2016,20(33):4890-4898.
- [18] 刘国菊, 李丛丛, 李睿坤, 等. 转化生长因子 β 1 在纤维化疾病发病中作用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2018,58(30):106-109.
- [19] HATA A, CHEN YG. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 2016;8(9):a022061.
- [20] LOBODA A, SOBCZAK M, JOZKOWICZ A, et al. TGF- β 1/Smads and miR-21 in Renal Fibrosis and Inflammation. *Mediator Inflamm.* 2016; 2016(7):1-12.
- [21] WEN S, WEI Y, ZHANG X, et al. Methyl helicaterilate ameliorates alcohol-induced hepatic fibrosis by modulating TGF- β 1/Smads pathway and mitochondria-dependent pathway. *Int Immunopharmacol.* 2019;75: 105759.
- [22] CHEN H, XU Y, YANG G, et al. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2017;14(5):4438-4442.
- [23] 王重阳, 姜京植, 李俊峰, 等. 隐丹参酮通过 TWEAK/Fn14 和 TGF- β 1/Smads 信号通路缓解 OVA 诱导哮喘小鼠气道炎症 [J]. *中国药理学通报*, 2019,35(8):1149-1154.
- [24] WANG W, ZHOU PH, HU W, et al. Cryptotanshinone hinders renal fibrosis and epithelial transdifferentiation in obstructive nephropathy by inhibiting TGF- β 1/Smad3/integrin β 1 signal. *Oncotarget.* 2018; 9(42):26625-26637.
- [25] 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 Burn Care Res.* 2012;33(2):218-227.

(责任编辑: GD, ZN, DL)