

沙棘总黄酮干预兔耳增生性瘢痕组织块的消退

牛梓晗, 余扬, 艾江, 卜盼盼, 李文博, 苏日耶·热合曼, 马少林

https://doi.org/10.12307/2022.940

投稿日期: 2021-09-30

采用日期: 2021-12-01

修回日期: 2022-04-16

在线日期: 2022-05-12

中图分类号:

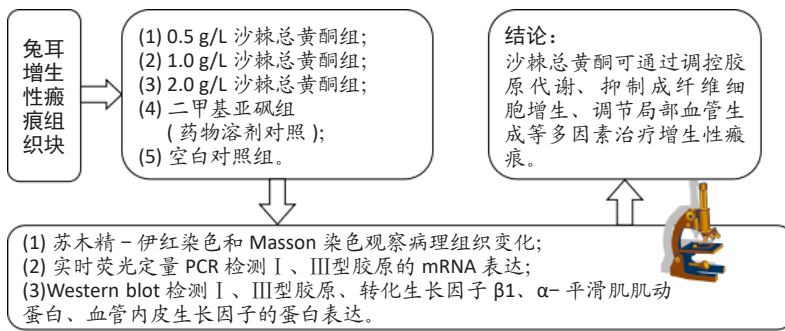
R459.9; R318; R285

文章编号:

2095-4344(2023)02-00258-06

文献标识码: B

文章快速阅读: 中草药沙棘总黄酮干预增生性瘢痕组织块消退的变化



文题释义:

沙棘总黄酮: 是中草药沙棘提取物中的主要活性成分, 具有抗氧化、抗炎、调节免疫、促进伤口愈合的功能。

兔耳增生性瘢痕组织块: 为研究增生性瘢痕常用的动物模型。在新西兰大白兔兔耳腹侧建立圆形创面, 创面上皮化后, 形成突出周围皮肤表面、质硬的瘢痕组织块。

摘要

背景: 沙棘总黄酮可抑制肾脏、肝脏、心肌纤维化, 但其对增生性瘢痕纤维化的相关疗效鲜有报道。

目的: 对兔耳增生性瘢痕组织块局部注射中草药沙棘总黄酮, 观察其对增生性瘢痕组织块消退的影响并探讨其作用机制。

方法: 选择8只新西兰大白兔, 每只耳沿腹侧中线两侧各建立3个直径8 mm圆形创面, 共96个创面。21 d创面上皮化后, 随机分为5组: 0.5, 1.0, 2.0 g/L沙棘总黄酮组, 2只/组; 二甲基亚砜(药物溶剂对照)和空白对照组, 1只/组。于组织块底部注射相应药物, 每间隔3 d注射1次, 连续干预4周。通过苏木精-伊红染色和Masson染色对比各组增生性瘢痕组织块病理组织变化; 实时荧光定量PCR检测各组组织块中I、III型胶原的mRNA表达; Western blot检测各组兔耳瘢痕组织块I、III型胶原、转化生长因子 $\beta 1$ 、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子的蛋白表达。

结果与结论: ①大体观察: 不同质量浓度的沙棘总黄酮局部注射后瘢痕组织块明显软化、变平; ②空白对照组大量炎性细胞浸润、血管生成、胶原纤维不规则排列; 与空白对照组相比, 各沙棘总黄酮组可见整齐的束状胶原纤维分布, 新生血管较少, 特别是2 g/L沙棘总黄酮组改善较为明显; 不同质量浓度沙棘总黄酮组间瘢痕增生指数和胶原密度均低于空白对照组和二甲基亚砜组($P < 0.05$); ③各沙棘总黄酮组和二甲基亚砜组瘢痕组织块的I、III型胶原mRNA表达水平均显著低于空白对照组, 其中2 g/L沙棘总黄酮组的抑制作用最明显($P < 0.05$); ④与空白对照组相比, 二甲基亚砜一定程度上可以降低组织块中III型胶原、转化生长因子 $\beta 1$ 、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子蛋白表达水平; 但不同质量浓度沙棘总黄酮组均可明显抑制兔耳增生性瘢痕组织块I、III型胶原、转化生长因子 $\beta 1$ 、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子蛋白的表达水平, 且呈剂量依赖性($P < 0.05$); ⑤提示沙棘总黄酮可抑制瘢痕增生, 使瘢痕组织块软化、变平, 颜色变淡, 降低兔耳增生性瘢痕组织块转化生长因子 $\beta 1$ 、I、III型胶原纤维的表达, 抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 减少瘢痕组织内血管生成, 从而达到治疗增生性瘢痕的作用。

关键词: 沙棘总黄酮; 增生性瘢痕; 胶原纤维; 转化生长因子 $\beta 1$; 血管内皮生长因子

缩略语: 转化生长因子 $\beta 1$: transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$

Total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. interfere with the regression of hypertrophic scar tissue blocks in a rabbit ear model

Niu Zihan, Yu Yang, Ai Jiang, Bu Panpan, Li Wenbo, Suriye-Reheman, Ma Shaolin

Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Niu Zihan, Master candidate, Physician, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Ma Shaolin, Doctoral supervisor, Professor, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

新疆医科大学第一附属医院整形外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

第一作者: 牛梓晗, 女, 1996年生, 甘肃省通渭县人, 新疆医科大学在读硕士, 医师, 主要从事增生性瘢痕的防治研究。

通讯作者: 马少林, 博士生导师, 教授, 新疆医科大学第一附属医院整形外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

https://orcid.org/0000-0002-0675-2663 (牛梓晗)

基金资助: 国家自然科学基金(81750345), 项目负责人: 马少林

引用本文: 牛梓晗, 余扬, 艾江, 卜盼盼, 李文博, 苏日耶·热合曼, 马少林. 沙棘总黄酮干预兔耳增生性瘢痕组织块的消退 [J].

中国组织工程研究, 2023, 27(2):258-263.



Abstract

BACKGROUND: Total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. can inhibit fibrosis in the kidney, liver and myocardium. However, related studies on hypertrophic scar fibrosis are rarely reported.

OBJECTIVE: To observe the effect of total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. on the regression of hypertrophic scar in a rabbit ear model and to explore its mechanism.

METHODS: Eight New Zealand white rabbits were selected for the study. Three round wounds with a diameter of 8 mm were made on both sides of each ear along the ventral midline, a total of 96 wounds. After 21 days of wound epithelization, all rabbits were randomly divided into five groups: 0.5, 1.0, 2.0 g/L total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. groups, two rabbits in each group, and dimethyl sulfoxide group (drug solvent control) and blank control group, one rabbit in each group. Corresponding drugs were injected into the base of tissue once every 3 days for 4 continuous weeks. The pathological changes of hypertrophic scar tissue blocks were observed and compared by hematoxylin-eosin staining and Masson staining. The expressions of type I and III collagen mRNAs in rabbit ear scar tissue were detected by real-time PCR. Western blot was used to detect the expression of type I and III collagen, transforming growth factor β 1, α -smooth muscle actin, and vascular endothelial growth factor proteins in rabbit ear scar tissue blocks.

RESULTS AND CONCLUSION: General observation: The scar tissue was softened and flattened significantly after the injection of different concentrations of total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. In the blank control group, there were a large number of infiltrated inflammatory cells, angiogenesis and irregular arrangement of collagen fibers. Compared with the blank control group, the neat distribution and loose arrangement of fascicular collagen fibers could be observed in different concentration treatment groups, especially in the 2 g/L group. Scar elevation index and collagen fiber area density in different concentration treatment groups were significantly lower than those in the blank control group and dimethyl sulfoxide group ($P < 0.05$). The expression levels of type I and III collagen mRNAs in scar tissue were significantly lower in different concentration treatment groups than the blank control group ($P < 0.05$). The collagen transcription was most significantly downregulated in the 2 g/L treatment group. Compared with the blank control group, dimethyl sulfoxide could partly inhibit the expression of type III collagen, transforming growth factor β 1, α -smooth muscle actin, and vascular endothelial growth factor. However, different concentrations of total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. could sufficiently inhibit the expression of type I and III collagen, transforming growth factor β 1, α -smooth muscle actin, and vascular endothelial growth factor in rabbit ear scar tissue in a concentration-dependent manner. To conclude, total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. can inhibit scar hyperplasia, soften and flatten the scar tissue and lighten the color of scar tissue, which treat hypertrophic scar by reducing the expressions of transforming growth factor β 1, type I and III collagen in rabbit ear scar tissue blocks, inhibiting the transformation of fibroblasts into myofibroblasts and reducing angiogenesis in scar tissue.

Key words: total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L.; hypertrophic scar; collagen fiber; transforming growth factor β 1; vascular endothelial growth factor

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81750345 (to MSL)

How to cite this article: NIU ZH, YU Y, AI J, BU PP, LI WB, REHEMAN S, MA SL. Total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. interfere with the regression of hypertrophic scar tissue blocks in a rabbit ear model. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(2):258-263.

0 引言 Introduction

皮肤伤口修复过程中,成纤维细胞的过度增殖导致病理性瘢痕的形成,包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩。增生性瘢痕通常高于周围正常皮肤但不超过皮损范围,表面呈红色、质硬,伴有瘙痒和压痛,瘢痕挛缩牵拉可导致局部功能受限,给患者带来身心痛苦^[1-2]。目前普遍认为瘢痕纤维化的发生主要是由转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)激活成纤维细胞,诱导成纤维细胞异常增殖,合成大量I型和III型胶原蛋白,造成细胞外基质胶原沉积,从而导致增生性瘢痕的形成^[3]。主要治疗手段包括手术切除、光电治疗以及局部涂抹药物,但疗效均不理想。沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)是胡颓子科植物,富含黄酮类、维生素类、类胡萝卜素类、甾醇类、糖类以及微量元素等多种化学成分,沙棘总黄酮是沙棘果实、叶和籽中提取,主要成分是异鼠李素、槲皮素、山奈酚、杨梅素及其苷类化合物,具有抗氧化、抗炎、调节免疫、促进伤口愈合的功能^[4]。研究证实沙棘总黄酮对肝、肾、心肌纤维化具有一定的治疗效果,但其对皮肤纤维化的相关疗效鲜见报道^[5-7]。1997年MORRIS等发现兔耳腹侧伤口形成的增生性瘢痕组织块与人增生性瘢痕病理结果类似,兔耳瘢痕模型已成为研究增生性瘢痕的常用动物模型^[8]。此次实验拟建立兔耳增生性瘢痕模型,以分析沙棘总黄酮对增生性瘢痕组织块消退的影响及其具体作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,两组间比较采用t检验,多组比较采用方差分析,组间两两比较采用Tukey多重比较检验后进行单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2020年10月至2021年2月在新疆

医科大学动物实验中心和临床医学研究院开展。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康新西兰大白兔8只,雌雄不拘,兔龄两三个月,体质量(2 650±250)g,购于新疆医科大学动物实验中心,生产许可证号:SCXK(新)2018-0002。单笼饲养,饲养条件:室内恒温条件18-20℃,相对湿度60%-70%,自由食用标准食物和饮用水,适应性饲养1周。

实验方案经新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准,批准号:20170214-71。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。

1.3.2 实验试剂 沙棘总黄酮(北京索莱宝科技有限公司,货号:SS5020);舒泰50(注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西洋,法国维克有限公司,批号:BN 7LR9A);盐酸赛拉嗪注射液(吉林省华牧动物保健品有限公司,批号:兽药字070011777);二甲基亚砷(BioFroxx, 1084ML100);Mayer苏木精染液(G1080)、改良Masson染色试剂盒(G1346)均购于北京索莱宝科技有限公司;转化生长因子 β 1抗体(GeneTax, GTX21279);I型胶原蛋白抗体(GeneTax, GTX26308);III型胶原蛋白抗体(Bioss, bs-0549R); α -平滑肌肌动蛋白抗体(Bioss, bs-0189R);GAPDH(Proteintech, 60004-Ig);血管内皮生长因子抗体(Abcam, ab1316);山羊血清、二抗、PBS、枸橼酸盐均购于中杉金桥;TRIzol® Reagent(Invitrogen, Lot267309);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermoscientific, Lot00705434);TB Green®Premix Ex Taq™(TaKaRa, RR820L)。

1.4 方法

1.4.1 建立兔耳增生性瘢痕模型 根据每只实验动物的体质

量于左下肢肌肉注射舒泰 50(25 g/L) 和盐酸赛拉嗪注射液 (1 g/L)。待麻醉完成后以仰卧位固定于兔固定台, 拔除双耳腹侧兔毛, 碘伏常规消毒铺巾, 使用直径 8 mm 的角膜环钻在每只兔耳腹侧中线两侧各创建 3 个圆形切口, 创面间距为 1 cm, 共 96 个创面, 见图 1A。将表皮、真皮及皮下组织钝性分离, 切除并剥除软骨膜至耳软骨表面, 见图 1B, 创面压迫止血, 无菌敷料包扎固定。动态观察创面愈合及瘢痕生长情况。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	沙棘总黄酮对兔耳增生性瘢痕组织块消退的影响及机制研究
选择动物的条件	新西兰大白兔, 雌雄不拘, 兔龄两三个月
模型与所研究疾病的关系	兔耳腹侧伤口愈合后形成的瘢痕组织块与人增生性瘢痕的病理变化相似, 成模率高且较为稳定
动物来源及品系	新西兰大白兔购于新疆医科大学动物实验中心
造模技术描述	使用直径 8 mm 的角膜环钻在兔耳腹侧中线两侧各创建 3 个创面, 间距 1 cm。钝性分离至耳软骨表面, 切除含软骨膜的上层组织, 止血、包扎
动物数量及分组方法	8 只形成瘢痕组织块的新西兰大白兔随机分为 5 组: 0.5, 1.0, 2.0 g/L 沙棘总黄酮组, 2 只/组; 二甲基亚砜组 (药物溶剂对照) 和空白对照组, 1 只/组
造模成功评价指标	创面形成圆形基底, 中心有乳头状突起, 色红、质韧的瘢痕组织块
造模后观察指标	瘢痕组织块消退情况; 病理组织改变; I、III型胶原 mRNA 和蛋白水平的变化; 转化生长因子 β 1、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子蛋白水平的变化
造模后动物处理	分别于瘢痕基底及瘢痕灶内注射不同质量浓度的沙棘总黄酮或二甲基亚砜, 注射用量 0.1 mL/个, 每间隔 3 d 注射 1 次, 注射 4 周
伦理委员会批准	新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准, 批准号: 20170214-71

1.4.2 动物分组及处理 术后 21 d, 共 89 个瘢痕组织块创面上皮化良好, 成模率 93%。瘢痕组织块成模标准: 可见创面形成圆形基底, 中心有乳头状突起 (高于周围的正常皮肤 ≥ 1 mm), 色红、质地坚韧的瘢痕组织。将 8 只形成瘢痕组织块的新西兰大白兔按随机数字表法分为 5 组: 低质量浓度 (0.5 g/L)、中质量浓度 (1 g/L)、高质量浓度 (2 g/L) 沙棘总黄酮组, 每组各 2 只; 二甲基亚砜组 (药物溶剂对照) 和空白对照组, 每组各 1 只。分别于瘢痕基底及瘢痕灶内注射沙棘总黄酮或二甲基亚砜, 注射用量 0.1 mL/个, 每间隔 3 d 注射 1 次, 连续干预 4 周。

1.4.3 组织标本采集及处理 在同样麻醉条件下, 用直径 12 mm 角膜环钻取下兔耳全层组织标本, 切取瘢痕组织及周围正常皮肤, 沿瘢痕凸起最高点纵行分割, 一半置于 40 g/L 多聚甲醛固定, 以进行组织病理学分析; 另一半置于 -80 °C 冰箱冷冻保存用于分子水平检测。

1.4.4 病理组织学分析 用 40 g/L 多聚甲醛固定收集标本 48 h, 自来水下冲洗过夜。按照常规组织制备程序, 将组织样本包

埋在石蜡块中, 取 4.0–5.0 μ m 的石蜡连续切片进行苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察 5 组病理组织变化情况, 每个标本随机选择 3 个镜下视野。低倍镜下测量分析 5 组标本的瘢痕增生指数, 根据公式瘢痕增生指数 = 瘢痕凸起组织顶部的表皮与软骨之间的最高垂直距离 / 周围正常皮肤的表皮与软骨之间的垂直距离, 计算每组标本瘢痕增生情况。为了进一步评估胶原纤维组织, 取 5 组标本进行 Masson 染色, 于 200 倍放大倍数下拍照, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量分析胶原纤维表面密度。

1.4.5 实时荧光定量 PCR 检测各组兔耳增生性瘢痕组织块中 I 型、III型胶原蛋白的 mRNA 表达 称取 20–25 mg 各组瘢痕组织标本, 加入 1 mL TRIZOL 充分匀浆研磨, 从组织中提取总 RNA。使用试剂盒说明书进行 cDNA 第一链合成和实时定量 PCR 反应。PCR 反应条件第一步: 预变性 95 °C 15 s。第二步: PCR 反应 95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 循环 40 次。PCR 扩增引物由上海生工公司合成, 引物序列见表 1。相对表达式采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。以空白对照组样本为基线, 计算其他各组样本中 I、III型胶原蛋白 mRNA 的相对表达量。

表 1 | 内参基因及目的基因的引物序列
Table 1 | The primer sequences used for real-time PCR assay

基因	前引物 (5'-3')	后引物 (5'-3')
I 型胶原蛋白	CCA GTG TCC ATG TCG CAG A	TGA GCC AGC AGA TTG AGA AC
III型胶原蛋白	TAG CAC CAT TGA GAC ATT	GAA GCC CCA GCA GAA AA
β -actin	CGG GAC ATC AAG GAG AAG C	AGG AAG GAG GGC TGG AAG A

1.4.6 Western blot 检测各组兔耳增生性瘢痕组织块 I、III型胶原蛋白、TGF- β 1、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子的蛋白表达 各组待测组织块剪碎并加入放射免疫沉淀法裂解缓冲液和磷酸酶抑制剂苯甲基磺酰氟, 使用超声匀浆机充分裂解总蛋白, 以 BCA 法测定提取蛋白水平。经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至聚偏氟乙烯膜上, 5% 牛血清白蛋白室温封闭抗原-抗体复合物 2 h, 分别加入稀释 I、III型胶原蛋白、TGF- β 1、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子抗体, 4 °C 摇床过夜。加入 1 : 5 000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 / 兔二抗, 室温摇床孵育 2 h, 采用 ECL 化学发光法显影, 并用 Image Lab 软件进行分析。

1.5 主要观察指标 ①大体观察对比各组增生性瘢痕组织块消退情况; ②病理组织学变化、瘢痕增生指数及胶原纤维密度; ③沙棘总黄酮对 I、III型胶原 mRNA 表达的影响; ④沙棘总黄酮对 I、III型胶原蛋白、TGF- β 1、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子蛋白表达的影响。

1.6 统计学分析 文章统计学方法经新疆医科大学生物统计学专家审核。使用软件 SPSS 22.0 进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验, 多组比较采用方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 多重比较检验后进行单因素方差分析, 以确定不同剂量药物治疗组和对照组之间的差异。P < 0.05 认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 将8只新西兰大白兔随机分为5组, 0.5, 1.0, 2.0 g/L沙棘总黄酮组每组各2只, 二甲基亚砷组1只, 空白对照组1只。每只兔耳制备6个增生性瘢痕, 最终形成的89个兔耳瘢痕组织块纳入研究, 成模率93%。

2.2 模型大体观察 术后各组兔耳创面愈合良好, 未见感染、坏死。术后1周, 创面边缘明显隆起, 表面血痂形成, 见图1C; 术后2周, 创面逐渐上皮化, 色鲜红, 瘢痕略高于周围正常皮肤, 但未完全上皮化, 见图1D; 术后3周, 各组创面表皮完全上皮化, 共89个瘢痕组织块增生最为明显, 中心见红色乳头状突起、质韧, 见图1E, 成模率93%; 术后7周, 空白对照组增生性瘢痕块形成, 色白、质硬, 但未超过创面边缘, 见图1F。

2.3 沙棘总黄酮对兔耳增生性瘢痕组织块的作用以及病理组织染色结果 不同质量浓度的沙棘总黄酮局部注射后各治疗组瘢痕组织块明显软化、变平。与空白对照组相比, 0.5, 1.0, 2.0 g/L沙棘总黄酮组创面愈合后的瘢痕增生程度均有所改善, 其中2 g/L沙棘总黄酮组瘢痕软化、表面萎缩, 颜色变淡, 治疗效果最为明显, 见图2A。

苏木精-伊红染色显示, 空白对照组大量炎性细胞浸润, 瘢痕增生最高处可见真皮层隆起、血管生成和成纤维细胞不规则排列; 然而在不同质量浓度沙棘总黄酮组中, 这一情况有所改善, 见图2B。

各组组织块细胞外基质胶原纤维的沉积情况见图2C, 空白对照组可见胶原纤维大量沉积、排列无序; 二甲基亚砷组胶原纤维较空白对照组有所改善, 但与各个治疗组比较表达增多; 不同质量浓度沙棘总黄酮组可见排列整齐的束状胶原纤维分布, 纤维排列更松散, 胶原纤维密度较小, 特别是2 g/L沙棘总黄酮组改善较为明显。

2.4 各组兔耳增生性瘢痕组织块瘢痕增生指数和胶原纤维表面密度比较 不同质量浓度沙棘总黄酮组间瘢痕增生指数和胶原纤维表面密度均低于空白对照组 ($P < 0.05$), 2 g/L沙棘总黄酮组瘢痕增生指数下降最为明显, 胶原纤维表面密度最低; 不同质量浓度沙棘总黄酮组两两比较瘢痕增生指数、胶原纤维表面密度差异均有显著性意义 ($P < 0.05$); 空白对照组与二甲基亚砷组瘢痕增生指数相比无明显差异 ($P > 0.05$), 见图3。

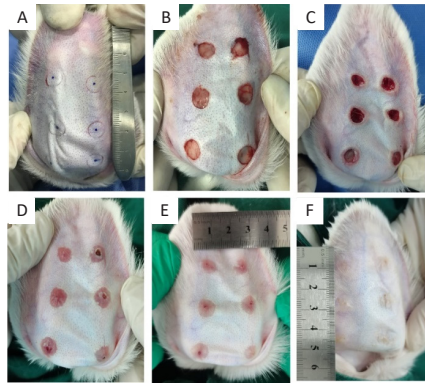
2.5 沙棘总黄酮干预后兔耳增生性瘢痕组织块 I、III型胶原蛋白 mRNA 表达情况 与空白对照组相比, 不同质量浓度沙棘总黄酮组均可抑制兔耳增生性瘢痕组织块 I、III型胶原蛋白 mRNA 的表达, 2 g/L沙棘总黄酮组的抑制效果更为明显, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 0.5 g/L沙棘总黄酮组和1 g/L沙棘总黄酮组抑制 I 型胶原蛋白 mRNA 表达的能力较二甲基亚砷组显著 ($P < 0.05$), 但二甲基亚砷组与2 g/L沙棘总黄酮组对 I 型胶原蛋白 mRNA 的影响差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 不同质量浓度沙棘总黄酮组两两比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图4。

2.6 沙棘总黄酮干预后兔耳增生性瘢痕组织块 I 型胶原蛋白、III型胶原蛋白、TGF- β 1、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子蛋白表达情况 与空白对照组相比, 二甲基亚砷对 I 型胶原蛋白的蛋白表达无显著影响 ($P > 0.05$), 二甲基亚砷虽可影响瘢痕组织块中III型胶原蛋白、TGF- β 1、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子的蛋白表达, 但下调效果较各个沙棘总黄酮组差。不同质量浓度沙棘总黄酮组均可明显抑制兔耳增生性瘢痕组织块 I、III型胶原蛋白、TGF- β 1、 α -平滑肌肌动蛋白、血管内皮生长因子蛋白的表达, 且呈剂量依赖性, 2 g/L沙棘总黄酮组对上述蛋白表达抑制效果更为明显, 差异有显著性意义 ($P < 0.000 1$), 见图5。

3 讨论 Discussion

常用防治瘢痕增生的外用药物包括硅酮制剂、积雪苷和洋葱提取物等, 但其价格较贵且需要长期坚持涂抹, 患者的依从性差, 据报道, 外用药物会导致皮炎、皮肤瘙痒等并发症^[9]。中草药中多种成分可通过多通路、多靶点治疗增生性瘢痕^[10], 这为增生性瘢痕的治疗和预防提供了新的思路。黄酮类化合物已证实可通过 TGF- β 1/Smad、Wnt/ β -catenin、JAK-STAT 信号通路抑制肝脏、肾脏、心肌纤维化疾病进展, 但其在皮肤纤维化方面的相关研究鲜见报道^[11-13]。前期体外实验发现异鼠李素通过转化生长因子 β 1/Smad3 信号通路抑制人皮肤成纤维细胞的增殖, 减少 I、III型胶原蛋白及 DNA 的合成^[14], 但该体外研究不能充分反映药物对机体的整体作用, 机体的内环境受多因素相互影响。故此次研究建立兔耳增生性瘢痕体内模型实验, 将不同质量沙棘总黄酮粉末溶于二甲基亚砷, 使其分别制成质量浓度为0.5, 1.0, 2.0 g/L的沙棘总黄酮溶液局部注射于瘢痕基底部。SARI等^[15]通过一项随机对照研究发现二甲基亚砷可抑制兔耳瘢痕增生, 为排除二甲基亚砷溶剂的影响, 故建立二甲基亚砷组和空白对照组作为对比, 探讨沙棘总黄酮干预兔耳增生性瘢痕组织的效果和可能的分子生物学机制。

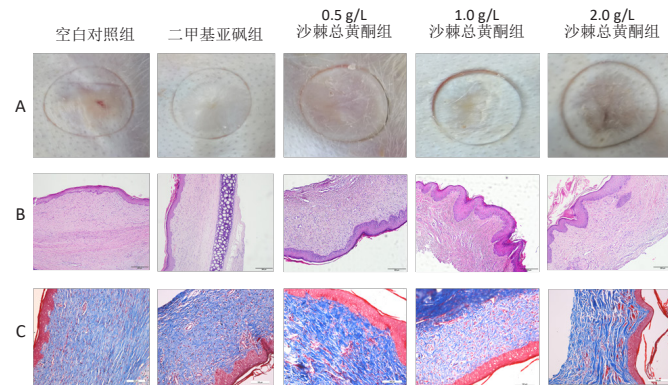
受伤后巨噬细胞、淋巴细胞迁移至伤口部位发生炎症反应, 同时分泌细胞因子和生长因子, 刺激成纤维细胞大量增殖以及形成细胞外基质。细胞外基质成分为成纤维细胞、胶原蛋白和弹性蛋白、蛋白聚糖、透明质酸等, 早期主要以III型胶原蛋白为主, 后随着瘢痕成熟, III型胶原蛋白被 I 型胶原蛋白取代^[16]。I / III型胶原比值的改变在增生性瘢痕的形成、成熟、重塑方面起重要作用。此次研究将空白对照组和二甲基亚砷组作为对比, 发现沙棘总黄酮能明显减少兔耳瘢痕组织炎性细胞和成纤维细胞数量, 降低瘢痕高度; 镜下可见真皮下主要为松散、束状分布的 I 型胶原纤维, 胶原纤维表面密度明显降低; 沙棘总黄酮组瘢痕组织块中 I、III型胶原纤维的 mRNA 表达及蛋白质水平均显著低于空白对照组, 尤其III型胶原明显减少; 这表明沙棘总黄酮可能通过促进增生性瘢痕组织中 I、III型胶原蛋白代谢, 使瘢痕软化、变平。TGF- β 1 是参与创面愈合最重要的细胞因子之一, TGF- β 1 通过



图注：图 A 为创面设计：直径为 8 mm，间距为 1 cm；B 示钝性分离并切除表皮、皮下组织、软骨膜，直至软骨表面；C 为术后 1 周；D 为术后 2 周；E 为术后 3 周，上皮化完成；F 为空白对照组术后 7 周

图 1 | 兔耳增生性瘢痕模型

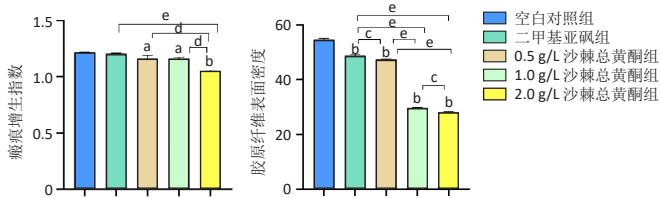
Figure 1 | Hypertrophic scar model in the rabbit ear



图注：图 A 为术后 7 周（即药物治疗 4 周）各组兔耳增生性瘢痕组织块愈合情况，使用 12 mm 角膜环钻标记待取材区域；图 B 为术后 7 周各组兔耳增生性瘢痕组织块病理学改变（苏木精-伊红染色，×100）；图 C 为术后 7 周各组兔耳增生性瘢痕组织块胶原纤维沉积情况（Masson 染色，×200）

图 2 | 各组兔耳增生性瘢痕组织块大体愈合情况以及组织学变化

Figure 2 | General healing and histological changes of hypertrophic scar in rabbit ears

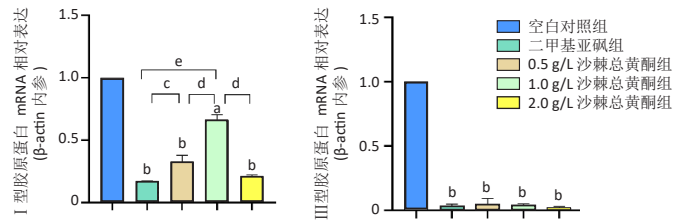


图注：与空白对照组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.0001$ ；两组之间比较，^c $P < 0.01$ ，^d $P < 0.001$ ，^e $P < 0.0001$

图 3 | 各组兔耳增生性瘢痕组织块瘢痕增生指数和胶原纤维表面密度情况

Figure 3 | Scar elevation index and collagen fiber area density of hypertrophic scar tissue of rabbit ears

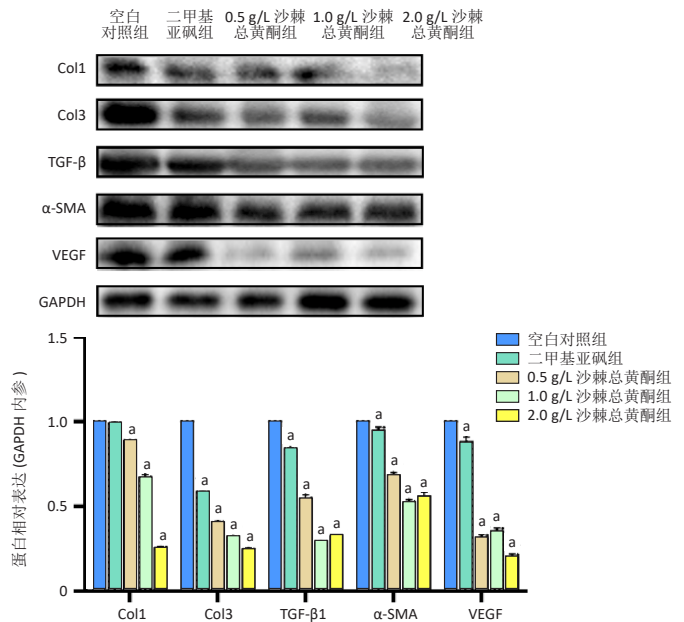
激活 TGF- β 1/Smad 通路促进成纤维细胞的增殖，胶原蛋白合成增加，抑制基质金属蛋白酶和金属蛋白酶组织抑制剂的表达，使胶原合成速度远大于降解速度，造成瘢痕纤维化^[17]。此次实验数据显示，沙棘总黄酮局部注射可显著下调增生性瘢痕组织 TGF- β 1 蛋白的表达，且呈剂量依赖性降低，1 g/L



图注：与空白对照组比较，^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.0001$ ；两组之间比较，^c $P < 0.01$ ，^d $P < 0.001$ ，^e $P < 0.0001$

图 4 | 实时荧光定量 PCR 分析沙棘总黄酮对兔耳增生性瘢痕组织块 I、III 型胶原蛋白 mRNA 表达的影响

Figure 4 | Real-time quantitative PCR detection of the expression of type I and III collagen mRNAs in hypertrophic scar tissue of rabbit ears



图注：与空白对照组比较，^a $P < 0.0001$ 。Col1：I 型胶原蛋白；Col3：III 型胶原蛋白；TGF- β 1：转化生长因子 β 1； α -SMA： α -平滑肌肌动蛋白；VEGF：血管内皮生长因子

图 5 | Western blot 分析沙棘总黄酮对兔耳增生性瘢痕组织块 Col1、Col3、TGF- β 1、 α -SMA、VEGF 蛋白表达的影响

Figure 5 | Western blot detection of the expression of type I and III collagen, transforming growth factor β 1, α -smooth muscle actin, and vascular endothelial growth factor proteins in hypertrophic scar tissue of rabbit ears

沙棘总黄酮组抑制 TGF- β 1 蛋白合成效果最明显。同样，有研究发现沙棘总黄酮可抑制肾脏纤维化大鼠肾脏组织 TGF- β 1 蛋白的表达水平^[6]。将洋葱提取物中的黄酮类化合物（槲皮素）作用于人皮肤成纤维细胞和无毛小鼠创面发现基质金属蛋白酶的表达上调，这意味着黄酮类化合物可通过降解细胞外基质抗皮肤纤维化^[18]。YANG 等^[19]通过体内、外实验发现异鼠李素能够通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路治疗肝纤维化。这些观察结果支持了作者的研究结果，初步表明沙棘总黄酮能够通过降低 TGF- β 1 抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路的激活，但需进一步研究 TGF- β /Smad 信号通路中对 Smad2、3、7 等关键下游分子的影响。

皮肤损伤后，成纤维细胞分化为肌成纤维细胞，其特征是表达 α -平滑肌肌动蛋白，合成、分泌胶原蛋白，从而

促进伤口愈合,然而伤口愈合后肌成纤维细胞的持续存在可能导致增生性瘢痕的形成^[20]。在此次研究中,不同质量浓度沙棘总黄酮治疗组的 α -平滑肌肌动蛋白表达水平均较空白对照组降低,说明沙棘总黄酮可通过抑制 α -平滑肌肌动蛋白的表达,以抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,其机制可能是通过抑制TGF- β 1/Smad信号通路阻断转化过程。WILGUS^[21]通过B超对比血流情况,发现增生性瘢痕的毛细血管数量比正常皮肤增加。SHI等^[22]检测发现兔耳瘢痕组织空白组血管内皮生长因子高表达,提示新生血管过度生成会导致瘢痕增生。各沙棘总黄酮治疗组干预后兔耳增生性瘢痕组织块与对照组比较,组织块颜色变白、变淡,微血管数量减少,血管内皮生长因子蛋白含量呈剂量依赖性降低,发现沙棘总黄酮能有效调控瘢痕组织块的血管微环境,减少血管内皮生长因子的分泌。

综上所述,沙棘总黄酮可通过调控胶原代谢、抑制成纤维细胞增生、调节局部血管生成等多因素治疗增生性瘢痕,但需进一步体内、外实验探讨其具体的分子机制和作用靶点,为中草药沙棘总黄酮的临床转化提供理论基础。

致谢:感谢新疆医科大学动物实验中心和临床医学研究院分别提供了动物饲养以及基础病理、分子生物学研究平台。

作者贡献:余扬负责实验设计,牛梓晗负责实验实施及数据处理、文章撰写,卜盼盼、李文博、苏日耶·热合曼负责动物模型的建立,艾江负责指标测定,马少林提供实验指导和文章校审。

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。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

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。

出版规范:该文章撰写遵守了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。

4 参考文献 References

- [1] LEE HJ, JANG YJ. Recent Understandings of Biology, Prophylaxis and Treatment Strategies for Hypertrophic Scars and Keloids. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):711.
- [2] WANG ZC, ZHAO WY, CAO Y, et al. The Roles of Inflammation in Keloid and Hypertrophic Scars. *Front Immunol.* 2020;11:603187.
- [3] ZHANG T, WANG XF, WANG ZC, et al. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF- β /Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation. *Biomed Pharmacother.* 2020; 129:110287.

- [4] 张东, 鄂国栋. 沙棘黄酮的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国药房*, 2019,30(9):1292-1296.
- [5] 周浩楠, 胡娜, 董琦, 等. 沙棘化学成分及药理作用的研究进展 [J]. *华西药学杂志*, 2020,35(2):211-217.
- [6] 李艺文, 唐志书, 张珍, 等. 沙棘总黄酮抗单侧输尿管梗阻大鼠肾脏纤维化作用及机制 [J]. *中南药学*, 2021,19(5):845-850.
- [7] 白跳, 迟丽屹, 高宇勤, 等. 异鼠李素对糖尿病大鼠心肌纤维化的干预作用 [J]. *新疆医科大学学报*, 2018,41(7):865-869.
- [8] 王晖, 李小静. 兔耳瘢痕模型的研究与应用进展 [J]. *中华整形外科杂志*, 2015,31(2):158-160.
- [9] 中国整形美容协会瘢痕医学分会. 瘢痕早期治疗全国专家共识 (2020版) [J]. *中华烧伤杂志*, 2021,37(2):113-125.
- [10] 韦凌霞, 丁茂鹏, 王志旺, 等. 基于数据挖掘及网络药理学方法探讨含当归中药复方抗肝纤维化的用药规律及作用机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020,31(11):1323-1331.
- [11] 盖李乐, 袁丁, 张长城, 等. 淫羊藿总黄酮通过TGF- β 1/Smad3信号通路改善自然衰老大鼠肾脏组织纤维化 [J]. *天然产物研究与开发*, 2021,33(3):373-379.
- [12] 曹后康, 高雅, 黄思茂, 等. 杠板归总黄酮抗大鼠肝纤维化作用的机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2017,33(9):1303-1308.
- [13] 焦美, 钟涵宇, 陈克研, 等. 槲皮素通过TGF- β 1/Smad3信号通路改善慢性心衰大鼠心肌纤维化 [J]. *解剖科学进展*, 2020,26(4):391-395.
- [14] 高海娜, 林莺, 张静, 等. 异鼠李素对长波紫外线照射人皮肤成纤维细胞ER/TGF- β 1/Smad3信号通路的影响 [J]. *国际中医中药杂志*, 2020,42(10):973-977.
- [15] SARI E, BAKAR B, DINCEL GC, et al. Effects of DMSO on a rabbit ear hypertrophic scar model: A controlled randomized experimental study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2017;70: 509-517.
- [16] YUAN FL, SUN ZL, FENG Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition in the formation of hypertrophic scars and keloids. *J Cell Physiol.* 2019; 234(12):21662-21669.
- [17] BERMAN B, MADERAL A, RAPHAEL B. Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment. *Dermatol Surg.* 2017; 43 Suppl 1:S3-S18.
- [18] CHO JW, CHO SY, LEE SR, et al. Onion extract and quercetin induce matrix metalloproteinase-1 in vitro and in vivo. *Int J Mol Med.* 2010; 25(3):347-352.
- [19] YANG JH, KIM SC, KIM KM, et al. Isorhamnetin attenuates liver fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad signaling and relieving oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 2016;783: 92-102.
- [20] LIMANDJAJA GC, BELIEN JM, SCHEPER RJ, et al. Hypertrophic and keloid scars fail to progress from the CD34-/ α -smooth muscle actin (α -SMA)+ immature scar phenotype and show gradient differences in α -SMA and p16 expression. *Br J Dermatol.* 2020;182(4):974-986.
- [21] WILGUS TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Cutaneous Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2019;8(12):671-678.
- [22] SHI J, WU Y, GUO S, et al. The efficacy of anti-VEGF antibody-modified liposomes loaded with paeonol in the prevention and treatment of hypertrophic scars. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019;45(3):439-455.

(责任编辑: GD, ZN, ZJP)