

· 基础研究 ·

红花注射治疗对兔耳增生性瘢痕中 TGF $\beta_1$  的表达变化\*刘燕,傅跃先<sup>△</sup>,邱林,田晓菲,甘立强,肖军

(重庆医科大学附属儿童医院烧伤整形科 400014)

**摘要:**目的 观察红花对兔耳增生性瘢痕(HS)及其转化生长因子 $\beta_1$ (TGF $\beta_1$ )表达的影响。方法 取27只新西兰大白兔兔耳腹侧建立HS模型,每耳2块。术后第45天开始对HS行注射治疗,每周1次,连续注射4次。设立正常皮肤组、阳性对照组、生理盐水组、低浓度红花(125 g/L)组、高浓度红花(500 g/L)组。注射完成后第2、4、6周分别测量HS厚度及硬度并切取8只兔耳HS及皮肤,采用免疫组织化学方法检测每块组织TGF $\beta_1$ 蛋白的表达(TGF $\beta_1$ 蛋白面密度),RT-PCR方法检测每块组织TGF $\beta_1$  mRNA的表达。结果 注射后4、6周,高浓度红花组HS厚度及硬度均较其他HS组低( $P < 0.05$ );注射后2、4、6周,高浓度红花组TGF $\beta_1$ 蛋白面密度值及TGF $\beta_1$  mRNA的表达均较其他HS组低( $P < 0.05$ );低浓度红花组TGF $\beta_1$  mRNA的表达在注射后4、6周均较阳性对照及生理盐水组低( $P < 0.05$ )。结论 红花能促进兔耳HS的软化、变薄,并能抑制兔耳HS的TGF $\beta_1$ 的表达,尤以高浓度红花组明显。红花抑制兔耳HS的机制可能与TGF $\beta_1$ 的表达被抑制相关。

**关键词:** 瘢痕;红花;转化生长因子 $\beta_1$ 

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)13-1294-03

TGF $\beta_1$  expression changes in hypertrophic scar of rabbit's ears by carthamus tinctorius injection\*

Liu Yan, Fu Yuexian, Qiu Lin, Tian Xiaofei, Gan Liqiang, Xiao Jun.

(Department of Burns and Plastic Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of carthamus tinctorius on hypertrophic scar(HS) of rabbit's ears and its transforming growth factor- $\beta_1$ (TGF $\beta_1$ ) expression. **Methods** 27 New Zealand rabbits were chosen as experiment animals. The models of HS were established with 2 HS in each ear. On 45 d after operation, HS of a rabbit was injected with nothing, sodium chloride, carthamus tinctorius(125 g/L) and carthamus tinctorius(500 g/L) respectively. The treatment was done once a week for 4 weeks. On 2, 4, 6 weeks after injection, HS and skin of 8 rabbits that were chosen randomly were measured their thicknesses and hardnesses, were harvested and detected by immunohistochemical method and reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** On 4, 6 weeks after injection, the thicknesses and the hardnesses of group carthamus tinctorius(500 g/L) were lowest in all HS groups( $P < 0.05$ ). The area density of TGF $\beta_1$  protein and expression of TGF $\beta_1$  mRNA in group carthamus tinctorius(500 g/L) were both the lowest in all HS groups on 2, 4, 6 weeks after injection( $P < 0.05$ ). The expression of TGF $\beta_1$  mRNA in group carthamus tinctorius(125 g/L) was lower than positive control and sodium chloride groups on 4, 6 weeks after injection( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Carthamus tinctorius could enhance HS in rabbit's ears softening, and could inhibit the expression of TGF $\beta_1$ . The effect of carthamus tinctorius(500 g/L) is more than carthamus tinctorius(125 g/L). The mechanism inhibiting HS of rabbit's ear is correlative possibly to the expressions inhibition of TGF $\beta_1$  by carthamus tinctorius.

**Key words:** cicatrix; carthamus tinctorius; transforming growth factor beta1

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是创伤愈合的异常结局,可造成机体的外形改变和功能障碍,并伴有痒痛,影响生活质量,迄今为止,HS的治疗方法多种多样,但疗效有限。近年来中药抑制病理性瘢痕生长并促进其软化逐渐被人们发现,并用于研究。故本课题设计兔活体HS模型作为实验对象,通过红花注射治疗后了解其对HS及其TGF $\beta_1$ 的影响。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 27只新西兰大白兔,雌雄不限,体质量(1 885.875±82.191 9)g,由重庆医科大学实验动物中心提供。500 g/L红花注射液由山西太原华卫药业有限公司生产。鼠抗TGF $\beta_1$ 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz biotechnology 公司。鼠/兔 s-p 试剂盒、二氨基联苯胺显色试剂盒等购于福州

迈新生物技术开发公司。PCR引物由上海英骏生物技术公司合成。Taq 酶、DNaseI(RNase free)、M-Mulv Reverse Transcriptase 购自上海生物工程有限公司。RNA提取试剂 Tri-pure reagent 为 Roche 公司产品。

**1.2 方法**

**1.2.1 HS模型的建立** 于兔耳腹侧手术切除1 cm×1 cm大小皮肤及软骨膜,间距为3 cm,每耳2块,无菌纱布包扎<sup>[1]</sup>。

**1.2.2 分组及给药** 术后第45天开始对兔耳HS进行治疗,其中右耳外侧HS为阳性对照组,不予以任何处理;右耳内侧HS为生理盐水组,注射生理盐水;左耳内侧HS为低浓度红花组,注射125 g/L红花注射液;左耳外侧HS为高浓度红花组,注射500 g/L红花注射液。注射量均为0.15 mL,待HS发白

表 1 HS 厚度及硬度 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	厚度(mm)				硬度(N/mm <sup>2</sup> )			
	术后第 45 天 (n=24)	注射后 2 周 (n=8)	注射后 4 周 (n=8)	注射后 6 周 (n=8)	术后第 45 天 (n=24)	注射后 2 周 (n=8)	注射后 4 周 (n=8)	注射后 6 周 (n=8)
阳性对照组	0.307 0±0.043 5	0.266 1±0.019 6	0.222 0±0.006 4	0.173 3±0.011 1	0.685 8±0.021 9	0.657 4±0.014 0	0.642 8±0.005 7	0.605 9±0.006 4
生理盐水组	0.311 7±0.015 6	0.271 5±0.016 2	0.214 5±0.004 4	0.171 4±0.010 6	0.689 6±0.017 6	0.656 6±0.008 8	0.635 9±0.010 8	0.605 3±0.007 7
低浓度红花组	0.309 3±0.017 1	0.244 3±0.018 9	0.206 3±0.002 2	0.169 5±0.008 3	0.681 3±0.019 3	0.655 4±0.015 5	0.632 0±0.014 2	0.603 0±0.008 7
高浓度红花组	0.306 0±0.020 8	0.245 5±0.015 3	0.181 5±0.013 0 <sup>a</sup>	0.131 0±0.012 8 <sup>a</sup>	0.684 7±0.018 9	0.652 6±0.013 2	0.605 6±0.012 1 <sup>a</sup>	0.527 8±0.017 2 <sup>a</sup>
正常皮肤组	0.060 9±0.008 9 <sup>b</sup>	0.060 8±0.010 0 <sup>b</sup>	0.059 6±0.009 6 <sup>b</sup>	0.062 9±0.008 7 <sup>b</sup>	0.431 6±0.005 9 <sup>b</sup>	0.432 1±0.008 4 <sup>b</sup>	0.434 5±0.004 9 <sup>b</sup>	0.431 1±0.003 0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与阳性对照、生理盐水组、低浓度红花组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与各 HS 组比较。

时停止注射。每周 1 次,共注射 4 次。自身兔耳腹侧皮肤作对照。

**1.2.3 表观检查** 术后第 45 天,注射完成后第 2、4、6 周,分别用 SEQUIA512 彩色多普勒彩色超声诊断仪 13 HZ 高频探头检测瘢痕及皮肤厚度,硬度计测量瘢痕及皮肤硬度。

**1.2.4 标本采集** 注射完成后(以后表述为注射后)第 2、4、6 周分别切取 8 只兔耳 HS 标本,同时,于右耳腹侧各切取 1 块相同大小的皮肤标本。标本的各一半分别于多聚甲醛液和液氮保存。

**1.2.5 TGFβ<sub>1</sub> 蛋白表达的检测** 采用免疫组织化学法,多聚甲醛固定后的标本经包埋、切片、烘烤、脱蜡、水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶活性、封闭血清、加鼠抗 TGFβ<sub>1</sub> 多克隆抗体、加二抗、蛋白结合、显色、苏木素复染、脱水、透明、封片后,光学显微镜下观察 10 个视野,并采用 IPP 软件进行 TGFβ<sub>1</sub> 蛋白面密度(视野中被分析物体的总面积/视场面积)处理<sup>[2]</sup>。

**1.2.6 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 表达的测定** 采用 RT-PCR,即总 RNA 提取,并除去 RNA 中的 DNA 污染;cDNA 第一链合成,用反转录试剂盒,将总 RNA 逆转录成 cDNA 第一链,反应体积 20 μL,反应条件为 42 °C,孵育 60 min,99 °C 5 min 终止反应,4 °C 5 min 灭活反转录酶;TGFβ<sub>1</sub> 引物合成上游引物 F5'-CTT CTC CAC CAA CTA CTG CTT C-3'下游引物 R5'-CTC CAC CTT GGG CTT GCG GC-3'(288 bp);PCR 扩增,PCR 反应条件为:94 °C 预变性 13 min,然后按 94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s 进行 32 个循环,最后 72 °C 延伸 8 min;根据扩增片段,进行 1.1% 琼脂糖电泳,最后用 Band-scan 扫描系统,测定各产物密度值,用凝胶自动成像仪拍照。

**1.3 统计学方法** 运用 SAS8.2 软件分析,统计学采用完全随机设计下的多组之间的多重比较方法(SNK 方法)对 HS 厚度、硬度、TGFβ<sub>1</sub> 蛋白面密度及 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 平均光密度值进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 HS 表观改变** 术后第 45 天,兔耳 HS 发生率为 89.81% (术后第 4、5 天,2 个创面发生穿孔;术后第 45 天,9 个创面未形成 HS;未形成 HS 的创面及发生穿孔创面位于 3 只兔耳中),呈暗红色,高出体表皮肤,质硬,HE 染色见真皮层内大量成纤维细胞增殖,并且有与人类 HS 相似的结节或旋涡状结构。注射后 2、4、6 周,各组 HS 色泽均逐渐变浅,厚度逐渐变低,硬度逐渐变小,尤以高浓度红花组明显,高浓度红花组在注射后 4、6 周两值均较其他各 HS 组低( $P < 0.05$ ),见表 1。

**2.2 各组 TGFβ<sub>1</sub> 蛋白表达检测结果** 注射后第 2、4、6 周,各

HS 组 TGFβ<sub>1</sub> 蛋白面密度呈下降趋势,同一时间段高浓度红花组均为各 HS 组中最低值( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组 TGFβ<sub>1</sub> 蛋白面密度测定结果比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	注射后 2 周	注射后 4 周	注射后 6 周
阳性对照组	0.205 8±0.002 7	0.190 3±0.002 9	0.115 2±0.001 8
生理盐水组	0.210 4±0.003 6	0.191 4±0.002 3	0.106 1±0.002 4
低浓度红花组	0.202 3±0.001 0	0.180 7±0.001 4 <sup>a</sup>	0.106 2±0.002 3
高浓度红花组	0.182 6±0.002 3 <sup>b</sup>	0.134 7±0.001 5 <sup>b</sup>	0.075 7±0.002 1 <sup>b</sup>
正常皮肤组	0.031 0±0.002 0 <sup>c</sup>	0.038 4±0.006 1 <sup>c</sup>	0.034 8±0.004 3 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与阳性对照、生理盐水组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与其他各 HS 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与各 HS 组比较。

**2.3 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 表达测定结果** RT-PCR 法通过电泳条带的平均光密度值反映 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 的表达,二者成反比关系。阳性对照、生理盐水组 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 平均光密度值在注射后第 2、4、6 周无明显变化且接近;高、低浓度红花组 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 平均光密度值在注射后第 2、4、6 周均逐渐升高,且尤以高浓度红花组明显;三时间段高浓度红花组 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 平均光密度值均较其他各 HS 组高( $P < 0.05$ );低浓度红花组 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 平均光密度值在注射后第 4 及 6 周均较阳性对照及生理盐水组高( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 各组 TGFβ<sub>1</sub> mRNA 平均光密度测定结果比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	注射后 2 周	注射后 4 周	注射后 6 周
阳性对照组	0.760 5±0.018 1	0.751 0±0.007 8	0.744 5±0.008 9
生理盐水组	0.740 2±0.006 6	0.732 8±0.011 1	0.742 5±0.009 4
低浓度红花组	0.761 8±0.010 8	0.920 7±0.010 6 <sup>a</sup>	1.101 1±0.004 9 <sup>a</sup>
高浓度红花组	1.573 8±0.010 9 <sup>b</sup>	1.667 5±0.008 1 <sup>b</sup>	1.816 5±0.011 9 <sup>b</sup>
正常皮肤组	1.945 1±0.012 2 <sup>c</sup>	1.928 5±0.014 9 <sup>c</sup>	1.944 1±0.011 7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与阳性对照、生理盐水组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与其他各 HS 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与各 HS 组比较。

**3 讨论**

HS 形成是多种细胞及细胞因子相互作用、调控的结果<sup>[3]</sup>,转化生长因子(TGFα)在其中扮演着重要角色。TGFβ<sub>1</sub> 被认为是促纤维化发展的最重要的生长因子,它既可促进成纤维细胞增殖并分泌基质成分,又可抑制其降解。在创伤修复过程中,TGFβ<sub>1</sub> 是巨噬细胞、中性粒细胞的有力激活剂,经自分泌和旁分泌,TGFβ<sub>1</sub> 局部浓度增加,激活巨噬细胞,提高

TGF $\beta_1$  mRNA 的表达,进一步促进成纤维细胞增殖。甚至加入外源性的 TGF $\beta_1$  也可增加创伤中胶原纤维、蛋白和炎性细胞的数量,TGF $\beta_1$  被认为是促进瘢痕组织形成必需的因素<sup>[4]</sup>。

近年研究还发现瘢痕形成与细胞外基质代谢异常<sup>[5]</sup>、高自由基<sup>[6]</sup>、过度脂质过氧化反应、过度炎症反应及免疫有关<sup>[7-8]</sup>。

中医认为瘢痕系气血壅滞、经络痹阻、痰湿搏结或三者相辅而成所致,因此活血化瘀、软坚散结成为中医治疗瘢痕的关键。红花为活血化瘀类中药的重要代表药物,近年研究发现红花具有减少自由基、抑制脂质过氧化反应、炎症反应等作用<sup>[9-10]</sup>。已有研究证明红花能抑制肾小管间质纤维化、肝脏纤维增生<sup>[11]</sup>,丹参红花提取物能抑制心肌间质成纤维细胞胶原合成<sup>[12]</sup>、抑制体外培养的人 HS 成纤维细胞的增殖和胶原合成<sup>[13]</sup>。本文结果显示,高浓度红花能促进 HS 厚度及硬度降低,低浓度和高浓度的红花药液均能抑制 TGF $\beta_1$  的表达,且高浓度红花明显优于低浓度红花,两种浓度红花药液对兔耳 HS 模型的表现改变基本一致。故推测红花抑制兔耳增生性瘢痕的机制可能与 TGF $\beta_1$  的表达被抑制相关。

红花注射液为中药提取物,其成分复杂,药理表明红花黄色素是红花中的主要有效成分<sup>[14-15]</sup>。研究表明红花黄色素可抑制脂质过氧化、清除氧自由基、控制炎症过程病理变化的肉芽增生<sup>[16-17]</sup>,故推测红花黄色素可能为抑制 HS 的有效成分。在今后的研究中,有待进一步明确红花作用的具体有效成分及其作用机制。

#### 参考文献:

[1] 李希军,柳大烈,王吉慧.兔耳增生性瘢痕模型建立方法的探讨[J].中国美容医学,2006,15(5):499-500.  
 [2] 王少华,曹广信,王燕华,等.病理性瘢痕中结缔组织生长因子的免疫组化研究[J].中国美容医学,2007,16(8):1032-1035.  
 [3] 张娟娟,吕世军.病理性瘢痕发病机制研究进展[J].医学综述,2007,13(8):580-582.  
 [4] Campaner AB, Ferreira LM, Gagnani A, et al. Upregulation of TGF-beta1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring[J]. J Invest Dermatol,

2006,126(5):168-1176.

[5] 付小兵,程颢.进一步重视病理性瘢痕发生机制的研究[J].中国修复重建外科杂志,2005,19(1):1-5.  
 [6] 朱兆明.整形领域中氧自由基研究的进展[J].中华整形外科杂志,2004,20(4):301-304.  
 [7] Naitoh M, Hosokawa N, Kubota H, et al. Upregulation of HSP47 and collagen type 111 in the dermal fibrotic disease[J]. Keloid Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(5):131-136.  
 [8] Harry M, Nef AW, King MW, et al. Regeneration or scarring: an immunologic perspective[J]. Dev Dyn, 2003, 226(2):268-272.  
 [9] 杨丽华,张敏,马春.红花的现代研究进展[J].中国老年学杂志,2007,27(14):1429-1430.  
 [10] 万春平,包照日格图,却翎.红花的研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(11):2854-2855.  
 [11] 邹丽宜,吴铁,崔燎.红花茯苓提取液防治四氯化碳性大鼠肝纤维化的作用[J].中国临床康复,2006,10(11):80-83.  
 [12] 徐琳,邱健,李志梁,等.丹参红花提取物对鼠心脏成纤维细胞胶原合成的影响[J].世界中医药,2008,3(3):179-180.  
 [13] 韩剑宇,郝立君,庞建华.红花对增生性瘢痕成纤维细胞增殖和胶原合成的影响[J].哈尔滨医科大学学报,2005,39(4):337-339.  
 [14] 王若菁,杨滨.红花的化学成分及质量标准研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(5):65-69.  
 [15] 张颖,曹江,黄达民,等.红花黄色素对冠状动脉介入治疗患者血小板功能影响[J].山东医药,2009,49(28):94-95.  
 [16] 王晓菲,金鸣.红花抗炎作用机制研究进展[J].山西医药杂志,2007,36(1):51-53.  
 [17] 赵丽娟,杜遵义,李恋.关于红花的研究进展[J].中国民族医药杂志,2007,13(3):75-77.

(收稿日期:2010-05-04 修回日期:2010-09-17)

(上接第 1290 页)

[10] 张健荣,卢尔海.关节镜下治疗股骨下段累及关节面的骨折[J].中国临床解剖学杂志,2005,23:544-546.  
 [11] Ling HM, Wang CJ, Tu YW, et al. Arthroscopy in avulsion fracture of posterior cruciate ligament[J]. Chang Gung Med J, 2001,24:313-317.  
 [12] Yang CK, Wu CD, Chih CJ, et al. Surgical treatment of avulsion fracture of the posterior cruciate ligament and postoperative management[J]. J Trauma, 2003, 54: 516-519.  
 [13] Chen CH, Chen WJ, Shih CH. Fixation of small tibial a-

vulsion fracture of the posterior cruciate ligament using the double bundles Du11 through suture method[J]. J Trauma, 1999, 46: 1036-1038.

[14] 俞海明,姚学东,林金矿,等. AO 齿状垫圈及螺钉置入固定后交叉韧带胫骨小块或粉碎撕脱骨折 11 例[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(44):8709-8712.  
 [15] 殷锋,乔丽娟.后交叉韧带胫骨止点撕脱骨折治疗体会[J].海南医学,2008,19(10):98.

(收稿日期:2010-05-04 修回日期:2010-09-17)