

粉防己碱对转化生长因子 β 促瘢痕胶原基质收缩效应的阻断作用*

刘德伍 李国辉 曹 勇 苏子毅 吴志宏 吴燮卿

内容提要 目的:研究粉防己碱对转化生长因子 β 促瘢痕胶原基质收缩效应的作用。方法:将瘢痕成纤维细胞、胶原基质和转化生长因子 β 共同构成体外瘢痕实验模型,观察粉防己碱对其收缩指数的影响。结果:粉防己碱对转化生长因子 β 促瘢痕胶原基质收缩具有阻断作用,并呈剂量依赖关系。结论:这一效应可能是粉防己碱抗瘢痕纤维化的机制之一。

关键词 粉防己碱 增生性瘢痕 转化生长因子 β 细胞外基质

Blocking Action of Tetrandrine on the Scar-Collagen Matrix Contraction Stimulated by Transforming Growth Factor β Liu Dewu, Li Guohui, Cao Yong, et al Burn Center, The First Affiliated Hospital of Jiangxi Medical College, Nanchang (330006)

Objective: To investigate the effect of Tetrandrine on the scar-collagen matrix contraction stimulated by transforming growth factor β (TGF- β). **Methods:** The scar-derived fibroblasts were suspended in a solution of collagen matrix, and TGF- β , they were associated to form a scar model in vitro. The influence of tetrandrine on the contraction indexes was observed. **Results:** Tetrandrine plays a blocking action in the scar-collagen matrix contraction stimulated by TGF- β , which was in a dose-dependent manner. **Conclusion:** This function of tetrandrine could be responsible for the anti-scar mechanism.

Key words tetrandrine, hypertrophic scar, transforming growth factor β , extracellular matrix

增生性瘢痕形成的分子机制尚不十分清楚。近年来胚胎无瘢痕愈合的研究揭示,转化生长因子 β 与瘢痕的发生发展密切相关。体外实验已证实转化生长因子 β 可促进成纤维细胞诱导细胞外基质产生收缩效应⁽¹⁾。本研究采用成纤维细胞三维培养方法,观察粉防己碱对转化生长因子 β 促瘢痕胶原基质收缩效应的影响。旨在为寻求阻断瘢痕纤维化进程的有效中药奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 药品与试剂 粉防己碱(Tet)由浙江金华制药厂提供。DMEM 培养基和胎牛血清系美国 Gibco 公司产品。转化生长因子 β 为 Megagene 公司产品。胰蛋白酶为 Difco 产品。

1.2 真皮胶原 参照高智仁等⁽²⁾的方法,将新鲜猪皮除去表皮、皮下组织及脂肪,依次用 0.05% 洗必

泰、生理盐水反复冲洗后剪成体积为 1mm^3 的真皮块,加入 0.5mol/L 乙酸做成组织匀浆,反复离心,沉淀,NaCl 盐析,双蒸水透析,将所得胶原溶解于 0.5mol/L 乙酸中,置 4°C 冰箱保存备用。微量凯氏定氮法测定胶原浓度为 4.35g/L 。

1.3 瘢痕成纤维细胞 按本中心细胞研究室建立的方法,取整形手术切除的瘢痕组织,修除表皮和皮下组织,剪成体积为 $0.5\sim 1\text{mm}^3$ 大小的真皮块,接种于培养瓶内,置 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 、饱和湿度恒温培养箱中培养 4h,再加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养。每周换液 2 次。待原代培养细胞基本长满瓶壁后,用 0.125% 胰蛋白酶消化,进行传代培养。本实验用成纤维细胞为第 3 代。

2 方法

2.1 成纤维细胞三维培养及药物处理 参照杨松林等⁽³⁾的方法,选择生长状态较好的传代成纤维细胞用胰蛋白酶消化成细胞悬液,调整细胞浓度为 $2\times 10^5/\text{L}$,按细胞悬液 2、胎牛血清 1、5 倍浓缩的 DMEM 液 2、胶原液 5 的容积比例,混匀形成成纤维细胞胶原混悬液,以每皿 0.5ml 移入培养皿(直径 35mm)中,置

*江西省青年科学基金资助项目(No. D960501)

江西医学院第一附属医院烧伤中心(南昌 330006)

5% CO₂、37℃、饱和湿度恒温培养箱中培养。数分钟后形成凝胶状,加入含 2μg/L 转化生长因子 β 和 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基(每皿 0.5ml),轻轻使凝胶块与培养皿表面分离。实验组分别加含 1mg/L、4mg/L 粉防己碱,对照组加等量生理盐水,继续培养。培养液、生长因子及药物每 2 天更换 1 次。

2.2 胶原基质收缩指数测定 于实验开始后的第 1、2、3、4 天分别用透明坐标纸测定每一凝胶块的最大和最小直径,取其均数按下式计算凝胶块的收缩指数: $CI = [1 - (\bar{D}/D_0)^2] \times 100\%$, 其中 CI 为收缩指数, $\bar{D}$ 为凝胶块最大与最小直径的均数,取 3 个重复样本的均值计算, D_0 为初始直径(33mm)。

3 统计学处理 采用 χ^2 检验。

结 果

粉防己碱对转化生长因子 β 促瘢痕胶原基质收缩效应的作用 见附表。实验结果显示:粉防己碱对转化生长因子 β 促瘢痕胶原基质收缩效应具有显著抑制作用,并呈剂量依赖关系。

附表 粉防己碱对转化生长因子 β 促瘢痕胶原基质收缩效应的作用比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别 剂量	收缩指数(%)			
	1d	2d	3d	4d
对照	61.62	79.34	84.08	88.89
实验 1mg/L	44.13*	66.26*	68.57**	70.80**
4mg/L	38.72**	47.11** ^{△△}	50.72** [△]	52.12** ^{△△}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与本组 1mg/L 剂量比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

讨 论

现代细胞生物学研究表明,多种细胞因子参与了瘢痕的形成和组织过度修复过程^[4]。其中转化生长因子 β 是目前已知与瘢痕纤维化关系最密切、最具代表性的一种。它是强烈的促细胞分裂剂,通过作用于靶细胞的转化生长因子 β 受体而发挥其广泛的生物学功能。它对细胞的作用可表现为刺激或抑制,主要取决于细胞类型及状态。在创面愈合过程中,转化生长因

子 β 可趋化成纤维细胞、单核细胞及巨噬细胞到损伤部位,诱导 α-平滑肌肌动蛋白在成纤维细胞中的表达,这一表达和创面病理性收缩及瘢痕形成有关。凡能影响这一病理生理进程的药物和因素,对瘢痕的防治均具有重要意义。

粉防己碱是从防己科植物汉防己根中提取的一种生物碱,系钙离子拮抗剂^[5]。它主要作用于钙离子通道,影响钙离子的跨膜转运及细胞内的分布利用。作者曾研究发现该药在 5~80mg/L 浓度范围内对体外培养的人皮肤成纤维细胞具有直接抑制作用^[6]。为进一步了解粉防己碱对瘢痕成纤维细胞的调控机理,本实验采用瘢痕成纤维细胞体外培养方法,将细胞、细胞外基质、生长因子和药物共同构成一个模拟瘢痕组织的有机整体,所用的粉防己碱剂量低于上述有效抑制浓度,结果表明仍对转化生长因子 β 促瘢痕成纤维细胞与胶原基质收缩呈现抑制效应。因此,我们推测粉防己碱对细胞因子刺激成纤维细胞、启动和促进瘢痕增生的过程,可能有直接的作用。有必要深入探讨和阐明。

(本研究承蒙梁胜媛主管技师大力协助,特此致谢)

参 考 文 献

1. Montesano R, Orci L. Transforming growth factor β stimulates collagen matrix contraction by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4894—4897.
2. 高智仁,李 毅,郝志强,等.猪皮胶原的实验室制备和成膜技术. *中华整形烧伤外科杂志* 1991; 7(3): 221—222.
3. 杨松林,何清濂,林子豪,等.瘢痕成纤维细胞三维培养的实验研究. *中华整形烧伤外科杂志* 1996; 12(1): 2—5.
4. 王文革,钱云良,商庆新.细胞因子与瘢痕形成机制的研究进展. *中华整形烧伤外科杂志* 1997; 13(2): 128—130.
5. 方达超,江明性.粉防己碱抗钙作用的研究. *中华医学杂志* 1983; 63(12): 772—774.
6. 刘德伍,李国辉,曹 勇,等.粉防己碱对人皮肤成纤维细胞生长的抑制作用观察. *中国中药杂志* 1998; 23(1): 55—57.

(收稿:1997-12-01 修回:1998-03-28)

(上接 416 页)

感受风热,侵蚀牙体,均可致发龋病。而肾精不足,牙齿不坚,易受侵蚀。儿童肾气未充,喜食肥甘,酿生湿热,故易发龋病。牙可喜含片具有清热除湿,补肾健齿作用,方中主要药物金银花、厚朴可清胃除湿,清解风热,药理研究其对变形链球菌有抑杀作用,对清除、抑

制牙菌斑有良好效果。骨碎补能促进钙磷吸收,并提高血钙、磷水平,牡蛎也含有大量的钙和磷,诸药合用,可清洁口腔,保护牙齿,达到防治龋病效果。

(收稿:1997-07-10 修回:1998-03-02)