

人参皂苷 Rg3 对兔耳增生性瘢痕 TNF- α 和 IL- β 表达的影响*

马 莉¹, 李晓静²

(1. 安徽中医药大学护理学院医学美容教研室, 安徽 合肥 230001;

2. 安徽医科大学第一附属医院整形外科, 安徽 合肥 230022)

摘要:目的 观察人参皂苷 Rg3 对兔耳病理性瘢痕组织中 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响。方法 建立兔耳病理性瘢痕模型, 随机分为治疗组和对照组; 各组均用微量注射器行于创面行局部封闭注射, 治疗组注射人参皂苷 Rg3, 对照组注射等量的 PBS; 通过比较各组瘢痕指数(SEI)及 I、III 型胶原表达不同评价瘢痕增生程度的差异; 采用免疫组化方法检测炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达。结果 与 PBS 对照组相比较, 人参皂苷 Rg3 治疗组兔耳病理性瘢痕组织 SEI 及 I、III 型胶原沉积显著下降, 炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达减少, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 人参皂苷 Rg3 在创面愈合早期及时干预, 可抑制兔耳增生性瘢痕组织中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达, 减少瘢痕的形成, 提示其抗瘢痕作用可能与抑制炎症反应有关。

关键词: 病理性瘢痕; 白兔; 炎症; 人参皂苷 Rg3; IL-1 β ; TNF- α

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)01-0006-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.01.002

瘢痕是人体创伤修复和愈合过程中的必然产物, 而病理性瘢痕则是皮肤创伤后组织过度修复引起的以胶原为主的细胞外基质成分的大量沉积为特征的皮肤纤维化疾病。病理性瘢痕包括增生性瘢痕(Hypertrophic scar, HS)和有肿瘤样生长倾向的瘢痕疙瘩(Keloid)。病理性瘢痕的形成不仅影响美观, 而且可出现瘙痒、疼痛等症状, 甚至会发生瘢痕性挛缩, 特别是关节处瘢痕挛缩, 常造成关节严重的功能障碍。严重影响患者的生活质量和身心健康, 目前尚无满意的治疗方法^[1-2]。创伤愈合时创面出现的炎症反应可促进炎症细胞浸润, 炎症因子的过度释放, 促进成纤维细胞增殖及 I、III 型胶原合成, 导致病理性瘢痕形成^[3-4]。人参皂苷 Rg3 是从人参中提取的一种稀有的单体成分, 已知人参皂苷 Rg3 在多种炎症疾病中具有抗炎作用^[5-7], 且人参皂苷 Rg3 可抑制病理性瘢痕形成^[8]。然而, 人参皂苷 Rg3 对病理性瘢痕炎症反应的影响未见报道。为此本研究采用人参皂苷 Rg3 干预兔耳病理性瘢痕模型, 观察其对病理性瘢痕形成过程中炎症因子肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor α , TNF- α)和白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人参皂苷 Rg3, 纯度>99.5%(Fluk 公司); I、III 型胶原和 TNF- α 抗兔抗体购于美国 Biorbyt 公司; 兔 IL- β 抗体购于美国 Bioss 公司; DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); 苏木精、伊红染色试剂、PBS 缓冲液(pH7.2~7.4)、0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(CB, pH6.0, 1000 mL)、生理盐水、醋酸、NaOH、高锰酸钾、多聚甲醛等常规试剂均为分析纯, 石蜡包埋仪(LEICA RM 2135 型上海莱卡仪器有限公司), 石蜡切片机(LEICA RM 2135 型上海莱卡仪器有限公司), 切片漂烘温控仪(QP.B2 安徽省电子科学研究所), 荧光显微镜(Nikon 80i, Japan)均由安徽医科大学相关实验室提供。

1.2 动物模型的制备

选取健康成年新西兰大耳兔 12 只(安徽医科大学实验动物中心提供), 雌雄不拘(不含孕兔), 体重 2.0~2.5 kg, 分笼适应性饲养 1 周, 饮用水、食物消毒, 室内温度约 22℃~25℃, 相对湿度 60%~75%, 洁净空气通风。兔耳瘢痕模型的制作参考 Morris 等人的方法^[9]。动物经随机化分为 2 组: PBS

* 基金项目: 安徽中医药大学青年基金(2014qn013)

收稿日期: 2015-12-15

作者简介: 马莉(1982-), 女, 安徽合肥人, 讲师, 研究方向: 瘢痕的临床和基础研究。E-mail: 284305993@qq.com

对照组;人参皂苷 Rg3 实验组;每组 6 只。治疗组与对照组均进行模型复制:实验兔四肢及头固定于手术台,用 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)作耳缘静脉麻醉,严格无菌条件下,选取兔耳腹侧面远离耳根部位无毛或少毛区,沿长轴避开可见血管,将耳展平后用眼科直径 6 mm 角膜环钻与皮肤平行钻孔,钻透全层皮肤及软骨膜达软骨,用蚊式血管钳沿创缘小心剥离全层皮肤及软骨膜,每侧耳制备 6 个相同创面,创面间隔 1.5 cm 以上,术后创面暴露,待创面自行愈合。造模术后给药,各组均用微量注射器从创面周围正常皮肤进针,行创面基底及创面灶内局部多点注射,人参皂苷 Rg3 治疗组(3 mg/mL)术后当天及术后 5 d、10 d、15 d 分别注射 1 次;PBS 组兔耳瘢痕块内注入等量的 PBS,方法同人参皂苷 Rg3 组。术后 26 d,3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)作耳缘静脉麻醉,切取瘢痕组织,经 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片。

1.3 实验方法

1.3.1 HE 染色

各组兔耳病理性瘢痕组织石蜡切片脱蜡至水(60℃的温箱内烤片 2 h—二甲苯 15 min $\times$ 2—梯度酒精 5 min $\times$ 3—PBS 3 min $\times$ 2),苏木素浸染 10 min,短暂水洗,1%盐酸酒精镜下分化,流水冲洗返蓝 30 min,伊红浸染 5 min,脱水、透明、封片。瘢痕增生程度以光镜下测量瘢痕指数(Scar elevation index, SEI)表示,即光镜下观察 HE 染色切片,用测微尺测出瘢痕最高点至耳软骨表面的垂直距离取值为 a ,瘢痕周围正常皮肤至耳软骨表面的垂直距离取值为 b ,使用公式 $SEI=a/b$,计算出瘢痕增生指数^[9]。

1.3.2 免疫组化染色

采用 SP 免疫组织化学测定法。按试剂盒说明书操作,简言之:各组兔耳病理性瘢痕组织石蜡切片入梯度酒精中脱蜡;水化;PBS(pH7.4)冲洗;3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶;枸橼酸钠缓冲液热抗原修复;小牛血清封闭;一抗为羊抗人 I、III 型前胶原多克隆抗体、兔 IL- β 抗体及 TNF- α 抗兔抗体;DAB 显色;苏木素复染;中性树胶封片。已知阳性片作阳性对照;PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 图像分析

将所采集的数码图片,用 ImagePro-Plus 6.0 图像分析软件分析,每个样本随机取 5 个视野,测得每张切片中阳性细胞的积分光密度(Integrated optical density, IOD),取平均值。

1.5 统计学方法

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,由 SPSS 18.0 统计软件处理,用 Origin7.0 软件进行统计分析和制图, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔耳增生性瘢痕大体观察

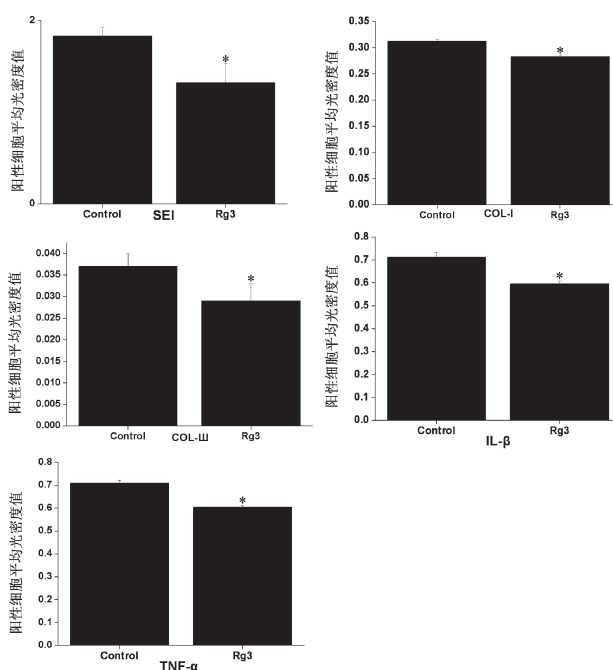
兔耳创面均于术后 2 周左右完全愈合,术后约 3 周左右,局部逐渐突起,高处皮面,呈淡红色,有挛缩现象;PBS 对照组瘢痕块颜色较红,质地较硬;人参皂苷 Rg3 治疗组瘢痕增生程度轻,质略软,色浅。

2.2 人参皂苷 Rg3 对兔耳增生性瘢痕的影响

人参皂苷 Rg3 治疗组瘢痕指数为(1.32 ± 0.21),PBS 对照组瘢痕指数为(1.83 ± 0.09),两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 1。免疫组化染色结果显示人参皂苷 Rg3 治疗组 I、III 型胶原沉积明显较 PBS 对照组减轻($P<0.05$)。见图 1 和图 2。

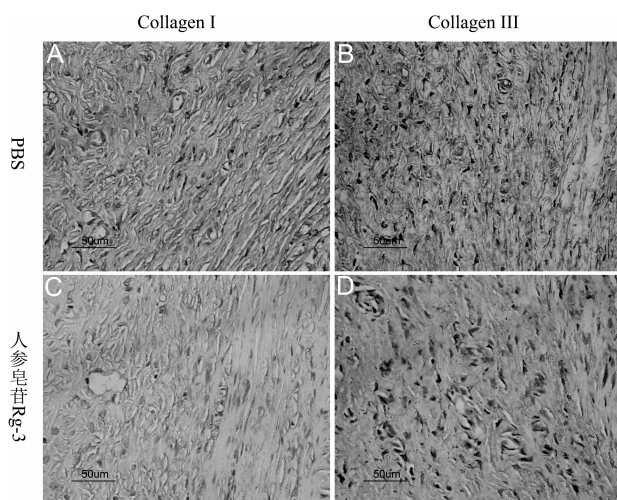
2.3 人参皂苷 Rg3 对兔耳增生性瘢痕中 TNF- α 和 IL-1 β 的影响

免疫组织化学染色结果显示人参皂苷 Rg3 可明显降低兔耳增生性瘢痕中 TNF- α 和 IL-1 β 的表达($P<0.05$)。见图 1 和图 3。



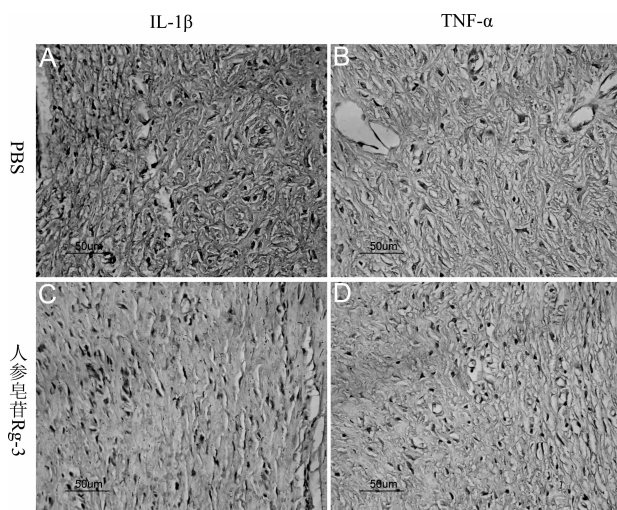
人参皂苷 Rg3 组瘢痕指数(SEI)、I、III 型胶原(COL-I、COL-III)、IL-1 β 和 TNF- α 较 PBS 对照组明显降低($P<0.05$)。

图1 各组瘢痕指数(SEI)TNF- α 、IL-1 β 及 I、III 型胶原阳性细胞积分光密度值比较



A、B 为 PBS 对照组;C、D 为人参皂苷 Rg3 治疗组。I、III 型胶原(COLI,III)阳性细胞显示为棕黄色、棕褐色,治疗组较对照组明显减少。

图 2 兔耳瘢痕组织 I、III 型胶原(COLI,III)免疫组化染色结果($\times 400$, bar=50 μm)



A、B 为 PBS 对照组;C、D 为人参皂苷 Rg3 治疗组。TNF- α 和 IL-1 β 阳性细胞显示为棕黄色、棕褐色,治疗组较对照组明显减少。

图 3 兔耳瘢痕组织 TNF- α 和 IL-1 β 免疫组化染色结果($\times 400$, bar=50 μm)

3 讨论

皮肤创伤愈合一般经历炎症、增殖和成熟或重塑 3 个阶段。当皮肤组织受到一定深度的损伤后,创面出现早期炎症瀑布反应,中性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞等大量炎症细胞浸润至损伤区,抗菌、清除坏死组织的同时并释放一些细胞因子。因此,适度的炎症反应有利于创面愈合^[10-11]。如严重损伤、烧伤或感染性创伤加重炎症反应并使炎症期延长,

浸润的炎症细胞增多,使得白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)等细胞因子分泌增加。这些细胞因子可促进成纤维细胞增殖和细胞外基质成分如纤维结缔组织、I、III 型胶原等合成,从而导致病理性瘢痕的形成^[3-4]。1971 年,Burrington 首次发现胎儿皮肤创伤后修复无瘢痕形成,并确立了“无瘢痕愈合”的概念^[12]。而后 Krummel 归纳了创伤后无急性炎症反应为无瘢痕愈合的首要特征^[13]。故通过抑制瘢痕炎症反应,抑制炎症细胞浸润及 TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的分泌,可控制瘢痕过度形成。既往研究发现,增生性瘢痕组织中 TNF- α 、IL-1 β 表达明显增高,且通过抑制瘢痕组织的炎症反应及 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的表达,可显著减少瘢痕的形成^[14-15]。

人参是我国名贵的中草药,属五加科多年生草本植物,其主要成分是人参皂苷,人参皂苷 Rg3 是从人参中提取的一种稀有的单体成分^[8]。赵自然等^[8]研究发现人参皂苷 Rg3 能够诱导兔耳与人瘢痕成纤维细胞凋亡,抑制成纤维细胞的增殖,减轻病理性瘢痕的形成。但目前国内外有关人参皂苷 Rg3 抗瘢痕增生机制的了解还十分有限,仅局限于对成纤维细胞增殖及凋亡及对病理性瘢痕的后期干预等方面^[16-17]。随着研究的深入,研究发现人参皂苷 Rg3 可抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 等表达,抑制 AD (Alzheimer's disease)大鼠海马组织纤维化形成,减少炎性损伤,从而改善大鼠学习和记忆等认知功能^[5]。在动脉粥样硬化病变中,TNF- α 、IL-1 β 作用与血管内皮细胞,一方面促使血管内皮细胞产生其他炎性介质,一方面增加粘附分子的表达水平,促进对中性粒细胞的粘附作用,从而启动局部的炎症反应和粥样斑块的形成,外源性人参皂苷 Rg3 通过下调血管内皮细胞中粘附分子和促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达调节抗炎和抗动脉粥样硬化^[6-7]。这些研究提示人参皂苷 Rg3 具有抗炎和减轻组织纤维化形成的作用。由于创面愈合时创面出现的炎症反应参与瘢痕的形成和发展过程,为进一步探讨人参皂苷 Rg3 抗瘢痕增生的机制,本研究采用人参皂苷 Rg3 干预兔耳病理性瘢痕模型,研究发现人参皂苷 Rg3 治疗组兔耳增生性瘢痕中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达明显低于对照组,同时人参皂苷 Rg3 治疗组 I、III 型胶原沉积显著减少。

综上所述,人参皂苷 Rg3 在创面愈合早期及时

干预,可抑制兔耳增生性瘢痕组织中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,减少瘢痕的形成,提示其抗瘢痕作用可能与抑制炎症反应有关。

参考文献:

- [1] Song C. Hypertrophic scars and keloids in surgery:current concepts[J]. Ann Plast Surg,2014,73(S1):108-118.
- [2] Aschoff R. Therapy of hypertrophic scars and keloids [J]. Hautarzt,2014,65(12):1067-1077.
- [3] Rosique RG,Rosique MJ,Farina Junior JA. Curbing inflammation in skin wound healing:a review [J]. Int J Inflam,2015:316235.
- [4] Eming SA,Martin P,Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration:mechanisms,signaling,and translation [J]. Sci Transl Med,2014,6(265):265.
- [5] Yang LQ,Wang B,Gan H,et al. Enhanced oral bioavailability and anti-tumour effect of paclitaxel by 20 (s)-ginsenoside Rg3 in vivo [J]. Biopharm Drug Dispos,2012,33(8):425-436.
- [6] Shin YM,Jung HJ,Choi WY,et al. Antioxidative,anti-inflammatory,and matrix metalloproteinase inhibitory activities of 20 (S)-ginsenoside Rg3 in cultured mammalian cell lines[J]. Mol Biol Rep,2013,40(1):269-279.
- [7] Cheng L,Sun X,Hu C,et al. In vivo inhibition of hypertrophic scars by implantable ginsenoside-Rg3-loaded electrospun fibrous membranes[J]. Acta Biomater,2013,9(12):9461-9473.
- [8] 马莉,李小静,宁金龙. 人参皂苷 Rg3 抗肿瘤作用与病理瘢痕关系研究进展 [J]. 中国美容医学,2013,22(20):2077-2079.
- [9] Morris DE,Wu L,Zhao LL,et al. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring:quantitative studies[J]. Plast Reconstr Surg,1997,100(3):674-681.
- [10] van den Broek LJ,van der Veer WM,de Jong EH,et al. Suppressed inflammatory gene expression during human hypertrophic scar compared to normotrophic scar formation [J]. Exp Dermatol,2015,24(8):623-629.
- [11] Liu C. Inhibition of mechanical stress-induced hypertrophic scar inflammation by emodin [J]. Mol Med Rep,2015,11(6):4087-4092.
- [12] Burrington JD. Wound healing in the fetal lamb[J]. J Pediatr Surg,1971,6(5):523-528.
- [13] 洪学哲,李小静,马莉. TSG-6 与炎症反应[J]. 安徽医学,2012,33(2):240-241.
- [14] Salgado RM,Alcantara L,Mendoza-Rodriguez CA,et al. Post-burn hypertrophic scars are characterized by high levels of IL-1 β mRNA and protein and TNF- α type I receptors[J]. Burns,2012,38(5):668-676.
- [15] Wang H,Chen Z,Li XJ,et al. Anti-inflammatory cytokine TSG-6 inhibits hypertrophic scar formation in a rabbit ear model[J]. Eur J Pharmacol,2015,751:42-49.
- [16] 刘鹤松,王芳,吴杰,等. 人参皂苷 Rg3 对兔耳增生性瘢痕中 Caspase-3、细胞色素 C 表达的影响[J]. 中国老年医学杂志,2011,31(16):3106-3107.
- [17] 刘鹤松,赵自然,兰珊珊,等. 人参皂苷 Rg3 对人成纤维细胞增殖和凋亡影响的实验研究 [J]. 中国实验诊断学,2010,14(11):1697-1700.

(编辑:杨阳)

Effect of Ginsenoside-Rg3 on IL-1 β and TNF- α Expression in Hypertrophic Scar Formation in Rabbit Ears Model

MA Li¹, LI Xiaojing²

(1. Department of Medical Cosmetology, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230001, China;

2. Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the effect of Ginsenoside-Rg3 on the expression of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the ear wounds. **Methods** Collagen I and III expression detected by immunohistochemistry and scar elevation index(SEI) was used to evaluate the extent of scarring. The expression of inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with control scars, Ginsenoside-Rg3-treated wounds exhibited decreased inflammation significantly as evidenced by the lower levels of IL-1 β and TNF- α . The SEI and the synthesis of collagens I and III were significantly decreased in the Ginsenoside-Rg3-treated scars ($P<0.05$). **Conclusion** Immediate topical injection of Ginsenoside-Rg3 during the wound healing process can reduce the severity of hypertrophic scarring in a rabbit model, which may result from controlling inflammation, inducing fibroblast apoptosis and promoting collagen degradation by decreased the inflammatory factors of IL-1 β and TNF- α .

KEY WORDS: hypertrophic scar; rabbit; inflammation; Ginsenoside-Rg3; IL-1 β ; TNF- α