文章编号:1000-5404(2005)01-0049-04

论著

积雪草甙对增生性瘢痕成纤维细胞增殖与Smad7蛋白的影响

潘 姝[1],利天增[1],李叶扬[2],陈晓东[1],谢举临[1],徐盈斌[1],祁少海[1] ([1]中山大学附属第一医院烧伤科,广州 510080;[2]广州市红十字会医院烧伤整形科,广州 510270)

提 要:目的 研究积雪草甙对增生性瘢痕成纤维细胞增殖及对Smad7蛋白的影响。**方法** 用组织块法培养人瘢痕成纤维细胞。应用流式细胞术、免疫细胞化学、RT-PCR及Western blot技术结合光密度扫描分析,观察积雪草甙对增生性瘢痕成纤维细胞细胞周期、凋亡和Smad7在细胞中的定位及其mRNA和蛋白含量的改变。**结果** 积雪草甙可抑制瘢痕的成纤维细胞从S期进入M期,增加瘢痕成纤维细胞中Smad7 mRNA和蛋白的含量。**结论** 积雪草甙抑制瘢痕的作用可能部分通过增加抑制性Smad7蛋白。

关键词: 积雪草甙;增生性瘢痕;Smad7

中图法分类号: R282.71; R329.28; R364.31 **文献标识码:** A

Effects of asiaticoside on cell proliferation and Smad7 expression of hypertrophic scar fibroblasts

PAN Shu[1], LI Tian-zeng[1], LI Ye-yang[2], CHEN Xiao-dong[1], XIE Ju-lin[1], XU Ying-bin[1], QI Shao-hai[1] ([1]Department of Burns, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080; [2]Department of Burns and Plastic Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou 510270, Guangdong Province, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of asiaticoside on the proliferation and expression of Smad7 of hypertrophic scar fibroblasts. **Methods** The hypertrophic scar fibroblasts were cultured with tissue culture method. Flow cytometry, immunocytochemistry, RT-PCR, and Western blot were applied to investigate the cell cycle, cell apoptosis, and expression of Smad7 with or without asiaticoside. **Results** Asiaticoside could inhibit hypertrophic scar fibroblasts entering from phase S to phase M and increase the protein contents and Smad7 mRNA in hypertrophic scar fibroblasts. **Conclusion** Asiaticoside may inhibit the formation of hypertrophic scar partly through the increase of Smad7 expression.

Key words: asiaticoside; hypertrophic scar; Smad7

增生性瘢痕是继发于皮肤损伤如烧伤或手术后,以胶原过度沉积于真皮和皮下组织为特征的皮肤胶原性疾病。转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)是影响创面愈合及病理性瘢痕形成的重要因素。Smad蛋白家族是近年来发现的TGF-β受体下游信号蛋白,它将TGF-β受体激活后的信号从胞浆传递到细胞核内,作用于相应的靶基因,从而发挥作用。可以推测阻断成纤维细胞内Smad信号转导能防止TGF-β的病理性作用,达到抑制瘢痕增生的目的。积雪草甙是从伞形科植物积雪草全草中提取的白色针状结晶。我们在以往的实验中已经证实其抑制成纤维细胞增殖及胶原的合成的作用[1,2],并且发现积雪草甙可使瘢痕内TGF-β表达减少[3]。但对于其作用的具体机制仍知之不多。本研究以体外培养的增生性瘢痕成纤维细胞为实验对象,采用流式细胞术、免疫细胞化学、RT-PCR及Western blot,检测瘢痕成纤维细胞在应用积雪草甙前后Smad7表达和细胞周期的改变,进一步探讨积雪草甙治疗瘢痕的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

标本分别取自我院和广州市红十字会医院因增生性瘢痕住院手术的患者6例,男3例,女3例,年龄1~35岁,瘢痕增生时间3~6个月,取材部位包括上肢2例,面部4例。高糖DMEM培养基购自Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,

基金项目: 广东省重点攻关项目(98278172)
Supported by the Key Sci & Tech Research Foundation of Guangdong Province (98278172)

作者简介: 潘 姝(1974-),女,黑龙江省佳木斯市人,博士研究生,主要从事瘢痕的防治方面的研究。电话:(020)87755766

通讯作者: 祁少海,电话:(020)87755766-8235,E-mail: qishaohai@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-05-06;**修回日期:** 2004-10-17

胰酶购自上海生工生物工程有限公司。兔抗人 Smad7 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司，羊抗兔 IgG 二抗及辣根过氧化物酶标记的 ECL 发光试剂盒购自 Cell Signal 公司，Trizol 购自 Gibco 公司，逆转录试剂盒购自 MBI 公司，PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成，*Taq* 酶购自 TaKaRa 公司，流式细胞仪为 Coulter 公司，PN6604451。

1.2 细胞培养

采用组织块法[4]，将手术切除的瘢痕用 75% 乙醇浸泡 1 min，后在 PBS 液中用剪刀去除皮下组织和表皮，PBS 冲洗两次，在 DMEM 培养液中用眼科剪剪成 1 mm^3 大小的组织块，用弯头吸管将其接种于培养瓶的底部，底部加入 DMEM 培养液，将瓶倾斜放入 37 ℃，5% CO_2 培养箱中 3～4 h 后，放平，使培养液没过组织块。3～4 d 后在组织块的边缘可见梭形的成纤维细胞游出，向四周呈火焰状蔓延。待细胞爬满瓶底后，用 0.25% 胰酶和 0.04% 的 EDTA 消化传代。取第 2 代的细胞进行检测。

1.3 RT-PCR 法检测 Smad7 mRNA 的表达

将细胞以 2×10^8 个/L 接种于 25 cm^2 细胞培养瓶，用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，经紫外分光光度计（日本导津 UV2201 型）测定总 RNA 浓度和纯度，重复测定 3 次，A_{260} 和 A_{280} 之比值应在 1.8～2.0，计算样品总 RNA 浓度。引物序列为：hSmad7（433 bp），正义 5′-AGC AGA AAT CCA AGC ACC-3′；反义 5′-CTG GCA GGA AGG GAA TAA G-3′；hGAPDH（300 bp）正义 5′-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3′；反义 5′-CGG CCA TCG CCA CAG TTT- 3′。取总 RNA 2 μg 及多聚脱氧胸腺核苷引物（Oligo dT）1 μl 加 0.1% 焦碳酸二乙酯（DEPC）水至 12 μl，在 70 ℃变性 5 min 后，依次加入 5× 反转录缓冲液 4 μl、10 mmol/L 三磷酸脱氧核苷酸（dNTP）2 μl、20 U/μl 核糖核酸抑制剂（Ribonuclease inhibitor）1 μl，在 37 ℃孵育 5 min 后，加入 200 U/μl M-MuLV 反转录酶 1 μl，总反应体积 20 μl，在 42 ℃反应 60 min 后，70 ℃加热 10 min 终止反应。PCR 反应总体积为 25 μl，将反应管置于 PCR 仪上，95 ℃预变性 10 min 后，进入 95 ℃变性 1 min，50 ℃退火 0.5 min，72 ℃延伸 0.5 min 的循环，共 30 次，最后 72 ℃充分延伸 10 min。反应完成后取 15 μl PCR 反应液，经 2% 琼脂糖凝胶电泳，用 PCR Marker 作分子量标准。电泳完毕后在紫外灯下观察照相，密度扫描分析 PCR 产物带。基因表达强度按被测条带与甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）蛋白的比率计算。

1.4 Western blotting 印迹检测 Smad7 蛋白

将待收集的细胞以预冷的 PBS 液洗 2 次，加入 100 μl 预冷裂解液，冰浴 30 min，刮勺收集样本，4 ℃ 12 000 × *g* 离心 15 min，取上清，以考马斯亮蓝法测定提取蛋白浓度。取 15 μl 蛋白质经 10% SDS-PAGE 垂直凝胶电泳后，电转移至 PVDF 膜上，用丽春红染色观察转移效果，5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h 后，加入相应的 1∶1 000 稀释的 Smad7 多克隆抗体，4 ℃过夜，TBST 洗膜后，加入 1∶2 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗，室温作用 1 h，TBST 洗膜后，ECL 增强发光，在暗室中将膜贴在 X 线胶片下曝光，常规方法显影、定影，直至显影出电泳带。杂交信号在图像分析系统中进行光密度分析。

1.5 流式细胞术检测细胞周期和凋亡

消化和收集生长良好的成纤维细胞，以无血清 DMEM 培养液制成细胞悬液，以 2×10^8 个/L 密度接种于 25 cm^2 培养瓶中，常规培养 24 h，使细胞同步化生长 24 h 后，继用无血清的 DMEM 培养。A 组：为对照组；B 组：加入积雪草甙 48 h 后，常规消化后以 3 000 r/min 离心 5 min，PBS 冲洗 2 次，70% 乙醇重悬细胞，37 ℃下 RNA 酶消化 30 min，300 目细胞筛过滤，碘化丙啶（PI）染色，流式细胞仪检测。

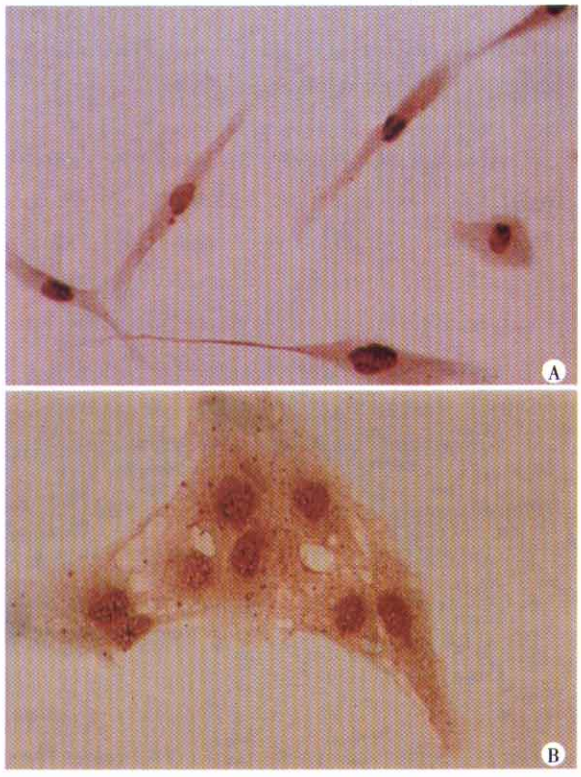
1.6 统计学处理

统计数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS10.0 进行 t 检验。

2 结果

2.1 积雪草甙对瘢痕成纤维细胞内 Smad7 蛋白定位的影响

免疫细胞化学 Smad7 的免疫阳性颗粒位于成纤维细胞的胞浆和胞核，但在积雪草甙处理组胞浆的表达强度较胞核强，对照组则相反（图 1）。



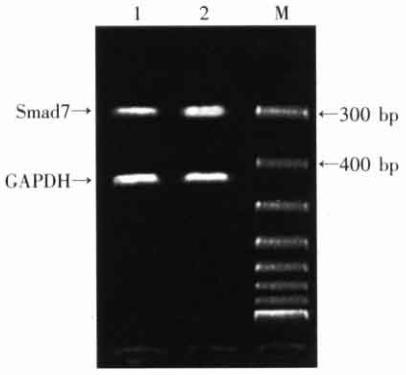
A: Control group; B: Asiaticoside group

图 1 对照组 Smad7 的免疫细胞化学结果 （DAB × 400）

Fig 1 Immunohistochemical results of Smad7 （DAB × 400）

2.2 积雪草甙 Smad7 mRNA 表达的影响

加入积雪草甙后 Smad7 mRNA 的表达水平[(50.80 ± 22.40)%]较对照组[(32.18 ± 17.84)%]明显增加（$P<0.05$）。结果见图 2。



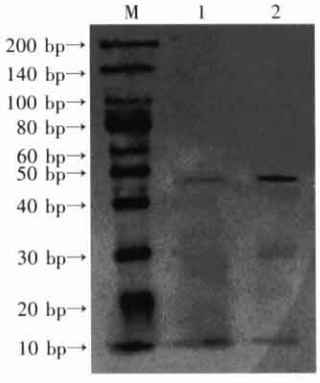
M: Marker; 1: Asiaticoside; 2: Control

图 2　RT-PCR 分析 Smad7 mRNA 表达变化

Fig 2　RT-PCR analysis of changes of Smad7 mRNA expression

2.3　积雪草甙对 Smad7 蛋白表达的影响

图像分析系统对杂交带密度扫描结果显示，但是 Smad7 蛋白含量在加入积雪草甙后明显增加，与 Smad7 mRNA 的表达变化趋势相同。结果见图 3。



M: Marker; 1: Control; 2: Asiaticoside

图 3　Western 分析 Smad7 蛋白表达变化

Fig 3　Western blot analysis of changes of Smad7 protein expression

2.4　积雪草甙对瘢痕成纤维细胞的细胞周期和凋亡的影响

流式细胞仪分析显示，积雪草甙作用成纤维细胞 48 h 后，与对照组比较，G_0-G_1 期细胞增多，S 期和 G_2-M 期细胞减少，但未见显著性差异（$P > 0.05$）（表 1）。另外，积雪草甙处理细胞 48 h 后，未见指示细胞凋亡的亚 G_1 期“凋亡峰”出现，这提示积雪草甙可使成纤维细胞的生长阻滞于 G_0-G_1 期，但不诱导成纤维细胞凋亡。

表 1　积雪草甙对细胞周期的影响（%，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Effects of asiaticoside on cell cycles（%，$\bar{x} \pm s$）

Group	G_0-G_1	S	G_2-M
Control	88.78 ± 5.66	7.00 ± 3.81	4.23 ± 2.28
Asiaticoside	91.33 ± 1.89	3.85 ± 1.06	4.88 ± 1.90

3　讨论

TGF-β 是增生性瘢痕发病的重要影响因素。信号转导是其中的关键环节，具有明显的生物学意义。针对病理状态下细胞的主要信号转导途径，采取适当的干预措施，可改善、逆转细胞表型，因而在疾病的防治方面具有一定的经济性和有效性。Smad 家族是近年来发现的 TGF-β 受体下游信号蛋白。Smad 蛋白家族包括 8 个成员，根据它们在 TGF-β 家族中信号转导的作用，可分为 3 类：① R-Smads（receptor activated Smads），包括 Smad1，2，3，5 和 8。其中 Smad2，3 转导 TGF-β 的信号。R-Smad 可直接被激活的 TGF-β1 受体磷酸化。②Co-Smads（common partner Smads）是 Smad4，Smad4 参与所有的 TGF-β 超家族成员的信号转导。③ I-Smads（inhibitory Smads），包括 Smad6 和 Smad7，可抑制 R-Smads 转导信号[5,6]。TGF-β 信号的转导始于 TGF-β Ⅰ型和Ⅱ型受体形成异源二聚体，激活的 TGF-βI 型受体使 Smad2 和 Smad3 磷酸化，与 Co-Smad 形成异源二聚体，转移到细胞核内与 TGF-β 诱导基因的特定序列直接结合，或通过与其他核蛋白的相互作用间接调节转录。TGF-β 在激活 R-Smad 的同时可激活 I-Smad（Smad7），发挥负反馈作用，使 TGF-β 的信号转导中断。I-Smad 静息时位于细胞核内，发挥抑制作用时则转移到细胞质[7]。阻断成纤维细胞内信号转导是防止 TGF-β 病理性作用，从而抑制瘢痕增生的有效方法。

本研究以体外培养的瘢痕成纤维细胞为实验对象，应用流式细胞术、免疫细胞化学及 Western Blot，观察到在应用积雪草甙后 Smad7 从胞核移至胞浆，且含量明显增加。本研究结果显示，积雪草甙可通过增加抑制性 Smad7 蛋白的表达及使其从胞核转移至胞浆发挥作用。不能排除积雪草甙可通过阻断 Smad3 的激活来抑制成纤维细胞增殖，尚需进一步的研究证实。

细胞周期指亲代细胞分裂结束到子代细胞分裂结束所经历的过程，这个过程所需的时间称为细胞周期时间。细胞周期由 G_1 期（DNA 合成前期/复制前期）、S 期（DNA 复制期）、G_2 期（合成后期）和 M 期（有丝分裂期，包括核分裂和胞质分裂）组成，G_1、S 和 G_2 期又合称为分裂间期。细胞增殖、细胞周期进程的关键是 G_1 期的启动，细胞一旦进入 S 期，则可以不再依赖外界信息刺激而很快完成分裂过程。本实验加入积雪草甙后可见 G_0-G_1 期细胞增多，S 期和 G_2-M 期细胞减少，表明细胞同时存在 DNA 复制和有丝分裂障碍；说明积雪草甙可抑制 S 期 DNA 合成，细胞滞留在 G_0-G_1 期。但不引起凋亡。

通过实验表明积雪草甙抑制瘢痕增生，主要通过增加抑制性 Smad 转导信号的 Smad7 的表达，抑制 TGF-β 的病理性作用，使成纤维细胞增殖受阻而发挥作用。对细胞周期的影响较少，不引起凋亡。

参考文献：

[1] 谢举临，利天增，祁少海，等. 积雪草甙对体外培养的成纤维细胞的作用[J]. 中山医科大学学报，2001，22(1)：41－43，47.
[2] 祁少海，谢举临，利天增，等. 积雪草甙对烧伤增生性瘢痕作用的实验研究[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(1)：53－56.
[3] 祁少海，利天增，黎志明，等. 积雪草甙对烧伤增生性瘢痕 T 细胞、巨噬细胞和 TGF-β 的影响[J]. 中国现代医学杂志，1999，9(增刊)：105－106.
[4] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1997. 2－235.
[5] Massague J. TGF-beta signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 753－791.
[6] Piek E, Heldin C H, Ten Dijke P, *et al*. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling[J]. FASEB J, 1999, 13(15): 2105－2124.
[7] Miyazono K. A new partner for inhibitory Smads[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(1): 7－9.

（编辑 冷怀明）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)01-0052-01

癌症根治术后化疗患者情绪状态评定及护理干预

Emotional state evaluation and nursing intervention of the cancer patients undergoing chemotherapy after radical operation

宋 爽[1]，石 彦[2]，陈显春[1]，姜 军[1]（第三军医大学西南医院：[1]乳腺中心，[2]普通外科，重庆 400038）

癌症患者根治术后面对化疗易产生焦虑、抑郁等负性情绪，影响化疗的进行。我们应用标准化焦虑自评量表(SAS)及抑郁自评量表(SDS)对术后化疗患者作了客观评定[1]，并试行护理干预，现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

癌症根治术后接受化疗并愿意参加受试者 100 例，随机分入干预组和常规组各 50 例。干预组：男 27 例，女 23 例，年龄 28－86 岁；其中乳癌 12 例，胃癌 10 例，结直肠癌 25 例，小肠恶性肿瘤 3 例。常规组：男 26 例，女 24 例，年龄 31－78 岁；其中乳腺癌 14 例，胃癌 11 例，结直肠癌 23 例，小肠恶性肿瘤 2 例。两组一般情况比较无显著性差异。

1.2 方法

常规组：按常规护理。

干预组：在常规护理基础上，从心理学角度，按认知、情绪、行为方面进行干预。

认知干预：①在医生指导下向患者介绍手术情况，特别说明根治性手术的意义；②进行心理卫生宣教，耐心倾听患者的忧虑和顾虑，客观回答其提出的问题；③介绍药物可能导致的恶心呕吐、脱发及白细胞下降等毒副反应，针对具体方案不同，重点介绍最可能发生的毒副反应；④女性患者对脱发极为关心，对此问题要如实回答，讲清是否会脱发，是否会脱光，脱光后能否重新生长及需要多长时间。

情绪干预：①根据患者性格、爱好、文化程度等，有针对性地帮助其改变思维方式和消极态度；②帮助其学会情绪的自我调节，介绍结交病友，营造良好的人际氛围；③向家属解释患者的病情，说明陪伴、安慰的重要性，取得家属的理解和配合，提供情感支持。

行为干预：①在病情许可条件下鼓励患者参加文娱活动，适当增加体育锻炼；②指导合理饮食，注意加强营养，多吃维生素丰富易消化食物；③化疗结束时指导定期复查，饮食调养，适当休息。

1.3 观察指标

采用 Zung 编制的 SAS 及 SDS[1]，分别于化疗前 1 d 及化疗后第 2 天各测评 1 次。评定前均按统一指导语解释填表方法，对文盲或文化程度低者由测试人员逐条讲明，请患者评判后由护士代为填写。

1.4 统计学处理

所得数值均 $x \pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件包进行方差分析。

2 结果

2.1 两组 SAS、SDS 评分与中国常模比较

结果见表 1。干预组化疗前 SAS、SDS 评分均显著高于中国常模($P<0.05$)，常规组化疗前 SAS、SDS 评分非常显著地高于中国常模($P<0.01$)；干预组化疗后 SAS 评分均接近中国常模($P>0.05$)，SDS 评分仍显著高于中国常模($P<0.05$)，常规组化疗后 SAS、SDS 评分仍非常显著地高于中国常模($P<0.01$)。

（下转 55 页）

作者简介：宋 爽(1976－)，女，山东省招远市人，护士，主要从事乳腺疾病护理方面的研究。电话：(023)68754163
通讯作者：石 彦，电话：(023)65428112
收稿日期：2004-09-07；修回日期：2004-04-28