维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0203－03

汉防己甲素对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响

曹治东[1], 石崇荣[2], 黄崇本[2], 陈维庭[1], 李邦春[1]

(1.重庆市急救医疗中心骨科,重庆 400014;2.重庆医科大学临床学院烧伤整形外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨汉防己甲素对增生性瘢痕成纤维细胞增殖活力的影响及其在瘢痕治疗中的意义。方法:利用瘢痕成纤维细胞体外培养模型,采用 MTT 记数、流式细胞仪记数及氯胺 T 法,观察并分析了汉防己甲素对瘢痕成纤维细胞增殖活力以及细胞外胶原量的影响,并采用直线相关法分析两者的关系。结果:汉防己甲素剂量及时间依赖性地使细胞生长曲线压低,群体倍增时间延长,细胞外胶原蛋白量减少且两者呈直线正相关。结论:汉防己甲素对增生性瘢痕成纤维细胞具有抑制作用,且此正为其抗瘢痕作用机理之一。

【关键词】粉防己碱/药理学;瘢痕,增生性/药物疗法;成纤维细胞

【中国图书分类法分类号】R961;R329.2+8 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－11－04

Effects of tetrandrine on fibroblast's proliferation derived from hypertrophic scar

CAO Zhidong, et al

(*The First Aid Center of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To probe into the effects of tetrandrine on fibroblast proliferation derived from hypertrophic scars and evaluate the role of tetrandrine in the treatment of scars. *Methods*: Taking the cultured fibroblasts derived from human hypertrophic scars as model, the effects of tetrandrine on fibroblast proliferation and content of extracellular collagen were observed and analyzed by MTT reduction assay, flow cytometry after propidium iodide staining and modified chloraseptine T oxidizing assay. Besides, their relationship was analyzed by linear correlation. *Results*: Growth curve descent, TD prolonging and extracellular collagen reduction in a dosage and time dependent manner were observed. Moreover, they changed in positive correlation with each other. *Conclusion*: Tetrandrine can inhibit fibroblast biological action derived from hypertrophic scars, which is one of the mechanism of anti－scarring action of tetrandrine.

【Key words】Tetrandrine/pharmacology; Scar, Hypertrophic/drug therapy; Fibroblast

瘢痕的形成是组织损伤修复的正常过程[1],过度的瘢痕增生可给患者带来外观畸形及功能障碍,也给医疗工作带来了巨大的困难。目前,随着细胞生物学、基因工程技术的发展应用,有关瘢痕病理机制的研究已有较大的突破,但仍未能推出较为理想的防治瘢痕药物,其原因在于一些已证实有效的药物存在较大的毒副作用以及作用机制不明确等问题[2]。近年来的研究表明,中医药在该领域有着良好的前景[3]。在体外将一系列梯度浓度的汉防己甲素(从粉防己根茎中提取出的具有高效低毒活性的纤维化抑制剂)作用于原代培养的增生性瘢痕成纤维细胞,研究其对瘢痕成纤维细胞增殖活力的影响,以探讨其防治瘢痕的可能性。

作者介绍:曹治东(1976－),男,住院医师,硕士生,主要研究方向:增殖性瘢痕的药物治疗。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

汉防己甲素(Tetrandrine. TET)由江西彭泽制药厂,DMEM 培养基购于 HyClone－PIERCE 公司,MTT(噻唑蓝)、PI(碘化丙啶)均购于 SIGMA 公司,氯胺 T 由中国科学院上海生物化学研究所提供。

1.2 实验分组

将 TET 先用无水乙醇溶解成 1g/L 溶液,再用培养液稀释为所需浓度的含药培养液(2mg/L、4mg/L、8mg/L),分别标记为 T1 组、T2 组、T3 组,乙醇在实验中的最终浓度为 1‰,空白对照组以等量的培养液处理。

1.3 成纤维细胞培养

组织标本取自人耳垂增生性瘢痕,近期无使用抗瘢痕药物史,不伴有恶性肿瘤等严重疾病。应用组织块贴壁法行成纤维细胞原代培养[4]。待细胞基本长满瓶壁后,用 0.2% 胰蛋白酶消化传代。本实验所用成纤维细胞为第四代。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 生长曲线的测定[5]

选生长状态良好的成纤维细胞,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中,共 7 块,置 5% CO_2 孵箱中,在 37℃、饱和湿度下培养 24h 后,实验组按实验设计换所需浓度的含药培养液,乙醇对照组换含 1‰乙醇的培养液,空白对照组仅加入等量培养液,每组均重复 5 孔,继续培养,从第 24h 起每日取出一块培养板,以 MTT 法测其光密度(A),算出其均值,按"抑制率 = 实验组 A - 空白对照组 A/空白对照组 A"计算抑制率,最后以时间为横轴,A 为纵轴绘制生长曲线。并按杀伤率 = $[(N_0-N_1)/N_0]\times100\%$(N:Y 轴截距),TD = $t.\log2/(\log N_t-\log N_0)$(t:对数生长期,N:接种后及接种 t 小时后的 A)计算药物对细胞的杀伤率及药物对细胞群体倍增时间(TD)的影响。

1.5 细胞周期的检测

同上接种细胞、用药 48h 后,收集细胞并固定,然后依次进行样品清洗、RNA 酶消化、PI 染色,最后以 488nm 的激发波长上机测定并用 MA fit LT2.0 软件分析。

1.6 成纤维细胞外胶原蛋白总量的测量

采用改良的氯胺 T 法,具体步骤参考 Inayama 法[6]。

1.7 统计学分析

以 TET 对成纤维细胞的杀伤率为自变量,TET 对成纤维细胞外胶原蛋白量的抑制率为因变量,分析其直线相关关系。

2 结 果

2.1 细胞增殖实验

在本实验条件下,TET 在 2mg/L~8mg/L 之间可明显抑制瘢痕成纤维细胞的增殖,使生长曲线压低,群体倍增时间延长,且具有明显的剂量及时间依赖性($P<0.01$)(图 1、表 1),流式细胞仪检测结果显示 TET 可使成纤维细胞 G_2-M 期细胞比例明显增多($P<0.01$),S 期与 G_2-M 期时相时间明显延长($P<0.01$)(表 2),乙醇对照组和空白对照组无显著差异($P>0.05$)。

表 1 TET 对成纤维细胞的杀伤率及群体倍增时间的影响

组别	杀伤率(%)	TD 值(小时)($\bar{x}\pm s$)	P 值
空白对照组		27.12±1.21	
乙醇对照组		27.14±1.02	>0.05
T1 组	29.41	49.56±1.14	<0.01
T2 组	52.46	61.12±0.89	>0.05
T3 组	95.42	80.29±0.57	<0.01

注:P 值表示各组与其前一组比较的结果

2.2 细胞外胶原蛋白总量

在本实验条件下,TET 呈浓度依赖性和时间依赖性地降低成纤维细胞外胶原蛋白量($P<0.01$,T_2 组抑制率高于阳性对照组(表 3)。

2.3 相关分析

$r=0.983$,$P<0.01$,说明两者呈显著的直线正相关。

表 2 TET 对成纤维细胞增殖周期的影响($\bar{x}\pm s$)

浓度(mg/L)	细胞分布(%)			时相时间(h)		
	G_0-G_1	S	G_2-M	G_0-G_1	S	G_2-M
空白对照	80.1±4.1	12.9±1.2	6.9±3.8	92.6±11.0	5.7±1.2	5.7±1.2
T1 组	72.6±4.3	14.3±1.0	13.1±1.3	81.2±10.0	5.1±0.8	7.9±0.9
T2 组	65.4±6.1	11.1±1.1	23.5±2.8	96.6±7.4	8.4±0.2	8.1±0.7
T3 组	62.1±2.8	7.6±0.7	30.3±1.7	111.6±12.8	11.3±0.9	11.3±0.9

表 3 汉防己甲素对成纤维细胞胶原蛋白合成的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	1d(ug/mL)	2d(ug/mL)#	3d(ug/mL)##
空白对照组	0.64±0.01	0.71±0.04	0.84±0.02
乙醇对照组	0.63±0.03	0.70±0.04	0.85±0.01
T1 组(抑制率)**	0.47±0.01	0.52±0.01	0.59±0.05
	(43.21)	(48.78)	(63.25)
T2 组(抑制率)***	0.31±0.01	0.32±0.03	0.38±0.01
	(53.89)	(59.78)	(76.45)
T3 组(抑制率)***	0.27±0.06	0.30±0.02	0.23±0.03
	(64.10)	(68.14)	(90.32)

说明:各实验组与空白对照组的比较结果:*$P<0.05$;**$P<0.01$;***$P<0.001$;实验组两两比较结果:T_1 组 vs. T_2 组 $P<0.01$;T_2 组 vs. T_3 组 $P<0.01$;实验组各时相的抑制率比较:#$P<0.05$;##$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

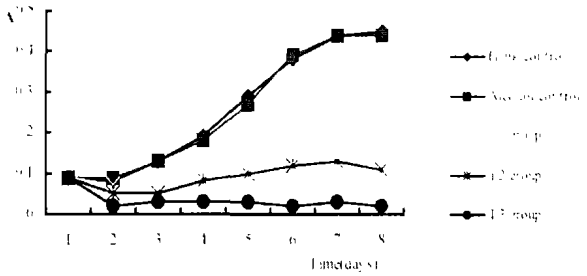


图 1 TET 对成纤维细胞生长曲线的影响

3 讨 论

成纤维细胞是导致瘢痕形成和增殖的关键,它的过度增殖及其胶原合成与降解失衡,构成了增生性瘢痕形成的生物学基础[7]。因此,了解与控制瘢痕成纤维细胞的生物学行为是防治瘢痕形成与发展的关键。目前对增生性瘢痕的药物治疗主要有类固醇激素、抗代谢药和免疫抑制剂等,虽然都有一定的疗效,但均因易复发或严重的全身性毒副作用而限制了临床应用,因此寻找一种高效低毒的抗瘢痕药物势在必行。

汉防己甲素系千金藤属防己科植物粉防己的主要生物活性成分,属双苄基异喹啉类化合物。研究证明 TET 系 Ca^{2+} 拮抗剂,既可阻滞细胞膜电压门控通道介导的 Ca^{2+} 内流,还可以阻滞受体门控通道干预细胞内 Ca^{2+} 分布,从而阻断有关病理过程[8],已有人证实该药对矽肺、肝硬化和肾小球硬化等内脏纤维化疾病具有较好的疗效[9,10],但对增生性瘢痕的防治作用如何,却鲜有报道。本实验利用瘢痕成纤维细胞体外培养模型,采用 MTT 记数、PI 染色流式细胞法,观察并分析了汉防己甲素对瘢痕成纤维细胞增殖活力的影响。结果表明,在本实验条件下,TET2mg/L 以上即可呈浓度和时间依赖性地抑制成纤维细胞的增殖、分裂,使细胞生长周期停滞,细胞发生调亡。

胶原等细胞外基质的合成与降解失衡,在细胞外过多沉积是瘢痕的基本病理特征,所有抗瘢痕药物的最终目的就是降低细胞外基质的沉积。羟脯氨酸(4-羟脯氨酸)是胶原蛋白特有的氨基酸,其含量相对恒定,据此通过测定羟脯氨酸是胶原定量的常用方法。本实验利用羟脯氨酸氧化后,其所形成的结构能与艾氏试剂(对二甲氨基苯甲醛)缩合而成红色的产物来定量和分析 TET 对成纤维细胞外胶原含量的影响。结果表明,实验浓度的 TET 能显著抑制细胞外胶原蛋白沉积,也具有浓度和时间依赖性。本实验还发现 1‰乙醇对成纤维细胞的生长和胶原合成功能均无影响。

我们还采用直线相关分析法,进一步分析了 TET 对成纤维细胞的抑制率与胶原蛋白抑制率的关系,结果表明两者呈明显的直线正相关,这就说明抑制成纤维细胞增殖分裂正是 TET 抗增生性瘢痕作用机理之一,此外由实验我们还可以发现各实验组各时相对胶原蛋白的抑制率明显高于对成纤维细胞增殖活力的抑制率,说明还有其他的作用机制存在,有必要深入研究。

参 考 文 献

[1] Haverstock-B-K. Hypertrophic scars and keloids[J]. Clin Podiatr Surg,2001;18(1):147-159.

[2] Banfalvi-T,Baer-A,Remenar-E,et al. Treatment of keloids(review of literature, therapeutic suggestion)[J]. Orv Hetil,1996;137(1):1861-1864.

[3] 商庆新,张涤生,关文祥,等.丹参和川芎嗪对瘢痕成纤维细胞 DNA 含量及细胞周期过程的影响[J].中国修复重建外科杂志,1998;12(6):325-328.

[4] 司徒镇强,主编.细胞培养[M].西安:世界图书出版社,1996;69-71.

[5]鄂 征,主编.组织培养和分子细胞学技术[M].北京:北京出版社,1995;78-98.

[6] Inayama-S,Shibata-T,Ohtsuki-J,et al. A new microanalytical method for determination of hydroxyproline in connective tissue[J]. Keio-J-Med,1978;27(1):43-46.

[7] Tredget-E-E,Nedelec-B,Scott-P-G,et al. Hypertrophic scar, keloids, and contracture: the cellular and molecular basis for therapy[J]. Surg Clin North Am,1997,77(7):701-703.

[8] Liu-Q-Y,Karpinski-E,Rao-M-R,et al. TET: a novel calcium channel antagonist inhibits typel calcium channels in neuroblastoma cells,Neuropharmacology[J]. 1991;30(12A):1325-1231.

[9] Liu-B-C,He-Y-X,Miao-Q,et al. The effects of TET(TT) and silicosis olyvinylpyridine-N-oxide (Pvno) on gene expression of type Ⅰ and type Ⅲ collagens during experimental[J]. Biomed-Environ-Sci,1994;7(3):199-204.

[10] Kamimura-S,Gaal-K,Britlon-R-S,et al. Increased 4-hydroxynonenal levels in experimental alcoholic liver diseaser: association of liqid peroxidation with liver fibrogenesis[J]. Hepatology,1992;16(3):448-453.