DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.027
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol.25, No.17
1562 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)17-1562-02

三七总甙对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖及胶原合成的作用

刘剑毅[1],李世荣[1],纪淑兴[2],胡晓红[3],覃 霞[1] ([1]第三军医大学附属西南医院整形外科,重庆 400038;[2]中山大学中山眼科中心免疫室,广州 510060;[3]第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所移植免疫室,重庆 400038)

提 要:目的 观察三七总甙对体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞增殖及胶原合成的作用,以寻找治疗人增生性瘢痕的有效药物。方法 体外培养人增生性瘢痕成纤维细胞,分别应用MTT比色法和^{3}H-脯氨酸掺入法检测三七总甙作用后细胞增殖及胶原合成的变化。结果 和对照组相比,三七总甙能够显著抑制成纤维细胞增殖及胶原合成($P<0.01$)。结论 三七总甙具有体外抗纤维化作用,可能成为治疗增生性瘢痕的有效药物。

关键词:三七总甙;增生性瘢痕;成纤维细胞;增殖;胶原合成
中图法分类号:R282.71;R329.2+8;R619+.6 文献标识码:A

Effects of panax notogin seng on the proliferation and collagen synthesis of the cultured human hypertrophic scar fibroblasts *in vitro*

LIU Jian-yi, LI Shi-rong, JI Shu-xing, HU Xiao-hong, QIN Xia (Department of Plastic and Aesthetic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of panax notogin seng on the proliferation and collagen synthesis of the cultured human hypertrophic scar fibroblasts *in vitro* to seek the effective drug for human hypertrophic scar. Methods The human hypertrophic scar fibroblasts were cultured *in vitro*. The MTT test and H^3-proline incorporation method were used to detect the effects of panax notogin seng on the proliferation and collagen synthesis of the cultured human hypertrophic scar fibroblasts. Results Compared with the control groups, panax notogin seng can markedly inhibit the proliferation and collagen synthesis of the cultured human hypertrophic scar fibroblasts ($P<0.01$). Conclusion Panax notogin seng has anti-fibrotic effect *in vitro* and may be an effective drug for the treatment of human hypertrophic scar.

Key words: panax notogin seng; hypertrophic scar; fibroblast; proliferation; collagen synthesis

增生性瘢痕(Hypertrophic scar, HS)是临床上常见的病理性瘢痕,其增生和挛缩常常导致病人外观畸形和功能障碍。虽然目前其发病机制还不清楚,但是寻找其有效治疗药物一直是研究者们努力的方向。已有研究表明中药三七总甙(Panax notogin seng, PNS)具有抗肝、肾纤维化的作用[1,2],并已用于肝硬化和糖尿病终末期肾纤维化的临床治疗,但是PNS对HS作用方面的研究尚未见报道。本实验通过观察PNS对体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞(Hypertrophic scar fibroblast, HSF)增殖及胶原合成的作用,旨在为临床防治HS提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

PNS购自云南植物药厂,MTT显色剂购自Sigma公司,^{3}H-脯氨酸购自上海原子能研究所,DMEM细胞培养液、小牛血清、胰蛋白酶购自华美生物工程公司;日本Olympus倒置相差显微镜,美国Beckman 3350型自动酶联免疫检测仪,美国Beckman Coulter LS-6500液体闪烁计数仪。

1.2 细胞培养

实验所用HS组织均为我科HS患者手术标本,均为烧伤创面愈合3个月以上瘢痕仍持续增生者,共10例。所取HS特点为外观发红充血、质硬、高出皮面1 cm以上,瘢痕增生局限于皮损区,局部伴瘙痒或疼痛等不适。应用组织块法进行HSF的原代培养,实验时应用第5代细胞。将处于生长期的HSF以2×10^4/ml的细胞密度接种于96孔细胞培养板中,每孔体积100 μl(用于MTT比色实验),以5×10^4/ml的细胞密度接种于96孔细胞培养板中,每孔体积200 μl(用于^{3}H-脯氨酸掺入实验)。实验所用PNS浓度分别为0、0.5、1.0、1.5 mg/ml。

1.3 MTT比色法检测细胞增殖和细胞毒性

分别于PNS处理24 h后在倒置相差显微镜下观察细胞形态,并向每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)10 μl,每组设3个复孔。在37 ℃、5 % CO_2条件下继续培养4 h,终止培养,吸弃上清液。每孔加入150 μl DMSO液,在振荡器上振荡混匀,使紫色结晶物充分溶解。选择490 nm波长,在自动酶联免疫检测仪上测定各

作者简介:刘剑毅(1975-),男,山东省淄博市人,硕士,医师,主要从事病理性瘢痕的基础和临床方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68754000-73091

收稿日期:2003-06-30;修回日期:2003-07-02

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

孔光密度(Optical density, OD)值。每孔重复 3 次。以时间为横轴, 光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.4　^{3}H-脯氨酸掺入法检测细胞胶原合成

分别于 PNS 处理 24 h 后吸弃上清液, 加入^{3}H-脯氨酸(1.85×10^{-4}Bq/孔)、维生素 C、β-氨基丙腈混合液共 100 μl 继续培养 10 h, 吸弃上清, 0.25%胰蛋白酶消化细胞, 多头细胞收集器收集细胞于玻璃纤维纸上, 液闪测定仪进行液闪计数。每组设 3 个复孔, 实验结果以 Bq/1 000 细胞表示。

1.5　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　体外培养 HSF 的形态学观察

倒置相差显微镜下观察 HSF 生长排列较规律, 多呈放射状、编织状或漩涡状排列。细胞界限较清楚, 表面光滑, 细胞核呈类圆形或长椭圆形。细胞体较大, 呈棱形、长梭形或不规则三角形, 向两极突起, 胞质向外伸出 2~3 个长短不同的突起。

2.2　细胞增殖和细胞毒性

应用 MTT 比色法测定 HSF 增殖活力, 结果见表 1。与空白对照组相比, 各浓度组 PNS 作用后 HSF 增殖活力均降低, 且具有浓度依赖性, 统计学分析差别具有非常显著性意义($P<0.01$)。在倒置相差显微镜下观察可见 1.5 mg/ml 组细胞形态明显收缩, 部分细胞飘浮、崩解死亡, 其余各组细胞形态正常。

表 1　PNS 对 HSF 增殖的作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of PNS on the proliferation of HSF($\bar{x}\pm s$)

Concentration(mg/ml)	n	D_{490}
0	10	0.217±0.025
0.5	10	0.146±0.018 *
1.0	10	0.115±0.009 *
1.5	10	0.093±0.042 *

*: $P<0.01$ *vs* 0 group

2.3　细胞胶原合成

应用^{3}H-脯氨酸掺入法检测 HSF 胶原合成, 结果见表 2。与空白对照组相比, 各浓度组 PNS 作用后 HSF 胶原合成率均降低, 且具有浓度依赖性, 统计学分析差别具有非常显著性意义($P<0.01$)。

表 2　PNS 对 HSF 胶原合成的作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of PNS on the collagen synthesis of HSF($\bar{x}\pm s$)

Concentration(mg/ml)	n	Bq/1 000 cell
0	10	3.71±0.42
0.5	10	2.24±0.27 *
1.0	10	2.05±0.08 *
1.5	10	1.84±0.47 *

*: $P<0.01$ *vs* 0 group

3　讨论

HS 是皮肤创面愈合后瘢痕持续增生的一种病理现象, 其病理本质是以成纤维细胞为主的细胞成分过度增殖和以胶原为主的细胞外基质过度沉积, 其中胶原主要由成纤维细胞合成分泌产生, 因此后者的数量和功能状态在很大程度上决定了 HS 纤维化的程度。传统治疗 HS 的方法包括局部加压、注射糖皮质激素和浅层放射治疗等, 它们在治疗 HS 的同时, 也会产生一些副作用和操作上的不便。现在越来越多的研究者们将寻找治疗瘢痕药物的目光转移到祖国传统中草药上。

PNS 为传统中药材五加科多年生人参属植物三七的主要有效成分。药理学研究证实 PNS 具有理血补气、滋补强壮、清肿定痛、耐缺氧、降血脂血糖、改善血液循环、增加机体免疫力、抗炎、抗衰老及护肝等多方面的生理活性[3]。根据中医学理论, 瘢痕发病机制主要有以下四方面: 气血壅滞、湿热博结, 气亏阴虚、血燥筋急, 经络痹阻, 邪毒与体内浊气、淤血、痰湿博结。理气活血、软坚散结为其治疗原则[4], 因此应用 PNS 防治 HS 具有充分的理论依据。

众多研究表明 PNS 具有延缓或阻止肝、肾和肺纤维化的作用, 其作用机制可能是: ①抗脂质过氧化作用, 改善微循环; ②抑制炎性细胞渗出与趋化, 减少细胞因子产生和释放; ③抑制成纤维细胞增殖, 减少胶原合成和分泌; ④调节免疫功能, 减轻细胞损伤, 增强胶原酶活性, 促进已合成的胶原降解等[5~7]。但 PNS 是否具有抗 HS 纤维化作用的研究国内外未见报道。本实验研究表明, PNS 在一定浓度范围内可以抑制体外培养的 HSF 的增殖和胶原合成, 其浓度大于 1.5 mg/ml 时会对细胞产生毒性作用, 因此 PNS 具有体外抗瘢痕纤维化的作用。该发现为进一步探索其对 HS 纤维化的防治作用和作用机制提供了实验依据。

作为祖国传统中药材的三七具有资源丰富、价格低廉、药效稳定等优点, 因此其在治疗 HS 方面具有良好的应用前景, 有望成为临床防治 HS 的有效药物。其具体作用机制仍有待于进一步深入研究。

参考文献:

[1] 刘成海, 熊　磊, 刘　平, 等. MTT 法观察三七总甙对 NIH/3T3 成纤维细胞毒性作用与增殖的影响[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1999, 7(4): 203-205.

[2] 张国强, 叶任高, 孔庆瑜, 等. 三七总甙诱导间质纤维化人肾成纤维细胞凋亡及其分子机理初探[J]. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(2): 93-95.

[3] 陈　英. 三七总甙的的药理研究及临床应用进展[J]. 广西医学, 1998, 20(6): 1109-1112.

[4] 蔡景龙, 张宗学. 现代瘢痕治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 220-223.

[5] 张荣华. 三七抗肝纤维化的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(4): 307-310.

[6] 韦　颖, 樊均明, 潘丽萍. 三七总甙对人肾成纤维细胞的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(1): 47-49.

[7] 李学军, 崔社怀. 三七总甙及甲泼尼龙对实验大鼠肺纤维化的干预作用及机制的初步探讨[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(9): 520-523.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net