

文章编号:1001-6880(2014)7-1014-07

# 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对增生性瘢痕影响的研究

李昕珊<sup>1</sup>,岳毅刚<sup>1\*</sup>,张克勤<sup>2</sup>,孙瑞军<sup>3</sup>,陈乃玲<sup>3</sup><sup>1</sup>桂林医学院附属医院整形外科,桂林 541000; <sup>2</sup>桂林市南溪山医院整形外科,桂林 541000;<sup>3</sup>河北联合大学,唐山 063000

**摘要:**本实验通过建立增生性瘢痕的动物模型探讨人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对增生性瘢痕的治疗效果。选取十分成熟的兔耳增生性瘢痕模型,每只兔子做 5 处增生性瘢痕,每个瘢痕做不同处理:空白对照组(a),生理盐水注射组(b),药物浓度分别为:0.2 mg/mL(c)、0.4 mg/mL(d)、1.0 mg/mL(e),共 5 组。通过 HE、VG 染色,计算 HI 和胶原纤维含量等发现人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 可使得瘢痕增生情况有所抑制。免疫组织化学上相关胶原 I 型蛋白和 Caspase 3 的表达以及原位杂交检测胶原 I 型 mRNA 的表达从更深的角度表明了该药物有促进成纤维细胞凋亡的趋势和抑制胶原增生的现象。实验结果表明人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 有抑制增生性瘢痕发展的作用。

**关键词:**人参皂苷;增生性瘢痕;兔耳瘢痕模型

中图分类号:R282

文献标识码:A

## Therapeutic Effect of Ginsenoside Rb<sub>1</sub> on Hypertrophic Scar

LI Xin-shan<sup>1</sup>, YUE Yi-gang<sup>1\*</sup>, ZHANG Ke-qin<sup>2</sup>, SUN Rui-jun<sup>3</sup>, CHEN Nai-ling<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541000, China; <sup>2</sup>Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541000, China; <sup>3</sup>Hebei United University, Tangshan 063000, China

**Abstract:** In this study, the therapeutic effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on hypertrophic scar was investigated through the establishment of animal model. A mature hypertrophic scar model on rabbits' ears was established and 5 hypertrophic scars were made on each rabbit. The hypertrophic scars were separated into 5 groups: blank control group (a), physiological saline group (b), ginsenoside Rb<sub>1</sub> treatment groups: 0.2 mg/mL (c), 0.4 mg/mL (d) and 1.0 mg/mL (e). The results of HE, VG staining, HI and collagen fiber content showed that ginsenoside Rb<sub>1</sub> can reduce the hyperplasia of scar. Furthermore, immunohistochemistry and situ hybridization were separately used to test the expression of collagen I, Caspase 3 and mRNA of collagen I. It was found that ginsenoside Rb<sub>1</sub> can promote apoptosis of fibroblast and inhibit collagen hyperplasia. Hence, it was concluded that ginsenoside Rb<sub>1</sub> played an effective role in the inhibition of hypertrophic scar development.

**Key words:** ginsenoside; hypertrophic scar; rabbit ear scar model

瘢痕组织是人体创伤修复过程中的一种必然产物,防治增生性瘢痕的方法有很多如药物、放射<sup>[3]</sup>、压力和手术等方法。根据已知的增生性瘢痕的可能机制和发病原因<sup>[6]</sup>已形成了从抑制成纤维细胞增殖和胶原代谢的水平寻找治疗和预防瘢痕增生的方法。

传统中医对瘢痕的治疗累积了丰富的经验,且有较显著疗效<sup>[13]</sup>。人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 为人参中提取的单体成分,刘鹤松等<sup>[12]</sup>已对人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 抑制增生性瘢痕的效果做了阐述,认为有效。对本研究选用更为经济廉价的 Rb<sub>1</sub> 成分同样以兔耳增生性瘢痕为

研究对象,通过 VG 特异性胶原染色,和免疫组织化学相关因子的检测和原位杂交检测胶原 I mRNA,同样认为人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 有抑制增生性瘢痕发展的作用。

通过建立增生性瘢痕的动物模型对瘢痕的外部形态和显微镜下的微观结构的观察和测量等方式,对瘢痕的动态发展和应用药物干预的发展变化做阐述。应用原位杂交方法检测胶原 I 型 mRNA 的表达,从分子的角度进一步说明了人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 有抑制增生性瘢痕进一步发展的可能。

## 1 材料与仪器

新西兰大耳白兔 15 只,雌雄不限,体重 2.6 ~

3.5 kg, 单笼饲养, 由河北联合大学实验室提供。人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 纯品(纯度≥98%), 天津灏洋生物科技有限公司提供, 用无菌注射用水配制成浓度分别为 0.2、0.4、1.0 mg/mL; 胶原 I 型蛋白(bs-0578R), Caspase 3 试剂盒(bs-0081R); 兔二步法检测试剂盒(PV-6001); DAB 及 DAB 增强剂(ZLI-9034)购自北京中衫金桥生物技术有限公司; VG 染色试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司); 原位杂交胶原 I 型 mRNA 试剂盒(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司提供), 含公司设计的成品阳性探针和阴性探针。防脱片及无 DNA 和 RNA 酶处理的氨基酸载玻片(中国医学科学院生物医学工程研究所提供), DEPC, 光学显微镜, 图像分析软件 Motic 等由河北联合大学基础实验室提供。

## 2 试验方法

### 2.1 增生性瘢痕动物模型的建立

实验兔子适应性喂养 7 d 后, 根据李荟元<sup>[1]</sup>等建立的增生性瘢痕动物模型法, 严格无菌操作下, 用 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉 3.0 mL/kg。分别于兔耳腹侧面中段的内、外、中部(避开可见血管)用直径约为 1.0 cm 的打孔器各形成一个圆形标记, 每只耳朵 2~3 处, 间隔≥1.0 cm, 建立兔耳增生性瘢痕模型。术中严格无菌操作切除圆形标记范围内除包括软骨膜在内的全层皮肤至软骨膜表面, 保留软骨, 压迫止血, 不予包扎。术后 7 d 严格无菌操作下去除创面新生的肉芽组织和血痴, 不包扎, 任其愈合。

### 2.2 实验分组、标本取材固定

每只兔子耳 5 处创面分别为空白对照组(a): 术后不进行任何处理; 生理盐水对照组(b): 上皮化后(即 26 d 后)在兔耳创面周围皮下注射生理盐水; 治疗组上皮化(约 26 d)后兔耳创面周围皮下注射不同浓度的人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(0.2 mg/mL, c)、(0.4 mg/mL, d)、(1.0 mg/mL, e)。每处创面注射剂量约为 0.3 mL, 每 3 d 一次, 共三次。大体观察创面愈合和增生性瘢痕情况。

分别于术后第 2、4、6 周切去瘢痕组织标本每次取 4 只兔子, 放于质量分数为 4% 的多聚甲醛固定液中固定, 24~72 h 石蜡包埋, 沿组织横切面进行切片(从组织取材至切片凡是接触组织的手术器械, 固定液, 切片刀片, 盛放组织的玻璃瓶, 塑料包埋盒, 切片展片水等全部必须无酶处理, 以免污染, 操作人

员数量尽量少, 操作过程戴帽子口罩手套并少言少语, 原位杂交用专用载玻片。), 进行 HE 染色及 VG 染色, 胶原 I 型蛋白和 Caspase 3, 图像分析系统测量计算 HI, 胶原纤维密度, 原位杂交测胶原 I 型 mRNA 的表达。

### 2.3 肉眼和显微镜下观察和测量

创面愈合情况: 术后 26 d, 肉眼观察各组增生性瘢痕的硬度, 色泽, 形态。

镜下观察: 常规 HE 染色, 红色为胞浆成分, 蓝紫色显示细胞核。VG 染色: 胶原纤维染成红色, 肌纤维、神经胶质、红细胞染黄色, 细胞核呈蓝黑色或棕蓝色。

瘢痕指数测量: 应用 Motic 软件系统, HE 染色后镜下观察, 低倍显微镜标尺测量瘢痕厚度, 测量三次取平均值。计算增生性瘢痕指数 HI(用来测量真皮层增生程度的指标)<sup>[2]</sup>。

$$HI = \frac{SH}{DH}$$

胶原含量测定: VG 染色, ×200 倍光镜下, 每个切片随机选取 5 个视野, 利用图像分析系统计算胶原面积<sup>[5]</sup>, 结果取均数。

### 2.4 免疫组化(Collagen I, Caspase-3 蛋白的表达)

Collagen I: 应用常规二步免疫组化法严格按试剂和说明书操作, 以 PBS 代替一抗为阴性对照, 有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 在 200 倍光镜观察下随机取 5 个视野进行计数, 结果取均数。

$$\text{阳性细胞反应率} = \frac{\text{阳性细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

用免疫组化的方法进行含量的测定, 石蜡切片经二甲苯脱蜡两次每次 5 min, 酒精浸洗无水、95% 各两次, 每次 5 min, 后放入 0.5 Triton 15 min, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min, 水化 5 min, 用 Super PAP Pen 沿组织周围画圈, 点上质量浓度为 1 g/L 的消化酶 37 °C, 20 min。放入 PBS I、II、III 各 5 min, 于湿盒中滴加一抗, 4 °C 冰箱过夜(或 37 °C, 1 h 30 min), 取出置常温, PBS 冲洗 3 次, 5 min/次, 滴加二抗, 37 °C 孵育 40 min, PBS 冲洗 3 次, 5 min/次, DAB 显色, 水冲 > 30 min, 苏木素复染 3 min, 盐酸酒精分化 2 s, 自来水冲洗 > 30 min, 95%、无水酒精各两次, 每次 5 min, 二甲苯两次, 15 min/次, 中性树胶封片, 晾干。

Caspase-3: 应用常规二步免疫组化法严格按试剂和说明书操作, 以 PBS 代替一抗为阴性对照, 棕黄色颗粒者为阳性细胞, 在 200 倍光镜观察下随机取 5 个视野进行计数, 结果取均数。

## 2.5 原位杂交测 I型胶原 mRNA 的表达

探针浓度:8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  杂交液。

Collagen 1 A 1 探针设计(试剂公司设计的成品探针):

NM\_000088 5927 bp homo sapiens collagen, type I ,alpha 1 ( COL1A1 ),mRNA.

AY633663 524 bpOryctolaguscuniculus prepro-alpha-1 collagen type I mRNA,

XM\_001081230 5862 bpRattusnorvegicusprocollagen, type 1 ,alpha 1 ( Col1a1 ),mRNA.

NM \_ 007742 4709 bpMusmusculusprocollagen, type I ,alpha 1 ( Col1a1 ),mRNA.

HRM1304-1277 TGTCCATCAGCAC-CAGGGTTCCAGCAG

HRM1358-1325 AAGCCAGGAGCACCA-G-CAATACCAGGAGCACCAT

HRM3431-3402 TGTTCGCCTGTCTCACCTT-GTCACCACGG

R369-336 CGTGCTTCTTCTCCCTGGGTTCTT-GCTGATGTA

R481-456 TCGGTGGACATGAGGCCAG-GAACGT

Collagen 1 A 1 探针合成序列:

5'-TCTTC TCCTT GGGGT TCTTG CTGAT GTA

5'-CGGT GGACA TGAGG CGCAG GAACG T



图 1 动物模型制作结果

Fig. 1 Images of animal model of hypertrophic scar at different stages

1. 造模术后第一天;2. 达到完全上皮化时,造模成功;3. 用药后第 6 周

1. The first day after model making;2. Modeling success;3. sixth weeks after medication

## 3.2 组织学变化

常规 HE 染色:正常组织表皮细胞层数少,细胞排列整齐,胶原排列整齐几乎成平行状态,间隙分明,条理性明显,细胞成分少,少见血管组织。a、b 组差别不大,表皮细胞层数明显增多,细胞排列杂乱,体积变大,胶原增生明显,胶原纤维排列杂乱扭曲难以看到整体形态,间隙不明显,常见胶原结节出

烤片后脱蜡,0.5% 曲拉通洗涤,质量分数为 3% 的过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,PBS 洗涤后复合消化,洗涤后滴加预杂交工作液,再次洗涤滴加小鼠抗地高辛孵育(在此之前所有的操作均应在无酶环境中进行,所有用品包括药物和器材均做无酶处理),洗涤后滴加高敏过氧化物酶链亲和复合物孵育,洗涤后滴加 DAB 及其增强剂显色,复染苏木素,脱水封片。

## 2.6 统计学处理

用 SPSS 13.0 进行数据处理,计量资料以“均数( $\bar{x} \pm s$ )标准差(s)”的表现形式,检查数据的方差齐性,如若不齐还需添加纠正检验,之后再进行配对 t 检验,方差分析等。选  $\alpha = 0.05$ ,当  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义, $P > 0.05$  则认为差异无统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 肉眼观察

各组创面均愈合良好,未见感染不愈,各组愈合时间约为 26 d, 外观粗略观察各组间无显著差别。瘢痕增生隆起突出于周围正常皮肤表面,但未超出创伤范围,可见 a、b 组形成的增生性瘢痕最显著,瘢痕呈圆形,范围未能超出造模时打孔器的标记范围,中央呈“小丘样”或“乳头样”凸起,质硬;c ~ e 组与前两组比较,瘢痕增生程度较轻,表面较平坦,质略软,色浅(图 1)。

现和漩涡状结构,细胞成分明显增多,细胞体积变大,血管组织数量较正常组增多。c、d、e 组随着药物浓度的增加胶原排列越显整齐数量减少,观察到的细胞成分减少,并且可见到趋于水平排列的多层胶原纤维束,新生血管和胶原结节的数量也相应减少(图 2)。

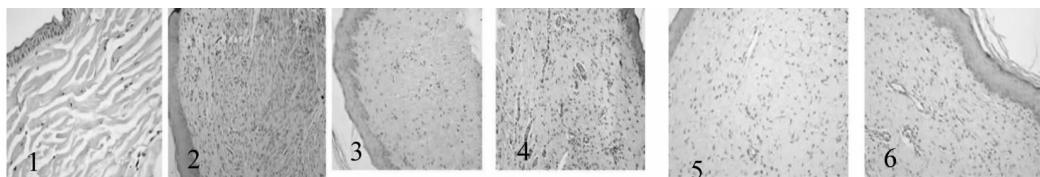


图 2 各组瘢痕 HE 染色结果

Fig. 2 Images of HE staining of hypertrophic scar

1. 正常组织 HE  $\times 400$ ; 2. a 组 HE  $\times 200$ ; 3. b 组 HE  $\times 200$ ; 4. c 组 HE  $\times 200$ ; 5. d 组 HE  $\times 200$ ; 6. e 组 HE  $\times 200$ 1. normal group  $\times 400$ ; 2. a group  $\times 200$ ; 3. b group  $\times 200$ ; 4. c group  $\times 200$ ; 5. d group  $\times 200$ ; 6. e group  $\times 200$ 

VG 染色:胶原纤维染成红色,肌纤维、神经胶质、红细胞染黄色,细胞核呈蓝黑色或棕蓝色。各组

变化如 HE 表现(如上),见图 3。

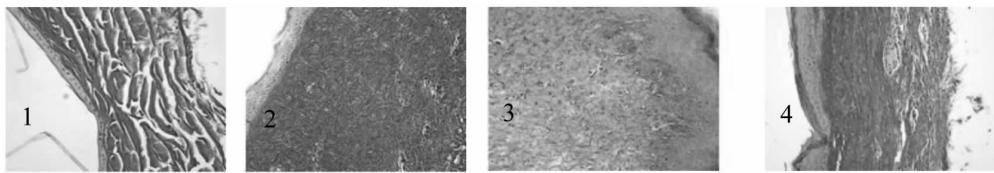


图 3 各组 VG 染色结果

Fig. 3 Images of VG staining of hypertrophic scar

1. 正常组织 VG  $\times 400$ ; 2. a,b 组 VG  $\times 200$ ; 3. c,d 组 VG  $\times 200$ ; 4. e 组 VG  $\times 400$ 1. normal group  $\times 400$ ; 2. a,b group  $\times 200$ ; 3. c,d group  $\times 200$ ; 4. e group  $\times 400$ 

瘢痕增生指数 HI 结果见表 1:a、b 组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),c~e 组的 HI 指数相比 a、b 组降低,有统计学意义( $P < 0.05$ ),c、d 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),c、d 组比 e 组的 HI 指数高,有统计学意义( $P < 0.05$ ),高浓度 1.0 mg/mL 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 有效抑制瘢痕增生。

胶原纤维密度,含量测定,结果见表 2:a、b 组之间胶原纤维密度无显著性差异( $P > 0.05$ ),c、d、e 组的胶原密度相比 a、b 组下降,有统计学意义( $P < 0.05$ ),c、d 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),c、d

组比 e 组高,有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3.3 免疫组织化学结果

Collagen I 分布特征:主要分布在真皮的细胞间质,成纤维细胞、血管壁亦见少量的阳性信号。I 型胶原蛋白的阳性表现见棕黄色颗粒,略粗,密度高,排列不规则,可呈旋涡状(如图 4)。a、b 组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),c~e 组 Collagen I 的阳性表达相比 a、b 组降低,有统计学意义( $P < 0.05$ ),c、d 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),e 组比 c、d 组的 Collagen I 阳性表达降低,有统计学意义( $P < 0.05$ )。

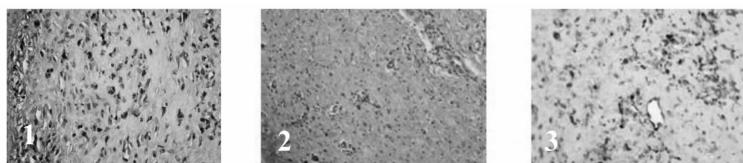


图 4 Collagen I 组织化学

Fig. 4 Collagen immunohistochemical of hypertrophic scar

1. a,b 组  $\times 400$ ; 2. c,d 组  $\times 200$ ; 3. e 组  $\times 400$ 1. a, b group  $\times 400$ ; 2. c, d group  $\times 200$ ; 3. e group  $\times 400$ 

Caspase-3:阳性表达为棕黄色颗粒信号,见局灶性分布或弥漫分布细胞和组织中,主要表达于表皮基底层细胞的胞浆内(如图 5)。a、b 组的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),c~e 组的 Caspase-3 阳性表达

相比 a、b 组升高,有统计学意义( $P < 0.05$ ),c、d 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),e 组比 c、d 组的阳性表达高,有统计学意义( $P < 0.05$ )。

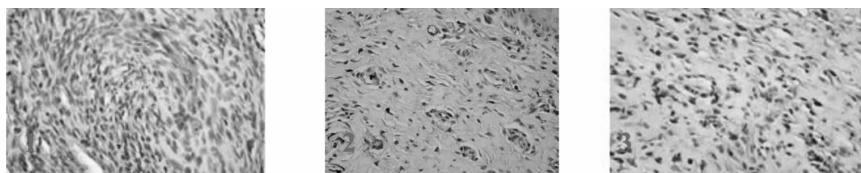


图 5 Caspase-3 组织化学

Fig. 5 Caspase-3 immunohistochemical of hypertrophic scar

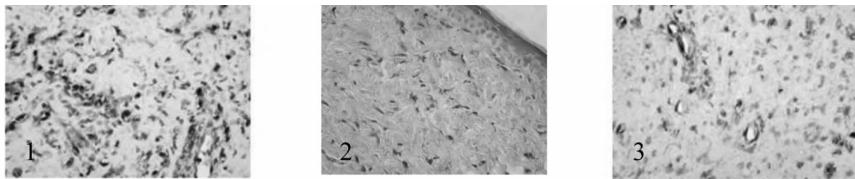
1. a,b 组  $\times 400$ ; 2. c,d 组  $\times 400$ ; 3. e 组  $\times 400$ 1. a, b group  $\times 400$ ; 2. c, d group  $\times 400$ ; 3. e group  $\times 400$ 

图 6 原位杂交染色 collagen I mRNA

Fig. 6 collagen I mRNA staining of hypertrophic scar

1. a,b 组  $\times 400$ ; 2. c,d 组  $\times 400$ ; 3. e 组  $\times 400$ 1. a, b group  $\times 400$ ; 2. c, d group  $\times 400$ ; 3. e group  $\times 400$ 

### 3.4 原位杂交的染色观察结果

阳性表达为棕黑色颗粒(使用 DAB 增强显色作用), 纤维结节处多见。图像分析结果显示 Collagen I mRNA 的表达随药物浓度增高而减少, 对照组 a、b 无差别, 相比实验组属于高表达(如图 6)。

## 4 讨论

瘢痕有正常瘢痕和病理性瘢痕两大类, 病理性瘢痕又分为增生性瘢痕和瘢痕疙瘩, 其形成是由于创伤愈合过程中纤维细胞合成胶原能力增强, 导致细胞外基质(FCM)增多和过度沉积, 胶原为其主要成分。增生性瘢痕(HS)是皮肤真皮损伤愈合后遗

表 1 HI 测量统计结果( $n = 75$ , )Table 1 The measurement results of HI ( $n = 75$ , )

组别 Group	用药后时间 Time after treatment		
	2 w	4 w	6 w
a	2.77 ± 0.30	2.62 ± 0.22	2.60 ± 0.12
b	2.80 ± 0.21	2.63 ± 0.3	2.59 ± 0.25
c	2.59 ± 0.17	2.41 ± 0.17	2.33 ± 0.35
d	2.55 ± 0.13	2.43 ± 0.17	2.19 ± 0.35
e	1.47 ± 0.21	1.30 ± 0.10	1.04 ± 0.17
<i>F</i> 19.376			
<i>P</i> < 0.05			

表 2 胶原含量测定统计结果, collagen I、Caspase-3 阳性细胞反应统计, 原位杂交染色统计(用药后第 6 w)

Table 2 The determination results of collagen content, collagen I, Caspase-3 positive cells reaction, in situ hybridization statistics( week 6)

组别 Group	胶原含量 Collagen content	Collagen I 阳性表达 Expression of Collagen I	Caspase-3 阳性表达 Expression of Caspase-3	Collagen I mRNA 表达 Expression of Collagen I mRNA
a	80.25 ± 5.23	48.92 ± 0.24	10.79 ± 0.80	49.70 ± 0.17
b	79.39 ± 4.27	45.77 ± 0.25	11.15 ± 0.42	46.56 ± 0.40
c	60.28 ± 6.07	39.58 ± 3.20	15.48 ± 1.50	40.32 ± 1.55
d	59.88 ± 3.52	37.49 ± 1.54	14.94 ± 0.76	38.09 ± 0.47
e	40.30 ± 7.14	20.69 ± 1.36	21.57 ± 1.42	22.64 ± 1.39
F	89.49	60.15	33.97	53.06
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

留的高出周围正常皮肤、发红、坚硬的病理结构,可以出现瘙痒、疼痛等不适症状,而且在不同形成阶段有不同的临床表现和发展趋势,不仅严重影响外貌和功能,也会对患者心理造成影响。

增生性瘢痕的治疗方法有:药物治疗、压迫治疗、按摩治疗、放射治疗、激光<sup>[3]</sup>、生物治疗、基因及手术治疗等。然而至今还没有发现非常令人满意的特别有效的防治策略。现有方法在疗效上都存在有一定的局限性,新方法还在不断探索中。

中药治疗瘢痕有悠久的历史,对瘢痕的认识有着独特的观点,中医学认为瘢痕形成主要由气血壅滞、经络痹阻、痰湿搏结所致,或相辅相成。治疗上亦多采用活血化瘀、攻毒散结之品。只要方法有内治法、外治法和内外兼治。以往资料对人参皂苷单体的药理作用,以及作用机制已经很深入,很多已进入分子、蛋白、基因组水平,人参皂苷单体抗细胞纤维化,促血管生成与抑制 TGF-β1 的刺激胶原增生的作用均提示人参皂苷有效成分具有促进伤口愈合预防增生性瘢痕的产生的作用。Kimura Y<sup>[4]</sup>,将低浓度人参皂甙 Rb<sub>1</sub> 应用与烧伤创面的小鼠,发现人参皂甙 Rb<sub>1</sub> 有强大的促进创面愈合能力。亦有研究认为人参皂甙 Rb<sub>1</sub> 抑制 ECM 分泌的作用<sup>[5]</sup>。赵自然<sup>[6]</sup>等认为人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 能够抑制病理性瘢痕的增生,但价格昂贵。至此对人参皂甙 Rb<sub>1</sub> 的研究主要在神经和心血管方面<sup>[7,8]</sup>,而在瘢痕的研究还属少见。但李俊飞<sup>[9]</sup>认为 Rb<sub>1</sub> 能增加正常人成纤维细胞的增殖水平,所以对 Rb<sub>1</sub> 对增生性瘢痕的治疗效果还要从用药时机、浓度和方式等多方面进行深入探讨。

现在常用于病理性瘢痕的研究途径主要有①人体瘢痕组织体外培养成纤维细胞;②观察记录临床病例和研究术后标本;③制作动物模型。

目前应用于建立增生性瘢痕动物模型的主要有新西兰白兔、日本大耳白兔、裸鼠、杜洛克雌猪等。裸鼠模型引起免疫系统缺失可将增生性瘢痕组织移植至此,进行一系列的研究分析,但由于此种瘢痕并不是物种本身所产生,所以无法细致的观测到增生性瘢痕的动态发展变化,同途径①、②,雌性杜洛克猪由于其来源和成本问题难以普遍推广。Morris<sup>[2]</sup>等首先在兔耳腹侧的创面上发现真皮过度增生现象与人类增生性瘢痕样改变相似。国内学者在兔耳腹侧成功建立了增生性瘢痕动物实验模型,并从多个侧面验证了兔耳增生块与人类瘢痕的相似性。兔耳

的增生性瘢痕因为是动物自身产生,研究者可对瘢痕的动态变化进行观察,又介于来源广泛成本问题等,成为目前研究的常用动物。

由检测结果得知 HI 和胶原密度随药物浓度的增加而下降,从外观上明显观察到瘢痕增生的抑制作用。而 c、d 组的组间差异不明显,怀疑与应用的药物浓度有关,还需以后的实验中进一步的探讨药物浓度的选择。

瘢痕组织中基质成分包括胶原纤维、结构性蛋白及蛋白多糖等,其中胶原纤维是瘢痕组织的主要成分,其中又以 I 型胶原纤维居多,I 型胶原粗、僵硬,瘢痕质地硬,弹性差。胶原的合成与降解是一个复杂的动态过程,主要涉及蛋白质的翻译、翻译后的修饰、剪接,在这个过程中,多种生物活性酶如氧化酶、蛋白酶、胶原酶和金属蛋白酶等参与其中<sup>[10]</sup>。正常情况下,胶原合成与分解呈动态平衡。当这种平衡被打破,导致成纤维、肌纤维母细胞合成胶原增多,分解减少,合成速度远大于胶原分解,最终导致了胶原沉积,从而形成瘢痕组织。成纤维细胞是产生胶原的主要细胞,所以抑制成纤维细胞的增殖和调节胶原蛋白的合成可能是治疗增生瘢痕的有效途径。

增生性瘢痕以 I 型胶原为主,所以 I 型胶原量的变化可以直接显示增生性瘢痕的增生状态。如此实验结果显示随人参皂苷药物浓度的提高,免疫组化结果中 I 型胶原的阳性表达越低,也就是说人参皂甙 Rb<sub>1</sub> 有抑制增生性瘢痕的趋势。

Caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cysteine requiring aspartateprtease caspase) 家族成员。Caspase 蛋白酶家族,是近年凋亡调控机制的研究热点。已发现的十几个家族成员,他们参与转导凋亡信号或直接作为凋亡效应分子,促进细胞骨架降解和 DNA 片断化。许多影响细胞凋亡的基因,如 p53、bcl-2、Fas、Rb 等细胞因子和药物都能通过调节 caspase 活化发挥作用。

Caspase-3 作为关键分子在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用。胶原的分解速度赶不上合成的速度以至于发生沉积,推测因为成纤维细胞的凋亡不足,过度的增殖分泌大量胶原蛋白,Caspase-3 正常以酶原的形式存在于胞核(浆)中,在凋亡的早期阶段被激活后作用于其底物。有学者发现增生瘢痕中 Caspase-3 表达降低<sup>[11]</sup>。本实验结果显示,对照组 a、b 中 Caspase-3 相比于用药组 c、d、e

的表达明显较弱,作者认为人参皂苷激发 Caspase-3 活性,促进诱导成纤维细胞的凋亡以达到治疗增生性瘢痕的作用。

前胶原是胶原蛋白的前体和胞内形式。前胶原基因是由多个外显子和内含子构成的断裂基因,它的过度表达使胶原合成异常增加,易导致瘢痕的形成,抑制基因的表达将有助于减少胶原的合成从而防治瘢痕。增生性瘢痕组织的主要成分是 I 型胶原,I 型前胶原在细胞内产生后分泌到胞外基质,通过内切肽酶等的作用,再通过聚合形成胶原纤维。故 I 型前胶原的转录及合成水平可以代表细胞的胶原合成能力。如实验结果显示,a、b 组的表达最高无差异,c、d、e 组的阳性表达与人参皂苷浓度成反比。

本研究建立动物模型,对瘢痕用药干预,通过外观形态,组织切片染色,免疫组化方法研究胶原量和细胞凋亡的变化趋势,并应用原位杂交的方法从基因的角度深入的印证人参皂苷对增生性瘢痕的治疗效果,认为有效。中药应用于增生性瘢痕期待有更深入全面的探索,从患者的安全性和依从性上考虑,传统医学在病理性瘢痕的治疗的优势上不可小觑。

## 参考文献

- 1 Li HY(李荟元),Liu JB(刘建波),Xia W(夏炜),et al. Establishment and application of experimental animal model for hypertrophic scar. *J Fourth Milit Med Univ* (第四军医大学学报),1998,19:655-657.
- 2 Morris DE,Wu L,Zhao LL,et al. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies. *Plast Reconstr Surg*,1997,100:674-681
- 3 De CarvalhoPde T,da Silva IS,Reis FA,et al. Influence of ingaalp laser (660 nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. *Acta Cir Bras*,2010,25:71-79.
- 4 Kimura Y,Sumiyoshi M,Kawahira K,et al. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng roots on burn wound healing in mice. *Br J Pharm*,2006,148:860-870.
- 5 Xie XS(谢席胜),Liu HC(刘衡川),Fan JM(樊均明),et al. Effects of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on TGF- $\beta$ 1 induced p47phox expression and extracellularmatrix accumulation in rat renal tubular epithelialcells. *J Sichuan Univ,Med Sci Edi*(四川大学学报,医学版),2009,1;106-110.
- 6 Liu HS(刘鹤松),Zhao ZR(赵自然),Lan SS(兰珊珊),et al. Research on the effect of ginsenoside-Rg<sub>3</sub> on human fibroblasts proliferation and apoptosis. *Chin J Labor Diag*(中国实验诊断学),2010,14:1697-1700.
- 7 Kong HL(孔宏亮),Li ZQ(李占全),Yuan L(袁龙). Nitric oxide synthase inhibition effect on myocardial cell hypertrophyenzyme/nitric oxide mediated by ginsenoside Rb<sub>1</sub>. *Guangdong Med J* (广东医学),2012,33:167-169.
- 8 Li YQ(李玉倩),Wang F(王芳),Chen JG(陈建国). Anti-depressant-like effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on behavior of animals. *Henan Med Res* (河南医学研究),2011,20:257-263.
- 9 Li JF(李俊飞),Zhou DX(周大兴),Hong XY(洪先业),et al. Ginsenoside Rg1, the role of human skin collagen metabolism of Rb<sub>1</sub> and Re. *J Tongji Univ,Med Sci*(同济大学学报,医学版),2011,32(3):28-32.
- 10 Peters T,SindrilaruA,HuberR,et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase in human dermal fibroblasts enhances the contraction of free floating collagen lattice: implications for ageing and hyperplastic scar formation. *Arch Dermatol Res*,2009,30:273-287.
- 11 Chen W(陈伟),Fu XB(付小兵),Sun TZ(孙同柱),et al. Effects of Fas, Fas-L and Caspase-3 expression in hypertrophic scar and the scar formation. *Med J Chin People's Liber Army*(解放军医学杂志),2002,7:580-581.
- 12 Liu HS(刘鹤松),Wang F(王芳),Wu J(吴杰),et al. Effect of ginsenoside Rg<sub>3</sub> on the expression of caspase-3, cytochrome C in rabbit ear hypertrophic scar. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志),2011,16:3106-3107.
- 13 Zhao LK(赵连魁),Gu TM(谷廷敏),Liu JC(刘建春),et al. The effect of Weixiongscar cream on bFGF and FN in hypertrophic scar. *Chin J Prac Aesthe Plas Sur*(中国实用美容整形外科杂志),2004,15:249-250.