

积雪草甙对体外培养的成纤维细胞的作用

谢举临¹, 利天增¹, 祁少海¹, 黎志明¹, 梁惠珍², 吴义方³

(中山医科大学 1. 附属第一医院烧伤科, 广东 广州 510080; 2. 病理学教研室;
3. 电子显微镜室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】探讨积雪草甙治疗增生性瘢痕的作用机制。【方法】采用光镜、电镜、³H-TdR、³H-脯氨酸掺入及 MTT 比色等方法检测成纤维细胞核 DNA 合成和胶原蛋白的合成。【结果】积雪草甙不仅能影响成纤维细胞的超微结构, 而且能抑制成纤维细胞增殖及胶原蛋白的合成。【结论】积雪草在预防和治疗增生性瘢痕中有重要作用, 其机制可能与抑制成纤维细胞增殖和胶原蛋白合成有关。

关键词: 积雪草甙/治疗作用; 增生性瘢痕/药物疗法; 胶原/药物作用; 成纤维细胞/药物作用

中图分类号: R318.1; 644 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2001)01-0041-03

The Effects of Asiaticoside on Fibroblasts *in vitro* Culture

XIE Ju-lin, Li Tian-zeng, QI Shao-hai, LI Zhi-ming, LIANG Hui-zhen, WU Yi-fang

(1. Department of Burn, First Affiliated Hospital; 2. Department of Pathology;
3. Department of Electron Microscope, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the possible mechanism of the asiaticoside used for the treatment of hypertrophic scar. 【Method】Using microscope, electron microscope, MTT test, ³H-TdR and ³H-Proline incorporation to study the effect of the asiaticoside on DNA synthesis and collagen biosynthesis of fibroblast *in vitro* culture. 【Results】The asiaticoside not only affected the ultrastructure of fibroblast, but also inhibited the DNA synthesis and collagen biosynthesis. 【Conclusion】Asiaticoside can play an important role in the prevention and treatment of scars, the mechanism may be that the asiaticoside can inhibited the DNA synthesis and collagen biosynthesis of fibroblast.

Key words: asiaticoside/therapeutic use; hypertrophic scar/drug therapy; fibroblast/drug effects; collagen/drug effects

积雪草甙(asiaticoside)是一种中草药, 别名落得打、崩大碗、马蹄, 分布于江南各地, 为唇形科植物, 性甘、辛、凉, 有清热解暑作用^[1]。现已证明, 从积雪草甙中提取的三萜皂甙成分能有效地促进伤口愈合, 对烧伤瘢痕及硬皮病等纤维化疾病有明显疗效。为进一步探讨积雪草甙治疗瘢痕的作用机理, 本研究以体外培养的成纤维细胞为实验对象, 研究积雪草甙对成纤维细胞形态及生物学作用的影响, 为瘢痕治疗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂

积雪草甙由上海医药工业研究院提供; RPMI1640 培养基系美国 GIBCO 公司生产; 新生小牛血清由广州畜牧厂提供; MTT[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 3-(4, 5-二甲基-2-噻唑)-2, 5-二苯溴化四唑, 噻唑蓝]为

收稿日期: 2000-05-22

基金项目: 广东省重点攻关项目资助(98278172)

作者简介: 谢举临(1973-)男, 江西瑞余人, 在读博士生, 研究方向: 烧伤创面愈合及瘢痕防治。

美国 GIBCO 公司产品; $^3\text{H-TdR}$ 、 ^3H -脯氨酸为中国原子能核物理所生产。二甲苯为北京化学试剂厂产品, 其余均为常规化学试剂。

1.2 方法

1.2.1 成纤维细胞培养 按文献[2]的方法, 手术中切下的增生性瘢痕组织在无菌条件下经漂洗, 剪碎, 培养于含 $\varphi = 20\%$ 新生牛血清的 RPMI 1640 全培养液中, 置 37°C , $\varphi = 5\%\text{CO}_2$ 原代培养, 待细胞接近融合时经胰酶消化传代。

1.2.2 Gimesa 染色法光镜观察 将成纤维细胞接种于盖玻片上, 待细胞呈亚汇合状态后换至含 $\varphi = 0.3\%$ 小牛血清的 RPMI 1640, 48 h 后更换至含 400 mg/L 积雪草甙, $\varphi = 20\%$ 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 培养 24 h, 用无水乙醇固定, 分别按常规处理标本、Gimesa 染色, 在光镜下观察。

1.2.3 电镜观察 接种、培养细胞和加入积雪草甙的方法同上。25 g/L 戊二醛前固定, 10 g/L 锇酸后固定, 经丙酮脱水、包埋、切片、染色后在 PHILIPS CM 10 透射电镜下观察。

1.2.4 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法研究成纤维细胞的 DNA 合成 96 孔细胞培养板, 每孔加入成纤维细胞 10^4 个, $\varphi = 20\%$ 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 $200\ \mu\text{L}$, 置 CO_2 孵箱静置 6 h 后, 弃上清液, 按分组分别加入含不同浓度积雪草甙的条件培养液, 每组设 18 个复孔。加入 $^3\text{H-TdR}$ $1.85 \times 10^{10}\text{ Bq/孔}$ 再孵育 24 h, 弃上清液, 用 $\varphi = 0.5\%$ 胰酶消化细胞, 以多头细胞收集器收集细胞于玻璃纤维纸上, 液闪测定仪闪烁计数 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量。

1.2.5 MTT 法测成纤维细胞中线粒体脱氢酶活性^[3] 将细胞悬液调节成细胞数密度为 $5 \times 10^7/\text{L}$, 接种至 96 孔培养板, 每孔 $200\ \mu\text{L}$, 培养 6 h 后, 改用无血清培养液培养 48 h, 弃培养液, 按分组加入条件培养液, 每组设 18 个复孔, 24 h 后, 加入 5 g/L MTT $10\ \mu\text{L/孔}$, 继续培养 4 h, 弃原有培养液, 洗板数次后加入无水乙醇 $200\ \mu\text{L/孔}$, 在酶标仪上测定吸光度 A_{570} 值^[3]。

1.2.6 ^3H -脯氨酸掺入法测成纤维细胞胶原蛋白的合成 成纤维细胞 $10^4/\text{孔}$, 分种于 24 孔培养板上, 静置培养 2 d 后, 弃上清, 用无血清培养液冲洗细胞 2 次, 加入条件培养液 $200\ \mu\text{L}$ 、 ^3H -脯氨酸 $1.85 \times 10^{10}\text{ Bq/孔}$ 、VitC ($\rho = 50\text{ mg/L}$) 和 β -氨基丙腈 ($\rho = 100\text{ mg/L}$), 继续培养 24 h 后, 弃上清液, 用 $\varphi = 0.5\%$ 胰酶消化细胞, 以多头细胞收集器

收集细胞于玻璃纤维纸上, 液闪测定仪闪烁计数 ^3H -脯氨酸掺入量^[4,5]。

1.3 统计处理

两组数据比较用 t 检验。

2 结果

2.1 积雪草甙对成纤维细胞形态的影响

光电镜观察显示, 用药组与对照组相比, 成纤维细胞形态及超微结构有明显变化, 表现为核分裂相较少, 核仁变细小或缺失, 胞浆内粗而内质网明显变疏松, 其中内容物减少, 核蛋白体有不同程度的脱颗粒现象, 自噬性溶酶体增多, 这说明用药后成纤维细胞的增殖变得不活跃, 合成和分泌蛋白的活性能力也减弱。此外, 用积雪草甙后成纤维细胞的线粒体也有所改变, 这些改变对成纤维细胞合成胶原蛋白的功能可能有一定的影响(图 1)。

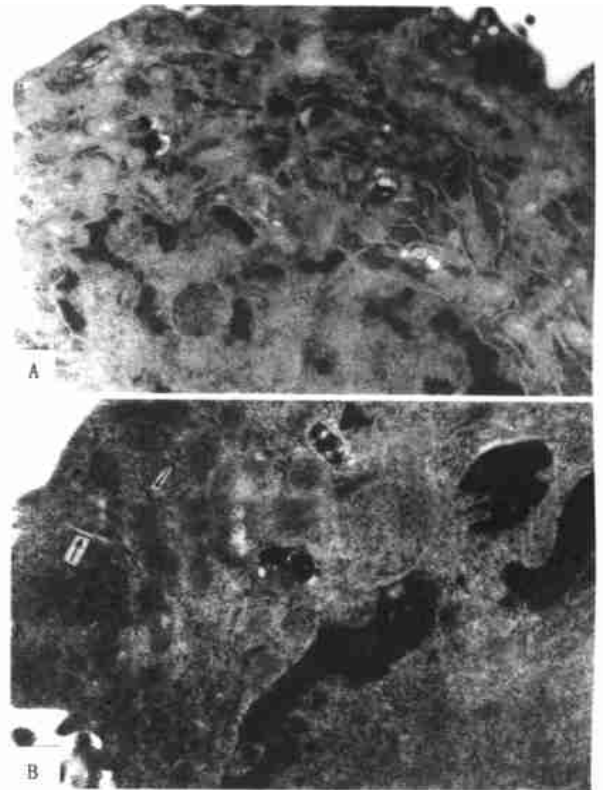


图 1 积雪草甙对成纤维细胞超微结构的影响

Fig. 1 Effect of asiaticoside on ultrastructure of fibroblast

A. Control group ($\times 11\ 000$); B. Experiment group ($\times 8\ 800$).

In the experiment group, nucleoprotein complex endures degranulation more or less (\blacktriangle) and the number of autophagosome increases (\rightarrow)

2.2 积雪草甙对成纤维细胞的 DNA 合成的影响 用 DNA 代谢的前身物质 $^3\text{H-TdR}$ 掺入成纤维

细胞DNA中,以观察细胞内DNA合成水平。结果表明,积雪草甙的浓度与 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量呈负相关,而与 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的抑制率呈正相关,随着积雪草甙浓度增加, $^3\text{H-TdR}$ 掺入下降,而 $^3\text{H-TdR}$ 掺入率上升,呈剂量效应关系,表明在积雪草甙作用下,成纤维细胞DNA合成减少,生长呈抑制状态。

表1 积雪草甙对成纤维细胞DNA合成¹⁾的影响

Table 1 Effect of asiaticoside on DNA synthesis of fibroblasts

c (Asiaticoside) / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	n (DNA, cpm)/ min^{-1}	r (inhibiting) / (%)	P
Cotrol group	3 157 ± 1 172	0	
5×10^{-6}	2 874 ± 837	9.0	> 0.05
5×10^{-5}	2 178 ± 884	31.2	< 0.01
5×10^{-4}	1 010 ± 778	68.4	< 0.01
5×10^{-3}	852 ± 665	73.4	< 0.01

1) $n = 12$

2.3 积雪草甙对成纤维细胞的增殖影响

哺乳类动物细胞的线粒体酶可将黄绿色的MTT降解成蓝紫色的甲替,用酶联免疫检测仪测定甲替的含量可定量测定细胞存活或增殖比例。在本实验中,MTT反应定量法和 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法的结果一致,均显示积雪草甙能抑制成纤维细胞的分裂增殖,且积雪草甙与细胞数量改变之间的剂量一效应关系明显,随着积雪草浓度增加,细胞生长增殖的抑制作用也随之增加(图2)。

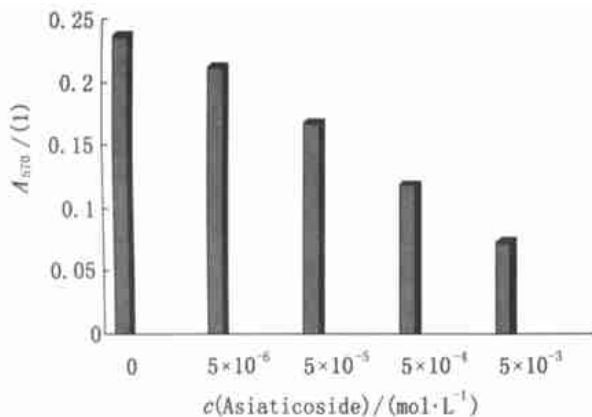


图2 积雪草甙对成纤维细胞的增殖影响

Fig. 2 Effect of asiaticosides on growth of fibroblast

2.4 积雪草甙对成纤维细胞胶原蛋白合成的影响

利用 ^3H -脯氨酸掺入,在无血清培养的条件下,观察积雪草甙对成纤维细胞胶原蛋白合成的影响,结果如图所示,积雪草甙对成纤维细胞的胶原合成有明显抑制作用,积雪草甙浓度在 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

L^{-1} 时 ^3H -脯氨酸的掺入量比浓度为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的掺入量明显降低,两组间相差非常显著($P < 0.01$)。积雪草甙浓度为 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,脯氨酸掺入量减至最少(表2)。

表2 积雪草甙对成纤维细胞胶原合成¹⁾的影响

Table 2 Effect of asiaticoside on collagen biosynthesis of fibroblast

c (Asiaticoside) / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	n (DNA, cpm)/ min^{-1}	r (inhibiting) / (%)	P
Cotrol group	1 978 ± 576	0	
5×10^{-6}	1 780 ± 601	10.0	> 0.05
5×10^{-5}	1 404 ± 462	29.2	> 0.05
5×10^{-4}	870 ± 421	56.4	< 0.01
5×10^{-3}	692 ± 398	65.4	< 0.01

1) $n = 12$

3 讨论

过量胶原沉积是造成增生性瘢痕形成的主要原因之一^[9]。近年来,分子生物学研究的介入,用相应胶原mRNA的cDNA探针进行原位杂交或抗相应前胶原蛋白的单克隆抗体标记追踪有胶原合成的细胞证实,成纤维细胞(FB)是产生胶原的主要细胞^[7],因此,成纤维细胞的活性功能与增生性瘢痕之间必然有着密切关系。FB的活性功能包括增殖分化功能和合成分泌ECM(主要是胶原)的功能,FB合成与分泌胶原能力的增强或成纤维细胞的大量繁殖都可能导致胶原总量的增加,从而产生增生性瘢痕^[8]。多年来,很多治疗增生性瘢痕的药物就是通过干扰成纤维细胞的活性功能中的一个或多个环节来实现。

我们运用积雪草甙作用于体外培养的瘢痕成纤维细胞,结果表明,积雪草甙干扰了成纤维细胞的DNA的合成,这说明积雪草甙对纤维细胞的活性有明显抑制作用,其机理可能与抑制成纤维细胞生长增殖、影响胶原的合成作用有关。我们还注意到电镜下用药组成纤维细胞有开始凋亡的现象,但是否能说明积雪草甙有引起成纤维细胞凋亡的作用尚不能肯定,我们正进行实验以证实。

增生性瘢痕的形成机制极其复杂,很多细胞介质参与调节胶原的代谢及细胞的增殖^[9,10],积雪草

(下转第47页)

作用, 从而改善血管壁结构的异常。这对高血压时的血管重塑是十分重要的。

综上所述, 我们认为 Losartan 对高血压的治疗既有 Losartan 对 VSMC 增殖的抑制作用, 也有对 NPY 等缩血管因素的拮抗作用。

参考文献:

- [1] 杜 宜, 高 聪. 氨氯地平对老年高血压病人左心室肥厚的逆转作用[J]. 广东药学院学报, 1996, 12(3): 163.
- [2] Bauer J H, Reams G P. The angiotensin II type I receptor antagonists: a new class of antihypertensive drugs [J]. Arch Intern Med, 1995, 55(10): 1361.
- [3] 郑永唐, 袁昆龙. 测定细胞抑制和增殖的 MTT 方法的建立[J]. 免疫学杂志, 1992, 8(4): 266.
- [4] Touyz R M, Schiffin E. Angiotensin II regulates vascular smooth muscle cell pH, contraction and growth via tyrosine kinase-dependent signaling pathways[J]. Hyperten-

sion, 1997, 30(2): 222.

- [5] Berk B C, Corson M A. Angiotensin II signal transduction vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. Circ Res, 1997, 80(5): 607.
- [6] Wong P C, Price W A, Chiu A T, *et al.* Nonpeptide angiotensin II receptor antagonist: studies with EXP9270 and Du753[J]. Hypertension, 1990, 15(6 pt 2): 823.
- [7] Siltanen S M, Isola J J, Rantala I S, *et al.* Intratumour variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis[J]. Am J Clin Pathol, 1993, 99(3): 226.
- [8] van Valdhuissen D J, Brodde O E, van Gilst W H, *et al.* Relation between myocardial beta-adrenoceptor density and hemodynamic and neurohumoral changes in a rat model of chronic myocardial infarction: effects ibopamine and captopril[J]. Cardiovasc Res, 1995, 30(3): 346.

(编辑 刘清海)

(上接第 43 页)

甙在体内的实际生物学过程中是否也具有体外这样一些生物活性仍需进一步研究, 而且积雪草甙药物治疗瘢痕的作用机理也可能是多方面的, 要完全阐明, 还有很多工作有待深入探讨。

(本实验得到病理教研室文剑明教授及张萌老师的大力帮助, 在此一并致谢)

参考文献:

- [1] 罗思剂. 积雪草甙的分离与鉴定[J]. 中草药, 1981, 11(6): 244.
- [2] 鄂 征. 组织培养技术[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 2 ~ 235.
- [3] Sargent J M, Taylor C G. Appraised of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia[J]. Br J Cancer, 1989, 60(3): 206.
- [4] Laurent G J. Rates of collagen synthesis in lung, skin and muscle obtained *in vivo* by a simplified method using [³H]-proline[J]. Biochem, 1982, 15, 206(3): 535.
- [5] 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 222 ~ 223.

- [6] Diegelmann R F, Cohen I K, McCoy B J. Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibroblasts in vitro[J]. J Cell Physiol, 1979, 98(2): 341.
- [7] Peltonen J, Larjava H, Jaakkola S. Localization of integrin receptors for fibronectin, collagen, and laminin in human skin; variable expression in basal and squamous cell carcinomas [J]. J Clin Invest, 1989, 84(6): 1916.
- [8] Granstein R D, Deak M R, Tacques S L, *et al.* The systemic administration of gamma interferon inhibits collagen synthesis and acute inflammation in a murine skin wounding model[J]. J Invest Dermatol, 1989, 93(1): 18.
- [9] Paulsson Y, Hammacher A, Heldin C, *et al.* Possible positive autocrine feedback in the prereplication phase of human fibroblast [J]. Nature, 1987, 328(6132): 715.
- [10] Reghu G, Masta S, Meyers D, *et al.* Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblast and the effect of TGF-β [J]. Am Rev Respir Dis, 1989, 140(1): 95.

(编辑 张敏瑞)