

# 甲基莲心碱在体外对瘢痕成纤维细胞生长的影响

刘丽忠,李国辉\*

(江西医学院一附院 烧伤整形科,江西 南昌 330006)

**摘要:**目的 研究甲基莲心碱(neferine, Nef)对瘢痕成纤维细胞增殖的影响,探讨 Nef应用于临床治疗增生性瘢痕的可能性。方法 对人增生性瘢痕进行体外培养,观察其形态学和生长特征;采用 MTT比色法测定 Nef对细胞的增殖抑制率。结果 Nef浓度  $10 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 时,成纤维细胞的形态发生改变,增殖受到抑制,并呈现明显的剂量依赖性。结论 Nef是瘢痕成纤维细胞生长的负性调节因子,有望在增生性瘢痕的防治中发挥作用。

**关键词:** 甲基莲心碱;增生性瘢痕;成纤维细胞;增殖

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)10-1018-03

## Influence of neferine on proliferation of hypertrophic scar fibroblasts *in vitro*

LIU Li-zhong, LI Guo-hui

(Department of Burn & Plastic Surgery, No. 1 Affiliated Hospital, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China)

**Key words** neferine; hypertrophic scar; fibroblast; proliferation

瘢痕形成是创伤愈合的必然结局,但瘢痕过度增殖,将影响外观和生理功能,防治瘢痕过度增生一直是医学研究中的一大难题<sup>[1]</sup>。创伤愈合的研究表明,影响瘢痕形成的主要因素是细胞、细胞外基质和细胞生长因子,成纤维细胞是创面修复的主要细胞,在创面愈合过程中起重要作用,通过合成胶原、纤维粘连蛋白等细胞外基质成分参与创面愈合<sup>[2]</sup>。近年来,许多国内外学者运用细胞培养技术,在体外控制条件下对瘢痕组织来源的成纤维细胞的生物学活动进行研究,以探求防治增生性瘢痕的方法<sup>[3]</sup>。本实验以体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞为实验对象,研究其生长特性及甲基莲心碱(neferine, Nef)对其生长增殖的影响,旨在为增生性瘢痕的防治寻求新的治疗方法,并提供实验依据。

### 1 材料

1.1 药物: Nef由同济医科大学药理教研室提供,纯度为 95%。

1.2 实验细胞的组织来源:增生性瘢痕,供者年龄为 4~35岁,病程半年至 1年,所有患者均无其它器质性疾病,未进行过特殊治疗。

1.3 试剂: RPMI-1640培养基、胎牛血清(美国 GIBCOBRL),小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所),MTT(美国 Sigma)。

1.4 仪器:细胞培养皿(美国 Corning), IT-41型

CO<sub>2</sub>培养(日本 YAMATO),医用超净工作台(苏州医疗器械仪器厂),全自动酶标仪(芬兰 Multiskan Aiscent),倒置显微镜(日本 Olympuse)。

### 2 方法

2.1 细胞培养:采用组织块培养法进行人瘢痕纤维细胞的原代培养<sup>[4]</sup>。取新鲜瘢痕组织,用 0.5% 新洁尔灭漂洗 2次,每次 3 min,再用 0.9% 生理盐水反复冲洗。在无菌工作台内,修除表皮和皮下组织。在少量胎牛血清中将瘢痕剪成  $0.5 \sim 1 \text{ mm}^3$ 组织块,接种于塑料培养皿中,组织块间距约 0.5 mm,在 5% CO<sub>2</sub>, 37℃,饱和湿度和 95% 空气条件下培养 4 h,使组织块粘附,然后加入 1640培养基(含 20% 小牛血清,青、链霉素各 100 U/mL)适量,继续培养,每 3~5 d换液 1次。3~4周后,待原代细胞生长基本融合成片时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:2 或 1:3 的比例分种传代培养,以后每 3~5 d传代一次。取 3~6代细胞进行实验。以  $2 \times 10^4$ 个/孔细胞接种于 24孔细胞培养板中,从次日起,每天用血球计数器计数 3孔细胞,计算均值。

2.2 实验分组:设 Nef实验和含 5% 小牛血清的 1640培养基空白对照两大组,其中实验组依 Nef 浓度不同分为 8个亚组。Nef用 0.03% 盐酸溶解后,加入到含 5% 小牛血清的 1640培养基中(含青、链霉素各 100 U/mL),制成终浓度分别为 1, 5, 10,

\* 收稿日期: 2002-04-21

作者简介:刘丽忠(1965-),女,副教授、副主任医师,多年从事烧伤整形外科工作,发表学术论文数篇。现攻读医学博士学位,研究方向为增生性瘢痕的防治。

\* 江西医学院博士生导师

20, 40, 60, 80和  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  的 Nef 条件培养基。

2.3 MTT 比色法<sup>[6]</sup> 取对数生长期成纤维细胞, 经 0.25% 胰酶消化后, 用含 20% 小牛血清的 1640 培养基制成细胞悬液, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 以每孔  $200 \mu\text{L}$  (即每孔  $2 \times 10^4$  个细胞) 接种于 96 孔细胞培养板中, 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 饱和湿度和 95% 空气条件下培养 24 h 后, 弃上清液, 每孔分别加入上述条件培养基, 每个浓度 6 个复孔, 再培养 24 h 抽出上清液  $150 \mu\text{L}$ , 加入 MTT ( $5 \text{ mg}/\text{mL}$ ) 溶液  $10 \mu\text{L}$ , 孵育 4 h 后, 加入 DMSO 溶液  $150 \mu\text{L}$ , 全自动酶标仪振荡 10 min, 使结晶充分溶解后, 测定波长为 570 nm 处的吸光度 (A) 值。根据公式计算 Nef 对细胞增殖的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \text{实验组 A 值}) / \text{对照 A 值} \times 100\%$$

2.4 统计学处理: 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 统计软件进行 Dunnett 检验

### 3 结果

3.1 细胞形态的变化: 倒置显微镜下观察, 瘢痕成纤维细胞贴壁生长, 呈带有突起的扁平长梭形。不同浓度的甲基莲心碱作用 24 h 后, 细胞形态观察结果: 1 和  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组, 成纤维细胞的形态基本正常, 从  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度开始, 细胞形态发生改变, 呈圆形或不规则椭圆形, 细胞贴壁减少, 细胞内颗粒增多,  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组细胞部分出现坏死。

3.2 细胞生长特性: 瘢痕组织块接种后, 第 7~9 天细胞萌出, 随后迅速生长, 围绕组织块呈放射状平行极性排列。第 21~24 天细胞生长融合成片。传代后细胞排列紊乱, 极性消失, 可出现交叉重叠现象。一般每 3~5 d 可传代一次。对数生长期成纤维细胞以每孔  $2 \times 10^4$  个细胞密度接种后, 第 1 天细胞数略有减少, 随后进入快速生长期, 第 5~6 天进入稳定生长期, 第 7~8 天进入生长停滞期, 细胞数不再明显增加。每天计数 3 孔细胞, 将上述均值绘制成细胞生长曲线 (图 1)。

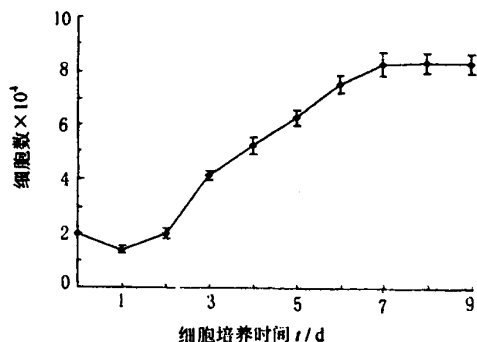
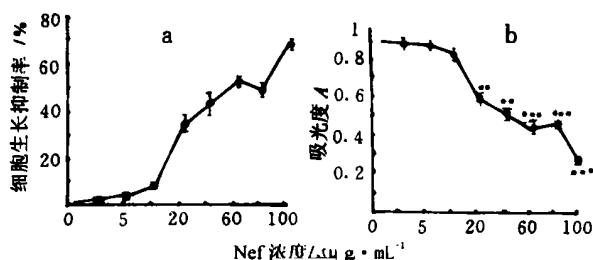


图 1 成纤维细胞生长曲线

3.3 Nef 对成纤维细胞生长的影响: Nef  $1 \sim 5 \mu\text{g}/\text{mL}$  对成纤维细胞生长增殖无明显影响, 而  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  Nef 则对成纤维细胞的增殖有抑制效应, 随着 Nef 浓度的加大, 各实验组 A 值逐渐减小, 成纤维细胞生长抑制率逐渐升高。10~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  各组 A 值与对照组比较  $P < 0.01$ , 60~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  各组 A 值与对照组比较  $P < 0.001$ , 差别均有显著性意义。以 Nef 浓度对数与 A 值、抑制率作图, 见 Nef 抑制成纤维细胞的生长率呈明显的剂量依赖关系 (图 2)。



与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$

图 2 Nef 对成纤维细胞的生长抑制率 (a) 和 A 值 (b) 的影响

### 4 讨论

瘢痕增生与成纤维细胞的生长和代谢有密切关系<sup>[6]</sup>。人成纤维细胞的体外培养技术目前已较成熟, 但因成纤维细胞的生存能力有限, 一般情况下最长不超过 50 代, 这给体外研究瘢痕成纤维细胞带来困难。探究成纤维细胞生长特性亦成为瘢痕防治研究的基础。对瘢痕成纤维细胞生长特性的观察结果显示, 瘢痕组织块接种后, 细胞萌出一般在第 7~9 天, 第 21~24 天原代细胞生长可传代, 第 2~6 天为对数生长期, 第 7~8 天进入生长停滞期, 细胞数不再明显增加, 这与其他学者的报道相吻合<sup>[7,8]</sup>。

近年来的研究表明, 钙通道阻滞剂能够抑制成纤维细胞胶原和蛋白的合成, 具有抗纤维化作用<sup>[9]</sup>。细胞内钙浓度对细胞功能活动具有重要的调节功能。细胞内钙离子浓度能增加刺激成纤维细胞的分裂, 改变胶原的合成分解代谢平衡和细胞外基质的合成<sup>[10]</sup>。钙通道阻滞剂则通过减少细胞内钙浓度而发挥广泛的生物学效应<sup>[11]</sup>。Nef 是从中药莲子心中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱, 是天然的钙通道阻滞剂<sup>[12]</sup>。为进一步研究钙通道阻滞剂对增生性瘢痕成纤维细胞的影响, 我们在了解人增生性瘢痕成纤维细胞生长特性的基础上, 观察 Nef 对人瘢痕成纤维细胞生长的影响。结果表明, Nef 以浓度依赖方式显著抑制体外培养的瘢痕成纤维细胞的增殖, 剂量较大时成纤维细胞可出现坏死。表明 Nef 可能

具有潜在的抗增生性瘢痕作用。这不仅拓展了来源丰富的 Nef 的又一药用领域,也为增生性瘢痕的治疗增添了一种新思路。因此, Nef 抑制成纤维细胞的作用及机制值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] Robson M C, Bameets R A, Leitch I O, *et al.* Prevention and treatment of postburn scars and contracture [J]. *World J Surg*, 1992, 16: 87-96.
- [2] Rockwell W B, Cohen I K, Ehrlich H P. Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1989, 84(5): 827-837.
- [3] Moulin V, Castilloux G, Jean A, *et al.* *In vitro* models to study wound healing fibroblasts [J]. *Burns*, 1996, 22(5): 359-362.
- [4] 司徒镇强, 吴申正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996.
- [5] 李翠玲, 崔正言, 李淑贞. MTT 比色法的改良及初步应用 [J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(5): 306-307.

- [6] Tuan T L, Nichter L S. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation [J]. *Mol Med Today*, 1998, 4(1): 19-24.
- [7] Russell J D, Witt W S. Cell size and growth characteristics of cultured fibroblasts isolated from normal and keloid tissue [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1976, 57(2): 207-212.
- [8] 黄勇, 任林森, 岑瑛, 等. 瘢痕成纤维细胞培养及其生物学行为的实验研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 1998, 12(6): 332-334.
- [9] 刘海林, 杨少平, 陆汉名, 等. 维拉帕米、硝苯地平对成人成纤维细胞增殖、胶原和透明质酸合成的影响 [J]. 中国药理学通报, 1996, 12(5): 456-458.
- [10] Hahn K, Deliasio R, Taylor D L. Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells [J]. *Nature*, 1992, 359: 736-738.
- [11] Doong H, Dissanayake S, Gowrishankar T R, *et al.* Calcium antagonists alter cell shape and induce procollagenase synthesis in keloid and normal human dermal fibroblasts [J]. *J Burn Care Rehabil*, 1996, 17(6 Pt 1): 497-514.
- [12] 潘竟先, 陆军, 张建军, 等. 莲子心钙拮抗活性成分的研究 [J]. 北京医科大学学报, 1989, 21(5): 401-403.

## 蒺藜果总皂苷对大鼠实验性脑缺血的保护作用

姜宗文<sup>1</sup>, 吕文伟<sup>2</sup>, 张志强<sup>3</sup>, 张宏<sup>3</sup>, 徐宏<sup>3</sup>, 晓昆<sup>3\*</sup>

(1. 中国人民解放军第 461 医院, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学基础医学院 药理教研室, 吉林 长春 130021; 3. 吉林省中医中药研究院, 吉林 长春 130021)

**摘要:** 目的 研究蒺藜果总皂苷对大鼠实验性脑缺血的保护作用。方法 采用结扎大鼠大脑中动脉的方法制备脑缺血模型, 测定脑含水量及血管通透性, 并观察脑缺血后血中内皮素含量、超氧化物歧化酶 (SOD)、6-Keto-PGF<sub>1</sub>和 TXB<sub>2</sub>等指标。结果 蒺藜果总皂苷 20, 50, 100 mg/kg 均能明显减轻脑含水量及血管通透性, 降低脑缺血后大鼠血中内皮素含量, 提高血中 SOD 活性。结论 蒺藜果总皂苷对实验性脑缺血有明显的保护作用。

**关键词:** 蒺藜果总皂苷; 脑含水量; 内皮素; 实验性脑缺血

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)11-1020-03

### Protective effect of total saponins from fruit of *Tribulus terrestris* on experimental cerebral ischemia of rat

JIANG Zong-wen<sup>1</sup>, LÜ Wen-wei<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-qiang<sup>3</sup>, ZHANG Hong<sup>3</sup>, XU Hong<sup>3</sup>, DING Xiao-kun<sup>3</sup>

(1. No. 461 Hospital of PLA, Changchun 130021, China; 2. Department of Pharmacology, Clinic College of Jilin University, Changchun 130021, China; 3. Jilin Academy of TCM, Changchun, 130021, China)

**Key words** total saponins from the fruit of *Tribulus terrestris* L.; water-bearing of brain; endothelins; experimental cerebral ischemia

蒺藜系蒺藜科蒺藜属一年生草本植物, 其果实为一常用中药, 有效成分为呋甾醇和螺甾醇两类皂苷, 含量为 68.1%<sup>[1]</sup>。具有增加脑血流量、降低脑血管阻力及减少脑梗死面积的作用, 本实验通过结扎大鼠大脑中动脉的方法造成实验性脑缺血模型, 观察蒺藜果总皂苷对脑缺血的保护作用。

#### 1 材料

1.1 动物: Wistar 雄性大鼠, 由吉林大学实验动物部提供

1.2 药物: 蒺藜果总皂苷由吉林省中医中药研究院提供, 批号: 990401; 心脑血管舒通胶囊由吉林敖东洮南药业股份有限公司生产, 批号: 980205; 内皮素试剂

\* 收稿日期: 2002-05-24

作者简介: 姜宗文 (1961-), 男, 副主任药师, 执业药师, 1983年毕业于长春市卫生学校大学班, 现在中国人民解放军第 461 医院药剂科工作, 主要从事中药新药研究与临床药学。