

白花檵木有效部位治疗糖尿病皮肤溃疡机制研究

张季林¹, 徐 彭^{2,3}, 董德刚², 喻文球², 喻治达², 王曼莹^{2*}

1. 江西省人民医院, 江西 南昌 330006

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 研究白花檵木醇提取物 (ethanol extract of *Loropetalum chinensis*, EELC) 治疗糖尿病皮肤溃疡的分子机制。方法 采用体外表皮干细胞 (epidermal stem cells, ESCs) 培养技术与双荧光素酶报告基因检测系统研究 EELC 治疗糖尿病皮肤溃疡的分子机制。结果 EELC 中含有山柰酚、槲皮素、杨梅素、没食子酸。ESCs 经 EELC 处理 48 h 后, Western blotting 检测表明 Wnt 信号通路相关的 Wnt、 β -catenin 与 C-myc 蛋白表达上调, 且与 EELC 剂量呈正相关 ($P < 0.01$)。经双荧光素酶报告基因检测系统进一步验证了 EELC 对 Wnt 信号通路的靶向作用。结论 EELC 激活经典 Wnt 信号通路, 促使 β -catenin 关键蛋白积累, 进入细胞核内与转录因子结合, 激活下游特异靶基因表达, 促进 ESCs 增殖、分化, 有效地修复糖尿病溃疡皮肤创面。

关键词: 白花檵木; 糖尿病; 皮肤溃疡; 表皮干细胞; Wnt 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)14-2907-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.017

Mechanism of *Loropetalum chinensis* in treatment of diabetic skin ulcer

ZHANG Ji-lin¹, XU Peng^{2,3}, DONG De-gang², YU Wen-qi², YU Zhi-da², WANG Man-ying²

1. Jiangxi People's Hospital, Nanchang 330006, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Materia Medica, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To study the molecule mechanism of ethanol extract of *Loropetalum chinensis* (EELC) in the treatment of diabetic skin ulcer. **Methods** *In vitro* epidermal stem cell (ESCs) culture technique and dual luciferase reporter gene detection system were used to study the mechanism of EELC in the treatment of diabetic skin ulcer. **Results** Totally 232.8 g powder was extracted from 4.5 kg *Loropetalum chinensis* by 75% ethanol, and the main ingredient was polyphenol. After treating for 48 h with different doses of EELC (50 and 100 $\mu\text{g/mL}$), the expression of WNT protein, β -catenin protein and C-myc protein was all up-regulated, and was positively correlated with the dose effect ($P < 0.01$). The target effect of EELC on the Wnt signaling pathway was further identified by the dual luciferase reporter gene assay system. **Conclusion** The results suggested that EELC could activate canonical Wnt signaling pathway, promote β -catenin protein accumulation in combination with transcription factor in the nucleus to activate the expression of specific target genes, promote ESCs proliferation and differentiation, and repair skin wounds of diabetic ulcers effectively as well.

Key words: *Loropetalum chinense* (R. Br.) Oliv.; diabetes mellitus; skin ulcer; epidermal stem cells; Wnt signaling pathway

檵木 (别名白花檵木) *Loropetalum chinense* (R. Br.) Oliv. 是金缕梅科檵木属的常绿灌木或小乔木植物, 分布于长江中下游以南, 北回归线以北, 集中于赣湘亚热带地区。白花檵木始载于《植物名实图考》, 是一种重要的民间草药资源, 历来用于治疗创

伤出血皮肤溃疡, 具有止血、生肌、消炎、镇痛的明显功效。经化学成分分析, 白花檵木的花、叶、茎、根中均含有多酚类成分, 是其药用的物质基础^[1-2]。

本课题组前期研究表明, 白花檵木醇提取物透皮吸收制剂可有效改善皮肤创面局部血液循环, 促进

收稿日期: 2017-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260604); 国家科技支撑计划项目 (2009BAD3B03)

作者简介: 张季林, 女, 主任医师, 从事中医药临床和科研工作。Tel: (0791)86895637 E-mail: xjl620403@163.com

*通信作者 王曼莹 Tel/Fax: (0791)87119663 E-mail: wangmy8888@sina.com

糖尿病溃疡皮肤愈合新生^[3]。根据文献报道^[4-6],表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)的增殖分化与 Wnt 信号传导通路密切相关。因此,本研究以人 ESCs 为对象,观察白花檫木醇提物(ethanol extract of *Loropetalum chinensis*, EELC)在 Wnt 信号传导通路中的作用位点,探讨 EELC 调控 ESCs 增殖分化的效应机制,为研制临床治疗糖尿病皮肤溃疡的新药提供理论依据。

1 材料

1.1 药材

白花檫木(产地江西)采集于景德镇德宇集团白花檫木生态园基地,由江西中医药大学王曼莹教授鉴定为金缕梅科檫木属植物檫木 *Loropetalum chinense* (R. Br.) Oliv., 实验用部位为新鲜叶片。

1.2 皮肤样本

正常人皮肤标本(来源于外科包皮环切材料)与糖尿病下肢皮肤(溃疡患者创面手术后剩余全厚皮组织),由江西省人民医院惠赠。

1.3 试剂与仪器

中性蛋白酶 II (德国罗氏公司); 0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA (Gibco 公司); IV 型胶原蛋白 (Sigma 公司); EpiLife 培养基 (Cascade Biologics 公司); Wnt、 β -catenin、C-myc 多克隆抗体兔血清 (Santa cruz 公司); Western blotting 二抗 (武汉博士德生物工程有限公司); DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司); Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 试剂盒 (Promega 公司); 胎牛血清 (美国 Front/RMBIO 公司); Lipofectamine 2000 脂质体 (Invitrogen 公司); 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); 凝胶成像分析系统 SK 300 (上海伯泰生物技术有限公司); 蛋白电泳仪 (Bio-Rad 公司); 双荧光素酶检测系统 Glomax[™] 20/20 (Promega 公司)。山柰酚、槲皮素、杨梅素、没食子酸对照品(质量分数>98%)均由中药固体剂制造技术国家工程研究中心对照品室提供。

2 方法

2.1 EELC 的制备

取檫木鲜叶 4.5 kg, 75%乙醇冷浸 2 次(每次用量 15 L, 时间 24 h), 合并浸提液, 真空浓缩后冷冻干燥, 得 EELC 冻干粉 232.8 g。4 °C 冰箱保存备用。

2.2 EELC 主要成分分析

2.2.1 黄酮类物质山柰酚、槲皮素及杨梅素定量测定^[7] 取 EELC 适量, 精密称量 0.5 g, 置于 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 75%乙醇 25 mL, 精密称质量,

回流提取 60 min, 冷却至室温后加 75%乙醇补足损失质量。混匀后滤过, 取续滤液至 50 mL 圆底烧瓶中, 加入 5%盐酸 10 mL、甲醇 5 mL, 回流 30 min, 冷却至室温后转移至 25 mL 量瓶中, 用甲醇洗涤圆底烧瓶 3 次, 洗液转入量瓶中, 以甲醇补充至刻度, 混匀后 0.45 μ m 有机相滤膜滤过, 备用。采用 HPLC 法测定山柰酚、槲皮素及杨梅素的质量分数, 色谱条件: SepaxHP-C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-4%磷酸水溶液 (32:68), 体积流量 1.0 mL/min, 等度洗脱; 进样体积 10 μ L; 柱温 25 °C; 检测波长 360 nm。

2.2.2 没食子酸定量测定^[8] 同“2.2.1”项方法处理 EELC, 采用 HPLC 法测定, 色谱条件: SepaxHP-C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (25:75), 体积流量 1.0 mL/min, 等度洗脱; 进样体积 10 μ L; 柱温 25 °C; 检测波长 272 nm。

2.3 ESCs 的分离与培养

采用文献方法^[9-10], 分别制备正常皮肤与糖尿病患者皮肤的原代角质形成细胞。皮肤标本剪成 0.5 cm \times 0.5 cm 小块。置 4 °C 冰箱用中性蛋白酶 II 消化过夜, 表皮与真皮彻底分离。取表皮于 0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA 联合消化液中, 37 °C 作用 15 min, 终止酶解反应, 轻轻吹打形成单细胞悬液, 在 EpiLife 培养基中 37 °C 继续培养, 即为正常原代角质形成细胞。将正常原代角质形成细胞悬液种于 IV 型胶原蛋白包被的 24 孔培养板中, 37 °C 孵育 20 min, 将培养板中未被黏附的细胞彻底洗去后, 置于 37 °C 培养, 即为 ESCs。

2.4 EELC 对体外培养 ESCs 的影响

分组设计, 采用 24 (4 \times 6) 孔细胞培养板, 对照组接种正常皮肤分离的 ESCs, 实验组接种溃疡皮肤分离的 ESCs, 每孔细胞 200 个。每孔加入 ESCs 培养液 200 μ L, 实验组在 ESCs 培养液中分别加入不同质量浓度 (10、50、100 μ g/mL) EELC, 对照组单纯加入 ESCs 培养液 EpiLife, 总液量补满至 1 000 μ L, 培养 2 周后染色观察, 计算克隆形成率(细胞克隆数/接种细胞数)^[11]。

2.5 双荧光素酶检测系统验证 EELC 激活 Wnt 信号通路实验

双荧光素酶检测系统含有 Wnt 信号通路应答元件的 Topflash 质粒和 Relina 质粒, 并包括一段荧光素酶报告基因与 TCF/EELCF 结合位点。按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒的操作步骤进行。以

HEK293T (由江西师范大学生命科学院蔡险峰教授赠予) 为转染细胞, 经 3 种剂量 (10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) EELC 处理后, 检测 Wnt 信号通路的激活状态。对照组与实验组均使用 3 个平行样品计算平均值和标准差。

2.6 EELC 对 Wnt 信号通路关键蛋白表达的影响

进一步采用 Western blotting 技术检测 EELC 与 Wnt 信号通路的相关性。分别提取经 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EELC 处理 48 h 后 ESCs 以及对照组 ESCs 中的总蛋白, 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 转膜后进行 Western blotting, 检测 Wnt 信号通路关键蛋白 Wnt、 β -catenin、C-myc 的表达水平。

2.7 统计学分析

用统计软件 SPSS 16.0 中单因素方差分析处理, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 EELC 中主要成分分析

经 HPLC 法测定, EELC 中山柰酚、槲皮素与杨梅素的质量分数分别为 5.61%、4.85%、1.36%, EELC 中没食子酸的质量分数为 1.06%。

3.2 ESCs 的形态学观察结果

3.2.1 分离培养的正常皮肤 ESCs 形态 经 20 min 孵育快速黏附于 IV 型胶原蛋白的细胞即为 ESCs, 正常皮肤 ESCs 形态见图 1。从图中可以看到, ESCs 细胞形态近似米粒形, 边界清晰, 大小均匀一致, 细胞核较大。

3.2.2 溃疡皮肤分离培养的 ESCs 的形态 观察溃疡皮肤分离得到的 ESCs 的生长全过程: 9~10 d 后开始增殖分化形成小克隆, 滞后对照组 3~4 d, 至 2 周后克隆率仅为对照组的 20%。正常皮肤与溃疡皮肤的原代 ESCs 分别培养 7 d, 染色观察已显示差

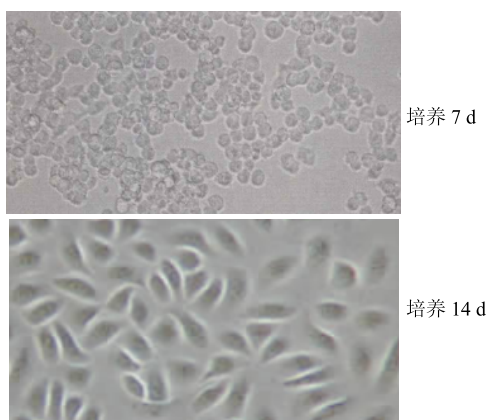


图 1 正常皮肤分离培养的 ESCs 形态
Fig. 1 Morphology of ESCs from normal skin

别, 见图 2, 正常皮肤 ESCs 培养 7 d, 细胞贴壁数量明显多于溃疡皮肤的 ESCs, 且正常皮肤 ESCs 体积大, 形成大的细胞克隆。

在培养 ESCs 期间, 每天分别取 3 孔培养液消化成单细胞悬浮液, 细胞计数后统计学处理, 表明溃疡皮肤的 ESCs 生长增殖缓慢, 进入对数生长期的时间为 (11.00 ± 1.21) d, 正常皮肤 ESCs 生长增殖速度明显快于溃疡皮肤 ESCs, 进入对数生长期的时间为 (5.00 ± 1.38) d, 见图 3。

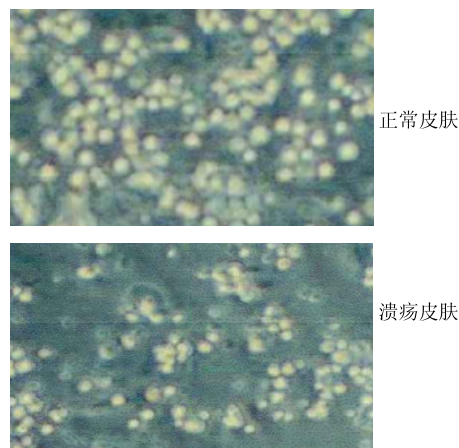


图 2 正常皮肤和溃疡皮肤分离的 ESCs 培养 7 d 形态比较
Fig. 2 Comparison on morphology of ESCs grew for 7 d isolated from normal skin and ulcer skin

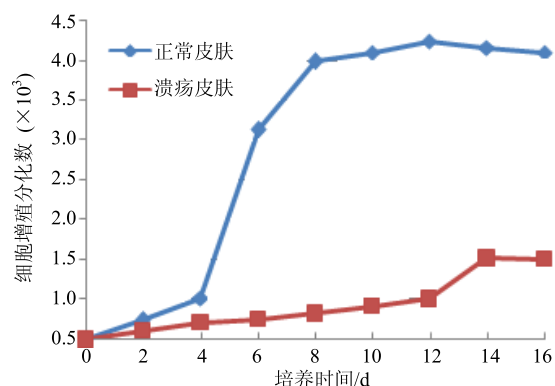


图 3 正常皮肤和溃疡皮肤分离的 ESCs 增殖分化比较
Fig. 3 Comparison on proliferation and differentiation of ESCs isolated from normal skin and ulcer skin

3.2.3 EELC 对溃疡皮肤分离的 ESCs 生长的影响

以正常皮肤 ESCs 克隆形成为对照, 选用第 7 天的 ESCs 为培养材料, 实验组 ESCs 培养液中分别加入 EELC (0、10、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 对照组单纯加入 ESCs 培养液 EpiLife, 继续培养 7 d, 检测克隆形成率。结果见图 4。EELC 具有促进溃疡皮肤 ESCs 增殖分化形成克隆的作用。与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EELC 组比

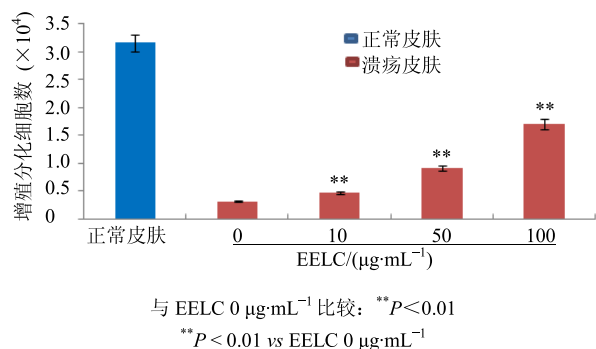


图 4 EELC 对溃疡皮肤 ESCs 增殖分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of EELC on proliferation and differentiation of ESCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

较, 不同质量浓度 EELC 组的 ESCs 克隆形成率明显提高 ($P < 0.01$), 且与剂量呈相关性。100 μg/mL EELC 组, ESCs 的克隆形成率几乎恢复到正常皮肤 ESCs 克隆形成率的 1/2。

3.3 EELC 对 Wnt 信号通路的靶向作用

双荧光素酶报告基因检测系统测定数据表明, EELC 通过与 Wnt 信号蛋白的靶向作用激活 Wnt 信号通路, 促进 ESCs 增殖与分化。进一步验证了 EELC 在体外实验与体内实验中显示的效果, EELC 治疗糖尿病皮肤溃疡的物质基础是启动了 Wnt 信号通路对 ESCs 的增殖分化调控作用。

采用 LiCl (25 mmol/L) 作阴性对照, 测定 EELC (10、30、50 μg/mL) 对双荧光素酶活性的影响, 结果 (图 5) 表明 EELC 与 HEK293 共转染后, 以对照组为参照, 除低剂量组无显著差异外, 中、高剂量组酶活均有提高, 且与剂量呈正向依赖关系。证明 EELC 能通过激活 Wnt 信号通路活性, 调控 ESCs 的增殖分化, 促进糖尿病溃疡皮肤创面的愈合再生。

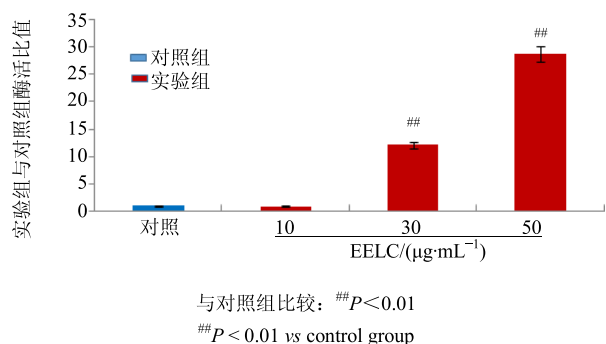


图 5 EELC 对 HEK293T 双荧光素酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of EELC on luciferase reporter assay on HEK293T ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 对 Wnt 信号通路关键蛋白表达的影响

分别采用 50、100 μg/mL EELC 处理正常皮肤 ESCs 后, 经 Western blotting 检验 3 种关键蛋白的表达, 与对照组比较, EELC 组 Wnt、β-catenin、C-myc 蛋白的表达均明显升高。结果见图 6。

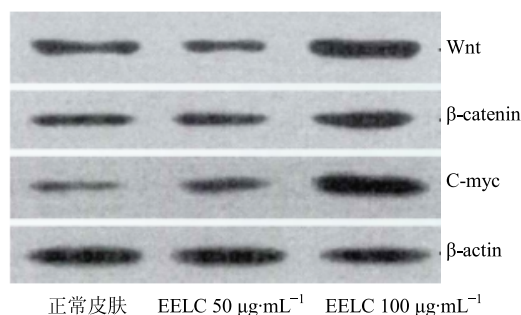


图 6 EELC 对正常皮肤 ESCs WNT、β-catenin、C-myc 蛋白表达的影响
Fig. 6 Effect of EELC on expression of WNT, β-catenin, and C-myc proteins in ESCs isolated from normal skin

4 讨论

ESCs 在皮肤损伤修复中的作用之所以十分重要, 在于其分裂方式与增殖分化直接与上皮的修复相关。ESCs 的增殖分化受到表面受体、微环境等多种因素的影响, 而 β-catenin 蛋白对 ESCs 的增殖、迁移与分化起着显著的调控作用^[12-13]。国内外研究表明, Wnt 信号途径通路中的关键蛋白 β-catenin 在创伤修复和正常皮肤发育过程中参与真皮和表皮结构的形成^[14]。本研究的结果表明, 通过 EELC 作用于体外培养的 ESCs, 由于 WNT 蛋白-EELC 复合物与细胞表面受体结合, 触发了细胞内的系列反应。EELC 作为 WNT 蛋白的配体与之结合后, 与跨膜受体 Frizzled、LRP5/6 结合, 连环激活信号通路上相关蛋白, 保护 β-catenin 蛋白不被降解复合物修饰而降解, 细胞质中 β-catenin 的量明显高于对照组。β-catenin 蛋白入核后, 激活下游 C-myc 蛋白, 参与 ESCs 的增殖与分化。

Wnt 信号通路是一条高度保守且交叉复杂的信号通路。Wnt 蛋白家族是进化过程中高度保守的信号分子。细胞外的 Wnt 蛋白与细胞膜上的 2 个经典受体 Frizzled 蛋白和 LRP-5/6, 激活胞浆蛋白 Dsh, 阻止 β-catenin 的降解, 使其移位到核内, 与 Lef/Tcf 等转录因子形成复合物, 进而激活下游基因 (c-myc、cyclinD、CD44 等) 的转录^[15]。β-catenin 入核参与转录调节是其重要生物功能之一。也是

Wnt 信号通路必须依赖的生物活性。EELC 的作用靶点是 Wnt 蛋白, 激活 Wnt 信号通路后明显上调 β -catenin 表达, 使之激活, 启动糖尿病溃疡皮肤的修复与再生, 其机制为已被实验验证的分子程序。

本实验分别采用 Western blotting 技术和双荧光素酶报告基因检测系统, 研究分析 EELC 与 Wnt 信号通路相关性, 具有相互印证的作用, 因为前者检测的是 EELC 对 Wnt 信号通路中关键蛋白的调控表达, 后者检测的是 EELC 对 Wnt 信号通路中相关基因的转录调节。实验结果的一致性, 保证了结论的可靠性。

参考文献

- [1] Zhang Y, Ren F X, Yang Y, *et al.* Chemical constituents and biological activities of *Loropetalum chinense* and *Loropetalum chinense* var. *rubrum*: Research advances [J]. *J Int Pharm Res*, 2014, 41(3): 307-312.
- [2] Zhou X, Yan Y, Li X, *et al.* A new lignan from the leaves of *Loropetalum chinense* [J]. *Chem Nat Compd*, 2001, 47(5): 690-692.
- [3] 连泽勤, 高 健, 李晓滨, 等. 白花檵木促大鼠皮肤伤口愈合物质基础初步研究 [J] 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3566-3570.
- [4] Wang H Y, Liu T, Malbon C C. Structure-function analysis of frizzleds [J]. *Cell Signal*, 2006, 18(7): 934-941.
- [5] Xia X, Qian S, Soriano S, *et al.* Loss of presenilin is associated with enhanced β -catenin signaling and skin tumor genes is Proc [J]. *Natl Acad Sci*, 2001, 98(19): 10863-10868.
- [6] Kishimoto J, Burgeson R E, Morgan B A. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(10): 1181-1185.
- [7] 游璐茜, 吴 振, 赵玉芬, 等. 檵木中槲皮素、山奈酚和杨梅素含量的高效液相色谱法测定 [J]. 化学通报, 2009(10): 896-900.
- [8] 谢 月, 邵海华, 宋永贵, 等. 白花檵木中没食子酸和总酚摄取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 9-12.
- [9] Kim D S, Cho H J, Choi H R, *et al.* Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(21): 2774-2781.
- [10] Wittmann M, Purwar R, Hartmann C, *et al.* Human keratinocytes respond to interleukin-18: Implication for the course of chronic inflammatory skin diseases [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(6): 1225-1233.
- [11] Dunwald M, Tomanek-Chalkley A, Alexandnma S, *et al.* Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering [J]. *Exp Dermatol*, 2001, 10(1): 45-54.
- [12] Gurung A, Uddin F, Hill R P, *et al.* Beta-catenin is a mediator of the response of fibroblasts to irradiation [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(1): 248-255.
- [13] Chen C H, Dixon R A, Ke L, *et al.* Vascular progenitor cells in diabetes mellitus: roles of Wnt signaling and negatively charged low-density lipoprotein [J]. *Circ Res*, 2009, 104(9): 1038-1040.
- [14] Enshell S D, Lindon C, Kashiwagi M, *et al.* Beta-catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(4): 633-642.
- [15] Amin N, Vincan F, The signaling pathways and cell adhesion [J]. *Fron Biosci*, 2012, 17(6): 784-804.