

本文引用:杨逸璇,朱明芳,王峰,朱亚梦,黄晓婵,杨婉婷.石榴皮多酚软膏通过介导 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路以抗痤疮瘢痕形成的机制研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(5):596-599.

# 石榴皮多酚软膏通过介导 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路 以抗痤疮瘢痕形成的机制研究

杨逸璇<sup>1</sup>,朱明芳<sup>2\*</sup>,王峰<sup>1</sup>,朱亚梦<sup>1</sup>,黄晓婵<sup>1</sup>,杨婉婷<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005)

**〔摘要〕**目的 探讨不同浓度的石榴皮多酚软膏抗增生性痤疮瘢痕形成的机制。方法 SD大鼠36只,于烫伤造模成功后,随机分为模型组、阴性对照组及石榴皮软膏低剂量组、中剂量组、高剂量组、超高剂量组6组,每组6只。模型组给予生理盐水湿敷,阴性对照组涂1 mL基质,石榴皮软膏组按低、中、高、超高剂量组每日分别给予1 mL的相应浓度的石榴皮多酚软膏1次。自造模日起观察创面情况,并于造模后第7、14、21天分别取各组大鼠创面皮肤进行病理组织学检测及免疫组化检测 TGF- $\beta$ 1、Smad4水平。结果 石榴皮多酚软膏中剂量组能降低 TGF- $\beta$ 1、Smad4 表达( $P<0.05$ ),抑制瘢痕形成。结论 石榴皮多酚软膏可以通过调控 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路抗增生性痤疮瘢痕的形成。

**〔关键词〕** 痤疮瘢痕;增生性瘢痕;TGF- $\beta$ /Smad 信号通路;石榴皮多酚

**〔中图分类号〕**R285.5

**〔文献标志码〕**A

**〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.05.007

## Mechanisms of Pomegranate Peel Polyphenol Ointment in Preventing Acne Scar Formation by Mediating TGF- $\beta$ /Smad Signaling Pathway

YANG Yixuan<sup>1</sup>, ZHU Mingfang<sup>2\*</sup>, WANG Feng<sup>1</sup>, ZHU Yameng<sup>1</sup>, HUANG Xiaochan<sup>1</sup>, YANG Wanting<sup>1</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

**〔Abstract〕 Objective** To investigate the mechanism of different concentrations of pomegranate peel polyphenol ointment in preventing hypertrophic acne scar formation. **Methods** After successful scald molding, 36 SD rats were randomly divided into a model group, a negative control group, a low dose, a medium dose, a high dose of pomegranate peel ointment group, with 6 rats in each group. The model group was given normal saline wet compress, and the negative control group was coated with 1 mL matrix, and the pomegranate peel ointment group was given 1 mL pomegranate peel polyphenol ointment of the corresponding concentration in the low, medium, high and ultra-high dose groups respectively. The wound condition was observed from the day of model establishment, and the wound skin of rats in each group was taken on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day after model establishment for histopathological examination and immunohistochemical detection of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and Smad4 levels. **Results** The middle dose group of pomegranate peel polyphenol ointment could decrease the expression of TGF- $\beta$ 1 and Smad4 ( $P<0.05$ ), and inhibit the formation of scar. **Conclusion** Pomegranate peel polyphenol ointment may inhibit the formation of acne scars by regulating TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway.

**〔Keywords〕** acne scar; hypertrophic scar; TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway; pomegranate peel polyphenol

**〔收稿日期〕**2018-11-11

**〔基金项目〕**湖南省中医药管理局科研项目计划(201705);湖南省教育厅科学研究项目(18A212)。

**〔作者简介〕**杨逸璇,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治皮肤病。

**〔通讯作者〕**\*朱明芳,女,教授,博士研究生导师,E-mail:26715858@qq.com。

痤疮(Acne)是一种常见的涉及毛囊皮脂腺的慢性炎症性皮肤病<sup>[1]</sup>。好发于青春期男女,其临床表现包括粉刺、炎性丘疹、脓疱、结节和囊肿。约95%的痤疮患者会出现不同程度的痤疮瘢痕,给患者造成严重的心理负担,从而影响其生活质量<sup>[2-3]</sup>。痤疮瘢痕属于病理性瘢痕,可表现为萎缩性瘢痕、增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)和瘢痕疙瘩(ke-loid, K)<sup>[4]</sup>。有研究证实,TGF- $\beta$ /Smad 通路在增生性瘢痕的形成过程中具有重要作用。本实验以增生性痤疮瘢痕为主要研究对象,因现阶段尚未有明确的痤疮瘢痕造模方法,故选择大鼠背部烫伤模型为代表进行研究。

石榴皮多酚是石榴皮的主要有效成分,具有抗氧化、抑菌、降脂、抗炎、抗过敏、促进皮肤愈合等多重作用<sup>[5-7]</sup>。基于此,本研究选用不同浓度的石榴皮多酚软膏,作用于大鼠背部烫伤后增生性瘢痕,通过苏木精-伊红(HE)染色观察其对增生性瘢痕的治疗作用,用免疫组化检测 TGF- $\beta$ 1、Smad4 表达,从而进一步探究石榴皮多酚软膏抗痤疮瘢痕形成的作用与 TGF- $\beta$  所介导的 Smad 通路之间的关系。

## 1 材料

### 1.1 动物

雄性 SD 大鼠(清洁级)36 只(批号:SCXK(湘)2016-0002),体质量 190~220 g,由湖南中医药大学动物实验中心提供。每只分笼圈养于动物中心实验室。饲养温度 20~25 °C,湿度 50%~70%,光照/黑暗为 12 h/12 h 条件下饲养,自由饮食、饮水,适应性饲养 1 周后开始实验。

### 1.2 主要药物与试剂

70%石榴皮多酚提取物(批号:RY151119,西安瑞盈生物科技有限公司);自制超高、高、中、低浓度石榴皮多酚软膏:按处方分别称取甘油 10 g、十八醇 5 g、液体石蜡 3 g、十二烷基硫酸钠 0.3 g、白凡士林 4.5 g、硬脂酸 2.5~3.5 g、单硬脂酸甘油酯 5 g、月桂氮酮 1.2~1.8 g、蒸馏水适量,总量至 100 g。其中十八醇、液体石蜡、白凡士林、硬脂酸、单硬脂酸甘油酯作为油相,其余药品作为水相。然后,将水油两相分别混合并用恒温水浴箱加热至 75 °C,缓慢搅拌均匀至熔融。最后,在 75 °C 水浴箱中,将水相以细流状缓慢加入油相中,持续搅拌 10 min,常温下持续搅拌直至冷凝,得到水包油(O/W)型软膏基质。10%水合氯醛(分析纯,上海山浦化工有限公司);75%

乙醇、0.9%氯化钠注射液、4%多聚甲醛(均产自谷歌生物(长沙)生物科技有限公司)。TGF- $\beta$  试剂盒(批次:BA0290,100  $\mu$ L,博士德生物工程有限公司),SMAD4 试剂盒(批次:bs-0585R,100  $\mu$ L,北京博奥森生物技术有限公司)。

### 1.3 主要仪器

FA1004 电子分析天平(上海恒平科学仪器有限公司);RM2235 轮转石蜡切片机(徕卡显微系统(上海)贸易有限公司);YD-A 生物组织摊片机(金迪生物科技集团);BCD-226SKA 冰箱(青岛海尔股份有限公司);DNP-9162 电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);Motic BA410 研究型显微镜、Motic 6.0 数码医学图像分析系统[麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司]。

## 2 方法

### 2.1 造模

首先制作动物固定板,20 cm $\times$ 20 cm $\times$ 1 cm 的木板 1 块。为排除激素水平对实验的干扰,故随机选择雄性 SD 大鼠 36 只,饲养 1 周后,称质量,电动剃毛刀脱毛后,用 75%酒精将背部 2.0 cm $\times$ 2.0 cm 预定区域消毒,然后腹腔内注射 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)进行麻醉,后以俯卧位将麻醉后的大鼠摆放在固定板上,恒温水浴箱温度调设为 85 °C,将 4 层无菌纱布置于水浴箱内,充分浸泡 10 s 后取出,均匀覆盖在大鼠背部裸露区 15 s。再用生理盐水冲洗,水分用无菌纱布吸干,形成 II 度烫伤模型(病理切片证实)<sup>[8]</sup>。

### 2.2 分组与给药

36 只动物随机分为 6 组,每组 6 只:A.模型组(烫伤模型组);B.阴性对照组(基质软膏组);C.石榴皮软膏低剂量组(低剂量石榴皮多酚+模型组);D.石榴皮软膏中剂量组(中剂量石榴皮多酚+模型组);E.石榴皮软膏高剂量组(高剂量石榴皮多酚+模型组);F.石榴皮软膏超高剂量组(超高剂量石榴皮多酚+模型组)。模型组给予生理盐水湿敷,阴性对照组涂 1 mL 基质软膏,实验组按照超高、高、中、低剂量组每日分别给予自制 1 mL 的 10%、2.4%、1.6%、0.9%石榴皮多酚软膏。

### 2.3 观察指标及检测方法

烫伤程度的判定常依照病检的组织学改变作为划分的标准,与临床的“三度四分法”基本一致,详见

表1 烧(烫)伤结果判断标准表

烧(烫)伤等级	组织学改变	体表症状
I度 (红斑性)	一般仅损伤表皮角质层、透明层和颗粒层,有时会伤及棘状层,但生发层(即基底层)仍健在。	发红、干燥、疼痛、无水疱、感觉过敏。
II度 (水泡性)	浅II度:表皮全层及真皮浅层(乳头层)受损。 深II度:真皮深层受损,仅残留深部的皮肤附件。	水泡、创面湿润、基底潮红、剧痛。 水泡破后,创面呈红白、红黄色,毛细血管扩张,有小出血点,疼痛。
III度 (焦痂性)	皮肤全层以致皮下组织受损,皮肤附件也完全破坏,严重者可伤及肌肉甚至骨骼。	组织烧焦,呈白、黄、焦黄、焦黑色,表浅静脉呈树枝状,静脉栓塞,痛觉消失。

表1<sup>[8]</sup>。结合皮损表现及病检结果可对创面愈合及瘢痕形成情况做出基本判断,而免疫组化检测则能更进一步表达出各因子在其中发挥的作用。(1)肉眼观察:自造模之日起,每日观察创面,记录其颜色、有无肿胀、出血、溃烂、结痂、脱痂等现象,记录创面修复的变化情况。(2)病理组织学检测:第7、14、21天,腹腔内注射10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉,剪取创面及其周围皮肤,部分甲醛固定,石蜡包埋,留作病理检测,观察创面的修复情况,判断石榴皮多酚软膏能否促进创面愈合及抑制瘢痕形成。(3)免疫组化检测:TGF- $\beta$ 1、Smad4免疫组织化检测结果在20倍放大下随机选5个测定区域,按一定域值分割阳性细胞,测定组织中TGF- $\beta$ 1、Smad4表达的平均积分光密度。

#### 2.4 统计学方法

采用SPSS 21.0对数据进行统计分析,计量资料均用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,各组间不同时点TGF- $\beta$ 1、Smad4比较采用单因素方差分析,进一步采用LSD法对各组间有统计学意义的指标进行两两比较。检验水准均为 $P < 0.05$ 有统计学意义。

### 3 结果

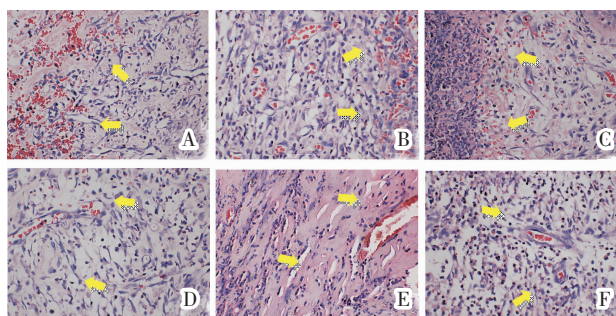
#### 3.1 肉眼观察

烫伤后各组大鼠创面皮肤苍白,烫伤区域边界清晰整齐,第1~3天,创面水肿;第4天烫伤区域可见瘀血、溃疡,并开始逐渐结痂。第7天各组烫伤区域皮肤的厚度加深、硬度加重,肉眼可见呈黄褐色。第14天石榴皮多酚软膏各组痂皮全部脱落,新生肉芽组织明显,创面明显小于模型组和阴性对照组,而中剂量组较其他剂量组稍明显;模型组和阴性对照组仍有较多痂皮尚未脱落,可见少许新生肉芽组织。第21天各组创面大部分已有上皮覆盖,但仍有部分尚未愈合,已愈合部位有少量毛发长出,未愈合部位形状不规则,肉眼可见中心有鲜红肉芽组织,其中,

石榴皮多酚各组愈合程度较模型组和阴性对照组高,中剂量组愈合程度较其他剂量组高,其余各组未见明显差异。

#### 3.2 病理组织学检测

根据不同时点各组HE染色,模型组及阴性对照组瘢痕可见明显的真皮层增厚、血管生成和炎细胞浸润,而石榴皮多酚软膏各组,尤其是中剂量组,瘢痕组织增生层明显比模型组薄,且未见丰富的血管和炎细胞,其中第14天时各组HE染色如图1所示,模型组和阴性对照组的表皮坏死层未明显脱落,显微镜下可见大量毛细血管和少量胶原纤维,石榴皮多酚软膏组表面大多数坏死层已经脱落,其下的结缔组织新生,有丰富的毛细血管,可见大量成纤维细胞及少量新生皮肤附属器。



注:A.模型组;B.阴性对照组;C.石榴皮软膏低剂量组;D.石榴皮软膏中剂量组;E.石榴皮软膏高剂量组;F.石榴皮软膏超高剂量组

图1 给药14 d后各组HE染色( $\times 100$ )

#### 3.3 免疫组化检测各组TGF- $\beta$ 1、Smad4表达情况

各组TGF- $\beta$ 1、Smad4不同时点表达的积分光密度比较结果见表2。各组间第7、14、21天时TGF- $\beta$ 1、Smad4经单因素方差分析结果显示,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。进一步采用LSD法对各组间TGF- $\beta$ 1、Smad4指标进行两两比较结果显示:第14、21天时中剂量组的TGF- $\beta$ 1均明显低于模型组、阴性对照组、低剂量组、高剂量组和超高剂量组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。第14、21天时中剂量

表2 各组 TGF- $\beta$ 1、Smad4 不同时点表达的积分光密度比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	TGF- $\beta$ 1			Smad4		
	第7天	第14天	第21天	第7天	第14天	第21天
模型组	0.45 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.05
阴性对照组	0.44 $\pm$ 0.06	0.37 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.03	0.61 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.05
低剂量组	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.31 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.54 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.45 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.36 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>
中剂量组	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.24 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>abc</sup>	0.53 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.37 $\pm$ 0.03 <sup>abc</sup>	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>abc</sup>
高剂量组	0.38 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.31 $\pm$ 0.04 <sup>abd</sup>	0.24 $\pm$ 0.04 <sup>abd</sup>	0.55 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	0.44 $\pm$ 0.07 <sup>abd</sup>	0.35 $\pm$ 0.05 <sup>abd</sup>
超高剂量组	0.39 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.31 $\pm$ 0.06 <sup>abd</sup>	0.31 $\pm$ 0.05 <sup>cd</sup>	0.53 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	0.45 $\pm$ 0.05 <sup>abd</sup>	0.43 $\pm$ 0.05 <sup>cd</sup>
F 值	3.244	7.923	14.311	5.335	9.006	15.690
P 值	0.019	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001

注:与模型组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与阴性对照组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与低剂量组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ;与中剂量组比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ ,与高剂量组比较,<sup>e</sup> $P<0.05$

组的 Smad4 均明显低于模型组、阴性对照组、低剂量组、高剂量组和超高剂量组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

#### 4 讨论

痤疮形成的瘢痕主要有3种:一是痤疮愈合后遗留的表浅性萎缩性瘢痕,二是痤疮发生较大面积的严重感染会产生增生性瘢痕,三是痤疮在皮下组织较少部位产生的瘢痕疙瘩<sup>[9]</sup>。增生性痤疮瘢痕作为痤疮瘢痕的主要类型,有代表性,具有研究价值。增生性痤疮瘢痕同属于增生性瘢痕,增生性瘢痕是皮肤损伤后由于过度修复而导致的一种病理性瘢痕,TGF- $\beta$ 被认为是促进纤维化类疾病发生必不可少而强有效的细胞因子,其介导的细胞内信号主要经 TGF- $\beta$ /Smad 通路传递完成对细胞核内靶基因的调控,导致成肌纤维细胞发生,细胞外基质沉积<sup>[10]</sup>。江宇峰等<sup>[11]</sup>证实,在兔耳增生性瘢痕组织中,TGF- $\beta$ 1、Smad4 蛋白水平较正常皮肤组织中含量显著增加,具有重要代表意义,提示增生性瘢痕的形成与 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路异常传导有关。

因此,本实验对石榴皮多酚软膏抗增生性痤疮瘢痕进行探究。病理组织学提示,石榴皮多酚软膏组较模型组及阴性对照组创面表皮坏死层脱落早,新生上皮形成较快,直至第21天,结缔组织增生,成纤维细胞及毛细血管数量下降明显。模型组与阴性对照组无论在创面修复速度,还是结缔组织增生情况方面都没有明显差异,进一步说明,石榴皮多酚软膏可以加快组织修复,抑制瘢痕形成。免疫组化检测结果显示,石榴皮多酚软膏可显著降低增生性瘢痕组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad4 水平,提示石榴皮多酚

软膏抗增生性瘢痕形成作用可能与 TGF- $\beta$  调控的 Smad4 表达有关。

综上所述,石榴皮多酚软膏可以通过调控 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路抗增生性瘢痕的形成,其中,石榴皮多酚中剂量组效果最佳,差异均有统计学意义,为临床应用提供实验依据。

#### 参考文献

- [1] CLARK A K, SARIC S, SIVAMANI R K. Acne scars: how do we grade them[J]. American Journal of Clinical Dermatology, 2018,19(2):139-144.
- [2] 赵启明,方方.皮肤外科学[M].杭州:浙江科学技术出版社,2012:335-340.
- [3] ZAENGLEIN A L, PATHY A L, SCHLOSSER B J, et al. Guidelines of care for the management of acne vulgaris[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2016,74(5):945-973.
- [4] 李凯,高琳,钱琳翰,等.面部痤疮瘢痕综合治疗[J].中国激光医学杂志,2016,25(5):291-291.
- [5] 杜晓霜,马莹莹,雍永秀,等.植物皮类中药治疗皮肤病的临床研究进展[J].中国民族民间医药,2016,25(5):22-24.
- [6] 杨筱静,赵波,那可,等.石榴皮中多酚类物质的研究进展[J].中国医药工业杂志,2013,44(5):509-514.
- [7] 张晓玲,朱明芳,杨柳,等.石榴皮多酚对痤疮丙酸杆菌体外抑菌活性的研究[J].湖南中医药大学学报,2015,35(9):23-25.
- [8] 苗明三,王坦,田硕.烧(烫)伤动物模型制备规范(草案)[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(24):11-16.
- [9] 王素红,刘长花,余贺玲,等.萎缩性痤疮瘢痕治疗进展[J].中国麻风皮肤病杂志,2017,33(1):55-58.
- [10] 李炳炅,周勇,李恒进.病理性瘢痕中 TGF- $\beta$ /Smad 通路研究进展[J].解放军医学院学报,2016,37(11):1211-1213.
- [11] 江宇峰,伍超,吴佳俊,等.积雪苷霜软膏对兔耳增生性瘢痕组织中 Smad4 蛋白表达的影响[J].安徽医药,2015,19(5):834-837.