

本文引用:黄新宇,陈丽,周忠志,胡晋婷,王霄霜,杨丁丁,王巍,叶永鑫,袁忠行,丁雅容,嵇昭钦,刘平安. 仙藕乳蒲方双向调节整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA对小鼠皮肤移植创面愈合的影响[J].湖南中医药大学学报,2021,41(7):1017-1021.

仙藕乳蒲方双向调节整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA 对小鼠皮肤移植创面愈合的影响

黄新宇¹,陈丽¹,周忠志²,胡晋婷¹,王霄霜¹,杨丁丁¹,王巍¹,叶永鑫¹,袁忠行¹,丁雅容¹,嵇昭钦¹,刘平安^{1*}
(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学中西医结合学科,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 从调节整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA探究仙藕乳蒲方促小鼠皮肤移植创面愈合的机制。**方法** 选用40只雌性C57BL/6小鼠,制作背部直径为1.2 cm圆形全层皮肤缺损模型,后进行自体原位皮肤移植,随机分为对照组和实验组,实验组给予仙藕乳蒲方粉末敷于皮肤移植区,对照组不予处理。免疫组织化学染色法比较组织整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA的含量;Masson染色比较两组皮肤移植区胶原纤维分布。**结果** (1)免疫组化统计结果显示:皮肤移植14 d,实验组合整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA表达明显高于对照组($P<0.05$);皮肤移植21 d,实验组合整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA表达则低于对照组($P<0.05$)。(2)Masson染色显示:与对照组相比,皮肤移植14 d,实验组真皮层胶原纤维丰富,排列致密有序;皮肤移植21 d,实验组真皮层胶原纤维更少沉积,且排列疏松规则。**结论** 仙藕乳蒲方在皮肤移植创面愈合早期,可提高整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA的表达,加强胶原纤维的合成分泌并加快创面收缩;在创面愈合晚期,降低整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA的表达,减少胶原纤维的合成分泌并防止创面过度收缩。仙藕乳蒲方可能通过双向调节整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA的表达,发挥促进皮肤移植创面愈合及降低纤维化的作用,为仙藕乳蒲方运用于临床皮肤移植创面愈合提供依据。

[关键词] 仙藕乳蒲方;皮肤移植;创面愈合;整合素 $\beta 1$; α -SMA

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.07.008

Effect of Xian'ou Rupu Recipe on the Wound Healing of Mice Skin Transplantation by Regulating Integrin $\beta 1$ and α -SMA Bidirectionally

HUANG Xinyu¹, CHEN Li¹, ZHOU Zhongzhi², HU Jinting¹, WANG Xiaoshuang¹, YANG Dingding¹, WANG Wei¹,
YE Yongxin¹, YUAN Zhonghang¹, DING Yarong¹, ZHUO Zhaoqin¹, LIU Ping'an^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Discipline of Integrated Chinese and
Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of the Xian'ou Rupu Recipe promoting the healing of mouse skin graft wounds by regulating integrin $\beta 1$ and α -SMA. **Methods** 40 female C57BL/6 mice were used to make a circular full-thickness skin defect model with a diameter of 1.2 cm on the back, autologous orthotopic skin graft were performed and divided into control group and experimental group. In the experimental group, the Xian'ou Rupu Recipe powder was applied to the skin grafting

[收稿日期] 2021-03-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973862);湖南省教育厅科研项目(18A207);湖南省长沙市科技局项目(kq1801047);湖南省大学生创新创业训练计划项目(S201910541006,S201910541016)。

[作者简介] 黄新宇,女,本科,研究方向:中西医结合创面修复与再生。

[通信作者] *刘平安,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:723679086@qq.com。

area, and the control group was not treated. Immunohistochemical staining was used to compare the content of integrin $\beta 1$ and α -SMA; Masson staining was used to compare the distribution of collagen fibers in the skin graft area between the two groups.

Results (1) The statistical results of immunohistochemistry showed that the expression levels of integrin $\beta 1$ and α -SMA in the experimental group were significantly higher than that in the control group at 14 days after skin transplantation ($P < 0.05$); at 21 days after the skin transplantation, the expression levels of integrin $\beta 1$ and α -SMA in the experimental group were lower than that in the control group ($P < 0.05$). (2) Masson staining showed that compared with the control group, 14 days after skin transplantation, the experimental group had rich collagen fibers in the dermis layer, and the arrangement was dense and orderly; 21 days after skin transplantation, the experimental group had less deposition of collagen fibers in the dermis layer, and the arrangement was loose and regular. **Conclusion** The Xian'ou Rupu Recipe can increase the expression of integrin $\beta 1$, α -SMA, strengthen the synthesis and secretion of collagen fibers and accelerate the contraction of wounds in the early stage of skin graft wound healing; in the late stage of wound healing, reduce the expression of integrin $\beta 1$, α -SMA, reduce synthesis and secretion of collagen fibers and prevent excessive contraction of the wound surface. It was confirmed that the Xian'ou Rupu Recipe may play a role in promoting skin graft wound healing and reducing fibrosis by bidirectionally regulating the expression of integrin $\beta 1$ and α -SMA, providing a basis for the application of the Xian'ou Rupu Recipe in clinical skin graft wound healing.

[**Keywords**] Xian'ou Rupu Recipe; skin transplantation; wound healing; integrin $\beta 1$; α -SMA

皮肤移植是一种广泛应用于临床的有效治疗手段,但如何提高植皮后创面愈合率仍需进一步探索^[1-2]。移植创面愈合是涉及细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相互作用的动态的复杂过程,整合素 $\beta 1$ 是整合素家族的重要成员,通过“ECM-整合素-肌动蛋白骨架”系统参与多种细胞生物学进程,如细胞信号传导、细胞黏附与迁移等^[3-4]。 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)是细胞骨架的重要组成部分之一,在整合素胞内端传递的信号作用下,发生聚合或解聚引起细胞骨架构象的改变,影响细胞迁移运动、胶原分泌及组织收缩^[5-6]。

仙藕乳蒲方基于益气活血、祛腐生新而立方,由仙鹤草、藕节、乳香和蒲黄按君臣佐使原则精密配伍而成,中医学认为其具有收敛止血、活血祛瘀、消肿生肌的功效^[7],是临床治疗创伤疗效显著的经验方。前期研究^[7]证实:仙藕乳蒲方在兔耳增生性瘢痕模型和小鼠背部皮层缺损模型中具有促进肉芽组织生成及调节 I/III 型胶原比值,发挥促愈抑疤作用,但尚不清楚的是其能否通过双向调控整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA 的表达影响皮肤移植创面愈合。

本实验通过建立小鼠背部全层皮肤原位自体移植模型,比较创面整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA 的表达变化及

胶原纤维表达的差异,探究仙藕乳蒲方对皮肤移植创面愈合的影响机制,为其临床应用于皮肤移植提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 伦理审查

本研究经湖南中医药大学动物实验中心批准,批准号:LL2018011902。

1.2 实验动物

40 只成年雌性 C57BL/6 小鼠,4~6 周,体质量 18~22 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验期间动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级实验室(许可证号:SYXK 湘 2015-0003),温度维持在 20~22 °C。动物饲养及操作均严格按照实验动物伦理准则和操作指南规范执行。

1.3 实验试剂

(1)仙藕乳蒲方(专利号:201210467065.8)由湖南中医药大学第一附属医院制剂室按照本课题组已有方法制备^[7];(2)免疫组化试剂:兔抗小鼠整合素 $\beta 1$ (英国 Abcam 公司,批号:ab17947); α -SMA 抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab5694);通用型二步法检测试剂盒(北京诺博莱德科技有限公司,批号:WK151518r)。

1.4 模型制作及分组

完成小鼠适应性喂养3 d后,用10%水合氯醛以2.5~3.0 mL/kg的剂量腹腔注射麻醉小鼠,再在小鼠背部正中备皮形成1个4 cm×4 cm正方形裸皮区域,用络合碘与酒精消毒处理后,在小鼠背部正中用打孔器创设1个直径为1.2 cm的圆形全层皮肤缺损区域,到达深筋膜,取下来的皮片去除皮下脂肪、筋膜、血管等皮下组织,将皮片原位覆盖于创面处,用4-0的无菌缝合线沿创缘进行间断缝合固定。随机将移植皮肤的小鼠分为对照组($n=20$)和实验组($n=20$)。实验组:将仙藕乳蒲方粉末均匀敷于植皮区域;对照组:不予药物粉末特殊处理。随后用细小无菌纱布条对移植区进行加压包扎,于10 d后打开包扎。实验过程中有1例(实验组)由于麻醉不耐受死亡,2例(对照组)由于皮片感染未能成活,均视为造模失败停止后续观察,其余皮片均存活。

1.5 标本采集与检测

分别于皮肤移植14 d、21 d采用10%的水合氯醛麻醉,在其背部切取以皮肤移植区为中心的包括皮下组织的2 cm×2 cm的标本,用4%多聚甲醛固定,常温保存,送至湖南中医药大学医学院实验室进行Masson染色、免疫组织化学染色。

1.6 免疫组织化学染色切片观察

将两组免疫组织化学染色切片在Nikon 80i正置显微镜下观察并摄片。两组各时间点分别使用DSAssistant Lite软件随机选取6个不连续的高倍镜视野($\times 400$)截图,运用Image-Pro Plus 6.0计算两组不同时间点整合素 $\beta 1$ 及 α -SMA的平均光密度值(average optical density, AOD)。

1.7 Masson染色切片观察

石蜡切片脱蜡至水,依次自来水和蒸馏水洗后用Regaud苏木精染液或Weigert苏木精液染核5~10 min,过水充分水洗,用Masson丽春红酸性复红液5~10 min,再以2%冰醋酸水溶液浸洗片刻并用1%磷钼酸水溶液分化3~5 min。后不经水洗,直接用苯胺蓝或光绿液染5 min,再以0.2%冰醋酸水溶

液浸洗片刻,最后用95%酒精、无水酒精、二甲苯透明、中性树胶封固。将两组Masson染色切片在Nikon 80i正置显微镜下观察胶原纤维含量及分布,并摄片。

1.8 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行数据统计分析,两个样本间的比较采用独立样本 t 检验或Mann-Whitney U 秩和检验。计量资料符合正态性以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 仙藕乳蒲方对整合素 $\beta 1$ 及 α -SMA的双向调节

与对照组相比,皮肤移植术14 d,实验组整合素 $\beta 1$ (阳性表达部位在胞浆和胞膜中)着色更深,阳性表达多,AOD高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);而皮肤移植术21 d,实验组整合素 $\beta 1$ 着色变浅,阳性表达降低,AOD低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1、表1。

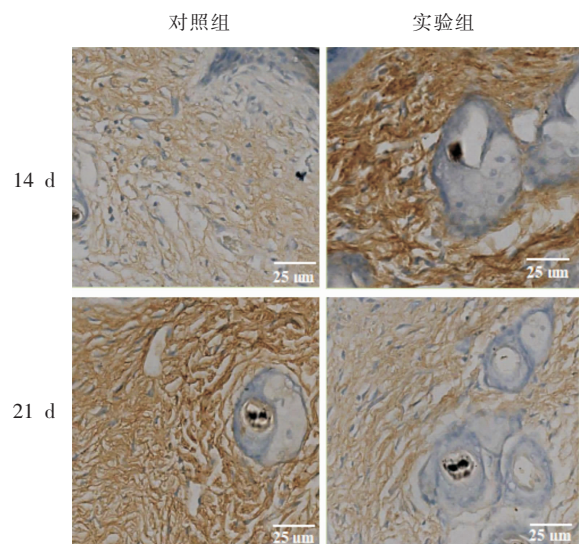


图1 皮肤移植14 d和21 d小鼠背部创面组织整合素 $\beta 1$ 表达对比($\times 400$)

表1 皮肤移植各组不同时间点整合素 $\beta 1$ 、 α -SMA的AOD($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	整合素 $\beta 1$		α -SMA	
	14 d	21 d	14 d	21 d
实验组	0.453 \pm 0.024*	0.361 \pm 0.023*	0.500 \pm 0.007*	0.269 \pm 0.010*
对照组	0.384 \pm 0.031	0.407 \pm 0.030	0.415 \pm 0.016	0.409 \pm 0.012

注:与对照组相比,* $P<0.05$

与对照组相比,皮肤移植术 14 d,实验组 α -SMA(阳性表达部位在胞浆中)着色更深,阳性表达多,AOD 高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);而皮肤移植术 21 d,实验组 α -SMA 着色变浅,阳性表达降低,AOD 低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2、表 1。

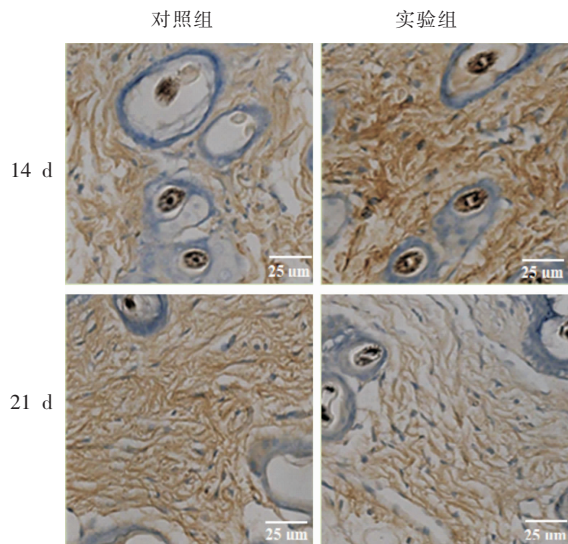


图 2 皮肤移植 14 d 和 21 d 小鼠背部创面组织 α -SMA 表达对比($\times 400$)

2.2 仙藕乳蒲方对胶原纤维的影响

Masson 染色显示,皮肤移植 14 d,对照组真皮层胶原纤维纵横交错,结构紊乱,且分布不均匀;实验组胶原纤维排列规律,含量丰富,分布均一。皮肤移植 21 d,对照组真皮层大量粗细不均胶原显著沉积,结构仍紊乱无规则;实验组真皮层沉积的胶原纤维较少,排列疏松规则。见图 3。

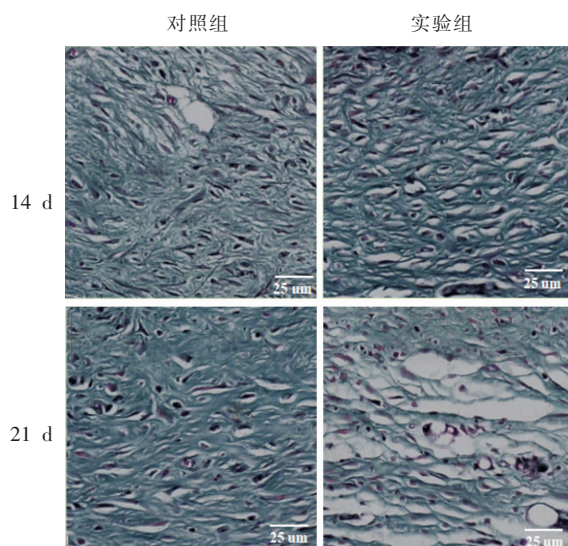


图 3 皮肤移植 Masson 染色结果对比($\times 400$)

3 讨论

皮肤移植创面愈合是一个涉及多种细胞和不同蛋白质参与的复杂有序的过程,整合素 $\beta 1$ 是细胞表面重要的跨膜黏附分子,ECM 中的诸多蛋白与整合素胞外段结合,胞内段与细胞内骨架蛋白 α -SMA 结合,形成 ECM-整合素-细胞骨架黏附物,从而细胞内外信号可实现双向传导,信号的双向传导在调节细胞增殖、迁移、黏附等多种生物过程都发挥了重要作用,这种机制是创面修复的重要一环^[3-4]。李哲^[8]发现在烧伤创面愈合过程中提高创面整合素的表达,可有效促进创面修复。 α -SMA 通过调节细胞骨架构象,影响肌成纤维细胞迁移运动、组织收缩,是参与创面修复的重要物质^[9],陈志勇等^[10]在对山萘酚促进皮肤瘢痕大鼠模型创面愈合过程的研究中证实 α -SMA 的表达和创面肉芽组织形成以及创面愈合率高度正相关;张玉婷等^[11]在对烧伤患者增生性瘢痕研究中发现,瘢痕的厚度随整合素表达量升高而增厚;张文夺等^[12]发现通过降低组织内 α -SMA 的表达,可调节 I、III 型胶原含量比例及降低增生瘢痕的形成。

本实验观察到,皮肤移植 14 d,实验组整合素 $\beta 1$ 和 α -SMA 表达水平明显高于对照组,而皮肤移植 21 d,实验组两者表达水平均低于对照组($P<0.05$)。Masson 染色结果显示,与对照组相比,皮肤移植 14 d,实验组胶原纤维含量较多,排列紧凑有规律;皮肤移植 21 d,实验组胶原纤维疏松、有序,更少沉积。以上结果提示,仙藕乳蒲方一方面在皮肤移植愈合早期增加整合素 $\beta 1$ 的表达,促进 ECM 等胞外信号向胞内传导,激活并聚合 α -SMA,促使成纤维细胞增殖、迁移并分泌胶原纤维以填充创面,促进创面收缩,加速创面愈合;另一方面,在皮肤移植愈合晚期,降低整合素 $\beta 1$ 的表达,使 α -SMA 解聚,抑制细胞运动及胶原分泌功能,减少创面胶原纤维沉积,创面组织不至于过度收缩,降低纤维化作用使创面更

好地塑形。综上,仙藕乳蒲方可能对整合素 $\beta 1$ 及 α -SMA 的表达具有双向调节的作用,达到促进小鼠背部皮肤移植创面愈合的同时降低纤维化作用。因此,我们推测仙藕乳蒲方可能对于人体皮肤移植创面愈合具有促愈抑疤的疗效,但是有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] SULLIVAN M A, ADKINSON J M. A systematic review and comparison of outcomes following simple syndactyly reconstruction with skin grafts or a dorsal metacarpal advancement flap[J]. *The Journal of Hand Surgery*, 2017, 42(1): 34-40.e6.
- [2] 冉小芳,孙进华,王香坤,等.对接受烧伤植皮手术患者的植皮区进行术后负压封闭引流的效果研究[J].*当代医药论丛*,2018,16(3): 69-70.
- [3] 李全,巴特.整合素在烧伤创面愈合中的作用研究进展[J].*中华损伤与修复杂志(电子版)*,2018,13(2):130-133.
- [4] 于永慧,王承龙.整合素 $\beta 1$ 家族参与心肌纤维化发生的关键细胞事件:进展与契机[J].*心血管病学进展*,2018,39(3):355-359.
- [5] 郭晋宣,杨时昕,陕柏峰,等.透明质酸联合硅酮凝胶膜对创面愈合后增生性瘢痕的疗效观察[J].*中国药物与临床*,2018,18(3):375-376.
- [6] 刘银平.创伤后瘢痕形成机制及治疗的研究[D].广州:南方医科大学,2012.
- [7] 周畅,陈丽,胡晋婷,等.复方 ANBP 对小鼠皮肤移植创面愈合的疗效观察[J].*湖南中医药大学学报*,2020,40(5):546-549.
- [8] 李哲.高压氧对烧伤后感染创面治疗的疗效分析[J].*山西医药杂志*,2020,49(20):2818-2819.
- [9] SHINDE A V, HUMERES C, FRANGOGIANNIS N G. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 2017, 1863(1): 298-309.
- [10] 陈志勇,余雪丰,黄洁清,等.山萘酚对皮肤瘢痕大鼠模型 α -SMA 蛋白及相关炎性因子表达的影响[J].*局解手术学杂志*,2019,28(6): 437-441.
- [11] 张玉婷,李攀,罗伦,等.烧伤患者瘢痕重塑期增生性瘢痕机械信号转导分子与伤后时间的相关性研究[J].*中华烧伤杂志*, 2018,34(10):690-695.
- [12] 张文夺,邓呈亮,郭常敏,等.人真皮间充质干细胞对增生性瘢痕成纤维细胞 α -SMA 和 DCN 表达的影响[J].*中华整形外科杂志*, 2016(4):285-292.

(本文编辑 苏维)