

五倍子癩痕膏对癩痕疙瘩 mTOR 信号通路的调控作用研究

翟晓翔¹, 唐志铭², 丁继存³, 管志强⁴, 蒋嬭⁴

1. 上海市第七人民医院皮肤科, 上海 200137
2. 徐州市中医院皮肤科, 江苏 徐州 221003
3. 徐州市中心医院烧伤整形科, 江苏 徐州 221009
4. 南京中医药大学研究生院, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 观察五倍子癩痕膏对癩痕疙瘩哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路关键分子磷脂酰肌醇 3-激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、10 号染色体张力缺失蛋白磷酸酶 (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)、蛋白激酶 B (Protein Kinase B, Akt)、mTOR 表达的影响。方法: 将 36 只裸鼠癩痕疙瘩模型随机分成治疗组和模型组, 每组 18 只。治疗组涂抹五倍子癩痕膏, 模型组仅涂抹制作五倍子癩痕膏的基质, 每天 3 次, 连续 30 天。然后应用免疫组化检测治疗组和模型组癩痕疙瘩及正常皮肤组织中 PI3K、PTEN、Akt、mTOR 的表达。结果: 与正常皮肤组比较, 模型组 PI3K、Akt、mTOR 表达阳性率升高, 而 PTEN 表达阳性率降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 治疗组 PI3K、Akt、mTOR 表达阳性率降低, 而 PTEN 表达阳性率升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。应用 Person 法对癩痕疙瘩中 mTOR 信号通路各关键信号分子表达相关性进行分析, 结果 PTEN 与 PI3K、mTOR、Akt 呈负相关, PI3K 与 mTOR、Akt 呈正相关, Akt 与 mTOR 呈正相关。结论: 五倍子癩痕膏抑制癩痕疙瘩成纤维细胞增殖的机制与其上调 mTOR 信号通路中 PTEN 表达及下调 PI3K、Akt、mTOR 表达有关。

[关键词] 癩痕疙瘩; 五倍子癩痕膏; mTOR 信号通路; 动物实验; 裸鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 04-0012-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.04.004

Study on the Regulatory Effect of Wubeizi Banhen Ointment on the mTOR Signaling Pathway of Keloid

ZHAI Xiaoxiang, TANG Zhiming, DING Jicun, GUAN Zhiqiang, JIANG Wan

Abstract: **Objective:** To observe the effect of Wubeizi Banhen ointment on expressions of such key molecules as phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K), phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten(PTEN) and protein Kinase B(Akt) and mTOR in the mammalian target of rapamycin(mTOR) signaling pathway of keloid in mammals. **Methods:** Divided the models of 36 nude mice with keloid into the treatment group and the model group randomly, 18 mice in each group. The treatment group received the external application of Wubeizi Banhen ointment, while the model group only received the external application of the base for making Wubeizi Banhen ointment, three times per day and for 30 days continuously. Detected the expressions of PTEN, PI3K, Akt and mTOR in keloid and normal skin of the treatment group and the model group via immunohistochemical detection. **Results:** Comparing with the normal skin group, the positive rate of expressions of PI3K, Akt and mTOR in the model group was increased respectively, and the positive rate of expressions of PTEN was decreased, differences being significant($P < 0.05$); comparing with the model group, the positive rate of expressions of PI3K, Akt and mTOR in the treatment group was decreased respectively, and the positive rate of expressions of PTEN was increased, differences being significant($P < 0.05$). A correlation analysis was conducted for the expressions of each key molecule in the mTOR signaling pathway of keloid via Person method. As the results showed, PTEN had a negative correlation with PI3K, mTOR and Akt, PI3K had a positive correlation with mTOR and Akt, and Akt had a positive correlation with mTOR. **Conclusion:** The mechanism of Wubeizi Banhen ointment suppressing fibroblast proliferation of keloid is related

[收稿日期] 2018-09-21

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81673976)

[作者简介] 翟晓翔 (1965-), 男, 主任中医师, 研究方向: 中西医结合防治皮肤病。

[通信作者] 唐志铭, E-mail: 158914788@qq.com.

to its up-regulation of expression of PTEN and its down-regulation of expressions of PI3K, Akt and mTOR in the mTOR signaling pathway.

Keywords: Keloid; Wubeizi Banhen ointment; The mTOR signaling pathway; Animal experiment; Nude mice

瘢痕疙瘩是皮肤创伤修复和愈合过程中异常增生所形成的病态产物,其病理特征主要表现为成纤维细胞大量增殖和以胶原为主的细胞外基质的过度沉积^[1]。目前国内外对瘢痕疙瘩的发病机制研究甚多,但是其确切发生机制至今尚未完全阐明,且其防治也没有取得突破性进展。本课题组应用中医皮肤科大家欧阳恒老先生创制的五倍子瘢痕膏治疗瘢痕疙瘩疗效确切^[2]。前期实验研究证实五倍子瘢痕膏能抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖^[3],但具体作用机理尚不清楚。研究表明,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路与细胞异常增殖密切相关,在瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖过程中有重要作用。为证实五倍子瘢痕膏抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖是否与其调控该信号通路有关,本研究应用免疫组化技术检测 mTOR 信号通路相关分子在瘢痕疙瘩组织中的表达情况及五倍子瘢痕膏的干预作用,以期阐明五倍子瘢痕膏抑制病理性瘢痕成纤维细胞增殖的具体机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 鼠抗人 mTOR 单克隆抗体、鼠抗人 p-Akt1/2/3(B-5)单克隆抗体、鼠抗人 10 号染色体张力缺失蛋白磷酸酶(Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)(A2B1)单克隆抗体、鼠抗人 PI3-Kinase p85(B-9)单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒、通用 SP 检测试剂盒、浓缩型胰蛋白酶消化液(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

高精度轮转式石蜡切片机、图像采集系统、正置显微镜(德国徕卡公司),石蜡包埋机(常州中威电子仪器有限公司),超净工作台(苏州净化设备公司),电热恒温水箱(北京长安科学仪器厂),振荡器(上海沪西分析仪器厂)。

1.2 标本来源 标本来自徐州市中医院皮肤科手术切除治疗后的前胸部瘢痕疙瘩组织和徐州市中医院泌尿外科包皮过长患者所切除的正常皮肤组织。

1.3 实验动物分组及模型制备 6 周龄雌性裸鼠(BALB/C-nunu 品系)36 只,体质量 18~22 g,购自徐州医科大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(苏)2017-0009。参照 Kischer 法^[4],将 36 只裸鼠无菌环境进行适应性喂养 1 周后,称量体质量,计算水合氯醛麻醉量(麻醉量:裸鼠体质量=0.2 mL:10 g),采用腹腔注射麻醉裸鼠,颈背部皮肤切开,将人体手术切除的瘢痕疙瘩组织切割成 5 mm×5 mm×5 mm 方块,移植到裸鼠背部皮下,对称缝合,加压包扎,固定,温箱麻醉复苏。14 天左右建成瘢痕疙瘩模型。随机分成治疗组和模型组,每组 18 只。治疗组涂抹五倍子瘢痕膏(徐州市中医院制剂室制备),模

型组仅涂抹制作瘢痕膏的基质,每天 3 次,连续 30 天。

1.4 免疫组织化学染色 采用颈椎脱臼法处死动物,随机取出移植裸鼠背部的瘢痕疙瘩组织,同时收集包皮过长患者所切除的正常皮肤组织 18 块,切成 5 mm×5 mm×5 mm 小块,4%多聚甲醛低温保存 72 h 以上。标本制成 4 μm 厚的石蜡切片,62 °C 烤箱烤 30 min,二甲苯脱蜡 2 次,梯度酒精水化,PBS 漂洗 3 次。封闭内源性过氧化酶,PBS 漂洗 3 次。用正常山羊血清在 37 °C 温箱中封闭非特异性抗原 10 min,PBS 漂洗 3 次。用一抗孵育切片放入 4 °C 冰箱过夜,用 PBS 漂洗 3 次。用生物素标记山羊抗裸鼠 / 兔 IgG 37 °C 恒温孵育 30 min,用 PBS 漂洗 3 次。滴入辣根酶标记链霉卵白素工作液 10 min,把切片放入 DAB 显色液,室温下反应,待显色充分,及时用 PBS 漂洗 2 次。苏木素染色液孵育 20 s,梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。以 PBS 代替一抗孵育组织切片为阴性模型组。

1.5 染色结果判定 正置显微镜下观察,mTOR、磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (Protein Kinase B, Akt)、以胞质着色为浅黄色、棕黄色、黄褐色为阳性细胞,PTEN 以细胞核着色为浅黄色、棕黄色、黄褐色为阳性细胞,评分参考 Shimizu 法^[5],根据每张切片染色差异,按无着色、浅黄色、棕黄色、黄褐色分别记 0、1、2、3 分,以阳性着色面积 / 光镜下拍照面积占比 0、小于 1/3、1/3~2/3、大于 2/3 分别记 0、1、2、3 分。以 2 种评分之和 ≥ 3 分记为阳性。

1.6 统计学方法 实验数据采用 SPSS20.0 软件进行分析,2 样本百分数比较, Pearson 法进行相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 PI3K、PTEN、Akt、mTOR 表达结果比较 PI3K、Akt、mTOR 主要表达在细胞质及少量细胞核中,PTEN 主要表达在细胞核及少量细胞质中,均呈棕黄色。见图 1。PI3K、Akt、mTOR 在模型组中高表达,而在治疗组和正常皮肤组中低表达;PTEN 在模型组中低表达,而在治疗组和正常皮肤组中高表达。

2.2 各组 PI3K、PTEN、Akt、mTOR 免疫组化染色阳性率结果比较 见表 1。与正常皮肤组比较,模型组 PI3K、Akt、mTOR 免疫组化染色表达阳性率高,而 PTEN 表达阳性率低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组 PI3K、Akt、mTOR 免疫组化染色表达阳性率低,而 PTEN 表达阳性率高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

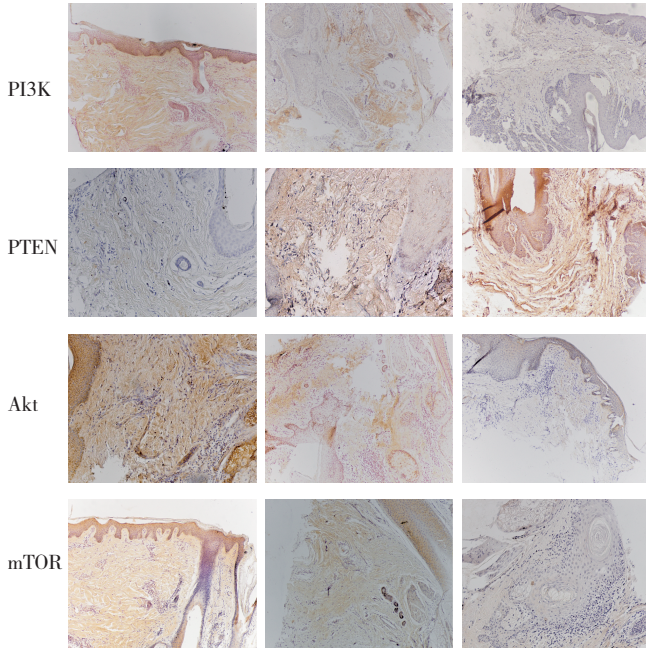


图1 各组 PI3K、PTEN、Akt、mTOR 表达情况

表1 各组 PI3K、PTEN、Akt、mTOR 免疫组化染色阳性率结果比较

组别	PI3K	PTEN	Akt	mTOR	%
正常皮肤组	27.78	100	44.44	11.11	
模型组	66.67 ^①	22.22 ^①	94.44 ^①	72.22 ^①	
治疗组	33.33 ^②	88.89 ^②	38.89 ^②	16.67 ^②	

与正常皮肤组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

2.3 瘢痕疙瘩中 PTEN 与 PI3K、mTOR、Akt 表达的相关性分析 在瘢痕疙瘩组织中, PTEN 阳性病例数中有 3 例 PI3K 阴性表达, PTEN 阴性病例数中有 11 例 PI3K 阳性表达, 2 组同阳性例数为 1 例, 同阴性 3 例。2 组表达呈负相关性($r = -0.74$, $P = 0.021$)。PTEN 阳性病例数中有 1 例 Akt 阴性表达, PTEN 阴性病例数中有 14 例 Akt 阳性表达, 2 组同阳性例数为 13 例, 同阴性 0 例, 2 组表达呈负相关性($r = -0.77$, $P = 0.000$)。PTEN 阳性病例数中有 2 例 mTOR 阴性表达, PTEN 阴性病例数中有 11 例 mTOR 阳性表达, 2 组同阳性例数为 2 例, 同阴性 3 例, 2 组表达呈负相关性($r = -0.66$, $P = 0.037$)。

2.4 瘢痕疙瘩中 PI3K 与 Akt、mTOR 表达的相关性分析 在瘢痕疙瘩组织中, PI3K 阳性病例数中有 1 例 Akt 阴性表达, PI3K 阴性病例数中有 6 例 Akt 阳性表达, 2 组同阳性例数为 11 例, 同阴性 0 例, 2 组表达呈正相关性($r = 0.768$, $P = 0.020$)。PI3K 阳性病例数中有 3 例 mTOR 阴性表达, PI3K 阴性病例数中有 4 例 mTOR 阳性表达, 2 组同阳性例数为 9 例, 同阴性 2 例, 两组表达呈正相关性($r = 0.635$, $P = 0.023$)。

2.5 瘢痕疙瘩中 Akt 与 mTOR 表达的相关性分析 在瘢痕疙

瘩组织中, Akt 阳性病例数中有 4 例 mTOR 阴性表达, Akt 阴性病例数中有 0 例 mTOR 阳性表达, 2 组同阳性例数为 13 例, 同阴性 1 例, 2 组表达呈正相关性($r = 0.746$, $P = 0.021$)。

3 讨论

中医药对瘢痕疙瘩的认识很早, 对其防治也有着悠久的历史, 并且积累了许多宝贵的经验与方法。中医学认为瘢痕疙瘩属“肉龟疮”“锯痕症”“肉蜈蚣”“蟹足肿”等范畴, 其基本病机为“湿毒搏结, 气血瘀滞”, 即机体素有湿浊内蕴, 复有金刀、火毒和虫毒外袭, 伤及肌肤, 致营卫不和, 湿毒搏结, 日久则经络痹阻, 气血瘀滞^[6]。

五倍子瘢痕膏为欧阳恒先生在以上病理理论指导下, 以化痰软坚解毒法为组方原则创制而成(方药组成为黑醋、五倍子、蜈蚣、丹参、威灵仙、地骨皮、白矾)。方中黑醋软坚解毒, 五倍子收敛解毒, 蜈蚣破瘀以毒攻毒, 丹参活血祛瘀, 威灵仙祛湿通络, 地骨皮软化角质层, 白矾解毒燥湿。本课题组前期临床研究显示, 五倍子瘢痕膏治疗瘢痕疙瘩疗效确切, 总有效率为 96.56%^[2]。此外, 实验研究发现五倍子瘢痕膏能抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖^[3], 以及在基因转录水平上影响其胶原的合成^[7]。目前五倍子瘢痕膏抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的具体作用机制尚不清楚, 有必要对此进行更深入的研究和探讨, 这对于进一步揭示活血软坚解毒法防治瘢痕疙瘩的相关机制及其有效靶点有重要的意义。

mTOR 信号通路是调控蛋白质合成的主要信号通路, 参与细胞增殖、分化等调节, 日益受到有关研究者的重视, 逐渐成为研究的热点。mTOR 信号通路包括上游的磷脂酰肌醇 PI3K、Akt、PTEN, 其中 PTEN 是负反馈调节因子; 下游的核糖体蛋白 S6 激酶(Ribosomal protein S6 kinase, S6K)、真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白(Eukaryotic cell translation initiation factor 4E binding protein, 4EBP), 两者均是蛋白翻译的关键调节因子。胞外信号与跨膜的酪氨酸激酶受体结合后, 受体酪氨酸残基被磷酸化而激活, 从而与 PI3K 的调节亚基 p85 结合, 再激活 PI3K, 活化的 PI3K 可激活下游的 Akt, 活化的 Akt 激活 mTOR。mTOR 是蛋白合成的关键调节物, 激活后的 mTOR 作用于下游的 2 个主要靶蛋白, 即 S6K 和 4EBP。近年来研究证实, mTOR 基因与细胞异常增殖及肿瘤的发生密切相关, 在多种肿瘤, 如胶质瘤、食管癌、大肠癌等组织中表达明显增强^[8]。瘢痕疙瘩属于良性实体瘤, 可向周围正常组织呈侵袭性生长, 其病理特点与肿瘤极为相似, 具有类肿瘤特性。因此, 本研究团队推测在瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖过程中 mTOR 信号通路可能具有重要的作用, 且五倍子瘢痕膏对该信号通路可能存在干预作用。

为证实以上科研假说, 本研究应用免疫组化技术来探讨 mTOR 信号通路关键分子在瘢痕疙瘩中的表达情况及五倍子瘢痕膏对它的调控作用。结果 PI3K、Akt、mTOR 在模型组瘢痕疙瘩中高表达, 而在治疗组瘢痕疙瘩和正常皮肤组织中低表

达; PTEN 在模型组瘢痕疙瘩中低表达, 而在治疗组和正常皮肤组织中高表达。应用 Person 法对瘢痕疙瘩中 mTOR 信号通路各关键信号分子表达相关性进行分析表明, PTEN 与 PI3K、mTOR、Akt 呈负相关, PI3K 与 mTOR、Akt 呈正相关, Akt 与 mTOR 呈正相关。提示 mTOR 通路参与了瘢痕疙瘩的形成过程, 而五倍子瘢痕膏对该信号通路存在干预作用。五倍子瘢痕膏抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的机制与其上调 mTOR 信号通路中 PTEN 表达及下调 PI3K、Akt、mTOR 表达有关, 这为五倍子瘢痕膏治疗瘢痕疙瘩提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Veer WMVD, Bloemen MCT, Ulrich MMW, et al. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation[J]. *Bums*, 2009, 35(1): 15-29.
- [2] 丁继存, 严月华, 翟晓翔, 等. 五倍子瘢痕膏治疗瘢痕疙瘩的疗效观察[J]. *河北医科大学学报*, 2007, 28(5): 356-359.
- [3] Ji CD, Zhi MT, Xiao XZ, et al. The effects of Wubeizi Ointment on the proliferation of Keloid-Derived Fibroblasts[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(1): 431-435.
- [4] Kischer CW, Pindur J, Shetlar MR, et al. Implants of hypertrophic scars and keloids into the nude (athymic) mouse: viability and morphology [J]. *Trauma*, 1989, 29: 672-677.
- [5] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissue [J]. *Human Pathol*, 1990, 21 (6): 607.
- [6] 赵炳南, 张志礼. 简明中医皮肤病学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2014: 248-249.
- [7] 翟晓翔, 丁继存, 陈向辉. 五倍子瘢痕膏水溶液对瘢痕疙瘩成纤维细胞 I、III 前胶原基因表达的影响[J]. *福建中医药*, 2010, 41(4): 53-55.
- [8] Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy—implications for cancer and aging[J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(3): 192-222.

(责任编辑: 冯天保, 钟志敏)

《新中医》杂志稿约 (2019 年)

《新中医》是由国家中医药管理局主管、广州中医药大学与中华中医药学会共同主办的国家级学术期刊, 1969 年创刊。标准刊号: ISSN 0256-7415, CN 44-1231/R, 月刊, 期刊代号: 国内: 46-38, 国外: M186。根据国家的有关标准和科技期刊的编排规范, 对来稿做出如下要求: 一、**征稿内容:** 本刊设方药实验研究、基础实验研究、实验模型研究、中医证型研究、文献综述研究、经典经方研究、古籍古方研究、临床治疗研究、针灸经络研究、推拿按摩研究、临床护理研究、思路方法研究、特色疗法研究、临床调研报告、临证医案研究、养生康复研究、名医传承研究、中医教育研究、医院管理研究等专栏。二、**来稿要求:** 主题鲜明, 论点明确, 论据充分, 文字精炼, 内容真实, 资料可靠, 数据准确, 数据比较应做统计学处理。三、**来稿格式:** 参照本刊格式。四、**投稿方式:** 在线投稿。网址: <http://xzy.ijournal.cn>。五、**文责自负:** 作者如有侵权行为, 本刊不负连带责任。署名人的顺序由作者决定。依照《著作权法》, 本刊对文稿有修改权、删节权, 修改稿未按时寄回视作自动撤稿。六、**稿件采用:** 需与编辑部签订论文著作权转让书, 并及时寄回《新中医》编辑部档案室。编辑部地址: 广州市番禺区广州大学城外环东路 232 号广州中医药大学办公楼《新中医》编辑部。邮编: 510006。电话: 020-39359588。