

本文引用:罗玉姣,岳金宝,吴丹,刘寻,李群,谭劲.扶正活血解毒方干预 ANE 诱导口腔黏膜成纤维细胞 I 型胶原表达的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(12):1308-1311.

扶正活血解毒方干预 ANE 诱导口腔黏膜成纤维细胞 I 型胶原表达的实验研究

罗玉姣,岳金宝,吴丹,刘寻,李群,谭劲*
(湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 观察槟榔提取液(areca nut extract, ANE)对口腔黏膜成纤维细胞 I 型胶原分泌的诱导作用及扶正活血解毒方的干预作用。**方法** 体外培养口腔黏膜成纤维细胞, ANE 为诱导剂,扶正活血解毒中药药物血清(低、中、高)为干预物;用免疫细胞化学法检测细胞内 I 型胶原的表达,用酶联免疫吸附剂测定法(ELISA)检测培养上清 I 型胶原的含量。**结果** ANE 对口腔黏膜成纤维细胞 I 型胶原的合成有促进作用($P<0.01$),扶正活血解毒方含药血清(中、高)对 ANE 刺激下的 FB 胶原合成有抑制作用($P<0.05$)。**结论** 扶正活血解毒中药可下调 ANE 诱导的口腔黏膜成纤维细胞 I 型胶原的表达。

[关键词] 槟榔提取液;扶正活血解毒方;口腔黏膜成纤维细胞;I 型胶原

[中图分类号] R285;R593.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.12.003

Effect of Fuzheng Huoxue Jiedu Decoction on the Expression of Collagen I in Oral Mucosal Fibroblasts Induced by ANE

LUO Yujiao, YUE Jinbao, WU Dan, LIU Xun, LI Qun, TAN Jin*

(The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of collagen I in oral mucosal fibroblasts induced by ANE and the intervention of Fuzheng Huoxue Jiedu decoction. **Methods** Oral mucosal fibroblasts were cultured in vitro, ANE was used as an indicator, and Fuzheng Huoxue Jiedu decoction as intervention medicine. The expression of collagen I was measured by immunocytochemical method, and the content of collagen I was determined by ELISA. **Results** ANE had promotion effect on the synthesis of collagen I in oral mucosal fibroblasts ($P<0.01$), Fuzheng Huoxue Jiedu decoction drug serum had inhibition effect on the expression of collagen I induced by ANE ($P<0.05$). **Conclusion** Fuzheng Huoxue Jiedu decoction can inhibit the expression of collagen I in oral mucosal fibroblasts induced by ANE.

[Keywords] areca nut extract; Fuzheng Huoxue Jiedu decoction; oral mucosal fibroblasts; collagen I

研究表明大量咀嚼槟榔导致的口腔黏膜成纤维细胞增殖、胶原蛋白等细胞外基质的大量沉积是导致口腔黏膜下纤维化(Oral Submucous Fibrosis, OSF)的重要病因之一^[1-2]。OSF 已被世界卫生组织定义为癌前状态^[3]。I 型胶原蛋白(collagen type I)是胶原蛋白(collagen)的一种,它是一种结构蛋白,是细胞外基质的主要成分,其主要的功能是对组织细胞

支持和连接的作用。研究发现 I 型胶原蛋白的高表达与许多的纤维化疾病的发生是密切相关的^[4],目前还发现 I 型胶原蛋白在多种肿瘤如舌癌^[5]、头颈鳞癌^[6]、胰腺癌^[7]等中也呈高表达。有资料显示, I 型胶原蛋白在 OSF 晚期和口腔鳞癌中表达显著性增多并更具有活性^[8-9]。因此, I 型胶原蛋白可能在 OSF 及癌变发生和发展的过程中扮演一个非常重要的角色。近

[收稿日期] 2017-10-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373701)。

[作者简介] 罗玉姣,女,在读硕士研究生,主要从事口腔黏膜病防治研究。

[通讯作者] *谭劲,男,教授,博士研究生导师, E-mail:tanjinhn@aliyun.com。

年来本院口腔科采用扶正活血解毒中药治疗 OSF, 取得良好疗效^[10], 本实验通过观察扶正活血解毒中药含药血清对槟榔提取液(areca nut extract, ANE) 诱导的口腔黏膜成纤维细胞 I 型胶原分泌影响的作用, 初步探讨中医药体外抗 OSF 及癌变的作用及机制。

1 材料与方

1.1 实验试剂与仪器

DMEM 培养基 (GIBCO), 胎牛血清 (GIBCO), 一抗 (兔抗 Collagen I, Abcam), 二抗 (羊抗兔 IgG, Vector), DAB 试剂盒 (Vector), I 型胶原 ELISA 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。扶正活血解毒方由丹参、当归、红花、生地黄、玄参、白花蛇舌草、生黄芪、薄荷等药组成, 药材由湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供, 浸泡、煎煮、去渣, 浓缩至药液浓度为每毫升含生药 1 g, 冷藏备用。ANE (按文献方法^[11]制备)。二氧化碳培养箱 (M2300, Sheldon Manufacturing Inc), 酶标仪 (ELM3000, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 中药血清的制备 成年健康 SD 大鼠 32 只, 随机分为 4 组 (正常组和中药低、中、高剂量组), 每组 8 只, 分别以蒸馏水、扶正活血解毒方 4、8、16 g/kg (按照体表面积药物剂量换算公式计算, 分别相当 70 kg 成人剂量的 1、2、4 倍) 灌胃, 2 次/d, 连续 5 d。大鼠末次灌胃 1 h 后, 无菌条件下颈动脉采血, 室温静置 2 h, 1 500 转/分离心 10 min 制备血清, 56 °C 灭活 30 min, 0.22 μm 滤器除菌后, 用 DMEM 配制成含 10% 大鼠血清的培养液备用。

1.2.2 口腔黏膜成纤维细胞的培养与分组干预处理 口腔黏膜成纤维细胞的培养、鉴定及 ANE 诱导增殖按课题组前期实验^[11]介绍的方法进行。取第 3 代细胞分为 5 组: (1) 正常组: 正常大鼠血清; (2) 实验对照组: 正常大鼠血清+100 μg/mL ANE; (3) 实验组 (分低、中、高剂量组): 低剂量扶正活血解毒方含药血清+100 μg/mL ANE、中剂量扶正活血解毒方含药血清+100 μg/mL ANE、高剂量扶正活血解毒方含药血清+100 μg/mL ANE。将经鼠尾胶处理的盖玻片植入 24 孔培养板孔内, 细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于盖玻片上, 每组 6 孔, 培养 48 h 后, 收集上清液, -80 °C 保存, 用于 ELISA 检测; 培养细

胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后进行免疫细胞化学染色。

1.2.3 ELISA 检测上清液中 I 型胶原含量 按试剂盒说明书操作, 设置对照品组、样品组及空白组, 显色后, 以空白孔调零, 在波长 490 nm 处读取 OD 值; 以 OD 值为纵坐标, 以对照品浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 根据所测得的 OD 值在标准曲线上计算出 I 型胶原含量的相应浓度。

1.2.4 免疫细胞化学染色检测 I 型胶原的表达 免疫细胞化学染色主要步骤依次为: 0.01 MPBS 漂洗, 1% 过氧化氢溶液 10 min, 0.01 MPBS 漂洗, 5% 正常小牛白蛋白 (BSA)+0.3% TritonX-100 室温下封闭 1 h, 吸弃封闭液, 直接滴加一抗 (1:500), 4 °C 过夜, 0.01 MPBS 漂洗, 加入二抗 (1:200), 37 °C 孵育 1 h; 0.01 MPBS 漂洗, 加入 ABC 复合物, 37 °C 孵育 1 h; 0.01 MPBS, DAB 显色试剂盒 37 °C 显色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。用 PBS 替代一抗做阴性对照, 排除二抗的非特异性染色。每片取 5 个视野, 在高倍镜下摄取图像, 采用图像分析系统, 测定免疫阳性细胞的灰度值, 同时测量背底灰度值, 计算其差值的绝对值, 即得出免疫阳性细胞的相对灰度值。

1.3 统计处理

数据以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示。用 SPSS 21.0 统计软件分析, 多样本均数满足正态分布及方差齐性者用 *F* 检验, 两组间均数比较采用 *q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 检测结果

ELISA 结果显示, 实验对照组培养液中 Collagen I 的含量比正常组显著增高 ($P < 0.01$); 加入扶正活血解毒方干预后各实验组的 Collagen I 的含量均有所降低, 中剂量组和高剂量组 Collagen I 的含量比实验对照组显著减少 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 免疫细胞化学染色结果

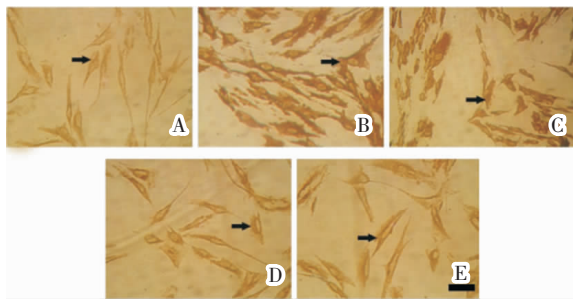
Collagen I 免疫阳性物质在正常口腔黏膜成纤维细胞胞浆中有表达, 但染色较浅。实验对照组 Collagen I 免疫阳性物质在胞浆中表达较强, 染色较深, 与正常组相比, 免疫阳性细胞相对灰度值明显要大 ($P < 0.01$)。各剂量实验组与实验对照组相比, 免

疫阳性细胞相对灰度值均有所减小,并且随剂量的增加而递减,中剂量组和高剂量组的作用最明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1,图1。

表1 扶正活血解毒中药对 ANE 刺激下的 Collagen I 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	培养液 (pg/mL)	细胞 (相对灰度值)
正常组	138±10.6	41.4±3.8
实验对照组	246±21.7 ^{△△}	73.1±6.9 ^{△△}
低剂量实验组	221±20.8	66.5±6.2
中剂量实验组	157±13.2*	46.8±4.5*
高剂量实验组	150±12.7*	44.5±4.3*
<i>F</i>	51.064	44.217
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与正常组相比,△△ $P<0.01$;与实验对照组相比,* $P<0.05$ 。



A.正常组; B.实验对照组; C.低剂量实验组; D.中剂量实验组; E.高剂量实验组。(箭头显示阳性变化区, bar=50 μm)

图1 口腔黏膜成纤维细胞 Collagen I 免疫化学染色

3 讨论

胶原又称胶原蛋白,是细胞外基质的主要成分,迄今已报道的胶原蛋白有20多类,胶原通常由3条肽链组成,每条单肽链称 α 链。根据胶原在体内的分布和功能特点分为两大类:成纤维胶原和非成纤维胶原。I型胶原属成纤维胶原,主要由成纤维细胞、网织细胞、巨噬细胞和血管平滑肌细胞等生成^[12]。I型胶原由2条 $\alpha 1$ -肽链和1条 $\alpha 2$ -肽链组成。I型胶原较粗大,交联紧密,抗张力强,其含量高的组织不易伸展、僵硬度高。增生性瘢痕组织中以I型胶原为主,瘢痕质地越硬,其含量越高^[13]。I型胶原蛋白的高表达与纤维化疾病的发生是密切相关的,目前还发现I型胶原蛋白在多种肿瘤中也呈高表达,I型胶原蛋白可能与肿瘤的发生和发展密切相关。OSF是以胶原纤维堆积为主要病变特征具有癌变倾向的口腔黏膜病^[14],研究发现,口腔黏膜下纤维化随病变程度进展的加深,I型胶原的表达逐渐增加,OSF晚期

和口腔鳞癌中I型胶原的表达显著性增多并更具有活性^[9,15],口腔黏膜下纤维化晚期患者出现固有层纤维弹性改变、上皮萎缩、口腔黏膜僵硬,张口受限,乃至不能进食,治疗方法主要采用注射胶原酶溶解胶原纤维和手术切除纤维条索^[16]。

中医学认为,口腔黏膜下纤维化是由于嗜食辛辣燥热之品,湿热邪毒郁积局部,引起局部气机不畅,日久气滞血瘀,形成病损^[17]。根据本病“毒瘀虚”互结的总体病机,我们采用扶正活血解毒中药治疗口腔黏膜下纤维化,临床疗效确切^[10]。方中丹参、当归、红花活血化瘀,生黄芪、白芍益气扶正,生地、玄参养阴清热,白花蛇舌草、茵陈解毒散瘀;全方共奏扶正活血解毒之功。现代研究表明丹参及化学组分具有抗纤维化、抗肿瘤的药理学作用^[18-19],丹参素可减少高糖诱导的腹膜间皮细胞I型胶原的分泌^[20];白花蛇舌草含有黄酮、三萜类、甾醇类等多种抗肿瘤活性成分,其主要通过诱导肿瘤细胞凋亡、产生超氧化物、影响癌基因表达、增强免疫功能、干扰肿瘤细胞能量代谢等多种途径起到抗肿瘤的作用^[21]。本实验采用ELISA、免疫细胞化学染色发现:正常培养的口腔黏膜成纤维细胞存在少量的I型胶原表达,经槟榔提取物刺激后I型胶原的含量明显增多。扶正活血解毒中药含药血清作用于ANE刺激下的FB后,上清液和细胞中I型胶原量均有所下降(与ANE刺激组相比 $P<0.05$),提示这种拮抗I型胶原的作用可能是其治疗OSF的有效机制之一。

本实验观察到了ANE对口腔黏膜成纤维细胞I型胶原分泌的诱导作用及扶正活血解毒方的干预作用,然而I型胶原的合成通路和降解通路是一系列复杂的分子事件,扶正活血解毒中药干预通路中的哪一环节还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Khan I, Kumar N, Pant I, et al. Activation of TGF- β pathway by areca nut constituents: a possible cause of oral submucous fibrosis[J]. PLoS ONE, 2012, 7(12): e51806.
- [2] Arakeri G, Rai KK, Hunasgi S, et al. Oral submucous fibrosis: An update on current theories of pathogenesis [J]. J Oral Pathol Med. 2017, 46(6):406-412.
- [3] Rajalalitha P, Vali S. Molecular pathogenesis of oral submucous fibrosis—a collagen metabolic disorder [J]. J Oral Pathol Med, 2005, 34(6):321-328.

- [4] Stefanovic B. RNA protein interactions governing expression of the most abundant protein in human body, type I collagen[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013, 4(5):535-545.
- [5] Salo S, Bitu C, Merkku K, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells induce collagen production and tongue cancer invasion[J]. PLoS One, 2013, 8(10):e77692.
- [6] Nurmenniemi S, Koivula MK, Nyberg P, et al. Type I and III collagen degradation products in serum predict patient survival in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2012, 48(2):136-140.
- [7] Dunér S, Lopatko Lindman J, Ansari D, et al. Pancreatic cancer: the role of pancreatic stellate cells in tumor progression[J]. Pancreatology, 2010, 10(6):673-681.
- [8] Manjunatha BS, Agrawal A, Shah V. Histopathological evaluation of collagen fibers using picrosirius red stain and polarizing microscopy in oral squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Ther, 2015, 11(2):272-276.
- [9] Hayashido Y, Kitano H, Sakaue T, et al. Overexpression of integrin αv facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin $\alpha v\beta 8$ with type I collagen [J]. Int J Oncol, 2014, 45(5):1875-1882.
- [10] 谭 劲,李元聪,陈 安,等.丹玄口康治疗口腔黏膜下纤维化的临床研究[J].湖南中医药大学学报,2006,26(5):41-43.
- [11] 谭 劲,李元聪,陈 明,等.槟榔提取物体外诱导人口腔黏膜成纤维细胞增殖模型的建立[J].湖南中医药大学学报,2007,27(3):11-13.
- [12] 牛建昭,贲长恩.器官纤维化基础及中医药防治[M].人民卫生出版社,2008:100.
- [13] 刘 燕,傅跃先,邱 林,等.红花对兔耳增生性瘢痕成纤维细胞及 I、III 型胶原的影响.中国组织工程研究与临床康复[J]. 2009,13(37):7296-7300.
- [14] Pindborg JJ, Murti PR, Bhonsle RB, et al. Oral submucous fibrosis as a precancerous condition[J]. Scand J Dent Res, 1984, 92: 224-229.
- [15] Hayashido Y, Kitano H, Sakaue T, et al. Overexpression of integrin αv facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via MEK/ERK signaling pathway that is activated by interaction of integrin $\alpha v\beta 8$ with type I collagen [J]. Int J Oncol, 2014, 45(5):1875-1882.
- [16] Aziz SR. Coming to America: betel nut and oral submucous fibrosis[J]. J Am Dent Assoc, 2010,141(4):423-428.
- [17] 李元聪.中西医结合口腔科学[M].北京:中国中医药出版社,2005:119.
- [18] Su CY, Ming QL, Rahman K, et al. Salvia miltiorrhiza: Traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology[J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(3):163-182.
- [19] 陆新良,钱可大.丹参抗纤维化作用机制的研究进展[J].中华内科杂志,2006,45(7):608-610.
- [20] 张 浩,徐 奕,王建华,等.丹参素对高糖刺激腹膜间皮细胞分泌纤维连接蛋白和 I 型胶原的影响[J].中南大学学报(医学版), 2011,36(1):44-50.
- [21] 吴逢选,周郁鸿,叶宝东.白花蛇舌草抗肿瘤机制研究进展及其在血液病中的应用[J].中华中医药杂志,2015,30(1):167-169.

(本文编辑 匡静之)