

冰蜜生肌膏对兔成纤维细胞增殖影响的实验研究

唐良华¹, 易洪城¹, 吴承龙², 熊屹¹, 宋应梅³

(1. 贵阳中医学院第二附属医院骨科, 贵州 贵阳 550003; 2. 贵阳医学院; 3. 贵阳中医学院)

【摘要】 目的: 观察冰蜜生肌膏促进体外培养兔成纤维细胞增殖的影响。方法: 采用消化分离法进行兔成纤维细胞的原代培养, 通过形态学和免疫组织化学的方法鉴定成纤维细胞。第 3 代纯化的成纤维细胞分为 5 组, 空白对照组每孔加入等量的 PBS, 实验组每孔分别加入 125、62.5、31.25、15.625 mg/ml 的冰蜜生肌膏提取液进行培养, 培养 24、48、72 h 后分别行 MTT 法检测每孔的光吸收值 (OD 值)。结果: 冰蜜生肌膏提取液加入到成纤维细胞中培养 24、48、72 h 后, 经 MTT 法检测, 不同浓度 (浓度分别为 125、62.5、31.25、15.625 mg/ml) 冰蜜生肌膏与对照组 OD 值比较差异有显著性统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 15.625 mg/ml 浓度冰蜜生肌膏对成纤维细胞的生长有明显促进作用 ($P < 0.05$), 药物浓度在 15.625 ~ 62.5 mg/ml 时其作用随药物浓度升高而增加, 并在浓度为 62.5 mg/ml 时达到最大效应值 ($P < 0.01$), 当药物浓度大于 62.5 mg/ml 时则作用趋向于饱和, 提示一定浓度范围内的冰蜜生肌膏药液能明显增加成纤维细胞数量, 且促进作用和浓度呈显著依赖性。

【关键词】 冰蜜生肌膏; 成纤维细胞; 免疫组织化学

Research of immunohistochemistry on the influence of borneol and honey ointment (BHO) promote proliferation of the fibroblasts of rabbits TANG Liang-hua^{*}, YI Hong-cheng, WU Cheng-long, XIONG Yi, SONG Ying-mei^{*} The 2nd Affiliated Hospital of Guiyang University of TCM, Guiyang 550003, Guizhou, China

ABSTRACT Objective: To observe the influence of BHO on the promotion of rabbit fibroblasts proliferation **Methods:** Fibroblasts of rabbit were obtained from the digested and apated method of primary culture and identified by morphology and immunohistochemistry. The third purified fibroblasts were divided into 5 groups. Each hole of the blank compared group was added into same quantity PBS to culture. Each hole of the experimental groups was cultured respectively with the concentration of BHO of different quantity (125, 62.5, 31.25, 15.625 mg/ml). MTT method was used to measure OD number of each hold after being cultured for 24, 48, 72 h respectively. **Results:** Fibroblasts of rabbit were obtained from technology of cell culture and identified by morphology and immunohistochemistry. Compared with blank groups, OD numbers with different concentration BHO were obviously different ($P < 0.05$). **Conclusion:** Fibroblasts of rabbit could be obtained from the digested and apated method of primary cell clture; BHO of regular concentration could increase the numbers of fibroblast obviously.

Key words Borneol and honey ointment; Fibroblast; Immunohistochemistry

冰蜜生肌膏是治疗皮肤缺损的复方中药制剂, 前期研究表明^[1], 冰蜜生肌膏具有解郁火、降热毒、促生肌、止疼痛的功效。本实验旨在从细胞水平观察冰蜜生肌膏对兔体外成纤维细胞增殖的影响, 为临床上使用冰蜜生肌膏治疗皮肤缺损提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 24 周龄的纯种新西兰兔 (雌雄不分), 由贵阳医学院实验动物中心提供, 体重 2.5 ~ 3 kg。

1.2 药物 冰蜜生肌膏: 将标准的纯冰片粉与新鲜紫云英蜂蜜 (贵阳中医学院第二附属医院中药房提供) 按质量比 1:5 混合后, 加入二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 制成浓度为 125 mg/ml 的冰蜜生肌膏药液, 调节 pH 值至 7.2, 用滤孔直径为 0.22 μm 的滤器进行过滤消毒, 密封备用。

1.3 主要试剂及仪器 兔 IgG 单克隆抗 Vimentin 抗体、DAB 显色试剂盒、SABC 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司, DMEM、胶原酶、胰蛋白酶购自华美生物工程有限公司, MTT 购自重庆辛创生物有限公司, 优生级小牛血清购自中美合资民海生物工程有限公司。中科院武汉科学仪器厂 B D-EK ELX800 酶标仪。

通讯作者: 唐良华 Tel: 0851-5581535 E-mail: thyyd@21.cn.com

1.4 观察项目与方法

1.4.1 成纤维细胞的鉴定方法 根据文献采用消化分离法^[2]培养技术进行兔成纤维细胞原代及传代培养,取第2代成纤维细胞,待其生长增殖达90%以上后,消化传代接种于96孔培养板内,培养72h后,行SABC法免疫细胞化学染色(一抗为兔克隆抗体,工作浓度为1:200,空白对照组以0.02 mol/L PBS代替一抗),鉴定其为成纤维细胞。

1.4.2 DMSO对成纤维细胞的细胞毒性试验 实验用第3代成纤维细胞,加入0.25%胰蛋白酶2 ml进行消化,加入DMEM培养液(添加有15%小牛血清)重悬,接种于96孔板中,每孔100 μl,分成5组(每组设3个复孔),培养8 d后,镜下观察细胞已经铺满80%后,换含不同浓度的DMSO,其中设一组为空白对照组(各加入100 μl PBS),其余4组为试剂添加组,分别加入浓度为100%、50%、25%、12.5%的DMSO(分别编号为1、2、3、4)各100 μl,放37℃,5% CO₂条件培养箱中静置培养24、48、72 h后各取1板,镜下观察细胞形态。

1.4.3 MTT法检测不同浓度冰蜜生肌膏对成纤维细胞增殖的影响 实验用第3代成纤维细胞,加入0.25%胰蛋白酶2 ml进行消化,加入DMEM培养液(添加有15%小牛血清)重悬,接种于96孔板中,每孔100 μl,分成5组(每组12孔),培养48 h,镜下观察细胞贴壁后,换含不同浓度的冰蜜生肌膏提取液,其中设一组为空白对照组(各加入100 μl PBS),其余4组为试剂添加组,分别加入浓度为125、62.5、31.25、15.625 mg/ml的冰蜜生肌膏药液(分别编号为1、2、3、4)各100 μl,放37℃,5% CO₂条件培养箱中静置培养24、48、72 h后各取1板,每孔加入5 mg/ml的MTT 20 μl,CO₂培养箱中孵育4 h,每孔加入150 μl的DMSO,恒温摇床震荡10 min,酶标仪上(最大吸收波长490 nm)测定每孔的光吸收值(OD值)(OD值大,说明细胞生长好,分化成熟;反之,则说明细胞生长差,分化不成熟)。

1.5 统计学处理 将所得数据输入Excel软件进行统计学处理。采用F检验和t检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著统计意义。

2 结果

2.1 成纤维细胞的鉴定 在实验中采用消化分离法培养技术进行兔成纤维细胞原代培养,通过换液法、自然纯化法得到成纤维细胞,通过形态学观察符合成纤维细胞的一般特征,并进一步通过免疫组化鉴定成纤维细胞特异性结构蛋白-Vimentin,鉴定为成纤维细胞。

2.2 DMSO对成纤维细胞的细胞毒性试验 经镜下观察发现各种浓度下细胞的形态均未发生明显的变化,说明各种浓度DMSO对成纤维细胞均无影响。

2.3 不同浓度冰蜜生肌膏对成纤维细胞增殖的影响 作用24、48、72 h后,4组试剂添加组较空白对照组明显增加($P < 0.05$),且随试剂浓度的增高OD值明显增加,但后两组(62.5、125 mg/ml组)比较差异无显著性统计意义($P > 0.05$),见表1。

实验结果提示:发现药物作用24、48、72 h后,不同浓度冰蜜生肌膏药液均有促进作用,其中15.625 mg/ml浓度冰

蜜生肌膏对成纤维细胞的生长有明显促进作用($P < 0.05$),药物浓度在15.625~62.5 mg/ml时其作用随药物浓度升高而增加,并在浓度为62.5 mg/ml时达到最大效应值($P < 0.01$),当药物浓度大于62.5 mg/ml时则作用趋向于饱和,提示一定浓度范围内的冰蜜生肌膏药液能明显增加成纤维细胞数量,且促进作用和浓度呈显著依赖性。

表1 不同浓度冰蜜生肌膏对成纤维细胞不同时间的OD值($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The OD value with different concentration BHO of fibroblast in the different time ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.281 ± 0.012	0.31 ± 0.046	0.369 ± 0.017
冰蜜生肌膏浓度			
15.625mg/ml	0.309 ± 0.017	0.392 ± 0.047	0.453 ± 0.068
31.250mg/ml	0.353 ± 0.049	0.488 ± 0.055	0.613 ± 0.071
62.500mg/ml	0.494 ± 0.034	0.577 ± 0.054	0.732 ± 0.083
125.000mg/ml	0.498 ± 0.045	0.581 ± 0.027	0.748 ± 0.048

注:与空白对照组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$

Note: Compared with control group, $P < 0.05$, $P < 0.01$

3 讨论

传统医学认为,冰片可去腐生肌、消肿止痛,现代医药学试验证明,冰片有抗菌、消炎、止痛作用^[3];蜂蜜可止痛,控制感染,减少渗出,促进疮面愈合,缩短疗程,将冰片与蜂蜜合用治疗疮疡,能协同发挥解郁火、降热毒、促生肌、止疼痛的功效^[1]。易洪城等^[1]在临床的初步运用证明冰蜜生肌膏具有比较明显的清热解毒、拔腐生肌、促进组织修复的作用。

在皮肤缺损后,成纤维细胞参与了愈合的全过程,真皮成纤维细胞是创伤愈合中合成和分泌I、III型胶原的主要细胞(正常皮肤以I、III型胶原为主),而且合成纤维连接蛋白(fibronectin, FN),FN可参与调控细胞的生长分化,促进创伤的再上皮化,并可促进伤口收缩,刺激血管内皮细胞生长^[4];而胶原的更新是影响伤口重建及瘢痕形成的重要因素,该过程主要依赖于胶原酶的作用,而胶原酶主要是由成纤维细胞产生的^[5]。冰蜜生肌膏通过促进成纤维细胞的生长,从而达到促进皮肤缺损的修复。本实验为该药临床的运用与开发提供了一定的理论依据,也为临床应用该药的剂量提供了一些依据。

参考文献

- 1 易洪城,周长林,李路,等.冰蜜生肌膏的临床应用-附128例报告.实用中西医结合杂志,1998,11(7):642
- 2 宋今丹,章静波,张世馥,等.组织和细胞培养技术.北京:人民卫生出版社,2002:83-84.
- 3 周小雅.中药冰片的药理研究.中国现代应用药学,1998,15(3):18.
- 4 秦全红,王德文.成纤维细胞在皮肤创伤愈合中的作用及调控.国外医学:创伤与外科基本问题分册,2000,21(1):36.
- 5 王益民,韦福康,刘敏.成纤维细胞与创伤修复的研究进展.中国修复重建外科杂志,2000,14(2):126-127.

(收稿日期:2006-07-19 本文编辑:李为农)