

•基础研究•

•论著•

超分子水杨酸对兔耳痤疮模型p38MAPK/NF- κ B信号通路的影响

杨力¹, 刘尚可², 林新瑜³, 罗霞¹, 肖媛媛¹

(1.西南医科大学附属医院皮肤科 四川 泸州 646000; 2.电子科技大学医学院 四川 成都 611731; 3.四川省医学科学院·四川省人民医院皮肤病性病研究所 四川 成都 610072)

[摘要]目的: 探究超分子水杨酸对兔耳痤疮模型p38MAPK/NF- κ B信号通路的影响机制。方法: 将30只实验兔随机分成正常对照组、2%超分子水杨酸(Salicylic acid, SA)组、30%SA组、夫西地酸组、模型对照组, 每组6只, 并予以相应外用药物干预, 连续4周, 并分别于用药2周后、用药4周后检测p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 、IL-8蛋白的表达。结果: 结果显示, 随着用药时间的延长, 各组的p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 、IL-8均呈下降趋势。用药前, 各组间p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 、IL-8蛋白表达均差异无统计学意义($P>0.05$)。用药2周后, 2%SA组、30%SA组、夫西地酸组p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 、IL-8低于模型对照组($P<0.001$); 三个用药组之间p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 两两比较差异无统计学意义($P>0.05$); 2%SA组IL-8低于30%SA组、夫西地酸组(均 $P<0.05$); 30%SA组与夫西地酸组IL-8差异无统计学意义($P>0.05$)。用药4周后, 三个用药组p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 、IL-8低于模型对照组($P<0.05$); 2%SA组、30%SA组p38MAPK、NF- κ B、IL-8低于夫西地酸组($P<0.05$), 2%SA组IL-8低于30%SA组($P<0.05$); 2%SA组与30%SA组p38MAPK差异无统计学意义($P>0.05$); 2%SA组、30%SA组与夫西地酸组IL-1 β 均差异无统计学意义(均 $P>0.05$); 2%SA组IL-1 β 低于30%SA组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论: 超分子水杨酸可通过抑制p38MAPK/NF- κ B信号通路来发挥抗炎作用, 且随着用药时间的延长疗效也在逐渐增加, 并优于夫西地酸。

[关键词]痤疮; 兔耳痤疮模型; 超分子水杨酸; 抗炎; p38MAPK/NF- κ B信号通路

[中图分类号]R758.73³ **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2024)03-0001-05

Effect of Supramolecular Salicylic Acid on p38MAPK/NF- κ B Signaling Pathway in Rabbit Ear Acne Models

YANG Li¹, LIU Shangke², LIN Xinyu³, LUO Xia¹, XIAO Yuanyuan¹

(1.Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China; 2.Medical School, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 611731, Sichuan, China; 3.Institute of Dermatology and Venereology, Sichuan Academy of Medical Sciences, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of supramolecular salicylic acid on p38MAPK/NF- κ B signaling pathway in rabbit ear acne model. **Methods** Divided thirty experimental rabbits into normal control group, 2%SA group, 30%SA group, fusidic acid group and model control group(There were 6 rabbits in each group) randomly. Gave corresponding external drug intervention for 4 weeks. Detected the expressions of p38MAPK, NF- κ B, IL-1 β and IL-8 after 2 weeks and 4 weeks. **Results** Result display, P38MAPK, NF- κ B, IL-1 β , and IL-8 of each group showed a downward trend after treatment. Before treatment, there were no significant differences in expression of p38MAPK, NF- κ B, IL-1 β and IL-8 among groups ($P>0.05$). After 2 weeks of treatment, p38MAPK, NF- κ B, IL-1 β , and IL-8 of 2% SA group, 30% SA group and fusidic acid group were lower than model control group ($P<0.001$). There were no significant differences in p38MAPK, NF- κ B, and IL-1 β ($P>0.05$). IL-8 of 2% SA group was lower than 30% SA group and fusidic acid group (all $P<0.05$). There was no significant difference in IL-8 between 30% SA group and fusidic acid group ($P>0.05$). After 4 weeks of treatment, p38MAPK, NF- κ B, IL-1 β , and IL-8 of three treatment groups were lower than model control group ($P<0.05$). p38MAPK, NF- κ B, IL-8 of 2% SA group and 30% SA group was lower than fusidic acid group ($P<0.05$), IL-8 of 2%SA group was lower than 30%SA group ($P<0.05$). There was no significant difference in p38MAPK between 2%SA group and 30%SA group ($P>0.05$). 2% SA group, 30% SA group and

基金项目: 四川省医学(青年创新)科研课题(编号: S19018); 四川省卫计委基金资助项目(编号: 21PJ087)

通信作者: 林新瑜, 主任医师; 研究方向为皮肤美容与损容性皮肤病的诊治。Email: linxinyu8989@163.com

第一作者: 杨力, 住院医师; 研究方向为皮肤美容与损容性皮肤病的诊治。Email: yanglili9494@163.com

fusidic acid group had no significant difference in IL-1 β (all $P>0.05$). 2%SA group IL-1 β was lower than 30%SA group, the difference was Statistical significance ($P<0.05$). **Conclusion** Supramolecular salicylic acid can exert an anti-inflammatory effect by inhibiting the p38MAPK/NF- κ B signaling pathway, and the curative effect gradually increases with the prolongation of medication time, and is superior to fusidic acid.

Key words: acne; rabbit ear acne models; supramolecular salicylic acid; anti-inflammatory; p38MAPK/NF- κ B signaling pathway

寻常痤疮是发病率极高的慢性炎症性皮肤病,为全球八大流行病之一,共计约9.4%的人口受累^[1]。目前公认的发病机制中包括毛囊漏斗部角化过度、P. acnes繁殖、皮脂分泌过度、炎症反应及宿主的免疫反应、性激素变化及精神心理等因素^[2]。其中P. acnes引起的炎症反应在痤疮发病机制中至关重要。组织病理、免疫以及临床研究等多方面均已经证实炎症反应参与了痤疮整个发病周期,组织病理甚至证实痤疮患者正常皮肤也已经存在炎症反应^[3-4],但由于该病理过程涉及了一系列由细菌及生化反应引起的细胞增殖异常和免疫微环境功能紊乱,故其具体的分子机制目前仍不清楚。有部分学者提出p38MAPK/NF- κ B信号通路与P. acnes诱导的炎症因子产生相关^[5]。本研究旨在探讨超分子水杨酸对兔耳痤疮模型的疗效及其抗炎机制,拟初步探究超分子水杨酸对p38MAPK/NF- κ B信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物:12周龄健康雄性新西兰兔30只,体重2.0~2.2 kg,由西南医科大学实验动物中心提供,质量合格证号:No.0044147。生产许可证号:SCXK(川)2018-17。

1.2 主要实验试剂:痤疮丙酸杆菌标准菌株(广东省微生物研究所菌种保藏中心)、VITEK MS-CHCA基质液(法国生物梅里埃公司)、组织标本固定液(国药集团化学试剂有限公司)、兔p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 、IL-8抗体(北京博奥森生物技术有限公司)、山羊抗兔工作液、山羊血清封闭液、浓缩型DAB试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司)、夫西地酸乳膏(香港澳美制药厂有限公司,国药准字H20243096)、2%超分子水杨酸调理凝露(四川亚姿宣生物科技有限公司,沪妆网备字2017012089)、30%超分子水杨酸焕颜面膜(四川亚姿宣生物科技有限公司,沪松械备20170017号)。

1.3 主要实验仪器:MALDI-TOF MS 质谱仪(法国生物梅里埃公司)、TSJ-II型全自动封闭式组织脱水机(常州市中威电子仪器有限公司)、BMJ-III型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂)、PHY-III型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司)、BA400Digital数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)、图像分析软件Image-Pro Plus 6.0(美国Media Cybernetics公司)。

1.4 实验方法:将30只实验兔随机分成正常对照组、2%SA组、30%SA组、夫西地酸组、模型对照组,每组6只。正常对照组不做任何处理,其余四组参照Kligman法^[6]构建兔耳

痤疮模型,用玻璃棒蘸取煤焦油并均匀涂在双耳内侧面耳管开口处,范围约2 cm \times 2 cm,每次约0.5 ml,每日1次,连续14 d。造模第7天时,皮下多点注射P. acnes菌悬液约50微升/耳(浓度:0.5麦氏比浊单位)。造模结束后,对造模组兔耳造模处行组织病理检查,镜下确认造模成功后开始外用药物干预。动物实验经过笔者医院伦理委员会审批。

1.4.1 干预方法:各组干预方法具体如下。2%SA组:外用2%超分子水杨酸调理凝露,每日1次,连续4周;30%SA组:外用30%超分子水杨酸焕颜面膜,每周1次,每次待药物发挥作用15 min左右即用清水将其洗净,连续4次;夫西地酸组:外用夫西地酸乳膏,每日1次,连续4周;模型对照组:外用生理盐水,每日1次,连续4周。

1.4.2 取材方法:分别在造模结束后、用药2周后、用药4周后进行实验兔处死取材。先剃除兔耳耳背的兔毛,再从耳缘静脉快速注射10 ml空气处死后用直径5 mm打孔器钻取全层皮肤,无菌纱布拭干血液,经4%多聚甲醛溶液固定。

1.4.3 组织病理学观察:将病理切片经脱水、透明、浸蜡与包埋、切片脱蜡、HE染色后于电子显微镜下观察。

1.4.4 p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 、IL-8免疫组化检测:固定组织经脱水、浸蜡、包埋、切片、脱蜡后,进行免疫组化染色并采用BA200 Digital数码三目摄像显微摄像系统观察并采集切片图像,每张切片先于100倍下观察全部组织,再选取3个视野分别采集400倍显微图像。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统测定全部切片图像的积分光密度(Integrated optical density, IOD)和面积,并计算每张图的平均光密度(Mean optical density, MOD),再用3张图的MOD计算均值,即为每例样本的MOD。

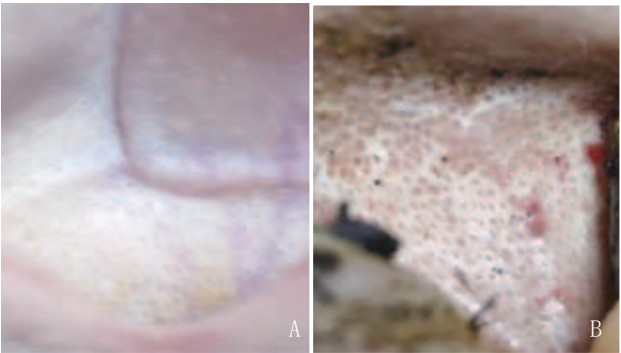
1.5 统计学分析:采用SPSS 21.0对数据进行统计分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两独立样本的均数比较进行 t 检验;单因素多水平重复测量设计的多组均数比较进行重复测量方差分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 兔耳痤疮造模结果:通过肉眼观察、组织病理学观察来判定造模成功与否,并进行免疫组化检测p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 、IL-8蛋白的表达,与正常对照组进行对比。

2.1.1 肉眼观察结果:正常对照组兔耳软而薄,透光可,毛细血管网清晰,耳管开口处毛囊口排列规则,分布均匀、细密、平整(见图1A)。造模组兔耳水肿明显,局部变硬、粗糙增厚,透光度降低,毛细血管网难以辨别,毛

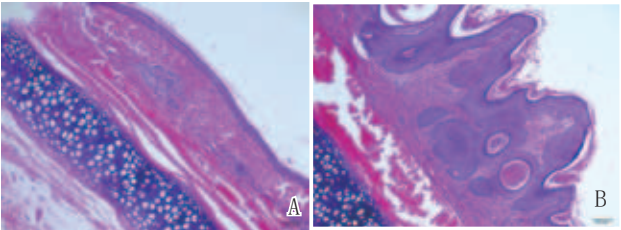
囊口扩张，可见明显堵塞的黑色角栓，兼有散在红色炎症丘疹和脓疱（见图1B）。



注：A. 正常对照组；B. 造模组

图1 两组兔耳肉眼观察结果

2.1.2 组织病理学观察结果：正常对照组兔耳组织表皮结构清晰，角质层较薄；真皮胶原纤维交错排列，胞质红染，间质可见少量毛囊及皮脂腺等附属器结构，毛囊体积正常、内容物少，毛囊壁未见增生，皮脂腺体积正常，附属器周围无炎症细胞浸润；真皮肌层肌纤维平行排列，未见明显增生（见图2A）。造模组兔耳组织表皮结构不清，局部增厚，可见角化过度，棘层肥厚；真皮内成纤维细胞增生，胶原纤维灶状坏死，胞质崩解，轮廓模糊不清，毛囊体积明显增大，其内出现大量角化物质并扩大成壶状，毛囊壁显著增厚，皮脂腺体积增大，分叶增多，附属器周围可见大量炎症细胞浸润（见图2B）。

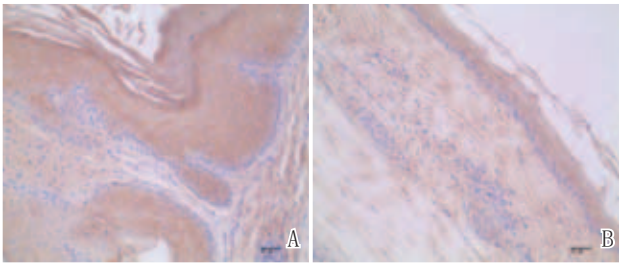


注：A. 正常对照组；B. 造模组

图2 两组HE染色兔耳组织病理学观察结果（100×）

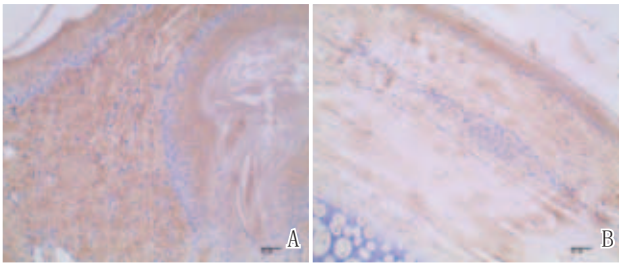
2.1.3 免疫组化检测p38MAPK、NF-κB、IL-1β和IL-8蛋白表达结果：造模组p38MAPK、NF-κB、IL-1β和IL-8蛋白呈强表达，正常对照组呈弱表达，免疫组化MOD测定结果对比见表1。两组免疫组化染色见图3~6。

表1 两组兔耳组织中p38MAPK、NF-κB、IL-1β和IL-8的表达 ($\bar{x} \pm s$, MOD)				
组别	p38MAPK	NF-κB	IL-1β	IL-8
造模组 (n=6)	0.31±0.02	0.28±0.02	0.29±0.02	0.32±0.02
正常对照组 (n=6)	0.14±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01	0.14±0.01
t值	-44.602	-48.406	-43.187	-55.127
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001



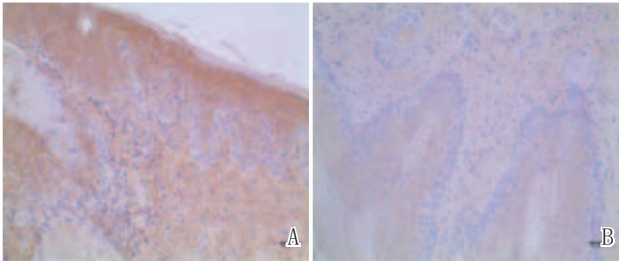
注：A. 造模组；B. 正常对照组

图3 两组免疫组化p38MAPK表达结果（400×）



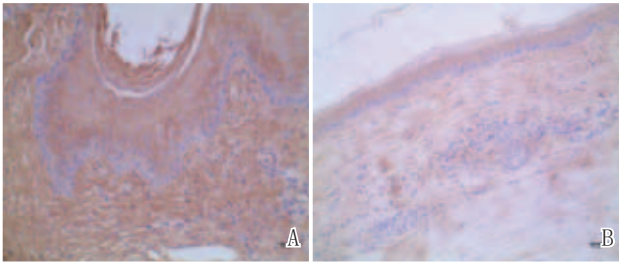
注：A. 造模组；B. 正常对照组

图4 两组免疫组化NF-κB表达结果（400×）



注：A. 造模组；B. 正常对照组

图5 两组免疫组化IL-1β表达结果（400×）



注：A. 造模组；B. 正常对照组

图6 两组免疫组化IL-8蛋白表达结果（400×）

2.2 各用药组免疫组化检测p38MAPK、NF-κB、IL-1β、IL-8蛋白表达结果

2.2.1 各用药组p38MAPK蛋白表达检测结果：由于时间和分组存在交互效应，故本研究限定时间对p38MAPK蛋白表达的影响，仅考虑分组对其产生的影响，进行简单效应分析，组间比较结果如下。用药前，各组间两两比较p38MAPK蛋白表达均差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。用药2周后，2%SA组、30%SA组、夫西地酸组p38MAPK蛋白表达低于模型对照

组 ($P < 0.001$)；2%SA组与夫西地酸组、30%SA组与夫西地酸组、2%SA组与30%SA组p38MAPK蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。用药4周后，2%SA组、30%SA组、夫西地酸组p38MAPK蛋白表达低于模型对照组 ($P < 0.001$)；2%SA组、30%SA组p38MAPK蛋白表达低于夫西地酸组 ($P < 0.001$)；2%SA组与30%SA组p38MAPK蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。此外，限定分组对p38MAPK蛋白表达的影响，仅考虑时间对其产生的影响，进一步进行简单效应分析，组内比较结果如下：四个组的p38MAPK蛋白表达均随着时间的延长呈下降趋势，且每个组的各时间点间均有差异 ($P < 0.05$)。p38MAPK蛋白表达测定结果见表2。

表2 各用药组兔耳组织中p38MAPK的表达比较 ($\bar{x} \pm s$, MOD)

组别	用药前	用药2周后	用药4周后
2%SA组	0.31 ± 0.02	0.20 ± 0.02**	0.15 ± 0.01****
30%SA组	0.31 ± 0.02	0.20 ± 0.01**	0.16 ± 0.01****
夫西地酸组	0.31 ± 0.02	0.20 ± 0.01**	0.17 ± 0.02**
模型对照组	0.302 ± 0.023	0.26 ± 0.02	0.19 ± 0.01
$F_{\text{组间}}$ 值, $P_{\text{组间}}$ 值	34.105, < 0.001		
$F_{\text{时间}}$ 值, $P_{\text{时间}}$ 值	886.928, < 0.001		
$F_{\text{交互}}$ 值, $P_{\text{交互}}$ 值	15.668, < 0.001		

注：*表示与同期模型对照组比较， $P < 0.001$ ；**表示与同期夫西地酸组比较， $P < 0.001$ 。

2.2.2 各用药组NF- κ B蛋白表达检测结果：简单效应分析组间比较结果如下。用药前，各组间两两比较NF- κ B蛋白表达均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。用药2周后，2%SA组、30%SA组、夫西地酸组NF- κ B蛋白表达低于模型对照组 ($P < 0.001$)；2%SA组与夫西地酸组、30%SA组与夫西地酸组、2%SA组与30%SA组NF- κ B蛋白表达差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。用药4周后，2%SA组、30%SA组、夫西地酸组NF- κ B蛋白表达低于模型对照组 ($P < 0.05$)；2%SA组、30%SA组NF- κ B蛋白表达均低于夫西地酸组 ($P < 0.001$)；2%SA组与30%SA组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。组内比较结果如下：四个组的NF- κ B蛋白表达均随着时间的延长呈下降趋势，模型对照组用药前与用药2周后NF- κ B蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，其余三组的各时间点间均有差异，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。NF- κ B蛋白表达测定结果见表3。

2.2.3 各用药组IL-1 β 蛋白表达检测结果：简单效应分析组间比较结果显示，用药前，各组间两两比较IL-1 β 蛋白表达均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。用药2周后，2%SA组、30%SA组、夫西地酸组IL-1 β 蛋白表达低于模型对照组 ($P < 0.001$)；2%SA组与夫西地酸组、30%SA组与夫西地酸组、2%SA组与30%SA组IL-1 β 蛋白表达差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。用药4周后，2%SA组、30%SA组、夫西地酸组IL-1 β 蛋白表达低于模型对照组 ($P < 0.05$)；

表3 各用药组兔耳组织中NF- κ B的表达比较 ($\bar{x} \pm s$, MOD)

组别	用药前	用药2周后	用药4周后
2%SA组	0.29 ± 0.02	0.19 ± 0.01**	0.15 ± 0.01****
30%SA组	0.28 ± 0.02	0.19 ± 0.01**	0.15 ± 0.01****
夫西地酸组	0.28 ± 0.02	0.20 ± 0.02**	0.18 ± 0.01*
模型对照组	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.19 ± 0.02
$F_{\text{组间}}$ 值, $P_{\text{组间}}$ 值	67.622, < 0.001		
$F_{\text{时间}}$ 值, $P_{\text{时间}}$ 值	701.107, < 0.001		
$F_{\text{交互}}$ 值, $P_{\text{交互}}$ 值	24.249, < 0.001		

注：*表示与同期模型对照组比较， $P < 0.05$ ；**表示与同期模型对照组比较， $P < 0.001$ ；***表示与同期夫西地酸组比较， $P < 0.001$ 。

2%SA组、30%SA组与夫西地酸组IL-1 β 蛋白表达均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；2%SA组IL-1 β 蛋白表达低于30%SA组 ($P < 0.05$)。四个组的IL-1 β 蛋白表达均随着时间的延长呈下降趋势，且每个组的各时间点间均有差异 ($P < 0.05$)。IL-1 β 蛋白表达测定结果见表4。

表4 各用药组兔耳组织中IL-1 β 的表达比较 ($\bar{x} \pm s$, MOD)

组别	用药前	用药2周后	用药4周后
2%SA组	0.30 ± 0.02	0.19 ± 0.01**	0.16 ± 0.01***
30%SA组	0.29 ± 0.02	0.20 ± 0.01**	0.18 ± 0.01*
夫西地酸组	0.29 ± 0.02	0.19 ± 0.02**	0.17 ± 0.02**
模型对照组	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.20 ± 0.02
$F_{\text{组间}}$ 值, $P_{\text{组间}}$ 值	39.487, < 0.001		
$F_{\text{时间}}$ 值, $P_{\text{时间}}$ 值	681.682, < 0.001		
$F_{\text{交互}}$ 值, $P_{\text{交互}}$ 值	23.245, < 0.001		

注：*表示与同期模型对照组比较， $P < 0.05$ ；**表示与同期模型对照组比较， $P < 0.001$ ；[△]表示与同期30%SA组比较， $P < 0.05$ 。

2.2.4 各用药组IL-8蛋白表达检测结果：简单效应分析组间比较结果显示，用药前，各组间两两比较IL-8蛋白表达均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。用药2周后，2%SA组、30%SA组、夫西地酸组IL-8蛋白表达低于模型对照组 ($P < 0.001$)；2%SA组IL-8蛋白表达低于30%SA组、夫西地酸组 (均 $P < 0.05$)；30%SA组与夫西地酸组IL-8蛋白表达差异无统计学意义 ($P = 0.436$)。用药4周后，2%SA组、30%SA组、夫西地酸组IL-8蛋白表达低于模型对照组 ($P < 0.05$)；2%SA组、30%SA组IL-8蛋白表达低于夫西地酸组 (均 $P < 0.05$)；2%SA组IL-8蛋白表达低于30%SA组 ($P < 0.05$)。组内比较结果如下：四个组的IL-8蛋白表达均随着时间的延长呈下降趋势，且每个组的各时间点间均有差异 ($P < 0.05$)。IL-8蛋白表达测定结果见表5。

3 讨论

目前公认的痤疮发病机制为毛囊角化异常、P. acnes定植、皮脂分泌过多、炎症反应及内分泌等。其中炎症反应在痤疮的发生、发展中尤为重要，贯穿了痤疮发病的始终^[7]。

表5 各用药组兔耳组织中IL-8的表达比较 ($\bar{x} \pm s$, MOD)

组别	用药前	用药2周后	用药4周后
2%SA组	0.32±0.02	0.19±0.02 ^{***}	0.15±0.01 ^{***}
30%SA组	0.31±0.02	0.21±0.02 ^{**}	0.16±0.01 ^{**}
夫西地酸组	0.32±0.02	0.21±0.01 ^{**}	0.18±0.01 [*]
模型对照组	0.31±0.02	0.28±0.02	0.19±0.01
$F_{\text{组间}}$ 值, $P_{\text{组间}}$ 值	78.628, <0.001		
$F_{\text{时间}}$ 值, $P_{\text{时间}}$ 值	1 038.847, <0.001		
$F_{\text{交互}}$ 值, $P_{\text{交互}}$ 值	26.164, <0.001		

注: *表示与同期模型对照组比较, $P < 0.05$; **表示与同期模型对照组比较, $P < 0.001$; [#]表示与同期夫西地酸组比较, $P < 0.05$; ^{##}表示与同期夫西地酸组比较, $P < 0.001$; [§]表示与同期30%SA组比较, $P < 0.05$ 。

目前关于痤疮炎症通路研究较成熟的为p38MAPK/NF- κ B信号通路,该通路可促使单核-巨噬细胞分泌过多的IL-1 β 、IL-6、IL-8和TNF- α 等促炎因子,从而介导天然免疫^[8]。

超分子水杨酸具有抗炎、调节角化、控油、抗菌、抗血凝(促进微循环)以及美白(抑制酪氨酸酶)等多重作用^[9-10],不仅可抑制痤疮主要发病机制,还可改善色素沉着及瘢痕。由于其具有控缓释能力、生物利用度高、皮肤刺激性小、患者耐受度高等特点^[11],规避了传统水杨酸的不足,已被广泛用于治疗痤疮。临床研究发现,超分子水杨酸既可和异维A酸、盐酸米诺环素等口服药物联用,也可和激光、红蓝光、光动力、粉刺挤压术等物理治疗联用,还可单独使用治疗轻中度痤疮,均可获得较好的疗效及较高的患者满意度,且极少发生不良反应。

兔耳易于观察皮损,方便采样,具有造模时间短、可靠性及成功率高、重复性好的特点,是研究寻常型痤疮的经典模型^[12]。1989年美国皮肤病学会制定了兔耳痤疮模型的规范方法,即Kligman法^[13],该法已被广泛用于痤疮模型的研究并被证实可以很好地模拟痤疮的毛囊皮脂腺导管角化异常。要同时研究痤疮炎症,还需要构建炎症模型。痤疮丙酸杆菌的定植和增殖在痤疮炎性皮损的发生发展起着重要作用^[14],它的细胞壁由较厚的肽聚糖组成,可被TLR2识别,激活NF- κ B信号通路,启动IL-1 β 、TNF- α 、IL-8、IL-12等细胞因子参与局部炎症反应和机体对其的免疫反应。痤疮模型发现在造模第7天时局部注射P. acnes混悬液后可形成明显的丘疹、脓疱等验证皮损表现^[15]。本研究通过改良Kligman法,将外涂煤焦油和局部注射P. acnes混悬液联合应用,很好地构建了兔耳痤疮的毛囊皮脂腺导管角化异常和炎症模型,有利于下一步试验的开展。

本研究发现兔耳痤疮模型中p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 和IL-8蛋白表达显著增多,进一步验证了p38MAPK/NF- κ B信号通路在痤疮炎症中可能发挥了一定作用。2%SA组、30%SA组、夫西地酸组兔耳痤疮模型中的p38MAPK、NF- κ B、IL-1 β 和IL-8蛋白降低程度均优于模型对照组,结果显示2%SA、30%SA、夫西地酸均可能通过抑制痤疮p38MAPK/NF- κ B信号通路而发挥抗炎作用。总体而言治疗2周后

2%SA、30%SA的抗炎作用与夫西地酸组相似,治疗4周后2%SA、30%SA的抗炎作用优于夫西地酸组。

综上,本研究证实超分子水杨酸可通过抑制p38MAPK/NF- κ B信号通路来发挥抗炎作用,且随着用药时间的延长疗效也在逐渐增加,并优于夫西地酸,对于临床工作中超分子水杨酸在痤疮炎性皮损的治疗具有重要意义。

[参考文献]

- [1]Heng A H S,Chew F T.Systematic review of the epidemiology of acne vulgaris[J].Sci Rep,2020,10(1):5754.
- [2]Kim J,Park T,Kim H J,et al.Inferences in microbial structural signatures of acne microbiome and mycobiome[J].J Microbiol,2021,59(4):369-375.
- [3]范宇焜,郝飞.痤疮丙酸杆菌在寻常痤疮发病中的作用及其机制[J].皮肤科学通报,2022,39(1):10-17,2-3.
- [4]Kanwar I L,Haider T,Kumari A,et al.Models for acne: A comprehensive study[J].Drug Discov Ther,2018,12(6):329-340.
- [5]Hou X X,Chen G,Hossini A M,et al.Aryl hydrocarbon receptor modulates the expression of TNF- α and IL-8 in human sebocytes via the MyD88-p65NF- κ B/p38MAPK signaling pathways[J].J Innate Immun,2019,11(1):41-51.
- [6]No authors listed.American Academy of Dermatology invitational symposium on comedogenicity[J].J Am Acad Dermatol,1989,20(2 Pt 1):272-277.
- [7]马英,项蕾红.痤疮发病机制及治疗目标的新认识[J].临床皮肤科杂志,2015,44(1):66-69.
- [8]Lu J,Cong T,Wen X,et al.Salicylic acid treats acne vulgaris by suppressing AMPK/SREBP1 pathway in sebocytes[J].Exp Dermatol,2019,28(7):786-794.
- [9]姚露,彭红霞,周文瑞,等.超分子水杨酸联合粉刺挤压治疗寻常型痤疮疗效观察[J].皮肤病与性病,2020,42(3):71-73.
- [10]李玉江,焦丹红,曹建军,等.调Q开关1 064 nm Nd:YAG激光联合超分子水杨酸治疗黄褐斑预后分析[J].临床研究,2019,27(10):101-102.
- [11]丛林.控释三酸修护敷料治疗面部轻中度寻常痤疮及改善皮肤屏障的功效评价[J].中国美容医学,2020,29(10):89-92.
- [12]李海秀,覃骊兰,郝二伟.痤疮动物模型的研究进展[J].大众科技,2022,24(7):5.
- [13]American Academy of Dermatology invitational symposium on comedogenicity[J].J Am Acad Dermatol,1989,20:272-277.
- [14]Dessinioti C,Katsambas A D.The role of Propionibacterium acnes in acne pathogenesis: facts and controversies[J].Clin Dermatol,2010,28(1):2-7.
- [15]刘文彬,王晖.痤疮模型的研究现状[J].广东药学院学报,2010,26(2):7.

[收稿日期]2022-12-26

本文引用格式: 杨力,刘尚可,林新瑜,等.超分子水杨酸对兔耳痤疮模型p38MAPK/NF- κ B信号通路的影响[J].中国美容医学,2024,33(3):1-5.

· 论 著 ·

血清正五聚蛋白3对坏死性软组织感染的诊断效能研究

李成志¹, 乔维龙¹, 鲁文², 王静³, 阿布力米提·阿不都哈力克¹, 孙向东¹

(喀什地区第一人民医院 1.烧伤整形外科; 2.血管外科; 3.神经外科 新疆 喀什 844000)

[摘要]目的: 探讨血清正五聚蛋白3 (Pentraxin 3, PTX3) 对坏死性软组织感染 (Necrotizing soft tissue infection, NSTI) 的诊断效能。方法: 选取喀什地区第一人民医院2021年6月-2022年6月行急诊手术治疗的158例疑似NSTI患者作为研究对象, 根据术后诊断结果将其分为NSTI组 (97例) 和非NSTI组 (61例), 另选取同期该院体检中心健康人群97例作为健康组。比较NSTI组、非NSTI组入院即刻和健康组体检时血清PTX3、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、降钙素原 (Procalcitonin, PCT)、红细胞沉降率 (Erythrocyte sedimentation rate, ESR)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 水平, 绘制健康志愿者工作特征 (Receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析上述指标对NSTI的诊断效能。另观察NSTI组患者入院即刻、入院第2天、第3天血清炎症指标水平变化, 并统计NSTI组患者住院天数、截肢率、死亡率。另外, 根据术后诊断结果将NSTI组分为坏死性筋膜炎组和气性坏疽组, 比较两组不同时刻血清炎症指标水平变化, 并观察各指标对坏死性筋膜炎和气性坏疽的诊断效能。结果: NSTI组、非NSTI组血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平均高于健康组 ($P < 0.05$), NSTI组均高于非NSTI组 ($P < 0.05$); ROC曲线分析结果显示, 血清PTX3诊断NSTI的灵敏度均高于CRP、PCT、ESR、IL-6; 特异度稍低于PCT, 但均高于CRP、ESR、IL-6; 曲线下面积 (Area under the curve, AUC) 均高于CRP、PCT、ESR、IL-6。气性坏疽组血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平均高于坏死性筋膜炎组 ($P < 0.05$); ROC曲线分析结果显示, 血清PTX3诊断坏死性筋膜炎和气性坏疽的灵敏度均高于CRP、PCT、ESR、IL-6; 特异度稍低于PCT, 但均高于CRP、ESR、IL-6; AUC均高于CRP、PCT、ESR、IL-6。入院即刻、入院第2天、入院第3天血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平在组间、时间、交互效应上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 入院第3天血清各指标水平均低于入院即刻和入院第2天 ($P < 0.05$), 且气性坏疽组入院即刻、入院第2天、入院第3天血清各指标水平均高于坏死性筋膜炎组 ($P < 0.05$); 气性坏疽组住院平均天数、截肢率、死亡率均高于坏死性筋膜炎组 ($P < 0.05$)。结论: NSTI患者血清PTX3水平异常升高, 且气性坏疽患者均高于坏死性筋膜炎患者, 另PTX3对诊断NSTI和鉴别坏死性筋膜炎与气性坏疽的效能均优于CRP、PCT、ESR、IL-6等常规炎症指标。

[关键词]正五聚蛋白3; 坏死性软组织感染; 坏死性筋膜炎; 气性坏疽; 死亡

[中图分类号]R639 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455 (2024) 03-0006-06

Study on the Diagnostic Efficacy of Serum Pentraxin 3 in Necrotic Soft Tissue Infection

LI Chengzhi¹, QIAO Weilong¹, LU Wen², WANG Jing³, Abolimiti · ABDULHALIK¹, SUN Xiangdong¹

(1.Department of Burn Plastic Surgery, 2.Department of Vascular Surgery, 3.Department of Neurosurgery, Kashgar First People's Hospital, Kashgar 844000, Xinjiang, China)

Abstract: **Objective** To investigate the diagnostic efficacy of serum Pentraxin 3 (PTX3) in necrotic soft tissue infection (NSTI). **Methods** 158 suspected NSTI patients who underwent emergency surgery in Kashgar First People's Hospital from June 2021 to June 2022 were selected as the study subjects, and they were divided into NSTI group (97 cases) and non NSTI group (61 cases) according to the results of postoperative diagnosis. Another 97 healthy people from the physical examination center of the hospital were selected as the health group. The levels of serum PTX3, C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), erythrocyte sedimentation rate (ESR) and interleukin-6 (IL-6) in NSTI group, non NSTI group at the time of admission and health group at the time of physical examination were compared, and the receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to analyze the diagnostic efficacy of the above indicators for NSTI. In addition, the changes of serum conventional

基金项目: 新疆喀什地区科技局2021年科技计划项目 (编号: KS2021079)

通信作者: 孙向东, 主治医师; 研究方向为烧伤创面修复。E-mail: 151406956@qq.com

第一作者: 李成志, 主治医师; 研究方向为烧伤创面修复。E-mail: lichengzhi85@163.com

inflammatory marks levels of patients in the NSTI group at the moment of admission, the second and third days of admission were observed, and the days of hospitalization, amputation rate and mortality rate of patients in the NSTI group were counted. In addition, the NSTI group was divided into necrotizing fasciitis group and gas gangrene group based on the postoperative diagnostic results, and the changes in serum conventional inflammatory marks levels between two groups at different times were compared, and the diagnostic efficacy of each indicator for necrotizing fasciitis and gas gangrene was observed. **Results** The levels of serum PTX3, CRP, PCT, ESR, IL-6 in NSTI group and non NSTI group were higher than those in healthy group ($P<0.05$), which in the NSTI group were higher than those in non NSTI group ($P<0.05$). ROC curve analysis showed that the sensitivity of serum PTX3 in diagnosing NSTI was higher than that of CRP, PCT, ESR and IL-6, and the specificity was slightly lower than PCT, but it was higher than CRP, ESR, IL-6, and area under the curve (AUC) was higher than CRP, PCT, ESR and IL-6. The serum PTX3, CRP, PCT, ESR, and IL-6 levels in the gas gangrene group were higher than those in the necrotizing fasciitis group ($P<0.05$). The ROC curve analysis results showed that the sensitivity of serum PTX3 in diagnosing necrotizing fasciitis and gas gangrene was higher than that of CRP, PCT, ESR, and IL-6, and the specificity was the same as PCT, but higher than CRP, ESR, and IL-6, and the AUC was higher than CRP, PCT, ESR and IL-6. There were statistically significant differences in serum PTX3, CRP, PCT, ESR and IL-6 levels among groups, time and interaction effects immediately after admission, on the second day of admission and on the third day of admission ($P<0.05$). The levels of serum indicators on the third day of admission were lower than those immediately and on the second day of admission ($P<0.05$), and the gas gangrene group had higher levels of serum indicators on the first day, second day, and third day of admission than the necrotizing fasciitis group ($P<0.05$). The average length of hospital stay, amputation rate and mortality rate in the gas gangrene group were higher than those in the necrotizing fasciitis group ($P<0.05$). **Conclusion** The serum PTX3 level in NSTI patients are abnormally elevated, and patients with gas gangrene are all higher than those with necrotizing fasciitis. In addition, PTX3 is more effective in diagnosing NSTI and distinguishing necrotizing fasciitis from gas gangrene than conventional inflammatory indicators such as CRP, PCT, ESR, IL-6.

Key words: Pentraxin 3; necrotic soft tissue infection; necrotizing fasciitis; gas gangrene; mortality

坏死性软组织感染是指伴有坏死的皮下、肌肉或筋膜等软组织层任意间隙的严重细菌感染,该病发病机制复杂,病情进展迅速,需尽早行手术清创或对感染肢体进行截肢,以避免发生感染性休克、器官衰竭等威胁患者生命^[1]。但NSTI早期皮肤症状不明显,容易与蜂窝织炎、皮下脓肿等混淆而延误诊断和治疗,从而导致其致残率、致死率升高^[2]。既往临床常用实验室风险指标(Laboratory risk index, LRINEC)评分诊断坏死性筋膜炎,该评分系统包括CRP、白细胞计数、血红蛋白等传统实验室指标,然而相关研究发现^[3-4],LRINEC评分诊断坏死性筋膜炎的敏感性不足,仅介于36%~80%。因此,积极寻找诊断NSTI的血清学敏感指标对早期识别病情及治疗具有重要意义。PTX3是一种由中性粒细胞、单核细胞和内皮细胞等产生的急性期炎症因子,可反映局部组织的炎症和损伤程度。国外均有研究报道^[5-6],PTX3在感染性休克、社区获得性肺炎等方面的预测和诊断价值均优于CRP、PCT等传统炎症指标,但对于PTX3水平在NSTI中的诊断效能尚罕见研究报道。鉴于此,本研究探讨血清PTX3水平对NSTI的诊断效能,旨在为临床诊断提供更准确的血清指标。

1 资料和方法

1.1 一般资料:选取喀什地区第一人民医院2021年6

月-2022年6月行急诊手术治疗的158例疑似NSTI(包括疑似坏死性筋膜炎、疑似气性坏疽、疑似Fournier's Gangrene)患者,根据术后诊断将患者分为NSTI组(97例)和非NSTI组(61例),另同期选取在医院体检中心行体检的健康人群97例作为健康组。NSTI组男60例、女37例,年龄49~70岁,平均 (59.25 ± 8.96) 岁,体质指数 $21\sim 29\text{ kg/m}^2$,平均 $(24.51\pm 2.72)\text{ kg/m}^2$,病变部位:下肢52例,上肢20例,会阴13例,腹部9例,头颈部3例;病变范围: $4\text{ cm}\times 6\text{ cm}\sim 11\text{ cm}\times 16\text{ cm}$;累及层次:皮肤3例,浅筋膜16例,深筋膜41例,肌层37例。非NSTI组男36例,女25例;年龄48~69岁,平均 (58.93 ± 8.73) 岁,体质指数 $20\sim 29\text{ kg/m}^2$,平均 $(24.09\pm 2.79)\text{ kg/m}^2$,病变部位:下肢33例,上肢13例,会阴7例,腹部6例,头颈部2例;病变范围: $3\text{ cm}\times 5\text{ cm}\sim 10\text{ cm}\times 15\text{ cm}$;累及层次:皮肤28例,浅筋膜22例,深筋膜层10例,肌层1例。健康组男58例,女39例;年龄50~68岁,平均 (60.23 ± 9.12) 岁,体质指数 $21\sim 27\text{ kg/m}^2$,平均 $(24.89\pm 2.85)\text{ kg/m}^2$ 。三组性别、年龄、体质指数比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 NSTI诊断标准:术后结合患者术前表现、实验室检查、影像学检查及组织学检查进行诊断^[7]。患者皮肤表面有瘀斑、水疱、捻发感、麻木感、疼痛,有组织水肿和坏死,伴(或不伴)高温、低血压、心动过速等全身症

状；常规抗感染药物治疗效果不佳；实验室检查NSTI危险指标评分升高；超声、X片等影像学检查发现筋膜增厚、水肿、皮下气肿、脓肿形成；术后组织学检查证实有感染。另外，根据诊断结果将坏死性筋膜炎和Fournier's Gangrene患者统一归为坏死性筋膜炎组，将气性坏疽患者（伤口周围触诊有捻发音，细菌培养见粗大的革兰阳性杆菌，X线片检查发现肌群中有气体存在）归为气性坏疽组。

1.3 纳入标准：年龄≥18周岁；所有疑似NSTI患者均行急诊手术治疗；健康人群均经体检确认健康；所有健康志愿者均自愿参与本研究并签署知情同意书。

1.4 排除/剔除标准：术中无法确认NSTI诊断；伴有严重的肝肾功能损害；既往有急性冠脉综合征、高血压脑出血、慢性阻塞性肺疾病急性加重期等器质性疾病；恶性肿瘤；自身免疫性疾病者；有持续感染或炎症者；拒绝参加本研究或依从性较差者。

1.5 方法

1.5.1 手术方法：所有疑似NSTI患者在入院24 h内进行手术清创，在病变部位多处切开，切口穿过感染区域直达正常组织，完全清除脓液和坏死皮肤、皮下脂肪、筋膜组织和正常组织边缘部分。术中留取标本进行细菌培养，确定致病菌种类，给予抗生素治疗。

1.5.2 血液样本采集及检测：疑似NSTI患者于入院即刻，健康组于体检当天分别采集空腹静脉血2 ml置于枸橼酸钠抗凝管中混匀，在2 h内送往喀什地区第一人民医院检验科应用全自动血沉仪测定ESR值；另采集5 ml静脉血置于普通采血管中，在室温下静置2 h，以3 000 r/min离心20 min分离血清，取上清液置于相应的样品管中，统一置于医院中心实验室-80℃冰箱中保存待测（6个月内检测）。采用双抗体二步夹心酶联免疫吸附实验检测血清PTX3水平，采用免疫速率比浊法检测血清CRP水平，采用化学发光法检测血清PCT水平，采用酶联免疫吸附试验检测血清IL-6水平。另外，NSTI患者在入院后第2天、第3天再次采集血样检测血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平，血液处理和检测方法与上述一致。

1.6 观察指标

1.6.1 NSTI组、非NSTI组、健康组血清各指标水平比较：比较基线期血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平，并记录其对NSTI的诊断效能，如截断值、灵敏度、特异度、AUC和

95%可信区间（95% credibility interval, 95%CI）。

1.6.2 坏死性筋膜炎组和气性坏疽组入院即刻血清各指标水平比较：比较入院即刻两组血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平，并记录其对坏死性筋膜炎和气性坏疽的鉴别诊断，如记录截断值、灵敏度、特异度、AUC和95%CI。

1.6.3 坏死性筋膜炎组和气性坏疽组不同时刻血清各指标水平比较：记录两组患者入院第2天、第3天的PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平，并进行比较。

1.6.4 NSTI患者住院指标：统计NSTI患者住院天数、截肢率、死亡率。

1.7 统计学分析：使用SPSS 26.0行统计学检验，计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述，两组间比较采用独立样本 t 检验，多样本比较采用单因素方差分析和SNK- q 检验，重复测量的资料比较采用重复测量方差分析和 $LSD-t$ 检验；计数资料采用“ $n/\%$ ”描述，组间比较使用 χ^2 检验，绘制ROC曲线分析血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平对NSTI以及坏死性筋膜炎和气性坏疽的诊断效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组入院即刻血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平比较：三组血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平比较差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），NSTI组、非NSTI组血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平均高于健康组（ $P < 0.05$ ），NSTI组均高于非NSTI组（ $P < 0.05$ ）。见表1。

2.2 入院即刻血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平对NSTI的诊断效能：ROC曲线分析结果显示，血清PTX3诊断NSTI的灵敏度均高于CRP、PCT、ESR、IL-6；特异度稍低于PCT，但均高于CRP、ESR、IL-6；AUC均高于CRP、PCT、ESR、IL-6。见图1、表2。

表2 入院即刻血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平对NSTI的诊断效能

检测指标	截断值	灵敏度	特异度	AUC	95%CI
PTX3	25.68 ng/ml	88.66 (86/97)	77.05 (47/61)	0.842	0.776~0.895
CRP	54.99 mg/L	82.47 (80/97)	57.38 (35/61)	0.764	0.690~0.828
PCT	2.64 ng/ml	75.26 (73/97)	80.33 (49/61)	0.785	0.713~0.847
ESR	26.00 mm/h	78.35 (76/97)	52.46 (32/61)	0.638	0.558~0.713
IL-6	55.92 μ g/L	69.07 (67/97)	62.30 (38/61)	0.682	0.603~0.754

2.3 坏死性筋膜炎组和气性坏疽组入院即刻血清PTX3、

表1 三组入院即刻血清各指标比较

组别	n	PTX3/ (ng/ml)	CRP/ (mg/L)	PCT/ (ng/ml)	ESR/ (mm/h)	IL-6/ (μ g/L)
健康组	97	0.95 \pm 0.21	2.45 \pm 0.46	0.27 \pm 0.05	9.81 \pm 1.85	5.76 \pm 1.25
非NSTI组	61	23.91 \pm 5.35 ^a	50.52 \pm 11.45 ^a	3.22 \pm 0.78 ^a	36.79 \pm 8.58 ^a	54.11 \pm 11.90 ^a
NSTI组	97	41.71 \pm 9.82 ^{ab}	64.46 \pm 12.17 ^{ab}	7.40 \pm 1.53 ^{ab}	48.49 \pm 10.70 ^{ab}	65.97 \pm 14.19 ^{ab}
F 值		928.273	1140.068	1196.602	602.687	864.441
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：^a表示与健康组比较， $P < 0.05$ ；^b表示与非NSTI组比较， $P < 0.05$ 。

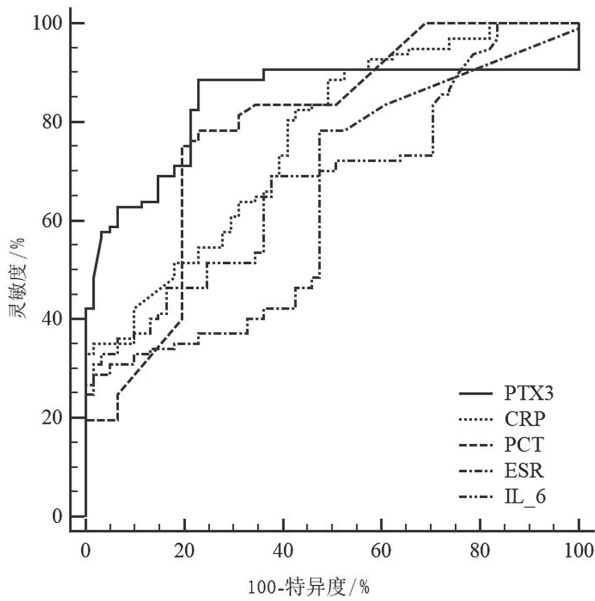


图1 入院即刻血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平诊断NSTI的ROC曲线

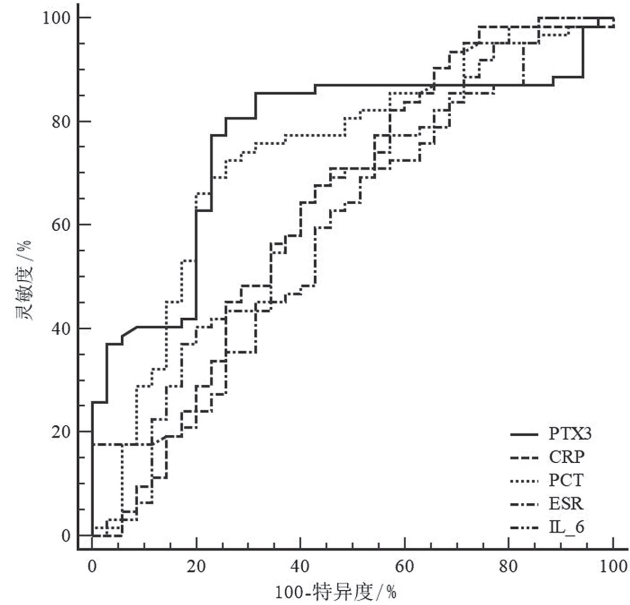


图2 入院即刻血清各指标诊断坏死性筋膜炎和气性坏疽的ROC曲线

表3 坏死性筋膜炎组和气性坏疽组入院即刻血清各指标比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PTX3/ (ng/ml)	CRP/ (mg/L)	PCT/ (ng/ml)	ESR/ (mm/h)	IL-6/ (μg/L)
坏死性筋膜炎组	62	38.08±8.91	60.72±13.37	7.06±1.46	46.39±9.43	63.17±13.82
气性坏疽组	35	48.14±10.51	71.09±19.34	7.99±1.63	52.21±10.86	70.93±17.75
t值		5.001	3.111	2.888	2.762	2.392
P值		<0.001	0.002	0.005	0.007	0.019

CRP、PCT、ESR、IL-6水平比较：97例NSTI患者中坏死性筋膜炎62例，气性坏疽35例。气性坏疽组血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平平均高于坏死性筋膜炎组（ $P<0.05$ ）。见表3。

2.4 入院即刻血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平对坏死性筋膜炎和气性坏疽的鉴别诊断：ROC曲线分析结果显示，血清PTX3诊断坏死性筋膜炎和气性坏疽的灵敏度均高于CRP、PCT、ESR、IL-6；特异度与PCT相同，但均高于CRP、ESR、IL-6；AUC均高于CRP、PCT、ESR、IL-6。见图2、表4。

表4 入院即刻血清各指标对坏死性筋膜炎和气性坏疽的鉴别诊断

检测指标	截断值	灵敏度	特异度	AUC	95%CI
PTX3	46.56 ng/ml	80.65 (50/62)	74.29 (26/35)	0.765	0.668~0.845
CRP	68.33 mg/L	70.97 (44/62)	54.29 (19/35)	0.636	0.533~0.732
PCT	7.58 ng/ml	72.58 (45/62)	74.29 (26/35)	0.733	0.633~0.818
ESR	50.44 mm/h	69.35 (43/62)	48.57 (17/35)	0.597	0.493~0.395
IL-6	66.87 μg/L	67.74 (42/62)	57.14 (20/35)	0.635	0.531~0.730

2.5 NSTI组中坏死性筋膜炎组和气性坏疽组不同时刻血清各指标比较：入院即刻、入院第2天、入院第3天血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平在组间、时间、交互效应上差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ）；坏死性筋膜炎组和气性坏疽组入院即刻和入院第2天血清各指标比较差异均无统

计学意义（ $P>0.05$ ），入院第3天血清各指标水平均低于入院即刻、入院第2天（ $P<0.05$ ），且气性坏疽组入院即刻、入院第2天、入院第3天血清各指标水平均高于坏死性筋膜炎组（ $P<0.05$ ）。见表5。

2.6 NSTI组患者住院天数、截肢率、死亡率：NSTI组患者住院平均天数为（37.25±7.23）d，其中坏死性筋膜炎组住院平均天数为（35.85±7.86）d，气性坏疽组住院平均天数为（39.71±8.94）d；截肢率为11.34%（11/97），其中坏死性筋膜炎组截肢率为4.84%（3/62），气性坏疽组截肢率为22.86%（8/35）；死亡率8.25%（8/97），其中坏死性筋膜炎组死亡率为3.23%（2/35），气性坏疽组死亡率为17.14%（6/35）。气性坏疽组住院平均天数、截肢率、死亡率均高于坏死性筋膜炎组（ $P<0.05$ ）。

3 讨论

NSTI具有多种微生物学病因，是一种复杂、罕见的细菌性感染疾病。该病导致软组织广泛损伤、坏死，甚至造成截肢或多器官衰竭，严重威胁患者的生命健康^[8]。近年来NSTI的发病率逐渐升高，尽管对该类患者的关注越来越多，但因其早期症状模糊，患者群体异质性较大，缺乏特异性的诊断方法，导致其截肢率及死亡率仍然很高^[9-10]。因此，寻找早期快速诊断NSTI的方法，对实现及时和精确的治疗，降低患者严重残疾和死亡的风险，改善预后至关重要。

表5 NSTI组中坏死性筋膜炎组和气性坏疽组不同时刻血清各指标比较

($\bar{x} \pm s$)

指标	时间	坏死性筋膜炎组 (n=62)	气性坏疽组 (n=35)	$F_{\text{组间}}$ 值, $P_{\text{组间}}$ 值	$F_{\text{时间}}$ 值, $P_{\text{时间}}$ 值	$F_{\text{交互}}$ 值, $P_{\text{交互}}$ 值
PTX3/ (ng/ml)	入院即刻	38.08±8.91	48.14±10.51 ^a			
	入院第2天	35.93±7.98	45.15±10.03 ^a	12.368, <0.001	22.368, <0.001	18.359, <0.001
	入院第3天	26.29±5.84 ^{bc}	33.18±7.73 ^{abc}			
CRP/ (mg/L)	入院即刻	60.72±13.37	71.09±19.34 ^a			
	入院第2天	57.67±12.82	67.86±15.08 ^a	11.562, <0.001	17.326, <0.001	12.468, <0.001
	入院第3天	53.09±11.80 ^{bc}	60.29±13.40 ^{abc}			
PCT/ (ng/ml)	入院即刻	7.06±1.46	7.99±1.63 ^a			
	入院第2天	6.67±1.78	7.54±1.67 ^a	8.367, <0.001	15.238, <0.001	11.895, <0.001
	入院第3天	4.96±1.10 ^{bc}	5.78±1.28 ^{abc}			
ESR/ (mm/h)	入院即刻	46.39±9.43	52.21±10.86 ^a			
	入院第2天	43.96±9.77	50.07±11.13 ^a	10.126, <0.001	20.135, <0.001	16.562, <0.001
	入院第3天	36.98±8.22 ^{bc}	44.17±9.82 ^{abc}			
IL-6/ (μg/L)	入院即刻	63.17±13.82	70.93±17.75 ^a			
	入院第2天	60.37±13.42	67.55±15.01 ^a	9.856, <0.001	19.967, <0.001	15.126, <0.001
	入院第3天	54.42±12.09 ^{bc}	60.26±13.39 ^{abc}			

注: ^a表示与坏死性筋膜炎组比较, $P < 0.05$; ^b表示与入院即刻比较, $P < 0.05$; ^c表示与入院第2天比较, $P < 0.05$ 。

CRP、IL-6均是炎症早期合成、释放的促炎因子,在炎症反应过程中发挥重要作用^[11];PCT是细菌感染的标志物,可判断感染的严重程度;ESR异常升高多见于细菌感染导致的急性改变,在一定程度上能够反映局部病灶的炎症反应程度。既往研究报道^[12-13],脓毒症患者CRP、PCT、IL-6、ESR水平均高于普通感染与健康人群。在本研究中NSTI患者血清CRP、PCT、ESR、IL-6水平均高于非NSTI患者和健康人群,表明上述血清指标在不同感染程度及健康人群中存在差异,与上述报道一致。PTX3是由多数炎症细胞和组织细胞产生的一种急性蛋白,通过识别病原微生物,激活补体通路,参与机体的免疫、炎症等反应^[14]。血清PTX3在健康机体中不表达或低表达,在机体发生感染后,炎症部位的组织、免疫细胞在白细胞介素1和肿瘤坏死因子的诱导下,可迅速合成并大量分泌PTX-3释放进入血液,导致其水平迅速升高^[15]。Ronanki K等^[16]研究报道,PTX3水平升高与脓毒症病情有关,能够评估感染严重程度。本研究发现NSTI患者血清PTX3水平均高于非NSTI患者和健康人群,可能有助于鉴别诊断NSTI。

本研究进一步分析血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平对NSTI的诊断价值,发现IL-6对NSTI诊断效能最低,灵敏度和特异度仅有69.07%和62.30%,研究发现^[17],IL-6在新生儿败血症中的诊断效能不足;CRP、ESR诊断NSTI的灵敏度虽然高于IL-6,但特异度仅有57.38%、52.46%,容易导致误诊,影响治疗方案决策;PCT对NSTI诊断的特异度最高,但灵敏度却略低于CRP、ESR,可能由于PCT在感染12~24 h内即可达到高峰,若错过最佳检测时间可能会导致诊断敏感度降低,延误患者治疗;PTX3诊断灵敏度和AUC均高于以上各指标,特异度略低于PCT,在NSTI诊断中凸显优势,可能由于PTX-3与CRP同

属于一个超家族,虽出现晚于CRP,但其更加稳定,存在时间更为持久,较CRP能够更迅速反映组织局部炎症、损伤,可作为炎症持续反应的标志物^[18]。曾永红等^[19]研究也报道在脓毒症诊断中PTX3较CRP、PCT具有更高的灵敏度和特异度,是诊断脓毒症的重要指标;赵德浩等^[20]研究也表明与CRP和白细胞相比,PTX3在颅内感染早期诊断中更具有诊断价值。因此,建议临床在采用常规CRP、PCT等炎症指标诊断NSTI的同时,可增加检测PTX3水平,以提高诊断效能。

本研究结果显示,气性坏疽组血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平均高于坏死性筋膜炎组,提示以上血清各指标水平在坏死性筋膜炎和气性坏疽中存在差异,可能有助于两者的鉴别诊断。坏死性筋膜炎感染累及皮下脂肪和筋膜组织,但其一般不会损害深层肌肉组织,而气性坏疽是由产气性细菌分泌的酶经糖、蛋白分解后产生大量不溶性气体并积聚,致使血管局部压力增加,加重组织缺血缺氧,促进细菌繁殖和炎症反应,相较于坏死性筋膜炎易侵入机体组织深部导致肌肉组织迅速坏死,致使病情快速恶化至全身感染^[21],故在气性坏疽中炎症因子水平相对较高。ROC曲线分析显示,血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6对坏死性筋膜炎和气性坏疽均具有一定的鉴别诊断价值,其中PTX3和PCT的诊断效能稍高于CRP、ESR、IL-6,PTX3稍高于PCT,但PTX3鉴别价值有限,建议临床仍需结合患者症状、病原学检查、影像学检查加以鉴别。

本研究结果发现,气性坏疽组入院即刻、入院第2天、入院第3天血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6水平均高于坏死性筋膜炎组,入院第2天和入院第3天均呈下降趋势,表明坏死性筋膜炎组和气性坏疽组上述指标均随着治疗时间

延长逐渐下降,可能对治疗转归具有一定的评估作用。既往研究发现^[22],血清PTX3与颅内感染患者预后情况相关;另有研究报道^[23-24],血清CRP、PCT、IL-6与坏死性筋膜炎患者预后有关。由此可推断,血清PTX3、CRP、PCT、ESR、IL-6等指标与坏死性筋膜炎和气性坏疽患者的临床结局有关。另外本研究结果显示,气性坏疽组住院平均天数、截肢率、死亡率均高于坏死性筋膜炎组,说明气性坏疽组患者截肢率和死亡率较高,提示临床应高度重视此类患者,尽早诊断救治,改善患者预后。

综上所述,NSTI患者血清PTX3水平异常升高,且气性坏疽患者高于坏死性筋膜炎患者,血清PTX3有助于诊断NSTI及鉴别坏死性筋膜炎与气性坏疽,其效能优于CRP、PCT、ESR、IL-6等常规炎症指标,有望作为此类疾病的早期诊断标志物。

[参考文献]

- [1]Peetermans M,de Prost N,Eckmann C,et al.Necrotizing skin and soft-tissue infections in the intensive care unit[J].Clin Microbiol Infect,2020,26(1):8-17.
- [2]Bruun T,Rath E,Madsen M B,et al.Risk factors and predictors of mortality in streptococcal necrotizing soft-tissue infections: A multicenter prospective study[J].Clin Infect Dis,2021,72(2):293-300.
- [3]Abdullah M,McWilliams B,Khan S U.Reliability of the laboratory risk indicator in necrotising fasciitis (LRINEC) score[J].Surgeon,2019,17(5):309-318.
- [4]Tarricone A,Mata K,Gee A,et al.A systematic review and meta-analysis of the effectiveness of Irinec score for predicting upper and lower extremity necrotizing fasciitis[J].J Foot Ankle Surg,2022,61(2):384-389.
- [5]Shi G Q,Yang L,Shan L Y,et al.Investigation of the clinical significance of detecting PTX3 for community-acquired pneumonia[J].Eur Rev Med Pharmacol Sci,2020,24(16):8477-8482.
- [6]Hansen C B,Bayarri-Olmos R,Kristensen M K,et al.Complement related pattern recognition molecules as markers of short-term mortality in intensive care patients[J].J Infect,2020,80(4):378-387.
- [7]崔瀛书,李怡,代站站,等.坏死性软组织感染的诊治[J].中华损伤与修复杂志(电子版),2019,14(5):374-379.
- [8]Kumar T,Kaushik R,Singh S,et al.Determinants of mortality in necrotizing soft tissue infections[J].Hell Cheirourgike,2020,92(5):159-164.
- [9]Nawijn F,Smeeing D P J,Houwert R M,et al.Time is of the essence when treating necrotizing soft tissue infections: a systematic review and meta-analysis[J].World J Emerg Surg,2020,15(1):4.
- [10]Eckmann C,Montravers P.Current management of necrotizing soft-tissue infections[J].Curr Opin Infect Dis,2021,34(2):89-95.
- [11]曹海萌,盛明珠,汤巧巧.牙周组织再生术联合口腔正畸治疗对慢性牙周炎患者口腔功能及TNF- α 、CRP水平的影响[J].中国美容医学,2023,32(1):131-134.
- [12]王婷,韦小碗,杨亮,等.脓毒症患者血清PCT、CRP、IL-6和IL-10水平检测及临床意义[J].陕西医学杂志,2020,49(11):1510-1514.
- [13]冯彦华,任强,甄磊,等.血清学指标水平变化对儿童急性骨关节感染继发脓毒症的早期预测价值分析[J].河北医科大学学报,2022,43(8):940-944.
- [14]Netti G S,Lucarelli G,Spadaccino F,et al.PTX3 modulates the immunoflogosis in tumor microenvironment and is a prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma[J].Aging (Albany NY),2020,12(8):7585-7602.
- [15]Jiang N,Zhou S,Wang G,et al.Diagnostic value and prognostic significance of CTRP9 combined with pentraxin-3 in acute coronary syndrome[J].Exp Ther Med,2021,21(3):254.
- [16]Ronanki K,Bairwa M,Kant R,et al.Pentraxin 3 (PTX3) as a predictor of severity of sepsis in patients admitted to an intensive care unit: A cross-sectional study from north india[J].Cureus,2022,14(8):28282.
- [17]刘启星,王斌.IL-6、TNF- α 和CRP联合检测在新生儿败血症诊断中的临床意义[J].检验医学与临床,2021,18(15):2272-2274.
- [18]Fahmney SS,Mostafa N.Pentraxin 3 as a novel diagnostic marker in neonatal sepsis[J].J Neonatal Perinatal Med,2019,12(4):437-442.
- [19]曾永红,徐俊,侯晓琳,等.正五聚蛋白3对脓毒血症的诊断价值[J].中国老年学杂志,2020,40(17):3725-3728.
- [20]赵德浩,蒋梁,赵军.PTX3在开颅术后颅内感染中的诊断价值研究[J].重庆医学,2020,49(16):2755-2757.
- [21]Leiblein M,Wagner N,Adam E H,et al.Clostridial gas gangrene-a rare but deadly infection: case series and comparison to other necrotizing soft tissue infections[J].Orthop Surg,2020,12(6):1733-1747.
- [22]孙占玉,郭智霖,王上桥.血清PTX3和NLRP3联合检测在颅脑损伤术后颅内感染早期诊治中的应用研究[J].热带医学杂志,2022,22(6):837-841.
- [23]刘远成,张劲远,李永海,等.肛周坏死性筋膜炎患者4种血液生化指标对疾病预后的预测[J].医学研究生学报,2020,33(2):164-168.
- [24]钮柏琳,杜慧敏,廖锐.早期CVVH治疗坏死性筋膜炎并发脓毒性休克的临床研究[J].免疫学杂志,2016,32(2):152-157.

[收稿日期]2022-12-27

本文引用格式: 李成志, 乔维龙, 鲁文, 等. 血清正五聚蛋白3对坏死性软组织感染的诊断效能研究[J]. 中国美容医学, 2024, 33(3): 6-11.

黑白中药通过调节MC1R和RTKs的表达对黑色素代谢的影响研究

杨波涛^{1,2}, 贾桂云³, 陈 鲲³, 吴跃文², 杨 柳⁴, 查旭山¹

(1.广州中医药大学附属第一临床医学院皮肤科 广东 广州 510405; 2.广东省人民医院南海医院皮肤科 广东 佛山 510251; 3.广州大学生命科学院 广东 广州 510006; 4.南方医科大学中医药学院 广东 广州 510515)

[摘要]目的: 探讨首乌、女贞子等七味黑色中药和白芷、白芷等七味白色中药对豚鼠皮肤组织黑色素合成中黑皮质素1受体(Melanocortin 1 receptor, MC1R)、受体酪氨酸激酶(Receptor tyrosine kinase, RTKs)表达的影响。方法: 采用水提法获得中药提取物, 用灌胃的方法以14 d为周期等量灌胃豚鼠获得背部皮肤组织, 采用免疫组化及免疫荧光法检测实验和对照组MC1R、RTKs蛋白的表达, 用Image J软件统计分析结果, 比较不同中药环境对豚鼠皮肤组织的黑色素合成的影响, 分析MC1R、RTKs蛋白与黑色素细胞代谢三者的变化关系。结果: 对MC1R蛋白有抑制作用的白药有白芷、白茯苓、白藜、白及、白僵蚕、白术, 其中白芷、白僵蚕、白术的作用最为明显, 对MC1R有明显抑制作用的黑药有乌梅、黑芝麻、丹参、鸡血藤, 其中丹参的抑制作用最为明显。该结果显示上述10味中药对黑色素合成有抑制作用, 其中白芷、白僵蚕、白术、丹参的抑制作用最为明显。其中对于RTKs蛋白有抑制作用的白药有白芷、白茯苓、白藜、白及、白僵蚕, 其中白茯苓、白藜、白及的作用最为明显, 具有明显作用的黑药有黑芝麻、丹参, 其中丹参的作用最为明显。结论: 药材颜色与药效之间有一定关系; 黑白中药都对MC1R及RTKs蛋白有不同程度的抑制作用, 色象中药可能通过调节 α -黑素细胞刺激素/黑皮质素1受体(α -melanocyte stimulating hormone/Melanocortin 1 receptor, α -MSH/MC1R)、干细胞生长因子/受体酪氨酸激酶(Stem cell growth factor/Receptor tyrosine kinase, SCF/RTKs)信号通路来影响黑色素细胞代谢。

[关键词] 中药色象理论; 黑白中药; 黑色素细胞; 黑皮质素1受体; 受体酪氨酸激酶

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455 (2024) 03-0012-05

Study on the Effect of Black and White Chinese Medicine on Melanin Metabolism by Regulating the Expression of MC1R and RTKs

YANG Botao^{1,2}, JIA Guiyun³, CHEN Kun³, WU Yuewen², YANG Liu⁴, ZHA Xushan¹

(1.Department of Dermatology, the First Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China; 2.Department of Dermatology, Nanhai Hospital, Guangdong Provincial People's Hospital, Foshan 510251, Guangdong, China; 3.School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, Guangdong, China; 4.School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of seven black Chinese herbs, such as *Polygonum multiflorum* Thunb, and *Ligustrum lucidum*, and seven white Chinese herbs, such as *Bletilla striata* and *Angelica dahurica*, on the expression of melanocortin 1 receptor (MC1R) and receptor tyrosine kinase (RTKs) in melanin synthesis of guinea pig skin. **Methods** The extract of traditional Chinese medicine was obtained by water extraction, and the skin tissue of the back of guinea pigs was obtained by gavage of the same amount in a 14 day cycle. The expression of MC1R protein and RTKs protein in the experimental and control groups were detected by immunohistochemistry and fluorescence methods. The results were statistically analyzed by Image J software. The effects of different traditional Chinese medicine environments on melanin synthesis in the skin tissue of guinea pigs were compared, and MC1R The relationship between RTKs protein and melanocyte metabolism. **Results** The white herbs with inhibitory effect on MC1R protein are *Angelica dahurica*, *Poria cocos*, *Ampelopsis japonica*, *Atractylodes macrocephala*, *atractylodes macrocephala*, among which the effects of *Angelica dahurica*, *Atractylodes macrocephala*, *Atractylodes macrocephala* are the most obvious, and the black herbs with significant inhibitory effect on MC1R are *Ophiopogon flexuosus*, *Nigella sativa*, *Dangshen*, *Chickweed*, among which the inhibitory effect of *Dangshen* is the most obvious. This result showed that the above 10 herbs had inhibitory effects on melanin synthesis, among which the inhibitory effects of *Angelica dahurica*, *Cortex alba*, *Atractylodes macrocephala*, and *Salvia miltiorrhiza* were the most obvious. Among them, the white herbs with inhibitory effect on RTKs protein are *Angelica dahurica*, *Poria cocos*, *Ampelopsis pilosulae*,

Bupleurum officinale and Bupleurum officinale, among which Poria cocos, Ampelopsis pilosulae and Bupleurum officinale have the most obvious effect, and the black herbs with obvious effect are Nigella sativa and Salvia miltiorrhiza, among which Salvia miltiorrhiza has the most obvious effect. **Conclusion** There is a certain relationship between the color of medicinal materials and their efficacy. Both black and white drugs inhibit the action of MC1R and RTKs protein to varying degrees, and color image Chinese medicine may regulate α -MSH/MC1R and SCF/RTKs signal pathways affect melanocyte metabolism.

Key words: Color-effect phenomenon theory of traditional Chinese herbs; black and white Chinese herbs; melanocytes; melanocortin 1 receptor; receptor tyrosine kinase

中药色象是表明中药材颜色与疗效相关的现象,该理论称为色象理论,而基于该理论的中药称为色象中药^[1],但中药材本身的颜色与药效之间是否存在特定的作用关系,机制尚未阐明。笔者团队从2007-2022年来一直致力于中药色象理论基础研究与临床工作,最近通过观察临床常用治疗白癜风与黄褐斑色象中药以及文献统计分析筛选出最常用的色象中药即黑色与白色中药^[2]各七味,提取物灌胃豚鼠后,采用免疫组化及荧光检测并观察实验组和对照组黑素皮质激素受体1(MC1R)蛋白、RTKs蛋白的表达量,分析不同中药环境对豚鼠皮肤组织的黑色素合成影响的原因及其相互作用关系,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:SPF级成年豚鼠64只,体重约250克/只,均购于广东省动物实验中心。

1.1.2 主要试剂与材料:白芷、白附子、白茯苓、白芨、白及、白僵蚕、白术、首乌、熟地、乌梅、女贞子、黑芝麻、丹参、鸡血藤共14味中药(均由香港奥美药业股份有限公司提供)、免疫染色固定液、免疫染色洗涤液、RTKs Rabbit Monoclonal Antibody、MC1R Rabbit Monoclonal Antibody、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒(均购于碧云天生物技术公司)。电磁炉(购于美的集团股份有限公司)、离心机(Model E3116R, ESSENSCIEN U.S.A.)、粉碎机、载玻片(帆船)、冷冻切片机(Leica, Germany)、荧光倒置显微镜(Nikon, Japan),电子天平(ME203E/02, 购于梅特勒-托利多仪器上海有限公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 中药的提取(水提法):将14味黑白中药分别称取10 g,用粉碎机粉碎成粉末状,分别加入蒸馏水300 ml,浸泡30 min,大火煎煮至沸腾,改用文火煎煮至黏稠。再加150 ml蒸馏水煎煮,重复上述操作两次,室温下静置过夜,次日用4层纱布过滤,得滤液于离心管,5 000 r/min离心15 min,收集上清液后定容至50 ml,分装后-20℃保存。

1.2.2 豚鼠给药及皮肤组织获取:将64只健康豚鼠(实验动物伦理编号:KJ-2019-03-001)按照随机分组的方式分为16组,每组4只,其中两组为对照组,余下14组为实验

组。相同条件下饲养1周后实验组每组每只每天灌胃喂养0.5 ml的中药提取液,对照组以同样的方法喂入等量的蒸馏水,连续喂药14 d,每天尽量保证同一时间给药。喂药周期结束后,处死豚鼠,刮去背毛,取其背部约4 cm²的皮肤组织,用液氮迅速冷却后置于离心管中做好标记后在-80℃下储存。

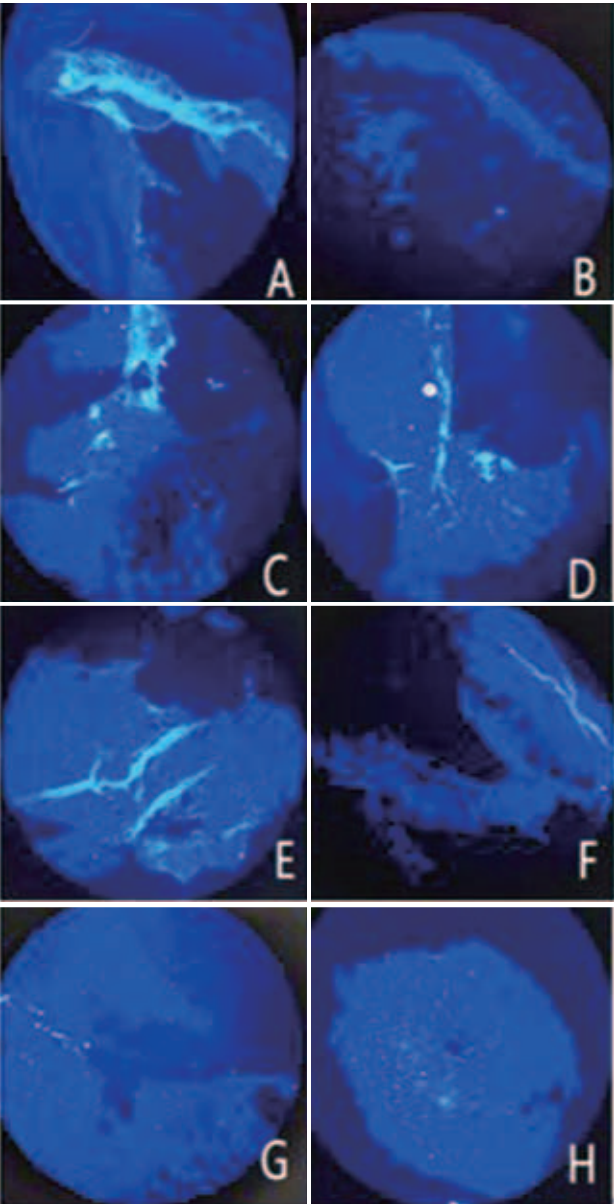
1.2.3 皮肤组织的免疫组化:使用德国Leica冷冻切片机将获取的豚鼠皮肤组织切成10 μm的薄片置于载玻片上,滴加免疫染色固定液覆盖组织切片,固定10 min后用免疫染色洗涤液洗涤2~3次,5分钟/次。吸去最后1次洗涤液后立即滴加BSA封闭液室温封闭1.5 h,回收封闭液后立即滴加稀释好的一抗[MC1R抗体或RTKs抗体(均按照1:200的比例稀释)]室温孵育1.5 h。回收一抗,用洗涤液洗涤3次,6分钟/次,吸去最后一次洗涤液后滴加稀释好的二抗[辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(按照1:200的比例稀释)]室温孵育1 h。回收二抗,用洗涤液洗涤3~5次,6分钟/次(整个过程要避免切片干燥,否则极易产生较高的背景),加入配置好的DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒(A液:B液=1:1)染色10 min,用蒸馏水洗涤3次。将载玻片置于荧光倒置显微镜下观察荧光,拍照记录结果。

2 结果

2.1 黑白中药对MC1R蛋白表达的影响:结果显示,对MC1R蛋白有抑制作用的白药有白芷、白茯苓、白芨、白及、白僵蚕、白术,其中白芷、白僵蚕、白术的作用最明显,见图1。黑药中对MC1R有明显抑制作用的中药有乌梅、黑芝麻、丹参、鸡血藤,其中丹参的抑制作用最为明显,见图2(结果图片来源于广州大学生命科学院)。黑白中药对MC1R蛋白表达影响Image J软件分析结果见图3。

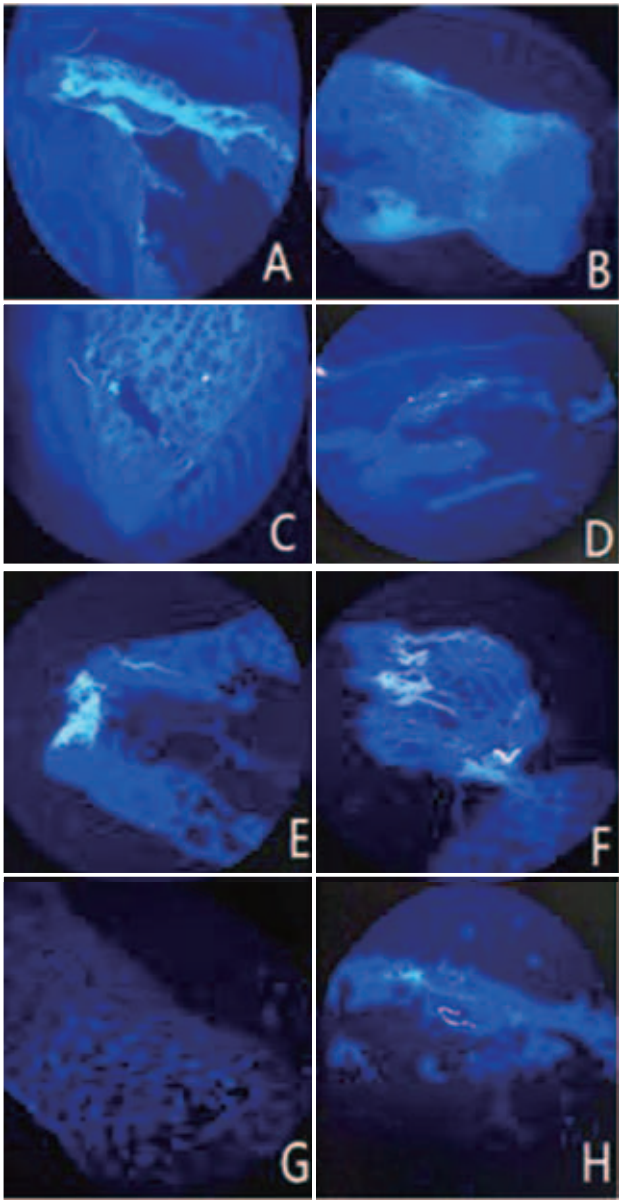
2.2 黑白中药对RTKs蛋白的影响:结果显示,对RTKs蛋白有抑制作用的白药有白芷、白茯苓、白芨、白及、白僵蚕,其中白茯苓、白芨、白及的作用最为明显,见图4;具有明显抑制作用的黑药有黑芝麻、丹参,其中丹参的作用最为明显,见图5。黑白中药对RTKs蛋白表达影响Image J软件分析结果见图6。

2.3 黑白中药对豚鼠背部皮肤组织荧光强度与面积的影响分析:结果显示,黑白中药对豚鼠背部皮肤组织MC1R、RTKs荧光强度与面积的影响作用与荧光图片、Image J软件分析结果一致。见表1。



注: A. 对照 (蒸馏水) 组; B. 白芷组; C. 白附子组; D. 白茯苓组; E. 白薏苡组; F. 白及组; G. 白僵蚕组; H. 白术组

图1 白药组对MC1R的影响 (100×)



注: A. 对照 (蒸馏水) 组; B. 首乌组; C. 熟地黄组; D. 乌梅组; E. 女贞子组; F. 黑芝麻组; G. 丹参组; H. 鸡血藤组

图2 黑药组对MC1R的影响 (100×)

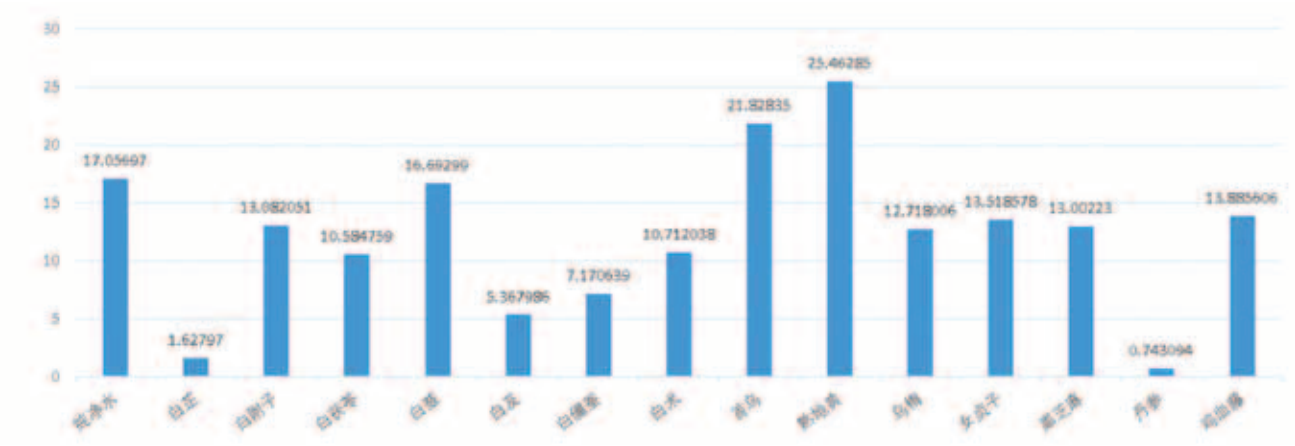
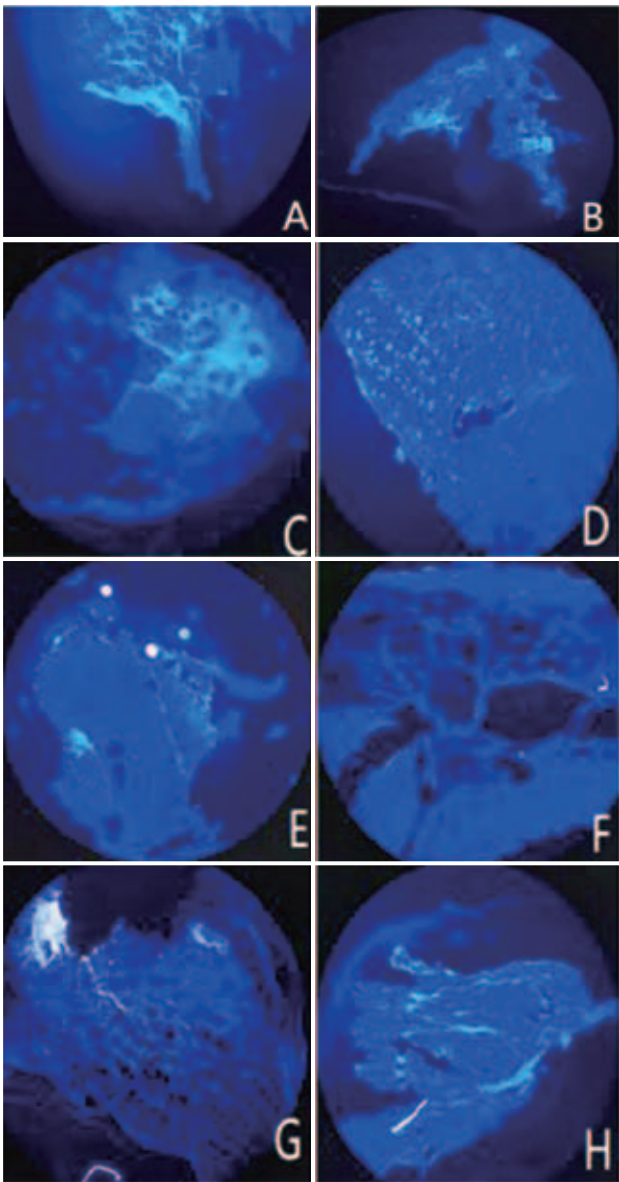
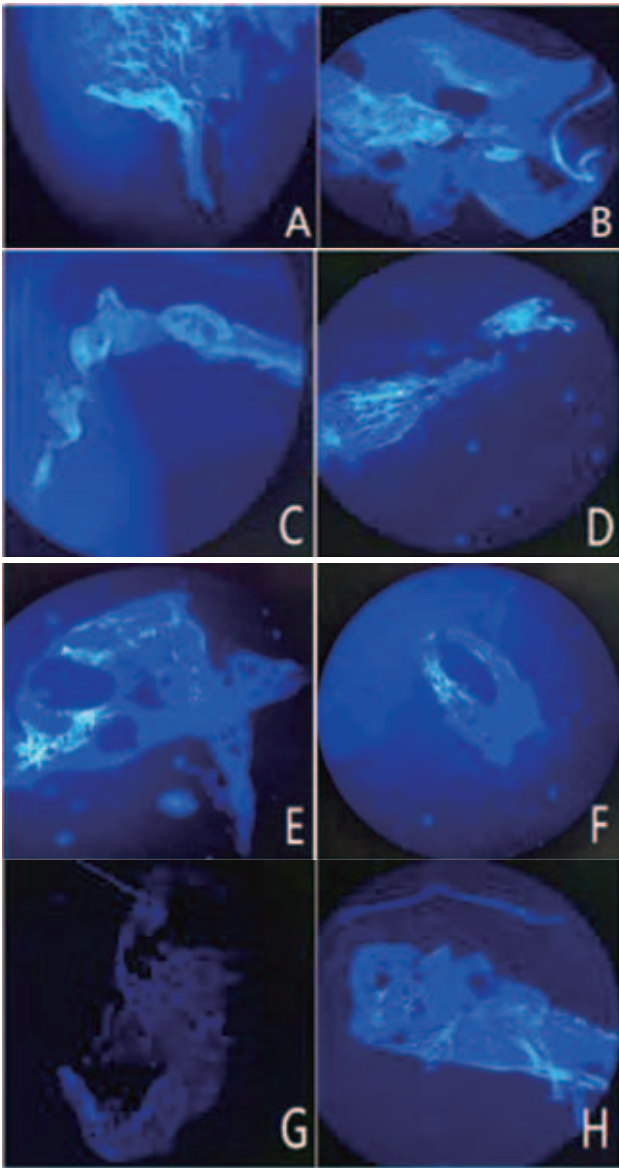


图3 黑白中药成分对MC1R的作用



注：A. 对照（蒸馏水）组；B. 白芷组；C. 白附子组；D. 白茯苓组；E. 白薏苡组；F. 白及组；G. 白僵蚕组；H. 白术组

图4 白药组对RTKs蛋白影响（100×）



注：A. 对照（蒸馏水）组；B. 首乌组；C. 熟地黄组；D. 乌梅组；E. 女贞子组；F. 黑芝麻组；G. 丹参组；H. 鸡血藤组

图5 黑药组对RTKs蛋白影响（100×）

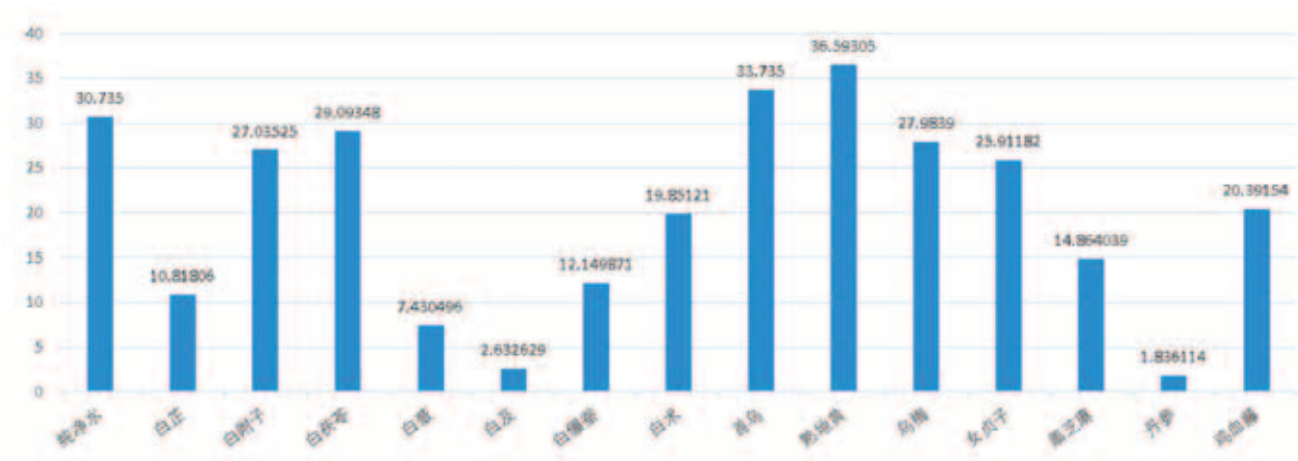


图6 黑白中药成分对RTKs蛋白的作用

表1 豚鼠背部皮肤组织荧光强度与面积分析

水、药物	MC1R荧光面积	MC1R荧光强度	RTKs荧光面积	RTKs荧光强度
纯净水	+++	+++	+++	+++
白芷	+	+	++	++
白附子	++	+++	++	+++
白茯苓	+	++	+	+
白薇	+	++	+	+
白及	+	+	+	+
白僵蚕	+	+	+	++
白术	+	+	++	++
首乌	+++	+++	+++	+++
熟地黄	++++	++++	++++	++++
乌梅	++	++	+++	+++
女贞子	++	+++	++	+++
黑芝麻	++	++	+	+
丹参	+	+	+	+
鸡血藤	++	++	+++	++

3 讨论

本研究选择经典的黑色素代谢研究方法（含中药血清对体外干预蘑菇酪氨酸酶活性的方法、中药血清干预体外培养人黑素细胞后其酪氨酸酶基因蛋白的表达、黑素合成量）来研究色象中药对色素代谢的影响，保证实验结果的可靠。黑色素的产生与黑素细胞分化紧密相关，分化和色素沉着的产生以各种信号转导途径的激活为标志，这些途径主要导致诱导邻苯二甲酸相关的转录因子Mitf转录。Mitf反过来激活的黑色素合成相关基因如TYIP1，TYRP2，Tyr等基因的分化。研究表明^[3-7]，有两种主要途径可控制Mitf的诱导： α -黑素细胞刺激素（ α -MSH）/黑皮质素1受体（MC1R）信号传导途径，以及干细胞因子（SCF）/RTKs受体酪氨酸激酶途径。作为对紫外线辐射的急性生理反应，角质形成细胞产生并分泌 α -MSH（类似于促肾上腺皮质激素，ACTH）可以与MC1R结合，从而在黑素细胞中启动细胞内cAMP介导的信号级联。活化蛋白反过来激酶A（PKA）磷酸化cAMP反应元件结合蛋白（CREB），导致Mitf的转录激活，从而驱动皮肤色素沉着。而RTKs受体（CD117）是由原癌基因RTKs编码的具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白，它是III型受体酪氨酸激酶家族（RTK）的重要成员^[8]，SCF/RTKs信号通路调节黑素细胞的增殖和迁移^[9-10]。以上都说明 α -MSH/MC1R、SCF/RTKs两种信号通路在黑素细胞代谢中起到关键作用。而本实验结果中发现黑白色中药均有不同程度抑制MC1R与RTKs（酪氨酸激酶受体）蛋白的作用，这与之前研究的基础推论一致。黑色素增加与减少与MC1R与RTKs两者关系紧密，呈现一定相关性。

本实验研究从中医传统治验与临床皮肤病治疗的实践中最常应用的治法“以黑治白，以白治黑”入手，选择临床常用于治疗色素障碍性疾病的黑、白两大类中药各7种中药作代表发现了药材本身的颜色（黑药、白药）与药效之间确实存在一定关系，也印证中药色象理论的科学性。而中药颜色与药效关系的机制之一可能是通过调节 α -MSH/

MC1R、SCF/RTKs信号通路来影响黑素细胞代谢。

本研究存在不足：①现有资料表示仅有白附子和白僵蚕具有毒性。豚鼠皮肤对药物刺激反应灵敏，其反应与人类相似，在饲喂豚鼠的过程中，所有药物的使用剂量对黑色素的合成有抑制作用但并未明显表现出毒性，若后续用于临床研究，则需先进行毒性检测，条件与时间所限本实验暂时未做药物的毒性检查。②本研究只对MC1R以及RTKs蛋白表达做了基础研究，但是对MC1R的凋亡通路以及RTKs蛋白增殖通路包括SCF/RTKs信号传导途径是否有被黑白中药具体影响还值得深入研究。可以看到的是现有研究黑药如黄连、红花等中药的美白已经初具成效^[11-12]，白药如白及、白附子等中药美白也在理化研究阶段^[13-15]，黑白中药即色象中药在皮肤美容方面拥有较大的发展潜力。

【参考文献】

- [1]杨波涛,杨柳,查旭山. 中药色象理论与临床研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 2137-2139.
- [2]梁培干, 钟慧, 莫琴仙, 等. 中药色象理论临床文献统计[J]. 中医学报, 2011, 26(1): 118-121.
- [3]Ji Z, Erin Chen Y, Kumar R, et al. MITF modulates therapeutic resistance through EGFR signaling[J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(7): 1863-1872.
- [4]马梓育, 陆洋. 体内黑色素合成、调控及常用天然、中药来源的黑色素抑制剂[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(24): 5898-5916.
- [5]于兰, 唐辉, 陈韩英, 等. 甲氧基黄酮促斑鱼黑色素生成的药效学评价及机制研究[J]. 中草药, 2020, 51(23): 6023-6034.
- [6]薛丽娜, 罗惠娣, 周胜花, 等. 不同毛色绵羊皮肤组织中MC1R、Agouti及TYR基因差异表达研究[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(1): 91-95, 100.
- [7]蒋婧, 李杰, 周鹏, 王高富, 等. MC1R基因在山羊皮肤组织及B16-F10细胞中的表达分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(15): 13-17.
- [8]Liang J, Wu Y L, Chen B J, et al. The RTKs receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases[J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(5): 435-443.
- [9]平宇, 曹莫. 干细胞因子受体RTKs在皮肤黑色素代谢方面的研究进展[J]. 中华整形外科杂志, 2018, 34(8): 671-675, 647.
- [10]谭明, 段波, 叶松, 等. 点阵激光对豚鼠皮肤干细胞因子及其RTKs受体表达的影响[J]. 中华医学美容美容杂志, 2017, 23(6): 415-418.
- [11]叶希韵, 朱萍亚. 黑色素的合成与美白产品的研究进展[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2016, 62(2): 1-8.
- [12]查琳, 王影, 杨怀雷, 等. 常用中药在化妆品功效中的应用研究进展[J]. 人参研究, 2021, 33(1): 51-53.
- [13]延永, 张亦琳, 李玉萌, 等. 白芷与茯苓美白保湿面膜的制备及性能研究[J]. 香料香精化妆品, 2019, 47(1): 65-68.
- [14]张国哲, 刘平平, 季禹乔, 等. 不同中药乙醇提取物对酪氨酸酶抑制活性的比较[J]. 中国医药导报, 2020, 17(16): 34-36, 48.
- [15]陈革豫, 朱周静, 田航周, 等. 白芷白术白附子提取物对酪氨酸酶抑制作用的比较[J]. 中国现代中药, 2020, 22(12): 2068-2071, 2079.

[收稿日期] 2023-01-09

本文引用格式：杨波涛, 贾桂云, 陈鲲, 等. 黑白中药通过调节MC1R和RTKs的表达对黑色素代谢的影响研究[J]. 中国美容医学, 2024, 33(3): 12-16.

·论著·

OPG过表达的ADSC对大鼠牙槽后槽骨缺损的修复作用

尹鹏, 季于琪

(乐山市人民医院口腔科 四川 乐山 614000)

[摘要]目的: 探究骨保护素 (Osteoprotegerin, OPG) 过表达的脂肪间充质干细胞 (Adipose-derived stem cell, ADSC) 对大鼠牙槽后槽骨缺损修复的影响。方法: 选择SD雄性大鼠38只, 其中6只用于获得ADSC及ADSC OPG过表达转染, 鉴定转染情况并观察不同ADSC的形态、成骨分化、成脂分化及增殖能力; 其中8只作为对照组, 另外24只建立牙槽后槽骨缺损大鼠模型, 随机分为模型组、正常ADSC组和OPG过表达的ADSC组。6周后, Micro-CT扫描观察骨缺损愈合情况; 苏木素-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色观察骨缺损组织病理改变; 免疫组化分析组织中碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素 (Osteocalcin, OCN) 的表达; Western blot分析组织中OPG/核因子- κ B受体活化因子配体 (Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) /核因子- κ B受体活化因子 (Receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK) 通路蛋白表达。结果: 携带空载体与OPG过表达慢病毒的转染效率分别为75.23%和79.08%; 两种ADSC均为长梭形; OPG过表达ADSC中的OPG蛋白表达水平、增殖能力、成骨能力明显高于正常ADSC, 成脂能力明显低于正常ADSC ($P < 0.05$); 与对照组相比, 模型组的牙槽后槽骨缺损体积、RANKL、RANK蛋白表达水平明显升高, Lane-Sandhu组织学评分、ALP、OCN阳性表达率、OPG蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 正常ADSC组获得与上述相反的结果; OPG过表达的ADSC组上述指标的变化幅度较正常ADSC组更显著。结论: OPG过表达的ADSC能够促进大鼠牙槽后槽骨缺损的修复。

[关键词]脂肪间充质干细胞; 骨保护素; 牙槽后槽骨缺损; 大鼠; 成脂分化能力; 成骨分化能力

[中图分类号]R781.42 [文献标志码]A [文章编号]1008-6455 (2024) 03-0017-05

The Osteogenesis of ADSC with OPG Overexpression Has A Great Effect on the Posterior Alveolar Bone Defect

YIN Peng, JI Yuqi

(Department of Stomatology, Leshan People's Hospital, Leshan 614000, Sichuan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of adipose-derived stem cell (ADSC) overexpressed with osteoprotegerin (OPG) on the repair of posterior alveolar bone defects in rats. **Methods** Thirty-eight male SD rats were selected, of which 6 were used to obtain the overexpression of ADSC and ADSC OPG. The transfection was identified and the morphology, osteogenic differentiation, adipogenic differentiation and proliferation of different ADSC were observed. Among them, 8 rats were used as control group, and 24 rats with alveolar bone defect were randomly divided into model group, normal ADSC group and OPG overexpression ADSC group. Six weeks later, Micro-CT scan was used to observe the healing of bone defect in rats. The histopathological changes of bone defects were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) in the tissue was analyzed by immunohistochemistry. The expression of OPG/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) / Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) pathway was analyzed by Western blot. **Results** The transfection efficiency of empty vector and OPG overexpression lentivirus was 75.23% and 79.08%, respectively. Both kinds of ADSC were fusiform. The expression level of OPG protein, proliferation ability and osteogenic ability in OPG overexpressed ADSC were significantly higher than those in normal ADSC, while the adipogenic ability was significantly lower than that in normal ADSC ($P < 0.05$). Compared with the control group, the volume of posterior alveolar bone defect, the expression of RANKL and RANK protein in the model group increased significantly, while the histological score of Lane-Sandhu, the positive expression rate of ALP and OCN and the expression level of OPG protein decreased significantly in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the normal ADSC group achieved the opposite results. The changes of the above indexes in the ADSC group with overexpression of OPG were more significant than those in the normal ADSC group. **Conclusion** ADSC overexpressed by OPG can promote the repair of alveolar bone defect in rats.

Key words: adipose-derived stem cell; osteoprotegerin; posterior alveolar bone defect; rats; adipogenic differentiation ability; osteogenic differentiation ability

口腔科骨代谢性疾病可导致大面积牙槽骨缺损,自体骨移植是目前治疗无法自我修复骨缺损的首选方案,但存在供区骨量受限、增加患者机体损伤等问题^[1]。组织工程学的兴起和应用解决了上述不足,其中,干细胞是研究的重点^[2-3]。骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC)和ADSC是目前应用于口腔骨再生医学中的主要非牙源性干细胞,且ADSC是良好的种子细胞^[4]。但单纯ADSC还不能达到理想的骨缺损修复目的。研究表明^[5],通过基因工程技术对干细胞进行修饰,能够提高对骨缺损的修复效果。OPG主要由骨髓基质细胞和成骨细胞合成并分泌,属于肿瘤坏死因子超家族成员。有研究证实^[6],OPG修饰的BMSC能够抑制破骨细胞活性,提高骨质疏松大鼠的骨密度。但目前鲜见关于通过OPG修饰的ADSC对骨缺损修复的影响的研究。本研究探讨OPG过表达的ADSC对大鼠牙槽后槽骨缺损修复的影响,为下一步的临床应用提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:体重为(220±20)g的4月龄雄性SD大鼠38只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。喂养3 d,正常饮食、饮水。本研究经乐山市人民医院实验动物伦理委员会审核、批准(批准号:L1329-18)。

1.1.2 主要试剂及仪器:DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);胰蛋白酶(美国Hyclone公司);pmirGLO表达载体(美国Promega公司);Lipofectamine™2000试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司);吉姆萨染液、油红O染色试剂盒、BCA蛋白质测定试剂盒(上海碧云天);茜素红染液(北京Solarbio公司);碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)抗体、骨钙素(Osteocalcin, OCN)抗体、OPG抗体、RANKL抗体、RANK抗体(美国Abcam公司);3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)(上海康郎生物科技有限公司)。SZ51型光学显微镜(日本Olympus公司);IX73型倒置显微镜(日本Olympus公司);Micro-CT扫描系统(比利时Bruker公司)。

1.2 方法

1.2.1 ADSC的提取、分离培养及传代:颈椎脱臼处死6只大鼠,获取2 g腹部脂肪组织, PBS清洗,剪刀剪碎并置于离心管中,加入其2倍体积的0.075%的I型胶原蛋白酶,37℃水浴震荡消化30 min,加入等体积的DMEM培养基(含10%胎牛血清),1 500 rpm离心15 min并弃去上清,用DMEM培养基重悬细胞沉淀并经细胞筛过滤。调整细胞浓度至 1×10^6 个/毫升,接种至装有DMEM培养基(含10%胎牛血清)的培养皿中,置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养,24 h后观察细胞形

态,3 d换液1次,当细胞生长达80%~85%融合时进行消化传代,取第3代细胞用于实验。

1.2.2 OPG过表达ADSC的转染、筛选及验证:取第3代ADSC,用DMEM培养基重悬,以 1×10^4 个/孔的细胞数量接种于96孔板中,参照文献^[7]并按照慢病毒转染说明书,将带有表达绿色荧光的空载体慢病毒液和OPG过表达载体慢病毒液加入96孔板中与ADSC混合,分别为正常ADSC和OPG过表达的ADSC。培养箱中培养24 h后,荧光显微镜观察细胞形态及绿色荧光强度,当转染率>70%时即为转染成功。Western blot分析进一步验证转染情况。

1.2.3 ADSC形态观察及增殖、分化能力的检测

1.2.3.1 细胞的形态观察:取对数生长期的细胞,胰酶消化,细胞涂片,甲醛固定,吉姆萨染色, PBS浸泡30 s,去离子水洗涤,晾干后在显微镜下观察(40×)并拍照。

1.2.3.2 细胞增殖能力的检测:取第3代ADSC,接种于6孔板中,细胞密度为 6×10^4 个/毫升,设置3个副孔,分别于细胞培养的第1、2、3、4、5、6、7天取3个副孔中的细胞, PBS洗涤,胰酶消化,10%血清培养液终止消化,显微镜下观察计数,每孔重复观察计数3次取平均值。

1.2.3.3 ADSC成骨分化能力的检测:取第3代细胞接种于6孔板中,密度为 1×10^5 个/ml,加入DMEM培养液培养,细胞融合至80%后,更换为成骨诱导液(胎牛血清10 ml+双抗1 ml+DMEM培养基89 ml+抗坏血酸50 μmol/L+地塞米松100 nmol/L+β-甘油磷酸钠10 mmol/L)继续培养21 d,期间每3 d换液一次,采用茜素红染色法检测钙沉积情况。

1.2.3.4 ADSC成脂分化能力的检测:按上述成骨分化能力检测中的方法,将细胞培养至融合80%后,更换为成脂诱导液(胎牛血清10 ml+双抗1 ml+DMEM培养基89 ml+吡哆美辛0.2 mmol/L+地塞米松1 μmol/L+胰岛素10 μg/ml+IBMX 0.5 mmol/ml),每3 d换液一次,培养21 d后,采用油红O染色法检测脂肪囊泡的形成情况。

1.2.4 ADSC种植于明胶海绵:将大小为2 mm×2 mm×2 mm的无菌明胶海绵置于48孔板内,分别将正常ADSC与OPG过表达的ADSC接种于明胶海绵上,每孔 1×10^5 个细胞,体外培养3 d后进行后续实验。

1.2.5 大鼠分组及牙槽后槽骨缺损大鼠模型的制备

1.2.5.1 分组:将32只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、正常ADSC组、OPG过表达的ADSC组,每组8只。每组中的2只大鼠用于Micro-CT扫描和病理学观察,3只用于免疫组化实验,3只用于Western blot实验。

1.2.5.2 牙槽后槽骨缺损大鼠模型的制备:模型组、正常ADSC组、OPG过表达的ADSC组大鼠按40 mg/kg的剂量腹腔注射2%的异戊巴比妥进行麻醉,术区消毒后,无菌条件下手术暴露大鼠牙槽后槽骨,使用牙科钻于上颌两侧后槽牙位

置各造一个直径2 mm、深2 mm的圆柱形缺损^[8]。模型组、正常ADSC组、OPG过表达的ADSC组大鼠双侧缺损内分别植入明胶海绵、明胶海绵与正常ADSC的复合体、明胶海绵与OPG过表达的ADSC的复合体；对照组大鼠未进行牙槽后槽骨缺损处理，不植入明胶海绵。

1.2.6 Micro-CT扫描观察各组大鼠牙槽后槽骨缺损区的修复情况：各组大鼠牙槽后槽骨缺损区植入明胶海绵6周后，麻醉并固定大鼠，采用Micro-CT对各组大鼠缺损区进行扫描，观察骨缺损区的愈合情况。

1.2.7 大鼠牙槽后槽骨缺损区组织病理学观察及评价：植入明胶海绵6周后，处死大鼠，分离获得手术区牙槽后槽骨标本，多聚甲醛固定，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，切片，脱蜡，水化，HE染色，脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，显微镜下观察。采用Lane-Sandhu组织学评分^[9]评价各组大鼠牙槽后槽骨缺损修复情况，包括连接、松质骨、皮质骨3个评价项目，每个项目0~4分，总分0~12分，评分越高提示骨缺损愈合情况越好。

1.2.8 免疫组化分析大鼠牙槽后槽骨缺损组织中成骨相关蛋白的表达：大鼠手术区牙槽后槽骨组织标本切片于65℃烘箱中烘烤过夜，二甲苯浸泡脱蜡，逆浓度梯度乙醇复水，去离子水洗涤，抗原高压修复，滴加3%的H₂O₂溶液，PBS洗涤，分别加ALP、OCN一抗，4℃孵育过夜，PBS洗涤，滴加二抗，37℃条件下孵育10 min，PBS洗涤，滴加二氨基联苯胺（Diaminobenzidine, DAB）溶液，显微镜下观察并控制染色时间，PBS洗涤，苏木素复染，0.5%氨水返蓝，脱水，透明，封片，电子显微镜下观察。

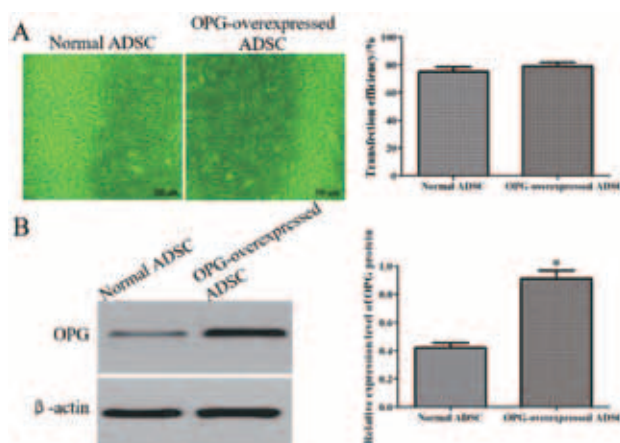
1.2.9 Western blot分析大鼠牙槽后槽骨缺损组织中OPG/RANKL/RANK通路蛋白的表达：RIPA缓冲液提取大鼠缺损牙槽后槽骨组织中的总蛋白，使用BCA蛋白质测定试剂盒测量蛋白质浓度。电泳，转膜，5%脱脂牛奶封闭，分别添加抗OPG、RANKL、RANK一抗，4℃下孵育过夜，加入辣根过氧化物酶偶联的二抗，37℃下孵育2 h， β -actin作内参。使用Gel Pro Analyzer 4.0对图像进行灰度识别。

1.3 统计学分析：采用SPSS 22.0进行统计学分析，作图软件采用GraphPad Prism 5.0。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPG过表达ADSC的转染鉴定：荧光显微镜观察发现，携带空载体与OPG过表达慢病毒的转染效率分别为75.23%和79.08%，见图1A。Western blot分析结果显示，OPG过表达的ADSC中OPG蛋白表达水平明显高于正常ADSC（ $P < 0.05$ ），见图1B。

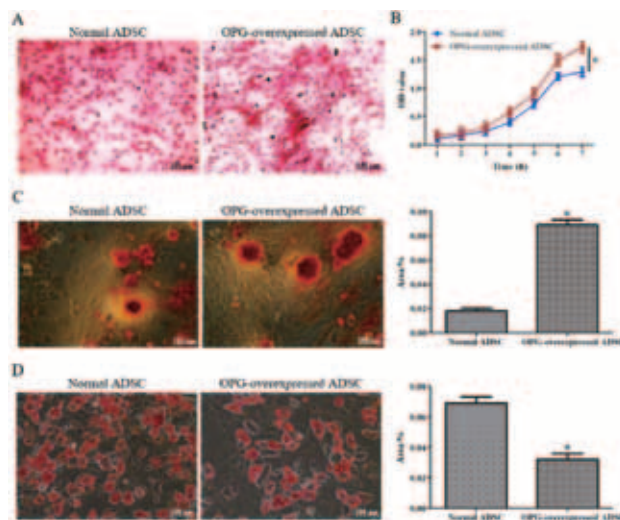
2.2 正常ADSC与OPG过表达的ADSC形态及增殖、分化能力的比较：正常ADSC与OPG过表达的ADSC均为纤维细胞样长梭形，细胞核明显，核质清晰；与正常ADSC相比，OPG过表达的ADSC增殖能力、成骨分化能力明显增强，成脂分化能力



注：A. 荧光显微镜观察细胞荧光强度（40×）；B. Western blot分析细胞中OPG蛋白表达情况。*表示与正常ADSC相比， $P < 0.05$

图1 OPG过表达ADSC的转染鉴定

明显减弱，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。见图2。

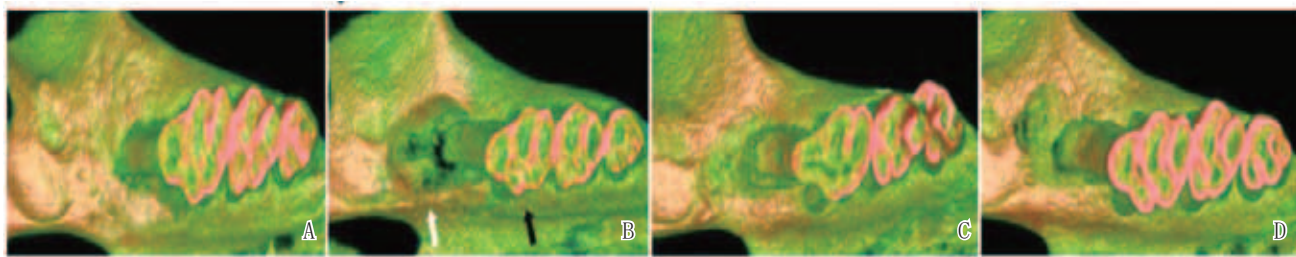


注：A. 吉姆萨染色观察ADSC细胞形态（40×）；B. 细胞增殖能力的比较；C. 茜素红染色观察ADSC细胞的成骨分化能力（400×）；D. 油红O染色观察ADSC细胞的成脂分化能力（400×）。*表示与正常ADSC相比， $P < 0.05$

图2 正常ADSC与OPG过表达ADSC形态及增殖、分化能力的比较

2.3 Micro-CT扫描观察各组大鼠牙槽后槽骨缺损区的修复情况：与对照组相比，模型组牙槽后槽骨缺损体积明显增加，与模型组相比，正常ADSC组的牙槽后槽骨缺损体积明显减小，OPG过表达的ADSC组的牙槽后槽骨缺损体积较正常ADSC组明显减小。见图3。

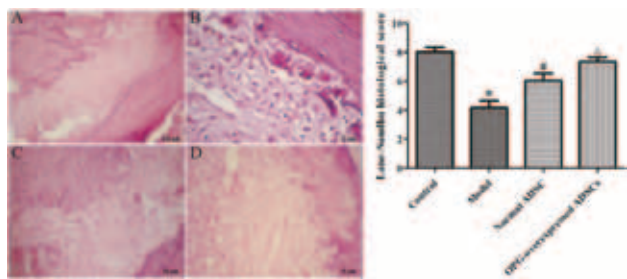
2.4 各组大鼠牙槽后槽骨缺损区组织病理染色结果的观察：HE染色结果显示，对照组上颌骨组织中的新生骨、新生血管及成骨细胞较为多见；模型组新生骨数量较少，可见大量的纤维结缔组织；与模型组相比，正常ADSC组可见明显的新生骨生成，但结构较为紊乱，且仍以编织骨为主，并附着大量的纤维组织，OPG过表达的ADSC组可见大量新生骨和部分新生血管，新生骨周围存在大量的成骨细



注: A. 对照组; B. 模型组; C. 正常ADSC组; D. OPG过表达的ADSC组

图3 Micro-CT扫描观察各组大鼠牙槽后槽骨缺损区的修复情况

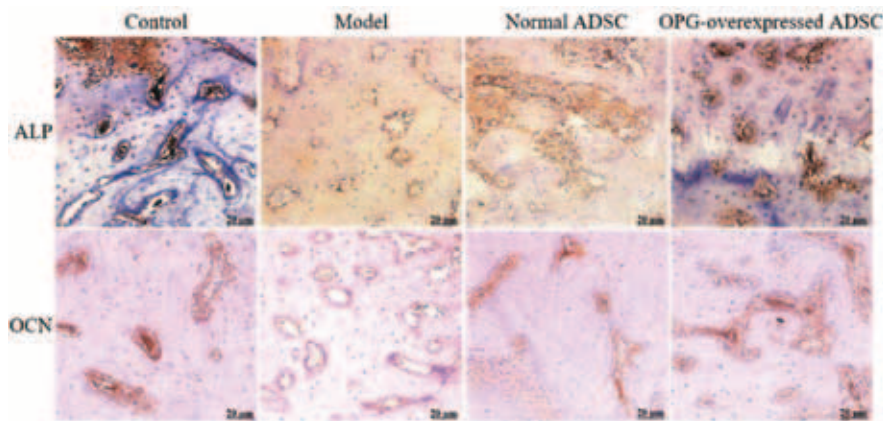
胞,但新生骨结构仍较紊乱。与对照组相比,模型组的Lane-Sandhu组织学评分明显降低,与模型组相比,正常ADSC组的Lane-Sandhu组织学评分明显升高,OPG过表达的ADSC组的Lane-Sandhu组织学评分较正常ADSC组明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见图4。



注: A. 对照组 (25×); B. 模型组 (100×); C. 正常ADSC组 (50×); D. OPG过表达的ADSC组 (50×)。*表示与对照组相比, $P < 0.05$; #表示与模型组相比, $P < 0.05$; △表示与正常ADSC组相比, $P < 0.05$

图4 HE染色观察各组大鼠上颌骨术区组织病理改变

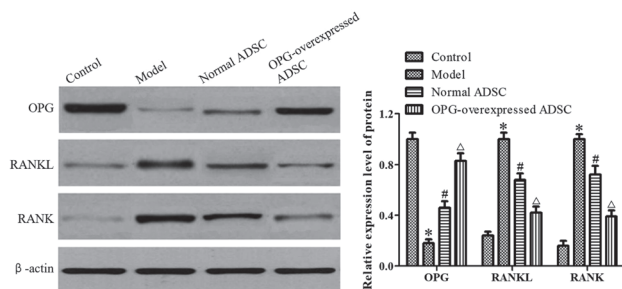
2.5 各组大鼠牙槽后槽骨中成骨相关蛋白表达水平的比较:与对照组相比,模型组大鼠牙槽后槽骨中的ALP、OCN蛋白阳性表达率明显降低,与模型组相比,正常ADSC组的ALP、OCN蛋白阳性表达率明显升高,与正常ADSC组相比,OPG过表达ADSC组的ALP、OCN蛋白阳性表达率明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见图5。



注: *表示与对照组相比, $P < 0.05$; #表示与模型组相比, $P < 0.05$; △表示与正常ADSC组相比, $P < 0.05$

图5 免疫组化分析各组大鼠牙槽后槽骨中成骨相关蛋白表达 (200×)

2.6 各组大鼠牙槽后槽骨中OPG/RANKL/RANK通路蛋白表达水平的比较:与对照组相比,模型组的OPG蛋白表达水平明显下降,RANKL、RANK蛋白表达水平明显升高,与模型组相比,正常ADSC组的OPG蛋白表达水平明显升高,RANKL、RANK蛋白表达水平明显下降,与正常ADSC组相比,OPG过表达ADSC组的OPG蛋白表达水平明显升高,RANKL、RANK蛋白表达水平明显下降,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见图6。



注: *表示与对照组相比, $P < 0.05$; #表示与模型组相比, $P < 0.05$; △表示与正常ADSC组相比, $P < 0.05$

图6 Western blot分析各组大鼠牙槽后槽骨中OPG及成骨相关蛋白表达情况

3 讨论

随着组织工程学的发展,干细胞移植修复骨缺损已成为目前医学界研究的热点,避免了自体骨移植来源不足及

异体骨移植和骨替代材料移植受到种间差异限制等问题^[10-11]。ADSC作为理想的种子细胞,具有多向分化潜能,通过移植至骨缺损组织并分化为成骨细胞发挥骨缺损修复的作用,但修复效果有限^[5]。OPG能够抑制破骨细胞增殖活化,促进破骨细胞凋亡^[12]。有研究发现^[13],骨形态发生蛋白2过表达能够提高ADSC的增殖和成骨分化能力,促进颅骨大段骨缺损组织的愈合。还有研究证实^[14],OPG修饰的牙周膜干细胞有利于其成骨分化,促进新西兰兔牙槽骨组织的再生修复。但目前关于OPG是否会增强提高ADSC的增殖及成骨分化的能力尚未明确。

在本研究中,OPG过表达ADSC中的OPG蛋白表达水平明显升高,表明ADSC中OPG过表达转染成功。此外,OPG过表达ADSC的增殖能力及成骨分化能力明显增强,成脂分化能力明显减弱,表明OPG过表达能够促进ADSC的增殖和成骨分化。目前关于通过OPG修饰的ADSC对骨缺损愈合的影响也尚未阐明。Song J等^[15]的研究表明,凝血酶抑制剂通过上调BMSC中Wnt的表达,促进细胞增殖,并诱导BMSC的成骨分化,抑制牙周病模型小鼠的牙槽骨丢失,促进骨缺损的修复。在本研究中,牙槽后槽骨缺损模型大鼠骨缺损部位分别植入明胶海绵与正常ADSC的复合体、明胶海绵与OPG过表达ADSC的复合体6周后,骨缺损体积均明显减小,组织病理染色结果显示骨缺损区组织的成骨细胞数量及新生骨数量明显增加,且应用OPG过表达ADSC的改善效果更显著,表明OPG过表达ADSC能够促进大鼠牙槽后槽骨缺损组织的愈合。

成骨细胞和破骨细胞平衡被打破是牙槽后槽骨缺损及骨缺损后难以自主愈合的重要原因^[16]。ALP、OCN与骨钙化相关,分别是成骨细胞分化成熟的早期标志和晚期标志物^[17-18]。裴吉雨等^[19]的研究结果显示,骨形成蛋白9过表达的人牙周膜干细胞能够明显增强大鼠牙周缺损区ALP、OCN的活性,增强干细胞的成骨分化能力,促进新骨形成,修复牙槽骨缺损。在本研究中,正常ADSC组与OPG过表达的ADSC组大鼠骨缺损区牙槽后槽骨组织中的ALP、OCN阳性表达率较模型组均明显增加,表明ADSC能够促进大鼠牙槽后槽骨缺损区新骨的形成,OPG过表达的ADSC组大鼠骨缺损组织中的ALP、OCN阳性表达率更高,提示OPG过表达能够促进ADSC成骨细胞分化,有利于骨缺损愈合。OPG是RANK的假性受体,竞争性阻断RANKL与RANK的结合,从而抑制骨吸收和骨破坏。OPG/RANKL/RANK是调节成骨与破骨偶联的信号通路^[20]。在本研究中,正常ADSC组与OPG过表达的ADSC组大鼠骨缺损区牙槽后槽骨组织中的OPG蛋白表达水平较模型组明显升高,RANKL、RANK蛋白表达水平较模型组明显下降,且OPG过表达的ADSC组的改善作用更明显,表明OPG过表达的ADSC可能通过调节OPG/RANKL/RANK信号通路对大鼠缺损组织起到促进成骨和抑制破骨的作用。

综上所述,OPG过表达能够增强ADSC的增殖和成骨分化能力,抑制ADSC的成脂分化能力,OPG过表达的ADSC能

够促进大鼠牙槽后槽骨缺损组织的愈合及新生骨形成,上调ALP、OCN成骨相关蛋白的表达,其作用机制可能与调节OPG/RANKL/RANK信号通路有关。

[参考文献]

- [1]Chatelet M,Afota F,Savoldelli C.Review of bone graft and implant survival rate: A comparison between autogenous bone block versus guided bone regeneration[J].J Stomatol Oral Maxillofac Surg,2022,123(2):222-227.
- [2]Chen L,Luo W,Wang Y,et al.Directional homing of glycosylation-modified bone marrow mesenchymal stem cells for bone defect repair[J].J Nanobiotechnology,2021,19(1):228-242.
- [3]晋红敏.自体角膜缘干细胞移植术治疗翼状胬肉疗效分析[J].中国美容医学,2022,31(7):84-88.
- [4]Di Stefano A B,Montesano L,Belmonte B,et al.Human Spheroids from adipose-derived stem cells induce calvarial bone production in a xenogeneic rabbit model[J].Ann Plast Surg,2021,86(6):714-720.
- [5]Lu T,Peng W,Liang Y,et al.PTEN-silencing combined with ChABC-overexpression in adipose-derived stem cells promotes functional recovery of spinal cord injury in rats[J].Biochem Biophys Res Commun,2020,532(3):420-426.
- [6]柏小金,黄文良,柏帆,等.骨保护素基因修饰的骨髓间充质干细胞治疗大鼠骨质疏松[J].中国老年学杂志,2019,39(13):3245-3249.
- [7]Yu T,Chu S,Liu X,et al.Extracellular vesicles derived from EphB2-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate DSS-induced colitis by modulating immune balance[J].Stem Cell Res Ther,2021,12(1):181-194.
- [8]Boda S K,Wang H,John J V,et al.Dual delivery of alendronate and E7-BMP-2 peptide via calcium chelation to mineralized nanofiber fragments for alveolar bone regeneration[J].ACS Biomater Sci Eng,2020,6(4):2368-2375.
- [9]张严,冯俊铭,谢磊,等.补肾方联合骨膜原位成骨治疗肾虚型大鼠股骨骨缺损的机制[J].中华中医药杂志,2021,36(9):5526-5531.
- [10]Alonso-Alonso M L,Garcia-Posadas L,Diebold Y.Extracellular vesicles from human adipose-derived mesenchymal stem cells: a review of common cargos[J].Stem Cell Rev Rep,2022,18(3):854-901.
- [11]Bispo D S C,Jesus C S H,Correia M,et al.NMR metabolomics assessment of osteogenic differentiation of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells[J].J Proteome Res,2022,21(3):654-670.
- [12]Gómez-Vaquero C,Martín I,Zacarias A,et al.Relation of the serum levels of dkk-1 and osteoprotegerin with bone mass in tightly controlled rheumatoid arthritis[J].Curr Rheumatol Rev,2021,17(1):101-108.
- [13]Hsu M N,Yu F J,Chang Y H,et al.CRISPR interference-mediated noggin knockdown promotes BMP2-induced osteogenesis and calvarial bone healing[J].Biomaterials,2020,252:120094.
- [14]Su F,Liu S S,Ma J L,et al.Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of osteoprotegerin-engineered periodontal ligament stem cells[J].Stem Cell Res Ther,2015,6(1):22-35.

(本文未完,下转第25页)