

α -硫辛酸抑制增生性瘢痕氧化应激的作用

倪子樵¹, 张锦松², 高翔¹, 朱秋璇¹, 王鑫¹, 黄海年¹, 朱飞¹

摘要 目的 探讨 α -硫辛酸 (ALA) 对兔耳增生性瘢痕 (HTS) 形成的影响及其机制。方法 选取 18 只新西兰大白兔, 随机分为正常组、模型组、4% ALA 组, 用药 28 d 后采用苏木精-伊红 (HE) 染色、马松 (Masson) 染色及免疫组织化学染色评估瘢痕相关指标的变化; 评估氧化应激相关指标的变化; 采用蛋白免疫印迹法检测抗氧化通路相关蛋白的表达水平。结果 4% ALA 组较模型组瘢痕颜色变浅、质地变软、体积明显缩小。HE、Masson 染色和免疫组织化学染色结果显示 4% ALA 组较模型组成纤维细胞数目减少, 纤维化程度减轻。4% ALA 组中, 丙二醛 (MDA) 含量低于模型组 ($P < 0.001$), 羟脯氨酸 (Hyp) 含量低于模型组 ($P < 0.01$), 谷胱甘肽 (GSH) 水平较模型组升高 ($P < 0.01$), T-SOD 活力较模型组升高 ($P < 0.001$)。蛋白免疫印迹结果显示 4% ALA 组 NRF2 含量较模型组增加, 其下游抗氧化蛋白的表达水平升高。结论 ALA 上调 NRF2 信号通路以降低兔耳 HTS 内氧化应激水平从而抑制瘢痕增生。

关键词 增生性瘢痕; 氧化应激; 纤维化; α -硫辛酸; NRF2

中图分类号 R 62

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)07-1060-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.009

目前增生性瘢痕 (hypertrophic scar, HTS) 的形成机制尚不清楚, 其预防和治疗也相对困难。氧化应激是机体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生和抗氧化能力失衡的结果。研究^[1]表明, 高水平 ROS 有促纤维化作用, HTS 和瘢痕疙瘩中存在氧化应激失衡。NRF2/ARE 通路是清除 ROS 的主要途径。在氧化应激过程中, ROS 促进 NRF2 核转位, 激活多种抗氧化酶如 [NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 NQO1]、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等表达^[2]。

2022-05-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30973124); 安徽医科大学校基金 (编号: 2019xkj058)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院整形外科, 合肥 230022

² 安徽医科大学第一附属医院北区整形外科, 合肥 230012

作者简介: 倪子樵, 男, 硕士研究生;

朱飞, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hfzfzx@163.com

α -硫辛酸 (α -lipoic acid, ALA) 最初由 Reed et al^[3] 于 1951 年从牛肝中分离, 因其抗氧化特性, ALA 可用于多种疾病的治疗, 如糖尿病、心血管疾病、癌症和艾滋病。但尚无文献报道 ALA 在 HTS 中的作用。ALA 因其稳定性差、溶解度低、刺激性强等缺点, 不宜直接制备成皮肤制剂使用。本研究将在兔耳 HTS 模型中探讨局部应用 ALA 是否可抑制 HTS 进展以及对氧化还原相关通路的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料 ALA、10% NaOH 溶液、10% HCl 溶液 (美国 Sigma 公司); 2-羟丙基- β -环糊精 (上海阿拉丁生化科技有限公司); HE 染色液、Masson 染色试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、DAB 显色液、ECL 显色液; 山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); NRF2、NQO1、SOD1、CAT、HO-1 抗体 (英国 Abcam 公司); T-SOD、MDA、Hyp、GSH、GSH-px、GSR 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 石蜡包埋机、切片图像分析系统 (德国 LEICA); 全自动化学发光分析仪 (上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 瘢痕模型的建立和 ALA 乳膏的制备

1.2.1.1 瘢痕模型的建立 随机选取 18 只健康新西兰大白兔, 雌雄不限, 体质量为 2.5 ~ 3.0 kg, 均由安徽医科大学实验动物中心提供。造模前, 适应性单笼喂养 3 d, 维持室内温度 21 ~ 25℃。根据李荟元等^[4]建立兔耳 HTS 模型的方法, 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 耳缘静脉麻醉。75% 酒精消毒术区, 术中严格遵循无菌操作原则。在兔耳腹侧用直径 10 mm 的角膜环钻钻穿全层皮肤, 骨膜剥离器去除软骨膜, 保留软骨, 按压止血, 然后用生理盐水清洗后暴露。每只兔耳两侧长轴方向各制备 6 个相同的创面, 间隔 1.5 cm。术后 7 d 去除创面痂皮, 再次造创后 14 d 左右所有创面均完成上皮化。

1.2.1.2 ALA 乳膏制备 根据 Ikuta et al^[5] 的实验方法, 将 2-羟丙基- β -环糊精溶解于 10% NaOH 中, 搅拌至完全溶解, 按 2:1 比例加入 ALA 粉末, 充分

搅拌至液体澄清透明。再用 10% HCl 滴定至 pH = 7.0, 形成稳定的 ALA/ β -CD 包合物。将 ALA/ β -CD 和凡士林、液体石蜡按 2 : 1 : 1 充分混合, 制备成 ALA 乳膏。

1.2.2 实验分组及给药 术后第 20 d, 所有创面均完全再上皮化并形成早期 HTS。随机将动物分为 2 组: 模型组 (HTS 组) 不予以特殊处理, 实验组 (ALA 组) 涂抹质量分数为 4% ALA 软膏 (预实验筛选浓度确定)。根据 Arivazhagan et al^[6] 提出的 ALA 有效抑制脂质过氧化的浓度 [100 mg/(kg · d)], 用量 0.1 g/次 2 次/d, 连续用药 28 d。另取 6 只作空白对照。术后第 49 d 处死所有实验动物, 每组获得标本 72 个, 每个瘢痕在最大突起处被一分为二, 一部分立即用 10% 福尔马林固定脱水, 石蜡包埋切片行后期染色观察。一部分放置于 -80 °C 冰冻保存, 测定氧化应激等相关蛋白表达的指标。

1.2.3 大体观察 所有创面再上皮化后, 动态观察并记录各组增生性瘢痕的大体情况, 在给药后第 7、14、28 d, 每组随机选择 18 个瘢痕组织, 由 3 名技术人员在相同条件下分别通过色泽、血管分布、厚度、柔软度评估各组瘢痕增生程度, 根据温哥华瘢痕评定量表 (VSS), 最高分为 13 分, 最低分为 0 分。对每一个瘢痕评分取平均值, 并做统计学处理。连续用药 28 d 后, 在无菌条件下取材。

1.2.4 病理指标检测 将取出的组织用 10% 中性福尔马林固定 24 h, 石蜡包埋后制备 3 ~ 4 μ m 切片。使用苏木精-伊红 (HE) 染色进行光镜检查, 光镜下观察 HTS 形态及成纤维细胞计数; 按照 Masson 染色试剂盒说明书行 Masson 染色, 脱水后用二甲苯透明、封片, 显微镜下拍照分析。

1.2.5 免疫组化检测 HTS 中 I 型胶原、III 型胶原、CD34、Ki67 表达 石蜡包埋的组织切片 (4 μ m) 脱蜡、脱水和复水。加入 3% H₂O₂ 阻断内源过氧化物酶活性, 漂洗后, 一抗 (collagen 1: 1 : 300; collagen 3: 1 : 300; CD 34: 1 : 400; Ki67: 1 : 200) 孵育 60 min, 冲洗后加二抗孵育 20 min, 苏木精复染。显微镜下捕获图像。

1.2.6 生化指标检测 MDA、Hyp、GSH-px、GR、GSH、T-SOD 水平 取保存在 -80 °C 的各组组织, 与冷却的 Tris-HCL 缓冲液以 1 : 5 (W/V) 比例冰浴匀浆, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液行样本分析。按照 MDA、Hyp、GSH 试剂盒操作说明检测各组组织中 MDA、Hyp、GSH 含量。按照 GSH-px、GR、T-SOD 试剂盒操作说明检测各组样本中 GSH-

px、GR、T-SOD 活性。

1.2.7 Western blot 检测组织中 NRF2、SOD-1、NQO1、CAT、HO-1 蛋白相对含量 取各组样本, 提取总蛋白和核蛋白。SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 用于将等量的蛋白质 (10 ~ 20 μ g) 转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜与抗体 HO-1 (1 : 1 000)、NRF2 (1 : 1 000)、SOD1 (1 : 1 000)、NQO1 (1 : 1 000)、CAT (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 2 000)、LaminB1 (1 : 1 000) 共同孵育 2 h。一抗孵育后, 再将 PVDF 膜与山羊抗兔 IgG 抗体或山羊抗小鼠 IgG 抗体孵育 1 ~ 2 h, 然后将膜在 DPS-Tween 20 中洗涤 4 次, 8 min/次, 洗涤后用 ECL 试剂盒进行信号检测。

1.3 统计学处理 所有结果均采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。行方差齐性检验, 正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用 *t* 检验; 多组资料之间比较采用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALA 对 HTS 抑制效果的大体观察 兔耳增生性瘢痕模型创面于术后 20 d 左右完成上皮化, 所有创面均愈合良好。上皮化后局部涂抹药物, 肉眼观察并拍照评估各组兔耳 HTS 组织的大小、颜色变化。局部给药第 7、14、28 d, 每组随机选取 18 个瘢痕, 每个瘢痕评分取平均数行统计学处理 (图 1), 第 7 d 时 4% ALA 组与模型组比较差异无统计学意义, 第 14 天与 28 天时 4% ALA 组与模型组比较, 温哥华瘢痕评分降低 ($F_{14d} = 1.262$, *P* < 0.001; $F_{28d} = 2.102$, *P* < 0.001)。实验组较模型组瘢痕体积减小, 瘢痕颜色变浅, 硬度降低。模型组呈现 HTS 的典型表现。见图 2。

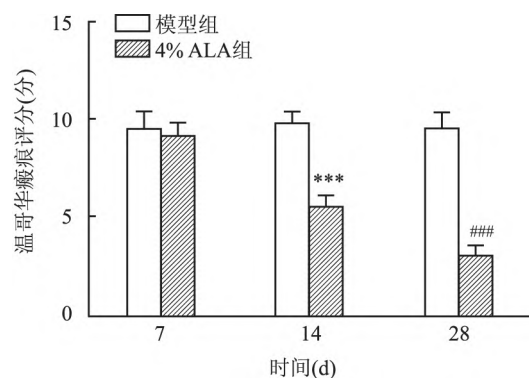


图1 模型组与 4%ALA 组瘢痕在不同时间温哥华瘢痕评分与模型组相比较: *** *P* < 0.001; 与模型组相比较: ### *P* < 0.001

2.2 ALA 对 HTS 组织结构的影响 HE 染色显示

模型组真皮层明显增厚,乳头层和网状层边界模糊。高倍视野下真皮内成纤维细胞、微血管也明显增多,表现为轻度的慢性炎症。4% ALA 治疗 28 d 的瘢痕,瘢痕真皮层明显变薄,细胞和微血管明显减少。Masson 染色显示模型组组织切片中真皮深层胶原纤维致密,胶原纤维较宽,排列紊乱,呈结节状、圆形或螺旋状排列。相反 4% ALA 组中胶原纤维细长,颜色浅蓝色,密度降低,平行于皮肤表面,有向正常皮肤转化的趋势。见图 2。

2.3 ALA 对 HTS 中 CD34、I 型胶原、III 型胶原和 Ki67 表达影响 正常组、模型组和 4% ALA 组中 CD34 阳性细胞的表达,主要定位在微血管内皮细胞胞浆中,呈棕黄色或褐色。模型组中 CD34 阳性表达的微血管数高于正常组及 ALA 组; Col I 和 Col III 主要表达于细胞外基质中,模型组中 Col I 和 Col III 阳性面积多于正常组及 4% ALA 组;模型组中, Ki67 阳性表达率多于正常组及 4% ALA 组。见图 3。

2.4 ALA 对 HTS 中 MDA、Hyp、GSH 含量及 GSH-px、GR、T-SOD 活性的影响 与 4% ALA 组及正常组相比,模型组中 MDA、Hyp 含量明显升高, GSH-px、GR 活性均明显升高, GSH 水平明显降低, T-SOD 活性逐渐递增 ($F_{GR} = 79.36$, $F_{GSH} = 237.3$, $F_{GPX} = 164$, $F_{HYP} = 285.5$, $F_{MDA} = 320.2$, $F_{T-SOD} = 99.25$), 差异有统计学意义。见图 4。

2.5 ALA 对 HTS 中 NRF2、SOD1、NQO1、CAT、HO-1 蛋白表达的影响 在正常组、模型组、4% ALA 组中, NRF2、SOD1、NQO1、CAT、HO-1 蛋白表达逐渐递增 ($F_{总NRF2} = 57.82$, $F_{HO-1} = 216.5$, $F_{NQO1} = 198.4$, $F_{Cat} = 103.7$, $F_{SOD1} = 480$, $F_{核NRF2} = 90.04$), 组间两两比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

HTS 形成的机制目前尚不完全清楚,以成纤维细胞持续活化和细胞外基质过度沉积为特征。局部应用抗瘢痕药物的优点在于无创且易于使用,可提

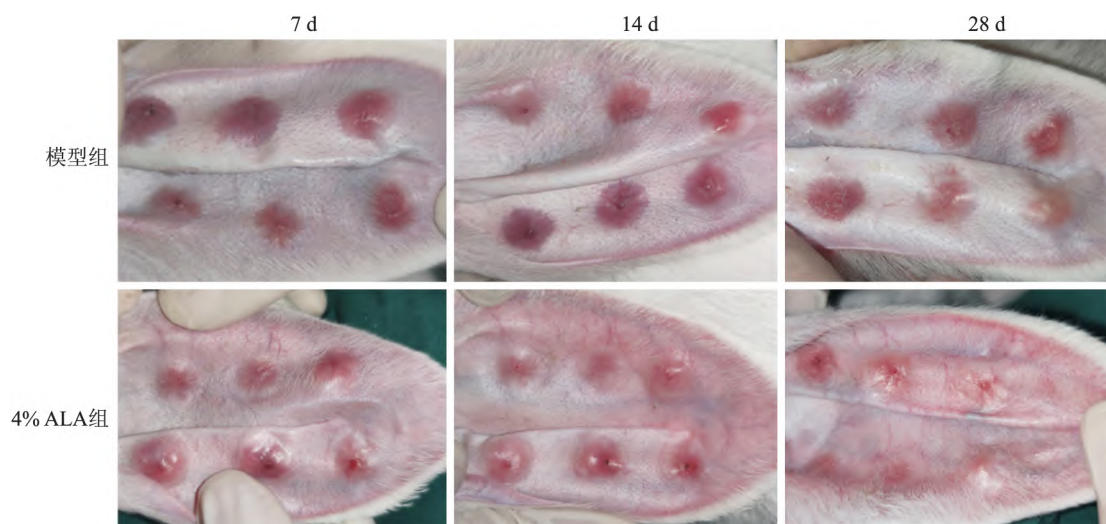


图2 肉眼观察 ALA 对兔耳增生性瘢痕模型的影响

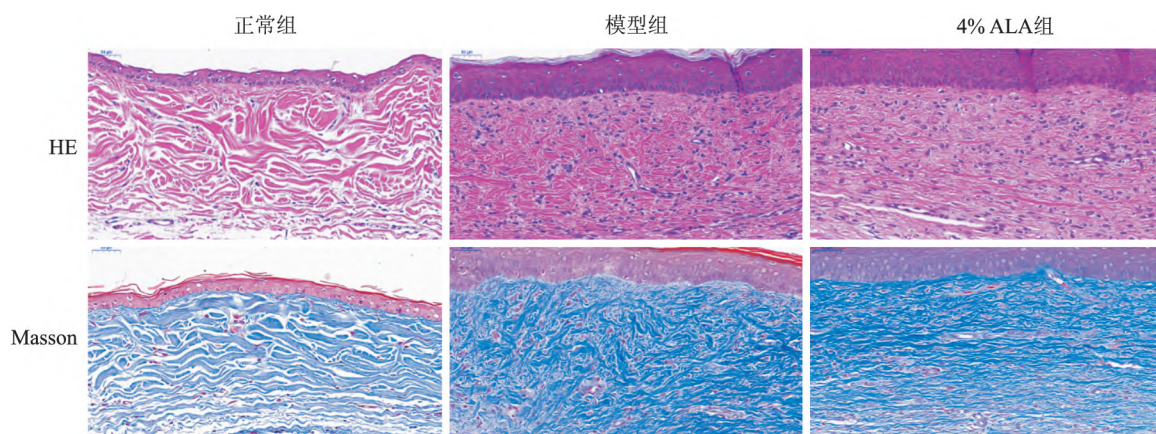


图3 ALA 对兔耳增生性瘢痕模型组织形态的影响 HE&Masson 染色 $\times 200$

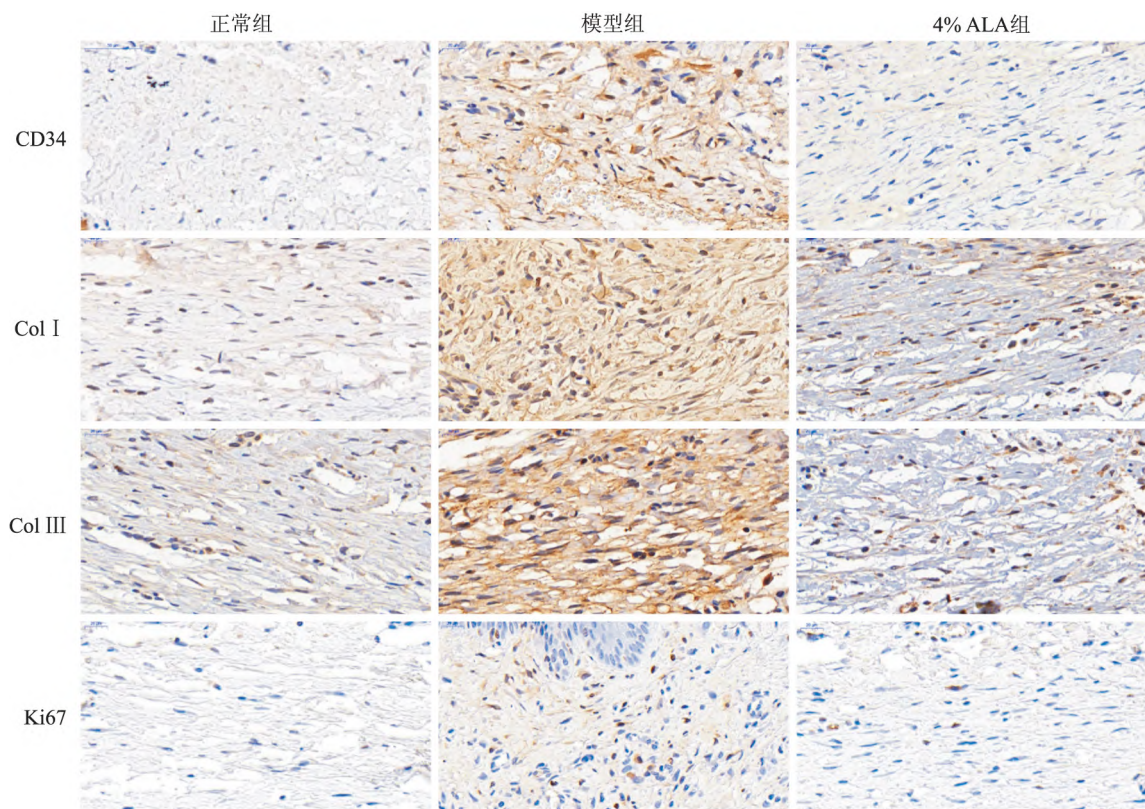


图4 ALA对兔耳增生性瘢痕模型组织CD34、Col I、Col III表达的影响 免疫组化 ×400

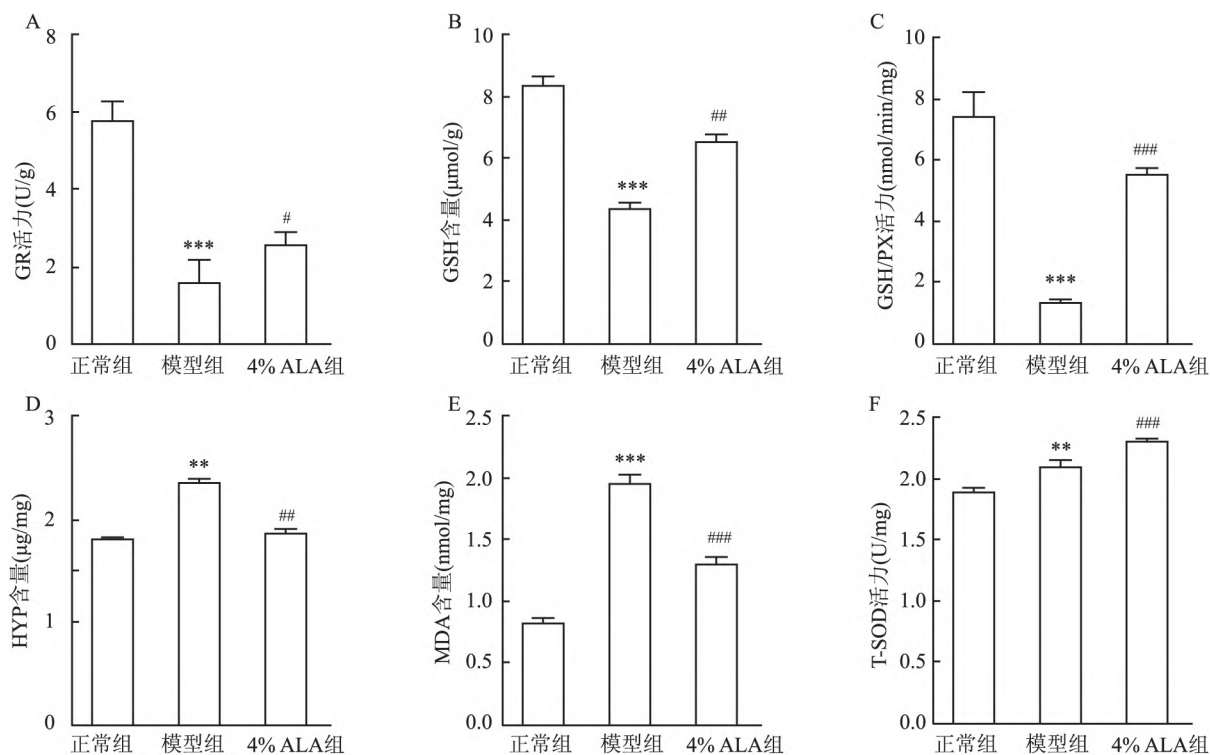


图5 ALA对兔耳增生性瘢痕模型中生化指标的影响

A: 模型组 HYP 含量; B: 模型组 MDA 含量; C: 模型组 T-SOD 活力; D: 模型组 GR 活力; E: 模型组 GSH 含量; F: 模型组 Gpx 活力; 与正常组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 4% ALA 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

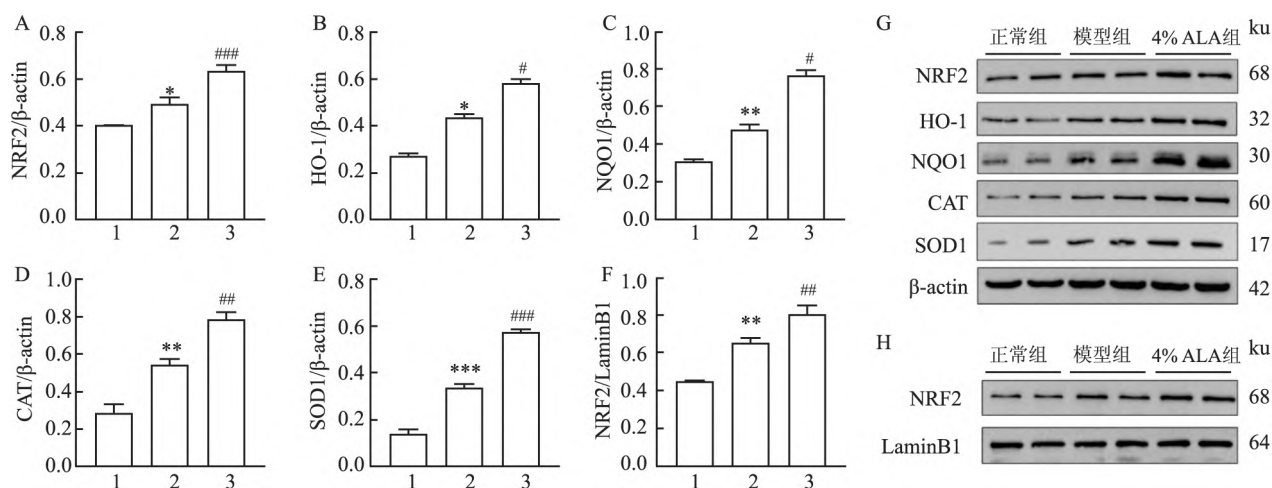


图6 ALA对兔耳增生性瘢痕模型中NRF2通路相关蛋白表达的影响

A: 模型组 Nrf2 蛋白表达水平; B: 模型组 HO-1 蛋白表达水平; C: 模型组 NQO1 蛋白表达水平; D: 模型组 CAT 蛋白表达水平; E: 模型组 SOD1 蛋白表达水平; F: 模型组 Nrf2 核蛋白表达水平; G: 各组总 Nrf2、NQO1、HO-1、CAT、SOD 蛋白的表达; H: 各组 Nrf2 核蛋白的表达; 与正常组比较: **P < 0.01, ***P < 0.001; 与 4% ALA 组比较: #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001

高患者的依从性^[7]。因此,临床上致力于寻找一种早期干预、安全性高、创伤小的治疗方法。氧化应激的相关机制已相对明确,近期已有研究^[8]表明,氧化还原失衡可能在增生性瘢痕的进展过程中起重要作用。

ALA 作为一种强效的抗氧化剂,能够提高细胞内抗氧化水平,清除和灭活自由基,保护细胞免受氧化应激损伤。Podda et al^[9]通过局部应用 ¹⁴C 标记的 ALA 探究其在裸鼠皮下动力学的分布,证实 ALA 可通过皮肤吸收。Beitner et al^[10]使用 5% 含 ALA 的面霜进行了关于光老化的双盲随机对照研究,证明其局部应用的安全性和有效性。

本实验成功建立兔耳增生性瘢痕模型,局部外涂 ALA 治疗后,通过大体观察、病理切片 HE 染色等指标证实 ALA 对 HTS 具有抑制作用。ALA 提高 HTS 组织内抗氧化酶的含量,激活 NRF2/ARE 通路,提示 ALA 发挥抗瘢痕作用可能与提高 HTS 组织内抗氧化能力有关。

细胞内的 ROS 主要由线粒体产生^[11]。MDA 含量高低间接反应机体细胞受 ROS 攻击的严重程度。但本研究结果显示,模型组中 MDA 和 T-SOD 水平较均较正常组升高,考虑是 HTS 的抗氧化能力不足以清除大量升高的 ROS,长期暴露在高水平 ROS 条件下的瘢痕组织,抗氧化物耗竭,氧化与抗氧化之间的平衡倾向于氧化,导致氧化应激损伤。促进成纤维细胞活化和细胞外基质的过度沉积,ALA 处理后的 HTS 抗氧化能力增强,证实了 ALA 的调节作用。

谷胱甘肽(GSH)循环是机体内重要的抗氧化

保护机制之一^[12],已有研究^[13]表明 ALA 可通过 NRF2/ARE 信号通路通过 GR 再生 GSH 来减轻镉诱导的 HepG2 细胞氧化应激。本研究模型组中 GSH-px、GR 活力及 GSH 水平较正常组降低,因此 GSH 可能直接参与 HTS 内清除 ROS 的作用,在 HTS 中,由于 ROS 增加导致 GSH 含量降低,而在 ALA 治疗后,GSH-px、GR 活力增加,同时 GSH 水平相应增加,这与本课题组预期结果相同。提示 ALA 可能通过 NRF2/ARE 信号通路增加 HTS 内 GSH 的循环,增强瘢痕组织抗氧化能力。

NRF2/ARE 信号通路是体内清除 ROS 的主要途径,作为氧化还原敏感的转录因子,激活的 NRF2 可以从细胞质移位到细胞核,并抗氧化反应元件(ARE)结合,调控一系列抗氧化酶表达。其蛋白表达水平间接反应机体清除氧自由基的能力。本研究发现,HTS 中 NRF2 表达及核转位增加,其下游相应的抗氧化蛋白表达相应增加,但 HTS 中仍处于高水平氧化应激状态。在 ALA 处理后的 HTS 中,NRF2 蛋白表达及核转位和其下游的抗氧化蛋白较模型组中表达增加,氧化应激水平相应降低。ALA 加速增生性瘢痕中 NRF2 的核转位,增加了抗氧化蛋白的表达,增强了 HTS 组织中的抗氧化能力,减轻了瘢痕组织中的氧化损伤。

已有研究^[14]表明高浓度 ALA 可导致细胞氧化应激损伤。前期预实验采用 1%、2%、4% 和 8% ALA 处理 HTS,结果提示 4% ALA 对 HTS 抑制效果最佳,因此本实验将 4% ALA 设为最适浓度。后续将通过设置更小浓度梯度探究 ALA 在 HTS 中的最

佳作用浓度。本研究仅在组织学及蛋白水平证实 ALA 增强了 HTS 的抗氧化能力,抑制瘢痕增生,未对 NRF2/ARE 通路及相关抗氧化蛋白的基因表达进行深入探究,但仍为后续研究提供了科学依据。

参考文献

- [1] Jiang L, Deng Y, Li W, et al. Arctigenin suppresses fibroblast activity and extracellular matrix deposition in hypertrophic scarring by reducing inflammation and oxidative stress[J]. *Mol Med Rep*, 2020 22(6): 4783–91.
- [2] Tonelli C, Chio I I C, Tuveson D A. Transcriptional regulation by Nrf2[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018 29(17): 1727–45.
- [3] Tibullo D, Li Volti G, Giallongo C, et al. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential[J]. *Inflamm Res*, 2017 66(11): 947–59.
- [4] 李荟元. 增生性瘢痕动物实验模型应用最新动态[J]. *中国美容医学*, 2013 22(13): 1455–61.
- [5] Ikuta N, Sugiyama H, Shimosegawa H, et al. Analysis of the enhanced stability of α -lipoic acid by the complex formation with cyclodextrins[J]. *Int J Mol Sci*, 2013 14(2): 3639–55.
- [6] Arivazhagan P, Ramanathan K, Panneerselvam C. Effect of DL- α -lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chem Biol Interact*[J]. 2001; 138(2): 189–98.
- [7] Rabello F B, Souza C D, Farina Jr J A. Update on hypertrophic scar treatment[J]. *Clinics*, 2014 69(8): 565–73.
- [8] 李仕一, 杨锦秀, 赖琳英, 等. 氧化应激及相关通路在人增生性瘢痕与正常皮肤组织成纤维细胞中的表达差异[J]. *中华整形外科杂志*, 2020 36(11): 1270–7.
- [9] Podda M, Rallis M, Traber M G, et al. Kinetic study of cutaneous and subcutaneous distribution following topical application of [7, 8- 14 C] rac- α -lipoic acid onto hairless mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 1996; 52(4): 627–33.
- [10] Beitner H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin[J]. *Br J Dermatol*. 2003; 149(4): 841–849.
- [11] Zorov D B, Juhaszova M, Sollott S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. *Physiol Rev*, 2014 94(3): 909–50.
- [12] Lu S C. Glutathione synthesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(5): 3143–53.
- [13] Shi C, Zhou X, Zhang J, et al. α -Lipoic acid protects against the cytotoxicity and oxidative stress induced by cadmium in HepG2 cells through regeneration of glutathione by glutathione reductase via Nrf2/ARE signaling pathway[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016 45: 274–81.
- [14] Slepneva I A, Sergeeva S V, Khrantsov V V. Reversible inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase by α -lipoic acid [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 214(3): 1246–53.

Inhibitory effect of α -lipoic acid on oxidative stress of hypertrophic scar

Ni Ziqiao¹, Zhang Jinsong², Gao Xiang¹, Zhu Qiuxuan¹, Wang Xin¹, Huang Hainian¹, Zhu Fei¹

(¹Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Plastic Surgery, North Branch of the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230012)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of α -lipoic acid (ALA) on the formation of hypertrophic scar (HTS) in rabbit ears. **Methods** Eighteen New Zealand white rabbits were randomly divided into normal group, model group and 4% ALA group. After 28 days of treatment, the changes of scar related indexes were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson pine (Masson) staining and immunohistochemical staining, the changes of oxidative stress related indexes were evaluated, and the expression of antioxidant pathway related proteins was detected by Western blotting. **Results** The color, texture and volume of scar in 4% ALA group were lighter and softer than those in model group. The results of HE, Masson staining and immunohistochemical staining showed that the number of fibrous cells and the degree of fibrosis in the 4% ALA group were less than those in the model group. In the 4% ALA group, the content of malondialdehyde (MDA) was lower than that of the model group ($P < 0.001$), the content of hydroxyproline (Hyp) was lower than that of the model group ($P < 0.01$), the level of glutathione (GSH) was higher than that of the model group ($P < 0.01$), the activity of T-SOD was higher than that of the model group ($P < 0.001$). Western blotting showed that the content of NRF2 and the expression level of downstream antioxidant proteins in the 4% ALA group were higher than those in the model group. **Conclusion** ALA up-regulates NRF2 signal pathway to reduce the level of oxidative stress in HTS and inhibit scar proliferation in rabbit ears.

Key words hypertrophic scar; oxidative stress; fibrosis; α -lipoic acid; NRF2