

生姜提取物 6-姜酚调节炎症因子促进创面愈合的机制研究

侯春 王肃生 梁刚 张志华 冀航 王平平 施然 李伯辉

广州医科大学附属第一医院 广东 广州 510120

【摘要】目的：探讨生姜提取物 6-姜酚对创面愈合过程中炎症因子中性粒细胞、巨噬细胞如 MPO、F4/80 的影响及其机制。方法：利用 C57BL/6 小鼠并在其脊柱两侧各做一个直径 8mm 的全皮肤层切除的圆形创面模型，使用 6-姜酚（GIN，30mg/kg/d）局部注射进行药物干预治疗。通过 HE 染色检测创面组织病理变化；通过免疫荧光检测创面中 MPO、F4/80 的表达变化；利用蛋白质免疫印迹技术和实时荧光定量技术检测创伤组织内炎症因子中 MPO、F4/80 的蛋白质和 mRNA 的表达情况。结果：术后第 5 天，HE 染色显示 6-姜酚治疗组的上皮间隙为 $(0.87 \pm 0.51)\text{mm}$ ，模型组上皮间隙为 $(1.78 \pm 1.21)\text{mm}$ ，结果比较显示有统计学意义（ $p=0.04$ ）。免疫荧光染色中 MPO 阳性标记物中显示 6-姜酚治疗组阳性细胞计数结果为 (17.33 ± 5.55) ，模型组阳性细胞计数结果为 (14.22 ± 1.03) ，结果比较显示无统计学意义（ $p=0.09$ ）；F4/80 阳性标记物中显示 6-姜酚治疗组阳性细胞计数结果为 (79.99 ± 11.11) ，模型组阳性细胞计数结果为 (71.23 ± 1.88) ，结果比较显示有统计学意义（ $p=0.02$ ）。6-姜酚治疗组、模型组 MPO mRNA 及蛋白表达水平分别为 2.89 ± 1.23 、 8.12 ± 0.87 和 2.04 ± 0.67 、 7.54 ± 0.55 （ $p=0.07$ ， $p=0.09$ ），6-姜酚治疗组、模型组 F4/80 mRNA 及蛋白表达水平分别为 3.23 ± 0.56 、 6.26 ± 3.76 和 2.76 ± 0.23 、 3.01 ± 1.23 （ $p=0.02$ ， $p=0.02$ ）。结论：6-姜酚可能通过调节炎症因子中的巨噬细胞表达进而促进小鼠创面愈合。

【关键词】6-姜酚；MPO；F4/80；创伤愈合

Studies on the Mechanism of 6-gingerol Regulating Inflammatory Factor to Accelerate Wound Healing

Hou Chun, Wang Susheng, Liang Gang, Zhang Zhihua, Ji Hang, Wang Pingping, Shi Ran, Li Bohui

Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120

【Abstract】Objective: To explore the effects of 6-gingerol on inflammatory related factors such as MPO, F4/80 during wound healing. Methods: Using C57BL/6 mice, we made two circular wounds with a full skin thickness excision of 8 mm in diameter on both sides of the spine. And topical injection of 6-gingerol (GIN, 30mg/kg/d) was used for drug intervention. Detection of pathological changes of wound tissues by HE staining; The mRNA and protein expression of local inflammatory factors MPO, F4/80 in wound tissues using real-time fluorescence quantitative technology and Western blotting. The expression of MPO and F4/80 in wounds was detected by immunofluorescence. Results: On postoperative days 5, the epithelial gap of 6-gingerol treatment group was $(0.87 \pm 0.51)\text{mm}$ after wounding using analysis of histology, and the epithelial gap of model group was $(1.78 \pm 1.21)\text{mm}$. The comparison of the results showed statistical significance ($p=0.04$). The MPO-positive cells in 6-gingerol treatment group were (17.33 ± 5.55) , model group MPO-positive cells were (14.22 ± 1.03) , the results showed statistical significance ($p=0.09$); F4/80-positive cells in 6-gingerol treatment group were (79.99 ± 11.11) , model group F4/80-positive cells were (71.23 ± 1.88) , The comparison of results showed statistical significance ($p=0.02$). The expression levels of MPO mRNA, protein in 6-gingerol treatment group and model group were 2.89 ± 1.23 、 8.12 ± 0.87 and 2.04 ± 0.67 、 7.54 ± 0.55 ($p=0.07$ ， $p=0.09$), The expression levels of F4/80 mRNA, protein in 6-gingerol treatment group and model group were

33.23 ± 0.56、6.26 ± 3.76 and 2.76 ± 0.23、3.01 ± 1.23(p=0.02, p=0.02)。Conclusion: 6-gingerol can accelerate the healing of mouse wounds by regulating the expression of local macrophages.

【Key words】 6-gingerol; Myeloperoxidase (MPO); F4/80; wound healing

引言

姜酚 (gingerol) 是生姜中的主要活性部分, 也是姜中辣味成分的主要成分之一。姜酚中又以 6-姜酚含量最高, 其生物活性也最强。已证实 6-姜酚具有抗氧化、强心、降压、降血脂、抗凝等^[1]多种生物学活性。有研究表明生姜中含量丰富的 6-姜酚能够治疗糖尿病引起的血管病变^[2]。生姜中 10% 姜黄素和 3% 生姜提取物一起可以促进擦伤伤口的愈合, 而这可能提供一种改进皮肤结构和功能的新方法, 并且可能减少皮肤不愈合的可能性^[3]。我们假设, 生姜中含量丰富的 6-姜酚可能参与创伤愈合的过程并起到一定的作用。

创伤愈合是一个极其复杂的过程, 涉及许多介质和细胞因子的相互作用。创伤修复的经典阶段分为三个重叠过程: 炎症阶段、新组织形成阶段和重塑阶段。受伤后会触发一系列多细胞生物修复组织和再生^[4], 其中炎症反应是创伤修复中重要的一个组成部分。炎症反应主要由组织浸润的白细胞 (如中性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞等) 来参与过程。这些炎性细胞的浸润或激活都可能对细胞的迁移、增殖、分化产生各种影响, 并影响了创伤愈合^[5]。

既往有研究表明生姜复合物可能有促进皮肤伤口愈合。目前关于 6-姜酚对伤口愈合的治疗和作用机制研究较少, 本文通过对于生姜提取物 6-姜酚的体内动物实验研究, 探究生姜提取物 6-姜酚可能通过炎症因子中的巨噬细胞影响创面愈合。

1. 实验材料

1.1 药品与试剂

生姜提取物 6-姜酚 (上海远慕生物科技有限公司); MPO, F4/80, GAPDH 引物 (上海生工生物工程股份有限公司); MPO, F4/80 抗体 (Cell Signaling Technology); 其他有机分析纯试剂 (国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 实验动物

20 只 SPF 级 8 ~ 12 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 18 ~ 23 g (广州源生医药科技有限公司, 生产合格证: SYXK 粤 2015-0150), 所有动物在温度控制的动物设施中以 12 小时的明暗周期适应至少 1 周, 并喂以标准的小鼠颗粒饲料和水。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及创面模型的制备

将 8-12 周的 C57BL/6 小鼠采用随机数字表发成分

2 组, 模型对照 (MOD) 组; 6-姜酚 (GIN, 30mg/kg/d) 局部注射治疗组, 每组 10 只。所有小鼠适应性喂养一周后, 小鼠吸入异氟醚麻醉, 在小鼠背部区域剃毛后沿着脊柱两侧分别做两个 8mm 直径的创伤面, 用半透膜覆盖创面防止其干燥。小鼠均进行局部注射, 其中模型组注射等量生理盐水。实验第 5 天取小鼠皮肤组织标本, 将小鼠左侧皮肤用于 HE 和免疫荧光检测, 右侧皮肤立即冻存于 -80℃ 用于蛋白质和 mRNA 水平表达检测。

1.3.2 伤口愈合状况测定

首先建模后第 1、3、5、7 天在相同条件下记录小鼠局部创面愈合情况, 对记录照片使用 Image J 软件统计伤口面积。以术后原始伤口面积为基准, 伤口愈合率 = 未愈合伤口面积 / 原始伤口面积 × 100%。

1.3.3 HE 染色及免疫荧光检测

根据前面实验得到的小鼠创面愈合的研究结果。重新对小鼠建模后, 连续给药, 实验第 5 天颈椎脱臼处死小鼠, 取创面及周围 1mm 皮肤组织, 固定于 4% 多聚甲醛, 制作石蜡切片, 进行 HE 染色, 光镜下观察并拍照。另取组织切片脱蜡、水化, 使用蒸锅在柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 中对样品进行抗原回收。用一抗 (MPO, F4/80) 抗体对切片进行染色、4℃ 过夜, 然后与二抗一起孵育, 并用 DAPI (40, 6-二甲基 -2-苯基咪唑) 染色。使用荧光显微镜对染色的样品成像。在 40 倍放大倍数下, 在四个随机选择的高倍镜视野 (HPF) 中对伤口边缘区域的角质形成细胞或成纤维细胞标记染色进行计数并取平均值。

1.3.4 Western Blot 检测目的蛋白

取冻存的皮肤组织样本, 丙酮清洗 3 次后于通风橱中晾干, 取适当体积组织加入含十二烷基硫酸钠的蛋白缓冲液进行组织匀浆, 4℃, 12000rpm 离心 10 min 后收集上清蛋白液。采用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度, 制作 SDS-PAGE 胶进行电泳分离蛋白质, 并将蛋白转移至 NC 膜。常温进行封闭, 4℃ 过夜孵育一抗 (MPO, F4/80, GAPDH), 第二天室温孵育二抗 1 h, 最后加入底物并曝光、显影成像。

1.3.5 Real-time PCR 检测 mRNA 表达

Trizol 法提取伤口组织总 RNA, 反转录得到 cDNA。设计合适的引物 (序列见表 1)。按照荧光定量 PCR 试剂盒 (Gibco-赛默飞) 完成扩增反应, 完成后进行溶解曲线制作。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因	Forward (5' -3')	Reverse (5' -3')
MPO	GGCTGAAGTCAGATCCAC	GGCTGAAGTCAGATCCAC
F4/80	CAACATTCTGGCGTTACCTT	CAAGGCAGTGAGCGCTGAA
GAPDH	GGCCTCCAAGGAGTAAGAAA	GCCCCTCCTGTTATTATGG

1.4 统计学分析

采用 SPSS19.0 与 Graphpad Prism 5.0 进行数据分析。计量数据以均值 $\bar{x} \pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 组间比较采用独立 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验小鼠创面愈合率

术后第 3 天开始, 小鼠创面肉眼看起来有所缩小, 部分创缘处可见结痂。术后第 5 天, 创面进一步缩小, 颜色加深, 其中 6-姜酚治疗组伤口面积显著缩小, 创面结痂覆盖, 愈合面积增大。术后 (POD) 分别在第 1, 3, 5, 7 天用数码相机对伤口拍照。用 ImageJ (NCBI) 软件测量伤口面积, 治愈率表示为: 术后伤口面积 / 原始伤口面积 $\times 100\%$, 见图 1。

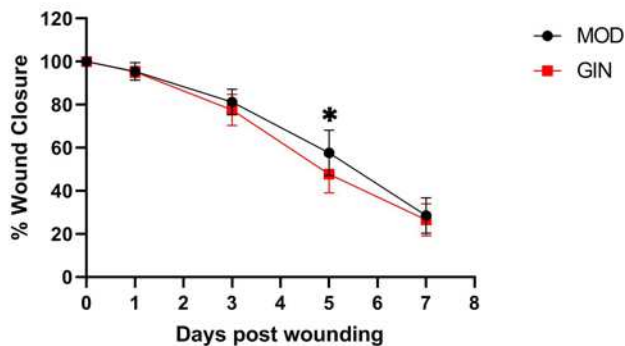


图 1

图 1 小鼠手术创伤后第 1、3、5、7 天创面皮肤组织愈合率。其中术后第 5 天显示 6-姜酚治疗组与模型组之间有统计学意义, $*p < 0.05$ 。

2.2 实验小鼠创面病理变化

实验第 5 天, 小鼠伤口组织切片染色结果见图 2。由图可见, 模型组创面肉芽组织较少, 可见少量毛细血管。与模型组相比, 6-姜酚治疗组创面肉芽组织更为丰富, 有较多成纤维细胞及新生毛细血管。

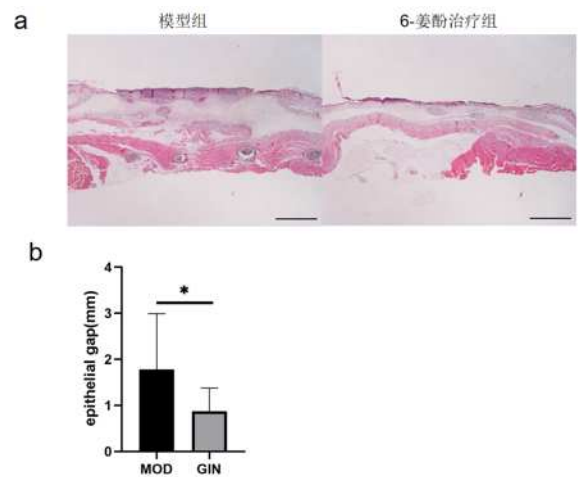


图 2

图 2 (a) 术后第 5 天模型组与 6-姜酚治疗组各自代表性的 HE 染色, scale bars = 1000 μ m。 (b) 术后第 5 天显示, 6-姜酚治疗组的上皮空隙比模型组有显著地下降 ($*p < 0.05$)。

2.3 愈合创面组织免疫组织化学变化

创伤形成第 5 天, 免疫荧光分析显示, 在皮肤结构内观察到了 MPO, F4/80 阳性标记物, 模型组创面组织中 F4/80 蛋白表达较低。6-姜酚治疗组 F4/80 蛋白较模型组显著提高。免疫荧光结果见图 3。

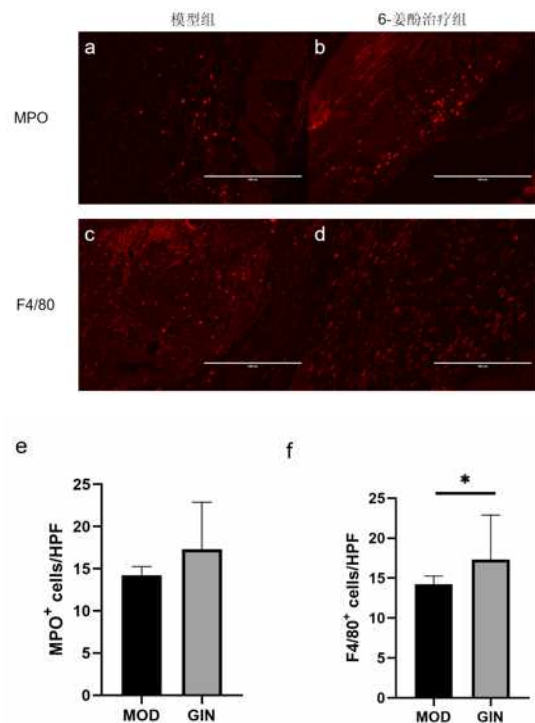


图 3

图 3 (a-b) 术后第 5 天小鼠创面皮肤组织中模型组与 6-姜酚治疗组的 MPO 免疫荧光染色, scale

bar=200 μ m。(c-d) 术后第 5 天创面组织中模型组与 6-姜酚治疗组的 F4/80 免疫荧光染色, scale bar=200 μ m。(e) 术后第 5 天显示 6-姜酚治疗组新生肉芽组织中 MPO 阳性细胞比模型组无显著变化($p=0.09$)。(f) 以 F4/80 作为阳性标记物, 术后第 5 天 6-姜酚治疗组显示出新生肉芽组织中阳性细胞数比模型组有显著的上升(* $p < 0.05$)。

2.4 创面组织中相关因子蛋白表达和 mRNA 表达与分布

创伤形成第 5 天, 与模型组相比, 6-姜酚治疗组创面组织中 F4/80 蛋白和基因表达均明显高于模型组。(蛋白表达水平见图 4, 基因表达水平见图 5)

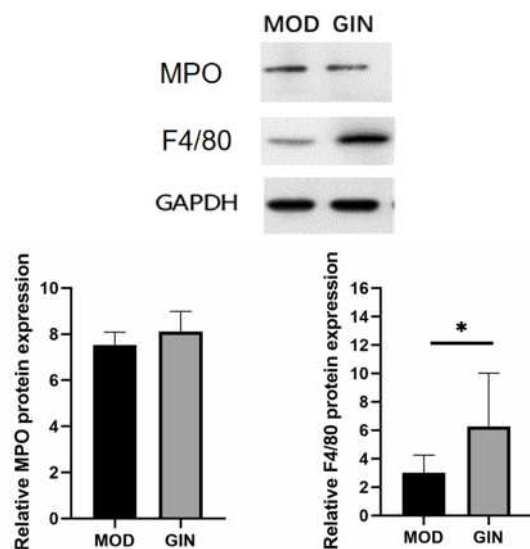


图 4

图 4 Western Blot 检测术后第 5 天创面组织中 MPO, F4/80 蛋白表达。* $p < 0.05$ 统计具有差异性。

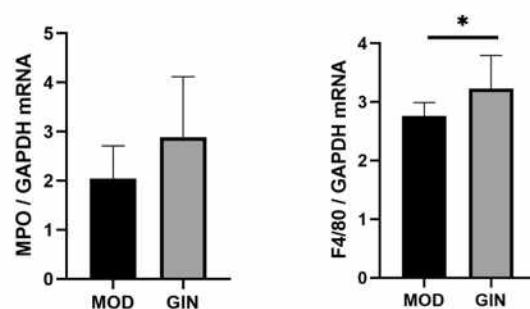


图 5

图 5 Real-time PCR 检测术后第 5 天创面皮肤组织中 MPO, F4/80 的 mRNA 表达。* $p < 0.05$ 统计具有差异性。

3 讨论

6-姜酚在抗肿瘤方面研究证明有很好的应用前景, 但 6-姜酚在创伤愈合过程中的机制仍不明确。本实验中 6-姜酚治疗组小鼠创面愈合率优于模型组, 具有促

进伤口愈合的功效。实验结果表明, 6-姜酚治疗后创面新生的肉芽组织中有更多的巨噬细胞, 且 6-姜酚治疗组中 F4/80 的蛋白质和 mRNA 表达量显著升高($p < 0.05$)。本实验结果显示 6-姜酚治疗组能够显著增加炎症因子中巨噬细胞的表达, 这对促进皮肤愈合具有一定帮助。

巨噬细胞在再生和创面愈合过程中起关键作用^[6]。传统上, 小鼠巨噬细胞分为三个表型和功能上不同的类别。M0 指幼稚 / 未刺激的巨噬细胞, M1 指促炎 / 抗菌的巨噬细胞, M2 指消炎 / 治愈 / 替代激活的巨噬细胞。在啮齿动物中, M1 巨噬细胞产生标志性杀菌分子的诱导型一氧化氮合酶 (iNos), 而 M2 巨噬细胞产生精氨酸酶。M2 过去一直被认为是巨噬细胞负责胶原蛋白沉积 / 纤维化和组织修复 / 伤口愈合^[7]。但是, 有研究表明有从伤口分离出巨噬细胞和人类 M2 巨噬细胞不产生精氨酸酶, 这些都表明体内的反应要复杂得多。

本研究初步探索了 6-姜酚在组织创伤愈合过程中的炎症分子可能的作用机制。6-姜酚治疗组 F4/80 基因及蛋白表达较模型组显著增加, 且免疫荧光检测 6-姜酚治疗显示出具有促进 F4/80 表达的作用。巨噬细胞在防御 / 炎症和重塑 / 解决 / 成熟阶段的伤口愈合处理等方面中起许多作用。伤口愈合的组织形成 / 增殖期主要取决于成纤维细胞和巨噬细胞的功能由血管生成, 胶原蛋白沉积 (纤维化) 和肉芽组织的形成。最终重塑、解决方案、伤口愈合的成熟阶段或多或少恢复原始状态组织的结构, 并通过凋亡去除不需要的血液。此阶段取决于多种细胞类型, 包括产生基质金属蛋白酶 (MMP) 的巨噬细胞锌依赖性蛋白酶家族, 参与细胞外基质消化和重塑^[8]。

综上所述, 6-姜酚对于促进组织创伤愈合效果显著, 其可能机制与 6-姜酚提高伤口组织中相关炎症因子的表达相关^[7-8]。但 6-姜酚是否通过直接靶向作用于巨噬细胞, 以及 6-姜酚的治疗剂量在临床中是否具有同样治疗效果还有待后期进一步深入研究验证。

【参考文献】

- [1] Mohammed Afroz Bakht, Mohammed F. Alajmi, Perwez Alamb. Theoretical and experimental study on lipophilicity and wound healing activity of ginger compounds[J]. Asian Pac J Trop Biomed 2014; 4(4): 329-333. doi:10.12980/APJTB.4.2014C1012.
- [2] Dan Liu, Mengqing Wu, Yi Lu. Protective effects of 6-Gingerol on vascular endothelial cell injury induced by high glucose via activation of PI3K-AKT-eNOS pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy 93 (2017) 788 - 795. doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.037.
- [3] Narasimharao Bhagavathula, Ph.D., Roscoe L. Warner, Ph.D.,

- Marissa DaSilva, B.S. .A COMBINATION OF CURCUMIN AND GINGER EXTRACT IMPROVES ABRASION WOUND HEALING IN CORTICOSTEROID DAMAGED HAIRLESS RAT SKIN[J]. Wound Repair Regen. 2009 ; 17(3): 360. doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00483.x.
- [3]Yan Sun,Rei Ogawa,Bi-Huan Xiao.Antimicrobial photodynamic therapy in skin wound healing: A systematic review of animal studies[J].Int Wound J. 2020;17:285 - 299.DOI: 10.1111/iwj.13269.
- [4]Takayuki Miura,Kazuyoshi Kawakami,EmiKanno.Dectin-2 - Mediated Signaling Leads to Delayed Skin Wound Healing through Enhanced Neutrophilic Inflammatory Response and Neutrophil Extracellular Trap Formation[J].Journal of Investigative Dermatology,Volume 139, Issue 3,March 2019, Pages 702-711.doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.015.
- [5]Tomas Castro-Dopico,Aaron Fleming,Thomas W. Dennison. GM-CSF Calibrates Macrophage Defense and Wound Healing Programs during Intestinal Infection and Inflammation[J]. Cell Reports 32, 107857, July 7, 2020.doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107857.
- [6]Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. . Origin and functions of tissue macrophages[J]. Immunity, Volume 41, Issue 1, 17 July 2014, Pages 21-35. doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013.
- [7]Daniel Elieh Ali Komi, Kelly Khomtchouk,Peter Luke Santa Maria.A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms[J].Clinical Reviews in Allergy & Immunology (2020) 58:298 - 312.doi.org/10.1007/s12016-019-08729-w.
- 基金项目：2020年度广东省中医药局科研项目（20201209）
- 通信作者：王肃生（1956-），主任医师，广州医科大学附属第一医院 整形外科。