

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.13.016

# 黑绛丹对大鼠放射性皮炎创面细胞凋亡 相关蛋白表达的影响

于明薇, 杨霖, 罗晓琴, 张怡, 张甘霖, 杨国旺, 王笑民\*

(首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010)

**摘要** 目的 观察黑绛丹治疗放射性皮炎的可能作用机制。方法 55 只大鼠采用<sup>60</sup>Co 源局部照射建立大鼠Ⅳ度放射性皮炎动物模型, 将 48 只造模成功的大鼠随机分为黑绛丹组、对照 1 组、对照 2 组、模型组, 每组 12 只, 各组分别外敷黑绛丹溶液、重组人表皮生长因子外用溶液、水溶维生素 E、生理盐水 1 ml, 每日 1 次, 连续给药 10 天。另设空白组 12 只, 予生理盐水外敷模型组大鼠同样部位。透射电镜观察各组创面组织细胞超微结构, 并检测各组创面组织细胞凋亡相关因子, 即死亡相关因子 (Fas)、死亡相关因子配体 (FasL)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (Caspase-8)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9 (Caspase-9)、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤 2 相关 X 蛋白 (Bax)、抗癌基因 p53 (p53)、细胞色素 C (Cyto-C)、凋亡诱导因子 (AIF) 蛋白表达。结果 模型组细胞核染色质浓聚, 线粒体肿胀, 粗面内质网扩张, 呈凋亡细胞改变; 黑绛丹组和对照 1 组细胞线粒体结构正常, 见胶原纤维, 桥粒丰富; 对照 2 组细胞核染色质浓缩, 粗面内质网扩张。与模型组比较, 黑绛丹组创面组织 Fas、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Cyto-C 及 AIF 表达显著降低, Bcl-2 表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。与对照 1 组比较, 黑绛丹组 Fas、Caspase-8 p53、Caspase-3、Bcl-2、Cyto-C、Bax 表达显著升高 ( $P < 0.05$  或 ( $P < 0.01$ ); 与对照 2 组比较, 黑绛丹组 Caspase-8、Bax、Caspase-9、Cyto-C、AIF 表达降低, Bcl-2、FasL 表达升高 ( $P < 0.05$  或 ( $P < 0.01$ )。结论 黑绛丹可通过抑制局部创面组织细胞凋亡、调节凋亡相关蛋白表达从而减轻大鼠放射性皮炎损伤程度。

**关键词** 放射性皮炎; 黑绛丹; 细胞凋亡; 凋亡蛋白

放疗是恶性肿瘤治疗的主要手段之一, 临床应用广泛, 虽然技术的发展、影像学的进步使放疗合理、精确的定位和剂量分布成为可能, 对机体的损伤相对减少, 但是放射线对肿瘤细胞产生治疗作用的同时也会对正常组织产生损伤, 导致放射性皮炎。前期研究显示, 以清热解毒、活血化瘀为治法的黑绛丹能加速大鼠Ⅳ度放射性皮炎创面的愈合<sup>[1]</sup>, 减轻创面组织脂质过氧化和细胞损伤, 缓解氧化应激反应<sup>[2]</sup>。氧化应激通过线粒体、死亡受体、内质网应激等途径介导细胞凋亡, 细胞凋亡及凋亡蛋白表达变化不仅与皮炎及溃疡的形成发展直接相关, 还会导致肉芽组织生长缓慢, 数量减

少, 伤口愈合缓慢<sup>[3-5]</sup>。本研究观察黑绛丹对<sup>60</sup>Co 射线照射致大鼠放射性皮炎创面细胞凋亡及相关蛋白表达的影响, 并探讨其可能作用机理。

## 1 材料

### 1.1 动物

清洁级雌性 Wistar 大鼠 67 只, 8 周龄, 体重 ( $200 \pm 20$ ) g, 由军事医学科学院动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (军) 2007-004。动物饲养环境温度 ( $25 \pm 1$ ) °C, 湿度 65%。

### 1.2 主要药品及试剂

黑绛丹由血余炭、鸡子黄按 15 : 100 比例组成, 首都医科大学附属北京中医医院制剂室提供, 批号 091118; 重组人表皮生长因子外用溶液 (深圳华生元基因工程发展有限公司, 批号: 20100602); 水溶维生素 E 治疗液 (Sigma 公司, 批号: STBB0442H9)。兔单抗半胱氨酸天冬氨酸

基金项目: 国家自然科学基金 (30973745); 北京市医院管理局青年人才培养“青苗”计划 (QML20150903); 北京市医院管理局“登峰”人才培养计划 (DFL20150901)

\* 通讯作者: wangxiaomin\_bhtem@126.com

蛋白酶 3 (Caspase-3) 抗体 (批号: GR21301-1)、兔多抗死亡相关因子 (Fas) 抗体 (批号: GR36125-1)、兔多抗 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 抗体 (批号: GR33146-1)、兔单抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (Caspase-8) 抗体 (批号: GR62143-1) 均购于 Abcam 公司; 兔多抗死亡相关因子配体 (FasL) 抗体 (批号: sc-834)、兔多抗 B 细胞淋巴瘤 2 相关 X 蛋白 (Bax, 批号: sc-526)、兔多抗抗癌基因 p53 (p53) 抗体 (批号: sc-6243) 均购于 Santa Cruz 公司; 兔单抗细胞色素 C (Cyto-C) 抗体 (批号: 4280S-3)、兔多抗凋亡诱导因子 (AIF) 抗体 (批号: 4642S-3)、兔多抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9 (Caspase-9) 抗体 (批号: 9507S-3) 均购于 Cell Signaling Technology 公司; 蛋白定量检测试剂盒 (Pierce BCA Protein Assay Kit, 批号: QK224833); 山羊抗兔二抗 (KPL 公司, 批号: 100672)。

### 1.3 主要仪器

透射电镜 (HITACHI 公司, 型号: H-7650); 小型垂直电泳仪 (Bio-Rad 公司, 电源型号: Power Pac Basic, 电泳槽型号: Mini-PROTEAN Tetra System); 双色红外荧光扫描成像系统 (Odyssey 公司, 型号: LI-COR)。

## 2 方法

### 2.1 模型建立

55 只大鼠进行Ⅳ度放射性皮炎造模。参照文献 [6] 并结合预实验结果, 将大鼠固定于特制的照射架上, 暴露左下肢, 其余部位用铅砖遮蔽, 采用军事医学科学院  $^{60}\text{Co}$  源照射, 照射剂量率 496.58 cGy/min, 照射距离 2 m, 照射剂量 6000 cGy, 照射时间 12 min 2 s, 一次照射。按国际抗癌联盟急性放射反应评分标准 [7], 48 只大鼠Ⅳ度放射性皮炎模型造模成功。

### 2.2 动物分组和给药

将 48 只造模成功的大鼠按随机数字表法分为黑绦丹组、对照 1 组、对照 2 组、模型组, 每组 12 只, 单笼饲养。黑绦丹组给予黑绦丹溶液外敷创面; 对照 1 组给予重组人表皮生长因子外用溶液外敷创面; 对照 2 组给予水溶维生素 E 治疗液外敷创面; 模型组给予生理盐水外敷创面。剩余 12 只正常大鼠设为空白组, 予生理盐水外敷模型组大鼠同样部位。各组均每天 1 次, 给药量为 1 ml, 连续给药 10 天。

### 2.3 观察指标及方法

造模后第 11 天每组随机取 6 只大鼠, 2% 戊巴比妥钠溶液 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 剪取创面及部分创周正常组织。

2.3.1 透射电镜观察创面组织细胞超微结构 创面组织切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小组织块, 立即放入新鲜预冷的 3% 戊二醛中, 4℃ 固定 2 h, 0.1 mol/L PBS 4℃ 洗 3 次, 预冷 1% 锇酸固定 30 min, 0.1 mol/L PBS 4℃ 洗 3 次, 30%、50%、70%、80%、90%、100% 梯度丙酮脱水, 环氧树脂 812 包埋, 制成 50 nm 超薄结构组织切片并载于铜网上, 透射电镜下观察。

2.3.2 Western blot 法检测创面组织细胞凋亡相关蛋白表达 切取创面组织, 将少量组织块置于 1 ~ 2 ml 匀浆器中球状部位, 用干净的剪刀将组织块尽量剪碎; 加 400  $\mu\text{l}$  裂解液于匀浆器中进行匀浆, 然后置于冰上, 5 min 后再次匀浆再置于冰上, 重复 3 ~ 5 次使组织充分破碎; 裂解 30 min 后, 将裂解液转移至 1.5 ml 离心管中, 在 4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清分装于 0.5 ml 离心管中并置于 -20℃ 保存; 按照蛋白定量检测试剂说明书进行蛋白定量。上样量 30  $\mu\text{g}$ , 操作时在同一张膜上进行目的蛋白和内参蛋白染色, 每个指标重复 3 ~ 6 次。

各组蛋白电泳上样量 30  $\mu\text{g}$ , 12% 分离胶分离蛋白样本, 转印至 PVDF 膜, 封闭后加一抗孵育过夜 (一抗条件: 兔单抗 Caspase-3, 1 : 5000; 兔多抗 Caspase-9, 1 : 5000; 兔多抗 Fas, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 兔多抗 Fas-L, 1 : 500; 兔多抗 Bcl-2, 1 : 100; 兔多抗 Bax, 1 : 500; 兔多抗 p53, 1 : 500; 兔单抗 Cyto-C, 1 : 1000; 兔多抗 AIF, 1 : 100; 兔单抗 Caspase-8, 1 : 1000; 以  $\beta$ -tubulin 或 GAPDH 为内参), 次日加入 1 : 10 000 稀释的山羊抗兔二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗 10 min 4 次, Odyssey 双色红外荧光扫描成像系统, Odyssey V3.0 软件分析, 分别以各目的蛋白条带与  $\beta$ -tubulin 或 GAPDH 条带的灰度比值作为相对表达水平。

### 2.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理, 数据采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 各组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠创面组织细胞超微结构

图 1 示, 空白组大鼠皮肤组织细胞线粒体呈圆

形或近圆形，双层膜结构清晰。模型组细胞核染色质浓聚，线粒体肿胀，粗面内质网扩张，呈凋亡细胞改变。黑绛丹组和对照 1 组细胞线粒体结构正常，见胶原纤维，桥粒丰富。对照 2 组细胞核染色质浓缩，粗面内质网扩张。

### 3.2 各组大鼠创面组织细胞凋亡相关蛋白表达比较

表 1 示，与空白组比较，模型组大鼠创面组织 Fas、FasL、Caspase-8、Caspase-3、p53、Bax、Caspase-9、Cyto-C 及 AIF 表达显著升高，Bcl-2 表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较，黑绛丹组创面组织 Fas、Caspase-3、Caspase-8、Bax、Caspase-9、Cyto-C 及 AIF 表达显著降低，Bcl-2 表达显著升高 ( $P < 0.01$ )；对照 1 组 Fas、Cyto-C、Caspase-3、Caspase-8、p53、Bax、Caspase-9 及 AIF 表达显著降低，Bcl-2 表达显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )；对照 2 组 Fas、Caspase-3、Cyto-C 表达显著降低，Caspase-8 表达显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与对照 1 组比较，黑绛丹组 Fas、Caspase-8、p53、Caspase-3、Bcl-2、Cyto-C、Bax 表达显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )；与对照 2 组比较，黑绛丹组 Caspase-8、Bax、Caspase-9、

Cyto-C、AIF 表达显著降低，Bcl-2、FasL 表达升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

### 4 讨论

中医学认为，放射线为火热毒邪，放射性皮炎的中医药治疗应以清热解毒、活血化瘀为主要法则，以达到消创生肌的目的。如兰改枝<sup>[7]</sup>运用中药双草油（紫草、甘草、冰片等）治疗 41 例鼻咽癌放疗患者放射性皮炎，韩素萍等<sup>[8]</sup>采用自拟解毒化腐方（大黄、黄连、黄芩、黄柏、芙蓉叶、泽兰叶等）治疗 128 例肿瘤患者放射性皮炎，姚惠娟等<sup>[9]</sup>采用新鲜芦荟肉汁局部外用治疗 69 例肿瘤患者放射性皮炎，付红萍等<sup>[10]</sup>采用美宝湿润烧伤膏预防乳腺癌放射性皮炎均取得了较好的疗效。黑绛丹又名血余蛋黄油，源于唐代刘禹锡的《传信适用方》鸡子乱发膏，由血余炭、鸡子黄组成，是首都医科大学附属北京中医医院院内制剂，临床应用数十年，除慢性溃疡、烧烫伤外，对放射性皮炎<sup>[11]</sup>、放射性肠炎<sup>[12]</sup>均有显著疗效。动物实验发现，黑绛丹能显著提升放射性皮炎大鼠创面皮肤组织超氧化物歧化酶（SOD）活力、丙二醛（MDA）

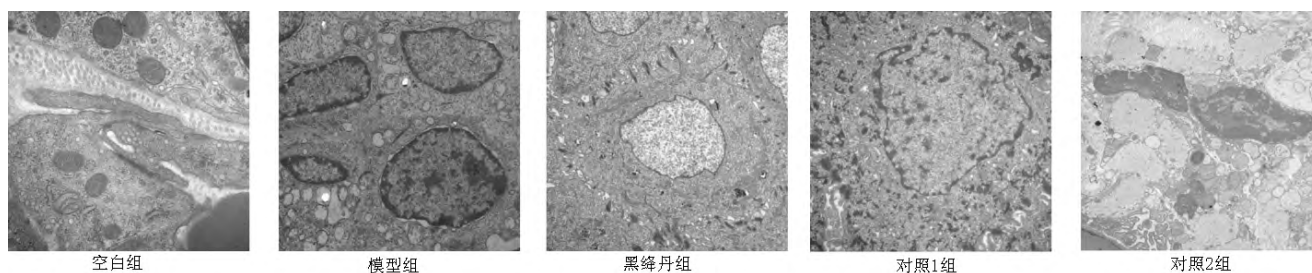


图 1 各组大鼠放射性皮炎创面组织细胞超微结构 ( $\times 10000$ )

表 1 各组大鼠放射性皮炎创面组织细胞凋亡相关蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | Fas/ $\beta$ -tubulin                     | FasL/ $\beta$ -tubulin                    | Caspase-8/GAPDH                           | Caspase-3/ $\beta$ -tubulin               | p53/GAPDH                           |
|--------|----|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|
| 空白组    | 6  | 0.201 $\pm$ 0.005                         | 0.276 $\pm$ 0.010                         | 0.102 $\pm$ 0.016                         | 0.115 $\pm$ 0.012                         | 0.094 $\pm$ 0.015                   |
| 模型组    | 6  | 0.282 $\pm$ 0.019 **                      | 0.323 $\pm$ 0.005 **                      | 0.302 $\pm$ 0.014 **                      | 0.326 $\pm$ 0.032 **                      | 0.258 $\pm$ 0.012 **                |
| 对照 1 组 | 6  | 0.216 $\pm$ 0.012 * $\Delta\Delta$        | 0.339 $\pm$ 0.019 **                      | 0.180 $\pm$ 0.008 ** $\Delta\Delta$       | 0.159 $\pm$ 0.004 * $\Delta\Delta$        | 0.215 $\pm$ 0.012 ** $\Delta$       |
| 对照 2 组 | 6  | 0.253 $\pm$ 0.002 ** $\Delta\Delta\Delta$ | 0.312 $\pm$ 0.119 ** $\Delta$             | 0.366 $\pm$ 0.023 ** $\Delta\Delta\Delta$ | 0.225 $\pm$ 0.016 ** $\Delta\Delta\Delta$ | 0.258 $\pm$ 0.034 ** $\Delta$       |
| 黑绛丹组   | 6  | 0.239 $\pm$ 0.016 ** $\Delta\Delta\Delta$ | 0.341 $\pm$ 0.009 ** $\Delta$             | 0.210 $\pm$ 0.015 ** $\Delta\Delta\Delta$ | 0.227 $\pm$ 0.025 ** $\Delta\Delta\Delta$ | 0.259 $\pm$ 0.019 ** $\Delta$       |
| 组别     | 鼠数 | Bcl-2/ $\beta$ -tubulin                   | Bax/ $\beta$ -tubulin                     | Caspase-9/GAPDH                           | Cyto-C/ $\beta$ -tubulin                  | AIF/GAPDH                           |
| 空白组    | 6  | 0.511 $\pm$ 0.016                         | 0.305 $\pm$ 0.012                         | 0.037 $\pm$ 0.003                         | 0.275 $\pm$ 0.017                         | 0.178 $\pm$ 0.122                   |
| 模型组    | 6  | 0.243 $\pm$ 0.021 **                      | 1.071 $\pm$ 0.030 **                      | 0.204 $\pm$ 0.018 **                      | 0.857 $\pm$ 0.049 **                      | 0.365 $\pm$ 0.027 **                |
| 对照 1 组 | 6  | 0.348 $\pm$ 0.028 ** $\Delta\Delta$       | 0.502 $\pm$ 0.042 ** $\Delta\Delta$       | 0.119 $\pm$ 0.011 ** $\Delta\Delta$       | 0.294 $\pm$ 0.023 $\Delta\Delta$          | 0.182 $\pm$ 0.013 $\Delta\Delta$    |
| 对照 2 组 | 6  | 0.309 $\pm$ 0.046 **                      | 1.109 $\pm$ 0.048 ** $\Delta\Delta$       | 0.204 $\pm$ 0.022 ** $\Delta\Delta$       | 0.696 $\pm$ 0.040 ** $\Delta\Delta\Delta$ | 0.384 $\pm$ 0.069 ** $\Delta\Delta$ |
| 黑绛丹组   | 6  | 0.434 $\pm$ 0.034 * $\Delta\Delta\Delta$  | 0.731 $\pm$ 0.037 ** $\Delta\Delta\Delta$ | 0.141 $\pm$ 0.009 ** $\Delta\Delta$       | 0.489 $\pm$ 0.024 ** $\Delta\Delta\Delta$ | 0.228 $\pm$ 0.018 $\Delta\Delta$    |

注：GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶； $\beta$ -tubulin，微管蛋白 2；Fas，死亡相关因子；FasL，死亡相关因子配体；Caspase-8，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8；Caspase-3，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3；p53，抗癌基因 p53；Bcl-2，B 细胞淋巴瘤 2；Bax，B 细胞淋巴瘤 2 相关 X 蛋白；Caspase-9，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9；Cyto-C，细胞色素 C；AIF，凋亡诱导因子；与空白组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与对照 1 组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与对照 2 组比较， $\# P < 0.05$ ， $\#\# P < 0.01$

含量、乳酸脱氢酶 (LDH) 活力<sup>[3]</sup>。

研究发现,放射性皮肤损伤疮面组织细胞氧化应激状态及其引起的细胞过度凋亡是皮肤溃疡发生发展的关键原因之一<sup>[3]</sup>。电离辐射引起皮肤疮面组织的氧化应激状态是细胞过度凋亡的重要因素,皮肤的水分子因辐射电解而产生大量自由基,导致细胞凋亡的主要成分是  $\text{OH}^-$ , 它具有较高的化学反应特性,与蛋白质、DNA 和脂质体反应,引起蛋白质氧化、DNA 链断裂、脂质过氧化等,而这些正是细胞凋亡的特征<sup>[3]</sup>。电离辐射致氧化应激引起的细胞凋亡主要机制为辐射引起的大量活性氧簇 (ROS) 致 DNA 损伤后,由于 DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA-PK) 的作用,激活 p53 基因,导致细胞周期阻滞、DNA 修复或诱发细胞凋亡<sup>[4]</sup>。辐射引起的大量 ROS 通过促进 Bax 基因表达,改变 Bcl-2/Bax 而诱发细胞凋亡<sup>[3]</sup>。辐射引起的大量 ROS 使细胞 Fas 表达升高, Fas 与 FasL 结合启动凋亡信号并传递而导致细胞凋亡<sup>[4]</sup>。细胞受到辐射刺激后,在 ROS 升高的同时,可检测到线粒体膜电位的下降、线粒体膜通透性转换孔的开放、细胞色素 C 的释放等促凋亡因素和线粒体基因组 (mtDNA) 氧化产物 8-羟基鸟嘌呤的生成,激活半胱氨酸蛋白酶 (Caspases), 使线粒体成为细胞凋亡信号的主要执行者<sup>[3]</sup>。辐射引起的大量 ROS 通过活化核转录因子  $\kappa\text{B}$  并诱导其表达,导致细胞凋亡<sup>[4]</sup>。当细胞受到凋亡信号刺激后, AIF 变成可溶性蛋白,从线粒体释放到细胞浆中,再通过其核定位信号序列进入细胞核内,和其他因子一起作用于染色体,使染色体凝聚和 DNA 呈大片段断裂,诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>。

本研究结果显示,与空白组相比,<sup>60</sup>Co 源照射后的模型组大鼠创面组织 Fas、FasL、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Cyto-C、p53 及 AIF 表达显著升高, Bcl-2 表达显著降低,造模后创面组织细胞超微结构及蛋白表达符合凋亡特征。黑绛丹治疗后创面组织 Fas、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Cyto-C 及 AIF 表达显著降低, Bcl-2 表达显著升高,其作用与对照药重组人表皮生长因子相似, p53、FasL 表达未见差异。电镜观察创面组织细胞超微结构显示,黑绛丹、重组人表皮生长因子治疗后细胞凋亡程度减轻,说明黑绛丹能够减轻放射性皮炎创面局部组织细胞凋亡,从而降低皮肤损伤程度。另一对照药水溶维生素 E 具有抗氧化的性质,研究发现其预处理酵母细胞能够降低强氧化剂  $\text{Cr}(\text{VI})$  对其所致毒性<sup>[8]</sup>,且其作为一种抗氧化剂具有缓解骨肉瘤 U2OS 细胞

<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线照射所致旁观者效应<sup>[9]</sup>,但水溶维生素 E 在本研究中未见明显疗效,目前研究尚未见其外用在抗氧化损伤动物实验中应用的报道,因此水溶维生素 E 作为对照药是否合理还需进一步研究。

致谢:感谢中国人民解放军军事医学科学院高亚兵老师对本研究中大鼠放射性皮炎动物模型建立方法的指导。

## 参考文献

- [1] 杨霖,于明薇,王笑民,等. 黑绛丹治疗<sup>60</sup>Co 射线照射致大鼠放射性皮炎的疗效评价 [J]. 中医杂志, 2011, 52 (23): 2040-2042.
- [2] YANG L, YU MW, WANG XM, et al. Heijiangdan ointment relieves oxidative stress from radiation dermatitis induced by <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -Ray in Mice [J]. Chin J Integr Med, 2016, 22 (2): 110.
- [3] 谷庆阳,王德文,赵梅兰,等. EGF 和 EGFR 在急性放射性皮肤溃疡组织中的表达水平与单纯伤口愈合的对比研究 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, 21 (2): 135-138.
- [4] 谷庆阳,王德文,杨志祥,等. 碱性成纤维细胞生长因子及 Bfgfr-3 在皮肤溃疡组织中的表达及对溃疡形成的影响 [J]. 中国临床康复, 2002, 4 (6): 516-517.
- [5] 谷庆阳,曹卫红,杨志祥,等. 急性放射性皮肤溃疡发生发展过程中多种生长因子及其受体表达水平和对溃疡愈合影响的研究 [J]. 军事医学科学院院刊, 2001, 25 (4): 251-254.
- [6] 马红兵,康华峰,王西京,等. 黄连、黄柏预防放射性皮肤损伤的临床观察 [J]. 中国皮肤病学杂志, 2002, 16 (6): 388-389.
- [7] 兰改枝. 中药双草油治疗放射性皮炎的临床观察 [J]. 实用医技杂志, 2006, 13 (24): 4380-4381.
- [8] 韩素萍,王强,高欣. 中药外敷治疗急性放射性皮肤损伤 128 例疗效观察 [J]. 新中医, 2008, 40 (3): 22-23.
- [9] 姚惠娟,邹丽芳,王明珠. 芦荟预防恶性肿瘤患者皮肤放射性损伤的效果观察 [J]. 中华护理杂志, 2006, 41 (4): 363-365.
- [10] 付红萍,熊娟胡,芙蓉. 美宝湿润烧伤膏预防乳腺癌放射性皮炎的临床观察 [J]. 实用中西医结合临床, 2009, 9 (3): 67-68.
- [11] 富琦,王笑民,杨杨,等. 黑绛丹治疗放射性皮炎 30 例 [J]. 中医杂志, 2007, 48 (12): 1101-1102.
- [12] 唐武军,王笑民,杨国旺,等. 血余蛋黄油灌肠治疗慢性放射性直肠炎 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (12): 228-229.
- [13] 张甘霖,李萍,王笑民,等. 黑绛丹对大鼠放射性皮炎创面细胞凋亡及相关蛋白表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31 (8): 549-552.
- [14] ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo

- [4] . J Exp Med, 1995, 181( 5) : 1661-1672.
- [5] BELKA C, JENDROSSEK V, PRUSCHY M, et al. Apoptosis modulating agents in combination with radiotherapy—current status and outlook [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 58( 2) : 542-554.
- [6] 雷义, 金文达, 陈锋. 活性氧与线粒体损伤 [J]. 南华大学学报( 医学版), 2006, 34 ( 5) : 648-649.
- [7] 刘会杰. 凋亡诱导因子的研究进展 [J]. 中国医药科学, 2012, 2( 10) : 32-33.
- [8] POLJŠAK B, GAZDAG Z, PESTI M, et al. Role of the vitamin E model compound Trolox in the prevention of Cr ( VI) -induced cellular damage [J]. Toxicological & Environmental Chemistry, 2006, 88( 1) : 141-157.
- [9] 余思邈, 海春旭, 梁欣, 等.  $^{60}\text{Co}$  辐照肿瘤细胞对未照射细胞的旁观者效应及 Trolox 的干预作用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2008, 20( 3) : 212-215.

## Impact of *Heijiang Dan* ( 黑绛丹) on the Expression of Wound Cell Apoptosis Related Protein of Rats with Radiodermatitis

YU Mingwei, YANG Lin, LUO Xiaoqin, ZHANG Yi, ZHANG Ganlin, YANG Guowang, WANG Xiaomin  
( Beijing Hospital of Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing, 100010)

**ABSTRACT Objective** To explore the possible mechanism of *Heijiang Dan* ( 黑绛丹) treating radiodermatitis. **Methods** Fifty-five rats were established IV-grade radiodermatitis animal models by  $^{60}\text{Co}$  source local irradiation. Forty-eight successfully modeled rats were randomized into *Heijiang Dan* group, control group 1, control group 2 and model group, 12 rats in each. The groups were externally applied *Heijiang Dan* solution, recombinant human epidermal growth factor topical solution, water soluble vitamin E and normal saline 1 ml respectively, once every day for 10 days. Besides, the blank group was established with 12 rats, which was externally applied normal saline at the same location as the model group rats. Ultrastructure of wound tissue cells in all groups were examined by transmission electron microscope. The protein expressions of wound tissue cell apoptosis related factors in all groups were detected, including death related factor ( Fas ), death associated factor ligand ( FasL ), cysteine-aspartate protease 3 ( Caspase-3 ), cysteine-aspartate protease 8 ( Caspase-8 ), cysteine-aspartate protease 9 ( Caspase-9 ), B cell lymphoma 2 ( Bcl-2 ), B cell lymphoma 2 related X protein ( Bax ), antioncogene p53 ( p53 ), cytochrome C ( Cyto-C ) and apoptosis inducing factor ( AIF ). **Results** In the model group, nuclear chromatin concentrated, with swelling mitochondrial and rough endoplasmic reticulum expansion, which showed apoptotic cell change. In the *Heijiang Dan* group and the control 1 group, the structure of cell mitochondria was normal, with collagenous fiber and rich in desmosomes. In the control 2 group, nuclear chromatin concentrated, with rough endoplasmic reticulum expansion. Compared with the model group, the expressions of wound tissue Fas, Bax, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Cyto-C and AIF in the *Heijiang Dan* group decreased, while Bcl-2 expression increased (  $P < 0.01$  ). Compared with the control 1 group, the expressions of Fas, Caspase-8, p53, Caspase-3, Bcl-2, Cyto-C and Bax in the *Heijiang Dan* group increased (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  ). Compared with the control 2 group, the expressions of Caspase-8, Bax, Caspase-9, Cyto-C and AIF in the *Heijiang Dan* group decreased, while Bcl-2 and FasL expressions increased (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  ). **Conclusion** *Heijiang Dan* might reduce the extent of rat radiodermatitis damage by inhibiting local wound tissue apoptosis and regulating the expressions of apoptosis related protein.

**Keywords** radiodermatitis; *Heijiang Dan*; apoptosis; apoptosis protein

( 收稿日期: 2017-01-22; 修回日期: 2017-03-15)

编辑: 王利菊

## 石家庄市桥西区炎黄针灸推拿专修学校

本校 1995 年成立, 是一所理论与实践相结合的全日制针灸推拿专修学校。现招生专业如下。

一、中医针灸推拿专修班: 2 月 19 日、7 月 1 日、11 月 1 日开学。开学、循环授课可随到随学, 一期学不会下学期免费学习。讲授中医基础理论、中医诊断学、解剖学、针灸学、推拿学、特色课程如: 腹诊与腹针、眼诊与眼针、锋针、舌三针、头皮针、梅花针的临床应用及高血压、半身不遂、心脏病、肠胃炎、妇科病、更年期综合征等疑难病症的缓解与治疗。

二、另开设高级针灸师进修班、高级按摩师培训班、小儿推拿班、中医正骨培训班; 经考试合格颁发证书。

招生电话: 0311-85876145、13131169949、15631134533

网址: WWW.YHZHENJIU.COM