

熊果酸对瘢痕成纤维细胞生物学功能 及TGF- β 1/Smads通路的影响

李大鹏* 刘菲菲 董利焕 王梦楠 靳楷 胡太平 王璞

(邯郸市中心医院, 医学美容科, 邯郸 056000)

摘要 该文探讨了熊果酸对瘢痕成纤维细胞生物学功能及转化生长因子 β 1(TGF- β 1)/Smads通路的影响。取对数生长期的增生性瘢痕成纤维细胞(HSFB), 用不同剂量熊果酸(0、10、20、30、40、50、60 μ mol/L)干预HSFB后, MTT法确定细胞存活率; 将HSFB分为对照组(0 μ mol/L熊果酸)、L-熊果酸组(20 μ mol/L熊果酸)、M-熊果酸组(40 μ mol/L熊果酸)、H-熊果酸组(60 μ mol/L熊果酸)、H-熊果酸+SRI-011381组(60 μ mol/L熊果酸+10 μ mol/L TGF- β 1/Smads通路激活剂SRI-011381)。流式细胞术和TUNEL染色测定细胞凋亡情况; Transwell实验测定细胞迁移和侵袭能力; Western blot测定各组中TGF- β 1/Smads通路蛋白(TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3、Smad4)、纤维化蛋白(Col 1A1、Col 3A1、 α -SMA)及凋亡蛋白(Bax、Bcl-2)的表达情况。结果显示, 随着熊果酸浓度的增加, HSFB存活率逐渐降低, 且呈剂量依赖性($P<0.05$)。与0 μ mol/L熊果酸对比, 10、20、30、40、50、60 μ mol/L熊果酸处理后细胞存活率降低, 差异显著($P<0.05$)。与对照组对比, L-熊果酸组、M-熊果酸组和H-熊果酸组的HSFB凋亡率、TUNEL阳性细胞比例、Bax蛋白表达水平均升高($P<0.05$), 迁移细胞数量、侵袭细胞数量以及纤维化标记蛋白(Col 1A1、Col 3A1、 α -SMA)、Bcl-2、TGF- β 1/Smads通路相关蛋白表达水平均降低($P<0.05$), 且熊果酸高剂量相比于低剂量变化程度更显著($P<0.05$); 与H-熊果酸组对比, H-熊果酸+SRI-011381组的HSFB凋亡率、TUNEL阳性细胞比例、Bax蛋白表达水平均降低($P<0.05$), 迁移细胞数量、侵袭细胞数量以及纤维化标记蛋白(Col 1A1、Col 3A1、 α -SMA)、Bcl-2、TGF- β 1/Smads通路相关蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。由此提示, 熊果酸可有效抑制HSFB的增殖、侵袭、迁移和纤维化, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与抑制TGF- β 1/Smads信号通路激活有关。

关键词 增生性瘢痕; 成纤维细胞; 转化生长因子 β 1(TGF- β 1)/Smads; 生物学功能

Effects of Ursolic Acid on the Biological Function of Scar Fibroblasts and the TGF- β 1/Smads Pathway

LI Dapeng*, LIU Feifei, DONG Lihuan, WANG Mengnan, JIN Kai, HU Taiping, WANG Pu

(Department of Medical Cosmetology, Handan Central Hospital, Handan 056000, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the effects of ursolic acid on the biological function of scar fibroblasts and the TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1)/Smads pathway. By culture with different doses of ursolic acid (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ mol/L), cell survival rate of HSFB (hypertrophic scar fibroblast) in logarithmic growth phase was firstly detected by MTT methods. After that, five experimental groups, named as control group (without ursolic acid adding in culture medium), L-ursolic acid group (with 20 μ mol/L ursolic acid adding in culture medium), M-ursolic acid group (with 40 μ mol/L ursolic acid adding in culture medium), H-ursolic acid group

收稿日期: 2024-07-08

接受日期: 2024-10-10

*通信作者。Tel: 15831594788, E-mail: t87lbm@163.com

Received: July 8, 2024

Accepted: October 10, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-15831594788, E-mail: t87lbm@163.com

(with 60 $\mu\text{mol/L}$ ursolic acid adding in culture medium), H-ursolic acid+SRI-011381 group (with 60 $\mu\text{mol/L}$ ursolic acid and 10 $\mu\text{mol/L}$ TGF- β 1/Smads pathway activator SRI-011381), were selected for the further study. Apoptosis of HSFB when culture in the above groups was determined by flow cytometry and TUNEL staining. Transwell experiment was applied to measure migration and invasion abilities of HSFB. Western blot was applied to determine the expression of TGF- β 1/Smads pathway proteins (TGF- β 1, p-Smad2, p-Smad3, Smad4), fibrotic proteins (Col 1A1, Col 3A1, α -SMA), and apoptotic proteins (Bax, Bcl-2) in each group. The result showed that with the concentration of ursolic acid increased in culture medium, the survival rate of HSFB gradually decreased in a dose-dependent manner ($P<0.05$). As compared with the blank control, the apoptosis rate, proportion of TUNEL positive cells and expression of Bax protein in HSFB in the L-ursolic acid group, M-ursolic acid group, and H-ursolic acid group were all increased ($P<0.05$), while the numbers of migrating cells, invading cells, and the expression of fibrotic marker proteins (Col 1A1, Col 3A1, α -SMA, Bcl-2, TGF- β 1/Smads pathway related proteins) of HSFB were all reduced on the contrary ($P<0.05$). Those degree of change in H-ursolic acid group was more obvious than that of L-ursolic acid group ($P<0.05$). Furthermore, the apoptosis rate, proportion of TUNEL positive cells and expression of Bax protein of HSFB in H-ursolic acid+SRI-011381 group were reduced ($P<0.05$), while the numbers of migrating cells, invading cells, and the protein expression of fibrotic marker proteins (Col 1A1, Col 3A1, α -SMA), Bcl-2, TGF- β 1/Smads pathway related proteins in H-ursolic acid+SRI-011381 group were increased ($P<0.05$), as compared with that of the H-ursolic acid group. As a reminder, ursolic acid can effectively inhibit the proliferation, invasion, migration, and fibrosis (Col 1A1, Col 3A1, α -SMA) of HSFB, and further induce HSFB's apoptosis. All the biological processes of HSFB that mediated by ursolic acid may be related to inhibiting the activation of TGF- β 1/Smads signaling pathway.

Keywords hypertrophic scars; fibroblasts; TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1)/Smads; biological function

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是皮肤受损后皮肤组织修复异常形成的纤维化疾病,常表现为创面局部异常增生,皮肤组织增厚突出、发红、硬化、组织疼痛、皮肤瘙痒等,甚至皮肤挛缩致使关节活动受限,严重影响外观、引起功能障碍^[1-2]。HS组织学特点为增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblast, HSFB)大量增殖、细胞外基质过度沉积。目前,临床治疗瘢痕主要通过手术、激光、激素疗法等,然而这些方法疗效个体差异较大、易复发,且治疗效果并不理想^[3]。因此,深入探究HS发病机制,开发新的、更优的治疗方法是十分有必要的。近年来研究发现,中药及其提取物在抑制HS形成方面存在巨大潜力,可通过抑制纤维细胞生长与迁移,进而发挥抑制HS的作用^[4]。熊果酸又称乌索酸,是一种天然的五环萜类羧酸,在熊果、沙棘、女贞子、车前草等植物中广泛存在。研究显示,熊果酸是转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的拮抗剂,可通过调控多条信号通路影响纤维化进程,其机制与TGF- β 1信号通路密切相关^[5-6]。

然而熊果酸是否影响纤维细胞的生物学功能、参与HS的纤维化过程目前尚不明确。TGF- β 1是介导纤维化的关键介质,可促进多种组织发生纤维化,其通过激活Smads信号进而在纤维化进程中发挥重要作用^[7]。但熊果酸能否通过调控TGF- β 1/Smads信号通路进而影响HSFB生物学功能尚未可知。基于此,本研究探讨熊果酸对HSFB生物学功能的影响,阐明其对TGF- β 1/Smads信号通路的调节功能。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

HSFB购于美国ATCC;熊果酸(纯度 $\geq 99.8\%$)购于长沙麓园科技有限公司;TGF- β 1/Smads通路激活剂SRI-011381购于北京百奥莱博科技有限公司;DMEM培养基与胎牛血清购于美国Hyclone公司;胰蛋白酶购于美国Gibco公司;四噻唑蓝(methylthiazolium, MTT)购于美国Amresco公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、TUNEL检测试剂盒购于上海碧云天生物有限公司;4,6-二脒基-2-苯基

吡啶(4, 6-diaminyl-2-phenylindole, DAPI)、Transwell小室购于美国Corning公司;全蛋白提取试剂盒购于美国Invitrogen公司;碘化丙啶(propidium iodide, PI)购于北京索莱宝科技有限公司;基质胶购于美国BD公司;PVDF膜与ECL发光液购于美国Millipore公司;TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3、Smad4、Bax、Bcl-2、Col 1A1、Col 3A1、 α -SMA抗体购于英国Abcam公司。DNM-9606酶标分析仪由北京朗普新技术有限公司提供;FACS Calibur流式细胞仪由美国BD公司提供。

1.2 方法

1.2.1 熊果酸浓度筛选及分组 细胞培养:HSFB采用含10%胎牛血清的DMEM培养基(5% CO₂、37 °C)培养,每2天一换液。当HSFB密度超80%时进行细胞传代,取3~5代对数期细胞,制成单细胞悬液,将其接种于96孔板(2×10³个/孔)中,培养24 h至细胞贴壁后加入不同浓度的熊果酸(0、10、20、30、40、50、60 μ mol/L)^[8]干预HSFB,48 h后加入MTT溶液20 μ L,37 °C孵育4 h后弃上清,再向各孔加入150 μ L DMSO,摇床振荡10 min(室温),结晶溶解后测定490 nm处吸光度(*D*)值,计算存活率,筛选熊果酸浓度。

细胞实验分组:根据不同浓度熊果酸培养HSFB后的存活率结果,选定添加20 μ mol/L、40 μ mol/L、60 μ mol/L熊果酸的细胞培养基设置为L-熊果酸组、M-熊果酸组、H-熊果酸组;添加60 μ mol/L熊果酸与10 μ mol/L TGF- β 1/Smads通路激活剂(SRI-011381^[9])的细胞培养基设置为H-熊果酸+SRI-011381组;同时将不添加熊果酸与SRI-011381的细胞培养基设置为对照组(Control group)。以上分组用于系统性探讨熊果酸对HSFB生物学功能以及TGF- β 1/Smads通路的影响。

1.2.2 流式细胞术和TUNEL染色检测细胞凋亡情况 取各组处理后的HSFB,预冷PBS溶液洗涤细胞,随后加入PBS结合缓冲液重悬细胞,调整细胞浓度,再添加5 μ L Annexin V-FITC,混匀后室温避光孵育10 min,最后加入5 μ L PI继续室温孵育5 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

用含有0.5% Triton X-100的PBS在室温下孵育5 min后,用含有末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)和荧光剂的TUNEL检测试剂盒在37 °C黑暗中孵育60 min。用激光共聚焦显微镜拍摄荧光。红色荧光标记的细胞为凋亡的成纤维细胞。通过细胞核染料DAPI染色,

测定HSFB细胞总数。以TUNEL染色细胞数与DAPI染色细胞数的百分比表示阳性细胞比例。

1.2.3 Transwell小室测定HSFB迁移和侵袭情况 侵袭实验:Transwell小室中加入终浓度为1 mg/mL的基质胶,取各组处理后的HSFB,使用无血清培养基重悬细胞制成1×10⁴/mL的细胞悬液,取100 μ L细胞悬液接种于Transwell小室上室,下室加500 μ L FBS(5%)培养基,培养箱中培养24 h后取出小室,依次进行多聚甲醇室温固定30 min,0.1%结晶紫室温下染色20 min,随后进行光学显微镜拍照,计数侵袭细胞数。

迁移实验:除上室中不加基质胶外,其余步骤同侵袭实验。

1.2.4 Western blot检测TGF- β 1/Smads通路蛋白、纤维化蛋白及凋亡蛋白表达情况 RIPA裂解液裂解各组处理后的HSFB,12 000 r/min、4 °C离心10 min取上清得到总蛋白,BCA法定量蛋白浓度。取等量的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分离蛋白,转膜后用脱脂牛奶室温封闭2 h,加入一抗(1:1 000):TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3、Smad4、Col 1A1、Col 3A1、 α -SMA、Bax、Bcl-2、 β -actin于4 °C过夜,洗膜,加入二抗(1:5 000)室温孵育2 h后,ECL法显色, β -actin为内参,ImageJ v1.8.0.345软件分析蛋白条带灰度值。

1.3 统计方法

采用SPSS 26.0软件对数据统计分析处理,Graphpad Prism 5作图。正态分布计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间对比行单因素方差分析,组间两两对比进行SNK-*q*检验。*P*<0.05表示差异有显著性意义。

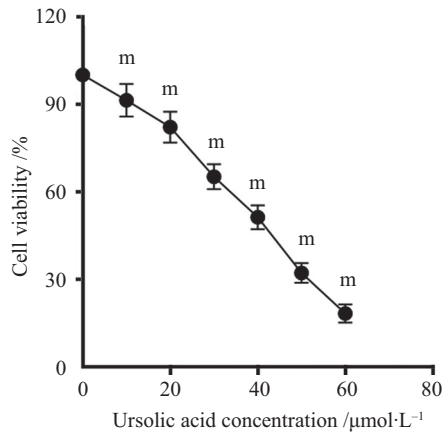
2 结果

2.1 熊果酸对HSFB存活率的影响

随着熊果酸浓度增加,HSFB细胞存活率逐渐降低,呈剂量依赖性(*P*<0.05),与0 μ mol/L熊果酸比较,10、20、30、40、50、60 μ mol/L熊果酸处理后细胞存活率显著降低(*P*<0.05,图1)。计算出熊果酸对HSFB的半抑制浓度(IC₅₀)是37.79 μ mol/L,遂选取熊果酸浓度为20、40、60 μ mol/L进行后续研究。

2.2 熊果酸对HSFB凋亡的影响

与对照组对比,L-熊果酸组、M-熊果酸组、H-熊果酸组的HSFB凋亡率和TUNEL阳性细胞比例依次升高,且呈熊果酸浓度依赖性变化(*P*<0.05);与H-



^m $P < 0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 比较。

^m $P < 0.05$ compared with 0 $\mu\text{mol/L}$.

图1 不同浓度熊果酸对HSFB存活率的影响

Fig.1 Effect of ursolic acid at different concentrations on survival rate of HSFB

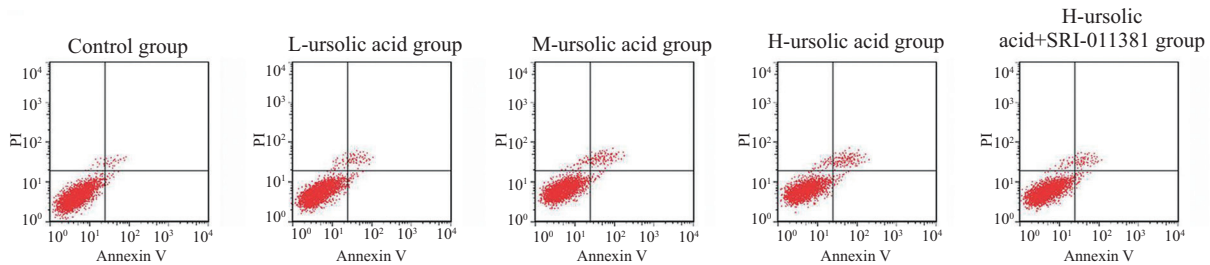


图2 流式细胞术测定各组HSFB凋亡率

Fig.2 The apoptosis rate of HSFB in each group was determined by flow cytometry

熊果酸组对比, H-熊果酸+SRI-011381组凋亡率和TUNEL阳性细胞比例降低($P < 0.05$), 见图2~图4。

2.3 熊果酸对HSFB迁移、侵袭的影响

与对照组对比, L-熊果酸组、M-熊果酸组、H-熊果酸组HSFB迁移、侵袭细胞数量均减少, 且呈熊果酸浓度依赖性变化($P < 0.05$); 与H-熊果酸组对比, H-熊果酸+SRI-011381组迁移、侵袭细胞数量均升高($P < 0.05$), 见图5~图7。

2.4 熊果酸对HSFB纤维化标记蛋白及凋亡蛋白的影响

与对照组对比, L-熊果酸组、M-熊果酸组、H-熊果酸组HSFB纤维化标记蛋白Col 1A1、Col 3A1、 α -SMA及凋亡蛋白Bcl-2表达水平均降低, Bax蛋白表达水平升高, 且变化趋势均呈熊果酸浓度依赖性($P < 0.05$); 与H-熊果酸组对比, H-熊果酸+SRI-011381组HSFB纤维化标记蛋白及凋亡蛋白变化趋势与上述相反, 见图8和图9。

2.5 各组细胞中TGF- β 1/Smads通路相关蛋白表达

与对照组对比, L-熊果酸组、M-熊果酸组、H-

熊果酸组HSFB中TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3、Smad4蛋白表达水平均降低, 且变化趋势均呈熊果酸浓度依赖性($P < 0.05$); 与H-熊果酸组对比, H-熊果酸+SRI-011381组TGF- β 1/Smads通路相关蛋白变化趋势与上述相反, 见图10和图11。

3 讨论

HS是由皮肤组织损伤或受刺激后伤口不正常愈合而引起的, HS是一种纤维增生性皮肤病, 可能会有疼痛、灼热、瘙痒等症状, 不仅影响患者美观, 还会诱发功能障碍, 严重影响生活质量及身心健康^[10-11]。目前, 临床治疗HS手段多样, 通常包括手术切除、激光治疗、局部注射激素类药物等, 然而手术切除复发率高, 且切除瘢痕后可能会因缝合张力过大致使HS再次产生, 激素类药物的长期使用可能会引起患者不良反应, 较难获得理想的治疗效果^[12-13]。因此, 探索新型治疗HS药物是皮肤美容行业亟需解决的问题。

现阶段, 随着中医药的不断发展, 许多中药在

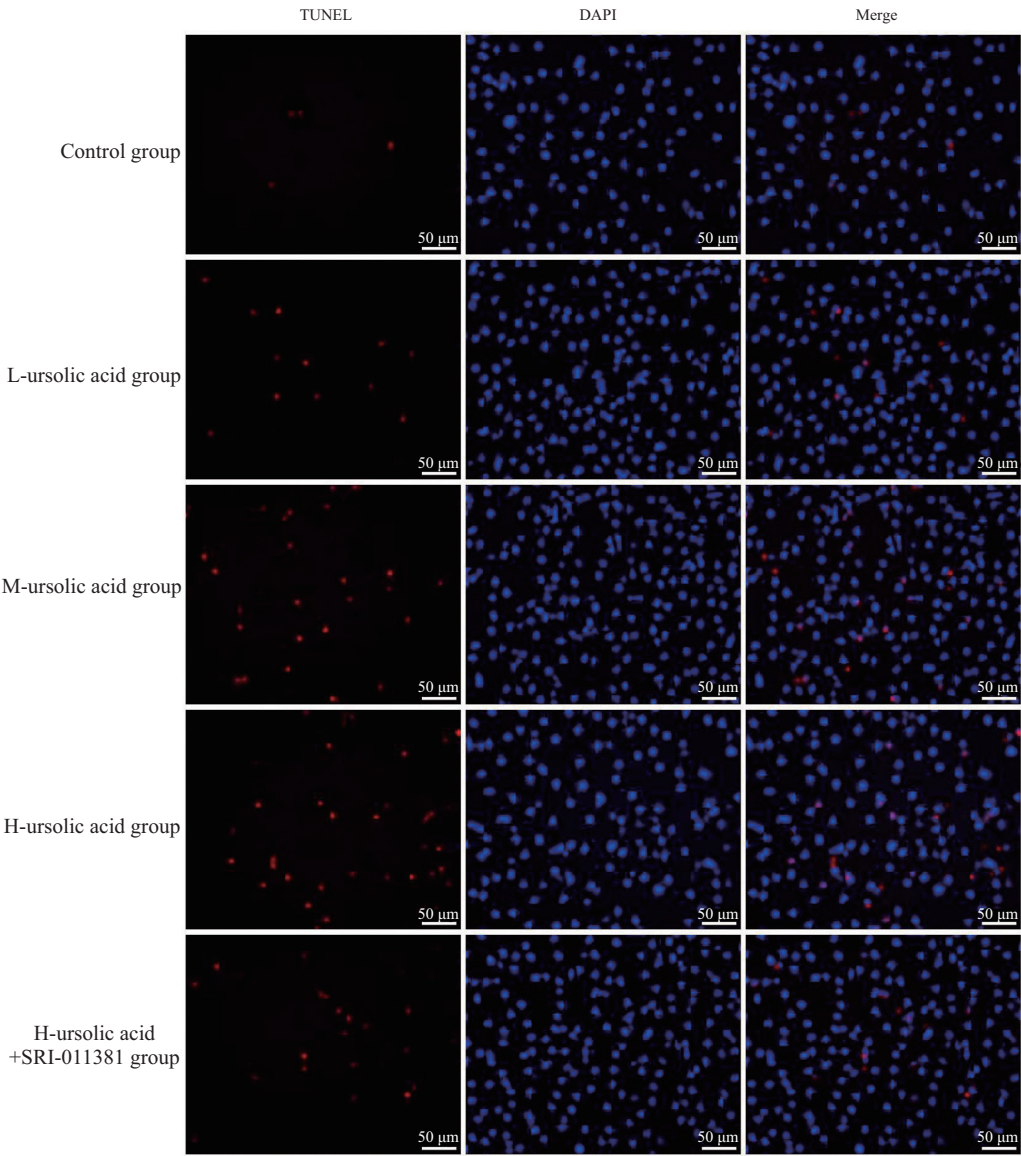
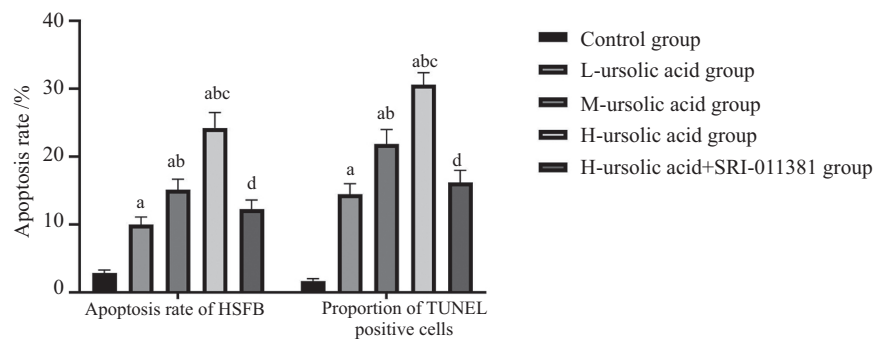


图3 TUNEL染色测定各组HSFB凋亡情况
Fig.3 The apoptosis of HSFb was determined by TUNEL staining



^a*P*<0.05, 与对照组相比; ^b*P*<0.05, 与L-熊果酸组相比; ^c*P*<0.05, 与M-熊果酸组相比; ^d*P*<0.05, 与H-熊果酸组对比。
^a*P*<0.05 compared with control group; ^b*P*<0.05 compared with L-ursolic acid group; ^c*P*<0.05 compared with M-ursolic acid group; ^d*P*<0.05 compared with H-ursolic acid group.

图4 各组HSFB凋亡率对比
Fig.4 Comparison of HSFb apoptosis rate among all groups

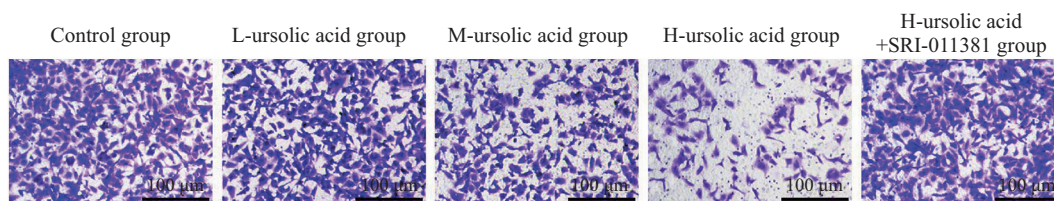


图5 Transwell观察HSFB迁移情况
Fig.5 HSFB migration observed by Transwell

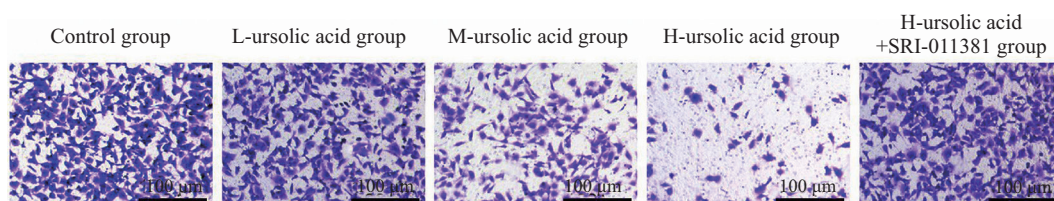
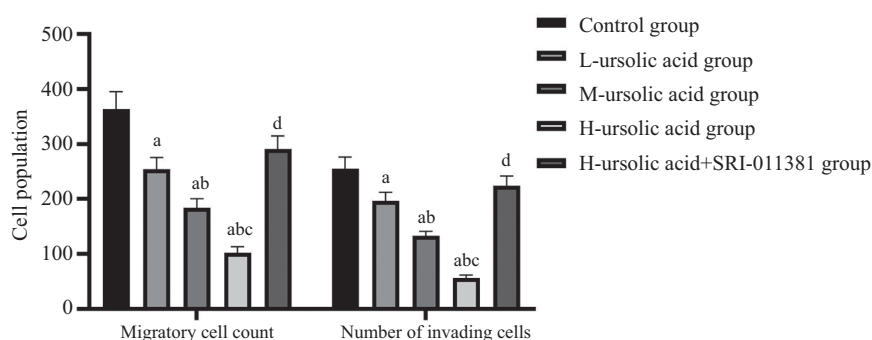


图6 Transwell观察HSFB侵袭情况
Fig.6 HSFB invasion observed by Transwell



^a $P < 0.05$, 与对照组相比; ^b $P < 0.05$, 与L-熊果酸组相比; ^c $P < 0.05$, 与M-熊果酸组相比; ^d $P < 0.05$, 与H-熊果酸组对比。

^a $P < 0.05$ compared with control group; ^b $P < 0.05$ compared with L-ursolic acid group; ^c $P < 0.05$ compared with M-ursolic acid group; ^d $P < 0.05$ compared with H-ursolic acid group.

图7 熊果酸对HSFB迁移、侵袭的影响

Fig.7 Effects of ursolic acid on migration and invasion of HSFB

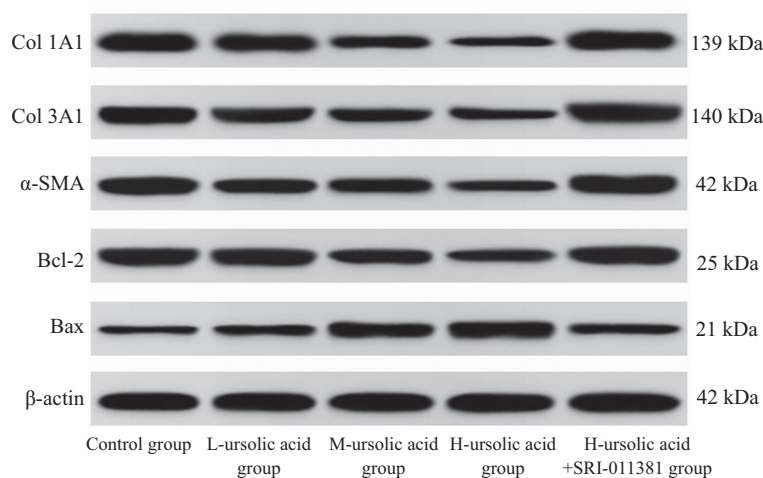
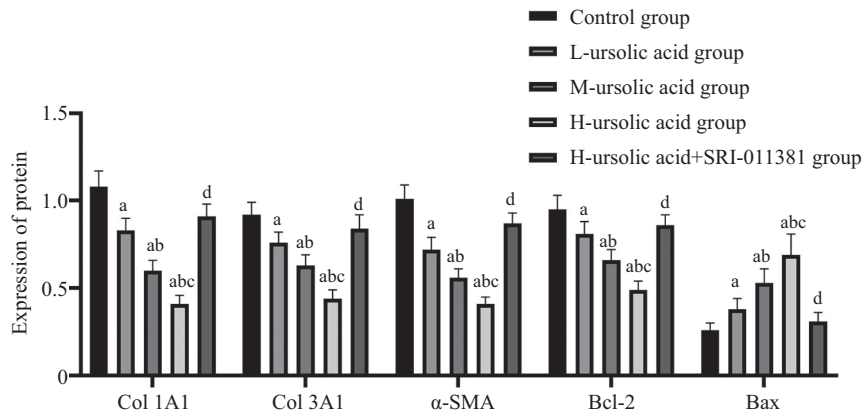


图8 Western blot检测HSFB纤维化标记蛋白及凋亡蛋白表达

Fig.8 Western blot analysis of HSFB fibrosis-labeled protein and apoptotic protein expression



^a $P<0.05$, 与对照组相比; ^b $P<0.05$, 与L-熊果酸组相比; ^c $P<0.05$, 与M-熊果酸组相比; ^d $P<0.05$, 与H-熊果酸组对比。
^a $P<0.05$ compared with control group; ^b $P<0.05$ compared with L-ursolic acid group; ^c $P<0.05$ compared with M-ursolic acid group; ^d $P<0.05$ compared with H-ursolic acid group.

图9 熊果酸对HSFB纤维化标记蛋白及凋亡蛋白的影响

Fig.9 Effects of ursolic acid on fibrotic marker proteins and apoptosis proteins of HSFB

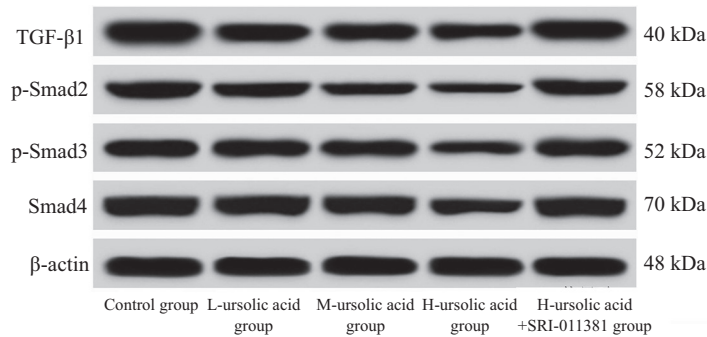
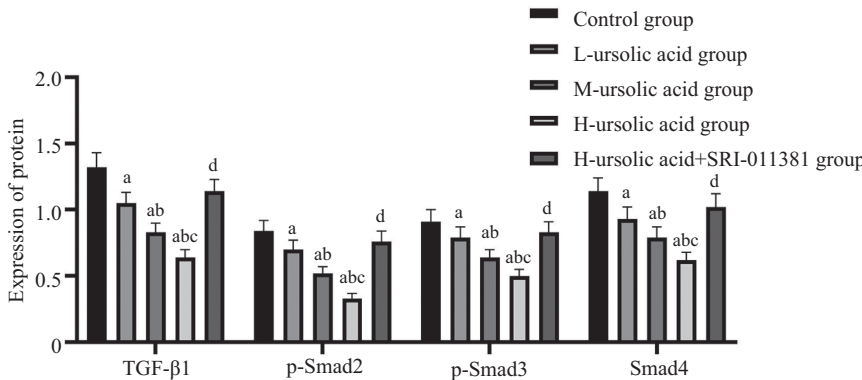


图10 Western blot检测TGF-β1/Smads通路相关蛋白表达

Fig.10 Western blot analysis of TGF-β1/Smads pathway-related protein expression



^a $P<0.05$, 与对照组相比; ^b $P<0.05$, 与L-熊果酸组相比; ^c $P<0.05$, 与M-熊果酸组相比; ^d $P<0.05$, 与H-熊果酸组对比。
^a $P<0.05$ compared with control group; ^b $P<0.05$ compared with L-ursolic acid group; ^c $P<0.05$ compared with M-ursolic acid group; ^d $P<0.05$ compared with H-ursolic acid group.

图11 各组细胞中TGF-β1/Smads通路相关蛋白表达

Fig.11 Expression of TGF-β1/Smads pathway-related proteins in cells of each group

皮肤病及美容应用中具有显著效果及广阔前景,如山奈酚可通过抑制蛋白激酶B(Akt)的磷酸化水平进而抑制HSFB增殖、迁移,阻滞细胞周期、促进其

凋亡^[14]。白藜芦醇可通过下调mTOR信号通路的关键分子mTOR和Akt表达进而抑制病理性瘢痕成纤维细胞增殖^[15]。熊果酸是一种传统中药,来源于药

用植物的浆果、叶子、花朵和果实,具有抗炎、神经保护、抗氧化、抗癌等特性,可用于治疗多种癌症、炎症性疾病、糖尿病等^[16]。近年来,研究显示熊果酸除上述作用外,还具有抗纤维化等能力,如熊果酸可通过抑制还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4)/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3炎症小体通路,进而逆转肝纤维化^[17]。HS也是由成纤维细胞和肌成纤维细胞产生过量的细胞外基质成分积累所致, α -SMA作为纤维细胞收缩功能蛋白,可转导收缩信号,在伤口愈合和组织修复过程中,产生大量肌成纤维细胞, α -SMA水平升高,进而刺激组织中Col 1A1、Col 3A1过量分泌,促进HS形成^[18]。因此抑制成纤维细胞转分化是治疗HS的关键。ZHOU等^[19]研究显示,熊果酸可有效抑制 α -SMA、Col 1A1、Col 3A1表达,改善人成纤维细胞过度增殖、迁移和胶原沉积。本研究中,熊果酸可有效抑制HSFB增殖、促进凋亡、改善过度侵袭和迁移、减少纤维化标记蛋白及凋亡蛋白表达,且作用效果呈熊果酸剂量依赖性,提示熊果酸可抑制HSFB生长、分化,有望用于HS治疗。

在促纤维化过程中,TGF- β 1被公认为是纤维化的核心介质,当组织受损时TGF- β 1表达量增多,通过激活TGF- β 1/Smads信号通路促进胶原合成ECM标志物的表达;此外,激活TGF- β 1/Smads信号通路可使TGF- β 1、Smad磷酸化水平升高,促进成纤维细胞增殖分化^[20]。现已有研究显示,TGF- β 1/Smads通路是伤口愈合和组织修复重要调控机制,TGF- β 1/Smads通路过度激活可促进HS的形成^[21]。近年来研究显示,清络饮通过调控TGF- β 1/Smads信号通路对大鼠肺纤维化起到一定的防治作用^[22]。熊果酸可通过影响TGF- β 1/Smads信号通路转导抑制细胞增殖,改善大鼠肾脏纤维化状态^[23]。但熊果酸是否抑制HSFB中TGF- β 1/Smads信号通路目前尚不明确。本研究中测定了不同浓度熊果酸干预下HSFB中TGF- β 1/Smads通路相关蛋白表达水平,结果显示HSFB中TGF- β 1、p-Smad2、p-Smad3、Smad4表达水平均降低,且随着熊果酸浓度的增加,上述蛋白水平逐渐降低。向H-熊果酸组加入TGF- β 1/Smads通路激活剂,可逆转熊果酸对HSFB的影响,促进HSFB的增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡。TGF- β 为最主要的促纤维化因子,Smad是TGF- β 1通路的下游分子,TGF- β 1与细胞

膜上TGF- β 1受体结合可促使Smad2、Smad3的磷酸化,p-Smad2、p-Smad3水平升高,既往研究显示,熊果酸为TGF- β 1的拮抗剂,给予熊果酸可有效减少p-Smad2、p-Smad3表达水平,进一步证实了本研究结论^[24]。由此推测熊果酸可能通过抑制TGF- β 1/Smads信号通路的激活进而影响HSFB的生物学行为。

综上所述,熊果酸可能通过抑制TGF- β 1/Smads信号通路激活,抑制HSFB细胞增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡,为临床治疗HS提供参考。然而此次实验仅进行了体外实验,研究存在不足,未来还需进行体内实验,以期更好、更安全地应用熊果酸。

参考文献 (References)

- [1] MENCHACA A D, STYLE C C, OLUTOYE O O. A review of hypertrophic scar and keloid treatment and prevention in the pediatric population-where are we now [J]? *Adv Wound Care*, 2022, 11(7): 255-79.
- [2] LIMANDJAJA G C, NIESSEN F B, SCHEPER R J, et al. The keloid disorder: heterogeneity, histopathology, mechanisms and models [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(3): 360-85.
- [3] 唐玉婷, 贺茜, 万瑀, 等. 紫草素调控MicroRNA-382-5p抑制人增生性瘢痕成纤维细胞纤维化[J]. 中国组织工程研究(TANG Y T, HE Q, WAN Y, et al. Shikonin inhibits fibrosis of human hypertrophic scar fibroblasts via MicroRNA-382-5p [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2023, 27(35): 5642-8.
- [4] 付志强, 白泽明, 陶凯, 等. 白藜芦醇通过抑制Egr1的表达抑制增生性瘢痕成纤维细胞的生长和迁移[J]. 中国美容整形外科杂志(FU Z Q, BAI Z M, TAO K, et al. Resveratrol inhibits the growth and migration of hypertrophic scar fibroblasts by inhibiting Egr1 expression [J]. *Chinese Journal of Aesthetic and Plastic Surgery*), 2022, 33(7): 404-7.
- [5] LEI P, LI Z, HUA Q, et al. Ursolic acid alleviates neuroinflammation after intracerebral hemorrhage by mediating microglial pyroptosis via the NF- κ B/NLRP3/GSDMD pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14771-92.
- [6] 侯梦珠, 李春玉, 王丽敏, 等. 熊果酸抗纤维化研究进展[J]. 广东化工(HOU M Z, LI C Y, WANG L M, et al. Research progress of ursolic acid anti-fibrosis [J]. *Guangdong Chemical Industry*), 2023, 50(12): 101-2,117.
- [7] GAO L, WANG L Y, LIU Z Q, et al. TNAP inhibition attenuates cardiac fibrosis induced by myocardial infarction through deactivating TGF- β 1/Smads and activating P53 signaling pathways [J]. *Cell Death and Disease*, 2020, 11(1): 44-58.
- [8] 杨晨, 黄峰, 晁旭, 等. 熊果酸对肝癌SMMC-7721细胞焦亡作用及机制研究[J]. 中药药理与临床(YANG C, HUANG F, ZHAO X, et al. Effect and mechanism of ursolic acid on pyroptosis of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*), 2022, 38(4): 101-7.
- [9] 王勇, 吴运桥, 邓任强, 等. 白藜芦醇阻断TGF- β 1/Smad信号通路抑制脑胶质瘤细胞迁移侵袭及上皮间质转化[J]. 脑与神经疾病杂志(WANG Y, WU Y Q, DENG R Q, et al. Resveratrol

- inhibits the migration and invasion of glioma cells and epithelial-mesenchymal transition by blocking TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. *Journal of Brain and Nervous Diseases*, 2023, 31(10): 614-20.
- [10] LI Y, ZHANG J, SHI J, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells attenuate hypertrophic scar fibrosis by miR-192-5p/IL-17RA/Smad axis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 221-36.
- [11] GAO Y, LIU Y, ZHENG D, et al. HDAC5-mediated Smad7 silencing through MEF2A is critical for fibroblast activation and hypertrophic scar formation [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(15): 5724-39.
- [12] 王晓妮, 郭涛, 罗启云, 等. 松萝酸对增生性瘢痕成纤维细胞生物学行为及JNK/MAPK信号通路的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*(WANG X N, GUO T, LUO Q Y, et al. Effect of usnic acid on biological behaviors of hypertrophic scar fibroblasts and JNK/MAPK signaling pathway [J]. *Journal of Jilin University, Medicine Edition*), 2023, 49(6): 1445-51.
- [13] ZHANG Q, WANG M, DENG X, et al. Shikonin promotes hypertrophic scar repair by autophagy of hypertrophic scar-derived fibroblasts [J]. *Acta Cir Bras*, 2023, 38(3): e384623-35.
- [14] 刘芮婧, 关莹, 韩子阳, 等. 山萘酚通过抑制Akt磷酸化的水平抑制增生性瘢痕成纤维细胞的迁移和生长[J]. *中国美容整形外科杂志*(LIU R D, GUAN Y, HAN Z Y, et al. Kaempferol prevents hypertrophic scar fibroblasts from migrating and expanding through preventing the phosphorylation of Akt [J]. *Chinese Journal of Aesthetic and Plastic Surgery*), 2023, 34(7): 423-7.
- [15] TANG Z, DING J C, ZHAI X X. Effects of resveratrol on the expression of molecules related to the mTOR signaling pathway in pathological scar fibroblasts [J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2020, 155(2): 161-7.
- [16] KORNEL A, NADILE M, RETSIDOU M I, et al. Ursolic acid against prostate and urogenital cancers: a review of *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7414-32.
- [17] NIE Y, LIU Q, ZHANG W, et al. Ursolic acid reverses liver fibrosis by inhibiting NOX4/NLRP3 inflammasome pathways and bacterial dysbiosis [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 72746-64.
- [18] 黄玉成, 许慧, 陈晓昱, 等. 隐丹参酮对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖的抑制、凋亡的促进和TGF- β 1/Smads信号通路活性的下调[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*(HUANG Y C, XU H, CHEN X Y, et al. Proliferation inhibition, apoptosis promotion and TGF- β 1/Smads signaling pathway suppression in human hypertrophic scar fibroblasts by cryptotanshinone [J]. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*), 2022, 31(4): 351-8.
- [19] ZHOU X, YE H, WANG X, et al. Ursolic acid inhibits human dermal fibroblasts hyperproliferation, migration, and collagen deposition induced by TGF- β via regulating the Smad2/3 pathway [J]. *Gene*, 2023, 867(3): 147367-74.
- [20] FEI H, QIAN Y, PAN T, et al. Curcumin alleviates hypertrophic scarring by inhibiting fibroblast activation and regulating tissue inflammation [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2024, 23(1): 227-5.
- [21] 唐悦玲, 李心怡. SIRT6通过TGF- β 1/Smad信号通路调控瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、侵袭和胶原合成[J]. *山西医科大学学报*(TANG Y L, LI X Y. SIRT6 regulates proliferation, invasion and collagen synthesis in keloid fibroblasts by regulating TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. *Journal of Shanxi Medical University*), 2023, 54(5): 616-22.
- [22] 于睿智, 王天娇, 臧凝子, 等. 清络饮调控TGF- β 1/Smads信号传导通路干预大鼠特发性肺纤维化急性加重[J]. *中华中医药杂志*(YU R Z, WANG T J, ZANG N Z, et al. Qingluo Yin regulates TGF- β 1/Smads signaling pathway to interfere with acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in rats [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*), 2024, 39(7): 3669-74.
- [23] 林志民, 施书涵, 李月婷, 等. 熊果酸对大鼠肾小球系膜细胞凋亡及TGF- β 1/Smads信号通路的影响[J]. *中国医院药学杂志*(LIN Z M, SHI S H, LI Y T, et al. Effect of ursolic acid on the apoptosis and TGF- β 1/Smads signal pathway of cultured rat mesangial cells [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*), 2020, 40(18): 1929-31, 1978.
- [24] MURAKAMI S, TAKASHIMA H, SATO-WATANABE M, et al. Ursolic acid, an antagonist for transforming growth factor (TGF)- β 1 [J]. *FEBS Lett*, 2004, 566(1-3): 55-9.