

芍药苷通过调节YAP/TAZ-TGF- β 1/Smad信号通路抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的生物活性

陈俊超¹ 祁丽华^{2*}

(¹汉川市人民医院创面修复与整形烧伤科, 孝感 431600; ²汉川市人民医院药剂科, 孝感 431600)

摘要 该文旨在探讨芍药苷通过调节Yes相关蛋白(YAP)/PDZ结合基序转录共激活因子(TAZ)-转化生长因子 β 1(TGF- β 1)/Smad信号通路抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的生物活性。从人瘢痕疙瘩组织中提取瘢痕疙瘩成纤维细胞, 并设置对照组, 芍药苷低(PL, 200 μ mol/L)、中(PM, 400 μ mol/L)、高浓度(PH, 800 μ mol/L)组以及空载体(pcDNA3.1)+芍药苷-H(PH, 800 μ mol/L)组, YAP过表达载体(pcDNA3.1 YAP)+芍药苷-H(PH, 800 μ mol/L)组。细胞存活、凋亡、迁移与侵袭分别用MTT、流式细胞仪以及Transwell实验检测; TGF- β 1 mRNA、胶原蛋白III(COL III) mRNA、基质金属蛋白酶-3(MMP-3) mRNA、Smad2 mRNA、Smad3 mRNA表达水平用qRT-PCR检测; TGF- β 1、COL III、MMP-3、Smad3、p-Smad2、p-Smad3、裂解半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cleaved caspase-3)、增殖细胞核抗原(PCNA)、YAP、TAZ蛋白表达水平用Western blot检测。免疫荧光检测p-Smad2和p-Smad3表达情况。结果显示, 芍药苷可以减少p-Smad2和p-Smad3的荧光强度, 抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞存活、侵袭、迁移, 降低TGF- β 1、COL III、MMP-3、Smad2、Smad3 mRNA和蛋白水平及p-Smad2、p-Smad3蛋白表达水平, 诱导细胞凋亡; 芍药苷可抑制YAP、TAZ、PCNA蛋白表达, 促进Cleaved caspase-3表达, 以上作用均以高剂量的芍药苷更佳。但过表达YAP逆转了芍药苷对瘢痕疙瘩形成的抑制。因此, 芍药苷可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的生物活性, 其机制可能与抑制YAP/TAZ-TGF- β 1/Smad信号通路有关。

关键词 芍药苷; YAP/TAZ信号通路; 瘢痕疙瘩成纤维细胞

Paeoniflorin Inhibits the Bioactivity of Keloid Fibroblasts by Regulating the YAP/TAZ-TGF- β 1/Smad Signaling Pathway

CHEN Junchao¹, QI Lihua^{2*}

(¹Department of Wound Repair and Orthopedics, Hanchuan People's Hospital, Xiaogan 431600, China;

²Department of Pharmacy, Hanchuan People's Hospital, Xiaogan 431600, China)

Abstract This study aims to investigate the inhibitory effect of paeoniflorin on bioactivity of keloid fibroblasts by regulating the YAP (Yes-associated protein)/TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)-TGF- β 1 (transforming growth factor β 1)/Smad signaling pathway. Keloid fibroblasts were extracted from human scar tissue and grouped into Con group, low (PL, 200 μ mol/L), medium (PM, 400 μ mol/L), high concentration (PH, 800 μ mol/L) groups, empty vector (pcDNA3.1)+PH (PH, 800 μ mol/L) group, and YAP overexpression vector (pcDNA3.1 YAP)+PH (PH, 800 μ mol/L) group. Cell survival, apoptosis, migration, and invasion were detected using MTT, flow cytometry, and Transwell assay, respectively; the expression of TGF- β 1, COL III (collagen III) mRNA,

收稿日期: 2024-11-22

接受日期: 2025-05-30

*通信作者。Tel: 13886399533, E-mail: m44aig@163.com

Received: November 22, 2024

Accepted: May 30, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-13886399533, E-mail: m44aig@163.com

MMP-3 (matrix metalloproteinase-3) mRNA, *Smad2* mRNA and *Smad3* mRNA were detected by qRT-PCR; the expression of TGF- β 1, COL III, MMP-3, *Smad3*, p-*Smad2*, p-*Smad3*, Cleaved caspase-3, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), YAP, and TAZ proteins was detected by Western blot. The expression of p-*Smad2* and p-*Smad3* was detected by immunofluorescence. The results showed that paeoniflorin could reduce the fluorescence intensity of p-*Smad2* and p-*Smad3*, reduce the survival, invasion, and migration of keloid fibroblasts and the expression of TGF- β 1, COL III, MMP-3, *Smad* and *Smad3* mRNA and protein and p-*Smad2*, p-*Smad3* protein, and induce cell apoptosis. Paeoniflorin inhibited the expression of YAP, TAZ, and PCNA, and increased Cleaved caspase-3 expression, and higher doses of paeoniflorin were better. However, overexpression of YAP reversed the inhibition of paeoniflorin on keloid formation. So, paeoniflorin inhibits the formation of keloid fibroblasts, which may be related to the inhibition of the YAP/TAZ signaling pathway.

Keywords paeoniflorin; YAP/TAZ signaling pathway; keloid fibroblasts

瘢痕疙瘩是由异常伤口愈合引起的一种常见的皮肤病, 会形成凸起或凹凸不平的疤痕, 还会引起瘙痒、疼痛等, 目前尚无完全有效的治疗方案, 因此瘢痕疙瘩的治疗亟待突破^[1]。芍药苷是一种蒎烷单萜葡萄糖苷, 具有抗炎、免疫调节等作用, 可通过抑制细胞外基质因子表达, 减缓增生性瘢痕的产生, 但其具体影响机制尚不清楚^[2]。Hippo通路参与组织特异性干细胞生成、细胞增殖、存活以及组织愈合和再生, 在器官大小调节及组织稳态中起着重要作用^[3-4]。Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)/PDZ结合基序转录共激活因子(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ)通路是Hippo通路的核心, 在创面愈合过程中至关重要。研究表明, YAP/TAZ可与其他信号通路如转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)/*Smad*相互作用, 并在伤口愈合、组织纤维化等方面发挥重要作用^[5-6]。抑制YAP和TGF- β 1/*Smad*通路能抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞生物增殖^[7-8]。芍药苷通过下调YAP/TAZ通路抑制非小细胞肺癌细胞增殖^[9]。但芍药苷能否通过调节YAP/TAZ-TGF- β 1/*Smad*通路治疗瘢痕疙瘩尚不可知, 本研究旨在探讨芍药苷对瘢痕疙瘩成纤维细胞生物活性的影响及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

收集2022年5月至2023年5月在汉川市人民医院外科中心接受手术的患者瘢痕疙瘩组织, 并将其浸泡在2.5%氯霉素溶液中, 用磷酸盐缓冲液冲洗, 切成小块, 置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 于37℃、含5%二氧化碳的培养箱中培养, 每2到3天更

换一次培养基。当细胞占据培养皿底部约80%时, 进行传代培养, 实验采用第4至7代细胞。本研究通过汉川市人民医院伦理委员会审核(20230816-02)。所有参与研究的患者均自愿签署了书面知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

芍药苷(货号: HY-321)购自陕西浩洋生物科技有限公司; Lipofectamine 2000试剂、Trizol试剂(货号: 11668500、15596-018)购自美国Invitrogen公司; 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂(货号: M2128)购自美国Sigma-Aldrich公司; 逆转录试剂盒(货号: K1621)购自美国Fermentas公司; PCR试剂盒(货号: RR014A)购自宝生物工程(大连)有限公司; 膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙锭(propidium iodide, PI)凋亡试剂盒(货号: V13242)购自美国ThermoFisher Scientific公司; TGF- β 1、胶原蛋白III(collagen III, COL III)、基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、*Smad3*、裂解半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cleaved cysteine aspartate protease-3, Cleaved caspase-3)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、YAP、TAZ、p-*Smad2*和p-*Smad3*抗体(货号: ab215715、ab184993、ab52915、ab40854、ab2302、ab92552、ab52771、ab307440、ab40855、ab280888、ab63403)购自英国Abcam公司; Tanon 2500凝胶成像系统购自北京原平皓生物技术有限公司; 7500荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞分组及处理 成纤维细胞在37℃条件下用胰蛋白酶消化2 min后, 再用DMEM培养液稀释

为 2×10^4 /mL, 以100 μL/孔接种于96孔板中, 分别加入200、400、800 μmol/L芍药苷^[2]培养, 并依次将其记为芍药苷低(PL)、中(PM)、高浓度(PH)组; 使用Lipofectamine 2000试剂分别转染过表达空载体(pcDNA3.1)、YAP过表达载体(pcDNA3.1 YAP), 24 h后以800 μmol/L芍药苷处理细胞, 作为pcDNA3.1+PH组、pcDNA3.1 YAP+PH组; 另以未处理的细胞为对照(Con)组。

1.3.2 MTT法检测细胞存活率 各组细胞培养24 h后, 进行MTT实验: 每孔分别加入20 μL MTT溶液, 37 °C培养4 h, 弃上清, 每孔加150 μL二甲基亚砷, 室温振荡混匀10 min, 酶标仪测定波长为490 nm处的吸光度(D)值, 细胞存活率(%)= $D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}}\times 100\%$ 。

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡 将各组细胞培养至对数生长期, 收集细胞至离心管中, 洗涤并进行胰蛋白酶在37 °C条件下消化2 min, 4 °C、2 000 r/min离心5 min, 弃上清, 根据Annexin V/PI试剂盒说明书: 加入195 μL标记缓冲液重悬细胞, 室温下以5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI避光孵育20 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3.4 Transwell实验检测细胞迁移、侵袭 将稀释的基质胶加入Transwell上室的聚碳酸酯膜中, 在Transwell下室中加入600 μL 10%胎牛血清, 将待测细胞用无血清培养基制成单细胞悬液, 以 1×10^5 /孔将成纤维细胞加入上室孔, 细胞悬液体积为200 μL, 培养48 h, 用湿棉签擦去未穿过膜的细胞, 10%福尔马林

室温固定30 min, 0.05%结晶紫室温染色20 min。在倒置显微镜下观察细胞侵袭数量, 迁移步骤除不添加基质胶外, 其余均相同。

1.3.5 qRT-PCR检测细胞外基质因子表达水平 成纤维细胞以 2.5×10^4 /孔的密度接种在24孔板中, 分组处理, 培养24 h后进行胰蛋白酶消化以收集各组细胞。Trizol试剂裂解细胞以提取总RNA, 并且使用逆转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA。使用cDNA作为模板, 参考PCR试剂盒的操作说明进行扩增。PCR扩增条件为: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共45个循环。以GAPDH为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析TGF-β1、COL III、MMP-3、Smad2、Smad3 mRNA表达, 引物序列见表1。

1.3.6 Western blot检测TGF-β1、COL III、MMP-3、Smad2、p-Smad2、Smad3、p-Smad3、YAP、TAZ、Cleaved caspase-3、PCNA蛋白表达水平 收集各组细胞, 裂解细胞、收集细胞总蛋白, BCA法检测蛋白浓度。随后进行SDS-PAGE分离蛋白样本, 电转仪转聚偏二氟乙烯膜, 脱脂奶粉室温封闭2 h, 然后分别加入稀释的一抗TGF-β1(1:500)、COL III(1:1 000)、MMP-3(1:1 000)、Smad3(1:500)、p-Smad3(1:500)、YAP(1:1 000)、TAZ(1:2 000)、Cleaved caspase-3(1:500)、PCNA(1:1 000)和内参GAPDH(1:5 000)抗体, 然后4 °C过夜孵育, 洗膜3次, 然后加入稀释的二抗(1:2 000), 孵育2 h。之后显影、拍照, 蛋白质的灰度值通过Image Pro Plus 6.0软件进行分析。以目的蛋白灰度值与GAPDH灰度值之比

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因名称 Gene name	方向 Direction	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
TGF-β1	F	GAA GTG GAT CCA CGA GCC CAA G
	R	GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC
COL III	F	TGG TGT TGG AGC CGC TGC CA
	R	CTC AGC ACT AGA ATC TGT CC
Smad2	F	ACT AAC TTC CCA GCA GGA AT
	F	GTT GGT CAC TTG TTT CTC CA
Smad3	F	TAA GTG AGC AGA ACA GGT AGT ATT
	R	CTC CCT CCC TCC CCA CTC CCA AGT C
MMP-3	F	AGG ACA AAG CAG GAT CAC AGT TG
	R	CCT GGT ACC CAC GGA ACC T
GAPDH	F	TGT TCG TCA TGG GTG TGA AC
	R	ATG GCA TGG ACT GTG GTC AT

表示蛋白水平。

1.3.7 免疫荧光检测 p-Smad2 和 p-Smad3 表达情况
收集细胞并用 4% 中性甲醛 4 °C 下固定 15 min, 磷酸缓冲液洗涤后, 加入封闭液 37 °C 孵育 30 min, 随后加入 p-Smad2 和 p-Smad3 一抗 (1:100), 4 °C 孵育过夜, 并加入 FITC 标记的荧光二抗 (1:200) 避光室温孵育 1 h, 清洗后滴加 DAPI, 室温避光染核 10 min, 封片后以荧光显微镜观察荧光强度。

1.4 统计分析

SPSS 26.0 软件分析结果, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示数据, 方差齐时, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步行 SNK-*q* 检验; 两组间比较采用 *t* 检验; 若方差不齐, 两组间比较采用校正 *t* 检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验, 进一步行 Bonferroni 法。当 $P<0.05$, 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药苷对细胞存活率影响

成纤维细胞过度增殖是瘢痕疙瘩形成的病理表现。为了确定芍药苷对成纤维细胞增殖的影响, 采用 MTT 实验分析细胞的增殖能力, 结果显示, PL 组、PM 组、PH 组细胞存活率较对照组显著下降 ($P<0.05$); pcDNA3.1 YAP+PH 组细胞存活率较 pcDNA3.1+PH 组显著增加 ($P<0.05$), 见图 1。以上结果表明芍药苷可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖, 而

过表达 YAP 可以削弱这种作用。

2.2 芍药苷对细胞凋亡率的影响

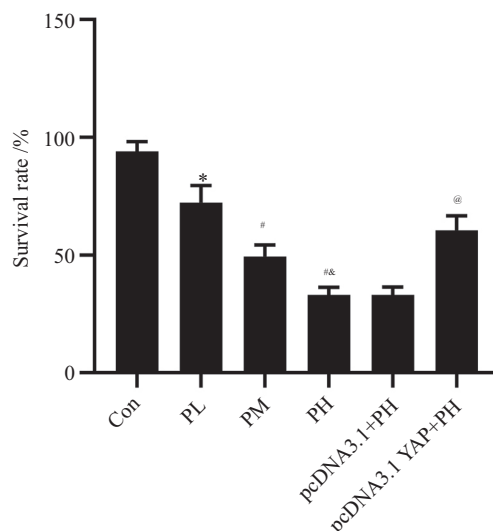
瘢痕疙瘩的形成与异常细胞凋亡有关。为确定芍药苷对成纤维细胞凋亡的影响, 使用流式细胞术进行检测, 结果显示, PL 组、PM 组、PH 组细胞凋亡率较对照组显著增加 ($P<0.05$); pcDNA3.1 YAP+PH 组细胞凋亡率较 pcDNA3.1+PH 组显著降低 ($P<0.05$), 见图 2。以上结果表明芍药苷可促进瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡, 而过表达 YAP 可以削弱这种作用。

2.3 芍药苷对细胞侵袭、迁移的影响

细胞迁移、侵袭与瘢痕疙瘩的形成相关。为了明确芍药苷对成纤维细胞侵袭、迁移的作用, 使用 Transwell 法进行检测。结果显示, PL 组、PM 组、PH 组细胞侵袭、迁移较对照组显著下降 ($P<0.05$); pcDNA3.1 YAP+PH 组细胞侵袭、迁移较 pcDNA3.1+PH 组显著增加 ($P<0.05$); 见图 3 和图 4。以上结果表明, 芍药苷可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞侵袭和迁移, 而过表达 YAP 可以削弱这种作用。

2.4 芍药苷对细胞中 TGF- β 1、COL III、MMP-3、Smad2、Smad3 表达的影响

TGF- β 1、COL III、MMP-3、Smad2、Smad3 是瘢痕疙瘩成纤维细胞形成的主要调节因子, TGF- β 1、Smad2、Smad3 调节细胞纤维化, COL III 影响胶原沉积, MMP-3 与细胞外基质合成相关。为了证实芍药苷对瘢痕疙瘩成纤维细胞的影响, 采用

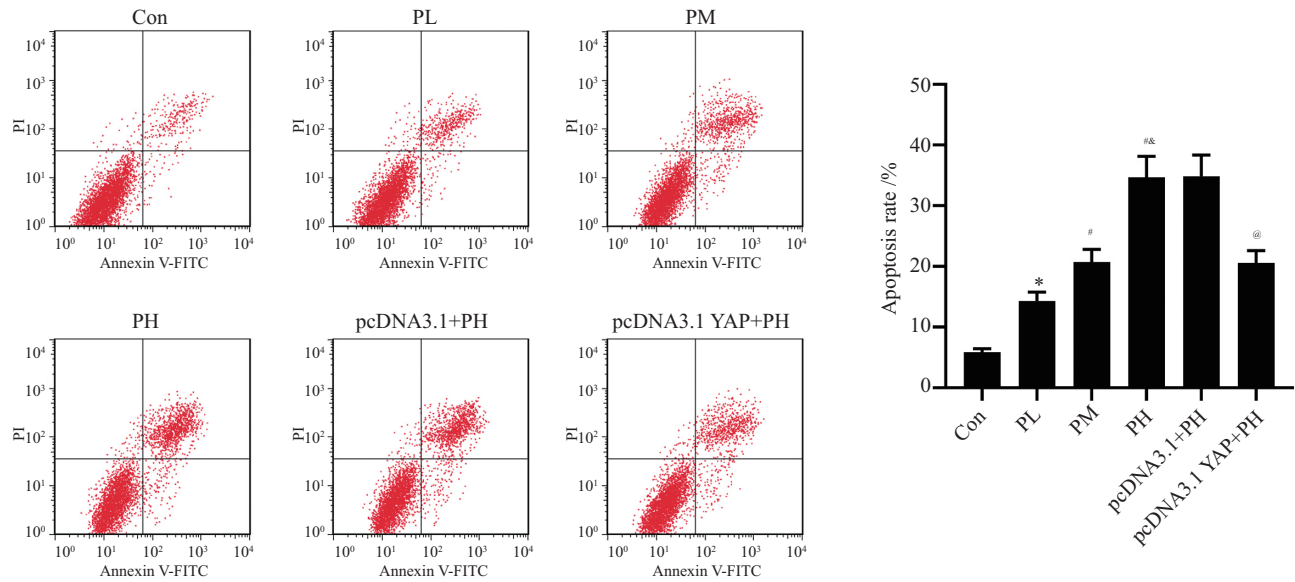


* $P<0.05$, 与 Con 组比较; # $P<0.05$, 与 PL 组比较; & $P<0.05$, 与 PM 组比较; @ $P<0.05$, 与 pcDNA3.1+PH 组比较。

* $P<0.05$ compared with Con group; # $P<0.05$ compared with PL group; & $P<0.05$ compared with PM group; @ $P<0.05$ compared with pcDNA3.1+PH group.

图1 各组瘢痕疙瘩成纤维细胞存活率比较

Fig.1 Comparison of survival rate of keloid fibroblasts in each group

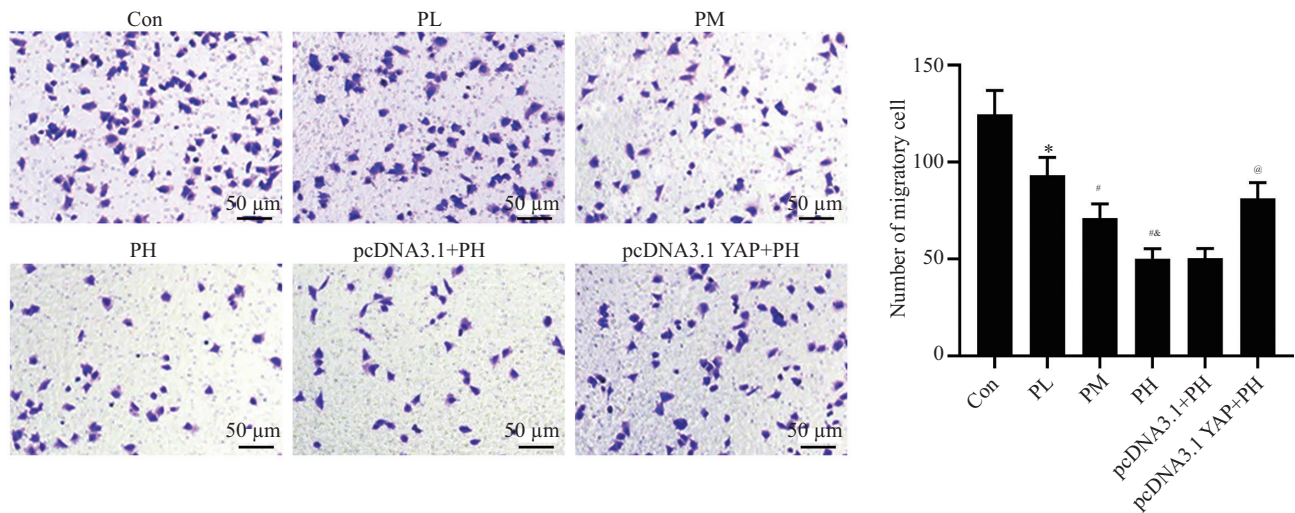


* $P < 0.05$, 与Con组比较; [#] $P < 0.05$, 与PL组比较; [&] $P < 0.05$, 与PM组比较; [@] $P < 0.05$, 与pcDNA3.1+PH组比较。

* $P < 0.05$ compared with Con group; [#] $P < 0.05$ compared with PL group; [&] $P < 0.05$ compared with PM group; [@] $P < 0.05$ compared with pcDNA3.1+PH group.

图2 各组瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡率比较

Fig.2 Comparison of apoptosis rate of keloid fibroblasts in each group



* $P < 0.05$, 与Con组比较; [#] $P < 0.05$, 与PL组比较; [&] $P < 0.05$, 与PM组比较; [@] $P < 0.05$, 与pcDNA3.1+PH组比较。

* $P < 0.05$ compared with Con group; [#] $P < 0.05$ compared with PL group; [&] $P < 0.05$ compared with PM group; [@] $P < 0.05$ compared with pcDNA3.1+PH group.

图3 各组瘢痕疙瘩成纤维细胞迁移细胞数比较

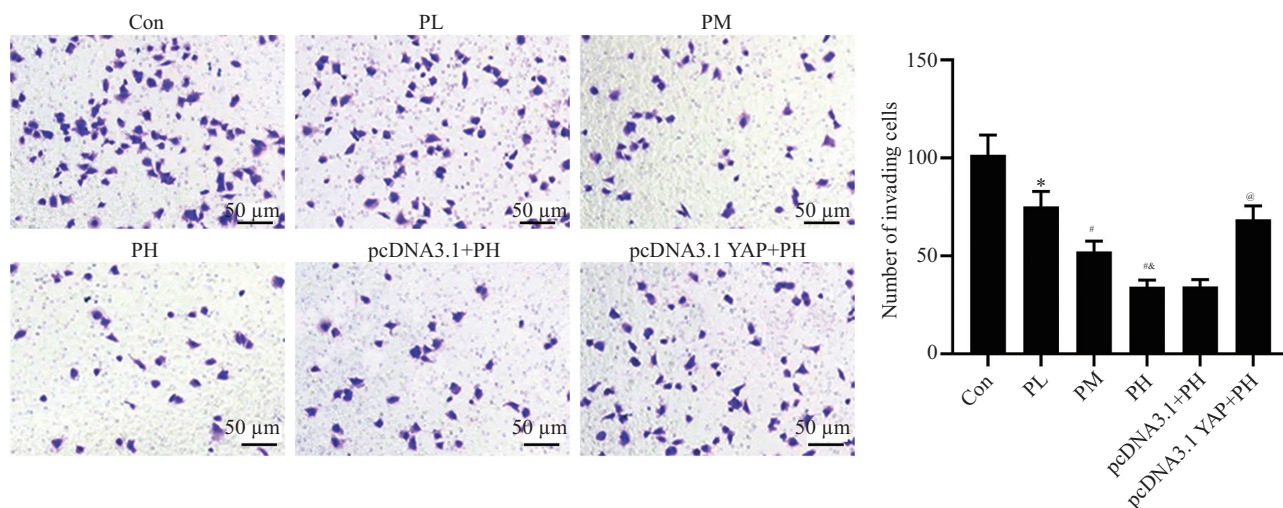
Fig.3 Comparison of number of migrating keloid fibroblasts in each group

qRT-PCR和 Western blot检测上述因子的转录和翻译水平, 结果显示, PL组、PM组、PH组细胞TGF- β 1、COL III、MMP-3、Smad2、Smad3 mRNA和蛋白表达水平及p-Smad2、p-Smad3表达水平较对照组显著下降($P < 0.05$); pcDNA3.1 YAP+PH组细胞TGF- β 1、COL III、MMP-3、Smad2、Smad3 mRNA和蛋白表达水平及p-Smad2、p-Smad3表达水平较pcDNA3.1+PH组显著增加($P < 0.05$); 见图5和图

6。以上结果表明, 芍药苷可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞TGF- β 1/Smad表达和胶原形成, 而过表达YAP可以削弱这种作用。

2.5 芍药苷对细胞中YAP、TAZ、Cleaved caspase-3、PCNA蛋白表达影响

PCNA参与细胞DNA的合成, 反映了细胞的增殖水平; Cleaved caspase-3反映了细胞凋亡的水平。为了研究芍药苷对成纤维细胞YAP/TAZ通路及增

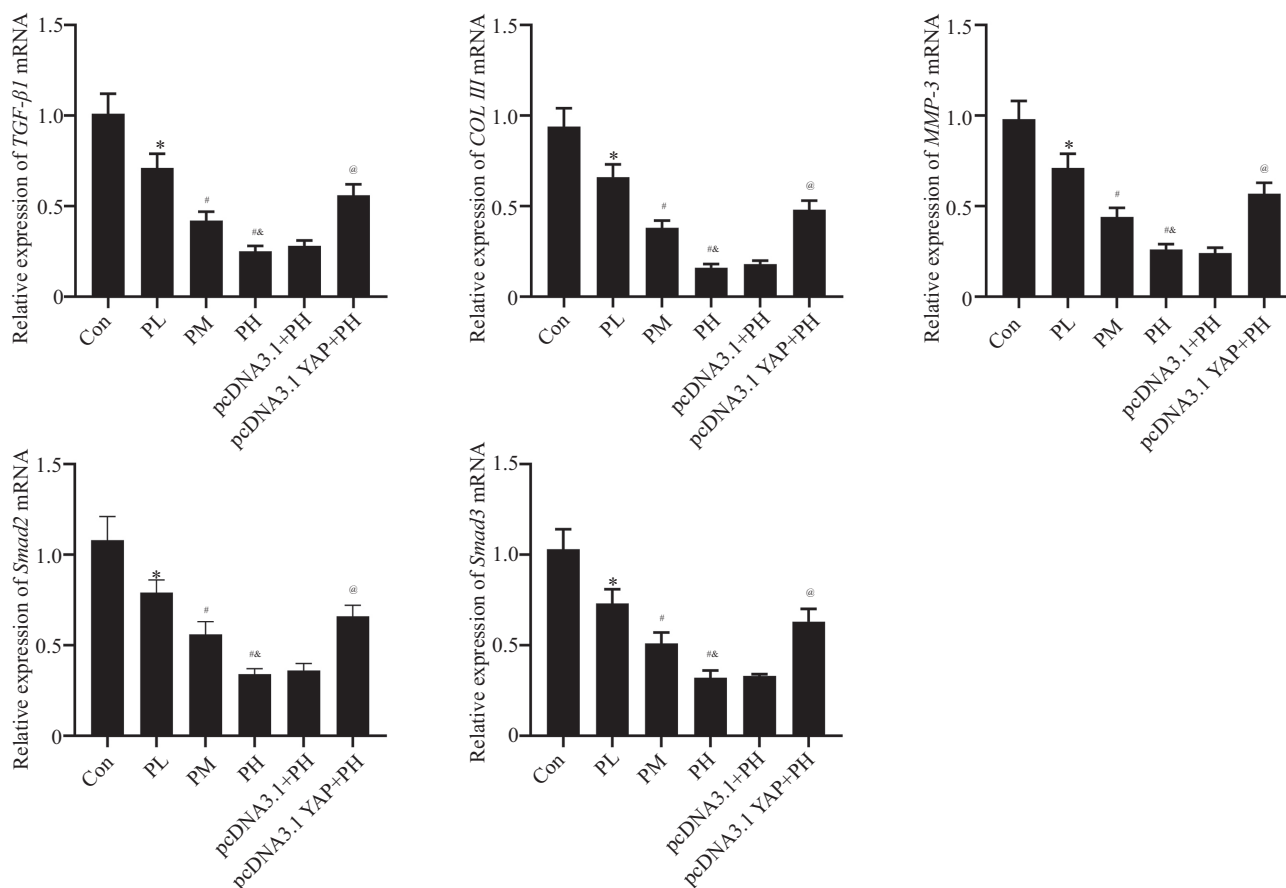


* $P < 0.05$, 与Con组比较; [#] $P < 0.05$, 与PL组比较; [&] $P < 0.05$, 与PM组比较; [@] $P < 0.05$, 与pcDNA3.1+PH组比较。

* $P < 0.05$ compared with Con group; [#] $P < 0.05$ compared with PL group; [&] $P < 0.05$ compared with PM group; [@] $P < 0.05$ compared with pcDNA3.1+PH group.

图4 各组瘢痕疙瘩成纤维细胞侵袭细胞数比较

Fig.4 Comparison of number of invading keloid fibroblasts in each group

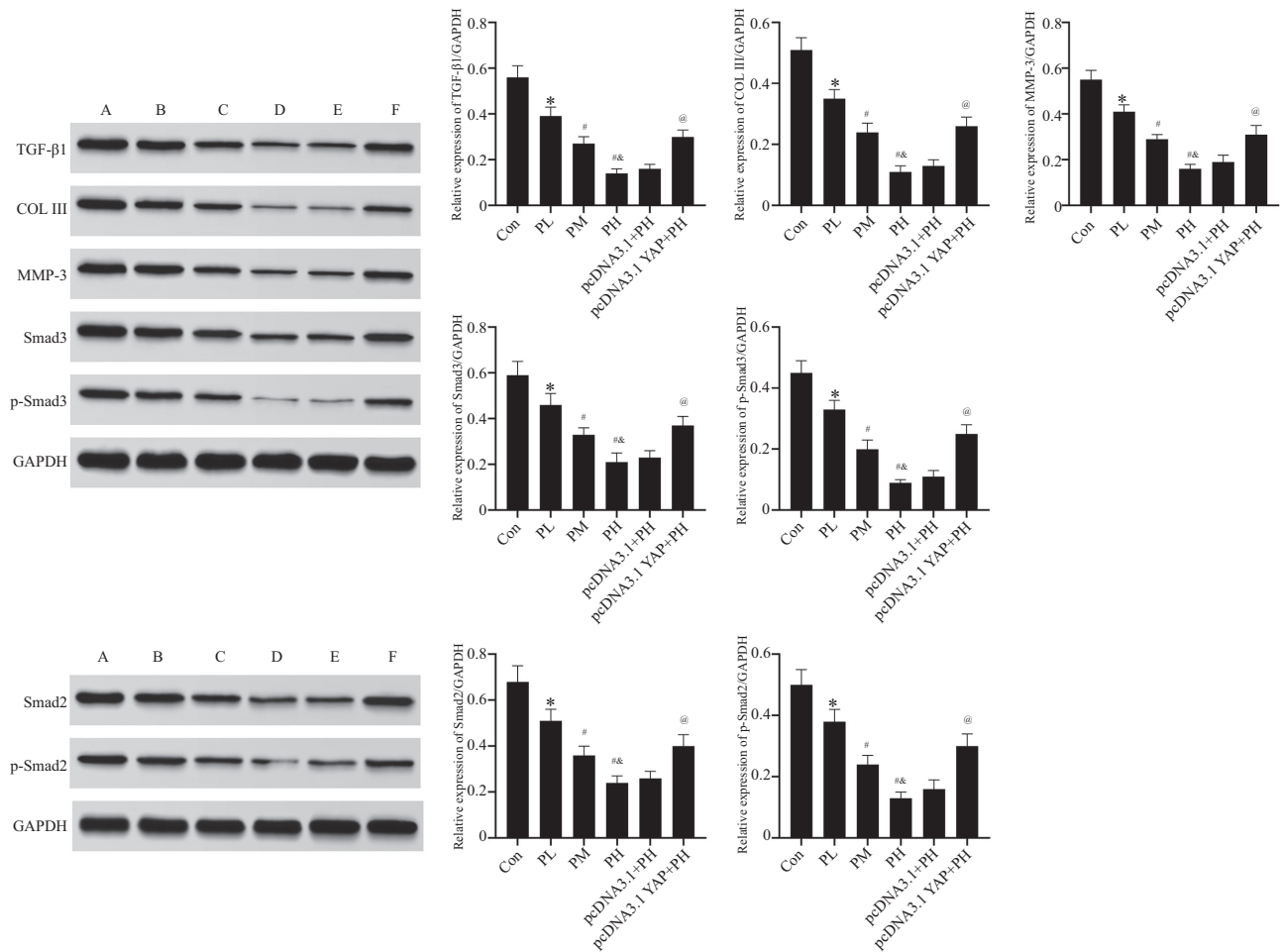


* $P < 0.05$, 与Con组比较; [#] $P < 0.05$, 与PL组比较; [&] $P < 0.05$, 与PM组比较; [@] $P < 0.05$, 与pcDNA3.1+PH组比较。

* $P < 0.05$ compared with Con group; [#] $P < 0.05$ compared with PL group; [&] $P < 0.05$ compared with PM group; [@] $P < 0.05$ compared with pcDNA3.1+PH group.

图5 各组瘢痕疙瘩成纤维细胞TGF-β1 mRNA、COL III mRNA、MMP-3 mRNA、Smad2 mRNA、Smad3 mRNA水平的比较

Fig.5 Comparison of TGF-β1 mRNA, COL III mRNA, MMP-3 mRNA, Smad2 mRNA and Smad3 mRNA of keloid fibroblasts in each group



A为Con组; B为PL组; C为PM组; D为PH组; E为pcDNA3.1+PH组; F为pcDNA3.1 YAP+PH组。* P <0.05, 与Con组比较; # P <0.05, 与PL组比较; & P <0.05, 与PM组比较; @ P <0.05, 与pcDNA3.1+PH组比较。

A is the Con group; B is PL group; C is PM group; D is PH group; E is pcDNA3.1+PH group; F is pcDNA3.1 YAP+PH group. * P <0.05 compared with Con group; # P <0.05 compared with PL group; & P <0.05 compared with PM group; @ P <0.05 compared with pcDNA3.1+PH group.

图6 各组瘢痕疙瘩成纤维细胞TGF- β 1、COL III、MMP-3、Smad2、Smad3蛋白表达水平的比较

Fig.6 Comparison of TGF- β 1, COL III, MMP-3, Smad2 and Smad3 protein expression of keloid fibroblasts in each group

殖、凋亡的影响, 采用Western blot检测YAP、TAZ、Cleaved caspase-3、PCNA蛋白表达水平, 结果显示, PL组、PM组、PH组细胞YAP、TAZ、PCNA蛋白表达水平较对照组显著下降, 但Cleaved caspase-3表达水平显著增加(P <0.05); pcDNA3.1 YAP+PH组细胞YAP、TAZ、PCNA蛋白表达水平较pcDNA3.1+PH组显著升高, 但Cleaved caspase-3表达水平显著降低(P <0.05); 见图7。以上结果表明, 芍药苷可降低瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖蛋白PCNA表达水平并增高凋亡蛋白Cleaved caspase-3表达水平, 而过表达YAP可以削弱这种作用。

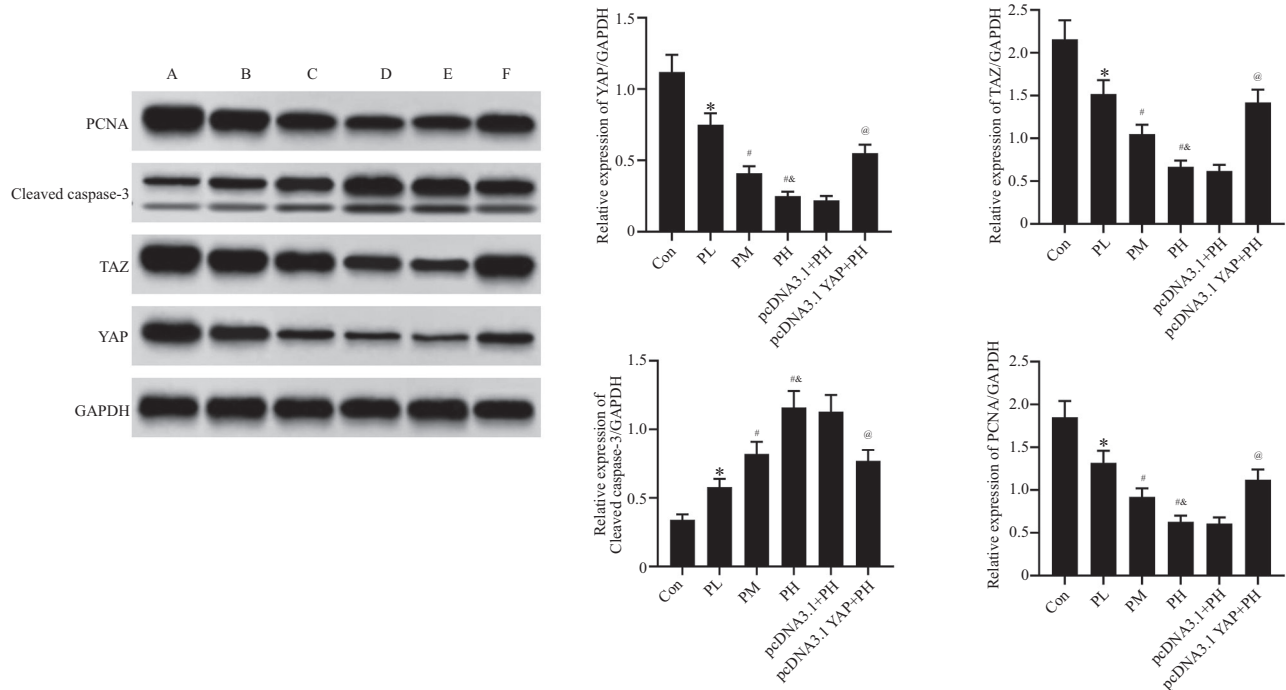
2.6 芍药苷对细胞中p-Smad2和p-Smad3荧光表达的影响

为了确定芍药苷对成纤维细胞Smad2和Smad3

活化的影响, 采用免疫荧光分析p-Smad2和p-Smad3的表达和定位情况, 结果显示, p-Smad2和p-Smad3主要在细胞核中表达, PL组、PM组、PH组p-Smad2和p-Smad3相对荧光强度显著低于对照组(P <0.05); pcDNA3.1 YAP+PH组p-Smad2和p-Smad3相对荧光强度较pcDNA3.1+PH组显著增加(P <0.05); 见图8、图9。以上结果表明, 芍药苷可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞Smad2和Smad3活化, 而过表达YAP可以削弱这种作用。

3 讨论

瘢痕疙瘩是一种纤维增生性疾病, 其特征真在于真皮成纤维细胞增殖失调和皮肤成纤维细胞产生的胶原蛋白紊乱, 可引起严重的瘙痒、疼痛和挛缩, 导



A为Con组; B为PL组; C为PM组; D为PH组; E为pcDNA3.1+PH组; F为pcDNA3.1 YAP+PH组。* $P<0.05$, 与Con组比较; # $P<0.05$, 与PL组比较; ## $P<0.05$, 与PM组比较; @ $P<0.05$, 与pcDNA3.1+PH组比较。

A is the Con group; B is PL group; C is PM group; D is PH group; E is pcDNA3.1+PH group; F is pcDNA3.1 YAP+PH group. * $P<0.05$ compared with Con group; # $P<0.05$ compared with PL group; ## $P<0.05$ compared with PM group; @ $P<0.05$ compared with pcDNA3.1+PH group.

图7 瘢痕疙瘩成纤维细胞中YAP、TAZ、Cleaved caspase-3和PCNA的表达水平

Fig.7 Expression of YAP, TAZ, Cleaved caspase-3, and PCNA in keloid fibroblasts

致患者生活质量下降, 目前已尝试手术、冷冻疗法、药物疗法等多种策略来进行治疗, 但效果欠佳且复发率较高^[1]。因此探索瘢痕疙瘩的发病机制, 寻找有效治疗瘢痕疙瘩的方法具有重要意义。

瘢痕疙瘩的纤维化反应是由慢性炎症引起的, 能影响成纤维细胞活性, 引起过度的细胞外基质沉积, 延缓疤痕成熟过程^[10]。此外, 成纤维细胞的异常增殖、凋亡和迁移侵袭与瘢痕疙瘩的形成密切相关。因此以人瘢痕疙瘩组织中提取瘢痕疙瘩成纤维细胞为研究对象, 探索治疗瘢痕疙瘩药物及作用机制。芍药苷是芍药的主要活性成分之一, 作为一种天然植物成分, 具有显著的抗肿瘤、改善心脏重塑、抑制炎症反应等多种生物潜力^[11]。本研究结果发现, 芍药苷处理可以抑制成纤维细胞增殖、侵袭与迁移, 促进其凋亡。为了初步明确芍药苷调节细胞增殖、凋亡及迁移侵袭的作用机制, 本研究采用 Western blot检测相关蛋白表达情况, 发现芍药苷降低增殖蛋白PCNA与迁移侵袭蛋白MMP-3表达水平, 增高凋亡蛋白Cleaved caspase-3表达水平, 且发现Cleaved caspase-3增高的同时 procaspase-3表达水

平也增加, 说明凋亡被促进, 初步证实芍药苷可能通过上调促凋亡蛋白表达和下调增殖及迁移侵袭相关的蛋白表达来诱导成纤维细胞凋亡, 抑制迁移侵袭和增殖, 提示芍药苷可能是治疗瘢痕疙瘩的潜在药物。瘢痕疙瘩的形成是生长因子和细胞因子过度表达的结果, TGF- β 1可刺激瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和胶原合成、抑制MMP的胶原降解活性^[12-13]。值得关注的是, Smad通路是TGF- β 1最重要的信号转导途径之一, 芍药苷可通过抑制TGF- β 1/Smad信号通路抑制增殖性瘢痕成纤维细胞增殖^[2], 而抑制p-Smad2和p-Smad3连接区表达可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖^[14]。研究发现, 芍药苷还具有抗纤维化活性如在辐射诱导的肝纤维化模型中可促使Smad3/4表达的下调和Smad7表达的上调^[15]。本研究先通过qRT-PCR和Western blot检测上述因子的mRNA和蛋白表达水平, 结果发现, 芍药苷处理瘢痕成纤维细胞后, TGF- β 1、COL III、MMP-3、Smad2、Smad3 mRNA和蛋白表达水平下降, 说明芍药苷可能通过降低各因子的转录及翻译后水平来抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的形成。Smad2和Smad3是TGF- β 1的下游

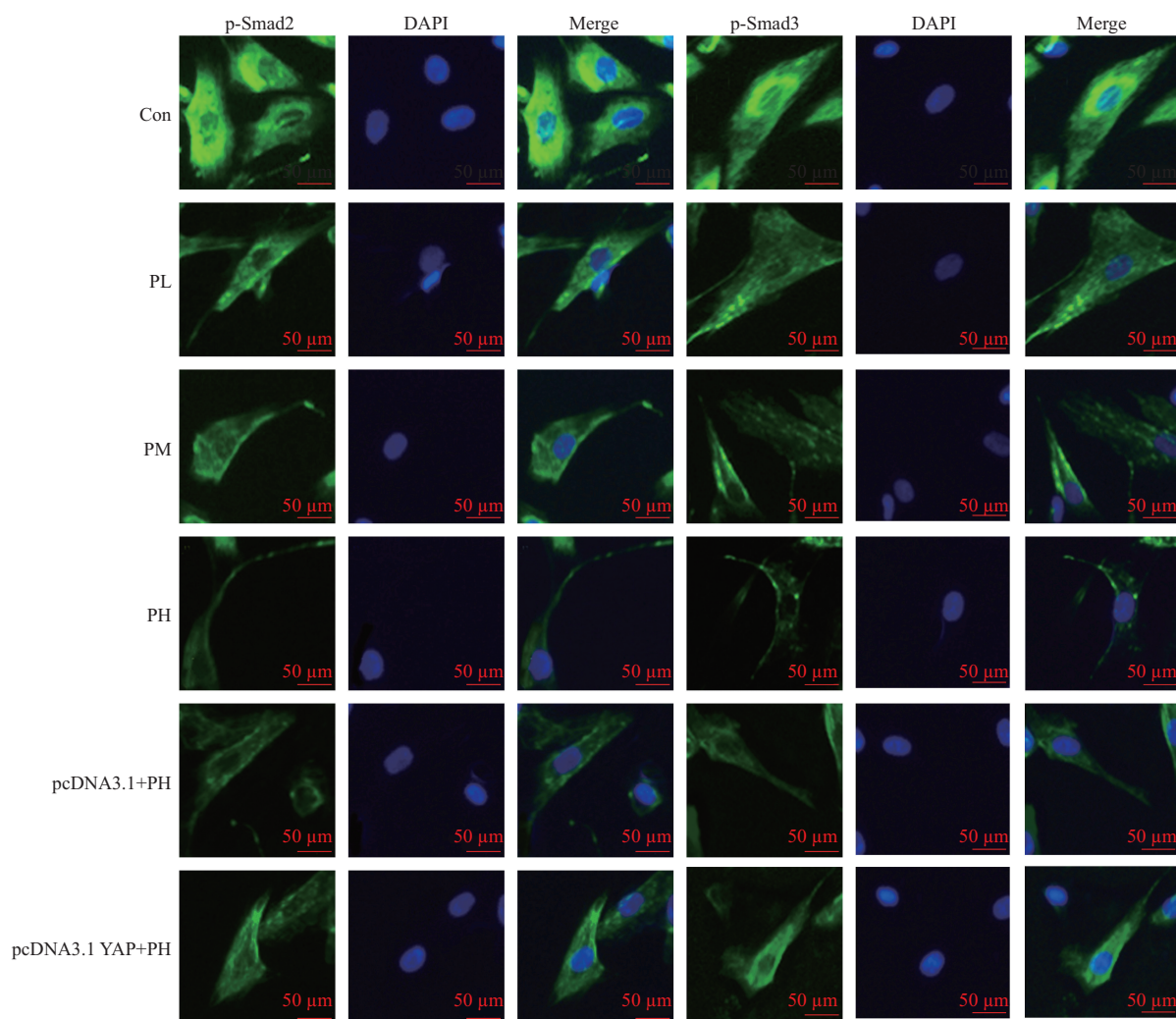
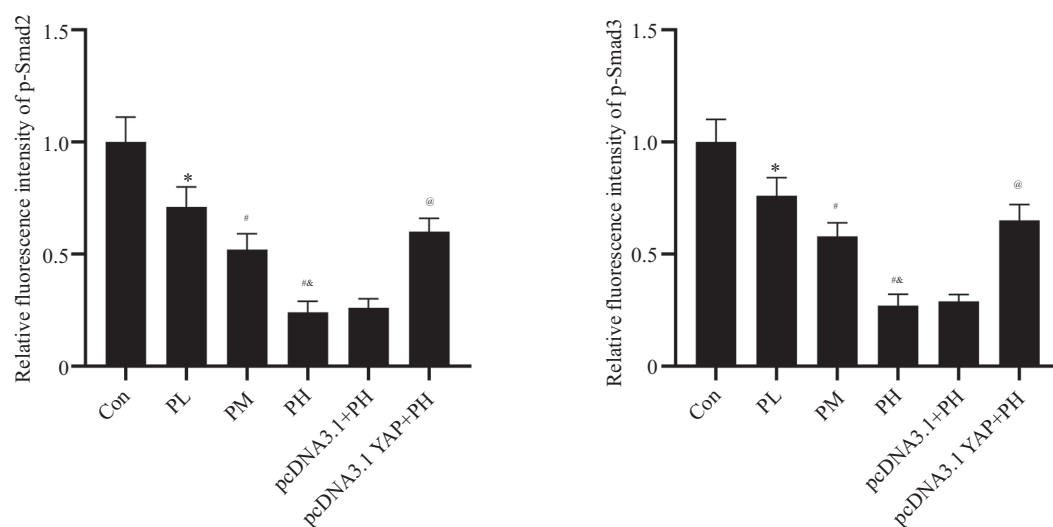


图8 细胞p-Smad2和p-Smad3蛋白的免疫荧光图

Fig.8 Immunofluorescence images of p-Smad2 and p-Smad3 proteins in cells



* $P < 0.05$, 与Con组比较; # $P < 0.05$, 与PL组比较; & $P < 0.05$, 与PM组比较; @ $P < 0.05$, 与pcDNA3.1+PH组比较。

* $P < 0.05$ compared with Con group; # $P < 0.05$ compared with PL group; & $P < 0.05$ compared with PM group; @ $P < 0.05$ compared with pcDNA3.1+PH group.

图9 瘢痕疙瘩成纤维细胞中p-Smad2和p-Smad3相对荧光强度比较

Fig.9 Comparison of relative fluorescence intensity of p-Smad2 and p-Smad3 in keloid fibroblasts

关键调控因子,也与胶原合成和成纤维细胞增殖相关,为明确芍药苷对Smad2和Smad3活性的影响,本研究采用免疫荧光技术检测p-Smad2和p-Smad3表达情况,结果显示,芍药苷可降低p-Smad2和p-Smad3相对荧光强度。以上结果提示芍药苷可通过抑制TGF- β 1/Smad信号通路下调胶原和基质金属蛋白酶表达进而抑制瘢痕疙瘩的形成。

Hippo信号通路在组织稳态和器官大小调节中起着重要作用,能参与调节细胞增殖、凋亡、存活以及组织愈合和再生,YAP/TAZ信号通路是Hippo通路的效应子,与成纤维细胞的异常增殖和基质硬化有关^[16]。文献报道,LTBP4抑制活性TGF- β 1的分泌,活性TGF- β 1抑制YAP1的磷酸化,刺激YAP1的质核易位,从而参与调节各种细胞和器官稳态,促进皮肤黑色素瘤进展^[17]。在TGF- β 1诱导的肝星状细胞活化研究中,pepstatin Pr可通过调控YAP-TGF- β 1-Smad通路发挥体外抗肝纤维化作用^[18]。GAO等^[19]研究发现,抑制YAP/TAZ可改变成纤维细胞的生物学行为,并将其用于瘢痕疙瘩的治疗。以上研究表明YAP/TAZ通路可能参与瘢痕疙瘩的形成。本研究通过Western blot检测发现,芍药苷处理细胞后,YAP、TAZ表达水平下调,提示芍药苷可能通过抑制YAP/TAZ降低瘢痕疙瘩成纤维细胞的生物活性。为进一步验证实验结论,本研究选择干预效果最好的PH组与pcDNA3.1 YAP联合进行反向验证,结果发现pcDNA3.1 YAP逆转了芍药苷对瘢痕疙瘩生物活性的影响以及对TGF- β 1/Smad信号通路的抑制作用,表明芍药苷可通过抑制YAP/TAZ-TGF- β 1/Smad信号通路影响瘢痕疙瘩成纤维细胞的生物活性。

综上所述,芍药苷抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的生物活性,可能与抑制YAP/TAZ-TGF- β 1/Smad信号通路有关。在后续的研究中,我们将针对芍药苷的作用机制进行更深入的研究,力求探索其作用靶点,为芍药苷用于瘢痕疙瘩的治疗提供依据。然而,不足的是本研究未进行芍药苷特异性作用验证,且机制探讨不充分,未来将设置阳性对照药证实芍药苷的特异性,并通过基因沉默、免疫共沉淀等技术进一步验证芍药苷的作用机制。

参考文献 (References)

[1] LESZCZYNSKI R, DA SILVA C A, PINTO A C P N, et al. Laser therapy for treating hypertrophic and keloid scars [J]. *Cochrane*

Database Syst Rev, 2022, doi: 10.1002/14651858.CD011642.pub2.

[2] 王雷, 马园园, 李亚玲, 等. 芍药苷对增殖性瘢痕成纤维细胞增殖抑制作用及机制研究[J]. *中国比较医学杂志*(WANG L, MA Y Y, LI Y L, et al. Inhibitory effect and mechanism of paeoniflorin on proliferation of hypertrophic scar fibroblasts [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*), 2017, 27(11): 38-43.

[3] MIA M M, SINGH M K. New insights into Hippo/YAP signaling in fibrotic diseases [J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2065-86.

[4] 胡守一, 谢苏杰, 张佳怡, 等. YAP/TAZ在皮肤创面修复中的作用[J]. *生命科学*(HU S Y, XIE S J, ZHANG J Y, et al. The role of YAP/TAZ in skin wound healing [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*), 2021, 33(10): 1246-51.

[5] LIU R, LI J, GUO Z, et al. Celastrol alleviates corneal stromal fibrosis by inhibiting TGF- β 1/Smad2/3-YAP/TAZ signaling after descemet stripping endothelial keratoplasty [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023, 64(3): 9.

[6] SZETO S G, NARIMATSU M, LU M, et al. YAP/TAZ are mechanoregulators of TGF- β -Smad signaling and renal fibrogenesis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(10): 3117-28.

[7] 陈雷刚, 任慧敏, 吴远慧, 等. 竹红素A联合LED红光照射通过YAP途径抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖[J]. *安徽医学*(CHEN L G, REN H M, WU Y H, et al. Hypocrellin A combined with LED reihe YAP pathway [J]. *Anhui Medical Journal*), 2024, 45(2): 142-6.

[8] 孔德祺, 金文玉, 金哲虎. 尼达尼布通过TGF- β 1/Smad信号通路调控人瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖及胶原蛋白的产生[J]. *中国皮肤性病学杂志*(KONG D Q, JIN W Y, JIN Z H. Nintedanib regulates the proliferation of human keloid fibroblasts and the production of collagen through the TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*), 2025, 39(3): 258-64.

[9] 李燕, 彭亮, 蒋立峰, 等. 芍药苷干预Hippo信号通路诱导非小细胞肺癌凋亡的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*(LI Y, PENG L, JIANG L F, et al. Paeoniflorin induces apoptosis in NSCLC cells via activating Hippo signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*), 2024, 30(12): 39-44.

[10] XU S, ZHU Y, WANG P, et al. Derazantinib inhibits the bioactivity of keloid fibroblasts via FGFR signaling [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(12): 3220.

[11] ZHOU J, TAN Y, WANG X, et al. Paeoniflorin attenuates DHEA-induced polycystic ovary syndrome via inactivation of TGF- β 1/Smads signaling pathway *in vivo* [J]. *Aging*, 2021, 13(5): 7084-95.

[12] PANG Q, WANG Y, XU M, et al. MicroRNA-152-5p inhibits proliferation and migration and promotes apoptosis by regulating expression of Smad3 in human keloid fibroblasts [J]. *BMB Rep*, 2019, 52(3): 202-7.

[13] LEI R, LI J, LIU F, et al. HIF-1 α promotes the keloid development through the activation of TGF- β /Smad and TLR4/MyD88/NF- κ B pathways [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(23): 3239-50.

[14] 尚念胜, 牛燕英. A型肉毒素对瘢痕疙瘩成纤维细胞TGF- β /Smad通路和ERK通路表达的影响[J]. *中国美容医学*(SHANG N S, NIU Y Y. Effects of botulinum toxin type a on the expression of TGF- β /Smad and ERK pathways in keloid fibroblasts [J]. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*), 2020, 29(5): 104-9.

- [15] HU Z, QIN F, GAO S, et al. Paeoniflorin exerts protective effect on radiation-induced hepatic fibrosis in rats via TGF- β 1/Smads signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(3): 1012-21.
- [16] PETROU I G, NIKOU S, MADDURI S, et al. The role of Hippo signaling pathway and ILK in the pathophysiology of human hypertrophic scars and keloids: an immunohistochemical investigation [J]. *Cells*, 2022, 11(21): 1-14.
- [17] WANG L, TANG D, WU T, et al. Disruption of LTBP4 inhibition-induced TGF β 1 activation promoted cell proliferation and metastasis in skin melanoma by inhibiting the activation of the Hippo-YAP1 signaling pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 9(1): 1-17.
- [18] 牛伟晓, 陈明华, 张娜, 等. Pepstatin Pr通过YAP-TGF β -Smad通路发挥体外抗肝纤维化作用[J]. *药学报*(NIU W X, CHEN M H, ZHANG N, et al. Pepstatin Pr show anti-fibrosis effect related to YAP-TGF β -Smad pathway [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*), 2019, 54(1): 89-94.
- [19] GAO N, LU L, MA X, et al. Targeted inhibition of YAP/TAZ alters the biological behaviours of keloid fibroblasts [J]. *Exp Dermatol*, 2022, 31(3): 320-9.