

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.05.008

Smurf1 对增生性瘢痕纤维化形成的影响及分子机制*

王璇¹ 李学拥¹ 李靖¹ 吕卓敏¹ 何林² 芦希艳^{3Δ}

(1 空军军医大学第二附属医院整形烧伤科 陕西 西安 710038;

2 西安交通大学第一附属医院整形美容颌面外科 陕西 西安 710061;

3 空军军医大学第二附属医院门诊部 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探究 Smurf1 对增生性瘢痕形成中纤维化进程的影响及分子机制。**方法:**收集 2021 年 6 月至 2022 年 6 月空军军医大学第二附属医院烧伤整形科行增生性瘢痕切除手术患者的瘢痕组织及正常皮肤标本各 12 例,采用 HE 和 Masson 染色进行病理学检查。取增生性瘢痕组织无菌处理后,采取组织块法分离培养获取人增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)。将 HSF 细胞按照实验方案分组,(1)Smurf1 过表达分组:对照 1 组(Con-1 组),空载体组(Vector 组)和 Smurf1 过表达组(OE-Smurf1 组);(2)Smurf1 干扰表达分组:对照 2 组(Con-2 组),阴性组(si-NC 组),Smurf1 干扰表达组(si-Smurf1 组)。再分别将 pcDNA3.1 空质粒、pcDNA3.1+Smurf1 质粒、si-NC 和 si-Smurf1 转染至 Vector 组、OE-Smurf1 组、si-NC 组和 si-Smurf1 组 HSF 细胞。通过 qRT-PCR 检测 Smurf1 表达水平,Western blot 检测蛋白表达水平,CCK-8 检测细胞增殖水平,流式细胞术检测细胞凋亡水平,Transwell 实验检测细胞侵袭水平,细胞划痕实验检测细胞迁移水平。**结果:**HE 染色和 Masson 染色结果显示,与正常皮肤组织相比,增生性瘢痕组织的真皮层厚度显著增加,真皮层中存在大量被染成蓝色的胶原纤维,排列紊乱且致密。与正常皮肤组织相比,增生性瘢痕组织中 TGF- β 1、 α -SMA、COL1、COL3、T β R-I、p-Smad3 和 Smad7 的蛋白表达水平均升高($P<0.05$),Smurf1 表达水平降低($P<0.05$)。与 Con-1 或 Vector 组比较,OE-Smurf1 组 HSF 细胞中 TGF- β 1、 α -SMA、COL1、COL3、T β R-I、p-Smad3 和 Smad7 蛋白的表达水平均降低($P<0.05$),HSF 细胞增殖、侵袭和迁移水平降低($P<0.05$),凋亡水平升高($P<0.05$)。与 Con-2 组或 si-NC 组比较,si-Smurf1 组 HSF 细胞中 TGF- β 1、 α -SMA、COL1、COL3、T β R-I、p-Smad3 和 Smad7 蛋白的表达水平均升高($P<0.05$),HSF 细胞增殖、侵袭和迁移水平升高($P<0.05$),凋亡水平降低($P<0.05$)。**结论:**Smurf1 可能通过抑制 TGF- β 1/Smad 通路,进而抑制增生性瘢痕的纤维化进程。

关键词:增生性瘢痕;纤维化;人增生性瘢痕成纤维细胞;TGF- β 1/Smad 通路;增殖;侵袭;迁移

中图分类号:R641;R619.6;R62 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)05-849-09

Effect of Smurf1 on Fibrosis Formation in Hypertrophic Scar and its Molecular Mechanism*

WANG Xuan¹, LI Xue-yong¹, LI Jing¹, LÜ Zhuo-min¹, HE Lin², LU Xi-yan^{3Δ}

(1 Department of Plastic Surgery and Burn, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710038, China; 2 Department of Plastic, Aesthetic and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China; 3 Department of Out-patient, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of Smurf1 on fibrosis process in hypertrophic scar formation and its molecular mechanism. **Methods:** Hypertrophic scar tissue and normal skin tissue samples of 12 patients who underwent hyperplastic scar resection in the department of burn and plastic surgery of the Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University from June 2021 to June 2022 were collected. And the pathological examination was performed by HE and Masson staining. After sterile treatment of hypertrophic scar tissue, human hypertrophic scar fibroblasts (HSF) were isolated and cultured by tissue block method. HSF cells were divided into some groups according to the experimental scheme, (1) Smurf1 overexpression treatment group, control group 1 (Con-1 group), empty vector group (Vector group) and Smurf1 overexpression group (OE-Smurf1 group), (2) Smurf1 interference expression treatment group, control group 2 (Con-2 group), negative group (si-NC group) and Smurf1 interference expression group (si-Smurf1 group). Then pcDNA3.1 empty plasmid, pcDNA3.1+Smurf1 plasmid, si-NC and si-Smurf1 were transfected into HSF cells in Vector group, OE-Smurf1 group, si-NC group and si-Smurf1 group, respectively. Smurf1 mRNA expression level was detected by qRT-PCR. Protein expression level was detected by Western blot. Cell proliferation level was detected by CCK-8. Cell apoptosis level was detected

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(2023-YBSF-179)

作者简介:王璇(1983-),主治医师,研究方向:瘢痕、美容整形,E-mail: AirWangX83@163.com

Δ 通讯作者:芦希艳,E-mail: 2045875985@163.com

(收稿日期:2023-11-20 接受日期:2023-12-15)

by flow cytometry. Cell invasion level was detected by Transwell assay and cell migration level was detected by cell scratch assay. **Results:** The results of HE staining and Masson staining showed that compared with normal skin tissue, the dermis thickness of hypertrophic scar tissue increased significantly, and there were a large number of blue-dyed collagen fibers in the dermis, which were disordered and dense. Compared with normal skin tissue, the protein expression levels of TGF- β 1, α -SMA, COL1, COL3, T β R-I, p-Smad3 and Smad7 in hypertrophic scar tissue were increased ($P<0.05$), while the expression level of Smurf1 was decreased ($P<0.05$). Compared with Con-1 or Vector groups, the expression levels of TGF- β 1, α -SMA, COL1, COL3, T β R-I, p-Smad3 and Smad7 proteins in HSF cells of OE-Smurf1 group were decreased ($P<0.05$), and the proliferation, invasion and migration levels of HSF cells were decreased ($P<0.05$), the apoptosis level was increased ($P<0.05$). Compared with Con-2 group or si-NC group, the expression levels of TGF- β 1, α -SMA, COL1, COL3, T β R-I, p-Smad3 and Smad7 proteins in HSF cells of si-Smurf1 group were increased ($P<0.05$), and the proliferation, invasion and migration levels of HSF cells were increased ($P<0.05$), the apoptosis level was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Smurf1 may inhibit the fibrotic process of hypertrophic scars by inhibiting TGF- β 1/Smad pathway.

Key words: Hypertrophic scar; Fibrosis; Hypertrophic scar fibroblasts (HSF); TGF- β 1/Smad pathway; Proliferation; Invasion; Migration

Chinese Library Classification(CLC): R641; R619.6; R62 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2024)05-849-09

前言

伤口愈合是人类一生中反复发生的最常见的事件之一。然而,这是一个复杂的过程,包括止血、炎症、增殖、再上皮化和重塑五个阶段^[1]。组织成熟是重塑阶段的标志,这个阶段包括新生血管的退化和伴随的细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的重建,产生有组织的胶原纤维,这是正常疤痕的基础。在该过程中出现任何生物程序异常都可能导致从无法愈合的伤口到过度疤痕的生成,包括增生性疤痕(Hypertrophic scar, HS)和疤痕疙瘩^[2]。过度疤痕的特征是由成纤维细胞的异常增殖,引发过度纤维化,以及分化引起的ECM的无序和冗余沉积。增生性疤痕可能会导致严重的瘙痒、压痛、疼痛、睡眠障碍、焦虑、抑郁和日常活动中断^[3]。

研究表明, TGF- β 1/Smads 信号通路在纤维化进程中处于异常活化状态,在肺纤维化^[4]、心肌纤维化^[5]、肝纤维化^[6]以及增生性疤痕纤维化^[7]活动中均扮演促进增强角色。目前 TGF- β 1 已被认为是最强的促纤维化效应分子,而 Smads 蛋白是 TGF- β 1 在胞内实现将信号传导至细胞核的关键底物^[8]。Smad 泛素化调节因子(Smad ubiquitination regulatory factors, Smurfs)属于 E3 泛素连接酶,包含 Smurf1 和 Smurf2 两类,通过对 Smad 类蛋白水平的调节,进而正向或负向调控 TGF- β 1 信号通路的传导^[9]。李丽等^[10]发现 Smurf1 在肝纤维化大鼠体内表达水平与纤维化进程成负相关性,表示 Smurf1 对肝纤维化进程起负调控作用;而周嘉俊等^[11]的研究发现, Smurf1 在大鼠纤维化的移植肾中高表达,通过抑制 Smurf1 的表达可以抑制移植肾间质纤维化进程。因此, Smurf1 的泛素化降解蛋白的作用,对于不同的目标或者不同的生理情况下,其所发挥的生物学作用是否存在差异?本研究旨在探究 Smurf1 对增生性疤痕形成中纤维化进程的影响及分子机制,以期为临床上治疗增生性疤痕提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 Lipofectamine™ 2000 试剂盒购自美国 Invit-

rogen 公司(货号 11668030)。苏木素伊红(HE)染色试剂盒(货号 G1120)、改良 Masson 三色染色试剂盒(货号 G1346)、动物组织/细胞总蛋白提取试剂盒(货号 BC3790)和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号 PC0020)均购自北京索莱宝科技有限公司。pcDNA3.1+Smurf1 质粒、si-NC 和 si-Smurf1 均委托上海吉玛制药技术有限公司设计合成。RT- 反转录试剂盒(货号 RR036A)和 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(货号 RR820A)均购自日本 TAKARA 公司。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(C1062M)购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.1.2 临床样本收集 收集 2021 年 6 月至 2022 年 6 月间空军军医大学第二附属医院烧伤整形科行增生性疤痕切除手术患者的疤痕组织及正常皮肤标本各 12 例,标本的获取流程均已取得患者同意,并通过空军军医大学第二附属医院伦理委员会的批准。标本纳入标准:① 临床确诊为增生性疤痕,并同意接受切除手术;② 疤痕外观正常,突出高于正常皮肤平面,而且病变未超出损伤范围;③ 病程 3~6 个月,且疤痕处未使用抗疤痕药物或其他方式治疗。排除标准:① 排除疤痕疙瘩;② 患有全身器质性疾病;③ 疤痕处有其他感染病灶。

1.2 方法

1.2.1 人增生性疤痕成纤维细胞(HSF)分离培养与鉴定 取部分增生性疤痕组织无菌处理后,参考文献^[12]所述方法采取组织块法分离培养获取人增生性疤痕成纤维细胞(Hypertrophic scar fibroblasts, HSF)。无菌超净工作台中,采用含 1%青霉素和链霉素的无菌 PBS 溶液多次冲洗增生性疤痕组织,去除血污,并分离保留白色真皮组织。将组织剪成长宽各为约 3 mm 大小的组织块,加入胰蛋白酶消化处理 4 h,然后将组织块转接至细胞培养皿,加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,于 37℃ 和 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 1 周。更换新鲜培养液,然后每 3 d 更换一次培养液,待贴壁细胞密度到 80%~90%,加入胰酶消化后,以 1:3 传代培养。取第 3~5 代细胞,采用免疫荧光染色法检测波形蛋白表达情况以鉴定 HSF 细胞。后续实验均取第 3~5 代处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 细胞分组和转染处理 将已鉴定的 HSF 细胞分组如下:① Smurf1 过表达分组:对照 1 组(Con-1 组),空载体组

(Vector 组)和 Smurf1 过表达组(OE-Smurf1 组);② Smurf1 干扰表达分组:对照 2 组(Con-2 组),阴性组(si-NC 组),Smurf1 干扰表达组(si-Smurf1 组)。取第 3~5 代处于对数生长期的 HSF 细胞,严格按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒的说明书方法,分别将 pcDNA3.1 空质粒、pcDNA3.1+Smurf1 质粒、si-NC 和 si-Smurf1 转染至 Vector 组、OE-Smurf1 组、si-NC 组和 si-Smurf1 组 HSF 细胞,Con-1 组和 Con-2 组 HSF 细胞均不做转染处理。各组细胞转染完成后,继续培养,48 h 后收集细胞,采用 qRT-PCR 鉴定转染效率,以及后续实验。

1.2.3 苏木精-伊红(HE)染色检测 取部分增生性瘢痕组织,加入 4%的多聚甲醛室温固定处理 24 h,双蒸水冲洗组织块 3 次,然后乙醇浓度梯度(50%、75%、85%、95%和 100%)依次脱水处理,然后透明再石蜡包埋,切成 4 μm 的切片备用。按照 HE 染色试剂盒所述操作步骤,对切片进行脱蜡至水,乙醇不同浓度梯度处理,然后滴加苏木素染色 5 min,双蒸水流水冲洗,滴加伊红染色 2 min,冲洗至清水后,再经过乙醇不同浓度梯度处理以及二甲苯透明处理,晾干后采用中性树胶封片,于光学显微镜下观察和拍照记录。

1.2.4 Masson 三色染色检测 取已制备好的切片,常规脱蜡和水化,按照改良 Masson 三色染色试剂盒所述操作步骤,加入媒染液浸没切片,室温下过夜处理,切片经双蒸水流水冲洗,滴加天青石蓝染液处理 3 min,水洗后滴加 Mayer 苏木素染液处理 3 min,水洗切片后滴加酸性分化液处理 10 s,然后分别依次滴加丽春红品红染液和磷酸铝溶液各处理 10 min,去除染液后再滴加苯胺蓝染液处理 5 min,然后滴加弱酸溶液清洗苯胺蓝后,再经过 95%和无水乙醇各脱水 1 次处理,二甲苯透明处理后,采用中性树胶封片,于光学显微镜下观察和拍照记录。

1.2.5 qRT-PCR 检测 Smurf1 表达水平 转染后各组细胞继续培养,48 h 后收集细胞,采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,按照 TAKARA 的 RT- 反转录试剂盒所述操作步骤,以总 RNA 为模板获取 cDNA。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒所述操作步骤,以 cDNA 为模板进行 PCR 反应,采用 25 μL 反应体系,程序为:95℃预变性 40 s;95℃变性 5 s,60℃退火 40 s,40 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 Smurf1 相对表达量,以 GAPDH 作为内参基因。Smurf1,上游引物 5'-CACTCCGCCAGTGCTTTTCAGTA-3',下游引物 5'-AATTC-GATCTGGTGGCAGACTC-3'。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达水平 取部分增生性瘢痕组织,以及收集的各组细胞,经过 RIPA 裂解液处理后,按照动物组织/细胞总蛋白提取试剂盒提取总蛋白,然后 BCA 法进行蛋白定量。经过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白条带后,依次经过转膜和 5%脱脂牛奶封闭处理后,再分别加入对应反应的一抗 Smurf1 (1:1000)、TGF- β 1 (1:500)、 α -SMA (1:1000)、COL1 (1:1000)、COL3 (1:1000)、T β R-I (1:2000)、p-Smad3 (1:1000)和 Smad7(1:1000),4℃过夜孵育处理,TBST 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔的二抗(1:3000),室温孵育 2 h,TBST 洗膜后,加入 ECL 发光液然后曝光凝胶成像和拍照,采用 Image J 分析蛋白条带相对表达量,以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.2.7 CCK-8 检测细胞增殖水平 各组细胞转染完成后,加入培养基稀释调整细胞密度为 10^5 个/mL,按照每孔 100 μL 的量

接种至 96 孔板,每组 10 个重复,于 37℃和 5% CO_2 的细胞培养箱中过夜培养,然后每孔加入 100 μL 浓度为 10%的 CCK-8 工作液,继续培养 2 h 后采用酶标仪检测 450 nm 处吸光度。各组细胞分别在转接后 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 取样检测,根据结果绘制细胞增殖曲线。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡水平 转染后各组细胞继续培养,48 h 后收集细胞,加入 0.25%的胰蛋白酶消化处理后,再加入 195 μL 的 Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,再依次加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 10 μL 的 PI 溶液轻柔混匀,于室温下避光孵育 15 min,然后流式细胞仪上机检测各组细胞凋亡率。

1.2.9 Transwell 实验检测细胞侵袭水平 取 1 倍体积融化后的 Matrigel 胶与 9 倍体积的 DMEM 培养基(不含血清)充分混合稀释,然后取 100 μL 铺于 Transwell 小室的上室,37℃环境下凝固待用。转染后各组细胞继续培养,48 h 后收集细胞,加入 0.25%的胰蛋白酶消化处理后,采用不含血清的 DMEM 培养基重悬细胞,调整密度约为 2×10^5 个/mL。每个 Transwell 上室加入 100 μL 细胞液,每个下室加入 500 μL 的 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清),细胞培养箱中培养 48 h。然后 4%多聚甲醛固定下室,PBS 洗涤后再结晶紫染色处理 30 min,PBS 洗涤后自然晾干,于光学显微镜下观察和拍照记录,采用 Image J 软件对侵袭细胞数量进行统计。

1.2.10 细胞划痕实验检测细胞迁移水平 收集转染后各组处于对数生长期的细胞,采用胰蛋白酶消化后,转接至 6 孔板于细胞培养箱中培养 48 h。待镜下观察细胞密度达 100%时,于无菌超净工作台中,采用 200 μL 的枪头垂直于培养基平面由上而下快速划出划痕。加入灭菌处理的 PBS 溶液洗涤 1 次,处理脱落的细胞,然后每孔加入等量的 DMEM 培养基(含 2%胎牛血清),然后转移至细胞培养箱中继续培养,分别于 0 h 和 24 h 这两个时间点于光学显微镜下观察和拍照记录,采用 Image J 软件分析细胞迁移相对宽度。

1.3 统计学分析

本研究所有实验均独立重复 5 次,所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示,采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。采用 t 检验进行两组间比较,单因素方差分析进行多组间比较。 $P < 0.05$ 表示为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 增生性瘢痕组织病理学染色检查

HE 染色结果显示,正常皮肤组织中表皮层和真皮层排列整齐,真皮层内乳头状真皮层和网状真皮层之间显示出清晰的边界,且成纤维细胞较少;增生性瘢痕组织其真皮层厚度显著增加,乳头层和网状层之间的边界因瘢痕组织的替换而消失,且真皮层内胶原纤维增加、排列紊乱。Masson 染色结果显示,与正常皮肤组织相比,增生性瘢痕组织的真皮层厚度显著增加,真皮层中存在大量被染成蓝色的胶原纤维,且相互交织,排列紊乱且致密。见图 1。

2.2 增生性瘢痕组织中纤维化标志物的表达水平变化

与正常皮肤组织相比,增生性瘢痕组织中 TGF- β 1、 α -SMA、COL1 和 COL3 的蛋白表达水平均升高($P < 0.05$)。见图 2。

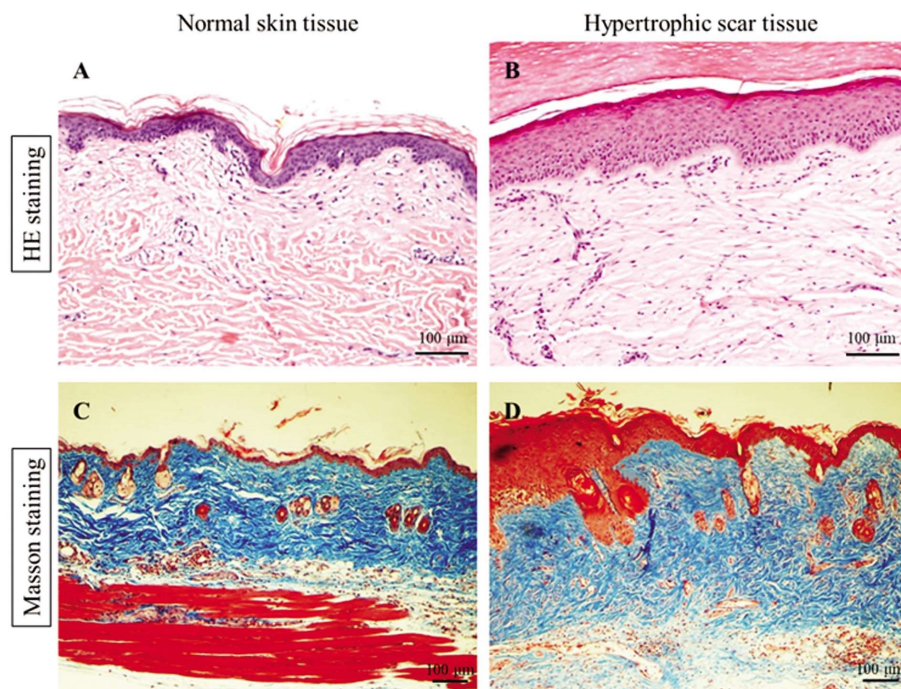


图 1 正常皮肤组织和增生性瘢痕组织 HE 和 Masson 染色检查

Fig. 1 Normal skin tissue and hypertrophic scar tissue were examined by HE and Masson staining

Note: A and B: Normal skin tissue and hypertrophic scar tissue were examined by HE staining;

C and D: Normal skin tissue and hypertrophic scar tissue were examined by Masson staining.

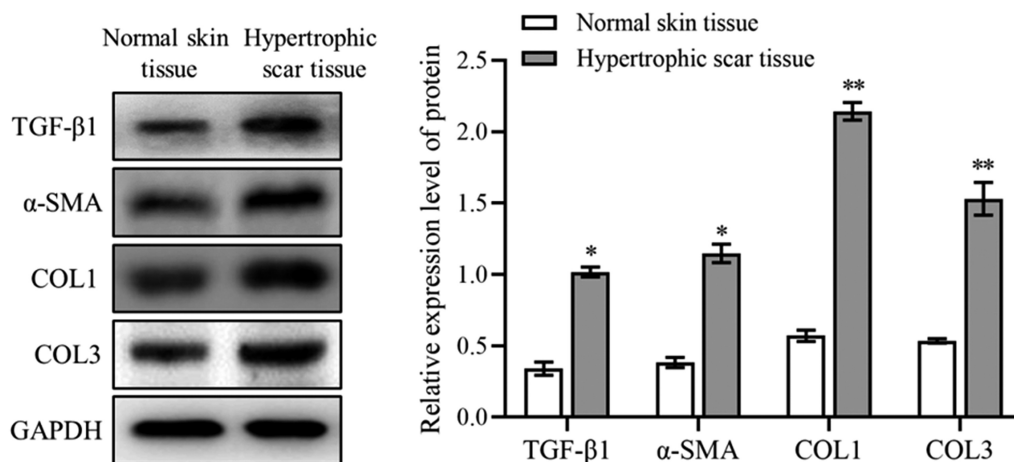


图 2 正常皮肤组织和增生性瘢痕组织中纤维化标志物表达水平变化

Fig. 2 Changes in the expression levels of fibrosis markers in normal skin tissue and hypertrophic scar tissue

Note: Compared with normal skin tissue, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 增生性瘢痕组织中 Smurf1 和 TGF-β1/Smads 信号通路相关蛋白表达水平变化

与正常皮肤组织相比,增生性瘢痕组织中 Smurf1 表达水平降低($P < 0.05$),TβR-I,p-Smad3 和 Smad7 的蛋白表达水平平均升高($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 Smurf1 过表达和干扰表达后 HSF 细胞中 Smurf1 表达效率检测

免疫荧光检测结果显示,细胞均呈不规则形态或长梭形,细胞核染色显示蓝色,细胞质因波形蛋白染色显示绿色,上述结果表明分离培养的细胞为人增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)。与 Con-1 组或 Vector 组比较,OE-Smurf1 组 HSF 细胞中

Smurf1 的 mRNA 和蛋白的表达水平均升高 ($P < 0.001$);与 Con-2 组或 si-NC 组比较,si-Smurf1 组 HSF 细胞中 Smurf1 的 mRNA 和蛋白的表达水平均降低($P < 0.01$)。见图 4。

2.5 Smurf1 过表达和干扰表达对 HSF 细胞中纤维化标志物表达水平的影响

与 Con-1 或 Vector 组比较,OE-Smurf1 组 HSF 细胞中 TGF-β1、α-SMA、COL1 和 COL3 蛋白的表达水平均降低($P < 0.05$);与 Con-2 组或 si-NC 组比较,si-Smurf1 组 HSF 细胞中 TGF-β1、α-SMA、COL1 和 COL3 蛋白的表达水平均升高($P < 0.05$)。见图 5 和图 6。

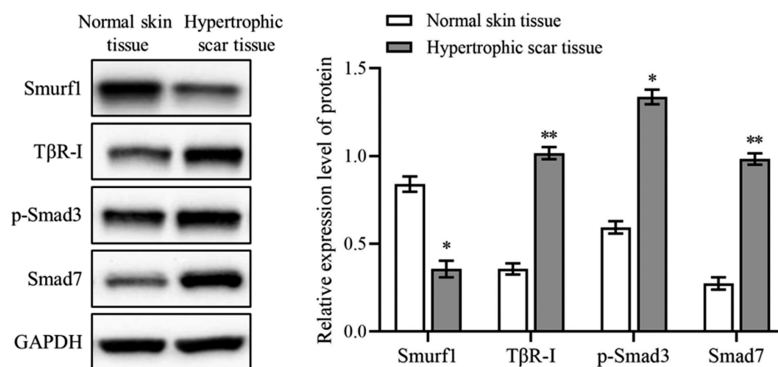


图3 正常皮肤组织和增生性瘢痕组织中 TGF-β1/Smads 信号通路蛋白表达水平变化

Fig. 3 Changes of protein expression levels of TGF-β1/Smads signaling pathway and Smurf1 in normal skin tissue and hypertrophic scar tissue

Note: Compared with normal skin tissue, *P<0.05, **P<0.01.

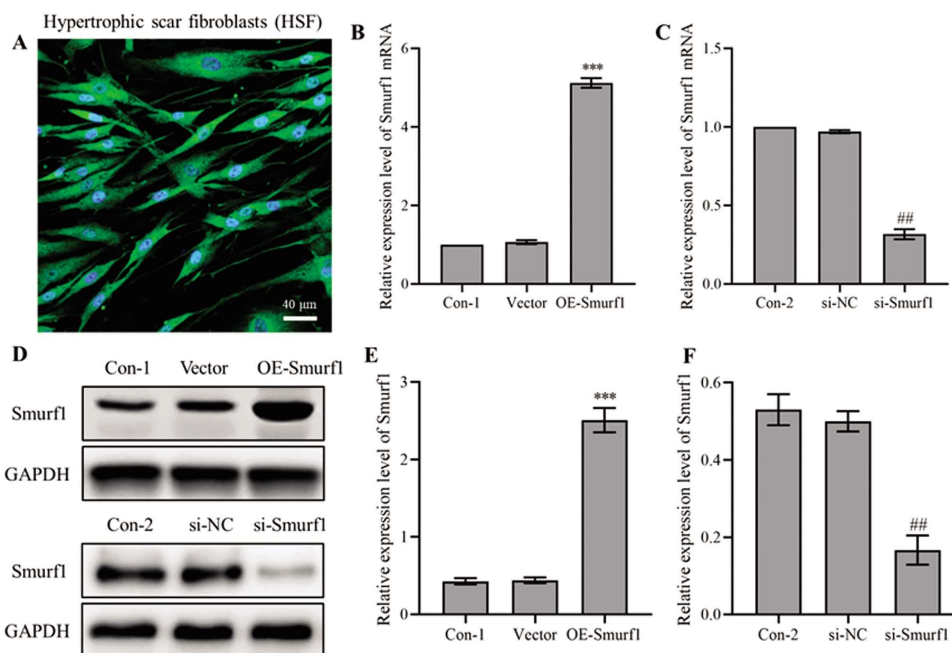


图4 HSF 细胞鉴定以及 Smurf1 过表达和干扰表达转染效率检测

Fig. 4 HSF cell identification and transfection efficiency detection of Smurf1 overexpression and interference expression

Note: A: HSF cells was detected by Immunofluorescence staining; B and C: Smurf1 mRNA expression levels in HSF cells after Smurf1 overexpression and interference expression; D-F: Smurf1 protein expression level in HSF cells after Smurf1 overexpression and interference expression.

Compared with Con-1 and Vector group, ***P<0.001; Compared with Con-2 group and si-NC group, ##P<0.01.

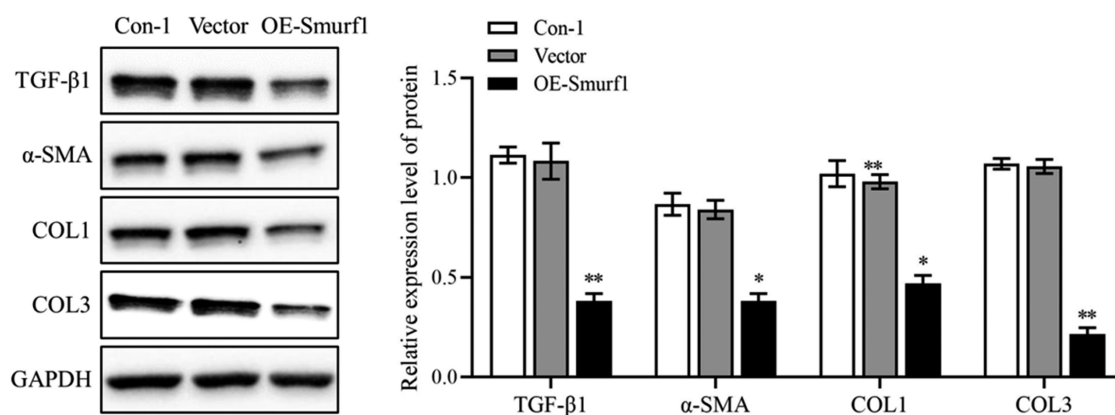


图5 Smurf1 过表达后 HSF 细胞中纤维化标志物表达水平的变化

Fig. 5 Changes in the expression levels of fibrosis markers in HSF cells after Smurf1 overexpression

Note: Compared with Con-1 group and Vector group, *P<0.05, **P<0.01.

2.6 Smurf1 过表达和干扰表达对 HSF 细胞增殖和凋亡的影响

与 Con-1 或 Vector 组比较,OE-Smurf1 组 HSF 细胞增殖水平降低($P<0.05$),凋亡水平升高($P<0.05$);与 Con-2 组或 si-NC 组比较,si-Smurf1 组 HSF 细胞增殖水平升高($P<0.05$),凋亡水平降低($P<0.05$)。见图 7 和图 8。

2.7 Smurf1 过表达和干扰表达对 HSF 细胞侵袭和迁移的影响

与 Con-1 或 Vector 组比较,OE-Smurf1 组 HSF 细胞侵袭和迁移水平平均降低($P<0.05$);与 Con-2 组或 si-NC 组比较,si-Smurf1 组 HSF 细胞侵袭和迁移水平平均升高($P<0.05$)。见图 9 和图 10。

2.8 Smurf1 过表达和干扰表达后对 HSF 细胞中 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响

与 Con-1 或 Vector 组比较,OE-Smurf1 组 HSF 细胞中 T β R-I、p-Smad3 和 Smad7 的蛋白表达水平均降低($P<0.05$);与 Con-2 组或 si-NC 组比较,si-Smurf1 组 HSF 细胞中 T β R-I、

p-Smad3 和 Smad7 的蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。见图 11 和图 12。

3 讨论

创面愈合是机体皮肤组织正常生理表现,其过程包含止血、炎症、增殖、再上皮化和重塑五个阶段^[1],其中任何一个阶段失调均会造成增生性瘢痕(HS)的发生。增生性瘢痕通常发生在严重烧伤或皮肤创伤后,实际上是一种皮肤伤口愈合的纤维增殖性疾病,表现为肌成纤维细胞活性和胶原沉积。成纤维细胞向肌成纤维细胞的反分化是瘢痕形成的关键过程,其特征是 α -平滑肌肌动蛋白阳性(α -SMA+)成纤维细胞可以刺激胶原合成,特别是 COL1 和 COL3^[13]。而 HS 造成的审美破坏和功能损害,常常会导致患者产生一系列生理或心理问题^[14]。因此,针对增生性瘢痕的发病机制研究是一个长期且急需解决的科学问题。

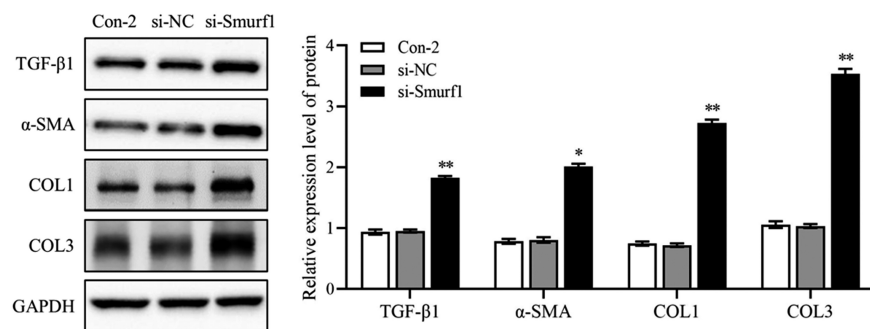


图 6 Smurf1 干扰表达后 HSF 细胞中纤维化标志物表达水平的变化

Fig. 6 Changes in the expression levels of fibrosis markers in HSF cells after Smurf1 interference expression

Note: Compared with Con-2 group and si-NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

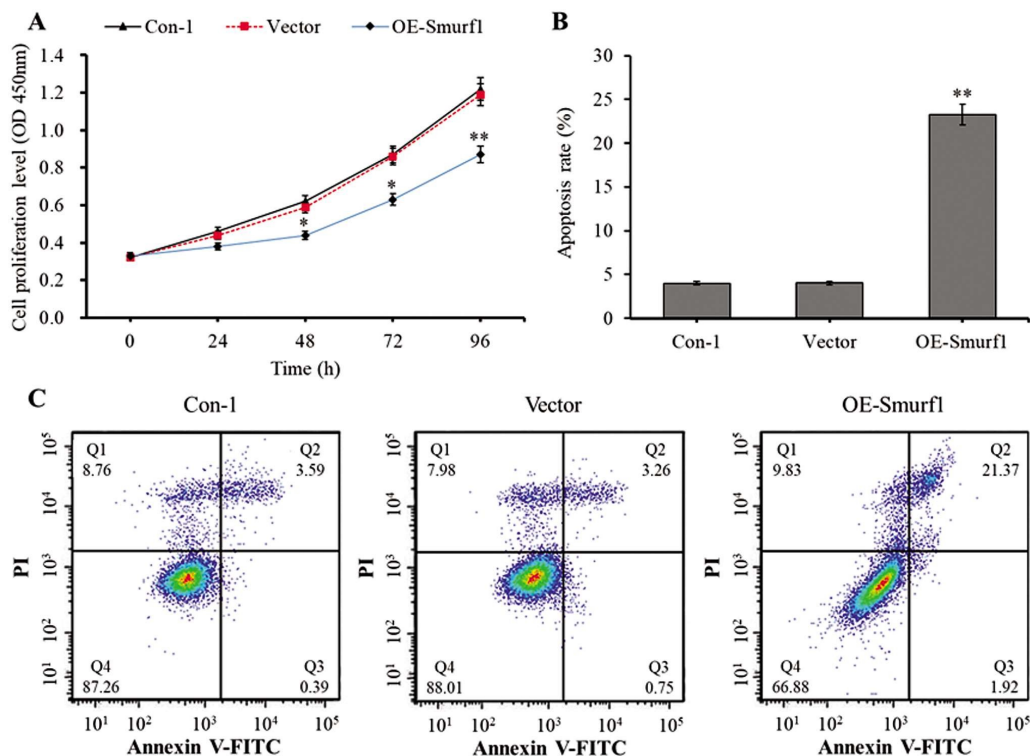


图 7 Smurf1 过表达后 HSF 细胞增殖和凋亡水平的变化

Fig. 7 Changes of HSF cell proliferation and apoptosis after Smurf1 overexpression

Note: A: HSF cell proliferation level; B and C: Apoptosis levels of HSF cells. Compared with Con-1 group and Vector group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

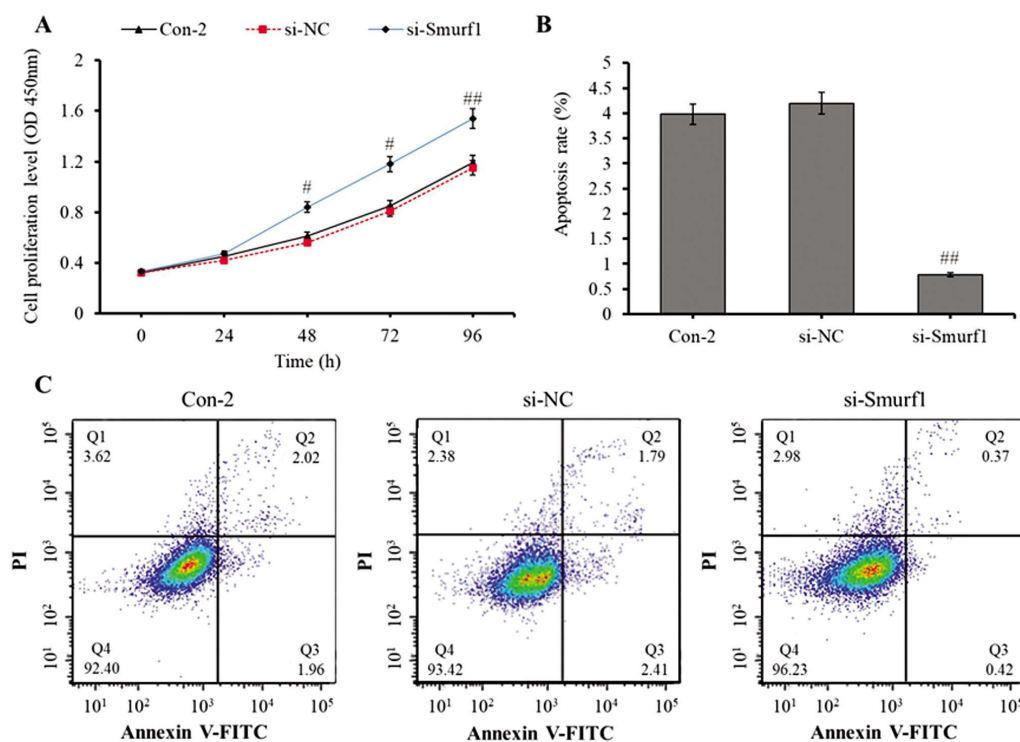


图 8 Smurf1 干扰表达后 HSF 细胞增殖和凋亡水平的变化

Fig. 8 Changes of HSF cell proliferation and apoptosis after Smurf1 interference expression

Note: A: HSF cell proliferation level; B and C: Apoptosis levels of HSF cells. Compared with Con-2 group and si-NC group, ^{##} $P<0.01$.

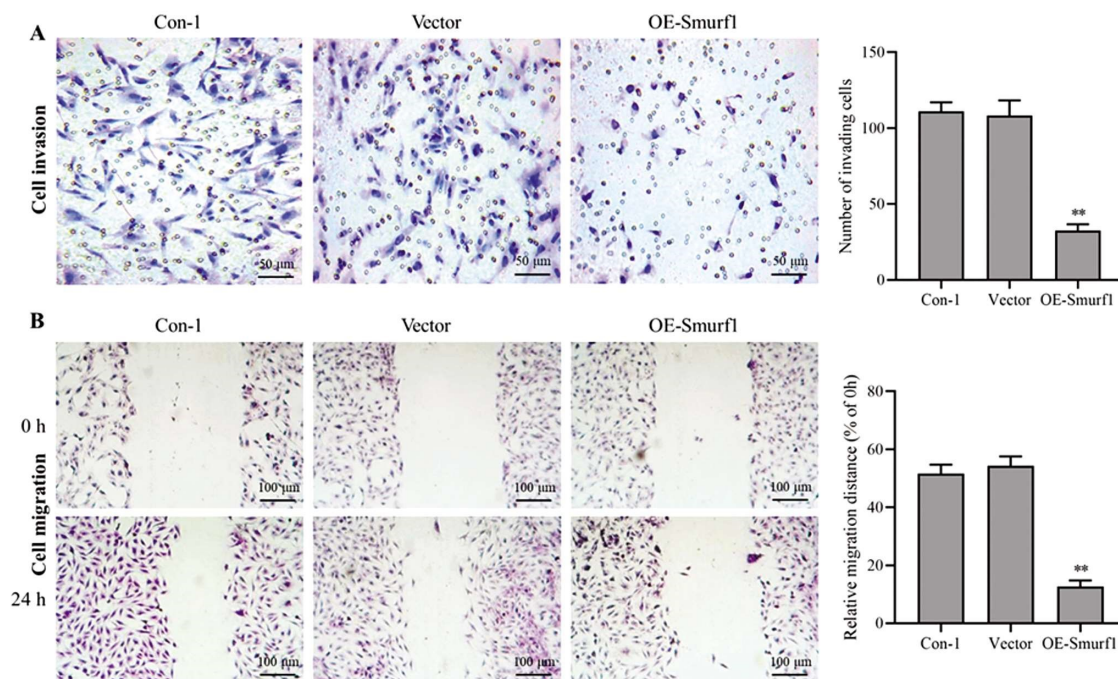


图 9 Smurf1 过表达后 HSF 细胞侵袭和迁移水平的变化

Fig. 9 Changes of HSF cell invasion and migration after Smurf1 overexpression

Note: A: HSF cell invasion level; B and C: HSF cell migration level. Compared with Con-1 group and Vector group, ^{**} $P<0.01$.

增生性瘢痕实际上是成纤维细胞过度增殖,多种细胞外基质合成和沉积导致组织纤维化而形成的,其中涉及最为主要的是 TGF- β 1、COL1 和 COL3 这 3 个蛋白的异常表达。众多研究表明,TGF- β 1 对细胞生长和胶原合成至关重要,TGF- β 1 的表达在瘢痕疙瘩成纤维细胞中显著升高^[15]。此外,如细胞外基质

合成基因胶原 I、 α -SMA 和基质金属蛋白酶等细胞因子,在瘢痕或疙瘩的发病和复发过程中均存在异常表达,这些细胞因子参与介导瘢痕疙瘩成纤维细胞中的一系列反应,包括成纤维细胞生长、ECM 的产生和积累、炎症浸润和基质重塑等^[16,17]。因此,减少相关细胞因子的产生或抑制其信号通路可能为瘢痕疙

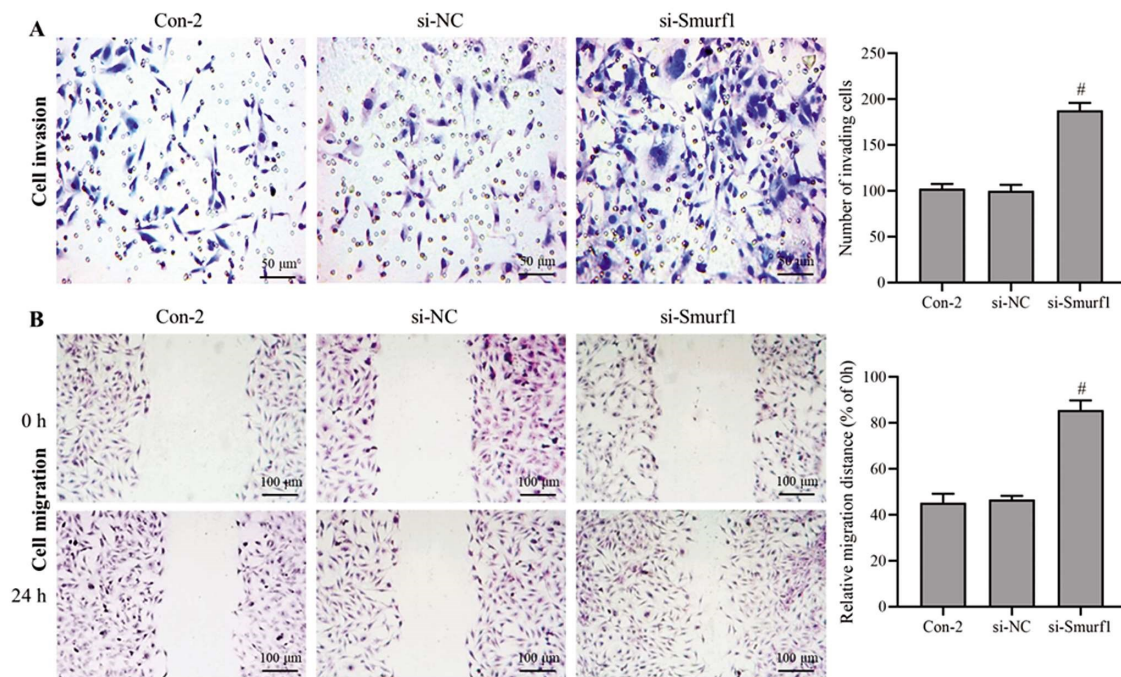


图 10 Smurf1 干扰表达后 HSF 细胞侵袭和迁移水平的变化

Fig. 10 Changes of HSF cell invasion and migration after Smurf1 interference expression

Note: A: HSF cell invasion level; B and C: HSF cell migration level. Compared with Con-2 group and si-NC group, [#] $P < 0.05$.

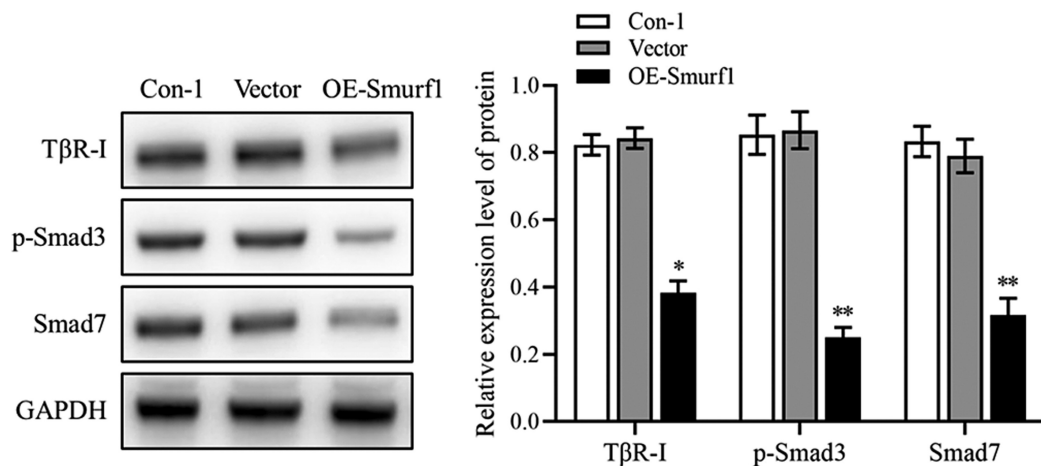


图 11 Smurf1 过表达后 HSF 细胞中 TGF-β1/Smads 信号通路蛋白表达水平变化

Fig. 11 Changes of TGF-β1/Smads signaling pathway protein expression in HSF cells after Smurf1 overexpression

Note: Compared with Con-1 group and Vector group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

瘡的治疗提供一种潜在的方法。黄玉成等^[18]研究发现隐丹参酮可以降低 HSF 细胞中 TGF-β1、α-SMA、Col1 和 Col3 的表达水平,并抑制 HSF 细胞的增殖;Xiao 等^[19]发现,过表达 miR-564 可以上调 TGF-β1 的表达水平,进而促进增生性瘢痕的形成。本研究通过分析人增生性瘢痕组织和正常皮肤组织,结果发现增生性瘢痕组织中 TGF-β1、α-SMA、COL1 和 COL3 均存在异常高表达,该结果证明这几个细胞因子在增生性瘢痕纤维化进程中起到积极促进作用。

TGF-β1 作为最强的促纤维化效应分子,其主要是通过 TGF-β1/Smads 信号通路发挥促纤维化作用^[8]。TGF-β1 通过与跨膜 TGF-β 型 II 受体(TGF-β type II receptor, TβR-II)结合进而激活 TGF-β 型 I 受体(TGF-β type I receptor, TβR-I),被激活的跨膜受体 TβR-I 与 Smad2/3 结合并使其磷酸化,然后跨膜

受体 TβR-I 分离,磷酸化的 Smad2/3 再与 Smad4 共同形成三聚体复合物入核调控生物过程^[20]。而 Smad7 可以竞争性结合活化的 TβR-I,并抑制 Smad2/3 的磷酸化,因此 Smad7 成为 TGF-β1/Smads 信号通路的负向调控因子^[21]。Smad 泛素化调节因子 Smurf1 和 Smurf2 可以通过对 Smad7 等 Smad 类蛋白水平的调节,进而正向或负向调控 TGF-β1 信号通路的传导^[9],但 Smurf1 对于 TGF-β1/Smads 信号通路的调控作用对于不同组织或生理情况下存在差异。Li 等^[22]的研究发现,在小鼠胚胎中 Smurf1 诱导 TβR-I 的蛋白酶体降解,从而拮抗 TGF-β1/Smad 信号;黄洁玉等^[23]研究显示,Smurf1 在大鼠肺纤维化进程中无明显作用,对 TGF-β1/Smad 信号通路无显著影响。本研究中,人增生性瘢痕组织中 Smurf1 蛋白处于低水平,而 TβR-I、p-Smad3 和 Smad7 均高水平,表明增生性瘢痕组织中

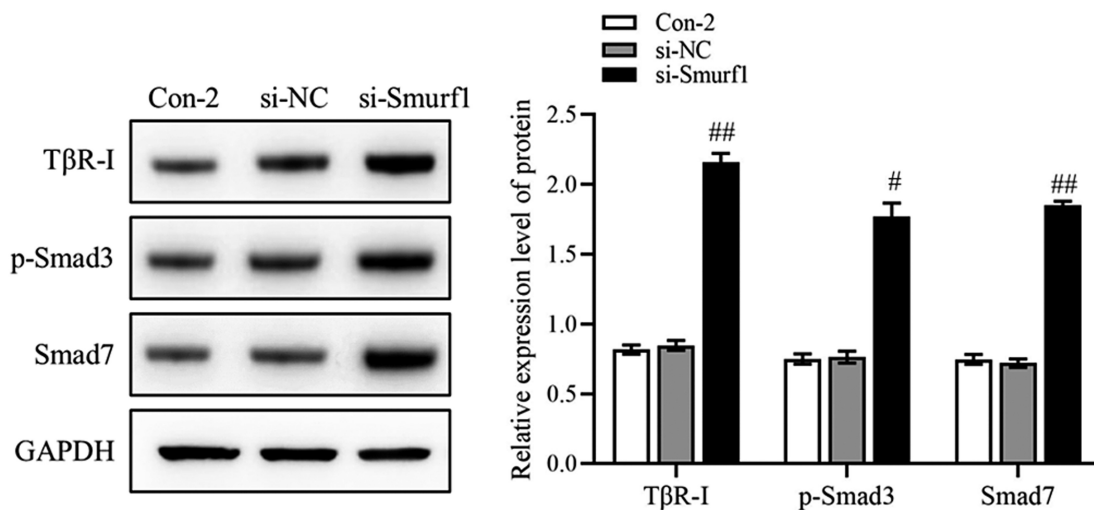


图 12 Smurf1 干扰表达后 HSF 细胞中 TGF-β1/Smads 信号通路蛋白表达水平变化

Fig. 12 Changes of TGF-β1/Smads signaling pathway protein expression in HSF cells after Smurf1 interference expression

Note: Compared with Con-2 group and si-NC group, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01.

TGF-β1/Smad 通路被激活, Smurf1 的调控作用处于相对较弱的地位, 而 HE 和 Masson 染色结果也显示增生性瘢痕组织纤维化程度严重。我们通过分离培养获得 HSF 细胞, 对 Smurf1 采用过表达和干扰表达处理, 分析 Smurf1 对纤维化和 TGF-β1/Smad 通路的调控作用。结果显示, 过表达 Smurf1 后, HSF 细胞中纤维化标志物 TGF-β1、α-SMA、COL1 和 COL3 的表达水平均降低, HSF 细胞的增殖、侵袭和凋亡水平均降低, 而凋亡水平升高, TGF-β1/Smad 通路相关蛋白 TβR-I、p-Smad3 和 Smad7 的表达水平均降低; 而当干扰 Smurf1 表达水平后, HSF 细胞纤维化生物行为进一步增强, 而 TGF-β1/Smad 通路相关蛋白的表达水平也均增强。因此, Smurf1 很有可能是通过抑制 TGF-β1/Smad 通路来抑制增生性瘢痕组织或 HSF 细胞纤维化进程。

另外, 本研究发现人增生性瘢痕组织中 Smad7 蛋白高表达, 我们推测可能是因为瘢痕组织中 Smurf1 水平较低, 导致只能结合少部分的 Smad7 与被激活的 TβR-I 形成复合体后共同泛素化降解, 从而导致 Smad7 在组织内蓄积。总之, 本研究结果表明, Smurf1 可能通过抑制 TGF-β1/Smad 通路, 进而抑制增生性瘢痕的纤维化进程。

参考文献(References)

- [1] Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, et al. Wound healing: A cellular perspective[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 665-706.
- [2] Ogawa R. The most current algorithms for the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids: A 2020 update of the algorithms published 10 years ago[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2022, 149(1): 79-94.
- [3] Edwards J. Hypertrophic scar management[J]. *Br J Nurs*, 2022, 31(20): 24-31.
- [4] Zhang G, Bai R, Huang J, et al. Barbaloin attenuates pulmonary fibrosis through TGF-β1/Smads/p38 pathway[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(8): 1160-1169.
- [5] 傅为武, 欧阳雅蓉, 黄彩依, 等. 基于 TGF-β1/Smads 通路治疗心肌纤维化的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2021, 18(4): 41-44.
- [6] 陈勇, 吴瑞胜, 王竞静, 等. 非编码 RNA 介导 TGF-β₁/Smads 信号通路与肝纤维化及中药活性成分干预研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(7): 252-261.
- [7] 郑康华. TGF-β/Smads 信号通路调控增生性瘢痕影响机制研究[J]. *基层医学论坛*, 2022, (8): 90-92.
- [8] 梁艳, 王丽娟, 吴惠林. miR-425-5p 靶向 TGF-β1/Smad2 信号通路减少小鼠增生性瘢痕组织胶原纤维沉积 [J]. *基础医学与临床*, 2023, 43(3): 393-401.
- [9] 邹俊驹. 从代谢组学及 E3 泛素连接酶 Smurfs 对 TGF-β/Smads 信号传导的调节探讨肾康注射液治疗肾纤维化的机制[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- [10] 李丽, 王宝恩. 肝星状细胞中的 TGFβ 信号转导通路[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(23): 2516-2520.
- [11] 周嘉俊, 桂泽平, 顾民, 等. 硼替佐米通过下调 Smurf1 拮抗大鼠慢性移植肾间质纤维化 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2019, 39(5): 636-642.
- [12] 董亮, 张迪, 方勇. 不同培养条件对人增生性瘢痕成纤维细胞生物学活性的影响[J]. *中华整形外科杂志*, 2018, 34(7): 558-564.
- [13] Perry DM, McGrouther DA, Bayat A. Current tools for noninvasive objective assessment of skin scars [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2010, 126(3): 912-923.
- [14] Coentro JQ, Pugliese E, Hanley G, et al. Current and upcoming therapies to modulate skin scarring and fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 46: 37-59.
- [15] Zhang Y, Cheng C, Wang S, et al. Knockdown of FOXM1 inhibits activation of keloid fibroblasts and extracellular matrix production via inhibition of TGF-β1/Smad pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116637.
- [16] Keskin ES, Keskin ER, Öztürk MB, et al. The effect of MMP-1 on wound healing and scar formation[J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2021, 45(6): 2973-2979.
- [17] Zhang T, Wang XF, Wang ZC, et al. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF-β/Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110287.

(下转第 891 页)

- (6): 585-597.
- [13] 赵震, 秦鸿利, 张红梅. ICU 患者压力性损伤风险因素及评估量表的研究进展[J]. 河南医学研究, 2023, 32(10): 1912-1916.
- [14] Pittman J, Beeson T, Dillon J, et al. Hospital-Acquired Pressure Injuries and Acute Skin Failure in Critical Care: A Case-Control Study[J]. J Wound Ostomy Continence Nurs, 2021, 48(1): 20-30.
- [15] Guan G, Lee CMY, Begg S, et al. The use of early warning system scores in prehospital and emergency department settings to predict clinical deterioration: A systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2022, 17(3): e0265559.
- [16] 陈春燕, 马小容, 杨巍. MEWS 评分联合外周血 cf-DNA/NETs 水平对重症肺炎病情及预后的评估价值 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(18): 1970-1973.
- [17] 陈琼妍, 辛若梅, 潘雪晖. SBAR 联合 MEWS 管理模式在呼吸系统疾病患者的安全管理中的效果观察 [J]. 新疆医科大学学报, 2022, 45(2): 223-227.
- [18] 陈茜. 压疮的评估、预防及治疗进展 [J]. 现代临床医学, 2014, 40(6): 460-462.
- [19] 吴安凤, 韩慧, 周勤学, 等. 营养素对压力性损伤影响的研究进展 [J]. 浙江医学, 2022, 44(15): 1669-1673.
- [20] Sheinenzon A, Shehadeh M, Michelis R, et al. Serum albumin levels and inflammation[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 43(184): 857-862.
- [21] 原炜, 冯杰. 严重创伤患者低白蛋白血症的发生机制及治疗研究 [J]. 创伤外科杂志, 2022, 24(11): 867-872.
- [22] Belcher DA, Williams AT, Munoz CJ, et al. Attenuating ischemia-reperfusion injury with polymerized albumin [J]. J Appl Physiol (1985), 2022, 132(2): 489-496.
- [23] 周杰, 芦戟, 李波, 等. 颅内压、颅温及血清 D-二聚体、白蛋白预测重型颅脑损伤患者术后短期预后的临床价值研究[J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(24): 4772-4776.
- [24] 李刚, 朱春凯, 郑培明. miR-499、miR-16、肌红蛋白与常规心肌损伤标志物的关系及在急性心肌梗死早期诊断中的价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(6): 728-732.
- [25] Traa WA, Strijkers GJ, Bader DL, et al. Myoglobin and troponin concentrations are increased in early stage deep tissue injury [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2019, 11(92): 50-57.
- [26] 王延庆, 韩玉珍, 黄立锋. 血清肌红蛋白监测的临床意义 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(24): 3859-3863.
- [27] Nasir NJM, Heemskerk H, Jenkins J, et al. Myoglobin-derived iron causes wound enlargement and impaired regeneration in pressure injuries of muscle[J]. Elife, 2023, 7(12): e85633.
- [28] 高娟, 罗嫚丽, 梁美景, 等. 重症监护室患者压力性损伤的危险因素及 Braden 评分和经皮氧分压的预测价值分析[J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(16): 3163-3167.

(上接第 857 页)

- [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, 2022, 31(4): 351-358.
- [19] Xiao L, Tang T, Huang Y, et al. MiR-564 promotes hypertrophic scar formation through TGF- β 1 upregulation [J]. G Ital Dermatol Venereol, 2019, 154(2): 186-191.
- [20] 涂龙翔. USP15 靶向调控 TGF- β /Smad 信号通路在增生性瘢痕形成中的作用与分子机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2021, 1-2.
- [21] Xiao H, Li B, Yang X, et al. Interference of TGF- β 1/Smad7 signal pathway affects myocardial fibrosis in hypertension [J]. Pak J Pharm Sci, 2020, 33(6): 2625-2631.
- [22] Li YH, Cui C, Xie F, et al. VprBP mitigates TGF- β and Activin signaling by promoting Snurf1-mediated type I receptor degradation [J]. J Mol Cell Biol, 2020, 12(2): 138-151.
- [23] 黄洁玉, 张敏. Smad 泛素化调节因子和 Arkadia 在大鼠肺纤维化中的作用研究[J]. 中国医药, 2019, 14(1): 121-125.