论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.008

黄芪总苷液对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖凋亡的影响*

付 昱,张 良,陈 娜,严 志,杨 静
(湖北省武汉市第一医院皮肤科 430022)

[摘要] **目的** 探讨黄芪总苷液对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖与凋亡的影响。**方法** 不同浓度黄芪总苷液(10、20、40 ng/mL)干预瘢痕疙瘩成纤维细胞,噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖;实时(real-time)PCR 测定成纤维细胞凋亡抑制基因 survivin 及细胞凋亡因子 p53 及 Bcl-2 的表达;Western blot 检测成纤维细胞 survivin、p53 及 Bcl-2 蛋白水平表达。**结果** MTT 法检测发现,与对照组(不加黄芪总苷液)比较,各黄芪总苷液各浓度组细胞 490 nm 处吸光度(A)值明显降低,瘢痕疙瘩细胞增殖均明显受抑制且呈剂量依赖性($P<0.05$)。real-time PCR 及 Western blot 检测结果显示,黄芪总苷液对瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡相关因子 survivin、Bcl-2 有不同程度的抑制作用,对 P53 有不同程度的促进作用,且呈浓度依赖性。**结论** 黄芪总苷液能抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖,调控其凋亡,从而达到有效治疗瘢痕疙瘩的效果。

[关键词] 黄芪总苷液;瘢痕疙瘩;成纤维细胞;survivin;p53
[中图分类号] R285 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2017)06-0746-03

Effects of astragaloside on proliferation and apoptosis of keloid fibroblasts*

Fu Yu, Zhang Liang, Chen Na, Yan Zhi, Yang Jing
(*Department of Dermatological, First Hospital of Wuhan city, Wuhan, Hubei* 430022, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of astragaloside on proliferation and apoptosis in human keloid fibroblasts. **Methods** The human keloid fibroblast cells were treated with different concentration of astragaloside(10、20、40 ng/mL). Cell proliferation was detected by MTT, the gene expreesion levels and protein levels of apoptosis-related proteins, survivin, p53 and Bcl-2, were determined by real-time PCR and Western blot, respectively. **Results** Comparecl with control group(treated with 0 ng/mL astragaloside), the absorbance values (A490 nm) of each concentration group were significantly reduced, which suggest that the proliferation of all keloid fibroblast were markably inhibited in a dose-dependent way ($P<0.05$). The gene expreesion levels and protein levels of apoptosis-related proteins, survivin、Bcl-2 were largely suppressed and P53 were largely promoted in a dose-dependent. **Conclusion** The keloid fibroblasts cells proliferation and apoptosis could be regulated by astragaloside.

[**Key words**] astragaloside; keloid; fibroblasts; survivin; p53

瘢痕疙瘩是一种常见的皮肤纤维组织增生疾病,该病理组织成纤维细胞增殖异常且胶原蛋白异常合成。黄芪总苷是从豆科植物膜荚黄芪或蒙古黄芪中提取出来的主要有效部位[1]。近年来,黄芪的药理作用及其机制有大量研究,学界在黄芪对增生性瘢痕的作用研究中发现了它对瘢痕有明显的抑制作用[2]。因此,深入认识黄芪总苷对人瘢痕疙瘩皮肤成纤维细胞增殖的影响很有必要,本研究以在抑制细胞非程序化凋亡过程中寻找新的治疗方法,为瘢痕疙瘩的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 培养基(Hyclone 公司)。实时荧光定量 PCR(real-time PCR)试剂盒(KAPA 公司),蛋白质 Marker(Thermo 公司),Trizol(Ambion 公司),实时荧光定量 PCR 引物(南京金斯瑞生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 瘢痕疙瘩组织成纤维细胞的培养 取手术切除的瘢痕疙瘩组织,将表皮和皮下组织去除干净后用少量含有 15% 胎牛血清 DMEM 培养液于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中进行原代培养。取第 3~6 代生长状态良好、对数生长期的细胞进行研究。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)法检测瘢痕成纤维细胞的增殖 取对数生长期的瘢痕成纤维细胞,加入不同浓度的黄芪总苷液(10、20、40 ng/mL),24 h 后观察细胞形态学,收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,分别接种于 96 孔板,每孔 180 μL,每种细胞每块板接种 3 个同样的孔作为复孔,1×10^3~5×10^3 个/孔,以 100 μL 培养液做空白对照,37 ℃培养过夜;按分组加入不同浓度的黄芪总苷液,继续培养适当时间。小心吸去上清液,加入 90 μL 新鲜培养液,再加入 10 μL MTT 溶液,继续培养 4 h。然后吸掉上清液,每孔加入 110 μL Formazan 溶解液,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度(*A*)。同时设置对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、Formazan 溶解液),每组设定 3 个复孔。细胞生长抑制率(%)=(1-试验组 *A* 值/空白对照组 *A* 值)×100%。

1.2.3 real-time PCR 细胞总 RNA 提取严格按 Trizol 提取液说明书进行,按照相应的 PCR 试剂盒逆转录合成 cDNA;按表 1 引物进行 real time-PCR 扩增。扩增条件:预变性 95 ℃ 5 min;变性 95 ℃ 1 min,退火 58 ℃ 1 min,延伸 72 ℃ 90 s,循环 35 次;最后 72 ℃ 7 min 延伸。

1.2.4 Western blot 检测 于加药后 24 h 收集各实验组细胞,以含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液分别处理细胞,收集细胞总蛋白,BCA 法定量后经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺

* 基金项目:武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WZ15Z09)。 作者简介:付昱(1977-),主治医师,硕士,主要从事皮肤外科及美容学相关研究。

凝胶电冰(SDS-PAGE),电转膜,免疫抗体反应,最后化学增强发光法(ECL)显带。

表 1　RT-PCR 所用引物序列

基因	引物	扩增片段长度(bp)
β-actin	上游 5′-CCACTCCTCCACCTTTG-3′	271
	下游 5′-CACCACCCTGTTGCTGT-3′	
p53	上游 5′-TACTCCCCTGCCCTCAACAAGA-3′	143
	下游 5′-ACAACCTCCGTCATGTGCTGTG-3′	
Bcl-2	上游 5′-TGGGATGCCTTTGTGGAACTAT -3′	328
	下游 5′-GCTGATTTGACCATTTGCCTGA -3′	
survivin	上游 5′-AGGAAAGCGCAACCGGACG-3′	250
	下游 5′-GCTCCGGCCAGAGGCCTCAA-3′	

1.3　统计学处理　采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　MTT 法检测各组细胞增殖活性　不同浓度的黄芪总苷液处理 24、48、72 h 后,通过 MTT 法检测发现 A 值明显降低,瘢痕疙瘩细胞增殖均明显受抑制,且呈剂量依赖性($P<0.05$),见图 1。

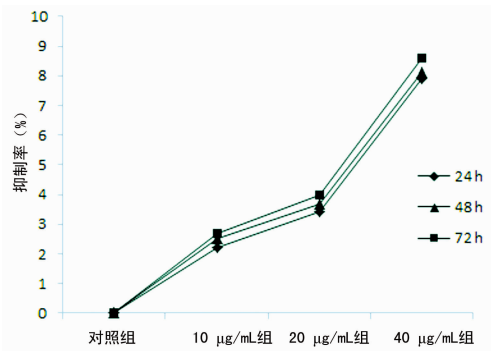

图 1　黄芪总苷液对成纤维细胞增殖的作用

2.2　Western blot 检测结果　不同浓度的黄芪总苷液处理 24 h 后,survivin、p53、Bcl-2 蛋白的表达水平与黄芪总苷液呈药物浓度依赖性,随着药物浓度增高,survivin、Bcl-2 蛋白表达水平降低,P53 蛋白表达水平增高。survivin 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中高表达。见图 2。

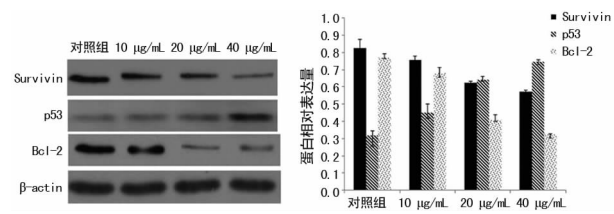

图 2　不同浓度黄芪总苷液干预的成纤维细胞中 survivin、p53、Bcl-2 蛋白表达

2.3　real-time PCR 检测结果　不同浓度的黄芪总苷液处理 48 h 后,瘢痕疙瘩细胞 survivin、Bcl-2 的表达水平见图 3。黄芪总苷液与 survivin、p53、Bcl-2 呈药物浓度依赖性,随着药物浓度增高,survivin、Bcl-2 基因表达水平降低,P53 基因表达表水升高,与蛋白表达结果一致。

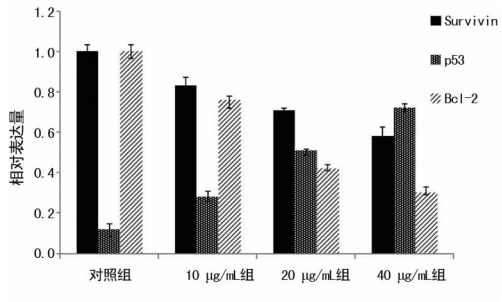

图 3　不同浓度黄芪总苷液干预的成纤维细胞中 survivin、p53、Bcl-2 mRNA 表达

3　讨　　论

瘢痕疙瘩是皮肤创伤后增殖异常的一种特殊瘢痕[3],是创面愈合后形成的良性肿瘤。目前有很多方法治疗瘢痕疙瘩,但无一种方法持久有效。随着细胞生物学和分子生物学技术的迅猛发展,试验研究表明瘢痕疙瘩的病理特征是成纤维细胞的过度增殖和胶原蛋白的过度累积[4],高表达的生长因子受体[5],成纤维细胞增生及凋亡、胶原、胞外基质合成等生理活动失衡。在多种发病机制中,成纤维细胞的增殖及凋亡水平失衡占重要地位,因此通过基因工程手段有目标地针对性诱导改变瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖与凋亡水平成为治疗瘢痕疙瘩的新途径。

survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis of protein,IAP)家族成员,是迄今为止发现的最强凋亡抑制因子之一[6]。survivin 在人类肿瘤细胞系(如肺癌细胞、胰腺癌细胞、乳腺癌细胞)中高表达,其异常表达与肿瘤细胞增殖、发展、血管生成、抗治疗及预后不良相关。潜在的分子机制研究表明,survivin 参与了细胞质分裂和细胞周期相关因子的调节[7],促进 survivin 的表达水平可以使 YAP(Yes-associated protein)核蛋白发生累积,促使阿霉素诱导细胞衰老[8]。survivin 抑制剂 YM155 能通过上调电压依赖型 K^+ 通道促进肺动脉平滑肌细胞的凋亡[9]。于冬梅等[10]研究发现瘢痕中 survivin 过度表达能抑制促凋 2 蛋白的活化,导致细胞凋亡过程关键酶的异常表达。Cao 等[11]前期工作发现瘢痕疙瘩中 survivin 的表达明显高于正常皮肤,推测与细胞凋亡有关的 survivin 因子可以作为瘢痕疙瘩的潜在治疗新靶点。survivin 基因能抑制成纤维细胞的程序化死亡,从而导致细胞增殖异常及恶性转化[12],与瘢痕疙瘩的形成有密切联系。

细胞凋亡因子 p53 是最常见的肿瘤抑制基因,能引起细胞周期阻滞、细胞衰老凋亡,影响癌细胞的发展[13]。p53 可以作为针对乳腺癌治疗的候选靶基因[14],有超过 50%的人类癌症体细胞中 p53 发生了突变[15]。在一些非皮肤恶性肿瘤中,基因突变率为 46.7%～95.0%,而在皮肤瘢痕肿瘤细胞中的突变率更低,但皮肤瘢痕肿瘤细胞多由于烧伤、烫伤或机械性创伤等损伤后细胞过度增生引起,这可能是细胞发生基因突变的诱导因素[16]。p53 突变能通过线粒体和内质网两种体内信号途径来调控细胞[17],在发生 DNA 损伤的情况下,p53 诱导下游通路 Bcl-2、bax 等蛋白表达,从而调节细胞周期和凋亡[18]。瘢痕疙瘩成纤维细胞中 Bcl-2 蛋白的表达较正常皮肤明显增加,抑制了 Cyt-C 的释放,导致线粒体膜通透性降低,进而影响线粒体途径下游凋亡信号的传递[19]。

黄芪有多种药理作用,如影响代谢、抗氧化、抗衰老和抗肿

瘤等[20]。黄芪根部植物化合物质能保护皮肤组织免受紫外线的损伤[21]，黄芪萃取物在小鼠结肠癌移植瘤模型中的研究显示，黄芪萃取物对肿瘤细胞有良好的抑制作用且对动物无明显毒副作用[22]。黄芪多糖可以通过 TLR-4 调控 RAW364.7 细胞因子-蛋白激酶 MAPKS 及核转录因子 NF-κB 的表达水平[23]。黄芪在肿瘤细胞中对细胞因子 TGF-β 表达具有一定的影响，因此黄芪在肿瘤中的应用成为近期研究热点。有研究显示，黄芪对肿瘤微环境中的巨噬细胞有较好的调节作用，而巨噬细胞增多与肿瘤患者良好预后相关，能干扰抗肿瘤免疫[24]。

本实验中，黄芪总苷液能明显抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖活性，并呈浓度依赖性。检测凋亡抑制因子 survivin、Bcl-2、促凋亡因子 p53 的表达水平，均与药物浓度呈线性负相关。结合课题前期实验结果，黄芪总苷液通过经典 TGF-β/Smad 通路中过表达 Smad2 及抑制 Smad3 表达水平从而抑制成纤维细胞的生长。确定黄芪总苷液通过调控凋亡相关因子的表达，调节成纤维细胞的增殖、凋亡平衡状态，为治疗瘢痕疙瘩提供理论依据。

参考文献

[1] 黄可儿，赵敏，王建华. 黄芪总苷的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理，2005，16(6)：461-463.

[2] 张艳，邱林，吴清华，等. 黄芪对兔耳增生性瘢痕作用的实验研究[J]. 重庆医科大学学报，2010，35(6)：864-868.

[3] Ogawa R. The most current algorithms for the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids[J]. Plast Reconstr Surg，2010，125(2)：557-568.

[4] 刘丽华，何云飞，杨万军，等. 复方倍他米松联合低浓度 5-氟尿嘧啶治疗瘢痕疙瘩的疗效观察[J]. 重庆医学，2013，42(20)：2364-2365.

[5] Andrews JP，Marttala J，Macarak E，et al. Keloids：the paradigm of skin fibrosis-pathomechanisms and treatment [J]. Matrix Biol，2016，51：37-46.

[6] 马莎，林俊，晋松，等. shRNA 抑制 survivin 基因表达对脐静脉血管内皮细胞增殖与凋亡的影响[J]. 重庆医学，2015，44(35)：4922-4924，4928.

[7] Chen X，Duan N，Zhang C，et al. Survivin and tumorigenesis：molecular mechanisms and therapeutic strategies[J]. J Cancer，2016，7(3)：314-323.

[8] Ma K，Xu Q，Wang S，et al. Nuclear accumulation of yes-associated protein(YAP)maintains the survival of doxorubicin-induced senescent cells by promoting survivin expression[J]. Cancer Lett，2016，375(1)：84-91.

[9] Zhang S，Liu B，Fan Z，et al. Targeted inhibition of survivin with YM155 promotes apoptosis of hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells via the upregulation of voltage-dependent K^+ channels[J]. Mol Med Rep，2016，13(4)：3415-3422.

[10] 于冬梅，郝立君，肖志波，等. survivin 和 caspase-3 在病理性瘢痕成纤维细胞中的表达及其意义[J]. 中国美容整形外科杂志，2008，19(1)：77-80.

[11] Cao Y，Zhang R，Wang X，et al. Is survivin a novel pathway for the treatment and pathogenesis of keloid? [J]. Med Hypotheses，2013，81(3)：389-393.

[12] Arno AI，Gauglitz GG，Barret JP，et al. Up-to-date approach to manage keloids and hypertrophic scars：a useful guide[J]. Burns，2014，40(7)：1255-1266.

[13] Page A，Navarro M，Suarez-Cabrera C，et al. Protective role of p53 in skin cancer：Carcinogenesis studies in mice lacking epidermal p53 [J]. Oncotarget，2016，7(15)：20902-20918.

[14] Ormenisan C，Kubik M，Legrand S，et al. The potential of ki67 and p53 assessment in development of individualized targeted therapy in breast cancer patients[J]. Pathologica，2016，107(3/4)：177-180.

[15] Hanel W，Moll UM. Links between mutant p53 and genomic instability[J]. J Cell Biochem，2012，113(2)：433-439.

[16] 郭瑞珍. 病理性瘢痕和瘢痕癌中 Cx26，Cx32 和 Ras 家族基因突变位点的检测[J]. 中国皮肤性病学杂志，2015，29(2)：118-121.

[17] Giorgi C，Bonora M，Missiroli S，et al. Alterations in mitochondrial and endoplasmic reticulum signaling by p53 mutants[J]. Front Oncol，2016，6：42.

[18] Tan BS，Tiong KH，Choo HL，et al. Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor (BMF)[J]. Cell Death Dis，2015，6(7)：e1826.

[19] 施晓晓，汤謢. 线粒体凋亡途径在瘢痕疙瘩中的作用机制[J]. 中国皮肤性病学杂志，2014，28(11)：1104-1108.

[20] Auyeung KK，Han QB，Ko JK. astragalus membranaceus：a review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers[J]. Am J Chin Med，2016，44(1)：1-22.

[21] Curnow A，Owen SJ. An evaluation of root phytochemicals derived from althea officinalis (marshmallow) and astragalus membranaceus as potential natural components of UV protecting dermatological formulations[J]. Oxid Med Cell Longev，2016，2016：7053897.

[22] Tseng A，Yang CH，Chen CH，et al. An in vivo molecular response analysis of colorectal cancer treated with Astragalus membranaceus extract[J]. Oncol Rep，2016，35(2)：659-668.

[23] Wei W，Xiao HT，Bao WR，et al. TLR-4 May mediate signaling pathways of Astragalus polysaccharide RAP induced cytokine expression of RAW264.7 cells[J]. J Ethnopharmacol，2016，179：243-252.

[24] Fridman WH，Remark R，Goc J，et al. The immune microenvironment：a major player in human cancers[J]. Int Arch Allergy Immunol，2014，164(1)：13-26.

(收稿日期：2016-10-21 修回日期：2016-11-19)