

· 基础研究 ·

## 青蒿素对人皮肤瘢痕疙瘩成纤维细胞的抑制作用及相关机制初探

殷芳<sup>1</sup>, 许瑾<sup>1</sup>, 张蓓蓓<sup>1</sup>, 权哲<sup>1</sup>, 王婷婷<sup>2</sup>, 钱苗<sup>1</sup>, 刘玮<sup>1</sup>, 杜霖儒<sup>1</sup>, 支媛婷<sup>1</sup>, 宋宁静<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>上海市同仁医院, 上海交通大学医学院附属同仁医院皮肤科, 上海 200336; <sup>2</sup>上海交通大学医学院, 上海 200025

**[摘要]** 目的: 探讨青蒿素对人皮肤瘢痕疙瘩成纤维细胞的抑制作用及相关机制。方法: 进行人瘢痕疙瘩成纤维细胞的原代分离、培养和传代。不同浓度青蒿素分别预处理人瘢痕疙瘩成纤维细胞, 每隔24 h用CCK-8法测定细胞增殖情况, 连续测定5 d, 观察药物处理的最佳浓度。后续实验分为空白组、青蒿素组、青蒿素+IL-6组、青蒿素+AG490组, 流式细胞术检测各组早期细胞凋亡率, real-time PCR法检测各组基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)2、MMP9、STAT3 mRNA的表达水平, Western blot法检测各组MMP2、MMP9、STAT3、p-STAT3蛋白的表达水平。结果: 根据CCK-8实验结果选择150 μg/mL青蒿素作用48 h的细胞为后续实验干预浓度和时间。流式细胞术结果显示, 青蒿素组、青蒿素+IL-6组、青蒿素+AG490组早期凋亡细胞百分比明显高于空白组, 青蒿素+IL-6组的早期凋亡细胞百分比低于青蒿素组和青蒿素+AG490组( $P < 0.01$ )。real-time PCR检测结果显示, 与空白组比较, 青蒿素组、青蒿素+IL-6组、青蒿素+AG490组中MMP2、MMP9 mRNA的表达均显著降低( $P < 0.01$ ); MMP2、MMP9 mRNA在青蒿素组、青蒿素+AG490组的表达较青蒿素+IL-6组显著降低( $P < 0.01$ )。Western blot检测结果显示, 与空白组比较, 青蒿素组、青蒿素+IL-6组、青蒿素+AG490组中STAT3、p-STAT3、MMP2、MMP9蛋白的表达均明显降低( $P < 0.01$ ), p-STAT3、MMP2、MMP9蛋白在青蒿素组、青蒿素+AG490组中的表达低于在青蒿素+IL-6组中的表达( $P < 0.01$ )。结论: 青蒿素对瘢痕疙瘩起抑制作用, 其机制可能通过抑制p-STAT3的过度激活来抑制MMP2、MMP9的表达。

**[关键词]** 青蒿素; 瘢痕疙瘩; 基质金属蛋白酶

**[中图分类号]** Q256

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)08-1119-06

doi:10.7655/NYDXBNS20200807

### Preliminary study on the inhibitory effects of artemisinin on human skin keloid fibroblasts and its related mechanism

YIN Fang<sup>1</sup>, XU Jin<sup>1</sup>, ZHANG Beibei<sup>1</sup>, QUAN Zhe<sup>1</sup>, WANG Tingting<sup>2</sup>, QIAN Miao<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, DU Jiru<sup>1</sup>, ZHI Yuanting<sup>1</sup>, SONG Ningjing<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology, Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200336; <sup>2</sup>School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effect of artemisinin on human skin keloid fibroblasts and its related mechanism. **Methods:** Primary isolation, culture and passage of human keloid fibroblasts were performed. Human keloid fibroblasts were pretreated with different concentrations of artemisinin, and cell proliferation was measured by CCK-8 method every 24 hours for 5 consecutive days to observe the optimal concentration of drug treatment. The following experiments were divided into four groups: blank group, artemisinin group, artemisinin+IL-6 group and artemisinin+AG490 group. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate in the early stage of each group, real-time PCR was used to detect the mRNA expression levels of matrix metalloproteinase (MMP)2, MMP9 and STAT3 in each group, and Western blot was used to detect the protein expression levels of MMP2, MMP9, STAT3 and p-STAT3 in each group. **Results:** According to the results of CCK-8, 150 μg/mL artemisinin cells for 48 hours were selected as the concentration and time of follow-up intervention. Flow cytometry results showed that the percentage of early apoptotic cells in artemisinin group,

**[基金项目]** 上海市同仁医院院级课题(TRYJ201609); 上海市长宁区科委课题(CNKW2018Y08); 上海市长宁区卫计委课题(20174Y003); 上海交通大学医工交叉基金(YG2017QN59)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:SNJ3367@shtrhospital.com

artemisinin+IL-6 group and artemisinin+AG490 group was significantly higher than that in the blank group, and the percentage of early apoptotic cells in artemisinin+IL-6 group was lower than that in artemisinin group and artemisinin+AG490 group ( $P < 0.01$ ). Real-time PCR showed that compared with the blank group, the expression of MMP2 and MMP9 mRNA in artemisinin, artemisinin+IL-6 groups, artemisinin+AG490 group were significantly lower ( $P < 0.01$ ). The expressions of MMP2, MMP9 mRNA in artemisinin, artemisinin+AG490 group were lower than in artemisinin+IL-6 group ( $P < 0.01$ ). Western blot showed that compared with the blank group, the expressions of STAT3, p-STAT3, MMP2, MMP9 protein in artemisinin, artemisinin+IL-6 groups, artemisinin+AG490 group were significantly lower ( $P < 0.01$ ). The expressions of p-STAT3, MMP2, MMP9 protein in artemisinin, artemisinin+AG490 group were lower than in artemisinin+IL-6 group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Artemisinin has an inhibitory effect on keloid, and its mechanism may inhibit the expression of MMP2, MMP9 by inhibiting the excessive activation of p-STAT3.

[Key words] artemisinin; keloid; matrix metalloproteinase

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(08): 1119-1124]

瘢痕疙瘩是皮肤科常见病、多发病,好发于耳垂、前胸、上臂、下颌缘等部位,高出皮肤表面,与正常组织界限明显,颜色暗红或紫红,质硬、坚韧,呈现侵袭性生长等症状<sup>[1]</sup>。瘢痕疙瘩是以皮肤受损后成纤维细胞大量增殖以及胶原纤维为主的细胞外基质过度产生和沉积为病理特征的皮肤纤维化疾病<sup>[2]</sup>,阻断细胞的异常增生,促使细胞凋亡,调节胶原蛋白的分泌与降解成为治疗瘢痕疙瘩的关键。研究表明,青蒿素类药物对瘢痕和成纤维细胞具有明显抑制和抗增殖作用<sup>[3-4]</sup>。在瘢痕疙瘩的形成过程中,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)起着十分重要的作用,特别是MMP2(明胶酶A)和MMP9(明胶酶B),是影响胶原降解的主要因素<sup>[5]</sup>。作为信号转导和转录活化因子(signal transducers and activators of transcriptions, STAT)家族的重要成员,STAT3通过相关调控因子,在细胞增殖、存活、凋亡、分化及转移等过程中起重要作用,MMP就是其中的一个下游靶基因<sup>[6-7]</sup>。本研究通过观察青蒿素干预后人瘢痕疙瘩成纤维细胞MMP-STAT3信号转导通路中相关信号分子的表达情况,探讨青蒿素对瘢痕疙瘩的抑制作用及可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胎牛血清(Gibco公司,美国),DMEM(Hyclone公司,美国),胰蛋白酶-EDTA消化液、青链霉素混合液(北京Solarbio公司),青蒿素(桂林南药股份有限公司),CCK-8(SAB公司,美国),Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天),人白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)(Peprotech公司,美国),STAT3抑制剂AG490(Selleck公司,美国),DEPC处理水

(上海基尔顿生物),RNA抽提试剂盒TRIzol(Invitrogen公司,美国),逆转录试剂盒(Fermentas公司,加拿大),SYBR Green qPCR试剂盒(Thermo公司,美国),MMP2、MMP9、STAT3、pSTAT3、GAPDH抗体(CST公司,美国),羊抗兔HRP标记二抗、羊抗小鼠HRP标记二抗(北京中杉金桥公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人瘢痕疙瘩成纤维细胞的原代分离、培养、传代和形态学观察

收集上海市同仁医院皮肤科门诊经病理确诊为瘢痕疙瘩的病例,本研究经本院伦理委员会审核会批准,术前经患者知情同意。所有患者术前均无药物及其他治疗史,无其他严重疾病。采用组织块贴壁法进行瘢痕成纤维细胞的原代培养,其步骤如下:手术切取组织1h内送至实验室,在超净台环境下,将组织用含100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的无血清培养基洗2次。用眼科剪仔细刮除表皮,然后用无血清培养基洗2~3次。将标本用锋利的眼科剪剪碎,使之成为0.5~1.0 mm<sup>3</sup>的组织块,用无血清培养基洗多次,直至液体不再浑浊、无油滴、清亮为止。将组织块放入培养瓶留置30 min,以使组织块干燥并贴附于培养瓶表面。加入含10%~20%的胎牛血清或小牛血清的DMEM高糖培养液,放入5%CO<sub>2</sub>、37℃温箱。3~4 d内不要观察和翻动,以免影响组织块的贴瓶及生长,1周后每天更换培养液1~2次。组织块接种后4~7 d开始长出细胞。当成纤维细胞呈若干大片的、密集细胞集落时,或是成纤维细胞铺满瓶底时,便可进行传代培养。

#### 1.2.2 CCK-8法检测细胞增殖情况

CCK-8法检测不同浓度青蒿素在不同时间对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响,确定青蒿素处理的

药物最佳浓度及作用时间。将处于对数生长期的细胞经胰蛋白酶消化,显微镜下计数后制成  $1.5 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液。分别取 100  $\mu$ L 至 96 孔培养板,每组细胞设 3 个复孔,  $1.5 \times 10^3$  个/孔,以 100  $\mu$ L 培养液做空白对照,37  $^{\circ}$ C 培养过夜。分别加入 100  $\mu$ L 含有 0、50、100、150、200  $\mu$ g/mL 青蒿素的培养基培养细胞。分别在 1、2、3、4、5 d 按 1:10 体积比混合 CCK-8 和无血清培养基,每孔 100  $\mu$ L 加入待测孔中,在 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h;用酶标仪测定 450 nm 波长吸光度。

### 1.2.3 FITC-Annexin V/PI 细胞流式技术检测细胞凋亡

取密度为  $1.5 \times 10^4$  个/mL 的对数生长期瘢痕疙瘩成纤维细胞接种于 6 孔培养板,每孔接种 1 mL,实验分为空白组(细胞不做处理)、青蒿素组(培养基中含有 150  $\mu$ g/mL 青蒿素)、青蒿素+IL-6 组(含有 150  $\mu$ g/mL 青蒿素的培养基中加入 10 ng/mL 的 IL-6)、青蒿素+AG490 组(含有 150  $\mu$ g/mL 青蒿素的培养基中加入 10  $\mu$ mol/L 的 AG490),培养 48 h 后收集细胞,按照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测专用试剂盒说明书操作,收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 Annexin V FITC 试剂 5  $\mu$ L,1 $\times$ Annexin V Binding Buffer 60  $\mu$ L 孵育 10 min 后,加入 PI 试剂 5  $\mu$ L,1 $\times$ Annexin V Binding Buffer 120  $\mu$ L,混匀后于流式细胞仪(美国 BD 公司)检测。正常的活细胞不被 Annexin V-FITC 和 PI 染色;凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-FITC 染色,PI 染色呈阴性;凋亡晚期的细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色;坏死细胞不能被 Annexin V-FITC 染色,只能被 PI 染色。Annexin V 阳性并且 PI 阴性细胞所占百分比,即细胞早期凋亡率。

### 1.2.4 real-time PCR 法检测青蒿素作用下 MMP2、MMP9、STAT3 mRNA 的表达情况

按 TRIzol RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA,逆转录试剂盒合成 cDNA,运用 SYBR Green qPCR 试剂盒,将制备好的 cDNA 进行 real-time PCR 扩增检测相关基因 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。反应程序:95  $^{\circ}$ C,10 min;95  $^{\circ}$ C,15 s;60  $^{\circ}$ C,45 s,40 个循环;95  $^{\circ}$ C,15 s;60  $^{\circ}$ C,1 min;95  $^{\circ}$ C,15 s;60  $^{\circ}$ C,15 s。数据采用仪器自带软件分析(ABI Prism 7300 SDS Software)。

### 1.2.5 Western blot 检测青蒿素作用下 MMP2、MMP9、p-STAT3、STAT3 蛋白的表达情况

按照试剂盒说明书进行。5%脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h 或 4  $^{\circ}$ C 过夜。根据说明书 MMP2 1:1 000,

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物序列

Table 1 Primers for real-time PCR		
名称	引物序列(5'→3')	长度(bp)
MMP2	F:TTGGTGGGAAGCTCAGAAG	139
	R:TTGCGGTCATCATCGTAG	
MMP9	F:GTGGCACCACCACAACATCAC	175
	R:CGCGACACCAAAGTGGATGAC	
STAT3	F:TGTCTAAAGGTCCCTCATC	104
	R:CCATAGTGTGCATCATGTC	
GAPDH	F:AATCCCATCACCATCTTC	218
	R:AGGCTGTTGCATACTTC	

MMP9 1:1 000,p-STAT3 1:2 000,STAT3 1:1 000,GAPDH 1:1 000 稀释抗体,抗体加入封闭液中稀释到所需浓度,室温孵育 2 h 或 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,加相应二抗,室温孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,ECL 化学发光法显色,对条带进行吸光度积分扫描。目的基因蛋白表达量以各目的蛋白条带吸光度值/内参照 GAPDH 吸光度值的比值表示。

### 1.3 统计学方法

用 SPSS19.0 进行统计分析,实验数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 青蒿素对细胞增殖的影响,后续实验药物浓度及作用时间的选择

人瘢痕疙瘩成纤维细胞在不同浓度青蒿素培养液的干预下,随浓度升高其增殖活性不断下降(表 2)。我们选择青蒿素最低药物浓度 150  $\mu$ g/mL、最短作用时间 48 h 作为后续实验的药物浓度及作用时间。

### 2.2 各组间细胞凋亡情况的比较

空白组、青蒿素组、青蒿素+IL-6 组、青蒿素+AG490 组早期凋亡细胞百分比分别为:( $1.90 \pm 0.17$ )%、( $7.17 \pm 0.40$ )%、( $3.93 \pm 0.21$ )% 和 ( $12.57 \pm 0.35$ )%,青蒿素组、青蒿素+IL-6 组、青蒿素+AG490 组早期凋亡细胞百分比明显高于空白组( $P < 0.01$ ),青蒿素+IL-6 组的早期凋亡细胞百分比低于青蒿素组、青蒿素+AG490 组青蒿素( $P < 0.01$ )。说明青蒿素可以促进瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡(图 1)。

### 2.3 各组 MMP-2、MMP-9、STAT3 mRNA 的表达

与空白组比较,青蒿素组、青蒿素+IL-6 组、青蒿素+AG490 组中 MMP2、MMP9 mRNA 的表达均显著降低( $P < 0.01$ );MMP2、MMP9 mRNA 在青蒿素组、

青蒿素+AG490组的表达较青蒿素+IL-6组显著降低 ( $P < 0.01$ ); MMP2、MMP9 mRNA 在青蒿素组、青蒿素+AG490组中的表达比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); STAT3 mRNA 各组中的表达比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表3)。

### 2.4 各组 MMP-2、MMP-9、STAT3、p-STAT3 蛋白的表达

与空白组比较, 青蒿素组、青蒿素+IL-6组、青蒿素+AG490组中 STAT3、p-STAT3、MMP2、MMP9 蛋白的表达均明显降低 ( $P < 0.01$ ), p-STAT3、MMP2、MMP9 蛋白在青蒿素组、青蒿素+AG490组中的表达低于在青蒿素+IL-6组中的表达 ( $P < 0.01$ , 图2)。

## 3 讨论

青蒿素是一类传统抗疟药, 二氢青蒿素、青蒿

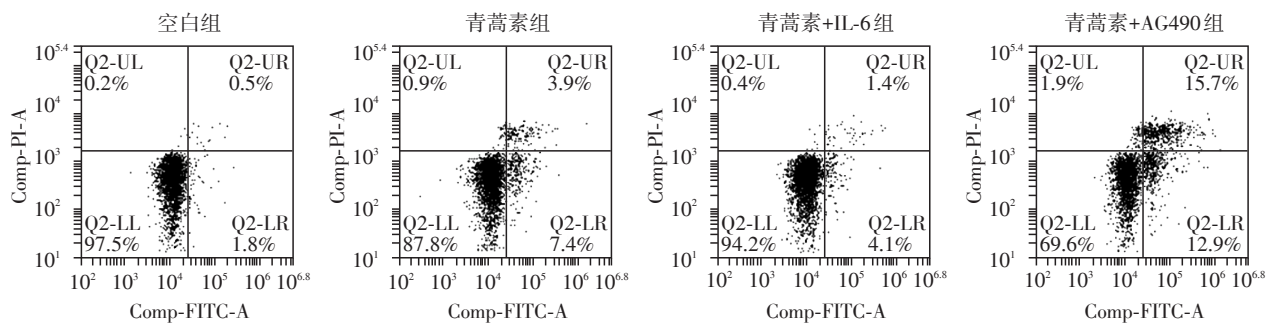
琥酯、蒿甲醚、蒿乙醚等是青蒿素的重要衍生物。目前研究发现青蒿素及其衍生物除了有传统的抗疟作用外, 还具有抗纤维化、抗肿瘤细胞和免疫调节等作用<sup>[8-10]</sup>。杨今言等<sup>[11]</sup>研究发现, 二氢青蒿素处理后的兔耳瘢痕发生率及瘢痕体积显著低于生理盐水处理后的兔耳瘢痕模型组, 说明二氢青蒿素具有治疗兔耳瘢痕的作用。袁继龙等<sup>[3]</sup>研究发现, 双氢青蒿素可以在体外抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖和迁移, 激活 Caspase3 并增加人瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡, 抑制 Cyclin D1 表达, 引起人瘢痕疙瘩成纤维细胞周期发生 G0~G1 期阻滞, 双氢青蒿素的作用机制与其抑制成纤维细胞内转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 和 I 型胶原的表达有关。虽然青蒿素对瘢痕疙瘩成纤维细胞具有抑制和抗增殖作用, 但其作用的具体分子机制目前研究甚少。

表2 不同浓度青蒿素在不同作用时间对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖能力的比较

**Table 2 Comparison of proliferation of human keloid fibroblasts in different concentrations of artemisinin and different time** ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

青蒿素浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	0 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
0	0.183 $\pm$ 0.006	0.208 $\pm$ 0.003	0.255 $\pm$ 0.005	0.420 $\pm$ 0.016	0.493 $\pm$ 0.011	0.587 $\pm$ 0.016
50	0.180 $\pm$ 0.002	0.219 $\pm$ 0.003	0.249 $\pm$ 0.009	0.409 $\pm$ 0.014	0.427 $\pm$ 0.012 <sup>▲</sup>	0.488 $\pm$ 0.018 <sup>▲</sup>
100	0.182 $\pm$ 0.004	0.220 $\pm$ 0.006	0.242 $\pm$ 0.019	0.378 $\pm$ 0.014 <sup>▲</sup>	0.404 $\pm$ 0.017 <sup>▲</sup>	0.480 $\pm$ 0.015 <sup>▲</sup>
150	0.182 $\pm$ 0.003	0.213 $\pm$ 0.006	0.227 $\pm$ 0.013 <sup>▲</sup>	0.373 $\pm$ 0.012 <sup>▲△</sup>	0.405 $\pm$ 0.015 <sup>▲</sup>	0.467 $\pm$ 0.013 <sup>▲</sup>
200	0.181 $\pm$ 0.005	0.207 $\pm$ 0.004	0.215 $\pm$ 0.004 <sup>▲△*</sup>	0.386 $\pm$ 0.007 <sup>▲△#</sup>	0.410 $\pm$ 0.010 <sup>▲</sup>	0.472 $\pm$ 0.013 <sup>▲</sup>

与0  $\mu\text{g/mL}$ 比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; 与50  $\mu\text{g/mL}$ 比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与100  $\mu\text{g/mL}$ 比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与150  $\mu\text{g/mL}$ 比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。



左下象限为正常的活细胞, 右下象限为早期凋亡的细胞, 右上象限为晚期凋亡的细胞, 左上象限为坏死细胞。

图1 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况示意图

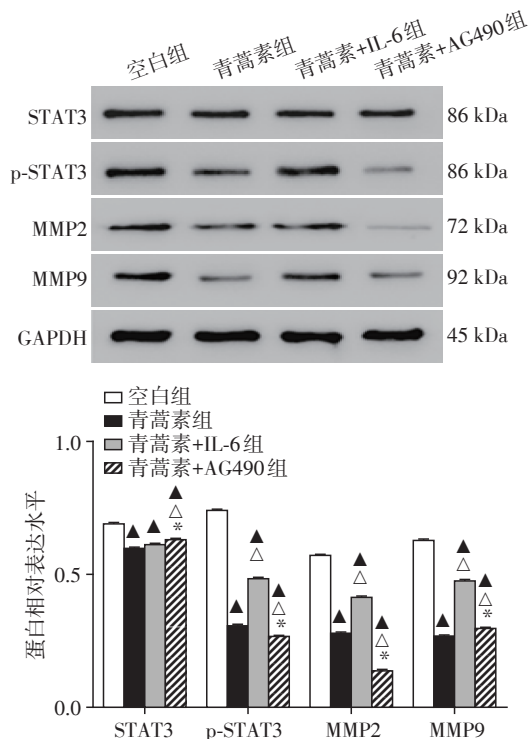
Figure 1 Cell apoptosis of each group by flow cytometry

表3 各组细胞MMP2、MMP9、STAT3 mRNA 表达情况的比较

**Table 3 Comparison of MMP2, MMP9 and STAT3 mRNA expression of each group** ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	MMP2	MMP9	STAT3
空白组	0.003 85 $\pm$ 0.000 35	0.011 35 $\pm$ 0.001 17	0.004 45 $\pm$ 0.000 14
青蒿素组	0.000 74 $\pm$ 0.000 14 <sup>▲</sup>	0.001 74 $\pm$ 0.000 18 <sup>▲</sup>	0.004 33 $\pm$ 0.000 48
青蒿素+IL-6组	0.002 06 $\pm$ 0.000 22 <sup>▲△</sup>	0.004 62 $\pm$ 0.000 46 <sup>▲△</sup>	0.004 00 $\pm$ 0.000 42
青蒿素+AG490组	0.000 56 $\pm$ 0.000 03 <sup>▲*</sup>	0.001 50 $\pm$ 0.000 07 <sup>▲*</sup>	0.004 58 $\pm$ 0.000 49

与空白组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; 与青蒿素组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与青蒿素+IL-6组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。



与空白组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与青蒿素组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与青蒿素+IL-6组比较,  $*P < 0.01 (n=3)$ 。

图2 各组细胞MMP2、MMP9、STAT3、p-STAT3蛋白表达情况的比较

Figure 2 Comparison of MMP2, MMP9, STAT3 and p-STAT3 protein expression of each group

MMP是一类依赖于锌离子和钙离子的蛋白水解酶,是许多生理和病理及组织重塑中的重要介质<sup>[12]</sup>。当皮肤受到创伤后,一方面细胞内的炎性介质、细胞因子等大量积累,刺激成纤维细胞表达MMP2、MMP9,另一方面MMP2、MMP9可通过降解基底膜和细胞外基质,加速肉芽组织增生和组织重建,导致瘢痕疙瘩的形成和发展<sup>[13]</sup>。Liu等<sup>[14]</sup>研究发现,TGF- $\beta$ 1上调miR-21在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达,促进其增殖、转移,其机制可能是促进MMP2、MMP9的表达,而当miR-21被抑制时,MMP2、MMP9的表达显著下调。Zhu等<sup>[15]</sup>研究发现,miR-188-5p通过抑制PI3K/Akt信号通路中MMP2、MMP9的表达,抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖和侵袭。Jiang等<sup>[16]</sup>研究发现,生长分化因子-9基因沉默能通过抑制Smad2/3信号通路的磷酸化,下调MMP2、MMP9的表达,MMP2、MMP9可能成为瘢痕疙瘩治疗的新靶点。然而也有研究发现,MMP2、MMP9在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达较正常皮肤组织降低<sup>[17]</sup>。对此我们认为,瘢痕疙瘩的形成机制极其复杂,并且体外研究也有相对的局限性,其实验结果往往受到细

胞来源、分化程度、培养条件等因素所影响,除MMP是否有其他的细胞因子参与,及其具体的作用机制仍需进一步研究。

STAT3是STAT家族的重要成员,STAT3通过相关调控因子,在细胞增殖、存活、凋亡、分化及转移等过程中起重要作用<sup>[18-19]</sup>,STAT3可通过IL-6诱导活化成p-STAT3<sup>[20-21]</sup>。持久活化的p-STAT3可存在于多种恶性肿瘤,可致细胞异常增殖和恶性分化,在肿瘤生长、细胞凋亡、血管重建、浸润转移等过程中起重要作用。AG490作为一种JAK激酶竞争性抑制剂,可以有效抑制STAT3活化<sup>[22]</sup>。相关研究发现,p-STAT3可能参与调控MMP2、MMP9的表达,MMP2、MMP9可能是p-STAT3的靶基因<sup>[7,23]</sup>。本团队前期的研究也发现,在皮肤黑色素瘤组织中p-STAT3、MMP2、MMP9蛋白表达显著高于色素痣,推测p-STAT3蛋白可能通过调节其下游基因MMP的表达,调控皮肤黑色素瘤的侵袭转移,MMP是STAT3信号通路的下游靶基因。

本研究通过CCK-8实验发现,青蒿素能够对人瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖起抑制作用。流式细胞术检测发现青蒿素组、青蒿素+IL-6组、青蒿素+AG490组早期凋亡细胞百分比明显高于空白组,青蒿素+IL-6组的早期凋亡细胞百分比低于青蒿素组、青蒿素+AG490组,说明青蒿素能够抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖、促进其凋亡,机制可能与STAT3相关靶基因相关。

本实验还发现,青蒿素可能通过STAT3抑制剂AG490,降低MMP2、MMP9的表达,对人瘢痕疙瘩成纤维细胞起抑制作用。青蒿素+IL-6组可能通过诱导STAT3的持续活化,促进MMP2、MMP9的表达。STAT3 mRNA、STAT3蛋白在各实验组的表达无统计学差异,说明在人瘢痕疙瘩成纤维细胞中起作用的可能是活化的p-STAT3;而Western blot结果显示,与空白组比较,青蒿素组、青蒿素+IL-6组、青蒿素+AG490组中p-STAT3蛋白的表达均明显降低,这也进一步证实了我们的观点。

综上所述,青蒿素通过抑制MMP-STAT3信号通路,抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖。在青蒿素抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞信号通路中,持续活化的p-STAT3可能起重要作用。青蒿素通过抑制p-STAT3的过度激活,抑制MMP2、MMP9的表达,对瘢痕疙瘩起抑制作用。

[参考文献]

[1] 吴志远,史玉仓,蒋军健,等. hIL-24基因通过调控转化

- 生长因子 $\beta$ /Smad通路影响瘢痕疙瘩的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(33):4926-4932
- [2] HAHN J M, MCFARLAND K L, COMBS K A, et al. Partial epithelial-mesenchymal transition in keloid scars: regulation of keloid keratinocyte gene expression by transforming growth factor- $\beta$ 1[J]. Burns Trauma, 2016, 4(1): 30-46
- [3] 袁继龙, 张鹏, 肖明. 双氢青蒿素对人增生性瘢痕成纤维细胞体外作用及其机制的研究[J]. 中国美容整形外科杂志, 2019, 30(1):48-53
- [4] 农晓琳, 陈洪, 陈石海, 等. 青蒿素、青蒿琥酯抗皮肤瘢痕的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2009, 42(6):421-424
- [5] HAO R, LI Z, CHEN X, et al. Efficacy and possible mechanisms of botulinum toxin type A on hypertrophic scarring[J]. J Cosmet Dermatol, 2018, 17(3):340-346
- [6] LIU Y X, SUN Y. MMP-2 participates in the sclera of guinea pig with form-deprivation myopia via IGF-1/STAT3 pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(9):2541-2548
- [7] ZOU M, ZHANG X, XU C. IL6-induced metastasis modulators p-STAT3, MMP-2 and MMP-9 are targets of 3,3'-diindolylmethane in ovarian cancer cells[J]. Cell Oncol (Dordr), 2016, 39(1):47-57
- [8] LARSON S A, DOLIVO D M, DOMINKO T. Artesunate inhibits myofibroblast formation via induction of apoptosis and antagonism of pro-fibrotic gene expression in human dermal fibroblasts[J]. Cell Biol Int, 2019, 43(11): 1317-1322
- [9] WONG Y K, XU C, KALESH K A, et al. Artemisinin as an anticancer drug: recent advances in target profiling and mechanisms of action[J]. Med Res Rev, 2017, 37(6):1492-1517
- [10] MENG Q F, ZHANG X X, ZHANG Z, et al. Therapeutic potential of artesunate in experimental autoimmune myasthenia gravis by upregulated T regulatory cells and regulation of Th1/Th2 cytokines[J]. Pharmazie, 2018, 73(9): 526-532
- [11] 杨今言, 林琳. 二氢青蒿素对兔耳增生性瘢痕增生的影响研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1):89-90
- [12] LI H, NAHAS Z, FENG F, et al. Tissue engineering for in vitro analysis of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of keloid lesions[J]. JAMA Facial Plast Surg, 2013, 15(6):448-456
- [13] 谢晓繁, 贺立新, 郝晓凤, 等. 增生性瘢痕中基质金属蛋白酶及其抑制因子基因的表达[J]. 中华烧伤杂志, 2007, 23(6):444-446
- [14] LIU Y, LI Y, LI N, et al. TGF- $\beta$ 1 promotes scar fibroblasts proliferation and transdifferentiation via upregulating microRNA-21[J]. Sci Rep, 2016(6):32231
- [15] ZHU W, WU X, YANG B, et al. miR-188-5p regulates proliferation and invasion via PI3K/Akt/MMP-2/9 signaling in keloids[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2019, 51(2):185-196
- [16] JIANG Z, YU Q, XIA L. Growth differentiation factor-9 promotes fibroblast proliferation and migration in keloids through the Smad2/3 pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(1-2):207-218
- [17] 宋维旭, 赵晓云, 赵晓霞, 等. 热休克蛋白47和基质金属蛋白酶2在增生性瘢痕皮肤和胎儿皮肤中的表达[J]. 兰州大学学报, 2015, 41(5):22-26
- [18] GUANIZO A C, FERNANDO C D, GARAMA D J, et al. STAT3: a multifaceted oncoprotein[J]. Growth Factors, 2018, 36(1-2):1-14
- [19] 罗振国, 朱国琴, 许海尘, 等. 胃泌素通过JAK2/STAT3信号通路调控胃癌细胞上皮间质转化[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(12):1557-1561
- [20] CUI Y, LI Y Y, LI J, et al. STAT3 regulates hypoxia-induced epithelial mesenchymal transition in oesophageal squamous cell cancer[J]. Oncol Rep, 2016, 36(1):108-116
- [21] XIANG D M, SUN W, NING B F, et al. The HLF/IL-6/STAT3 feedforward circuit drives hepatic stellate cell activation to promote liver fibrosis[J]. Gut, 2018, 67(9): 1704-1715
- [22] WANG D, WANG Q, YIN J, et al. Combined administration of propranolol+AG490 offers better effects on portal hypertensive rats with cirrhosis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2016, 31(5):1037-1044
- [23] JIA Z H, JIA Y, GUO F J, et al. Phosphorylation of STAT3 at Tyr705 regulates MMP-9 production in epithelial ovarian cancer[J]. PLoS One, 2017, 12(8):e0183622

[收稿日期] 2019-10-18