

临床与基础  
桥接研究Clinical and Basic  
Bridging Research芦荟大黄素调控 p53 信号通路抑制病理性  
瘢痕成纤维细胞的上皮间质转化的研究Aloe – emodin regulates p53 signal pathway to inhibit epithelial mesenchymal  
transformation in pathological scar fibroblasts杨毅斌, 黄宗涌, 黄焱彬,  
黄爱本(厦门大学 附属妇女儿童医院、厦门市妇幼保健  
院 病理科, 福建 厦门 361003)YANG Yi – bin, HUANG Zong – yong,  
HUANG Yi – bin, HUANG Ai – ben(Department of Pathology, Women and  
Children's Hospital Affiliated to Xiamen  
University, Xiamen Maternal and Child  
Health Hospital, Xiamen 361003, Fujian  
Province, China)作者简介: 杨毅斌(1983 – ), 男, 主管技师, 主要  
从事病理技术方面工作和研究

通信作者: 杨毅斌

MP: 13696976586

E – mail: yesblueant@163.com

**摘要:**目的 探究芦荟大黄素对病理性瘢痕成纤维细胞增殖、凋亡及上皮间质转化(EMT)的影响及调控机制。**方法** 将增生性瘢痕成纤维细胞(HSFb)随机分为HSFb对照组(正常培养)、HSFb低剂量组(25.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  芦荟大黄素)、HSFb中剂量组(50.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  芦荟大黄素)、HSFb高剂量组(100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  芦荟大黄素)、HSFb – PFT –  $\alpha$ 组(100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  芦荟大黄素 + 20.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  p53 特异性抑制药 PFT –  $\alpha$ )。将人原代瘢痕疙瘩成纤维细胞(KFb)随机分为KFb对照组(正常培养)、KFb低剂量组(25.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  芦荟大黄素)、KFb中剂量组(50.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  芦荟大黄素)、KFb高剂量组(100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  芦荟大黄素)、KFb – PFT –  $\alpha$ 组(100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  芦荟大黄素 + 20.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  p53 特异性抑制药 PFT –  $\alpha$ )。用细胞计数试剂盒 – 8(CCK – 8)实验检测细胞存活率,用蛋白质印迹法检测 p53 及 EMT 相关蛋白的表达,原位末端标记法(Tunel)实验检测细胞凋亡。**结果** KFb对照组、KFb低剂量组、KFb中剂量组、KFb高剂量组的细胞存活率分别为(100.00  $\pm$  5.17)%、(84.13  $\pm$  8.34)%、(73.81  $\pm$  7.62)%和(54.59  $\pm$  3.47)%;HSFb对照组、HSFb低剂量组、HSFb中剂量组、HSFb高剂量组的细胞存活率分别为(100.00  $\pm$  6.77)%、(83.50  $\pm$  6.08)%、(71.43  $\pm$  2.70)%和(61.80  $\pm$  4.79)%;KFb对照组、KFb低剂量组、KFb高剂量、KFb – PFT –  $\alpha$ 组的调节蛋白 53(p53)蛋白相对表达水平分别为0.31  $\pm$  0.04、0.52  $\pm$  0.04、0.76  $\pm$  0.06和0.38  $\pm$  0.05,上皮细胞钙黏蛋白(E – cadherin)蛋白相对表达水平分别为0.35  $\pm$  0.04、0.58  $\pm$  0.08、0.76  $\pm$  0.13和0.41  $\pm$  0.06,凋亡率分别为(4.82  $\pm$  0.59)%、(11.72  $\pm$  1.68)%、(20.36  $\pm$  1.93)%和(12.46  $\pm$  1.28)%;HSFb对照组、HSFb低剂量组、HSFb高剂量组、HSFb – PFT –  $\alpha$ 组的p53蛋白相对表达水平分别为0.37  $\pm$  0.03、0.48  $\pm$  0.05、0.65  $\pm$  0.07和0.46  $\pm$  0.04,E – cadherin蛋白相对表达水平分别为0.26  $\pm$  0.03、0.46  $\pm$  0.05、0.63  $\pm$  0.08和0.34  $\pm$  0.05,凋亡率分别为(4.89  $\pm$  0.28)%、(13.98  $\pm$  0.83)%、(21.51  $\pm$  1.08)%和(12.95  $\pm$  1.10)%。KFb低、高剂量组的上述指标与KFb对照组比较,KFb – PFT –  $\alpha$ 组的上述指标与KFb高剂量组比较,HSFb低、高剂量组的上述指标与HSFb对照组比较,HSFb – PFT –  $\alpha$ 组的上述指标与HSFb高剂量组比较,在统计学上差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。**结论** 芦荟大黄素可能通过调控 p53 相关信号抑制病理性成纤维细胞增殖、EMT 并诱导凋亡。

**关键词:** 芦荟大黄素;病理性瘢痕;成纤维细胞;上皮间质转化;p53 信号通路

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.06.009

中图分类号:R28

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)06-0794-06

**Abstract: Objective** To explore the effects of aloe – emodin on the proliferation, apoptosis, and epithelial – mesenchymal transition (EMT)

of pathological scar fibroblasts, as well as its regulatory mechanisms. **Methods** Proliferative scar fibroblasts (HSFb) were randomly divided into the following groups: HSFb control group (normal culture), HSFb low-dose group ( $25.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe-emodin), HSFb medium-dose group ( $50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe-emodin), HSFb high-dose group ( $100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe-emodin), and HSFb-PFT- $\alpha$  group ( $100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe-emodin +  $20.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  p53-specific inhibitor PFT- $\alpha$ ). Keloid fibroblast (KFb) cells were randomly divided into the following groups: KFb control group (normal culture), KFb low-dose group ( $25.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe-emodin), KFb medium-dose group ( $50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe-emodin), KFb high-dose group ( $100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe-emodin), and KFb-PFT- $\alpha$  group ( $100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe-emodin +  $20.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  p53-specific inhibitor PFT- $\alpha$ ). Cell viability was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay, Western blotting was performed to detect the expression of p53 and EMT-related proteins, apoptosis was measured using the TUNEL assay. **Results** The cell survival rates of the KFb control group, KFb low-dose group, KFb medium-dose group, and KFb high-dose group were  $(100.00 \pm 5.17)\%$ ,  $(84.13 \pm 8.34)\%$ ,  $(73.81 \pm 7.62)\%$  and  $(54.59 \pm 3.47)\%$ , respectively; the cell survival rates of the HSFb control group, HSFb low-dose group, HSFb medium-dose group, and HSFb high-dose group were  $(100.00 \pm 6.77)\%$ ,  $(83.50 \pm 6.08)\%$ ,  $(71.43 \pm 2.70)\%$  and  $(61.80 \pm 4.79)\%$ , respectively. The relative expression levels of p53 protein in the KFb control group, KFb low-dose group, KFb high-dose group, and KFb-PFT- $\alpha$  group were  $0.31 \pm 0.04$ ,  $0.52 \pm 0.04$ ,  $0.76 \pm 0.06$  and  $0.38 \pm 0.05$ , respectively; the relative expression levels of E-cadherin protein were  $0.35 \pm 0.04$ ,  $0.58 \pm 0.08$ ,  $0.76 \pm 0.13$  and  $0.41 \pm 0.06$ , respectively; the apoptosis rates were  $(4.82 \pm 0.59)\%$ ,  $(11.72 \pm 1.68)\%$ ,  $(20.36 \pm 1.93)\%$  and  $(12.46 \pm 1.28)\%$ , respectively; the relative expression levels of p53 protein in the HSFb control group, HSFb low-dose group, HSFb high-dose group, and HSFb-PFT- $\alpha$  group were  $0.37 \pm 0.03$ ,  $0.48 \pm 0.05$ ,  $0.65 \pm 0.07$  and  $0.46 \pm 0.04$ , respectively; the relative expression levels of E-cadherin protein were  $0.26 \pm 0.03$ ,  $0.46 \pm 0.05$ ,  $0.63 \pm 0.08$  and  $0.34 \pm 0.05$ , respectively; the apoptosis rates were  $(4.89 \pm 0.28)\%$ ,  $(13.98 \pm 0.83)\%$ ,  $(21.51 \pm 1.08)\%$  and  $(12.95 \pm 1.10)\%$ , respectively. The differences between the KFb low- and high-dose groups and the KFb control group, the KFb-PFT- $\alpha$  group and the KFb high-dose group, the HSFb low- and high-dose groups and the HSFb control group, and the HSFb-PFT- $\alpha$  group and the HSFb high-dose group were statistically significant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** Aloe-emodin may inhibit the proliferation of pathological fibroblasts, EMT, and induce apoptosis by regulating the p53-related signaling pathway.

**Key words:** aloe-emodin; pathological scar; fibroblast; epithelial mesenchymal transformation; p53 signal pathway

病理性瘢痕是创伤愈合过程中形成的病理产物,包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩,是典型的纤维增生性疾病,其病理改变以成纤维细胞大量增生和以胶原为主的细胞外基质过度沉积为主要特征,病理性瘢痕的发病机制错综复杂,目前尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。近年来,中医药已被证实在病理性瘢痕治疗中具有积极作用<sup>[2]</sup>。芦荟大黄素是一种存在于大黄、芦荟等中草药中的蒽醌类物质,其具有多种药理作用,包括皮肤调理、抗炎、抗肿瘤等<sup>[3]</sup>。研究表明,芦荟大黄素可通过调节胶原蛋白水平抑制成纤维细胞的过度增殖<sup>[4]</sup>。本研究旨在通过体外实验探究芦荟大黄素对增生性瘢痕成纤维细胞和瘢痕疙瘩成纤维细胞生长的影响,并探究其作用机制。

## 材料与方法

### 1 材料

**细胞** 人原代瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblast, KFb)和人原代增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblasts, HSFb),均购自合肥万物生物科技有限公司。

**药品与试剂** 芦荟大黄素,规格:每支 20 mg,纯度:97%,批号:20240213,上海源叶生物科技有限公司生产;调节蛋白 53(regulatory protein 53, p53)特异性抑制药 PFT- $\alpha$ ,规格:每支 5 mg,纯度:99%,批号:20240125,北京百奥莱博科技有限公司生产。细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8),购于北京索莱宝科技有限公司;p53 抗体,购于美国 CST 公

司;鼠双微体同源基因2(mouse double microhomologous gene 2, MDm2)、调节蛋白21(regulatory protein 21, p21)、上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、I型胶原蛋白(type I collagen, Collagen I)、Collagen III、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗及二抗,均购于美国 Abcam 公司;原位末端标记法(TdT mediated dUDP nick end labeling, TUNEL)凋亡检测试剂盒、4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(4',6-diaminidine-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI),均购于西安百萤生物科技有限公司;结晶紫,购于湖北实顺生物科技有限公司。

**仪器** Cytation5 酶标仪,美国 Biotek 公司产品;DMi8-S 荧光显微镜,德国徕卡公司产品;BX53 荧光显微镜,日本奥林巴斯公司产品;Bolt TM Bis-Tris Plus 预制凝胶蛋白电泳系统,美国赛默飞世尔公司产品。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养<sup>[5]</sup>

KFb 和 HSFb 细胞均培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基并置于培养箱中进行培养,培养箱条件:温度为 37℃,CO<sub>2</sub>为 5%,湿度为 95%,每隔 1 d 更换 1 次培养液。

### 2.2 细胞分组与处置方法

将 KFb 细胞均随机分为 KFb 对照组、KFb 低剂量组、KFb 中剂量组、KFb 高剂量组、KFb-PFT- $\alpha$  组;将 HSFb 细胞均随机分为 HSFb 对照组、HSFb 低剂量组、HSFb 中剂量组、HSFb 高剂量组、HSFb-PFT- $\alpha$  组。HSFb 对照组、HSFb 对照组细胞为常规培养的细胞,KFb 低、中、高剂量组细胞和 HSFb 低、中、高剂量组细胞均分别用质量浓度为 25.00、50.00、100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦荟大黄素(用二甲基亚砜试剂溶解稀释)处理细胞 24 h,KFb-PFT- $\alpha$  组细胞、HSFb-PFT- $\alpha$  组细胞均用 100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芦荟大黄素及 20.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  p53 特异性抑制药 PFT- $\alpha$  共同处理细胞 24 h。

### 2.3 CCK-8 实验检测细胞存活率<sup>[6]</sup>

取细胞制备细胞悬液( $1 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ )接种在 96 孔板中(每孔 0.2 mL),培养箱培养 24 h 后分组处理,然后每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$  进行染色,2 h 后用酶标仪检测光密度值(450 nm),并计算细胞存活率。

### 2.4 细胞免疫荧光检测 p53 表达<sup>[7]</sup>

收集细胞,制备细胞爬片,用多聚甲醛溶液固定 15 min,用通透液(Triton X-100)通透 15 min,清洗后

封闭 1 h,然后滴加 p53 一抗试剂,在 4℃ 下孵育过夜,次日在室温下与荧光二抗(1:200)进行孵育 1 h,用抗荧光淬灭封片剂封片后,在荧光显微镜下观察。

### 2.5 蛋白质印迹(Western blot)实验检测相关蛋白表达水平<sup>[5]</sup>

收集各组细胞,RIPA 裂解液充分处理细胞后离心收集上清液,检测总蛋白浓度后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,然后转至 PVDF 膜上,封闭(5% 脱脂奶粉)后加入对应的一抗稀释液,在 4℃ 下孵育过夜,次日加入同种属的二抗稀释液,孵育 2 h 后显影、曝光,分析灰度值。

### 2.6 TUNEL 实验检测细胞凋亡情况<sup>[8]</sup>

取各组细胞,用多聚甲醛固定 20 min 后磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗,加入 0.2% Triton X-100 细胞通透液处理 20 min, PBS 清洗,然后严格按照试剂盒操作步骤进行 TUNEL 染色,并用 DAPI 试剂对细胞核进行染色(蓝色),在荧光显微镜下观察。

### 2.7 Transwell 实验检测细胞侵袭情况<sup>[8]</sup>

用培养液稀释基质胶,并将基质胶置于上室中,凝固后将消化后的各组细胞制备细胞悬液并加入上室中(不含血清),然后在下室中加入 DMEM-F12 培养基 600  $\mu\text{L}$ ,48 h 后取出小室,去除上室细胞, PBS 清洗,用甲醛固定 5 min 后结晶紫(0.1%)染色 15 min,在显微镜下观察。

## 3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较用独立样本  $t$  检验,多组间比较用单因素方差分析。

## 结 果

### 1 芦荟大黄素对细胞存活的影响

HSFb 对照组、HSFb 对照组细胞为常规培养的细胞,KFb 低、中、高剂量组细胞和 HSFb 低、中、高剂量组细胞均分别用质量浓度为 25.00、50.00 和 100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芦荟大黄素处理细胞 24 h,KFb-PFT- $\alpha$  组细胞、HSFb-PFT- $\alpha$  组细胞均用 100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芦荟大黄素及 20.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PFT- $\alpha$  共同处理细胞 24 h。

KFb 对照组、KFb 低剂量组、KFb 中剂量组、KFb 高剂量组的细胞存活率分别为  $(100.00 \pm 5.17)\%$ 、 $(84.13 \pm 8.34)\%$ 、 $(73.81 \pm 7.62)\%$  和  $(54.59 \pm 3.47)\%$ ; HSFb 对照组、HSFb 低剂量组、HSFb 中剂量组、HSFb 高剂量组的细胞存活率分别为  $(100.00 \pm 6.77)\%$ 、

(83.50 ± 6.08)%、(71.43 ± 2.70)% 和 (61.80 ± 4.79)%，KfB 低、中、高剂量组的细胞存活率与 KfB 对照组比较，HSFb 低、中、高剂量组的细胞存活率与 HSFb 对照组比较，在统计学上差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )，同种细胞低、中、高剂量组间的细胞存活率比较，在统计学上差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

2 芦荟大黄素对 p53 相关通路表达的影响

KfB 低、高剂量组及 HSFb 低、高剂量组的 p53、MDm2、p21 蛋白相对表达水平分别较 KfB 对照组、HSFb 对照组均显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )，且 KfB 高剂量组、HSFb 高剂量组细胞 p53、MDm2、p21 蛋白相对表达水平分别较 KfB 低剂量组、HSFb 低剂量组均进一步升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，KfB - PFT -  $\alpha$ 、HSFb - PFT -  $\alpha$  组细胞中

p53、MDm2、p21 蛋白水平分别较 KfB 高剂量组、HSFb 高剂量组均显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )，见表 1。

3 芦荟大黄素介导 p53 对细胞凋亡的影响

KfB 对照组、KfB 低剂量组、KfB 高剂量、KfB - PFT -  $\alpha$  组的凋亡率分别为 (4.82 ± 0.59)%、(11.72 ± 1.68)%、(20.36 ± 1.93)% 和 (12.46 ± 1.28)%，KfB 低、高剂量均较 KfB 对照组明显升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )，KfB - PFT -  $\alpha$  组较 KfB 高剂量明显下降 ( $P < 0.001$ )。HSFb 对照组、HSFb 低剂量组、HSFb 高剂量组、HSFb - PFT -  $\alpha$  组的凋亡率分别为 (4.89 ± 0.28)%、(13.98 ± 0.83)%、(21.51 ± 1.08)% 和 (12.95 ± 1.10)%；HSFb 低、高剂量较 HSFb 对照组明显升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )，HSFb - PFT -  $\alpha$  组较 HSFb 高剂量明显下降 ( $P < 0.001$ )，见图 1。

表 1 各组细胞 p53 信号通路蛋白表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of p53 signal pathway protein expression in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group                 | n | p53                              | MDm2                       | p21                              |
|-----------------------|---|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| KfB - control         | 9 | 0.31 ± 0.04                      | 0.26 ± 0.05                | 0.35 ± 0.03                      |
| KfB - low dose        | 9 | 0.52 ± 0.04 *                    | 0.50 ± 0.07 *              | 0.59 ± 0.05 *                    |
| KfB - high dose       | 9 | 0.76 ± 0.06 * * * &              | 0.62 ± 0.10 * * * &        | 0.80 ± 0.12 * * * &              |
| KfB - PFT - $\alpha$  | 9 | 0.38 ± 0.05 $\Delta\Delta\Delta$ | 0.41 ± 0.04 $\Delta\Delta$ | 0.52 ± 0.03 $\Delta\Delta$       |
| HSFb - control        | 9 | 0.37 ± 0.03                      | 0.32 ± 0.04                | 0.41 ± 0.02                      |
| HSFb - low dose       | 9 | 0.48 ± 0.05 #                    | 0.60 ± 0.06 ##             | 0.60 ± 0.08 #                    |
| HSFb - high dose      | 9 | 0.65 ± 0.07 ## \$                | 0.76 ± 0.11 ### \$         | 0.91 ± 0.09 ### \$ \$            |
| HSFb - PFT - $\alpha$ | 9 | 0.46 ± 0.04 $\Delta$             | 0.44 ± 0.03 $\Delta\Delta$ | 0.52 ± 0.04 $\Delta\Delta\Delta$ |

HSFb control group: Normal culture; HSFb low - dose group: 25.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe - emodin; HSFb high - dose group: 100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe - emodin; HSFb - PFT -  $\alpha$  group: 100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe - emodin + 20.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  p53 - specific inhibitor PFT -  $\alpha$ ; KfB control group: Normal culture; KfB low - dose group: 25.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe - emodin; KfB high - dose group: 100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe - emodin; KfB - PFT -  $\alpha$  group: 100.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  aloe - emodin + 20.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  p53 - specific inhibitor PFT -  $\alpha$ ; Compared with KfB - control, \*  $P < 0.05$ , \* \* \*  $P < 0.001$ ; Compared with KfB - low dose, &  $P < 0.05$ ; Compared with KfB - High dose,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ ; Compared with HSFb - control group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ ; Compared with HSFb - low dose group, \$  $P < 0.05$ , \$ \$  $P < 0.01$ ; Compared with HSFb - high dose group,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ,  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ ; p53: Regulatory protein 53; MDm2: Mouse double microhomologous gene 2.

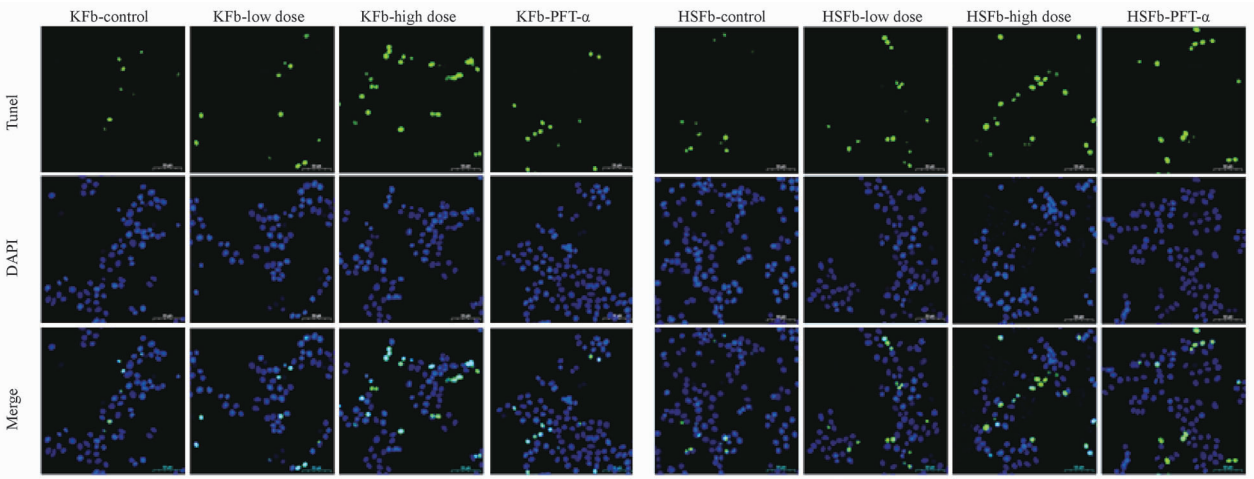


图 1 各组细胞原位末端标记法 (Tunel) 荧光图 (×200)

Figure 1 TdT mediated dUDP nick end labeling (Tunel) fluorescence of cells in each group (×200)

表2 各组细胞上皮间质转化蛋白表达及侵袭细胞数的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of the expression of epithelial mesenchymal transforming protein and the number of invasive cells in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group            | E - cadherin      | Vimentin          | Invasion number( <i>n</i> ) |
|------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|
| KFb - control    | 0.35 ± 0.04       | 0.88 ± 0.09       | 163.00 ± 9.93               |
| KFb - low dose   | 0.58 ± 0.08 **    | 0.67 ± 0.06 *     | 126.89 ± 8.09 *             |
| KFb - high dose  | 0.76 ± 0.13 *** & | 0.53 ± 0.04 *** & | 78.00 ± 6.00 *** &          |
| KFb - PFT - α    | 0.41 ± 0.06 ΔΔΔ   | 0.86 ± 0.07 ΔΔΔ   | 131.67 ± 9.10 ΔΔ            |
| HSFb - control   | 0.26 ± 0.03       | 0.95 ± 0.09       | 166.22 ± 11.84              |
| HSFb - low dose  | 0.46 ± 0.05 ##    | 0.76 ± 0.10 #     | 131.11 ± 14.37 ##           |
| HSFb - high dose | 0.63 ± 0.08 ### § | 0.49 ± 0.07 ### § | 92.00 ± 9.13 ### §          |
| HSFb - PFT - α   | 0.34 ± 0.05 ▲▲▲   | 0.88 ± 0.11 ▲▲▲   | 132.56 ± 7.75 ▲▲            |

Dose and *n* refer to table 1; Compared with KFb - control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; Compared with KFb - low dose, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ ; Compared with KFb - High dose, ΔΔ  $P < 0.01$ , ΔΔΔ  $P < 0.001$ ; Compared with HSFb - control group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ ; Compared with HSFb - low dose group, §  $P < 0.05$ , § §  $P < 0.01$ ; Compared with HSFb - high dose group, ▲▲  $P < 0.01$ , ▲▲▲  $P < 0.001$ .

表3 各组细胞纤维化相关蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of fibrosis - related protein expression in each group( $\bar{x} \pm s$ )

| Group            | Collagen I        | Collagen III      | α - SMA           |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| KFb - control    | 0.76 ± 0.10       | 0.91 ± 0.07       | 0.98 ± 0.09       |
| KFb - low dose   | 0.62 ± 0.06 *     | 0.69 ± 0.07 *     | 0.81 ± 0.10 *     |
| KFb - high dose  | 0.40 ± 0.04 *** & | 0.47 ± 0.03 *** & | 0.56 ± 0.06 *** & |
| KFb - PFT - α    | 0.68 ± 0.10 ΔΔ    | 0.81 ± 0.09 ΔΔΔ   | 0.88 ± 0.08 ΔΔΔ   |
| HSFb - control   | 0.81 ± 0.08       | 0.88 ± 0.10       | 1.02 ± 0.09       |
| HSFb - low dose  | 0.64 ± 0.05 ##    | 0.75 ± 0.05 #     | 0.78 ± 0.06 ##    |
| HSFb - high dose | 0.43 ± 0.04 ### § | 0.52 ± 0.03 ### § | 0.58 ± 0.04 ### § |
| HSFb - PFT - α   | 0.77 ± 0.06 ▲▲▲   | 0.82 ± 0.08 ▲▲▲   | 0.91 ± 0.12 ▲▲▲   |

Collagen I: Type I collagen; α - SMA: Alpha - smooth muscle actin; Dose and *n* refer to table 1; Compared with KFb - control, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; Compared with KFb - low dose, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ ; Compared with KFb - High dose, ΔΔ  $P < 0.01$ , ΔΔΔ  $P < 0.001$ ; Compared with HSFb - control group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ ; Compared with HSFb - low dose group, §  $P < 0.01$ ; Compared with HSFb - high dose group, ▲▲▲  $P < 0.001$ .

4 芦荟大黄素介导 p53 对细胞凋亡上皮间质转化 (epithelial - mesenchymal transition, EMT) 的影响

KFb 低、高剂量组和 HSFb 低、高剂量组的 E - cadherin 蛋白相对表达水平分别相比 KFb 对照组和 HSFb 对照组均显著升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), Vimentin 蛋白相对表达水平及侵袭细胞数均显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ); KFb 高剂量组、HSFb 高剂量组的 E - cadherin 蛋白相对表达水平分别较 KFb 低剂量组、HSFb 低剂量组进一步升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), Vimentin 蛋白相对表达水平及侵袭细胞数进一步降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), KFb - PFT - α 组、HSFb - PFT - α 组细胞中 E - cadherin 蛋白相对表达水平分别较 KFb 高剂量组、HSFb 高剂量组均显著下降 (均  $P < 0.001$ ), Vimentin 蛋白相对表达水平及侵袭细胞数均显著升高 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), 见表 2。

5 芦荟大黄素介导 p53 对细胞纤维化的影响

由表 3 可见, KFb 低、高剂量组和 HSFb 低、高剂量组细胞中 Collagen I、Collagen III、α - SMA 蛋白相对

表达水平相比 KFb 对照组和 HSFb 对照组均显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 且 KFb 高剂量组、HSFb 高剂量组细胞 Collagen I、Collagen III、α - SMA 蛋白相对表达水平较 KFb 低剂量组、HSFb 低剂量组进一步降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), KFb - PFT - α 组、HSFb - PFT - α 组细胞中 Collagen I、Collagen III、α - SMA 蛋白相对表达水平分别较 KFb 高剂量组、HSFb 高剂量组均显著升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。

讨 论

皮肤上的异常瘢痕包括 2 种不同类型的瘢痕, 即瘢痕疙瘩和增生性疤痕, 与病理性无序伤口愈合过程和慢性炎症有关, 只要组织中存在炎症反应, 病理性纤维化就可以在没有真正伤口的情况下发生, 这种炎症反应可能促进成纤维细胞的增殖状态, 这种增殖状态可能启动并维持足够长的时间, 导致随后持续的细胞外基质沉积<sup>[9]</sup>。有证据表明, 芦荟大黄素可通过调

节胶原蛋白表达改善成纤维细胞外基质沉积,延长G1期,进而抑制成纤维细胞的过度增殖<sup>[4]</sup>,这提示芦荟大黄素对病理性瘢痕的形成具有控制作用。在本研究中,用不同剂量的芦荟大黄素处理各细胞后发现,KFb、HSFb细胞的存活率均随着芦荟大黄素剂量的增加不断降低,这提示芦荟大黄素对病理性瘢痕成纤维细胞过度增殖具有一定的抑制作用,这与李牧等<sup>[3]</sup>研究结果一致。

p53是调控细胞增殖和凋亡的转录因子,先前的研究发现在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩中p53的表达水平较低,甚至没有表达,p53水平与病理性瘢痕的形成密切相关<sup>[10]</sup>。LIANG等<sup>[11]</sup>研究表明,p53在病理性瘢痕中低表达,而激活p53可部分抵消病理性瘢痕成纤维细胞的过度增殖。这些研究均表明,p53是改善病理性瘢痕形成的潜在靶点,在本研究中发现芦荟大黄素可呈剂量依赖性上调p53、MDM2、p21的表达。p21是p53的下游靶基因,在调控细胞周期进展中具有重要作用,此外MDM2也是p53的下游靶基因,在生理条件下形成负反馈调控机制,维持p53蛋白的稳态<sup>[12-13]</sup>。本研究提示,芦荟大黄素抑制病理性瘢痕成纤维细胞增殖的机制可能与上调p53相关。

本研究发现,芦荟大黄素可明显诱导KFb、HSFb细胞发生凋亡,同时还观察到抑制p53的表达后,芦荟大黄素对细胞凋亡的诱导作用被削弱,这提示芦荟大黄素可通过激活p53表达诱导病理性成纤维细胞的凋亡。多项研究表明,病理性瘢痕成纤维细胞的生物学行为与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)有关<sup>[14-15]</sup>。本研究中,芦荟大黄素可明显上调E-cadherin表达,并减少Vimentin水平及细胞侵袭数,而在p53抑制剂的刺激下,芦荟大黄素对E-cadherin、Vimentin表达及细胞侵袭数的作用被部分减弱,这提示芦荟大黄素可能通过靶向p53表达抑制EMT进程缓解病理性成纤维细胞的过度增殖。此外,除成纤维细胞大量增生外,以胶原沉积为特征的纤维化也是病理性瘢痕的显著特征<sup>[16]</sup>。本研究中芦荟大黄素可下调KFb、HSFb细胞中Collagen I、Collagen III、 $\alpha$ -SMA蛋白表达,而抑制p53后削弱了芦荟大黄素对Collagen I、Collagen III、 $\alpha$ -SMA表达的抑制作用。

本研究提示:芦荟大黄素可能通过部分激活p53

相关信号诱导细胞凋亡,抑制EMT进程进而减缓病理性成纤维细胞大量增生和以胶原为主的细胞外基质过度沉积。

## 参考文献:

- [1] 杨斌. 增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的发病机制与诊治进展[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2023, 30(6): 481—488.
- [2] 马卉, 张润田, 李航, 等. 龙血素A对瘢痕疙瘩成纤维细胞生长作用研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(6): 827—831.
- [3] 李牧, 杜智敏. 芦荟大黄素的药理作用研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(9): 765—768.
- [4] 杨成华, 程基焱. 芦荟大黄素对培养人成纤维细胞Smad2与I型胶原表达及细胞周期的影响[J]. 医学理论与实践, 2019, 32(2): 157—159.
- [5] 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, 2023, 27(35): 5642—5648.
- [6] 张帅, 安胜军, 崔清卓, 等. 丹参有效成分最佳配伍对载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠血管外膜成纤维细胞增殖的影响[J]. 世界中医药, 2023, 18(3): 320—323.
- [7] 李雅琪. 田蓟苷调控p53/NOX4信号通路抗缺氧诱导的心肌细胞损伤的机制研究[D]. 新疆: 石河子大学, 2022.
- [8] 高璐. Piezo1蛋白通过p53信号通路影响食管鳞癌的增殖、周期和凋亡[D]. 河南: 郑州: 郑州大学, 2021.
- [9] 林新晔, 赖玉平. 病理性瘢痕的形成机制与治疗概述[J]. 生物学教学, 2022, 47(12): 2—5.
- [10] SHI S, LI Q, LIU Y, et al. SPARC promotes fibroblast proliferation, migration, and collagen production in keloids by inactivation of p53[J]. *J Dermatol Sci*, 2023, 109(1): 2—11.
- [11] LIANG Y, ZHOU R, FU X, et al. HOXA5 counteracts the function of pathological scar-derived fibroblasts by partially activating p53 signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 40.
- [12] 向万平, 唐翎瀚, 谢杰斌, 等. LSAMP-AS1/LSAMP通过PI3K/Akt/MDM2/p53信号通路调控胃癌作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2024, 31(12): 738—745.
- [13] CHENG X, SHEN X, WANG M, et al. TNFAIP8 modulates the survival and immune activity of Th17 cells via p53/p21/MDM2 pathway after acute insult[J]. *Cytokine X*, 2022, 4(1): 100062.
- [14] 杨伊兰. 利巴韦林通过靶向eIF4E/eIF4G1介导的上皮间质转化(EMT)来调节瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖、运动和细胞外基质的生成[D]. 北京: 北京协和医学院, 2023.
- [15] 龚琬茹, 刘梦婷, 刘星可, 等. 增生性瘢痕与瘢痕疙瘩上皮间质转化及CD26表达的异质性研究[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(21): 2174—2182.
- [16] 唐玉婷, 马芳, 贺茜, 等. PTEN介导紫草素抑制人增生性瘢痕成纤维细胞的胶原沉积[J]. 实用医学杂志, 2023, 39(11): 1382—1388.

(收稿日期 2024-11-18)