

调控Smad7基因对瘢痕疙瘩角质形成细胞上皮-间质转化的影响*

周小凡, 赵亚南, 肖敏勤, 肖 鸿, 刘 垠[△]

昆明医科大学第二附属医院 整形外科(昆明 650101)

【摘要】 目的 阐述Smad7对瘢痕疙瘩角质形成细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响。方法 培养瘢痕疙瘩角质形成细胞(KK细胞)和正常皮肤角质形成细胞(NK细胞), 构建Smad7过表达慢病毒载体及Smad7干扰慢病毒载体, 筛选最佳过表达和干扰慢病毒以及对照载体分别感染NK和KK细胞, 嘌呤霉素筛选稳定表达细胞株, 将培养细胞分为8组: NK-Control(正常培养的NK细胞); NK-NC(对照慢病毒筛选的NK细胞); NK-shSmad7(干扰慢病毒筛选的NK细胞); NK-mSmad7(过表达慢病毒筛选的NK细胞); KK-Control(正常培养的KK细胞); KK-NC(对照慢病毒筛选的KK细胞); KK-shSmad7(干扰慢病毒筛选的KK细胞); KK-mSmad7(过表达慢病毒筛选的KK细胞)。CCK-8法观察细胞的增殖情况, 流式细胞仪检测细胞的凋亡, Transwell小室检测细胞的迁移能力, Western blot检测上皮-间质转化的关键蛋白(N-cadherin和Occludin)表达情况。结果 成功构建Smad7干扰慢病毒载体和Smad7过表达慢病毒载体。干扰Smad7可促进NK细胞和KK细胞增殖和迁移能力, 并抑制KK细胞的凋亡, 但对NK细胞的凋亡无明显影响($P>0.05$); 过表达Smad7可抑制NK细胞和KK细胞的增殖和迁移能力, 并促进其凋亡。干扰慢病毒感染后, 与NC组比较, NK细胞和KK细胞Occludin蛋白表达减弱($P<0.01$), KK细胞N-cadherin蛋白表达增多($P<0.01$), 但NK细胞N-cadherin蛋白表达无明显变化($P>0.05$); 过表达慢病毒感染后, 与NC组比较, NK和KK细胞Occludin蛋白表达增多($P<0.05$), NK细胞的N-cadherin蛋白表达降低($P<0.05$), 但KK细胞N-cadherin蛋白表达无明显变化($P>0.05$)。结论 Smad7基因的调节可以影响正常皮肤角质形成细胞和瘢痕疙瘩角质形成细胞中的EMT, 进而调控细胞的增殖、迁移、凋亡的能力。Smad7基因的调节对瘢痕疙瘩角质形成细胞中EMT的影响大于对正常皮肤角质形成细胞中EMT的影响。

【关键词】 瘢痕疙瘩 上皮-间质转化 Smad7

Effects of Regulating Smad7 Gene on Epithelial-Mesenchymal Transition in Keloid Keratinocyte ZHOU Xiao-fan, ZHAO Ya-nan, XIAO Min-qin, XIAO Hong, LIU Yin[△]. Department of Plastic Surgery, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China

[△] Corresponding author, E-mail: liuyinsky@163.com

【Abstract】 **Objective** The effect of Smad7 on epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) of keloid keratinocytes was studied. **Methods** Culture formed keloid cutin cells (KK) and normal skin cutin cell (NK cells), built the Smad7 too slow virus slow virus vector and Smad7 interference expression vector, screening the best expression and interfering with the slow virus infection NK and KK cells respectively, and contrast carrier puro screening stable expression cell lines, stem cells can be divided into 8 groups: NK-Control (normal training of NK cells); NK-NC (NK cells screened against lentivirus); NK-shSmad7 (NK cells that interfere with lentivirus screening); NK-mSmad7 (NK cells screened for overexpression of lentivirus); KK-control (normal cultured KK cells); KK-NC (KK cells screened against lentivirus); KK-shSmad7 (KK cells that interfere with lentivirus screening); KK-mSmad7 (KK cells screened for overexpression of lentivirus). Cell proliferation was observed by the CCK-8 method, cell apoptosis was detected by flow cytometry, cell migration ability was detected by Transwell chamber, and expression of key proteins (N-cadherin and Occludin) in epithelium-interstitial transform was detected by Western blot. **Results** The Smad7 interfering lentivirus vector and Smad7 overexpressing lentivirus vector were successfully constructed. Interference with Smad7 can promote NK cell and KK cell proliferation and migration, and inhibit KK cell apoptosis, but it has no significant effect on NK cell apoptosis ($P>0.05$). Overexpression of Smad7 inhibited the proliferation and migration of NK cells and KK cells, and promoted their apoptosis. After interfering with lentivirus infection, NK cells and KK cells showed decreased expression of Occludin protein compared with NC group ($P<0.01$), increased N-cadherin protein expression in KK cells ($P<0.01$), but there was no significant change in N-cadherin protein expression in NK cells ($P>0.05$); After lentivirus overexpression, NK and KK cells showed increased expression of Occludin protein ($P<0.05$), the expression of N-cadherin protein in NK cells decreased ($P<0.05$), but there was no significant change in N-cadherin protein expression in KK cells ($P>0.05$). **Conclusion** The regulation of Smad7 gene can affect the EMT in normal skin keratinocytes and keloid keratinocytes, and further regulate the ability of cell proliferation, migration and apoptosis. The effect of Smad7 gene regulation on EMT in keloid keratinocytes was greater than that on normal skin keratinocytes.

【Key words】 Keloid Epithelial-mesenchymal transition Smad7

* 云南省应用基础研究计划项目(No.40218010)资助

[△] 通信作者, E-mail: liuyinsky@163.com

瘢痕疙瘩是一种皮肤的纤维增生性疾病,具有持续浸润性生长、侵蚀周围组织且不会自行消退的特点^[1]。瘢痕疙瘩的病理学特征是具有增厚的透明化胶原束,这是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分过量沉积的结果^[2]。在伤口愈合过程中,角质形成细胞通过分泌、激活或抑制各种生长因子来调节成纤维细胞的活性,它们在皮肤纤维化中具有重要作用^[3-6]。HAHN等^[7]在研究中发现了瘢痕疙瘩角质形成细胞的基因表达谱,揭示了参与上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)中众多基因的异常表达。近年来有更多研究表明EMT可能是瘢痕疙瘩的病理生理发展过程中至关重要的一环^[8-9]。

EMT是一种生物学过程,上皮细胞通过其基底表面与基底膜相互作用,经历多种生化变化,呈现间充质细胞表型,包括迁移能力、侵袭性、对凋亡的抵抗力增强以及ECM成分的增加^[10]。EMT广泛存在于胚胎发育、伤口愈合、器官纤维化和癌症转移等过程中^[11]。在EMT的过程中主要是以下几项指标发生了变化,上皮细胞标志物如E-钙黏蛋白、 α -连环蛋白、 β -连环蛋白、细胞角蛋白、黏蛋白、桥粒蛋白等表达降低;而间质细胞标志物如波形蛋白、纤连蛋白、N-钙黏蛋白(N-cadherin)等表达增加^[12]。

前期我们已对成纤维细胞转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)/Smad信号通路做过一系列的研究,结果表明过表达Smad7或沉默Smad4基因均能够显著抑制成纤维细胞增殖和I型、III型胶原沉积^[13-14]。对角质形成细胞相关的TGF- β /Smad信号通路研究结果表明,TGF- β 1诱导的EMT作用在瘢痕疙瘩角质形成细胞中效果显著,而对正常皮肤角质形成细胞诱导效力弱^[15]。但目前尚未有研究报道沉默或过表达Smad7基因对瘢痕疙瘩角质形成细胞的增殖、迁移、抗凋亡及EMT等造成何种影响。由此本研究通过体外培养正常皮肤角质形成细胞和瘢痕疙瘩角质形成细胞,应用短发夹RNA(shRNA)慢病毒干扰Smad7基因和过表达Smad7基因,调控EMT,阐述瘢痕疙瘩角质形成细胞获得抗凋亡特性、过度增殖及迁移性的作用及机制,为治疗瘢痕疙瘩开辟新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

PBS缓冲液(索莱宝公司);胎牛血清(美国Gibco公司);DMEM/F-12 1:1(体积比)培养基、RPMI1640培养基(美国Hyclone公司);角质细胞培养基、EDTA-胰酶(美国Millipore公司);CCK-8试剂盒(日本同仁研究所);N-cadherin抗体、Occludin抗体、Smad7抗体(英国abcam公司);DAB试剂盒(中杉金桥);定量PCR仪(美国应用生

物系统公司);酶标板自动读数仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏通过健康人的重睑成形术切下的上睑皮肤培养的正常皮肤角质细胞(NK细胞)、耳部瘢痕疙瘩及腹部瘢痕疙瘩标本培养的瘢痕疙瘩角质细胞(KK细胞)为实验细胞,皆由昆明医科大学附属第二医院整形外科前期分离鉴定冻存。所有角质细胞使用角质细胞培养基进行培养;在DMEM培养基中补充10%胎牛血清,细胞在37℃,体积分数为5%CO₂培养箱中培养。

1.2.2 过表达和干扰慢病毒的构建 使用的慢病毒载体系统购于北京英茂盛业公司。干扰慢病毒载体为pLVshRNA-mCherry(2A)puro,通过化学合成Smad7 shRNA,退火连接到干扰慢病毒载体;过表达慢病毒载体为pLV-EGFP-2A,通过内切酶EcoRI和BamHI加入编号为NM 005904.3 Homo sapiens Smad7的CDS区(美国国家生物技术信息中心检索)构建过表达Smad7慢病毒载体。Smad7 shRNA序列为5'-GCGCTCACGCAC TCGGTGCTCA-3',对照载体的scramble序列为5'-GCTTCGCGCCGCGTAGTCTTA-3'。序列合成公司为广州复能公司。

Smad7干扰和过表达载体的慢病毒包装:使用Lenti-Pac™HIV表达包装试剂盒(GeneCopoeia),将干扰质粒和过表达质粒用DNA-lipofectamine 2000试剂(Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.)转染到293T细胞中(购于中国科学院昆明动物研究所细胞库)。

1.2.3 慢病毒感染 使用polybrene™(Millipore)和1.5 μ g/mL嘌呤霉素将感染复数(multiplicity of infection, MOI)为5的干扰和过表达慢病毒感染NK细胞和KK细胞,筛选感染阳性细胞。干扰质粒中自带红色荧光mCherry序列,表达质粒中自带绿色荧光EGFP序列,转染后48 h进行观测,在光镜和荧光显微镜下观察感染阳性率达到80%以上,将筛选出的阳性细胞传代扩大培养,收获细胞用于后续实验。分组如下: NK-Control, 正常培养的NK细胞; NK-NC, 对照慢病毒筛选的NK细胞; NK-shSmad7, 干扰慢病毒筛选的NK细胞; NK-mSmad7, 过表达慢病毒筛选的NK细胞; KK-Control, 正常培养的KK细胞; KK-NC, 对照慢病毒筛选的KK细胞; KK-shSmad7, 干扰慢病毒筛选的KK细胞; KK-mSmad7, 过表达慢病毒筛选的KK细胞。

1.2.4 稳定细胞株细胞增殖检测 通过CCK8检测感染Smad7干扰或过表达慢病毒的稳定NK细胞和KK细胞增殖情况。将细胞以 5×10^3 /孔接种于96孔细胞培养板内(每孔100 μ L),各组细胞均同时设置3个复孔。分别在接种培养24 h、48 h、72 h、96 h后,向每孔细胞中加入10 μ L

CCK-8溶液。于37℃、体积分数为5%CO₂条件下孵育2 h,用酶标仪测定450 nm处的光密度(optical density, OD)值。

1.2.5 稳定细胞株细胞迁移能力检测 通过Transwell小室方法检测感染Smad7干扰和过表达慢病毒的稳定NK细胞和KK细胞迁移情况。将细胞以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种200 μL 于Transwell小室中,放入细胞培养箱常规培养24 h。取出Transwell小室,弃去培养液,并用PBS小心淋洗1遍,用棉签轻擦去小室内层的细胞,加入95%乙醇固定5 min后加4%结晶紫溶液染色;倒置显微镜下计数已经穿过小室微孔膜的细胞,每个样品随机挑选10个视野进行计数,取均值进行统计分析。

1.2.6 稳定细胞株细胞凋亡检测 待细胞培养生长达到80%,通过流式细胞术检测感染Smad7干扰或过表达慢病毒的稳定NK细胞和KK细胞凋亡情况。适量胰酶细胞消化消化稳定构建好的细胞,使用Annexin V-FITC和PI染色后进行流式细胞仪检测。凋亡率为晚期凋亡率(UR,右上象限-晚期凋亡细胞百分比)和早期凋亡率(LR,右下象限-早期凋亡细胞百分比)之和。

1.2.7 Western blot检测EMT中关键蛋白的表达 待细胞培养生长达到80%,通过Western blot检测感染Smad7干扰或过表达慢病毒的稳定NK细胞和KK细胞系N-cadherin和Occludin蛋白表达情况。使用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,蛋白质用BCA蛋白测定试剂盒定量。样

本通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转移到聚偏二氟乙烯膜。 β -actin为内参对照,用5%无脂牛奶封闭,一抗分别孵育:小鼠抗N-cadherin抗体(1:2 000);小鼠抗Occludin抗体(1:1 000),小鼠抗 β -actin抗体(1:5 000)。然后将膜与二抗一起孵育(山羊抗小鼠IgG)。后进行显影,曝光。蛋白条带使用ImageJ软件进行灰度分析并计算相对蛋白表达。

1.2.8 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组内比较采用配对样本 t 检验,组间比较采用单因素方差分析,先进行方差齐性检验,方差齐选用LSD法,方差不齐选用Dunnett's T3法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养情况和慢病毒感染后细胞荧光表达情况

结果见图1、图2。光镜下观察NK和KK原代细胞形态呈多边形,细胞核、核仁均清晰。荧光显微镜下观察感染Smad7干扰慢病毒的细胞中表达大量红色荧光蛋白,提示干扰慢病毒感染成功,感染Smad7过表达慢病毒的细胞中表达大量绿色荧光蛋白,提示过表达慢病毒感染成功。

2.2 感染Smad7干扰慢病毒或过表达慢病毒的NK细胞及KK细胞的增殖差异

结果见表1。培养48 h及以后,干扰Smad7的NK细胞较NC组增多($P < 0.05$),过表达Smad7的NK细胞较NC组

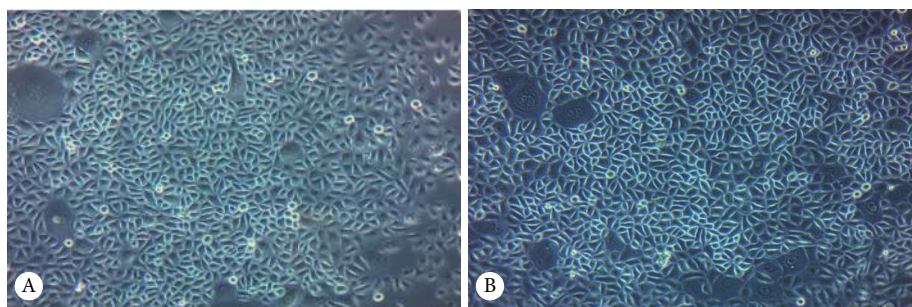


图1 原代NK细胞(A)和KK细胞(B)生长情况。光镜 $\times 100$

Fig 1 The growth of primary NK cells (A) and KK cells (B). Optical microscope $\times 100$

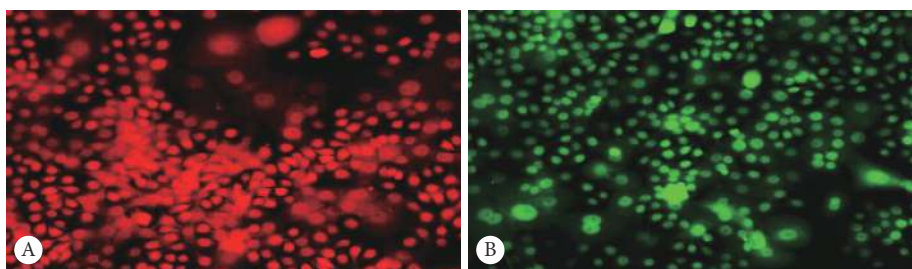


图2 Smad7干扰慢病毒(A)和过表达慢病毒(B)感染72 h的KK细胞感染情况。荧光显微镜 $\times 100$

Fig 2 Infection of KK cells with Smad7 interfering lentivirus (A) and overexpressing lentivirus (B) for 72 h. Fluorescence microscope $\times 100$

表 1 干扰或过表达Smad7的NK细胞以及KK细胞增殖差异 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Differences in proliferation of NK cells and KK cells that interfered with and overexpressed Smad7 ($\bar{x} \pm s$)

Time	NK cell line (n=3)				KK cell line (n=3)			
	Control group	NC group	shSmad7 group	mSmad7 group	Control group	NC group	shSmad7 group	mSmad7 group
24 h	0.408±0.016	0.422±0.010	0.411±0.003	0.402±0.023	0.392±0.038	0.415±0.022	0.410±0.024	0.425±0.003
48 h	0.794±0.068	0.765±0.075	0.842±0.024 [*]	0.591±0.078 ^{*,&&}	0.770±0.047	0.786±0.041	0.929±0.026 ^{*,#}	0.794±0.084 ^{*,&&}
72 h	1.102±0.170	1.080±0.111	1.730±0.026 [*]	0.813±0.045 ^{*,&&}	1.517±0.210 [#]	1.507±0.171 [#]	2.115±0.167 ^{*,#}	1.141±0.133 ^{*,#,&&}
96 h	1.870±0.056	1.853±0.080	2.268±0.175 [*]	1.416±0.048 ^{*,&&}	2.321±0.037 [#]	2.359±0.267 [#]	2.635±0.081 ^{*,#}	1.961±0.028 ^{*,#,&&}

*P<0.05, vs. NC group of the same cell line; #P<0.05, vs. the same group of NK cell line; &&P<0.01, vs. shSmad7 group.

减少($P < 0.05$); 培养48 h及以后, 干扰Smad7的KK细胞较NC组增多($P < 0.05$), 培养72 h及以后, 过表达Smad7的KK细胞较NC组减少($P < 0.05$)。培养48 h及以后, 干扰Smad7或过表达Smad7的KK细胞均较相应的NK细胞数量更多($P < 0.05$), 培养72 h及以后, NC组和Control组KK细胞均较相应的NK细胞数量更多($P < 0.05$)。

2.3 感染Smad7干扰慢病毒或过表达慢病毒的NK细胞及KK细胞的迁移能力差异

结果见图3、图4。在NK细胞中, 干扰Smad7的细胞迁移数量多于NC组($P < 0.05$), 过表达Smad7的细胞迁移数量少于NC组($P < 0.05$); KK细胞表现出同样的趋势。无论在NK细胞还是KK细胞中, 过表达Smad7的细胞迁移数量少于干扰Smad7的细胞迁移数量($P < 0.01$)。NK细胞与KK细胞比较, KK细胞各组迁移细胞数均较NK各组细胞更多($P < 0.05$)。

2.4 感染Smad7干扰慢病毒或过表达慢病毒的NK细胞及KK细胞的凋亡差异

结果见图5、图6。在NK细胞中, 干扰Smad7的细胞

凋亡率较NC组降低($P < 0.05$), 过表达Smad7的细胞凋亡率较NC组增加($P < 0.05$)。在KK细胞中, 干扰Smad7的细胞凋亡率与NC组比较差异无统计学意义, 过表达Smad7的细胞凋亡率较NC组增加($P < 0.01$)。无论在NK细胞还是KK细胞中, 过表达Smad7的细胞凋亡率高于干扰Smad7的细胞凋亡率($P < 0.01$)。NK与KK各组间比较, KK细胞各组细胞凋亡率均较NK各组细胞更低($P < 0.05$)。

2.5 感染Smad7干扰慢病毒或过表达慢病毒的NK细胞及KK细胞的EMT关键蛋白表达差异

2.5.1 N-cadherin相对表达情况 结果见图7、图8。在NK细胞中, 干扰Smad7的细胞N-cadherin蛋白的相对表达量与NC组比较差异无统计学意义, 过表达Smad7的细胞N-cadherin蛋白的相对表达量较NC组降低($P < 0.05$)。在KK细胞中, 干扰Smad7的细胞N-cadherin蛋白的相对表达量较NC组增加($P < 0.01$); 过表达Smad7的细胞N-cadherin蛋白的相对表达量与NC组比较差异无统计学意义。无论在NK细胞还是KK细胞中, 过表达Smad7的细

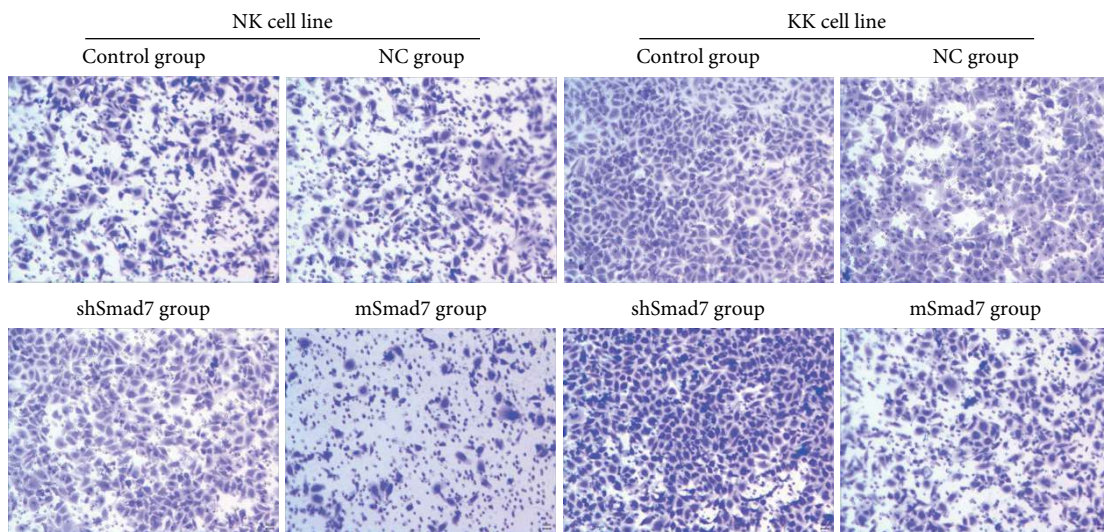


图 3 干扰或过表达Smad7的NK细胞及KK细胞迁移能力的差异。倒置显微镜 ×200

Fig 3 Differences in increased migration of NK cells and KK cells that interfered with and overexpressed Smad7. Inverted microscope ×200

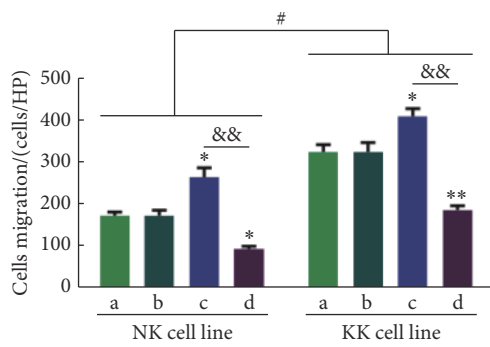


图 4 干扰或过表达 Smad7 的 NK 细胞及 KK 细胞迁移能力的差异 (n=10)

Fig 4 Differences in increased migration of NK cells and KK cells that interfered with and overexpressed Smad7 (n=10)

a: Control group; b: NC group; c: shSmad7 group; d: mSmad7 group.
*P<0.05, **P<0.01, vs. b; #P<0.05; &&P<0.01. HP ×200.

胞 N-cadherin 蛋白的相对表达量低于干扰 Smad7 的细胞 (P<0.05)。且 NK 与 KK 各组间比较差异均有统计学意义 (P<0.05)。

2.5.2 Occludin 相对表达情况 结果见图 7、图 8。在 NK 细胞中, 干扰 Smad7 的细胞 Occludin 蛋白相对表达量较 NC 组降低 (P<0.01), 过表达 Smad7 的细胞 Occludin 蛋白相对表达量较 NC 组增加 (P<0.05)。在 KK 细胞中, 干扰 Smad7 的细胞 Occludin 蛋白相对表达量较 NC 组降低 (P<0.01), 过表达 Smad7 的细胞 Occludin 蛋白相对表达量较 NC 组增加 (P<0.05)。无论在 NK 细胞还是 KK 细胞中, 过表达 Smad7 的细胞 Occludin 蛋白的相对表达量高于干

扰 Smad7 的细胞 (P<0.01)。且 NK 与 KK 各组间比较差异均有统计学意义 (P<0.05)。

3 讨论

不同于典型的增生性瘢痕, 瘢痕疙瘩的尺寸可以无限增加, 增生超出原来的伤口边缘, 导致身体发生变形和功能障碍^[16]。目前许多针对瘢痕疙瘩的治疗方法 (例如病灶内注射糖皮质激素、手术切除、局部注射 5-氟尿嘧啶和放疗等) 的局限性在于, 它们只能治疗症状而不能根治疾病, 没有纠正尚未完全发现的潜在病理机制, 因此导致瘢痕疙瘩的复发率居高不下。

在 EMT 过程中, 上皮细胞失去上皮特征, 间质细胞特性不断显现, 细胞与细胞间、细胞与基底膜间黏性降低, 迁移性增强^[17]。EMT 可分为以下 3 种类型^[18-19]: I 型 EMT 发生在胚胎发育过程中, 使细胞在组织形态发生和器官发育过程中分化为不同的组织。II 型 EMT 发生在组织损伤修复过程中, 并与炎症反应息息相关。III 型 EMT 发生在癌症进展期间, 使上皮来源的癌症转移到远处。同时, EMT 是可以逆转的瞬态过程, II 型 EMT 在伤口愈合和炎症消退后停止或逆转。但是, 在存在慢性炎症的情况下, 修复过程可能会延长, 导致 ECM 过多沉积并形成瘢痕。

HAHN 等^[7]研究发现瘢痕疙瘩角质形成细胞中有大量参与 EMT 的基因被上调, 而这些基因在瘢痕疙瘩和正常细胞中的表达均受 TGF-β 的调节。Smad 蛋白则被视为 TGF-β 家族受体信号传导的细胞内转录的关键效应子。

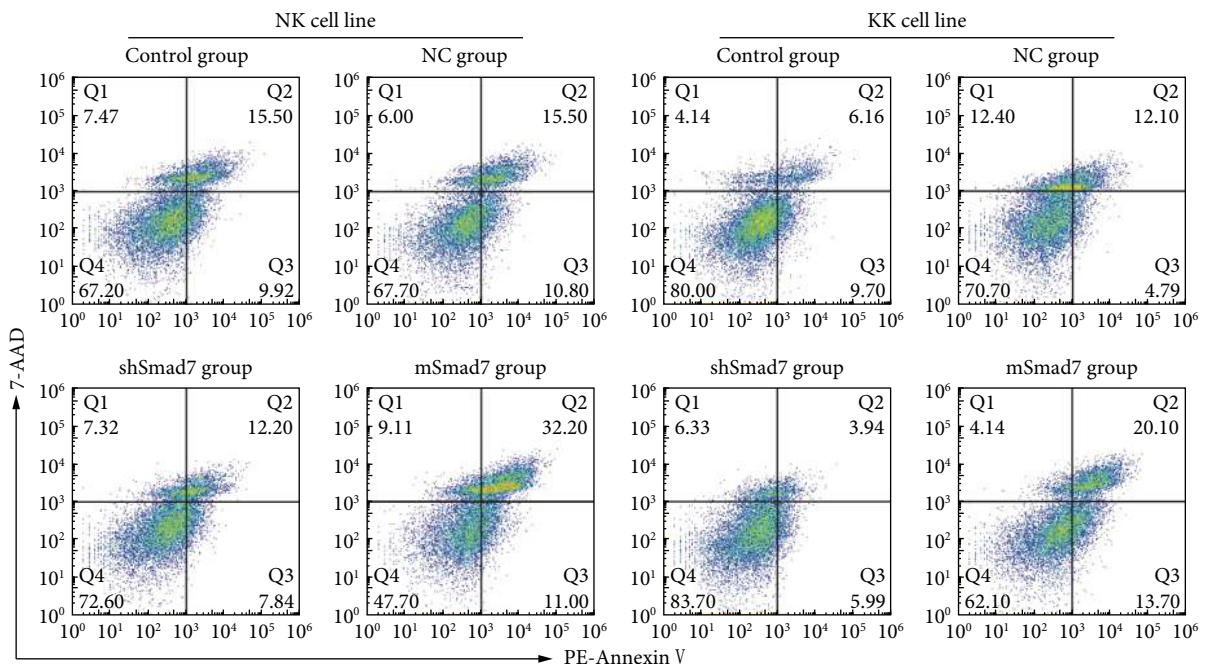


图 5 干扰或过表达 Smad7 的 NK 细胞及 KK 细胞凋亡率的差异

Fig 5 Differences in apoptosis rate of NK cells and KK cells that interfered with and overexpressed Smad7

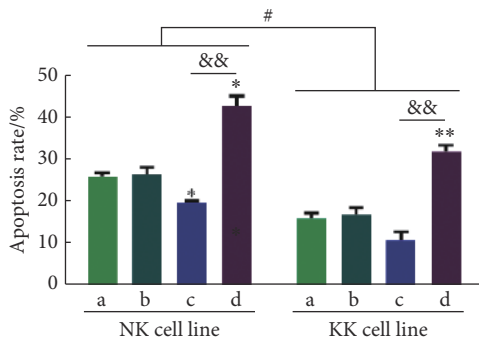


图 6 干扰或过表达Smad7的NK细胞及KK细胞凋亡率的差异 (n=3)
Fig 6 Differences in apoptosis rate of NK cells and KK cells that interfered with and overexpressed Smad7 (n=3)

a: Control group; b: NC group; c: shSmad7 group; d: mSmad7 group.
*P<0.05, **P<0.01, vs. b; #P<0.05; &&P<0.01.

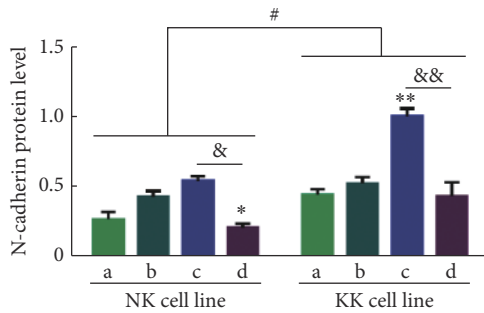


图 8 干扰或过表达Smad7的NK细胞及KK细胞N-cadherin和Occludin蛋白的表达差异 (n=3)

Fig 8 Difference in expression of N-cadherin and Occludin protein in NK cells and KK cells that interfered with and overexpressed Smad7 (n=3)
a: Control group; b: NC group; c: shSmad7 group; d: mSmad7 group. *P<0.05, **P<0.01, vs. b; #P<0.05; &&P<0.01.

本研究通过体外培养NK细胞和KK细胞,应用慢病毒干扰Smad7基因和过表达Smad7基因,Western blot检测干扰和过表达Smad7的NK细胞以及KK细胞中间质转化关键蛋白的表达情况。N-cadherin是间质细胞标志性蛋白,NK细胞中过表达Smad7可以使其表达降低,在KK细胞中干扰Smad7可以使其表达显著升高;Occludin是上皮细胞标志性蛋白,干扰Smad7后NK细胞和KK细胞Occludin蛋白的表达较对照组明显降低,过表达Smad7则使其表达较对照组明显增加,提示瘢痕疙瘩角质形成细胞过表达Smad7基因可以抑制细胞EMT,有可能逆转瘢痕疙瘩角质形成细胞的间质表型。用CCK-8检测细胞增殖情况发现:过表达Smad7可抑制NK细胞和KK细胞的增殖,而干扰Smad7则能促进细胞的增殖,且随着培养时间延长,抑制和促进的趋势都愈发明显。流式细胞术检测细胞凋亡差异情况,在NK细胞中过表达Smad7可促进细胞的凋亡,干扰Smad7可减缓细胞的凋亡;KK细胞中,过表达Smad7也能促进细胞的凋亡(P<0.05),但干扰Smad7的表达对KK细胞凋亡的影响没有影响。MA等^[8]研究发现在缺氧条件下,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible

Smad家族可分为3类:①受体调节型Smad(R-Smad),包括Smad1、Smad2、Smad3、Smad5和Smad8;②共同通路型Smad(Co-Smad):Smad4;③抑制型Smads(I-Smads),包括Smad6和Smad7。

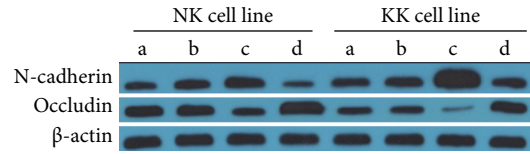
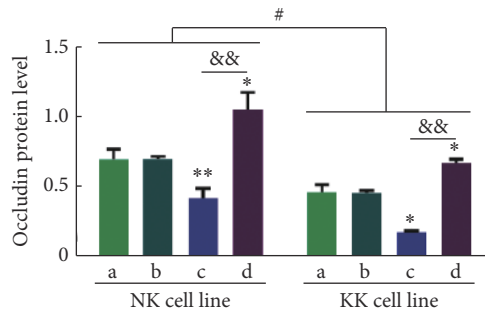


图 7 干扰或过表达Smad7的NK细胞及KK细胞N-cadherin和Occludin蛋白的表达差异

Fig 7 Difference in expression of N-cadherin and Occludin protein in NK cells and KK cells that interfered with and overexpressed Smad7
a: Control group; b: NC group; c: shSmad7 group; d: mSmad7 group.



factor-1 α , HIF-1 α)可以上调瘢痕疙瘩角质形成细胞中波形蛋白和纤连蛋白的表达,并下调E-钙黏蛋白和紧密连接蛋白-1(Zonula occluden-1, ZO-1)的表达,从而促进了EMT过程并增强了瘢痕疙瘩角质形成细胞的侵袭能力。本研究发现在正常培养条件下,过表达Smad7的KK细胞迁移数较对照组明显减少,干扰Smad7的KK细胞迁移数较对照组增加,说明过表达Smad7可以抑制瘢痕疙瘩角质形成细胞产生迁移的潜能,而干扰Smad7则可激发其迁移能力。相对于NK细胞,无论是干扰Smad7还是过表达Smad7,KK细胞在增殖活性、迁移能力和凋亡方面的改变均更大(P<0.05),故我们认为Smad7基因的调节对瘢痕疙瘩角质形成细胞中EMT的影响大于对正常皮肤角质形成细胞中EMT的影响。

综上所述,通过下调Smad7基因在瘢痕疙瘩角质形成细胞中的表达可促进TGF- β 介导的EMT,使细胞表现出更多间质细胞的特征,其迁移性、增殖性增强并抑制其凋亡。上调Smad7基因在瘢痕疙瘩角质形成细胞中的表达可抑制TGF- β 介导的EMT,从而抑制其增殖性、迁移能力并促进细胞凋亡。本研究在TGF- β 1调节瘢痕疙瘩角质

形成细胞基因表达,并影响其EMT的理论基础上^[3],进一步阐述了过表达Smad7可能是抑制瘢痕疙瘩表现出侵袭性、抗凋亡性的潜在的临床治疗方向。但本研究也有一定的不足之处,尚未涉及动物实验说明其在体内的作用,后续将继续跟进相关研究,进一步探索过表达Smad7预防瘢痕疙瘩形成或逆转瘢痕疙瘩EMT的潜能。

参 考 文 献

- [1] FUJIO K, KOMAI T, INOUE M, *et al.* Revisiting the regulatory roles of the TGF- β family of cytokines. *Autoimmun Rev*, 2016, 15(9): 917–922.
- [2] HU Z C, SHI F, LIU P, *et al.* TIEG1 represses Smad7-mediated activation of TGF- β 1/Smad signaling in keloid pathogenesis. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(5): 1051–1059.
- [3] ANDREWS J P, MARTTALA J, MACARAK E, *et al.* Keloids: the paradigm of skin fibrosis—pathomechanisms and treatment. *Matrix Biol*, 2016, 51: 37–46.
- [4] HUANG P, BI J, OWEN G R, *et al.* Keratinocyte microvesicles regulate the expression of multiple genes in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(12): 3051–3059.
- [5] RUSSO B, BREMBILLA N C, CHIZZOLINI C. Interplay between keratinocytes and fibroblasts: a systematic review providing a new angle for understanding skin fibrotic disorders. *Front Immunol*, 2020, 11: 648[2020-07-18]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00648>.
- [6] ALGHAMDI M A, AL-EITAN L N, STEVENSON A, *et al.* Secreted factors from keloid keratinocytes modulate collagen deposition by fibroblasts from normal and fibrotic tissue: a pilot study. *Biomedicine*, 2020, 8(7): 200[2020-07-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7400315/>. doi: 10.3390/biomedicine8070200.
- [7] HAHN J M, GLASER K, MCFARLAND K L, *et al.* Keloid-derived keratinocytes exhibit an abnormal gene expression profile consistent with a distinct causal role in keloid pathology. *Wound Repair Regen*, 2013, 21(4): 530–544.
- [8] MA X, CHEN J, XU B, *et al.* Keloid-derived keratinocytes acquire a fibroblast-like appearance and an enhanced invasive capacity in a hypoxic microenvironment *in vitro*. *Int J Mol Med*, 2015, 35(5): 1246–1256.
- [9] ZHANG M, LIU S, GUAN E, *et al.* Hyperbaric oxygen therapy can ameliorate the EMT phenomenon in keloid tissue. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(29): e11529[2020-07-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6086457/>. doi: 10.1097/MD.00000000000011529.
- [10] YUAN F L, SUN Z L, FENG Y, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in the formation of hypertrophic scars and keloids. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 21662–21669.
- [11] NIETO M A, HUANG R Y, JACKSON R A, *et al.* EMT: 2016. *Cell*, 2016, 166(1): 21–45.
- [12] SCANLON C S, VAN TUBERGEN E A, INGLEHART R C, *et al.* Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *J Dent Res*, 2013, 92(2): 114–121.
- [13] 杨明. 靶向调控TGF β /Smad通路中Smad4蛋白对增生性瘢痕成纤维细胞的影响. 昆明: 昆明医科大学, 2016.
- [14] 陈祯炜. 过表达TGF- β /Smad信号转导通路中Smad7蛋白对瘢痕疙瘩成纤维细胞的影响研究. 昆明: 昆明医科大学, 2017.
- [15] 夏舟. 上皮-间质转化在正常皮肤与瘢痕疙瘩角质细胞的对比研究. 昆明: 昆明医科大学, 2018.
- [16] OJEH N, BHARATHA A, GAUR U, *et al.* Keloids: current and emerging therapies. *Scars Burn Heal*, 2020, 6(2): 205951312094049 [2020-07-18]. <https://doi.org/10.1177/2059513120940499>.
- [17] LI D, KULAR L, VIJ M, *et al.* Human skin long noncoding RNA WAKMAR1 regulates wound healing by enhancing keratinocyte migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(19): 9443–9452.
- [18] MORRISON C D, PARVANI J G, SCHIEMANN W P. The relevance of the TGF- β Paradox to EMT-MET programs. *Cancer Lett*, 2013, 341(1): 30–40.
- [19] WENDT M K, TIAN M, SCHIEMANN W P. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- β -induced EMT during cancer progression. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 85–101.

(2020-07-22收稿, 2020-11-02修回)

编辑 余琳