

# 马齿苋提取物调控 miR-199a-5p 对人瘢痕疙瘩成纤维细胞生长和胶原合成的影响

张佳音，饶美荣，钟咪，曾芬

(江南大学附属医院皮肤科，江苏 无锡 214026)

**摘要：**目的 探讨马齿苋提取物调控 miR-199a-5p 对人瘢痕疙瘩成纤维细胞 (HKF) 生长和胶原合成的影响。方法 将 HKF 细胞分为对照组、马齿苋提取物 (50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组、miR-NC 组、miR-199a-5p 组、anti-miR-NC+200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  马齿苋提取物组、anti-miR-199a-5p+200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  马齿苋提取物组。CCK-8 法检测 HKF 细胞活力，流式细胞术检测细胞周期分布，RT-qPCR 法检测细胞 miR-199a-5p 表达，Western blot 法检测细胞 Col- I、Col- III 蛋白表达。结果 与对照组比较，马齿苋提取物组细胞活力、S 期细胞比例、Col- I 和 Col- III 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )，miR-199a-5p 表达、 $G_0/G_1$  期细胞比例升高 ( $P<0.05$ )。与 miR-NC 组比较，miR-199a-5p 组细胞活力、S 期细胞比例、Col- I 和 Col- III 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )， $G_0/G_1$  期细胞比例升高 ( $P<0.05$ )。与 anti-miR-NC+200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  马齿苋提取物组比较，anti-miR-199a-5p+200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  马齿苋提取物组细胞活力、S 期细胞比例、Col- I 和 Col- III 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )， $G_0/G_1$  期细胞比例降低 ( $P<0.05$ )。结论 马齿苋提取物可能通过上调 miR-199a-5p 表达抑制 HKF 细胞生长和胶原合成。

**关键词：**马齿苋提取物；瘢痕疙瘩成纤维细胞；miR-199a-5p；增殖；胶原合成

中图分类号：R285.5

文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2023)03-0969-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.049

瘢痕疙瘩是皮肤损伤后创面异常愈合引起的病理性纤维增生性疾病，主要表现为瘢痕成纤维细胞 (HKF) 过度增殖、胶原蛋白异常堆积，其严重影响皮肤外观和患者健康，虽然临床已有手术、药物治疗、激光治疗、放射治疗等治疗措施，但仍面临频繁复发风险<sup>[1]</sup>。马齿苋 *Portulaca oleracea* L. 是一种药食两用植物，其提取物或有效部位具有抑菌、降糖、抗肿瘤等药理作用<sup>[2]</sup>。先前的研究表明马齿苋提取物可抑制多种类型肿瘤细胞的增殖并可能诱导细胞凋亡<sup>[3-5]</sup>。基于 HKF 细胞的肿瘤样生物学特性以及马齿苋提取物的抗肿瘤作用，提示马齿苋提取物可能是一种潜在的瘢痕疙瘩治疗药物。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是重要的表观遗传调节因子，其表达改变与细胞生长、增殖、代谢等基本过程有关，研究表明 miR-199a-5p 在瘢痕疙瘩中表达降低，可影响 HKF 细胞的周期分布和增殖，可能参与瘢痕疙瘩形成<sup>[6]</sup>。本研究以 miR-199a-5p 为切入点，探讨马齿苋提取物对 HKF 细胞增殖、胶原合成的影响和潜在机制。

## 1 材料

人瘢痕疙瘩成纤维细胞 HKF (批号 200205，无锡欣润生物科技有限公司)。马齿苋 (批号 200310) 由江南大学附属医院中药房提供。Lipofectamine 2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司)；miRNA 提取试剂盒、miRNA 逆转录试剂盒 (批号 191015、190910，南京诺唯赞生物科技股份有限公司)；miR-NC、miR-199a-5p mimics、anti-miR-NC、anti-

miR-199a-5p、CCK-8 细胞计数试剂盒 (批号 200505)、miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒 (批号 200110) [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]；羊抗兔 IgG 二抗、I 型胶原 (Col- I) 兔多抗、Col- III 兔多抗、 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 兔多抗 (批号 191220、191105、190920、200212，英国 Abcam 公司)。

## 2 方法

2.1 马齿苋提取物制备 取 400 g 马齿苋粉碎，加 80% 乙醇提取，回收溶剂，水层用正丁醇萃取，得 20 g 浸膏<sup>[3]</sup>。

2.2 细胞培养和分组 HKF 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，长至 90% 时用胰酶消化，1:2 传代，取第 3~5 代细胞进行实验。将对数期 HKF 细胞以每孔  $2\times10^4$  个的密度接种于 24 孔板中，长至 50% 时用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 40 nmol/L miR-NC、40 nmol/L miR-199a-5p mimics、40 nmol/L anti-miR-NC、40 nmol/L anti-miR-199a-5p 分别转染至 HKF 细胞，收集转染 48 h 细胞备用。用含 0、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  马齿苋提取物的培养液孵育 HKF 细胞 48 h，分别记作对照组和 50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  马齿苋提取物组；转染 miR-199a-5p mimics、miR-NC 的 HKF 细胞分别记作 miR-199a-5p 组、miR-NC 组；用含 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  马齿苋提取物的培养液孵育转染 anti-miR-NC、anti-miR-199a-5p 的 HKF 细胞 48 h，依次记作 anti-miR-NC+200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  马齿苋提取物组、anti-miR-199a-5p+200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  马齿苋提取物组。

收稿日期：2022-01-12

作者简介：张佳音 (1980—)，女，副主任医师，研究方向为炎症性皮肤病及皮肤肿瘤。Tel：18915350087，E-mail：zjyin566@163.com

2.3 CCK-8法检测细胞活力 将未转染 HKF 细胞以及转染 miR-NC、miR-199a-5p mimics、anti-miR-NC、anti-miR-199a-5p 的 HKF 细胞按每孔  $3 \times 10^3$  个的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 按照实验分组分别给予对应剂量的马齿苋提取物孵育 48 h, 更换新鲜培养液, 各孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂孵育 2 h, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定每孔的吸光度 (A) 值, 用以表示细胞活力。

2.4 流式细胞术检测细胞周期分布 细胞按“2.2”项下方法处理, 收集各组细胞, 用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 加入预冷的 75% 乙醇于 4 ℃ 固定 5 h, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤细胞后, 加入 400  $\mu\text{L}$  碘化丙啶和 100  $\mu\text{L}$  RNase A 于 4 ℃ 避光孵育 30 min, 用流式细胞仪进行检测, 采用细胞周期拟和软件 ModFit 分析结果。

2.5 RT-qPCR 法检测细胞 *miR-199a-5p* 表达 细胞按“2.2”项下方法处理, 收集各组细胞, 用 miRNA 提取试剂盒分离得 HKF 细胞的总 RNA, miRNA 逆转录试剂盒合成 cDNA 后, 再用 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒进行 RT-qPCR 反应, 以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算 *miR-199a-5p* 表达。*miR-199a-5p* 引物正向序列 5'-TCAAGAGCAATAACGAAAAATGT-3', 反向序列 5'-GCTGTCAACGATAACGCTACGT-3'; *U6* 引物正向序列

5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向序列 5'-AACGCTTCA CGAATTGCGT-3'。

2.6 Western blot 法检测细胞 Col-I、Col-III 蛋白表达 细胞按“2.2”项下方法处理, 收集各组细胞, 加入放射免疫沉淀测定缓冲液于冰上提取总蛋白, 取 30  $\mu\text{L}$  总蛋白经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转移到硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h, 加入一抗 Col-I (1:2 000)、 $\beta$ -actin (1:2 000)、Col-III (1:5 000) 4 ℃ 孵育 10 h, 洗涤 3 次后, 加二抗室温孵育 1 h, 加入化学发光底物, 在化学发光系统下呈现蛋白条带, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 用 Image J 软件定量分析 Col-I 和 Col-III 蛋白表达。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 马齿苋提取物对 HKF 细胞增殖活力和细胞周期的影响 与对照组比较, 各剂量马齿苋提取物组细胞活力、S 期细胞比例降低 (*P*<0.05),  $G_0/G_1$  期细胞比例升高 (*P*<0.05), 见图 1、表 1。

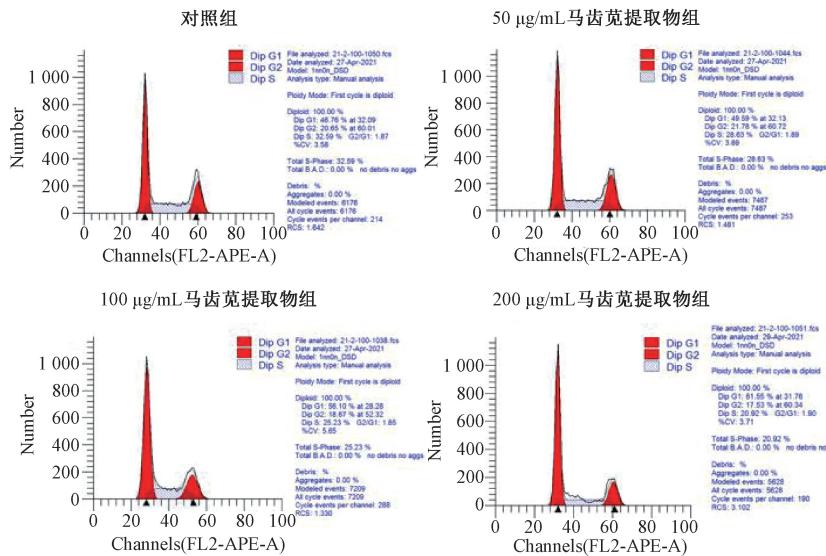


图 1 各组细胞周期流式图

表 1 马齿苋提取物对 HKF 细胞增殖活力、周期分布的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ )

| 组别                                  | A 值                | $(G_0/G_1)/\%$     | S/%                | $G_2/\%$         |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| 对照组                                 | $1.124 \pm 0.10$   | $43.68 \pm 4.01$   | $32.79 \pm 2.37$   | $23.53 \pm 2.01$ |
| 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 马齿苋提取物组  | $0.973 \pm 0.09^*$ | $48.23 \pm 4.35^*$ | $30.13 \pm 2.24^*$ | $21.64 \pm 1.94$ |
| 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 马齿苋提取物组 | $0.712 \pm 0.07^*$ | $54.96 \pm 5.14^*$ | $24.41 \pm 1.94^*$ | $20.63 \pm 1.64$ |
| 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 马齿苋提取物组 | $0.543 \pm 0.05^*$ | $61.97 \pm 5.73^*$ | $14.46 \pm 1.17^*$ | $23.57 \pm 2.08$ |

注: 与对照组比较, \**P*<0.05。

3.2 马齿苋提取物对 HKF 细胞胶原合成的影响 与对照组比较, 各剂量马齿苋提取物组细胞 Col-I、Col-III 蛋白表达降低 (*P*<0.05), 见图 2、表 2。

3.3 马齿苋提取物对 HKF 细胞 *miR-199a-5p* 表达的影响 与对照组比较, 各剂量马齿苋提取物组细胞 *miR-199a-5p* 表

达升高 (*P*<0.05), 见表 3。

3.4 过表达 *miR-199a-5p* 对 HKF 细胞增殖活力、细胞周期和胶原合成的影响 与 miR-NC 组比较, *miR-199a-5p* 组细胞 *miR-199a-5p* 表达、 $G_0/G_1$  期细胞比例升高 (*P*<0.05), 细胞活力、S 期细胞比例、Col-I 和 Col-III 蛋白表达降低

( $P<0.05$ ), 见图3、表4。

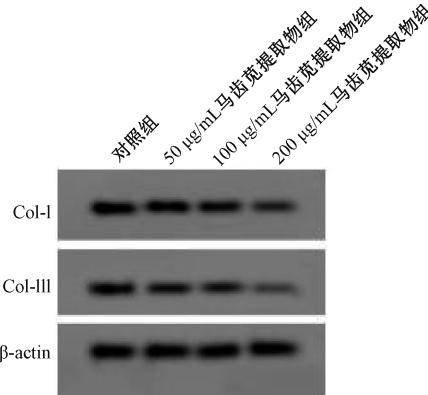


图2 各组细胞Col-I、Col-III蛋白条带图

表2 马齿苋提取物对HKF细胞胶原合成的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=9)

| 组别                | Col-I       | Col-III     |
|-------------------|-------------|-------------|
| 对照组               | 0.87±0.08   | 0.75±0.07   |
| 50 μg/mL 马齿苋提取物组  | 0.75±0.07 * | 0.62±0.06 * |
| 100 μg/mL 马齿苋提取物组 | 0.61±0.05 * | 0.51±0.05 * |
| 200 μg/mL 马齿苋提取物组 | 0.47±0.03 * | 0.42±0.03 * |

注: 与对照组比较, \*  $P<0.05$ 。

表3 马齿苋提取物对HKF细胞miR-199a-5p表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=9)

| 组别                | miR-199a-5p |
|-------------------|-------------|
| 对照组               | 1.00±0.10   |
| 50 μg/mL 马齿苋提取物组  | 1.43±0.12 * |
| 100 μg/mL 马齿苋提取物组 | 1.91±0.15 * |
| 200 μg/mL 马齿苋提取物组 | 2.37±0.21 * |

注: 与对照组比较, \*  $P<0.05$ 。

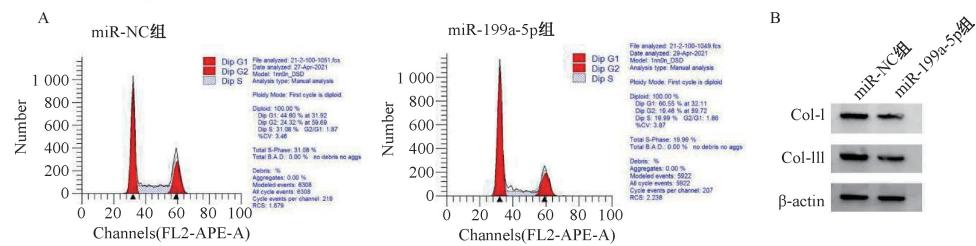


图3 过表达miR-199a-5p后各组细胞细胞周期 (A) 和Col-I、Col-III蛋白表达 (B)

表4 过表达miR-199a-5p对HKF细胞增殖活力、周期分布和胶原合成的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=9)

| 组别           | miR-199a-5p | Col-I       | Col-III     | A值           | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> /% | S/%          | G <sub>2</sub> /% |
|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------------------------------|--------------|-------------------|
| miR-NC组      | 1.00±0.10   | 0.85±0.07   | 0.73±0.06   | 1.121±0.11   | 43.58±4.18                        | 32.97±2.87   | 23.45±1.87        |
| miR-199a-5p组 | 2.28±0.18 * | 0.45±0.04 * | 0.33±0.03 * | 0.541±0.05 * | 59.03±5.39 *                      | 18.54±1.37 * | 22.43±1.97        |

注: 与miR-NC组比较, \*  $P<0.05$ 。

3.5 抑制miR-199a-5p表达可逆转马齿苋提取物对HKF细胞增殖活力、周期分布和胶原合成的影响 与anti-miR-NC+200 μg/mL马齿苋提取物组比较, anti-miR-199a-5p+

200 μg/mL马齿苋提取物组细胞miR-199a-5p表达、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例降低( $P<0.05$ ), 细胞活力、S期细胞比例、Col-I和Col-III蛋白表达升高( $P<0.05$ ), 见图4、表5。

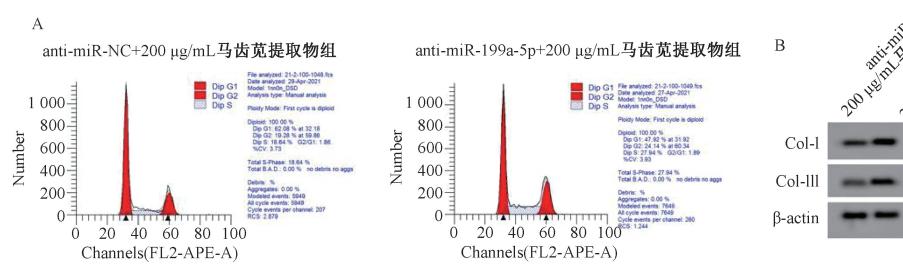


图4 抑制miR-199a-5p表达后各组细胞细胞周期 (A) 和Col-I、Col-III蛋白表达 (B)

表5 抑制miR-199a-5p表达可逆转马齿苋提取物对HKF细胞增殖活力、周期分布和胶原合成的影响 ( $\bar{x}\pm s$ , n=9)

| 组别                                 | miR-199a-5p | Col-I       | Col-III     | A值           | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> /% | S/%          | G <sub>2</sub> /% |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------------------------------|--------------|-------------------|
| anti-miR-NC+200 μg/mL 马齿苋提取物组      | 1.00±0.08   | 0.48±0.04   | 0.41±0.03   | 0.547±0.04   | 64.88±5.39                        | 11.85±0.98   | 23.27±1.99        |
| anti-miR-199a-5p+200 μg/mL 马齿苋提取物组 | 0.45±0.04 * | 0.91±0.07 * | 0.87±0.08 * | 1.086±0.09 * | 45.08±3.76 *                      | 31.21±2.54 * | 23.71±1.87        |

注: 与anti-miR-NC+200 μg/mL马齿苋提取物组比较, \*  $P<0.05$ 。

#### 4 讨论

HKF细胞是创面愈合过程的主要效应细胞, 其异常增殖导致细胞外基质过度沉积, 创面过度愈合, 形成病理性

瘢痕, 近年研究表明抑制HKF细胞增殖和胶原合成有助于改善瘢痕疙瘩形成<sup>[7-8]</sup>。本研究探讨马齿苋提取物对HKF细胞增殖、胶原合成的影响, 结果显示马齿苋提取物干预

降低HKF细胞活力,诱导G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>周期阻滞,并抑制胶原蛋白Col-Ⅰ和Col-Ⅲ合成。转化生长因子-β1(TGF-β1)是组织再生和纤维化过程中成纤维细胞增殖、胞外基质过度累积的关键启动子<sup>[9]</sup>。研究报道马齿苋黄酮通过抑制TGF-β1表达可有效改善肝纤维化病变<sup>[10]</sup>,这与本研究中马齿苋提取物的抗胶原合成作用相似。以上研究表明,马齿苋提取物在抑制HKF细胞增殖和胶原合成方面具有重要作用,但其是否通过TGF-β1发挥作用仍值得探讨。

miR-199a-5p是一种多功能miRNA,参与调控许多细胞过程。喉癌中miR-199a-5p表达下降,上调miR-199a-5p表达可触发喉癌细胞凋亡,并阻碍细胞增殖和侵袭<sup>[11]</sup>。miR-199a-5p靶向丝裂原活化蛋白3激酶11能够降低肺癌细胞增殖能力,抑制裸鼠移植瘤形成<sup>[12]</sup>。miR-199a-5p还参与调控未分化甲状腺癌的上皮间质转化,抑制肺转移,具有肿瘤抑制因子功能<sup>[13-14]</sup>。此外,有研究报道香菇多糖对PM2.5暴露肺癌细胞的抗炎和抗迁移作用可能与上调miR-199a-5p表达相关<sup>[15]</sup>。本研究发现,马齿苋提取物干预后HKF细胞miR-199a-5p表达升高,提示miR-199a-5p可能介导马齿苋提取物的功能。过表达miR-199a-5p可降低HKF细胞活力,诱导G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>周期阻滞,抑制Col-Ⅰ和Col-Ⅲ蛋白表达,这与前人报道的抗增殖作用一致<sup>[6]</sup>。实验还显示,抑制miR-199a-5p表达可减弱马齿苋提取物对HKF细胞活力、周期分布、胶原合成的影响,这进一步证实马齿苋提取物对HKF细胞增殖和胶原合成的抑制作用至少部分与上调miR-199a-5p表达有关。

综上所述,马齿苋提取物可能通过上调miR-199a-5p表达抑制HKF细胞的生长和胶原合成,本研究为马齿苋提取物和miR-199a-5p在瘢痕疙瘩治疗中的潜在应用奠定了理论基础。

## 参考文献:

- [1] 贾赤宇,陈冷西.瘢痕疙瘩的肿瘤特征[J].中华烧伤杂志,2021,37(4):301-305.
- [2] 解思友,逢美芳,孙艳,等.马齿苋的化学成分与药理作用最新研究进展[J].现代药物与临床,2011,26(3):212-215.
- [3] 崔丽敏,张学.马齿苋提取物抑制肺癌A549细胞增殖的实验研究[J].四川中医,2007,25(12):15-16.
- [4] 崔香淑,金元哲,张学武.马齿苋提取物对肝癌细胞HepG-2抑制作用的实验研究[J].时珍国医国药,2007,18(5):

1065-1066.

- [5] 熊祎虹,邓超,白文,等.马齿苋醇提取物对结肠癌细胞及其干细胞体外增殖作用的机理研究[J].北京中医药大学学报,2018,41(1):39-44.
- [6] 吴志远,卢玲,郭晓瑞,等.瘢痕疙瘩microRNA表达谱的筛选及miR-199a-5p生物功能的初步研究[J].中华整形外科杂志,2013,29(4):279-284.
- [7] Cui J B, Li Z N, Jin C L, et al. Knockdown of fibronectin extra domain B suppresses TGF-β1-mediated cell proliferation and collagen deposition in keloid fibroblasts via AKT/ERK signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(4): 1131-1137.
- [8] Li Y, Liu H X, Liang Y Z, et al. DKK3 regulates cell proliferation, apoptosis and collagen synthesis in keloid fibroblasts via TGF-β1/Smad signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 174-180.
- [9] Lin L X, Wang Y T, Liu W Y, et al. BAMBI inhibits skin fibrosis in keloid through suppressing TGF-β1-induced hyperplastic fibroblast cell proliferation and excessive accumulation of collagen I[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 13227-13234.
- [10] 潘晓丽,熊永爱,谭玉柱,等.马齿苋总黄酮对肝纤维化大鼠转化生长因子-β1信号因子表达的影响[J].医药导报,2014,33(9):1140-1143.
- [11] Li D J, Wang X, Yin W H, et al. MiR-199a-5p suppresses proliferation and invasion of human laryngeal cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(23): 12200-12207.
- [12] Li Y L, Wang D T, Li X, et al. MiR-199a-5p suppresses non-small cell lung cancer via targeting MAP3K11[J]. *J Cancer*, 2019, 10(11): 2472-2479.
- [13] Hao F Y, Bi Y N, Wang L, et al. miR-199a-5p suppresses epithelial-mesenchymal-transition in anaplastic thyroid carcinoma cells via targeting Snail signals[J]. *Cancer Biomark*, 2020, 29(3): 317-326.
- [14] Ma S G, Jia W, Ni S Y. miR-199a-5p inhibits the progression of papillary thyroid carcinoma by targeting SNAI1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(1): 181-186.
- [15] Qi H, Liu Y, Wang N, et al. Lentinan attenuated the PM2.5 exposure-induced inflammatory response, epithelial-mesenchymal transition and migration by inhibiting the PVT1/miR-199a-5p/caveolin1 pathway in lung cancer[J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(5): 683-693.