

靶向 p38 丝裂素活化蛋白激酶 对兔唇裂术后瘢痕增生的影响

葛盈盈^{1,2} 岳金^{1,2} 薛令法^{1,2} 许尧祥^{1,2} 赵浩然¹ 崔明雪^{1,2} 肖文林^{1,2}

¹青岛大学附属医院口腔颌面外科, 青岛 266555; ²青岛大学口腔医学院, 青岛 266071

通信作者: 肖文林, Email: wenlinxiao@sina.com

【摘要】 目的 研究运用 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)基因重组腺病毒靶向敲低目的基因的表达,通过检测 p38MAPK 信号通路受到抑制后不同时间段兔上唇瘢痕增生受到的影响,来探讨疗效最佳的基因治疗时间。**方法** 对 90 只 2.0 ~ 2.5 kg 的上唇裂新西兰白兔进行唇裂修复术,选取术后第 0、1、2 周对其瘢痕正中注射重组病毒,将第 3 周的瘢痕组织制成标本。通过使用蛋白免疫印迹法(Western blot)、实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫组织化学染色等方法分别定性、定量检测 p38MAPK 及瘢痕形成相关因子与 Smad 蛋白和 mRNA 的相对表达水平。使用 SPSS 24.0 软件对实验结果进行统计学分析。**结果** 相较于术后第 0、2 周,术后第 1 周瘢痕组织中 Col III (1.373 ± 0.073 , $F = 8.027$, $P = 0.002$)、MMP1 (1.715 ± 0.028 , $F = 9.262$, $P = 0.001$) 表达明显升高, Col I (0.424 ± 0.015 , $F = 7.794$, $P = 0.003$) 和 TIMP1 (0.464 ± 0.025 , $F = 6.196$, $P = 0.007$) 表达明显降低,差异均有统计学意义。术后第 1 周的 Smad2 蛋白表达水平与 mRNA 表达水平降低 ($F = 14.123$, $P = 0.029$), Smad3 蛋白表达水平与 mRNA 表达水平降低 ($F = 3.796$, $P = 0.037$),与其他组相比差异均有统计学意义。**结论** 抑制 p38MAPK 表达可能通过 Smad 依赖型信号通路发挥抑制瘢痕增生的作用,兔上唇唇裂术后第 1 周瘢痕形成过程中靶向敲低 p38MAPK 对瘢痕增生影响最大。

【关键词】 p38 丝裂素活化蛋白激酶; 基因沉默; 腺病毒; 增生性瘢痕; 基因治疗

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2015HM022)

引用著录格式: 葛盈盈, 岳金, 薛令法, 等. 靶向 p38 丝裂素活化蛋白激酶对兔唇裂术后瘢痕增生的影响[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2023, 17(1): 37-44.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.01.005

Effect of targeting p38MAPK on scar hyperplasia after rabbit cleft lip repair *in vivo*

Ge Yingying^{1,2}, Yue Jin^{1,2}, Xue Lingfa^{1,2}, Xu Yaoxiang^{1,2}, Zhao Haoran¹, Cui Mingxue^{1,2}, Xiao Wenlin^{1,2}

¹Department of the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266555, China; ²School of Stomatology of Qingdao University, Qingdao 266071, China

Corresponding author: Xiao Wenlin, Email: wenlinxiao@sina.com

【Abstract】 Objective The recombinant adenovirus of p38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPK) gene was used to knock down the expression of target genes. By detecting the influence of p38MAPK signal pathway obstruction on upper lip scar hyperplasia in different time periods, the optimal therapeutic time of gene therapy was determined. **Methods** A total of ninety New Zealand white rabbits with cleft upper lip of 2.0-2.5 kg were treated with cleft lip repair. Recombinant virus was injected into the scar center at week 0, 1 and 2 after surgery, and the scar tissue was made into specimens at week 3 after surgery. Western blot, Real-time fluorescence quantitative RT-PCR and immunohistochemical staining were used to quantitatively and qualitatively detect the relative expression levels of proteins and mRNA of p38MAPK, scar formation related factors and Smad. The results of Western blot and RT-PCR were analyzed with software (SPSS v. 24.0). **Results** The results of Western blot, RT-PCR and immunohistochemical staining showed that the expressions of Col III (1.373 ± 0.073 , $F = 8.027$, $P = 0.002$) and MMP1 (1.715 ± 0.028 , $F = 9.262$, $P = 0.001$) in scar tissue of the injection group at week 1 after surgery were significantly

higher than those at week 0 and 2. The expressions of Col I (0.424 ± 0.015 , $F = 7.794$, $P = 0.003$) and TIMP1 (0.464 ± 0.025 , $F = 6.196$, $P = 0.007$) significantly decreased. The expression level of Smad protein and mRNA in the injection group at 1 week after surgery decreased, and the results were statistically significant compared with other groups ($F_{p-smad2} = 14.123$, $P_{p-smad2} = 0.029$; $F_{p-smad3} = 3.796$, $P_{p-smad3} = 0.037$).

Conclusions Inhibition of *p38MAPK* expression may play a role in inhibiting scar hyperplasia through the *Smad* dependent signaling pathway. Targeted *p38MAPK* knockdown had the greatest effect on scar hyperplasia at one week after cleft-lip surgery in rabbit upper lip.

【Key words】 p38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPK); Gene silencing; Adenovirus; Hypertrophic scar; Gene therapy

Found program: Natural Science foundation of Shandong Province (ZR2015HM022)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.01.005

唇裂修复术在临床应用至今,手术产生的瘢痕影响颌面部功能及美观的问题已得到广泛关注。考虑到大多患者接受手术的年纪较小、心智尚不成熟,在成长过程中瘢痕对患者的身心健康更易产生不良影响。研究发现,亚洲人群皮肤受伤后相较其他人群更有倾向于色素沉着和瘢痕形成的趋势^[1]。对唇裂术后瘢痕增生的防治研究从未停止,其研究方向主要有手术修复、愈合材料、激光治疗等^[2-4]。然而在现今的临床,有限的防治手法导致的手术伤口的增生性瘢痕(hypertrophic scar, HTS)仍是一个重要问题^[5]。

瘢痕增生是瘢痕相关细胞、细胞因子及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)之间相互作用的结果。其中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)在瘢痕增生形成中起到了重要作用。在TGF- $\beta 1$ 调控的瘢痕增生形成的信号通路有Smad依赖型及非Smad依赖型两种。p38丝裂素活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)作为TGF- β 信号通路的重要一员最早于1993年被发现。目前为止,已有实验证明抑制p38MAPK信号通路可以减轻瘢痕形成及减少相关因子的表达^[6]。本课题组前期的体内研究表明, I型胶原(collagen type I, Col I)、III型胶原(collagen type III, Col III)、基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase 1, MMP1)、基质金属蛋白酶抑制剂1(tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP1)的含量经敲低*p38MAPK* 1周后在天狼猩红染色中具有显著变化^[7]。Yamanaka等^[8]对视网膜色素上皮细胞的研究发现, Smad信号依赖于*p38MAPK*调控瘢痕ECM中的Col I和纤连蛋白表达。本实验旨在探索p38MAPK信号通路受到抑制后对兔唇裂术后HTS的治疗作用,以及在瘢痕增生过程中抑制*p38MAPK*表达对Smad信号通路的影响。

在最新细胞及动物试验研究的基础上,针对我国唇裂修复术后唇裂瘢痕过度增生的临床实际,对该类高危人群的干预性治疗和早期预防提供必要的理论依据和实验基础。

材料与方法

一、实验动物

70日龄SPF级纯种雄性新西兰白兔90只,购于青岛康大生物科技有限公司,合格证号:SCXK(鲁)20160002。购置的所有白兔健康状态良好,无遗传性疾病及病原菌携带,平均体质量为2.0~2.5 kg,均携带有无感染的自然上唇裂隙。所有白兔饲养于温度15~21℃,相对湿度40%~60%的兔舍中,定时定量提供消毒灭菌饲料与清洁饮水。后期进行的动物实验符合实验动物保护与使用的准则。

二、实验试剂和仪器设备

Col I一抗、Smad3一抗与Phospho-Smad3一抗(Abcam,英国); Col III一抗、p38MAPK一抗(Novus, 美国); TIMP1一抗、MMP1一抗(Millipore, 美国); phospho-p38MAPK一抗、Smad2一抗(北京博奥森生物科技有限公司); phospho-Smad2一抗(Santa, 美国); SDS-PAGE电泳仪、湿法转膜仪(Bio-Rad, 美国); BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司); Tanon 5200化学发光检测系统(上海天能科技有限公司); SYBR® Premix Ex Taq试剂盒、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒、RNAiso Plus(TaKaRa, 日本); Nanodrop分光光度计(Thermo, 美国); Stepone Plus荧光定量PCR仪(ABI, 美国); 正置光学显微镜成像系统(Nikon, 日本); 显微注射器(Hamilton, 美国)。

三、实验分组方法

对90只兔进行唇裂修复术,以手术当日为起始

周开始计算术后周数。使用完全随机分组设计,将所有兔编号,任意从随机数字表中某行某列抄录90个数。将各数除以3,得到的余数为1、2、3者分别记为3大组。若数目不等,则再使用随机数字表对角线数字决定组别的改变,直至每组均为30只。

1. 实验组:兔的局部瘢痕上用显微注射器注射 3×10^{10} PFU/mL的含p38MAPK干扰序列的腺病毒干扰组40 μ L,注射点位于瘢痕正中的上、中、下3点,该组为p38MAPK腺病毒干扰组。将p38MAPK腺病毒干扰组按照同样的随机分组方法再分为3组,每组10只。病毒注射时间是术后当天的为术后0周组、注射时间是术后第7天的为术后1周组,术后第14天注射病毒的是术后2周组。

2. 阴性对照组:兔的局部瘢痕上注射 3×10^{10} PFU/mL的不含干扰序列的阴性对照腺病毒40 μ L,注射点方法与位点同上。

3. 空白对照组:不予注射。

术后第3周处死所有兔后取得上唇瘢痕组织,从上至下分为4等份。取近下唇端的瘢痕组织用 $\varphi=4\%$ 甲醛溶液固定,石蜡包埋并切成厚度4 μ m的切片,分别标记组别以待后续实验使用。

四、免疫组织化学染色检测

将各组上唇瘢痕石蜡切片脱蜡至水,进行微波抗原修复后封闭。分别加入稀释的Col I (1:2 000)、Col III (1:5 000)、MMP1 (1:500)、TIMP1 (1:1 000)的一抗,4 $^{\circ}$ C环境下过夜。PBS冲洗切片3次后,每张切片加入相应种属的二抗,置于4 $^{\circ}$ C环境下50 min后磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗切片3次。加入60 μ L 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride, DAB)溶液后镜下观察显色情况。使用蒸馏水洗涤,苏木素液复染,梯度乙醇(φ , 75%~100%)脱水干燥每张切片,再进行二甲苯透明,最后中性树胶封固,标记留存。每组切片使用显微镜400倍视野观察,每张切片由3位病理科老师分别进行双盲阅片,拍照,观察Col I、Col III、MMP1和TIMP1的表达。

五、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测

1. 检测每组瘢痕形成相关因子的蛋白水平表达:每组取上唇瘢痕组织约30 mg,加入Ripa蛋白裂解液,研磨裂解,使用碧云天BCA试剂盒测定浓度后进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜印记至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上,加入一抗Col I (1:1 000)、Col III (1:5 000)、MMP1 (1:200)

和TIMP1 (1:1 000),4 $^{\circ}$ C过夜孵育,羊抗小鼠二抗常温孵育1 h,采用Thermo ECL进行化学发光,用Tanon凝胶成像仪拍照并获取图片。使用Image J软件分析测量目标条带的灰度值,取其与内参条带比值,并重复3次以取得平均值。

2. 检测术后1周组与阴性对照组、空白对照组的p38MAPK与Smad的蛋白水平表达:取以上3组兔上唇瘢痕组织每组约30 mg,研磨裂解测定浓度后进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,加入一抗Smad3 (1:1 000)与phospho-Smad3 (1:2 000)、p38MAPK (1:500)、phospho-p38MAPK (1:1 000)、Smad2 (1:2 000)、phospho-Smad2 (1:5 000),4 $^{\circ}$ C过夜孵育,二抗常温孵育1 h后进行化学发光,拍照并获取图片。使用Image J软件分析测量目标条带的灰度值,取其与内参条带比值,并重复3次以取得平均值。

六、实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

1. 检测每组瘢痕形成相关因子的mRNA表达水平:每组称取30 mg上唇瘢痕组织,加入1 mL Total RNA提取试剂(TaKaRa, 日本),冰上研磨至无明显沉淀,将匀浆转移至无RNA酶的EP管中。室温静置5 min,离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 $\times g$, 5 min),吸取上清液移入一新EP管中。加入氯仿200 μ L后充分振荡15 s,室温静置5 min,离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 $\times g$, 15 min),吸取离心后的上层无色液体移入一新EP管中。加入等体积异丙醇,上下颠倒混匀。室温静置5 min后离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 $\times g$, 10 min),去上清,沉淀加入 $\varphi=75\%$ 乙醇1 mL,轻微振荡15 s,离心(4 $^{\circ}$ C, 7 500 $\times g$, 5 min)。去上清,在超净台中将管内沉淀鼓风静置干燥3 min。加入50 μ L DEPC水溶解,检测浓度,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。置于PCR仪中进行反转录,条件为37 $^{\circ}$ C, 15 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 s。PCR扩增条件:95 $^{\circ}$ C, 10 min; 94 $^{\circ}$ C, 60 s; 50 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 15 min; 20 $^{\circ}$ C维持,共40个循环。引物设计见表1。

2. 检测术后1周组与阴性对照组、空白对照组的p38MAPK与Smad的mRNA水平表达:取以上3组兔上唇瘢痕组织每组约30 mg,冰上研磨,提取RNA后置于PCR仪中进行反转录,条件为37 $^{\circ}$ C, 15 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 s。PCR扩增条件:95 $^{\circ}$ C, 10 min; 94 $^{\circ}$ C, 60 s; 50 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 15 min; 20 $^{\circ}$ C维持,共40个循环。引物设计见表2。

七、统计学处理方法

采用SPSS 24.0统计软件对数据进行结果分

表1 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测瘢痕形成相关因子的引物序列

基因	引物序列	产物长度 (bp)
<i>GAPDH</i>	正向:5'-AAGGTCGGAGTGAACGGATTG-3'	148
	反向:5'-CGTGGGTGGAATCATACTGGAAC-3'	
<i>Col I</i>	正向:5'-CAAGGGAGAGAGTGGTAACAAG-3'	92
	反向:5'-TTCCCACTTTCACCCTTGAC-3'	
<i>Col III</i>	正向:5'-CACTCGGACTTGCAGGAATTA-3'	109
	反向:5'-TTCCCACTTTCACCCTTGAC-3'	
<i>MMP1</i>	正向:5'-GATGACAGGTGGACCAAGAT-3'	102
	反向:5'-CCCAATATCAGTAGAATGGGAGAG-3'	
<i>TIMP1</i>	正向:5'-CTACCTTGTACCAGCGTTATGA-3'	140
	反向:5'-GTTCTGGGATTCTGGGAGTA-3'	

表2 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测p38MAPK与Smad的引物序列

基因	引物序列	产物长度 (bp)
<i>GAPDH</i>	正向:5'-AAGGTCGGAGTGAACGGATTG-3'	148
	反向:5'-CGTGGGTGGAATCATACTGGAAC-3'	
<i>p38MAPK</i>	正向:5'-CAAATCTCCGAGGCCTAAA-3'	103
	反向:5'-GGATCTTCAGCTCACAGTCTTC-3'	
<i>Smad2</i>	正向:5'-CCAGTTCTGCCTCCAGTATTAG-3'	91
	反向:5'-TTTCTGGAATGGAGTGGGTATAG-3'	
<i>Smad3</i>	正向:5'-TACCTGAGCGAAGATGGAGAG-3'	119
	反向:5'-GGCTGCAGGTCCAAGTTATT-3'	

析。在检测瘢痕相关因子的Western blot与RT-PCR实验中,数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。对p38MAPK腺病毒干扰组与阴性对照组、空白对照组进行方差齐性检验,单因素方差分析的多重比较则使用LSD-*t*检验进行两两比较。同理,对p38MAPK腺病毒干扰组中的术后0、1、2周组进行单因素方差分析和LSD-*t*两两比较。检测Smad的Western blot与RT-PCR实验的统计方法同前。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

一、免疫组织化学染色检测病毒转染后瘢痕组织内瘢痕形成相关因子的表达情况

瘢痕组织细胞在染色后,相关因子呈棕黄色,且存在于细胞质,细胞核呈蓝色。如图1所示,在空白对照组和阴性对照组中Col I和TIMP1表达最多,而Col III和MMP1表达最少。前者在术后第0、2周表达降低,在术后第1周表达最低;后者在术后第0、

2周表达升高,在术后第1周表达最高。

二、蛋白免疫印迹检测病毒转染后瘢痕组织内瘢痕形成相关因子与Smad蛋白水平表达情况

p38MAPK腺病毒干扰组与阴性对照组、空白对照组的瘢痕形成相关因子蛋白表达量差异有统计学意义($P < 0.05$),其中阴性对照组与空白对照组之间无明显差异,而p38MAPK腺病毒干扰组与其他两组相较差异明显。术后第1周时Col III(1.373 ± 0.073 , $F = 8.027$, $P = 0.002$)和MMP1(1.715 ± 0.028 , $F_{MMP1} = 9.262$, $P_{MMP1} = 0.001$)蛋白的表达相较最高,Col I(0.424 ± 0.015 , $F = 7.794$, $P = 0.003$)和TIMP1(0.464 ± 0.025 , $F = 6.196$, $P = 0.007$)相较最低,与术后0、2周组的蛋白表达量相比差异有统计学意义($P < 0.05$,图2)。调平术后1周组、阴性对照组、空白对照组样本的总的Smad2、Smad3及p38MAPK的磷酸化蛋白量,检测phospho-Smad2、phospho-Smad3及phospho-p38MAPK在瘢痕组织中的蛋白表达变化,数据经SPSS 24.0统计软件分析后,术后1周组的phospho-Smad2(1.605 ± 0.069 , $F_{p-Smad2} = 14.123$, $P_{p-Smad2} = 0.029$)、phospho-Smad3(0.434 ± 0.022 , $F_{p-Smad3} = 3.796$, $P_{p-Smad3} = 0.037$)及phospho-p38MAPK(0.502 ± 0.012 , $F_{p-p38MAPK} = 6.140$, $P_{p-p38MAPK} = 0.042$)蛋白的表达水平较空白对照组及阴性对照组达最低,结果差异均有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

三、反转录聚合酶链反应检测病毒转染后瘢痕形成相关因子与Smad mRNA水平表达情况

如图4~5所示,实时荧光定量RT-PCR的检测结果和Western blot结果一致。经统计分析,Col III(2.56 ± 0.20)和MMP1(2.70 ± 0.05)、Col I(0.50 ± 0.05)和TIMP1(0.57 ± 0.04)的mRNA的表达水平在术后第1周时分别达到最高值、最低值,与其他各组的mRNA表达量相比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。与空白对照组及阴性对照组相比,术后1周组Smad2(0.82 ± 0.02)、Smad3(0.89 ± 0.10)及p38MAPK(0.41 ± 0.10)的mRNA表达水平最低,且结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

瘢痕是伤口愈合的一般过程,同时也是最后的结局。HTS可能的成因是愈合时的瘢痕增生。无论是瘢痕增生还是HTS的发生,都是瘢痕相关细胞、细胞因子及ECM之间相互作用的结果^[9-10]。在瘢痕增生进程中,多种细胞因子都发挥了作用,比如

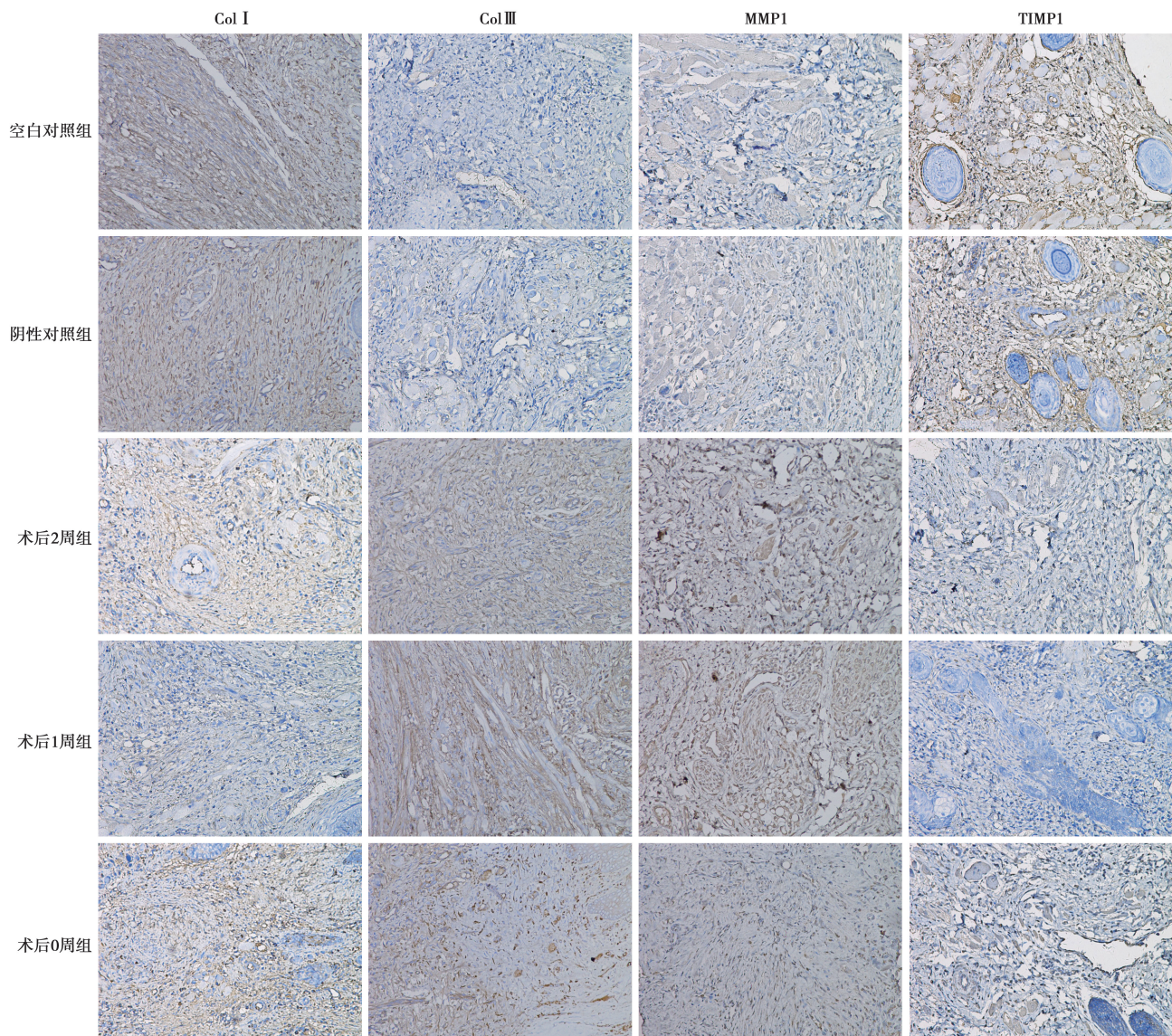


图1 病毒注射后各组兔上唇瘢痕组织切片免疫组织化学染色结果(高倍放大) 瘢痕形成相关因子在染色切片中均被染为棕黄色,存在于细胞质,细胞核呈蓝色;Col I : I 型胶原;Col III : III型胶原;MMP1:基质金属蛋白酶1;TIMP1:基质金属蛋白酶抑制剂1。

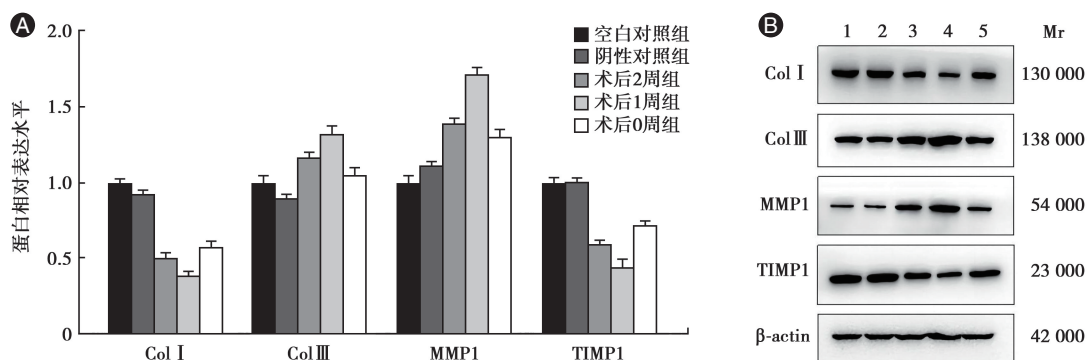


图2 蛋白免疫印迹(Western blot)检测各组兔上唇瘢痕组织内瘢痕形成相关因子的蛋白表达水平 A:蛋白相对表达水平量化统计图;B: Western blot结果;Col I : I 型胶原;Col III : III型胶原;MMP1:基质金属蛋白酶1;TIMP1:基质金属蛋白酶抑制剂1;Mr:相对分子质量;1:空白对照组;2:阴性对照组;3:术后2周组;4:术后1周组;5:术后0周组。

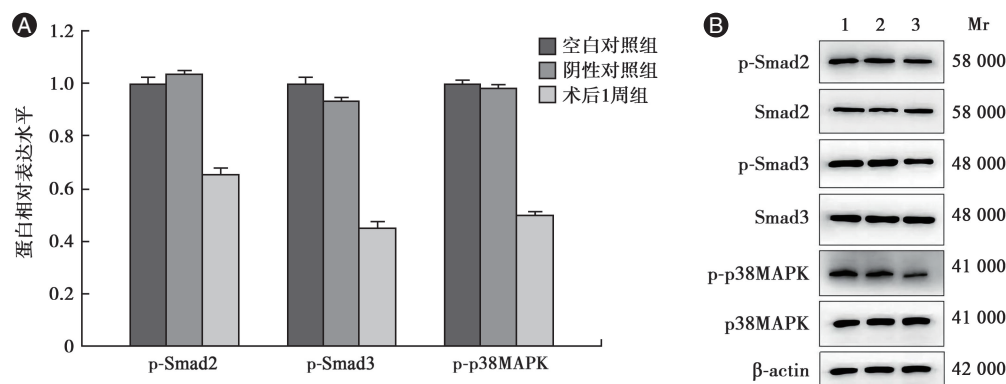


图3 蛋白免疫印迹(Western blot)检测兔上唇瘢痕组织内的Smad与p38MAPK的磷酸化蛋白表达水平 A:蛋白相对表达水平量化统计图; B: Western blot结果;p-Smad2:Smad2磷酸化蛋白;p-Smad3:Smad3磷酸化蛋白;p-p38MAPK:p38MAPK磷酸化蛋白;Mr:相对分子质量;1:空白对照组;2:阴性对照组;3:术后1周组。

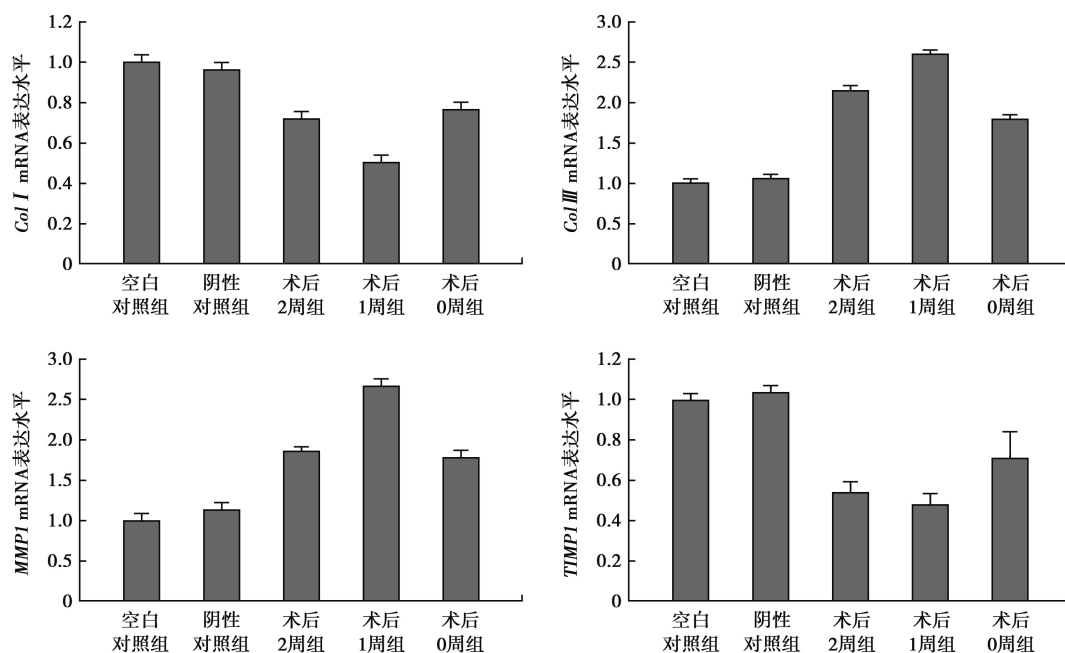


图4 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组兔上唇瘢痕组织内瘢痕形成相关因子mRNA水平表达情况 Col I: I型胶原;Col III: III型胶原;MMP1:基质金属蛋白酶1;TIMP1:基质金属蛋白酶抑制剂1。

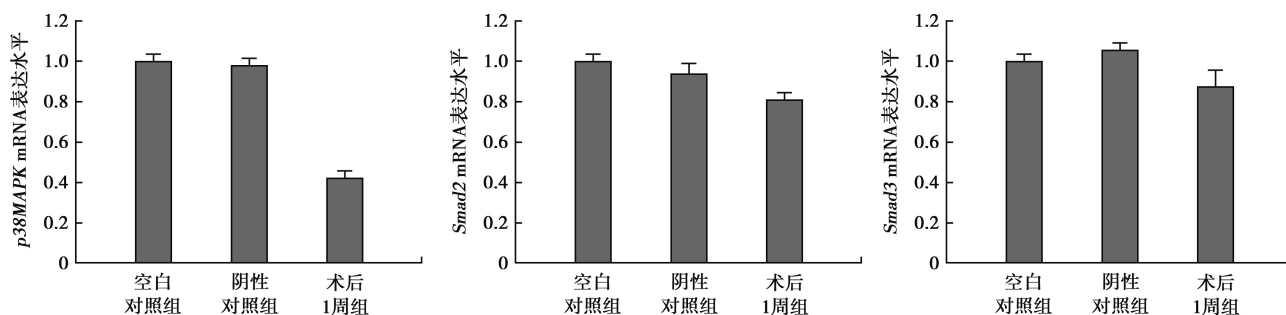


图5 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测兔上唇瘢痕组织内Smad与p38MAPK的mRNA水平表达情况 p38MAPK:p38丝裂素活化蛋白激酶;Smad2、Smad3:TGF-β信号通路转导途径中的重要基因。

MMP1、TIMP1、Col I、Col III、p38MAPK。

作为MAPK家族的核心成员之一,p38MAPK信号通路在多种受体信号传导途径中扮演重要角色,

参与基因表达调控、细胞分化、细胞凋亡和细胞增殖等重要机制^[11-13]。MMP是一类由结缔组织细胞分泌的有Zn²⁺依赖性的肽链内切酶^[12]。在ECM的降

解的过程中,MMP与TIMP同时参与调节组织重构和伤口愈合进程。MMP1属于MMP家族,可以在单一位点分解Col I、Col III以便后续其他酶分解,因此也是一种间质胶原酶^[13-15]。TIMP家族中主要参与抑制MMP活性的成员是TIMP1,它可以通过与MMP非共价键结合形成复合物来调节MMP对胶原的降解^[10-11]。皮肤伤口HTS的特点是Col III减少和Col I增加,即Col III/Col I比例降低,总体表现为ECM成分尤其是总胶原蛋白合成增加^[9-10]。伤口愈合时,瘢痕增生程度加重的成因是MMP及TIMP相互作用失衡,导致MMP降解Col I的过程被抑制,Col III/Col I比例降低^[16-17]。Parekh等^[18]的研究提到,对于伤口愈合过程中胶原分泌、合成速度快慢与Col III的合成量多寡,成人皮肤与胎儿皮肤相比有一定差异。后者胶原分泌合成较快,Col III合成较多,此外炎症反应减弱导致TGF- β 1表达减少,都在一定程度上有利于无瘢痕愈合。

有研究表明,成纤维细胞中p38MAPK的存在不仅对于TGF- β 1刺激产生Col I来说不可或缺,还会影响成纤维细胞中MMP1的表达^[19-20],多项体内外实验证明p38MAPK与TGF- β 1共同参与了对ECM中胶原蛋白的调控^[21-24]。体外实验已证实抑制皮肤成纤维细胞Smad3活性可阻断TGF- β 诱导Col I的合成,从而降低纤维化程度^[23]。

本研究采用IHC、Western blot和RT-PCR等方法,对病毒转染后瘢痕组织中的Col I、Col III、MMP1和TIMP1进行定性、定量观察及分析。以上结果证明,敲低p38MAPK基因可以升高Col III和MMP1的表达并降低Col I和TIMP1的表达从而影响瘢痕增生情况,在术后第1周敲低p38MAPK的表达,对瘢痕增生的影响最大;验证了前期实验并同时证明了在HTS形成过程中,抑制p38MAPK的表达亦可对Smad的表达产生影响,从而说明了抑制p38MAPK表达可能通过TGF- β 1介导的Smad依赖型信号通路发挥抑制瘢痕增生的作用。本研究为临床使用靶向基因治疗抑制瘢痕增生、降低HTS发生率提供了重组病毒注射基因疗法的理论依据和实验基础。Yue等^[11]的实验证明,MAPK通过转录和转录后机制调控细胞凋亡,而p38MAPK的激活通常与促凋亡作用相关。因此,在未来的研究中,p38MAPK对于调节瘢痕形成相关细胞凋亡的基因靶向治疗或可成为下一个有临床应用前景的研究方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 葛盈盈、岳金:实验研究、采集数据、起草文章;薛令法、许尧祥、赵浩然:数据分析,承担部分动物实验工作;崔明雪:统计分析;肖文林:酝酿和设计实验、获得研究经费

参 考 文 献

- [1] Kim S, Choi TH, Liu W, et al. Update on scar management: guidelines for treating Asian patients [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2013, 132(6): 1580-1589. DOI: 10.1097/PRS.0b013e3182a8070c.
- [2] Masuoka H. A new technique of unilateral cleft lip repair with scarless Cupid's bow peaks [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2021, 148(3): 597-604. DOI: 10.1097/PRS.00000000000008254.
- [3] Pouzet L, Ramon A, Jayyosi L, et al. Use of the surgical glue in the cutaneous closure of cheiloplasties for cleft lip [J]. *Ann Chir Plast Esthet*, 2019, 64(1): 89-92. DOI: 10.1016/j.anplas.2018.06.007.
- [4] Jahanbin A, Eslami N, Layegh P, et al. Fractional CO₂ laser treatment for post-surgical lip scars in cleft lip and palate patients [J]. *Lasers Med Sci*, 2019, 34(8): 1699-1703. DOI: 10.1007/s10103-019-02819-z.
- [5] Coentro JQ, Pugliese E, Hanley G, et al. Current and upcoming therapies to modulate skin scarring and fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146: 37-59. DOI: 10.1016/j.addr.2018.08.009.
- [6] Du QC, Zhang DZ, Chen XJ, et al. The effect of p38MAPK on cyclic stretch in human facial hypertrophic scar fibroblast differentiation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75635. DOI: 10.1371/journal.pone.0075635.
- [7] 贾铠宁, 许尧祥, 于果, 等. 不同时间p38MAPK信号通路受阻对兔上唇瘢痕增生的影响[J]. *中华医学美容美容杂志*, 2019, 25(3): 243-247. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0290.2019.03.020.
- [8] Yamanaka O, Saika S, Ohnishi Y, et al. Inhibition of p38MAP kinase suppresses fibrogenic reaction in conjunctiva in mice [J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 1730-1739.
- [9] McArdle C, Abbah SA, Bhowmick S, et al. Localized temporal co-delivery of interleukin 10 and decorin genes using a mediated by collagen-based biphasic scaffold modulates the expression of TGF- β 1/ β 2 in a rabbit ear hypertrophic scarring model [J]. *Biomater Sci*, 2021, 9(8): 3136-3149. DOI: 10.1039/d0bm01928c.
- [10] Aoki M, Matsumoto NM, Dohi T, et al. Direct delivery of apatite nanoparticle-encapsulated siRNA targeting TIMP-1 for intractable abnormal scars [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 50-61. DOI: 10.1016/j.omtn.2020.08.005.
- [11] Yue J, López JM. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2346. DOI: 10.3390/ijms21072346.
- [12] Zhang YE. Non-smad signaling pathways of the TGF- β family [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(2): a022129. DOI: 10.1101/cshperspect.a022129.
- [13] Gabbiani G. The cellular derivation and the life span of the myofibroblast [J]. *Pathol Res Pract*, 1996, 192(7): 708-711.

- DOI:10.1016/S0344-0338(96)80092-6.
- [14] Arif S, Attiogbe E, Moulin VJ. Granulation tissue myofibroblasts during normal and pathological skin healing: The interaction between their secretome and the microenvironment [J]. Wound Repair Regen, 2021, 29(4):563-572. DOI:10.1111/wrr.12919.
- [15] Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation [J]. Exp Cell Res, 1999, 250(2):273-283. DOI:10.1006/excr.1999.4543.
- [16] Sabir N, Hussain T, Mangi MH, et al. Matrix metalloproteinases: Expression, regulation and role in the immunopathology of tuberculosis [J]. Cell Prolif, 2019, 52(4):e12649. DOI:10.1111/cpr.12649.
- [17] Tian M, Chang X, Zhang Q, et al. TGF- β 1 mediated MAPK signaling pathway promotes collagen formation induced by Nano NiO in A549 cells [J]. Environ Toxicol, 2019, 34(6):719-727. DOI:10.1002/tox.22738.
- [18] Parekh A, Hebda PA. The contractile phenotype of dermal fetal fibroblasts in scarless wound healing [J]. Curr Pathobiol Rep, 2017, 5(3):271-277. DOI:10.1007/s40139-017-0149-3.
- [19] Sato M, Shegogue D, Gore EA, et al. Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts [J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(4):704-711. DOI:10.1046/j.1523-1747.2002.01719.x.
- [20] Murai M, Yamamura K, Hashimoto-Hachiya A, et al. Tryptophan photo-product FICZ upregulates AHR/MEK/ERK-mediated MMP1 expression: Implications in anti-fibrotic phototherapy [J]. J Dermatol Sci, 2018, 91(1):97-103. DOI:10.1016/j.jdermsci.2018.04.010.
- [21] Walimbe T, Calve S, Panitch A, et al. Incorporation of types I and III collagen in tunable hyaluronan hydrogels for vocal fold tissue engineering [J]. Acta Biomater, 2019, 87:97-107. DOI:10.1016/j.actbio.2019.01.058.
- [22] Rajshankar D, Wang B, Worndl E, et al. Focal adhesion kinase regulates tractional collagen remodeling, matrix metalloproteinase expression, and collagen structure, which in turn affects matrix-induced signaling [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(3):3096-3111. DOI:10.1002/jcp.29215.
- [23] Ashcroft GS, Mills SJ, Flanders KC, et al. Role of Smad3 in the hormonal modulation of *in vivo* wound healing responses [J]. Wound Repair Regen, 2003, 11(6):468-473. DOI:10.1046/j.1524-475x.2003.11614.x.
- [24] 刘峰. p38MAPK 基因沉默对唇裂术后瘢痕增生影响的实验研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- (收稿日期:2022-06-16)
(本文编辑:王嫚)