

# Sparc 对瘢痕疙瘩成纤维细胞以及正常人皮肤成纤维细胞增殖凋亡及 I 型、III 型胶原分泌影响的研究

朱晓璇<sup>1</sup>, 李心怡<sup>1</sup>, 王佳妮<sup>2</sup>, 丁以春<sup>1</sup>, 李小静<sup>1\*</sup>

**摘要** 目的 探讨富含半胱氨酸的酸性分泌糖蛋白(Sparc 蛋白)对人瘢痕疙瘩成纤维细胞(HKF)、正常人成纤维细胞(NFs)增殖与凋亡以及对于其细胞外基质中 I 型胶原与 III 型胶原表达的影响。方法 分离培养 HKF 以及 NFs 将 2 种细胞分为实验组与对照组,实验组加入 Sparc 蛋白孵育,对照组加入等量培养基进行处理。CCK-8 细胞增殖实验检测 Sparc 蛋白对各组细胞增殖的影响;流式细胞实验检测 Sparc 蛋白对各组细胞凋亡的影响;Western blot 与 RT-PCR 检测各组细胞 I 型胶原与 III 型胶原的表达。结果 Sparc 蛋白可以显著促进各组细胞的增殖,抑制其凋亡,Sparc 蛋白可以显著促进各组细胞 I 型胶原与 III 型胶原的表达。结论 Sparc 蛋白是促进瘢痕疙瘩形成的重要蛋白,可靶向调控抑制瘢痕疙瘩的生成。

**关键词** Sparc 蛋白;瘢痕疙瘩;成纤维细胞;I 型胶原;III 型胶原

中图分类号 R 619.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1222-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.010

病理性瘢痕是由于皮肤创伤过度愈合导致的,分为增生性瘢痕及瘢痕疙瘩<sup>[1]</sup>,瘢痕疙瘩形成的原因主要是成纤维细胞的过度增生,以胶原蛋白为主的细胞外基质的过度沉积<sup>[2]</sup>。Sparc 蛋白是细胞基质相互作用的重要媒介物<sup>[3]</sup>。现有实验<sup>[4-5]</sup>证明 Sparc 在肺、真皮、肠、眼睛等纤维化病变组织中呈现高表达。课题组前期研究<sup>[6-7]</sup>已初步证明了 Sparc 与病理性瘢痕形成的相关性,其在病理性瘢痕中存在高表达,可促进正常皮肤以及病理性瘢痕成纤维细胞的增殖,并且能促进增生性瘢痕中 I 型胶原的表达。但其对正常皮肤以及瘢痕疙瘩 III 型胶原的影响尚不明确。该研究通过探讨 Sparc 蛋白对瘢痕疙瘩纤维化的影响,为研究其作用机制奠定基础。

2021-05-06 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:9021548201)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

<sup>2</sup>合肥市第一人民医院整形外科,合肥 230031

作者简介:朱晓璇,女,硕士研究生;

李小静,女,教授,责任作者,E-mail: [lixiaojing5@163.com](mailto:lixiaojing5@163.com)

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 新鲜切取的人体瘢痕疙瘩组织以及植皮手术中正常皮肤组织,均来自于安徽医科大学第一附属医院门诊及病房自愿行瘢痕疙瘩切除术以及植皮手术的患者,其中瘢痕疙瘩患者局部无感染溃疡,没接受过任何药物及放射治疗。所有标本取材均已获得患者本人或监护人的知情同意。实验对所有样本的处理方法符合国家卫生和计划生育委员会印发的《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》。

**1.2 试剂** CCK-8 细胞增殖检测试剂盒(美国 Sigma),Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(上海生工科技),重组人 Sparc 蛋白(美国 Biorbyt 公司),人 I 型胶原抗体、人 III 型胶原抗体(北京康为世纪)。

## 1.3 方法

**1.3.1 人瘢痕疙瘩成纤维细胞(human keloid fibroblasts, HKF)的分离培养** 于超净工作台无菌条件下手术切取新鲜瘢痕疙瘩组织,去除髓核、表皮以及血管等结缔组织,将其切割成约 2~3 mm<sup>3</sup> 大小置于培养皿中,用 PBS 清洗 2 次后以 1~2 块组织/cm<sup>2</sup> 的密度排列整齐,每颗组织块表面滴加 1~2 滴胎牛血清浸润,置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6~8 h 后组织块贴壁,加入适量含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养过夜,第二日观察培养基无污染后换液,之后每 2~3 d 换液 1 次,1 周后观察有成纤维细胞组织迁移出来,待贴壁生长达 80% 以上时即可传代。

**1.3.2 正常人成纤维细胞(normal fibroblasts, NFs)的分离培养** 与超净工作台无菌条件下处理手术切取新鲜皮肤组织,去除表层皮肤等结缔组织,实验方法同 1.3.1。

**1.3.3 加入 Sparc 蛋白处理 HKF 以及 NFs** 取 3~5 代呈对数生长期的细胞,待细胞生长至贴壁达 80%~90% 时胰酶消化,用含 15% 体积分数胎牛血清的 DMEM 调整细胞浓度至 2 × 10<sup>6</sup> 个/ml 接种于

96孔板中,每孔100  $\mu\text{l}$  待细胞贴壁后加入 Sparc 蛋白培养72 h 将细胞分为实验组与对照组 实验组加2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的重组人 Sparc 蛋白 对照组加入等量培养基 每组设4个复孔。

**1.3.4 CCK-8 检测细胞增殖** 将细胞以  $3 \times 10^3$  个/孔的密度均匀铺至96孔板中,每组共设8个孔。放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱正常培养12 h 至细胞贴壁,形态正常。排枪吸去培养基中旧液,用PBS缓冲液冲洗2次,对照组加入正常培养基,实验组加入含 Sparc 蛋白2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的培养基。孵育72 h 后,用排枪吸出各组培养液后,加入按10%浓度配制的CCK-8溶液混合液,每孔加入混合液100  $\mu\text{l}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。调节分光光度计,于450 nm 波长处检测吸光度(optical density, OD)值。

**1.3.5 Annexin V-FITC/PI 双染细胞实验** 将细胞培养基转移至15 ml 离心管中,用2 ml PBS 轻轻润洗细胞,弃去PBS。加入胰酶消化细胞后,用预冷的PBS洗涤细胞2次,弃去PBS。用400  $\mu\text{l}$  的 Annexin V 结合液悬浮细胞,密度约为  $1 \times 10^6$  个细胞/ml。在细胞悬液中加入5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 染色液混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15 min。加入10  $\mu\text{l}$  PI 染色液混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10 min。立即使用流式细胞仪检测凋亡率。

**1.3.6 Western blot 实验检测各组细胞中I型、III型胶原蛋白的表达** 分别收集 HKF 以及 NFs 的实验组与对照组细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量。制备好的蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移至聚氟乙烯(PVDF)膜。5%脱脂奶粉37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1.5 h 后,加入1:2 000 稀释的 I 型胶原蛋白抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜后加入1:3 000 稀释的二抗,室温孵育2 h,TBST 洗膜后与化学发光底物孵育5 min 曝光、显影、定影。用 GAPDH 作内参验证蛋白含量。同样方法检测 III 型胶原蛋白的表达。

**1.3.7 RT-PCR 检测各组细胞中 I 型、III 型胶原蛋白的表达** 分别收集 HKF 以及 NFs 的实验组与对照组细胞,提取其总 RNA,逆转录得 cDNA,采用 SYBR Green 法进行 RT-PCR。引物根据 GenBank 中 I 型胶原蛋白基因序列设计:上游引物:5'-TACAGCGTCACTGTCGATGGC 3',下游引物:3'-TCAATCACTGTCTTGCCCCAG 5'; III 型胶原蛋白基因序列设计:上游引物:5'-AATTTGGTGTGGACGTTGGC 3',下游引物:3'-TTGTCCGTCACCTGCACTGG 5';内参 GAPDH 基因序列:上游引物:5'-CAA-CAGCGACACCCACTCCT 3',下游引物:3'-CACCT-

GTTGCTGTAGCCAAA 5',由上海生工公司合成。反应参数设置为94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 预变性,94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s 变性,61 $^{\circ}\text{C}$ 、35 s 退火,42 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s 延伸,共40个循环。反应产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测,以 Gel pro 凝胶吸光度分析软件分析,测其 OD 值,计算 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白表达量。将数据导入 Graph Prism 8.0.1 软件采用单因素方差分析获得柱状图。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 软件进行分析,样本间差异比较均采用配对样本  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 4 组细胞增殖比较** CCK-8 实验显示加入 Sparc 蛋白后,实验组 HKF( $t = 4.371, P = 0.007$ ) 以及 NFs( $t = 2.685, P = 0.044$ ) 增殖状态较对照组增高,差异有统计学意义。各实验组之间差别不显著( $t = 2.052, P = 0.96$ ),差异无统计学意义(图1)。

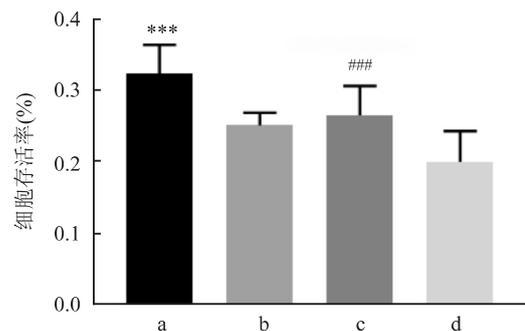


图1 CCK-8 检测细胞增殖结果

a: HKF 实验组; b: HKF 对照组; c: NFs 实验组; d: NFs 对照组; 与 HKF 对照组比较: \*\*\*  $P < 0.05$ ; 与 NFs 对照组比较: ###  $P < 0.05$

**2.2 4 组细胞凋亡率比较** 流式细胞仪结果表明加入 Sparc 蛋白后, HKF 实验组( $t = 17.591, P = 0.00$ ) 与 NFs 实验组( $t = 15.679, P = 0.00$ ) 较对照组细胞凋亡率降低(图2),差异有统计学意义。

**2.3 Western blot 以及 RT-PCR 检测各组细胞中 I 型胶原与 III 型胶原表达差异** Western blot 实验结果显示,与对照组比较,各实验组 I 型胶原的表达增高, HKF 实验组 III 型胶原的表达增高,而 NFs 实验组增高不明显(图3); RT-PCR 实验结果显示,加入 Sparc 蛋白后,与对照组比较,实验组 HKF( $t = 5.151, P = 0.014$ ) 以及 NFs( $t = 18.502, P = 0.00$ ) 的 I 型胶原表达增高,差异有统计学意义;实验组 HKF( $t = 3.597, P = 0.037$ ) 以及 NFs( $t = 11.295, P = 0.00$ ) 的 III 型胶原的表达增高,差异有统计学意义。而各实验组之间差别不明显(图4)。

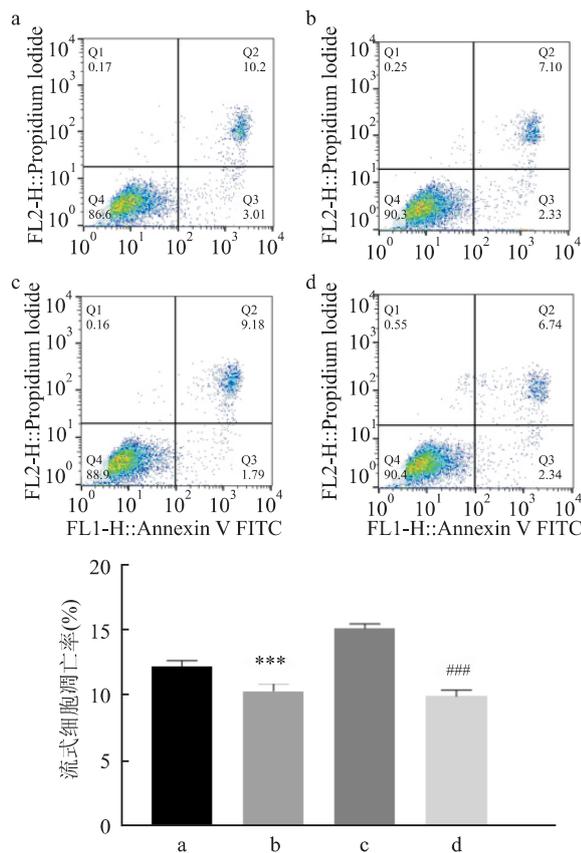


图2 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率

a: HKF 对照组; b: HKF 实验组; c: NFs 对照组; d: NFs 实验组; 与 HKF 对照组比较: \*\*\* P < 0.001; 与 NFs 对照组比较: ### P < 0.001

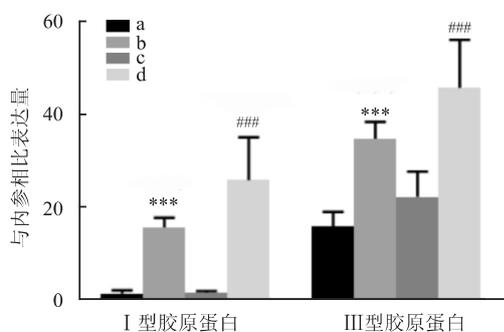


图3 RT-PCR 检测各组细胞 I 型胶原和 III 型胶原表达结果

a: NFs 对照组; b: NFs 实验组; c: HKF 对照组; d: HKF 实验组; 与 HKF 对照组比较: \*\*\* P < 0.001; 与 NFs 对照组比较: ### P < 0.001

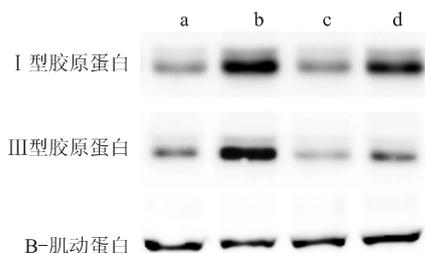


图4 Western blot 检测各组细胞 I 型胶原和 III 型胶原表达结果

a: HKF 对照组; b: HKF 实验组; c: NFs 对照组; d: NFs 实验组

### 3 讨论

瘢痕疙瘩是由于皮肤创伤或自发形成的病理性瘢痕组织,伴随着成纤维细胞的过度增殖以及细胞外胶原的过度沉积<sup>[8]</sup>。组织损伤可以通过皮下组织重建或瘢痕的形成来愈合,在皮肤愈合的过程中,成纤维细胞负责将创面边缘拉紧,并形成创面瘢痕的细胞外基质。这种病理性的改变伴随着明显的增长特征:其范围超过原先的损伤范围并且持续向周围正常皮肤组织延伸,类似肿瘤,因此也称为良性真皮肿瘤<sup>[9]</sup>。此外,大量研究<sup>[9-10]</sup>表明瘢痕疙瘩与多种细胞因子、基因调节、伤口张力、免疫失调以及细胞外基质生成与调节的失衡有关。因此抑制成纤维细胞的增殖以及胶原蛋白的沉积或许是改善瘢痕疙瘩的有效方式,而找到促进成纤维细胞增殖以及胶原蛋白生成的因素至关重要。Sparc 蛋白是一种多功能小分子糖蛋白,在体内分布广泛,可促进损伤后发生的组织重建。最初于 1981 年被 Termine et al<sup>[11]</sup> 作为非胶原成分描述和纯化。Sparc 可通过调节血管生成、抑制细胞黏附、促进细胞增殖来促进肿瘤组织的生长及侵袭和转移<sup>[12-13]</sup>。目前已有研究<sup>[14]</sup>证明通过基因沉默的方式靶向抑制成纤维细胞中 Sparc 蛋白的表达可以抑制硬皮病成纤维细胞的增殖,抑制其 I 型胶原以及 III 型胶原的表达。有研究人员<sup>[15]</sup>通过 Sparc siRNA 抑制皮肤成纤维细胞形成和小鼠 Sparc 基因表达,提出了抑制 Sparc 表达是抑制纤维化疾病发生的有效途径。并且既往研究也已初步证实了 Sparc 蛋白与病理性瘢痕的相关性。因此 Sparc 蛋白或许可以成为治疗病理性瘢痕的新靶点,为病理性瘢痕的治疗提供新的思路。本次实验应用不同实验方法证实了 Sparc 蛋白对 HKF 以及正常皮肤成纤维细胞增殖的促进作用,并且对各实验组细胞的凋亡起抑制作用。Sparc 实验中 Sparc 蛋白对于各实验组细胞 I 型与 III 型胶原表达均有促进作用,而 Western blot 实验中 Sparc 蛋白对各实验组细胞 I 型胶原表达有促进作用,对于 HKF 实验组 III 型胶原表达也有促进作用,但是对于 NFs 实验组 III 型胶原表达的促进作用不明显。以上实验结果提示 Sparc 蛋白可以促进 HKF 以及 NFs 增殖,抑制其凋亡,并且可以促进 HKF 以及 NFs I 型与 III 型胶原的表达。但是 Sparc 蛋白具体是通过哪种途径对瘢痕产生促进作用以及敲除此种基因对瘢痕疙瘩形成的影响还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Theoret C. Tissue engineering in wound repair: The three "R"s—repair, replace, regenerate [J]. *Vety Surg*, 2009, 38(8): 905–13.
- [2] Alster T S, Tanzi E. Hypertrophic scars and keloids: etiology and management [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2003, 4(4): 235–43.
- [3] Brekken R A, Sage E H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix [J]. *Matrix Biol*, 2000, 19(7): 569–80.
- [4] Chen L Z, He C Y, Su X, et al. SPPI rs4754 and its epistatic interactions with SPARC polymorphisms in gastric cancer susceptibility [J]. *Gene*, 2018, 640: 43–50.
- [5] Trombetta-Esilva J, Bradshaw A D. The function of SPARC as a mediator of fibrosis [J]. *Open Rheumatol J*, 2012, 6: 146–55.
- [6] 刘超华, 李小静, 宁金龙, 等. 富含半胱氨酸的酸性分泌糖蛋白在病理性瘢痕中的表达及其意义 [J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2010, 6(1): 17–20.
- [7] 王春, 李小静, 刘超华, 等. SPARC对增生性瘢痕成纤维细胞 I 型胶原蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. *山东医药*, 2009, 49(50): 110–1.
- [8] Lee J Y, Wong T W, 牛新武. 瘢痕疙瘩与肥厚性瘢痕的组织病理学鉴别诊断 [J]. *世界核心医学期刊文摘(皮肤病学分册)*, 2005(1): 26–7.
- [9] Berman B, Maderal A, Raphael B. Keloids and hypertrophic scars: pathophysiology, classification, and treatment [J]. *Dermatol Surg*, 2017, 43 Suppl 1: S3–S18.
- [10] 张苏文. TSG-6 对人病理性瘢痕成纤维细胞增殖与凋亡的作用及其机制 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [11] Termine J D, Kleinman H K, Whitson S W, et al. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen [J]. *Cell*, 1981, 26(1 Pt 1): 99–105.
- [12] Seet L F, Tan Y F, Toh L Z, et al. Targeted therapy for the post-operative conjunctiva: SPARC silencing reduces collagen deposition [J]. *Br J Ophthalmol*, 2018, 102(10): 1460–70.
- [13] Wong S L, Sukkar M B. The SPARC protein: an overview of its role in lung cancer and pulmonary fibrosis and its potential role in chronic airways disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(1): 3–14.
- [14] Zhou X, Tan FK, Guo X, et al. Attenuation of collagen production with small interfering RNA of SPARC in cultured fibroblasts from the skin of patients with scleroderma [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(8): 2626–31.
- [15] Wang J C, Lai S, Guo X, et al. Attenuation of fibrosis *in vitro* and *in vivo* with SPARC siRNA [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(2): R60.

## The effect of Sparc on the proliferation and apoptosis, and the expression of collagen type I and collagen type III of human keloid fibroblasts and normal fibroblasts

Zhu Xiaoxuan<sup>1</sup>, Li Xinyi<sup>1</sup>, Wang Jian<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Plastic Surgery, The First People's Hospital of Hefei, Hefei 230031)

**Abstract Objective** To investigate the effect of secreted protein, acidic and rich in cysteine (Sparc) on the proliferation and apoptosis of human keloid fibroblasts (HKF) and normal fibroblasts (NFs), as well as the expression of collagen type I and collagen type III in the extracellular matrix. **Methods** HKF and NFs were isolated and cultured. The two types of cells were both divided into experimental group and control group in which the experimental group was incubated with Sparc while the control group was incubated with the same amount of DMEM. CCK-8 experiment was used to test the influence of Sparc on each cell proliferation; flow cytometry was used to test the influence of Sparc on each cell apoptosis; Western blot and RT-PCR were used to detect the expression of collagen type I and collagen type III on each group. **Results** SPARC could significantly promote the proliferation and inhibit the apoptosis of cells in each group, and SPARC could obviously promote the expression of collagen type I and Collagen type III in each group. **Conclusion** SPARC is an important protein to promote the formation of keloids, which can be targeted to regulate the formation of keloids.

**Key words** Sparc; keloid; fibroblasts; collagen type I; collagen type III