

冬凌草甲素对人瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞生物学行为的影响及作用机制

宋采滢,高翔,朱秋璇,程盛荣,陈文东,朱飞

(安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022)

摘要 目的 探讨冬凌草甲素(ORI)对人瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞(HKF)的影响及作用机制。方法 CCK-8法检测ORI对HKF的增殖活性的影响,实验分为对照组和实验组,细胞划痕和transwell实验检测HKF的迁移和侵袭能力,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测ORI对HKF的细胞外基质形成相关mRNA和纤维连接蛋白1(FN1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原蛋白(COL I)、COL III表达的影响。实验分为对照组、模型组和转化生长因子(TGF)- β 1+ORI组,用RT-qPCR和Western blot检测ORI对HKF内TGF- β 1诱导的相关mRNA和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、Smad2、Smad3、磷酸化Smad2蛋白(p-Smad2)、p-Smad3表达的影响。结果 CCK-8显示随着ORI浓度增加,HKF细胞抑制率逐渐增加;与对照组比较,实验组细胞24 h迁移面积、侵袭细胞数显著下降, FN1、 α -SMA、COL I、COL III表达水平显著下降($P < 0.05$);与对照组相比,模型组NLRP3、ASC、Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3表达显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,TGF- β 1+ORI组NLRP3、ASC、Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3表达显著下降($P < 0.05$)。结论 ORI通过阻断TGF- β 1/Smad信号通路和NLRP3介导的炎症反应,抑制HKF的增殖、迁移和侵袭能力以及细胞外基质的形成和沉积。

关键词 冬凌草甲素;人瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞;细胞外基质;NLRP3;TGF- β 1;Smad蛋白

中图分类号 R 751

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1706-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.003

瘢痕疙瘩是一种皮肤纤维增殖性疾病,向创缘外持续性肿瘤样增生,其特征是胶原的过度沉积和成纤维细胞持续性增殖^[1]。目前已知转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β ,尤其是TGF- β 1亚型是参与瘢痕疙瘩形成的关键作用因子之一^[2]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体是一种多聚蛋白复合物,由NLRP3、半胱氨酸蛋白酶-1(cysteine-specific proteinase-1, caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)组成,其介导的白细胞介素(interleukin, IL)-18和IL-1 β 等促炎因子与纤维化疾病的发生和发展有关^[3-4]。冬凌草甲素(oridonin, ORI)是从唇形科香茶菜属植物中分离出来的四环

二萜类化合物,可作为一种NLRP3炎性小体的共价抑制剂,治疗由NLRP3过度活化引起的相关疾病^[5]。尽管多项研究^[6-7]表明,ORI具有抗肿瘤、抗炎、抗纤维化等多种药理效应。目前尚没有关于ORI对瘢痕疙瘩作用机制的研究,该研究旨在研究体外ORI对人瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞(human keloid fibroblasts, HKF)的影响,并探索其潜在的分子机制,为治疗瘢痕疙瘩开发新的药物治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 ORI(上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$); HKF(深圳豪地华拓生物科技有限公司); CCK-8检测试剂盒(合肥Biosharp公司); ECL超敏发光试剂盒、TRIzol(美国Thermo Fisher公司); RIPA细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司); α -SMA、COL I、COL III、FN1、Smad2、p-Smad3抗体(北京博奥森生物技术有限公司); NLRP3抗体(美国Affinity公司); Smad3抗体(英国Abcam公司); p-Smad2抗体(美国Cell Signaling公司); TGF- β 1抗体、ASC抗体(美国Santa Cruz公

2024-07-08 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:30973124);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2014A108)

作者简介:宋采滢,女,硕士研究生;

朱飞,男,博士,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: hfzfx@163.com

司);GAPDH、山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);逆转录试剂盒(日本 TAKARA 公司);引物(上海生工生物工程公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Roche 公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司);CO₂ 培养箱(意大利 Scotsman 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 在 5% CO₂、37 °C 的培养条件下, HKF 于含 1% 双抗和 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中进行贴壁培养, 细胞长至 90% 时用胰酶消化, 1:2 传代, 取第 3~7 代细胞进行实验。用不同浓度 ORI 处理 HKF 后, 进行分批实验, 第一批分为两组: 对照组和实验组, 对照组不加任何处理因素, 实验组用 10.0 μmol/L ORI 的培养液孵育 HKF 细胞 24 h, 检测 HKF 迁移、侵袭能力以及细胞外基质相关 mRNA 和蛋白水平。第二批分为三组: 对照组、模型组、TGF-β1 + ORI 组, 对照组不加任何处理因素, 模型组向完全培养基内加 10.0 ng/ml TGF-β1 进行干预培养细胞, TGF-β1 + ORI 组用 10.0 μmol/L ORI 的培养液孵育 HKF 细胞 24 h, 再加入终浓度为 10.0 ng/ml TGF-β1 进行干预培养细胞, 检测 HKF 内 TGF-β1 诱导的 mRNA 和蛋白水平。

1.2.2 CCK-8 实验检测细胞增殖能力 胰酶消化对数期细胞, 用含血清培养基终止消化, 制成细胞悬液, 调整其密度接种于 96 孔板中(5 × 10⁴ 个/孔), 设置调零组, 对照组, 10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 μmol/L 五个浓度冬凌草甲素组, 重复 3 孔, 按 24、48、72 h 三个时长来进行干预, 加入 CCK-8(10 μl/孔), 继续培养 2 h。用酶标仪(OD = 450 nm)处测量各孔的吸光值。计算细胞抑制率(%) = [(对照组 OD 值 - 实验组 OD 值)/(对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] × 100%。采用 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行分析确定 ORI 的半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.3 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 收集各组细胞, 胰酶消化后计数, 接种于 6 孔板中(4 × 10⁵ 个/孔), 每组设置 3 个复孔, 待细胞贴壁后, 用无菌枪头比着尺子, 垂直于之前画的横线划痕, 用 PBS 冲洗划痕 3 次, 拍下 0 h 的划痕, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后再次拍照记录, 用 Image J 软件分析划痕面积, 计数细胞迁移率(%) = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积)/0 h 划痕面积 × 100%。

1.2.4 细胞 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 收集各组细胞接种于 24 孔板中, 加入无血清培养基重悬后计数, 调整细胞浓度 2 × 10⁵/ml, 将 100 μl 细胞

悬液接种于基质胶包被过 Transwell 小室的上室中, 在下室加入 500 μl 含 10% 血清培养基作为趋化剂, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, PBS 清洗 3 遍, 棉签轻轻擦去上室底部膜表面的细胞, 用 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, 弃去固定液, 再用 0.5% 结晶紫染色 15 min。用清水冲洗数次, 在显微镜下观察和采集图像, 计数侵袭细胞数。

1.2.5 RT-qPCR 检测细胞 mRNA 表达水平 收集各组细胞沉淀, 用 TRIzol 裂解, 根据 RNA 提取试剂盒说明书步骤, 提取各组 HKF 中的总 RNA 后检测其浓度, 逆转录获得 cDNA, 以 β-actin 作为内源性参照, 用 RNA 荧光定量 PCR 试剂盒进行扩增定量, 反应条件为: 95 °C 预变性(30 s), 循环(1 次); 95 °C 变性(5 s), 60 °C 退火(30 s), 循环(40 次), 采用 2^{-ΔΔC_T}法计算 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab. 1 Primers used for RT-qPCR

Gene	Forward (5'-3')
β-actin	F: CCCTGGAGAAGACTACGAG R: GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT
COL I	F: AGCACAAAGCAGTTTTTCCC R: TTTGGGTCATTCCACATGC
COL III	F: GCTGAGTTTTATGACGGGC R: TGAAGCAGAGCGAGAAGTAG
FN 1	F: GACTGTGGACCAAGTTGATG R: TGTGCTGCTACCTTCTACTG
α-SMA	F: TGTGAAGCAGCTCCAGCTAT R: CTTACAGAGCCCAGAGCCAT
TGF-β1	F: GCAACAATTCTGCGGATAC R: CTAAGGCGAAAGCCCTCAAT
NLRP3	F: GAGAAGTTTCTGTGGACC R: TTCAAGTCCACATCCTCCAG
ASC	F: GTCAGCTTCTACCTGGAGAC R: CCGGTGCTGCTTATAAAGT
Smad2	F: CGGTAGAAATGACAAGAAGG R: ATCACTTAGGCACTCAGCAA
Smad3	F: AAGATCCCACCAGGATGCAA R: GGTCAACTGCTAGACAGCCT

1.2.6 Western blot 检测细胞蛋白表达水平 收集各组细胞, 用 RIPA 裂解液裂解细胞后离心, 取上清液, 按照 1:4 加入 5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水加热 10 min, 使蛋白充分变性。待样品冷却到室温后, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳(10 μl/孔)分离蛋白, 转移蛋白到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入抗体 FN1、α-SMA、ASC、COL I、COL III、NLRP3、Smad3、p-Smad3、Smad2、p-Smad2 (1 :

1 000) 4 ℃ 慢摇孵育过夜, TBST 洗涤 (3 次, 10 min/次), 将 PVDF 膜与 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体或山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1 : 5 000) 在室温孵育 1 h, 再用 TBST 洗涤 (3 次, 10 min/次), 使用 ECL 发光试剂进行显色, 采集图像后用 Image J 软件分析各条带灰度值, 进行半定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析, 连续变量表示为 $\bar{x} \pm s$ 。两组间比较采用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析。数据可视化图形使用 GraphPad Prism 9.0.0 绘制, *P* < 0.05 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 ORI 对 HKF 增殖能力的影响 CCK-8 结果显示, 不同浓度 ORI (10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 μmol/L) 分别干预 HKF 细胞 24、48、72 h, 同一时间段内, 随着 ORI 浓度升高, 细胞抑制率逐渐增加, 呈浓度依耐性, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 但同一浓度药物下, 随作用时长增加, 细胞抑制率差异无统计学意义。根据以上结果计算出 24、48、72 h ORI 作用于 HKF 的 IC₅₀ 值分别为: 15.64、15.65、15.70 μmol/L。为消除 ORI 对 HKF 细胞的毒性影响, 该实验选择了低于 IC₅₀ 的浓度值进行后续实验。10.0 μmol/L 浓度 ORI 时, 24、48、72 h 三个作用时长细胞抑制率均值分别为 12.29%、12.53%、12.63%, 对细胞无明显抑制作用, 故选用 10.0 μmol/L 浓度的 ORI 用于后续研究。见图 1 和表 2。

2.2 ORI 对 HKF 迁移、侵袭能力的影响 相较于

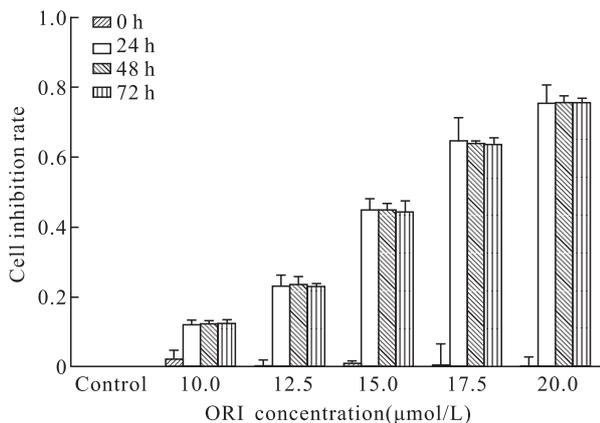


图 1 不同浓度 ORI 分别在作用 24、48、72 h 后对 HKF 抑制率的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of ORI on the inhibition rate of HKF after 24, 48, and 72 hours

表 2 不同浓度 ORI 在不同作用时间点干预 HKF 细胞抑制率

Tab.2 The inhibition rate of HKF cells by different concentrations of ORI at various intervention time points

Drug concentration (μmol/L)	Cell inhibition rate		
	24 h	48 h	72 h
10.0	0.123 ± 0.011	0.125 ± 0.005	0.126 ± 0.008
12.5	0.233 ± 0.028	0.237 ± 0.021	0.233 ± 0.005
15.0	0.450 ± 0.030	0.451 ± 0.016	0.445 ± 0.029
17.5	0.649 ± 0.063	0.642 ± 0.003	0.638 ± 0.016
20.0	0.756 ± 0.050	0.757 ± 0.020	0.757 ± 0.009
<i>F</i> value	129.570	1 058.990	802.470
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001

对照组, 实验组 HKF 细胞的迁移及侵袭能力均下降。细胞划痕实验结果显示: 相较于对照组, 实验组细胞的 24 h 划痕距离显著增宽, 迁移能力显著下降, 差异有统计学意义 (0.392 ± 0.011 ; 0.083 ± 0.013 ; $t = 32.034$, *P* < 0.05)。细胞 Transwell 实验结果显示: 相较于对照组, 实验组 24 h 穿过滤膜的细胞数目显著下降, 差异有统计学意义 (19.330 ± 1.528 ; 9.333 ± 2.082 ; $t = 6.708$, *P* < 0.05)。见图 2。

2.3 ORI 对 HKF 细胞外基质形成相关 mRNA 和蛋白表达的影响 RT-qPCR 结果显示: 相较于对照组, 实验组 HKF 中 FN1、α-SMA、COL I、COL III 的 mRNA 表达水平显著下降, 差异有统计学意义 ($t_{FN1} = 5.945$, *P* < 0.001; $t_{\alpha-SMA} = 8.246$, *P* < 0.001; $t_{COL I} = 7.804$, *P* < 0.001; $t_{COL III} = 56.350$, *P* < 0.001)。见图 3。Western blot 结果显示: 相较于对照组, 实验组 FN1、α-SMA、COL I、COL III 蛋白表达量显著下降, 差异有统计学意义 ($t_{FN1} = 2.837$, *P* < 0.05; $t_{\alpha-SMA} = 3.934$, *P* < 0.05; $t_{COL I} = 5.855$, *P* < 0.01; $t_{COL III} = 3.658$, *P* < 0.05)。见图 4。

2.4 ORI 对 HKF 内 TGF-β1 诱导的相关 mRNA 和蛋白的影响 RT-qPCR 结果显示: 相较于对照组, 模型组 HKF 中 NLRP3、ASC、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达水平显著升高; 相较于模型组, TGF-β1 + ORI 组 HKF 中 ASC、NLRP3、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达水平显著下降, 差异有统计学意义 ($F_{ASC} = 211.90$, *P* < 0.001; $F_{NLRP3} = 199.30$, *P* < 0.001; $F_{Smad2} = 549.00$, *P* < 0.001; $F_{Smad3} = 531.00$, *P* < 0.001)。见图 5。Western blot 结果显示: 相较于对照组, 模型组 HKF 中 NLRP3、ASC、Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达量显著升高; 相较于模型组, TGF-β1 + ORI 组 HKF 中 ASC、NLRP3、Smad2、

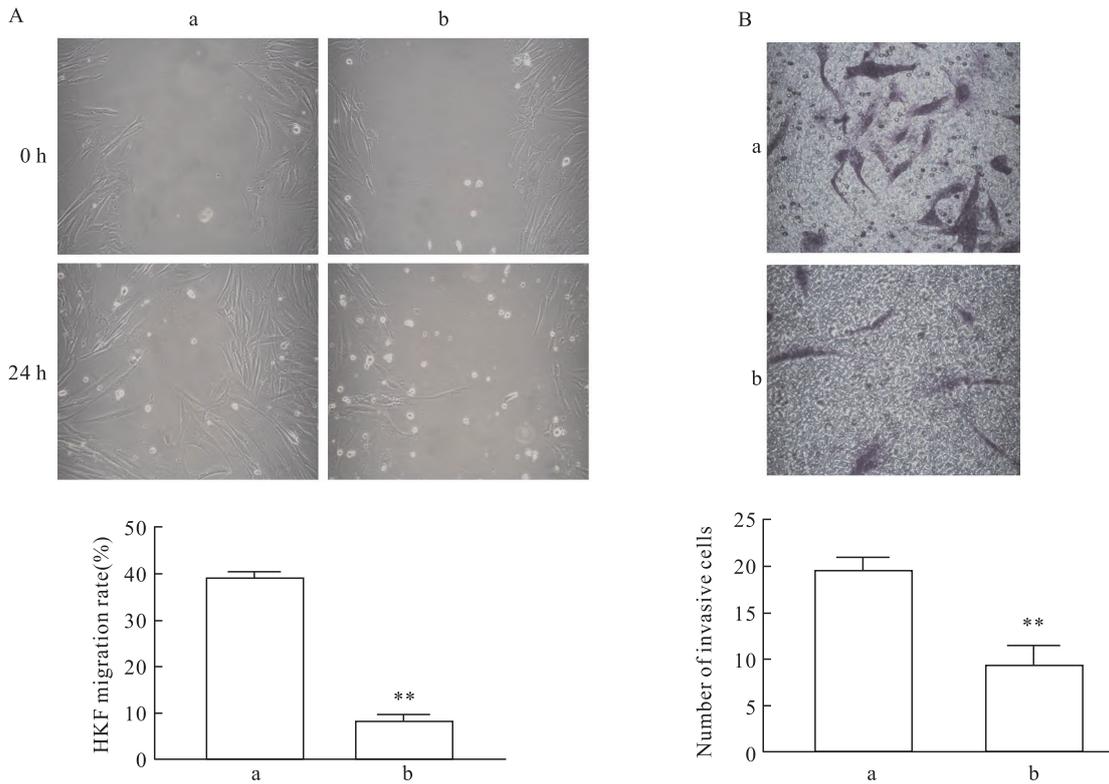


图2 ORI对HKF迁移、侵袭能力的影响

Fig.2 Effect of ORI on HKF migration and invasion ability

A: Migration distance after 24 hours in a cell scratch assay $\times 100$; B: Number of invasive cells after 24 hours, stained with crystal violet $\times 100$; a: control group; b: experimental group; ** $P < 0.01$ vs control group.

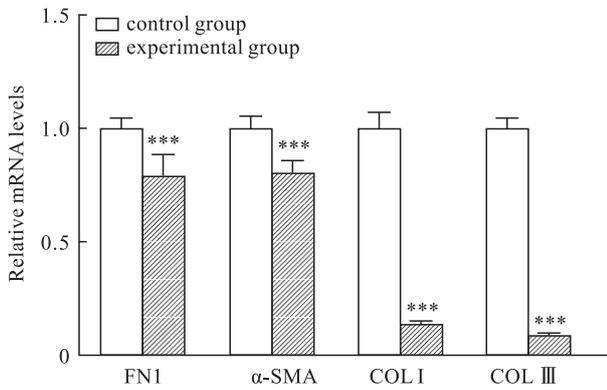


图3 ORI对HKF细胞外基质形成相关mRNA表达水平的影响

Fig.3 Effect of ORI on the expression of mRNA related to extracellular matrix formation in HKF cells

*** $P < 0.001$ vs control group.

Smad3、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达量显著下降, 差异有统计学意义 ($F_{ASC} = 20.70, P < 0.05$; $F_{NLRP3} = 40.68, P < 0.001$; $F_{Smad2} = 32.90, P < 0.001$; $F_{Smad3} = 34.89, P < 0.001$; $F_{p-Smad2} = 28.85, P < 0.01$; $F_{p-Smad3} = 38.25, P < 0.001$)。见图6。

3 讨论

目前, 瘢痕疙瘩的治疗方法包括手术、药物、放疗、激光及压迫等多种方式, 且常采用联合疗法, 然而复发率高, 临床治疗难度大^[8]。瘢痕成纤维细胞在伤口的愈合过程中扮演关键角色, 其过度增殖和凋亡延迟引发细胞外基质过量积累, 导致创伤愈合异常, 形成病理性瘢痕。研究^[9]表明 TGF- β 1/Smad 信号通路对瘢痕疙瘩的形成具有关键影响。TGF- β 1 与其 II 型受体 (T β R-II) 结合, 活化 T β R-I, 激活 Smad 信号通路, 调控胶原 α -SMA 及 FN1 等蛋白合成, 并影响成纤维细胞增殖、分化以及细胞外基质的沉积, 此过程对瘢痕疙瘩的形成至关重要^[10]。ORI 能降低 TGF- β 1 诱导下 Smad2、Smad3、Smad4 以及 PAI-I 蛋白水平, 并减少了 Smad2 和 Smad3 的磷酸化水平, 由此阻断 TGF- β 1/Smad 信号通路, 抑制结肠癌细胞的增殖^[11]。ORI 可以降低乙醇促进的细胞因子 TNF- α 、TGF- β 1、IL-1 β 和 IL-6 的释放, 改善肝脏的局灶性坏死和炎症细胞浸润, 有效减轻饮酒

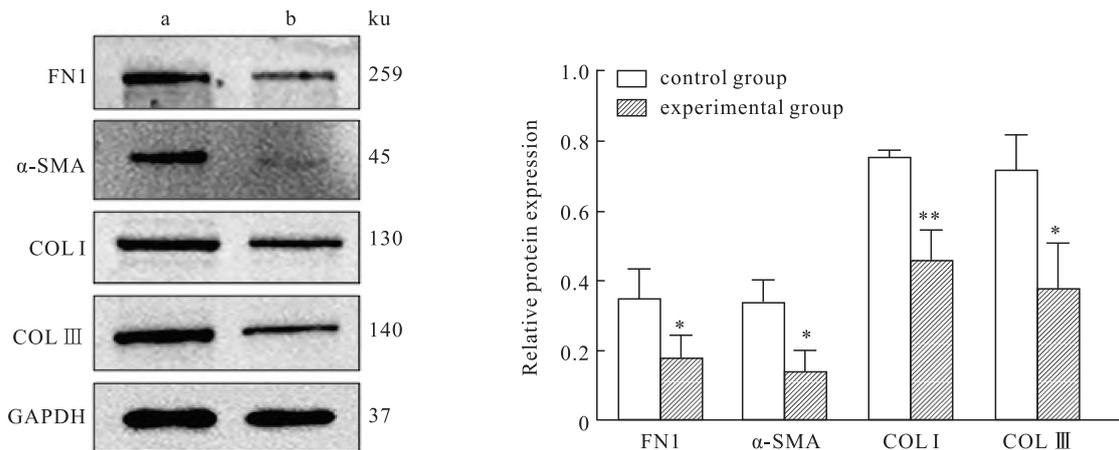


图4 ORI对HKF细胞外基质形成相关蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effect of ORI on the expression of proteins related to extracellular matrix formation in HKF cells

a: control group; b: experimental group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

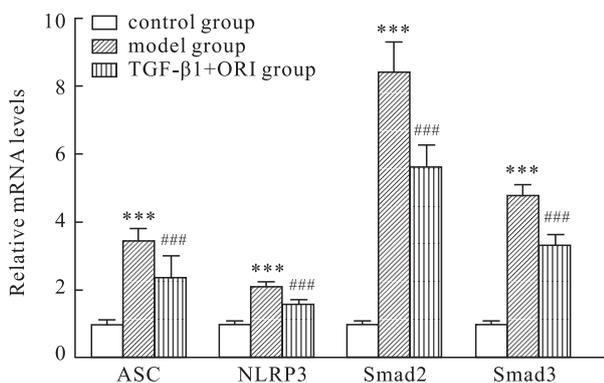


图5 ORI对HKF内TGF-β1诱导的相关mRNA表达水平的影响

Fig. 5 Effect of ORI on TGF-β1-induced mRNA expression levels in HKF

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

对肝脏的炎症损伤^[12]。既往已有大量研究表明从药用植物中提取的成分能有效抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞。该研究结果显示,经ORI处理的HKF,细胞外基质形成相关FN1、α-SMA、COL I和COL III mRNA以及蛋白的表达量显著下降,表明ORI能够限制瘢痕疙瘩细胞外基质的积累,促进已存在细胞外基质组分的降解,并且抑制胶原合成,刺激胶原的降解。该研究表明以往已知的研究结论,TGF-β1能够诱导瘢痕疙瘩中的Smad2和Smad3表达及磷酸化,并且显示经ORI处理的HKF,TGF-β1诱导的Smad2和Smad3 mRNA以及蛋白质表达水平显著下降,Smad2、Smad3蛋白的磷酸化水平受到抑制,提示ORI可能通过阻断TGF-β1/Smad信号传导通路来

削弱HKF的生物活性,从而发挥抑制瘢痕疙瘩形成的作用。

有研究^[13]表明在瘢痕疙瘩样本的成纤维细胞中观察到,NLRP3炎症小体被激活的现象,这提示瘢痕疙瘩作为一种由慢性真皮炎症所触发的过度纤维化疾病,NLRP3炎症小体在其形成与进展中存在着作用。ORI能够通过靶向NLRP3来发挥其抗炎活性,当ORI与Cys279形成共价键时,它可以阻止NLRP3与NEK7之间的相互作用以及随后的NLRP3炎症小体组装和激活过程,从而有效地抑制了由NLRP3驱动的相关疾病^[5]。ORI还显著减少了IL-4所诱导的NLRP3炎症小体相关蛋白的表达,用于缓解哮喘^[14]。ORI通过抑制NLRP3及其相关的信号通路,可以减少炎症介质IL-1β和IL-18的释放以及随后的TGF-β1/Smad信号传导,从而减轻心肌纤维化进程^[15]。该研究模型组中TGF-β1可增加NLRP3、ASC的mRNA以及蛋白水平的表达,而ORI能够显著抑制由TGF-β1所诱导的NLRP3和ASC mRNA及蛋白表达的上调,提示ORI对HKF的作用机制可能与调控NLRP3炎症小体的活性有关联,抑制TGF-β1/Smad信号转导通路可以抑制NLRP3炎症小体的激活,从而发挥抗瘢痕作用,表明NLRP3炎症小体与TGF-β之间存在互相影响、相互作用的关系。

该研究探讨并确认了ORI对HKF多种关键生物学行为的影响,包括细胞增殖、迁移、侵袭以及细胞外基质的生成与积累。在此基础上进一步揭示了ORI可能通过干预TGF-β1/Smad信号传导的经典

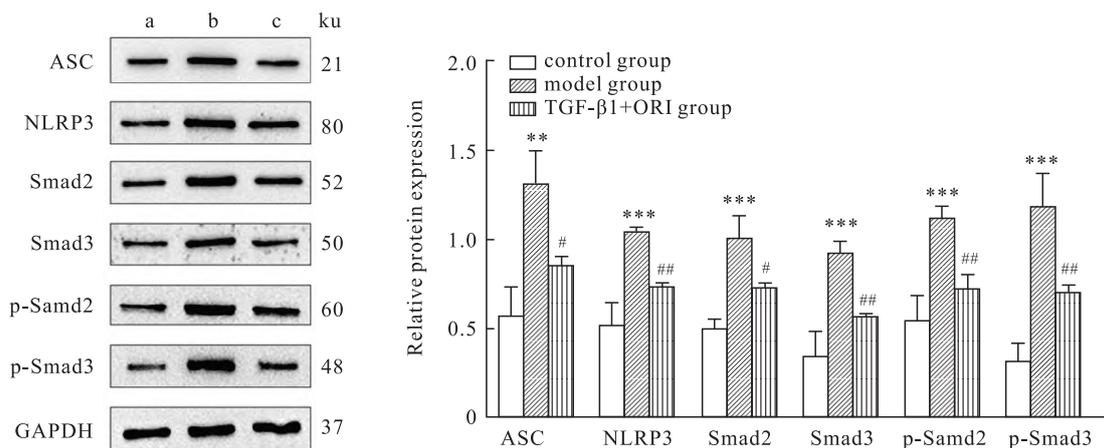


图6 ORI对HKF内TGF-β1诱导的相关蛋白表达水平的影响

Fig. 6 Effect of ORI on TGF-β1-induced protein expression levels in HKF

a: control group; b: model group; c: TGF-β1 + ORI group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group.

途径来实现其调控作用。此外,该研究还初步探讨了NLRP3炎症小体在瘢痕疙瘩发病机制中的潜在角色,为ORI从多个层面抑制瘢痕疙瘩提供了理论依据。但该实验研究存在一定局限性,瘢痕疙瘩是人体特有的病理现象,瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞体外培养与在体时的生物学行为具有一定差异,这与其复杂的相关生物学因素及其细胞因子有关,未来对ORI在瘢痕疙瘩发病机制中的调控作用仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Ud-Din S, Bayat A. Keloid scarring or disease: unresolved quasi-neoplastic tendencies in the human skin[J]. Wound Repair Regen, 2020, 28(3): 422-6. doi:10.1111/wrr.12793.
- [2] Wu Z Y, Zhang H J, Zhou Z H, et al. The effect of inhibiting exosomes derived from adipose-derived stem cells via the TGF-β1/Smad pathway on the fibrosis of keloid fibroblasts[J]. Gland Surg, 2021, 10(3): 1046-56. doi:10.21037/gst-21-4.
- [3] 刘丹, 李玲霞, 吴锦艳, 等. NLRP3炎症小体及其调控机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2020, 41(12): 90-5. doi:10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.12.017.
- [3] Liu D, Li L X, Wu J Y, et al. Advance in NLRP3 inflammasome and its controlling mechanisms[J]. Prog Vet Med, 2020, 41(12): 90-5. doi:10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.12.017.
- [4] 韩玉立, 董夏男, 杨柳, 等. NOX4-NLRP3信号通路在衰老小鼠肾脏纤维化中的激活研究[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(7): 1022-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.003.
- [4] Han Y L, Dong X N, Yang L, et al. Activation of NOX4-NLRP3 signaling pathway in renal fibrosis of aging mice[J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(7): 1022-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.003.
- [5] He H, Jiang H, Chen Y, et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2550. doi:10.1038/s41467-018-04947-6.
- [6] Li J, Bao L, Zha D, et al. Oridonin protects against the inflammatory response in diabetic nephropathy by inhibiting the TLR4/p38-MAPK and TLR4/NF-κB signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 55: 9-19. doi:10.1016/j.intimp.2017.11.040.
- [7] Hwang T L, Chang C H. Oridonin enhances cytotoxic activity of natural killer cells against lung cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 122: 110669. doi:10.1016/j.intimp.2023.110669.
- [8] Berman B, Maderal A, Raphael B. Keloids and hypertrophic scars: pathophysiology, classification, and treatment[J]. Dermatol Surg, 2017, 43(Suppl 1): S3-18. doi:10.1097/DSS.0000000000000819.
- [9] Zhang T, Wang X F, Wang Z C, et al. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF-β/Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation[J]. Biomedicine Pharmacother, 2020, 129: 110287. doi:10.1016/j.biopha.2020.110287.
- [10] 王若涵, 张霄霏, 孙佳, 等. TGF-β及Smad家族在瘢痕疙瘩形成中作用的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(10): 2051-6. doi:10.11844/cjcb.2022.10.0020.
- [10] Wang R H, Zhang X P, Sun J, et al. Research progress on the role of TGF-β and smad family in keloid formation[J]. Chin J Cell Biol, 2022, 44(10): 2051-6. doi:10.11844/cjcb.2022.10.0020.
- [11] Bu H Q, Shen F, Cui J. The inhibitory effect of oridonin on colon cancer was mediated by deactivation of TGF-β1/Smads-PAI-1 signaling pathway in vitro and vivo[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 7467-76. doi:10.2147/OTT.S220401.

- [12] Yan S L, Huang C S, Mong M C, et al. Oridonin attenuates the effects of chronic alcohol consumption inducing oxidative, glycolytic and inflammatory injury in the mouse liver[J]. *In Vivo*, 2021, 35(4): 2141–9. doi:10.21873/invivo.12484.
- [13] Lee S, Kim S K, Park H, et al. Contribution of autophagy-Notch1-mediated NLRP3 inflammasome activation to chronic inflammation and fibrosis in keloid fibroblasts[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8050. doi:10.3390/ijms21218050.
- [14] Wang W, Ming D. Oridonin attenuates apoptosis and NLRP3 inflammasome activation in IL-4-stimulated human bronchial epithelial cells in an *in vitro* pediatric asthma model[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2024, 33(2): 163–70. doi:10.17219/acem/166253.
- [15] Gandhi T, Patel A, Gupta D, et al. Repositioning Glibenclamide in cardiac fibrosis by targeting TGF- β 1-pSmad2/3-NLRP3 cascade[J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(10): 2281–95. doi:10.1007/s11010-023-04659-6.

Effect and mechanism of oridonin on malignant biological behavior of keloid fibroblasts

Song Caiying, Gao Xiang, Zhu Qiuxuan, Cheng Shengrong, Chen Wendong, Zhu Fei

(Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects and mechanisms of oridonin (ORI) on human keloid-derived fibroblasts (HKF). **Methods** The effects of ORI on the proliferation activity of HKF were assessed using the CCK-8 assay. The experiment was divided into control and experimental groups. Cell scratch and Transwell assays were conducted to evaluate the migration and invasion capabilities of HKF. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot were used to examine the impact of ORI on the expression of extracellular matrix-related mRNA and fibronectin 1 (FN1), α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen (COL I), and COL III in HKF. The experiment was also divided into control, model, and transforming growth factor (TGF)- β 1 + ORI groups. RT-qPCR and Western blot were utilized to determine the effects of ORI on the expression of TGF- β 1-induced mRNA and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), Smad2, Smad3, phosphorylated Smad2 (p-Smad2), and p-Smad3 in HKF. **Results**

CCK-8 assay demonstrated that the cell inhibition rate of HKF progressively increased with increasing concentrations of ORI. Compared with the control group, the experimental group exhibited a significant reduction in the migration area at 24 hours and a decrease in the number of invasive cells. Furthermore, there was a significant downregulation in the expression levels of FN1, α -SMA, COL I, and COL III ($P < 0.05$). In comparison with the control group, the model group showed a significant upregulation in the expression of NLRP3, ASC, Smad2, Smad3, p-Smad2, and p-Smad3 ($P < 0.05$). Relative to the model group, the TGF- β 1 + ORI group demonstrated a significant downregulation in the expression of NLRP3, ASC, Smad2, Smad3, p-Smad2, and p-Smad3 ($P < 0.05$).

Conclusion ORI the proliferation, migration, and invasiveness of HKF, as well as the formation and deposition of the extracellular matrix, through the blockade of the TGF- β 1/Smad signaling pathway and the NLRP3-mediated inflammatory response.

Key words oridonin; human keloid fibroblasts; extracellular matrix; NLRP3; TGF- β 1; Smad proteins

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 30973124); Natural Science Research Project in Higher Education Institutions of Anhui Province (No. KJ2014A108)

Corresponding author Zhu Fei, E-mail: hfzfx@163.com