丹参素对银屑病样细胞 Yes 相关蛋白表达及细胞增殖、凋亡的影响

贾金靖^{1,2} 莫秀梅² 刘俊峰² 王宁¹ 郑焱¹ 陈达灿²

¹西安交通大学第二附属医院皮肤科 710004; ²广州中医药大学第二附属医院皮肤科 510120

通信作者: 陈达灿, Email: 4910702@163.com

【摘要】目的 研究丹参素对 M5 刺激的 HaCaT 细胞(银屑病样细胞模型)增殖、凋亡的影响及与 Yes 相关蛋白(YAP)的关系。**方法** 采用 M5(含 10 μ g/L 的 IL-1 α 、IL-17、IL-22、TNF- α 、Oncostatin M)作用于 HaCaT 细胞 48 h, 制作银屑病样细胞模型, 同时分别加入 0(对照组)、0.125、0.25、0.5 mmol/L 丹参素刺激细胞, 以未做处理的 HaCaT 细胞为空白对照组。实时定量 PCR 及 Western 印迹检测各组细胞 YAP 的表达; MTT 法检测丹参素刺激细胞 24、48、72 h 时各组细胞的增殖活性; 流式细胞仪检测丹参素对各组细胞周期及凋亡的影响, Western 印迹检测各组细胞周期相关蛋白(cyclin A、cyclin B1、cyclin D、cyclin E)及凋亡相关蛋白(cleaved caspase-3、Bcl-2、BAX、p53、p21)的表达。多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验。**结果** 空白对照组与 0(对照组)、0.125、0.25、0.5 mmol/L 丹参素组细胞 YAP mRNA、蛋白的相对表达水平及培养 24、48、72 h 时的增殖活力差异均有统计学意义($P < 0.001$), 0.125、0.25、0.5 mmol/L 丹参素组 YAP mRNA (1.76 ± 0.04 、 1.54 ± 0.05 、 1.33 ± 0.05)、YAP 蛋白的相对表达水平 (1.78 ± 0.06 、 1.49 ± 0.32 、 1.27 ± 0.04) 及培养 48 h 时的细胞增殖活力 (1.66 ± 0.04 、 1.52 ± 0.02 、 1.34 ± 0.04) 均低于对照组(mRNA: 2.04 ± 0.04 , 蛋白: 2.10 ± 0.06 , 活力: 1.82 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$)。流式细胞仪检测显示, 5 组细胞 G0/G1 期、S 期、G2/M 期细胞比例及凋亡率差异均有统计学意义($P < 0.001$), 0.125、0.25、0.5 mmol/L 丹参素组细胞 G0/G1 期、G2/M 期细胞比例高于对照组, S 期细胞比例低于对照组(均 $P < 0.05$), 0.25、0.5 mmol/L 丹参素组细胞凋亡率高于对照组(均 $P < 0.05$)。Western 印迹显示, 5 组的细胞周期相关蛋白及凋亡相关蛋白相对表达差异均有统计学意义。**结论** 丹参素可能通过抑制 YAP 的表达而抑制银屑病样细胞的增殖与促进其凋亡。

【关键词】 银屑病; 丹参素; 角蛋白细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; Yes 相关蛋白

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2018JQ8067); 广东省中医药科技创新平台建设(粤中医药函[2017]340号)

DOI: 10.35541/cjd.20190749

Effect of danshensu on Yes - associated protein expression in as well as on proliferation and apoptosis of a psoriasis-like cell model

Jia Jinjing^{1,2}, Mo Xiumei², Liu Junfeng², Wang Ning¹, Zheng Yan¹, Chen Dacan²

¹Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ²Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: Chen Dacan, Email: 4910702@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of danshensu on proliferation and apoptosis of M5-stimulated HaCaT cells (a psoriasis-like cell model), and to explore its relationship with Yes-associated protein (YAP) expression. **Methods** HaCaT cells were stimulated with M5, a mixture containing 10 μ g/L interleukin (IL)-1 α , IL-17, IL-22, tumor necrosis factor (TNF)- α and oncostatin M, for 48 hours to establish a psoriasis-like cell model. Then, the cell model was divided into several groups to be treated with 0 (control group), 0.125, 0.25 and 0.5 mmol/L danshensu respectively, and HaCaT cells receiving no treatment served as the blank control group. Real-time quantitative PCR and Western blot analysis were performed to determine the mRNA and protein expression of YAP respectively in these groups; methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was conducted to estimate the cellular proliferative activity after 24-, 48- and 72-hour treatment with danshensu, flow cytometry to evaluate the effect of danshensu on cell cycle and

apoptosis, and Western blot analysis to determine expression of cell cycle-related proteins (cyclin A, cyclin B1, cyclin D, cyclin E) and apoptosis-related proteins (cleaved caspase-3, Bcl-2, BAX, p53 and p21). One-way analysis of variance was used for comparing means in several groups, and least significant difference (LSD)-*t* test for multiple comparisons. **Results** The mRNA and protein expression of YAP significantly differed among the blank control group, control group, 0.125-, 0.25- and 0.5-mmol/L danshensu groups (both $P < 0.001$), so did the cellular proliferative activity at 24, 48 and 72 hours (all $P < 0.001$). The 0.125-, 0.25- and 0.5-mmol/L danshensu groups all showed significantly decreased mRNA and protein expression of YAP (mRNA: 1.76 ± 0.04 , 1.54 ± 0.05 , 1.33 ± 0.05 respectively; protein: 1.78 ± 0.06 , 1.49 ± 0.32 , 1.27 ± 0.04 respectively), and cellular proliferative activity at 48 hours (1.66 ± 0.04 , 1.52 ± 0.02 , 1.34 ± 0.04 respectively) compared with the control group (mRNA: 2.04 ± 0.04 ; protein: 2.10 ± 0.06 ; cellular proliferative activity: 1.82 ± 0.03 ; all $P < 0.05$). Flow cytometry showed significant differences in the proportions of cells at G0/G1, S and G2/M phases as well as in the apoptosis rates among the above 5 groups (all $P < 0.001$). Compared with the control group, the 0.125-, 0.25- and 0.5-mmol/L danshensu groups showed significantly higher proportions of cells at G0/G1 and G2/M phases, but lower proportions of cells at S phase (all $P < 0.05$). Additionally, the apoptosis rates were significantly higher in the 0.25- and 0.5-mmol/L danshensu groups than in the control group (both $P < 0.05$). Western blot analysis revealed significant differences in the expression of cell cycle-related proteins and apoptosis-related proteins among the above 5 groups (all $P < 0.001$). **Conclusion** Danshensu can inhibit the proliferation of the psoriasis-like cell model and promote its apoptosis, likely by suppressing YAP expression.

[Key words] Psoriasis; Danshensu; Keratinocytes; Cell proliferation; Apoptosis; Yes-associated protein

Fund programs: Natural Science Basic Research Program of Shaanxi Province - General Project (Youth) (2018JQ8067); Guangzhou Traditional Chinese Medicine Science and Technology Innovation Platform Construction Project (Guangdong Traditional Chinese Medicine Bureau [2017] 340)

DOI: 10.35541/cjd.20190749

Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 是 Hippo 信号通路的关键组分,其在调控细胞增殖和凋亡等方面发挥重要作用^[1-2]。我们的前期研究^[3]发现,银屑病皮损 YAP 阳性率升高,YAP 主要表达于皮损组织基底层和棘层下部,基底层作为表皮的生发区,提示 YAP 在银屑病表皮异常增殖中发挥重要作用。治疗银屑病的方剂中丹参多见^[4-5]。体外实验研究表明,丹参素在多种肿瘤细胞中均有抑制细胞增殖、引起细胞周期阻滞、诱导凋亡以及抑制侵袭和转移等作用^[6-10]。用含白细胞介素 1 α (IL-1 α)、IL-17、IL-22、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、抑癌蛋白 M (oncostatin M) 的混合物 M5 刺激人永生表皮细胞 (HaCaT) 后其病理生理学特征与银屑病高度类似,既往有很多文献将其作为银屑病样细胞模型^[11-13]。本研究检测丹参素对 M5 诱导的银屑病样细胞模型中 YAP 的表达情况,探讨其对角质形成细胞增殖、细胞周期以及凋亡的影响。

资料与方法

一、实验材料与仪器

HaCaT 细胞 (上海复祥生物科技有限公司)、DMEM 培养液 (美国 HyClone 公司)、丹参素 (C9H10O5, 相对分子质量 162.14, 纯度 95%, 大连

美仑生物技术有限公司)、M5 (IL-1 α 、IL-17、IL-22、TNF- α 、Oncostatin M, 美国 PeproTech 公司)。兔抗人 YAP 抗体 (美国 Cell Signaling 公司)。细胞周期相关蛋白抗体:兔抗人细胞周期蛋白 A (Cyclin A)、兔抗人 Cyclin B1、鼠抗人 Cyclin D1、鼠抗人 Cyclin E (美国 Santa Cruz 公司)。细胞凋亡相关蛋白抗体:兔抗人胱天蛋白酶 3 剪切体 (cleaved-caspase-3)、兔抗人 p21 (沈阳万类科技有限公司)、兔抗人 Bcl-2、兔抗人 BAX (美国 Cell Signaling 公司)。鼠抗人 p53 (美国 Santa Cruz 公司)。鼠抗人 β 肌动蛋白抗体、HRP 标记的羊抗兔二抗、HRP 标记的羊抗鼠二抗 (美国 Santa Cruz 公司)。细胞周期检测试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司)。流式细胞仪 (FACSCalibur, 美国 BD 公司)。

二、银屑病样细胞模型构建

HaCaT 细胞由含 10% 胎牛血清及 100 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。采用 M5 (含 10 $\mu\text{g/L}$ 的 IL-1 α 、IL-17、IL-22、TNF- α 、Oncostatin M) 作用于细胞 48 h, 制作银屑病样细胞模型^[11-13]。HaCaT 细胞加入 M5 的同时分别加入 0 (丹参素对照组, 以下简称对照组)、0.125、0.25、0.5 mmol/L 丹参素刺激细胞, 以未做处理的 HaCaT 细胞为空白对照组。

三、实时定量 PCR 检测丹参素对银屑病样细胞模型 YAP mRNA 表达的影响

丹参素刺激细胞 48 h 后,采用 Trizol 试剂盒提取各实验组细胞总 RNA,反转录得到 cDNA 后扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,YAP 引物序列:正向 5'-GCTAGACCCAAGGCTTGACC-3',反向 5'-ATTTGCTGTGCTGGGATTGA-3'; GAPDH 引物序列:正向 5'-CACTGTGCCCATCTACGAGG-3',反向 5'-TAATGTCACGCACGATTTCC-3'。PCR 扩增条件:95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s;72 ℃ 延伸 30 s,共 40 个循环,获取各组标本的标准曲线,计算机分析 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 YAP mRNA 的相对表达。

四、Western 印迹检测丹参素对银屑病样细胞模型 YAP 及相关蛋白水平的影响

丹参素刺激细胞 48 h 后,提取各组细胞总蛋白并进行蛋白定量,取 25 μ g 蛋白行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭非特异性抗原,加入特异性一抗,4 ℃ 孵育过夜,洗膜后加入二抗室温孵育 1 h,曝光、显影、定影,扫描后用 Image J 软件分析目标条带灰度值,计算蛋白的相对表达量。

五、细胞增殖实验

采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞的增殖能力。取对数生长期细胞接种于 96 孔板,每孔 5×10^3 个细胞加 200 μ l 培养液,培养 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 20 μ l,避光孵育 4 h,弃上清液,每孔加入二甲亚砜 150 μ l,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,采用酶标仪 490 nm 波长测定各孔吸光度(A 值)间接反映活细胞数量。每组设 5 个复孔。

六、细胞周期检测

按照细胞周期试剂盒说明书操作,常规消化各组细胞,PBS 洗涤 2 次,于 -20 ℃、75% 乙醇溶液中固定过夜,再次用 PBS 洗涤 2 次,加入终浓度为 100 μ g/ml 的 RNaseA 和 50 μ g/ml 的 PI 染色液,37 ℃ 避光孵育 30 min,流式细胞仪检测各组细胞周期,激发波长 488 nm,采用 Modifit 软件分析检测结果。Western 印迹检测丹参素刺激 48 h 后各组细胞细胞周期相关蛋白的相对表达。

七、细胞凋亡检测

按照细胞凋亡试剂盒说明书操作,常规消化各组细胞,PBS 洗涤 2 次,2 000 转/min(离心半径 9.7 cm)离心 5 min,收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞,加入 500 μ l 的结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μ l

Annexin V-FITC 混匀后再加入 5 μ l PI 染色液混匀,室温避光孵育 5 ~ 15 min,流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。Western 印迹检测丹参素刺激 48 h 后各组细胞凋亡相关蛋白的相对表达。

八、统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、YAP 在银屑病样细胞模型中的表达

实时定量 PCR 与 Western 印迹结果显示,银屑病样细胞模型组 YAP mRNA、蛋白相对表达 (2.03 ± 0.04 、 2.20 ± 0.02) 均高于 HaCaT 细胞组 (0.95 ± 0.03 、 1.01 ± 0.02 , $t = 21.93$ 、 44.38 , 均 $P < 0.001$)。见图 1。

二、丹参素对银屑病样细胞模型 YAP 表达的影响

实时定量 PCR 与 Western 印迹结果显示,空白对照组与 0 (对照组)、0.125、0.25、0.5 mmol/L 丹参素组 YAP mRNA、蛋白的相对表达水平差异有统计学意义 ($F = 93.96$ 、 56.65 , $P < 0.001$),对照组 YAP mRNA、蛋白的相对表达水平均高于空白对照组 ($P < 0.001$),亦高于 0.125、0.25、0.5 mmol/L 丹参素组 (均 $P < 0.05$),YAP mRNA 及蛋白表达水平随丹参素浓度的增加呈降低趋势。见图 2。

三、丹参素对银屑病样细胞模型增殖能力的影响

空白对照组、对照组与 0.125、0.25、0.5 mmol/L 丹参素组细胞分别在培养 24、48、72 h 时的增殖活力差异均有统计学意义 ($F = 43.17$ 、 71.65 、 88.39 , 均 $P < 0.001$),在培养 24 h 时,对照组细胞增殖活力高于 0.5 mmol/L 丹参素组细胞 ($P < 0.001$);培养 48、72 h 时,对照组细胞增殖活力均高于 0.125、0.25、0.5 mmol/L 丹参素组 (均 $P < 0.05$),且随着丹参素

图 1 Western 印迹检测 YAP 在银屑病样细胞模型中的表达
银屑病样细胞组 YAP 蛋白的表达高于 HaCaT 细胞组

图2 实时定量PCR(2A)与Western印迹(2B)检测丹参素对银屑病样细胞模型YAP表达的影响 丹参素可抑制银屑病样细胞模型中YAP mRNA、蛋白的相对表达。1:空白对照组; 2~5:分别为0(对照组)、0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组。a:与对照组相比, $P < 0.01$

图3 MTT法检测丹参素处理银屑病样细胞模型24、48、72 h对细胞增殖的影响 丹参素可抑制银屑病样细胞模型的增殖。a:与对照组相比, $P < 0.01$

浓度的增加增殖能力呈降低趋势。见图3。

四、丹参素对银屑病样细胞模型细胞周期的影响

空白对照组、0(对照组)、0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组G0/G1期、S期、G2/M期细胞比例差异均有统计学意义($F = 61.55、313.60、9.20$, 均 $P < 0.01$)。0(对照组)、0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组进一步两两比较,除对照组与0.125 mmol/L丹参素组、0.25与0.5 mmol/L丹参素组间G0/G1期细胞比例,0.125与0.25 mmol/L丹参素组、0.25与0.5 mmol/L丹参素组间G2/M期细胞比例差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),余各组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组G2/M期细胞比例高于对照组,S期细胞比例低于对照组;0.25、0.5 mmol/L丹参素组G0/G1期细胞比例高于对照组。见图4。

Western印迹结果显示,空白对照组、对照组与0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组Cyclin A、Cyclin B1、Cyclin D1、Cyclin E蛋白相对表达水平差异均

有统计学意义($F = 206.50、92.89、280.36、48.45$, $P < 0.001$)。对照组、0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。对照组相对表达水平平均高于0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组。见图5。

五、丹参素对银屑病样细胞模型凋亡的影响

空白对照组、对照组与0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组的凋亡率差异有统计学意义($F = 154.08$, $P < 0.001$)。对照组、0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组间两两比较,除对照组与0.125 mmol/L丹参素组差异无统计学意义($P > 0.05$),余各组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。对照组凋亡率低于0.25、0.5 mmol/L丹参素组。见图4。

Western印迹结果显示,空白对照组、对照组与0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组细胞cleaved-caspase-3、Bcl-2、BAX、p53、p21的相对表达水平差异均有统计学意义($F = 15.42、19.36、33.98、17.11、26.81$, $P < 0.001$)。0.5 mmol/L丹参素组cleaved-caspase-3水平高于对照组、0.125 mmol/L丹参素组(均 $P < 0.05$)。对照组、0.125与0.25 mmol/L丹参素组间两两比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。0.5 mmol/L丹参素组Bcl-2水平低于对照组、0.125 mmol/L丹参素组(均 $P < 0.05$)。对照组、0.125与0.25 mmol/L丹参素组间两两比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。0.5 mmol/L丹参素组BAX水平高于0.25 mmol/L丹参素组,0.25 mmol/L丹参素组高于0.125 mmol/L丹参素组及对照组(均 $P < 0.05$)。对照组与0.125 mmol/L丹参素组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。0.5 mmol/L丹参素组p53水平高于对照组、0.125 mmol/L丹参素组(均 $P < 0.05$)。0.125与0.25 mmol/L丹参素组、0.25与0.5 mmol/L丹参素组间两两比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

图4 流式细胞仪检测丹参素对银屑病样细胞模型细胞周期及凋亡的影响 4A, 4C:丹参素处理组S期细胞比例降低, G0/G1期、G2/M期细胞比例升高; 4B, 4D:丹参素可促进细胞凋亡。1:空白对照组; 2~5:分别为0(对照组)、0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组。a:与对照组相比, $P < 0.05$

图5 Western印迹检测丹参素刺激48 h后各组细胞周期相关蛋白、凋亡相关蛋白的表达 对照组Cyclin A、Cyclin B1、Cyclin D1、Cyclin E蛋白相对表达水平高于0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组; 对照组cleaved-caspase-3相对水平低于0.5 mmol/L丹参素组, BAX水平低于0.25、0.5 mmol/L丹参素组, p53、p21水平低于0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组, Bcl-2水平高于0.5 mmol/L丹参素组。1:空白对照组; 2~5:分别为0(对照组)、0.125、0.25、0.5 mmol/L丹参素组。a:与对照组相比, $P < 0.05$

0.5 mmol/L 丹参素组 p21 水平高于 0.25 mmol/L 丹参素组, 0.125 mmol/L 丹参素组高于对照组 (均 $P < 0.05$), 0.125 与 0.25 mmol/L 丹参素组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

讨 论

近来研究发现, YAP 在多种恶性肿瘤中表达上调, 参与肿瘤的发生、发展^[14]。D'Addario 等^[15]发现, 在正常人原代角质形成细胞中过表达 YAP 后, 可使原代角质形成细胞永生增殖, 阻碍其正常分化进程。以往研究发现, YAP 可通过下游 RAS-AKT/ERK 通路促进皮肤鳞状细胞癌的进展^[16], 我们既往的研究证实, YAP 在银屑病皮损组织中表达增加^[3], 提示 YAP 可能作为银屑病发病机制中的关键分子, 如能通过外界手段干预其表达, 将有望发挥治疗银屑病的作用。丹参是治疗银屑病的常用中药之一, 体外实验发现, 在胃癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤等多种肿瘤细胞中, 丹参素均有抑制细胞增殖、引起细胞周期阻滞、诱导凋亡以及抑制侵袭和转移等作用, 上述作用可能与其较强的自由基清除和抗氧化活性、抑制 AKT 以及 ERK1/2 的磷酸化水平有关^[6-10], 这些机制及通路与我们前期研究中 YAP 在皮肤鳞状细胞癌中发挥作用的相关信号通路一致^[16]。

本研究结果表明, 丹参素可以抑制银屑病样细胞模型中 YAP mRNA 及蛋白的表达, 同时也可以抑制细胞增殖、引起细胞周期阻滞在 G0/G1 期, 并且不同程度地抑制细胞周期蛋白 Cyclin A、Cyclin B1、Cyclin D1 及 Cyclin E 的表达, 而这些蛋白的表达可通过影响细胞周期的转换进而影响细胞的增殖^[17]。因此, 我们推测, 丹参素可能正是通过影响这些细胞周期蛋白的表达发挥抑制银屑病细胞增殖的作用, 引起细胞周期阻滞在 G0/G1 期。细胞凋亡相关蛋白中, Caspase-3 是多种凋亡途径的下游效应部分, 被认为是调控凋亡的执行蛋白酶, 其激活 (即被剪切为 cleaved-caspase-3) 代表细胞凋亡机制进入了不可逆转的阶段^[18]; Bcl-2 和 BAX 同属于 Bcl-2 家族, 二者在凋亡调控过程中功能是相互对抗的, Bcl-2 表达高于 BAX 时, 抑制细胞凋亡, 反之则促进细胞凋亡^[19]。P53 基因是人体内的抑癌基因, 有促凋亡的作用, 而 p21 是其下游调控细胞凋亡的关键靶基因^[20]。本研究发现, 丹参素可诱导银屑病样细胞的凋亡, 并同时增加促凋亡蛋白 cleaved-caspase-3、BAX、p53、p21 的表达, 抑制 Bcl-2

的表达, 提示丹参素可能是通过影响这些凋亡相关蛋白的表达促进银屑病样细胞的凋亡。既往研究证实^[3], 在 HaCaT 细胞中敲除 YAP 后可抑制细胞的增殖, 促进凋亡, 将细胞周期阻滞在 G0/G1 期, 本文中丹参素对银屑病样细胞的作用与上述 HaCaT 细胞中敲除 YAP 后细胞的表现高度吻合, 且引起细胞周期相关蛋白及凋亡相关蛋白的表达改变趋势也基本一致。同时, 本研究也发现, 丹参素可呈剂量依赖性地降低 YAP 的表达水平, 因此推测丹参素通过影响 YAP 的表达, 进而抑制了银屑病表皮角质形成细胞的异常增殖而发挥治疗作用。

综上, 本研究结果提示, 丹参素可能通过抑制银屑病样细胞中 YAP 的表达, 进而发挥细胞周期阻滞、抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用。本研究尚处在初步探索阶段, 具体的信号通路机制等仍有待后续研究进一步完善。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Sudol M. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product[J]. *Oncogene*, 1994,9(8):2145-2152.
- [2] Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal[J]. *Nat Cell Biol*, 2011,13(8):877-883. doi: 10.1038/ncb2303.
- [3] Jia J, Li C, Yang J, et al. Yes-associated protein promotes the abnormal proliferation of psoriatic keratinocytes via an amphiregulin dependent pathway[J]. *Sci Rep*, 2018,8(1):14513. doi: 10.1038/s41598-018-32522-y.
- [4] 赵庆利, 丰绍祥, 蔡瑞康, 等. 复方丹参注射液、山莨菪碱及川芎嗪加低分子右旋糖酐治疗银屑病疗效对比观察[J]. *中华皮肤科杂志*, 2001,34(1):69.
- [5] 张祥德, 蒋永芬, 廖平平. 凉血愈风汤和复方丹参注射液治疗银屑病[J]. *中华皮肤科杂志*, 1997,30(2):136.
- [6] 睦建, 林枫. 丹参素对胃癌 NGCC 细胞株的作用[J]. *镇江医学院学报*, 1997,(04):384-385.
- [7] 方杰. 丹参素对乳腺癌 MCF 细胞株的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2003,23(3):168-169. doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2003.03.028.
- [8] 毕明慧, 陈坚. 丹参素诱导人肝癌细胞株 SMMC7721 凋亡的研究[J]. *胃肠病学*, 2011,16(4):222-225. doi: 10.3969/j.issn.1008-7125.2011.04.008.
- [9] 陶丽, 王生, 赵杨, 等. 丹参素对非小细胞肺癌 A549 细胞内氧化还原状态及相关核转录因子的影响[J]. *中国中药杂志*, 2012,37(9):1265-1268. doi: 10.4268/cjcm20120920.
- [10] Zhang LJ, Chen L, Lu Y, et al. Danshensu has anti-tumor activity in B16F10 melanoma by inhibiting angiogenesis and tumor cell invasion[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010,643(2-3):195-201. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.06.045.
- [11] Rabeony H, Petit - Paris I, Garnier J, et al. Inhibition of keratinocyte differentiation by the synergistic effect of IL-17A, IL-22, IL-1 α , TNF α and oncostatin M[J]. *PLoS One*, 2014,9(7):e101937. doi: 10.1371/journal.pone.0101937.
- [12] Li C, Xiao L, Jia J, et al. Cornulin is induced in psoriasis lesions and promotes keratinocyte proliferation via phosphoinositide 3-Kinase/Akt pathways[J]. *J Invest Dermatol*, 2019,139(1):71-

80. doi: 10.1016/j.jid.2018.06.184.
- [13] Chen C, Wu N, Duan Q, et al. C10orf99 contributes to the development of psoriasis by promoting the proliferation of keratinocytes[J]. *Sci Rep*, 2018,8(1):8590. doi: 10.1038/s41598-018-26996-z.
- [14] Lorenzetto E, Brenca M, Boeri M, et al. YAP1 acts as oncogenic target of 11q22 amplification in multiple cancer subtypes[J]. *Oncotarget*, 2014,5(9):2608-2621. doi: 10.18632/oncotarget.1844.
- [15] D'Addario I, Abbruzzese C, Lo Iacono M, et al. Overexpression of YAP1 induces immortalization of normal human keratinocytes by blocking clonal evolution[J]. *Histochem Cell Biol*, 2010,134(3):265-276. doi: 10.1007/s00418-010-0728-4.
- [16] Jia J, Li C, Luo S, et al. Yes-associated protein contributes to the development of human cutaneous squamous cell carcinoma via activation of RAS[J]. *J Invest Dermatol*, 2016,136(6):1267-1277. doi: 10.1016/j.jid.2016.02.005.
- [17] Abreu Velez AM, Howard MS. Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin[J]. *N Am J Med Sci*, 2015,7(5):176-188. doi: 10.4103/1947-2714.157476.
- [18] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, et al. Old, new and emerging functions of caspases[J]. *Cell Death Differ*, 2015,22(4):526-539. doi: 10.1038/cdd.2014.216.
- [19] Zheng JH, Viacava Follis A, Kriwacki RW, et al. Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis[J]. *FEBS J*, 2016,283(14):2690-2700. doi: 10.1111/febs.13527.
- [20] Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2015,75(23):5001-5007. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0563.
- (收稿日期:2019-07-16)
(电子版发表日期:2020-03-23)
(本文编辑:朱思维 颜艳)

此文已撤销
Retraction