LATS1-YAP 信号通路对人皮肤成纤维细胞增殖及细胞外基质合成的调控

卢 昊,刘 婷,陈 宇,毛彤春,雷泽源,樊东力 (第三军医大学新桥医院整形外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 探讨 LATS1-YAP 信号通路对人皮肤成纤维细胞活力及细胞外基质合成的调控作用。**方法** 实验分为未干预组、LATS1 siRNA 干预组和 YAP siRNA 干预组。构建 LATS1 siRNA 和 YAP siRNA,LATS1 siRNA 干预组利用 LATS1 siRNA 转染人皮肤成纤维细胞株 HS27,YAP siRNA 干预组利用 YAP siRNA 转染 HS27。转染后 48 h 利用 Western-blot 观察 LATS1、YAP 和 collagen Ⅰ的表达情况,应用 MTT 检测 HS27 细胞株的细胞活力情况。**结果** LATS1 siRNA 转染 48 h 后 LATS1 蛋白表达显著降低,YAP 蛋白和 collagen Ⅰ蛋白表达升高,细胞活力显著增高;YAP siRNA 转染 48 h 后 LATS1 蛋白表达无变化,YAP 蛋白和 collagen Ⅰ蛋白表达降低,细胞活力显著降低。**结论** LATS1-YAP 信号通路可调控人皮肤成纤维细胞活力和细胞外基质的合成,可能成为皮肤创伤后修复以及阻止创伤后瘢痕形成提供潜在治疗靶点。

[关键词] 皮肤成纤维细胞;LATS1-YAP 信号通路;增殖;细胞外基质
[中图分类号] R329.28;R619.6 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)01-0027-03

LATS1-YAP pathway regulate proliferation of human skin fibroblast and synthesis of extracellular matrix

LU Hao, LIU Ting, CHEN Yu, MAO Tong-chun, LEI Ze-yuan, FAN Dong-li (Department of Plastic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the proliferation of human skin fibroblast and synthesis of extracellular matrix which were regulated by LATS1-YAP pathway. **Methods** They were divided into three groups: control groups, LATS1 siRNA intervention group and YAP siRNA treatment group. Using LATS1 siRNA transferred human skin fibroblasts cell lines HS27 in LATS1 siRNA intervention group, and using YAP siRNA transferred HS27 in YAP siRNA treatment group. Expression of LATS1, YAP and collage Ⅰ were detected by western-blot 48 h later, and the activity of HS27 cells was determined by MTT. **Results** Compared with control group, expression of LATS1 protein decreased while expression of YAP protein and collagen Ⅰ protein increased 48 h after LATS1 siRNA transfection. Expression of LATS1 protein remains unchanged and expression of YAP protein and collagen Ⅰ protein decreased 48 h after YAP siRNA transfection. **Conclusion** LATS1-YAP pathway could regulate proliferation of human skin fibroblast and synthesis of extracellular matrix. It provides a potential therapeutic targets for skin wound repair and cicatrization.

Keywords: human skin fibroblast; LATS1-YAP pathway; proliferation; extracellular matrix

皮肤成纤维细胞是皮肤真皮中最主要的细胞成分,在合成分泌纤维和细胞外基质(extracellular matrix,ECM)中扮演着重要的角色。在皮肤受到创伤后,皮肤成纤维细胞作为主要修复细胞,在趋化因子的作用下由创周向创面移位,并分泌细胞外基质成分,如Ⅰ型胶原蛋白(collagen Ⅰ)、层联蛋白等,成纤维细胞与 ECM 相互作用,在皮肤创伤修复过程中发挥着关键作用。而当皮肤创伤修复过程中成纤维细胞过度增殖,则会导致瘢痕或瘢痕疙瘩的出现,影响形体的美观,乃至影响功能。故如何调控皮肤成纤维细胞的增殖成为皮肤创伤修复和阻止瘢痕形成的关键环节,但目前调控皮肤成纤维增殖的机制尚不清楚。本研究旨在探讨 LATS1-YAP 信号通路对人皮肤成纤维细胞 HS27 增殖及细胞外基质合成的调控作用,以期为皮肤创伤后修复以及阻止创伤后瘢痕形成提供潜在治疗靶点。

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201401010
[通讯作者] 樊东力,fdltummu@sina.com
[收稿日期] 2013-09-09 [修回日期] 2013-10-15

1 材料与方法

1.1 主要材料和实验分组

人皮肤成纤维细胞 HS27 购自 ATCC。DMEM 培养基、优等胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司,LATS1 siRNA、YAP siRNA 由上海生物工程有限公司合成。LATS1 兔单克隆抗体、YAP 兔单克隆抗体、collagen Ⅰ兔单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司。蛋白提取试剂盒、二抗辣根酶标记山羊抗兔、GAPDH 兔多克隆抗体均购自北京天德悦生物科技公司。BeyoECL plus(超敏 ECL 化学发光试剂盒)购自江苏碧云天生物技术有限公司。lipofectmine2000 购自美国 Invitrogen 公司。

LATS1 siRNA 干预组:使用 LATS1 siRNA 对 HS27 细胞进行干预;YAP siRNA 干预组:使用 YAP siRNA 对 HS27 细胞进行干预;未干预组 HS27 细胞只加入等量的培养基。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人皮肤成纤维细胞 HS27 培养于含

10% FBS 的高糖 DMEM 培养基中，于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养传代，实验中选用对数生长期细胞。

1.2.2 LATS1 siRNA 和 YAP siRNA 的转染 转染前 1 d 将对数生长期的 HS27 细胞分别接种 6 孔细胞培养板，每孔 1×10^5 个细胞。倒置显微镜下观察细胞生长情况，待培养板中细胞约 60% 融合时开始转染。取无血清 DMEM 培养基 240 μl 与 10 μl lipofectmine2000 混匀，再取无血清 DMEM 培养基 240 μl 与 10 μl LATS1/YAP siRNA 混匀，放置 5 ~ 10 min 后将上述 2 种溶液混合，再放置 20 min。将 6 孔细胞培养板中培养基吸出，用 PBS 洗涤 1 次后将脂质体 siRNA 混合液加入培养板，孵育 6 h 后吸取培养基，换为 10% FBS 的高糖 DMEM，继续培养 48 h。

1.2.3 检测 LATS1、YAP 和 collagen Ⅰ 蛋白表达 收集各组细胞，加细胞蛋白提取液提取总蛋白，置于冰中裂解约 20 min 后，用细胞刮收集细胞于 EP 管中，4 ℃ 12000 r/min 离心 10 min，取上清用核酸蛋白检测仪测蛋白浓度，将蛋白浓度调成一致，加入 5 × Loading buffer 后在沸水中煮 5 min 变性。配制 8% 分离胶、5% 浓缩胶后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，300 mA 湿转 120 min，将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，分别加入 5% 脱脂奶粉稀释的 LATS1、YAP 和 collagen Ⅰ 一抗（稀释浓度均为 1∶1 000）中 4 ℃ 孵育过夜，次日用 TBST 漂洗 6 次，每次 5 min，放入 5% 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG（1∶5 000）抗体中室温孵育 1 h，TBST 漂洗 6 次，每次 5 min，ECL 化学发光法显色，以 GADPH 内参蛋白校正。

1.2.4 检测 HS27 细胞的活力 以每孔 10^3 个细胞将 HS27 细胞接种于 96 孔培养板中，每孔体积 200 μl，每组设 5 个复孔，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后进行转染，待转染 48 h 后每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μl，继续孵育 4 h，小心吸弃培养孔内上清液。每孔加入 150 μl DMSO，轻微振荡 10 min，使结晶物完全溶解，酶标仪选择 490 nm 波长，测定各孔吸光度（A）值，空白对照孔调零。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

使用 Image-Pro Plus 10.0 对电泳图像进行分析；使用 SPSS 16.0 统计学软件对数据进行分析，各实验至少重复 3 次，2 组均数间比较用配对 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同干预条件下 LATS1 蛋白的表达

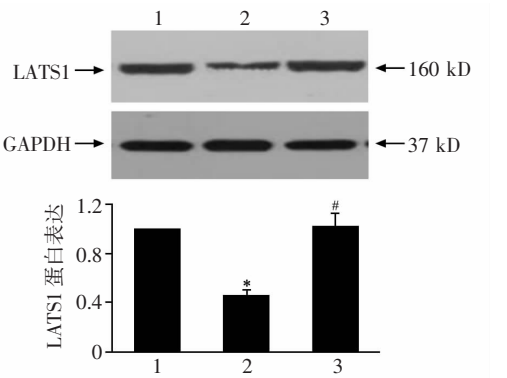
LATS1 siRNA 干预组 LATS1 蛋白表达显著低于未干预组（$P<0.05$），YAP siRNA 干预组 LATS1 蛋白表达与未干预组无显著差异（$P>0.05$），LATS1 siRNA 干预组 LATS1 蛋白的表达显著低于 YAP siRNA 干预组（$P<0.05$），见图 1。

2.2 不同干预条件下 YAP 蛋白的表达

LATS1 siRNA 干预组 YAP 蛋白表达显著高于未干预组（$P<0.05$），YAP siRNA 干预组 YAP 蛋白表达显著低于未干预组（$P<0.05$），LATS1 siRNA 干预组 YAP 蛋白的表达显著高于 YAP siRNA 干预组（$P<0.05$），见图 2。

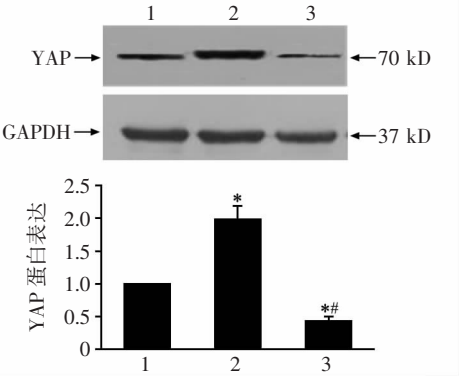
2.3 不同干预条件下 collagen Ⅰ 蛋白的表达

LATS1 siRNA 干预组 collagen Ⅰ 蛋白表达显著高于未干预组（$P<0.05$），YAP siRNA 干预组 collagen Ⅰ 蛋白表达显著低于未干预组（$P<0.05$），LATS1 siRNA 干预组 collagen Ⅰ 蛋白的表达显著高于 YAP siRNA 干预组（$P<0.05$），见图 3。



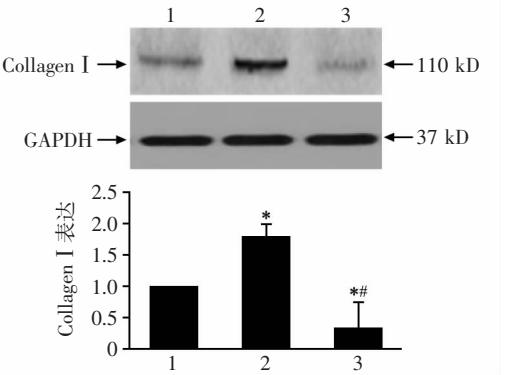
1：未干预组；2：LATS1 siRNA 干预组；3：YAP siRNA 干预组；*：与未干预组比较，$P<0.05$；#：与 LATS1 siRNA 干预组比较，$P<0.05$

图 1 LATS1 蛋白的表达



1：未干预组；2：LATS1 siRNA 干预组；3：YAP siRNA 干预组；*：与未干预组比较，$P<0.05$；#：与 LATS1 siRNA 干预组比较，$P<0.05$

图 2 YAP 蛋白的表达



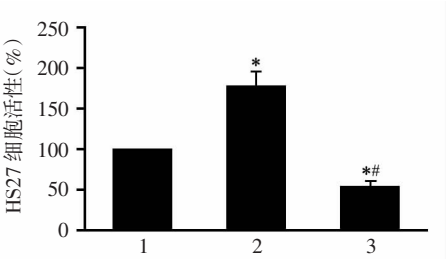
1：未干预组；2：LATS1 siRNA 干预组；3：YAP siRNA 干预组；*：与未干预组比较，$P<0.05$；#：与 LATS1 siRNA 干预组比较，$P<0.05$

图 3 collagen Ⅰ 蛋白的表达

2.4 不同干预条件下 HS27 的活性

LATS1 siRNA 干预组 HS27 细胞活力显著高于为未干预组（$P<0.05$），YAP siRNA 干预组 HS27 细胞活力显著低于未干预

组($P<0.05$),LATS1 siRNA 干预组 HS27 细胞活力显著高于 YAP siRNA 干预组($P<0.05$),见图 4。



1:未干预组;2:LATS1 siRNA 干预组;3:YAP siRNA 干预组;*:与未干预组比较,$P<0.05$;#:与 LATS1 siRNA 干预组比较,$P<0.05$

图 4 HS27 细胞的活性变化

3 讨论

皮肤是人身体最大的器官,主要承担着保护身体、排汗、感觉冷热和压力的功能,使体内各种组织和器官免受物理性、机械性、化学性和病原微生物侵袭。当皮肤受到损伤后,身体中多种细胞内外信号通路激活,使成纤维细胞、免疫细胞(如中性粒细胞、单核细胞、树突细胞)、内皮细胞等胞内一些相关基因表达、细胞的极性发生显著的改变,导致细胞的增殖、迁移、分化,从而修复皮肤创伤[1-2]。多数皮肤受损后修复时会出现成纤维细胞的过度增殖和 ECM 的紊乱,从而导致瘢痕的出现[3],极少数皮肤创伤修复中会出现异常增生和恶变[4],但目前尚无有效方法阻止瘢痕的形成甚至恶变,其主要原因是调控真皮层成纤维细胞增殖的机制尚不清楚。

LATS1 和 YAP 蛋白是 Hippo 信号通路中的关键元件。Hippo 信号通路具有调节器官体积、保持细胞增殖凋亡平衡、参与细胞接触性抑制调控等作用[5-6],而该通路的异常或失活可导致细胞的异常增殖以及肿瘤的形成[7]。研究发现 LATS1 基因敲除后,小鼠常死于胚胎阶段,即使存活下来也伴有肿瘤发生[8],提示 LATS1 在细胞增殖、分化以及抑制肿瘤发生中发挥着重要作用。YAP 是经典 Hippo 通路的主要效应因子,被其上游 Wts 磷酸化而失活,YAP 的过度表达会造成组织器官的增大,相反 YAP 的失活会造成组织器官萎缩。Hippo 通路中其他因子的突变(如 LATS1)受到抑制能增加 YAP 的活性,导致下游转录因子 cyclinE、DIAP1 等表达增加,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡[9]。本研究同样证实了抑制 LATS1,增加了 YAP 的表达,从而促进了细胞的活力,相反 YAP 受到抑制后,HS27 细胞活力也显著下降。

皮肤中存在多种胶原蛋白,其中 collagen Ⅰ是含量最丰富的胶原蛋白,占其干重的 90% 以上[10]。真皮层 collagen Ⅰ的减少是皮肤皱纹形成的主要原因,同时皮肤创伤修复时紊乱 collagen Ⅰ是形成瘢痕的关键环节[11],提示胶原蛋白的合成对维持组织的完整性发挥着重要作用。研究发现 TGF-β 和其他的细胞因子可促进 collagen Ⅰ mRNA 的翻译和转录[12-13],而 MMPs 可负性调节 collagen Ⅰ的表达[14]。其他研究指出抑制 Smad2/3 的表达可显著下调 collagen Ⅰ合成[15]。本研究发现当抑制 LATS1 时,collagen Ⅰ的合成增加,相反抑制 YAP 时,collagen Ⅰ蛋白表达显著下调,提示 LATS1-YAP 信号通路可调控 collagen Ⅰ的表达,但其机制尚不清楚,需进一步进行研究。

[参考文献]

[1] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing[J]. N Engl J Med, 1999, 341(10), 738-746.

[2] Aarabi S, Longaker MT, Gurtner GC. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment[J]. PLoS Med, 2007, 4(9): e234.

[3] Opalenik SR, Davidson JM. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair[J]. FASEB J, 2005, 19(11): 1561-1563.

[4] Trent JT, Kirsner RS. Wounds and malignancy[J]. Adv Skin Wound Care, 2003, 16(1): 31-34.

[5] Zhao B, Lei QY, Guan KL. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(6): 638-646.

[6] Zhao B, Wei X, Li W, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control[J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2747-2761.

[7] Da CL, Xin Y, Zhao J, et al. Significance and relationship between Yes-associated protein and surviving expression in gastric carcinoma and precancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(32): 4055-4061.

[8] St John MA, Tao W, Fei X, et al. Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction[J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 182-186.

[9] Zhang J, Ji JY, Yu M, et al. YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non cell autonomous component of the Hippo pathway[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(12): 1444-1450.

[10] Takasao N, Tsuji-Naito K, Ishikura S, et al. Cinnamon extract promotes type I collagen biosynthesis via activation of IGF-I signaling in human dermal fibroblasts[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(5): 1193-1200.

[11] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration[J]. Nature, 2008, 453(7193): 314-321.

[12] Honda N, Jinnin M, Kajihara I, et al. TGF-β-mediated downregulation of microRNA-196a contributes to the constitutive upregulated type I collagen expression in scleroderma dermal fibroblasts[J]. J Immunol, 2012, 188(7): 3323-3331.

(下转第 33 页)

用材料的溶血率试验要求。另通过将血管浸提液接触培养细胞,检测血管对体外细胞的毒性,细胞贴壁生长良好,细胞呈棱形或不规则三角形,血管浸提液培养的细胞相对增殖率(RGR)为 351.053 7%(>100),毒性为 0 级,说明血管具有较好的细胞相容性。此外通过将血管浸提液对家兔进行皮内刺激试验,验证得出血管进入体内后没有潜在的刺激性,刺激性方面亦符合临床使用的要求。

人源性小口径血管移植物材料的供应不足使同种异体脱细胞血管材料的应用受到极大的限制,经过脱细胞处理的猪血管来源丰富,且具备较好的生物力学性质,同时具有良好的血液相容性和细胞相容性,通过检测符合生物医用植入物的国家标准,这为小口径血管移植物提供了很好的基质材料来源。

[参考文献]

[1] Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Tranquillo. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro[J]. Circ Res,2006,98(1):25 - 35.

[2] Hong Y, Ye SH, Nieponice A, et al. A small diameter, fibrous vascular conduit generated from a poly(ester urethane)urea and phospholipid polymer blend[J]. Biomaterials,2009,30(13):2457 - 2467.

[3] Conte MS. The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail? [J]. FASEB J,1998,12(1):43 - 45.

[4] Derham C, Yow H, Ingram J, et al. Tissue engineering small-diameter vascular grafts: preparation of a biocompatible porcine ureteric scaffold [J]. Tissue Eng Part A,2008,14(11):1871 - 1882.

[5] 毛志刚,陈朝辉,韩宏光. 人工血管材料生物相容性和血液相容性的研究与分析[J]. 中国组织工程研究,2012,16(16):2981 - 2988.

[6] 罗新锦,吴清玉. 小口径人工血管的研究进展[J]. 中国胸心外科临床杂志,2001,8(3):193 - 196.

[7] Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, et al. Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998,115(3):536 - 546.

[8] Niklason LE, Gao J, Abbott WM, et al. Functional arteries grown in vitro [J]. Science,1999,284(5413):489 - 493.

[9] 孙庆兰,张 华,张西正,等. 血管组织工程支架材料的研究进展[J]. 化工新型材料,2009,37(11):1 - 4.

[10] Turner NJ, Kielty CM, Walker MG, et al. A novel hyaluronan-based biomaterial(Hyaff-11) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts[J]. Biomaterials,2004,25:5955 - 5964.

[11] Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering[J]. Annu Rev Biomed Eng,2001,3:225 - 243.

[12] Vara DS, Salacinski HJ, Kannan RY, et al. Cardiovascular tissue engineering: state of the art[J]. Pathol Biol (Paris),2005,53(10):599 - 612.

[13] Zhu C, Ying D, Mi J, et al. Development of anti-atherosclerotic tissue-engineered blood vessel by A20-regulated endothelial progenitor cells seeding decellularized vascular matrix [J]. Biomaterials, 2008, 29 (17):2628 - 2636.

[14] Zeng W, Wen C, Wu YX, et al. The use of BDNF to enhance the patency rate of small-diameter tissue-engineered blood vessels through stem cell homing mechanisms[J]. Biomaterials,2012,33 (2):473 - 484.

[15] GB/T 528-2009,硫化橡胶或热塑性橡胶拉伸应力应变性能的测定[S].

[16] GB/T 16886.5-2003,医疗器械生物学评价(第 5 部分):体外细胞毒性试验[S].

[17] GB/T14233.2-2005,医用输液、输血、注射器具检验方法(第 2 部):分生物学试验方法[S].

[18] GB/T 16886.10-2005,医疗器械生物学评价(第 10 部分):刺激与迟发型超敏反应试验[S].

[19] Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials[J]. Science, 1994,263(5154):1715 - 1720.

[20] Bader A, Steinhoff G, Strobl K, et al. Engineering of human vascular aortic tis-sue based on a xenogeneic starter matrix[J]. Transplantation, 2000,70(1):7 - 14.

[21] 朱楚洪,应大君,张 伟,等. 生物血管基质材料的抗原表达及力学特性[J]. 生物医学工程学杂志,2002,19(4): 602 - 605.

[22] 刘国锋,杨大平,郭铁芳. 血管组织工程支架材料的研究进展[J]. 哈尔滨医科大学学报,2007,41(3):291 - 293.

[23] Teebken OE, Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg,2002,23(6):475 - 485.

[24] Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Small-diameter arti? cial arteries engineered in vitro[J]. Circ Res,2006,98(1):25 - 35.

[25] Nugent HM, Edelman ER. Tissue engineering therapy for cardiovascular disease[J]. Circ Res,2003,92(10):1068 - 1078.

(编辑:左艳芳)

(上接第 29 页)

[13] Amento EP, Ehsani N, Palmer H, et al. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb,1991,11 (5):1223 - 1230.

[14] Enjoji M, Kotoh K, Iwamoto H, et al. Self-regulation of type I collagen degradation by collagen-induced production of matrix metalloproteinase-1 on cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma cells[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim,2000,36(2):71 - 73.

[15] Cho JW, Il KJ, Lee KS. Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of Smad2/3-dependent signaling pathways: potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids[J]. Int J Mol Med,2013,31(5):1148 - 1152.

(编辑:余汇洋)