

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.04.009
文章编号: 1005-8982 (2021) 04-0049-09

基础研究·论著

长链非编码RNA-ATB对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究

高蜜阳, 张荣明, 熊亮, 申锦帆, 刘畅

(锦州医科大学附属第一医院 烧伤整形科, 辽宁 锦州 121000)

摘要: **目的** 探讨被转化生长因子 β 激活的长链非编码RNA(lncRNA-ATB)对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响,并分析其作用机制。**方法** 检测瘢痕疙瘩和正常皮肤组织中ATB、microRNA-200c(miR-200c)和DNA甲基转移酶DNMT3B的表达水平,并分析其相关性。在成纤维细胞中分别转染sh-ATB、o/e-ATB、miR-200c mimics、miR-200c inhibitors和sh-DNMT3B,采用CCK-8法检测细胞增殖情况;流式细胞分析仪检测细胞凋亡情况;双荧光素酶测定法检测ATB和miR-200c、miR-200c和DNMT3B靶向结合情况;Western blotting和qRT-PCR检测增殖相关分子周期素依赖性激酶6(CDK6)和凋亡相关分子半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)相对表达量。**结果** ATB和DNMT3B在瘢痕疙瘩组织中的表达水平均高于正常皮肤($P < 0.05$),miR-200c在瘢痕疙瘩组织中的表达水平低于正常皮肤($P < 0.05$),同时ATB与miR-200c在瘢痕疙瘩组织中呈负相关($r_s = -3.429, P < 0.05$),miR-200c与DNMT3B在瘢痕疙瘩组织中呈负相关($r_s = -2.011, P < 0.05$)。双荧光素酶结果显示ATB能够靶向结合miR-200c,miR-200c能够靶向结合DNMT3B。在瘢痕疙瘩成纤维细胞中转染sh-ATB或miR-200c mimics后,细胞的增殖能力和增殖相关分子CDK6的表达水平均降低($P < 0.05$),细胞的凋亡率和凋亡相关分子Caspase-3的表达水平均升高($P < 0.05$)。在回复实验中,瘢痕疙瘩成纤维细胞中共转染sh-ATB和miR-200c inhibitors能够逆转单独转染sh-ATB对细胞增殖和凋亡的影响($P > 0.05$),共转染o/e-ATB和miR-200c inhibitors能够进一步增强单独转染o/e-ATB对细胞增殖和凋亡的影响($P < 0.05$);瘢痕疙瘩成纤维细胞中共转染miR-200c inhibitors和sh-DNMT3B能够逆转单独转染miR-200c inhibitors对细胞增殖和凋亡的影响($P < 0.05$),共转染miR-200c mimics和sh-DNMT3B能够进一步增强单独转染miR-200c mimics对细胞增殖和凋亡的影响($P < 0.05$)。**结论** ATB在瘢痕疙瘩组织中高表达,低表达ATB能够通过调控miR-200c/DNMT3B通路,抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖,并促进细胞凋亡。

关键词: 瘢痕疙瘩;成纤维细胞;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号: R751.05

文献标识码: A

Effects of lncRNA-ATB on the proliferation and apoptosis of keloid fibroblasts and its mechanism

Mi-yang Gao, Rong-ming Zhang, Liang Xiong, Jin-fan Shen, Chang Liu

(Department of Burn and Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of long non-coding RNA activated by transforming growth factor- β (lncRNA-ATB) on proliferation and apoptosis of keloid fibroblasts and to analyze its mechanism. **Methods** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression levels of ATB, microRNA-200c (miR-200c) and DNA methyltransferase 3 beta (DNMT3B) in keloids and normal skin tissues, and

收稿日期: 2020-08-22

[通信作者] 张荣明, E-mail: zrm99999@126.com, Tel: 15941657855

the correlation among the three was analyzed. The fibroblasts were transfected with sh-ATB, o/e-ATB, miR-200c mimics, miR-200c inhibitors and sh-DNMT3B. The cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, and the cell apoptosis was detected by flow cytometry. The dual luciferase assay was used to detect the binding of ATB and miR-200c, and that of miR-200c and DNMT3B. The expression levels of proliferation-related molecule cyclin-dependent kinase 6 (CDK-6) and apoptosis-related molecule caspase-3 were detected by Western blotting and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** The expression levels of ATB and DNMT3B in keloid tissues were higher than those in normal skin ($P < 0.05$). The expression level of miR-200c in keloid tissues was lower than that in normal skin ($P < 0.05$). The expression levels of ATB and miR-200c ($r_s = -3.429$), and those of miR-200c and DNMT3B ($r_s = -2.011$) were negatively correlated in keloid tissues ($P < 0.05$). The dual luciferase assay showed that ATB was able to target miR-200c, and that miR-200c was able to target DNMT3B. After transfection of sh-ATB or miR-200c mimics into keloid fibroblasts, the proliferation of cells and the expression of CDK-6 were decreased ($P < 0.05$), while apoptosis rate and the expression of caspase-3 were increased ($P < 0.05$). In the recovery experiment, co-transfection of sh-ATB and miR-200c inhibitors into keloid fibroblasts reversed the effects of single transfection of sh-ATB on cell proliferation and apoptosis ($P > 0.05$). Co-transfection of o/e-ATB and miR-200c inhibitors could further enhance the effects of single transfection of o/e-ATB on cell proliferation and apoptosis ($P < 0.05$). Co-transfection of miR-200c inhibitors and sh-DNMT3B in keloid fibroblasts could reverse the effects of single transfection of miR-200c inhibitors on cell proliferation and apoptosis ($P > 0.05$). Co-transfection of miR-200c mimics and sh-DNMT3B can further enhance the effects of single transfection of miR-200c mimics on cell proliferation and apoptosis ($P < 0.05$). **Conclusions** ATB was highly expressed in keloid tissues, and low expression of ATB could inhibit proliferation and promote apoptosis of fibroblasts by regulating miR-200c/DNMT3B pathway.

Keywords: lncRNA ATB; miR-200c; DNMT3B; keloid; fibroblast; proliferation; apoptosis

瘢痕疙瘩是由于伤口、创伤、烧伤、手术切口或疾病等导致瘢痕形成，主要与成纤维细胞的过度增殖和细胞外基质的大量沉积有关^[1]。瘢痕疙瘩的临床表现主要是高出皮肤的瘢痕组织生长，通常伴有瘙痒和疼痛。有研究显示瘢痕疙瘩的形成与基因调控、炎症因子、细胞因子和免疫因素等密切相关^[2]。由于瘢痕疙瘩的发病机制和调控机制尚不清楚，瘢痕疙瘩的治疗仍未取得突破性进展。长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是非编码RNA的亚类，其长度超过200 nt，且具有比编码RNA更强的组织和细胞特异性。lncRNA在不同的细胞、组织及其不同的发育阶段中表达均不同，并参与各种疾病的发生、发展，同时在细胞分化、增殖、迁移、凋亡和代谢等过程中起着重要的调节作用^[3]。有研究显示大量lncRNAs在瘢痕疙瘩中存在异常表达，其中lncRNA AC073257.2能够调控GLI2基因，参与成纤维细胞的生长、增殖；lncRNA HNF1A-AS1能够调控HNF1A基因，参与瘢痕疙瘩的形成^[4]。有研究显示被转化生长因子 β 激活的长链非编码RNA (lncRNA-ATB) 在肿瘤、外周血管疾病、动脉粥样硬化、骨关节炎、免疫性等疾病中发挥着重要作用^[5-7]。然而ATB在瘢痕疙瘩中的作用及机制尚未完

全阐明。因此本研究采用RT-PCR检测瘢痕疙瘩和正常皮肤组织中ATB的表达水平，并进一步深入探讨ATB调控miR-200c/DNA甲基转移酶DNMT3B通路在瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡中的作用，证实ATB/miR-200c/DNMT3B轴对瘢痕疙瘩形成的影响。

1 材料与方法

1.1 组织标本

选取2017年12月—2018年7月在锦州医科大学附属第一医院烧伤整形科接受瘢痕疙瘩治疗的30例患者。其中，男性19例，女性11例；平均年龄(32.7 ± 10.1)岁；在手术前均未接受药物治疗、放射治疗、化学治疗、激光治疗等。排除肿瘤、免疫性疾病及严重的肝肾功能不全患者。术中切除瘢痕疙瘩和少量周围正常皮肤组织，标本保存于液氮中用于进一步实验。同时分为瘢痕疙瘩组和正常皮肤组，以及瘢痕疙瘩成纤维细胞细胞组与正常成纤维细胞组。患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

DMEM细胞培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司，CCK-8试剂盒购自大连碧云天生物技术有限

公司,磷酸盐缓冲液和胰蛋白酶购自上海思吉生物制品有限公司, RNA 逆转录试剂盒和 Lipofectamine 2000 购自日本 TaKaRa 公司, Trizol Reagent 和 SYBR Green 购自美国 Promega 公司, miRNeasy Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司, TaqMan MicroRNA Assay 试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司, 兔抗人 DNMT3B、周期素依赖性激酶 6 (CDK6)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 和 β -actin 抗体购自美国 Abcam 公司, HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自美国 CST 公司。sh-ATB、sh-DNMT3B、miR-NC、miR-200c mimics 和 miR-200c inhibitors 由中国上海 Genepharma 公司合成。通过 PCR 扩增野生型 (o/e-ATB) 或突变体 (o/e-NC) ATB 片段, 并亚克隆到 pcDNA3.1 载体, pcDNA3.1 载体购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 人瘢痕疙瘩成纤维细胞购自中国科学院上海细胞库, 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基在 37℃、5% 二氧化碳平衡湿度培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验, 采用 Lipofectamine 2000 按试剂盒说明书转染 sh-ATB、o/e-ATB、miR-200c mimics、miR-200c inhibitors 和 sh-DNMT3B, 转染 24 h 后用于进一步实验。同时根据不同转染方式分为: sh-NC 组、sh-ATB 组、o/e-NC 组、o/e-ATB 组、miR-NC 组、miR-200c mimics 组、miR-200c inhibitors 组、共转染 sh-ATB+miR-200c inhibitors 组、共转染 o/e-ATB+miR-200c inhibitors 组、共转染 miR-200c inhibitors+sh-DNMT3B 组、共转染 miR-200c mimics+sh-DNMT3B 组。

1.3.2 qRT-PCR 采用 miRNeasy Mini Kit 提取 miRNA, 使用 TaqMan MicroRNA Assay 试剂盒检测 miR-200c 的相对表达量, 并使用 Applied Biosystem 7500 进行 qRT-PCR, U6 作为内参。采用 Trizol 提取组织和细胞中总 RNA, 使用 NanoDrop 1000 分光光度计测定 RNA 的浓度, 使用 PrimeScript™ qRT-PCR 试剂盒从总 RNA 合成第一链互补 DNA, 并使用 SYBR Green PCR Master Mix 进行 qRT-PCR, 以 β -actin 作为内参, 按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达量分析。

1.3.3 细胞增殖 转染后 24 h 收集各组细胞, 以 2×10^4 个密度接种到 96 孔培养板中, 各组细胞分别

培养 0 d、1 d、2 d 和 3 d 后, 加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 在 37℃ 下再孵育 2 h, 使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度值。

1.3.4 细胞凋亡 转染后 24 h 收集各组细胞, 以 2×10^5 个密度接种到 6 孔培养板中, 以 2×10^4 个密度接种到 96 孔培养板中, 加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l 碘化丙啶染色液 (0.25 mg/ml), 轻轻混匀, 室温避光孵育 20 min, 用流式细胞仪进行检测。

1.3.5 双荧光素酶 将野生型 ATB (ATB-WT)、突变型 ATB (ATB-MUT)、野生型 DNMT3B (DNMT3B-WT) 或突变型 DNMT3B (DNMT3B-MUT) 克隆到 pmirGLO 质粒受体中, 同时将 miR-200c mimics 或 miR-NC 导入 293 细胞中, 共培养 48 h 后采用双荧光素酶受体分析系统测量双荧光素活性。

1.3.6 Western blotting 转染后 24 h 收集各组细胞, 常规提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 使用 10% SDS-PAGE 凝胶分离等量 (50 μ g) 蛋白质样品, 110 V 电泳, 250 mA 电转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 2 h。分别加入 DNMT3B、CDK6、Caspase-3 和 β -actin 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 二抗 37℃ 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 30 min/次, ECL 显影。并使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 β -actin 作为内参, 计算相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用配对 *t* 检验、独立样本 *t* 检验或重复测量设计的方差分析, 进一步的两两比较用 Dunnett-*t* 检验, 相关性分析用 Spearman 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATB 在瘢痕疙瘩组织和瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达

瘢痕疙瘩组与正常皮肤组 ATB 相对表达量分别为 (2.96 ± 1.07) 和 (1.11 ± 0.49), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=8.561$, $P=0.000$), 瘢痕疙瘩组较正常皮肤组高。瘢痕疙瘩成纤维细胞细胞组与正常成纤维细胞组 ATB 相对表达量分别为 (2.37 ± 0.26) 和 (1.07 ± 0.12), 经 *t* 检验, 差异有

统计学意义 ($t=7.814, P=0.001$), 瘢痕疙瘩成纤维细胞细胞组较正常成纤维细胞组高。sh-NC 组与 sh-ATB 组 ATB 的相对表达量分别为 (0.44 ± 0.10) 和 (1.01 ± 0.15), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.476, P=0.005$), sh-ATB 组较 sh-NC 组高。o/e-NC 组与 o/e-ATB 组 ATB 的相对表达量分别为 (1.01 ± 0.06) 和 (1.97 ± 0.21), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=7.686, P=0.002$), o/e-ATB 组较 o/e-NC 组高。

2.2 低表达 ATB 对成纤维细胞增殖和凋亡的影响

sh-ATB 组与 sh-NC 组转染后不同时间点的成纤维细胞 OD450 值比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点间的 OD450 值比较有差异 ($F=180.102, P=0.000$); ②sh-ATB 组与 sh-NC 组的 OD450 值比较有差异 ($F=61.130, P=0.000$), sh-ATB 组较 sh-NC 组低; ③sh-ATB 组与 sh-NC 组的 OD450 值变化趋势比较有差异 ($F=10.612, P=0.000$)。同时 sh-NC 组与 sh-ATB 组 CDK6 的相对表达量分别为 (0.96 ± 0.12) 和 (0.57 ± 0.08), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.678, P=0.010$), sh-ATB 组较 sh-NC 组低 (见图 1)。进一步检测细胞凋亡情况, sh-NC 组与 sh-ATB 组细胞的凋亡率分别为 (6.97 ± 1.43) % 和 (14.00 ± 1.37) %, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=6.142, P=0.004$), sh-ATB 组较 sh-NC 组高 (见图 2)。sh-NC 组与 sh-ATB 组 Caspase-3 的相对表达量分别为 (0.99 ± 0.12) 和 (1.74 ± 0.10), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.839, P=0.004$), sh-ATB 组较 sh-NC 组高 (见图 3)。见表 1。

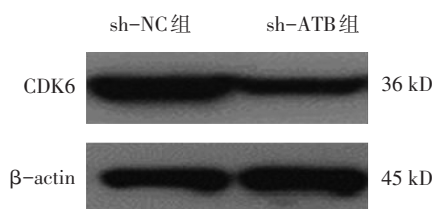


图 1 sh-NC 组与 sh-ATB 组 CDK6 相对表达量比较

2.3 ATB 靶向结合 miR-200c

miR-NC 组 ATB-WT 和 ATB-MUT 双荧光素酶活性分别为 (1.15 ± 0.08) 和 (1.07 ± 0.09), miR-200c mimics 组分别为 (0.47 ± 0.04) 和 ($1.10 \pm$

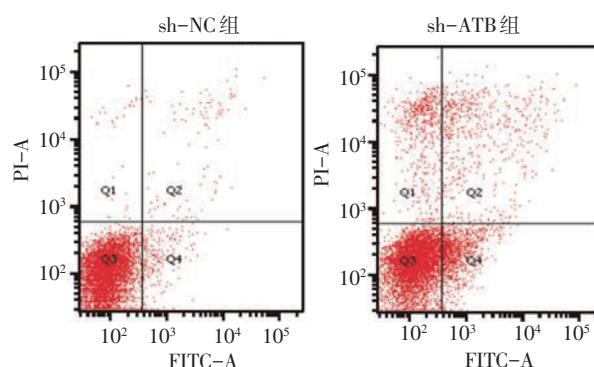


图 2 低表达 ATB 对成纤维细胞凋亡的影响

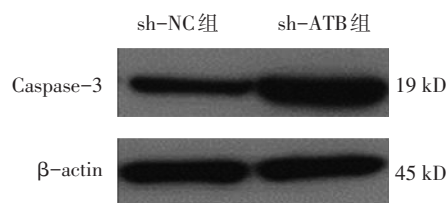


图 3 低表达 ATB 对凋亡相关分子 Caspase-3 表达的影响

表 1 sh-ATB 组与 sh-NC 组转染后不同时间点的成纤维细胞 OD450 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	1 d	2 d	3 d
sh-NC 组	0.57 ± 0.05	0.93 ± 0.15	1.63 ± 0.13	2.05 ± 0.17
sh-ATB 组	0.57 ± 0.02	0.73 ± 0.13	1.15 ± 0.16	1.48 ± 0.13

0.04)。两组 ATB-WT 双荧光素酶活性比较, 差异有统计学意义 ($t=13.083, P=0.000$), 两组 ATB-MUT 双荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($t=0.469, P=0.664$)。o/e-ATB 组 miR-200c 相对表达量为 (0.45 ± 0.06), o/e-NC 组为 (1.02 ± 0.12), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=7.190, P=0.002$), o/e-ATB 组低于 o/e-NC 组。sh-NC 组与 sh-ATB 组 miR-200c 相对表达量分别为 (0.97 ± 0.12) 和 (1.47 ± 0.12), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.977, P=0.008$), sh-ATB 组高于 sh-NC 组。瘢痕疙瘩组与正常皮肤组 miR-200c 相对表达量分别为 (0.66 ± 0.20) 和 (1.17 ± 0.39), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=6.461, P=0.000$), 瘢痕疙瘩组低于正常皮肤组。经 Spearman 相关分析, ATB 与 miR-200c 在瘢痕疙瘩组织中的表达水平呈负相关 ($r_s=-3.429, P=0.000$) (见图 4)。miR-NC 组 miR-200c 相对表达量为 (1.01 ± 0.13), miR-200c mimics 组相对表达量为 (1.54 ± 0.10), miR-200c inhibitors 组为 (0.45 ± 0.08), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=$

76.010, $P=0.000$), 成纤维细胞细胞转染 miR-200c mimics 后能够促进 miR-200c 的表达, 转染 miR-200c inhibitors 后能够抑制 miR-200c 的表达。

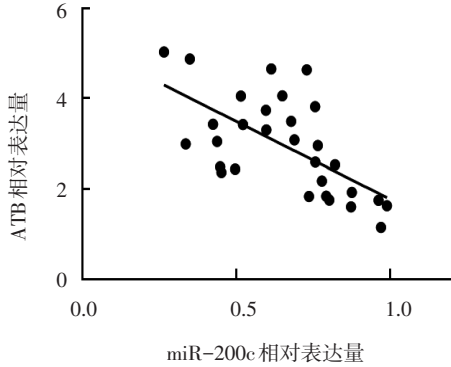


图4 ATB与miR-200c在瘢痕疙瘩组织中表达的相关性

2.4 过表达 miR-200c 对成纤维细胞细胞增殖和凋亡的影响

miR-200c mimics 组和 miR-NC 组转染后不同时间点的成纤维细胞 OD450 值比较, 经重复测量设计的方差分析显示: ①不同时间点间的 OD450 值比较有差异 ($F=331.764, P=0.000$); ②两组的 OD450 值比较有差异 ($F=155.169, P=0.000$), miR-200c mimics 组较 miR-NC 组低; ③两组的 OD450 值变化趋势比较有差异 ($F=17.397, P=0.000$)。miR-NC 组与 miR-200c mimics 组 CDK6 的相对表达量分别为 (1.00 ± 0.16) 和 (0.45 ± 0.07), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.529, P=0.005$), miR-200c mimics 组较 miR-NC 组低 (见图 5)。miR-NC 组与 miR-200c mimics 组细胞凋亡率分别为 (7.40 ± 0.28) % 和 (16.53 ± 1.14) %, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=9.252, P=0.001$) (见图 6), miR-200c mimics 组较 miR-NC 组高。miR-NC 组与 miR-200c mimics 组 Caspase-3 的相对表达量分别为 (1.02 ± 0.22) 和 (1.63 ± 0.09), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.467, P=0.011$) (见图 7), miR-200c mimics 组较 miR-NC 组高。见表 2。

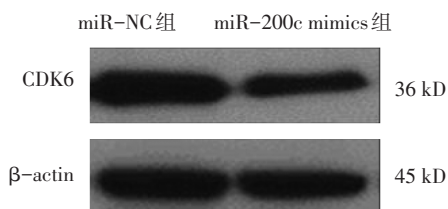


图5 过表达 miR-200c 对增殖相关分子 CDK6 表达的影响

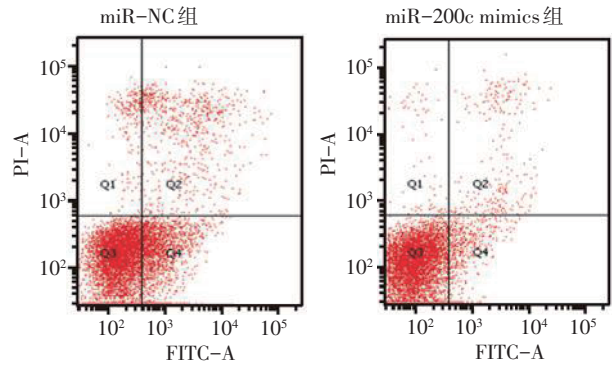


图6 过表达 miR-200c 对成纤维细胞凋亡的影响

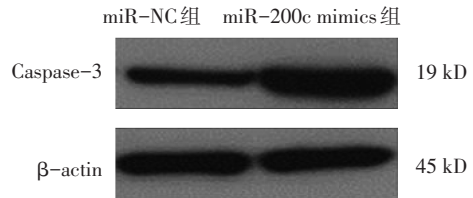


图7 过表达 miR-200c 对凋亡相关分子 Caspase-3 表达的影响

表 2 miR-200c mimics 组和 miR-NC 组转染后不同时间点的成纤维细胞 OD450 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	1 d	2 d	3 d
miR-NC 组	0.56 ± 0.03	1.16 ± 0.07	1.71 ± 0.10	2.22 ± 0.17
miR-200c mimics 组	0.56 ± 0.01	0.65 ± 0.10	1.15 ± 0.12	1.64 ± 0.14

2.5 miR-200c 能够靶向结合 DNMT3B

miR-200c mimics 组 DNMT3B-WT 和 DNMT3B-MUT 荧光素酶活性分别为 (0.58 ± 0.04) 和 (0.97 ± 0.08), miR-NC 组分别为 (0.98 ± 0.07) 和 (1.04 ± 0.07)。两组 DNMT3B-WT 荧光素酶活性比较, 差异有统计学意义 ($t=8.094, P=0.001$), 转染 miR-200c mimics 后双荧光素活性下降。两组 DNMT3B-MUT 荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($t=1.090, P=0.337$)。miR-NC 组与 miR-200c mimics 组 DNMT3B 蛋白相对表达量分别为 (1.02 ± 0.05) 和 (0.51 ± 0.04), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=13.796, P=0.000$), miR-200c mimics 组较 miR-NC 组低 (见图 8)。miR-NC 组与 miR-200c inhibitors 组 DNMT3B 蛋白相对表达量分别为 (1.04 ± 0.07) 和 (1.47 ± 0.11), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.712, P=0.005$), miR-200c inhibitors 组较 miR-NC 组高。瘢痕疙瘩组与正常皮肤组 DNMT3B 相对表达量分别为 (2.28 ± 0.70) 和 (1.03 ± 0.30), 经 t 检

验,差异有统计学意义($t=9.025, P=0.000$),瘢痕疙瘩组较正常皮肤组高。经Spearman分析,miR-200c与DNMT3B在瘢痕疙瘩组织中的表达水平呈负相关($r_s=-2.011, P=0.001$)(见图9),ATB与DNMT3B在瘢痕疙瘩组织中的表达水平呈正相关($r_s=0.829, P=0.002$)(见图10)。

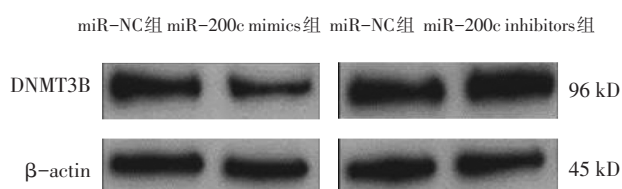


图8 瘢痕疙瘩成纤维细胞转染 miR-NC、miR-200c mimics 和 miR-200c inhibitors 后 DNMT3B 的表达水平

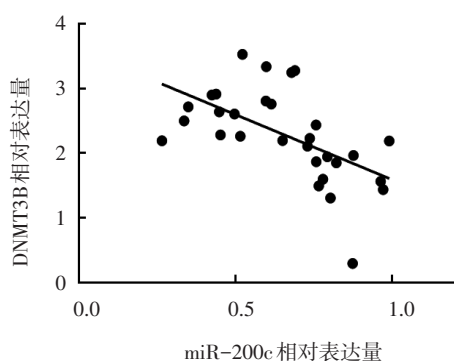


图9 miR-200c 与 DNMT3B 在瘢痕疙瘩组织中表达的相关性

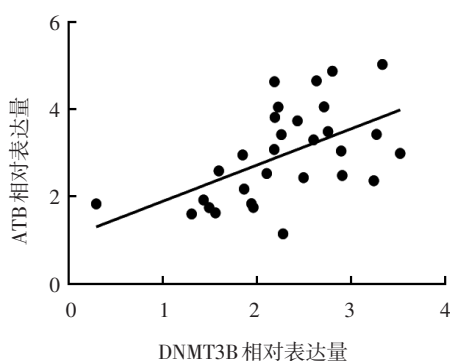


图10 ATB 与 DNMT3B 在瘢痕疙瘩组织中表达的相关性

2.6 ATB 调控 miR-200c/DNMT3B 通路参与成纤维细胞细胞的增殖和凋亡

共转染 sh-ATB+miR-200c inhibitors 组与 sh-NC 组转染后不同时间点的成纤维细胞 OD450 值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间的 OD450 值比较有差异 ($F=192.560, P=0.000$);②两组 OD450 值比较无差异 ($F=4.339,$

$P=0.054$);③两组 OD450 值变化趋势比较无差异 ($F=1.024, P=0.409$)。共转染 sh-ATB+miR-200c inhibitors 组与 sh-ATB 组成纤维细胞 OD450 值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间的 OD450 值比较有差异 ($F=138.352, P=0.000$);②两组 OD450 值比较有差异 ($F=27.567, P=0.000$);③两组 OD450 值变化趋势比较有差异 ($F=4.235, P=0.022$)。sh-NC 组与共转染 sh-ATB+miR-200c inhibitors 组细胞凋亡率分别为 (6.97 ± 1.43)% 和 (7.60 ± 1.35)%,经 t 检验,差异无统计学意义 ($t=0.559, P=0.606$)。见表3。

共转染 o/e-ATB+miR-200c inhibitors 组与 o/e-ATB 组转染后不同时间点的成纤维细胞 OD450 值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间的 OD450 值比较有差异 ($F=271.965, P=0.000$);②两组 OD450 值比较有差异 ($F=42.868, P=0.000$);③两组 OD450 值变化趋势比较有差异 ($F=7.459, P=0.002$)。共转染 o/e-ATB 和 miR-200c inhibitors 组和 o/e-ATB 组细胞凋亡率分别为 (2.37 ± 0.85)% 和 (4.35 ± 0.60)%,经 t 检验,差异有统计学意义 ($t=3.302, P=0.030$),o/e-ATB 组较共转染 o/e-ATB+miR-200c inhibitors 组高。见表4。

共转染 miR-200c inhibitors+sh-DNMT3B 组与 miR-NC 组转染后不同时间点的成纤维细胞 OD450 值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间的 OD450 值比较有差异 ($F=177.080, P=0.000$);②两组 OD450 值比较无差异 ($F=0.002, P=0.964$);③两组 OD450 值变化趋势比较无差异 ($F=2.661, P=0.083$)。共转染 miR-200c inhibitors+sh-DNMT3B 组与 miR-200c inhibitors 组成纤维细胞 OD450 值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间的 OD450 值比较有差异 ($F=171.475, P=0.000$);②两组 OD450 值比较有差异 ($F=45.448, P=0.000$);③两组 OD450 值变化趋势比较有差异 ($F=6.883, P=0.003$)。miR-NC 组与共转染 miR-200c inhibitors+sh-DNMT3B 组细胞凋亡率分别为 (7.40 ± 1.28)% 和 (6.63 ± 0.91)%,经 t 检验,差异无统计学意义 ($t=0.848, P=0.444$)。见表5。

共转染 miR-200c mimics+sh-DNMT3B 组与 miR-200c mimics 组转染后不同时间点的成纤维细胞

OD450值比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间的OD450值比较有差异($F=83.287, P=0.000$);②两组OD450值比较有差异($F=14.702, P=0.002$);③两组OD450值变化趋势比较有差异($F=5.401, P=0.009$)。共转染 miR-200c mimics+sh-DNMT3B 组与 miR-200c mimics 组细

胞凋亡率分别为 $(21.17 \pm 1.41)\%$ 和 $(16.53 \pm 1.14)\%$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.440, P=0.011$), 共转染 miR-200c mimics+sh-DNMT3B 组较 miR-200c mimics 组高。这提示 ATB 能够通过调控 miR-200c/DNMT3B 通路参与成纤维细胞的增殖和凋亡。见表6。

表3 共转染 sh-ATB 和 miR-200c inhibitors 对成纤维细胞细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	1 d	2 d	3 d
sh-NC组	0.57 ± 0.05	0.93 ± 0.15	1.63 ± 0.13	2.06 ± 0.17
sh-ATB组	0.57 ± 0.02	0.73 ± 0.13	1.15 ± 0.15	1.48 ± 0.13
共转染 sh-ATB+miR-200c inhibitors 组	0.59 ± 0.03	0.88 ± 0.06	1.45 ± 0.13	1.90 ± 0.09

表4 共转染 o/e-ATB 和 miR-200c inhibitors 对成纤维细胞细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	1 d	2 d	3 d
o/e-NC组	0.58 ± 0.04	0.98 ± 0.18	1.58 ± 0.10	1.97 ± 0.10
o/e-ATB组	0.56 ± 0.03	1.29 ± 0.19	2.06 ± 0.17	2.44 ± 0.17
共转染 o/e-ATB+miR-200c inhibitors 组	0.57 ± 0.03	1.65 ± 0.16	2.45 ± 0.16	3.25 ± 0.16

表5 共转染 miR-200c inhibitors 和 sh-DNMT3B 对成纤维细胞细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	1 d	2 d	3 d
miR-NC组	0.56 ± 0.03	1.11 ± 0.14	1.71 ± 0.10	2.22 ± 0.17
miR-200c inhibitors 组	0.58 ± 0.01	1.62 ± 0.14	2.31 ± 0.17	2.87 ± 0.27
共转染 miR-200c inhibitors+sh-DNMT3B 组	0.57 ± 0.02	1.20 ± 0.14	1.46 ± 0.13	2.38 ± 0.22

表6 共转染 miR-200c mimics 和 sh-DNMT3B 对成纤维细胞细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	1 d	2 d	3 d
miR-NC组	0.57 ± 0.03	1.16 ± 0.07	1.71 ± 0.10	2.22 ± 0.17
miR-200c mimics 组	0.56 ± 0.01	0.65 ± 0.10	1.15 ± 0.13	1.64 ± 0.14
共转染 miR-200c mimics+sh-DNMT3B 组	0.57 ± 0.02	0.64 ± 0.13	0.89 ± 0.09	1.23 ± 0.14

3 讨论

在瘢痕疙瘩的研究中,越来越多的研究开始转向 lncRNAs 和 miRNAs 对瘢痕疙瘩的调控作用^[8]。目前采用基因芯片证实存在大量异常表达的 lncRNAs 和 miRNAs, 其中有研究显示在瘢痕疙瘩中有 1 731 种 lncRNAs 表达上调, 782 种 lncRNAs 表达下调^[9]。lncRNAs 能够通过多种途径参与疾病的调控, 其中最常见的是 ceRNA 机制, 即 lncRNAs 靶向结合 miRNAs, 进而调控下游分子的表达。miRNAs 是一类非编码的小 RNA, 长度只

有 20 ~ 24 nt, 在生物体基因组中普遍存在。目前研究证实 miRNAs 只占有所有 RNA 的 1.0% 左右, 但能够调控机体 30% ~ 50% 基因表达^[10]。miRNAs 通过靶向调控靶 mRNA, 参与细胞增殖、分化、侵袭、迁移和凋亡等多种细胞生物学行为。随着对 miRNAs 研究的深入, 越来越多的证据表明 miRNAs 参与瘢痕疙瘩的形成^[11]。然而关于 lncRNAs 调控 miRNAs 在瘢痕疙瘩中的研究尚少。

在本研究中采用 qRT-PCR 检测瘢痕疙瘩组织和瘢痕疙瘩成纤维细胞中 ATB 相对表达量, 结果

显示 ATB 在瘢痕疙瘩组织中的表达水平明显高于正常皮肤,同时在瘢痕疙瘩成纤维细胞中 ATB 的表达水平明显高于正常成纤维细胞。这提示 ATB 在瘢痕疙瘩中存在明显异常表达。在进一步的研究中采用 shRNA 干扰技术在成纤维细胞中低表达 ATB,结果显示低表达 ATB 能够明显抑制细胞增殖,并促进细胞凋亡,同时下调增殖相关分子 CDK6,上调凋亡相关分子 Caspase-3 的表达水平。这提示 ATB 参与瘢痕疙瘩的形成。然而其作用机制有待进一步探讨。

有研究显示 miR-152-3p、miR-21、miR-200c 和 miR-203 在瘢痕疙瘩中均存在异常表达,并参与瘢痕疙瘩的形成^[12-14]。同时研究显示 LncRNA HOXA11-AS 能够靶向结合 miR-124-3p 而抑制 Smad5 的表达,参与瘢痕疙瘩细胞外基质的形成^[15]。最近有研究显示,ATB 能够通过调控 miR-200c 参与结直肠癌的发生发展^[16]。在本研究中,双荧光素酶结果显示 ATB 能够靶向结合 miR-200c,同时在成纤维细胞中转染 o/e-ATB 后能够明显抑制 miR-200c 的表达水平,在转染 sh-ATB 后能够明显促进 miR-200c 的表达水平,这说明在成纤维细胞中 ATB 能够靶向抑制 miR-200c。在进一步的人体瘢痕疙瘩组织中也证实 ATB 与 miR-200c 的表达水平呈负相关。

为证实 miR-200c 在成纤维细胞中发挥的作用,采用 miR-200c mimics 过表达 miR-200c 后能够明显抑制细胞增殖,并促进细胞凋亡,同时下调增殖相关分子 CDK6 和上调凋亡相关分子 Caspase-3 的表达水平。这一结果与低表达 ATB 对成纤维细胞的作用相似,更进一步提示 ATB 能够靶向结合 miR-200c 而抑制 miR-200c 的表达水平。

DNA 甲基化是表观遗传学中一种重要的修饰方式,主要是通过 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 来催化和维持起作用^[17]。DNMT 家族成员在生命的各种活动中均发挥重要作用,包括 DNMT1、DNMT2、DNMT3A 和 DNMT3B,后者主要在哺乳动物中发挥作用^[18]。DNMT3B 是从头 DNA 甲基化转移酶,可以不需要甲基化的 DNA 作模板,即可完成非甲基化的 DNA 的甲基化修饰,研究显示 DNMT3B 参与了肿瘤、血管性疾病和免疫性疾病等^[19]。同时也有研究显示 DNMT3B 在瘢痕组

织中的表达水平明显升高^[20]。在本研究中双荧光素酶结果显示 miR-200c 能够靶向结合 DNMT3B,同时在成纤维细胞中转染 miR-200c mimics 后能够明显抑制 DNMT3B 蛋白的表达水平,在转染 miR-200c inhibitors 后能够明显促进 DNMT3B 蛋白的表达。这进一步提示 miR-200c 能够靶向结合 DNMT3B,进而抑制 DNMT3B 的表达。同时 miR-200c 与 DNMT3B 在瘢痕疙瘩组织中的表达水平呈负相关,ATB 与 DNMT3B 在瘢痕疙瘩组织中的表达水平呈正相关,这提示 ATB 可能通过靶向抑制 miR-200c,进而促进 DNMT3B 的表达,最后参与成纤维细胞增殖和凋亡。

在进一步的回复验证试验中,已证实 lncRNA-ATB/miR-200c/DNMT3B 轴在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的作用。结果显示在瘢痕疙瘩成纤维细胞中共转染 sh-ATB 和 miR-200c inhibitors 能够逆转单独转染 sh-ATB 对细胞增殖和凋亡的影响,共转染 o/e-ATB 和 miR-200c inhibitors 能够进一步加强单独转染 o/e-ATB 对细胞增殖和凋亡的影响;瘢痕疙瘩成纤维细胞中共转染 miR-200c inhibitors 和 sh-DNMT3B 能够逆转单独转染 miR-200c inhibitors 对细胞增殖和凋亡的影响,共转染 miR-200c mimics 和 sh-DNMT3B 能够进一步加强单独转染 miR-200c mimics 对细胞增殖和凋亡的影响。这进一步证实 ATB 能够通过调控 miR-200c/DNMT3B 通路参与成纤维细胞增殖和凋亡。

综上所述,ATB 在瘢痕疙瘩组织中高表达,低表达 ATB 能够通过调控 miR-200c/DNMT3B 通路,抑制成纤维细胞增殖,并促进细胞凋亡。lncRNA-ATB/miR-200c/DNMT3B 轴在瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖和凋亡中发挥着重要作用。ATB 可能成为瘢痕疙瘩治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] JFRI A, O'BRIEN E, ALAVI A, et al. Association of hidradenitis suppurativa and keloid formation: a therapeutic challenge[J]. *JAAD Case Rep*, 2019, 5(8): 675-678.
- [2] 荣媛,刘明华,邓朝霞,等. RNA 干扰敲低 β -catenin 的表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖及凋亡的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(14): 2631-2636.
- [3] YUAN C Y, BU W B, LI L, et al. Long non-coding RNA expression profiling in the lesional tissue and derived fibroblasts of keloid[J]. *Postepy Dermatol Alergol*, 2017, 34(6): 587-600.

- [4] HUANG H P, FU S F, LIU D W. Detection and analysis of the hedgehog signaling pathway-related long non-coding RNA (lncRNA) expression profiles in keloid[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 9032-9044.
- [5] TANG F, WANG H L, CHEN E F, et al. lncRNA-ATB promotes TGF-beta-induced glioma cells invasion through NF- κ B and P38/MAPK pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23302-23314.
- [6] ZHU A D, SUN Y Y, MA Q J, et al. lncRNA-ATB promotes viability, migration, and angiogenesis in human microvascular endothelial cells by sponging microRNA-195[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14360-14371.
- [7] DANG X L, LIAN L P, WU D S. The diagnostic value and pathogenetic role of lncRNA-ATB in patients with osteoarthritis [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018, 23: 55-64.
- [8] ZHANG G Y, WU L C, LIAO T, et al. A novel regulatory function for miR-29a in keloid fibrogenesis[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2016, 41(4): 341-345.
- [9] LIANG X B, MA L, LONG X, et al. lncRNA expression profiles and validation in keloid and normal skin tissue[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1829-1838.
- [10] JIAN X P, QU L, WANG Y L, et al. Trichostatin ainduced mir30a5p regulates apoptosis and proliferation of keloid fibroblasts via targeting BCL₂[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 5251-5262.
- [11] KASHIYAMA K, MITSUTAKE N, MATSUSE M, et al. miR-196a downregulation increases the expression of type I and III collagens in keloid fibroblasts[J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(6): 1597-1604.
- [12] WANG R, BAI Z L, WEN X L, et al. MiR-152-3p regulates cell proliferation, invasion and extracellular matrix expression through by targeting FOXF1 in keloid fibroblasts[J]. *Life Sci*, 2019, 234: DOI: org/10.1016/j.lfs.2019.116779.
- [13] SHI K, QIU X, ZHENG W, et al. MiR-203 regulates keloid fibroblast proliferation, invasion, and extracellular matrix expression by targeting EGR₁ and FGF₂[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 1282-1288.
- [14] WU J L, FANG L, CEN Y, et al. MiR-21 regulates keloid formation by downregulating Smad7 via the TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *J Burn Care Res*, 2019, 40(6): 809-817.
- [15] JIN J, ZHAI H F, JIA Z H, et al. Long non-coding RNA HOXA11-AS induces type I collagen synthesis to keloid formation via sponging miR-124-3p and activating Smad5 signaling[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(5): C1001-C1010.
- [16] GAO Z Y, ZHOU H R, WANG Y, et al. Regulatory effects of lncRNA ATB targeting miR-200c on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 121: DOI: 10.1002/jcb.29180.
- [17] PAN X Y, YOU H M, WANG L, et al. Methylation of RCAN1.4 mediated by DNMT1 and DNMT3b enhances hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis through Calcineurin/NFAT3 signaling[J]. *Theranostics*, 2019, 9(15): 4308-4323.
- [18] TAN H K, WU C S, LI J, et al. DNMT3B shapes the mCA landscape and regulates mCG for promoter bivalency in human embryonic stem cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(14): 7460-7475.
- [19] ZHOU Y, CHEN M, O'KEEFE R J, et al. Epigenetic and therapeutic implications of dnmt3b in temporomandibular joint osteoarthritis[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3): 1736-1747.
- [20] 季江, 冷红, 冀胜军, 等. 瘢痕疙瘩及其成纤维细胞p16基因甲基化状态和相关基因表达研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2015, 48(3): 171-174.

(李科 编辑)

本文引用格式: 高蜜阳, 张荣明, 熊亮, 等. 长链非编码RNA-ATB对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(4): 49-57.

Cite this article as: GAO M Y, ZHANG R M, XIONG L, et al. Effects of lncRNA-ATB on the proliferation and apoptosis of keloid fibroblasts and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(4): 49-57.