

# HOXA5对病理性瘢痕成纤维细胞功能的调控机制研究

梁奕敏 周仁鹏 杨怡圆 陈佳琳 王丹茹\*

(上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200025)

**摘要** 该课题旨在研究HOXA5对病理性瘢痕成纤维细胞凋亡和细胞行为的影响, 以及HOXA5对细胞内p53通路活化的调控作用。取患者增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织, 分离培养成纤维细胞。将HOXA5过表达质粒转染细胞, 通过CCK-8检测细胞增殖情况, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, Transwell检测细胞迁移能力, Western blot检测细胞内 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、黏着斑蛋白(vinculin)以及I、III型前胶原肽的蛋白含量, 并构建含成纤维细胞的胶原网架(FPCL)评价细胞收缩能力。进一步通过p53启动子荧光素酶报告基因检测HOXA5对p53通路的激活作用, ChIP PCR检测HOXA5与p53启动子区含ATTA的HOX核心结合序列的结合情况。Western blot检测p53下游靶点p21和MDM2蛋白含量。结果显示, 转染了HOXA5过表达质粒的细胞增殖活性下降, 迁移、收缩能力减弱, 细胞凋亡情况加重, 细胞内 $\alpha$ -SMA、vinculin以及I、III型前胶原肽的蛋白含量减少。细胞内进一步的机制研究发现, HOXA5过表达可以促进p53启动子荧光素酶报告基因的表达, ChIP PCR检测发现, 过表达HOXA5后, p53启动子区富含ATTA的HOX核心结合序列区域结合的HOXA5增多, 并且p53下游靶点p21和MDM2蛋白含量显著增加。综上, 该实验证实了HOXA5可以激活病理性瘢痕成纤维细胞内p53凋亡通路, 并促进细胞凋亡, 抑制细胞的增殖、迁移和收缩能力。

**关键词** HOXA5; p53; 病理性瘢痕; 凋亡

## A Study of HOXA5 Function in Regulating Fibroblasts Activity from Pathological Scars

Liang Yimin, Zhou Renpeng, Yang Yiyuan, Chen Jialin, Wang Danru\*

(Shanghai 9th People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract** The study is aimed to detect the HOXA5 function in regulating the activity of fibroblasts from pathological scars and p53 pathway. Fibroblasts harvest from both hypertrophic scars (HSFb) and keloids (KFb) transfected with HOXA5-overexpressing plasmids, and were then detected for the ability of proliferation, migration and contraction. Apoptosis was also evaluated. Protein contents of  $\alpha$ -SMA, vinculin, Col1A1 and Col3A1 were measured. We further detected the combination of HOXA5 with p53 at the hox core motif. Protein contents of p21 and MDM2, the downstream targets of p53 were also measured. As a result, we demonstrated that HOXA5 promoted the apoptosis of both HSFb and KFb, inhibited their proliferation, migration and contraction. Further study through ChIP PCR demonstrated that HOXA5 transactivated p53 expression by combining ATTA-rich core sequence at the

收稿日期: 2019-06-24

接受日期: 2019-07-05

国家自然科学基金(批准号: 81671923、81501668)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-23271699-5118, E-mail: wangdanru@126.com

Received: June 24, 2019

Accepted: July 5, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81671923, 81501668)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-23271699-5118, E-mail: wangdanru@126.com

网络出版时间: 2019-07-16 17:01:58

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1701.034.html>

promoter site for HOX binding. HOXA5 was also proved to be able to induce the expression of p21 and MDm2. Our results suggest that HOXA5 is able to activate p53 pathway in both HSFb and Kfb, promotes cells apoptosis, and inhibits their proliferation, migration and contraction.

**Keywords** HOXA5; p53; pathologic scars; apoptosis

全世界每年都有数以百万计的患者因为创伤或烧伤而导致瘢痕增生,造成组织器官畸形和功能障碍。这给创伤修复和组织再生领域带来了极为严峻的挑战<sup>[1-2]</sup>。目前对于瘢痕病理学机制的研究大多表明,病理性瘢痕(即过度增生的瘢痕,包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩)的形成源自于异常的创面愈合过程,这一过程主要是由于细胞内凋亡信号失调<sup>[3-4]</sup>、细胞凋亡受阻,造成成纤维细胞和细胞外基质蛋白大量堆积、胶原的合成与降解失衡,最终导致病理性的瘢痕愈合<sup>[3,5]</sup>。研究发现,包括B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)、Fas基因(fas cell surface death receptor, *Fas*)、smad家族3基因(smader family member 3, *smad3*)和p53在内的一些凋亡相关基因和信号通路参与了病理性瘢痕的形成过程,而其中p53凋亡刺激蛋白的失活是导致瘢痕增生以及瘢痕疙瘩形成的一个重要原因<sup>[6-8]</sup>。然而如何靶向性地调控p53通路进而抑制瘢痕的形成,目前尚不明确。

本课题组<sup>[9]</sup>的前期研究发现,同源异形框基因A5(homeobox A5, HOXA5)能够显著促进皮肤角质形成细胞的凋亡,并且抑制体外构建的三维表皮形态发生。既往研究在乳腺癌细胞中已证实,HOXA5通过激活p53通路来诱导细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。另外值得注意的是,HOXA5具有潜在的抑制瘢痕形成的作用。如Stelnicki等<sup>[12]</sup>发现,HOXA5在胚胎皮肤发育过程中被显著激活,尤其在发育的早中期特异性地在真皮内激活,而早中期胚胎的皮肤创面具有无瘢痕愈合的特征。这提示,HOXA5可能调控了胚胎创面的无瘢痕修复。

此外,本课题组<sup>[13]</sup>另一项研究还发现,HOXA5在扩张后新生的皮肤内表达显著激活,提示了HOXA5对皮肤再生具有重要意义。需要指出的是,皮肤无瘢痕的修复愈合也是皮肤再生的一种形式,这为寻找创伤修复的调控靶点提供了一个新思路。

因此,本研究旨在阐明HOXA5对瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts, Kfb)和增生性瘢痕成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblasts, HSFb)的细胞凋亡和细胞行为的影响,以及对细胞内p53基因转录激

活和p53蛋白通路活化的调控作用,明确HOXA5是否能够通过靶向性激活p53通路,抑制瘢痕增殖,实现无瘢痕的创面修复。

## 1 材料和方法

### 1.1 增生性瘢痕和瘢痕疙瘩成纤维细胞培养

经我院伦理委员会批准,从增生性瘢痕和瘢痕疙瘩患者身上获得新鲜瘢痕组织,分离培养增生性瘢痕成纤维细胞(HSFb)和瘢痕疙瘩成纤维细胞(Kfb)。患者均为健康人士,无肿瘤、慢性疾病史。成纤维细胞的分离培养方法在之前的文章中已有描述<sup>[14]</sup>。简单来说,将获得的瘢痕组织切成1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm大小,用含有1%盘尼西林、硫酸链霉素和两性霉素B的PBS溶液洗涤,然后用混合I型胶原酶(0.5 mg/mL)和胰酶(0.2 mg/mL)溶液在37 °C孵育6 h。原代细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液(Gibco公司)在37 °C、5% CO<sub>2</sub>环境下培养。

### 1.2 HOXA5慢病毒转染HSFb和Kfb

野生型cDNA购自上海吉满生物科技公司。设计扩增HOXA5引物为F: 5'-GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG AGC TCT TAT TTT GTA AAC-3', R: 5'-TCA CCA TGG TGG CGA CCG GGG GAC GGA AGG CCC CTC CTG-3'。通过限制内切酶(*AgeI*)将引物亚克隆至pGC-FU慢病毒载体。使用慢病毒表达系统(上海吉满生物科技公司)包装重组病毒。用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养的HSFb和Kfb接种于6孔板(BD Falcon公司)中,24 h后转染HOXA5过表达载体和对照载体。详细方法可见课题组之前的文献<sup>[9]</sup>。

### 1.3 CCK-8检测细胞增殖情况

细胞转染至96孔板(BD Falcon公司),以2×10<sup>3</sup>的密度接种于每孔中,加入含有10% PBS和抗生素的100 mL DMEM培养液。每组8个重复。孵育24 h后每孔加入10 μL的CCK-8(Dojindo公司),37 °C再孵育3 h,在450 nm处检测吸光度表示细胞活性。

### 1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

HSFb和Kfb细胞用75%乙醇固定,以含50 μg/mL

碘化丙啶(PI)和50  $\mu\text{g/mL}$  Rnase I的PBS溶液固定总DNA 30min(37  $^{\circ}\text{C}$ 环境),然后用流式细胞仪(BD Calibu公司)检测,上机量为5 000~10 000个细胞。采用ModFit LT细胞分析软件分析不同的细胞周期(Verity Software House公司)。

### 1.5 Transwell小室检测HSFb和Kfb细胞的迁移能力

将进入对数生长期的HSFb和Kfb细胞以0.25%胰酶消化处理后,以无血清DMEM培养基重悬细胞沉淀,接种 $1 \times 10^4$ 个细胞于Matrigel包被的Transwell小室中,小室外加500  $\mu\text{L}$ 含10% FBS的DMEM培养基培养24 h。然后固定小室(甲醇:冰乙酸=3:1) 10 min,苏木精染色。显微镜下观察穿过Matrigel至滤膜反面的细胞,100倍光学显微镜下计数10个视野的细胞,取均值。

### 1.6 构建含成纤维细胞的胶原网架(FPCL)检测HSFb和Kfb细胞收缩能力

将HSFb和Kfb以 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 浓度加入I型鼠尾胶原,混合后加入3  $\mu\text{m}$ 多聚碳酸酯膜小孔(Millipore公司),使胶原在37  $^{\circ}\text{C}$ 环境凝固0.5 h,然后加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,放入37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱内培养48 h。观察胶原收缩情况。

### 1.7 Western blot检测

HSFb和Kfb细胞裂解后离心得上清。以25  $\mu\text{g}$ 的蛋白上样量用10% SDS-PAGE胶进行蛋白电泳,并转至PVDF膜。室温封闭后,一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。一抗如下:兔抗鼠抗体 $\alpha$ -SMA(1:500, Abcam)、兔抗鼠抗体vinculin(1:500, Abcam)、羊抗兔抗体Col1A1(1:500, Abcam)、羊抗兔抗体Col3A1(1:500, Abcam)、兔抗鼠抗体p21(1:500, Abcam)和兔抗鼠抗体MDm2(1:500, Abcam)。PBST洗3次,每次10 min,再相应二抗室温孵育1 h, PBST清洗后, ECL发光试剂盒进行蛋白半定量检测。

### 1.8 Real-time PCR检测

总RNA用Trizol提取后,取500 ng RNA进行反转录得到cDNA,并用荧光染料检测HSFb和Kfb细胞中 $\alpha$ -SMA、vinculin、Col1A1和Col3A1的相应表达。引物序列: GAPDH上游5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3',下游5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3';  $\alpha$ -SMA上游5'-AGG TAA CGA GTC AGA GCT TTG GC-3',下游5'-CTC TCT GTC CAC CTT CCA GCA G-3'; vinculin上游5'-AGA GAC TGT TCA

GAC CAC TGA G-3',下游5'-CAT TGA GTT CAC CAA CAT CAC-3'; Col1A1上游5'-AAG AGC TCG TGG GAA AGC CTG GAT GG-3',下游5'-AAA GAT CTT TTG GGA CTT ACT GTC TTC GT-3'; Col3A1上游5'-CCC AGA ACA TCA CAT ATC AC-3',下游5'-CAA GAG GAA CAC ATA TGG AG-3'。

### 1.9 荧光素酶活性检测

HOXA5过表达质粒和p53启动子荧光素酶报告基因质粒均购于上海吉满生物科技公司。转染前24 h,将Kfb或HSFb接种于24孔板。每种质粒转染复孔3孔。利用Lipo2000转染试剂分别将HOXA5过表达质粒和p53启动子荧光素酶报告基因质粒以及对照空载质粒共同导入不同组细胞(Kfb或HSFb)中,24 h后收集细胞,按荧光素酶报告分析系统说明,用Promega公司荧光素酶活性检测试剂盒检测荧光素酶活力。

### 1.10 染色质免疫共沉淀PCR (ChIP PCR)

收集HOXA5过表达和对照空载的Kfb或HSFb,按ChIP试剂盒(Millipore公司)说明书,加入甲醛固定,超声片10 s/次,5次片段化后,离心去除沉淀;处理后分别加入磁珠悬液和HOXA5抗体或正常IgG抗体(阴性对照),4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。将免疫共沉淀样品(IP)和Input样品一同用DNA纯化试剂盒抽提,采用实时定量PCR对DNA的富集情况进行检测,以Input作为参照计算百分比。

### 1.11 统计学分析

所有数据的收集与分析采用SPSS 12.0版本。所有实验重复3次,结果以均数 $\pm$ 标准差的方式表达,并用 $t$ 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 视为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 HOXA5抑制HSFb和Kfb的增殖

利用酶消化法分离增生性瘢痕组织(HSFb)和瘢痕疙瘩成纤维细胞(Kfb),通过CCK-8测定细胞增殖情况,各组结果以 $D$ 值均值表示。

利用CCK-8检测发现,在HSFb和Kfb细胞中过表达HOXA5可以抑制HSFb和Kfb细胞的细胞增殖活性(图1)。在HSFb细胞中过表达HOXA5后,与空载体vector组相比,HOXA5组在第3天的细胞活性显著性降低(图1A)。在Kfb细胞中过表达HOXA5后,与空载体vector组相比,HOXA5组在第3天和第5天的细胞活性显著性降低(图1B)。



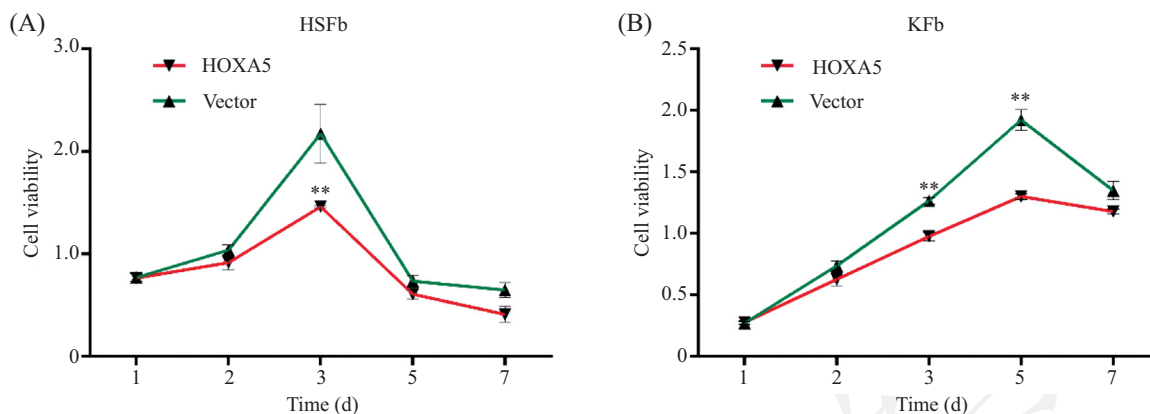
## 2.2 HOXA5促进HSFb和KFb凋亡

在HSFb和KFb细胞中过表达HOXA5后, 利用流式细胞仪检测分析发现, 与Lenti-vector组相比,

Lenti-HOXA5组细胞的凋亡显著性增加(图2)。

## 2.3 HOXA5降低HSFb和KFb细胞的迁移能力

在HSFb和KFb细胞中过表达HOXA5后, 利用

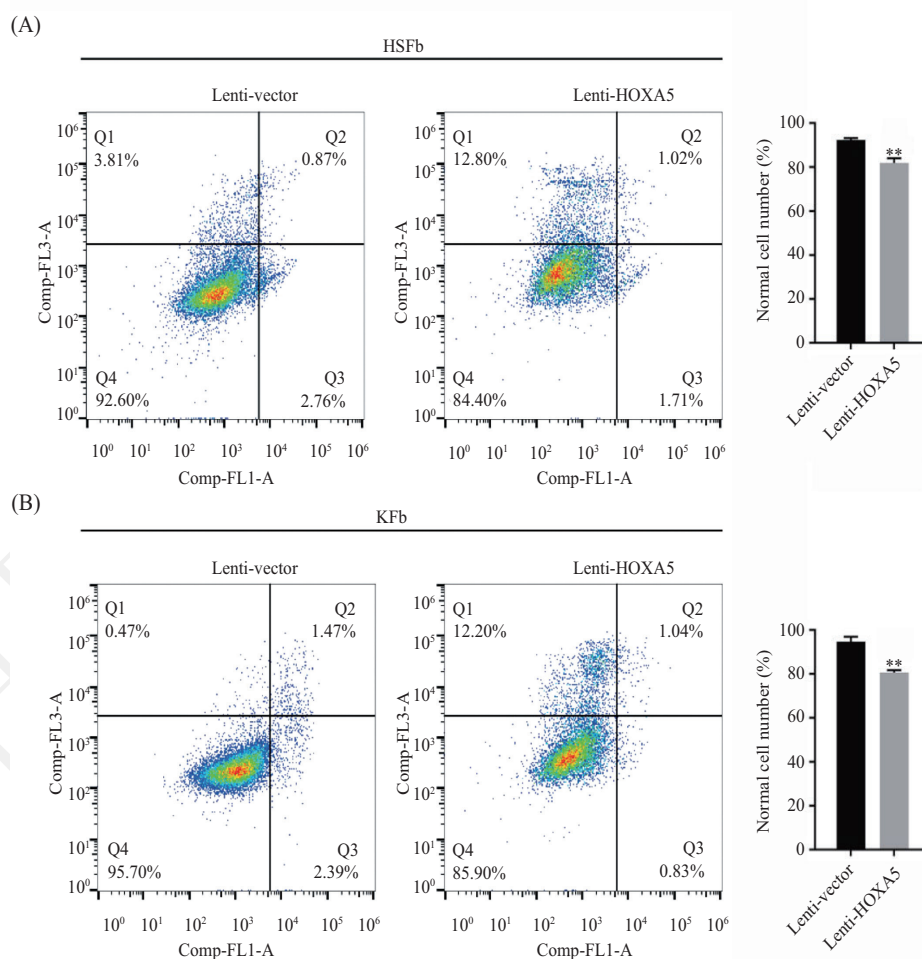


A、B: HOXA5过表达降低HSFb和KFb细胞的增殖能力。 \*\* $P < 0.01$ , HOXA5过表达组与对照组相比。

A,B: HOXA5 overexpression inhibits the proliferation of both HSFb and KFb. \*\* $P < 0.01$  compared with the vector group.

图1 HOXA5抑制HSFb和KFb细胞的增殖

Fig.1 HOXA5 inhibits proliferation of both HSFb and KFb



A、B: HOXA5过表达促进HSFb和KFb细胞的凋亡。 \*\* $P < 0.01$ , HOXA5过表达组与对照组相比。

A,B: HOXA5 overexpression promotes the apoptosis of both HSFb and KFb. \*\* $P < 0.01$  compared with the vector group.

图2 HOXA5促进HSFb和KFb细胞的凋亡

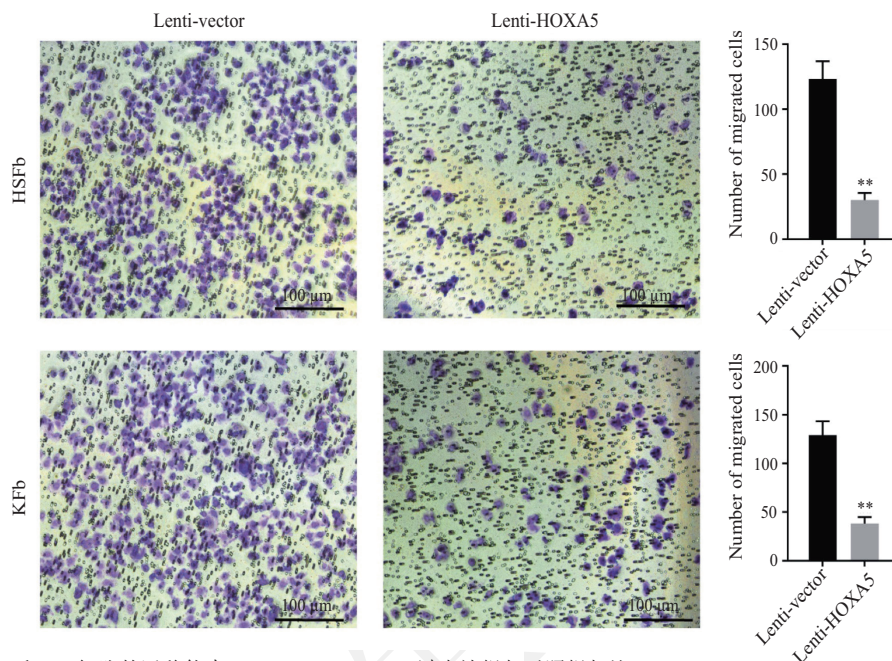
Fig.2 HOXA5 promotes apoptosis of both HSFb and KFb

Transwell检测分析发现,与Lenti-vector组相比,Lenti-HOXA5组细胞的迁移能力显著性降低(图3)。

## 2.4 明确HOXA5促进成纤维细胞的收缩

通过构建含成纤维细胞的胶原网架(FPCL)评价细胞收缩能力。利用凝胶检测分析发现,对

于HSFb细胞,与Lenti-vector组( $59.36 \pm 5.37$ )%相比,Lenti-HOXA5组( $84.70 \pm 2.84$ )%细胞的收缩能力显著性降低( $P=0.005\ 2$ );对于Kfb细胞,与Lenti-vector组( $53.20 \pm 2.66$ )%相比,Lenti-HOXA5组( $73.36 \pm 2.81$ )%细胞的收缩能力显著性降低( $P=0.000\ 85$ )(图4)。

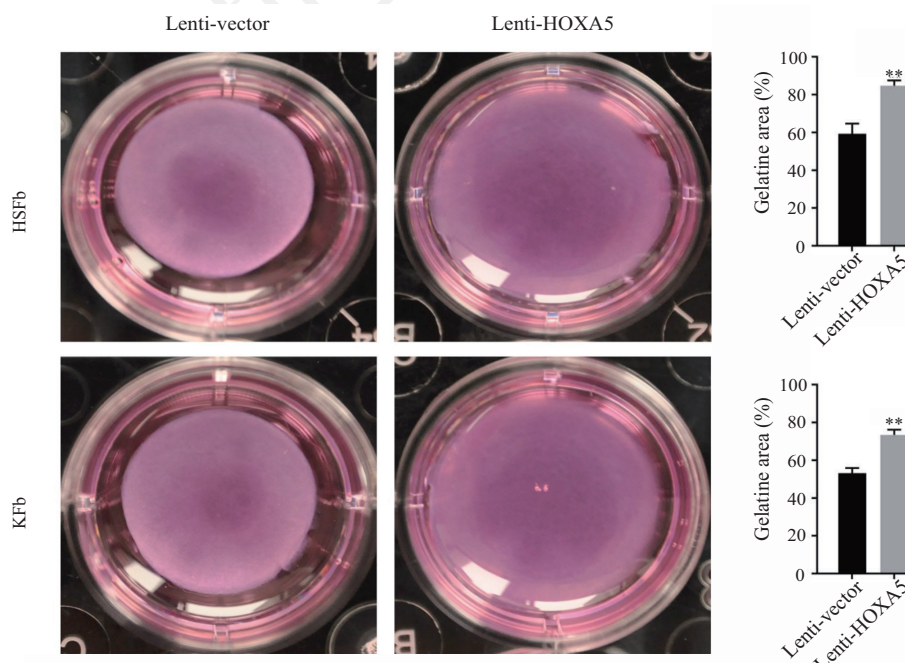


HOXA5过表达降低HSFb和Kfb细胞的迁移能力。 $**P<0.01$ , HOXA5过表达组与对照组相比。

HOXA5 overexpression impairs the migration ability of both HSFb and Kfb.  $**P<0.01$  compared with the vector group.

图3 HOXA5对HSFb和Kfb细胞迁移能力的影响

Fig.3 HOXA5 inhibits migration of both HSFb and Kfb



HOXA5过表达降低HSFb和Kfb细胞的收缩能力。 $**P<0.01$ , HOXA5过表达组与对照组相比。

HOXA5 overexpression impairs the contraction ability of both HSFb and Kfb.  $**P<0.01$  compared with the vector group.

图4 HOXA5显著降低HSFb和Kfb细胞的收缩能力

Fig.4 HOXA5 inhibits contraction of both HSFb and Kfb

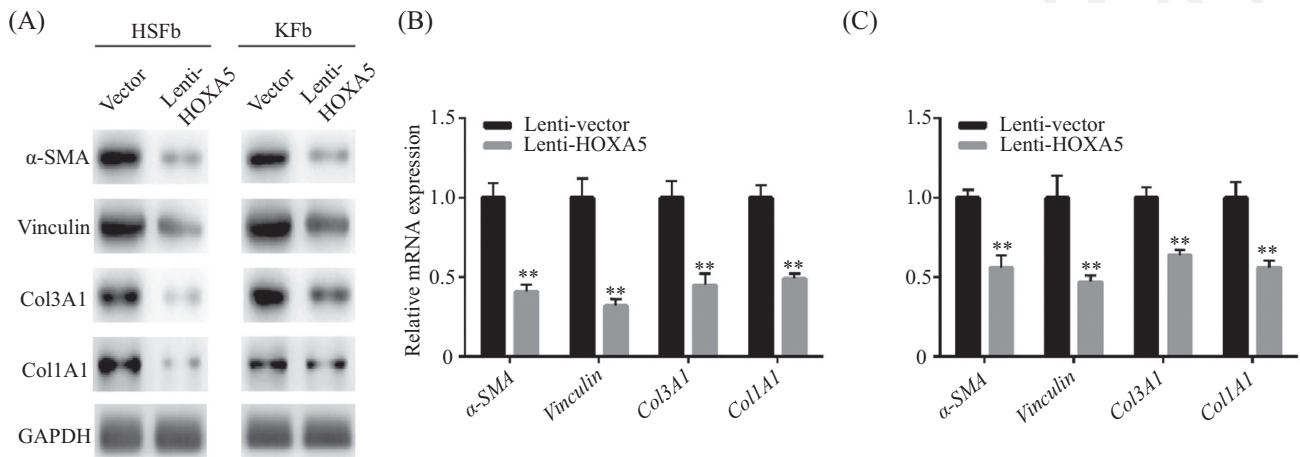
## 2.5 明确HOXA5对HSFb和KFb细胞中相关基因的表达调控

利用Western blot检测发现, 在HSFb和KFb细胞中, 与vector组相比, Lenti-HOXA5组中 $\alpha$ -SMA、黏着斑蛋白vinculin含量, 以及I、III型前胶原肽的蛋白表达降低(图5A)。同时, 利用Real-time PCR检测发现, 在HSFb和KFb细胞中, 与vector组相比, Lenti-HOXA5组中 $\alpha$ -SMA、黏着斑蛋白vinculin含量以及I、

III型前胶原肽的mRNA表达降低(图5B和图5C)。

## 2.6 *p53*启动子荧光素酶报告基因检测HOXA5对*p53*通路的激活作用

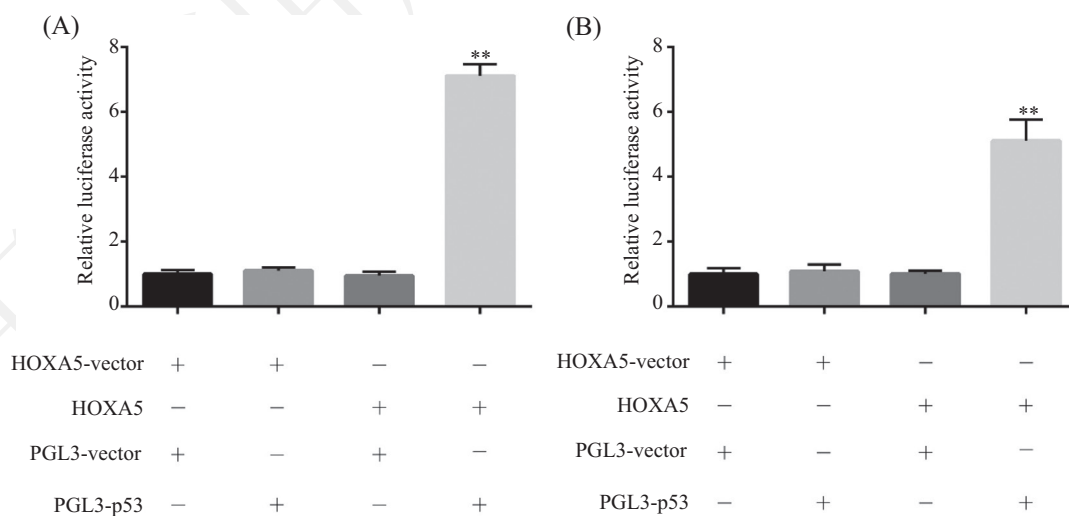
将HOXA5过表达质粒和*p53*启动子(转录起始位点上游2 Kb)荧光素酶报告基因质粒共同转染到HSFb和KFb细胞中, 检测荧光素酶活性, 发现在HSFb(图6A)和KFb(图6B)细胞中, HOXA5过表达可以促进*p53*启动子荧光素酶报告基因的表达。



A: Western blot显示, 在HSFb和KFb细胞中,  $\alpha$ -SMA、vinculin以及I、III型前胶原肽的蛋白表达降低; B、C: Real-time PCR显示了这四个指标在RNA水平的降低。\*\* $P < 0.01$ , HOXA5过表达组与对照组相比。

A: Western blot shows HOXA5 overexpression decreases the protein contents of  $\alpha$ -SMA, vinculin, Col1A1 and Col3A1 in both HSFb and KFb; B,C: HOXA5 overexpression also decreases the RNA expression of  $\alpha$ -SMA, vinculin, Col1A1 and Col3A1. \*\* $P < 0.01$  compared with the vector group.

图5 HOXA5抑制HSFb和KFb内 $\alpha$ -SMA、vinculin、Col1A1 and Col3A1基因的表达  
Fig.5 HOXA5 downregulates  $\alpha$ -SMA, vinculin, Col1A1 and Col3A1 in both HSFb and KFb



A: HSFb细胞中, HOXA5过表达促进*p53*启动子荧光素酶报告基因的表达; B: KFb细胞中, HOXA5同样促进*p53*启动子荧光素酶报告基因的表达。\*\* $P < 0.01$ , HOXA5过表达组与对照组相比。

A: HOXA5 overexpression promotes the activity of *p53* promoter luciferase reporter gene in HSFb; B: HOXA5 overexpression promotes the activity of *p53* promoter luciferase reporter gene in KFb. \*\* $P < 0.01$  compared with the vector group.

图6 *p53*启动子荧光素酶报告基因活性检测  
Fig.6 Detection of *p53* promoter luciferase reporter gene activity

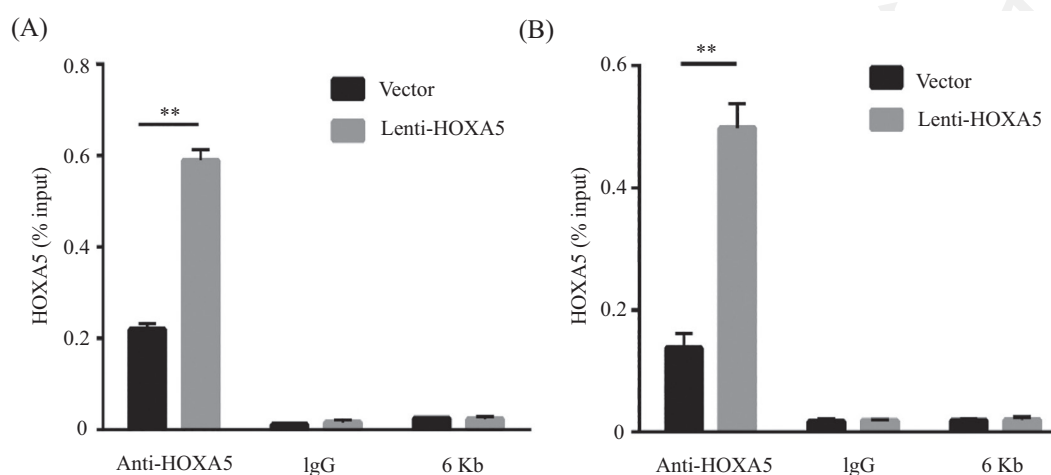
## 2.7 ChIP PCR检测HOXA5和p53启动子区含ATTA的HOX核心结合序列结合

前期荧光素酶报告基因检测发现, HOXA5可以促进p53启动子区荧光素酶报告基因的表达, 项目组进一步利用ChIP PCR检测发现, 在HSFb(图7A)和KFb(图7B)细胞中, HOXA5与p53启动子区富含ATTA的HOX核心结合序列结合; 过表达HOXA5后, p53启动子区富含ATTA的HOX核心结合序列区域结

合的HOXA5增多。故推测, HOXA5通过与p53启动子区富含ATTA的HOX核心结合序列结合调控p53的表达。

## 2.8 HOXA5调控p53核心蛋白及其下游靶点p21和MDm2蛋白的表达

利用Western blot检测发现, 在HSFb和KFb细胞(图8)中过表达HOXA5可以促进p53的表达以及p53下游靶基因p21和MDm2的表达。

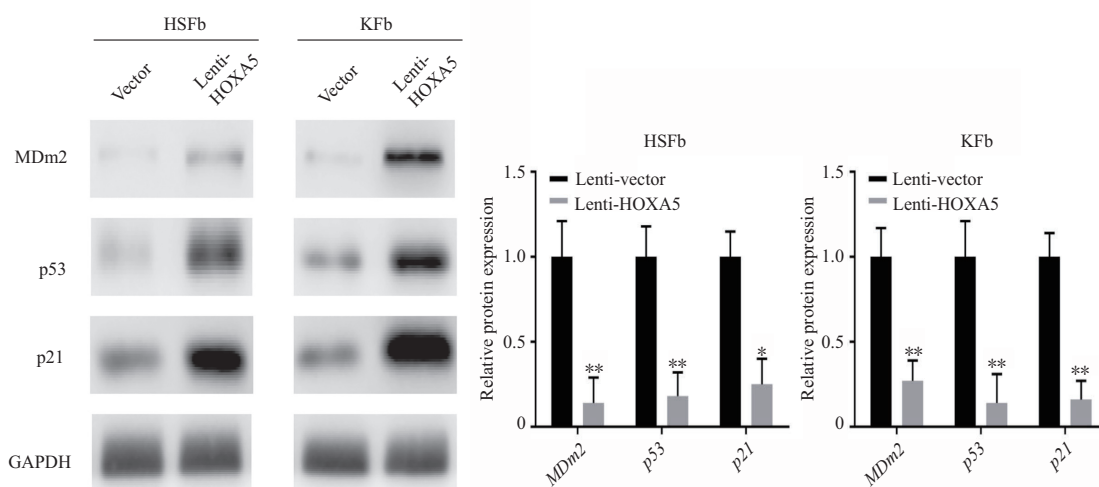


A: HSFb细胞中, 过表达HOXA5后, p53启动子区富含ATTA的HOX核心结合序列区域结合的HOXA5增多; B: KFb细胞中, HOXA5也能与p53启动子区富含ATTA的HOX核心结合序列区域结合。 \*\* $P < 0.01$ , HOXA5过表达组与对照组相比。

A: in HSFb, HOXA5 overexpression enhances the HOXA5 combination with p53 promoter at the ATTA-rich hox core motif; B: in KFb, HOXA5 overexpression also enhances the combination of HOXA5 with p53 promoter at this hox core motif. \*\* $P < 0.01$  compared with the vector group.

图7 ChIP PCR检测HOXA5与p53启动子区结合

Fig.7 ChIP PCR detection for the combination of HOXA5 with p53 promoter at the hox core motif



HSFb细胞和KFb细胞中, HOXA5促进p53下游靶点p21和MDm2表达。 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , HOXA5过表达组与对照组相比。

HOXA5 overexpression increases the protein contents of both p21 and MDm2, the downstream targets of p53. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the vector group.

图8 HOXA5调控p53核心蛋白及其下游靶基因p21和MDm2的表达

Fig.8 HOXA5 increases the protein contents of both p21 and MDm2, the downstream targets of p53



### 3 讨论

本研究发现, HOXA5可以促进KfB和HSFb细胞凋亡,抑制细胞的增殖、迁移和收缩能力。而瘢痕成纤维细胞的这一功能,是其产生大量胶原和细胞外基质、造成瘢痕过度增生的重要因素。研究还证实, HOXA5可以抑制瘢痕细胞内与瘢痕病理性过度增生密切相关的 $\alpha$ -SMA、黏着斑蛋白vinculin以及I、III型前胶原肽的蛋白表达。进一步研究揭示了HOXA5可以和KfB和HSFb细胞内p53启动子区含ATTA的HOX核心结合序列结合,调控p53表达,并且进一步激活p53下游靶点p21和MDm2蛋白的表达,意味着HOXA5可以激活瘢痕细胞内p53通路,从而产生抑制瘢痕增生的效应。而这一机制可能是HOXA5促进瘢痕细胞凋亡的重要机制。

HOXA5来源于同源异形盒基因(homeobox, HOX)家族,该家族在进化上高度保守,是调控胚胎发育和细胞分化的主要基因,并且也在肿瘤发生发展中起到重要作用<sup>[15]</sup>。研究发现,在许多肿瘤组织和细胞中,HOXA5都发生了甲基化而导致基因沉默;并且HOXA5具有促进肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[16-18]</sup>。而瘢痕疙瘩的生长模式类似于良性增生的肿瘤,其生长范围往往超过原始区域,向周围皮肤组织浸润<sup>[19]</sup>。但关于HOXA5在瘢痕细胞内的作用鲜有文献报道。

p53凋亡刺激蛋白是细胞凋亡的重要调控因子,p53的失活是瘢痕增生和瘢痕疙瘩形成的重要原因<sup>[20-21]</sup>。已有研究发现,HOXA5-p53信号通路抑制与肿瘤发生密切相关。在乳腺癌细胞内,HOXA5可以通过激活p53通路来诱导癌细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。HOXA5和p53联合应用可以抑制肺癌细胞的增殖和浸润<sup>[22]</sup>。因而本课题组推测,HOXA5-p53通路可能成为调控病理性瘢痕凋亡的一个重要通路,并通过研究证实了这一论证,为病理性瘢痕的临床治疗提供了一个潜在有效的靶点。一些HOXA5的诱导激活剂,如全反式维甲酸(atRA)、9-顺式维甲酸(9cRA)等,可能成为治疗病理性瘢痕的有效药物<sup>[23-24]</sup>。本课题组也将对此开展进一步的研究。

p21和MDm2都是p53调控网络中的下游基因。p21作为细胞周期调控因子,在正常细胞周期调控系统中可抑制CDK或Cyclin-CDK复合物的活性,使细胞停滞在G<sub>1</sub>期,从而抑制DNA复制,最终表现为负调控细胞生长<sup>[25]</sup>。有研究发现,在加入去炎松和5-Fu的瘢痕疙瘩成纤维细胞中,p53和p21被激活,细胞周

期进展受阻<sup>[26]</sup>。另有研究证实,在被诱导凋亡的增生性瘢痕成纤维细胞内,MEK、p-ERK和p21表达升高<sup>[27]</sup>,表明p21与瘢痕细胞凋亡密切相关。MDm2作为p53的重要调节因子,可以与野生型p53蛋白酸性活化区结合,形成一个负反馈环。p53在转录水平上激活MDm2,而MDm2的过高表达反过来又会降低p53的水平<sup>[28]</sup>。关于MDm2的研究目前较多地集中在其与肿瘤发生发展的联系,尚无MDm2在瘢痕领域的研究<sup>[29-30]</sup>。本实验发现了MDm2的激活表达,证实了p53通路的激活。而关于MDm2在瘢痕衍化发展中的作用,我们将会开展进一步的研究。

增生性瘢痕与瘢痕疙瘩虽然都属于过度增生的瘢痕,都由伤口愈合异常引起,并以皮肤纤维化病理性过度增生为特征,但两者在发病机制、外观形态上不完全相同<sup>[31-32]</sup>。本课题组分别获取这两类瘢痕组织的成纤维细胞进行了研究,都发现了HOXA5和p53通路在细胞内的激活表达,表明这一通路可能是病理性瘢痕形成的一个共同的通路。但研究过程中也发现了一些差异性,这将在今后的实验中进一步比较论证。

综上所述,本实验证实了HOXA5可以激活病理性瘢痕成纤维细胞内p53凋亡通路,并促进细胞凋亡,抑制细胞的增殖、迁移和收缩能力。本研究为病理性瘢痕的临床治疗提供了一个新的靶点。

### 参考文献 (References)

- 1 Heng MC. Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. *Int J Dermatol* 2011; 50(9): 1058-66.
- 2 Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276(5309): 75-81.
- 3 Shih B, Garside E, McGrouther DA, Bayat A. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair Regen* 2010; 18(2): 139-53.
- 4 Butler PD, Longaker MT, Yang GP. Current progress in keloid research and treatment. *J Am Coll Surg* 2008; 206(4): 731-41.
- 5 Deitch EA, Wheelahan TM, Rose MP, Clothier J, Cotter J. Hypertrophic burn scars: analysis of variables. *J Trauma* 1983; 23(10): 895-8.
- 6 De Felice B, Garbi C, Santoriello M, Santillo A, Wilson RR. Differential apoptosis markers in human keloids and hypertrophic scars fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2009; 327(1-2): 191-201.
- 7 Teofoli P, Barduagni S, Ribuffo M, Campanella A, De Pita O, Puddu P. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars. *J Dermatol Sci* 1999; 22(1): 31-7.
- 8 Wassermann RJ, Polo M, Smith P, Wang X, Ko F, Robson MC. Differential production of apoptosis-modulating proteins in patients with hypertrophic burn scar. *J Surg Res* 1998; 75(1):



- 74-80.
- 9 Liang Y, Xia L, Du Z, Sheng L, Chen H, Chen G, *et al.* HOXA5 inhibits keratinocytes growth and epidermal formation in organotypic cultures in vitro and in vivo. *J Dermatol Sci* 2012; 66(3): 197-206.
- 10 Gendronneau G, Lemieux M, Morneau M, Paradis J, Tetu B, Frenette N, *et al.* Influence of Hoxa5 on p53 tumorigenic outcome in mice. *Am J Pathol* 2010; 176(2): 995-1005.
- 11 Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, *et al.* Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* 2000; 405(6789): 974-8.
- 12 Stelnicki EJ, Komuves LG, Kwong AO, Holmes D, Klein P, Rozenfeld S, *et al.* HOX homeobox genes exhibit spatial and temporal changes in expression during human skin development. *J Invest Dermatol* 1998; 110(2): 110-5.
- 13 Yang M, Liang Y, Sheng L, Shen G, Liu K, Gu B, *et al.* A preliminary study of differentially expressed genes in expanded skin and normal skin: implications for adult skin regeneration. *Arch Dermatol Res* 2011; 303(2): 125-33.
- 14 Sun Z, Li S, Cao C, Wu J, Ma B, Tran V. ShRNA targeting SFRP2 promotes the apoptosis of hypertrophic scar fibroblast. *Mol Cell Biochem* 2011; 352(1/2): 25-33.
- 15 Nunes FD, de Almeida FC, Tucci R, de Sousa SC. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17(1): 94-8.
- 16 Zhang H, Zhao JH, Suo ZM. Knockdown of HOXA5 inhibits the tumorigenesis in esophageal squamous cell cancer. *Biomed Pharmacother* 2017; 86: 149-54.
- 17 Zhao H, Yu H, Zheng J, Ning N, Tang F, Yang Y, *et al.* Lowly-expressed lncRNA GAS5 facilitates progression of ovarian cancer through targeting miR-196-5p and thereby regulating HOXA5. *Gynecol Oncol* 2018; 151(2): 345-55.
- 18 Zhu Q, Lv T, Wu Y, Shi X, Liu H, Song Y. Long non-coding RNA 00312 regulated by HOXA5 inhibits tumour proliferation and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer. *J Cell Mol Med* 2017; 21(9): 2184-98.
- 19 Glass DA 2nd. Current understanding of the genetic causes of keloid formation. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2017; 18(2): S50-3.
- 20 Gong YF, Zhang XM, Liu F, Wang ZZ, Deng XF, Jiao Y, *et al.* Inhibitory effect of recombinant human endostatin on the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts in a rabbit ear model. *Eur J Pharmacol* 2016; 791: 647-54.
- 21 Shi J, Xiao H, Li J, Zhang J, Li Y, Zhang J, *et al.* Wild-type p53-modulated autophagy and autophagic fibroblast apoptosis inhibit hypertrophic scar formation. *Lab Invest* 2018; 98(11): 1423-37.
- 22 Chang CJ, Chen YL, Hsieh CH, Liu YJ, Yu SL, Chen JJW, *et al.* HOXA5 and p53 cooperate to suppress lung cancer cell invasion and serve as good prognostic factors in non-small cell lung cancer. *J Cancer* 2017; 8(6): 1071-81.
- 23 Chen H, Zhang H, Lee J, Liang X, Wu X, Zhu T, *et al.* HOXA5 acts directly downstream of retinoic acid receptor beta and contributes to retinoic acid-induced apoptosis and growth inhibition. *Cancer Res* 2007; 67(17): 8007-13.
- 24 Marshall H, Morrison A, Studer M, Popperl H, Krumlauf R. Retinoids and Hox genes. *FASEB J* 1996; 10(9): 969-78.
- 25 Weng MS, Ho YS, Lin JK. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(12): 1815-27.
- 26 Huang L, Cai YJ, Lung I, Leung BC, Burd A. A study of the combination of triamcinolone and 5-fluorouracil in modulating keloid fibroblasts in vitro. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2013; 66(9): e251-9.
- 27 Liu B, Guo Z, Gao W. miR-181b-5p promotes proliferation and inhibits apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts through regulating the MEK/ERK/p21 pathway. *Exp Ther Med* 2019; 17(3): 1537-44.
- 28 Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998; 95(1): 5-8.
- 29 Borbora D, Dutta HK, Devi KR, Mahanta J, Medhi P, Narain K. Long telomeres cooperate with p53, MDM2, and p21 polymorphisms to elevate pediatric solid tumor risk. *Pediatr Int* 2019.
- 30 Mrkvova Z, Uldrijan S, Pombinho A, Bartunek P, Slaninova I. Benzimidazoles downregulate Mdm2 and MdmX and activate p53 in MdmX overexpressing tumor cells. *Molecules* 2019; 24(11).
- 31 Barker TH. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. *Biomaterials* 2011; 32(18): 4211-4.
- 32 Seifert O, Mrowietz U. Keloid scarring: bench and bedside. *Arch Dermatol Res* 2009; 301(4): 259-72.