

# 抑制circPVT1对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响及其相关机制研究

李侃<sup>1</sup> 杜庆安<sup>1\*</sup> 杨阳<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>泰康仙林鼓楼医院整形外科, 南京 210000; <sup>2</sup>东部战区总医院秦淮医疗区整形外科, 南京 210000)

**摘要** 为探讨circPVT1对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响及分子机制, 该实验将瘢痕疙瘩成纤维细胞分为si-NC组、si-circPVT1组、miR-NC组、miR-194-5p组、si-circPVT1+anti-miR-NC组以及si-circPVT1+anti-miR-194-5p组。RT-qPCR检测circPVT1及miR-194-5p的表达情况; 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞活性; 流式细胞术检测细胞凋亡; 蛋白质印迹(Western blot)法检测蛋白表达; 双荧光素酶报告实验检测circPVT1和miR-194-5p的靶向关系。结果显示, 瘢痕疙瘩成纤维细胞中circPVT1表达水平升高, miR-194-5p表达水平降低( $P<0.05$ )。敲减circPVT1表达或过表达miR-194-5p, 瘢痕疙瘩成纤维细胞的活性、CyclinD1、Bcl-2、Caspase-3、PARP的表达均呈显著下降趋势, 而细胞凋亡率、Bax和p21表达水平呈显著的上升趋势( $P<0.05$ )。miR-194-5p表达的强弱与circPVT1有关, 后者能靶向调控前者; 敲减circPVT1表达通过上调miR-194-5p可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖, 促进细胞凋亡。由此得出结论: circPVT1表达下调能刺激miR-194-5p表达, 从而抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖, 促进细胞凋亡。

**关键词** circPVT1; 瘢痕疙瘩; 成纤维细胞; 增殖; 凋亡

## Effect of Inhibiting of circPVT1 on the Proliferation and Apoptosis of Keloid Fibroblasts and Its Related Mechanisms

LI Kan<sup>1</sup>, DU Qing'an<sup>1\*</sup>, YANG Yang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Plastic Surgery, Taikang Xianlin Gulou Hospital, Nanjing 210000, China; <sup>2</sup>Department of Plastic Surgery, Qinhuai Medical District, Eastern Theater General Hospital, Nanjing 210000, China)

**Abstract** In order to investigate the effect of circPVT1 on the proliferation and apoptosis of keloid fibroblasts and its molecular mechanism, keloid fibroblasts were divided into si-NC group, si-circPVT1 group, miR-NC group, miR-194-5p group, si-circPVT1+anti-miR-NC group and si-circPVT1+anti-miR-194-5p group. The expression of circPVT1 and miR-194-5p was tested by RT-qPCR; the cell viability was tested by the tetramethylazolium salt colorimetric method (MTT); the cell apoptosis was tested by flow cytometry; Western blot was used to detect protein expression; dual luciferase reporter experiment was used to detect the targeting relationship between circPVT1 and miR-194-5p. The results showed that the expression level of circPVT1 in keloid fibroblasts increased, and the expression level of miR-194-5p decreased ( $P<0.05$ ). After knockdown of circPVT1 expression or overexpression of miR-194-5p, the activity of keloid fibroblasts, the expression of CyclinD1, Bcl-2, Caspase-3 and PARP all showed a significant downward trend, while the apoptosis rate, the expression of Bax and p21 indicators showed a significant upward trend ( $P<0.05$ ). The strength of miR-194-5p expression was related to circPVT1, and the latter could target and regulate the

收稿日期: 2021-08-20

接受日期: 2021-10-09

\*通讯作者。Tel: 13815412345, E-mail: 18652038000@163.com

Received: August 20, 2021

Accepted: October 9, 2021

\*Corresponding author. Tel: +86-13815412345, E-mail: 18652038000@163.com

former; knockdown circPVT1 expression could inhibit the proliferation of keloid fibroblasts and promote cell apoptosis by up-regulating miR-194-5p. This leads to the conclusion: down-regulation of circPVT1 expression can stimulate the expression of miR-194-5p, thereby inhibiting the proliferation of keloid fibroblasts and promoting cell apoptosis.

**Keywords** circPVT1; keloid; fibroblasts; proliferation; apoptosis

瘢痕疙瘩(keloid)是一种皮肤遭受外伤后由结缔组织过度增生和透明变形而引起的良性皮肤肿瘤,其发病机制尚未完全明确,研究发现瘢痕疙瘩的形成与成纤维细胞的增殖、凋亡密切相关<sup>[1-2]</sup>。因此,抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts, KFs)的增殖,促进其凋亡是治疗瘢痕疙瘩的一种有效途径。研究发现, circRNA可能参与瘢痕疙瘩的发病机理<sup>[3]</sup>;如敲低circ\_101238通过miR-138-5p/CDK6轴抑制细胞增殖,同时促进瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡<sup>[4]</sup>。研究报道沉默circPVT1可以促进细胞衰老<sup>[5]</sup>。此外,敲除circPVT1可抑制非小细胞肺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>。circPVT1通过海绵化miR-149增强上皮性卵巢癌细胞增殖,抑制细胞凋亡<sup>[7]</sup>。而circPVT1对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响及机制尚不清楚。LncBase Predicted v.2在线软件预测发现, circPVT1的序列和miR-194-5p有互补的核苷酸序列。研究报道miR-194-5p通过靶向NR2F2抑制人瘢痕疙瘩成纤维细胞的侵袭性<sup>[8]</sup>。miR-194-3p通过抑制CDK4和MMP2表达抑制成纤维细胞的增殖和迁移<sup>[9]</sup>。而miR-194-5p对瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖和凋亡的影响尚不清楚。本实验旨在研究circPVT1对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响及其机制是否与miR-194-5p有关。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人皮肤成纤维细胞(human skin fibroblasts, HSFs)(例数: 16例; 性别: 女; 平均年龄: 27岁)、KFs(例数: 16例; 性别: 女; 平均年龄: 35岁)(美国ATCC)。

试剂包括: DMEM培养基、胎牛血清、Trizol试剂、逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司), MTT试剂盒、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(eBioscience), 蛋白提取试剂盒(Invent), 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(GeneCopoeia)。

### 1.2 细胞处理与分组

常规培养人皮肤成纤维细胞(HSFs)、瘢痕疙瘩

成纤维细胞(KFs); 待KFs生长至80%时, 将circPVT1干扰表达载体(si-circPVT1)及阴性对照(si-NC)、miR-194-5p模拟物(miR-194-5p)及阴性对照(miR-NC)转染至KFs中, 记为si-circPVT1组、si-NC组、miR-194-5p组、miR-NC组; 将si-circPVT1分别与anti-miR-NC、anti-miR-194-5p共转染至KFs中, 前者的转染物标记为si-circPVT1+anti-miR-NC组, 后者的转染物标记为si-circPVT1+anti-miR-194-5p组。其中si-circPVT1-2序列为: 5'-GCA TTT ACA GGC CAG CCT A-3'。

### 1.3 经RT-qPCR分别检验 circPVT1与 miR-194-5p的表达情况

用Trizol试剂提取各组细胞总RNA, 按照逆转录试剂盒逆转录成cDNA, 以GAPDH和U6为内参, 用cDNA作为模板开始RT-qPCR检验, 反应步骤为: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共循环40次; 经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法获得相对表达量。circPVT1的内参为GAPDH, miR-194-5p的内参为U6, circPVT1的上游引物序列为: 5'-ATC GGT GCC TCA GCG TTC GG-3', 下游引物序列: 5'-CTG TCC TCG CCG TCA CAC CG-3'; GAPDH上游引物序列: 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3', 下游引物序列: 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GT-3'; miR-194-5p上游引物序列: 5'-GCG GCG GTG TAA CAG CAA CTC C-3', 下游引物序列: 5'-ATC CAG TGC AGG GTC CGA GG-3'; U6上、下游引物序列分别为: 5'-GCT TCG GCA CAT ATA CTA AAA T-3'/5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'; 本实验所有引物序列均购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.4 MTT检测细胞增殖

各组细胞以 $2 \times 10^3$ 个/孔的密度接种在96孔板中, 培养48 h, 按试剂盒说明每孔分别加入5 mg/mL的MTT溶液20  $\mu$ L, 于37 °C恒温培养箱中继续孵育4 h后弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu$ L, 振荡反应10 min使沉淀溶解, D值测量位置取波长490 nm处, 利用酶标仪获得吸光度值, 细胞活性使

用D值表示。

### 1.5 流式细胞术观察细胞死亡情况

各组细胞以 $2 \times 10^3$ 个/孔的密度接种在96孔板中, 培养48 h, 弃去培养液, 获得细胞样本, PBS预冷后清洗细胞样本, 各清洗2次, 再次加入缓冲液, 重悬细胞; 再滴入Annexin V-FITC与PI, 剂量分别为10  $\mu$ L、5  $\mu$ L; 充分搅拌后37  $^{\circ}$ C避光孵育10 min; 细胞凋亡率经流式细胞仪检验而获得。

### 1.6 Western blot法获得各组蛋白的表达数据

各组样本细胞总蛋白的提取工作参考试剂盒说明书进行, 将获得的细胞总的蛋白加热变性, 每孔蛋白上样量为40  $\mu$ g, 然后SDS-PAGE电泳, 电压100 V, 电泳120 min, 电泳结束后将胶条割至合适大小, 然后用湿转法转移至PVDF膜上, 用5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 封闭后洗膜, 将膜置于杂交袋中, 将稀释好的一抗(1:500)倒入杂交袋, 在4  $^{\circ}$ C条件下孵育过夜, 倒掉一抗后洗膜, 将二抗以1:2 000的比例稀释, 使用HRP标记好后滴入杂交袋中, 摇晃均匀后常温孵育120 min, 加入显影剂显影, 再浸入定影液, 最后洗去残液, 晾干, 用ChemiDoc XRS+系统成像, 蛋白条带灰度值经Quantity One凝胶软件获得, 蛋白表达情况以其与内参GAPDH的灰度值比值表示。

### 1.7 双荧光素酶报告实验

构建含有miR-194-5p结合位点的circPVT1野生型和突变型荧光素酶报告质粒(WT-circPVT1、MUT-circPVT1), 然后和miR-NC或miR-194-5p共同转染到KFs中, 荧光素酶的活性参考说明书要求检验。

### 1.8 统计学处理方法

本研究收集的所有数据均通过SPSS 20.0软件进行处理, 计量数据中符合正态分布的数据使用t检验, 表达方式为 $\bar{x} \pm s$ , 多组数据间的差异通过单因素方差分析检验, 经用LSD-t检验组间数据,  $P < 0.05$ 表

示数据间的差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 circPVT1和miR-194-5p在HSFs和KFs中的表达

用RT-qPCR检测HSFs和KFs中circPVT1、miR-194-5p的表达水平, 结果显示, 与HSFs比较, KFs中circPVT1表达水平升高, miR-194-5p表达水平降低( $P < 0.05$ )(表1)。

### 2.2 敲减circPVT1表达抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖

将si-NC、si-circPVT1转染至KFs, RT-qPCR检测结果显示, circPVT1表达水平降低, 表明转染成功; MTT检测结果显示, si-circPVT1组细胞活性低于si-NC组( $P < 0.05$ ); Western blot检测结果显示, 与si-NC组比较, si-circPVT1组CyclinD1的表达呈显著下降趋势, 而p21的表达则呈显著上升趋势(图1和表2)。

### 2.3 敲减circPVT1表达促进瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡

流式细胞术检测结果显示, si-circPVT1组瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡率高于si-NC组( $P < 0.05$ ); Western blot检测结果显示, 与si-NC组比较, si-circPVT1组Bcl-2、Caspase-3、PARP表达水平降低, Bax表达水平升高( $P < 0.05$ )(图2和表3)。

### 2.4 circPVT1靶向调控miR-194-5p的表达

经LncBase Predicted v.2软件检验在circPVT1的序列中发现了一种核苷酸序列, 该序列能和miR-194-5p发生互补反应(图3)。双荧光素酶检验结果表明, WT-circPVT1与miR-194-5p共转染后的细胞荧光素酶活性降低( $P < 0.05$ ), MUT-circPVT1与miR-194-5p共转染后的细胞荧光素酶活性无显著变化(表4)。将circPVT1过表达载体和抑制表达转染至瘢痕

表1 circPVT1和miR-194-5p在人皮肤成纤维细胞和瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达

Table 1 The expression of circPVT1 and miR-194-5p in HSFs and KFs

组别 Group	circPVT1	miR-194-5p
HSFs	1.01 $\pm$ 0.04	1.02 $\pm$ 0.04
KFs	3.15 $\pm$ 0.19*	0.49 $\pm$ 0.03*
t	10.926	11.598
P	0.000	0.000

n=9。\* $P < 0.05$ , 与HSFs比较。

n=9。\* $P < 0.05$  compared with HSFs.

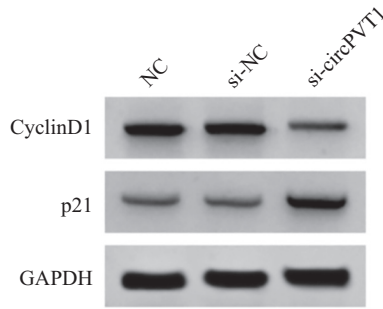


图1 增殖蛋白的表达情况

Fig.1 Proliferation protein expression

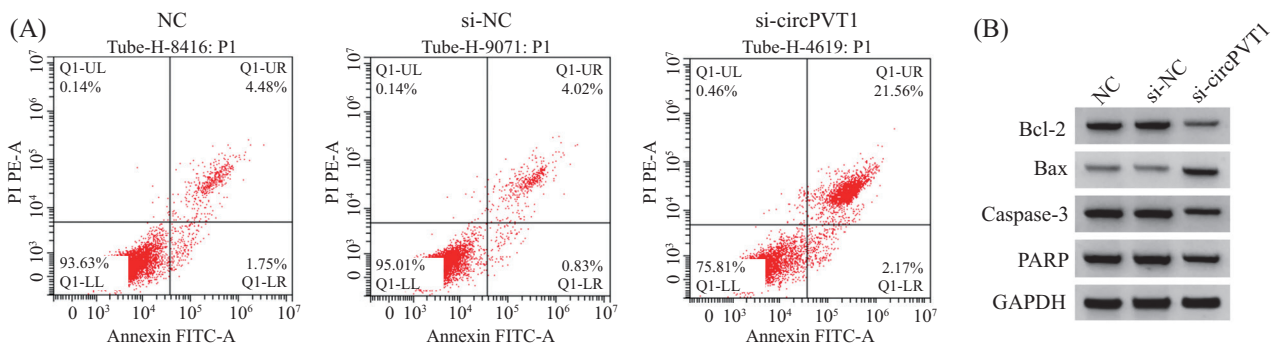
表2 敲减circPVT1表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响

Table 2 The effect of knockdown circPVT1 expression on the proliferation of KFs

分组 Group	circPVT1	$D_{490}$			CyclinD1	p21
		24 h	48 h	72 h		
NC	1.00±0.07	0.59±0.05	1.03±0.09	1.37±0.08	0.65±0.06	0.22±0.02
si-NC	1.01±0.05	0.55±0.03	0.98±0.06	1.42±0.06	0.69±0.04	0.25±0.01
si-circPVT1	0.43±0.02*	0.32±0.02*	0.61±0.03*	0.78±0.03*	0.25±0.02*	0.71±0.03*
<i>F</i>	45.309	17.622	13.025	35.413	31.281	132.240
<i>P</i>	0.000	0.003	0.006	0.001	0.001	0.000

$n=3$ 。\* $P<0.05$ , 与si-NC组比较。

$n=3$ 。\* $P<0.05$  compared with the si-NC group.



A: 细胞凋亡流式图; B: 凋亡相关蛋白表达。

A: apoptosis flow cytometry; B: apoptosis-related protein expression.

图2 敲减circPVT1表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的影响

Fig.2 The effect of knockdown circPVT1 expression on the apoptosis of KFs

表3 敲减circPVT1表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的影响

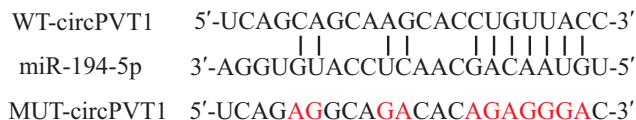
Table 3 The effect of knockdown circPVT1 expression on the apoptosis of KFs

分组 Group	凋亡率/% Apoptosis rate /%	Bcl-2	Bax	Caspase-3	PARP
NC	6.25±0.53	0.66±0.05	0.23±0.02	0.75±0.07	0.46±0.05
si-NC	5.18±0.36	0.63±0.04	0.25±0.02	0.73±0.05	0.49±0.04
si-circPVT1	24.87±1.18*	0.19±0.02*	0.69±0.03*	0.20±0.03*	0.18±0.02*
<i>F</i>	204.770	43.619	124.760	35.770	23.124
<i>P</i>	0.000	0.001	0.000	0.001	0.002

$n=3$ 。\* $P<0.05$ , 与si-NC组比较。

$n=3$ 。\* $P<0.05$  compared with the si-NC group.





红色碱基表示结合位点的突变位点。

The red base represents the mutation site of the binding site.

图3 circPVT1的序列中含有与miR-194-5p互补的核苷酸序列

Fig.3 The sequence of circPVT1 contains a nucleotide sequence complementary to miR-194-5p

表4 双荧光素酶检验结果

Table 4 Dual luciferase test results

分组 Group	WT-circPVT1	MUT-circPVT1
miR-NC	1.01±0.05	0.99±0.04
miR-194-5p	0.36±0.03*	1.02±0.05
<i>t</i>	10.689	0.455
<i>P</i>	0.000	0.673

*n*=3。\**P*<0.05, 与miR-NC组比较。

*n*=3。\**P*<0.05 compared with the miR-NC group.

表5 circPVT1调控miR-194-5p表达

Table 5 circPVT1 regulates the expression of miR-194-5p

分组 Group	miR-194-5p
pcDNA	1.00±0.04
pcDNA-circPVT1	0.47±0.02 <sup>#</sup>
si-NC	1.01±0.05
si-circPVT1	3.08±0.15 <sup>*</sup>
<i>F</i>	198.270
<i>P</i>	0.000

*n*=3。<sup>#</sup>*P*<0.05, 与pcDNA组比较; <sup>\*</sup>*P*<0.05, 与si-NC组比较。

*n*=3。<sup>#</sup>*P*<0.05 compared with the pcDNA group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 compared with the si-NC group.

疙瘩成纤维细胞, RT-qPCR检测结果显示, pcDNA-circPVT1组 miR-194-5p表达水平低于pcDNA组 (*P*<0.05), si-circPVT1组 miR-194-5p表达水平高于si-NC组 (*P*<0.05)(表5)。

## 2.5 过表达miR-194-5p抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和促进凋亡

将 miR-NC、miR-194-5p转染至 KFs, RT-qPCR检测结果显示, miR-194-5p表达水平升高, 表明转染成功; MTT和流式细胞仪检测结果显示, 与 miR-NC组比较, miR-194-5p组瘢痕疙瘩成纤维细胞活性降低, 细胞凋亡率升高, Western blot检测结果显示, 与 miR-NC组比较, miR-194-5p组 CyclinD1、Bcl-2、Caspase-3、PARP表达水平降低, p21、Bax表达水平升高 (*P*<0.05)(图4、图5、表6和表7)。

## 2.6 下调miR-194-5p表达逆转了敲减circPVT1表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的抑制作用和凋亡的促进作用

将si-circPVT1分别与anti-miR-NC、anti-miR-194-5p共转染至 KFs, RT-qPCR检测结果显示, miR-194-5p表达水平降低; MTT和流式细胞仪检测结果显示, 与si-circPVT1+anti-miR-NC组比较, si-circPVT1+anti-miR-194-5p组瘢痕疙瘩成纤维细胞活性升高, 细胞凋亡率降低 (*P*<0.05); Western blot检测结果显示, 与si-circPVT1+anti-miR-NC组比较, si-circPVT1+anti-miR-194-5p组 CyclinD1、Bcl-2、Caspase-3、PARP表达水平升高, p21、Bax表达水平降低 (*P*<0.05)(图6、图7、表8和表9)。

## 3 讨论

瘢痕疙瘩是一种常见的皮肤纤维增生性疾病,

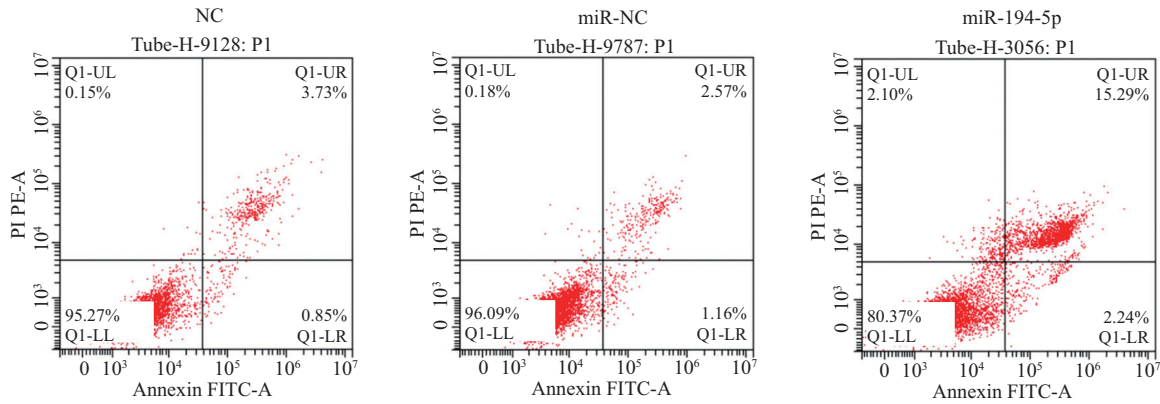


图4 过表达miR-194-5p对瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的影响

Fig.4 The effect of overexpression of miR-194-5p on the apoptosis of KFs

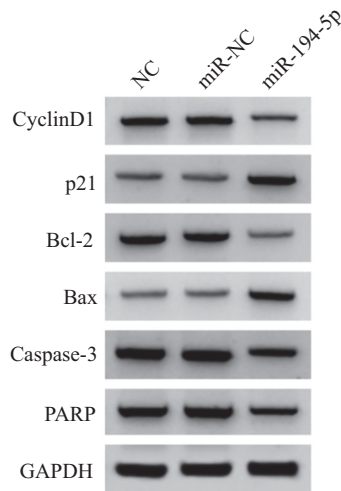


图5 增殖和凋亡相关蛋白表达

Fig.5 Proliferation and apoptosis-related protein expression

表6 过表达miR-194-5p对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响

Table 6 The effect of overexpression of miR-194-5p on the proliferation and apoptosis of KFs

分组 Group	miR-194-5p	$D_{490}$			凋亡率/%
		24 h	48 h	72 h	Apoptosis rate /%
NC	1.01±0.05	0.51±0.03	1.02±0.07	1.45±0.08	5.63±0.32
miR-NC	0.99±0.05	0.48±0.03	1.06±0.07	1.47±0.08	4.76±0.32
miR-194-5p	2.93±0.17*	0.29±0.02*	0.64±0.03*	0.78±0.04*	19.86±0.96*
<i>F</i>	103.830	16.452	14.260	34.641	180.830
<i>P</i>	0.000	0.008	0.006	0.002	0.000

$n=3$ 。\* $P<0.05$ , 与miR-NC组比较。

$n=3$ 。\* $P<0.05$  compared with miR-NC group.

一种良性皮肤肿瘤,其特征在于成纤维细胞增殖和细胞外基质过度积累;深入研究瘢痕疙瘩的机制有望为瘢痕疙瘩的诊断、治疗靶点带来新的见解<sup>[10-11]</sup>。有研究表明, circRNA参与调控瘢痕疙瘩的发病机制<sup>[12]</sup>。如 circ\_101238可通过 miR-138-5p/CDK6轴调控瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖和凋亡<sup>[13]</sup>。circNRIP1通过

FXR1介导的 miR-503-3p和 miR-503-5p促进瘢痕疙瘩进展<sup>[14]</sup>。这些影响瘢痕疙瘩进展的 circRNA均可作为瘢痕疙瘩的生物标志物。然而瘢痕疙瘩中的 circRNA的研究报道尚有不足,仍需继续深入研究。circPVT1作为 circRNA的一种,其可影响多种肿瘤细胞的异常增殖,如沉默 circPVT1可抑制多形性胶质母细胞瘤

表7 过表达miR-194-5p调控瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡蛋白的表达及细胞增殖

Table 7 Overexpression of miR-194-5p regulates the expression of fibroblast protein and cell proliferation in keloids

分组 Group	CyclinD1	p21	Bcl-2	Bax	Caspase-3	PARP
NC	0.64±0.03	0.25±0.03	0.69±0.04	0.23±0.02	0.76±0.06	0.45±0.05
miR-NC	0.67±0.03	0.27±0.03	0.66±0.04	0.25±0.02	0.73±0.05	0.47±0.06
miR-194-5p	0.22±0.02*	0.74±0.05*	0.23±0.01*	0.71±0.04*	0.22±0.02*	0.21±0.03*
<i>F</i>	38.904	59.028	46.873	89.831	42.076	9.894
<i>P</i>	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.013

*n*=3。\**P*<0.05, 与miR-NC组比较。

*n*=3。\**P*<0.05 compared with miR-NC group.

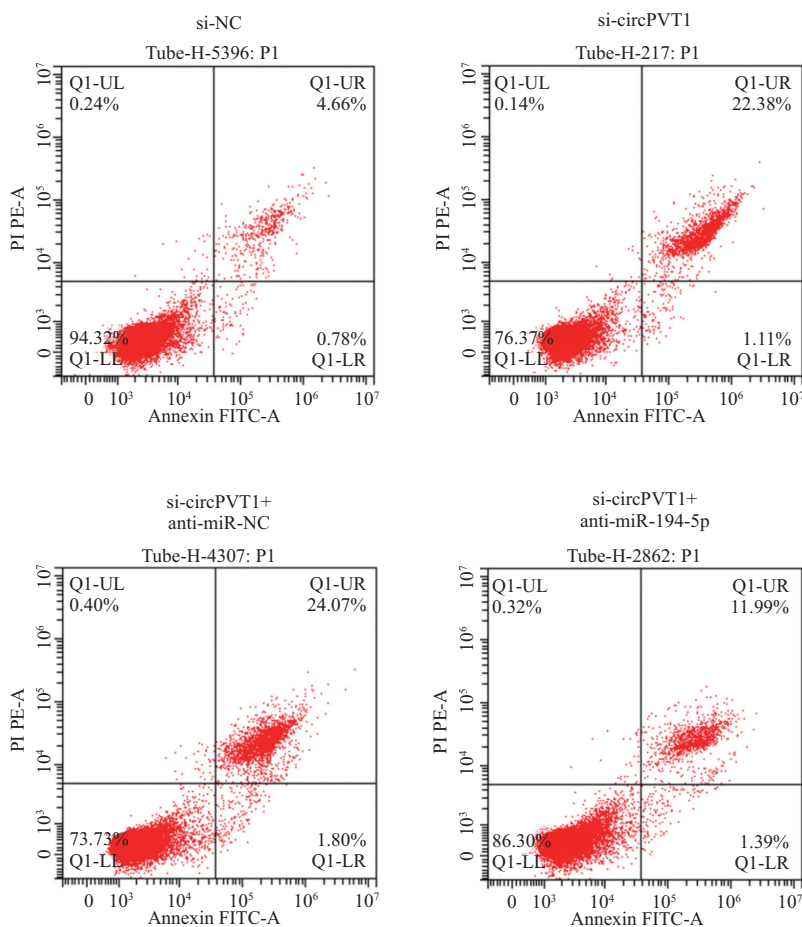


图6 下调miR-194-5p表达逆转了敲减circPVT1表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的影响

Fig.6 Down-regulation of miR-194-5p expression reverses the effect of knockdown circPVT1 expression on the apoptosis of KFs

细胞的生长和口腔鳞状细胞癌细胞增殖<sup>[15-16]</sup>。敲除circPVT1不仅抑制肝癌细胞的生长,还促进细胞凋亡<sup>[17]</sup>。而circPVT1是否在瘢痕疙瘩这种良性皮肤肿瘤中起作用尚不清楚。本实验结果显示,瘢痕疙瘩成纤维细胞中circPVT1表达水平高于正常皮肤成纤维细胞,提示circPVT1可能与瘢痕疙瘩的形成有关。本实验进一步敲减circPVT1表达后,瘢痕疙瘩成纤维细胞的活性降低,同时CyclinD1、Bcl-

2、Caspase-3与PARP均呈显著的低水平表达,但细胞凋亡率、p21和Bax的表达均呈显著的上升趋势;CyclinD1和p21介导细胞增殖,而Bcl-2、Bax、Caspase-3、PARP与细胞凋亡相关<sup>[18-19]</sup>。该情况可以表示,通过降低circPVT1表达能大大抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖,且促进细胞凋亡。提示circPVT1或可作为瘢痕疙瘩有前景的治疗靶点。

研究发现, miRNA参与增生性瘢痕形成机制,

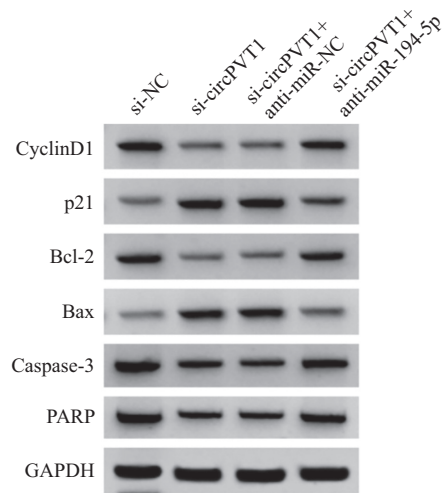


图7 增殖和凋亡相关蛋白表达

Fig.7 Proliferation and apoptosis-related protein expression

表8 下调miR-194-5p表达逆转了敲减circPVT1表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响

Table 8 Down-regulation of miR-194-5p expression reverses the effect of knockdown circPVT1 expression on the proliferation and apoptosis of keloid fibroblasts

分组 Group	miR-194-5p	$D_{490}$			凋亡率/%
		24 h	48 h	72 h	Apoptosis rate /%
si-NC	1.01±0.05	0.54±0.04	0.97±0.05	1.42±0.07	5.43±0.37
si-circPVT1	2.85±0.13*	0.29±0.02*	0.63±0.03*	0.72±0.04*	22.41±1.38*
si-circPVT1+anti-miR-NC	2.91±0.16	0.33±0.01	0.65±0.03	0.78±0.03	25.74±1.81
si-circPVT1+anti-miR-194-5p	1.58±0.07 <sup>#</sup>	0.45±0.03 <sup>#</sup>	0.84±0.04 <sup>#</sup>	1.24±0.06 <sup>#</sup>	12.35±0.52 <sup>#</sup>
<i>F</i>	74.072	18.515	15.749	42.129	61.977
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

$n=3$ 。\* $P<0.05$ , 与si-NC组比较; <sup>#</sup> $P<0.05$ , 与si-circPVT1+anti-miR-NC组比较。

$n=3$ 。\* $P<0.05$  compared with the si-NC group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with the si-circPVT1+anti-miR-NC group.

表9 下调miR-194-5p表达逆转了敲减circPVT1表达对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响

Table 9 Down-regulation of miR-194-5p expression reverses the effect of knockdown circPVT1 expression on the proliferation and apoptosis-related protein expression of KFs

分组 Group	CyclinD1	p21	Bcl-2	Bax	Caspase-3	PARP
si-NC	0.71±0.05	0.29±0.01	0.64±0.04	0.23±0.02	0.74±0.05	0.47±0.04
si-circPVT1	0.21±0.02*	0.75±0.04*	0.25±0.02*	0.68±0.05*	0.22±0.02*	0.20±0.03*
si-circPVT1+anti-miR-NC	0.24±0.02	0.76±0.04	0.20±0.02	0.63±0.04	0.23±0.02	0.19±0.02
si-circPVT1+anti-miR-194-5p	0.52±0.03 <sup>#</sup>	0.45±0.04 <sup>#</sup>	0.51±0.03 <sup>#</sup>	0.35±0.03 <sup>#</sup>	0.39±0.04 <sup>#</sup>	0.34±0.02 <sup>#</sup>
<i>F</i>	51.180	42.420	54.329	32.321	55.352	21.147
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

$n=3$ 。\* $P<0.05$ , 与si-NC组比较; <sup>#</sup> $P<0.05$ , 与si-circPVT1+anti-miR-NC组比较。

$n=3$ 。\* $P<0.05$  compared with the si-NC group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with the si-circPVT1+anti-miR-NC group.

影响成纤维细胞的过度增殖以及胶原纤维的过度分泌<sup>[20]</sup>。如miR-152-5p、miR-21均参与调控人瘢痕疙瘩成纤维细胞的凋亡<sup>[21-22]</sup>。miR-194-5p作为众多miRNA的一种, 研究发现miR-194-5p可影响子宫内

膜细胞及喉癌细胞的增殖<sup>[23-24]</sup>。而miR-194-5p对瘢痕疙瘩成纤维细胞异常增殖的影响尚不清楚。本实验结果显示, 瘢痕疙瘩成纤维细胞中miR-194-5p呈低表达趋势; 瘢痕疙瘩成纤维的细胞活性和凋亡率



受miR-194-5p表达调控, miR-194-5p过表达能大大提高该类细胞的凋亡率, 同时降低其细胞活性; 表明过表达miR-194-5p可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖, 促进细胞凋亡。研究发现, circRNA可充当竞争性内源RNA调控miRNA, 影响瘢痕疙瘩形成<sup>[25]</sup>。生物学软件预测发现, circPVT1中的一段核苷酸序列能和miR-194-5p发生互补反应, 且本实验证实了circPVT1可靶向调控miR-194-5p表达; 此外, circPVT1低表达能够影响瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖与凋亡, 而下调miR-194-5p表达可有效逆转该调控。

由此可知, 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中circPVT1高表达, 而miR-194-5p低表达; 敲减circPVT1表达通过上调miR-194-5p可抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖, 促进细胞凋亡。circPVT1、miR-194-5p可作为瘢痕疙瘩治疗的有前景的分子靶点。

### 参考文献 (References)

- [1] 房渊, 郝平, 张辉, 等. 瘢痕疙瘩的治疗新进展[J]. 临床医药实践(FANG Y, HAO P, ZHANG H, et al. New progress in the treatment of keloids [J]. Proceeding of Clinical Medicine), 2018, 27(3): 216-21.
- [2] 李周娜, 全福花, 金承龙, 等. 瘢痕疙瘩发病机制和治疗进展[J]. 皮肤科学通报(LI Z N, QUAN F H, JIN C L, et al. Progress in the pathogenesis and treatment of keloid [J]. China Medical Abstracts of Dermatology), 2019, 36(5): 524-7.
- [3] ZHANG Z, YU K, LIU O, et al. Expression profile and bioinformatics analyses of circular RNAs in keloid and normal dermal fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 2020, 388(1): 111799.
- [4] YANG D, LI M, DU N. Effects of the circ\_101238/miR1385p/CDK6 axis on proliferation and apoptosis keloid fibroblasts [J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3): 1995-2002.
- [5] PANDA A C, IOANNIS G, MI K K, et al. Identification of senescence-associated circular RNAs (SAC-RNAs) reveals senescence suppressor CircPVT1 [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(7): 4021-35.
- [6] QIN S, ZHAO Y, LIM G, et al. Circular RNA PVT1 acts as a competing endogenous RNA for miR-497 in promoting non-small cell lung cancer progression [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 244-50.
- [7] SUN X, LUO L, GAO Y. Circular RNA PVT1 enhances cell proliferation but inhibits apoptosis through sponging microRNA-149 in epithelial ovarian cancer [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2020, 46(4): 625-35.
- [8] XU Q J, JIANG S J. miR-194-5p serves a suppressive role in human keloid fibroblasts via targeting NR2F2 [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(1): 57.
- [9] XU Z, GUO B, CHANG P, et al. The differential expression of miRNAs and a preliminary study on the mechanism of miR-194-3p in keloids [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019(5): 1-10.
- [10] LÜ W, REN Y, HOU K, et al. Epigenetic modification mechanisms involved in keloid: current status and prospect [J]. Clin Epigenetics, 2020, 12(1): 183.
- [11] 罗银利, 金哲虎, 皮龙泉, 等. 瘢痕疙瘩的临床治疗与预防最新研究进展[J]. 中国医疗美容(LUO Y L, JIN Z H, PI L Q, et al. Recent advances in the clinical treatment and prevention of keloid [J]. China Medical Cosmetology), 2020, 10(4): 105-9.
- [12] ZHANG Z, YU K, LIU O, et al. Expression profile and bioinformatics analyses of circular RNAs in keloid and normal dermal fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 2020, 388(1): 111799.
- [13] YANG D, LI M, DU N. Effects of the circ\_101238/miR1385p/CDK6 axis on proliferation and apoptosis keloid fibroblasts [J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3): 1995-2002.
- [14] WANG B, YIN H, ZHANG H, et al. circNRIP1 facilitates keloid progression via FXR mediated upregulation of miR-503-3p and miR-503-5p [J]. Int J Mol Med, 2021, 47(5): 70.
- [15] CHI G, YANG F, XU D, et al. Silencing hsa\_circ\_PVT1 (circPVT1) suppresses the growth and metastasis of glioblastoma multiforme cells by up-regulation of miR-199a-5p [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1): 188-96.
- [16] HE T, LI X, XIE D, et al. Overexpressed circPVT1 in oral squamous cell carcinoma promotes proliferation by serving as a miRNA sponge [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3509-18.
- [17] LI Y, SHI H, YUAN J, et al. Downregulation of circular RNA circPVT1 restricts cell growth of hepatocellular carcinoma through downregulation of Sirtuin 7 via microRNA-3666 [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(7): 1291-300.
- [18] DODURGA Y, GUNDOGDU G, TEKIN V, et al. Valproic acid inhibits the proliferation of SHSY5Y neuroblastoma cancer cells by downregulating URG4/URGCP and CCND1 gene expression [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(7):4595-9.
- [19] KIM S M, LEE E J, LEE J H, et al. Simvastatin in combination with bergamottin potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of NF-κB signalling pathway in human chronic myelogenous leukaemia [J]. Pharm Biol, 2016, 54(10): 2050-60.
- [20] 罗滨林, 张轩龙, 姚刚. MicroRNA在增生性瘢痕中的研究进展[J]. 医学综述(LUO B L, ZHANG X L, YAO G. Research progress of microRNA in hypertrophic Scar [J]. Medical Recapitulate), 2020, 26(21): 4200-6.
- [21] PANG Q, WANG Y, XU M, et al. MicroRNA-152-5p inhibits proliferation and migration and promotes apoptosis by regulating expression of Smad3 in human keloid fibroblasts [J]. BMB Rep, 2019, 52(3): 202-7.
- [22] LIU Y, REN L, LIU W, et al. MiR-21 regulates the apoptosis of keloid fibroblasts by caspase-8 and mitochondrial-mediated apoptotic signaling pathway via targeting FasL [J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(5): 548-55.
- [23] ZHAO Q, HAN B, ZHANG Y, et al. Effect of miR-194-5p regulating STAT1/mTOR signaling pathway on the biological characteristics of ectopic endometrial cells from mice [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(10): 6136-48.
- [24] CHEN X, SU X, ZHU C, et al. Knockdown of hsa\_circ\_0023028 inhibits cell proliferation, migration, and invasion in laryngeal cancer by sponging miR-194-5p [J]. Biosci Rep, 2019, 39(6): BSR20190177.
- [25] SHI J, YAO S, CHEN P, et al. The integrative regulatory network of circRNA and microRNA in keloid scarring [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(1): 201-9.