

miR-145-5p靶向XBP1对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响

李响 张刚 吴志贤 李晨浩 莫自增*

(广东医科大学附属整形医院整形外科, 湛江 524000)

摘要 该文探究 miR-145-5p 靶向内质网应激相关蛋白剪接型 X 盒结合蛋白 1(XBP1) 对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响。选择人瘢痕疙瘩成纤维细胞(KFB)为研究对象, 随机分组分为: Control 组(常规培养)、miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-145-5p mimics 组(转染 miR-145-5p mimics)、miR-145-5p mimics+pcDNA-NC 组(转染 miR-145-5p mimics+pcDNA-NC)、miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1 组(转染 miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1), 另选取人正常皮肤成纤维细胞(NFB)作为 NFB 组。CCK8 检测细胞增殖; 划痕实验检测细胞的迁移; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; qPCR 法检测细胞 miR-145-5p、XBP1 mRNA 表达; Western blot 检测细胞中 Col-I、Col-III、P21、Bax、XBP1 蛋白的表达; 双荧光素酶实验检测 miR-145-5p 与 XBP1 互作。建立患者来源的异种移植模型, 用 miR-145-5p mimics、pcDNA-XBP1 进行干预, 观察小鼠植入物生长、凋亡和 Col-I 表达情况。结果显示, 与 NFB 组相比, Control 组细胞 miR-145-5p 表达水平降低($P<0.05$), XBP1 mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$); 与 Control 组、miR-NC 组相比, miR-145-5p mimics 组细胞 miR-145-5p 表达水平和 P21、bax 蛋白表达水平及凋亡率升高($P<0.05$), XBP1 mRNA 表达水平和存活率、克隆数、划痕愈合率及 Col-I、Col-III、XBP1 蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与 miR-145-5p mimics+pcDNA-NC 组相比, miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1 组细胞 XBP1 mRNA 表达水平、存活率、克隆数、划痕愈合率及 Col-I、Col-III、XBP1 蛋白表达水平升高($P<0.05$), P21、bax 蛋白表达水平以及凋亡率降低($P<0.05$); miR-145-5p 可靶向负调控 XBP1 表达($P<0.05$)。过表达 miR-145-5p 抑制体内 KFB 增殖和 Col-I 表达, 诱导细胞凋亡, 上调 XBP1 减弱了 miR-145-5p 过表达对体内 KFB 增殖、凋亡的影响($P<0.05$)。总之, miR-145-5p 可能通过靶向调控 XBP1 表达, 进而抑制 KFB 细胞增殖, 促进细胞凋亡。

关键词 人瘢痕疙瘩成纤维细胞; miR-145-5p; 内质网应激相关蛋白剪接型 X 盒结合蛋白 1; 细胞增殖; 凋亡

Impacts of miR-145-5p on Proliferation and Apoptosis of Keloid Fibroblasts by Targeting XBP1

LI Xiang, ZHANG Gang, WU Zhixian, LI Chenhao, MO Zizeng*

(Department of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China)

Abstract This article explores the effect of miR-145-5p targeting XBP1 (endoplasmic reticulum stress-related protein splicing X-box binding protein 1) on the proliferation and apoptosis of human scar tissue fibroblasts. Human KFBs (keloid fibroblasts) were selected as the research subjects and randomly assigned into Control group

收稿日期: 2025-02-19

接受日期: 2025-05-12

广东省医学科研基金(批准号: A2019103)资助的课题

*通信作者。Tel: 18218867476, E-mail: b77tqg@163.com

Received: February 19, 2025

Accepted: May 12, 2025

This work was supported by the Guangdong Provincial Medical Research Fund Project (Grant No.A2019103)

*Corresponding author. Tel: +86-18218867476, E-mail: b77tqg@163.com

(conventional culture), miR-NC group (transfected with miR-NC), miR-145-5p mimics group (transfected with miR-145-5p mimics), miR-145-5p mimics+pcDNA-NC group (transfected with miR-145-5p mimics+pcDNA-NC), miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1 group (transfected with miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1), and human NFB (normal skin fibroblasts) were also used as the NFB group. CCK8 was used to detect cell proliferation. Scratch experiment was used to detect cell migration. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate. qPCR was used to detect the expression of miR-145-5p and *XBP1* mRNA in cells. Western blot was used to detect the expression of Col-I, Col-III, P21, Bax, and XBP1 proteins in cells. In addition, dual luciferase assay was used to detect the interaction between miR-145-5p and XBP1. A patient-derived xenotransplantation model was established, and miR-145-5p mimics and pcDNA-XBP1 were used to intervene, and the growth, apoptosis and Col-I expression of mouse implants were observed. The results showed that compared with NFB group, control group showed a decrease in miR-145-5p ($P<0.05$) and a great increase in *XBP1* mRNA ($P<0.05$). Compared with Control group and miR-NC group, the miR-145-5p mimics group showed increased miR-145-5p expression, P21, Bax proteins expression, and apoptosis rate ($P<0.05$), while decreased *XBP1* mRNA, survival rate, clone number, scratch healing rate, and Col-I, Col-III, XBP1 proteins expression ($P<0.05$). Compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA-NC group, the miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1 group showed an increase in *XBP1* mRNA, survival rate, clone number, scratch healing rate, and Col-I, Col-III, XBP1 proteins expression ($P<0.05$), while a decrease in P21 and Bax proteins expression and apoptosis rate ($P<0.05$). miR-145-5p could target the negative regulation of XBP1 ($P<0.05$). Overexpression of miR-145-5p inhibited the proliferation and Col-I expression, and induced apoptosis of KFB *in vivo*, and up-regulation of XBP1 weakened the effects of overexpression of miR-145-5p on the proliferation and apoptosis of KFB *in vivo* ($P<0.05$). In conclusion, miR-145-5p may inhibit KFB cell proliferation and promote cell apoptosis by targeting XBP1 expression.

Keywords keloid fibroblasts; miR-145-5p; endoplasmic reticulum stress-related protein splicing X-box binding protein 1; cell proliferation; apoptosis

瘢痕疙瘩属于皮肤纤维组织异常增生性疾病,其形成主要源于皮肤损伤后愈合过程的调控失衡,表现为胶原过度分泌、成纤维细胞增殖活性增强及凋亡能力减弱,最终发展为皮肤瘤样病变,该疾病常伴有疼痛、畸形等,严重时会造成功能受损,对患者的身心健康带来严重危害^[1-2]。目前,临床可采用手术切除、激光等治疗方式进行治疗,但是治疗效果不佳,易复发,此外,由于瘢痕疙瘩的发生机制尚未明确,导致其治疗难度加大^[3]。因此,探究瘢痕疙瘩形成的潜在机制,了解如何抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞(keloid fibroblasts, KFB)增殖并促进细胞凋亡,对改善治疗效果具有重要意义。微小RNA(miRNA)在机体中参与多种重要的生物学活动,相关研究表明,miRNA在瘢痕疙瘩的形成中表达异常,可参与其形成过程^[4]。研究发现,过表达miR-145-5p可抑制血管平滑肌细胞增殖、血管重塑等,可作为治疗高血压的潜在靶点^[5]。miR-145-5p在细胞的增殖、迁移、侵袭等生物学过程中发挥重要作用,在多种疾病中表现出治疗潜能^[6]。内质网应激相关蛋白剪接型

X盒结合蛋白1(endoplasmic reticulum stress-related protein splicing X-box binding protein 1, XBP1)对机体炎症小体具有一定的调控作用,可影响线粒体功能^[7],研究表明,XBP1作为内质网应激过程中的关键因子,在细胞增殖中同样发挥重要作用,但是其在瘢痕疙瘩形成中的作用尚未可知。本研究前期经网站预测发现,miR-145-5p与*XBP1*存在多个结合位点,本研究主要探讨miR-145-5p靶向XBP1对人KFB增殖、凋亡的作用,探讨其潜在的作用机制,为瘢痕疙瘩治疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

KFB(货号:AW-YCH052)购自长沙艾碧维生物科技有限公司;人正常皮肤成纤维细胞(normal skin fibroblasts, NFB)(货号:SCC058)、DMEM培养基(货号:SCM162)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号:APOAF)购自德国Mecrk公司;miR-145-5p mimics(货号:HY-R00282)购自

广州威佳生物科技有限公司; Trizol试剂盒(货号: 12183555CN)、反转录试剂盒(货号: N8080234)、One-Step qPCR(Probe)试剂盒(货号: 11753100)、RIPA裂解液(货号: 89901)、BCA蛋白定量试剂盒(货号: 23225)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(货号: 89888)、Lipofectamine® 3000转染试剂(货号: L30000)购自美国ThermoFisher Scientific公司; CCK8试剂盒(货号: BCKK0100)购自武汉贝茵莱生物科技有限公司; ECL化学发光试剂盒(货号: P0018AFT)购自上海碧云天生物技术有限公司; 抗体Col-I(货号: ab270993)、Col-III(货号: ab184993)、P21(货号: ab188224)、bax(货号: ab289364)、XBP1(货号: ab220783)及羊抗兔二抗(货号: ab216352)、GAPDH(货号: ab181603)购自英国Abcam公司; 倒置显微镜(型号: BZ-X)购自日本Keyence公司; 多功能酶标仪(型号: SparK)购自瑞士TECAN公司; 流式细胞仪(型号: FACSArray)购自美国BD公司; 凝胶成像系统(型号: GelDoc Go)购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 KFB在DMEM培养基(5% CO₂、37 °C)中培养, 含10%胎牛血清、100 mg/mL青-链霉素双抗。将细胞随机分为NFB组(NFB正常培养)、Control组(KFB正常培养)、miR-NC组(KFB转染miR-NC)、miR-145-5p mimics组(KFB转染miR-145-5p mimics)、miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组(KFB转染miR-145-5p mimics+pcDNA-NC)、miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1组(KFB转染miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1)。

1.2.2 qPCR法检测NFB、KFB中miR-145-5p、XBP1 mRNA表达 通过Trizol试剂盒提取总RNA, 使用反转录试剂盒获得cDNA, 上机扩增, 采取qPCR系统检测目标基因转录本, 40个循环, 反应调节: 95 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min。miR-145-5p以U6为内参, XBP1以GAPDH为

内参, 2^{-ΔΔCt}法计算相对表达量, 引物序列见表1。

1.2.3 CCK8和克隆形成实验检测KFB的增殖
CCK8: 将KFB接种在96孔板上, 按分组进行对应处理后, 加入10 μL CCK-8试剂孵育2 h。通过酶标仪检测D₄₅₀, 计算细胞存活率。**克隆形成实验:** 将KFB接种在6孔板上培养(5% CO₂、37 °C), 经观察可见克隆后, 经PBS浸洗, 固定液固定, 结晶紫染色, 观察并拍照, 统计克隆细胞数。

1.2.4 划痕实验检测KFB的迁移 将KFB接种在6孔板中培养, 细胞汇合度达100%时, 用200 μL移液枪头划伤细胞, 37 °C、5% CO₂条件下培养24 h, 对0、24 h创面拍照, 计算划痕愈合率。

1.2.5 流式细胞仪检测KFB的凋亡 将KFB接种于6孔板中。处理后细胞用冷PBS洗涤两次, 重悬。根据Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒的说明处理细胞并使用流式细胞仪检测分析KFB细胞的凋亡率。

1.2.6 Western blot检测蛋白表达 收集各组细胞并分别加入RIPA裂解液, 提取总蛋白, 通过BCA法定量蛋白, 并通过SDS-PAGE分离蛋白, 转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, 室温封闭1 h(5%脱脂奶粉), 加入一抗Col-I(1:2 000)、Col-III(1:1 000)、P21(1:1 000)、bax(1:2 000)、XBP1(1:1 000)孵育过夜(4 °C)。加入二抗(1:1 000)室温下孵育1 h, 通过化学发光(electrochemiluminescence, ECL)检测蛋白表达, 凝胶成像系统曝光、拍照。采用ImageJ软件分析各条带灰度值, 以GAPDH(1:10 000)为内参, 分析目标蛋白表达情况。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 将各组KFB接种于48孔板(1×10⁵/孔)并培养(5% CO₂、37 °C), 当细胞融合为单层时, 用Lipofectamine® 3000将XBP1-WT、XBP1-MUT分别与miR-NC、miR-145-5p mimics共转染至细胞, 另外, 将内参质粒(海肾素荧光)及miR-145-5p转染细胞作为对照, 转染48 h, 测定荧光

表1 qPCR引物序列
Table 1 qPCR primer sequences

基因 Gene	上游引物((5'→3') Upstream primers (5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primers (5'→3')
miR-145-5p	CCT TGT CCT CAC GGT CCA GT	AAC CAT GAC CTC AAG AAC AGT ATT T
XBP1	AAG AAC ACG CTT GGG AAT GG	CTG CAC CTG CTG CGG AC
U6	TAT GAT GAT ATC AAG AGG GTA GT	TGT ATC CAA ACT CAT TGT CAT AC
GAPDH	AAC GAG ACG ACG ACA GAC	GCA AAT TCG TGA AGC GTT CCA TA

素酶活性。

1.2.8 动物实验 6~8周龄BALB/c雌性小鼠,购自广东药康生物科技有限公司[SYXK(粤)2022-0286],在特定的无病原体条件下饲养。本研究经广东医科大学附属医院伦理委员会审批(AHGDMU-LAC-B-20221-0060)。瘢痕疙瘩标本用无菌剪刀从表皮上新鲜取出,切成均匀的片状(8 mm×5 mm×5 mm),其余标本作为初始对照。然后将瘢痕疙瘩片植入裸鼠皮下^[9]。植入后第14天,测量种植体的最长和最短直径,计算异种移植体的体积,计算公式为 $V=0.52 \times (\text{长度} \times \text{直径}^2)$ 。将小鼠随机分为Control组、miR-NC组、miR-145-5p mimics组、miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组、miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1组,每组6只,平均异种移植植物体积相等。miR-NC组、miR-145-5p mimics组、miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组、miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1组小鼠每隔一天分别皮下注射miR-NC、miR-145-5p mimics、miR-145-5p mimics和pcDNA-NC、miR-145-5p mimics和pcDNA-XBP1,Control组小鼠注射溶剂。第10天终止实验,石蜡包埋部分异种移植植物,制成组织切片,使用H&E、TUNEL、Masson染色试剂盒分别进行H&E、TUNEL染色及Masson三色染色。石蜡切片经脱蜡至水、抗原修复、室温封闭1 h后采用CD31(1:50)、Ki67(1:200)、CD163(1:500)、Col-I(1:100)一抗进行孵育,然后添加二抗(1:1 000),室温孵育2 h后用DAB显色,苏木素复染,显微镜下计数阳性细胞数。另一部异种移植组织进行miR-145-5p、XBP1 mRNA和蛋白检测,方法参考1.2.2和1.2.6。

1.3 统计学分析

数据以SPSS 25.0软件进行统计学分析,符合

正态分布的计量数据以($\bar{x} \pm s$)描述,多组比较采用单因素方差分析,进一步两两比较用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达miR-145-5p降低了KFB中XBP1 mRNA表达水平

采用qPCR法测量不同细胞中miR-145-5p、XBP1 mRNA表达,结果显示,与NFB组相比,Control组细胞miR-145-5p表达水平降低($P < 0.05$),XBP1 mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$);与Control组、miR-NC组相比,miR-145-5p mimics组细胞miR-145-5p表达水平升高($P < 0.05$),XBP1 mRNA表达水平降低($P < 0.05$);与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组相比,miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1组细胞XBP1 mRNA表达水平升高($P < 0.05$),见表2。这表明miR-145-5p在KFB中下调表达,过表达miR-145-5p能够抑制KFB中XBP1 mRNA表达,而上调XBP1表达可减少这一现象。

2.2 过表达miR-145-5p抑制KFB增殖

利用CCK8和克隆形成实验评估KFB的增殖能力,结果显示,与Control组、miR-NC组相比,miR-145-5p mimics组细胞存活率、克隆数降低($P < 0.05$);与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组相比,miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1组细胞存活率、克隆数升高($P < 0.05$)。见图1和表3。这表明过表达miR-145-5p能够抑制KFB侵袭,而上调XBP1表达可减少这一现象。

2.3 过表达miR-145-5p抑制KFB迁移

通过划痕实验分析KFB迁移能力,结果显

表2 过表达miR-145-5p对KFB中miR-145-5p、XBP1 mRNA表达影响

Table 2 Effect of overexpression of miR-145-5p on the expression of miR-145-5p and XBP1 mRNA in KFB

组别 Groups	miR-145-5p	XBP1 mRNA
NFB	1.00±0.06	1.00±0.08
Control	0.65±0.13 ^a	1.57±0.33 ^a
miR-NC	0.63±0.11	1.52±0.31
miR-145-5p mimics	0.84±0.08 ^{bc}	1.09±0.09 ^{bc}
miR-145-5p mimics+pcDNA-NC	0.87±0.11	1.08±0.07
miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1	0.83±0.07	1.53±0.32 ^d

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P < 0.05$, 与NFB组比较; ^b $P < 0.05$, 与Control组比较; ^c $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; ^d $P < 0.05$, 与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P < 0.05$ compared with the NFB group; ^b $P < 0.05$ compared with the Control group; ^c $P < 0.05$ compared with the miR-NC group; ^d $P < 0.05$ compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA-NC group.

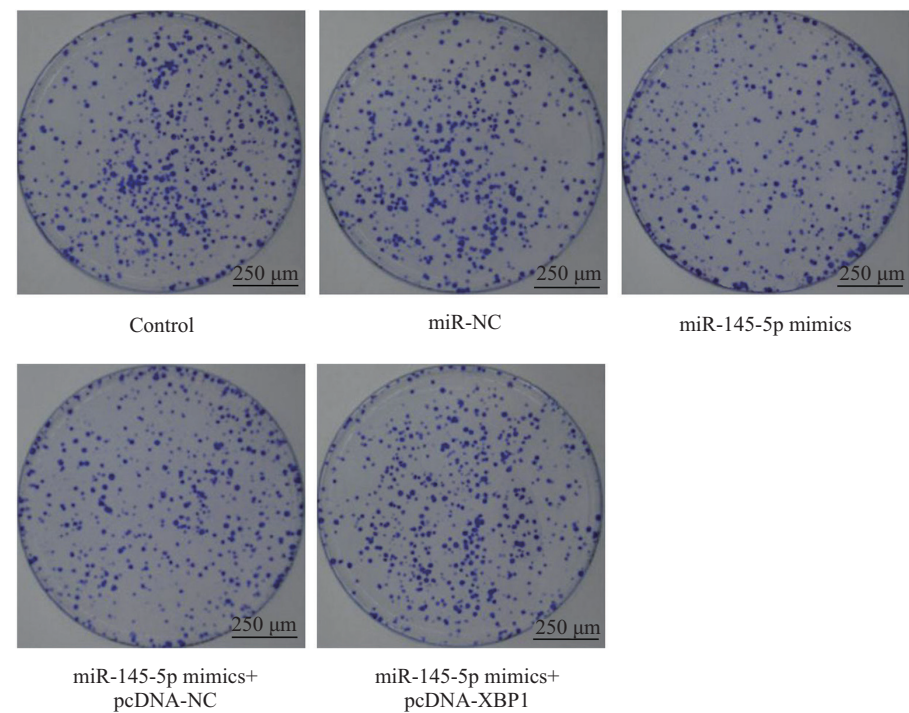


图1 各组KFB克隆形成图

Fig.1 Clone formation diagrams of KFB in each group

表3 过表达miR-145-5p对KFB增殖的影响

Table 3 Effect of overexpression of miR-145-5p on the proliferation of KFB

组别 Groups	存活率/% Survival rate /%	克隆数 Number of clones
Control	98.69±0.48	118.49±10.46
miR-NC	97.46±0.59	115.82±10.37
miR-145-5p mimics	59.68±6.22 ^{ab}	65.29±6.05 ^{ab}
miR-145-5p mimics+pcDNA-NC	62.73±6.45	68.52±6.13
miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1	95.68±0.76 ^c	116.33±10.54 ^c

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较; ^b $P<0.05$, 与miR-NC组比较; ^c $P<0.05$, 与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with the Control group; ^b $P<0.05$ compared with the miR-NC group; ^c $P<0.05$ compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA-NC group.

示, 与Control组、miR-NC组相比, miR-145-5p mimics组细胞划痕愈合率降低 ($P<0.05$); 与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组相比, miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1组细胞划痕愈合率升高 ($P<0.05$)。见图2和表4。这表明过表达miR-145-5p能够抑制KFB迁移, 而上调XBP1表达可减少这一现象。

2.4 过表达miR-145-5p促进KFB凋亡

采用流式细胞术检测细胞凋亡情况, 结果显示, 与Control组、miR-NC组相比, miR-145-5p mimics组细胞凋亡率升高 ($P<0.05$); 与miR-

145-5p mimics+pcDNA-NC组相比, miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1组细胞凋亡率降低 ($P<0.05$)。见图3和表5。这表明过表达miR-145-5p能够促进KFB凋亡, 而上调XBP1表达可减少这一现象。

2.5 过表达miR-145-5p调控KFB中Col-I、Col-III、P21、bax、XBP1蛋白表达

瘢痕疙瘩的形成与胶原蛋白异常沉积和成纤维细胞增殖、凋亡密切相关, Col-I、Col-III是胶原形成相关蛋白, P21和bax分别是增殖和凋亡相关蛋白。XBP1是miR-145-5p下游的可能靶点。为明确miR-145-5p抑制瘢痕疙瘩形成的机制, 本研究使

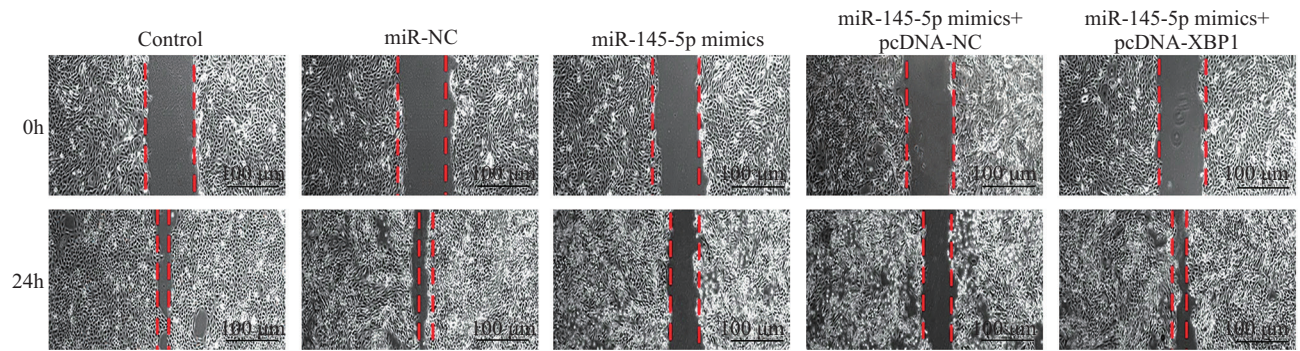


图2 各组KFB迁移图
Fig.2 Migration maps of KFB in each group

表4 过表达miR-145-5p对KFB迁移的影响
Table 4 Effect of overexpression of miR-145-5p on the migration of KFB

组别 Groups	划痕愈合率/% Scratch healing rate /%
Control	74.56±6.38
miR-NC	72.19±6.24
miR-145-5p mimics	41.82±4.16 ^{ab}
miR-145-5p mimics+pcDNA-NC	39.67±3.52
miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1	73.59±6.45 ^c

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较; ^b $P<0.05$, 与miR-NC组比较; ^c $P<0.05$, 与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组比较。
 $\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with the Control group; ^b $P<0.05$ compared with the miR-NC group; ^c $P<0.05$ compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA-NC group.

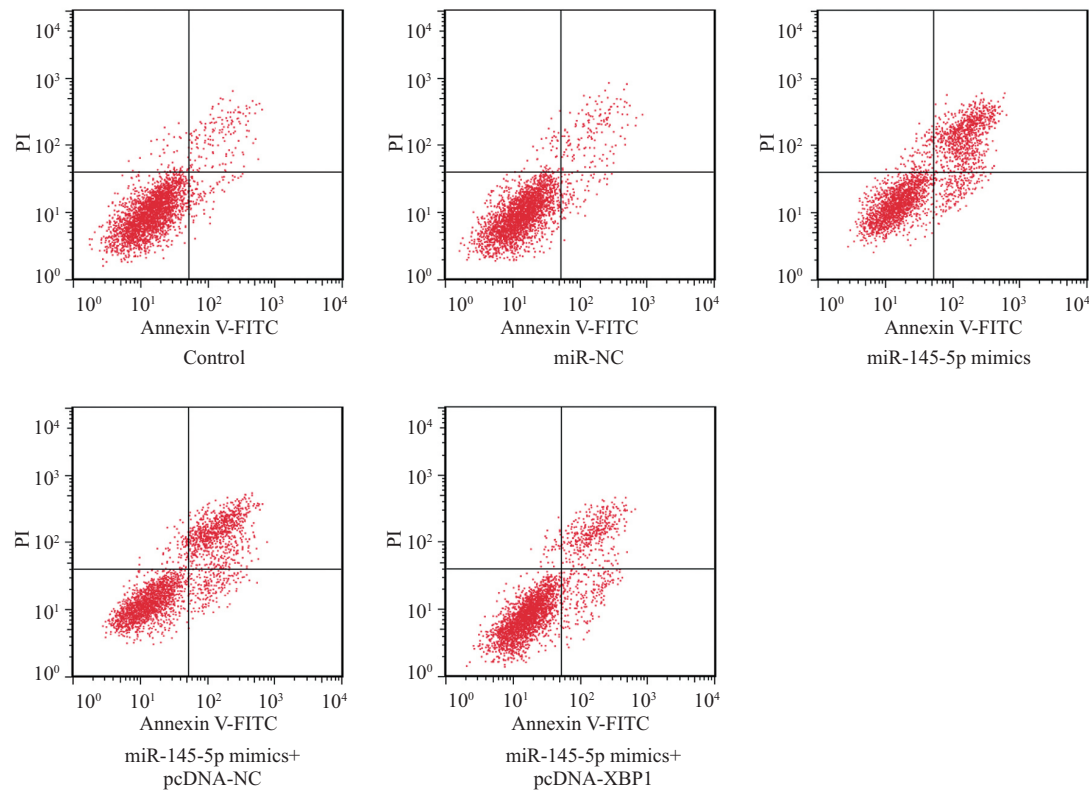


图3 各组KFB流式凋亡图
Fig.3 Flow cytometry apoptosis plots of KFB in each group

表5 过表达miR-145-5p对KFB凋亡率的影响
Table 5 Effect of overexpression of miR-145-5p on the apoptosis rate of KFB

组别 Groups	凋亡率/% Apoptosis rate /%
Control	2.59±0.35
miR-NC	2.87±2.74
miR-145-5p mimics	31.58±3.23 ^{ab}
miR-145-5p mimics+pcDNA-NC	35.64±3.36
miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1	10.08±1.87 ^c

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较; ^b $P<0.05$, 与miR-NC组比较; ^c $P<0.05$, 与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with the Control group; ^b $P<0.05$ compared with the miR-NC group; ^c $P<0.05$ compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA-NC group.

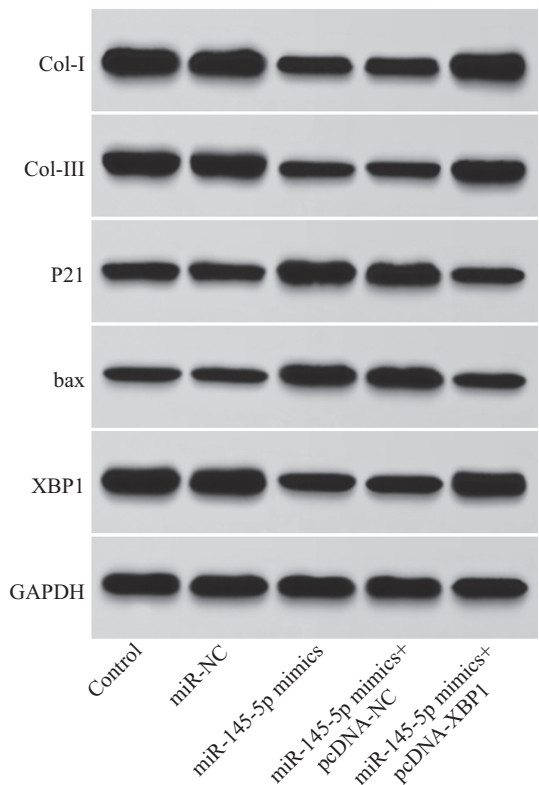


图4 各组KFB中Col-I、Col-III、P21、bax、XBP1蛋白表达图
Fig.4 Expression maps of Col-I, Col-III, P21, bax and XBP1 proteins in each group of KFB

用WB检测了上述蛋白的表达情况,结果显示,与Control组、miR-NC组相比,miR-145-5p mimics组细胞Col-I、Col-III、XBP1蛋白表达水平降低($P<0.05$),P21、bax蛋白表达水平升高($P<0.05$);与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组相比,miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1组细胞Col-I、Col-III、XBP1蛋白表达升高($P<0.05$),P21、bax蛋白表达水平降低($P<0.05$)。见图4和表6。这表明过表达miR-145-5p能够调控胶原形成、细胞增殖和凋亡相关蛋白

表达来抑制KFB增殖,促进凋亡,减少瘢痕疙瘩的形成,而上调XBP1表达可减少这一现象。

2.6 miR-145-5p靶向负调控XBP1

为了确定miR-145-5p的潜在机制,进行了生物信息学分析,发现XBP1 3'UTR包含miR-145-5p的结合位点,见图5。为检测XBP1是否是miR-7-5p的直接靶点,进行了双荧光素酶报告基因检测。结果显示,与miR-NC+XBP1-WT组相比,miR-145-5p mimics+XBP1-WT组相对荧光素酶活性显著降低($P<0.05$),见表7。这表

表6 过表达miR-145-5p对KFB中Col-I、Col-III、P21、bax、XBP1蛋白表达的影响

Table 6 Effects of overexpression of miR-145-5p on the protein expressions of Col-I, COL-III, P21, bax, and XBP1 in KFB

组别 Groups	Col-I	Col-III	P21	bax	XBP1
Control	1.59±0.26	1.32±0.18	0.72±0.11	0.63±0.06	1.43±0.21
miR-NC	1.54±0.23	1.28±0.15	0.69±0.08	0.66±0.08	1.42±0.20
miR-145-5p mimics	0.85±0.14 ^{ab}	0.77±0.12 ^{ab}	1.25±0.16 ^{ab}	1.08±0.13 ^{ab}	0.91±0.16 ^{ab}
miR-145-5p mimics+pcDNA-NC	0.82±0.15	0.74±0.09	1.28±0.18	1.12±0.15	0.89±0.17
miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1	1.56±0.25 ^c	1.29±0.16 ^c	0.70±0.09 ^c	0.65±0.07 ^c	1.37±0.18 ^c

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较; ^b $P<0.05$, 与miR-NC组比较; ^c $P<0.05$, 与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with the Control group; ^b $P<0.05$ compared with the miR-NC group; ^c $P<0.05$ compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA-NC group.

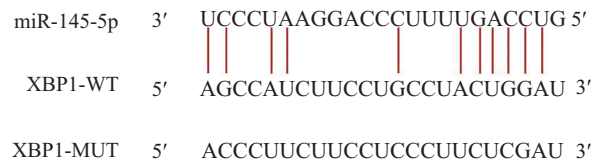


图5 miR-145-5p与XBP1的结合位点

Fig.5 The binding site of miR-145-5p and XBP1

表7 双荧光素酶活性比较

Table 7 Comparison of dual-luciferase activities

组别 Groups	荧光素酶活性 Luciferase activity
miR-NC+XBP1-WT	1.00±0.27
miR-145-5p mimics+XBP1-WT	0.52±0.14 ^a
miR-NC+XBP1-MUT	1.03±0.29
miR-145-5p mimics+XBP1-MUT	0.96±0.25

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与miR-NC+XBP1-WT组比较。

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with the miR-NC+XBP1-WT group.

明miR-145-5p直接靶向负调控XBP1。

2.7 过表达miR-145-5p抑制瘢痕疙瘩植入模型纤维化

使用新鲜瘢痕疙瘩组织在BALB/c裸鼠中建立了瘢痕疙瘩植入模型,以评估miR-145-5p过表达对体内瘢痕疙瘩进展的影响。植入后14天,免疫组化染色显示,人鼠皮肤融合区出现CD31⁺腔样细胞,提示瘢痕疙瘩植入与鼠皮肤形成血管吻合。瘢痕疙瘩植入物显示出与H&E、Masson三色染色和CD163免疫组化染色证实的患者瘢痕疙瘩相同的病理特征(图6)。miR-145-5p mimics干预10天后,植入物体积减少($P<0.05$,图7),Ki67阳性的真皮成纤维细胞的百分比降低至对照组的32.48%($P<0.05$,图8),表明过表达miR-145-5p抑制体内KFB的增殖。H&E染色显示miR-145-5p mimics组免疫细胞聚集程度较高,

与观察到的局部组织坏死增加一致(图9)。TUNEL染色显示miR-145-5p mimics诱导的成纤维细胞凋亡增多($P<0.05$,图10)。此外,miR-145-5p mimics治疗抑制M2巨噬细胞极化,CD163染色几乎为阴性(图8)。Col-I免疫组化染色结果显示,miR-145-5p mimics处理降低了Col-I的阳性率($P<0.05$,图8)。且qPCR和WB结果显示,miR-145-5p mimics处理降低了XBP1表达水平($P<0.05$,图11),提示miR-145-5p mimics处理过表达miR-145-5p具有较强的抗成纤维细胞作用。而在miR-145-5p mimics干预的基础上给予pcDNA-XBP1处理,Ki67、CD163和Col-I阳性细胞比例增高,凋亡细胞增多,免疫细胞聚集程度下降,XBP1表达水平增高,提示miR-145-5p过表达对成纤维细胞的抑制作用可能与XBP1的表达下调相关。

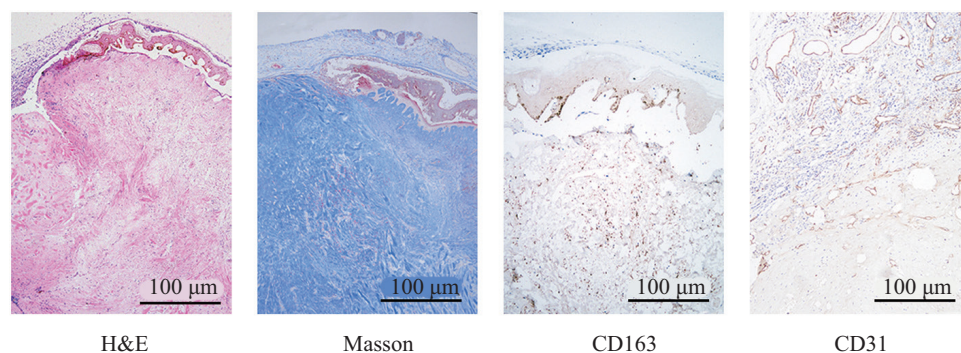


图6 第0天H&E、Masson三色染色和CD163、CD31免疫组化染色的代表性图像

Fig.6 Representative images of H&E and Masson tricolor staining and CD163 and CD31 immunohistochemical staining on day 0

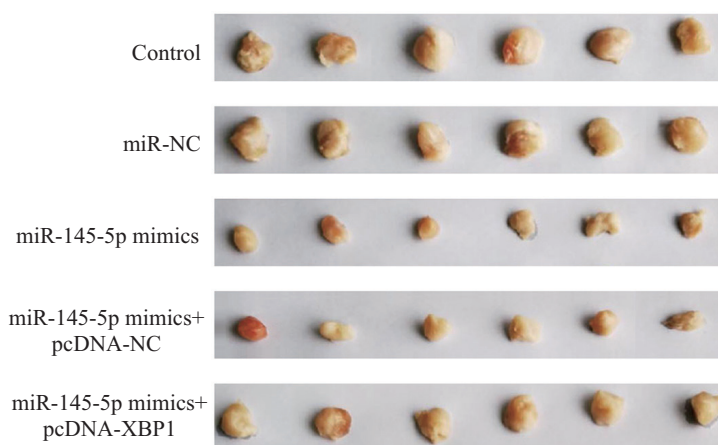


图7 第10天各组异种移植瘤图像

Fig.7 Images of xenografts in each group on the 10th day

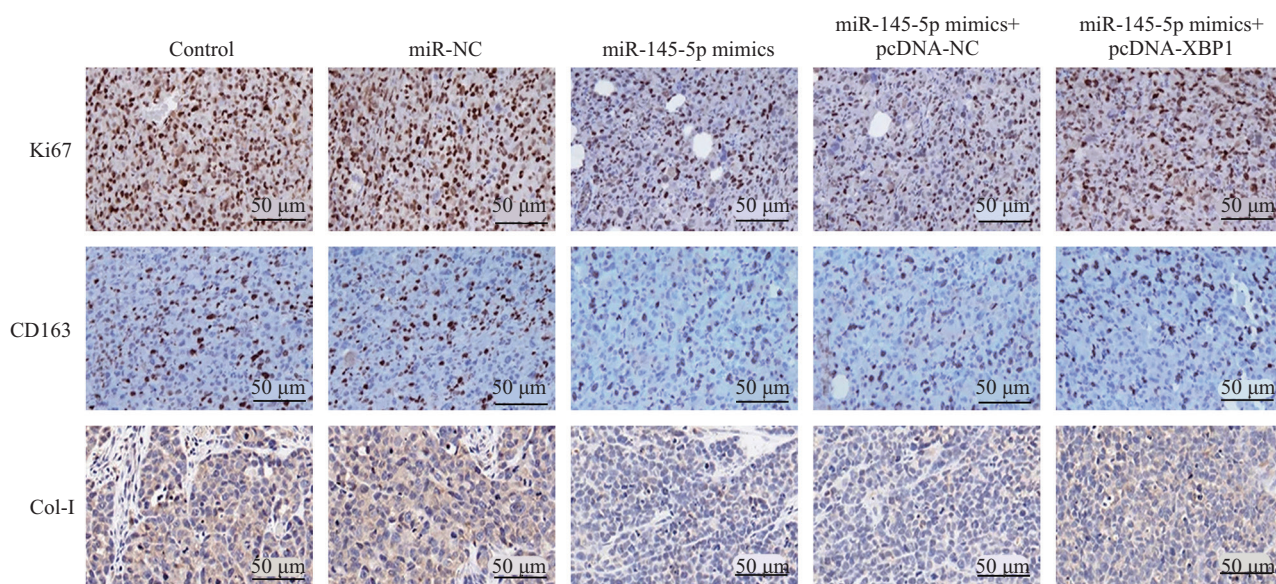


图8 第10天各组异种移植组织Ki67、CD163和Col-I免疫组化染色的代表性图像

Fig.8 Representative immunohistochemical staining images of Ki67, CD163 and Col-I in each group of xenograft tissues on the 10th day

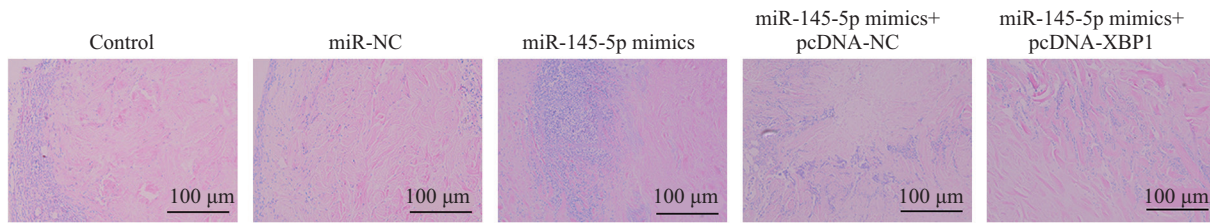


图9 第10天各组异种移植组织HE染色的代表性图像

Fig.9 Representative images of HE staining of xenograft tissues in each group on the 10th day

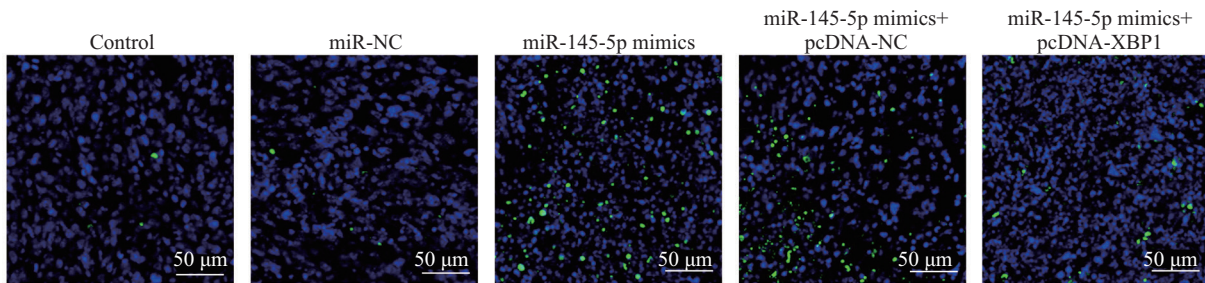


图10 第10天各组异种移植组织TUNEL染色的代表性图像

Fig.10 Representative images of TUNEL staining of each group of xenograft tissues on the 10th day

表8 过表达miR-145-5p对瘢痕疙瘩植入模型纤维化的影响

Table 8 Effect of overexpression of miR-145-5p on fibrosis in keloid implantation models

组别 Groups	植入物体积/mm ³ Implant volume /mm ³	Ki67阳性细胞比例 (% of total) Proportion of Ki67 positive cells (% of total)	CD163阳性细胞比 例(% of total) Proportion of CD163 positive cells (% of total)	Col-I阳性细胞比例 (% of total) Proportion of Col-I positive cells (% of total)	TUNEL阳性细胞比例 (% of total) Proportion of TUNEL positive cells (% of total)
Control	268.75±30.58	100.00±13.14	13.52±3.75	32.14±5.34	2.03±0.57
miR-NC	267.89±29.67	98.79±12.67	12.46±3.53	31.62±5.12	2.12±0.63
miR-145-5p mimics	121.34±16.79 ^{ab}	32.48±5.12 ^{ab}	2.11±0.64 ^{ab}	5.06±0.75 ^{ab}	20.16±4.32 ^{ab}
miR-145-5p mimics+pcDNA-NC	123.51±18.54	34.35±5.89	2.23±0.78	5.16±0.81	18.95±3.97
miR-145-5p mimics+pcDNA- XBP1	213.48±23.15 ^c	81.73±10.35 ^c	8.47±1.33 ^c	20.55±3.85 ^c	7.38±1.21 ^c

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较; ^b $P<0.05$, 与miR-NC组比较; ^c $P<0.05$, 与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with the Control group; ^b $P<0.05$ compared with the miR-NC group; ^c $P<0.05$ compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA-NC group.

3 讨论

瘢痕疙瘩是一种良性真皮肿瘤,实质上是结缔组织增生,超出原来伤口位置,侵入健康皮肤,不仅影响美观,还会引起疼痛、功能障碍等,增加患者心理和生理上痛苦^[10-11]。研究表明,该疾病的发生与胶原蛋白异常沉积以及成纤维细胞增殖、凋亡等过程密切相关,但其病理机制尚未完全阐明,其成为临床治疗的一大难题^[12]。目前,临床治疗多采用手术切除等方式,但是术后畸形发生率高,并且难以治愈^[13],

因此,急需探究瘢痕疙瘩形成的分子机制,为临床治疗提供新的靶点。

已发现多种miRNA参与瘢痕疙瘩的形成,通过影响成纤维细胞的增生、迁移以及细胞外基质沉积等,在伤口愈合过程中发挥重要作用^[14-15]。近几年miR-145-5p在癌症相关疾病中研究较多,miR-145-5p常作为抑癌因子,在多种癌症中发挥抑癌作用,如乳腺癌、前列腺癌等,可作为治疗靶点,诱导其过表达可抑制癌细胞增殖、迁移^[16]。QI等^[17]发现,在

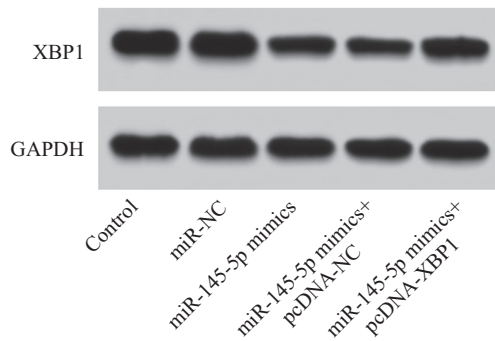


图11 各组异种移植组织中XBP1蛋白表达图

Fig.11 Expression maps of XBP1 protein in xenograft tissues of each group

表9 过表达miR-145-5p对各组异种移植组织中miR-145-5p、XBP1表达的影响

组别 Groups	miR-145-5p	<i>XBP1</i> mRNA	XBP1蛋白 XBP1 protein
Control	0.53±0.06	1.46±0.21	1.29±0.17
miR-NC	0.56±0.07	1.43±0.19	1.27±0.15
miR-145-5p mimics	0.93±0.12 ^{ab}	0.98±0.10 ^{ab}	0.81±0.09 ^{ab}
miR-145-5p mimics+pcDNA-NC	0.95±0.10	0.96±0.09	0.79±0.08
miR-145-5p mimics+pcDNA-XBP1	0.77±0.09 ^c	1.14±0.12 ^c	1.02±0.13 ^c

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$, 与Control组比较; ^b $P<0.05$, 与miR-NC组比较; ^c $P<0.05$, 与miR-145-5p mimics+pcDNA-NC组比较。
 $\bar{x}\pm s$; $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with the Control group; ^b $P<0.05$ compared with the miR-NC group; ^c $P<0.05$ compared with the miR-145-5p mimics+pcDNA-NC group.

KFB细胞中, miR-145-5p表达水平减少, 过表达miR-145-5p可明显降低细胞增殖能力, 提高凋亡率, 可有效治疗瘢痕疙瘩的形成。LIU等^[18]发现, miR-145-5p受到circRNA的调控, 可在KFB中抑制细胞增殖、迁移、侵袭, 促进凋亡, 并且可通过抑制胶原形成相关蛋白Col-I、Col-III的表达, 进而抑制瘢痕疙瘩形成。本研究中, miR-145-5p在KFB细胞中表达水平降低, miR-145-5p过表达可显著抑制细胞存活率和克隆形成能力, 并下调Col-I、Col-III及XBP1蛋白的表达水平, 增殖相关蛋白P21、促凋亡蛋白Bax表达水平及凋亡率升高, 提示过表达miR-145-5p可通过抑制KFB细胞的增殖、迁移, 促进凋亡, 起到抑制瘢痕疙瘩形成的作用。

既往研究表明, XBP1在多种恶性肿瘤疾病中呈高表达, 与肿瘤细胞增殖存在密切联系^[19]。HAN等^[20]研究表明, XBP1在瘢痕疙瘩组织中表达呈激活状态, 对于KFB细胞的周期、增殖进程存在促进作用, 进一步研究证实, 抑制IRE1 α /XBP1通路激活, 可抑制KFB细胞增殖。SONG等^[21]发现, XBP1受miRNA调控, 在细胞增殖及炎症反应中发挥重要作用, 如

miR-34a-5p可以通过直接抑制XBP1表达抑制成纤维样滑膜细胞增殖及炎症因子的释放。HAM等^[22]发现, 在成纤维细胞中, 过表达热休克蛋白47可促进XBP1分泌, 进而诱导胶原蛋白Col-I表达, 加快胶原形成。本研究发现, 在KFB细胞中, XBP1明显上调, 提示XBP1表达水平升高可能是瘢痕疙瘩形成的重要原因。通过生物信息学分析发现, miR-145-5p与*XBP1*存在结合位点, miR-145-5p可靶向负调控XBP1表达, 过表达XBP1可部分逆转过表达miR-145-5p对KFB细胞增殖、迁移、凋亡及胶原形成相关蛋白表达的影响, 提示miR-145-5p可能是通过抑制XBP1表达, 抑制KFB细胞增殖、迁移及胶原形成, 促进细胞凋亡, 进而抑制瘢痕疙瘩的形成的。近年研究显示, IRE1 α /XBP1通路在KFB中被激活, 敲除基因*IRE1 α* 可抑制TGF- β 1的表达^[20], 本研究推测TGF- β 1可能是XBP1的下游靶点, 但二者在瘢痕疙瘩形成中的调控关系仍需进一步研究证实。

最后, 本研究通过建立患者来源的异种移植模型发现, miR-145-5p过表达能抑制瘢痕疙瘩增殖、诱导细胞凋亡和减少Col-I阳性表达, 并通过回复实

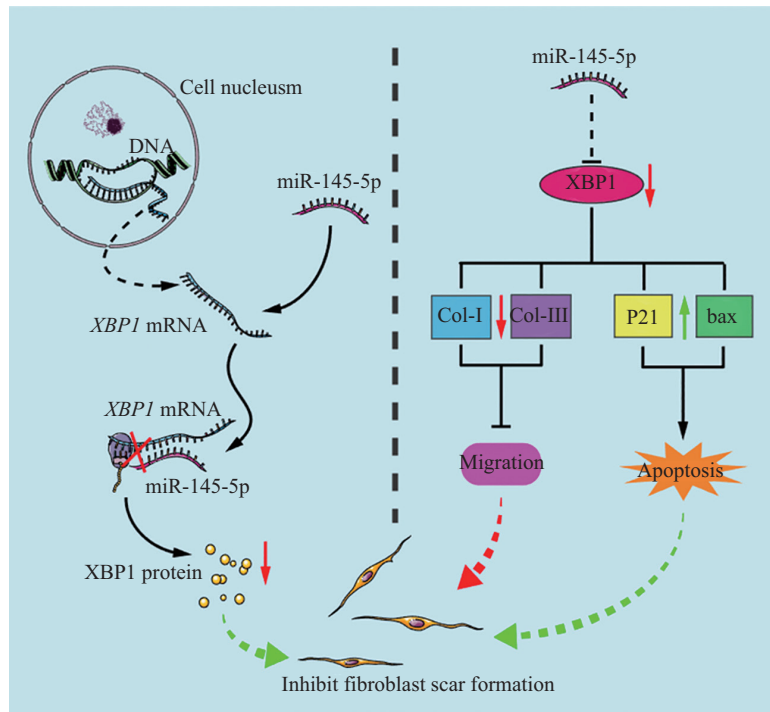


图12 miR-145-5p靶向XBP1调控人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的原理图

Fig.12 Schematic diagram of miR-145-5p targeting XBP1 to regulate the proliferation and apoptosis of human keloid fibroblasts

验证了miR-145-5p对XBP1的靶向下调作用, 突出了我们研究结果的临床和转化前景。因为仍然缺乏成熟的瘢痕疙瘩动物模型, 我们相信类器官培养和患者来源的异种移植将克服目前的困难^[23]。

综上所述, miR-145-5p可能通过靶向调控XBP1表达, 进而抑制KFB细胞增殖, 促进细胞凋亡。

参考文献 (References)

- [1] DENG C C, HU Y F, ZHU D H, et al. Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3709-21.
- [2] ZHANG H, ZANG C, ZHAO W, et al. Exosome derived from mesenchymal stem cells alleviates hypertrophic scar by inhibiting the fibroblasts via TNFSF-13/HSPG2 signaling pathway [J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18: 7047-63.
- [3] MENG S, WEI Q, CHEN S, et al. miR-141-3p-functionalized exosomes loaded in dissolvable microneedle arrays for hypertrophic scar treatment [J]. Small, 2024, 20(8): 5374-86.
- [4] 高栋梁, 高东东, 白翠翠, 等. miR-582-5p靶向DNMT1对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和凋亡的影响[J]. 河北医药(GAO D L, GAO D D, BAI C C, et al. Effects of miR-582-5p targeting DNMT1 on the proliferation and apoptosis of human keloid fibroblasts [J]. Hebei Medical Journal), 2021, 43(9): 1302-6,11.
- [5] 田朝霞, 李卫萍, 赵娜, 等. miR-145-5p在原发性高血压患者血清中的表达及其对人脐静脉内皮细胞增殖和凋亡的影响[J]. 医学研究与战创伤救治(TIAN Z X, LI W P, ZHAO N, et al. Expression of miR-145-5p in serum of patients with essential hypertension and its impacts on the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells [J]. Journal of Medical Research & Combat Trauma Care), 2024, 37(5): 504-8.
- [6] JI S, SHI Y, YANG L, et al. miR-145-5p inhibits neuroendocrine differentiation and tumor growth by regulating the SOX11/MYCN axis in prostate cancer [J]. Front Genet, 2022, 13(10): 621-35.
- [7] LIU Z, WANG M, WANG X, et al. XBP1 deficiency promotes hepatocyte pyroptosis by impairing mitophagy to activate mtDNA-cGAS-STING signaling in macrophages during acute liver injury [J]. Redox Biol, 2022, 52(8): 2305-16.
- [8] ARGÜELLO-MIRANDA O, MARCHAND A J, KENNEDY T, et al. Cell cycle-independent integration of stress signals by Xbp1 promotes Non-G₁/G₀ quiescence entry [J]. J Cell Biol, 2022, 221(1): 3171-82.
- [9] CHAO H, ZHENG L, HSU P, et al. IL-13RA2 downregulation in fibroblasts promotes keloid fibrosis via JAK/STAT6 activation [J]. JCI Insight, 2023, 8(6): e157091.
- [10] MASCHARAK S, DESJARDINS-PARK H E, DAVITT M F, et al. Preventing Engrailed-1 activation in fibroblasts yields wound regeneration without scarring [J]. Science, 2021, 372(6540): 2374-85.
- [11] 张佳音, 饶美荣, 钟咪, 等. 马齿苋提取物调控miR-199a-5p对人瘢痕疙瘩成纤维细胞生长和胶原合成的影响[J]. 中成药(ZHANG J Y, RAO M R, ZHONG M, et al. The effect of purslane extract regulating miR-199a-5p on the growth and collagen synthesis of human keloid fibroblasts [J]. Chinese Traditional Patent Medicine), 2023, 45(3): 969-72.
- [12] 林颜, 阮树斌, 陈晓东, 等. miR-214-5p通过调控SFRP2影响人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、凋亡 [J]. 中国老年学杂志(LIN Y, RUAN S B, CHEN X D, et al. miR-214-5p affects the proliferation and apoptosis of human keloid fibroblasts by regulating SFRP2 [J]. Chinese Journal of Gerontology), 2023, 38(10): 2345-50.

- eration and apoptosis of human keloid fibroblasts by regulating SFRP2 [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2021, 41(23): 5325-30.
- [13] ZHANG Q, WANG M, DENG X, et al. Shikonin promotes hypertrophic scar repair by autophagy of hypertrophic scar-derived fibroblasts [J]. Acta Cir Bras, 2023, 38(13): 84623-36.
- [14] LI Y, ZHANG J, SHI J, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells attenuate hypertrophic scar fibrosis by miR-192-5p/IL-17RA/Smad axis [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 221-34.
- [15] ZHANG Y, PAN Y, LIU Y, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor- β receptor inhibition [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 434-45.
- [16] 赵微, 李润滋, 张雨, 等. miR-145-5p对口腔鳞癌细胞增殖的调控作用及其机制[J]. 成都医学院学报(ZHAO W, LI R Z, ZHANG Y, et al. Regulation of miR-145-5p on the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells and its mechanism [J]. Journal of Chengdu Medical College), 2024, 19(2): 225-30.
- [17] QI X, LIU Y, YANG M. Circ_0057452 functions as a ceRNA in hypertrophic scar fibroblast proliferation and VEGF expression by regulating TGF- β 2 expression and adsorbing miR-145-5p [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(6): 6200-10.
- [18] LIU Y, WANG X, NI Z, et al. Circular RNA hsa_circ_0043688 serves as a competing endogenous RNA for microRNA-145-5p to promote the progression of keloids via fibroblast growth factor-2 [J]. J Clin Lab Anal, 2022, 36(8): 4528-39.
- [19] 倪海强, 彭宣, 顾世琦, 等. 下调XBP1s通过抑制ITPR介导的线粒体功能障碍改善肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤[J]. 器官移植(NI H Q, PENG X, GU S Q, et al. Down-regulating XBP1s alleviates hypoxia/reoxygenation injury of renal tubular epithelial cells by inhibiting ITPR-mediated mitochondrial dysfunction [J]. Organ Transplantation), 2024, 15(2): 220-8.
- [20] HAN X, JIANG S, HU C, et al. Inhibition of keloid fibroblast proliferation by artesunate is mediated by targeting the IRE1 α /XBP1 signaling pathway and decreasing TGF- β 1 [J]. Burns, 2024, 50(5): 1259-68.
- [21] SONG A F, KANG L, WANG Y F, et al. miR-34a-5p inhibits fibroblast-like synoviocytes proliferation via XBP1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(22): 11675-82.
- [22] HAM S Y, PYO M J, KANG M, et al. HSP47 increases the expression of type I collagen in fibroblasts through IRE1 α activation, XBP1 splicing, and nuclear translocation of β -catenin [J]. Cells, 2024, 13(6): 527-38.
- [23] UD-DIN S, BAYAT A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* models of wounds and scars in human skin [J]. Wound Repair Regen, 2017, 25(2): 164-76.