

LncRNA LHFPL3-AS1靶向miR-145-5p/*ATF3*轴 调控瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和侵袭

吴希晞¹ 周楚超¹ 王菁菁² 杨艳清^{1*}

(¹武汉市第三医院整形外科, 武汉 430000; ²武汉市第三医院药学部, 武汉 430000)

摘要 瘢痕疙瘩是皮肤损伤后形成的病理性瘢痕, 该研究旨在探讨LncRNA LHFPL3-AS1靶向miR-145-5p/*ATF3*轴对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和侵袭的影响。将瘢痕疙瘩成纤维细胞系HKF分为control组、si-NC组、si-LHFPL3-AS1组、si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC组、si-LHFPL3-AS1+miR-145-5p inhibitor组、miR-NC组、miR-145-5p mimic组、miR-145-5p mimic+pc-NC组、miR-145-5p mimic+pc-*ATF3*组。qRT-PCR检测LncRNA LHFPL3-AS1、miR-145-5p、*ATF3* mRNA表达水平; MTT法检测细胞增殖情况; Transwell检测细胞侵袭情况; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; Western blot法检测*ATF3*、Collagen I蛋白表达水平; 双荧光素酶报告基因实验检测LncRNA LHFPL3-AS1与miR-145-5p、miR-145-5p与*ATF3*的相互作用。结果发现, 与正常皮肤细胞相比, HKF细胞中LncRNA LHFPL3-AS1、*ATF3* mRNA水平升高, miR-145-5p水平降低($P<0.05$)。与si-NC组比较, si-LHFPL3-AS1组HKF细胞中LncRNA LHFPL3-AS1水平、*ATF3*蛋白表达水平以及细胞增殖和侵袭能力均降低, miR-145-5p水平和细胞凋亡率升高($P<0.05$); 与si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC组相比, si-LHFPL3-AS1+miR-145-5p inhibitor组HKF细胞的miR-145-5p水平降低, *ATF3*蛋白表达水平以及细胞增殖和侵袭能力提高, 凋亡率降低($P<0.05$)。与miR-NC组相比, miR-145-5p mimic组HKF细胞中*ATF3*蛋白表达水平以及细胞增殖和侵袭能力降低, 凋亡率升高($P<0.05$); 与miR-145-5p mimic+pc-NC组相比, miR-145-5p mimic+pc-*ATF3*组HKF细胞中*ATF3*蛋白表达水平以及细胞增殖和侵袭能力提高, 凋亡率降低($P<0.05$)。双荧光素酶活性显示, LncRNA LHFPL3-AS1与miR-145-5p、miR-145-5p与*ATF3*具有靶向关系($P<0.05$)。总结得出, LncRNA LHFPL3-AS1可能通过靶向调控miR-145-5p/*ATF3*轴来调控HKF细胞增殖和侵袭。

关键词 LncRNA LHFPL3-AS1; miR-145-5p; *ATF3*; 瘢痕疙瘩; 成纤维细胞

LncRNA LHFPL3-AS1 Regulates the Proliferation and Invasion of Keloid Fibroblasts by Targeting the miR-145-5p/*ATF3* Axis

WU Xixi¹, ZHOU Chuchao¹, WANG Jingjing², YANG Yanqing^{1*}

(¹Department of Plastic Surgery, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430000, China;

²Department of Pharmacy, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430000, China)

Abstract Keloids are pathological scars formed after skin lesions. This study aims to explore the effect of LncRNA LHFPL3-AS1 targeting miR-145-5p/*ATF3* axis on the proliferation and invasion of keloid fibroblasts. The keloid fibroblast line HKF was assigned into control group, si-NC group, si-LHFPL3-AS1 group, si-LHFPL3-

收稿日期: 2025-06-10

接受日期: 2025-07-18

武汉市卫生健康委员会医学科学研究项目(批准号: WX23A07)资助的课题

*通信作者。Tel: 027-65399466, E-mail: ojot49@163.com

Received: June 10, 2025

Accepted: July 18, 2025

This work was supported by the Medical Science Research Project of Wuhan City Health Commission (Grant No. WX23A07)

*Corresponding author. Tel: +86-27-65399466, E-mail: ojot49@163.com

AS1+inhibitor NC group, si-LHFPL3-AS1+miR-145-5p inhibitor group, miR-NC group, miR-145-5p mimic group, miR-145-5p mimic+pc-NC group, and miR-145-5p mimic+pc-ATF3 group. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of LncRNA LHFPL3-AS1, miR-145-5p, and *ATF3*. MTT assay was used to detect cell proliferation. Transwell method was used to detect invasion. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western blot was used to detect ATF3 and Collagen I proteins. Dual luciferase reporter gene assay was used to detect the interaction between LncRNA LHFPL3-AS1 and miR-145-5p, as well as miR-145-5p and *ATF3*. The results showed that compared with normal skin cells, the levels of LncRNA LHFPL3-AS1 and *ATF3* mRNA in HKF cells raised, while the level of miR-145-5p reduced ($P<0.05$). Compared with si-NC group, the LncRNA LHFPL3-AS1 level, ATF3 protein expression, cell proliferation and invasion abilities in HKF cells in si-LHFPL3-AS1 group were all reduced, and the miR-145-5p level and cell apoptosis rate were increased ($P<0.05$). Compared with si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC group, the miR-145-5p level of HKF cells in the si-LHFPL3-AS1+miR-145-5p inhibitor group was decreased, the ATF3 protein expression, cell proliferation and invasion abilities were improved, and the apoptosis rate was decreased ($P<0.05$). Compared with miR-NC group, miR-145-5p mimic group showed a decrease in ATF3 protein expression, reduced cell proliferation and invasion abilities, and raised apoptosis rate in HKF cells ($P<0.05$). Compared with miR-145-5p mimic+pc-NC group, miR-145-5p mimic+pc-ATF3 group showed raised expression of ATF3 protein, enhanced proliferation and invasion abilities, and reduced apoptosis rate in HKF cells ($P<0.05$). Dual luciferase activity showed that LncRNA LHFPL3-AS1 had a targeted relationship with miR-145-5p, and miR-145-5p had a targeted relationship with *ATF3* ($P<0.05$). In summary, LncRNA LHFPL3-AS1 may regulate proliferation and invasion of HKF cells by targeting miR-145-5p/*ATF3* axis.

Keywords LncRNA LHFPL3-AS1; miR-145-5p; ATF3; keloid; fibroblasts

瘢痕疙瘩是皮肤损伤后高出皮肤表面的病理性瘢痕,其发病机制十分复杂,病变范围常超出原损伤边界,且不会随时间自然消退,目前主要病因包括成纤维细胞过度增生、胶原及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积、血管生成过多等^[1]。瘢痕经常复发,且很少消退,会破坏美观,引起疼痛、瘙痒以及心理压力^[2]。因此需要对瘢痕疙瘩形成的分子机制进行探究,并开发其治疗方法。竞争性内源性RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)包括各种RNA种类,例如长非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)、基因组病毒RNA和环状RNA(circular RNA, circRNA),通过微小RNA(microRNA, miRNA)调节基因表达。CeRNA-miRNA-mRNA相互作用创造了一个复杂的转录后调控网络,已有研究发现几种ceRNA网络参与皮肤老化和伤口愈合的分子基础^[3]。有研究鉴定出了与人瘢痕疙瘩上皮-间质转化相关的生物标志物,其中包括miR-145-5p^[4]。另有研究表明, circ_0057452通过调节转化生长因子- β 2(transforming growth factor- β 2, TGF- β 2)表达和吸附miR-145-5p在增生性瘢痕成纤维细胞增殖和血管内皮生长因子(vascular

endothelial growth factor, VEGF)表达中发挥ceRNA的作用^[5]。此外,生物信息学网站预测显示LncRNA LHFPL3-AS1与miR-145-5p有互补结合序列,因此,本研究将对LncRNA LHFPL3-AS1与miR-145-5p在瘢痕疙瘩中的作用进行探究。激活转录因子3(activating transcription factor 3, ATF3)是ATF/cAMP反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)家族的成员,在细胞应对各种应激和损伤时起着至关重要的作用,ATF3是炎症、氧化应激和免疫反应之间的重要纽带^[6]。ATF3通过TGF- β /SMAD信号通路调节瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长、凋亡、侵袭和胶原蛋白合成^[7]。已有研究表明,ATF3是miR-145-5p的靶点^[8]。因此,本研究旨在探究LncRNA LHFPL3-AS1靶向miR-145-5p/*ATF3*轴对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

HKF细胞(人瘢痕疙瘩成纤维细胞,货号:JSY-CC3650)、TE353.sk细胞(人正常皮肤细胞,货号:JSY-CC3784)购自金少源(上海)生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

si-LHFPL3-AS1、si-NC、miR-145-5p mimic、miR-NC、miR-145-5p inhibitor、inhibitor NC、pcDNA-NC、pcDNA-ATF3购自上海吉玛制药有限公司; 第三代全长cDNA一链合成试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; RIPA裂解液、qRT-PCR高品质预混液购自上海碧云天生物技术有限公司; MTT试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; Lipofectamine 2000转染试剂购自美国ThermoFisher Scientific公司; 增强型ECL化学发光检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; ATF3(货号: ab207434)、Collagen I(货号: ab260043)、GAPDH兔单克隆抗体(货号: ab313650)、羊抗兔IgG二抗(HRP标记, 货号: ab205718)购自英国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与分组转染 使用含10% FBS的DMEM培养基培养HKF细胞和TE353.sk细胞, 37 °C、5% CO₂的条件下培养。将HKF细胞分为control组(不转染质粒)、si-NC组(转染si-NC)、si-LHFPL3-AS1组(转染si-LHFPL3-AS1)、miR-NC组(转染miR-NC)、miR-145-5p mimic组(转染miR-145-5p mimic)、si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC组(共转染si-LHFPL3-AS1与inhibitor NC)、si-LHFPL3-AS1+miR-145-5p inhibitor组(共转染si-LHFPL3-AS1与miR-145-5p inhibitor)、miR-145-5p mimic+pc-NC组(共转染miR-145-5p mimic与pcDNA-NC)、miR-145-5p mimic+pc-ATF3组(共转染miR-145-5p mimic与pcDNA-ATF3), 转染组均使用Lipofectamine 2000进行质粒转染。

1.3.2 qRT-PCR检测LncRNA LHFPL3-AS1、miR-145-5p和ATF3 mRNA水平 使用TRIzol试剂从细

胞中提取RNA, 用紫外分光光度计测定总RNA浓度。然后按照第三代全长cDNA一链合成试剂盒的说明将RNA逆转录为cDNA。反应体系的构建和条件的准备按照qRT-PCR试剂盒的说明书进行。采用2^{-ΔΔC_t}法计算基因相对表达水平, 其中, miR-145-5p以U6为内参, LncRNA LHFPL3-AS1、ATF3以GAPDH为内参, 引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成, 引物序列见表1。

1.3.3 MTT检测细胞增殖情况 将HKF细胞接种于96孔板中, 密度为3×10³/孔, 加入200 mL DMEM培养基, 37 °C下培养12 h。随后分别将质粒转染到各组细胞中。转染48 h后, 向90 μL新鲜培养基中加入10 μL MTT溶液, 培养4 h并按照试剂盒说明书进行后续操作, 在490 nm波长处检测吸光度(D)值。

1.3.4 Transwell检测细胞侵袭情况 将转染的HKF细胞放入无血清培养基中, 并以1×10⁵/mL密度接种到上室, 上室涂有基质胶, 下室则加入含血清培养基。随后, 将细胞于37 °C孵育24 h, 用0.1%结晶紫对膜下表面的细胞进行染色。最后, 使用显微镜观察细胞侵袭情况。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况 收集HKF细胞(5×10⁵个), 清洗后用冰冷乙醇于-20 °C固定过夜, 再用5 μL FITC标记的Annexin V和10 μL含有PI的染色液重悬细胞, 室温避光孵育10 min后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.6 Western blot检测ATF3、Collagen I的蛋白表达情况 用裂解液裂解细胞获取总蛋白, 取等量蛋白样品(20 μg)进行10% SDS-PAGE分离蛋白, 然后将其转移到PVDF膜上, 用5%脱脂奶粉室温封闭2 h。将膜与针对ATF3(稀释度1:1 000)、Collagen I(稀释度1:1 000)、GAPDH(稀释度1:1 000)的一抗于4 °C下孵育过夜。用TBST洗涤膜3次后, 将膜与HRP标记的二抗(稀释度1:10 000)在室温下孵育2 h。使用增强型

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	上游引物(5'→3') Upstream primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primer (5'→3')
LHFPL3-AS1	ATG GGA AGG CAA GTC ATG AA	GGC CCG AGC ATC AGC CTG TG
miR-145-5p	GTC CAG TTT TCC CAG GA	GAA CAT GTC TGC GTA TCT C
ATF3	TTT GCT AAC CTG ACG CCC TT	TGA CTG ATT CCA GCG CAG AG
U6	CTC GCT TCG GCA GCA CA	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
GAPDH	GGT CAC CAG GGC TGC TTT	GGA AGA TGG TGA TGG GAT T

ECL化学发光检测试剂盒检测蛋白质信号,并使用Quantity-One软件进行定量。

1.3.7 双荧光素酶实验检测LncRNA LHFPL3-AS1、miR-145-5p、ATF3之间的靶向关系 构建LncRNA LHFPL3-AS1-野生型(WT)、LncRNA LHFPL3-AS1-突变型(MUT)、ATF3-WT、ATF3-MUT质粒,将HKF细胞以 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于6孔板中,当其生长至对数期时,将LncRNA LHFPL3-AS1-WT、LncRNA LHFPL3-AS1-MUT质粒分别与miR-NC、miR-145-5p mimic共转染HKF细胞;ATF3-WT、ATF3-MUT质粒分别与miR-NC、miR-145-5p mimic共转染HKF细胞,48 h后,使用双荧光素酶活性检测系统进行检测。

1.4 统计学分析

实验数据用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各实验均设置6次生物学重复,采用Graphpad Prism 7.0软件进行统计分析, t 检验比较两组间差异;多组比较采用单因素方差分析,Tukey's检验进一步比较两组间

差异。 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

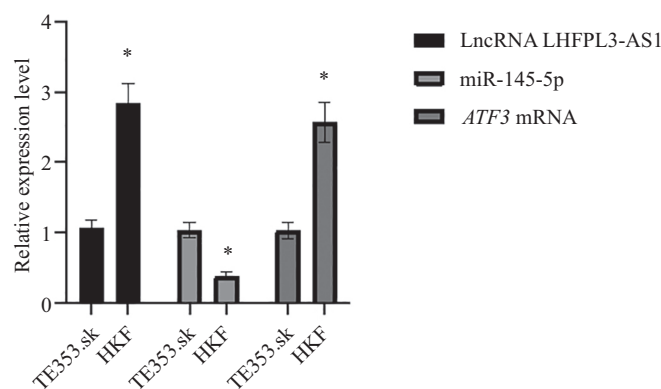
2 结果

2.1 HKF中LncRNA LHFPL3-AS1、miR-145-5p、ATF3 mRNA水平

与TE353.sk细胞比较,HKF细胞中LncRNA LHFPL3-AS1和ATF3 mRNA水平升高,miR-145-5p水平降低($P < 0.05$),见图1。

2.2 干扰LncRNA LHFPL3-AS1后LncRNA LHFPL3-AS1、miR-145-5p水平及ATF3、Collagen I蛋白表达情况

与control组和si-NC组比较,si-LHFPL3-AS1组HKF中LncRNA LHFPL3-AS1水平以及ATF3、Collagen I蛋白表达水平降低,miR-145-5p水平升高($P < 0.05$);与si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC组比较,si-LHFPL3-AS1+miR-145-5p inhibitor组HKF中miR-145-5p水平降低,ATF3、Collagen I蛋白表达水平升高($P < 0.05$),见图2与图3。

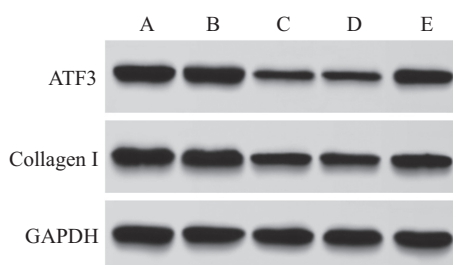


* $P < 0.05$, 与TE353.sk细胞相比。 $n=6$, $\bar{x} \pm s$ 。

* $P < 0.05$ compared with TE353.sk cells. $n=6$, $\bar{x} \pm s$ 。

图1 两组细胞LncRNA LHFPL3-AS1、miR-145-5p、ATF3 mRNA水平比较

Fig.1 Comparison of LncRNA LHFPL3-AS1, miR-145-5p and ATF3 mRNA levels in two groups of cells



A: control组; B: si-NC组; C: si-LHFPL3-AS1组; D: si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC组; E: si-LHFPL3-AS1+miR-145-5p inhibitor组。

A: control group; B: si-NC group; C: si-LHFPL3-AS1 group; D: si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC group; E: si-LHFPL3-AS1+miR-145-5p inhibitor group.

图2 各组HKF细胞ATF3、Collagen I蛋白条带

Fig.2 Protein bands of ATF3 and Collagen I of HKF cells in each group

2.3 干扰LncRNA LHFPL3-AS1对HKF细胞的影响

与control组和si-NC组比较, si-LHFPL3-AS1组HKF细胞的 D 值降低, 侵袭细胞数减少, 凋亡率增加($P<0.05$); 与si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC组比较, si-LHFPL3-AS1+miR-145-5p inhibitor组HKF细胞的 D 值升高, 侵袭细胞数增加, 凋亡率降低($P<0.05$), 见图4和图5。

2.4 过表达miR-145-5p后miR-145-5p水平及ATF3、Collagen I蛋白表达情况

与control组和miR-NC组比较, miR-145-5p

mimic组HKF细胞中miR-145-5p表达水平升高, ATF3、Collagen I的蛋白表达水平降低($P<0.05$); 与miR-145-5p mimic+pc-NC组比较, miR-145-5p mimic+pc-ATF3组HKF中ATF3、Collagen I蛋白表达水平升高($P<0.05$), 见图6和图7。

2.5 过表达miR-145-5p对HKF细胞的影响

与control组和miR-NC组比较, miR-145-5p mimic组HKF细胞的 D 值降低, 侵袭细胞数减少, 凋亡率增加($P<0.05$); 与miR-145-5p mimic+pc-NC组比较, miR-145-5p mimic+pc-ATF3组HKF细胞的 D 值升

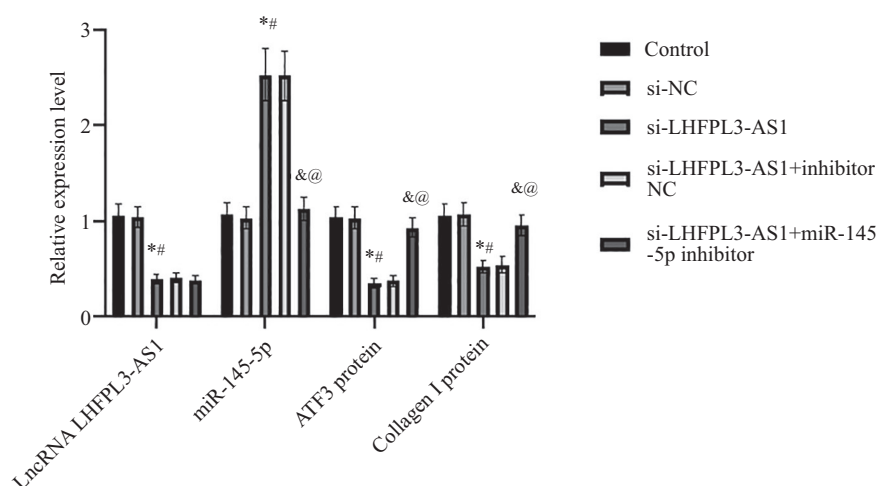


图3 HKF细胞中LncRNA LHFPL3-AS1、miR-145-5p以及ATF3、Collagen I蛋白表达水平比较
* $P<0.05$, 与control组相比; [#] $P<0.05$, 与si-NC组相比; ^{*} $P<0.05$, 与si-LHFPL3-AS1组相比; [@] $P<0.05$, 与si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC组相比。n=6, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with control group; [#] $P<0.05$ compared with si-NC group; ^{*} $P<0.05$ compared with si-LHFPL3-AS1 group; [@] $P<0.05$ compared with si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC group. n=6, $\bar{x}\pm s$.

图3 HKF细胞中LncRNA LHFPL3-AS1、miR-145-5p以及ATF3、Collagen I蛋白表达水平比较
Fig.3 Comparison of expression levels of LncRNA LHFPL3-AS1, miR-145-5p, ATF3 and Collagen I in HKF cells

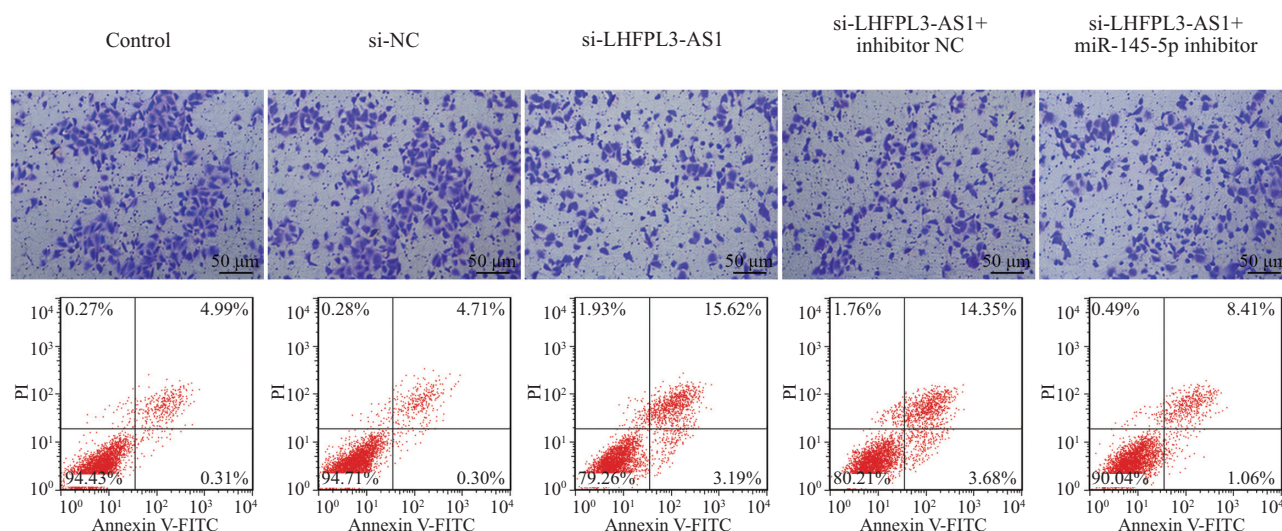
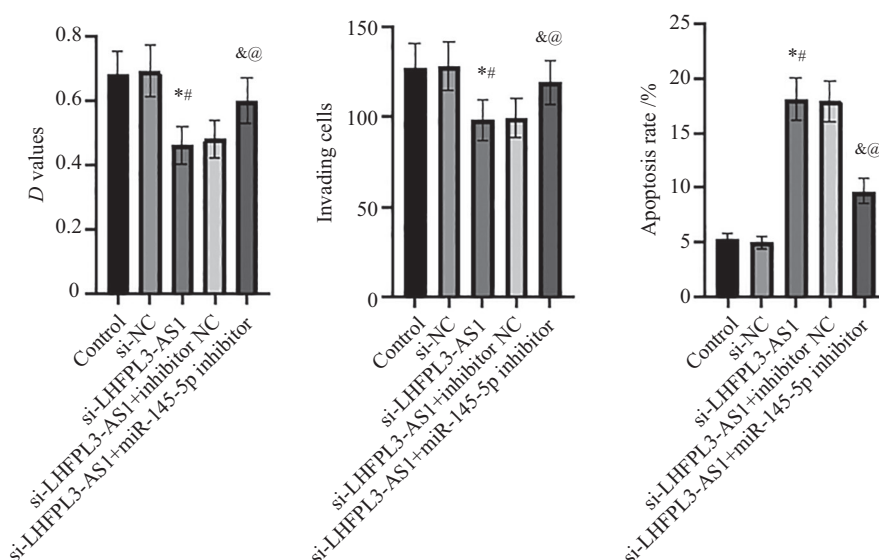


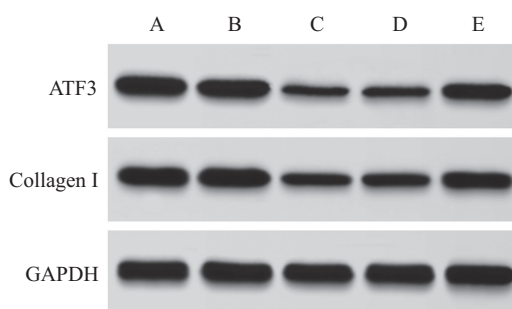
图4 各组HKF细胞Transwell侵袭和凋亡情况
Fig.4 Transwell invasion and apoptosis of HKF cells in each group



* $P < 0.05$, 与control组相比; # $P < 0.05$, 与si-NC组相比; & $P < 0.05$, 与si-LHFPL3-AS1组相比; @ $P < 0.05$, 与si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC组相比。 $n=6$, $\bar{x} \pm s$ 。
* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with si-NC group; & $P < 0.05$ compared with si-LHFPL3-AS1 group; @ $P < 0.05$ compared with si-LHFPL3-AS1+inhibitor NC group. $n=6$, $\bar{x} \pm s$.

图5 各组HKF细胞增殖、侵袭、凋亡比较

Fig.5 Comparison of proliferation, invasion and apoptosis of HKF cells in each group



A: control组; B: miR-NC组; C: miR-145-5p mimic组; D: miR-145-5p mimic+pc-NC组; E: miR-145-5p mimic+pc-ATF3组。

A: control group; B: miR-NC group; C: miR-145-5p mimic group; D: miR-145-5p mimic+pc-NC group; E: miR-145-5p mimic+pc-ATF3 group.

图6 各组HKF细胞中ATF3和Collagen I蛋白条带

Fig.6 ATF3 and Collagen I protein bands in HKF cells of each group

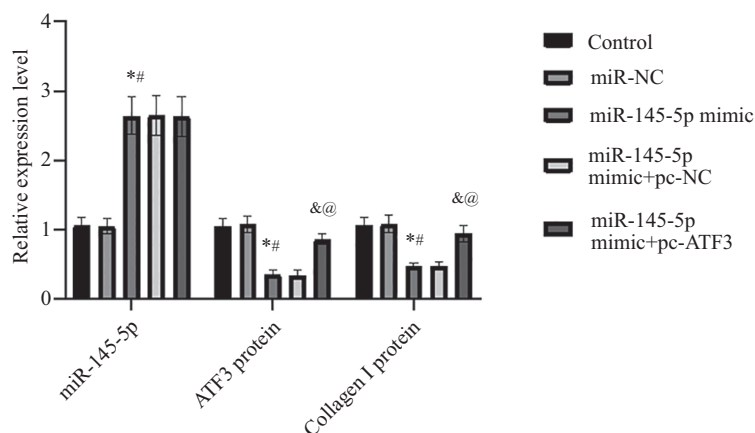
高, 侵袭细胞数增加, 凋亡率降低($P < 0.05$), 见图8和图9。

2.6 LncRNA LHFPL3-AS1与miR-145-5p、miR-145-5p与ATF3相互关系

如图10和图11所示, LncRNA LHFPL3-AS1与miR-145-5p、miR-145-5p与ATF3有互补结合序列。双荧光素酶活性检测得出, 与共转染LncRNA LHFPL3-AS1-MUT和miR-NC质粒相比, LncRNA LHFPL3-AS1-WT和miR-145-5p mimic质粒共转染HKF细胞后, 荧光素酶活性降低($P < 0.05$); 与共转染ATF3-MUT和miR-NC质粒相比, ATF3-WT和miR-145-5p mimic质粒共转染HKF细胞后, 荧光素酶活性降低($P < 0.05$), 见表2。

3 讨论

瘢痕疙瘩是一种病理性瘢痕, 其组织学特征是炎症性网状真皮内成纤维细胞和I型胶原大量聚集, 其临床特征包括瘢痕组织持续生长并通过红斑和瘙痒的前缘侵入原始伤口边界以外的邻近健康皮肤^[9]。瘢痕疙瘩生长的风险因素包括局部因素(伤口/瘢痕张力)、全身因素(例如高血压)、遗传因素(例如单核苷酸多态性)和生活方式因素^[10]。小而单发的瘢痕疙瘩可以通过手术联合辅助治疗或多模式保守治疗进行彻底治疗。对于大而多发的瘢痕疙瘩, 手术目的以缩小体积和减少数量为主^[11]。炎症介质也会影响瘢痕愈合过程中胶原蛋白重塑的失调, 除了类固醇



* $P < 0.05$, 与 control 组相比; [#] $P < 0.05$, 与 miR-NC 组相比; [&] $P < 0.05$, 与 miR-145-5p mimic 组相比; [@] $P < 0.05$, 与 miR-145-5p mimic+pc-NC 组相比。 $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。

* $P < 0.05$ compared with control group; [#] $P < 0.05$ compared with miR-NC group; [&] $P < 0.05$ compared with miR-145-5p mimic group; [@] $P < 0.05$ compared with miR-145-5p mimic+pc-NC group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。

图7 各组HKF细胞中miR-145-5p、ATF3和Collagen I蛋白表达水平比较

Fig.7 Comparison of miR-145-5p, ATF3 and Collagen I protein expression levels in HKF cells of each group

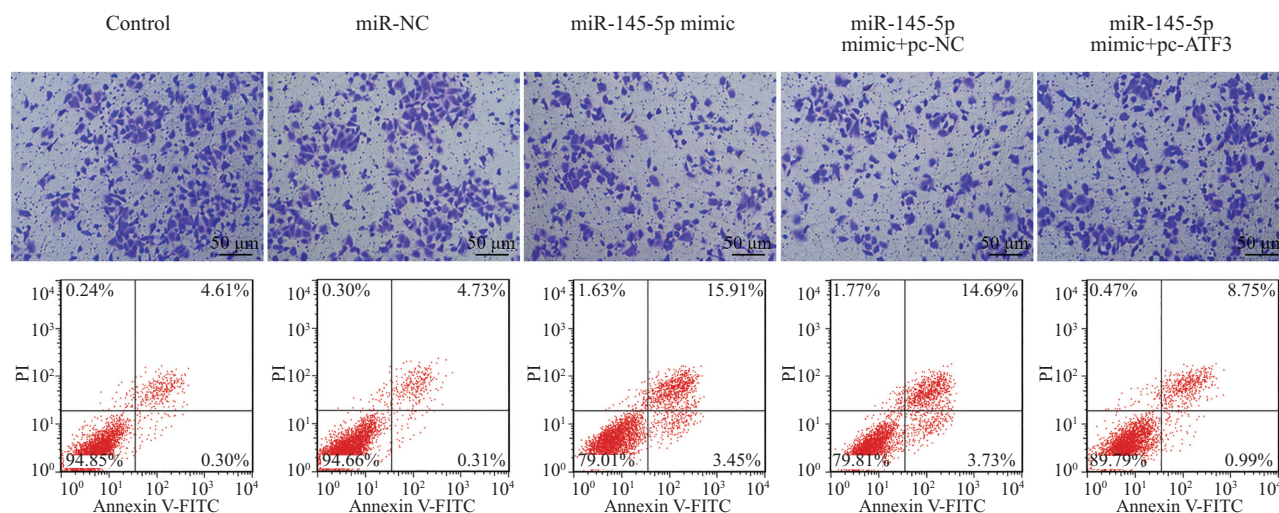


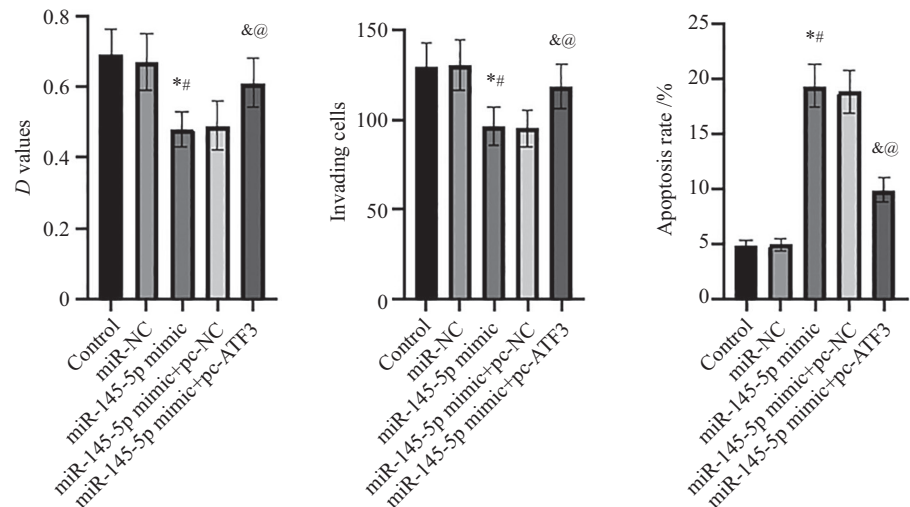
图8 各组HKF细胞侵袭和凋亡情况

Fig.8 Invasion and apoptosis of HKF cells in each group

和放射等常见疗法的使用外, 抗炎剂和化疗分子抑制瘢痕疙瘩复发也是有潜力的疗法^[12]。

LHFPL3-AS1是一种未定义的lncRNA, 促进多种癌症的发展, 包括黑色素瘤和口腔鳞状细胞癌^[13]。此外, 已发现许多lncRNA和miRNA通过调节相关信号通路的活性来调节器官纤维化^[14]; miRNA在伤口愈合所涉及的炎症中起着至关重要的作用^[15]。研究表明, Hsa_circ_0043688敲低通过miR-145-5p/成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)信号轴抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长和转移^[16]; miR-145-5p通过降低Smad2/3的表达水平来阻止纤维化

的发展并减少增生性瘢痕的形成^[17]。本研究结果表明, HKF细胞中LncRNA LHFPL3-AS1高表达, miR-145-5p低表达; 干扰LncRNA LHFPL3-AS1表达发现, HKF细胞miR-145-5p水平和凋亡率升高, 增殖和侵袭能力降低, Collagen I蛋白表达水平降低, 表明LncRNA LHFPL3-AS1和miR-145-5p参与调节HKF细胞的生物学行为; 干扰LncRNA LHFPL3-AS1表达对HKF细胞增殖和侵袭的影响被抑制miR-145-5p表达消除; 双荧光素酶实验证实LncRNA LHFPL3-AS1与miR-145-5p存在靶向关系; 上述结果均提示干扰LncRNA LHFPL3-AS1可能通过靶向上调miR-145-5p



* $P < 0.05$, 与control组相比; # $P < 0.05$, 与miR-NC组相比; & $P < 0.05$, 与miR-145-5p mimic组相比; @ $P < 0.05$, 与miR-145-5p mimic+pc-NC组相比。 $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。
* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with miR-145-5p mimic group; @ $P < 0.05$ compared with miR-145-5p mimic+pc-NC group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$.

图9 各组HKF细胞增殖、侵袭、凋亡比较

Fig.9 Comparison of proliferation, invasion and apoptosis of HKF cells in each group

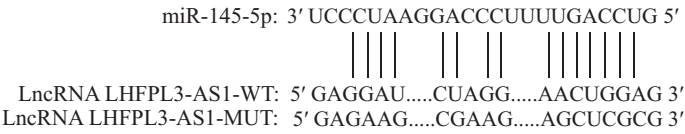


图10 LncRNA LHFPL3-AS1与miR-145-5p靶向结合位点预测

Fig.10 Prediction of target binding sites of LncRNA LHFPL3-AS1 and miR-145-5p

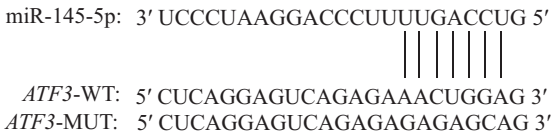


图11 miR-145-5p与ATF3靶向结合位点预测

Fig.11 Prediction of binding sites between miR-145-5p and ATF3

表2 双荧光素酶活性检测结果

Table 2 Detection results of diluciferase activity

分组 Groups	LncRNA LHFPL3-AS1- WT	LncRNA LHFPL3-AS1- MUT	ATF3-WT	ATF3-MUT
miR-NC	1.04±0.11	1.06±0.11	1.07±0.11	1.05±0.11
miR-145-5p mimic	0.43±0.06	1.07±0.12	0.46±0.06	1.04±0.11
<i>t</i>	11.925	0.150	11.925	0.157
<i>P</i>	0.000	0.883	0.000	0.878

抑制HKF细胞增殖和侵袭, 并促进凋亡, 本研究首次发现LncRNA LHFPL3-AS1在疤痕疙瘩治疗中的潜力, 且本研究中miR-145-5p的相关结果与前人研究结果^[16-17]一致。

ATF3是一种21 kDa的蛋白, 包含4个不同的区域, 包括激活、抑制、碱性和亮氨酸拉链结构域, 在啮齿动物和人类细胞系中, ATF3会在肝脏、心脏、肾脏和神经系统等多种组织中因创伤或细胞应激

而迅速被诱导表达,表明ATF3诱导是一般应激反应的一部分^[18]。ATF3的表达在静止细胞中处于较低水平,但在氧化损伤和缺血/再灌注等应激源的作用下会增加,其正在成为多种病理生理过程(如心血管疾病、痴呆和缺血/再灌注引起的损伤)中炎症的主要调节因子^[19]。在伤口愈合过程中,ATF3促进成纤维细胞活化和胶原蛋白生成,导致伤口加速愈合^[20];然而在瘢痕疙瘩中,ATF3可以促进瘢痕疙瘩成纤维细胞的生长和侵袭,抑制细胞凋亡^[7]。本研究结果表明,HKF细胞中ATF3表达水平高于正常皮肤细胞;由于miR-145-5p的过表达会抑制ATF3表达,本研究同时过表达miR-145-5p和ATF3发现,miR-145-5p升高对细胞增殖、侵袭及凋亡的作用被ATF3过表达逆转;双荧光素酶实验证实miR-145-5p与ATF3具有靶向关系;由此表明,LncRNA LHFPL3-AS1可能通过靶向调控miR-145-5p/ATF3轴来调控HKF细胞增殖、侵袭和凋亡。

综上所述,LncRNA LHFPL3-AS1可能通过靶向调控miR-145-5p/ATF3轴来调控HKF细胞增殖和侵袭。本研究丰富了瘢痕疙瘩中ceRNA的研究,为瘢痕疙瘩形成后的治疗提供了新的靶点,但本研究仅进行了细胞实验,不足之处在于未进行动物实验,后续研究可继续探究LncRNA LHFPL3-AS1和miR-145-5p/ATF3轴在瘢痕疙瘩治疗中的临床价值。

参考文献 (References)

- [1] QI W, XIAO X, TONG J, et al. Progress in the clinical treatment of keloids [J]. *Front Med*, 2023, 10(1): 1284109.
- [2] OJEH N, BHARATHA A, GAUR U, et al. Keloids: current and emerging therapies [J]. *Scars Burn Heal*, 2020, 6(1): 499.
- [3] KIM S. LncRNA-miRNA-mRNA regulatory networks in skin aging and therapeutic potentials [J]. *Front Physiol*, 2023, 14(1): 3151.
- [4] QIU Z K, YANG E, YU N Z, et al. The biomarkers associated with epithelial-mesenchymal transition in human keloids [J]. *Burns*, 2024, 50(2): 474-87.
- [5] 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.
- [6] LIU S, LI Z, LAN S, et al. The dual roles of activating transcription factor 3 (ATF3) in inflammation, apoptosis, ferroptosis, and pathogen infection responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 824.
- [7] WANG X M, LIU X M, WANG Y, et al. Activating transcription factor 3 (ATF3) regulates cell growth, apoptosis, invasion and collagen synthesis in keloid fibroblast through transforming growth factor beta (TGF-beta)/SMAD signaling pathway [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 117-26.
- [8] PAN J, XU Z, GUO G, et al. Circ_nuclear factor I X (circNfix) attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy via regulating miR-145-5p/ATF3 axis [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 5373-85.
- [9] LIU X, CHEN W, ZENG Q, et al. Single-cell RNA-sequencing reveals lineage-specific regulatory changes of fibroblasts and vascular endothelial cells in keloids [J]. *J Invest Dermatol*, 2022, 142(1): 124-35.
- [10] LIU R, XIAO H, WANG R, et al. Risk factors associated with the progression from keloids to severe keloids [J]. *Chin Med J*, 2022, 135(7): 828-36.
- [11] OGAWA R. The most current algorithms for the treatment and prevention of hypertrophic scars and keloids: a 2020 update of the algorithms published 10 years ago [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2022, 149(1): 79-94.
- [12] BETARBET U, BLALOCK T W. Keloids: a review of etiology, prevention, and treatment [J]. *J Clin Aesthet Dermatol*, 2020, 13(2): 33-43.
- [13] LI J, XU X, ZHANG D, et al. LncRNA LHFPL3-AS1 promotes oral squamous cell carcinoma growth and cisplatin resistance through targeting mir-362-5p/chs1 pathway [J]. *OncoTargets Ther*, 2021, 14(1): 2293-300.
- [14] GHAFOURI-FARD S, ABAK A, TALEBI S F, et al. Role of miRNA and lncRNAs in organ fibrosis and aging [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143(1): 112132.
- [15] JIANG Y, XU X, XIAO L, et al. The role of microRNA in the inflammatory response of wound healing [J]. *Front Immunol*, 2022, 13(1): 852419.
- [16] 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): e24528.
- [17] SHEN W, WANG Y, WANG D, et al. miR-145-5p attenuates hypertrophic scar via reducing Smad2/Smad3 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(4): 1042-8.
- [18] KATZ HR, ARCESE AA, BLOOM O, et al. Activating transcription factor 3 (ATF3) is a highly conserved pro-regenerative transcription factor in the vertebrate nervous system [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10(1): 824036.
- [19] LI Y, FAN Q, LI F, et al. The multifaceted roles of activating transcription factor 3 (ATF3) in inflammatory responses-potential target to regulate neuroinflammation in acute brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2023, 43(2): 8-17.
- [20] LUO P, WANG F, LI J, et al. The stress-responsive gene ATF3 drives fibroblast activation and collagen production through transcriptionally activating TGF- β receptor II in skin wound healing [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 760(1): 110134.