

长链非编码RNA SNHG1对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响

万瑀^{1,2,3}, 马芳^{1,2}, 贺茜^{1,2,3}, 马胜超^{2,4}, 姜怡邓^{2,4}, 沈江涌^{2,3*}¹宁夏医科大学临床医学院, 银川 750004; ²国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室, 银川 750004;³宁夏医科大学总医院烧伤整形外科, 银川 750004; ⁴宁夏医科大学基础医学院, 银川 750004

[中图分类号] R622

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.02.0118

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

万瑀, 马芳, 贺茜, 等. 长链非编码RNA SNHG1对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(2): 118-127.

[收稿日期] 2021-06-28

[录用日期] 2021-09-15

[上线日期] 2021-12-17

[摘要] 目的 探讨长链非编码RNA核仁小RNA宿主基因1(lncRNA SNHG1)对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响。方法 纳入2019—2021年在宁夏医科大学总医院烧伤整形外科接受手术治疗的22例增生性瘢痕患者, 收集其增生性瘢痕组织与瘢痕旁正常皮肤组织(瘢痕旁3 cm以内), 从中分离培养成纤维细胞。采用qRT-PCR从组织和细胞水平检测SNHG1 mRNA和miR-382-3p相对表达水平。将增生性瘢痕成纤维细胞随机分为对照组、SNHG1阴性对照组(转染慢病毒空载体)、模拟物对照组(转染对照模拟物)、SNHG1阴性对照+模拟物对照组(转染慢病毒空载体和对照模拟物)、SNHG1过表达组(转染过表达慢病毒)、miR-382-3p过表达组(转染miR-382-3p模拟物)、SNHG1过表达+模拟物对照组(转染过表达慢病毒和对照模拟物)与SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组(转染过表达慢病毒和miR-382-3p模拟物), 采用qRT-PCR检测各组SNHG1、PCNA、p27 mRNA和miR-382-3p的相对表达水平; CCK-8法检测各组细胞增殖能力; EdU染色法检测各组细胞增殖水平; Western blotting检测各组p27和PCNA蛋白表达水平。结果 与正常皮肤组织及其成纤维细胞相比, SNHG1 mRNA在增生性瘢痕组织(3.21 ± 2.65 vs. 1.14 ± 0.61 , $P < 0.001$)及其成纤维细胞中呈高表达(0.91 ± 0.08 vs. 0.54 ± 0.08 , $P < 0.01$), 而miR-382-3p表达下调(组织: 0.53 ± 0.34 vs. 1.15 ± 0.61 , $P < 0.001$; 细胞: 0.84 ± 0.09 vs. 1.01 ± 0.004 , $P < 0.05$)。与SNHG1阴性对照组相比, SNHG1过表达组细胞增殖能力增强(0.23 ± 0.03 vs. 0.16 ± 0.01 , $P < 0.001$), EdU阳性细胞百分比明显增高($30.01\% \pm 5.70\%$ vs. $7.13\% \pm 4.40\%$, $P < 0.001$), PCNA mRNA和蛋白相对表达水平增高(mRNA: 2.97 ± 0.33 vs. 0.98 ± 0.25 , $P < 0.01$; 蛋白: 2.20 ± 0.09 vs. 0.88 ± 0.20 , $P < 0.05$), p27 mRNA和蛋白相对表达水平降低(mRNA: 0.30 ± 0.03 vs. 1.42 ± 0.15 , $P < 0.001$; 蛋白: 0.47 ± 0.11 vs. 1.13 ± 0.19 , $P < 0.05$), miR-382-3p相对表达水平降低(0.05 ± 0.01 vs. 1.03 ± 0.12 , $P < 0.001$); 与SNHG1过表达+模拟物对照组相比, SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组细胞增殖能力减弱(0.15 ± 0.02 vs. 0.26 ± 0.01 , $P < 0.001$), EdU阳性细胞百分比下降($5.97\% \pm 0.33\%$ vs. $11.70\% \pm 0.87\%$, $P < 0.001$), PCNA mRNA和蛋白相对表达水平降低(mRNA: 0.64 ± 0.09 vs. 3.33 ± 0.38 , $P < 0.001$; 蛋白: 1.70 ± 0.36 vs. 2.34 ± 0.16 , $P < 0.05$), p27 mRNA和蛋白相对表达水平升高(mRNA: 1.01 ± 0.44 vs. 0.09 ± 0.04 , $P < 0.05$; 蛋白: 1.38 ± 0.31 vs. 0.50 ± 0.09 , $P < 0.05$)。结论 SNHG1在增生性瘢痕中呈高表达, 可负向调控miR-382-3p的表达, 进而促进增生性瘢痕成纤维细胞的增殖, 有望成为治疗增生性瘢痕的新靶点。

[关键词] 增生性瘢痕; 成纤维细胞; 核仁小RNA宿主基因1; 细胞增殖**[基金项目]** 国家自然科学基金(81860555); 宁夏高等学校一流学科建设(宁夏医科大学国内一流建设学科临床医学)资助项目(NXYLXK2017A05); 宁夏医科大学2020年国家级大学生创新创业训练计划项目(202010752002)**[作者简介]** 万瑀, 硕士研究生, 主要从事增生性瘢痕形成机制的基础与临床研究**[通信作者]** 沈江涌, E-mail: sjzypp@163.com

Effect of long non-coding RNA-SNHG1 on the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts

Wan Yu^{1,2,3}, Ma Fang^{1,2}, He Qian^{1,2,3}, Ma Sheng-Chao^{2,4}, Jiang Yi-Deng^{2,4}, Shen Jiang-Yong^{2,3*}

¹School of Clinical Medicine, ⁴School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

²Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research, National Health Commission, Yinchuan 750004, China

³Department of Burn and Plastic Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

*Corresponding author, E-mail: sjzyyp@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81860555), the First-Class Discipline Construction Founded Project of Ningxia Medical University and the School of Clinical Medicine (NXYLXK2017A05), and the 2020 National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of Ningxia Medical University (202010752002)

[Abstract] Objective To investigate the effect of long non-coding small nucleolar RNA host gene 1 (lncRNA-SNHG1) on the proliferation of human hypertrophic scar fibroblasts. **Methods** The hypertrophic scar tissue and normal skin tissue adjacent to the scar (within 3 cm near the scar) of 22 patients with hypertrophic scar treated and operated in the Department of Burn and Plastic Surgery of the General Hospital of Ningxia Medical University from 2019 to 2021 were collected, and human primary fibroblasts were isolated and cultured from the hypertrophic scar and normal skin tissue adjacent to the scar, while the expression of SNHG1 and miR-382-3p was detected at the tissue and primary cell levels by using qRT-PCR. Proliferative scar fibroblasts were randomly divided into control group, SNHG1 negative control group (adding empty lentivirus vectors), mimic control group (adding control mimic), SNHG1 negative control + mimic control group (adding empty lentivirus vectors and control mimic), SNHG1 overexpression group (adding overexpression lentivirus), miR-382-3p overexpression group (adding miR-382-3p mimics), SNHG1 overexpression + mimic control group (adding overexpression lentivirus and control mimics) and SNHG1 overexpression + miR-382-3p overexpression group (adding overexpression lentivirus and miR-382-3p mimics). qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of SNHG1, PCNA, p27 and miR-382-3p in each group; CCK-8 method to detect the proliferation viability of the cells in each group after transfection; EdU staining method to detect the change of proliferation level of each group of cells after transfection; Western blotting to detect the expression levels of p27 and PCNA proteins in each group of cells after transfection. **Results** SNHG1 presented high expression in hypertrophic scar tissue (3.21 ± 2.65 vs. 1.14 ± 0.61 , $P < 0.001$) and primary cells (0.91 ± 0.08 vs. 0.54 ± 0.08 , $P < 0.01$), whereas the expression of miR-382-3p was down-regulated (0.53 ± 0.34 vs. 1.15 ± 0.61 , $P < 0.001$; 0.84 ± 0.09 vs. 1.01 ± 0.004 , $P < 0.05$). Compared with SNHG1 negative control group, the cell proliferation ability of SNHG1 overexpression group increased (0.23 ± 0.03 vs. 0.16 ± 0.01 , $P < 0.001$), the percentage of EdU positive cells significantly increased ($30.01\% \pm 5.70\%$ vs. $7.13\% \pm 4.40\%$, $P < 0.001$), the expression levels of PCNA mRNA and protein increased (mRNA: 2.97 ± 0.33 vs. 0.98 ± 0.25 , $P < 0.01$; protein: 2.20 ± 0.09 vs. 0.88 ± 0.20 , $P < 0.05$), the expression levels of p27 mRNA and protein decreased (mRNA: 0.30 ± 0.03 vs. 1.42 ± 0.15 , $P < 0.001$; protein: 0.47 ± 0.11 vs. 1.13 ± 0.19 , $P < 0.05$), and the expression level of miR-382-3p decreased significantly (0.05 ± 0.01 vs. 1.03 ± 0.12 , $P < 0.001$). Compared with SNHG1 overexpression + mimic control group, the cell proliferation ability of SNHG1 overexpression + miR-382-3p overexpression group decreased (0.15 ± 0.02 vs. 0.26 ± 0.01 , $P < 0.001$), the percentage of EdU positive cells decreased ($5.97\% \pm 0.33\%$ vs. $11.70\% \pm 0.87\%$, $P < 0.001$), the expression levels of PCNA mRNA and protein decreased significantly (mRNA: 0.64 ± 0.09 vs. 3.33 ± 0.38 , $P < 0.001$; protein: 1.70 ± 0.36 vs. 2.34 ± 0.16 , $P < 0.05$), the expression levels of p27 mRNA and protein increased (mRNA: 1.01 ± 0.44 vs. 0.09 ± 0.04 , $P < 0.05$; protein: 1.38 ± 0.31 vs. 0.50 ± 0.09 , $P < 0.05$). **Conclusion** SNHG1 presents high expression in hypertrophic scar and can negatively regulate miR-382-3p expression to promote proliferation of primary hypertrophic scar fibroblasts, which may become a potential new target in the treatment of hypertrophic scar.

[Key words] hypertrophic scar; fibroblasts; small nucleolar RNA host gene 1; cell proliferation

增生性瘢痕是创面愈合异常的结果，主要包括成纤维细胞过度增殖和胶原纤维代谢失衡^[1-2]。据统计，创伤后皮肤创面增生性瘢痕的发生率为38%~68%，手术后高达45%~100%^[3]。增生性瘢痕外观呈红色，质地较硬，瘢痕组织高于皮面^[4]，伴有瘙痒和压痛^[5-6]等症状，发生于头面部及四肢时破坏美观、影响日常活动，严重时可引起焦虑^[7]、睡眠障碍^[8-9]等，甚至造成创伤后应激反应^[10]，给患者带来巨大的心理负担。临床治疗增生性瘢痕的

方法虽多，但疗效个体差异较大，易复发。目前对增生性瘢痕形成的潜在机制知之甚少，近年来基因靶向治疗技术发展迅速，在多种疾病中的应用初见成效。因此，在基因水平探究增生性瘢痕的形成机制，寻找新的基因治疗靶点，从而建立有效的防治策略，对预防增生性瘢痕的形成具有重要意义。

长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是一类长度大于200个核苷酸的非编码RNA，虽缺乏编码蛋白质的能力^[11]，但在细胞周期、增殖、

分化、凋亡等多种病理生理过程中具有重要的调控作用^[12-16]。研究发现,过表达核仁小RNA宿主基因1(*SNHG1*)可促进胃癌细胞、食管癌细胞和非小细胞肺癌细胞的增殖^[17-18]。目前*SNHG1*调控人增生性瘢痕成纤维细胞生物学行为的相关研究较少。*lncRNA*可与*microRNA*相互作用,从而发挥调控效应^[19-21]。本课题组前期研究采用*starBase v3.0*在线软件预测发现,*miR-382-3p*与*SNHG1*存在结合位点,即*SNHG1*可能靶向结合*miR-382-3p*^[22]。有研究发现,*miR-382*可促进肾小管间质的纤维化^[23]。然而,*SNHG1*通过靶向调控*miR-382-3p*而在增生性瘢痕成纤维细胞中发挥作用的研究鲜有报道。为此,本研究探讨了*SNHG1*靶向*miR-382-3p*对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响,以期发现增生性瘢痕形成机制的新靶点,为预防和治疗增生性瘢痕提供新思路。

1 材料与方法

1.1 组织标本 2019—2021年于宁夏医科大学总医院烧伤整形外科接受手术治疗的22例增生性瘢痕患者,收集其增生性瘢痕组织与瘢痕旁正常皮肤组织(瘢痕旁3 cm以内)。纳入标准:具有增生性瘢痕典型的临床症状,即瘢痕高于皮面且不超过原有伤口大小,质地较正常皮肤硬。排除标准:瘢痕疙瘩患者;瘢痕有溃疡;接受过放疗;患有其他皮肤疾病、肿瘤或免疫性疾病等。本研究通过宁夏医科大学伦理委员会审批(2018-087),患者及其家属均签署知情同意书。

1.2 主要试剂及仪器 反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(日本TaKaRa公司);蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司);RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);p27抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司);增殖性细胞核抗原(PCNA)抗体(上海艾博抗贸易有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司); β -actin抗体(武汉爱博泰克生物技术有限公司);上样缓冲液(北京康为世纪生物科技有限公司);过表达慢病毒颗粒(上海吉凯基因医学科技有限公司);DMEM高糖培养基(北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司);胎牛血清(上海道鹏生物科技有限公司);青链霉素(北京索莱宝科技有限公司);CCK-8试剂盒(美国Invigentech公司);LipofectamineTM 2000试剂盒、*miR-382-3p*模拟物(上海吉玛制药技术有限公司)。5415D型微量台式离心机(德国Eppendorf公司);荧光定量PCR仪(德国耶拿分析仪器股份公司);电泳仪及凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);荧光显微镜(日本Olympus公司);酶

标仪(美国BioTek公司);CO₂培养箱(德国Heraeus公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞分离及培养 从人增生性瘢痕组织及瘢痕旁正常皮肤组织中提取并分离成纤维细胞,并于含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM培养液中培养,置于5% CO₂、37℃细胞培养箱中。根据细胞状态每1~2 d更换1次培养液,待细胞密度达80%~90%时,用0.25%胰蛋白酶消化传代,取第3~6代成纤维细胞用于后续实验。

1.3.2 细胞转染及分组 采用常规转染方法,按照过表达慢病毒颗粒试剂盒和LipofectamineTM 2000试剂盒说明书步骤培养人增生性瘢痕成纤维细胞至对数生长期,消化后接种于6孔板中培养,待细胞融合度达60%时进行转染。设置对照组(不做处理)、*SNHG1*阴性对照组(转染慢病毒空载体)、*SNHG1*过表达组(转染过表达慢病毒)、模拟物对照组(转染对照模拟物)、*miR-382-3p*过表达组(转染*miR-382-3p*模拟物)、*SNHG1*阴性对照+模拟物对照组(转染慢病毒空载体和对照模拟物)、*SNHG1*过表达+模拟物对照组(转染过表达慢病毒和对照模拟物)与*SNHG1*过表达+*miR-382-3p*过表达组(转染过表达慢病毒和*miR-382-3p*模拟物)。

1.3.3 过表达慢病毒载体构建效果鉴定 将*SNHG1*过表达慢病毒颗粒转染至增生性瘢痕成纤维细胞48 h后,荧光显微镜下观察增生性瘢痕成纤维细胞生长情况。

1.3.4 qRT-PCR检测*SNHG1*、PCNA、p27 mRNA及*miR-382-3p*相对表达水平 (1)取人增生性瘢痕组织和瘢痕旁正常皮肤组织及其成纤维细胞,检测*SNHG1* mRNA和*miR-382-3p*相对表达水平;(2)收集对照组、*SNHG1*阴性对照组、*SNHG1*过表达组和*SNHG1*过表达+*miR-382-3p*过表达组细胞,检测*SNHG1* mRNA相对表达水平;(3)收集对照组、*SNHG1*阴性对照组、*SNHG1*过表达组细胞,检测PCNA、p27 mRNA和*miR-382-3p*相对表达水平;(4)收集对照组、模拟物对照组和*miR-382-3p*模拟物组细胞,检测*miR-382-3p*相对表达水平;(5)收集*SNHG1*阴性对照+模拟物对照组、*SNHG1*过表达+模拟物对照组和*SNHG1*过表达+*miR-382-3p*过表达组细胞,检测PCNA和p27 mRNA相对表达水平。根据总RNA提取试剂盒说明书步骤提取总RNA,用反转录试剂盒反转录成cDNA,按照qRT-PCR说明书步骤进行扩增。*miR-382-3p*扩增条件:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火及延伸34 s,共40个循环;熔解曲线95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。*SNHG1*、PCNA、p27扩增条件:95℃预变

性30 s; 95 °C变性5 s, 退火及延伸34 s(退火温度: SNHG1 61 °C, PCNA 59.3 °C, p27 57.8 °C), 共40个循环; 熔解曲线95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。设置空白对照和内参(miR-382-3p内参为U6; SNHG1、PCNA和p27内参为GAPDH)对照同体系扩增。反应结束后, 根据扩增曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算SNHG1、PCNA、p27 mRNA及miR-382-3p的相对表达水平。miR-382-3p引物由广州锐博生物科技有限公司设计并合成, SNHG1、PCNA、p27引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列如表1所示。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequence of qRT-PCR

基因	引物序列
SNHG1	正义: 5'-GCCACCTTCTGTTCCTCCGTCATG-3'
	反义: 5'-AAGTGAAGAGCAAGGCCCTGAATG-3'
miR-382-3p	正义: 5'-ATCCGTGAAGTTGTTTCGTGG-3'
	反义: 5'-TATGGTTGTAGAGGACTCCTTGAC-3'
PCNA	正义: 5'-CCTGCTGGGATATTAGCTCCA-3'
	反义: 5'-CAGCGGTAGGTGTCGAAGC-3'
p27	正义: 5'-AGGAGG AGATAGAAGCGCAGA-3'
	反义: 5'-GTGCGGACTTGGTACAGGT-3'
U6	正义: 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3'
	反义: 5'-CTCGCTGGAAGATGGTG-3'
GAPDH	正义: 5'-GAACGGGAAGCTCACTGG-3'
	反义: 5'-GCCTGCTTACCACCTTCT-3'

SNHG1. 核仁小RNA宿主基因1; PCNA. 增殖性细胞核抗原

1.3.5 CCK-8法检测细胞增殖能力 (1)收集对照组、SNHG1阴性对照组和SNHG1过表达组细胞; (2)收集SNHG1阴性对照+模拟物对照组、SNHG1过表达+模拟物对照组和SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组细胞。均接种于96孔板(3×10^3 个/孔)中培养48 h后, 每孔加入10 μ l CCK-8试剂继续孵育2 h。采用酶标仪测定各孔450 nm波长处的吸光度(OD)值, 并绘制细胞生长曲线。

1.3.6 EdU染色观察细胞增殖情况 (1)收集对照组、SNHG1阴性对照组和SNHG1过表达组细胞; (2)收集SNHG1阴性对照+模拟物对照组、SNHG1过表达+模拟物对照组和SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组细胞。按照($4 \sim 100$) $\times 10^5$ 个/孔接种于共聚焦小皿中, 用DMEM培养液按5000:1的比例稀释EdU溶液, 制备适量的50 μ mol/L EdU培养基; 每个皿中加入200 μ l EdU培养基孵育2 h; 弃掉培养基, 依次采用固定液(含4%多聚甲醛的PBS)、甘氨酸和渗透剂进行孵育; PBS清洗细胞, 加入1 \times Apollo染色反应液室温避光孵育30 min, 加入渗透剂; 用甲

醇清洗细胞, 加入1 \times Hoechst反应液室温避光孵育30 min; 加入抗荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜下观察, 获取图像进行分析。

1.3.7 Western blotting检测PCNA、p27蛋白相对表达水平 (1)收集对照组、SNHG1阴性对照组和SNHG1过表达组细胞; (2)收集SNHG1阴性对照+模拟物对照组、SNHG1过表达+模拟物对照组和SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组细胞。常规提取蛋白, 采用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白样品浓度。取蛋白上样行SDS-PAGE电泳, 0.3 A恒流转膜2 h; 5%脱脂奶粉封闭2 h, PBST洗膜10 min \times 3次; 依次加入PCNA、p27特异性一抗4 °C摇床孵育过夜, 次日加入HRP标记的二抗, 室温下摇床孵育2 h, 参考ECL试剂盒说明书步骤进行发光显色, 在凝胶成像分析仪上进行成像分析。以 β -actin为内参, 计算PCNA、p27蛋白相对表达水平。

1.3.8 目标预测 运用在线生物信息学软件starBase v3.0(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)分析预测miR-382-3p与SNHG1的结合位点。

1.4 统计学处理 采用SPSS 25.0软件进行统计分析, 以GraphPad Prism 6.0软件制图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布并满足方差齐性, 两组间比较采用独立样本t检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNHG1和miR-382-3p在人增生性瘢痕组织和瘢痕旁正常皮肤组织及其成纤维细胞中的表达情况 qRT-PCR检测结果显示, 与瘢痕旁正常皮肤组织及其成纤维细胞相比, 增生性瘢痕组织(3.21 ± 2.65 vs. 1.14 ± 0.61 , $t=4.26$, $P < 0.001$)及其成纤维细胞(0.91 ± 0.08 vs. 0.54 ± 0.08 , $t=5.60$, $P < 0.01$)中SNHG1 mRNA相对表达水平增高, 而miR-382-3p相对表达水平下降(组织: 0.53 ± 0.34 vs. 1.15 ± 0.61 , $t=6.30$, $P < 0.001$; 细胞: 0.84 ± 0.09 vs. 1.01 ± 0.004 , $t=3.22$, $P < 0.05$, 图1)。

2.2 过表达慢病毒载体构建结果 将SNHG1过表达慢病毒颗粒转染至增生性瘢痕成纤维细胞后, 镜下观察显示, 增生性瘢痕成纤维细胞分布均匀且生长良好, 细胞呈梭形, 可见较强的绿色荧光, 转染效率 $>80\%$ (图2A), 表明过表达慢病毒载体构建成功, 可用于后续实验。

qRT-PCR检测结果显示, SNHG1阴性对照组SNHG1 mRNA相对表达水平与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 与SNHG1阴性对照组比较, SNHG1过表达组SNHG1 mRNA相对表达水

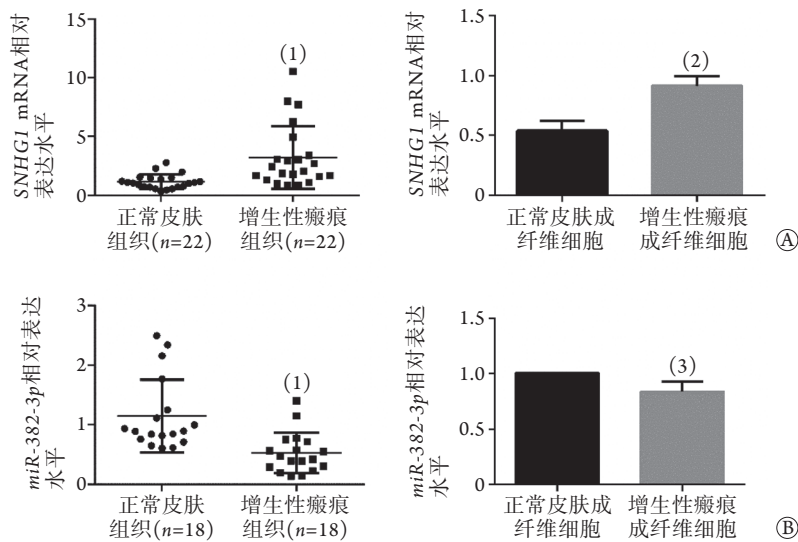


图1 SNHG1和miR-382-3p在人增生性瘢痕组织和瘢痕旁正常皮肤组织及其成纤维细胞中的表达情况

Fig. 1 Expression of SNHG1 and miR-382-3p in human hypertrophic scar tissues, adjacent normal skin tissue and its fibroblasts

A. qRT-PCR检测增生性瘢痕组织及其成纤维细胞中SNHG1 mRNA相对表达水平; B. qRT-PCR检测增生性瘢痕组织及其成纤维细胞中miR-382-3p相对表达水平; 与正常皮肤组织相比, (1) $P<0.001$; 与正常皮肤成纤维细胞相比, (2) $P<0.01$, (3) $P<0.05$

平明显升高(16.81 ± 0.92 vs. 0.91 ± 0.20 , $t=29.14$, $P<0.001$); SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组SNHG1 mRNA相对表达水平与SNHG1过表达组比较差异无统计学意义($P>0.05$, 图2B)。

2.3 过表达SNHG1对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响 CCK-8法检测结果显示, SNHG1阴性对照组成纤维细胞增殖能力与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 与SNHG1阴性对照组比较, SNHG1过表达组成纤维细胞增殖能力明显增强(0.23 ± 0.03 vs. 0.16 ± 0.01 , $t=6.40$, $P<0.001$, 图3A)。

EdU染色检测结果显示, SNHG1阴性对照

组EdU阳性细胞百分比与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 与SNHG1阴性对照组比较, SNHG1过表达组EdU阳性细胞百分比明显增高($30.01\% \pm 5.70\%$ vs. $7.13\% \pm 4.40\%$, $t=13.25$, $P<0.001$, 图3B)。

2.4 过表达SNHG1对增生性瘢痕成纤维细胞中PCNA、p27 mRNA和蛋白表达的影响 qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, SNHG1阴性对照组PCNA、p27 mRNA和蛋白相对表达水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 与SNHG1阴性对照组比较, SNHG1过表达组PCNA mRNA

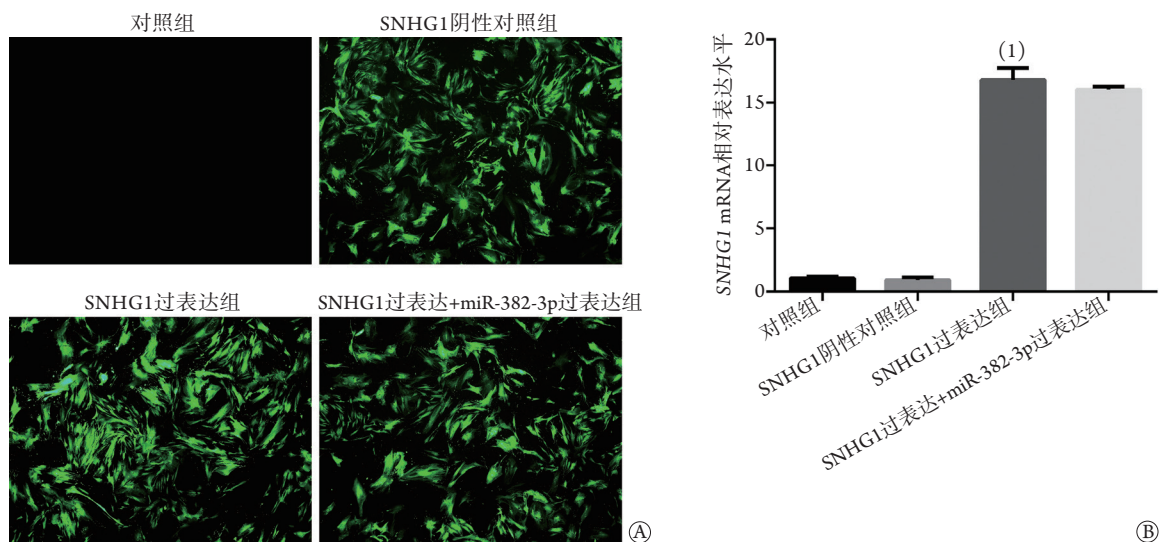


图2 过表达慢病毒载体构建结果

Fig. 2 Construction of lentiviral vector with overexpression

A. 镜下观察慢病毒载体的绿色荧光; B. qRT-PCR检测各组增生性瘢痕成纤维细胞中SNHG1 mRNA相对表达水平; 与SNHG1阴性对照组相比, (1) $P<0.001$

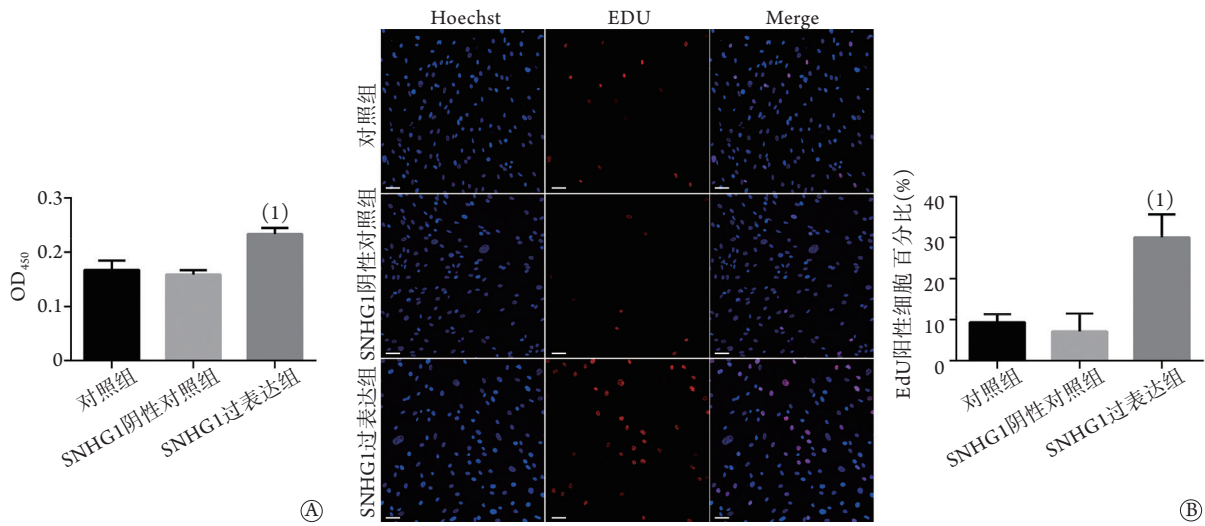


图3 过表达SNHG1对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of overexpression of SNHG1 on proliferation of hypertrophic scar fibroblasts

A. CCK-8法检测增生性瘢痕成纤维细胞增殖能力; B. EdU染色检测增生性瘢痕成纤维细胞增殖水平(bar=50 μm); 与SNHG1阴性对照组相比, (1) $P < 0.001$

和蛋白相对表达水平明显升高(mRNA: 2.97 ± 0.33 vs. 0.98 ± 0.25 , $t=8.39$, $P < 0.01$; 蛋白: 2.20 ± 0.09 vs. 0.88 ± 0.20 , $t=8.64$, $P < 0.05$), p27 mRNA和蛋白相对表达水平明显降低(mRNA: 0.30 ± 0.03 vs. 1.42 ± 0.15 , $t=12.46$, $P < 0.001$; 蛋白: 0.47 ± 0.11 vs. 1.13 ± 0.19 , $t=4.34$, $P < 0.05$, 图4)。

2.5 过表达SNHG1对增生性瘢痕成纤维细胞中

miR-382-3p表达的影响 starBase v3.0软件预测结果显示, SNHG1序列中含有与miR-382-3p互补的核苷酸序列, 表明两者存在结合位点, 提示miR-382-3p可能是SNHG1的靶基因(图5A)。

qRT-PCR检测各组细胞中miR-382-3p相对表达水平, 结果显示, SNHG1阴性对照组miR-382-3p相对表达水平与对照组比较差异无统计学意义

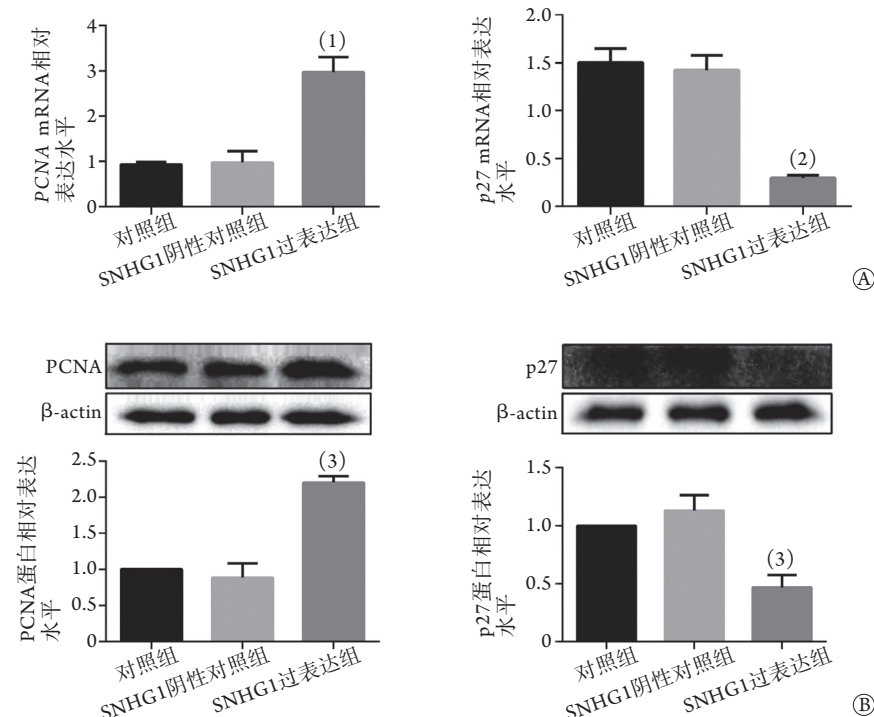


图4 过表达SNHG1对增生性瘢痕成纤维细胞中PCNA、p27 mRNA和蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of overexpression of SNHG1 on the expression of PCNA and p27 mRNA and proteins of hypertrophic scar fibroblasts

A. qRT-PCR检测各组增生性瘢痕成纤维细胞中PCNA、p27 mRNA相对表达水平; B. Western blotting检测各组增生性瘢痕成纤维细胞中PCNA、p27蛋白相对表达水平; 与SNHG1阴性对照组相比, (1) $P < 0.01$, (2) $P < 0.001$, (3) $P < 0.05$

($P>0.05$); 与SNHG1阴性对照组比较, SNHG1过表达组miR-382-3p相对表达水平明显降低(0.05 ± 0.01

vs. 1.03 ± 0.12 , $t=13.98$, $P<0.001$, 图5B)。

2.6 SNHG1调控miR-382-3p表达对增生性瘢痕成纤维

miRNA	GeneID	GeneName	GeneType	TargetSite	Alignment	Class
hsa-miR-382-3p	ENSG00000255717	SNHG1	processed transcript	chr11:62621124-62621145[-]	Target: 5'-aucUGAUUUUCUGAGAAUGAUg-3' miRNA: 3'-uucAC-AACAGGCACUUACUAA-5'	7mer-m8

SNHG1 5'-aucUGAUUUUCUGAGAAUGAUg-3'
miR-382-3p 5'-uucAC-AACAGGCACUUACUAA-3'

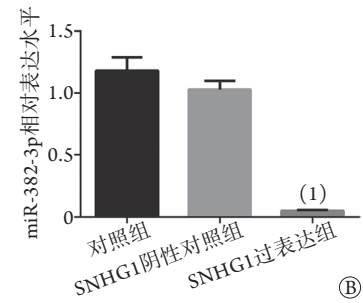


图5 过表达SNHG1对增生性瘢痕成纤维细胞中miR-382-3p表达的影响

Fig.5 Effect of overexpression of SNHG1 on the expression of miR-382-3p of hypertrophic scar fibroblast

A. SNHG1与miR-382-3p的核苷酸互补序列; B. qRT-PCR检测各组增生性瘢痕成纤维细胞中miR-382-3p相对表达水平; 与SNHG1阴性对照组相比, (1) $P<0.001$

维细胞增殖的影响 qRT-PCR检测结果显示, 模拟物对照组miR-382-3p相对表达水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); 与模拟物对照组比较, miR-382-3p过表达组miR-382-3p相对表达水平明显升高(43.52 ± 0.10 vs. 0.89 ± 0.09 , $t=7.42$, $P<0.01$, 图6A)。

CCK-8法检测结果显示, 与SNHG1阴性对照+模拟物对照组比较, SNHG1过表达+模拟物对照组细胞增殖能力明显增强(0.26 ± 0.01 vs. 0.17 ± 0.01 , $t=10.42$, $P<0.001$); 与SNHG1过表达+模拟物对照组比较, SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组细胞增殖能力明显减弱(0.15 ± 0.02 vs. 0.26 ± 0.01 , $t=8.87$, $P<0.001$, 图6B)。

EdU染色检测结果显示, 与SNHG1阴性对照+模拟物对照组比较, SNHG1过表达+模拟物对照组EdU阳性细胞百分比增高($11.70\% \pm 0.87\%$ vs. $5.00\% \pm 0.53\%$, $t=14.76$, $P<0.001$); 与SNHG1过表达+模拟物对照组比较, SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组EdU阳性细胞百分比下降($5.97\% \pm 0.33\%$ vs. $11.70\% \pm 0.87\%$, $t=15.02$, $P<0.001$, 图6C)。

qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, 与SNHG1阴性对照+模拟物对照组比较, SNHG1过表达+模拟物对照组PCNA mRNA和蛋白相对表达水平明显升高(mRNA: 3.33 ± 0.38 vs. 0.67 ± 0.07 , $t=11.79$, $P<0.001$; 蛋白: 2.34 ± 0.16 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=14.39$, $P<0.001$), p27 mRNA和蛋白相对表达水平明显降低(mRNA: 0.09 ± 0.04 vs. 1.12 ± 0.10 , $t=16.40$, $P<0.001$; 蛋白: 0.50 ± 0.09 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=7.70$, $P<0.05$); 与SNHG1过表达+模拟物对照组比较, SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组PCNA mRNA和蛋白相对表达水平明显降低(mRNA: 0.64 ± 0.09 vs. 3.33 ± 0.38 , $t=11.82$, $P<0.001$; 蛋白: 1.70 ± 0.36 vs. 2.34 ± 0.16 , $t=2.84$,

$P<0.05$), p27 mRNA和蛋白相对表达水平明显升高(mRNA: 1.01 ± 0.44 vs. 0.09 ± 0.04 , $t=3.62$, $P<0.05$; 蛋白: 1.38 ± 0.31 vs. 0.50 ± 0.09 , $t=3.87$, $P<0.05$, 图6D、E)。

3 讨论

瘢痕是伤口修复的正常结果, 但皮肤成纤维细胞过度增殖、胶原分泌紊乱等一系列病理反应会引起过度纤维化, 最终导致增生性瘢痕^[24]。近年来, 许多研究聚焦于非编码RNA在增生性瘢痕形成机制中的作用^[25-27]。长度超过200个核苷酸的非编码RNA即为lncRNA, 其虽无法翻译为蛋白质, 但参与细胞的多种生物学过程, 如细胞周期、增殖和分化等^[12,14,16]。大量研究发现, lncRNA通过调控众多生物学过程在增生性瘢痕的形成中起着重要作用, 包括对成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积发挥调节作用^[28-31]。本研究中SNHG1定位于11q12.3, 有11个外显子。目前对SNHG1在增生性瘢痕形成中的作用研究较少, 但其在多种增殖相关疾病如肿瘤中呈高表达, 且与肿瘤细胞增殖、侵袭、转移等重要癌变过程密切相关^[32]。Zhu等^[33]发现, 与邻近正常组织和细胞系相比, 大肠癌组织和细胞系中SNHG1表达上调。本研究结果显示, SNHG1在瘢痕组织及其成纤维细胞中呈高表达, 与上述研究结果相似, 提示SNHG1与增生性瘢痕的形成密切相关。研究发现, 过表达SNHG1可促进胃癌、食管癌和非小细胞肺癌细胞的增殖。本研究发现, 过表达SNHG1后成纤维细胞的增殖能力增强, PCNA蛋白表达增加, p27蛋白表达减少, 表明SNHG1高表达能促进增生性瘢痕成纤维细胞的增殖。

许多lncRNA通过与miRNA相互作用来发挥生理学功能, 从而引起基因表型的变化^[21]。在lncRNA、miRNA和靶基因组成的调控网络中,

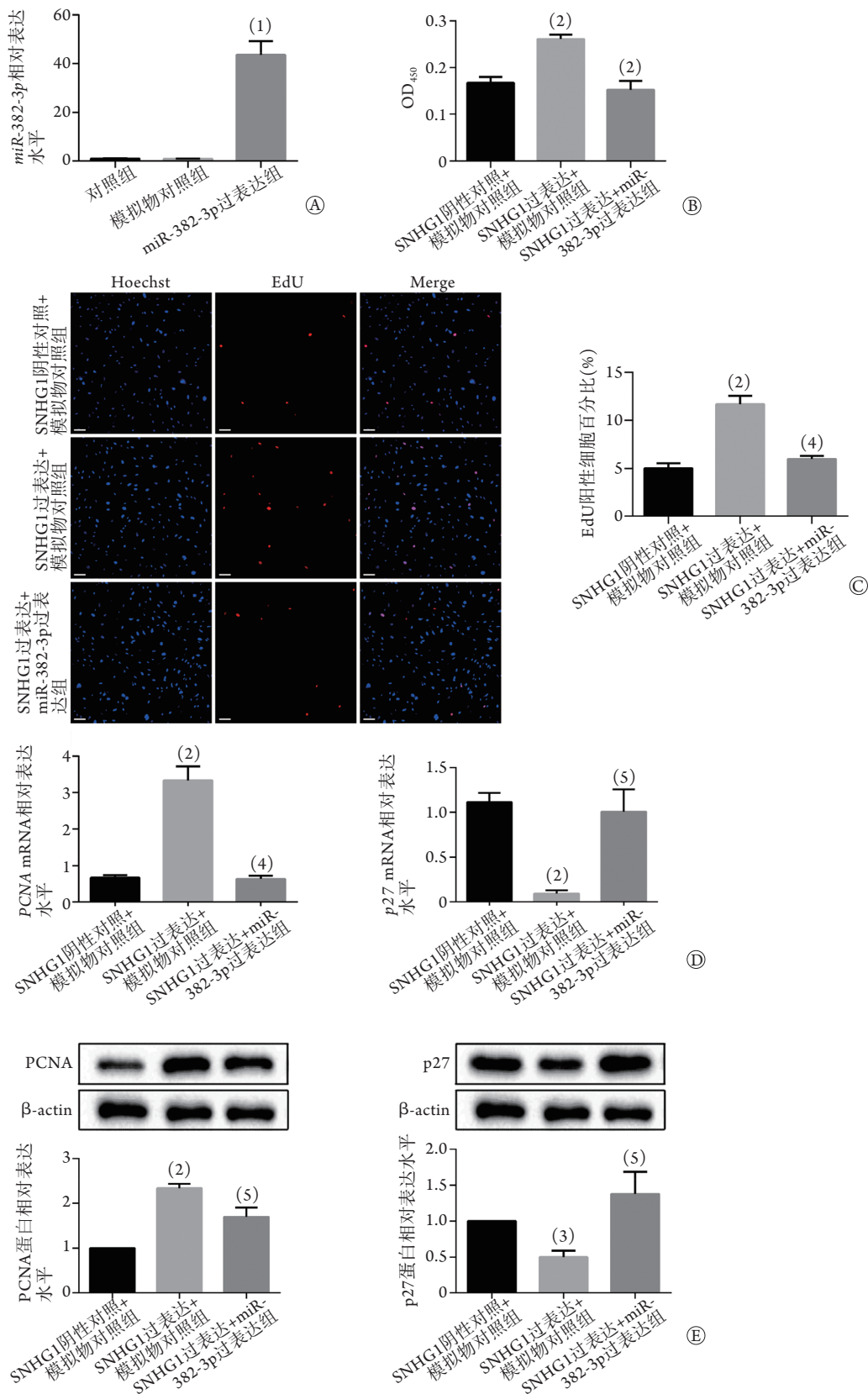


图6 SNHG1调控miR-382-3p表达对增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响

Fig.6 Effect of SNHG1 regulate miR-382-3p expression on proliferation of hypertrophic scar fibroblasts

A. qRT-PCR检测各组增生性瘢痕成纤维细胞中miR-382-3p相对表达水平; B. CCK-8法检测各组增生性瘢痕成纤维细胞增殖能力; C. EdU染色检测各组增生性瘢痕成纤维细胞增殖水平(bar=100 μm); D. qRT-PCR检测各组增生性瘢痕成纤维细胞PCNA和p27 mRNA相对表达水平; E. Western blotting检测各组增生性瘢痕成纤维细胞PCNA和p27蛋白相对表达水平; 与模拟物对照组相比, (1) $P<0.01$; 与SNHG1阴性对照+模拟物对照组相比, (2) $P<0.001$, (3) $P<0.05$; 与SNHG1过表达+模拟物对照组相比, (4) $P<0.001$, (5) $P<0.05$

lncRNA被广泛报道为“海绵”或“ceRNA”^[34]。Zheng等^[35]证实了SNHG1与miR-382-5p之间存在相互作用,且在体内敲除SNHG1基因可抑制乳腺肿瘤细胞的增殖。本研究采用starBase v3.0软件预测发现,miR-382-3p与SNHG1存在结合位点,而miR-382-3p在增生性瘢痕形成中的作用研究较少。本研究发现,增生性瘢痕组织和成纤维细胞中miR-382-3p表达下调。与SNHG1阴性对照组相比,SNHG1过表达组miR-382-3p表达亦明显下调;为进一步证实SNHG1与miR-382-3p之间的相互作用,过表达SNHG1后继续过表达miR-382-3p,发现SNHG1过表达+miR-382-3p过表达组细胞增殖能力减弱,增殖相关蛋白PCNA表达降低。由此可见,SNHG1可能通过海绵吸附miR-382-3p,抑制miR-382-3p对下游靶基因的作用,但过表达miR-382-3p可部分抵消SNHG1对成纤维细胞增殖的促进作用,从而抑制成纤维细胞的增殖,下调下游增殖相关蛋白PCNA的表达,上调下游蛋白p27的表达,表明SNHG1可通过负向调控miR-382-3p的表达来促进增生性瘢痕成纤维细胞的增殖。

综上所述,本研究结果表明,SNHG1可通过调控miR-382-3p的表达而促进增生性瘢痕成纤维细胞的增殖。但本研究存在诸多不足,如组织样本量不足及未进行体内实验进一步阐明增生性瘢痕成纤维细胞中SNHG1和miR-382-3p通过海绵吸附调控增殖相关蛋白表达的机制。通过查阅相关文献发现,miR-382-3p广泛参与心肌细胞纤维化相关的通路,如Akt/GSK-3 β 和TGF- β /MAPK通路等^[36],而过表达SNHG1可激活PI3K/Akt信号通路^[37-38]。因此,SNHG1/miR-382-3p轴能否通过Akt信号通路调控下游靶基因的表达而影响增生性瘢痕成纤维细胞的增殖有待进一步验证。随着基因组学技术的不断发展,SNHG1等多种lncRNAs的功能多样性及重要性逐渐被揭示,有望成为治疗增生性瘢痕的潜在靶点。

【参考文献】

- [1] Lee H, Jang YJ. Recent understandings of biology, prophylaxis and treatment strategies for hypertrophic scars and keloids[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 711.
- [2] Shi S, Li MF, Wang L, et al. Effects of lipopolysaccharide on expression of fibrosis-related factors in dermal fibroblast and hypertrophic scar formation[J]. Med J Chin PLA, 2020, 45(6): 604-610. [石珊,李梦凡,王玲,等.脂多糖对真皮成纤维细胞纤维化相关因子的表达及瘢痕形成的影响[J].解放军医学杂志,2020,45(6):604-610.]
- [3] Elsaie ML. Update on management of keloid and hypertrophic scars: A systemic review[J]. J Cosmet Dermatol, 2021, 20(9): 2729-2738.
- [4] Rabello FB, Souza CD, Júnior JAF. Update on hypertrophic scar treatment[J]. Clinics (Sao Paulo), 2014, 69(8): 565-573.
- [5] Low ZK, Ng WY, Fook-Chong S, et al. Comparison of clinical outcomes in diabetic and non-diabetic burns patients in a national burns referral centre in southeast Asia: A 3-year retrospective review[J]. Burns, 2017, 43(2): 436-444.
- [6] Ault P, Plaza A, Paratz J. Scar massage for hypertrophic burns scarring-A systematic review[J]. Burns, 2018, 44(1): 24-38.
- [7] Fang QQ, Chen CY, Zhang MX, et al. The Effectiveness of topical anti-scarring agents and a novel combined process on cutaneous scar management[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(15): 2268-2275.
- [8] Hubbard M, Masters IB, Williams GR, et al. Severe obstructive sleep apnoea secondary to pressure garments used in the treatment of hypertrophic burn scars[J]. Eur Respir J, 2000, 16(6): 1205-1207.
- [9] Chiang RS, Borovikova AA, King K, et al. Current concepts related to hypertrophic scarring in burn injuries[J]. Wound Repair Regen, 2016, 24(3): 466-477.
- [10] Loskotova A, Loskotova J. The use of acupuncture in first aid of burns-clinical report[J]. Burns, 2017, 43(8): 1782-1791.
- [11] Robinson EK, Covarrubias S, Carpenter S. The how and why of lncRNA function: An innate immune perspective[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2020, 1863(4): 194419.
- [12] Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones[J]. Cell, 2014, 157(1): 77-94.
- [13] He A, Liu Y, Chen Z, et al. Over-expression of long noncoding RNA BANCR inhibits malignant phenotypes of human bladder cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 125.
- [14] Jiang W, Zhang D, Xu B, et al. Long non-coding RNA BANCR promotes proliferation and migration of lung carcinoma via MAPK pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 69: 90-95.
- [15] Li JQ, Hu SY, Wang ZY, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits microRNA-125a-5p expression and induces immune imbalance of Treg/Th17 in immune thrombocytopenic purpura[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 905-911.
- [16] Yu X, Li Z. Long non-coding RNA HOTAIR: A novel oncogene (review)[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 5611-5618.
- [17] Cui Y, Zhang F, Zhu C, et al. Upregulated lncRNA SNHG1 contributes to progression of non-small cell lung cancer through inhibition of miR-101-3p and activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 17785-17794.
- [18] Zhang M, Wang W, Li T, et al. Long noncoding RNA SNHG1 predicts a poor prognosis and promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 80: 73-79.
- [19] Abramson DH, Shields CL, Munier FL, et al. Treatment of retinoblastoma in 2015: Agreement and disagreement[J]. JAMA Ophthalmol, 2015, 133(11): 1341-1347.
- [20] Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer[J]. Nat Med, 2015, 21(11): 1253-1261.
- [21] Yoon JH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 34: 9-14.
- [22] Zhu XL, Liu SM, Yang AH, et al. Expression level of lncRNA SNHG1 in endometrial cancer tissues and its clinical significance[J]. Chin J Cancer Biother, 2020, 27(10): 1118-1125. [祝晓玲,刘淑梅,杨爱华,等.lncRNA SNHG1在子宫内膜癌组织中的表达水平及其临床意义[J].中国肿瘤生物治

- 疗杂志, 2020, 27(10): 1118-1125.]
- [23] Zhou SG, Zhang W, Ma HJ, *et al.* Silencing of LncRNA TCONS_00088786 reduces renal fibrosis through miR-132[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1): 166-173.
- [24] Limandjaja GC, Niessen FB, Scheper RJ, *et al.* Hypertrophic scars and keloids: Overview of the evidence and practical guide for differentiating between these abnormal scars[J]. *Exp Dermatol*, 2021, 30(1): 146-161.
- [25] Li J, Chen L, Cao C, *et al.* The long non-coding RNA lncRNA8975-1 is upregulated in hypertrophic scar fibroblasts and controls collagen expression[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1-2): 326-334.
- [26] Liu B, Lin L, Yu S, *et al.* Long non-coding RNA H19 acts as a microRNA-194 sponge to inhibit the apoptosis and promote the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99(12): 1288-1297.
- [27] Luo HB, Cao Y, Tao MC, *et al.* Long non-coding RNA GAS5 inhibits the proliferation and induces the apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts by sponging miR-21[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2021, 35(1): 283-288.
- [28] Zhu HY, Bai WD, Li C, *et al.* Knockdown of lncRNA-ATB suppresses autocrine secretion of TGF- β 2 by targeting ZNF217 via miR-200c in keloid fibroblasts[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24728.
- [29] Wang Z, Jinnin M, Nakamura K, *et al.* Long non-coding RNA TSIX is upregulated in scleroderma dermal fibroblasts and controls collagen mRNA stabilization[J]. *Exp Dermatol*, 2016, 25(2): 131-136.
- [30] Sun H, Chen J, Qian W, *et al.* Integrated long non-coding RNA analyses identify novel regulators of epithelial-mesenchymal transition in the mouse model of pulmonary fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(7): 1234-1246.
- [31] Zhou C, York SR, Chen JY, *et al.* Long noncoding RNAs expressed in human hepatic stellate cells form networks with extracellular matrix proteins[J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 31.
- [32] Thin KZ, Tu JC, Raveendran S, *et al.* Long non-coding SNHG1 in cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 494: 38-47.
- [33] Zhu Y, Li B, Liu Z, *et al.* Up-regulation of lncRNA SNHG1 indicates poor prognosis and promotes cell proliferation and metastasis of colorectal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(67): 111715-111727.
- [34] Zhou RS, Zhang EX, Sun QF, *et al.* Integrated analysis of lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in squamous cell carcinoma of tongue[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 779.
- [35] Zheng S, Li M, Miao K, *et al.* SNHG1 contributes to proliferation and invasion by regulating miR-382 in breast cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 5589-5598.
- [36] Liu L, Chen Y, Shu J, *et al.* Identification of microRNAs enriched in exosomes in human pericardial fluid of patients with atrial fibrillation based on bioinformatic analysis[J]. *J Thorac Dis*, 2020, 12(10): 5617-5627.
- [37] Du Q, Chen J. SNHG1 promotes proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5): 110.
- [38] Li W, Dong X, He C, *et al.* LncRNA SNHG1 contributes to sorafenib resistance by activating the Akt pathway and is positively regulated by miR-21 in hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 183.

(责任编辑: 纪方方)