

网络出版时间:2023-08-31 15:02:30 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230831.1357.016

miR-148b-3p 调控瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞增殖的机制研究

李心怡,李茜,张伟,李小静

摘要 目的 分析 miR-148b-3p 对瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞增殖的影响。方法 通过 Real-time PCR 分析人瘢痕疙瘩来源成纤维细胞(HKF)和正常人成纤维细胞(NFs)中 miR-148b-3p 和 SPARC 的表达水平。通过 Western blot 检测细胞中富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(SPARC)蛋白表达水平。利用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法和平板克隆形成分析 miR-148b-3p 和 SPARC 对 HKF 增殖的影响。使用在线分析软件预测 miR-148b-3p 的靶基因,随后构建荧光素酶报告基因质粒,通过荧光素酶报告基因法分析 miR-148b-3p 与靶基因的靶向结合位点。结果 miR-148b-3p 在 HKF 中低表达,SPARC 在 HKF 中高表达。在 HKF 细胞中转染 miR-148b-3p 能够下调 SPARC 的表达,并抑制细胞增殖。在线分析软件预测 miR-148b-3p 能够靶向结合 SPARC 的 3'-UTR;双荧光素酶报告基因的结果进一步证实 miR-148b-3p 能够靶向作用于 SPARC 的 3'-UTR。在转染 miR-148b-3p 的 HKF 中再转染 SPARC 真核表达质粒,能够抵消 miR-148b-3p 的作用,

恢复细胞增殖能力。结论 miR-148b-3p 通过靶向作用于 SPARC 的 3'-UTR,抑制其表达,抑制 HKF 增殖。

关键词 病理性瘢痕;miR-148b-3p;富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白;增殖

中图分类号 R 619.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1534-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.016

病理性瘢痕是皮肤损伤过度愈合的结果,可导致美学受损或皮肤功能减退以及心理障碍,包括自卑和焦虑。瘢痕主要由成纤维细胞增生和以胶原蛋白为主的细胞外基质的过度沉积引起。富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(secreted protein acidic and rich in cysteine,SPARC)是一种胶原结合蛋白,能够通过影响转化生长因子- β (TGF- β)活性参与组织纤维化及瘢痕的形成^[1]。先前的研究显示 SPARC 能够促进人瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞(HKF)和正常人成纤维细胞(NFs)增殖,下调 HKF 中 SPARC 表达能够抑制细胞的增殖^[2,3]。微小 RNA(miRNAs)是一类小的非编码 RNA 分子,参与调节多种生物学过程,如细胞增殖和组织再生等,也参与瘢痕的发生发

2023-08-13 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1908085QH327)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介:李心怡,女,博士研究生,主治医师;

李小静,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:lixiaojing5@163.com

group were injected with silicon dioxide (SiO_2) dust suspension, and the control group was injected with the same amount of normal saline. HE, Masson and immunohistochemistry staining were used to observe the pathological changes and lymphangiogenesis of lung tissue. The expression levels of miR-455-3p and VEGF-C in lung tissues of rats were detected by Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and Western blot; The miR-455-3p inhibitors and negative controls (NC) were transfected into HLECs, and the expression levels of miR-455-3p and VEGF-C in cells were detected by RT-qPCR and Western blot. The migration ability of HLECs was detected by scratch test, the ability of tubular structure formation was detected by matrigel tube formation test, and dual luciferase experiments were used to verify the targeting relationship between miR-455-3p and VEGF-C. **Results** Compared with the normal control group, in the silicosis model group, a large number of inflammatory cells gathered and collagen gradually deposited in the pulmonary interstitium, and there was lymphatic hyperplasia in the lung. The expression of miR-455-3p in the lung tissue was lower than that in the control group, and the expression of VEGF-C was higher than that in the control group; After transfection with HLECs, compared with the NC group, the expression of miR-455-3p in the cells of the Inhibitors group decreased, the expression of VEGF-C increased, and the ability of cell migration and tubular structure formation increased ($P < 0.05$); VEGF-C was confirmed as a target gene of miR-455-3p by the dual luciferase experiments. **Conclusion** miR-455-3p can affect the tubular structure formation ability of HLECs and regulate lymphangiogenesis by targeting the expression of VEGF-C.

Keywords miR-455-3p; VEGF-C; silicosis; lymphangiogenesis

展^[4]。已有报道显示在瘢痕疙瘩和 HKF 中 miR-148b-3p 的表达水平下调^[5],利用数据库预测显示 SPARC 是 miR-148b-3p 的潜在靶点,但目前还未见相关报道。因此,该研究分析了 HKF 细胞中 miR-148b-3p 和 SPARC 的表达水平以及 miR-148b-3p 对 SPARC 调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 胎牛血清、DMEM 培养基、青链霉素液、胰蛋白酶-EDTA 消化液、TRIzol reagent 和 Lipofectamine 3000 均购自美国 Thermo Fisher 公司; miScript II RT Kit 试剂盒购自德国 Qiagen 公司; Gene Pharma Hairpin-itTM microRNA RT-PCR Quantitation Kit 购自上海 Gene Pharma 公司; SPARC 和 GAPDH 抗体购自武汉 Proteintech 公司; 细胞裂解液、PVDF 膜、CCK-8 检测试剂盒和 HRP 标记山羊抗兔二抗购自上海碧云天公司; 双荧光素酶报告基因检测系统购自美国 Promega 公司; 包含 SPARC 3'-UTR 的野生型 (WT-pmirGLO-SPARC)、突变型 (Mut-pmirGLO-SPARC) 荧光素酶报告基因质粒和真核表达质粒 (pCND3.1-SPARC) 购自滁州通用生物技术有限公司; miR-148b-3p mimic 及对照 (miR-NC) 购自上海吉玛制药技术有限公司。ABI StepOne Plus 系统购自美国 Applied Biosystems 公司; 细胞培养箱和 NanoDropTM 1000 微量分光光度计购自美国 Thermo Fisher 公司; 酶标仪购自美国 Biotek 公司; Imagequant LAS4000 分子成像仪购自美国 GE 公司。新鲜切取的瘢痕疙瘩组织标本及正常皮肤组织均来源于安徽医科大学第一附属医院整形外科, 其中耳垂 2 例, 胸部 2 例, 背部 1 例, 取材标本未接收药物治疗并均获得本人或其监护人同意。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HKF 和 NFs 由本室采用组织块贴壁法制备并传代保存^[3], 培养基选用 DMEM 培养基, 培养基中包含 10% FBS 及 1 × 青链霉素液, 放置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 使用 Lipofectamine 3000 将 miR-148b-3p mimic、miR-NC pCND3.1 和 pCND3.1-SPARC 质粒分别转染 HKF 细胞, 转染操作步骤按照说明书进行。

1.2.3 RNA 提取和 Real-time PCR 细胞中的总 RNA 通过 TRIzol reagent 提取, 提取过程参考说明书进行。总 RNA 的纯度和含量通过 NanoDropTM 1000 分光光度计检测和计算 260 nm 与 280 nm 处吸光度

值的比值, 以及 260 nm 与 230 nm 处吸光度值的比值来评价。使用 miScript II RT Kit 将总 RNA 转录成 cDNA, 将 1 μg 总 RNA 加入到含 12 μl DEPC 处理水、2 μl miScript Reverse Transcriptase Mix、2 μl miScript Nucleics Mix 和 4 μl 5 × miScript HiSpec buffer 中, 在 37 °C 孵育 60 min 后, 95 °C 孵育 5 min, 终止反应, 冻存于 -20 °C 备用。对于 miR-148b-3p 的表达水平检测使用 Gene Pharma Hairpin-itTM microRNA RT-PCR Quantitation Kit 在 ABI StepOne Plus 系统上进行, 反应条件: 95 °C、10 min 为预变性阶段条件; 95 °C、12 s、62 °C、40 s, 共 40 个循环。以 U6 作为内参, 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-143 的相对表达量。对于 SPARC mRNA 的定量检测同样在 ABI StepOne Plus 系统上进行, 反应条件为 95 °C、10 min 预变性; 95 °C、5 s、60 °C、40 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参, 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 的相对表达量。扩增使用的引物为 SPARC: F: 5'-TGAGGTATCTGTGGGAGCTAATC-3', R: 5'-GCTCAGGACTCGCTTCATGG-3'; U6snRNA: F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', R: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; GAPDH: F: 5'-TGGGTGTGAACCACGAGAA-3', R: 5'-GGCATGGACTGTGTCATGA-3'。

1.2.4 细胞增殖活力检测 使用 CCK-8 试剂盒对不同组细胞的增殖情况进行分析。将处于对数生长期的各组细胞用胰酶消化后用未添加血清的培养基重悬, 按照 100 μl/孔 (2 000 个细胞) 接种 96 孔板, 饥饿培养 12 h 后更换完全培养基继续培养, 于培养 0、24、48、72、96 h 时每孔分别加入 10 μl CCK-8 溶液, 孵育 1 h 后通过酶标仪检测 A450 值。每组细胞进行 6 复孔重复检测。

1.2.5 平板克隆形成实验 将处于对数生长期的各组细胞用胰酶消化, 将 1 × 10³ 个细胞用完全培养基重悬, 置于 10 cm 细胞培养皿中。在 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中持续培养 7 d, 用 0.1% 的结晶紫染色后, 在显微镜下计数 ≥ 30 个细胞的克隆数量。每组细胞进行 3 复孔重复检测。

1.2.6 双荧光素酶报告基因分析 双荧光素酶报告基因质粒构建包括野生型、突变型 SPARC 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒 WT-pmirGLO-SPARC, miR-148b-3p 结合区域点突变的荧光素酶报告基因质粒 Mut-pmirGLO-SPARC。将构建的质粒转染至 HEK293 细胞, 另将内参质粒 (海肾素荧光) 和 miR-148b-3p 转染至 HEK293 细胞进行对照研究。48 h 后操作裂解细胞, 具体操作方法参照双荧光素酶报

告基因检测系统的说明书,在多功能酶标仪上加入发光液之后检测结果。内参质粒为海肾素荧光。分析 miR-148b-3p 和 SPARC 3'-UTR 的相互作用。

1.2.7 Western blot 收集细胞后,使用细胞裂解液裂解细胞,于 4 ℃,1 000 r/m 离心 5 min,收集上清液。加入上样 buffer 后煮沸 5 min,进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,用封闭液稀释的 SPARC 和 GAPDH 抗体 4 ℃ 孵育过夜,洗涤后加入适当稀释的 HRP 标记山羊抗兔二抗室温孵育 1 h。将膜洗涤 3 次后在膜上涂布 ECL 发光液后在 Imagequant LAS4000 分子成像仪上观察结果。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差分析(ANOVA)进行多组间数据的比较,使用 Student's-*t* 检验进行数据间两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SPARC 和 miR-148b-3p 在 HKF 和 NFs 中表达水平 Real-time PCR 检测 HKF 和 NFs 中 SPARC 和 miR-148b-3p 的表达水平显示,HKF 中 SPARC mRNA 的相对表达水平为 4.11 ± 0.27 ,在 NFs 中 SPARC mRNA 的相对表达水平为 1.14 ± 0.19 ,HKF 高于 NFs ($t = 9.68$, $P = 0.0005$),而 HKF 中 miR-148b-3p 的相对表达水平为 0.47 ± 0.22 ,NFs 中 miR-148b-3p 的相对表达水平为 1.24 ± 0.15 ,HKF 则低于 NFs ($t = 8.56$, $P = 0.0008$)。见图 1。

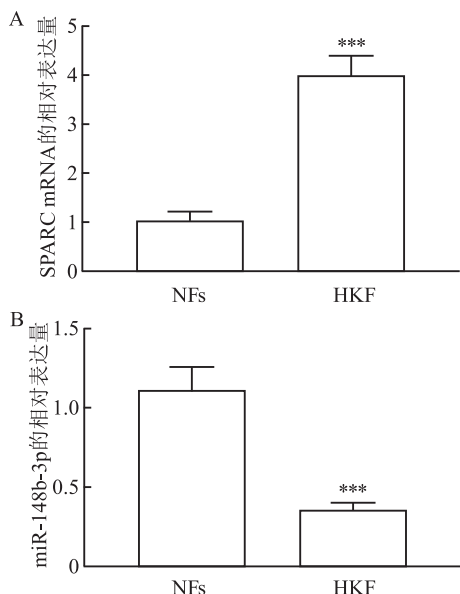


图 1 SPARC 和 miR-148b-3p 在 HKF 和 NFs 中表达水平

A: SPARC 的表达水平; B: miR-148b-3p 的表达水平; 与 NFs 比较: *** $P < 0.001$

2.2 miR-148b-3p 抑制 HKF 中 SPARC 的表达

在 HKF 细胞中转染 miR-148b-3p, 后 Real-time PCR 检测显示 miR-148b-3p 的表达水平增加 [(1.08 ± 0.15) vs (7.05 ± 0.14) , $t = 12.46$, $P = 0.000$], 而 SPARC 的表达水平降低了 [(1.21 ± 0.25) vs (0.47 ± 0.08) , $t = 6.46$, $P = 0.004$]。见图 2。

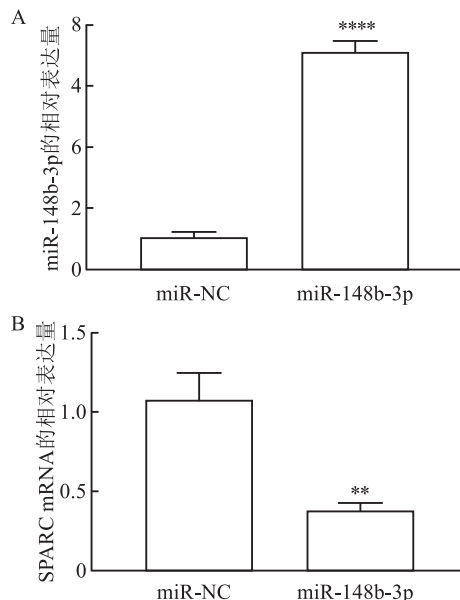


图 2 miR-148b-3p 抑制 HKF 中 SPARC 的表达

A: miR-148b-3p 的表达水平; B: SPARC 的表达水平; 与 miR-NC 组比较: ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$

2.3 miR-148b-3p 对 HKF 增殖的影响 通过 CCK-8 法检测在 HKF 细胞中转染 miR-148b-3p 后 0 ~ 96 h 细胞增殖情况, 结果表明, 从 48 h 开始, 与 miR-NC 组相比, miR-148b-3p 组的增殖能力明显下降 ($F = 125.4$, $P = 0.002$)。见图 3。

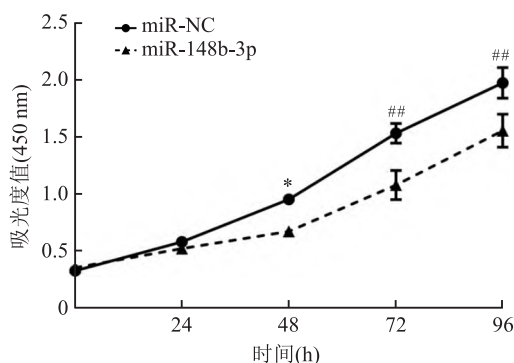


图 3 miR-148b-3p 对 HKF 增殖的影响

与 miR-148b-3p 组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-148b-3p 组比较: ** $P < 0.01$

2.4 miR-148b-3p 对 HKF 克隆形成的影响 平板

克隆形成分析显示 miR-NC 组 (729 ± 37) 细胞克隆的数量明显高于 miR-148b-3p 组 (476 ± 38) ($t = 9.34$, $P = 0.0006$), 见图 4。

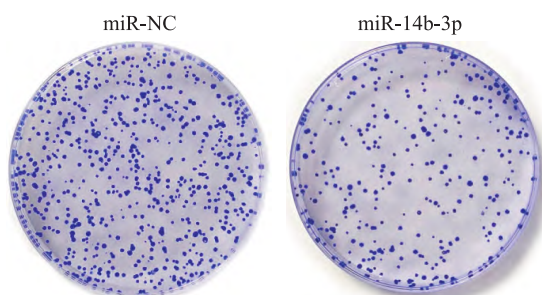


图 4 平板克隆形成分析 miR-148b-3p 对 HKF 克隆形成的影响

2.5 miR-148b-3p 靶向作用于 SPARC 3'-UTR 抑制 SPARC 的表达 分别使用在线分析软件 miRANda (<http://www.microrna.org/>)、PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) 和 TargetScan7.1 (<http://www.targetscan.org/>) 预测 SPARC 3'-UTR 中 miR-148b-3p 的结合位点, 构建荧光素酶报告基因质粒进行实验验证。软件分析显示 miR-148b-3p 与 SPARC 3'-UTR 存在结合位点(图 5A); 双荧光素酶报告基因分析显示, miR-148b-3p 能够靶向作用于 SPARC 3'-UTR 抑制荧光素酶表达, 当对 SPARC 的 3'-UTR 中结合位点进行点突变处理后, miR-148b-3p 的抑制作用消失, 见图 5B、C。

www.targetscan.org/) 预测 SPARC 3'-UTR 中 miR-148b-3p 的结合位点, 构建荧光素酶报告基因质粒进行实验验证。软件分析显示 miR-148b-3p 与 SPARC 3'-UTR 存在结合位点(图 5A); 双荧光素酶报告基因分析显示, miR-148b-3p 能够靶向作用于 SPARC 3'-UTR 抑制荧光素酶表达, 当对 SPARC 的 3'-UTR 中结合位点进行点突变处理后, miR-148b-3p 的抑制作用消失, 见图 5B、C。

2.6 过表达 SPARC 抵消 miR-148b-3p 对 HKF 增殖的抑制作用 在转染 miR-148b-3p 的同时转染 SPARC 真核表达质粒, 通过 Western blot 分析细胞中 SPARC 的表达水平发现转染 miR-148b-3p 后细胞中 SPARC 表达水平下降, 转染 SPARC 真核表达质粒后, 细胞中 SPARC 表达水平回升。通过 CCK-8 法检测各组细胞 0~96 h 增殖情况, 结果显示, 转染 SPARC 细胞的增殖能力明显增加 ($F = 120.9$, $P = 0.005$), 见图 6。

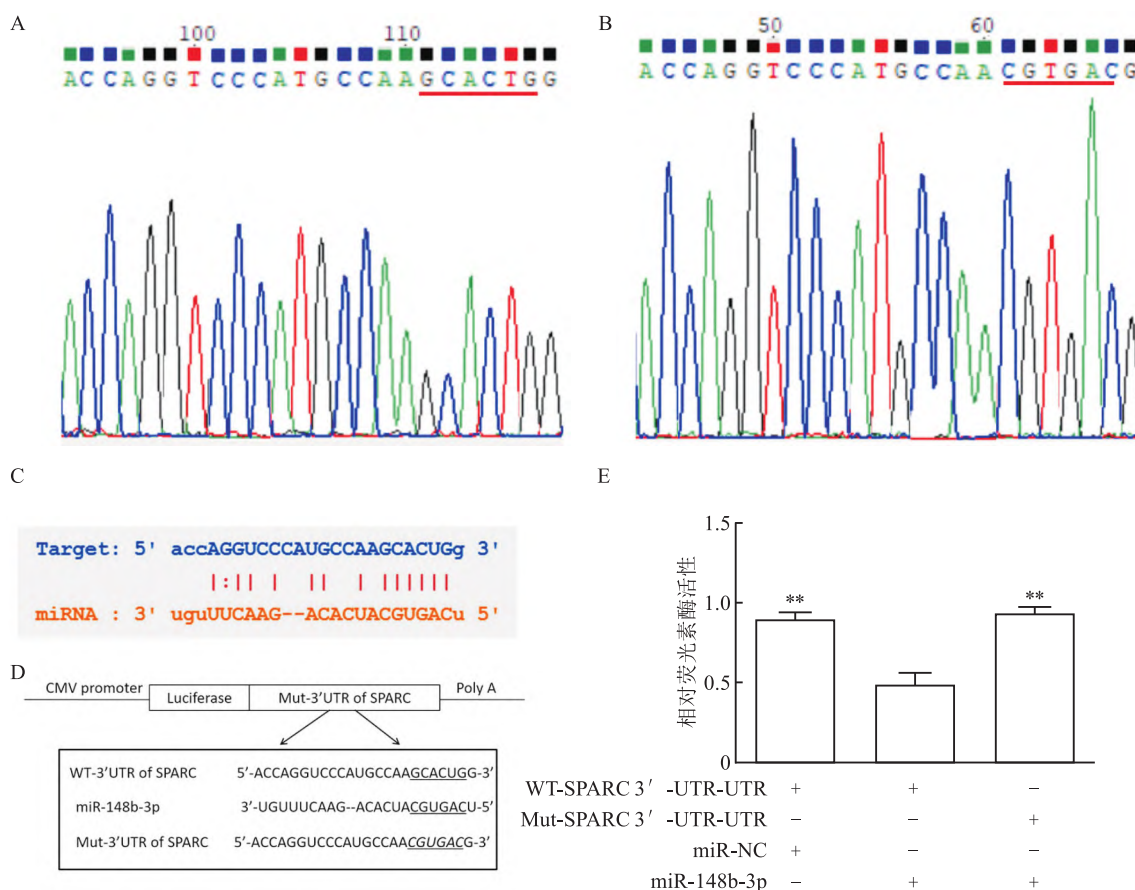


图 5 miR-148b-3p 靶向作用于 SPARC 3'-UTR 抑制 SPARC 的表达

A: 野生型荧光素酶报告基因质粒测序结果; B: 突变型荧光素酶报告基因质粒测序结果; C: 在线分析软件预测 SPARC 3'-UTR 中 miR-148b-3p 的结合位点; D: WT-pmirGLO-SPARC 和 Mut-pmirGLO-SPARC 荧光素酶报告基因质粒构建的示意图; E: 双荧光素酶报告基因分析 miR-148b-3p 与 SPARC 3'-UTR 的靶向作用; ** $P < 0.01$

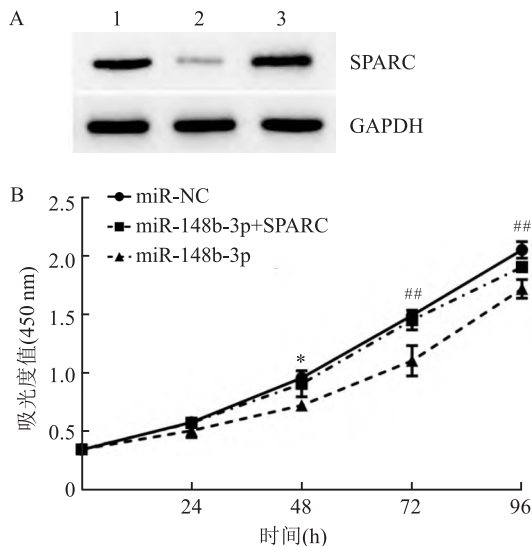


图6 过表达 SPARC 抵消 miR-148b-3p 对 HKF 增殖的抑制作用

A: Western blot 分析细胞中 SPARC 的表达水平;1: miR-NC 组;2: miR-148b-3p 组;3: miR-148b-3p + SPARC 组;B: CCK-8 法检测细胞增殖能力变化;miR-NC 组与 miR-148b-3p 组比较: * $P < 0.05$; miR-148b-3p + SPARC 组与 miR-148b-3p 组比较: ## $P < 0.01$

2.7 过表达 SPARC 抵消 miR-148b-3p 对 HKF 克隆形成的抑制作用 平板克隆形成分析显示 miR-NC 组细胞克隆的数量为 (749 ± 22) , miR-148b-3p 组细胞克隆的数量为 (470 ± 37) , miR-148b-3p + SPARC 组细胞克隆的数量为 (663 ± 32) 。miR-148b-3p + SPARC 组与 miR-148b-3p 组相比细胞克隆的数量明显增加 ($t = 6.88$, $P = 0.0011$)。见图 7。

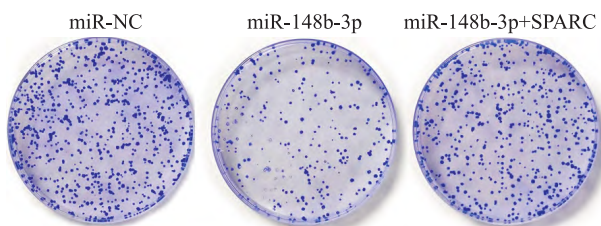


图7 过表达 SPARC 抵消 miR-148b-3p 对 HKF 克隆形成的抑制作用

3 讨论

病理性瘢痕是一种皮肤纤维化疾病,影响患者的生活质量,其潜在机制仍不清楚。已观察到 miRNA 在瘢痕形成过程中发挥调节作用,对瘢痕组织的基因芯片检测已经确定了 40 个上调和下调的 miRNA^[6]。例如,miR-422a 可以靶向 MAPK1,积极参与 HTS 的形成^[7];miR-3187-3p 可以靶向 IGF1R 抑制其表达,IGF1R 表达水平下调已被证明与皮肤

纤维化相关^[8];在 HKF 中 miR-3187-3p 可以调控 GAB1 表达,促进细胞增殖、迁移和侵袭^[9]。在癌症中,miR-148b-3p 作为肿瘤抑制因子,能够抑制癌细胞的生物学表型,如细胞活力、迁移等^[10-12]。在瘢痕以及瘢痕疙瘩来源的成纤维细胞中 miR-148b-3p 表达水平下调,但其作用尚不明确。本研究进一步分析显示 miR-148b-3p 在 HKF 中的表达水平低于 NFs,在 HKF 中转染 miR-148b-3p 能够抑制细胞增殖。在线数据库分析显示,miR-148b-3p 可能靶向作用于 SPARC 基因的 3'-UTR,抑制其表达。Real-time PCR 的结果也进一步证实了在 HKF 中 miR-148b-3p 能够抑制 SPARC 的表达。

SPARC 是一种胶原结合细胞基质蛋白,其表达水平在伤口愈合过程^[13]和纤维化疾病组织^[14]中升高。SPARC 具有结合 I 型、III 型和 IV 型胶原蛋白的作用,在细胞外基质 (ECM) 形成中发挥重要作用。TGF- β 1 和 TGF- β 2 均能够诱导成纤维细胞表达 SPARC,而 SPARC 处理细胞后也观察到 Smad2 的磷酸化水平增加^[15],表明 SPARC 可以激活 TGF- β ,导致 TGF- α 信号的增强。在本研究中发现 SPARC 在 HKF 中的表达水平高于 NFs,与 miR-148b-3p 恰恰相反,在 HKF 中转染 miR-148b-3p 能够下调 SPARC 的表达并抑制细胞增殖,荧光素酶报告基因法进一步证实 miR-148b-3p 通过靶向 SPARC 3'-UTR 发挥抑制作用。在转染 miR-148b-3p 的 HKF 中再转染 SPARC 真核表达质粒,能够抵消 miR-148b-3p 的作用,恢复细胞的增殖能力。上述结果表明在 HKF 中 miR-148b-3p 可能通过靶向抑制 SPARC 的表达,发挥抑制瘢痕进展的作用。先前的研究^[2-3]显示在 HKF 细胞中下调 SPARC 表达能够抑制 I 和 III 型胶原蛋白的表达,改善瘢痕的形成。在本研究中进一步发现瘢痕组织及 HKF 中 SPARC 表达水平较正常皮肤成纤维细胞升高可能是因为 miR-148b-3p 的水平不足引起的。因此 SPARC 以及 miR-148b-3p 可能是治疗病理性瘢痕的新靶点,本研究为病理性瘢痕的治疗提供新的思路。

综上所述,该研究表明,在 HKF 细胞中 miR-148b-3p 的表达水平下调,SPARC 表达水平上调,过表达 miR-148b-3p 能够下调 SPARC 表达,发挥抑制 HKF 增殖的作用,提示 miR-148b-3p 和 SPARC 是治疗病理性瘢痕的潜在靶点。

参考文献

[1] Bao J M, Dang Q, Lin C J, et al. SPARC is a key mediator of

- TGF- β -induced renal cancer metastasis[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(3):1926–38.
- [2] 李茜, 李心怡, 李小静, 等. 慢病毒介导的 SPARC 基因沉默对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(6):944–8.
- [3] 朱晓璇, 李心怡, 王佳妮, 等. Sparc 对瘢痕疙瘩成纤维细胞以及正常人皮肤成纤维细胞增殖凋亡及 I 型、III 型胶原分泌影响的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(8):1222–5.
- [4] Lu T X, Rothenberg M E. MicroRNA[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4):1202–7.
- [5] Wang J, Shen J. LncRNA HOXA11-AS aggravates the keloid formation by targeting miR-148b-3p/IGFBP5 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 581:60–67.
- [6] Zhu Z, Hou Q, Li M, et al. Molecular mechanism of myofibroblast formation and strategies for clinical drugs treatments in hypertrophic scars[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5):4109–19.
- [7] Zhang Z, Huang X, Yang J, et al. Identification and functional analysis of a three-miRNA ceRNA network in hypertrophic scars[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):451.
- [8] 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):1288–97.
- [9] Xiao M, Zou X, Li B, et al. Long non-coding RNA H19 promotes the proliferation, migration and invasion while inhibits apoptosis of hypertrophic scarring fibroblasts by targeting miR-3187-3p/GAB1 axis[J]. *Burns*, 2021, 47(3):654–64.
- [10] He G, Qiu J, Liu C, et al. MiR-148b-3p Regulates the Expression of DTYMK to Drive Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Metastasis[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:625566.
- [11] Arámbula-Meraz E, Bergez-Hernández F, Leal-León E, et al. Expression of miR-148b-3p is correlated with overexpression of biomarkers in prostate cancer[J]. *Genet Mol Biol*, 2020, 43(1):e20180330.
- [12] Wang Y, Li J, Kuang D, et al. miR-148b-3p functions as a tumor suppressor in GISTs by directly targeting KIT[J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1):16.
- [13] Wang L Y, Zhang Y T, Du L Q, et al. The effect of SPARC on the proliferation and migration of limbal epithelial stem cells during the corneal epithelial wound healing[J]. *Stem Cells Dev*, 2021, 30(6):301–8.
- [14] Wong S L, Sukkar M B. The SPARC protein: an overview of its role in lung cancer and pulmonary fibrosis and its potential role in chronic airways disease[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(1):3–14.
- [15] Carneiro T, Malvar Fernández B, Ottria A, et al. Extracellular SPARC cooperates with TGF- β signalling to induce pro-fibrotic activation of systemic sclerosis patient dermal fibroblasts[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2020, 59(9):2258–63.

Mechanism of miR-148b-3p regulating proliferation of keloid derived fibroblasts

Li Xinyi, Li Xi, Zhang Wei, Li Xiaojing

(Dept of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the effect of miR-148b-3p on the proliferation of keloid derived fibroblasts. **Methods** The expression levels of miR-148b-3p and SPARC in human keloid derived fibroblasts (HKF) and normal human fibroblasts (NFS) were analyzed by real time PCR. The expression level of SPARC protein was detected by Western blot. The effects of miR-148b-3p and SPARC on HKF proliferation were analyzed by CCK-8 method and plate clone formation. The target gene of miR-148b-3p was predicted using online analysis software, and then the luciferase reporter plasmid was constructed. The targeted binding site of miR-148b-3p and the target gene was analyzed by luciferase reporter gene method. **Results** miR-148b-3p was low expressed in HKF and SPARC was high expressed in HKF. Transfection of miR-148b-3p in HKF cells could down regulate the expression of SPARC and inhibit cell proliferation. Online analysis software predicted that miR-148b-3p could target the 3'-UTR binding SPARC; The results of dual luciferase reporter gene further confirmed that miR-148b-3p could target the 3'-UTR of SPARC. Transfection of SPARC eukaryotic expression plasmid into HKF transfected with miR-148b-3p could counteract the effect of miR-148b-3p and restore cell proliferation. **Conclusion** miR-148b-3p can inhibit the proliferation of HKF by targeting the 3'-UTR of SPARC and inhibiting its expression.

Key words pathological scar; miR-148b-3p; secreted protein acidic and cysteine rich; proliferation