

· 论 著 ·

微小 RNA-627 在人增生性瘢痕中的表达及作用

郭冰玉 林枫 回蕾 王洪一

北部战区总医院烧伤整形科, 沈阳 110016

通信作者: 王洪一, Email: why1_0@163.com



【摘要】 目的 探讨微小 RNA-627(miR-627)在人增生性瘢痕中的表达及作用。 方法 采用实验研究方法。收集 2019 年 10 月—2020 年 1 月于北部战区总医院就诊的符合入选标准的 6 例增生性瘢痕患者[男 2 例、女 4 例,年龄(34±11)岁]的增生性瘢痕组织、同期于同单位就诊的 6 例符合入选标准的外伤患者[男 3 例、女 3 例,年龄(35±13)岁]行皮瓣移植手术后剩余的正常皮肤组织,采用实时荧光定量反转录 PCR 法检测 miR-627 的 mRNA 表达。取增生性瘢痕组织,培养第 3~5 代成纤维细胞(Fb),经鉴定后用于后续实验。取增生性瘢痕 Fb,分为 miR-627 阴性对照组、miR-627 模拟物组和 miR-627 抑制物组,分别转染对应的序列,转染后 0(即刻)、12、24、36、48 h,用噻唑蓝法检测细胞活力;转染后 24 h,用流式细胞术检测细胞凋亡情况;转染后 24 h,用蛋白质印迹法检测胰岛素样生长因子 I(IGF-I)、I 型胶原和 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的蛋白表达水平。取 2 批增生性瘢痕 Fb,一批分为 IGF-I 野生型+miR-627 阴性对照组、IGF-I 野生型+miR-627 模拟物组,另一批分为 IGF-I 突变型+miR-627 阴性对照组、IGF-I 突变型+miR-627 模拟物组,分别转染对应的序列,转染后 48 h,采用荧光素酶报告基因检测试剂盒分别检测荧光素酶和肾荧光素酶的表达,并计算两者比值,反映 IGF-I 的活性。取增生性瘢痕 Fb,分为 miR-627 阴性对照组、单纯 miR-627 模拟物组和 miR-627 模拟物+IGF-I 组,分别转染对应的序列,转染后 24 h,采用蛋白质印迹法检测 IGF-I、I 型胶原和 α -SMA 蛋白表达水平。细胞实验中样本数均为 3。对数据行析因设计方差分析、单因素方差分析、独立样本 t 检验及 χ^2 检验。 结果 增生性瘢痕组织中 miR-627 的 mRNA 表达量为 0.47 ± 0.06 ,显著低于正常皮肤组织中的 $1.12\pm 0.23(t=15.090, P<0.01)$ 。转染后 12、24、36、48 h,miR-627 模拟物组细胞活力明显低于 miR-627 阴性对照组($t=9.918, 34.370, 13.580, 61.550, P<0.05$ 或 $P<0.01$),miR-627 抑制物组细胞活力明显高于 miR-627 阴性对照组($t=4.722, 8.616, 13.330, 14.000, P<0.05$ 或 $P<0.01$)。转染后 24 h,与 miR-627 阴性对照组的细胞凋亡率(8.42 ± 0.47)%相比,miR-627 模拟物组的(10.89 ± 0.35)%显著升高($t=7.301, P<0.01$),miR-627 抑制物组的(5.00 ± 0.22)%显著下降($t=11.510, P<0.01$)。转染后 24 h,与 miR-627 阴性对照组细胞 IGF-I、I 型胶原和 α -SMA 的蛋白表达相比,miR-627 模拟物组明显下降($t=25.470, 5.282, 7.415, P<0.01$),miR-627 抑制物组明显升高($t=15.930, 8.857, 9.763, P<0.01$)。转染后 48 h,IGF-I 野生型+miR-627 模拟物组细胞 IGF-I 的荧光素酶/肾荧光素酶比值为 0.463 ± 0.061 ,明显低于 IGF-I 野生型+miR-627 阴性对照组的 $0.999\pm 0.011(t=16.852, P<0.01)$;IGF-I 突变型+miR-627 模拟物组细胞 IGF-I 的荧光素酶/肾荧光素酶比值为 0.934 ± 0.021 ,与 IGF-I 突变型+miR-627 阴性对照组的 0.930 ± 0.023 相近($t=1.959, P>0.05$)。转染后 24 h,单纯 miR-627 模拟物组细胞 IGF-I、I 型胶原和 α -SMA 的蛋白表达量 $1.623\pm 0.070, 1.363\pm 0.042, 1.617\pm 0.025$ 均较 miR-627 阴性对照组的 $2.723\pm 0.045, 2.147\pm 0.067, 2.533\pm 0.055$ 明显降低($t=22.831, 7.280, 26.220, P<0.01$),miR-627 模拟物+IGF-I 组细胞 IGF-I、I 型胶原、 α -SMA 的蛋白表达量 $2.477\pm 0.102, 1.760\pm 0.046, 2.387\pm 0.049$ 均较单纯 miR-627 模拟物组明显升高($t=3.830, 8.286, 3.436, P<0.05$ 或 $P<0.01$)。 结论 人增生性瘢痕

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200225-00090

本文引用格式:郭冰玉,林枫,回蕾,等.微小 RNA-627 在人增生性瘢痕中的表达及作用[J].中华烧伤杂志,2021,37(4):369-376. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200225-00090.

Guo BY, Lin F, Hui Q, et al. Expression and effect of microRNA-627 in human hypertrophic scar[J]. Chin J Burns, 2021, 37(4): 369-376. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200225-00090.

中 miR-627 表达下调;miR-627 可通过靶向抑制 IGF- I 的表达从而抑制人增生性瘢痕 Fb 的增殖,促进 Fb 的凋亡。

【关键词】 瘢痕; 成纤维细胞; 胰岛素样生长因子 I; 微小 RNA-627

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81971845)

Expression and effect of microRNA-627 in human hypertrophic scar

Guo Bingyu, Lin Feng, Hui Qiang, Wang Hongyi

Department of Burns and Plastic Surgery, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, China

Corresponding author: Wang Hongyi, Email: why1_0@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression and effect of microRNA-627 (miR-627) in human hypertrophic scar. **Methods** The experimental research method was used. From October 2019 to January 2020, hypertrophic scar tissue from 6 patients with hypertrophic scar (2 males and 4 females, aged 34 ± 11 years) and the remaining normal skin tissue from 6 trauma patients (3 males and 3 females, aged 35 ± 13 years) after flap transplantation were collected. The above-mentioned 12 patients were admitted to the General Hospital of Northern Theater Command and met the inclusion criteria. The mRNA expression of miR-627 was detected by real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The 3rd to 5th passages of fibroblasts (Fbs) were isolated from hypertrophic scar tissue and cultured for subsequent experiments after identification. Fbs from hypertrophic scar were divided into miR-627 negative control group, miR-627 mimic group, and miR-627 inhibitor group. The corresponding sequences were transfected respectively. At 0 (immediately), 12, 24, 36, and 48 h after transfection, the cell viability was detected by thiazolyl blue method; at 24 h after transfection, the apoptosis was detected by flow cytometry; at 24 h after transfection, the protein expression levels of insulin-like growth factor I (IGF- I), type I collagen, and α smooth muscle actin (α -SMA) were detected by Western blotting. Two batches of Fbs from hypertrophic scar were used, one batch was divided into IGF- I wild type+miR-627 negative control group and IGF- I wild type+miR-627 mimic group, and the other batch was divided into IGF- I mutant+miR-627 negative control group and IGF- I mutant+miR-627 mimic group. The corresponding sequences were transfected respectively. At 48 h after transfection, the expressions of luciferase and renal luciferase were detected by luciferase reporter gene detection kit, and the ratio of the two was calculated to reflect the activity of IGF- I. Fbs from hypertrophic scar were divided into miR-627 negative control group, miR-627 mimic alone group, and miR-627 mimic+IGF- I group, and were transfected with the corresponding sequences respectively. At 24 h after transfection, the protein expression levels of IGF- I, type I collagen, and α -SMA were detected by Western blotting. The number of samples in cell experiment was 3. Data were statistically analyzed with analysis of variance for factorial design, one-way analysis of variance, independent sample *t* test, and chi-square test. **Results** The expression of miR-627 mRNA in hypertrophic scar tissue was 0.47 ± 0.06 , which was significantly lower than 1.12 ± 0.23 in normal skin tissue ($t=15.090$, $P<0.01$). At 12, 24, 36, and 48 hours after transfection, the cell viability of miR-627 mimic group was significantly lower than that of miR-627 negative control group ($t=9.918$, 34.370 , 13.580 , 61.550 , $P<0.05$ or $P<0.01$); the cell viability of miR-627 inhibitor group was significantly higher than that of miR-627 negative control group ($t=4.722$, 8.616 , 13.330 , 14.000 , $P<0.05$ or $P<0.01$). At 24 h after transfection, compared with the apoptosis rate (8.42 ± 0.47)% in miR-627 negative control group, (10.89 ± 0.35)% in miR-627 mimic group was significantly higher ($t=7.301$, $P<0.01$), and (5.00 ± 0.22)% in miR-627 inhibitor group was significantly lower ($t=11.510$, $P<0.01$). At 24 h after transfection, compared with the cell protein expressions of IGF- I, type I collagen, and α -SMA in miR-627 negative control group, those in miR-627 mimic group were significantly lower ($t=25.470$, 5.282 , 7.415 , $P<0.01$), and those in miR-627 inhibitor group were significantly higher ($t=15.930$, 8.857 , 9.763 , $P<0.01$). At 48 h after transfection, the luciferase/renal luciferase ratio of IGF- I of cells in IGF- I wild type+miR-627 mimic group was 0.463 ± 0.061 , which was significantly lower than 0.999 ± 0.011 in IGF- I wild type+miR-627 negative control group ($t=16.852$, $P<0.01$); the luciferase/renal luciferase ratio of IGF- I of cells in IGF- I mutant+miR-627 mimic group was 0.934 ± 0.021 , which was similar to 0.930 ± 0.023 in IGF- I mutant+miR-627 negative control group ($t=1.959$, $P>0.05$). At 24 h after transfection, the protein expressions of IGF- I, type I collagen, and α -SMA of cells in miR-627 mimic alone group were 1.623 ± 0.070 , 1.363 ± 0.042 , and 1.617 ± 0.025 , which were significantly lower than 2.723 ± 0.045 , 2.147 ± 0.067 , and 2.533 ± 0.055 in miR-627 negative control group ($t=22.831$, 7.280 , 26.220 , $P<0.01$); the protein expressions of IGF- I, type I collagen, and α -SMA of cells in mimic+IGF- I group were 2.477 ± 0.102 , 1.760 ± 0.046 , and 2.387 ± 0.049 , which were significantly higher than those of miR-627 mimic alone group ($t=3.830$, 8.286 , 3.436 , $P<0.05$ or

$P < 0.01$). **Conclusions** miR-627 expression in human hypertrophic scars is down-regulated; miR-627 can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of Fbs in human hypertrophic scar by targeted inhibition of IGF- I expression.

【Key words】 Cicatrix; Fibroblasts; Insulin-like growth factor I; MicroRNA-627

Fund program: General Program of National Natural Science Foundation of China (81971845)

皮肤瘢痕是烧伤后常见的疾病,可诱发患者心理和身体的双重伤害。烧伤后最常见的瘢痕是增生性瘢痕,据报道其发病率高达 70%^[1]。大面积烧伤患者通常伴有广泛的瘢痕和挛缩、瘙痒和疼痛,导致患者对自己的外表、运动受限、瘙痒或功能丧失感到强烈的心理不适^[1-2]。虽然可以通过手术、放射治疗、类固醇注射等手段对增生性瘢痕进行治疗,但这些治疗方法尚未得到优化,增生性瘢痕的分子机制尚不清楚,因此有必要对增生性瘢痕进行深入探讨,以寻找更好的治疗方案^[3-6]。

微小 RNA(miR)是一种小的寡核苷酸分子,能够通过其 3'-非翻译区结合进而调控其表达,已经被证明能够参与皮肤修复和相关疾病的进展^[7-9]。miR 具有复杂而又精细的调节机制,可以靶向调节多种病理过程中的信号通路。各种技术手段可以通过提高 miR 分子的稳定性,提高 miR 的输送效率,使其成为多种疾病治疗的潜在手段^[10-13]。miR-205-5p 被证明可以通过靶向作用 Smad2 调节增生性瘢痕 ECM 的产生,miR-181b-5p 能够调节 MAPK/胞外信号调节激酶/p21 途径促进增生性瘢痕 Fb 增殖并抑制其凋亡,miR-23b-3p 可以被 10-羟基喜树碱调节进而影响人 Fb 的凋亡^[14-16]。miR-627 被观察到在多种肿瘤中存在差异性表达,可以参与调节胃癌、肝癌、骨肉瘤、胶质瘤和鳞状细胞癌的进展^[17-21],在纤维化疾病中 miR-627 被证明可以通过靶向调节细胞外高迁移率族蛋白 B1 来影响肺纤维化的进程^[22],但是有关 miR-627 在增生性瘢痕中的作用研究鲜见报道。

目前已经有许多研究指出,增生性瘢痕组织中存在大量异常表达蛋白,包括饰胶蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、胰岛素样生长因子 I (IGF- I) 和 TGF- β ^[23-25]。本研究在检测 miR-627 在增生性瘢痕组织中表达情况后,分析 miR-627 对人增生性瘢痕 Fb 增殖、凋亡的调节作用,进一步探讨 miR-627 影响增生性瘢痕的进程,以期对增生性瘢痕的治疗提供新的思路。

1 资料与方法

本研究经北部战区总医院伦理委员会审批,批

号:R20180113。

1.1 主要试剂与仪器来源

高糖 DMEM 培养基、乙二胺四乙酸(EDTA)-胰蛋白酶、胰蛋白酶、胎牛血清均自美国 Gibco 公司,小鼠抗人 IGF- I 单克隆抗体、小鼠抗人 I 型胶原单克隆抗体、小鼠抗人 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体、小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的人抗小鼠 IgG 抗体均自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,miR-627 引物、U6 引物、IGF- I 野生型、IGF- I 突变型(将与 miR-627 结合位点的序列进行突变)及 IGF- I 质粒引物均合成于生工生物工程(上海)股份有限公司,miR-627 模拟物、miR-627 抑制物、miR-627 阴性对照均自广州市锐博生物科技有限公司,噻唑蓝、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶双染细胞凋亡检测试剂盒、荧光素酶报告基因检测试剂盒、SYBR Green 荧光定量试剂盒、TRIzol 试剂、PCR 扩增试剂盒、Takara 反转录试剂盒、脂质体 2000 转染试剂、细胞 RIPA 裂解液均自上海碧云天生物技术有限公司。CFX96™ 型实时荧光定量 PCR 仪自美国 Bio-Rad 公司,AlphaImager™2200 型凝胶图像分析系统自美国 Alpha Innotech 公司,Thermo Scientific™ Multiskan Sky 型全波长酶标仪自上海辅泽商贸有限公司,DMi3000 B 型倒置荧光显微镜自成都成器(上海)有限公司,BeamCyte 型流式细胞仪自常州必达生物科技有限公司。

1.2 病例入选标准

纳入标准:(1)患者没有任何血液系统及全身性疾病。(2)增生性瘢痕患者符合增生性瘢痕的诊断。(3)增生性瘢痕患者只接受过手术治疗。(4)患者签署知情同意书。排除标准:(1)孕妇及哺乳期妇女。(2)依从性差者。

1.3 临床资料

2019 年 10 月—2020 年 1 月于北部战区总医院就诊的 6 例增生性瘢痕患者符合本研究入选标准,其中男 2 例、女 4 例,年龄 19~45(34±11)岁,瘢痕位于胸部 4 例、手臂 1 例、下颌部 1 例。同期同单位的 6 例外伤患者符合本研究入选标准,其中男 3 例、女 3 例,年龄 22~49(35±13)岁,受伤部位位于胸部

5 例、手臂 1 例。2 类患者性别和年龄比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.343, t=1.191, P=0.517, 0.924$)。

1.4 组织中 miR-627 的 mRNA 表达情况

取 6 例外伤患者皮瓣移植手术后剩余的正常皮肤组织、6 例增生性瘢痕患者增生性瘢痕组织,每 50~100 mg 组织用 1 mL TRIzol 试剂裂解,收集裂解液加入 0.2 mL 三氯甲烷,振荡 15 s, 12 000×g 离心 15 min, 取上清液,按照体积比 2:1 加入异丙醇,振荡 15 s, 12 000×g 离心 10 min, 弃上清液,加入等体积的无水乙醇洗涤, 7 500×g 离心 5 min, 弃上清液,用无酶无菌水溶解 RNA 沉淀。使用反转录试剂盒将总 RNA 反转录成互补 DNA。miR-627 上游引物为 5'-TGTCAGAACTAGAATTTGATTATTAACATA-3', 下游引物为 5'-CAGTTCTTTGTTACAAAATGTACGTG-3', 产物长度 24 bp; U6 上游引物为 5'-CTC-GCTTCGGCAGCACATATACT-3', 下游引物为 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTG-3', 产物长度 26 bp。以 U6 为 miR-627 的内参照,按照 SYBR Green 荧光定量试剂盒说明书,采用实时荧光定量 PCR 仪进行检测。PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用 $\Delta\Delta Ct$ 法处理结果,计算目的基因的相对表达量,即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。本实验重复 3 次,结果取均值。

1.5 细胞实验

1.5.1 细胞培养 取增生性瘢痕组织,用眼科剪剪碎, PBS 漂洗 3 次。加入 2.5 g/L 的胰蛋白酶 2 mL 消化 20~40 min, 加入 3~5 mL 含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基终止消化, 800×g 离心 10 min, 弃上清液, 加入前述培养基重新悬浮细胞, 置于 37 °C 含体积分数 5% 二氧化碳的培养箱中恒温培养。待细胞生长至 80% 以上融合时, 用 EDTA-胰蛋白酶消化, 并传代培养。倒置荧光显微镜下观察细胞形态, 取第 3~5 代 Fb 细胞用于后续实验。

1.5.2 miR-627 对 Fb 活力的影响 采用噻唑蓝法检测 Fb 的活力。取细胞, 按 1×10^3 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ L。将细胞分为 miR-627 阴性对照组、miR-627 模拟物组和 miR-627 抑制物组, 每组 15 孔。按照脂质体 2000 转染试剂说明书分别转染 miR-627 阴性对照、miR-627 模拟物和 miR-627 抑制物。miR-627 模拟物序列为 5'-UCUUUUCUUGAGACUCACU-3', miR-627 抑制物序列为 5'-UCUUUUCU UU-GAGACUCACU-3', miR-627 阴性对照序列为

5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。转染后 0 (即刻)、12、24、36、48 h, 每组取 3 孔细胞, 每孔加入 20 μ L 噻唑蓝溶液, 置于 37 °C、含体积分数 5% 二氧化碳的培养箱中恒温培养 4 h, 弃上清液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜以溶解结晶。用酶标仪测量 490 nm 波长处的吸光度值, 按照噻唑蓝试剂说明书计算细胞活力。本实验重复 3 次, 结果取均值。

1.5.3 miR-627 对 Fb 凋亡的影响 取细胞, 按 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 按照 1.5.2 行分组及处理, 每组 3 孔。转染后 24 h, 用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化、收集细胞。于室温下, 800×g 离心 5~10 min, 收集细胞; 用预冷 (4 °C) PBS 重新悬浮细胞, 于室温下, 800×g 离心 5~10 min, PBS 洗涤细胞。加入 300 μ L 结合缓冲液悬浮细胞。加入 5 μ L 膜联蛋白 V-FITC 混匀后, 避光、室温孵育 15 min。上机前再加入 5 μ L 碘化丙啶染色。流式细胞仪分别测定 miR-627 阴性对照组、miR-627 模拟物组和 miR-627 抑制物组细胞早期凋亡、晚期凋亡、坏死和存活的比例, 计算凋亡率。本实验重复 3 次, 结果取均值。

1.5.4 miR-627 对 Fb 中 3 种相关蛋白表达水平的影响 采用蛋白质印迹法检测蛋白表达。取细胞, 按 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 按照 1.5.2 行分组和处理, 每组 3 孔。转染后 24 h, 使用细胞 RIPA 裂解液提取蛋白。取 30 μ g 蛋白样品, 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转膜, 50 g/L 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h。分别加入小鼠抗人 IGF- I、 α -SMA、I 型胶原和 GAPDH 一抗 (稀释比均为 1:1 000), 4 °C 孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的人抗小鼠 IgG 二抗 (稀释比为 1:5 000), 室温孵育 1 h。化学发光、显影, 凝胶成像分析系统获取图像, 采用 Image J 软件 (美国国立卫生研究院) 行灰度分析, 分别计算 IGF- I、 α -SMA、I 型胶原蛋白灰度值与 GAPDH 蛋白灰度值的比值, 以此表示各蛋白表达水平。本实验重复 3 次, 结果取均值。

1.5.5 miR-627 与 IGF- I 结合位点的预测 MIRDB 软件 (<http://mirdb.org/>) 中检索 miR-627 可能调节的靶蛋白, 通过查阅文献选出与增生性瘢痕密切相关的 IGF- I 作为后续研究对象。

1.5.6 miR-627 对 IGF- I 的靶向作用 取 2 批细胞, 按 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL。第 1 批分为 IGF- I 野生型+miR-627 阴性对照组、IGF- I 野生型+miR-627 模拟物组, 第 2 批分为 IGF- I 突变

型+miR-627阴性对照组、IGF- I 突变型+miR-627模拟物组,每组3孔。按照脂质体2000转染试剂说明书分别转染 IGF- I 野生型引物+miR-627阴性对照、IGF- I 野生型引物+miR-627模拟物、IGF- I 突变型引物+miR-627阴性对照、IGF- I 突变型引物+miR-627模拟物。IGF- I 野生型的上游引物为 5'-TCACT-CAGAGTTTCTTTTCT-3',下游引物为 5'-GCCTCTGATCCTTGAGGTGA-3',产物长度为 149 bp;IGF- I 突变型的上游引物为 5'-AGTGAGTCTCTAAGAAAA-GA-3',下游引物为 5'-GCCTCTGATCCTTGAGGTGA-3',产物长度为 149 bp;miR-627 模拟物和 miR-627 阴性对照序列同 1.5.2。转染后 48 h 重新悬浮、收集细胞,采用荧光素酶报告基因检测试剂盒分别检测并计算荧光素酶和肾荧光素酶的数值,随后计算荧光素酶/肾荧光素酶比值反映 IGF- I 的活性。本实验重复 3 次,结果取均值。

1.5.7 IGF- I 对 miR-627 的调节作用 取细胞,按 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,每孔 2 mL。将细胞分为 miR-627 阴性对照组、单纯 miR-627 模拟物组、miR-627 模拟物+IGF- I 组,每组 3 孔。按照脂质体 2000 转染试剂说明书分别转染 miR-627 阴性对照、miR-627 模拟物、miR-627 模拟物+IGF- I 质粒。IGF- I 质粒上游引物为 5'-GCCCAAGGCT-CAGAAGG-3',下游引物为 5'-TTTAACAGGTA-ACTCGTGC-3',产物长度 167 bp;miR-627 模拟物和 miR-627 阴性对照序列同 1.5.2。转染后 24 h,采用同 1.5.4 的方法检测 IGF- I、I 型胶原和 α -SMA 的蛋白表达。本实验重复 3 次,结果取均值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。计数资料数据以频数表示,行 χ^2 检验;计量资料数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间多个时间点总体比较行析因设计方差分析,多组间单一时间点总体比较行单因素方差分析,组间两两比较行独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织中 miR-627 的 mRNA 表达

增生性瘢痕组织中 miR-627 的 mRNA 表达量为 0.47 ± 0.06 ,显著低于正常皮肤组织中的 1.12 ± 0.23 ($t=15.090, P=0.004$)。

2.2 Fb 形态

从增生性瘢痕组织中分离培养的第 3 代细胞胞

体呈梭形或不规则三角形,中央有卵圆形核,胞质突起,生长时呈放射状,见图 1。细胞鉴定为 Fb。

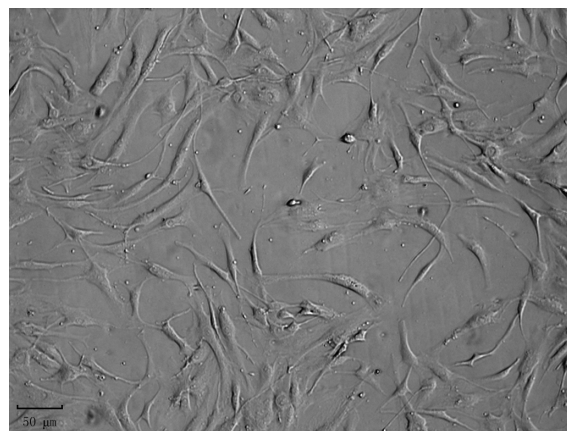


图 1 第 3 代人增生性瘢痕成纤维细胞的形态呈梭形或不规则三角形 倒置荧光显微镜 $\times 200$,图中标尺为 $50 \mu\text{m}$

2.3 miR-627 调节 Fb 后细胞的活力

转染后 0 h,各组细胞活力相近 ($P > 0.05$)。转染后 12、24、36、48 h,与 miR-627 阴性对照组相比,miR-627 模拟物组细胞活力明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),miR-627 抑制物组细胞活力明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

2.4 miR-627 调节 Fb 后细胞的凋亡

转染后 24 h,miR-627 阴性对照组、miR-627 模拟物组、miR-627 抑制物组细胞凋亡率分别为 $(8.42 \pm 0.47)\%$ 、 $(10.89 \pm 0.35)\%$ 、 $(5.00 \pm 0.22)\%$,组间总体比较,差异有统计学意义 ($F=164.00, P < 0.01$)。miR-627 模拟物组的细胞凋亡率较 miR-627 阴性对照组显著升高 ($t=7.301, P=0.002$),miR-627 抑制物组的细胞凋亡率较 miR-627 阴性对照组显著下降 ($t=11.510, P=0.003$)。

2.5 miR-627 调节 Fb 后细胞中 IGF- I、I 型胶原和 α -SMA 的表达

与 miR-627 阴性对照组细胞 IGF- I、I 型胶原和 α -SMA 的蛋白表达量相比,miR-627 模拟物组显著下降 ($t=25.470, 5.282, 7.415, P=0.001, 0.006, 0.002$),miR-627 抑制物组明显升高 ($t=15.930, 8.857, 9.763, P=0.001, 0.001, 0.001$)。见图 2。

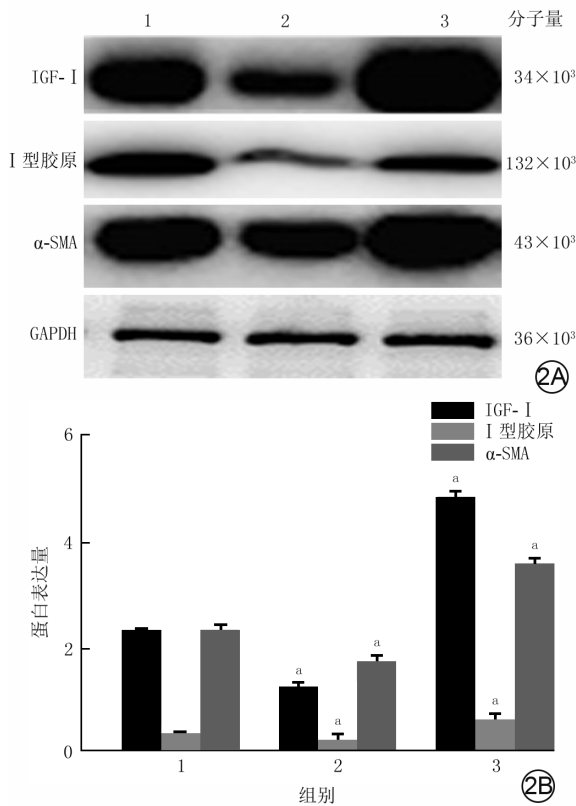
2.6 miR-627 靶向作用后 IGF- I 的表达

转染后 48 h,IGF- I 野生型+miR-627 模拟物组细胞 IGF- I 的荧光素酶/肾荧光素酶的比值为 0.463 ± 0.061 ,明显低于 IGF- I 野生型+miR-627 阴性对照组的 0.999 ± 0.011 ($t=16.852, P=0.004$);IGF- I 突变型+miR-627 模拟物组细胞 IGF- I 的荧光素酶/肾

表 1 3 组人增生性瘢痕成纤维细胞转染后各时间点细胞活力比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 样本数 | 0 h | 12 h | 24 h | 36 h | 48 h |
|------------------|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| miR-627 阴性对照组 | 15 | 0.161±0.017 | 0.460±0.008 | 0.741±0.026 | 0.962±0.023 | 1.076±0.015 |
| miR-627 模拟物组 | 15 | 0.157±0.019 | 0.227±0.028 | 0.377±0.012 | 0.459±0.037 | 0.524±0.007 |
| miR-627 抑制物组 | 15 | 0.140±0.009 | 0.556±0.033 | 0.955±0.016 | 1.264±0.012 | 1.451±0.031 |
| F 值 | | 0.99 | 86.27 | 482.50 | 492.40 | 1 056.00 |
| P 值 | | 0.427 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| t ₁ 值 | | 0.185 | 9.918 | 34.370 | 13.580 | 61.550 |
| P ₁ 值 | | 0.870 | 0.010 | 0.001 | 0.005 | 0.001 |
| t ₂ 值 | | 3.739 | 4.722 | 8.616 | 13.330 | 14.000 |
| P ₂ 值 | | 0.065 | 0.042 | 0.013 | 0.006 | 0.005 |

注:miR-627 为微小 RNA-627;各组各时间点样本数均为 3;处理因素主效应, $F=189.70, P<0.01$;时间因素主效应, $F=1 951.00, P<0.01$;两者交互作用, $F=863.00, P<0.01$;F 值、P 值为各时间点组间总体比较所得, t₁ 值、P₁ 值, t₂ 值、P₂ 值分别为 miR-627 模拟物组、miR-627 抑制物组与 miR-627 阴性对照组比较所得



注:IGF- I 为胰岛素样生长因子 I, α-SMA 为 α 平滑肌肌动蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, miR-627 为微小 RNA-627;条带图上方和条图横坐标 1、2、3 分别为 miR-627 阴性对照组、miR-627 模拟物组、miR-627 抑制剂组;3 组间 IGF- I、I 型胶原、α-SMA 总体比较, $F=385.400、92.510、155.900, P<0.01$;与 miR-627 阴性对照组比较, $^*P<0.01$

图 2 蛋白质印迹法检测 3 组人增生性瘢痕成纤维细胞转染后 24 h IGF- I、I 型胶原、α-SMA 蛋白表达。2A. 条带图;2B. 条图($\bar{x} \pm s$, 样本数为 3)

荧光素酶的比值为 0.934±0.021, 与 IGF- I 突变型+miR-627 阴性对照组的 0.930±0.023 比较, 差异无统计学意义 ($t=1.959, P=0.189$)。

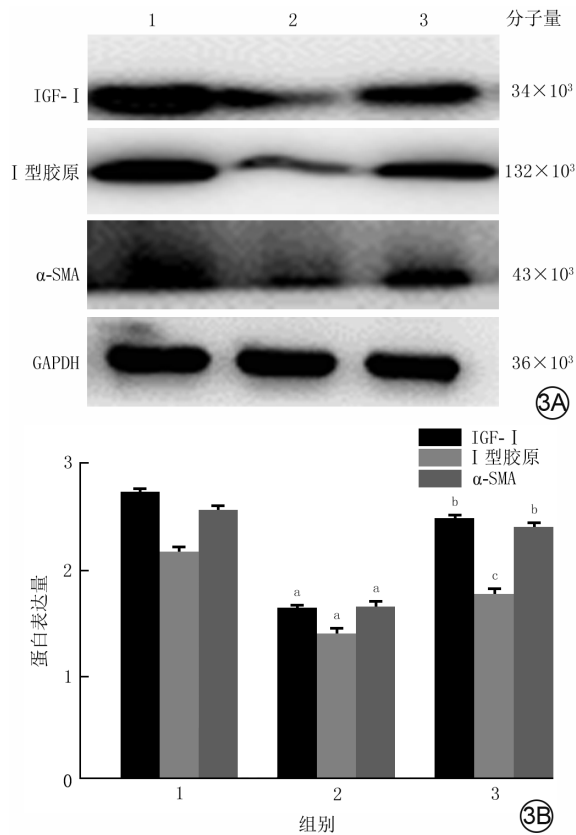
2.7 miR-627 通过 IGF- I 调节 Fb 后细胞中 IGF- I、I 型胶原和 α-SMA 的表达

转染后 24 h, 与 miR-627 阴性对照组细胞 IGF- I、I 型胶原和 α-SMA 的蛋白表达量相比, 单纯 miR-627 模拟物组明显下降 ($t=22.831、7.280、26.220, P<0.001$), 而 miR-627 模拟物+IGF- I 组细胞 IGF- I、I 型胶原、α-SMA 的蛋白表达量较单纯 miR-627 模拟物组明显升高 ($t=3.830、8.286、3.436, P=0.019、<0.001、0.026$)。见图 3。

3 讨论

miR-29、miR-137、miR-663、miR-6836-3p 和 miR-155 都被证明可以通过多种方式影响增生性瘢痕 Fb 的生物学功能^[26-30]。目前常见的增生性瘢痕治疗方案主要是降解 ECM, 减少 IGF- I 合成, 抑制 Fb 的过度增殖^[31-35]。miR-627 已经被证明可以参与治疗肺纤维化疾病, 其可能机制是 miR-627 的高表达可部分逆转 TGF-β₁ 诱导的正常人肺 Fb 增殖, 下调 α-SMA 和 IGF- I 的表达^[12]。本研究证明, 增生性瘢痕组织中 miR-627 的 mRNA 表达降低。进一步细胞实验的结果表明, miR-627 能够显著抑制增生性瘢痕 Fb 的增殖, 并且促进增生性瘢痕 Fb 的凋亡; miR-627 过表达后能够下调 α-SMA、IGF- I 及 I 型胶原的表达。以上结果说明, miR-627 可能是增生性瘢痕的潜在诊疗靶点。

本研究通过 MIRDB 软件预测了 miR-627 可能靶向作用的蛋白, 选取了 IGF- I 作为后续研究对象。IGF- I 和 IGF- II 被证明可以通过促进 Fb 增殖和胶原合成促进伤口愈合^[23]。本研究结果显示, miR-627 能够靶向调节 IGF- I 的表达和活性。当



注: IGF-1 为胰岛素样生长因子 I, α -SMA 为 α 平滑肌肌动蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, miR-627 为微小 RNA-627; 条带图上方和条图横坐标 1、2、3 分别为 miR-627 阴性对照组、单纯 miR-627 模拟物组、miR-627 模拟物+IGF-1 组; 3 组间 IGF-1、I 型胶原、 α -SMA 总体比较, $F=172.300$ 、 167.000 、 357.700 , $P<0.01$; 与 miR-627 阴性对照组比较, $^aP<0.01$; 与 miR-627 模拟物比较, $^bP<0.05$, $^cP<0.01$

图 3 蛋白质印迹法检测 3 组人增生性瘢痕成纤维细胞转染后 24 h IGF-1、I 型胶原、 α -SMA 蛋白表达。3A. 条带图; 3B. 条图($\bar{x} \pm s$, 样本数为 3)

miR-627 与 IGF-1 共同转染 Fb 时, miR-627 能够显著下调 IGF-1 的活性, 但是 miR-627 结合位点发生突变后, IGF-1 的活性没有被 miR-627 抑制。过表达 miR-627 的 Fb 中 IGF-1、I 型胶原和 α -SMA 蛋白表达水平下降, 转染 IGF-1 质粒后, 上述 3 种蛋白表达水平升高了, 其水平与 miR-627 阴性对照接近。因此, 本课题组推断 miR-627 可靶向调节 IGF-1, 临床中可通过过表达 miR-627 来实现抑制增生性瘢痕的发生发展。

本研究表明, 人增生性瘢痕组织中 miR-627 表达下调, 过表达 miR-627 可能通过靶向抑制 IGF-1 从而抑制增生性瘢痕 Fb 增殖, 促进 Fb 凋亡。miR-627 可能成为增生性瘢痕治疗的潜在靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xiao Y. MiR-486-5p inhibits the hyperproliferation and production of collagen in hypertrophic scar fibroblasts via IGF1/PI3K/AKT pathway[J]. J Dermatolog Treat, 2020, 21: 1-10. DOI: 10.1080/09546634.2020.1728210.
- [2] Zhang Y, Deng Q, Tu L, et al. tRNA-derived small RNAs: a novel class of small RNAs in human hypertrophic scar fibroblasts[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(1):115-130. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4411.
- [3] Zhong C, Nong Q, Feng W, et al. Polyphyllin VII induces fibroblasts apoptosis via the ERK/JNK pathway[J]. Burns, 2021, 47(1):140-149. DOI: 10.1016/j.burns.2020.03.012.
- [4] Klifto KM, Asif M, Hultman CS. Laser management of hypertrophic burn scars: a comprehensive review[J/OL]. Burns Trauma, 2020, 8:tkz002[2020-02-25]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32346540/. DOI: 10.1093/burnst/tkz002.
- [5] Xu X, Gu S, Huang X, et al. The role of macrophages in the formation of hypertrophic scars and keloids[J/OL]. Burns Trauma, 2020, 8:tkaa006[2020-02-25]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32341919/. DOI: 10.1093/burnst/tkaa006.
- [6] Karlsson M, Steinvall I, Sjöberg F, et al. Burn scar outcome at six and 12 months after injury in children with partial thickness scalds: effects of dressing treatment[J]. Burns, 2020, 46(3): 546-551. DOI: 10.1016/j.burns.2020.02.007.
- [7] Li L, Han W, Chen Y, et al. MiR-3613-3p inhibits hypertrophic scar formation by down-regulating arginine and glutamate-rich 1[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(2):1025-1036. DOI: 10.1007/s11010-020-03968-4.
- [8] Chai CY, Tai IC, Zhou R, et al. MicroRNA-9-5p inhibits proliferation and induces apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts through targeting peroxisome proliferator-activated receptor β [J]. Biol Open, 2020, 9(12): bio051904. DOI: 10.1242/bio.051904.
- [9] Jiang D, Guo B, Lin F, et al. miR-205 inhibits the development of hypertrophic scars by targeting THBS1[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(21):22046-22058. DOI: 10.18632/aging.104044.
- [10] 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):1042-1048. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.11.040.
- [11] Pang K, Li B, Tang Z, et al. Resveratrol inhibits hypertrophic scars formation by activating autophagy via the miR-4654/Rheb axis[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(4): 3440-3452. DOI: 10.3892/mmr.2020.11407.
- [12] Zhang Y, Hong WL, Li ZM, et al. The mechanism of miR-222 targets matrix metalloproteinase 1 in regulating fibroblast proliferation in hypertrophic scars[J]. Aesthetic Plast Surg, 2021, 45(2): 749-757. DOI: 10.1007/s00266-020-01727-w.
- [13] Xiao L, Tang T, Huang Y, et al. MiR-564 promotes hypertrophic scar formation through TGF- β 1 upregulation[J]. G Ital Dermatol Venereol, 2019, 154(2): 186-191. DOI: 10.23736/S0392-0488.17.05773-X.
- [14] Qi J, Liu Y, Hu K, et al. MicroRNA-205-5p regulates extracellular matrix production in hyperplastic scars by targeting Smad2[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3):2284-2290. DOI: 10.3892/etm.2019.7187.
- [15] Liu B, Guo Z, Gao W. miR-181b-5p promotes proliferation and inhibits apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts through regulating the MEK/ERK/p21 pathway[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3):1537-1544. DOI: 10.3892/etm.2019.7159.
- [16] Zeng L, Sun Y, Li X, et al. 10-Hydroxycamptothecin induces apoptosis in human fibroblasts by regulating miRNA-23b-3p ex-

- pression[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(4): 2680-2686. DOI: 10.3892/mmr.2019.9927.
- [17] Raad M, Salehi Z, Habibzaadeh Baalsini M, et al. Association of rs2620381 polymorphism in miR-627 and gastric cancer[J]. Br J Biomed Sci, 2020, 77(2): 76-80. DOI: 10.1080/09674845.2019.1692762.
- [18] Wang J, Chen T, Wang L, et al. MicroRNA-627-5p inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting BCL3 transcription coactivator[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(3): 485-494. DOI: 10.1111/1440-1681.13218.
- [19] Li Z, Zhang J, Zheng H, et al. Modulating lncRNA SNHG15/CDK6/miR-627 circuit by palbociclib, overcomes temozolomide resistance and reduces M2-polarization of glioma associated microglia in glioblastoma multiforme[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):380. DOI: 10.1186/s13046-019-1371-0.
- [20] He M, Shen P, Qiu C, et al. miR-627-3p inhibits osteosarcoma cell proliferation and metastasis by targeting PTN[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(15): 5744-5756. DOI: 10.18632/aging.102157.
- [21] Chen F, Liu M, Yu Y, et al. LINC00958 regulated miR-627-5p/YBX2 axis to facilitate cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(9): 1270-1280. DOI: 10.1080/15384047.2019.1617571.
- [22] Li J, Kong X, Jiang S, et al. miR-627/HMGB1/NF- κ B regulatory loop modulates TGF- β 1-induced pulmonary fibrosis[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3):2983-2993. DOI: 10.1002/jcb.27038.
- [23] 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. DOI: 10.1111/exd.14121.
- [24] Kirkpatrick LD, Shupp JW, Smith RD, et al. Galectin-1 production is elevated in hypertrophic scar[J]. Wound Repair Regen, 2021, 29(1):117-128. DOI: 10.1111/wrr.12869.
- [25] Laberge A, Merjaneh M, Arif S, et al. Shedding of proangiogenic microvesicles from hypertrophic scar myofibroblasts[J]. Exp Dermatol, 2021, 30(1):112-120. DOI: 10.1111/exd.14178.
- [26] Li Y, Zhang J, Zhou Q, et al. Linagliptin inhibits high glucose-induced transdifferentiation of hypertrophic scar-derived fibroblasts to myofibroblasts via IGF/Akt/mTOR signalling pathway [J]. Exp Dermatol, 2019, 28(1):19-27. DOI: 10.1111/exd.13800.
- [27] Gallant-Behm CL, Piper J, Lynch JM, et al. A microRNA-29 mimic (remlarsen) represses extracellular matrix expression and fibroplasia in the skin[J]. J Invest Dermatol, 2019, 139(5): 1073-1081. DOI: 10.1016/j.jid.2018.11.007.
- [28] Zhang Q, Guo B, Hui Q, et al. miR-137 inhibits proliferation and metastasis of hypertrophic scar fibroblasts via targeting pleiotrophin[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(3): 985-995. DOI: 10.1159/000493236.
- [29] Chen Q, Zhao T, Xie X, et al. MicroRNA-663 regulates the proliferation of fibroblasts in hypertrophic scars via transforming growth factor- β 1[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(2): 1311-1317. DOI: 10.3892/etm.2018.6350.
- [30] Liu F, Chen WW, Li Y, et al. MiR-6836-3p promotes proliferation of hypertrophic scar fibroblasts by targeting CTGF[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(13):4069-4074. DOI: 10.26355/eur-rev_201807_15396.
- [31] Wu X, Li J, Yang X, et al. miR-155 inhibits the formation of hypertrophic scar fibroblasts by targeting HIF-1 α via PI3K/AKT pathway[J]. J Mol Histol, 2018, 49(4): 377-387. DOI: 10.1007/s10735-018-9778-z.
- [32] Xie F, Teng L, Xu J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit cell proliferation and migration and suppress extracellular matrix synthesis in hypertrophic-scar and keloid fibroblasts[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(2): 139. DOI: 10.3892/etm.2020.9571.
- [33] de Bakker E, van der Putten MAM, Heymans MW, et al. Prognostic tools for hypertrophic scar formation based on fundamental differences in systemic immunity[J]. Exp Dermatol, 2021, 30(1): 169-178. DOI: 10.1111/exd.14139.
- [34] Jiang Z, Zhao L, He F, et al. Palmatine-loaded electrospun poly (ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds accelerate wound healing and inhibit hypertrophic scar formation in a rabbit ear model[J]. J Biomater Appl, 2021, 35(7): 869-886. DOI: 10.1177/0885328220950060.
- [35] Yang L, Li X, Zhang S, et al. Baicalein inhibits proliferation and collagen synthesis of mice fibroblast cell line NIH/3T3 by regulation of miR-9/insulin-like growth factor-1 axis[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 3202-3211. DOI: 10.1080/21691401.2019.1645150.

(收稿日期:2020-02-25)

· 科技快讯 ·

肺康复对烧伤患者肺功能和运动能力的影响： 一项前瞻性随机单盲研究

本文引用格式: Won YH, Cho YS, Joo SY, et al. The effect of a pulmonary rehabilitation on lung function and exercise capacity in patients with burn: a prospective randomized single-blind study[J]. J Clin Med, 2020, 9(7): 2250. DOI: 10.3390/jcm9072250.

该研究通过对 120 例吸入性损伤患者进行肺功能测定及影响因素分析, 探讨烧伤合并吸入性损伤患者的肺功能康复效果。干预前, 肺康复组与常规康复组患者评估结果无明显差异。肺康复组患者康复前后最大吸气压(MIP)占预计值百分比和峰值咳嗽流量变化与常规康复组相比有显著改善($P=0.04, 0.01$), 其他参数与常规康复组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。康复 12 周后, 肺康复组和常规康复组患者一氧化碳弥散量占预计值百分比、MIP、MIP 占预计值百分比和膈肌活动度比较, 差异有统计学意义($P=0.02, 0.005, 0.001, 0.005$), 其他指标相近($P>0.05$)。这些结果表明, 肺康复应该是烧伤患者治疗计划的基本组成部分。

李羽霖, 编译自《J Clin Med》, 2020, 9(7): 2250; 茹天峰、袁林审校