

## 荧光定量分析人皮肤瘢痕疙瘩组织中miRNA-34s的表达

金玉丹<sup>1</sup>, 郭晓瑞<sup>1</sup>, 黄海华<sup>2</sup>, 卢玲<sup>3</sup>, 蔡小健<sup>1</sup>, 王绥江<sup>2</sup> (<sup>1</sup>中山市第二人民医院激光美容整形中心, 广东省中山市 528447; <sup>2</sup>广东医学院附属医院整形外科研究所, 广东省湛江市 524001; <sup>3</sup>赣南医学院第一附属医院整形外科, 江西省赣州市 341000)

### 文章亮点:

1 作为与 p53 基因密切相关的 microRNA, miRNA-34s 在肿瘤性疾病中的研究已有较多成果, 但尚缺乏在瘢痕疙瘩等病理性瘢痕方面的数据。

2 课题通过实时荧光定量 RT-PCR 技术检测 miRNA-34(miR-34a/b/c)在瘢痕疙瘩组织和正常皮肤组织中的表达水平, 结果显示 miRNA-34s(miRNA-34a/b/c)在瘢痕疙瘩组织中较正常皮肤组织呈下调表达, 表明该家族成员参与了瘢痕疙瘩的形成发展, 下调表达的 miRNA-34s 可能导致了瘢痕疙瘩的肿瘤性生长。

### 关键词:

组织构建; 组织工程; miRNA-34s; miRNA-34a/b/c; 瘢痕疙瘩; 实时荧光定量 RT-PCR

### 主题词:

微 RNAs; 瘢痕疙瘩; 逆转录聚合酶链反应

### 基金资助:

中山市科技计划项目(20122A041)资助

### 摘要

背景: 通过分析不同肿瘤组织与正常组织 miRNA 表达谱的差异, 有可能筛选到特异性好、灵敏度高、可作为特定肿瘤分子标志物的 miRNA。

目的: 采用实时荧光定量 RT-PCR 检测 miRNA-34 家族(miRNA-34s: miR-34a/b/c)在瘢痕疙瘩和正常皮肤组织中的差异表达, 分析评价 microRNA-34s 在瘢痕疙瘩形成发展的作用及可能的机制影响。

方法: 收集手术切除瘢痕疙瘩组织(10 例)和正常皮肤(2 例); TRIZOL 法提取标本的总 RNAs 并进行质检, 再采用 Ambion's miRNA Isolation Kit 从总 RNAs 中分离 microRNA, 采用实时荧光定量 RT-PCR 技术检测 miRNA-34s(miR-34a/b/c)在瘢痕疙瘩组织和正常皮肤组织中的表达水平。

结果与结论: miRNA-34s(miRNA-34a/b/c)在瘢痕疙瘩组织中均呈下调表达( $P < 0.01$ )。表明该家族成员参与了瘢痕疙瘩的形成发展, 下调表达的 miRNA-34s 可能导致了瘢痕疙瘩的肿瘤性生长。

金玉丹, 郭晓瑞, 黄海华, 卢玲, 蔡小健, 王绥江. 荧光定量分析人皮肤瘢痕疙瘩组织中 miRNA-34s 的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(11):1694-1699.

## Fluorescent quantitative analysis on the expression of miRNA-34s in human skin keloid tissue

Jin Yu-dan<sup>1</sup>, Guo Xiao-rui<sup>1</sup>, Huang Hai-hua<sup>2</sup>, Lu Ling<sup>3</sup>, Cai Xiao-jian<sup>1</sup>, Wang Sui-jiang<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Cosmetic Surgery & Laser Center, Second People's Hospital of Zhongshan City, Zhongshan 528447, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Plastic Surgery Institute, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital of Gannan Medical College, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Understanding the difference of miRNA-34s expression in normal tissue and tumor tissue will contribute to screen out a miRNA with high sensitivity as the specific tumor molecular marker.

**OBJECTIVE:** To investigate the differential expression of miRNA-34s (miR-34a/b/c) between normal skin and keloid tissue using real-time fluorescent quantitative PCR, and to evaluate the role and mechanisms of miRNA-34s in keloid formation and development.

**METHODS:** Ten cases of keloid tissue and two cases of normal skin tissue were collected as specimens. Total RNAs were extracted from keloid and normal skin tissue by Trizol method, and miRNA-34s were further isolated by Ambion's miRNA Isolation Kit. Real-time fluorescent quantitative PCR was applied to verify expression levels of microRNA-34s (miR-34a/b/c) in keloid tissue and normal skin tissue.

**RESULTS AND CONCLUSION:** miRNA-34s (miRNA-34a/b/c) expression was down-regulated in keloid tissue compared with normal skin tissue ( $P < 0.01$ ). The findings showed that miRNA-34s (miRNA-34a/b/c) are involved in keloid formation and development, and down-regulation of the family member may result in neoplastic growth of keloid.

**Subject headings:** microRNAs; keloid; reverse transcriptase polymerase chain reaction

金玉丹, 女, 1971 年生, 黑龙江省牡丹江市人, 朝鲜族, 1998 年广东医学院毕业, 硕士, 主任医师, 主要从事损容性皮肤的激光治疗、病理性瘢痕及整形美容外科的基础及临床研究。

并列第一作者: 郭晓瑞, 男, 1983 年生, 河北省大名县人, 汉族, 2011 年广东医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事色素损容性皮肤、病理性瘢痕及难愈性创面的基础及临床研究。

通讯作者: 金玉丹, 硕士, 主任医师, 中山市第二人民医院激光美容整形中心, 广东省中山市 528447

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.11.009

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)11-01694-06

稿件接受: 2014-02-14

Jin Yu-dan, Master, Chief physician, Cosmetic Surgery & Laser Center, Second People's Hospital of Zhongshan City, Zhongshan 528447, Guangdong Province, China

Guo Xiao-rui, Master, Physician, Cosmetic Surgery & Laser Center, Second People's Hospital of Zhongshan City, Zhongshan 528447, Guangdong Province, China

Jin Yu-dan and Guo Xiao-rui contributed equally to this work.

Corresponding author: Jin Yu-dan, Cosmetic Surgery & Laser Center, Second People's Hospital of Zhongshan City, Zhongshan 528447, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-02-14

Funding: grants from Science and Technology Plan of Zhongshan City, No. 20122A041

Jin YD, Guo XR, Huang HH, Lu L, Cai XJ, Wang SJ. Fluorescent quantitative analysis on the expression of miRNA-34s in human skin keloid tissue. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(11):1694-1699.

## 0 引言 Introduction

瘢痕疙瘩是皮肤创伤后结缔组织的异常增殖所形成的肿块,好发于有色人种,其形成由于胶原及糖蛋白过度沉积,好发于10-30岁,是皮肤科和整形美容外科面临的难题之一<sup>[1-3]</sup>。瘢痕疙瘩累及范围常超过原来的损伤部位,可无明显外伤诱发,多呈深红色或紫红色,没有随时间逐渐消退的倾向。它不仅严重影响美观,而且常伴有瘙痒、疼痛、感染、甚至导致功能障碍,给患者的身心带来极大危害。其治疗手段很多,目前仍多为以皮质类固醇局部注射作为首选且必要治疗手段的综合治疗,包括手术、放射、激光治疗以及冷冻、加压疗法,硅胶凝胶膜外贴,咪喹莫特外用等。有报道表明单纯手术切除后瘢痕疙瘩的复发率高达50%-60%<sup>[4]</sup>。

激光治疗在近年来逐渐受到人们的关注,先后有应用氩激光治疗瘢痕疙瘩、CO<sub>2</sub>激光、532nm倍频Nd:YAG激光、2 940 nm Er:YAG激光、585 nm PDL激光及595 nm PDL激光等先后应用于增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的治疗<sup>[3-6]</sup>,因不同程度损伤和疗效的不确定性以及复发率高等问题亦尚未被医者广泛应用。因此人们冀希于利用现在成熟的分子生物学技术寻找一种有效的方法预防、抑制瘢痕疙瘩的形成,或者是消除已经形成的瘢痕疙瘩将显著改善患者生活质量。

MicroRNA (miRNA)的发现为基因表达调控的机制提供了一个全新的模式和更为复杂的调控网络。microRNAs(miRNAs)是一类内源性染色体上非编码蛋白的RNA,在转录后水平调控基因的表达,与个体发育、干细胞分化和疾病发生密切相关<sup>[7-9]</sup>。作为新的切入点,miRNA为肿瘤性疾病的诊断与治疗开辟了一条新途径<sup>[9]</sup>。

miRNAs表达异常与某些疾病的发生、发展和预后密切相关,在人类已知的miRNAs中,约50%基因定位在与肿瘤相关的染色体区,可见其在肿瘤疾病发生发展中具有重要意义。通过分析不同肿瘤组织与正常组织miRNA表达谱的差异<sup>[10-13]</sup>,有可能筛选到特异性好、灵敏度高、可作为特定肿瘤分子标志物的miRNA。由于miRNA几乎参与了肿瘤发生和发展的每一步过程,所以miRNA在肿瘤的诊断、预后、对化疗药物的疗效预测以及治疗的新靶点方面均有很好的应用前景。但是作为新兴的肿瘤分子标志物距离临床应用还有一定距离。寻找和验证各种肿瘤的特异性miRNA是首先需要解决的问题,建立适合临床应用的标准化检测体系,包括质控和诊断阈值的确定等都有待继续努力<sup>[14]</sup>。

瘢痕疙瘩的形成受多种基因、细胞因子的调控,然而目前对这些基因、细胞因子的调控表达机制的研究尚不明确;而瘢痕疙瘩在临床表现及病理学改变等方面与肿瘤具

有相似之处,许多学者借鉴肿瘤的研究成果,将其应用于瘢痕疙瘩的研究中,发现许多肿瘤的相关基因及细胞因子在瘢痕疙瘩与正常皮肤中存在差异表达<sup>[15-16]</sup>。

miRNA-34s定位在人类染色体1p36,是一个在人类肿瘤中常发生缺失的区带。miRNA-34s的非正常表达出现在不同类型的肿瘤中。在脊椎动物基因中,miRNA-34s包括进化上保守的3个成员:miR-34a、miR-34b和miR-34c。目前对miR-34家族的生物学机制及其在多种肿瘤性疾病的差异表达研究显示了其在疾病发生发展和临床诊治中的重要意义及潜在的应用价值<sup>[17]</sup>,某些治疗肿瘤的方法和药物对瘢痕疙瘩亦有显著的疗效<sup>[18]</sup>。鉴于瘢痕疙瘩表现的肿瘤特性,miRNA-34s对其发生发展影响值得探讨。

## 1 材料和方法 Materials and methods

设计:基因对照研究。

时间及地点:于2012年3月2013年8月在中山市第二人民医院皮肤性病学实验室及广东医学院附属医院整形外科研究所完成。

材料:

**实验组织标本资料:**标本取自中山市第二人民医院激光美容整形中心和广东医学院附属医院整形外科门诊和住院患者。标本采集前均征得患者知情同意,记录患者性别、年龄、确诊疾病、取材部位等相关信息。根据实验设计将标本分成瘢痕疙瘩组(病例组)、正常皮肤组(对照组)共2组。

正常皮肤组共2例:其中男性1例,女性1例;年龄分别为27岁和32岁;均为瘢痕切除植皮中腹部移植皮肤。瘢痕疙瘩组共10例:其中男性6例,女性4例;年龄最大者42岁,最小者14岁。3例取自耳郭,因穿耳洞而形成;3例取自项背部,2例因既往毛囊炎引起,1例无明显诱因自发形成;2例取自肩部,因外伤后形成;1例取自前胸部,自发形成;1例取自腹部,因剖腹产引起。

**瘢痕疙瘩组织诊断及纳入标准:**所有标本临床诊断符合要求后采集,瘢痕疙瘩标本临床诊断标准参照王炜主编的《整形外科学》制定<sup>[19]</sup>:瘢痕疙瘩表现为高出周围正常皮肤的、超出原损伤部位的持续性生长的肿块,扪之较硬,弹性差,局部痒或痛,早期多呈粉红色或紫红色,晚期可呈苍白或色素沉着,与周围正常皮肤有较明显的界限。形态呈多样性,可为平坦、有规则边缘的对称性突起或不平坦、不规则突起的高低不平团块抑或呈“蟹足肿”向周围组织浸润生长。

**瘢痕疙瘩组织排除标准:**首先排除增生性瘢痕及萎缩性瘢痕。另凡患者存在以下情况者之一者标本不纳入:①

病程 < 6 个月。②有过类固醇注射、放射等治疗者。③病变部位存在感染者。④患者合并其他家族遗传性疾病。⑤患者年龄过大或者过小。

荧光定量分析人皮肤瘢痕疙瘩组织 miRNA-34s 的表达实验所用主要试剂及仪器:

仪器及试剂	来源
NanoDrop ND-1000 紫外分光光度计	NanoDrop, 美国
SPSS 统计软件分析系统	SPSS, 美国
ABI-9700 荧光定量 PCR 仪	应用生物系统公司, 美国
光学显微镜	Olympus, 日本
TRIZOL、RNA later	Invitrogen, 美国
氯仿、异丙醇	广州化学试剂厂, 中国
Reverse Transcription System	Promega, 美国
mirVana miRNA Isolation Kit	Ambion, 美国
SYBR® Premix Ex Taq™ II Takara	日本

#### 实验方法:

**标本准备:** 正常皮肤组织为住院患者手术留取全厚皮片; 瘢痕疙瘩标本去除皮下脂肪, 切取瘢痕中间部分。正常皮肤和瘢痕疙瘩组织均切成小于 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小, 取材后即刻分装、RNA-later 液固定(组织的体积应不大于 RNA later 的 10%)于组织冻存管, 4 °C 放置过夜后移入 -70 °C 冰箱中低温冻存备用。

**提取 RNA:** 整个操作过程为保证提取的 RNA 符合研究要求, 树立严格 Free-RNase 观念, 整个试验环境去 RNase 处理。组织总 RNA 的提取按照 Trizol® 试剂的说明进行, 紫外分光光度计测 A 值, 定量 RNA 浓度。琼脂糖凝胶电泳并照相, 检测 RNA 有无降解: 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 1×TBE, 电压 9 V/cm, 电泳时间 15 min。应用 Ambion's miRNA Isolation Kit 分离纯化 microRNAs。

**实时荧光定量 RT-PCR 反转录反应:** 取 5 μmol/L 反转录引物工作液 5 μL, 加入 45 μL RNase-Free H<sub>2</sub>O, 配置成 500 nmol/L 反转录引物工作液。反应体系如下: RNA Template 5 μL, 反转录引物工作液 4 μL, RNase-Free H<sub>2</sub>O

10 μL。混合后进行瞬时离心, 70 °C 放置 10 min, 冰浴 2 min, 再加入以下体系: 上述变性退火反应液 10 μL, 5×MLV 酶 Buffer 10 μL, RNase Inhibitor 1 μL, dNTP Mix 4 μL, RNase-Free H<sub>2</sub>O 6 μL。混合后进行瞬时离心, 反转录反应程序: 42 °C, 60 min, 72 °C, 15 min; -20 °C 保存。

**实时荧光定量 RT-PCR 扩增:** ①取灭菌 RNase-free 0.2 mL PCR 反应管, 按以下要求配制实时荧光 PCR 反应体系 (SYBR Green Mix: 包括 Taq 酶、dNTP mix、PCR Buffer、SYBR Green I)。RT-PCR 反应体系如下: SYBR Green Mix 9 μL, 反转录产物 2 μL, miRNA Forward Primer 0.8 μL, miRNA Reverse Primer 0.8 μL, RNase-Free H<sub>2</sub>O 7.4 μL。②配完体系混匀后进行瞬时离心, 然后在 PCR 仪上进行如下程序的反应:

循环	步骤	温度	时间
1×	预变性	93 °C	2 min
	变性	93 °C	15 s
40×	退火	60 °C	25 s
	延伸	70 °C	25 s

**主要观察指标:** 实时荧光定量 PCR 检测 miRNA-34s (miRNA-34a/b/c) 基因表达 ΔCt 值 (ΔCt = [Ct(miRNA34)] - [Ct(U6snRNA)])。

**统计学分析:** 应用统计软件 SPSS 17.0 进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用校正 *t* 检验, *P* < 0.01 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 总 RNA 提取结果** 各 RNA 样品 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值均位于 2.0 左右且 A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> > 2.0; RNA 样品电泳条带清晰, 28 s 比 18 sRNA 条带亮度接近 2:1, RNA 完好无降解。

**2.2 实时荧光定量 PCR 结果** 行 U6 扩增作为参照, 采用校正 *t* 检验比较正常皮肤组织和瘢痕疙瘩组的 miRNA-34s 差异表达 (图 1-3)。检测结果 miRNA-34s (miRNA-34a/b/c) 在瘢痕疙瘩组织中相对正常皮肤组织呈下调表达 (表 1), 差异有显著性意义 (*P* < 0.01)。

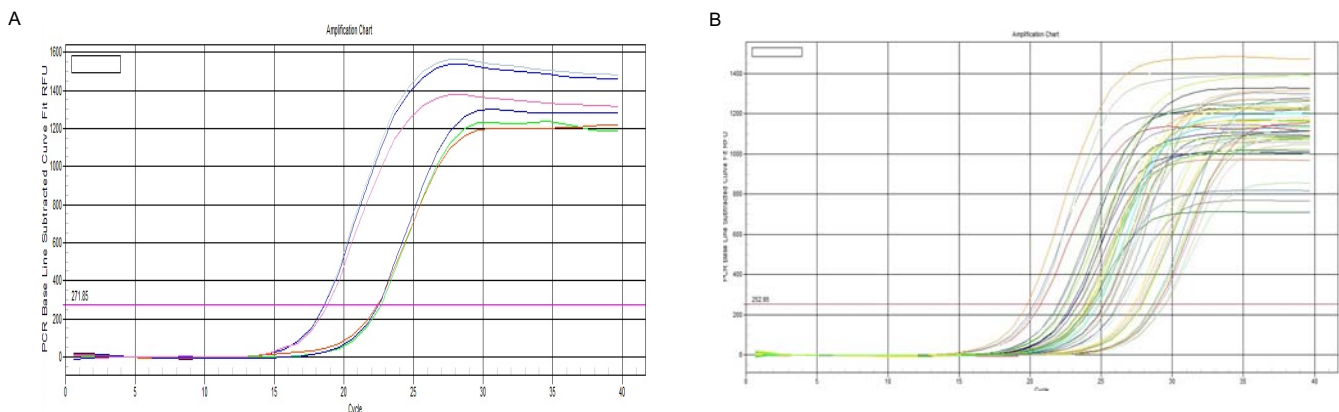


图 1 正常皮肤组织和瘢痕疙瘩组织 miR-34s 荧光定量扩增曲线

Figure 1 Fluorescence quantitative amplification curves of miR-34s in normal skin tissue and keloid tissue

图注: 图中 A 为正常皮肤组织; B 为瘢痕疙瘩组织。扩增曲线平行性好, 表明良好的扩增效率。

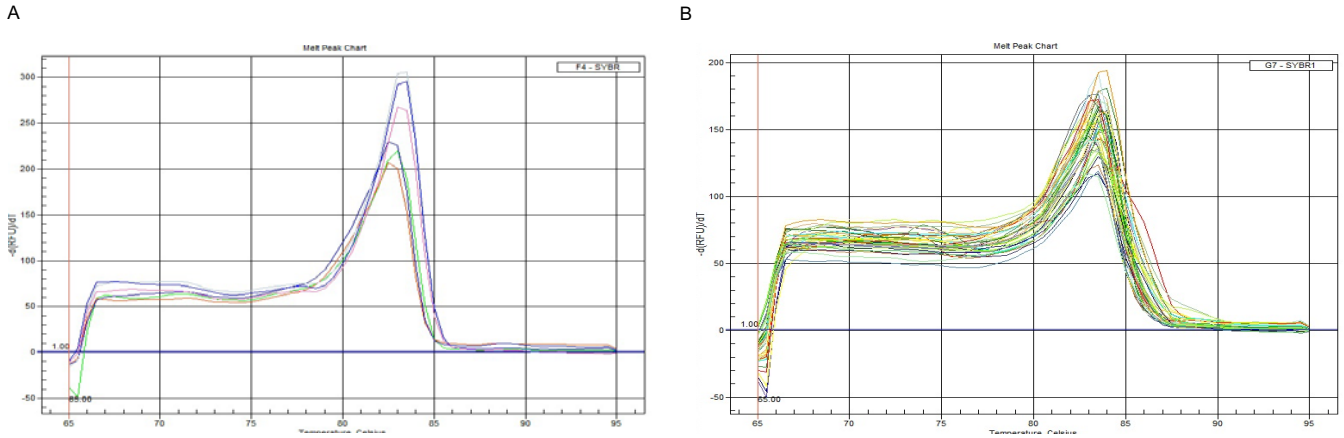


图2 正常皮肤组织和瘢痕疙瘩组织 miR-34s 荧光定量熔解曲线  
 Figure 2 Fluorescence quantitative melting curves of miR-34s in normal skin tissue and keloid tissue  
 图注: 图中 A 为正常皮肤组织; B 为瘢痕疙瘩组织。熔解曲线显示单峰, 表明良好的扩增特异性。

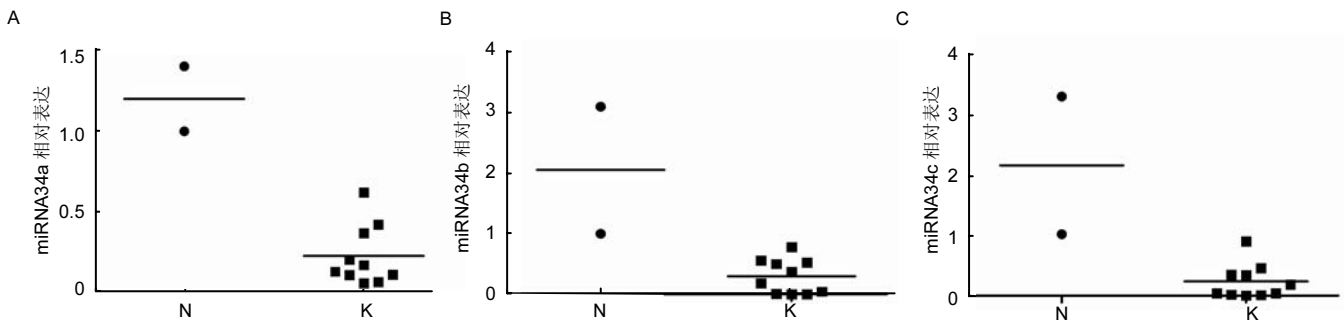


图3 miRNA-34s 在正常皮肤组织和瘢痕疙瘩组织中的差异表达  
 Figure 3 Differential expression of miRNA-34s in normal skin tissue and keloid tissue  
 图注: 图中 A 为 miRNA-34a 在瘢痕疙瘩组织和正常皮肤组织的相对表达; B 为 miRNA-34b 在瘢痕疙瘩组织和正常皮肤组织的相对表达; C 为 miRNA-34c 在瘢痕疙瘩组织和正常皮肤组织的相对表达。N: 正常皮肤组织; K: 瘢痕疙瘩组织。相对正常皮肤组织, miRNA-34a/b/c 在瘢痕疙瘩组织中呈下调表达

表1 miRNA-34s 在正常皮肤组织和瘢痕疙瘩组织中的差异表达结果  
 Table 1 Differential expression of miRNA-34s in normal skin tissue and keloid tissue ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

miRNA-34s	正常皮肤组织 $\Delta CT(\bar{x} \pm s)$	瘢痕疙瘩组织 $\Delta CT(\bar{x} \pm s)$	差异表达 $\Delta CT(\bar{x} \pm s)$	t
miRNA34a	1.202±0.202	0.228±0.058	0.974±0.153	6.377
miRNA34b	2.048±1.048	0.298±0.091	1.750±0.420	4.169
miRNA34c	2.125±1.125	0.230±0.089	1.895±0.442	4.289

表注: 与正常皮肤组织比较, miRNA-34a/b/c 在瘢痕疙瘩组织中均呈下调表达 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论 Discussion

瘢痕疙瘩是常见的纤维结缔组织增生性疾病, 主要表现为皮肤创伤愈合过程中成纤维细胞过度增殖和胶原过度合成, 超出原有皮损范围, 具有侵袭性生长、易复发、对放疗有效等肿瘤的生物特点, 其发病机制尚不清楚<sup>[20]</sup>。因瘢痕疙瘩在临床表现、遗传性、基因调控、细胞因子及其受体以及端粒酶调控等方面均与肿瘤具有相似之处, 一些治疗肿瘤的药物及方法已应用于治疗瘢痕疙瘩, 国内学者提出瘢痕疙瘩的肿瘤源性学说<sup>[21]</sup>。miRNA-34家族是一类保守的、非编码miRNA, 定位在人类染色体在肿瘤中常

发生缺失的区带1p36。人类miRNA-34包括miR-34a、miR-34b和miR-34c等, 在多种肿瘤中都呈现非正常表达。miR-34家族在肿瘤发生中发挥关键作用, 已发现通过调节其靶基因参与了许多如细胞增殖、存活、凋亡、迁移、侵袭和衰老等细胞过程<sup>[22]</sup>。

郭晓瑞, 吴志远等<sup>[23-24]</sup>应用microRNA微阵列芯片技术筛选瘢痕疙瘩组织中microRNA差异表达谱与Liu<sup>[25]</sup>和Bai等<sup>[26]</sup>研究结果有较大差别, 表明有多个miRNA参与了瘢痕疙瘩的发生发展过程, 尤其下调表达的microRNAs有可能成为瘢痕疙瘩诊治的新靶点, 但其具体机制尚需进一步探讨, 研究样本需进一步加大。

实验应用实时荧光定量RT-PCR技术检测瘢痕疙瘩组织相对正常皮肤组织miRNA-34s的差异表达, 荧光定量熔解曲线显示了良好的扩增特异性, miRNA-34s(miRNA-34a/b/c)在瘢痕疙瘩组织中均呈下调表达, 表明该家族成员参与了瘢痕疙瘩的形成发展, 下调表达的miRNA-34s可能导致了瘢痕疙瘩的肿瘤性生长。与国内外多项miRNA-34s的研究结果相同, 均显示了该家族(miRNA-34a/b/c)在肿瘤性疾病中的下调表达。在皮肤黑色素瘤的研究中, Yamazaki等<sup>[27]</sup>发现黑色素瘤细胞系中miR-34呈下调表达, 恢复miR-34a

及miR-34c的表达可抑制黑色素瘤的增殖及转移, 说明miR-34在发挥抑癌作用的同时抑制癌细胞的侵袭能力。Tanaka等<sup>[28]</sup>研究发现miR-34b/e在小细胞肺癌细胞系及临床样本中大量被甲基化, 进一步研究发现miR-34b/c甲基化导致其在肿瘤中表达下调。此外, 在肺癌<sup>[29]</sup>、恶性间皮瘤<sup>[30]</sup>、乳腺癌等研究中均发现miR-34的表达下调<sup>[31]</sup>。以上研究表明, miR-34表达的下调或缺失与肿瘤的发生及发展存在着联系。

p53是细胞中重要的抑癌基因, 大约50%的人类肿瘤中都能够检测出有抑癌基因p53的突变或缺失。2007年以来, 连续有报道miRNA-34家族的成员(miRNA-34a/b/c)是p53作用的直接靶点<sup>[32]</sup>, miRNA-34基因表达上调促进细胞凋亡, 细胞周期停滞和衰老。c-Kit在多种肿瘤中呈过表达, 活化p53下调其表达。p53诱导的miR-34调节了c-Kit的表达, Siemens等<sup>[33]</sup>认为c-Kit是miR-34新的直接靶基因并证明该调节调控了多种c-Kit介导效应从而对肿瘤细胞的变化产生影响。

Concepcion等<sup>[34]</sup>应用mir-34缺陷小鼠进行研究发现p53基因功能在miR-34缺陷型细胞和组织是完整的, 虽然miR-34表达的丧失导致体外细胞增殖略有增加, 但不影响p53诱导的细胞周期停滞或凋亡。该研究还发现miR-34家族成员在小鼠睾丸、肺和脑的高表达在很大程度上依赖p53在这些组织中的表达。所以研究组认为miR-34s在p53通路中的存在其他作用。

Javeri等<sup>[31]</sup>研究发现在约40%的野生型p53乳腺肿瘤样本中miR-34a表达显著下调, 而miR-34a下调的肿瘤样本均无miR-34a启动子甲基化和p53结合位点的遗传变异。研究提供证据证明miR-34a的表达受乳腺肿瘤显著比例影响而独立于p53基因, 此外, miR-34a表达显著下调与乳腺肿瘤转移有关, 表达上调和非转移性对更多的侵袭性疾病具有保护作用, 从而提供了特别是当p53基因检测显示无异常时miR-34a有关乳腺肿瘤性质的其他重要信息。该研究结论乳腺肿瘤miR-34a的下调不与任何p53基因突变或启动子甲基化有关, 而与肿瘤转移相关。根据上述研究, miR-34a可能为metastamir<sup>[35]</sup>, 即与肿瘤细胞获得转移能力相关的miRNA。

随着对miRNA-34s在肿瘤学上的深入研究<sup>[36-41]</sup>, 进一步阐明了miR-34s(miRNA-34a/b/c)生物学功能及其相关基因调控网络关系。目前临床对瘢痕疙瘩多采取手术联合其他以及激光等物理性的综合治疗, 但治疗效果及不良反应尚不能令医患满意。miRNA-34s家族在瘢痕疙瘩等病理性瘢痕的研究尚缺乏相关数据, miRNA-34s(miRNA-34a/b/c)的研究将可能为该损容性皮肤问题的防治确立新的靶点。

**致谢:** 感谢广州外显子生物给予的技术支持, 感谢广东医学院整形外科研究所吴志远教授给予研究的帮助和指导。

**作者贡献:** 实验设计和结果评估由第一、第二作者完成, 干

预实施由第二作者完成, 所有作者均经过系统培训。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 参与实验的患病个体及其家属自愿参加, 所有供者、受者均对实验过程完全知情同意, 在充分了解本治疗方案的前提下签署“知情同意书”; 干预及治疗方案获医院伦理委员会批准。

**学术术语:** metastamirs-在肿瘤转移过程中, microRNA扮演着重要角色, 有研究将与肿瘤细胞获得转移能力密切相关的miRNA称为metastamirs。该类miRNA的上调或下调表达促进肿瘤发生和转移。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

## 4 参考文献 References

- [1] 朱学骏, 王宝玺, 孙建芳, 等译. 皮肤病学[M]. 2版. 北京: 北京大学医学出版社, 2010: 1835-1840.
- [2] 王春虎, 黄渭清. 瘢痕疙瘩的治疗研究进展[J]. 中国美容医学, 2008, 17(4): 610-613.
- [3] 钟珊, 梅雪岭, 赵俊英. 不同脉宽595 nm染料激光治疗增生性瘢痕和瘢痕疙瘩的疗效[J]. 2013, 34(5): 759-765.
- [4] Al-Attar A, Mess S, Thomassen JM, et al. Keloid pathogenesis and treatment. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117: 286-300.
- [5] Nouri K, Elsaie ML, Vejjabhinanta V, et al. Comparison of the effects of short- and long-pulse durations when using a 585-nm pulsed dye laser in the treatment of new surgical scars. *Lasers Med Sci*. 2010; 25(1): 121-126.
- [6] Manuskiatti W, Wanitphakdeedecha R, Fitzpatrick RE. Effect of pulse width of a 595-nm flashlamp-pumped pulsed dye laser on the treatment response of keloidal and hypertrophic sternotomy scars. *Dermatol Surg*. 2007; 33(2): 152-161.
- [7] O'Hara SP, Mott JL, Splinter PL, et al. MicroRNAs: Key modulators of post transcriptional gene expression. *Gastroenterology*. 2009; 136: 17-25.
- [8] Karres JS, Hilgers V, Carrera I, et al. The conserved microRNA miR28 tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell*. 2007; 131(1): 136-145.
- [9] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 857-866.
- [10] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008; 18: 997-1006.
- [11] Resnick KE, Alder H, Hagan JP, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*. 2009; 112(1): 55-59.
- [12] Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B2cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008; 141(5): 672-675.
- [13] Gilad S, Meiri E, Yogev Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 2008, 3(9): e3148.
- [14] 郭晓瑞, 吴志远, 黄海华, 等. MicroRNA的基础与临床研究进展[J]. 中国实用医药, 2011, 6(15): 256-258.
- [15] Satish L, Lyons-Weiler J, Hebda PA, et al. Gene expression patterns in isolated keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2006; 14 (4): 463-470.

- [16] Lu M, Zhang Q, Deng M, et al. An analysis of human microRNA and disease associations. *Plos One*, 2008; 3(10): e3420.
- [17] 娄文加, 陈青, 刘立, 等. miR-34家族-肿瘤抑制蛋白P53基因高度相关的microRNA[J]. *遗传*, 2010, 32(5): 423-430.
- [18] Ohtsuru A, Yoshimoto H, Ishihara H, et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I)/IGF-I receptor axis and increased invasion activity of fibroblasts in keloid. *Endocr J*. 2000;47:41-44.
- [19] 王炜. 整形外科学(上册)[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1999: 430-431.
- [20] Shih B, Bayat A. Genetics of keloid scarring. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(5):319-339.
- [21] 宗宪磊, 姜笃银, 蔡景龙, 等. 瘢痕疙瘩的肿瘤特性研究进展[J]. *中国美容整形外科杂志*, 2007, 8(5):393-397.
- [22] Wang R, Ma J, Wu Q, et al. Functional role of miR-34 family in human cancer. *Curr Drug Targets*. 2013;14(10):1185-1191.
- [23] 郭晓瑞, 梁杰, 黄如林, 等. MicroRNAs在瘢痕疙瘩中的差异表达[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(50):9370-9375.
- [24] 吴志远, 卢玲, 郭晓瑞, 等. 瘢痕疙瘩microRNA表达谱的筛选及miR-199a-5p生物功能的初步研究[J]. *中华整形外科杂志*, 2013, 29(4):279-284.
- [25] Liu Y, Yang D, Xiao Z, et al. miRNA expression profiles in keloid tissue and corresponding normal skin tissue. *Aesthetic Plast Surg*. 2012 ;36(1):193-201.
- [26] Bai Y, Liu H, Zuo X, et al. Comparative study of microRNA profiling in keloid fibroblast and annotation of differential expressed microRNAs. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2013; 45(8):692-699.
- [27] Yamazaki H, Chijiwa T, Inoue Y, et al. Over expression of the miR-34 family suppresses invasive growth of malignant melanoma with the wild-type p53 gene. *Exp Ther Med*. 2012; 3(5):793-796.
- [28] Tanaka N, Toyooka S, Soh J, et al. Frequent methylation and oncogenic role of microRNA-34b/c in small-cell lung Cancer. *Lung Cancer*. 2012;76(1):32-38.
- [29] Garofalo M, Jeon YJ, Nuovo GJ, et al. MiR-34a/c-Dependent PDGFR- $\alpha/\beta$  Down regulation Inhibits Tumorigenesis and Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Lung Cancer. *PLoS One*. 2013;8(6):e67581.
- [30] Tanaka N, Toyooka S, Soh J, et al. Down regulation of microRNA-34 induces cell proliferation and invasion of human mesothelial cells. *Oncol Rep*. 2013;29(6):2169-2174.
- [31] Javeri A, Ghaffarpour M, Taha MF, et al. Down regulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis. *Med Oncol*. 2013;30(1):413.
- [32] Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2010;17:193-199.
- [33] Siemens H, Jackstadt R, Kaller M, et al. Repression of c-Kit by p53 is mediated by miR-34 and is associated with reduced chemoresistance, migration and stemness. *Oncotarget*. 2013; 4(9):1399-1415.
- [34] Concepcion CP, Han YC, Mu P, et al. Intact p53-dependent responses in miR-34-deficient mice. *PLoS Genet*. 2012;8(7): e1002797.
- [35] Douglas R, Hurst, Mick D, et al. Metastamir: The Field of Metastasis - Regulatory microRNA Is Spreading. *Cancer Res* 2009;69:7495-7498.
- [36] Hau A, Ceppi P, Peter ME. CD95 is part of a let-7/p53/miR-34 regulatory network. *PLoS One*. 2012;7(11):e49636.
- [37] Tamura M, Uyama M, Sugiyama Y, et al. Canonical Wnt signaling activates miR-34 expression during osteoblastic differentiation. *Mol Med Rep*. 2013;8(6):1807-1811.
- [38] Dickson JR, Kruse C, Montagna DR, et al. Alternative polyadenylation and miR-34 family members regulate tau expression. *J Neurochem*. 2013;127(6):739-749.
- [39] Iqbal N, Mei J, Liu J, et al. miR-34a is essential for p19Arf-driven cell cycle arrest. *Cell Cycle*. 2014;13(5). [Epub ahead of print]
- [40] Jin K, Xiang Y, Tang J, et al. miR-34 is associated with poor prognosis of patients with gallbladder cancer through regulating telomere length in tumor stem cells. *Tumour Biol*. 2013. [Epub ahead of print]
- [41] Hahn S, Jackstadt R, Siemens H, et al. SNAIL and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J*. 2013;32(23): 3079-3095.