

miR-2116-3p 在人增生性瘢痕中的表达及作用

田文融, 左俊, 余扬, 齐郁松, 艾江, 卜盼盼, 赵皎均, 马志伟, 李培培, 马少林

https://doi.org/10.12307/2023.562

投稿日期: 2022-08-01

采用日期: 2022-08-27

修回日期: 2022-11-25

在线日期: 2022-12-08

中图分类号:

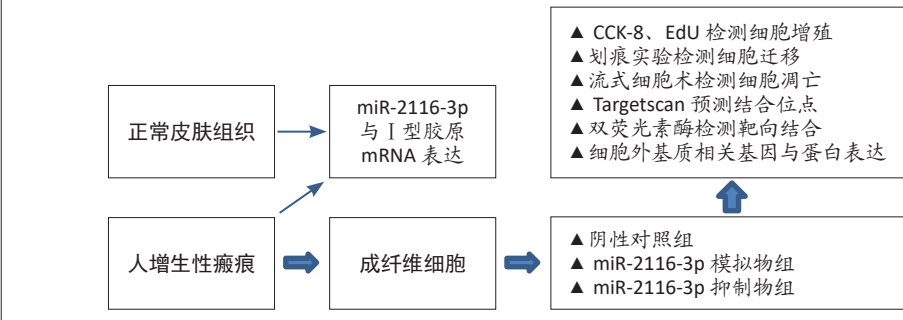
R446; R318; R62

文章编号:

2095-4344(2023)28-04480-07

文献标识码: A

文章快速阅读: miR-2116-3p 在人增生性瘢痕中的表达



文题释义:

miRNA: 是一种小片段的非编码RNA, 能够通过与其靶基因结合进而调控其基因表达, 并产生相应生物学表现。

增生性瘢痕: 是真皮或深部组织损伤或病变后, 由新生结缔组织过度增生修复而成的一种皮损。增生性瘢痕多见于创伤、溃疡和局部炎症病变引起的深达真皮层的创面愈合之后, 是人体创伤或炎症愈合过程的产物, 临床表现为局部隆起的粉红色或紫红色肿块, 表面充血、质地偏硬、边缘不突向正常皮肤, 伴痒痛症状, 治疗上以综合治疗为主。

摘要

背景: 目前多项研究证实了miRNA影响增生性瘢痕的发生发展, I型胶原与增生性瘢痕成纤维细胞密切相关, 猜测miR-2116-3p也有可能和增生性瘢痕的发生发展有关系。

目的: 探讨miR-2116-3p在人增生性瘢痕中的表达及作用。

方法: 收集新疆医科大学第一附属医院6例患者的增生性瘢痕组织与6例患者重睑术后正常皮肤组织, 采用qRT-PCR法检测miR-2116-3p与I型胶原的表达。取增生性瘢痕组织, 原代培养第3-6代成纤维细胞, 分为阴性对照组、miR-2116-3p模拟物组和miR-2116-3p抑制物组, 分别转染对应的序列, 用CCK-8法与EdU试剂盒检测细胞增殖活力, 划痕实验检测细胞迁移能力, 流式细胞术检测细胞凋亡, qRT-PCR法与Western blot法检测I型胶原、III型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的基因与蛋白表达, 双荧光素酶实验验证其靶向结合。

结果与结论: ①增生性瘢痕组织中miR-2116-3p的mRNA表达量低于正常皮肤组织($P < 0.01$), I型胶原的mRNA表达量低于正常皮肤组织($P < 0.01$); ②转染后24, 48, 72 h, 与阴性对照组比较, miR-2116-3p模拟物组细胞活力降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), miR-2116-3p抑制物组细胞活力升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 转染后48 h, 与阴性对照组比较, miR-2116-3p模拟物组细胞EdU标记数减少($P < 0.01$), miR-2116-3p抑制物组EdU标记数增加($P < 0.05$); ③转染后24 h, 与阴性对照组比较, miR-2116-3p模拟物组细胞划痕面积、细胞凋亡率增加($P < 0.01$), miR-2116-3p抑制物组细胞划痕面积、细胞凋亡率减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); ④转染后24 h, 与阴性对照组比较, miR-2116-3p模拟物组I型胶原、III型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的基因与蛋白表达下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), miR-2116-3p抑制物组I型胶原、III型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达升高($P < 0.01$); ⑤双荧光素酶实验显示, miR-2116-3p能够与I型胶原靶向结合; ⑥结果表明, 人增生性瘢痕中miR-2116-3p表达下调, miR-2116-3p可能通过靶向抑制I型胶原的表达抑制人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖、迁移, 促进其凋亡。

关键词: miR-2116-3p; I型胶原; 增生性瘢痕; 成纤维细胞; 皮肤纤维化

Expression and effect of microRNA-2116-3p in human hypertrophic scar

Tian Wenrong, Zuo Jun, Yu Yang, Qi Yusong, Ai Jiang, Bu Panpan, Zhao Jiaojun, Ma Zhiwei, Li Peipei, Ma Shaolin

Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Tian Wenrong, Master, Physician, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

新疆医科大学第一附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

第一作者: 田文融, 女, 1999年生, 汉族, 硕士, 医师, 主要从事增生性瘢痕的形成机制与防治研究。

通讯作者: 马少林, 主任医师, 教授, 新疆医科大学第一附属医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

https://orcid.org/0000-0003-2108-4541(田文融)

基金资助: 国家自然科学基金(81760345): 中医药提取物总黄酮抑制增生性瘢痕TGF- β 1激活下游MAPK与Smad信号通路调控机制研究, 项目负责人: 马少林; 新疆维吾尔自治区科研创新项目基金(XJ2919G202): 肉苁蓉苯乙醇总苷对人增生性瘢痕成纤维细胞基于TGF- β /Smad信号通路的机制研究, 项目负责人: 艾江; 新疆维吾尔自治区科研创新项目基金(XJ2022G174): miRNA在人增生性瘢痕中的表达及作用, 项目负责人: 田文融

引用本文: 田文融, 左俊, 余扬, 齐郁松, 艾江, 卜盼盼, 赵皎均, 马志伟, 李培培, 马少林. miR-2116-3p 在人增生性瘢痕中的表达及作用 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(28):4480-4486.



Corresponding author: Ma Shaolin, Chief physician, Professor, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: A wide range of studies have demonstrated that microRNA (miR) plays a crucial role in hypertrophic scars development, and type I collagen is closely related to hypertrophic scar fibroblasts. There might be a relationship between miR-2116-3p and occurrence and development of hypertrophic scars.

OBJECTIVE: To investigate the expression and role of miR-2116-3p on human hypertrophic scar fibroblasts.

METHODS: Hypertrophic scar tissues were collected from six patients from the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University and normal skin tissues were collected from another six patients after blepharoplasty in the same unit at the same time. The expression of miR-2116-3p and type I collagen was detected by qRT-PCR. Hypertrophic scar tissues were taken and primary cells were cultured to passages 3 to 6. Hypertrophic scar fibroblasts were divided into negative control group, miR-2116-3p mimic group, and miR-2116-3p inhibitor group, and transfected with corresponding sequences. Cell proliferation was detected by cell counting kit-8 and EdU kit. Cell migration was detected by cell scratch assay, and apoptosis was detected by flow cytometry. Expression of type I collagen, type III collagen and α -smooth muscle actin was detected by western blot and qRT-PCR at protein and mRNA levels, respectively. Dual luciferase reporter assay system was used to carry out targeting assays.

RESULTS AND CONCLUSION: The mRNA expression of miR-2116-3p and type I collagen in hypertrophic scar tissues was significantly lower than that in normal skin tissues ($P < 0.01$). After 24, 48, and 72 hours of transfection, the cell viability of the miR-2116-3p mimic group was significantly lower than that of the negative control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the cell viability of miR-2116-3p inhibitor group was significantly higher than that of the negative control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At 48 hours after transfection, the number of EdU positive cells in the miR-2116-3p mimic group was significantly lower than that in the negative control group, while the number of EdU positive cells in the miR-2116-3p inhibitor group was significantly higher than that in the negative control group ($P < 0.05$). At 24 hours after transfection, the cell scratch area and apoptotic rate of the miR-2116-3p mimic group were significantly higher than those of the negative control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and while the cell scratch area and apoptotic rate of the miR-2116-3p inhibitor group were significantly lower than those of the negative control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). At 24 hours after transfection, the mRNA and protein expression levels of type I collagen, type II collagen and α -smooth muscle actin were significantly decreased in the miR-2116-3p mimic group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and significantly increased in the miR-2116-3p inhibitor group ($P < 0.01$) compared with the negative control group. Results from the dual luciferase assay showed that miR-2116-3p could bind to type I collagen. To conclude, the expression of miR-2116-3p is down-regulated in human hypertrophic scar. miR-2116-3p may inhibit the proliferation and migration of human hypertrophic scar fibroblasts and promote their apoptosis by targeting the expression of type I collagen.

Key words: miR-2116-3p; type I collagen; hypertrophic scar; fibroblast; skin fibrosis

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81760345 (to MSL); Scientific Research and Innovation Projects of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Nos. XJ2919G202 (to AJ) and XJ2022G174 (to TWR)

How to cite this article: TIAN WR, ZUO J, YU Y, QI YS, AI J, BU PP, ZHAO JJ, MA ZW, LI PP, MA SL. Expression and effect of microRNA-2116-3p in human hypertrophic scar. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(28):4480-4486.

0 引言 Introduction

烧伤或其他创伤后产生的增生性瘢痕，不仅引发相关功能障碍还产生瘙痒或伴有疼痛，严重影响患者生活且在外观上对患者心理产生严重影响^[1]。目前临床上增生性瘢痕常采用物理治疗、手术切除、激光治疗以及糖皮质激素注射药物治疗等，但疗效欠佳，且暂无治疗金标准，有必要进一步阐明分子机制以开发新的预防和治疗增生性瘢痕的策略与方法。微小RNA(miRNA)是一种小片段的非编码RNA，能够通过与其靶基因结合进而调控表达^[2-3]。miRNA被观察到在多种疾病中存在表达差异，并参与调节皮肤纤维化^[4]、肝纤维化^[5]、肾纤维化^[6]、心肌纤维化等纤维化疾病^[7]。BI等^[8]发现miR-98的模拟物通过靶向I型胶原抑制增生性瘢痕成纤维细胞的增殖。CHAO等^[9]发现在增生性瘢痕成纤维细胞中，miR-181c和miR-10a分别以尿激酶型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制物1为靶点进行差异表达，其抑制了I型胶原的表达、促进了基质金属蛋白酶1的表达，从而抑制增生性瘢痕的形成。LI等^[10]发现增生性瘢痕和增生性瘢痕成纤维细胞中miR-101的表达下调，证实模拟物miR-101可靶向结合EZH2，从而降低增生性瘢痕成纤维细胞中I型胶原、III型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的表达，其还可有效抑制博来霉素诱导的纤维化小鼠模型中的胶原沉积。近年研究已表明，各种miRNA能够参与增生性瘢痕的发生发展。增生性瘢痕形成与发展中涉及的多种细胞类型中，成纤维细胞是其形成的原型细胞，因为它们直接参与肉芽形成、细胞外基质沉积、伤口收缩和异常增生的整个过程^[11]。目前有研究表明，

miR-422a、miR2116-3p和miR-3187-3p在增生性瘢痕组织和增生性瘢痕成纤维细胞中表达下调^[12]，并与泛素化密切相关，其中有关miR-2116-3p在增生性瘢痕中的具体作用机制研究鲜见报道^[13]。此次研究在检测miR-2116-3p在增生性瘢痕组织中表达情况后，分析miR-2116-3p对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖、凋亡的调节作用，进一步探讨miR-2116-3p影响增生性瘢痕的机制，以期为增生性瘢痕的防治提供新的策略，为增生性瘢痕的发病机制和临床治疗的探寻提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验，采用盲法评估，组间比较采用两样本均数t检验。

1.2 时间及地点 实验于2021-2022年在新疆医科大学科技楼研究重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 标本来源 收集2021-2022年新疆医科大学第一临床医学院整形外科提供的增生性瘢痕和正常皮肤。6例增生性瘢痕患者，其中男3例，女3例；6例重睑术后患者，其中男3例，女3例。研究方案的实施符合《赫尔辛基宣言》和新疆医科大学第一临床医学院的相关伦理要求(伦理批号：20170214-71)。供者对标本的采集完全知情同意，并签署了“知情同意书”。

增生性瘢痕患者纳入标准：①烧烫伤或创伤后增生期增生性瘢痕皮肤；②患者没有任何血液系统及全身性疾病；③只接受过手术治疗。

增生性瘢痕患者排除标准：①瘢痕疙瘩；②供者伴有其他血液系统及全身性疾病；③孕妇及哺乳期妇女；④依从性差者。

正常皮肤供者纳入标准：①正常皮肤；②患者没有血液系统及全身性疾病。

正常皮肤供者排除标准：①供者伴有其他血液系统及全身性疾病；②依从性差者。

1.3.2 主要试剂及仪器 DMEM 高糖培养基、PBS (Hyclone, 美国); EDTA-胰蛋白酶 (Gibico, 美国); 细胞 RIPA 裂解液 (Solarbio, 中国); I 型胶原多克隆抗体、III型胶原单克隆抗体、 α -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体 (Abcam, 英国); GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体、CCK-8 试剂 (bioss, 美国); miR-2116-3p 前向引物、U6 前向引物、I 型胶原野生型 (WT)、I 型胶原突变型 (MT)(与 miR-2116-3p 结合位点的序列突变)及 I 型胶原质粒引物 (生工, 上海); miR-2116-3p 模拟物、miR-2116-3p 抑制物、miR-2116-3p 阴性对照 (锐博, 广州); 脂质体 Lipo8000 转染试剂 (碧云天, 上海); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、BD FACSCalibur 型流式细胞仪 (BD, 美国); SYBRGreen 荧光定量试剂盒 -RR820、荧光素酶报告基因检测试剂盒 (promega, 美国); PCR 反转录试剂盒 -RR047(Takara, 日本); miRNA 提取分离试剂盒 -DP501、miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 -KR211、miRNA 荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green)-FP411(天根, 北京); TRIzol、ThermoScientific™ MultiskanSky 型全波长酶标仪 (Thermo, 美国); CFX96™ 型实时荧光定量 PCR 仪、Gel Doc™ XR+Western-Blot 凝胶成像分析系统 (Bio-Rad, 美国); Leica DMI4000B/DM5000B 型正、倒置荧光显微镜 (Leica, 日本)。

1.4 实验方法

1.4.1 qRT-PCR 检测 miR-2116-3p、I 型胶原的 mRNA 表达

miR-2116-3p 的 mRNA 表达：取正常皮肤组织、增生性瘢痕组织，每 50 mg 组织加 1 mL 裂解液 MZ，用匀浆仪进行匀浆处理。按照天根 DP501 试剂盒提取富集 miRNA；按照天根 KR211 试剂盒反转录 cDNA；按 SYBRGreen 荧光定量试剂盒 -FP411 说明书，采用实时荧光定量 PCR 仪进行检测。采用 Δ 循环阈值 (Ct) 法处理结果，计算目的基因的相对表达量，即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。基因引物序列见表 1，扩增条件见表 2。

I 型胶原的 mRNA 表达：取正常皮肤组织、增生性瘢痕组织，每 60-70 mg 组织用 0.3 mL TRIzol 于高速研磨仪匀浆，后加 TRIzol 试剂至 1 mL 完全裂解；收集裂解液，加入 0.2 mL 氯仿，大力振荡 15 s，静置 2 min；4 °C 下 12 000×g 离心 15 min，取上清液，加入异丙醇 0.6 mL，振荡 15 s；4 °C 下 12 000×g 离心 10 min，弃上清液，加入等体积的 75% 无水乙醇洗涤 2 遍；7 500×g 离心 5 min，弃上清液，静置风干至啫喱状，用 15-30 μ L 双蒸水溶解 RNA 沉淀，用 nanodrop2000 测量总 RNA 浓度。使用反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。基因引物序列见表 1，扩增条件见

表 1 | qRT-PCR 引物序列

Table 1 | Sequences of primers for qRT-PCR

基因	引物序列
miR-2116-3p	正义：5'-AAC AGA CCT CCC ATG CCA AGA ACT C-3' 反义：5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3'
U6	正义：5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3' 反义：5'-GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G-3'
I 型胶原	正义：5'-AAA GAT GGA CTC AAC GGT CTC-3' 反义：5'-CAT CGT GAG CCT TCT CTT GAG-3'
III型胶原	正义：5'-GTA ACA CTG GTG CTC CTG GC-3' 反义：5'-ACC AGG CGA TCC CTT CTC TC-3'
α -平滑肌肌动蛋白	正义：5'-CAT CAT GCG TCT GGA TCT GG-3' 反义：5'-GGA CAA TCT CAC GCT CAG CA-3'
GAPDH	正义：5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3' 反义：5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'

表 2 | qRT-PCR 反应扩增条件

Table 2 | qRT-PCR amplification conditions

基因	预变性	变性	退火及延伸	循环	内参
miR-2116-3p	95 °C 15 min	94 °C 20 s	60 °C 34 s	40	U6
I 型胶原	95 °C 30 s	95 °C 5 s	60 °C 30 s	40	GAPDH
III型胶原	95 °C 30 s	95 °C 5 s	60 °C 30 s	40	GAPDH
α -平滑肌肌动蛋白	95 °C 30 s	95 °C 5 s	60 °C 30 s	40	GAPDH

表 2。

1.4.2 增生性瘢痕成纤维细胞的分离及培养 取增生性瘢痕组织，用含 3% 双抗的 PBS 漂洗 3 次，用眼科剪剪为长宽高约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小的组织块，放入 10 cm 培养皿中，加入含体积分数 15% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基。待细胞从组织块中爬出，移除组织块，加入含 EDTA 的胰蛋白酶 1.5 mL 消化两三分种；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，1 000×g 离心 5 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 3-6 代增生性瘢痕成纤维细胞用于后续实验。同理，分离培养正常皮肤组织成纤维细胞。采用 qRT-PCR 检测两种皮肤组织成纤维细胞内 miR-2116-3p 的 mRNA 表达。

增生性瘢痕成纤维细胞的培养：

细胞来源	新疆医科大学第一附属医院整形外科
培养基	DMEM 高糖培养基
添加材料	体积分数 10% 胎牛血清
原代培养时间	取 3-6 代细胞用于后续实验
细胞传代	当细胞密度达 90%-95% 进行传代
细胞鉴定	课题组前期已完成增生性瘢痕成纤维细胞的鉴定
伦理学批准	研究经新疆医科大学第一临床医学院伦理委员会批准，伦理批号：20170214-71

1.4.3 CCK-8 法检测成纤维细胞的增殖活力 将成纤维细胞按 $4 \times 10^7 L^{-1}$ 的细胞浓度接种于 96 孔板中，每孔 100 μ L。将细胞分为阴性对照组、miR-2116-3p 模拟物组和 miR-2116-3p 抑制物组，每组 15 孔。按照脂质体 Lipo8000 转染试剂说明书分

别转染阴性对照 (miR1N0000001-1-5)、miR-2116-3p 模拟物 (5'-CCU CCC AUG CCA AGA ACU CCC-3') 和 miR-2116-3p 抑制物 (5'-CCU CCC AUG CCA AGA ACU CCC-3')。转染后 0, 24, 48, 72 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 避光置于 37 $^{\circ}$ C、含体积分数 5%CO₂ 的培养箱中恒温培养 1-1.5 h, 用酶标仪测量 450 nm 波长处的吸光度值, 按照 CCK-8 试剂说明书计算细胞活力。

1.4.4 EdU 检测成纤维细胞的增殖活力 取成纤维细胞, 按 5×10^4 的细胞密度接种于 20 mm 共聚焦小皿中。将细胞分为阴性对照组、miR-2116-3p 模拟物组和 miR-2116-3p 抑制物组, 每组 3 皿。转染后 48 h, 依据 EdU 检测说明书进行操作完后用激光共聚焦拍摄, 计数绿色的细胞数 (处于增殖期的增生性瘢痕成纤维细胞) 和蓝色的细胞数 (细胞核), 用绿色的细胞数 / 蓝色的细胞数的比值进行统计分析。

1.4.5 细胞划痕实验检测成纤维细胞迁移能力 将成纤维细胞按 1×10^5 / 孔的细胞密度接种于 6 孔板中, 待细胞密度达到 80% 后, 取 10 μ L 枪头在 6 孔板底垂直划线, 用 37 $^{\circ}$ C 预热的 PBS 洗涤未贴壁的细胞, 加入含有体积分数 3% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 按 1.4.3 分组转染相应试剂后, 立即在倒置相差显微镜下拍摄 0 h 图像, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后观察并拍摄图像, 通过 Image J 软件计算划痕面积。

1.4.6 流式细胞术检测成纤维细胞凋亡 将成纤维细胞按 1×10^8 L⁻¹ 的细胞浓度接种于 6 孔板, 每孔加 2 mL 完全培养基, 按照 1.4.3 分组及处理。转染后 24 h, 加入 5 μ L 膜联蛋白 AV-FITC 混匀后, 避光室温孵育 15 min, 加入 400 μ L 结合缓冲液悬浮细胞。用流式细胞仪分别测细胞凋亡比例, 计算细胞凋亡率。

1.4.7 Western blot 法检测成纤维细胞中相关蛋白表达 将成纤维细胞按 1×10^8 L⁻¹ 的细胞浓度接种于 6 孔板中, 每孔加 2 mL 完全培养基, 按照 1.4.3 分组及处理, 每组 3 孔。转染后 24 h, 使用细胞 RIPA 裂解液提取蛋白。取 20 μ g 蛋白样品, Bis-Tris 凝胶电泳, 湿法转膜, 快速封闭液封闭 0.5 h。分别加入兔抗人 I 型胶原、 α -平滑肌肌动蛋白、III 型胶原和 GAPDH 一抗 (稀释比: 1 : 1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入二抗 (稀释比: 1 : 10 000), 室温孵育 1 h。采用 ECL 显影, Biorad 凝胶成像分析系统获取图像, 采用 ImageJ 软件行灰度分析, 分别计算 I 型胶原、 α -平滑肌肌动蛋白、III 型胶原蛋白灰度值与 GAPDH 蛋白灰度值的比值, 计算各蛋白表达水平。

1.4.8 qRT-PCR 检测成纤维细胞中相关基因表达 将成纤维细胞按 1×10^8 L⁻¹ 的细胞浓度接种于 6 孔板中, 每孔加 2 mL 完全培养基, 按照 1.4.3 分组及处理, 每组 3 孔。转染后 24 h, 使用细胞 RIPA 裂解液进行裂解, 检测方法同 1.4.1 中 I 型胶原的 mRNA 表达检测。引物序列与扩增条件见表 1, 2。

1.4.9 生物信息学网站预测 miR-2116-3p 与 I 型胶原的靶向关系 应用靶基因预测数据库 Targetscan(www.targetscan.org/vert_80/) 预测 miR-2116-3p 和 I 型胶原的潜在结合位点, 选

出与增生性瘢痕密切相关的 I 型胶原作为研究对象。

1.4.10 双荧光素酶法检测 miR-2116-3p 与 I 型胶原的靶向关系 将增生性瘢痕成纤维细胞接种于 24 孔板上, 将含有 I 型胶原的突变型质粒 (MT) 和对照野生型质粒 (WT) 分别转染至增生性瘢痕成纤维细胞中, 同时分别共转染 miR-2116-3p 阴性对照物和 miR-2116-3p 模拟物。按照 Lipo8000 转染试剂说明书分别转染。转染后 48 h, 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。

1.5 主要观察指标 ①增生性瘢痕组织与正常皮肤组织中 miR-2116-3p、I 型胶原的 mRNA 表达; ②各组成纤维细胞的增殖与凋亡; ③各组成纤维细胞中 I 型胶原、III 型胶原及 α -平滑肌肌动蛋白的蛋白与 mRNA 表达; ④ Targetscan 预测 miR-2116-3p 的下游靶基因, 双荧光素酶验证 miR-2116-3p 与 I 型胶原的结合情况。

1.6 统计学分析 使用软件 SPSS 25.0 进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 认为差异有显著性意义。文章统计学方法已经新疆医科大学统计学专家审核。

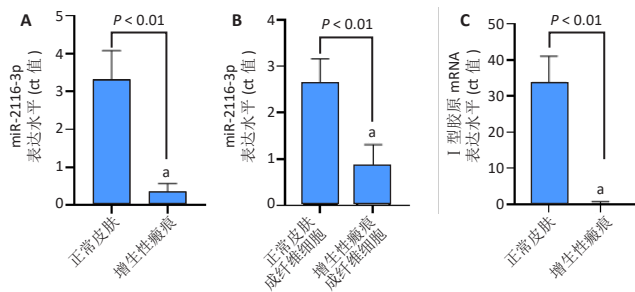
2 结果 Results

2.1 两种皮肤组织中 miR-2116-3p 与 I 型胶原的 mRNA 表达 qRT-PCR 检测结果显示, 与正常皮肤组织相比, 增生性瘢痕组织中 miR-2116-3p 的 mRNA 表达量减少 (*P* < 0.01); 与正常皮肤成纤维细胞相比, 增生性瘢痕组织成纤维细胞中 miR-2116-3p 的 mRNA 表达量减少 (*P* < 0.01); 与正常皮肤组织相比, 增生性瘢痕组织中 I 型胶原的 mRNA 表达量减少 (*P* < 0.01), 见图 1。

2.2 miR-2116-3p 对增生性瘢痕成纤维细胞增殖活力的影响 CCK-8 检测显示, 转染后 0 h, 各组细胞活力相近 (*P* > 0.05); 转染后 24, 48, 72 h, miR-2116-3p 模拟物组细胞活力明显低于阴性对照组 (*t*=5.693, 15.541, 36.26, *P* < 0.05 或 *P* < 0.01), miR-2116-3p 抑制物组细胞活力明显高于阴性对照组 (*t*=7.021, 20.782, 18.618, *P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 见图 2A。依据 EdU 试剂盒操作后, 用绿色细胞数 / 蓝色的细胞数的比值进行统计分析, 结果显示, 与 miR-2116-3p 阴性对照组相比, miR-2116-3p 模拟物组细胞增殖水平显著下降 (*P* < 0.05), miR-2116-3p 抑制物组细胞增殖水平显著升高 (*P* < 0.05), 见图 2B。

2.3 miR-2116-3p 对增生性瘢痕成纤维细胞迁移的影响 转染后 24 h, 与阴性对照组相比, miR-2116-3p 模拟物组细胞迁移面积显著下降 (*t*=25.387, *P* < 0.01), miR-2116-3p 抑制物组细胞迁移面积显著升高 (*t*=42.834, *P* < 0.01), 见图 3。

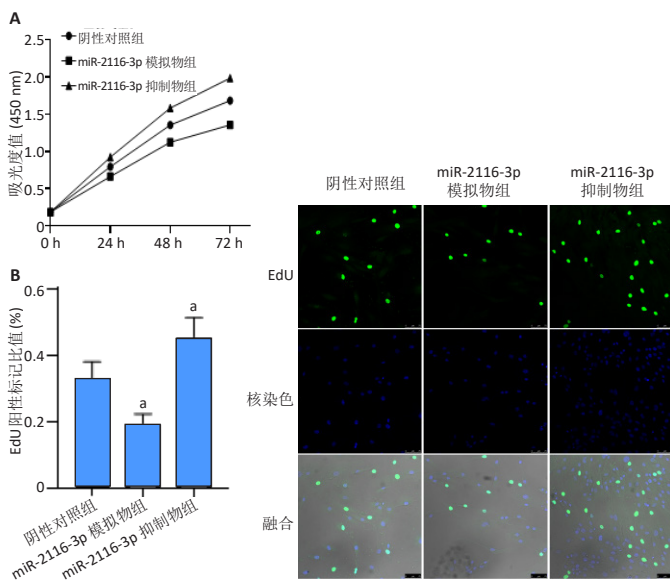
2.4 miR-2116-3p 对增生性瘢痕成纤维细胞凋亡的影响 转染后 24 h, miR-2116-3p 阴性对照组、miR-2116-3p 模拟物组、miR-2116-3p 抑制物组细胞凋亡率分别为 (11.97 \pm 1.33)%, (42.03 \pm 2.17)%, (7.267 \pm 1.65)%, miR-2116-3p 模拟物组的



图注: A为两种皮肤组织中 miR-2116-3p 的 mRNA 表达量, B为两种皮肤组织成纤维细胞中 miR-2116-3p 的 mRNA 表达量, C为两种皮肤组织中 I 型胶原的 mRNA 表达量

图 1 | 正常皮肤和增生性瘢痕组织中 miR-2116-3p 与 I 型胶原的 mRNA 表达

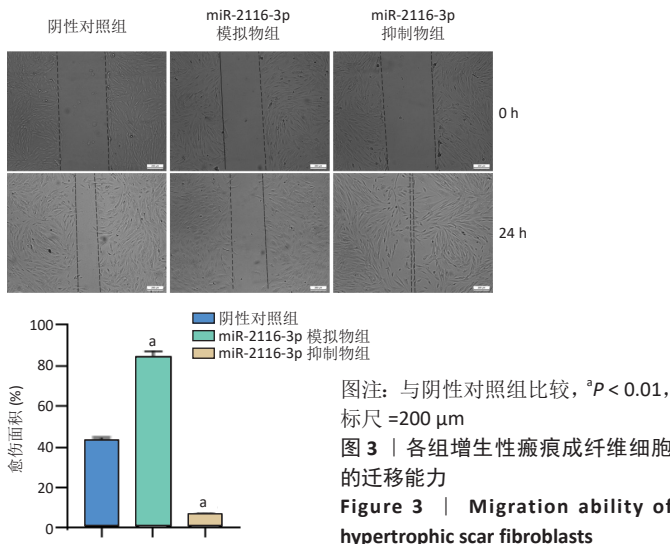
Figure 1 | mRNA expression of miR-2116-3p and type I collagen in normal skin tissues and hypertrophic scar tissues



图注: A 为 CCK-8 检测各组细胞活力, 转染后 24, 48, 72 h, miR-2116-3p 模拟物组细胞活力低于阴性对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), miR-2116-3p 抑制物组细胞活力高于阴性对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); B 为 EdU 标记检测细胞增殖, 与阴性对照组比较, $^a P < 0.05$, 标尺 = 75 μm

图 2 | 各组增生性瘢痕成纤维细胞的增殖

Figure 2 | Proliferation of hypertrophic scar fibroblasts

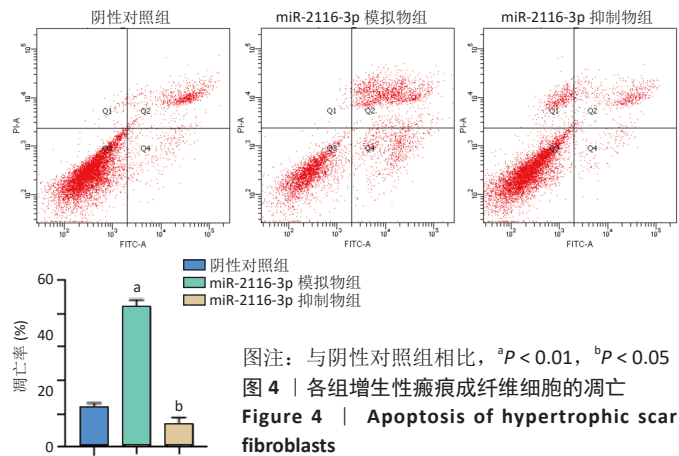


图注: 与阴性对照组比较, $^a P < 0.01$, 标尺 = 200 μm

图 3 | 各组增生性瘢痕成纤维细胞的迁移能力

Figure 3 | Migration ability of hypertrophic scar fibroblasts

细胞凋亡率较阴性对照组显著升高 ($t=20.432$, $P < 0.01$), miR-2116-3p 抑制物组的细胞凋亡率较阴性对照组显著下降 ($t=3.839$, $P < 0.05$), 见图 4。



图注: 与阴性对照组相比, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$

图 4 | 各组增生性瘢痕成纤维细胞的凋亡

Figure 4 | Apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts

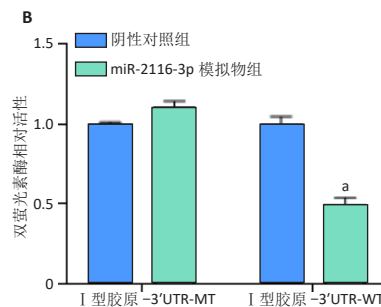
2.5 miR-2116-3p 与 I 型胶原的靶向结合 运用 Targetscan 预测 miR-2116-3p 的下游靶基因, 即 I 型胶原, 见图 5A。双荧光素酶结果示, 与 miR-2116-3p 阴性对照组相比, 共转染野生型 (WT) I 型胶原 -3'UTR 时, miR-2116-3p 模拟物组能减弱萤光素酶活性 ($P < 0.01$), 共转染突变型 (MT) I 型胶原 -3'UTR 时, 两组萤光素酶活性比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见图 5B。

Poorly conserved		Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)		Site type	Contact score	Contact score percentile	Weighted contact score	Conserved branch length	PCT	Predicted relative Kq
Position 102-109 of COL1A1 3' UTR	5' ...CCUAAUCCUAAAAGCCGACA...			8mer	-0.34	99	-0.34	0	N/A	-3.630
hsa-miR-2116-3p	3' CCCCAGAGAAUCCUCCUCC									

I 型胶原: 5'...CUC AAA AGC CAA AAA AUG GGA GA...3'

||||||

hsa-miR-2116-3p: 3'-CCC UCA AGA ACC GUA CCC UCC-5'



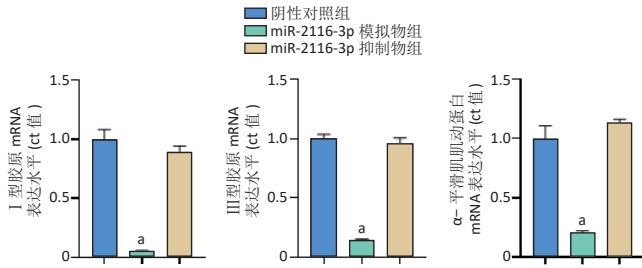
图注: MT 为突变型质粒, WT 为对照野生型质粒。A 为 Targetscan 预测 miR-2116-3p 的下游靶基因, 为 I 型胶原; B 为双荧光素酶报告基因实验结果, 与阴性对照组相比, $^a P < 0.01$

图 5 | miR-2116-3p 和 I 型胶原的结合情况

Figure 5 | Binding between miR-2116-3p and type I collagen

2.6 miR-2116-3p 对增生性瘢痕成纤维细胞中相关基因与蛋白表达的影响 qRT-PCR 检测结果显示, 与阴性对照组相比, miR-2116-3p 模拟物组细胞 I 型胶原、III 型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的 mRNA 表达量显著下降 ($P < 0.01$), miR-2116-3p

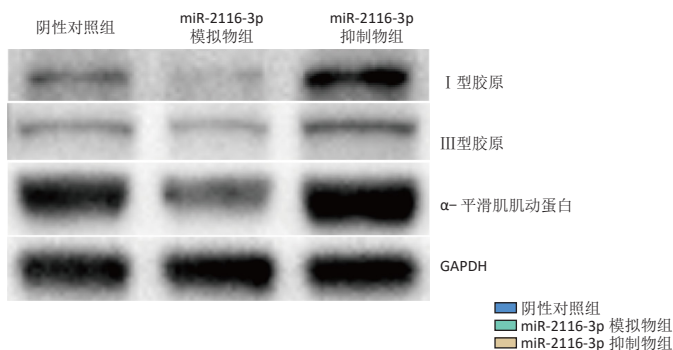
抑制物组细胞 I 型胶原、III 型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.01$), 见图 6。Western blot 检测结果显示, 与阴性对照组相比, miR-2116-3p 模拟物组细胞 I 型胶原、III 型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达量明显降低, miR-2116-3p 抑制物组细胞 I 型胶原、III 型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达量升高, 见图 7。



图注: 与阴性对照组相比, $^a P < 0.01$

图 6 | 各组增生性瘢痕成纤维细胞中 I 型胶原、III 型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的 mRNA 表达量

Figure 6 | mRNA expression levels of type I collagen, type III collagen, and α -smooth muscle actin in hypertrophic scar fibroblasts



图注: 与阴性对照组相比, $^a P < 0.01$

图 7 | 各组增生性瘢痕成纤维细胞中 I 型胶原、III 型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达量

Figure 7 | Protein expression levels of type I collagen, type III collagen, and α -smooth muscle actin in hypertrophic scar fibroblasts

3 讨论 Discussion

增生性瘢痕是一种皮肤纤维化疾病^[14], 其发病机制尚不明确^[11], 且无特效的治疗手段^[1]。目前常见的增生性瘢痕治疗方案机制主要是抑制增生性瘢痕成纤维细胞的过度增殖、促进其凋亡, 减少细胞外基质沉积、促进其降解吸收^[2]。因此, 为了寻找更好的治疗手段并取得更有效的治疗效果, 需要更加深入研究增生性瘢痕的发病机制。近年来, miRNA 在各种疾病中的作用机制是研究热点, 多种 miRNA 被证明可以通过多种方式影响增生性瘢痕成纤维细胞的生物学功

能^[12, 15-23]。研究发现 miR-422a、miR2116-3p 和 miR-3187-3p 在增生性瘢痕组织和增生性瘢痕成纤维细胞中表达下调, 还提出了各自的 CERN 网络并进行了生物信息学分析, 表明这些网络与泛素化密切相关^[12]。已有研究表明, I 型、III 型胶原在增生性瘢痕中明显表达增多^[24], 且 I 型、III 型胶原是细胞外基质的主要成分, 抑制其表达可有效减少细胞外基质的沉积^[25-30]。

此次研究发现, miR-2116-3p 在增生性瘢痕中呈低表达, I 型胶原 mRNA 在增生性瘢痕中呈低表达, 提示其在增生性瘢痕与正常皮肤中存在明显的表达差异, 并可能与增生性瘢痕的发生发展有关; 过表达 miR-2116-3p 后, 增生性瘢痕成纤维细胞的增殖能力显著减弱, 凋亡明显增加, I 型胶原、III 型胶原、 α -平滑肌肌动蛋白的 mRNA 与蛋白表达减少; 采用生物信息学网站 Targetscan 预测发现, miR-2116-3p 与 I 型胶原 mRNA 存在靶向结合位点。双萤光素酶报告提示 miR-2116-3p 可直接结合于 I 型胶原 mRNA, 靶向调控 I 型胶原的表达与翻译, 表明 miR-2116-3p 与 I 型胶原存在一定的负向调控关系; 使用 miR-2116-3p 抑制物使 miR-2116-3p 表达降低后, 增生性瘢痕成纤维细胞的增殖能力增加, 凋亡明显减少, I 型胶原、III 型胶原、 α -平滑肌肌动蛋白的蛋白表达增多, 但 I 型胶原、III 型胶原、 α -平滑肌肌动蛋白的 mRNA 未见明显差异。综上所述, miR-2116-3p 可下调 I 型胶原的表达进而抑制增生性瘢痕成纤维细胞的增殖, 提示 miR-2116-3p 可能成为增生性瘢痕治疗的潜在防治靶点。

此次研究只探讨了 miR-2116-3p 与 I 型胶原对增生性瘢痕增殖、迁移、凋亡的影响, 还需进一步在动物模型中使用 miR-2116-3p 拮抗剂与激动剂^[31], 或与泛素化深入研究 miR-2116-3p 与 I 型胶原对增生性瘢痕的作用^[12, 32]; 其中模拟物是双链 RNA, 抑制物是单链 RNA, 此次研究只设计了模拟物的阴性对照组, 可再设置抑制物的阴性对照组以排除可能产生的假阳性结果; 其中分组转染 miR-2116-3p 抑制物后 I 型胶原蛋白呈高表达、而 I 型胶原 mRNA 未见明显差异, 考虑可能是由于 miRNA 抑制剂是化学合成经特殊修饰的单链, 通过特异性结合成熟 miRNA 分子发挥其作用, 它并不是改变了目的 miRNA 的生成, 或 miR-2116-3p 与增生性瘢痕成纤维细胞细胞外基质的蛋白沉积较基因更为相关。

此次研究揭示了增生性瘢痕成纤维细胞增殖的部分分子机制, 为靶向调控 miR-2116-3p/ I 型胶原相关分子来防治增生性瘢痕的发生发展提供一定的理论依据。未来可继续探寻增生性瘢痕的相关作用机制, 以期防治增生性瘢痕提供新的策略。

作者贡献: 实验设计为田文融及马少林, 实验实施为田文融、齐郁松、马志伟, 实验评估为左俊、艾江, 资料收集为卜盼盼、赵皎均、李培培, 艾江、余扬及马少林修改及审核。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] FINNERTY C, JESCHKE M, BRANSKI L, et al. Hypertrophic scarring: the greatest unmet challenge after burn injury. *Lancet*. 2016;388(10052):1427-1436.
- [2] LEE H, JANG Y. Recent Understandings of Biology, Prophylaxis and Treatment Strategies for Hypertrophic Scars and Keloids. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3): 711.
- [3] MCGEARY S, LIN K, SHI C, et al. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science*. 2019;366(6472):eaav1741. doi: 10.1126/science.aav1741.
- [4] MENG X, NIKOLIC-PATERSON D, LAN H. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(6):325-338.
- [5] WANG X, HE Y, MACKOWIAK B, et al. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut*. 2021;70(4):784-795.
- [6] WONNACOTT A, DENBY L, JM COWARD R, et al. MicroRNAs and Their Delivery in Diabetic Fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022;182:114045.
- [7] JIN Z. MicroRNA targets and biomarker validation for diabetes-associated cardiac fibrosis. *Pharmacol Res*. 2021;174:105941. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105941.
- [8] BI S, CHAI L, YUAN X, et al. MicroRNA-98 inhibits the cell proliferation of human hypertrophic scar fibroblasts via targeting Col1A1. *Biol Res*. 2017;50(1): 22.
- [9] LI C, ZHU H, BAI W, et al. MiR-10a and miR-181c regulate collagen type I generation in hypertrophic scars by targeting PAI-1 and uPA. *FEBS Lett*. 2015;589(3):380-389.
- [10] LI J, LI Y, WANG Y, et al. Overexpression of miR-101 suppresses collagen synthesis by targeting EZH2 in hypertrophic scar fibroblasts. *Burns Trauma*. 2021;9:tkab038. doi: 10.1093/burnst/tkab038.
- [11] HUANG X, GU S, LIU C, et al. CD39 + Fibroblasts Enhance Myofibroblast Activation by Promoting IL-11 Secretion in Hypertrophic Scars. *J Invest Dermatol*. 2022;142(4):1065-1076.e19.
- [12] ZHANG Z, HUANG X, YANG J, et al. Identification and functional analysis of a three-miRNA ceRNA network in hypertrophic scars. *J Transl Med*. 2021;19(1):451.
- [13] GALLANT-BEHM C, PIPER J, LYNCH J, et al. A MicroRNA-29 Mimic (Remlarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin. *J Invest Dermatol*. 2019;139(5):1073-1081.
- [14] 张紫嫣, 徐洪, 高学敏, 等. microRNA 在皮肤纤维化中的研究进展 [J]. *实用皮肤病学杂志*, 2021,14(2):91-94.
- [15] HA M, KIM V. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-524.
- [16] ZHANG Q, GUO B, HUI Q, et al. miR-137 Inhibits Proliferation and Metastasis of Hypertrophic Scar Fibroblasts via Targeting Pleiotrophin. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(3):985-995.
- [17] JIANG D, GUO B, LIN F, et al. miR-205 inhibits the development of hypertrophic scars by targeting THBS1. *Aging*. 2020;12(21):22046-22058.
- [18] GUO B, HUI Q, XU Z, et al. miR-495 inhibits the growth of fibroblasts in hypertrophic scars. *Aging*. 2019;11(9):2898-2910.
- [19] BARONE N, SAFRAN T, VORSTENBOSCH J, et al. Current Advances in Hypertrophic Scar and Keloid Management. *Semin Plast Surg*. 2021;35(3):145-152.
- [20] 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.
- [21] 贾本川, 郭冰玉, 李泰然, 等. miR-663 靶向抑制 TGF- β 1 表达介导抑制增生性瘢痕皮肤成纤维细胞增殖 [J]. *解剖科学进展*, 2021,27(2):218-221,225.
- [22] 郭冰玉, 姜栋文, 回蕾, 等. 微小 RNA-205 在人增生性瘢痕中的表达及作用 [J]. *中华烧伤杂志*, 2021,37(2):180-186.
- [23] XIAO Y. MiR-486-5p inhibits the hyperproliferation and production of collagen in hypertrophic scar fibroblasts IGF1/PI3K/AKT pathway. *J Dermatol Treat*. 2021;32(8):973-982.
- [24] ZHANG K, GARNER W, COHEN L, et al. Increased types I and III collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA and protein in hypertrophic burn scar. *J Invest Dermatol*. 1995;104(5):750-754.
- [25] CHAI C, TAI I, ZHOU R, et al. MicroRNA-9-5p inhibits proliferation and induces apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts through targeting peroxisome proliferator-activated receptor β . *Biol Open*. 2020;9(12):bio051904. doi: 10.1242/bio.051904.
- [26] 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 Mol Histol*. 2018;49(4):377-387.
- [27] TANG J, YANG J, HU H, et al. miR-211-5p inhibits the proliferation, migration, invasion, and induces apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts by regulating TGF β 2 expression. *Ann Transl Med*. 2021;9(10):864.
- [28] ZHANG Z, GAO X, HE Y, et al. MicroRNA-411-3p inhibits bleomycin-induced skin fibrosis by regulating transforming growth factor- β /Smad ubiquitin regulatory factor-2 signalling. *J Cell Mol Med*. 2021;25(24):11290-11299.
- [29] ZHANG T, WANG X, WANG Z, et al. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF- β /Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110287.
- [30] GRAS C, RATUSZNY D, HADAMITZKY C, et al. miR-145 Contributes to Hypertrophic Scarring of the Skin by Inducing Myofibroblast Activity. *Mol Med*. 2015;21:296-304.
- [31] GUO L, XU K, YAN H, et al. MicroRNA expression signature and the therapeutic effect of the microRNA-21 antagomir in hypertrophic scarring. *Mol Med Rep*. 2017;15(3):1211-1221.
- [32] LI S, LIU Y, ZHANG T, et al. A Tetrahedral Framework DNA-Based Bioswitchable miRNA Inhibitor Delivery System: Application to Skin Anti-Aging. *Adv Mater*. 2022;e2204287. doi: 10.1002/adma.202204287.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)