

· 基础研究 ·

大鼠烧伤和热压伤自身修复过程中 miRNA-199a-5p 的表达变化

熊亮¹, 王立夫^{2*}, 胡寅², 钱莉丽¹, 曹咬脐¹, 刘泾科¹

¹南京医科大学附属江苏盛泽医院整形烧伤科, 江苏 苏州 215228; ²南京医科大学第一附属医院整形烧伤科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨大鼠烧伤和热压伤中变性真皮 miRNA-199a-5p 表达量随时间的变化情况。方法:用控温烫伤仪制作皮肤烧伤模型和热压伤模型,设置阴性对照组,用 qRT-PCR 检测不同的时间烫伤和热压伤部位变性真皮中的 miRNA-199a-5p 相对表达量。结果:各模型组变性真皮中 miRNA-199a-5p 相对表达量较正常组织中的相对表达量呈先下调后上调趋势,14 d 时 miRNA-199a-5p 相对表达量上调具有显著差异($P < 0.05$)。结论:miRNA-199a-5p 表达和变性真皮的增殖和迁移调控相关,损伤早期表达量的下调,促进变性真皮恢复正常功能,表达量的上调则促进细胞增殖和迁移,为热压伤创面修复机制的探讨提供新思路。

[关键词] 热压伤;大鼠;miRNA-199a-5p

[中图分类号] R644;Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)11-1575-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20191105

在深度烧伤及热压伤中,真皮细胞的代谢、功能、形态都发生了病理性改变。能够可逆修复创面、恢复功能的变性真皮是影响手术修复以及预后的重要因素^[1-2]。miRNA 在生物体发育和修复过程中起着重要的调控作用^[3],参与细胞凋亡、血管生成等伤口愈合的不同方面,在皮肤病理生理及皮肤病中发挥重要的作用。本研究选择在皮肤真皮层毛囊中高表达且具有促进细胞增殖和迁移作用的 miRNA-199a 家族中高度保守的 miRNA-199a-5p 作为目标 miRNA^[4],研究大鼠烧伤和热压伤中随着自身修复的时间变化,miRNA-199a-5p 表达的变化,为探讨热压伤创面修复机制提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

6 周龄清洁级 SD 大鼠,体重 200~250 g。脱毛处理:实验前 24 h,大鼠双侧大腿及臀部用脱毛膏脱毛,清水冲洗干净,避免皮肤损伤。暴露 24 h 后,观察脱毛处皮肤,无损伤者纳入实验,进行后续操作。本动物实验 3R 原则。

1.2 方法

将纳入实验的 SD 大鼠随机分成 5 组,其中阴性

对照组 6 只不进行处理,其余 4 组每组 26 只,为热压伤模型组,用异氟烷进行麻醉^[5]。将 YLS-5Q 台式超级控温烫伤仪温度调节至 90 °C,时间调节至 10 s,压力分别调节至 0 kg(无压力烫伤组)和 0.5、1.0、1.5 kg,对各组大鼠进行造模。造模 24 h 后,每组各取 1 只大鼠实施安乐死,取造模处皮肤组织,制成切片、HE 染色观察。

组织样本收集和 RNA 抽提。4 组造模动物,每组在造模后第 1、3、5、7、14 天分别随机取 5 只实施安乐死,无菌摘取造模处皮肤组织,封闭于经处理的保存管中。阴性对照组在造模后的第 14 天一次取样。所有取得的大鼠皮肤组织样本在液氮下研磨,研磨好后取相同重量的组织,分别加入 1 mL TRIzol(Ambion 公司,美国),按照说明书进行 RNA 的抽提并测浓度。

miRNA 逆转录预处理。根据数据库检索结果,定制逆转录引物(RT-primer):miRNA-199a-5p RT 引物(5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT-CGCACTGGATACGACGAACAG-3'),U6 RT 引物(5'-CGAGCACAGAATCGCTTCACGAATTTGCCGTGTCAT-3')。合成 miRNA-199a-5p 扩增引物(正向引物:5'-TCGACCCAGTGTTTCAGACTAC-3',反向引物:5'-GTGCAGGTCAGGATT-3'),U6 扩增引物(正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACATAT-3',反向引物:5'-CGAGCACAGAATCGCTTCA-3')。将

[基金项目] 苏州市吴江区科技局科研项目(WWK201615)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:wanglifu_md@163.com

RT-primer 分别稀释至 5 μmol/L,按照 RNA 1 μg(换算成体积)、RT primer 2 μL,用 H₂O 补充至 11 μL 预混合 RNA 样本,70 °C 下恒温 10 min,之后冰浴 2 min。将冰浴后的预混合 RNA 样本按照 5×RT-buffer 5 μL、dNTP(10 mmol/L)0.5 μL、RNAasin 0.5 μL、RT 酶 0.5 μL 分别加入试剂,用 H₂O 补充至 25 μL。将混合后的样本在 PCR 仪中 42 °C 恒温 60 min,70 °C 处理 10 min。

实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)检测。按照 2×SYBR Green (Thermo Fisher Scientific,公司)5 μL、正向引物(20 μmol/L)0.1 μL 反向引物(20 μmol/L)0.1 μL、cDNA(1 ng/μL)1 μL、H₂O 3.8 μL 添加检测样本,每个样本每个基因设 3 个复孔。qPCR 程序:95 °C 5 min 预变性,95 °C 15 s,60 °C 1 min 进行检测,并记录荧光信号。以 ΔC_T 表示检测样本模板中 miRNA-199a-5p 达到对照 U6 相同信号强度时扩增的循环数,ΔC_T 值越高,代表检测样本模板中 miRNA-199a-5p 的数量越少。通过 2^{-ΔΔC_T} 法检测 miR-199a-5p 的相对含量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件。实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 热压伤造模

造模后,大鼠模型部位如图 1 所示。造模 24 h

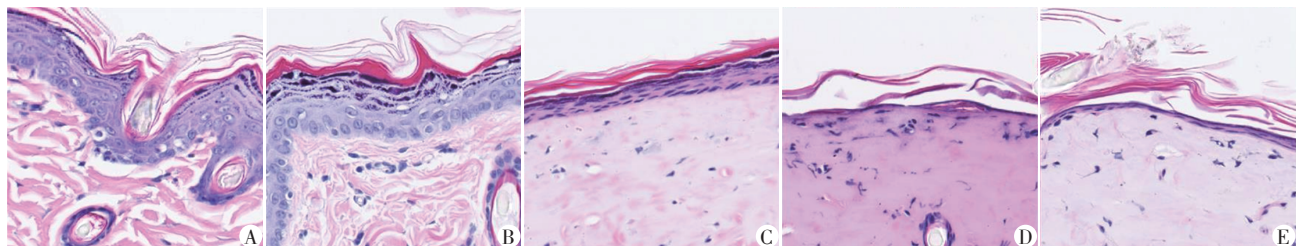
后取造模处皮肤组织切片,HE 染色结果见图 2。阴性对照组大鼠皮肤组织结构完整,毛囊结构明显可见。无压力烫伤组烫伤部位皮肤真皮层表层细胞有损伤,核内物质外泄。热压伤中真皮层细胞损伤情况较为严重,随着热压伤压力的增加,真皮层厚度减少。

2.2 qPCR 数据与分析

以阴性对照组作为基准,将 qPCR 法检测的 miR-199a-5p 相对含量处理成百分比值,结果见表 1。无压力烫伤组皮肤组织中的 miR-199a-5p 相对含量第 1、3、5、7 天表达下调,第 14 天时表达显著上调。0.5 kg 热压伤组皮肤组织中的 miR-199a-5p 相对含量第 1、3、5 天表达下调,第 7 天时回复至正常水平,第 14 天时表达显著上调。1.0 kg 和 1.5 kg 热压伤组皮肤组织中的 miR-199a-5p 相对含量第 1、3、5 天表达下调,第 7 天时表达比正常组织表达水平略高,第 14 天时表达上调,但与 0.5 kg 热压伤组比较,表达上调的幅度低。造模之后 3 个压力组在表达趋势上趋于一致,都是先抑制,然后逐步上调。第 14 天



图1 SD大鼠热压伤造模部位图示



A: 阴性对照组; B: 无压力烫伤组; C: 0.5 kg 热压伤组; D: 1.0 kg 热压伤组; E: 1.5 kg 热压伤组。

图2 热压伤皮肤组织 HE 染色结果(×400)

组别	第1天	第3天	第5天	第7天	第14天
阴性对照组	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
无压力烫伤组	51.17 ± 24.07	64.65 ± 17.41	39.58 ± 13.34*	61.61 ± 16.32	440.44 ± 123.13*
0.5 kg 热压伤组	50.36 ± 8.47*	58.24 ± 8.78	39.84 ± 9.11*	95.70 ± 17.14	478.48 ± 180.89*
1.0 kg 热压伤组	56.17 ± 18.72	51.59 ± 30.33	64.81 ± 40.63	149.34 ± 59.31	309.36 ± 94.00*
1.5 kg 热压伤组	85.38 ± 33.33	41.52 ± 17.35*	57.41 ± 16.84	142.05 ± 29.17	205.43 ± 61.86*

与阴性对照组比较,**P* < 0.05。

时 miR-199a-5p 相对含量表达略有不同,压力值越大,miR-199a-5p 相对含量上调的幅度越小。

3 讨论

目前,早期手术削痂或切痂结合皮片和/或皮瓣移植,是治疗深度烧伤的重要方法^[6]。但是,对烧伤深度的判断以及术者手术水平的优劣,直接影响了患者的预后。而热压伤的特点是热力烧伤与机械压力损伤共同存在,往往伤及肢体的深部组织,治疗时既要有足够的组织来修复创面,又要兼顾损伤部位复杂、精细的活动功能,治疗有一定难度^[1]。

皮肤中表达丰富的 miRNA 中,miRNA-199 家族主要存在于真皮层的毛囊中^[7]。研究表明,Dicer 酶在皮肤表皮层级毛囊中均有表达,当小鼠表皮的 Dicer 酶被敲除后,其中许多 miRNA 不能成熟,失去了正常功能,改变了皮肤结构发育,而且只能观察到一些毛囊样结构^[8]。miR-199a-5p 为高度保守 miRNA,在多种肿瘤中异常表达,与肿瘤的发生、发展关系密切^[4]。

本研究中使用大鼠制作烧伤和热压伤模型,在不同的时间里取烧伤处组织样本,检测样本中的 miRNA-199a-5p 的相对表达量,结果呈现 miRNA-199a-5p 相对表达量先抑制后上调的趋势。推测在皮肤组织受损初期,真皮层受到影响,变性真皮细胞在短时间内无法恢复正常功能,因此细胞内 miRNA-199a-5p 的表达量相对减少,表现为表达抑制。损伤发生过后,变性真皮随着时间慢慢发生改变,恢复真皮细胞的正常功能,细胞进行内调节,miRNA-199a-5p 的相对表达量慢慢趋于正常,达到正常水平。当真皮细胞恢复功能之后,由于烧伤和热压伤造成的真皮层损伤,真皮细胞需要进行分裂增殖、迁移,对损伤真皮和表皮进行修复,因此细胞内 miRNA-199a-5p 的相对表达量上调,真皮细胞增殖活跃,细胞迁移能力增强,开始实施真皮细胞的修复。

各模型组之间进行比较,0.5 kg 压力组组织细胞的表现与烧伤组差别不大。在变性真皮细胞恢复正常细胞水平的过程中,各压力组之间的差别不大,细胞进入活跃期,miRNA-199a-5p 表达量相对上调的过程中,可见上调的幅度随压力的增加呈现降

低的现象。在真皮细胞增殖和迁移的能力上,压力组之间存在区别,压力越小,miRNA-199a-5p 上调幅度大,细胞的增殖和迁移能力强。这可能与皮肤组织修复有关,压力值越小,细胞增殖和迁移发生的时间越早,皮肤组织修复得越快。反之,压力值越大,皮肤需要修复的时间越长。

本研究所使用的模型模拟的是临床上烧伤/热压伤发生期及修复早期的过程。理论上,miRNA-199a-5p 的调控在组织完成修复之后,存在一个逐渐下调,并恢复至正常细胞表达水平的一个趋势,在临床上对应的是疤痕修复至结束。因此,在本研究的基础上,可以设计进一步的实验来验证理论,从而为热压伤的创面修复提供新的思路。

【参考文献】

- [1] Liang P, Lv C, Jiang B, et al. MicroRNA profiling in denatured dermis of deep burn patients [J]. *Burns*, 2012, 38(4):534-540
- [2] Zhou J, Zhang X, Liang P, et al. Protective role of microRNA-29a in denatured dermis and skin fibroblast cells after thermal injury [J]. *Biol Open*, 2016, 5(3):211-219
- [3] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297
- [4] Kim BK, Kim I, Yoon SK. Identification of miR-199a-5p target genes in the skin keratinocyte and their expression in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *J Dermatol Sci*, 2015, 79(2):137-147
- [5] 李健楠, 吴畏, 冉明梓, 等. 蓝斑区去甲肾上腺素能神经元在 Orexin 促麻醉觉醒中的作用研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(12):2239-2241
- [6] 蔡玉辉, 王磊, 朱兴华, 等. 富血小板血浆结合自体网状皮移植治疗Ⅲ度烧伤创面的临床研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(10):1446-1450
- [7] Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(3):356-362
- [8] Sun H, Zhou Z, Dong Y, et al. Expression analysis of microRNAs related to the skin ulceration syndrome of sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 49:205-212

【收稿日期】2019-03-31