

· 基础医学 ·

miRNA-199a-5p在热损伤人皮肤成纤维细胞中的表达及其功能研究

熊亮¹, 胡寅^{2*}, 王立夫², 曹咬脐¹, 钱莉丽¹, 刘泾科¹¹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: 观察热损伤人皮肤成纤维细胞中 miRNA-199a-5p 表达量的变化, 以及对皮肤成纤维细胞增殖、迁移、侵袭功能的影响。方法: 分别用人皮肤成纤维细胞株(HSF)隔水 52 °C 水浴 30 s、60 s 制造细胞热损伤模型, 对比观察细胞热损伤状态; 用四甲基偶氮唑盐(MTT)检测热损伤 24 h、48 h 后细胞的增殖率; 用 qRT-PCR 检测热损伤 24 h、48 h 后细胞 miRNA-199a-5p 表达量的变化情况; 用划痕和 Transwell 测试细胞的迁移、侵袭功能; 用模拟物提高热损伤细胞中 miRNA-199a-5p 的表达量, 检测热损伤细胞的增殖和侵袭情况。结果: 52 °C 30 s 可以很好地制造人皮肤成纤维热损伤模型; 与对照组比较, 热损伤后 miRNA-199a-5p 表达量下调 [24 h, (2.67±0.35)%, $P < 0.001$; 48 h, (18.42±0.44)%, $P < 0.001$], 细胞增殖显著受到抑制 [24 h, (17.10±3.21)%, $P < 0.002$; 48 h, (25.93±1.74)%, $P < 0.001$], 细胞的迁移功能显著下降 [(35.35±7.07)%, $P < 0.001$], 侵袭功能亦被显著抑制 [(57.14±9.52)%, $P < 0.007$]。通过模拟物提高热损伤细胞中 miRNA-199a-5p 的表达量后, 细胞的增殖显著上调 [(136.55±6.14)%, $P < 0.003$], 细胞的侵袭能力增强 [(196.88±15.63)%, $P < 0.003$]。结论: 热损伤人皮肤成纤维细胞中 miRNA-199a-5p 的表达量与细胞增殖、迁移和侵袭正相关, 提高热损伤细胞中 miRNA-199a-5p 的表达量可以帮助热损伤细胞快速转归。

[关键词] 皮肤成纤维细胞; 热损伤; miRNA-199a-5p; qRT-PCR; 细胞增殖; 细胞迁移与侵袭**[中图分类号]** R329.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2021)08-1160-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20210808

Expression and function of miRNA-199a-5p in human skin fibroblasts after thermal injury

XIONG Liang¹, HU Yin^{2*}, WANG Lifu², CAO Yaoqi¹, QIAN Lili¹, LIU Jinke¹¹Department of Plastic and Burns, Jiangsu Shengze Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou 215228; ²Department of Plastic and Burns, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to observe the changes of miRNA-199a-5p expression in human skin fibroblasts with thermal injury and its effects on the proliferation, migration and invasion of skin fibroblasts. **Methods:** Cell models of thermal injury were established using human skin fibroblast cell line by bathing in water at 52°C for 30 s and 60 s, respectively, and the thermal injury of cells was observed and compared. The proliferation rate of cells 24 h and 48 h after thermal injury was detected by MTT assay. The changes of miRNA-199a-5p expression in the cells 24 and 48 h after thermal injury were determined through qRT-PCR. Cell migration and invasion were detected using wound-healing assay and Transwell assay. The expression of miRNA-199a-5p in thermally injured cells was increased using mimics, and the proliferation and invasion of thermally injured cells were detected. **Results:** Bathing in water at 52 °C for 30 s could successfully establish a thermal injury model in human skin fibroblasts. After thermal injury, miRNA-199a-5p expression was down-regulated [24 h, (2.67±0.35)%, $P < 0.001$; 48 h, (18.42±0.44)%, $P < 0.001$], cell proliferation was significantly inhibited [24 h, (17.10±3.21)%, $P < 0.002$; 48 h, (25.93±1.74)%, $P < 0.001$], cell migration decreased significantly [(35.35±7.07)%, $P < 0.001$], and cell invasion was also significantly inhibited [(57.14±9.52)%, $P < 0.007$]. After enhancing miRNA-199a-5p expression in the thermally injured cells using mimics, the proliferation of the cells increased significantly [(136.55±6.14)%,

[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: huyin282@sohu.com

$P < 0.003$], and the invasion ability of the cells was enhanced [(136.55±6.14)% , $P < 0.003$]. **Conclusion:** The expression level of miRNA-199a-5p in human skin fibroblasts with thermal injury is positively correlated with cell proliferation, migration and invasion. Increasing the expression level of miRNA-199a-5p in thermally injured cells can help it rapid return.

[**Key words**] human skin fibroblasts; thermal injury; miRNA-199a-5p; qRT-PCR; cell proliferation; cell migration and invasion

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(08): 1160-1165]

miRNA 是一类较短的单链 RNA, 参与许多靶基因的表达与调控, 影响细胞生物学功能^[1-2]。miRNA-199a 作为高度保守 microRNA, 在正常皮肤和肿瘤细胞中表达丰富, 影响细胞的增殖和迁移^[3-4]。目前对 miRNA-199a-5p 的研究主要集中在癌细胞^[5-6], 本研究构建人皮肤成纤维细胞 (human skin fibroblasts HSF) 热损伤模型^[7], 通过逆转录实时定量 PCR 对 miRNA-199a-5p 的表达量进行检测, 分析热损伤对 HSF 增殖和迁移功能的影响; 用 miRNA-199a-5p 模拟物转染热损伤细胞, 观察其对热损伤细胞的增殖和迁移能力^[8], 旨在为由热损伤引起的皮肤功能恢复提供研究依据。

1 材料和方法

1.1 材料

正常 HSF 购自无锡博慧斯生物医药科技有限公司。低糖细胞培养液 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胎牛血清 (fetal bovine Serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司; RNA 提取试剂 (TRIzol)、LipofectamineTM 2000 转染试剂、RT-PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; microRNA mimics (5'-CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCACAGGUAGU-CUGAACACUGGGGUU-3')、阴性对照 mimics (5'-CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCACAGGUAGUCUGAACACUGGGGUU-3') 购自苏州吉玛生物科技有限公司; U6 RT 引物 (5'-CGAGCACAGAATCGCTT-CACGAATTTGCGTGTCAT-3')、miR-199a-5p RT 引物 (5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTC-GCACTGGATACGACGAACAG-3')、U6 扩增引物 (正向引物: 5'-CGAGCACAGAATCGCTTCA-3'; 反向引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATAT-3')、miR-199a-5p 扩增引物 (正向引物: 5'-GTGCAGGGTCCGAGG-TATT-3'; 反向引物: 5'-CTAACCCAGTGTTTCAGAC-TAC-3') 由苏州金唯智公司合成; 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 试剂盒购自上海碧云天生物公司; Transwell 小室 (康宁公司, 美国); Matrigel (B&D 公司, 美国); 转染试剂 Lipo2000 (Invitrogen 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

复苏后的 HSF 常规培养, FBS 浓度为 10%, 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 HSF 热损伤处理及热损伤模型的制作

细胞生长至 80%~90%, 胰蛋白酶消化, 分成 3 个培养皿进行培养; 对照组和实验组的培养皿均用封口膜封好, 两个热损伤组在同一温度 (52 °C) 水浴中热损伤不同时间 (30 s 和 60 s), 对照组细胞悬液培养皿在 37 °C 水浴中水平面下浸泡 30 s。细胞均保持在水平面以下。分别在 0 h 和 24 h 进行拍照, 并结合瑞-姬氏染色法观察热损伤对 HSF 形态的影响。HSF 热损伤模型的制作参照文献^[7]: 将封口膜密封的培养皿放入 52 °C 水浴箱中水平面下浸泡 30 s。

1.2.3 MTT 实验

将经过热损伤处理的 HSF (52 °C 30 s) 计数, 调节细胞数量至 25 000 个/mL, 每孔 200 μL, 加入到 96 孔培养板中。一组培养 24 h, 另一组培养 48 h。培养结束时, 每孔分别加入 MTT 20 μL, 2 h 后加入 DMSO 溶解, 570 nm 处测吸光度值。

1.2.4 实时定量 PCR

将经过热损伤处理的 HSF (52 °C 30 s) 分为两组, 一组培养 24 h, 另一组培养 48 h。收集培养皿中的细胞, 用 TRIzol 试剂提取细胞 miRNA。配制逆转录及 PCR 扩增体系。逆转录条件为: 50 °C 逆转录 30 min, 94 °C 失活 2 min。PCR 条件为: 94 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环后 72 °C 继续延伸 10 min。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测 miR-199a-5p 的相对含量。

1.2.5 细胞迁移实验

将经过热损伤处理的 HSF (52 °C 30 s) 调节细胞密度, 以过夜铺满为准, 接种于 6 孔板。用 100 μL 的枪头在每孔中线轻轻划过, PBS 清洗。用 FBS 浓度为 4% 的 DMEM 培养基补充培养液至 3 mL/孔。培养 24 h 后观察细胞的迁移。

1.2.6 细胞侵袭实验

在 Transwell 小室膜的上室面加入稀释后基质

胶(基质胶与无血清培养稀释比例为1:7),每孔100 μL,30 min后吸掉基质胶。将HSF用DMEM制成无血清悬液,在上室层各加入250 μL,细胞数为 1.5×10^4 个/孔。下室加入10% FBS的DMEM,常规培养24 h。擦净上室面细胞,用4%的多聚甲醛固定下室面剩余细胞,Giemsa染色,统计细胞个数,以每个小室的平均细胞数为最终计数。

1.2.7 细胞转染实验

HSF稳定传代2~3代,待细胞长满70%时,消化接种至6孔板中继续培养。细胞正常生长后制作热损伤模型(52 °C 30 s)。模拟物组,用100 pmol miRNA-199a-5p模拟物加5 μL转染试剂混合转染细胞;对照组,用100 pmol的阴性对照模拟物加5 μL转染试剂Lipo2000混合转染细胞。添加DMEM培养液至1 mL/孔。4 h后更换培养液,用10% FBS的DMEM继续培养。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 13.0统计软件,定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用*t*检验或方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 热损伤对正常HSF形态的影响

正常HSF呈梭形或三角形,个体饱满,细胞膜光滑透亮。热损伤后HSF变圆钝,体积增大,表面有较多突起,胞浆中有大量的异常疏松透亮区,核浆比例变小(图1)。

2.2 热损伤对HSF增殖的影响

热损伤24 h和48 h后,HSF增殖明显受到了抑制。相对于正常细胞增殖,热损伤24 h后细胞平均抑制率为 $(17.10 \pm 3.21)\%$ ($P < 0.002, n=3$)、热损伤48 h后细胞平均抑制率为 $(25.93 \pm 1.74)\%$ ($P <$

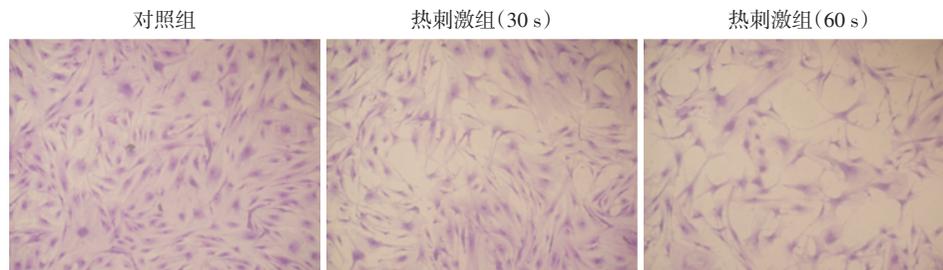


图1 热损伤对HSF形态的影响(Giemsa染色,×200)

Figure 1 Effects of thermal injury on HSF morphology (Giemsa staining, ×200)

0.001, $n=3$,图2)。

2.3 热损伤对HSF miR-199a-5p表达的影响

荧光实时定量PCR结果见表1。热损伤后HSF miRNA-199a-5p的表达明显得到了抑制(图3),24 h HSF miRNA-199a-5p表达率为 $(2.67 \pm 0.35)\%$,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.001$),48 h表达率为 $(18.42 \pm 0.44)\%$,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.4 热损伤对HSF迁移的影响

热损伤后,HSF细胞迁移速率明显降低。显微镜下进行细胞计数($n=4$),对照组计数结果为

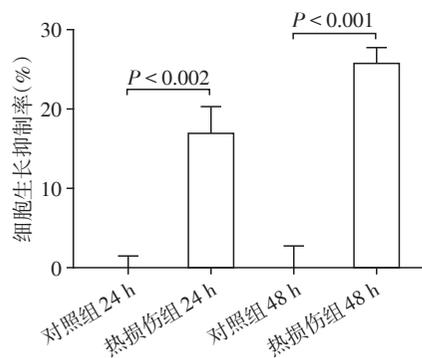


图2 热损伤对HSF增殖的影响

Figure 2 Effects of thermal injury on proliferation of HSF

表1 24 h、48 h热损伤HSF miRNA-199a-5p qRT-PCR结果

Table 1 miRNA-199a-5p qRT-PCR results of thermal injury HSF at 24 h and 48 h ($n=4, \bar{x} \pm s$)

指标	对照组-24 h	热损伤组-24 h	对照组-48 h	热损伤组-48 h
Ct-U6	14.76 ± 0.18	16.21 ± 0.15	15.31 ± 0.22	13.81 ± 0.30
Ct-miR-199a-5p	25.80 ± 0.07	32.48 ± 0.19	29.89 ± 0.07	30.84 ± 0.04
ΔCt	11.03 ± 0.07	16.27 ± 0.19	14.58 ± 0.07	17.02 ± 0.04
ΔΔCt×10 ⁵	47.79 ± 2.15	1.28 ± 0.17	4.08 ± 0.20	0.75 ± 0.02
表达率(%)	100.00 ± 4.50	2.67 ± 0.35	100.06 ± 4.99	18.42 ± 0.44

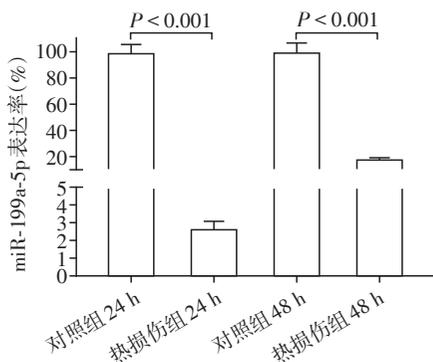


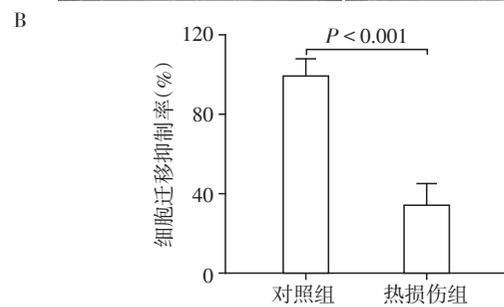
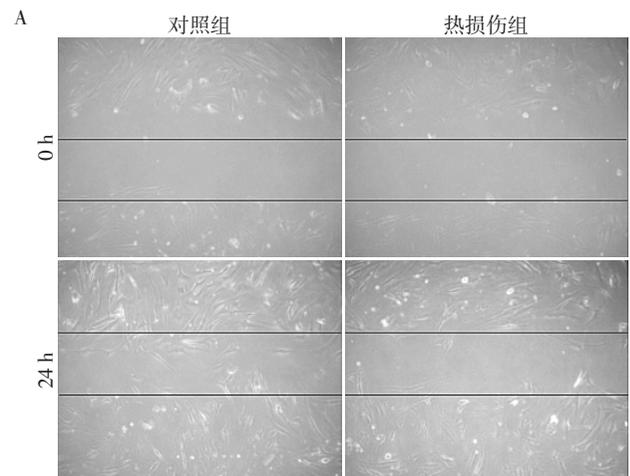
图3 热损伤对HSF miRNA-199a-5p表达的影响

Figure 3 Effects of thermal injury on miRNA-199a-5p expression in HSF

(24.75 ± 2.06)个,热损伤组计数结果为(8.75 ± 2.06)个,热损伤对细胞迁移的抑制率为(35.35 ± 7.07)%,与对照组比较迁移功能下降($P < 0.001$,图4)。

2.5 热损伤对HSF侵袭的影响

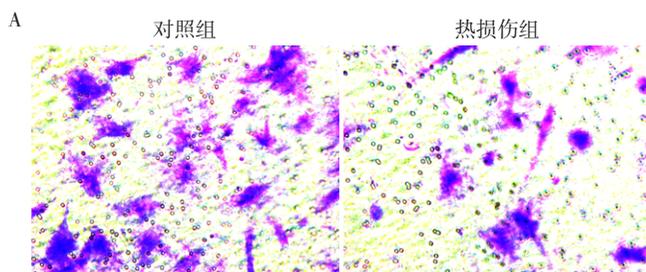
热损伤后,HSF侵袭速率明显降低。显微镜下进行细胞计数($n=4$),对照组细胞数量为(21.00 ± 5.56)个,热损伤组细胞数量为(12.00 ± 2.58)个,热损伤对细胞侵袭的抑制率为(57.14 ± 9.52)%,与对照组比较侵袭功能亦下降($P < 0.007$,图5)。



A: 0 h、24 h细胞迁移结果拍照($\times 200$);B:细胞迁移统计分析。

图4 热损伤对HSF迁移的影响

Figure 4 Effects of thermal injury on HSF migration



A:细胞侵袭结果拍照($\times 400$);B:对侵袭的细胞进行统计学分析。

图5 热损伤对HSF侵袭的影响

Figure 5 Effect of thermal injury on HSF invasion

2.6 miRNA-199a-5p模拟物对热损伤后HSF增殖的影响

加入阴性模拟物组的细胞增殖率为(104.52 ± 5.46)%,加入miR-199a-5p模拟物组的细胞增殖率为(136.55 ± 6.14)%,后者的热损伤细胞增殖明显升高($P < 0.003$, $n=3$,图6)。

2.7 miRNA-199a-5p模拟物对热损伤后HSF侵袭的影响

显微镜下对侵袭的细胞进行计数($n=4$),加入阴性对照模拟物组细胞数量为(9.00 ± 2.16)个,细胞侵袭率为(112.50 ± 18.75)%;加入miR-199a-5p模

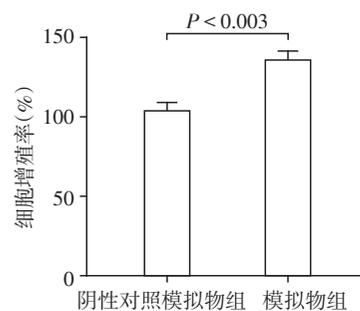
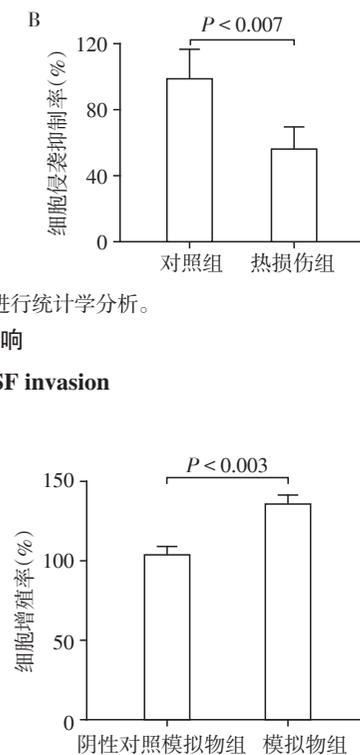


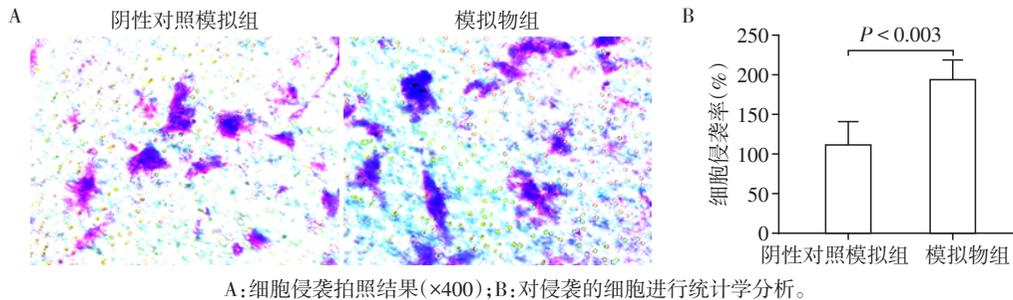
图6 miRNA-199a-5p模拟物对热损伤后HSF增殖的影响

Figure 6 Effects of miRNA-199a-5p mimics on proliferation of HSF after thermal injury

拟物组细胞数量为(15.75±1.71)个,细胞侵袭率为(196.88±15.63)%,后者的热损伤细胞侵袭率明显升高($P < 0.003$,图7)。

3 讨论

在深度烧伤及热压伤中,真皮细胞的代谢、功



A: 细胞侵袭拍照结果($\times 400$); B: 对侵袭的细胞进行统计学分析。

图7 miRNA-199a-5p模拟物对热损伤后HSF侵袭的影响

Figure 7 Effects of miRNA-199a-5p mimics on invasion of HSF after thermal injury

能、形态等都发生了病理性改变。能够可逆修复创面、恢复功能的间生态真皮是影响手术修复及预后的重要因素^[9]。临床治疗过程中,医生时常处于尽可能去除坏死组织和保留间生态组织两难的境地,通过研究影响变性真皮转归的重要因素及其机制,可以为临床治疗提供更多的理论依据。真皮中含有多种细胞,HSF是其中的重要细胞之一,它由胚胎时期的间充质干细胞分化而来。深度烧伤及热压伤后HSF增殖并迁移至创面,大量分泌胶原纤维及各种生长因子,还可以和新生毛细血管、各种炎症细胞形成肉芽组织促进创面的愈合,在创面修复过程中发挥着重要作用。

作为高度保守的micorRNA,miRNA-199a-5p广泛存在于皮肤、炎症反应、血管内皮细胞、癌细胞中,参与细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭等活动与功能^[4,6,10-12]。研究发现,过表达miRNA-199a-5p后,U2OS细胞的增殖能力显著降低($P < 0.05$),同时cyclin D1、p Rb表达水平显著下降,而P27、LC3 II/I、Beclin 1的表达水平显著增加($P < 0.05$)^[5]。miR-199a-5p通过调节EGF、SP1下调ERK5的表达并抑制其磷酸化,进而发挥对乳腺癌MDA-MB-231细胞侵袭的抑制作用^[13]。

大鼠真皮热压伤实验显示,在不同时间点获取组织样本,检测样本中miRNA-199a-5p的相对表达量,结果显示miRNA-199a-5p相对表达量为先抑制后上调的趋势^[14]。推测在大鼠皮肤组织受损初期,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。此结论可能也适用于人的皮肤组织。因此,本研究利用HSF,通过构建热

损伤模型观察细胞的形态变化,检测细胞中miRNA-199a-5p表达量的变化,以及人为干扰miRNA-199a-5p表达量来观察热损伤对HSF的影响。

本研究观察到,热损伤模型中HSF形态发生了改变,miRNA-199a-5p表达量显著下调,并显著抑制HSF的增殖、迁移和侵袭能力。通过转染模拟物的方式提高热损伤人成纤维细胞中miRNA-199a-5p的量,可以显著提高热损伤细胞的增殖和侵袭能力,提示HSF热损伤后的细胞功能与miRNA-199a-5p的表达量密切相关。这与之前的动物实验结果相对应。而如何在皮肤热损伤后提高人皮肤成纤维细胞中miRNA-199a-5p的表达量,加快热损伤皮肤的恢复与治疗,成为下一步研究的方向。

[参考文献]

- [1] D'ANGELO B, BENEDETTI E, CIMINI A, et al. Mic-mRNAs: a puzzling tool in cancer diagnostics and therapy [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(11): 5571-5575
- [2] ZHANG G M, GOYAL H, SONG L L. Bioinformatics analysis of differentially expressed miRNA-related mRNAs and their prognostic value in breast carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(6): 2865-2872
- [3] SUN Y, XIONG X, WANG X. HIF1 α /miR-199a/ADM feedback loop modulates the proliferation of human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs) under hypoxic condition [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(21): 2998-3009
- [4] QU D, YANG Y, HUANG X. miR-199a-5p promotes proliferation and metastasis and epithelial-mesenchymal transition through targeting PIAS3 in cervical carcinoma [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13562-13572
- [5] 王世先, 张遵俊, 杨水法, 等. 人肾癌细胞株miRNA表达差异临床意义研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2018, 25

- (3):175-179
- [6] 林其玲,陈畅. lncRNA LUCAT1通过靶向调控 miR-199a-5p/HIF-1 α 促进肾透明细胞癌786-O细胞的增殖和迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2020,150(3):67-75
- [7] 李德全,黄晓元,杨兴华. 离体人皮肤成纤维细胞热损伤后转归的形态学观察[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(11):2056-2060
- [8] 李国梁,潘志坚,柴立新,等. 微小RNA-451对巨噬细胞移动抑制因子的调控及对结肠癌细胞增殖与迁移的影响[J]. 中华实验外科杂志,2019,36(11):2026-2028
- [9] 王志勇,王西樵,刘英开,等. 大鼠深II度灼伤后皮肤力学性质改变及变性真皮再利用的初步观察[J]. 上海交通大学学报(医学版),2019,39(11):1239-1242
- [10] 周洋. miR-199a-5p在慢性缺氧心肌内质网应激中的作用及机制研究[D]. 重庆:第三军医大学,2016
- [11] WEI D, WANG W, SHEN B, et al. MicroRNA199a5p suppresses migration and invasion in oral squamous cell carcinoma through inhibiting the EMTrelated transcription factor SOX4[J]. Int J Mol Med, 2019, 44(1): 185-195
- [12] QU D, YANG Y, HUANG X. miR-199a-5p promotes proliferation and metastasis and epithelial-mesenchymal transition through targeting PIAS3 in cervical carcinoma [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13562-13572
- [13] 马寅英,李首庆,米旭光,等. miR-126和miR-199对乳腺癌细胞周期进程的影响[J]. 中国实验诊断学,2017,21(10):1828-1830
- [14] 熊亮,王立夫,胡寅,等. 大鼠烧伤和热压伤自身修复过程中miRNA199a5p的表达变化[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(11):1575-1577
- [收稿日期] 2020-12-23

(上接第1150页)

- gression of hepatocellular carcinoma [J]. Gut, 2017, 66(2):342-351
- [32] ROHR -UDILOVA N, KLINGLMULLER F, SCHULTE -HERMANN R, et al. Deviations of the immune cell landscape between healthy liver and hepatocellular carcinoma [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):6220
- [33] MIHALCEA C E, MOROSANU A M, MURARASU D, et al. Analysis of TP53 gene and particular infrastructural alterations in invasive ductal mammary carcinoma [J]. Rom J Morphol Embryol, 2020, 61(2):441-447
- [34] MIYAKI M, IJIMA T, KIMURA J, et al. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer [J]. Cancer Res, 1999, 59(18):4506-4509
- [35] OUYANG G, YI B, PAN G, et al. A robust twelve-gene signature for prognosis prediction of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20:207
- [36] DESSIE E Y, TU S J, CHIANG H S, et al. Construction and validation of a prognostic gene-based model for overall survival prediction in hepatocellular carcinoma using an integrated statistical and bioinformatic approach [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4):1632
- [37] CHEN P F, LI Q H, ZENG L R, et al. A 4-gene prognostic signature predicting survival in hepatocellular carcinoma [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6):9117-9124
- [38] WANG Z, TENG D, LI Y, et al. A six-gene-based prognostic signature for hepatocellular carcinoma overall survival prediction [J]. Life Sci, 2018, 203:83-91
- [收稿日期] 2021-03-23