

引用本文:高栋梁,张雷,张宏峰,等.微小RNA-4463对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和侵袭的影响[J].安徽医药, 2021, 25(6):1140-1143.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.06.019.

◇临床医学◇



微小RNA-4463对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和侵袭的影响

高栋梁,张雷,张宏峰,杨喜明

作者单位:延安大学附属医院烧伤整形手外科,陕西 延安 716000

通信作者:张宏峰,男,副主任医师,研究方向为创面修复的机制及病理性瘢痕的防治,Email:zxy200538@163.com

摘要: **目的** 研究微小RNA-4463(miR-4463)对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、迁移、侵袭的影响以及机制。**方法** 收集延安大学附属医院2017年12月至2019年6月整形手术病人40例,每例切除瘢痕疙瘩组织1个以及邻近正常皮肤组织1个,利用定量聚合酶链反应(qPCR)检测人正常成纤维细胞和瘢痕疙瘩成纤维细胞中miR-4463的表达量;将miR-4463模拟物对照质粒和miR-4463模拟物分别在Lipofectamine 2000介导下转染入瘢痕疙瘩成纤维细胞,分为miR-NC组和miR-4463组;常规培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞作为对照;qPCR检测转染后miR-4463的表达量;qPCR检测上调miR-4463对瘢痕疙瘩纤维化相关基因Col 1 A1、Col 3 A1表达的影响;细胞计数试剂盒(CCK-8)检测上调miR-4463对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖的影响,Transwell实验检测细胞的迁移、侵袭;采用TargetScan软件预测miR-4463与B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关的致病基因BAG4的靶向关系,双荧光素酶报告基因进一步进行验证。**结果** miR-4463在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达量较人正常成纤维细胞显著降低[(0.218±0.036)比(1.000±0.071), $P<0.05$];与对照组相比,转染miR-4463模拟物明显增加瘢痕疙瘩成纤维细胞中miR-4463的表达量[(1.000±0.073)比(3.313±0.242), $P<0.05$];上调miR-4463显著抑制瘢痕疙瘩纤维化相关基因Col 1 A1[(1.000±0.065)比(0.334±0.010)]、Col 3 A1[(1.000±0.070)比(0.301±0.008)]的表达量($P<0.05$);上调miR-4463抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖[(0.836±0.081)比(0.656±0.072), $P<0.05$],降低其迁移[(153.269±12.471)个比(82.363±7.254)个]、侵袭细胞数[(73.623±6.451)个比(36.459±3.235)个]($P<0.05$);BAG4是miR-4463下游靶基因。**结论** miR-4463可能通过调控BAG4抑制细胞外基质中纤维化相关胶原基因的表达,抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、迁移、侵袭。

关键词: 瘢痕疙瘩; 成纤维细胞; miR-4463; Bcl2相关致病基因4(BAG4)

Effect of miR-4463 on proliferation and invasion of human keloid fibroblasts

GAO Dongliang, ZHANG Lei, ZHANG Hongfeng, YANG Ximing

Author Affiliation: Burn and Hand Plastic Surgery, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an, Shaanxi 716000, China

Abstract: **Objective** To study the effects of microRNA-4463 (miR-4463) on the proliferation, migration and invasion of human keloid fibroblasts and its mechanism. **Methods** Forty patients with plastic surgery in Yan'an University Affiliated Hospital from December 2017 to June 2019 were collected. One keloid tissue and one adjacent normal skin tissue were excised from each patient. The expression of miR-4463 in human normal fibroblasts and keloid fibroblasts was detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The control plasmid and the mimic of miR-4463 were respectively transfected into keloid fibroblasts by Lipofectamine 2000 and assigned into miR-NC group and miR-4463 group, while the conventional cultured keloid fibroblasts were selected as controls. The expression of miR-4463 after transfection was detected by qPCR. qPCR was used to detect the effect of up-regulated miR-4463 on the expression of keloid fibrosis related genes Col 1 A1 and Col 3 A1. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the effect of up-regulation of miR-4463 on the proliferation of keloid fibroblasts. The cell migration and invasion were analyzed by Transwell assay. The targeting relationship between miR-4463 and Bcl-2-associated athanogene (BAG4) was predicted by TargetScan and further validated by double luciferase reporter gene. **Results** The expression of miR-4463 in keloid fibroblasts was significantly lower than that in human normal fibroblasts [(0.218±0.036) vs. (1.000±0.071), $P<0.05$]. Compared with the control group, the expression of miR-4463 in keloid fibroblasts transfection with miR-4463 mimics was significantly increased [(1.000±0.073) vs. (3.313±0.242), ($P<0.05$)]. Up-regulation of miR-4463 significantly inhibited the expression of Col 1 A1 [(1.000±0.065) vs. (0.334±0.010)] and Col 3 A1 [(1.000±0.070) vs. (0.301±0.008)] in keloid fibrosis ($P<0.05$). Up-regulation of miR-4463 inhibited the proliferation of keloid fibroblasts [(0.836±0.081) vs. (0.656±0.072), $P<0.05$], and decreased the number of migrating [(153.269±12.471) vs. (82.363±7.254)] and invading [(73.623±6.451) vs. (36.459±3.235)] cells ($P<0.05$). BAG4 was the downstream target gene of miR-4463. **Conclusion** miR-4463 may inhibit the expression of fibrosis-related collagen genes in extracellular matrix by regulating BAG4, and inhibit the proliferation, migration and invasion of keloid fibroblasts.

Key words: Keloid; Fibroblasts; MiR-4463; Bcl2 Associated Athanogene 4 (BAG4)

瘢痕疙瘩是一种病理性瘢痕,主要表现为皮肤损伤修复过程中结缔组织快速增殖,成纤维细胞过度生长,胶原大量沉积,并伴有炎症以及组织损伤等^[1-2]。瘢痕疙瘩生长在面部等部位严重影响病人的容貌,给病人带来极大的生活困扰。目前,瘢痕疙瘩的发病机制尚不十分清楚,临床缺乏特异性的治疗方法。因此,探究瘢痕疙瘩发生发展过程中的分子机制,为临床寻找新的防治方法具有重要意义。研究表明,阻碍成纤维细胞的恶性增殖可抑制瘢痕疙瘩的生长^[3]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种具有广泛作用的非编码RNA,主要调控转录后的靶基因水平,影响多种人类疾病的发生发展^[4-6]。研究证实,miRNA的表达量异常与多种皮肤病如瘢痕疙瘩的病理进程紧密相关^[7]。研究显示,miR-4463在瘢痕疙瘩组织中较正常对照明显降低^[8],但其具体的作用机制尚不明确。本研究拟通过探究miR-4463对人瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、侵袭的影响及分子机制,为临床阐明瘢痕疙瘩发生发展分子机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 胎牛血清、DMEM培养基、Transwell小室购自美国Corning公司,Trizol试剂、Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司,定量聚合酶链反应(qPCR)试剂盒、cDNA逆转录试剂盒购自中国Roche公司,细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)购自上海碧云天生物有限公司;Mataigel胶购自美国BD公司,miR-4463模拟物对照质粒、miR-4463模拟物均购自广州锐博生物科技有限公司,荧光素酶试剂盒购自美国Sigma公司。荧光定量PCR扩增仪购自美国ABI公司,多功能酶标仪购自美国Applied Biosystems公司。

1.2 细胞的收集与培养 收集延安大学附属医院2017年12月至2019年6月整形手术病人40例,每例切除瘢痕疙瘩组织1个以及邻近正常皮肤组织1个,其研究均获得病人或其近亲属的同意,且均经过病理学检验确认为瘢痕疙瘩。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。病人年龄在20~35岁,均未接受任何瘢痕相关治疗。收集的样本置于无菌条件下清洗,使用组织块贴壁法分离瘢痕疙瘩成纤维细胞^[9],经鉴定符合实验要求,加入含10%胎牛血清DMEM培养基孵育,置于5%二氧化碳、37℃培养,每2天加入胰酶消化、传代。

1.3 细胞的转染 选取对数期3~5代瘢痕疙瘩成纤维细胞,采用随机数字表法分为对照组、miR-NC

组、miR-4463组。常规培养的瘢痕疙瘩成纤维细胞作为对照组,miR-NC组、miR-4463组根据Lipofectamine 2000说明书将miR-4463模拟物对照质粒和miR-4463模拟物分别转染入瘢痕疙瘩成纤维细胞,然后置于37℃继续培养48 h。取临床手术中正常皮肤标本,应用组织块法进行培养,用2.5 g/L胰蛋白酶进行消化传代,实验用第3~8代处于对数生长期的细胞。

1.4 qPCR实验 各组瘢痕疙瘩成纤维细胞转染后培养48 h,收集 5×10^5 /孔置于6孔板中,待细胞密度约为80%~90%,加入Trizol试剂,提取瘢痕疙瘩成纤维细胞总RNA,逆转录为互补DNA(cDNA),反应条件为50℃ 60 min, 85℃ 5 min。引物均由上海生工生物公司设计、合成,如下表所示。miR-4463以U6为参照,Col 1 A1和Col 3 A1以GAPDH为参照,根据qPCR试剂盒指示检测miR-4463的表达量,反应条件:95℃ 15 min, 95℃ 15 s, 57℃ 45 s, 35个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-4463的表达量。

表1 引物序列

基因	序列
miR-4463	正向:5'-GGCCCCACCCAGTCTC-3' 反向:5'-GCAGGAGACTGGGCTG-3'
Col 1 A1	正向:5'-CGAAGACATCCACCAATCAG-3' 反向:5'-GATCGCACAAACACCTTGCC-3'
Col 3 A1	正向:5'-CCTGGTCCTTGCTGTGCTGCTGT-3' 反向:5'-GCAGTTTCTAGCGGGGTTTTTACG-3'
U6	正向:5'-CCTGCTTCGGCAGCACA-3' 反向:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	正向:5'-AACGGATTGTGCTGATTG-3' 反向:5'-GGAAGATGCTGATGGGATT-3'

1.5 CCK-8实验 将各组 1×10^4 个瘢痕疙瘩成纤维细胞接种至96孔板,加入适量培养基,分别培养24 h、48 h、72 h,每孔加入10 μL CCK-8溶液,37℃继续孵育2 h,酶标仪检测瘢痕疙瘩成纤维细胞450 nm吸光度。

1.6 Transwell实验 将Mataigel基质胶稀释液提前加入Transwell上室膜,风干、备用;收集各组转染48 h的瘢痕疙瘩成纤维细胞,在胰酶的介导下将其密度调整为 1×10^6 /mL;吸取200 μL瘢痕疙瘩成纤维细胞悬液加入Transwell上室,下室中加入600 μL、含10%胎牛血清的培养基,37℃培养48 h;取5个区域计数,计算平均值即为侵袭细胞数;检测迁移细胞数时,Transwell上室膜不加入Mataigel基质胶。

1.7 miR-4463靶基因的预测和验证 Targetscan

(http://www.targetscan.org/vert_71/) 预测 miR-4463 与 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) Bcl-2 相关的致病基因 BAG4 的靶向关系。野生型 (BAG4-wt) 荧光素酶报告载体 (含有与 miR-4463 结合的位点) 和突变型 (BAG4-mut) 荧光素酶报告载体 (含有突变位点) 均购买自美国 Sigma 公司, 分别与 miR-NC 质粒、miR-4463 模拟物共转染, 37 °C 培养 48 h, 在荧光素酶试剂盒说明书指示下测定瘢痕疙瘩成纤维细胞中的荧光素酶相对活性。

1.8 统计学方法 实验结果通过 SPSS 22.0 统计学软件分析, 正态分布资料表示为 $\bar{x} \pm s$, 两组间的比较采用成组 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较使用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-4463 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达量 与人正常成纤维细胞 (1.000±0.071) 相比, miR-4463 在瘢痕疙瘩成纤维细胞中表达量 (0.218±0.036) 明显降低 ($t=29.470, P < 0.001$)。

2.2 转染 miR-4463 模拟物对瘢痕疙瘩成纤维细胞中 miR-4463 表达量的影响 与对照组 (1.000±0.073) 相比, miR-NC 组瘢痕疙瘩成纤维细胞中 miR-4463 表达量 (1.026±0.085) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 miR-4463 组细胞中 miR-4463 表达量 (3.313±0.242) 明显增加 ($F=669.515, P < 0.001$)。

2.3 上调 miR-4463 对瘢痕疙瘩纤维化相关基因表达、细胞增殖、迁移及侵袭的影响 与对照组相比, miR-NC 组瘢痕疙瘩成纤维细胞中 Col 1 A1、Col 3 A1 表达量、细胞增殖、迁移及侵袭差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 miR-4463 组细胞中 Col 1 A1、Col 3 A1 表达量、增殖活性、迁移及侵袭数明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

2.4 miR-4463 靶基因的预测和验证 BAG4 基因 3' 端非翻译区域 (3' UTR) 部分碱基可与 miR-4463 特异性结合, 见图 2。

跟 miR-NC 与 BAG4-wt 共转染 (1.000±0.065) 相

比, miR-4463 模拟物与 BAG4-wt 共转染降低瘢痕疙瘩成纤维细胞荧光素酶相对活性 (0.435±0.048) ($t=20.977, P < 0.001$); 但 miR-4463 模拟物与 BAG4-mut 共转染 (0.994±0.081) 跟 miR-NC 与 BAG4-mut 共转染 (1.000±0.083) 相比, 对瘢痕疙瘩成纤维细胞荧光素酶相对活性无明显影响 ($t=0.155, P=0.879$)。

Position 1455-1461 of BAG4 3' UTR
BAG4-wt 5' -CGGAGAAACCCAGUCUC-3'
miR-4463 3' -CCGGGGUGGGGUCAGAG-5'
BAG4-mut 5' -CGGAGAAACggucaCUC-3'

图 2 Targetscan 预测 miR-4463 与 BAG4 的靶向关系

3 讨论

瘢痕疙瘩是一种组织在创伤或感染后过度修复、纤维化的良性肿瘤, 其病理进展与成纤维细胞增殖调控异常有关。瘢痕疙瘩发生发展主要表现为成纤维细胞增殖活性增强, 但其发病机制尚不明确, 治疗手段多样, 但效果不令人满意, 已经成为整形外科亟待解决的主要难题之一。越来越多的研究表明, 瘢痕疙瘩的发生、发展与 miRNA 表达量异常紧密相关^[10-11]。

Col 1 A1 和 Col 3 A1 基因是一种胶原表达的相关基因, 在瘢痕疙瘩发生发展中起到重要作用, Col 1 A1 和 Col 3 A1 基因过表达可引起成纤维细胞的增殖。

miR-4463 是近年来发现的一种 miRNA, 通过调控细胞的增殖、侵袭影响人类疾病的发生发展。研究表明, 采用 miRNA 芯片技术检测发现, miR-4463 在动脉硬化闭塞症病人中表达量明显降低, 进一步过表达 miR-4463 抑制低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞迁移, 从而参与动脉硬化闭塞症的病理发生过程^[12]。另外研究表明, miR-4463 可通过靶向调控下游靶基因 (细胞迁移相关蛋白 AMOT) 表达来调控血管平滑肌细胞迁移, 为探究血管疾病的新疗法提供实验依据^[13]。除此之外, miR-4463 可增强过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激反应, 并促进其凋亡, 表明 miR-4463 在血管疾病中发挥重要作用

表 1 上调 miR-4463 对瘢痕疙瘩纤维化相关基因表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Col 1 A1 相对表达量	Col 3 A1 相对表达量	吸光度			迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
				24 h	48 h	72 h		
对照组	9	1.000±0.065	1.000±0.070	0.503±0.049	0.836±0.081	1.227±0.156	153.269±12.471	73.623±6.451
miR-NC 组	9	1.022±0.090	1.025±0.059	0.525±0.058	0.857±0.086	1.254±0.163	148.235±13.052	83.274±7.336
miR-4463 组	9	0.334±0.010 ^①	0.301±0.008 ^①	0.487±0.050	0.656±0.072 ^①	0.872±0.085 ^①	82.363±7.254 ^①	36.459±3.235 ^①
<i>F</i> 值		558.490	601.287	1.189	17.219	21.109	111.663	155.781
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.322	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: Col 1 A1 为 I 型胶原蛋白 A1, Col 3 A1 为 III 型胶原蛋白 A1。

①与 miR-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

用。但研究发现,miR-4463在瘢痕疙瘩病人样本组织中表达量异常,表明miR-4463可能参与瘢痕疙瘩病理发展过程。因此本实验通过qPCR检测miR-4463在瘢痕疙瘩成纤维细胞、人正常成纤维细胞中的表达量,结果显示,miR-4463在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达量明显降低,与前人研究在组织中的表达量具有一定的相似性;进一步上调miR-4463在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达量,结果显示,过表达miR-4463抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖,降低其侵袭、迁移能力,表明miR-4463可通过影响瘢痕疙瘩成纤维细胞的生物学特性,阻碍瘢痕疙瘩组织的生长。

BAG4是BAG家族蛋白成员之一,可靶向结合于B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2),阻碍细胞凋亡信号的传导,降低细胞的凋亡率。近年来的研究发现,BAG4在多种肿瘤组织如非小细胞肺癌^[14]、乳腺癌^[15]、黑色素瘤^[16]中表达量异常,参与肿瘤的发生、转移过程。研究证实,BAG4在瘢痕疙瘩病理演进过程中表达量明显上调,表明BAG4参与瘢痕疙瘩的病理进程^[17]。在本实验中,为进一步探究miR-4463抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、侵袭、迁移的分子机制,通过在线数据库预测发现,BAG4 3'UTR区域含有部分碱基可特异性结合于miR-4463,表明BAG4可能是miR-4463的下游靶基因;进一步通过双荧光素酶验证发现,miR-4463与含有结合位点的BAG4野生型载体共转染可降低细胞中的双荧光素酶相对活性,而与BAG4突变型载体共转染对细胞中双荧光素酶相对活性无显著影响,表明miR-4463可通过特异性结合于BAG4,从而降低细胞中的双荧光素酶相对活性,证实BAG4是miR-4463的下游靶基因。

综上所述,miR-4463在瘢痕疙瘩成纤维细胞中的表达量显著降低;过表达miR-4463可抑制细胞外基质中纤维化相关胶原基因的表达,抑制瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖、侵袭、迁移,其作用机制可能是通过靶向调控BAG4表达量,为瘢痕疙瘩临床特异性治疗方法的探究提供实验依据,未来会进一步深入研究miR-4463的作用机制以及探究其在临床样本中的作用。

(本文图1见插图6-4)

参考文献

[1] KULAWCZUK P, CZAPLA N, BIŃCZAK-KULETA A, et al. Genetic basis of keloid formation in wounds after cardiac surgery[J].

Kardiochir Torakochirurgia Pol, 2014, 11(3):273-277.

- [2] LEDON J A, SAVAS J, FRANCA K, et al. Intralesional treatment for keloids and hypertrophic scars: a review[J]. Dermatol Surg, 2013, 39(12):1745-1757.
- [3] MUKHOPADHYAY A, TAN E K J, KHOO Y T A, et al. Conditioned medium from keloid keratinocyte/keloid fibroblast coculture induces contraction of fibroblast-populated collagen lattices[J]. Br J Dermatol, 2005, 152(4):639-645.
- [4] LUDWIG N, LEIDINGER P, BECKER K, et al. Distribution of miRNA expression across human tissues[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(8): 3865-3877.
- [5] REDDY K B. MicroRNA (miRNA) in cancer[J]. Cancer cell Int, 2015, 15(1): 38-52.
- [6] GANJU A, KHAN S, HAFEEZ B B, et al. miRNA nanotherapeutics for cancer[J]. Drug Discov Today, 2017, 22(2): 424-432.
- [7] LIU Y, YANG D, XIAO Z, et al. miRNA expression profiles in keloid tissue and corresponding normal skin tissue[J]. Aesthetic Plast Surg, 2012, 36(1):193-201.
- [8] YAO X, CUI X, WU X, et al. Tumor suppressive role of miR-1224-5p in keloid proliferation, apoptosis and invasion via the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(1): 713-720.
- [9] 薛斌, 王璞, 董浦江. 人瘢痕疙瘩成纤维细胞原代培养及生物学行为研究[J]. 激光杂志, 2007, 28(2):95-95.
- [10] LI C, BAI Y, LIU H, et al. Comparative study of microRNA profiling in keloid fibroblast and annotation of differential expressed microRNAs[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2013, 45(8): 692-699.
- [11] LUAN Y, LIU Y, LIU C, et al. Serum miRNAs signature plays an important role in Keloid disease[J]. Cur Mol Med, 2016, 16(5): 504-514.
- [12] 何雪梅, 王雪琴, 杜超, 等. miR-4463在下肢动脉硬化闭塞症中的表达及意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(8):812-817.
- [13] WANG X, DU C, HE X, et al. MiR-4463 inhibits the migration of human aortic smooth muscle cells by AMOT[J/OL]. Biosci Rep, 2018, 38(5): 20180150.DOI: 10.1042/BSR20180150.
- [14] WANG R, WANG L, LI Y, et al. FGFR1/3 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of non - small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(15): 4107-4114.
- [15] ZUBOR P, HATOK J, MORICOVA P, et al. Gene expression abnormalities in histologically normal breast epithelium from patients with luminal type of breast cancer[J]. Mol Biol Rep, 2015, 42(5):977-988.
- [16] REULAND S N, SMITH S M, BEMIS L T, et al. MicroRNA-26a is strongly downregulated in melanoma and induces cell death through repression of silencer of death domains (SODD)[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(5): 1286-1293.
- [17] SATISH L, LUO JH, PRIYA KS, et al. 139 Gene array profiling of keloid fibroblasts to identify the target genes for therapeutic evaluations[J]. Wound Repair and Regeneration, 2004, 12(2): A36.

(收稿日期:2020-01-22,修回日期:2020-05-18)