

0.05),联合检测的灵敏度、特异度均优于单独检测( $P < 0.05$ )。

脑梗死分型与进展型缺血性脑卒中之间有密切关系,可预测卒中的进展,且TACI亚型+PACI亚型+UE亚型+腔隙梗死组合模型是预测进展型缺血性脑卒中的最优模型。

#### 【参考文献】

- [1] Behari S, Singh S, Bhaisora KS. Ischemic stroke associated with ankylosing spondylitis: an integral part of disease spectrum, or a natural consequence of progressive infirmity[J]. Acta Neurochir (Wien), 2018, 160(5):959~961.
- [2] 解红,刘学政,刘新桥.进展性缺血性脑卒中的发病机制和危险因素研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(6):612~614.
- [3] Feng J, Chen X, Guan B, et al. Inhibition of peroxynitrite-induced mitophagy activation attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(8):6369~6386.
- [4] Ohya Y, Osaki M, Sakai S, et al. A case of recurrent ischemic stroke due to intravascular lymphomatosis, undiagnosed by random skin biopsy and brain imaging[J]. Case Rep

Neurol, 2017, 9(3):234~240.

- [5] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组.急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组中国急性缺血性脑卒中诊治指南2010[J].中国临床医生, 2011, 39(3):69.
- [6] 陈欣,关兰芳,马赞英,等.进展性缺血性脑卒中危险因素及其预测价值研究[J].卒中与神经疾病, 2016, 23(6):392~395.
- [7] 王凯华,黄龙坚,黄建民,等.气虚血瘀型急性缺血性脑卒中的TOAST分型及中西医结合治疗的临床研究[J].陕西中医, 2016, 22(2):145~148.
- [8] Pulagam KR, Colas L, Padro D, et al. Evaluation of the novel TSPO radiotracer VUHS1008 in a preclinical model of cerebral ischemia in rats[J]. EJNMMI Res. 2017, 7(1):93.
- [9] Walla A, Gnandi-Piou F, Egbohou P, et al. Bilateral divergent shoulder's fracture dislocation case in an ischemic stroke patient[J]. Orthop Case Rep, 2017, 7(3):13~16.
- [10] 王楠星,张江.OCSP分型联合CT分型预测急性脑梗死进展价值[J].中国煤炭工业医学杂志, 2016, 19(9):1313~1315.

【文章编号】1006-6233(2019)09-1466-04

## miR-145 与 TGF- $\beta_1$ 在瘢痕疙瘩组织中的表达及临床意义

苏钰<sup>1</sup>, 郭艳红<sup>2</sup>, 姚伟伟<sup>2</sup>, 殷茜<sup>3</sup>, 焦伟<sup>1</sup>, 王海龙<sup>1</sup>

(1.河北省邯郸市眼科医院/邯郸市第三医院, 河北 邯郸 056001

2.河北省邯郸市中心医院, 河北 邯郸 056001

3.河北省邯郸钢铁有限责任公司职工医院, 河北 邯郸 056001)

**【摘要】目的:**检测 miR-145 在瘢痕疙瘩组织的表达水平,探讨其临床意义。**方法:**选取 2014 年 1 月至 2016 年 5 月于邯郸市第三医院皮肤科、眼耳鼻喉科、普外科体表皮肤瘢痕疙瘩患者 83 例,和 20 例皮脂腺囊肿周边的正常皮肤组织,采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测瘢痕组织和正常皮肤组织中 miR-145 与 TGF- $\beta_1$ mRNA 的表达水平;分析 miR-145 与 TGF- $\beta_1$  在皮肤瘢痕疙瘩中的表达及临床意义。**结果:**皮肤瘢痕疙瘩组织 miR-145mRNA 表达水平明显低于正常皮肤组织,而 TGF- $\beta_1$ mRNA 表达水平明显高于正常皮肤组织;在皮肤瘢痕疙瘩术后复发患者组织 miR-145mRNA 表达水平明显低于未复发组,而 TGF- $\beta_1$ mRNA 表达水平明显高于未复发组。**结论:**miR-145 在皮肤瘢痕疙瘩组织的低表达, TGF- $\beta_1$ mRNA 在皮肤瘢痕疙瘩组织的高表达,二者对瘢痕疙瘩的形成起着重要的作用,且二者表达呈现明显的相关性,对瘢痕疙瘩术后复发起到提示作用。

**【关键词】** 瘢痕疙瘩; miR-145; TGF- $\beta_1$ ; 复发

**【文献标识码】** A **【doi】**10.3969/j.issn.1006-6233.2019.09.015

瘢痕疙瘩是病理性瘢痕的一种主要类型,是皮肤纤维增生性疾病,在皮肤外伤后创面愈合过程中胶原局部过度积聚形成的增殖性瘢痕组织。发生于头颈、颌面部、前胸、肩背及四肢关节部,瘢痕除了影响美观

外,还因瘙痒、疼痛及相关部位功能障碍等并发症,被视为临床治疗上面临的难题之一。目前仍未明确其具体发病机制。有研究表明,人体组织中,微小 RNA (microRNA、miRNA)参与调节成纤维细胞增殖、分化

【基金项目】河北省科技支撑计划项目,(编号:152777130)

【通讯作者】王海龙

和细胞外基质合成过程在瘢痕疙瘩中发挥重要作用<sup>[1-3]</sup>。MicroRNA-145 (miR-145) 可能通过调控特定的信号通路抑制原癌基因的激活,具有潜在抑癌作用,近年来已经成为肿瘤研究中的热点<sup>[4]</sup>,瘢痕疙瘩在多方面与肿瘤有相似特性,miR-145 是否与瘢痕疙瘩相关少见报道。本研究的目的是检测 miR-145 和 TGF-β1 在瘢痕疙瘩组织的表达水平,探讨其临床意义。

### 1 资料与方法

**1.1 临床资料:**收集 2014 年 1 月至 2016 年 5 月于邯郸市第三医院皮肤科、眼耳鼻喉科、普外科体表皮肤瘢痕疙瘩 83 例,均经病理检查确诊。该组患者均为初治患者;既往体健,无皮肤疾病、结缔组织病、无肿瘤和其他重要心脑血管等全身疾病;未接受过放疗、化疗等抗癌治疗;无激光治疗史。排除使用免疫抑制剂、激素类药物及既往接受放化疗治疗过的患者。选取同一时间 20 例皮脂腺囊肿周边的正常皮肤组织作为对照组。两组资料在年龄、性别等一般情况等比较差异无统计学 ( $P>0.05$ ), 因此具有可比性。

**1.2 主要试剂:**RT-PCR 试剂盒购自美国 GeneCopoeia 公司;miR-145 引物、TGF-β1 引物及 GAPDH 引物均购自中国上海吉玛生物公司。Real-time PCR 仪为美国 ABI 公司生产的 ABI 7900。

**1.3 实验方法:**瘢痕疙瘩患者和皮脂腺囊肿患者接受手术治疗,术后留取瘢痕疙瘩组织和皮脂腺囊肿患者正常皮肤组织放置-80℃冰箱保存。瘢痕疙瘩患者接受手术后加放疗和术区曲安奈德激素局部注射治疗,随访 1 年按照复发与否分为复发组和未复发组。按照总 RNA 提取试剂盒操作步骤提取总 RNA,合成互补 DNA,反转录产物采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测 miR-145 及 TGF-β1 的 mRNA 表达。GAPDH 上游引物为 5'-GAGTCCACTGGCGTCTTCA-3',下游引物为 5'-GGGGTGTCTAAGCAGTTGGT-3',miR145-上游引物序列为:5'-ACACTCCAGCTGGGGTCCAGTTTTCCAGGA-3';下游引物为:5'-TCAACTGGTGTCTGAGTCCG-GCAATTCAGTTGAGAGGGATTTC-3'。TGF-β1 上游引物为 5'-CCCACAACGAAATCTATGACA-3',下游引物为 5'-AAGGCCAAAGCCCTCAAT-3';按 RT-PCR 反应条件进行:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s、51℃ 退火 30s、72℃ 延伸 30s,共 30 个循环。以 GAPDH 为内参照,采用 Δ 循环阈值 (Ct) 法处理结果,计算各指标 mRNA 的相对表达量,即  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

**1.4 统计学分析:**采用 SPSS17.0 对数据进行统计学分析,计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,并采用 t 检验,相关性分析采用 Pearson 法,  $P<0.05$  具有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 研究对象基线资料:**实验组共收集皮肤瘢痕疙瘩 83 例,20 例皮脂腺囊肿周边的正常皮肤组织作为对照组,研究对象基线资料比较统计学无明显差异。见表 1。

表 1 两组资料研究对象基线资料比较

组别	例数	年龄	性别(女/男)	BMI
瘢痕疙瘩组	83	33.70±6.64	59/24	23.84±3.02
正常皮肤组	20	35.90±5.96	11/9	23.81±2.98
统计值		F=0.046	$\chi^2=1.92$	F=0.001
P	0.831	0.167	0.98	

**2.2 瘢痕疙瘩和正常皮肤组织中 miR-145mRNA 和 TGF-β1mRNA 表达水平:**在皮肤瘢痕疙瘩组织 miR-145 mRNA 表达水平明显低于正常皮肤组织 ( $P<0.01$ ),而 TGF-β1mRNA 表达水平明显高于正常皮肤组织 ( $P<0.01$ ), 详见表 2。

表 2 瘢痕疙瘩组和正常皮肤组织中 miR-145 和 TGF-β1 mRNA 表达水平的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	miR-145mRNA	TGF-β1mRNA
瘢痕疙瘩组	83	0.461±0.030	0.705±0.057
正常皮肤组	20	0.650±0.035	0.312±0.051
t		24.32	28.20
P		<0.001	<0.001

**2.3 瘢痕疙瘩术后复发组和未复发组中 miR-145 和 TGF-β1mRNA 表达水平:**在皮肤瘢痕疙瘩手术加综合治疗 1 年后复发,患者组织 miR-145 mRNA 表达水平明显低于未复发组 ( $P<0.05$ ),而 TGF-β1mRNA 表达水平明显高于未复发组 ( $P<0.05$ ), 详见表 3。

表 3 瘢痕疙瘩术后复发组和未复发组中 miR-145 和 TGF-β1 mRNA 表达水平的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	miR-145mRNA	TGF-β1mRNA
复发组	31	0.447±0.024	0.737±0.074
未复发组	52	0.483±0.027	0.669±0.062
t		6.342	9.294
P		<0.001	<0.001

2.4 采用 Pearson 法对瘢痕疙瘩组织中 miR-145mRNA 和 TGF-β1mRNA 表达相关性分析:在皮肤瘢痕疙瘩患者组织 miR-145 mRNA 表达水平与 TGF-β1mRNA 表达水平呈现明显的负性相关 (P<0.001), 见表 4。

表 4 瘢痕疙瘩组织中 miR-145mRNA 和 TGF-β1mRNA 表达相关性分析

项目		miR-145	TGF-β1
TGF-β1	Pearson 相关性	1.000	-.448*
	Sig.(双侧)		.000
	N	83	83
miR-145	Pearson 相关性	-.448*	1.000
	Sig.(双侧)		.000
	N	83	83

注: \* 在置信度(双侧)为 0.01 时,相关性是显著的

### 3 讨论

瘢痕疙瘩主要表现为机体对皮肤创伤进行修复的过程中成纤维细胞过度增殖,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成胶原、弹性蛋白等功能增加,而降解功能下降,导致胶原过度沉积于真皮层为特征的一种病理性瘢痕。外观表现为病变超出皮肤创伤的原有范围,突出于皮肤表面,颜色暗红,影响美观,同时合并肿胀、皮痒等症状,临床上多采用手术切除,联合激素及放射治疗等综合手段,但术后仍有部分患者复发,让临床医师颇为棘手。国内外学者对瘢痕疙瘩形成病因及调控机制进行不断研究,虽然并没有完全确定,但瘢痕疙瘩在临床上过度增生,放射治疗和 5-氟尿嘧啶等抗肿瘤药物的治疗有效性等方面与肿瘤相似,因此,有学者提出了瘢痕疙瘩与肿瘤均具有相似特性<sup>[5,6]</sup>。

MiRNA(microRNA)是一类内源性非编码小分子 RNA,可能作为新的致癌基因、或抑癌基因、或通过翻译、转录后水平对基因表达进行调控,与肿瘤发生、发展及侵袭转移密切相关。因为瘢痕疙瘩的类肿瘤性,有些学者考虑,microRNA 是否在瘢痕疙瘩也发挥着重要的作用。宁璞等<sup>[7]</sup>通过基因芯片的研究方法将病理性瘢痕与正常皮肤组织中的 microRNA 差异表达谱进行分析,证明了 microRNA 表达在两种组织中存在着统计学差异。Li 等<sup>[8]</sup>比较了瘢痕疙瘩和正常皮肤组织成纤维细胞中 miRNA 的表达差异,发现 9 种 miRNA 存在表达差异。其中 6 种基因表达上调,包括 miR-152、miR-320C、miR-30A-5P 等;3 种基因表达下调,包括 miR-4328、miR-145-5p、miR-143-3p。在

这些表达差异的 miRNA 中,miR-145 因在乳腺癌、肺癌、肝癌、卵巢癌等多种肿瘤组织中低表达,并通过调整 KRAS、C-MYC 和 ERK5 等多个靶基因抑制细胞增殖、侵袭、转移和凋亡,在肿瘤的诊断、治疗及预后等方面具有重要的临床价值,是最近研究的热点<sup>[9]</sup>。Fang 等<sup>[10]</sup>报道,在皮肤缺损小鼠实验模型中,瘢痕形成过程中脐带来源的间充质干细胞(MSCs)和肌成纤维细胞积聚密切相关,该作用主要是依赖于 uMSC 衍生的外泌体(uMSC-Exos)而上述作用又是由外泌体内 microRNA 来调控完成,于是通过高通量 RNA 测序和功能分析,证明一组富含特定 miR-145 的 uMSC-Exos 通过调控 TGF-β2/SMAD2 而抑制肌成纤维细胞的作用,在伤口愈合期间对瘢痕形成发挥重要作用。本研究中我们利用 RT-PCR 检测瘢痕疙瘩组织和正常皮肤组织中 miR-145mRNA 表达水平,发现在瘢痕疙瘩组织 miR-145mRNA 的表达水平明显低于正常皮肤组织 P<0.05,实验结果表明瘢痕疙瘩组织中 miR-145mRNA 低表达,对瘢痕疙瘩的形成发挥重要的作用。但本实验结果和 Gras 等<sup>[11]</sup>的研究结果不同,Gras 认为在增生性瘢痕组织中 miR-145mRNA 表达水平与正常皮肤组织相比,明显增加 3 倍,miR-145mRNA 过表达对增生性瘢痕组织发挥重要的作用。Gras 等研究结果与本研究不同,可能是因为本研究选用的是瘢痕疙瘩与正常皮肤进行对照研究,而 Gras 等采用的是增生性瘢痕与正常皮肤进行对照研究,瘢痕疙瘩与增生性瘢痕都属于病理性瘢痕,但是二者的发生机制不尽相同;其次,研究结果不同可能源于本研究样本量较小。提示我们在日后的研究设计可以追加增生性瘢痕组织中 miR-145 表达情况,以及在未来的研究中要继续收集样本,增加样本数量,必要时进行多中心研究。

转化生长因子 β(transforming growth factor β, TGF-β), 是一种分泌型活性多肽,在哺乳动物体内发现的三种亚型 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3,而其中 TGF-β1 在瘢痕疙瘩的发病过程中发挥着重要促进作用。虽然瘢痕疙瘩的具体发病机制目前仍未明确,但是组织学显示大量的成纤维细胞增生,细胞外基质中胶原、蛋白多糖、糖蛋白等过量沉积、胶原纤维排列紊乱等是其特点,在临床上针对瘢痕疙瘩进行治疗方案中,使用类固醇激素、抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)和丝裂霉素 c 是通过抑制成纤维细胞的增殖或胶原的合成发挥作用。肖刚等<sup>[12]</sup>利用免疫组化及 TUNEL 的方法验证在瘢痕组织中 TGF-β1 通过调节成纤维细胞增殖和凋亡而发挥作用;武继祥等<sup>[13]</sup>采用原位杂交和图像分析技术阐明 TGF-β1 可促进 TIM-1 表达,通过抑制胶原酶而阻止胶原的降解;徐孝兴<sup>[14]</sup>对 TGF-β 介导 Smad 的信号通路、MAPK 通路及 PI3K/Akt 的信号



转导通路,以自分泌、旁分泌和内分泌机制在病理性瘢痕中发挥其生物学作用。本研究皮肤瘢痕疙瘩组织 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平明显高于正常皮肤组织;在皮肤瘢痕疙瘩术后复发患者组织 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平明显高于未复发组,提示 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平明显增高对瘢痕疙瘩术后复发具有提示作用。

目前,通过调控 TGF- $\beta$ 1 的过程来防治瘢痕疙瘩的形成,在临床上取得一定的疗效,但是仍有一部分患者在治疗后(手术加放疗、糖皮质激素治疗等综合治疗)复发。创面过度愈合形成瘢痕疙瘩是一个复杂的、多种基因表达调控的过程,故需进一步研究找出其他的关键基因及调控途径尤为重要,是研究人员目前的工作重点。在过去的5年中,全球范围内至少有137项临床试验调查 miRNA 与一系列疾病中的关系,包括牛皮癣,癌症和急性移植物抗宿主病等,Olubukola Babalola 等<sup>[15]</sup>使用 Medline、PubMed、EMBASE、Web of Science、Google Scholar 和 Cochrane 数据库,以关键词或 MeSH 术语“皮肤纤维化”与“microRNA”,“miRNA”,“microRNA 疗法”或“miRNA 疗法”对1990年1月至2013年5月发表的关于 miRNA 在皮肤纤维化中作用的文献进行检索分析,结果显示,miRNA 通过调控 TGF- $\beta$  信号传导,细胞外基质合成与降解,以及成纤维细胞增殖和分化等过程参与瘢痕疙瘩的形成,认为调节 miRNA 有可能为瘢痕疙瘩的预防和治疗提出一种新的视野。本研究,皮肤瘢痕疙瘩组织 miR-145 mRNA 表达水平明显低于正常皮肤组织,而 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平明显高于正常皮肤组织;在皮肤瘢痕疙瘩术后复发患者组织 miR-145 mRNA 表达水平明显低于未复发组,而 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平明显高于未复发组;相关分析显示在瘢痕疙瘩中二者的表达成明显的负相关,提示 miR-145 与 TGF- $\beta$ 1 在瘢痕疙瘩发挥重要意义,并对患者术后复发有一定的提示作用。二者相互调节机制是我们下一步研究的方向。

总之,在瘢痕疙瘩的研究工作中,对 miRNAs 在病理性瘢痕组织中的差异表达,结合其相应的靶基因和(或)靶蛋白,及参与调控的信号通路,有助于我们更加了解瘢痕增生的机制,能够实现在基因水平上对瘢痕疙瘩的发生和发展进行调控,有望为其治疗提供崭新的思路。

#### 【参考文献】

[1] Rang Z, Wang ZY, Pang QY, et al. MiR-181a targets PHLPP2 to augment AKT signaling and regulate proliferation and apoptosis in human keloid fibroblasts [J]. Cell

Physiol Biochem, 2016, 40(3-4): 796~806.  
[2] Luan Y, Liu Y, Liu C, et al. Serum miRNAs signature plays an important role in keloid disease [J]. Curr Mol Med, 2016, 16(5): 504~514.  
[3] Yu X1, Li Z2, Chan MT3, et al. microRNA deregulation in keloids: an opportunity for clinical intervention [J]. Cell Prolif, 2015, 48(6): 626~630.  
[4] Banmjoahann D, Ansel KM. MicroRNA regulation of the germinal center response [J]. Curt Opin Immunol, 2014, 6(28): 6~11.  
[5] 蔡景龙. 瘢痕疙瘩发生的肿瘤源性学说 [J]. 中华医学杂志, 2009, 89(16): 1084~1087.  
[6] Vincent AS1, Phan TT, Mukhopadhyay A, et al. Human skin keloid fibroblasts display bioenergetics of cancer cells [J]. Invest Dermatol, 2008, 128(3): 702~709.  
[7] 宁璞, 刘德伍, 毛远桂等. 增生性瘢痕与正常皮肤微小 RNA 的差异表达谱分析 [J]. 中华医学杂志, 2012, 92(10): 692~694.  
[8] 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.  
[9] Sachdeva M, Mo YY. miR-145-mediated suppression of cell-growth, invasion and metastasis [J]. Am Transl Res, 2010, 2(2): 170~180.  
[10] Fang S, Xu C, Zhang Y, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNAs suppress myofibroblast differentiation by inhibiting the transforming growth factor- $\beta$ /SMAD2 pathway during wound healing [J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5(10): 1425~1439.  
[11] Gras C, Ratuszny D, Hadamitzky C, et al. miR-145 contributes to hypertrophic scarring of the skin by inducing myofibroblast activity [J]. Mol Med, 2015, 9(21): 296~304.  
[12] 肖刚, 王智园, 谭敏, 等. 转化生长因子  $\beta$ 1 对病理性瘢痕中成纤维细胞增殖及凋亡水平的影响 [J]. 实用医学杂志, 2008, 24(13): 2242~2245.  
[13] 武继祥, 陈德英, 吴宗耀. 增生性瘢痕中 TGF- $\beta$  和胶原酶、TIMP-1 mRNA 表达的定量研究 [J]. 中华整形外科杂志, 2000, 16(1): 34.  
[14] 徐孝兴. 病理性瘢痕与 TGF- $\beta$  介导的信号通路的相关性研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013, 34(1): 77~80.  
[15] Babalola O, Mamalis A, Lev-Tov H, et al. The Role of microRNAs in skin fibrosis [J]. Arch Dermatol Res. 201, 305(9): 763~776.