

MicroRNA-744 调控 PRKACA 和 FGF2 对 皮肤烧伤愈后瘢痕形成的影响

张博,张浩

(佳木斯大学附属第一医院整形外科,黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:目的 研究皮肤烧伤愈后瘢痕形成中 MicroRNA-744 调控蛋白激酶 cAMP 激活催化亚基 α (PRKACA)和成纤维细胞生长因子 2(FGF2)的作用和相关性。方法 选择烧伤动物模型共 30 只作为研究对象,分为对照组、烧伤组、愈后组,每组 10 只。比较各组 microRNA-744 表达、PRKACA 和 FGF2 水平及蛋白表达量,并采用 Pearson 相关性分析 microRNA-744 与 PRKACA 和 FGF2 的关系。结果 烧伤组和愈后组 microRNA-744 表达量分别为(6.901±1.031)、(7.583±1.067),均高于对照组的(4.671±1.012),差异有统计学意义($P<0.05$);烧伤组和愈后组 PRKACA 表达水平及蛋白表达低于对照组,且愈后组低于烧伤组,差异有统计学意义($P<0.05$);烧伤组和愈后组 FGF2 表达水平及蛋白表达高于对照组,且愈后组高于烧伤组,差异有统计学意义($P<0.05$);Pearson 相关性分析显示,microRNA-744 和 PRKACA 呈负相关($r=-0.821, P<0.05$),与 FGF2 呈正相关($r=0.773, P<0.05$)。结论 在皮肤烧伤愈后瘢痕形成中 microRNA-744 可以调控 PRKACA 和 FGF2 的表达,其通过调控 PRKACA 间接促进 FGF2 的表达。

关键词:MicroRNA-744;蛋白激酶 cAMP 激活催化亚基 α ;成纤维细胞生长因子 2;皮肤烧伤

中图分类号:R644

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.16.019

文章编号:1006-1959(2022)16-0083-03

Effect of MicroRNA-744 Regulating PRKACA and FGF2 on Scar Formation After Skin Burn Wound Healing

ZHANG Bo,ZHANG Hao

(Department of Plastic Surgery,the First Affiliated Hospital of Jiamusi University,Jiamusi 154007,Heilongjiang,China)

Abstract: Objective To study the role and correlation of microRNA-744 regulating protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha (PRKACA) and fibroblast growth factor 2 (FGF2) in scar formation after skin burn. **Methods** A total of 30 burn animal models were selected as the research objects and divided into control group, burn group and recovery group, with 10 rats in each group. The expression of microRNA-744, PRKACA and FGF2 levels and protein expression were compared among the groups, and the relationship between microRNA-744 and PRKACA and FGF2 was analyzed by Pearson correlation. **Results** The expression levels of microRNA-744 in the burn group and the healing group were (6.901±1.031) and (7.583±1.067), respectively, which were higher than (4.671±1.012) in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression level and protein expression of PRKACA in the burn group and the healing group were lower than those in the control group, and the healing group was lower than the burn group ($P<0.05$). The expression level and protein expression of FGF2 in the burn group and the healing group were higher than those in the control group, and the healing group was higher than the burn group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that microRNA-744 was negatively correlated with PRKACA ($r=-0.821, P<0.05$) and positively correlated with FGF2 ($r=0.773, P<0.05$). **Conclusion** MicroRNA-744 can regulate the expression of PRKACA and FGF2 in scar formation after skin burn healing, which indirectly promotes the expression of FGF2 by regulating PRKACA.

Key words: MicroRNA-744;Protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha;Fibroblast growth factor 2;Skin burns

烧伤(burn)是导致皮肤损伤的主要原因之一,根据世界卫生组织统计^[1],全世界每年有近 30 万人死于烧伤。在严重烧伤过程中,细胞和血管均受到损伤,分子代谢出现异常调控,进一步导致各种非编码 RNA 和细胞因子等分子调控出现紊乱^[2-5]。有研究表明^[6-8],微小 RNA(microRNA)参与了皮肤烧伤后的分子调控代谢过程,其中 microRNA-744 在皮肤烧伤具有重要调控作用。蛋白激酶 cAMP 激活催化亚基 α (PRKACA)是参与细胞信号转导的重要分子之一^[7,8]。成纤维细胞生长因子(FGF)是组织稳态

和癌症中的关键有丝分裂原,FGF2 在皮肤烧伤愈后的分子机制中也具有重要作用^[9]。本研究主要探讨 microRNA-744 调控 PRKACA 和 FGF2 对皮肤烧伤愈后疤痕形成的影响和分子间的相关性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和动物 30 只健康新西兰大白兔由腾新生物技术有限公司提供(许可证号:SCX2021-0004),体重 2.0~2.5 kg,雌雄各半。清洁级动物室适应性饲养 1 周,在制备烧伤动物模型前 24 h 禁食不禁水,实验方案获佳木斯大学附属第一医院伦理委员会审批通过。microRNA 提取分离试剂盒(北京天根生化科技有限公司);cDNA 第一链合成试剂盒(北京天根生化科技有限公司);qRT-PCR 检测试剂盒(北京天根生化科技有限公司);microRNA 检测引物 U6(北京天根生化科技有限公司);microRNA 检

作者简介:张博(1990.4-),男,黑龙江佳木斯人,硕士,主治医师,主要从事皮肤烧伤研究

通讯作者:张浩(1970.4-),男,黑龙江佳木斯人,本科,主任医师,主要从事皮肤烧伤研究

测引物 miR-744 (天根生化科技有限公司);RNase-Free 双蒸水(北京天根生化科技有限公司)等。

1.2 实验仪器 实时荧光定量 PCR(美国应用生物系统公司)、琼脂糖凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、反转录 PCR (美国应用生物系统公司)、-80 °C超低温冰箱(美国 Thermo Scientific 公司)、蛋白凝胶成像仪(美国 Wealtec 公司)、超净工作台(山东新华医疗器械股份有限公司)、4 °C低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)等。

1.3 方法

1.3.1 烧伤模型和组织样本收集 提前 24 h 由耳缘静脉注射戊巴比妥钠,麻醉后行颈内静脉和颈动脉穿刺置管备用,将兔背部涂抹 10%硫代钠脱毛,烧伤面积为总体表面积的 30%。体表面积公式: $A(m^2) = R \times W^{2/3}$,A 为体表面积(m^2),W 为体重(kg),经计算烧伤面积约为 514 cm^2 。根据烧伤时间和常用烧伤动物模型制作方法进行分组,分别为对照组、烧伤组、愈后组,每组 10 例。组织样本离体后迅速冷冻至液氮中,直至 MicroRNA 提取。

1.3.2 血液样本收集 用不含抗凝剂的试管采集外周静脉血 0.5 ml,室温下 3000 r/min 离心 15 min,去除血细胞,收集上层血清,然后将收集血清在 4 °C,3000 r/min 离心 15 min,进一步除去残留血细胞;小心吸取上层血清至新的离心管,置于-80 °C冰箱中保存备用。

1.3.3 qRT-PCR 检测 MicroRNA-744 表达 首先进行样本 microRNA 提取分离,合成 microRNA cDNA 第一链,再进行琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA(图 1),然后再进行反转录实验,反转录程序包括:①RNA 加尾反应和反转录反应 42 °C,60 min;②酶失活反应 95 °C,3 min。microRNA 荧光定量检测:按实验样本数量计算各试剂总量,分装到反应管中,然后加入引物和 microRNA cDNA,再加入样本的 cDNA,混匀,离心,设置反应程序,进行检测,然后观察结果。样本 microRNA 使用核酸定量仪测定 RNA 浓度和纯度,光密度 A260/A280 均在 1.8~2.0 间表明 RNA 无降解。microRNA 经逆转录生成 cDNA 后,进行琼脂糖凝胶电泳。运用 qRT-PCR 检测各组样本时,如果溶解曲线分析未见杂峰,扩增产物单一,表明没有非特异性扩增。用 U6 为内参,反应结束后计算 Ct 值。根据扩增曲线得到 microRNA-744 和 U6 的 Ct 值,通过公式计算 ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{\text{microRNA-744}} - Ct_{\text{U6}}$),运用 $2^{-\Delta Ct}$ 法对各组样本 microRNA 的表达水平。

1.3.4 ELISA 实验检测 PRKACA 和 FGF2 每孔加入 100 μl 标准品、空白样品或样品;弃掉每个孔的液体,然后不要洗,向每孔加入 100 μl 检测试剂 A 工

作溶液;用微量加样枪吸出每个孔并洗涤,重复 3 次,总共洗涤 3 次;每孔加入 100 μl Detection Reagent B 作溶液,盖上一个新的密封板,在 37 °C 孵育 1 h;重复抽吸/洗涤 5 次;每孔加入 90 μl 底物溶液,盖上新 Plate 密封剂,在 37 °C 下孵育 15~30 min,避光;每孔加入 50 μl 终止液,如果颜色变化不均匀,轻轻敲打板确保充分混合;确定每个孔的光密度到 450 nm,使用酶标仪一次测定;根据酶标仪的标准曲线进行数据分析。

1.3.5 Western Blot 检测组织 PRKACA 和 FGF2 蛋白表达 组织加入裂解液,4 °C裂解 1 h 后,12 000 g,4 °C 离心 30 min,取上清,放于-80 °C冰箱中,每次电泳之前进行蛋白测定,使用蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,然后进行一抗、二抗反应,最后再进行显色反应和凝胶图象分析。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理,计量资料使用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,相关性采用 Pearson 线性相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



图 1 cDNA 琼脂糖凝胶电泳图

2 结果

2.1 各组 microRNA-744 表达比较 烧伤组和愈后组 microRNA-744 表达量分别为 (6.901 ± 1.031)、(7.583 ± 1.067),均高于对照组的(4.671 ± 1.012),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各组 PRKACA 和 FGF2 表达量比较 烧伤组和愈后组 PRKACA 表达水平低于对照组,且愈后组低于烧伤组,差异有统计学意义($P < 0.05$);烧伤组和愈后组 FGF2 表达水平高于对照组,且愈后组高于烧伤组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组 PRKACA 和 FGF2 表达量比较($\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$)

组别	n	PRKACA	FGF2
对照组	10	35.214 ± 1.762	36.071 ± 1.347
烧伤组	10	29.971 ± 2.425	38.679 ± 2.921
愈后组	10	25.088 ± 1.913	41.286 ± 1.498
F		2.3613	1.8976
P		0.0245	0.0239

2.3 各组 PRKACA 和 FGF2 蛋白表达量比较 烧伤组和愈后组 PRKACA 蛋白表达低于对照组,且愈后组低于烧伤组,差异有统计学意义($P<0.05$);烧伤组和愈后组 FGF2 蛋白表达高于对照组,且愈后组高于烧伤组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2、图3、表 2。

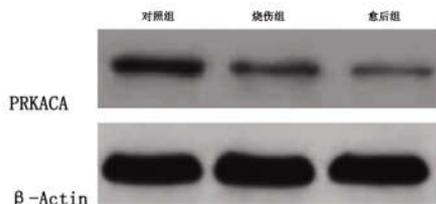


图 2 各组 PRKACA 蛋白表达量比较(表达量范围 0.5~1.3)

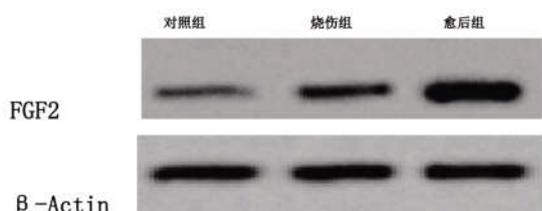


图 3 各组 FGF2 蛋白表达量比较(表达量范围 0.4~1.2)

表 2 各组 PRKACA 和 FGF2 蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PRKACA	FGF2
对照组	10	1.241±0.053	0.563±0.085
烧伤组	10	0.708±0.015	0.982±0.012
愈后组	10	0.475±0.093	1.129±0.076
F		1.0820	2.1250
P		0.0297	0.0278

2.4 MicroRNA -744 和 PRKACA、FGF2 的关系 Pearson 相关性分析显示,microRNA-744 和 PRKACA 呈负相关($r=-0.821, P<0.05$),与 FGF2 呈正相关($r=0.773, P<0.05$)。

3 讨论

MicroRNA 是参与基因转录后调控非常重要的非编码 RNA,且其可间接影响相关蛋白质表达^[10]。目前,已经有很多研究表明^[11],microRNA 与烧伤的分子调控机制密切相关,大多数 microRNA 有抑制相关蛋白质表达的作用,但是 microRNA-744 在皮肤烧伤愈后瘢痕形成中的具体分子机制仍尚未明确。

FGF2 是一种多功能蛋白,在伤口愈合、组织修复和再生中具有重要作用。这种治疗性蛋白质广泛用于烧伤治疗,因为其可刺激细胞增殖和分化、血管生成和细胞外基质重塑^[12]。本研究结果发现,烧伤组和愈后组 microRNA-744 表达量高于对照组 ($P<0.05$);烧伤组和愈后组 PRKACA 表达水平及蛋白表达低于对照组,且愈后组低于烧伤组($P<0.05$);烧伤组和愈后组 FGF2 表达水平及蛋白表达高于对照

组,且愈后组高于烧伤组($P<0.05$);Pearson 相关性分析显示,microRNA-744 和 PRKACA 呈负相关($P<0.05$),与 FGF2 呈正相关($P<0.05$),提示 microRNA-744 表达可以通过抑制 PRKACA 间接促进 FGF2 的表达,且在烧伤及愈后的发生发展中,microRNA-744 的先降低和再升高导致 PRKACA、FGF2 表达量发生改变,因此在烧伤及愈后发生发展中,microRNA-744 可以调控 PRKACA、FGF2 表达,进而可以作为预测烧伤轻重程度及愈后发展的分子指标。

综上所述,microRNA-744 通过影响 PRKACA 和 FGF2 含量变化,从而从分子水平实现影响调控烧伤及愈后发生发展的作用。

参考文献:

- [1]Roshangar L,Soleimani Rad J,Kheirjou R,et al.Skin Burns: Review of Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches [J].Wounds,2019,31(12):308-315.
- [2]梁娜娜,薛喜娟,刘晓慧,等.烧伤患者照顾者生活质量及其影响因素[J].河南医学研究,2021,30(31):5769-5773.
- [3]Barnes LA,Marshall CD,Leavitt T,et al.Mechanical Forces in Cutaneous Wound Healing: Emerging Therapies to Minimize Scar Formation[J].Adv Wound Care (New Rochelle),2018,7(2): 47-56.
- [4]Savoji H,Godau B,Hassani MS,et al.Skin Tissue Substitutes and Biomaterial Risk Assessment and Testing [J].Front Bioeng Biotechnol,2018,6:86.
- [5]Gibson ALF,Carney BC,Cuttle L,et al.Coming to Consensus: What Defines Deep Partial Thickness Burn Injuries in Porcine Models? [J].J Burn Care Res,2021,42(1):98-109.
- [6]Zhang M,Li H,Zhang Y,et al.Oncogenic miR-744 promotes prostate cancer growth through direct targeting of LKB1 [J].Oncol Lett,2019,17(2):2257-2265.
- [7]Kang W,Huang T,Zhou Y,et al.miR-375 is involved in Hippo pathway by targeting YAP1/TEAD4-CTGF axis in gastric carcinogenesis [J].Cell Death Dis,2018,9(2):92.
- [8]Moody SE,Schinz AC,Singh S,et al.PRKACA mediates resistance to HER2-targeted therapy in breast cancer cells and restores anti-apoptotic signaling [J].Oncogene,2015,34(16):2061-2071.
- [9]Jimenez-Pascual A,Mitchell K,Siebzehnruhl FA,et al.FGF2:a novel druggable target for glioblastoma? [J].Expert Opin Ther Targets,2020,24(4):311-318.
- [10]胡雅琼,白俊,陈琳,等.miR-625-5p 通过靶向调控PRKACA 促进肺癌细胞的增殖和侵袭 [J].中国癌症杂志,2021,31(6):447-454.
- [11]Yu W,Chen PB,Chen FC,et al.MicroRNA-744 promotes proliferation of osteosarcoma cells by targeting PTEN [J].Mol Med Rep,2020,21(5):2276-2282.
- [12]Ahn HN,Kang HS,Park SJ,et al.Safety and efficacy of basic fibroblast growth factors for deep second-degree burn patients [J].Burns,2020,46(8):1857-1866.

收稿日期:2021-10-07;修回日期:2022-01-19

编辑/杜帆