编号：

**miR-203 在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达与调控研究**

**Expression and regulation of miR-203 in the human epidermal stem cells and differentiated keratinocytes**

**专业、领域名称：**  外科学

**专** 业 代 码： 100210

**种类（在相应方框内打√）：**

全日制学术类博士□√

全日制专业学位类博士□ 全日制学术类硕士□

全日制专业学位类硕士□ 非全日制专业学位类博士□ 非全日制专业学位类硕士□

同等学力人员申请硕士学位□ 高校教师在职攻读硕士学位□

**一、学位论文独创性声明**

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得南昌大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名（手写）： 签字日期： 年 月 日

**二、学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解南昌大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权南昌大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编本学位论文。同时授权北京万方数据股份有限公司和中国学术期刊（光盘版）电子杂志社将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》和《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》中全文发表，并通过网络向社会公众提供信息服务，同意按“章程”规定享受相关权益。

学位论文作者签名（手写）： 导师签名（手写）：

签字日期： 年 月 日 签字日期： 年 月 日

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 论文题目 |  | | | | |
| 姓 名 |  | 学号 |  | 论文级别 | 博士□ 硕士□ |
| 院/ 系/ 所 |  | | 专业 |  | |
| E\_mail |  | | | | |
| 备注： | | | | | |

□公开 □保密（向校学位办申请获批准为“保密”， 年 月后公开）

I

摘 **要**

表皮干细胞是皮肤组织中的特异性成体干细胞，主要位于表皮基底层和毛囊外根鞘膨凸部，具有极强的增殖、分化潜能及自我更新能力，在维持皮肤及其附属器正常的结构与功能、皮肤的创伤修复等方面发挥着重要作用。因此，表皮干细胞被认为是构建组织工程皮肤的理想种子细胞。充分了解表皮干细胞调控机制是其临床应用的重要前提和理论依据。国内外现有研究主要集中在干细胞壁龛、Wnt信号转导通路、Notch信号转导通路、原癌基因和抑癌基因表达等途径上，且已取得一定进展，但其确切机制还远未澄清。

研究表明，微小RNA(microRNA, miRNA)作为内源性非编码单链RNA，在细胞增殖与分化、细胞凋亡、信号转导、器官发育、免疫调节、脂肪代谢、炎症反应、肿瘤形成、衰老与死亡及疾病的发生发展等许多生物过程中发挥重要作用。近期研究证实，miRNA广泛参与调控皮肤及其附属器的形成和稳态，并与皮肤再生修复密切相关，其中miR-203在皮肤中存在特异性表达。但miRNA特别是miR-203在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化、作用及其调控机制，目前尚不十分清楚。

因此，本课题拟通过miRNA芯片检测技术筛选体外培养的人表皮干细胞与角质形成细胞中miRNA的差异表达谱，并比较观察miR-203与p63在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化，分析其相关性；通过脂质体转染技术将miR-203抑制物导入体外培养的人角质形成细胞中，观察下调miR-203诱导角质形成细胞去分化形成表皮样干细胞的作用及其机制；通过脂质体转染技术将miR-203模拟物导入体外培养的人表皮干细胞中，观察上调miR-203诱导表皮干细胞向汗腺样细胞分化的可能性。旨在进一步明确miR-203在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化、作用及其调控机制，为其在创面修复与皮肤组织工程中的应用提供新思路及理论依据。

# 第一部分 人表皮干细胞与角质形成细胞**miRNA**的差异表达谱分析

**目的**：观察体外培养的人表皮干细胞和角质形成细胞miRNA表达谱的差异，预测其靶基因与增殖分化的关系。

**方法：**（1）取泌尿外科行包皮环切术患者的正常包皮组织，采用酶消化和Ⅳ

I

型胶原快速贴壁方法获得人表皮干细胞、角质形成细胞。倒置显微镜下观察培养细胞的生长状况，免疫细胞化学染色法行β1整合素、CK1、CK10、CK19单抗检测鉴定。（2）Trizol一步法分别提取2组细胞总RNA，甲醛变性胶电泳质检。mirVana™miRNA分离试剂盒对其进行纯化，使用miRNA标记和杂交试剂盒进行荧光标记及芯片杂交，利用Feature Extraction(v10.7)软件对杂交图片进行分析，GeneSpring(GXl0.0)软件进行数据归一化及差异分析，同时应用RT-PCR法验证miRNA芯片结果的可靠性。（3）预测部分差异表达的miRNA的靶基因。

**结果**：（1）快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞群培养3 d能形成明显克隆，免疫细胞化学染色显示β1整合素及CK19呈阳性表达，为表皮干细胞；不能快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞群培养3 d无明显克隆形成，CK1及CK10呈阳性表达，为角质形成细胞。（2）筛选出人表皮干细胞中表达上调的miRNA 31个，表达下调的miRNA 153个。其中显著上调的miRNA有hsa-miR-125b-3p、hsa-miR-197-5p、hsa-miR-376a-3p等；显著下调的miRNA有hsa-miR-203、hsa-miR-29b-3p、hsa-miR-34a-3p等。其中上调的hsa-miR-197-5p和下调的hsa-miR-29b-3p的RT-PCR验证结果与芯片检测结果具有较好的一致性。（3）miRNA靶基因预测提示部分miRNA与细胞增殖分化、凋亡衰老等生物学特性有关。

**结论**：体外培养的人表皮干细胞与角质形成细胞miRNA表达谱存在明显差异，可能与两者不同的增殖分化能力等生物学特性有关。

# **第二部分** **miR-203**与**p63**在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化

**目的**：观察miR-203与p63在体外培养人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化，探讨其在表皮增殖分化中的作用及意义。

**方法**：实时荧光定量RT-PCR 检测体外培养人表皮干细胞和角质形成细胞

miR-203、p63 mRNA表达，蛋白质印迹法检测p63蛋白表达。对数据行*t*检验、

Pearson相关分析。

**结果**：人表皮干细胞miR-203的mRNA相对表达量为0.74±0.20，较角质形成细胞的3.66±0.34明显下调（*t*= 16.582, *P*＜0.001）。表皮干细胞p63的mRNA相对表达量为4.16±0.28 较角质形成细胞的2.90±0.39 明显上调（*t*=5.850，

*P*=0.001）。表皮干细胞p63的蛋白相对表达量为1.42±0.05，较角质形成细胞的

0.73±0.03明显上调（*t*=26.460, *P*＜0.001）。miR-203的mRNA表达量与p63 的

mRNA和蛋白表达量均呈明显负相关（*r*值分别为-0.938、-0.976，*t*值分别为4.687、

II

7.763, *P*值分别为0.019、0.005)。

**结论**：miR-203在体外培养人表皮干细胞中的表达明显低于角质形成细胞，而p63在人表皮干细胞中的表达显著高于角质形成细胞，可能参与表皮干细胞和角质形成细胞的增殖与分化。

# **第三部分** **miR-203**下调促进人角质形成细胞去分化形成表皮样干细胞

**目的**：探讨miR-203下调促进体外培养人角质形成细胞去分化形成表皮样干细胞的可能性及机制，为构建组织工程皮肤促进创面的解剖修复提供新的种子细胞来源。

**方法**：根据人源miR-203序列，设计并合成其单链抑制物。通过脂质体转染将miR-203抑制物导入体外培养人角质形成细胞（实验组），转染对照miRNA抑制物作为对照组。对转染前及转染后72 h的细胞通过免疫细胞化学染色法行

ITGB1、CK19、CK1、CK10单克隆抗体检测鉴定；实时荧光定量RT-PCR检测miR-203、p63、ITGB1、CK19、CK1、CK10 mRNA相对表达量；Western blot法检测p63、ITGB1、CK19、CK1、CK10蛋白相对表达量；并对miR-203 的

mRNA表达与p63的mRNA和蛋白表达分别行Pearson相关分析。

**结果**：实验组转染后72 h的细胞ITGB1、CK19呈阳性表达。miR-203 的

mRNA相对表达量显著低于转染前，p63、CK19、ITGB1的mRNA及蛋白的相对表达量均高于转染前及对照组，而CK1、CK10的mRNA及蛋白的相对表达量均低于转染前和对照组，比较差异均有统计学意义（*P*＜0.05）。上述指标对照组与转染前比较差异均无统计学意义（*P*＞0.05）。转染前后miR-203 的mRNA表达量与p63的mRNA和蛋白相对表达量均成负相关（*P*＜0.05）。

**结论**：miR-203抑制物能诱导人角质形成细胞去分化为表皮样干细胞，靶基因p63表达上调可能是其重要机制之一。

# **第四部分** **miR-203**转染诱导人表皮干细胞向汗腺样细胞分化

**目的**：探讨miR-203转染诱导体外培养人表皮干细胞向汗腺样细胞分化的可能性及机制，为实现创面的功能愈合提供实验依据及新途径。

**方法**：通过脂质体转染将miR-203模拟物导入体外培养人表皮干细胞（实验组），转染对照miRNA模拟物作为对照组。对转染前及转染后72 h的细胞通过免疫细胞化学染色法行ITGB1、CK19、CK1、CK10、CK18、CEA单克隆抗

III

体检测鉴定；实时荧光定量RT-PCR检测miR-203、p63、ITGB1、CK19、CK1、

CK10、CK18、CEA mRNA相对表达量；Western blot法检测p63、ITGB1、CK19、

CK1、CK10、CK18、CEA蛋白相对表达量；并对miR-203的mRNA表达与p63

的mRNA和蛋白表达分别行Pearson相关分析。

**结果**：实验组转染后72 h的细胞CK1、CK10、CK18、CEA呈阳性表达。miR-203 mRNA相对表达量显著高于转染前，CK1、CK10、CK18、CEA mRNA及蛋白的相对表达量均高于转染前及对照组，而p63、CK19、ITGB1 mRNA及蛋白的相对表达量均低于转染前和对照组，比较差异均有统计学意义（*P*＜0.05）。上述指标对照组与转染前比较差异均无统计学意义（*P*＞0.05）。转染前后miR-203的mRNA表达量与p63的mRNA和蛋白相对表达量均成负相关（*P*＜0.05）。

**结论**：miR-203能诱导人表皮干细胞分化为汗腺样细胞，其作用可能是通过靶向抑制p63来实现的。

**全文小结**

（1）体外培养的人表皮干细胞与角质形成细胞miRNA表达谱存在明显差异，可能与两者不同的增殖分化能力等生物学特性有关。

（2）miR-203在体外培养人表皮干细胞中的表达明显低于角质形成细胞，而p63在人表皮干细胞中的表达显著高于角质形成细胞，miR-203与p63基因及蛋白表达呈负相关。p63的mRNA可能是miR-203的靶基因，miR-203可能通过抑制p63参与调控表皮细胞的增殖分化。

（3）miR-203下调能够诱导体外培养的人角质形成细胞去分化为表皮样干细胞，且去分化源性表皮样干细胞与机体自身来源的表皮干细胞形态及生物学特性相似。靶基因p63表达上调可能是其重要机制之一。

（4）miR-203能诱导体外培养的人表皮干细胞分化为汗腺样细胞，其作用可能是通过靶向抑制p63来实现的。

**关键词：**表皮干细胞；角质形成细胞； miR-203； p63；分化；去分化

IV

**Abstract**

As the skin tissue-specific stem cells, epidermal stem cells which locate in the basal layer of epidermis and hair follicle outer root sheath bulge have strong proliferation and differentiation potential and self-renewal capacity. They play an important role in the maintenance of the normal structure, function of skin and its appendages and wound repair. Therefore, epidermal stem cells are considered as the ideal seed cells for constructing tissue engineered skin. Understanding fully the regulation mechanism of epidermal stem cells is an important premise and theoretical basis for their clinical application. Domestic and foreign existing researches mainly concentrate in the stem cell niche, Wnt signaling pathway, Notch signaling pathway, proto oncogene and anti oncogene expression way, which have made progress, but the exact mechanism is far from clear.

Recent studies show that RNA (microRNA, miRNA) as a non encoding RNA plays an important role in cell proliferation, differentiation, cell apoptosis, signal transduction, organ development, immune regulation, fat metabolism, inflammation, tumor formation, aging, death, disease development and many other biological processes. Studies have shown that miRNA widely participates in the formation and homeostasis of skin and its appendages and is closely related to the regeneration and reparation of skin, and miR-203 specifically expresses in skin. However, the expression change, function and regulation mechanism of miRNA, especially miR-203 in human epidermal stem cells and keratinocytes is not very clear.

In this topic, the different expression profile of miRNA between cultured human epidermal stem cells and keratinocytes in vitro was detected by miRNA microarray, and the expression of p63 and miR-203 between human epidermal stem cells and keratinocytes and their relevance was compared too. Then miR-203 inhibitors were transfected into human keratinocytes by liposome transfection technology in vitro and the effect of down- regulated miR-203 on the formation of epidermal like stem cells and its mechanism were observed. On the other hand, miR-203 mimics were transfected into human epidermal stem cells by liposome transfection technology in

V

Vitro and the possibility of miR-203 inducing the epidermal stem cells differentiate into sweat gland like cells was observed, which may clarify the expression and regulation of miRNA, especially miR-203 in human epidermal stem cells and keratinocytes and provide new ideas and theories for the application of miR-203 in wound healing and skin tissue engineering.

**Part I** Different expression profiles of miRNA between human epidermal stem cells and epidermal keratinocytes

**Objective:** To investigate the difference in expression profiles of miRNA between human epidermal stem cells and keratinocytes in vitro, and to predict the relationship between the target gene and the proliferation and differentiation.

**Methods:** (1) The normal foreskin tissues of patients with circumcision were taken from the Department of Urology to obtain the epidermal stem cells and keratinocytes with enzyme digestion method and type IV collagen coated chosen method. Growth of cells cultured in vitro was observed by inverted microscope. Monoclonal antibody of integrinlβ1, CKl, CKl0 and CKl9 were detected by immunocytochemical staining. (2) Total RNA was respectively isolated from epidermal stem cells and epidermal keratinocytes by Trizol-based single-step procedure, detected by formaldehyde denaturing gel electrophoresis, purified by mir VanaTM miRNA isolation kit, and then labeled and hybridized by miRNA labeling and hybridization kit. Images of hybridization were analyzed using the Feature Extraction(Version 10.7). Data normalization and difference analysis were performed with Gene Spring(GX 10.0). Moreover, miRNA microarray results were confirmed by RT-PCR. (3) Target genes of differently expressed miRNA were predicted.

**Results:** (1) Epidermal stem cells exhibited rapid adherence to type IV collagen and formed distinct clones after 3 days of culture; expressions of integrinlβ1 and CK19 were positive. Keratinocytes could not adhere rapidly to type1V collagen and formed few clones after 3days of culture; expressions of CKl and CKl0 were positive. (2) Of the epidermal stem cells, 31 miRNAs were up-regulated and 153 down-regulated. Besides, significantly up-regulated miRNAs were hsa-miR-125b-3p, hsa-miR-197-5p, and hsa-miR-376a-3p, while significantly down-regulated miRNAs

VI

Were hsa-miR-203, hsa-miR-29b-3p and hsa-miR-34a-3p. Findings of RT-PCR on hsa-miR-197-5p and hsa-miR-29b-3p revealed high concordance with the microarray results. (3) Some miRNAs target genes indicated that miRNA related to cell proliferation, differentiation, apoptosis, aging and other biological characteristics.

**Conclusion:** Distinct differences in miRNA expression profiles are detected between human epidermal stem cells and keratinocytes in vitro and these may correlate closely with their different biological characteristics such as proliferation and differentiation ability.

**Part II** Expression of miR-203 and p63 in human epidermal stem cells and keratinocytes

**Objective:** To observe the expression changes of miR-203 and p63 in epidermal stem cells and keratinocytes, and to investigate their effect and significance in the epidermal proliferation and differentiation.

**Methods:** The expression of miR-203 and mRNA of p63 was detected by real-time fluorescence quantitative RT-PCR. The protein expression of p63 was detected by Western blotting. Data was processed with *t* test and Pearson correlation analysis.

**Results:** The expression level of miR-203 in epidermal stem cells (0.74±0.20) was lower than that in keratinocytes (3.66±0.34, *t*=16.582, *P*<0.001). The mRNA expression level of p63 in epidermal stem cells(4.16±0.28) was higher than that in

Keratinocytes (2.90±0.39, *t*=5.850, *P*=0.001). The protein expression level of p63 in

Epidermal stem cells(1.42±0.05) was higher than that in keratinocytes(0.73±0.03, *t*=26.460, *P*<0.001). The expression level of miR-203 was in significant negative correlation with the expression level of mRNA and protein of p63

(With *r* values respectively -0.938, -0.976; *t* values respectively 4.687, 7.763; *P* values

Respectively 0.019, 0.005).

**Conclusion:** The expression level of miR-203 in cultured human epidermal stem cells was significantly lower than that in keratinocytes, and the expression level of p63 in human epidermal stem cells was significantly higher than that in keratinocytes, which may involve in the proliferation and differentiation of epidermal stem cells and

VII

keratinocytes.

**Part III** Down-regulated miR-203 promoting human keratinocytes to dedifferentiate into epidermal like stem cells

**Objective:** To investigate the possibility and mechanism of down-regulated miR-203 promoting human keratinocytes cultured in vitro to dedifferentiate into epidermal like stem cells, and to provide a new seed cell source for the construction of tissue engineered skin to promote wound healing.

**Methods:** Single chain inhibitors of miR-203 were designed and synthesized according to human miR-203 sequence. Then they were transfected into the cultured human keratinocytes with Lipofectamine 2000(Experimental group) and the human keratinocytes transfected with nonsense miRNA inhibitors served as control group. The monoclonal antibodies of ITGB1, CK19, CK1, CK10 were used for identifying the cells before transfected and at 72 hours after transfected by immunocytochemical staining; the mRNA relative expressions of miR-203, p63, ITGB1, CK19, CK1 and CK10 were detected by real-time fluorescence quantitative RT-PCR before transfected and at 72 hours after transfected. The protein relative expressions of p63, ITGB1, CK19, CK1 and CK10 were detected by Western blot. The mRNA expression of miR-203 and the mRNA and protein expressions of p63 were analyzed respectively with Pearson correlation.

**Results:** The CK19 and ITGB1 were positively expressed after transfection with miR-203 inhibitors for 72 hours. The mRNA relative expression of miR-203 after transfection was significantly lower than that before transfection(*P*<0.05). The mRNA and protein relative expressions of p63, CK19, ITGB1 after transfection in experimental group was significantly higher than those before transfection and control group (*P*<0.05), while the mRNA and protein relative expressions of CK1, CK10 was significantly lower than those before transfection and control group (*P*<0.05). These indicators showed no significant difference between the control group and before transfection(*P*>0.05). The expression level of miR-203 was

Negatively correlated with the mRNA and protein relative expressions of p63 before and after transfection（*P*＜0.05）.

VIII

**Conclusion:** miR-203 inhibitors can induce the human keratinocytes to dedifferentiate into epidermal like stem cells while the up-regulated expression of target gene p63 may be one of the important mechanisms.

**Part IV** miR-203 inducing differentiation of human epidermal stem cells into sweat gland like cells in vitro

**Objective:** To investigate the possibility and mechanism of miR-203 inducing the human epidermal stem cells cultured in vitro to differentiate into sweat gland like cells, and to provide an experimental basis and new way for the functional healing of wound.

**Methods:** Double stranded mimics of miR-203 were transfected into the cultured human epidermal stem cells with Lipofectamine 2000(Experimental group) and the human epidermal stem cells transfected with nonsense miRNA mimics served as control group. The monoclonal antibodies of ITGB1, CK19, CK1, CK10, CK18 and CEA were used for identifying the cells before transfected and at 72 hours after transfected by Immunocytochemical staining; the mRNA relative expressions of miR-203, p63, ITGB1, CK19, CK1, CK10, CK18 and CEA were detected by real-time fluorescence quantitative RT-PCR before transfected and at 72 hours after transfected. The protein relative expressions of p63, ITGB1, CK19, CK1, CK10, CK18 and CEA were detected by Western blot. The mRNA expression of miR-203 and the mRNA and protein expressions of p63 were analyzed respectively with Pearson correlation.

**Results:** The CK1, CK10, CK18, and CEA were expressed positively after transfection with miR-203 mimics for 72 hours. The mRNA relative expression of miR-203 after transfection in experimental group was significantly higher than that

Before transfection (*P*＜0.05). The mRNA and protein relative expressions of CK1,

CK10, CK18 and CEA after transfection in experimental group was significantly higher than those before transfection and control group (*P*＜0.05), while the mRNA and protein relative expressions of p63, CK19, and ITGB1 was significantly lower than those before transfection and control group (*P*＜0.05). These indicators showed no significant difference between the control group and before transfection (*P*> 0.05).

IX

The expression level of miR-203 was negatively correlated with the mRNA and protein relative expressions of p63 before and after transfection（*P*＜0.05）.

**Conclusion:** miR-203 can induce epidermal stem cells to differentiate into sweat gland cells by targeting inhibition of p63 probably.

**Keyword:** epidermal stem cells; Keratinocytes; MiR-203; P63; Differentiation; Dedifferentiation

X

[5.2.3人表皮干细胞转染后细胞形态 96](#_bookmark89)

[5.2.4人表皮干细胞转染后免疫细胞化学染色鉴定 97](#_bookmark90)

[5.2.5转染前后miR-203、p63、ITGB1、CK19、CK1、CK10、CK18、](#_bookmark91)

[CEA的mRNA表达 97](#_bookmark91)

[5.2.6转染前后p63、CK1、CK10、CK18、CEA、CK19、ITGB1的蛋白表达 98](#_bookmark92)

[5.2.7 miR-203和p63表达的相关性分析 99](#_bookmark93)

目 录

[摘](#_Toc686121183)[要](#_Toc686121183) 2

[第一部分 人表皮干细胞与角质形成细胞](#_Toc686121184)**[miRNA](#_Toc686121184)**[的差异表达谱分析](#_Toc686121184) 2

[第二部分](#_Toc686121185) **[miR-203](#_Toc686121185)**[与](#_Toc686121185)**[p63](#_Toc686121185)**[在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化](#_Toc686121185) 3

[第三部分](#_Toc686121186) **[miR-203](#_Toc686121186)**[下调促进人角质形成细胞去分化形成表皮样干细胞](#_Toc686121186) 3

[第四部分](#_Toc686121187) **[miR-203](#_Toc686121187)**[转染诱导人表皮干细胞向汗腺样细胞分化](#_Toc686121187) 3

**[Abstract](#_Toc686121188)** 4

**[第 1](#_Toc686121189)** [章引言](#_Toc686121189) 13

[第](#_Toc686121190)**[2](#_Toc686121190)** [章人表皮干细胞与角质形成细胞](#_Toc686121190)**[miRNA](#_Toc686121190)**[的差异表达谱分析](#_Toc686121190) 14

**[2.1](#_Toc686121191)** [材料与方法](#_Toc686121191) 14

**[2.1.1](#_Toc686121192)** [研究对象](#_Toc686121192) 14

**[2.1.2](#_Toc686121193)** [主要试剂](#_Toc686121193) 14

**[2.1.3](#_Toc686121194)** [主要仪器设备与耗材](#_Toc686121194) 15

**[2.1.4](#_Toc686121195)** [人表皮干细胞与角质形成细胞的分离培养](#_Toc686121195) 17

**[2.1.5](#_Toc686121196)** [人表皮干细胞及角质形成细胞的鉴定](#_Toc686121196) 17

**[2.1.6](#_Toc686121197)** [细胞总](#_Toc686121197)**[RNA](#_Toc686121197)**[的提取](#_Toc686121197) 18

**[2.1.7](#_Toc686121198)** [总](#_Toc686121198)**[RNA](#_Toc686121198)**[质量检测](#_Toc686121198) 18

**[2.1.8](#_Toc686121199)** [总](#_Toc686121199)**[RNA](#_Toc686121199)**[的纯化](#_Toc686121199) 19

**[2.1.9](#_Toc686121200)** [总](#_Toc686121200)**[RNA](#_Toc686121200)**[的荧光标记与](#_Toc686121200)**[miRNA](#_Toc686121200)**[芯片杂交](#_Toc686121200) 19

**[2.1.10](#_Toc686121201)** [杂交芯片的清洗及扫描](#_Toc686121201) 19

**[2.1.11](#_Toc686121202)** [筛选条件](#_Toc686121202) 19

**[2.1.12](#_Toc686121203)** [实时定量](#_Toc686121203)**[RT-PCR](#_Toc686121203)**[验证](#_Toc686121203) 19

**[2.1.13](#_Toc686121204)****[miRNA](#_Toc686121204)**[靶基因预测及功能富集分析](#_Toc686121204) 21

**[2.2](#_Toc686121205)** [结果](#_Toc686121205) 21

**[2.2.1](#_Toc686121206)** [人表皮干细胞与角质形成细胞镜下观察结果](#_Toc686121206) 21

**[2.2.2](#_Toc686121207)** [人表皮干细胞与角质形成细胞的鉴定结果](#_Toc686121207) 21

**[2.2.3](#_Toc686121208)** [总](#_Toc686121208)**[RNA](#_Toc686121208)**[质检结果](#_Toc686121208) 22

**[2.2.4](#_Toc686121209)** [芯片扫描结果](#_Toc686121209) 22

**[2.2.5](#_Toc686121210)** [散点图结果](#_Toc686121210) 22

**[2.2.6](#_Toc686121211)** [芯片检测结果](#_Toc686121211) 23

**[2.2.7](#_Toc686121212)** [实时定量](#_Toc686121212)**[RT-PCR](#_Toc686121212)**[验证结果](#_Toc686121212) 42

**[2.2.8](#_Toc686121213)****[miRNA](#_Toc686121213)**[功能富集分析结果](#_Toc686121213) 46

**[2.3](#_Toc686121214)** [讨论](#_Toc686121214) 51

**[2.4](#_Toc686121215)** [小结](#_Toc686121215) 51

**[第 3](#_Toc686121216)** [章](#_Toc686121216)**[miR-203](#_Toc686121216)**[与](#_Toc686121216)**[p63](#_Toc686121216)**[在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化](#_Toc686121216) 52

**[3.1](#_Toc686121217)** [材料与方法](#_Toc686121217) 52

**[3.1.1](#_Toc686121218)** [研究对象](#_Toc686121218) 52

**[3.1.2](#_Toc686121219)** [主要试剂](#_Toc686121219) 52

**[3.1.3](#_Toc686121220)** [主要仪器设备与耗材](#_Toc686121220) 54

**[3.1.4](#_Toc686121221)** [人表皮干细胞与角质形成细胞的分离培养](#_Toc686121221) 56

**[3.1.5](#_Toc686121222)** [人表皮干细胞及角质形成细胞的鉴定](#_Toc686121222) 56

**[3.1.6](#_Toc686121223)** [细胞总](#_Toc686121223)**[RNA](#_Toc686121223)**[的提取](#_Toc686121223) 56

**[3.1.7](#_Toc686121224)** [总](#_Toc686121224)**[RNA](#_Toc686121224)**[质量检测](#_Toc686121224) 56

**[3.1.8](#_Toc686121225)** [总](#_Toc686121225)**[RNA](#_Toc686121225)**[的纯化](#_Toc686121225) 56

**[3.1.9](#_Toc686121226)****[RT-PCR](#_Toc686121226)**[检测](#_Toc686121226)**[miR-203](#_Toc686121226)** 56

**[3.1.10](#_Toc686121227)****[RT-PCR](#_Toc686121227)**[检测](#_Toc686121227)**[p63](#_Toc686121227)** 57

**[3.1.11](#_Toc686121228)****[Western-blot](#_Toc686121228)**[检测](#_Toc686121228)**[p63](#_Toc686121228)**[蛋白](#_Toc686121228) 59

**[3.1.12](#_Toc686121229)** [统计学方法](#_Toc686121229) 62

**[3.2](#_Toc686121230)** [结果](#_Toc686121230) 62

**[3.2.1](#_Toc686121231)** [人表皮干细胞与角质形成细胞镜下观察结果](#_Toc686121231) 62

[3.1 B)；人角质形成细胞，细胞分离即刻，细胞分布不均匀，细胞大小不一，形状不规则，折光性不强(图3.1C)；培养3d，细胞贴壁不牢固且无克隆形成(图](#_Toc686121232) 62

[3.1 D)。](#_Toc686121233) 62

**[3.2.2](#_Toc686121234)** [人表皮干细胞与角质形成细胞的鉴定结果](#_Toc686121234) 63

**[3.2.3](#_Toc686121235)****[RNA](#_Toc686121235)**[质量检测结果](#_Toc686121235) 63

**[3.2.4](#_Toc686121236)****[miR-203 PCR](#_Toc686121236)**[基因扩增结果](#_Toc686121236) 63

**[3.2.5](#_Toc686121237)****[p63 PCR](#_Toc686121237)**[基因扩增结果](#_Toc686121237) 63

**[3.2.6](#_Toc686121238)** [蛋白印迹法检测](#_Toc686121238)**[p63](#_Toc686121238)**[的蛋白表达结果](#_Toc686121238) 63

**[3.2.7](#_Toc686121239)****[miR-203](#_Toc686121239)**[和](#_Toc686121239)**[p63mRNA](#_Toc686121239)**[和蛋白表达的关系](#_Toc686121239) 64

**[3.3](#_Toc686121240)** [讨论](#_Toc686121240) 64

**[3.4](#_Toc686121241)** [小结](#_Toc686121241) 65

**[第 4](#_Toc686121242)** [章](#_Toc686121242)**[miR-203](#_Toc686121242)**[下调促进人角质形成细胞去分化形成表皮样干细胞](#_Toc686121242) 65

**[4.1](#_Toc686121243)** [材料与方法](#_Toc686121243) 65

**[4.1.1](#_Toc686121244)** [研究对象](#_Toc686121244) 65

**[4.1.2](#_Toc686121245)** [主要试剂](#_Toc686121245) 65

**[4.1.3](#_Toc686121246)** [主要仪器设备与耗材](#_Toc686121246) 68

**[4.1.4](#_Toc686121247)** [人角质形成细胞的分离培养](#_Toc686121247) 69

**[4.1.5](#_Toc686121248)** [人角质形成细胞的鉴定](#_Toc686121248) 70

**[4.1.6](#_Toc686121249)** [人](#_Toc686121249)**[miR-203](#_Toc686121249)**[抑制物对人角质形成细胞的瞬时转染](#_Toc686121249) 70

**[4.1.7](#_Toc686121250)** [转染后免疫细胞化学染色鉴定](#_Toc686121250) 70

**[4.1.8](#_Toc686121251)****[RT-PCR](#_Toc686121251)**[检测](#_Toc686121251) 71

[3.2 ，ITGB1、CK19 、CK1、CK10引物序列见表4.1。反转录产物采用SYBR Ｇ](#_Toc686121252) 73

[7.5 约16ml](#_Toc686121253) 74

[4.1.10 统计学方法](#_Toc686121254) 77

**[4.2](#_Toc686121255)** [结果](#_Toc686121255) 77

**[4.2.1](#_Toc686121256)** [人角质形成细胞转染前形态学观察及鉴定](#_Toc686121256) 77

[5.2 A～2D)。](#_Toc686121257) 77

**[4.2.2](#_Toc686121258)** [转染及转染效率](#_Toc686121258) 77

**[4.2.3](#_Toc686121259)** [人角质形成细胞转染后细胞形态](#_Toc686121259) 77

**[4.2.4](#_Toc686121260)** [人角质形成细胞转染后免疫细胞化学染色鉴定](#_Toc686121260) 78

**[4.2.5](#_Toc686121261)** [转染前后](#_Toc686121261)**[miR-203](#_Toc686121261)**[、](#_Toc686121261)**[p63](#_Toc686121261)**[、](#_Toc686121261)**[ITGB1](#_Toc686121261)**[、](#_Toc686121261)**[CK19](#_Toc686121261)**[、](#_Toc686121261)**[CK1](#_Toc686121261)**[、](#_Toc686121261)**[CK10](#_Toc686121261)**[的](#_Toc686121261)**[mRNA](#_Toc686121261)** 78

**[4.2.6](#_Toc686121262)** [转染前后](#_Toc686121262)**[p63](#_Toc686121262)**[、](#_Toc686121262)**[ITGB1](#_Toc686121262)**[、](#_Toc686121262)**[CK19](#_Toc686121262)**[、](#_Toc686121262)**[CK1](#_Toc686121262)**[、](#_Toc686121262)**[CK10](#_Toc686121262)**[的蛋白表达](#_Toc686121262) 79

**[4.2.7](#_Toc686121263)****[miR-203](#_Toc686121263)**[和](#_Toc686121263)**[p63](#_Toc686121263)**[表达的相关性分析](#_Toc686121263) 81

**[4.3](#_Toc686121264)** [讨论](#_Toc686121264) 81

**[4.4](#_Toc686121265)** [小结](#_Toc686121265) 82

**[第 5](#_Toc686121266)** [章](#_Toc686121266)**[miR-203](#_Toc686121266)**[转染诱导人表皮干细胞向汗腺样细胞分化](#_Toc686121266) 82

**[5.1](#_Toc686121267)** [材料与方法](#_Toc686121267) 83

**[5.1.1](#_Toc686121268)** [研究对象](#_Toc686121268) 83

**[5.1.2](#_Toc686121269)** [主要试剂](#_Toc686121269) 83

**[5.1.3](#_Toc686121270)** [主要仪器设备与耗材](#_Toc686121270) 85

**[5.1.4](#_Toc686121271)** [人表皮干细胞的分离培养](#_Toc686121271) 87

**[5.1.5](#_Toc686121272)** [人表皮干细胞的鉴定](#_Toc686121272) 87

**[5.1.6](#_Toc686121273)** [人](#_Toc686121273)**[miR-203](#_Toc686121273)**[模拟物对人表皮干细胞的瞬时转染](#_Toc686121273) 88

**[5.1.7](#_Toc686121274)** [转染后免疫细胞化学染色鉴定](#_Toc686121274) 88

**[5.1.8](#_Toc686121275)****[RT-PCR](#_Toc686121275)**[检测](#_Toc686121275)**[miR-203](#_Toc686121275)** 88

**[5.1.9](#_Toc686121276)****[RT-PCR](#_Toc686121276)**[检测](#_Toc686121276)**[p63](#_Toc686121276)**[、](#_Toc686121276)**[ITGB1](#_Toc686121276)**[、](#_Toc686121276)**[CK19](#_Toc686121276)**[、](#_Toc686121276)**[CK1](#_Toc686121276)**[、](#_Toc686121276)**[CK10](#_Toc686121276)**[、](#_Toc686121276)**[CK18](#_Toc686121276)**[、](#_Toc686121276)**[CEA](#_Toc686121276)** 90

**[5.1.10](#_Toc686121277)****[Western blot](#_Toc686121277)**[检测](#_Toc686121277) 91

[7.5 约16ml](#_Toc686121278) 92

**[5.1.11](#_Toc686121279)** [统计学方法](#_Toc686121279) 94

**[5.2](#_Toc686121280)** [结果](#_Toc686121280) 94

**[5.2.1](#_Toc686121281)** [人表皮干细胞转染前形态学观察及鉴定](#_Toc686121281) 94

**[5.2.2](#_Toc686121282)** [转染及转染效率](#_Toc686121282) 94

**[5.2.3](#_Toc686121283)** [人表皮干细胞转染后细胞形态](#_Toc686121283) 95

**[5.2.4](#_Toc686121284)** [人表皮干细胞转染后免疫细胞化学染色鉴定](#_Toc686121284) 95

**[5.2.5](#_Toc686121285)** [转染前后](#_Toc686121285)**[miR-203](#_Toc686121285)**[、](#_Toc686121285)**[p63](#_Toc686121285)**[、](#_Toc686121285)**[ITGB1](#_Toc686121285)**[、](#_Toc686121285)**[CK19](#_Toc686121285)**[、](#_Toc686121285)**[CK1](#_Toc686121285)**[、](#_Toc686121285)**[CK10](#_Toc686121285)**[、](#_Toc686121285)**[CK18](#_Toc686121285)**[、](#_Toc686121285) 95

**[5.2.6](#_Toc686121286)** [转染前后](#_Toc686121286)**[p63](#_Toc686121286)**[、](#_Toc686121286)**[CK1](#_Toc686121286)**[、](#_Toc686121286)**[CK10](#_Toc686121286)**[、](#_Toc686121286)**[CK18](#_Toc686121286)**[、](#_Toc686121286)**[CEA](#_Toc686121286)**[、](#_Toc686121286)**[CK19](#_Toc686121286)**[、](#_Toc686121286)**[ITGB1](#_Toc686121286)**[的蛋白表达](#_Toc686121286) 97

**[5.2.7](#_Toc686121287)****[miR-203](#_Toc686121287)**[和](#_Toc686121287)**[p63](#_Toc686121287)**[表达的相关性分析](#_Toc686121287) 100

**[5.3](#_Toc686121288)** [讨论](#_Toc686121288) 100

**[5.4](#_Toc686121289)** [小结](#_Toc686121289) 100

[全文小结](#_Toc686121290) 101

[参考文献](#_Toc686121291) 102

表格目录

表2.1 实时定量RT-PCR引物序列 19

表2.2 总RNA质检结果 22

表2.3 差异表达＞2倍的上调miRNA列表 23

表2.4 差异表达＞2倍的下调miRNA列表 25

表2.5 PCR基因扩增结果 42

表2.6 差异表达明显的miRNAs 功能富集分析结果 46

表2.7 差异表达明显的miRNAs及其与细胞增殖分化相关的KEGG信号通路 49

表3.1 实时荧光定量RT-PCR引物序列及产物大小 56

表3.2 实时荧光定量RT-PCR引物序列及产物大小 57

表4.1 实时荧光定量RT-PCR引物序列及产物大小 73

表4.2 实时荧光定量RT-PCR 检测各组p63、CK19、ITGB1表达（n=5） 78

表4.3 实时荧光定量RT-PCR 检测各组miR-203、CK1、CK10表达（n=5） 79

表4.4 Western blot 检测各组p63、CK19、ITGB1、CK1、CK10蛋白表达 79

表5.1 实时荧光定量RT-PCR引物序列及产物大小 90

表5.2 实时荧光定量RT-PCR 检测各组miR-203、CK1、CK10、CK18、CEA表达（n=5） 95

表5.3 实时荧光定量RT-PCR 检测各组p63、CK19、ITGB1表达（n=5） 96

表5.4 Western blot 检测各组CK1、CK10、CK18、CEA蛋白表达 97

表5.5 Western blot 检测各组p63、CK19、ITGB1蛋白表达 98

[攻读学位期间的研究成果111](#_bookmark99)

[综述112](#_bookmark100)

XIV

**中英文缩略词表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
| ESC | Epidermal stem cell | 表皮干细胞 |
| KC | Keratinocyte | 角质形成细胞 |
| ITGB1 | Integrin β1 | β1 整合素 |
| K-SFM | Keratinocyte-serum free medium | 角质细胞无血清培养基 |
| CK | keratin | 角蛋白 |
| CEA | Carcinoembryonic antigen | 癌胚抗原 |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid | 乙二胺四乙酸 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 焦炭酸二乙酯 |
| SHIP2 | SH2-containing phosphoinositide  5'-phosphatase-2 | 含 SH2 结构域的 II 型 5’肌醇  磷酸酶 2 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | 磷酸盐缓冲液 |
| DAB | Diaminobenzidine | 二氨基联苯胺 |
| EGF | Epidermal growth factor | 表皮生长因子 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| RNA | Ribonucleic Acid | 核糖核酸 |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid | 脱氧核糖核酸 |
| cDNA | Complementary DNA | 互补 DNA |
| miRNA | MicroRNA | 微小 RNA |
| mRNA | Messenger RNA | 信使 RNA |
| miR-203 | microRNA-203 | 微小 RNA-203 |
| UTR | Untranslation region | 非翻译区 |
| 3'-UTR | 3'-untranslated region | 3'端非翻译区 |
| HIF-1 | Hypoxia-inducible factor-1 | 缺氧诱导因子-1 |
| TIMP3 | Tissue inhibitor of metalloproteinase  3 | 组织金属蛋白酶抑制因子 3 |
| TIAM1 | Tlymphoma invasion and metastasis | T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 |

XV

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Inducing factor 1 | 1 |
| TGF | Transforming growth factor | 转化生长因子 |
| SOCS | Suppressor Of Cytokine Signaling | 细胞因子信号转导抑制因子 |
| CDK | Cyclin-dependent protein kinases | 细胞周期蛋白依赖性激酶 |
| CDC | Cell division cyclin | 细胞分裂周期蛋白 |
| CCND1 | CyclinDl | 细胞周期蛋白 D1 |
| OD | Optical density | 光密度 |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | 聚合酶链式反应 |
| RT-PCR | Real-time fluorescent quantitative  PCR | 实时荧光定量 PCR |
| rpm | Rotate per minute | 转/分 |

XVI

# **第 1** 章引言

皮肤是人体最大的器官，具有保护机体、感[受刺激](http://www.wiki8.com/ciji_104431/)、调节[体温](http://www.wiki8.com/tiwen_48362/)、分泌和[排泄](http://www.wiki8.com/paixie_48392/)、渗透和[吸收](http://www.wiki8.com/xishou_40743/)、维持内环境稳定、参与[代谢](http://www.wiki8.com/daixie_104205/)和[免疫活动](http://www.wiki8.com/mianyi_106949/)等多种生理[功能](http://www.wiki8.com/gongneng_119143/)。严重烧伤、创伤或肿瘤手术后等原因往往造成机体皮肤广泛缺损，尽早封闭创面并尽可能地恢复皮肤正常结构及功能以实现创面的解剖修复及功能修复是亟待解决的难题。临床上常采用皮肤移植术修复治疗，但由于自体移植皮源有限，且必须以牺牲人体正常组织为代价，而异体、异种移植又存在免疫排斥反应等风险，使临床应用面临困难。特别是大面积深度烧伤患者，如不能及时封闭裸露的创面，常常出现严重烧伤休克、感染、多器官功能衰竭等并发症，甚至死亡[1]。组织工程学的迅速发展为临床解决这一难题提供了新方法。有学者利用人自体皮肤标本分离获得表皮细胞，行体外培养扩增后移植于创面，开创了以组织工程技术治疗皮肤缺损的新途径[2]，但随后的研究发现表皮细胞体外培养时增殖分裂能力非常弱，且易于衰老，难以在较短的时间内形成足够的皮源来覆盖创面[3]。因此种子细胞的来源不足成为制约组织工程技术临床用于皮肤缺损治疗的瓶颈。另一方面人工皮肤缺乏汗腺等附件，常因无法分泌汗液而对患者的生活与工作造成严重不便。如何重建汗腺等附属器来实现皮肤的功能修复，亦是目前烧伤创面修复与组织再生研究的难点[4]。

研究表明，表皮干细胞是皮肤及其附件发生、修复和改建的重要来源[5-7]。表皮干细胞是皮肤组织中的特异性成体干细胞，主要位于表皮基底层和毛囊外根鞘膨凸部，约占基底层细胞的1%～10%，具有极强的增殖、分化潜能及自我更新能力。表皮干细胞最显著的两个特征为：（1）慢周期性，在体内表现为标记滞留细胞；（2）自我更新能力，表现为细胞在离体培养时呈克隆性生长；利用干细胞的这两个特征和一些相对特异的标志来鉴定在体与离体干细胞是最基本且可靠的实验手段[8]。此外，表皮干细胞还有一个显著特点是对基底膜的黏附，通过表达整合素实现对基底膜各种成分的黏附。目前常利用这一特点对表皮干细胞进行分离和纯化[9]。表皮干细胞并不直接分化形成终末分化细胞，而是先分化形成短暂扩充细胞（TAC），TAC再向上迁移历经棘层、颗粒层后，最终进入角质层形成角质形成细胞。表皮干细胞自我更新和分化的方式通常有两种：（1）不对称方式分裂，即一个表皮干细胞分裂成一个干细胞和一个TAC；（2）高度

1

调控机制方式分裂，即表皮干细胞按一定的概率分裂为两个表皮干细胞或两个

TAC。胚胎学理论认为，汗腺与表皮干细胞的发育有共同的来源，均由外胚层上皮分化形成。外胚层上皮细胞经过分裂增殖、内陷在表皮嵴形成上皮细胞索，上皮细胞索的末端向深部组织内生长而不发生分支，并出现空隙，逐渐发育为汗腺分泌部，上皮细胞索的近端发育为汗腺导管[10]。这样为离体和在体诱导表皮干细胞再生汗腺提供了理论依据。因此表皮干细胞被认为是构建组织工程皮肤的理想种子细胞。充分了解表皮干细胞调控机制是其临床应用的重要前提和理论依据。国内外现有研究主要集中在干细胞壁盒、Wnt信号转导通路、Notch信号转导通路、原癌基因和抑癌基因表达等途径上，且已取得一定进展[11-14]，但其确切机制还远未澄清。

研究表明，miRNA作为内源性非编码单链RNA，几乎参与所有的生物学过程：细胞增殖与分化、细胞凋亡、信号转导、器官发育、免疫调节、脂肪代谢、炎症反应、肿瘤形成、衰老与死亡及疾病的发生发展等[15-20]，对生物正常发育和疾病的发生发挥重要作用。近期研究证实，miRNA广泛参与调控皮肤及其附属器的形成和稳态，并与皮肤再生修复密切相关[21, 22]，其中miR-203被证实与皮肤的关系尤为密切[23]。miR-203由22个核苷酸组成，通过和靶基因mRNA[碱基](http://baike.baidu.com/view/24576.htm)配对引导沉默复合体（[RISC](http://www.wiki8.com/RISC_108215/)）降解mRNA或阻碍其[翻译](http://www.wiki8.com/fanyi_42775/)，继而在转录后水平抑制蛋白质的合成，达到负性调控基因表达的目的。人miR-203基因定位于14号染色体长臂32.33区(14q32.33) [24]。研究发现miR-203在皮肤中的表达水平最高，高于其它器官100余倍，被称为是“皮肤特异性的miRNA”[25]。若抑制miR-203的合成，可导致小鼠表皮基底层细胞过度增殖、表皮形态紊乱、毛囊发育不良及皮肤屏障功能缺陷[26,27]。有学者以人和小鼠胚胎为在体研究对象发现miR-203在单层表皮细胞中几乎没有表达，而当表皮开始分层时表达水平逐渐增高，直到形成复层表皮其表达水平达到高峰并持续保持至出生后[28,29]。Yi R等对出生后的小鼠皮肤组织进行miR-203原位杂交实验时发现miR-203在表皮基底上层高表达，而在表皮基底层无表达[28]。Nissan X等在体外诱导人胚胎干细胞向角朊细胞早期定向分化实验中发现，miR-203于胚胎干细胞分化早期开始逐渐高表达，并参与了随后的分化[30]。这些研究都表明miR-203对表皮细胞的增殖分化、皮肤发育及功能维持具有重要作用。但miRNA特别是miR-203在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化、作用及其调控机制，目前尚不十分清楚。

2

因此，本课题拟通过miRNA芯片检测技术筛选体外培养人表皮干细胞与角质形成细胞中miRNA的差异表达谱，并比较观察miR-203与p63在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化，分析其相关性；通过脂质体转染技术将miR-203抑制物导入体外培养的人角质形成细胞中，观察下调miR-203诱导角质形成细胞去分化形成表皮样干细胞的作用及其机制；通过脂质体转染技术将miR-203模拟物导入体外培养的人表皮干细胞，观察上调miR-203诱导表皮干细胞向汗腺样细胞分化的可能性。旨在进一步明确miRNA特别是miR-203在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化、作用及其调控机制，为miR-203在创面修复与皮肤组织工程中的应用提供新思路及理论依据。

3

## 第**2** 章人表皮干细胞与角质形成细胞**miRNA**的差异表达谱分析

皮肤是人体的最大器官，作为机体与外界的机械屏障，具有重要的生理功能。位于皮肤外层的表皮为复层上皮，其最外层为已分化的角质形成细胞，它们不断地脱落并被替代，但其自身不能分裂，它们的替代依赖于表皮最里层的表皮干细胞。表皮干细胞位于表皮的基底层，是皮肤的专能干细胞，具有强大的增殖分化潜能，是皮肤形态发生、创面结构修复及功能重建的关键种子细胞。

miRNA是一种长约19～22nt的非编码RNA，在转录后水平调节基因和（或）蛋白的表达，参与生命过程中一系列的重要的生物学进程，是调节细胞增殖、分化及个体发育的重要分子。研究证实，若敲除皮肤中miRNA 生物合成必需的

DGCR8基因或Dicer酶可导致新生小鼠表皮基底层细胞异常增殖、毛囊发育缺陷、皮肤屏障功能障碍[26-27]，说明miRNA对皮肤结构形成和功能维持具有重要作用。但表皮中处于不同分化阶段的细胞之间miRNA的表达差异尚不清楚。本章通过基因芯片技术检测比较未分化的人表皮干细胞与终末分化的角质

形成细胞之间miRNA的差异表达情况，探讨miRNA在表皮细胞增殖分化、凋亡衰老等方面的作用及可能机制，有助于识别和发现特异性的miRNA，明确它们在皮肤创面愈合及附属器官修复中的作用及其调控机制，以miRNA为靶标的基因治疗可为临床难愈性创面修复提供新方法。

### **2.1** 材料与方法

### **2.1.1** 研究对象

以包皮组织作为本章实验研究对象，标本取材于2013年2-4月在泌尿外科行包皮环切术的健康青年男性，年龄18～40岁，平均26岁。所有取材均经患者知情同意。研究方案经医学伦理委员会审核批准。

### **2.1.2** 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 兔抗人 ITGB1 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK1 | 美国 Abgent 公司 |

4

|  |  |
| --- | --- |
| 兔抗人 CK10 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK19 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK18 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CEA | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 β 肌动蛋白 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| K -SFM | 美国 Gibco 公司 |
| EGF | 美国 Gibco 公司 |
| 0.25％胰蛋白酶-EDTA | 美国 Gibco 公司 |
| FBS | 美国 Gibco 公司 |
| IV 型胶原 | 美国 Sigma 公司 |
| D-Hanks 液 | 美国 Hyclone 公司 |
| TRIZOL | 美国 Invitrogen 公司 |
| PBS | 美国 Gibco 公司 |
| HRP 标记的ft羊抗兔二步法免疫组织化学检测试剂盒 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| ft羊抗兔 IgG-HRP 二抗 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| 注射用庆大霉素 | 中国华北制药股份有限公司 |
| mirVana™miRNA 纯化试剂盒 | 美国 Ambion 公司 |
| miRNA 标记和杂交试剂盒 | 美国 Ambion 公司 |
| 人 miRNA V14．08\*15K 芯片 | 美国 Ambion 公司 |
| 互补 DNA 反转录试剂盒 | 日本 TaKaRa 公司 |
| SYBR Ｇreen 荧光定量试剂盒 | 日本 TaKaRa 公司 |

### **2.1.3** 主要仪器设备与耗材

|  |  |
| --- | --- |
| Sw-CJ-lF 无菌超净工作台 | 苏州安泰空气技术公司 |
| CX40 型普通光学显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| CK40 倒置相差显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| NanoDropND-1000 紫外分光光度计 | 美国 NanoDrop 公司 |

5

|  |  |
| --- | --- |
| 二氧化碳培养箱 | 德国 Thermo-BB15 公司 |
| LDZS-2 型自动平衡离心机 | 中国上海医用分析仪器厂 |
| Image-proplus6.0 图像分析软件 | 美国 MediaCyberneties 公司 |
| 杂交炉 G2545A | 美国 Agilent 公司 |
| 芯片扫描仪 G2565CA | 美国 Agilent 公司 |
| Feature Extraction 10．7 软件 | 美国 Agilent 公司 |
| GeneSpring(GXl0．0)软件 | 美国 Agilent 公司 |
| 7900 HT 实时定量 RT-PCR 系统 | 美国 ABI 公司 |
| 微量移液器 | 中国上海医用设备厂 |
| FA 型电子分析天平 | 中国上海恒平科学仪器有限公司 |
| TGL-16C 型高速台式离心机 | 中国上海安亭科学仪器厂 |
| WD-9403D 型紫外仪 | 中国北京六一仪器厂 |
| 凝胶成像分析系统 | 中国北京君意东方电泳设备有限  公司 |
| HH-W420 型恒温水浴箱 . | 中国江苏荣华仪器制造有限公司 |
| 恒温干燥箱 | 中国上海康路仪器设备有限公司 |
| 自动双重纯水蒸馏器 | 中国上海亚荣生化仪器厂 |
| -80°C 超低温冰箱 | 中国青岛海尔有限公司 |
| -20°C 超低温冰箱 | 中国青岛海尔有限公司 |
| 制冰机 | 美国 MVE 公司 |
| 系列可调式微量移液枪 | 德国 Eppendorf 公司 |

耗材：50ml细胞培养瓶、六孔细胞培养板、35mm细胞培养皿、15ml离心管

（美国Corning公司）、一次性无菌橡胶手套、封口胶、l.5mlEp管、各种规格吸头、一次性注射器、酒精棉球、口罩等。

### **2.1.4** 人表皮干细胞与角质形成细胞的分离培养

(1)无菌条件下取下的人包皮标本，用棉球蘸碘伏擦拭消毒标本，生理盐水反复冲洗干净后放入超净工作台，刀片轻轻刮除掉标本的皮下组织及结缔组织，取D-Hank'S液漂洗标本3次，每次2min；

6

(2)将皮肤标本放入无菌弯盘中，加入含庆大霉素(1600u/mL)的无菌PBS溶液浸泡5min，再以无菌PBS溶液漂洗标本3次，每次2min；

(3)用眼科剪将皮肤标本剪成0.5cm×0.3cm的皮片置入无菌培养瓶中，滴加体积比为1: 5的0.25%胰蛋白酶-EDTA液，放入4℃冰箱过夜消化8-9h；

(4)将PBS稀释后的IV型胶原（100mg/L）均匀涂被培养板（瓶）后置入

37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中风干备用；

(5)取出消化过夜后的皮条片标本置于无菌培养皿中，滴加少许含FBS 的

K-SFM培养基终止消化，D-Hank'S液漂洗2次；

(6)用眼科镊小心分离表皮和真皮，弃真皮，将撕下的表皮放入另一无菌培养皿中，用眼科剪将表皮充分剪碎，用眼科镊将其放入消毒的培养瓶或试管中，加入适量无菌PBS液反复充分吹打成混悬状，经200目筛网过滤至离心管，离心，1000rpm×5min ；

(7)吸除上清后将K-SFM培养基加入离心管中制成细胞悬液，行细胞计数，将细胞浓度调整为1×10 5/L后接种于已铺被Ⅳ型胶原的培养板（瓶）中，置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养；

(8) 15-20min后将培养液及悬浮细胞（即角质形成细胞）吸出移至离心管中，离心，1000rpm×5min。吸除上清后于离心管中滴加含10ug/L EGF的K-SFM培养基制成细胞悬液，接种于无菌培养板（瓶）中，继续置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养。贴壁细胞（即表皮干细胞）滴加含10ug/L

EGF、10%FBS的K-SFM培养基，置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养；

(9)每天于倒置相差显微镜下观察2组细胞的生长情况，每隔2-3天换1次液。

### **2.1.5** 人表皮干细胞及角质形成细胞的鉴定

将无菌的专用玻片置于培养皿内，按lxl05/ml的细胞密度，将2-3滴人表皮干细胞、角质形成细胞悬液分别接种于玻片上，置于37℃、5%CO2、饱和湿度

95%的恒温培养箱中进行培养，24h后取表皮干细胞及角质形成细胞的细胞爬片，分别行CK19、ITGB1、CK1、CK10的免疫细胞化学染色（PV-9000法），具体步骤如下：

(1)取细胞爬片，PBS液轻轻冲洗3次，每次3min。取4℃冰丙酮将其固定

7

5min后，PBS液冲洗3次，每次2min；

(2)每张玻片加1滴3％H2O2阻断液，于室温下孵育10min，以灭活内源性过氧化物酶活性，PBS液轻轻冲洗3次，每次2min；

(3)分别滴加兔抗人CK19、ITGB1、CK1、CK10一抗(1: 150)，(PBS取代一抗作为阴性对照)，置入37℃保温箱中孵育2h后，PBS液轻轻冲洗3次，每次2min；

(4)滴加试剂1（Polymer Helper），于37℃保温箱中孵育20min, PBS液轻轻冲洗3次，每次2min；

(5)滴加试剂2 （poly peroxidase-anti rabbit IgG），于37℃保温箱中孵育

20min, PBS液轻轻冲洗3次，每次2min；

(6)每张切片加2滴新鲜配制的DAB溶液，显微镜下观察3-10min,适时终止显色；

(7)将玻片置于自来水下冲洗，苏木素复染0.5min，自来水冲洗返蓝5min；

(8)玻片置于梯度酒精脱水干燥，二甲苯透明，最后中性树胶封片。将玻片置于400倍显微镜下观察并拍照，细胞呈棕黄色显色作为阳性表达。

### **2.1.6** 细胞总**RNA**的提取

分别提取人表皮干细胞及角质形成细胞的总RNA，做好标记，具体操作如下：

(1)从保温箱中分别取出人表皮干细胞及角质形成细胞培养皿，移入超净工作台。吸除细胞培养液，无菌PBS液漂洗1次，吸除PBS液，每10cm2加1ml的预冷Trizol于培养皿中，用细胞刮轻轻刮取细胞，将刮取的细胞转移到1.5ml的离心管中；

(2)用1ml的移液管反复充分吹打，混匀，并冰浴5min；

(3)每1 ml的Trizol中加入氯仿0.2 ml，盖紧盖子，上下颠倒用力摇60次；

(4)冰浴5min后离心，4℃,12000 rpm, 15min，吸取上清（约500μl）；

(5)在500μl的上清中加入500μl已预冷的冰异丙醇，轻轻上下颠倒几次，然后置入-20℃冰箱沉淀10min；

(6)取出，离心，4℃, 12000 rpm, 10min，弃除上清。在管中先加无水乙醇750μl，再加DEPC处理的水250μl，轻轻上下颠倒几次后离心，4℃，8000rpm，5min；

8

(7)弃除上清，在管中加无水乙醇1ml，再离心，4℃，8000rpm，5min；移入超净台，用枪吸除上清；

(8)在超净台里静置1-2分钟（超净台鼓风），加入10-15μl DEPC水，沉淀即刻溶解。

### **2.1.7** 总**RNA**质量检测

#### 2.1.7.1 RNA浓度和纯度的检测

采用NanoDrop ND-1000全波长紫外／可见光扫描分光光度计测定2组样品中总RNA的浓度和纯度，具体步骤如下：

(1)滴加0.1%DEPC水先给比色仪调零；

(2) 2组RNA样品各取1µl，用49µl的0.1%DEPC水稀释50倍，用加样器吹打充分混匀。同时吸取50μl的DEPC水加入比色杯中标记空白，采用NanoDrop ND-1000型全波长紫外分光光度计来检测RNA样品的OD260nm和OD280nm, RNA于260nm吸收达峰值，蛋白于280 nm吸收达峰值，按下列公式计算RNA浓度和纯度：

RNA浓度（µg/µl）=OD260nm×50×40

RNA纯度=OD260nm/OD280nm，理想纯度的RNA是其OD260 / OD280的比值介于1.8和2.1之间，比值接近或大于1.8，说明RNA纯度较高，没有蛋白质、酚等的残余；而如果OD260 /OD280的比值> 2.1或者<1.6，说明RNA样品受蛋白质、酚等污染。

#### 2.1.7.2 RNA完整性的检测

釆用变性琼脂糖凝胶电泳法检测样品RNA的完整性，具体步骤如下：

(1) 1×TBE电泳缓冲液的制备：取108g Tris, 55g硼酸，7.44g EDTA加入烧杯中，加入去离子水约800ml，混匀；用NaOH将pH值调至8.3，加去离子水至1L，室温下保存，使用时需稀释10倍；

(2)甲醛变性琼脂糖凝胶的制备：取1×TBE电泳缓冲液30ml，加入琼脂糖

0.45g，置入微波炉中加热至完全溶化，轻轻摇动使电泳缓冲液与琼脂糖充分混匀至颗粒状悬浮物消失，冷却至60℃，加入甲醛600μl，充分混匀，倒入RNA专用制胶器中，室温静置30min后可使用；

(3) RNA样品的准备：取500 ngRNA样本加入无菌DEPC水至6μl，再加入2μl EtBr (1.0 mg/mL)及2μlRNA上样缓冲液，充分混匀，孵育，65℃×5min，再

9

置于冰上骤冷2min；

(4)电泳：先凝胶预电泳5-10分钟，随后将RNA样品加入至上样孔中，电压调至120-130V，约15-20min；

(5)成像：电泳结束后，用凝胶成像仪照像；

(6)理想结果：RNA样品条带清晰，28S: 18S rRNA条带亮度大于或接近

2: 1。

### **2.1.8** 总**RNA**的纯化

取质检合格的样品总RNA10-20μg，用mirVana™miRNA纯化试剂盒进行纯化，具体步骤如下：

(1)取10-20μg样品总RNA加入EP管中，调至适量体积，注入5倍体积的

Lysis/Binding缓冲液，充分混匀；

(2)加十分之一体积的miRNA匀浆添加剂，充分混匀，冰上孵育10min；

(3)加三分之一体积的100％乙醇，混合均匀；

(4)将上述混合液加入滤管中，离心，5000rpm×lmin，收集其滤液；

(5)加入三分之二体积的100％乙醇于滤液中，混合均匀；

(6)置换滤管，将⑤的混合物过滤，离心，5000rpm×lmin，吸除滤液，继续使用收集管；

(7)将滤管放于收集管中，取miRNA 洗涤液700μl 清洗滤管，离心，

5000rpm×lmin，吸除滤液；

(8)取miRNA洗涤液500μl清洗滤管，离心，5000rpm×1min，吸除滤液。

miRNA洗涤液再次清洗一遍，将滤管连同收集管一起离心，10000rpm×lmin，弃除滤管中所残留液体；

(9)置换一个新的收集管，在滤器中加入95℃的洗脱液50μl，盖紧，室温下孵育2min。离心，10000 rpm×lmin，收集滤液。重复此步骤，纯化后重新定量。

### **2.1.9** 总**RNA**的荧光标记与**miRNA**芯片杂交

取100ng纯化后的样品总RNA进行实验，使用Agilent公司的miRNA标记和杂交试剂盒，具体步骤如下：

(1)去磷酸化：①用超纯水稀释RNA样本，使其浓度为50ng/μl；②取稀释了的RNA样本2μl加入1.5mL微量离心管中，置于冰面；③按试剂盒说明书配置

10

CIP液；④在RNA样本管中加入2μlCIP液，轻轻吹吸混合均匀，以去除RNA 5’

端磷酸基团；⑤将各样本管水浴，37℃×30min ；

(2)变性：向各样品管中加入DMSO液2.8μl，水浴，100℃×10min，后置于冰水浴降温；

(3)荧光标记：①将10×T4 RNA连接酶缓冲液置于37℃水浴箱中，振荡使其完全溶解；②取1μl缓冲液加入3.0μl Cyanine3-pCp荧光染液和0.5μlT4 RNA连接酶，作为荧光标记液；③向各样品管中分别加入刚刚配制的4.5μl荧光标记液，轻轻吹吸混合均匀；④16℃孵育2h，在T4RNA连接酶的作用下使Cyanine3-pCp连接到RNA的3’端；⑤将标记反应产物在真空浓缩仪中浓缩抽干，设定温度45℃，浓缩时间约3h，确保样本彻底干燥；

(4)配制杂交体系：①各取18μl 干燥样品溶于100℃超纯水中；②加入

10×GE封闭液4.5μl；③加入2×Hi -RPM杂交缓冲液22.5μl；④100℃加热5min；

⑤冰水浴5min；⑥离心，收集沉淀物；

(5)芯片杂交：①将杂交液加样至杂交盖片上，安放人miRNA V14.0 8\*15K芯片，旋紧杂交装置；②将杂交装置放在Agilent公司杂交炉中过夜杂交，20rpm约16h。

### **2.1.10** 杂交芯片的清洗及扫描

使用GE Wash Buffer试剂盒进行实验，具体步骤如下：

(1)取GE wash buffer 1和2，分别加入12mL 10％Triton X-102;

(2)将处理后的GE wash buffer 2置入37℃水浴箱中水浴至过夜；

(3)从杂交装置内取出miRNA杂交芯片，置于GE wash buffer1中，使用磁力搅拌器将其清洗5min；

(4)将杂交芯片置于GE wash buffer 2中，再次使用磁力搅拌器清洗5min；

(5)使用Agilent芯片扫描仪对清洗后的芯片荧光强度进行扫描，获得杂交图片。借助Agilent公司的Feature Extraction(v10.7)软件分析杂交图片并行数据提取。

### **2.1.11** 筛选条件

使用GeneSpring软件对数据进行归一化和差异表达分析，筛选条件为：表皮干细胞与角质形成细胞差异倍数比值的绝对值在2倍或2倍以上。

11

### **2.1.12** 实时定量**RT-PCR**验证

分别取人表皮干细胞及角质形成细胞的RNA样本各1µl，根据基因芯片检测结果，选取差异较为明显且原始实验信号值较强的上调表达差异和下调表达差异的hsa-miR-197-5p、hsa-miR-29b-3p采用实时定量RT-PCR方法进行验证。从miRNA库中查找hsa-miR-197-5p、hsa-miR-29b-3p序列，由美国Invitrogen公司设计引物（引物序列见表2.1），U6作为内参，进行归一化。

表2.1 实时定量RT-PCR引物序列

| miRNA 及引物名称 引物序列（5′→3′） | |
| --- | --- |
| hsa-miR-197-5p  hsa-miR-197-5p 逆转录引物  hsa-miR-197-5p 反义引物  hsa-miR-29b-3p  hsa-miR-29b-3p 逆转录引物  hsa-miR-29b-3p 反义引物  U6 上游引物  U6 下游引物  miRNA 通用正义引物 | CGGGTAGAGAGGGCAGTGGGAGG GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACTGGATACGACcctccc TATATACGGGTAGAGAGGGCAGTG TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA GGTATTCGCACTGGATACGACaacact ACGATAGCACCATTTGAAATCAGT CTCGCTTCGGCAGCACA AACGCTTCACGAATTTGCGT  GTGCAGGGTCCGAGGT |

#### 2.1.12.1 逆转录合成cDNA

(1)总RNA逆转录反应体系的配制

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 标准量 |
| RNA样本 | 100ng |
| MiRNA Specific Stem-Loop RT-Primer (1µM) | 1µl |
|  | 加无核酸酶超纯水定容至12.3µl ，  65 ℃，孵育5 min；冰上放置2 min |
| 0.1M DTT | 2µl |
| M-MLV反转录酶 | 1µl |
| dNTP混合物 | 0.5µl |
| RNase Inhibitor | 0.2µl |
| 5× First -Strand缓冲液 | 4µl |
| 总体积 | 20µl |

(2)逆转录反应条件：在PCR仪上进行，16℃×10 min；37℃×30 min；65℃×5

min。

12

#### **2.1.12.2** 定量**PCR**反应

(1) miRNA RealTime PCR反应体系的配制：

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 标准量 |
| miRNA cDNA 样本 | 1µl |
| Power SYBR Green PCR Master Mix (2×) | 10µl |
| 正义引物(10µM) | 0.5µl |
| 反义引物(10µM) | 0.5µl |
| 无核酸酶超纯水 | 8µl |
| 总体积 | 20µl |

(2)进行定量PCR反应条件：95℃变性10 min；95℃退火15 s；60℃延伸l min，循环40次；60-95℃绘制溶解曲线；

(3)收集荧光建立标准曲线，根据曲线分别获得人表皮干细胞及角质形成细胞样本2种miRNA的Ct值（每个样本每种miRNA的Ct值均测量3次，取平均值）。采用2-△△Ct方法计算基因相对表达量。具体方法如下：目标基因△Ct值=目标基因Ct值－同一样本U6Ct值；目标基因△△Ct值=处理组△Ct值－对照组△Ct值，再计算各组样本2-△△Ct值。

### **2.1.13** **miRNA**靶基因预测及功能富集分析

应用3个数据库（Target-Scan、miRDB、miRanda）对部分差异表达明显的

miRNAs进行靶基因预测，选取3个数据库均预测到的基因作为靶基因。对预测的靶基因采用DAVID 数据库（[http: //david. abcc. ncifcrf. gov/home. jsp](http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp)）进行KEGG

pathways功能分析。同时应用miR2Subpath数据库（http: // 202.97.205.78:8080/ miR2Subpath/ index. jsp）对部分差异表达明显的miRNAs进行功能富集分析，整理出与细胞增殖、分化、迁移、凋亡、衰老、炎症及癌症发生等密切相关的部分信号通路。

### **2.2** 结果

### **2.2.1** 人表皮干细胞与角质形成细胞镜下观察结果

倒置相差显微镜下观察，表皮干细胞分布较均匀，细胞小而圆，折光性较强（图2.1A）；孵育3d后，细胞贴壁牢固，并有明显克隆形成（图2.1B）。角质形成细胞大小不一，形状不规则（图2.1C）；孵育3d后，细胞贴壁不牢固，且无明

13

显克隆形成（图2.1D）。

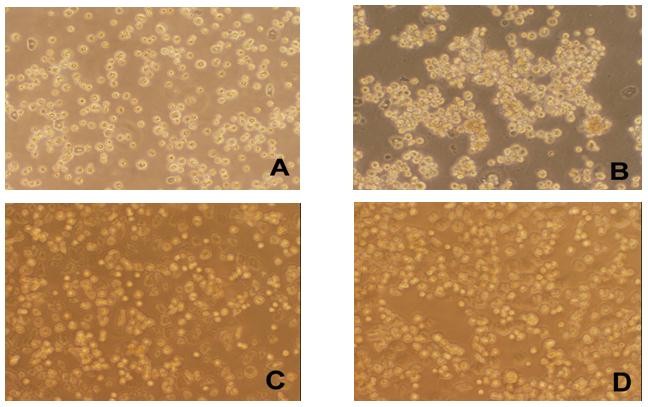


图2.1 显微镜下观察人原代表皮干细胞与角质形成细胞（×100 ）

A. Ⅳ型胶原快速贴壁法筛选的人原代表皮干细胞；B. 人表皮干细胞孵育3d时明显克隆形成；C.

Ⅳ型胶原快速贴壁法筛选的人角质形成细胞；D. 人角质形成细胞孵育3d时无明显克隆形成

### **2.2.2** 人表皮干细胞与角质形成细胞的鉴定结果

免疫细胞化学染色显示快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞群ITGB1、CK19呈棕黄色阳性表达，CK1、CK10呈阴性表达，符合表皮干细胞特征（图2.2A～2D）；未快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞群CK1、CK10呈棕黄色阳性表达，ITGB1、CK19呈阴性表达，符合角质形成细胞特征（图2.3A～3D）。

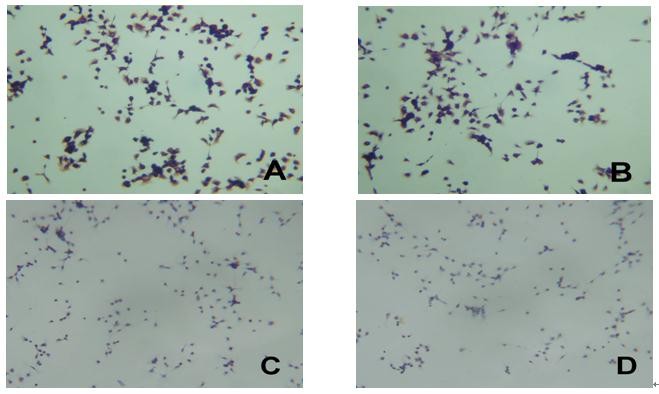


图2.2 人表皮干细胞免疫细胞化学染色结果辣根过氧化物酶×400

图A. 人表皮干细胞ITGB1呈阳性表达；图B. 人表皮干细胞CK19呈阳性表达；图C. 人表皮干细胞CK1呈阴性表达；图D. 人表皮干细胞CK10呈阴性表达

14



图2.3 人角质形成细胞免疫细胞化学染色结果辣根过氧化物酶×400

图A. 人角质形成细胞CK1呈阳性表达；图B. 人角质形成细胞CK10呈阳性表达；图C. 人角质形成细胞ITGB1呈阴性表达；图D. 人角质形成细胞CK19呈阴性表达

### **2.2.3** 总**RNA**质检结果

人表皮干细胞及角质形成细胞总RNA质检结果见表2.2，琼脂糖凝胶电泳图见图2.4。

表2.2 总RNA质检结果

| 样本 | A260/280 浓度(μg/μl) 总量(μg) 样本质量描述 |
| --- | --- |
| 人表皮干细胞 | 1.76 0.164 4.61 完好 |
| 人角质形成细胞 | 1.80 0.126 3.49 完好 |



图2.4 总RNA品质检测琼脂糖凝胶电泳图

1.表皮干细胞；2.角质形成细胞；M. Hela 细胞RNA

人表皮干细胞及角质形成细胞RNA总量均≥1µg，A260/280≥1.70，经甲醛变性胶电泳检测，RNA样品电泳条带清晰，28S: 18S rRNA条带亮度大于或接近2: 1，两组样品总RNA总量、纯度及完整性均符合表达谱芯片实验要求。

### **2.2.4** 芯片扫描结果

15

使用Agilent芯片扫描仪对清洗后的芯片进行扫描，得到如图2.5所示杂交图。



人表皮干细胞人角质形成细胞图2.5微数组芯片扫描仪扫描芯片后获得的杂交图片

### **2.2.5** 散点图结果

散点图（见图2.6）显示人表皮干细胞及角质形成细胞样本差异表达2倍或

2倍以上的miRNA的分布情况。



图2.6 散点图

T：表皮干细胞；C：角质形成细胞

### **2.2.6** 芯片检测结果

与角质形成细胞相比，表皮干细胞中明显上调大于等于2倍的miRNA有31

个，其中差异表达＞5倍的上调miRNA有12个（见表2.3）；明显下调大于等于

2倍者153个，其中差异表达＞5倍的下调miRNA有8个（见表2.4）；上调最明显者为hsa-miR-197-5p (21.99倍)，下调最明显者为hsa-miR-203(25.45倍)。

16

表2.3 差异表达＞2倍的上调miRNA列表

| miRNA 名称 原始实验信号 原始实验信号 绝对倍数变化  （角质形成细胞） （干细胞） （干细胞 vs 角质形成细胞） | | | |
| --- | --- | --- | --- |
| Hsa-miR-197-5p hsa-miR-125b-3p hsa-miR-376a-3p hsa-miR-345  Hsa-miR-127-3p hsa-miR-671-3p hsa-miR-18a-5p hsa-miR-181c-5p hsa-miR-222-5p hsa-miR-30d-3p hsa-miR-374a-3p hsa-miR-545-3p hsa-miR-192-5p hsa-miR-23a-3p hsa-miR-186-5p hsa-miR-335-3p hsa-miR-181a-5p hsa-miR-200c-5p hsa-miR-182-3p hsa-miR-154-5p hsa-miR-455-3p hsa-miR-338-3p hsa-miR-24-3p hsa-miR-96-5p hsa-miR-21-3p hsa-miR-205-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-933  hsa-miR-196a-3p  Hsa-miR-99b-5p hsa-miR-885-5p | 1638.40  18.91  129.74  76.70  10.13  30.56  299.02  89.15  446.64  4.17  661.46  78.07  1.78  612.23  291.62  2.96  116.80  1190.99  23.39  200.57  228.80  487.05  819.13  4.11  980.89  230.39  551.78  1868.86  38.00  10.32  356.57 | 32033.12  334.35  1986.32  1147.51  143.09  357.02  3166.46  910.34  3669.74  33.00  3808.10  349.03  7.88  2644.69  1233.79  11.95  433.20  4356.29  83.80  703.73  775.45  1572.54  2383.53  11.87  2719.04  583.62  1378.50  4092.83  78.73  19.96  652.01 | 21.99  19.89  17.22  16.82  15.88  13.14  11.91  11.48  9.24  8.89  6.47  5.03  4.99  4.86  4.75  4.54  4.18  4.11  4.02  3.95  3.82  3.63  3.27  3.25  3.12  2.85  2.81  2.46  2.33  2.17  2.05 |

17

表2.4 差异表达＞2倍的下调miRNA列表

| miRNA 名称 | 原始实验信号  （角质形成细胞） | 原始实验信号  （干细胞） | 绝对倍数变化  （角质形成细胞  vs 干细胞) |
| --- | --- | --- | --- |
| hsa-miR-203 | 2.86 | 0. 10 | 25.45 |
| hsa-miR-29b-3p | 20944.45 | 841.82 | 22.13 |
| hsa-miR-34a-3p | 427.67 | 22.89 | 16.62 |
| hsa-miR-574-5p | 154.53 | 12.12 | 11.33 |
| hsa-miR-23b-3p | 1.14 | 0.10 | 10.17 |
| hsa-miR-720 | 692.48 | 73.52 | 8.38 |
| hsa-miR-20b-5p | 1008.73 | 132.81 | 6.75 |
| hsa-miR-106a | 1495.80 | 259.09 | 5.13 |
| hsa-let-7b-5p | 40.73 | 7.25 | 4.98 |
| hsa-miR-150-5p | 231.99 | 41.61 | 4.95 |
| hsa-miR-31-3p | 1044.03 | 187.26 | 4.91 |
| hsa-miR-483-3p | 120.92 | 21.84 | 4.91 |
| hsa-miR-137-5p | 642.67 | 116.88 | 4.90 |
| hsa-miR-210 | 412.41 | 75.53 | 4.87 |
| hsa-miR-122-5p | 325.82 | 59.67 | 4.87 |
| hsa-miR-204 | 974.11 | 178.39 | 4.87 |
| hsa-miR-184 | 1436.10 | 264.82 | 4.83 |
| hsa-miR-496 | 3896.44 | 718.52 | 4.82 |
| hsa-miR-34 | 183.28 | 34.03 | 4.80 |
| hsa-miR-668-3p | 47.44 | 8.87 | 4.75 |
| hsa-miR-134 | 4538.31 | 854.47 | 4.73 |
| hsa-miR-328-3p | 522.01 | 98.28 | 4.73 |
| hsa-miR-542 | 56.80 | 10.70 | 4.73 |
| hsa-miR-539 | 115.20 | 21.69 | 4.73 |
| hsa-miR-191-3p | 0.53 | 0.10 | 4.71 |
| hsa-miR-150-3p | 222.54 | 42.19 | 4.68 |
| hsa-miR-346-5p | 17055.40 | 3256.00 | 4.67 |
| hsa-miR-363 | 364.04 | 69.50 | 4.67 |
| hsa-miR-339 | 540.42 | 104.61 | 4.60 |
| hsa-miR-449 | 2642.96 | 511.60 | 4.60 |
| hsa-miR-718 | 61.31 | 11.87 | 4.60 |
| hsa-miR-622 | 633.82 | 122.69 | 4.59 |
| hsa-miR-187-5p | 1267.65 | 247.09 | 4.55 |
| hsa-miR-663a | 197.81 | 38.82 | 4.53 |
| hsa-miR-765 | 8011.97 | 1628.00 | 4.37 |

18

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 续表 2.4 差异表达＞2 倍的下调 miRNA 列表 | | | |
| miRNA 名称 | 原始实验信号  （角质形成细胞） | 原始实验信号  （干细胞） | 绝对倍数变化  （角质形成细胞  vs 干细胞) |
| hsa-miR-155-5p | 86.70 | 17.74 | 4.34 |
| hsa-miR-623 | 37.22 | 7.67 | 4.32 |
| hsa-miR-146a-5p | 758.99 | 158.56 | 4.27 |
| hsa-miR-762 | 15694.16 | 3278.64 | 4.27 |
| hsa-miR-194-3p | 9.90 | 2.08 | 4.23 |
| hsa-miR-572 | 0.47 | 0.10 | 4.20 |
| hsa-miR-188-5p | 796.73 | 169.94 | 4.15 |
| hsa-miR-142-3p | 2161.68 | 461.08 | 4.15 |
| hsa-miR-654-5p | 1044.03 | 225.80 | 4.11 |
| hsa-miR-760 | 11409.44 | 2484.75 | 4.08 |
| hsa-miR-483-5p | 140.84 | 30.89 | 4.07 |
| hsa-miR-939 | 728.07 | 159.66 | 4.07 |
| hsa-miR-149-5p | 48.43 | 10.62 | 4.05 |
| hsa-miR-630 | 62.59 | 13.92 | 4.01 |
| hsa-miR-557 | 1560.66 | 349.44 | 3.98 |
| hsa-miR-223-3p | 243.53 | 54.53 | 3.96 |
| hsa-miR-193a-5p | 379.50 | 85.56 | 3.95 |
| hsa-miR-320c | 7632.50 | 1720.82 | 3.95 |
| hsa-miR-9-3p | 2.80 | 0.63 | 3.95 |
| hsa-miR-378a-3p | 20.22 | 4.59 | 3.92 |
| hsa-miR-501-5p | 445.09 | 101.75 | 3.90 |
| hsa-miR-635 | 1182.76 | 270.39 | 3.90 |
| hsa-miR-139-3p | 66356.06 | 15169.48 | 3.88 |
| hsa-miR-4466 | 3923.54 | 903.19 | 3.86 |
| hsa-miR-652-5p | 102.39 | 23.90 | 3.81 |
| hsa-miR-493-5p | 29490.05 | 6883.30 | 3.80 |
| hsa-miR-296-5p | 451.30 | 106.81 | 3.75 |
| hsa-miR-32-3p | 1258.89 | 317.12 | 3.53 |
| hsa-miR-509-3p | 70.91 | 17.86 | 3.52 |
| hsa-miR-135-3p | 13.72 | 616.90 | 3.52 |
| hsa-miR-4695-5p | 2191.86 | 555.98 | 3.50 |
| hsa-miR-17-3p | 718.05 | 183.40 | 3.48 |
| hsa-miR-361-3p | 1285.35 | 328.30 | 3.48 |
| hsa-miR-409-3p | 0.39 | 0.10 | 3.44 |
| hsa-miR-342-5p | 27.06 | 7.06 | 3.42 |
| hsa-miR-4476 | 3015.00 | 797.25 | 3.36 |

19

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 续表 2.4 差异表达＞2 倍的下调 miRNA 列表 | | | |
| miRNA 名称 | 原始实验信号  （角质形成细胞） | 原始实验信号  （干细胞） | 绝对倍数变化  （角质形成细胞  vs 干细胞) |
| hsa-miR-221-3p | 166.33 | 44.29 | 3.34 |
| hsa-miR-642a-3p | 382.14 | 103.17 | 3.30 |
| hsa-miR-371a-5p | 2448.94 | 665.77 | 3.27 |
| hsa-miR-1225-3p | 51.20 | 14.11 | 3.23 |
| hsa-miR-514a-5p | 902.60 | 252.28 | 3.18 |
| hsa-miR-371b-5p | 8767.44 | 2450.54 | 3.18 |
| hsa-miR-3917 | 656.18 | 183.40 | 3.18 |
| hsa-miR-149-5p | 86.70 | 24.23 | 3.18 |
| hsa-miR-595 | 68.97 | 19.41 | 3.16 |
| hsa-miR-27b-3p | 21.23 | 6.02 | 3.15 |
| hsa-miR-33a-5p | 1780.34 | 511.60 | 3.10 |
| hsa-miR-154-3p | 1190.99 | 347.02 | 3.06 |
| hsa-miR-3676-3p | 587.29 | 171.12 | 3.06 |
| hsa-miR-151a-3p | 48.10 | 14.11 | 3.03 |
| hsa-miR-128 | 321.34 | 94.94 | 3.01 |
| hsa-miR-513a-5p | 184.56 | 55.29 | 2.97 |
| hsa-miR-16-2-3p | 2102.57 | 634.24 | 2.96 |
| hsa-miR-378g | 515.21 | 173.51 | 2.96 |
| hsa-miR-10a-5p | 89.14 | 26.89 | 2.94 |
| hsa-miR-362-3p | 129.61 | 39.64 | 2.92 |
| hsa-miR-130a-3p | 275.89 | 84.38 | 2.91 |
| hsa-miR-543 | 172.20 | 52.67 | 2.91 |
| hsa-miR-106b-5p | 555.61 | 169.94 | 2.90 |
| hsa-miR-629-3p | 1134.58 | 749.44 | 2.90 |
| hsa-miR-183-3p | 5548.72 | 1708.94 | 2.89 |
| hsa-miR-708-5p | 108.98 | 34.03 | 2.85 |
| hsa-miR-1260a | 129.60 | 40.75 | 2.83 |
| hsa-miR-634 | 28.60 | 8.99 | 2.82 |
| hsa-miR-103a-3p | 9.97 | 3.16 | 2.82 |
| hsa-miR-766-3p | 15913.25 | 5038.87 | 2.82 |
| hsa-miR-19a-3p | 80.89 | 25.97 | 2.77 |
| hsa-miR-514b-5p | 295.69 | 94.94 | 2.77 |
| hsa-miR-152 | 1134.58 | 364.27 | 2.76 |
| hsa-miR-769-5p | 64.80 | 20.81 | 2.76 |
| hsa-miR-136-3p | 2073.63 | 679.76 | 2.71 |
| hsa-miR-874 | 409.56 | 134.26 | 2.71 |
| hsa-miR-15a-5p | 7372.51 | 2450.54 | 2.68 |

20

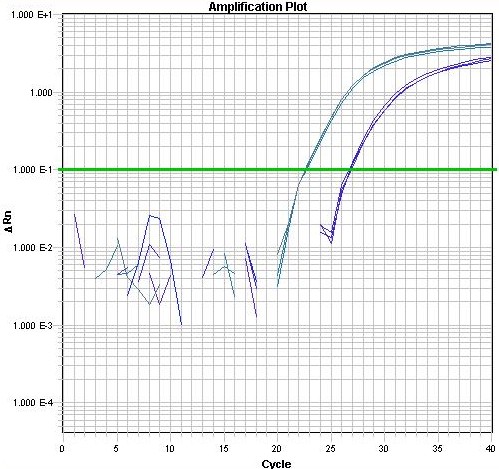
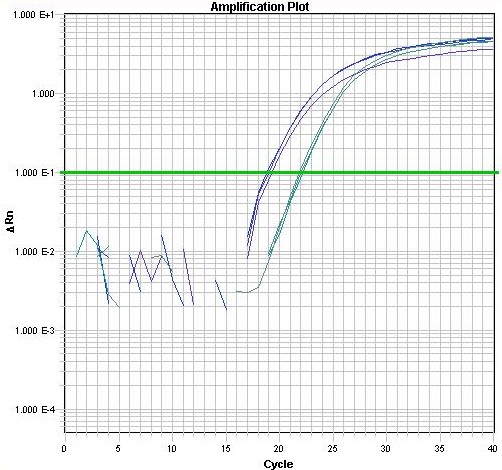
|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 续表 2.4 差异表达＞2 倍的下调 miRNA 列表 | | | |
| miRNA 名称 | 原始实验信号  （角质形成细胞） | 原始实验信号  （干细胞） | 绝对倍数变化  （角质形成细胞  vs 干细胞) |
| hsa-miR-3960 | 182.02 | 60.50 | 2.68 |
| hsa-miR-101-3p | 231.99 | 77.11 | 2.68 |
| hsa-miR-2392 | 8.74 | 2.93 | 2.66 |
| hsa-miR-141-3p | 43.35 | 14.61 | 2.64 |
| hsa-miR-940 | 960.70 | 323.78 | 2.64 |
| hsa-miR-100-5p | 8951.67 | 3037.95 | 2.62 |
| hsa-miR-574-3p | 78.68 | 27.07 | 2.58 |
| hsa-miR-107 | 31.51 | 10.84 | 2.58 |
| hsa-miR-365a-3p | 178.27 | 61.35 | 2.58 |
| hsa-miR-127-3p | 289.60 | 99.66 | 2.58 |
| hsa-miR-411-5p | 6286.06 | 2163.10 | 2.58 |
| hsa-miR-3679-3p | 18153.25 | 6290.17 | 2.57 |
| hsa-miR-375 | 58.00 | 20.52 | 2.51 |
| hsa-miR-185-5p | 15585.76 | 5590.97 | 2.48 |
| hsa-miR-301a-3p | 94.87 | 34.03 | 2.48 |
| hsa-miR-324-3p | 253.86 | 91.07 | 2.48 |
| hsa-miR-3125 | 4414.21 | 1594.49 | 2.46 |
| hsa-miR-28-5p | 1080.84 | 390.42 | 2.46 |
| hsa-miR-135b-5p | 67.09 | 24.40 | 2.45 |
| hsa-miR-575 | 157.36 | 58.04 | 2.41 |
| hsa-miR-194-5p | 451.30 | 166.44 | 2.41 |
| hsa-miR-377-3p | 1894.95 | 698.87 | 2.41 |
| hsa-miR-148b-3p | 842.15 | 317.12 | 2.36 |
| hsa-miR-877-5p | 3121.32 | 1191.76 | 2.33 |
| hsa-miR-382-5p | 9932.50 | 3872.06 | 2.28 |
| hsa-miR-19b-1-5p | 10.84 | 4.25 | 2.27 |
| hsa-miR-381 | 189.75 | 76.05 | 2.22 |
| hsa-miR-224-3p | 281.69 | 112.90 | 2.22 |
| hsa-miR-638 | 3057.08 | 1225.27 | 2.22 |
| hsa-miR-151b | 723.04 | 293.84 | 2.19 |
| hsa-miR-510 | 24.22 | 9.98 | 2.15 |
| hsa-miR-1237 | 164.04 | 67.60 | 2.15 |
| hsa-miR-215 | 291.62 | 121.00 | 2.14 |
| hsa-miR-188-3p | 1560.66 | 656.61 | 2.11 |
| hsa-miR-26a-5p | 240.17 | 101.05 | 2.11 |
| hsa-miR-22-3p | 418.17 | 178.39 | 2.10 |
| hsa-miR-132-3p | 31.73 | 13.54 | 2.10 |

21

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 续表 2.4 差异表达＞2 倍的下调 miRNA 列表 | | | |
| miRNA 名称 | 原始实验信号  （角质形成细胞） | 原始实验信号  （干细胞） | 绝对倍数变化  （角质形成细胞  vs 干细胞) |
| hsa-miR-195-5p | 1908.13 | 819.66 | 2.07 |
| hsa-miR-331-3p | 525.64 | 225.80 | 2.07 |
| hsa-miR-129-1-3p | 24.05 | 10.40 | 2.06 |
| hsa-miR-25-3p | 275.89 | 120.17 | 2.04 |
| hsa-miR-1275 | 1436.10 | 625.51 | 2.04 |
| hsa-miR-299-5p | 807.85 | 354.31 | 2.03 |
| hsa-miR-140-3p | 7739.05 | 3417.87 | 2.01 |

### **2.2.7** 实时定量**RT-PCR**验证结果

采用实时定量RT-PCR，以角质形成细胞作为对照，以U6作为内参检测表皮干细胞中2条miRNA（hsa-miR-197-5p、hsa-miR-29b-3p）的相对表达量，绘制hsa-miR-197-5p、hsa-miR-29b-3p 及U6 标准曲线（图2.7），通过观测达到阈值（Threshold为0.1）荧光强度时的循环数，可测得各标本中hsa-miR-197-5p、hsa-miR-29b-3p及U6的Ct值。溶解曲线（图2.8）均为单峰，表明扩增产物均为反应得到的特征性产物，记录各样本相应miRNA的Ct值（表2.5）。使用2-△△Ct计算结果即代表待测miRNA表达差异，2-△△Ct> 1，表示miRNA表达上调，2-△△Ct



< l，表示下调。本实验结果示表皮干细胞相对于角质形成细胞hsa-miR-197-5p的2-△△Ct为19.29，大于1，表达上调；表皮干细胞相对于角质形成细胞hsa-miR-29b-3p的2-△△Ct为0.14，小于1，表达下调，表明RT-PCR验证结果与芯片筛查结果一致。

hsa-miR-197-5p hsa-miR-29b-3p

22



U6



图2.7 hsa-miR-197-5p、hsa-miR-29b-3p及内参U6的标准曲线纵坐标为标准荧光强度，横坐标为循环数

hsa-miR-197-5p hsa-miR-29b-3p



U6

图2.8 hsa-miR-197-5p、hsa-miR-29b-3p及内参U6的溶解曲线横坐标为温度，纵坐标为产物的荧光强度与时间变化的负倒数

23

表2.5 PCR基因扩增结果

| 样本 | CT 值 | 平均 CT 值 | △CT | △△CT | 2-△△CT |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 角质形成细胞  表皮干细胞 | U6 22.95 |  |  |  |  |
| 22.82 | 22.92 |  |  |  |
| 23.01 |  |  |  |  |
| 24.21 |  |  |  |  |
|  | 24.29 | 24.20 |  |  |  |
|  | 24.09 |  |  |  |  |
|  | miR-197-5p |  |  |  |  |
| 角质形成细胞  表皮干细胞  角质形成细胞表皮干细胞 | 22.75 |  |  |  |  |
| 22.33 | 22.16 | -0.76 | 0.00 | 1.00 |
| 21.39 |  |  |  |  |
| 19.27 |  |  |  |  |
| 19.19 | 19.17 | -5.03 | -4.27 | 19.29 |
| 19.04 |  |  |  |  |
| miR-29b-3p |  |  |  |  |
| 22.81 |  |  |  |  |
| 22.74 | 22.72 | -0.20 | 0.00 | 1.00 |
| 22.62 |  |  |  |  |
| 26.87 |  |  |  |  |
|  | 26.85 | 2.65 | 2.85 | 0.14 |
|  | 26.92 |
|  | 26.75 |  |  |  |  |

### **2.2.8** **miRNA**功能富集分析结果

对差异表达明显的miRNA进行靶基因预测，一共预测到796个靶基因。采用DAVID 数据库对靶基因进行KEGG pathways 功能分析，发现25 个KEGG

pathways 明显富集（p<0.05）（见表2.6）。应用miR2Subpath数据库对差异表达明显的miRNAs进行功能富集分析，显示其参与与细胞增殖分化等生物学特性有关的KEGG信号通路（见表2.7）。

24

表2.6 差异表达明显的miRNAs 功能富集分析结果

| KEGG pathway | Count | % |
| --- | --- | --- |
| MAPK signaling pathway | 34 | 5.3 |
| Wnt signaling pathway | 27 | 4.2 |
| TGF-beta signaling pathway | 16 | 2.5 |
| ErbB signaling pathway | 18 | 2.8 |
| Adipocytokine signaling pathway | 13 | 2.0 |
| Jak-STAT signaling pathway | 9 | 1.4 |
| Chemokine signaling pathway | 10 | 1.6 |
| Insulin signaling pathway | 15 | 2.3 |
| Neurotrophin signaling pathway | 8 | 1.2 |
| Axon guidance | 12 | 1.9 |
| Focal adhesion | 13 | 2.0 |
| Regulation of actin cytoskeleton | 22 | 3.4 |
| ECM-receptor interaction | 17 | 2.7 |
| Adherens junction | 19 | 3.0 |
| Cytokine-cytokine receptor interaction | 14 | 2.2 |
| Pathways in cancer | 23 | 3.6 |
| Oocyte meiosis | 18 | 2.8 |
| Colorectal cancer | 9 | 1.4 |
| Apoptosis | 11 | 1.7 |
| Cell cycle | 14 | 2.2 |
| Long-term depression | 12 | 1.9 |
| Adipocytokine signaling pathway | 9 | 1.4 |
| Long-term potentiation | 15 | 2.3 |
| GnRH signaling pathway | 11 | 1.7 |
| Melanogenesis | 19 | 3.0 |

25

表2.7 差异表达明显的miRNAs及其与细胞增殖分化相关的KEGG信号通路

| 差异表达明显的 miRNAs | 参与的KEGG 信号通路 | 与细胞增殖分化相关的功能描述 |
| --- | --- | --- |
| miR-125b,-203,-335,-204,  -31,-34b/c,-130b,-182,-150,  -127, -34a,-25,-137 | MAPK 信号途径 | 参与细胞的增殖、分化、迁移、凋亡、衰  老、色素形成、炎症及应激等生物进程 |
| miR-125b,-222,-23b,-346,  -186,-542,-200c,-138,-182,  -150,-191 | Wnt 信号途径 | 参与干细胞增殖分化、胰岛 β 细胞增殖， 调控细胞命运，胰岛素分泌、糖代谢等 |
| miR-193b,-34a,-484-3p,  -182,-203,-200c | 癌症通路 | 基因组损伤、促血管生成、抗凋亡、细胞增殖、细胞迁移、调控细胞周期 |
| miR-24,-222,-182,-338,-363  -122, -34c, -200c, -23a, -96 | 肌动蛋白骨架途径 | 参与调控细胞增殖、分化、运动以及细胞内物质运输等，参与维持细胞形态， |
| miR-34b/c,-96,-200c,-338,  -150,-539,-134,-542,-23a,  -222,-455 | 粘着斑途径 | 调控细胞增殖、分化、迁移、凋亡、基因表达等 |
| miR-106a,-34b/c,-200c,  -150, -222 | ErbB 信号途径 | 参与细胞增殖、分化、迁移以及抗凋亡 |
| MiR-338,-let-7d,-196a, -96 | 细胞外基质受体途径 | 参与细胞增殖、分化、粘着、运动及凋亡等，维持细胞正常形态及功能 |
| miR-210,-186,-221,-154,  -21,-155,-192 | TGF-beta 信号途径 | 调控细胞的增殖、分化、迁移及凋亡，参  与免疫炎性反应及代谢平衡 |
| miR-496 | 细胞粘附分子 | 参与免疫炎症反应、止血及神经生长等过程 |
| miR-34c,-455,-186,-449,  -328 | 粘着连接途径 | 维持细胞极性，限制细胞增殖和迁移 |
| miR-205 | 钙信号传导通路 | 参与肌肉收缩、物质代谢、细胞增殖、迁移及抗凋亡 |
| miR-434,-668 | p53 信号通路 | 调控细胞周期、细胞凋亡、细胞衰老、细  胞分泌、抗血管生成、修复 DNA 等 |
| miR-376,-134,-181a,-200c,-  204,-222,-339,-346,-31,-34b  ，-23a | 轴突导向信号途径 | 调控轴突的生长，参与神经发育 |
| miR-let-7b,-720,-574 | Jak-STAT 信号传导通路 | 调节细胞增殖、分化、凋亡、细胞周期、免疫反应 |
| miR-328,-222,-150 | T 细胞受体信号途径 | 参与细胞增殖、分化、细胞因子生成及诱导性细胞死亡等 |
| MiR-34c, -449a | Notch 信号途径 | 介导细胞间信号传导，调控细胞的增殖、分化与凋亡 |
| miR-222 | VEGF 信号途径 | 调控内皮细胞的增殖及迁移，调节血管通透性，参与[血管](http://zh.wikipedia.org/wiki/%E7%8C%AB%E9%9A%86%E8%81%99%E8%8E%BD%E5%BA%90%E9%9A%86)生成与分化 |

注：MAPK：有丝分裂原激活蛋白激酶；TGF-beta：转化生长因子-β；VEGF：血管内皮生长因子。

26

### **2.3** 讨论

miRNA是一类由真核生物内源性基因编码的长约19～22个核苷酸的小分子非编码单链RNA，他们在动植物中广泛存在，到目前为止，已经有4000余种

miRNA分子被发现，一般以基因簇、多拷贝或单拷贝的形式存在于基因组中。

miRNA基因仅占真核基因基因总数的1%～3%，但受miRNA调控的靶基因数却可占基因总数的30%左右[31]。自从1993年Lee等发现了第一个miRNA，即秀丽新小杆线虫中能时序调控胚胎后期发育的基因lin-4及Ｒeinhart等发现了第二个miRNA，即在线虫C. elegans中发现的let-7后，miRNA随之成为生物学研究的热点与焦点。miRNA的生物合成过程如下：miRNA基因首先在细胞核内由

RNA多聚酶Ⅱ转录，产生茎环结构的初级miRNA(pri-miRNA)，pri-miRNA茎部随即被RNaseⅢ核酸酶Drosha及其辅助因子DGCR8切割，形成由60～110个核苷酸组成的环状前体miRNA(pre-miRNA)。pre-miRNA 在核转运受体

exportin5及核蛋白RanGTP的帮助下从细胞核被输送至细胞质内，进入胞质的pre-miRNA环部被RNA酶ⅢDicer切割，形成由19～22个核苷酸组成的双链配对分子。然后在RNA解旋酶的作用下，其中一条链被降解，另一条链则发育为成熟的单链miRNA，其与Argonaute 蛋白家族结合组成RAN诱导沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)，RISC通过完全互补或不完全互补配对的方式结合到其靶基因mRNA3’端非翻译区，对靶mRNA进行切割、降解或抑制翻译等从而抑制蛋白质的合成，负性调控基因的表达。在少数情况下，miRNA也可能促进mRNA的转录及翻译[32]。几乎所有的生物学过程都有miRNA的参与：细胞增殖与分化、细胞凋亡、信号转导、器官发育、免疫调节、脂肪代谢、炎症反应、肿瘤形成、衰老与死亡及疾病的发生发展等，对生物正常发育和疾病的发生起到非常重要的作用。皮肤的发育是一个相当复杂的过程，受到众多信号通路的调节，已有大量的基础与临床研究证实皮肤的形成离不开稳定正常的miRNA调控网络，miRNA异常将导致皮肤结构失常及功能缺陷[33]。

表皮干细胞位于表皮基底层和毛囊外根鞘膨凸部，是皮肤组织中的特异性成体干细胞。研究证实表皮基底层只有约1%～10%的细胞属于具有增殖分化能力的干细胞[34]，干细胞一般分裂不对称，除了形成一个与母体相同的干细胞外，还分裂形成一个短暂扩增细胞（TAC），TAC再向上迁移历经棘层、颗粒层后，最终进入角质层形成终末分化的角质形成细胞。表皮干细胞从基底层向角质层移行时，是细胞增殖、分化的连续过程，即增殖能力逐渐下降，而分化能力渐加

27

强，最终产生成熟的角质形成细胞。表皮干细胞自我更新能力极强，在进行体外培养时呈全克隆性生长，具有非常强的增殖、分化潜能，参与维持皮肤的形态结构及损伤修复与再生。表皮干细胞一般处于静息状态，细胞周期缓慢，形态幼稚，表现为相对未分化的状态，即细胞体积小，呈球形、致密，胞核大，胞内细胞器稀少，细胞内RNA含量低，在显微镜下折旋光性强、胞体透亮，胞质相对原始，而已分化的角质形成细胞与其相反，表现为体积大，胞浆丰富，胞核小，折光性不强，两者有明显的不同。表皮干细胞还有一个显著特点是黏附性能强，而且主要是通过整合素实现对基底膜的黏附[35]。本实验体外分离、纯化表皮干细胞就是利用其对IV型胶原的快速黏附性来进行的。同时可利用β1整合素的抗体来鉴别表皮干细胞与已分化的角质形成细胞[36]，即表皮干细胞高表达

β1整合素，而角质形成细胞不表达β1整合素。另外角蛋白属于表皮细胞的结构蛋白，表皮细胞随着分化程度的不同而表达不同的角蛋白，因而角蛋白亦可作为干细胞、分化细胞的鉴别手段[37]。常用于鉴别的角蛋白为CK1、CK10 及

Ck19[8]，研究表明表皮干细胞表达Ck19，而分化的角质形成细胞表达CK1、

CK10。虽然表皮干细胞与已分化的角质形成细胞处于表皮细胞的不同发育阶段，它们生物学特性却截然不同，miRNA可能在其中发挥了重要作用，但目前对表皮干细胞与已分化的角质形成细胞中miRNA的表达变化、作用及其机制尚不十分清楚。

本研究采用miRNA芯片检测技术比较观察得出表皮干细胞与分化的角质形成细胞的miRNA差异表达谱。结果显示两者有184个miRNA的表达水平存在明显的差别，其中在表皮干细胞中表达显著上调的miRNA31 个，显著下调的

miRNA153个，靶基因预测结果提示miRNA与两组细胞的增殖与分化、免疫与炎症、凋亡与衰老等生物学特性变化密切相关。Yi R[38]等检测皮肤miRNA的表达谱发现，miR-200 家族(miR-141、miR-149、miR-200a、miR-200b及miR-200c) 、miR-203、miR-19/20家族(miR-17-5p、miR-93、miR-19b及miR-20)优先表达于表皮，而miR-126、miR-152、miR-143、miR-199a、miR-214优先表达于毛囊。而Sonkoly E[25]等系统比较了miR-203在正常人各器官中的表达情况，结果发现miR-203在皮肤中的表达水平最高，高于其它器官100余倍，因此miR-203被认为是“皮肤特异性的miRNA”。本研究结果显示miR-203在人表皮干细胞中下调最明显，其在角质形成细胞中的表达水平是表皮干细胞的25.45倍。Yi R[28]等亦研究发现miR-203在表皮基底部无表达，而是显著表达于表皮基底上层，

28

对复层表皮的形成及皮肤防护层的生成发挥重要作用。且在有关银屑病的研究中证实细胞因子信号转录抑制因子（SOCS-3）[25]是其直接靶点，miR-203通过转录后水平抑制靶基因SOCS-3的表达，进而影响细胞转导通路，实现其生物功能。与miR-203类似，Let-7b在表皮干细胞中的表达亦低于角质形成细胞。Let-7b属于Let-7家族成员之一，Let-7家族是miRNA中研究最为深入的家族之一，最早于2000年在线虫中被鉴定[39]。Johnson[40]等发现上调人类肺组织中的let-7表达水平可以通过转录后下调细胞周期蛋白依赖性激酶CDK6、细胞分裂周期蛋白

25A（CDC25A）和细胞周期蛋白CCND等细胞周期相关基因进而来阻断细胞周期中的G1/S期转化，使处于G0/G1期的细胞显著增加，从而抑制细胞增殖，细胞失去“干性”，同时诱导细胞有序地进入终末分化阶段。同样miR-31在表皮干细胞中表达低于角质形成细胞。Peng H等[41]研究发现miR-31通过负向调控缺氧诱导因子-1（HIF-1）来激活Notch通路，从而诱导干细胞分化。同时，Mardaryev

AN[42]研究发现miR-31还参与调控毛发生长周期，其在毛发生长期表达水平明显增加，通过抑制靶基因Dlx3、Krt16、Fgf10的表达来抑制毛发的生长；相反，下调miR-31的表达水平后，则毛囊数量显著增加，毛球亦增多，毛囊外根鞘异常增生肥厚。另外，在表皮干细胞中表达下调的miR-210被研究发现在缺血缺氧的伤口中由于受到缺氧诱导因子HIF-1α的诱导miR-210表达水平明显增加，其通过抑制细胞周期调节蛋白E2F3的表达，使细胞周期停滞，从而细胞增殖受到显著抑制[43]。与之类似，miR-483-3p在表皮干细胞中表达下调。有研究发现在创面愈合的终末阶段miR-483-3p表达水平上调，其通过转录后水平抑制靶基因MK2、YAP1、MK167的表达，继而抑制表皮细胞的增殖与迁移，最终阻抑创面再上皮化进程[44]。表皮干细胞中下调的miR-137、miR-668[45]、miR-191[46]等与角质形成细胞的复制性衰老有关，其通过转录后下调细胞周期调节基因SATB1、CDK6阻止干细胞从G1期进入S期，导致细胞周期停滞，增殖停止，诱导角质形成细胞进入衰老程序。

本研究发现miR-125b表达水平在表皮干细胞中显著上调, Zhang L[47]等研究发现miR-125b通过抑制维生素D受体（VDR）及Blimp1等靶基因维持哺乳动物表皮干细胞的“干性”，调节干细胞的自我更新，抑制干细胞的分化。若miR-125b过表达于转基因小鼠的表皮干细胞及子代细胞，则小鼠表皮显著增生增厚。同样，miR-24在表皮干细胞中表达亦上调，其被证实通过转录后抑制P27、P16等细胞周期抑制蛋白，诱导干细胞由G1期向S期转变，S期细胞增多，G1

29

期细胞减少，即促进细胞增殖；相反，拮抗miR-24可抑制细胞增殖[48]。本研究发现miR-21-3p在表皮干细胞的表达水平高于角质形成细胞，有学者发现其参与了创面的愈合及再上皮化，创面愈合过程中转化生长因子TGF-β1能够上调miR-21的表达，miR-21通过转录后抑制组织金属蛋白酶抑制因子3（TIMP3）及T淋巴瘤侵袭转移诱导因子-1（TIAM1），从而促进表皮细胞的增殖、迁移，有利于创面的再上皮化[49]。同样在表皮干细胞中上调的miR-205通过抑制靶基因SHIP2的表达，促进表皮细胞的迁移，并抑制表皮细胞的凋亡，有利于上皮的稳定及创面愈合；拮抗miR-205后，可阻抑创面的丝状肌动蛋白合成，细胞焦点接触增强，粘附力增加，迁移能力下降，从而延缓创面的愈合[50]。另有研究发现miR-205在体内受miR-184的调控，即miR-184能拮抗miR-205对SHIP2的抑制作用，从而miR-184参与促进表皮细胞的凋亡与死亡[51]，与本研究结果一致，即miR-184在表皮干细胞中下调。

综上所述，本章实验采用miRNA芯片检测技术对人表皮干细胞与角质形成细胞之间miRNA差异表达谱进行分析研究，发现31个上调和153个下调的miRNA，实时定量RT-PCR验证结果表明该miRNA芯片技术可靠，并且靶基因预测显示部分miRNA的靶基因与细胞增殖、分化、迁移、凋亡及衰老等密切相关，有助于进一步理解正常皮肤发育的进程及分子通路、创面愈合的发生及发展机制，为寻找促进创面解剖愈合及功能修复的靶标奠定了良好的实验基础及理论依据；另外可通过干扰相关的miRNA诱导成熟的细胞去分化从而为组织工程皮肤提供新的种子细胞来源。

### **2.4** 小结

（1）人表皮干细胞和已分化的角质形成细胞中的miRNA表达存在明显差异，靶基因预测提示部分miRNA与细胞增殖、分化、凋亡和迁移等生物学特性密切相关。

（2）miRNA微阵列芯片技术稳定、可靠，能够为miRNA在皮肤相关研究提供特异和可靠的资料。

30

## **第 3** 章**miR-203**与**p63**在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化

上一章比较分析了人表皮干细胞与已分化的角质形成细胞之间的miRNA表达差异情况，得知miR-203在表皮干细胞中的表达下调最明显，与Yi R等的研究结果一致，即miR-203在基底部无明显表达，而在表皮基底上层高表达。miR-203这种在增殖能力强的干细胞中低表达，在终末分化细胞中高表达的存在方式提示miR-203可能通过调节表皮细胞的增殖和分化参与复层表皮的形成及皮肤防护层的生成。miR-203与其它的miRNA一样都是通过作用于靶基因而发挥效应的，miR-203的靶基因产物包括转录因子、转运蛋白、分泌蛋白、受体等[52]。为了进一步了解miR-203的功能机制，首先需探明其生理学靶基因。如何寻找miR-203的靶标呢？将基因组序列与计算机程序相结合的生物信息学方法，是预测miRNA靶基因的一个常用而又比较准确的方法[53]。由于miR-203序列在脊椎动物皮肤中的高度保守性[54]，所以可以根据miR-203与靶基因mRNA完全或不完全互补性、miR-203与靶基因mRNA之间的热稳定性及邻近序列的二级结构等信息预测其靶基因。现在较公认和常用的miRNA靶基因预测软件主要有miRanda及TargetScan等，在本章研究中，我们釆用这两个靶基因预测软件预测miR-203的靶基因，总共发现600余个潜在靶点，通过对各个靶基因的功能分析，我们选择了与表皮增殖分化密切相关的p63基因作为本章实验的研究对象。

为了进一步探讨miR-203与其靶基因如何参与调控皮肤的结构与功能及可能机制，本章研究对比观察人表皮干细胞与角质形成细胞之间miR-203及p63的表达差异，并分析两者的相关性，有助于理解miR-203在皮肤发育过程中的作用及机制，为创面修复的基因治疗奠定实验基础，为miRNA的临床应用提供理论依据。

### **3.1** 材料与方法

### **3.1.1** 研究对象

以包皮组织作为本章实验研究对象，标本取材于2013年4-6月在泌尿外科行包皮环切术的健康青年男性，共计５例。患者年龄18～40岁，平均28岁，

31

所有取材均经患者知情同意，研究方案经医学伦理委员会审核批准。

### **3.1.2** 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 兔抗人 ITGB | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK1 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK10 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK19 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 β 肌动蛋白 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| 兔抗人 p63 | 美国 Abgent 公司 |
| K -SFM | 美国 Gibco 公司 |
| EGF | 美国 Gibco 公司 |
| 0.25％胰蛋白酶-EDTA | 美国 Gibco 公司 |
| FBS | 美国 Gibco 公司 |
| IV 型胶原 | 美国 Sigma 公司 |
| D-Hanks 液 | 美国 Hyclone 公司 |
| TRIZOL | 美国 Invitrogen 公司 |
| PBS | 美国 Gibco 公司 |
| HRP 标记的ft羊抗兔二步法免疫组织化学检测试剂盒 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| ft羊抗兔 IgG-HRP 二抗 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| 注射用庆大霉素 | 中国华北制药股份有限公司 |
| mirVana™miRNA 纯化试剂盒 | 美国 Ambion 公司 |
| Super-Bradford 蛋白定量试剂盒 | 中国北京康为世纪生物科技有限公司 |
| 互补 DNA 反转录试剂盒 | 日本 TaKaRa 公司 |
| SYBR Green 荧光定量试剂盒 | 日本 TaKaRa 公司 |
| 去氧胆酸钠 | 美国 Biosharp 公司 |
| 甘氨酸 | 美国 Sigma 公司 |

32

|  |  |
| --- | --- |
| PMSF | 美国 Sigma 公司 |
| Bromopheenol blue | 美国 Sigma 公司 |
| 二硫苏糖醇（DTT） | 美国 Sigma 公司 |
| Tris－Base | 中国北京索莱宝科技有限公司 |
| ECL | 中国北京普利莱基因技术有限公司 |
| PVDF 膜 | 中国北京索莱宝科技有限公司 |
| 十二烷基硫酸钠（SDS） | 美国 Sigma 公司 |
| 考马斯亮兰 G250 | 美国 Sigma 公司 |
| N,N,N',N'- 四 甲 基 乙 二 胺  （TEMED） | 美国 Sigma 公司 |
| N,N'-亚甲双丙烯酰胺 | 美国 Sigma 公司 |
| Tween-20 | 美国 Sigma 公司 |
| 过硫酸胺（APS） | 美国 Amresco 公司 |

### **3.1.3** 主要仪器设备与耗材

|  |  |
| --- | --- |
| Sw-CJ-lF 无菌超净工作台 | 苏州安泰空气技术公司 |
| CX40 型普通光学显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| CK40 倒置相差显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| NanoDropND-1000 紫外分光光度计 | 美国 NanoDrop 公司 |
| 二氧化碳培养箱 | 德国 Thermo-BB15 公司 |
| LDZS-2 型自动平衡离心机 | 中国上海医用分析仪器厂 |
| Image-proplus6.0 图像分析软件 | 美国 MediaCyberneties 公司 |
| 7900 HT 实时定量 RT-PCR 系统 | 美国 ABI 公司 |
| 垂直电泳槽 | 中国北京六一仪器厂 |
| 水平电泳槽 | 中国北京六一仪器厂 |
| DYCZ-40D型转移槽 | 中国北京六一仪器厂 |
| FA 型电子分析天平 | 中国上海恒平科学仪器有限公司 |

33

|  |  |
| --- | --- |
| TGL-16C 型高速台式离心机 | 中国上海安亭科学仪器厂 |
| WD-9403D 型紫外仪 | 中国北京六一仪器厂 |
| 凝胶成像分析系统 | 中国北京君意东方电泳设备有限公司 |
| Multiskan Spectrum Microplate  酶标仪 | 德国 Themo 公司 |
| HH-W420 型恒温水浴箱 . | 中国江苏荣华仪器制造有限公司 |
| 恒温干燥箱 | 中国上海康路仪器设备有限公司 |
| PHS-TP型酸度计 | 中国上海大普仪器有限公司 |
| 自动双重纯水蒸馏器 | 中国上海亚荣生化仪器厂 |
| -80°C 超低温冰箱 | 中国青岛海尔有限公司 |
| -20°C 超低温冰箱 | 中国青岛海尔有限公司 |
| 制冰机 | 美国 MVE 公司 |
| 系列可调式微量移液枪 | 德国 Eppendorf 公司 |

耗材：50ml细胞培养瓶、六孔细胞培养板、35mm细胞培养皿、15ml离心管

（美国Corning公司）、一次性无菌橡胶手套、封口胶、l.5mlEp管、各种规格吸头、一次性注射器、酒精棉球、口罩等。

### **3.1.4** 人表皮干细胞与角质形成细胞的分离培养

采用胰蛋白酶消化法分离人表皮获得单细胞悬液，应用Ⅳ型胶原快速黏附法将细胞分为人表皮干细胞和人角质形成细胞。２种细胞分别培养于加了EGF的K-SFM中。倒置相差显微镜观察２种细胞分离即刻及培养３ｄ的生长情况。

具体步骤同第2章，2.1.4。

### **3.1.5** 人表皮干细胞及角质形成细胞的鉴定

取人表皮干细胞及角质形成细胞的细胞爬片，采用HRP标记的ft羊抗兔二步法免疫组织化学检测试剂盒分别行CK19、ITGB1、CK1、CK10的免疫细胞化学染色（PV-9000法）。

具体步骤同第2章，2.1.5。

### **3.1.6** 细胞总**RNA**的提取

34

Trizol法分别提取人表皮干细胞及角质形成细胞的总RNA，做好标记，具体操作同第2章，2.1.6。

### **3.1.7** 总**RNA**质量检测

分别吸取人表皮干细胞及角质形成细胞的RNA样本1ul，采用NanoDrop ND-1000全波长紫外／可见光扫描分光光度计来检测每个样本总RNA量，计算

OD260／OD280比值（1.7～2.1时合格）及RNA浓度；甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。

具体步骤同第2章，2.1.7。

### **3.1.8** 总**RNA**的纯化

分别从表皮干细胞及角质形成细胞样本中取10-20ug质检合格的总RNA，用mirVana™miRNA纯化试剂盒进行纯化，具体步骤同第2章，2.1.8。

### **3.1.9** **RT-PCR**检测**miR-203**

分别取1ul的人表皮干细胞及角质形成细胞总RNA，以U6作为内参。采用互补DNA反转录试剂盒将总RNA合成总互补DNA，采用SYBR Green荧光定量试剂盒和荧光定量RT-PCR仪对反转录产物行PCR. MiR-203及内参照U6的反转录引物和PCR引物均购自中国上海吉玛制药技术有限公司。引物序列见表

3.1. 采用Δ循环阈值（Ct）法处理结果，计算相对表达量，即2-△△CT. PCR反应条件：95℃预变性10min；95℃变性15s，60℃退火1min，共40个循环。每个样本PCR反应重复３次。

表3.1 实时荧光定量RT-PCR引物序列及产物大小

| 基因名称 | 引物序列（5’→3’） | 产物大小 |
| --- | --- | --- |
| hsa-miR-203 | GTGAAATGTTTAGGACCACTAG |  |
| hsa-miR-203逆转录引物 | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA  TTCGCACTGGATACGACCTAGTG | 81 |
| hsa-miR-203反义引物 | GCTCAGTGAAATGTTTAGGACCAC |  |
| U6上游引物 | CTCGCTTCGGCAGCACA | 70 |
| U6下游引物 | AACGCTTCACGAATTTGCGT |

(1)总RNA逆转录合成cDNA（具体步骤同2.1.12.1）

(2)实时定量PCR（具体步骤同2.1.12.2）

(3)收集荧光建立标准曲线，根据曲线分别获得人表皮干细胞及角质形成细

35

胞样本miR-203的Ct值（每例样本miR-203的Ct值测量3次，取平均值），根据

Ct值公式，计算各样本2-△△CT值，代表miR-203在各样本中的表达情况。具体方法如下：目标基因△Ct值=目标基因Ct值－同一样本U6Ct值；目标基因△△Ct值=处理组△Ct值－对照组△Ct值，再计算各样本2-△△Ct值。本实验中△Ct= Ct miR-203－Ct U6，△△Ct= (Ct miR-203-Ct U6)表皮干细胞组－(Ct miR-203-Ct U6)角质形成细胞组。

### **3.1.10** **RT-PCR**检测**p63**

分别取0.2ul的人表皮干细胞及角质形成细胞总RNA，以OligdT为反转录引物，应用反转录试剂盒将总RNA合成总互补DNA。采用SYBRＧreen荧光定量试剂盒和荧光定量RT-PCR 仪对反转录产物行PCR。采用引物设计软件

PrimerPremier5.0设计p63及内参照β肌动蛋白的PCR引物，并经blast进一步验证。引物序列由中国上海生工生物工程股份有限公司合成，见表3.2。

表3.2 实时荧光定量RT-PCR引物序列及产物大小

| 基因名称 | 引物序列（5’→3’) | 产物大小 |
| --- | --- | --- |
| p63上游引物 | TCCTCCCCTTCCTCTTGTCT |  |
|  |  | 80 |
| p63下游引物 | GATGCCAGGTCAGATGTTAGGT |  |
| β-actin上游引物 | TTTTTTGGCTTGACTCAGGAT | 400 |
| β-actin下游引物 | GGGAGACCAAAAGCCTTCAT |  |

#### 3.1.10.1 RN A逆转录合成cDNA

(1)总RNA逆转录反应体系的配制

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| RNA样本 | 0.2 ul |
| 5×PrimeScript 缓冲液 | 2 ul |
| PrimeScript [逆转录](http://www.baidu.com/s?wd=%E9%80%86%E8%BD%AC%E5%BD%95&amp;hl_tag=textlink&amp;tn=SE_hldp01350_v6v6zkg6)酶 | 0.5 ul |
| Oligo (dT) Primer | 0.5 ul |
| Radom 6 mers | 0.5 ul |
| 无核酸酶超纯水 | 加至10 ul |

(2)逆转录反应条件：在PCR仪上进行，37℃×15 min；85℃×5 sec 。

#### **3.1.10.2** 定量**PCR**反应

(1) PCR 反应体系的配制

36

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | 试剂 | 使用量 |  |
|  | mRNA cDNA 样本 | 2µl |  |
|  | SYBR® Premix Ex Taq™ | 10µl |  |
|  | 正义引物(10µM) | 0.4µl |  |
|  | 反义引物(10µM) | 0.4µl |  |
|  | ROX Reference Dye(50×) | 0.4µl |  |
|  | 灭菌蒸馏水 | 6.8µl |  |
|  | 总体积 | 20µl |  |

(2)定量PCR反应条件：95℃变性10 min；95℃退火15 s；60℃延伸l min，循环40次；60-95℃绘制溶解曲线。

(3)收集荧光建立标准曲线，根据曲线分别获得每例人表皮干细胞及角质形成细胞样本p63的Ct值（每例样本p63的Ct值测量3次，取平均值），根据Ct值公式，计算样本2-△△CT值，代表p63在各样本中的表达情况。采用2-△△Ct方法计算基因相对表达量。具体方法如下：目标基因△Ct值=目标基因Ct值－同一样本内参β-actin值；目标基因△△Ct值=处理组△Ct值－对照组△Ct值，再计算各样本2-△△Ct值。本实验中p63△Ct= Ct p63－Ctβ-actin，△△Ct= (Ct p63-Ctβ-actin)表皮干细胞组－( Ct p63-Ctβ-actin)角质形成细胞组。

### **3.1.11** **Western-blot**检测**p63**蛋白

#### 3.1.11.1配制 试剂

（l）母液的配制

A: 1.0mol/L的Tris HCl的配制：Tris 30.29g加蒸馏水100ml溶解后，用浓盐酸调配pH值（如下所示）:

|  |  |
| --- | --- |
| PH | HCl |
| 7.4 | 约17ml |
| 7.5 | 约16ml |
| 7.6 | 约15ml |
| 8.0 | 约10ml |

B: 10%SDS的配制：SDS 10g加蒸馏水至100ml，500℃水浴溶解后，室温保存。

C: 0.2mol/L NaH2PO4的配制：NaH2PO4 12g加蒸馏水至500ml溶解后，高压灭菌，室温保存。

37

D: 0.2mol/L Na2HPO4的配制：Na2HPO4 71.6g加蒸馏水至1000ml溶解后，高压灭菌，室温保存。

E: 10mM单去污剂裂解液(PMSF)的配制：PMSF 0.174g加异丙醇100ml溶解后，取1.5ml离心管分装，-20℃保存。

F: 1.5mol/L Tris HCl(PH8.8)的配制：Tris 45.43g加蒸馏水200ml溶解后，用浓盐酸将pH调至6.8，再加蒸馏水至250ml，室温下保存。

G: 10%过硫酸胺(AP)的配制：过硫酸胺0.1g加超纯水l.0ml溶解后，取50µl

离心管分装，-20℃保存。

H: 20%Tween20的配制：Tween20 20g加蒸馏水100ml混合均匀后4℃保存。I: 40%Acr/Bic(37.5: l)的配制：丙烯酰胺(Acr) 37.5g 加甲叉双丙烯酰胺

（Bic）1.0g加超纯水100ml溶解，室温下保存。

（2）使用液的配制

A: RlPA裂解液:50mM pH7.4的Tris HCl加150mM NaCl加lmM PMSF 加

lmM EDTA加l%TritonX-100加l%脱氧胆酸钠加0.1%SDS，混匀。

B: 单去污剂裂解液(PMSF):1mol/L pH8.0的Tris HCl2.5ml加NaCl 0.438g加TritonX-100 0.5ml加蒸馏水100ml混合均匀后4℃保存。使用时加入PMSF使终浓度为100µg/ml(0.87ml的裂解液加入10mM PMSF50µl)。

C: G250考马斯亮蓝溶液的配制：考马斯亮蓝G250 100mg加95%乙醇50ml

加磷酸100ml加蒸馏水2000ml混匀后4℃保存。

D: 0.0lmol/L PBS(PH7.2-7.4)的配制：0.2mol/L NaH2PO419ml 加0.2mol/L

Na2HPO48lml加NaCl 17g加蒸馏水2000ml溶解，室温下保存。

E: 0.15mol/L NaCl的配制：NaCl 0.877g加蒸馏水100ml，高压灭菌，室温保存。

F: 100mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的配制：BSA 0.1g加0.15mol/LNaCl 1ml溶解后-20℃保存。制作蛋白标准曲线时，取0.15mol/L NaCl将其稀释100倍后浓度为lmg/ml，-20℃保存。

G: 10%分离胶的配制：

40%Acr/Bic(37.5:1) 2.5ml

1.5Mol/L Tris HCl(PH8.8) 2.5ml

TEMED 5µl

10%AP(过硫酸胺) 50µl

38

10% SDS 100µl

超纯水4.85ml

H: 5%积层胶的配制：

30%聚丙烯酰胺(37.5:1) 0.83ml

1 mM Tris-HCl(PH6.8) 0.63ml

TEMED 5µl

10%AP(过硫酸胺) 50µl

10% SDS 50µl

超纯水3.4ml

I：脱色液

甲醇 45ml

冰乙酸 10ml

双蒸水 45ml

J: 还原型SDSS(x)上样缓冲液的配制：0.5mol/LTris HCl(pH6.8) 2.5ml

溴酚蓝0.025g

二硫叔糖醇0.39g

SDS 0.5g

甘油 2.5ml

混匀后取1.5ml离心管分装，4℃保存。

K：电泳液缓冲液的配制：Tris 3.03g加甘氨酸18.77g加SDS 1.0g加蒸馏水至1000ml，溶解后室温保存。

L：转移缓冲液的配制：

Tris 5.8g

甘氨酸 2.9g

SDS 0.37g

甲醇 200ml

蒸馏水至1000ml

M: TBST缓冲液的配制：20%Tween20 1.65ml加TBS700ml混合均匀，现配现用。

N: TBS缓冲液的配制：1mol/L Tris HCI(pH7.5) 10ml加NaCl 8.8g加蒸馏水

39

至1000ml，混合均匀。

O：封闭液的配制：脱脂奶粉(WB专用) 5g加TBST 100ml,现配现用。P：洗脱抗体缓冲液的配制：14.4mol/Lβ-巯基乙醇700µl加0.5mol/L Tris

HCI(PH6.8) 12.5ml加SDS 1g加超纯水至100ml，混合均匀。Q: 显影液的配制：

米吐尔1.55g

自来水(50℃) 375ml

亚硫酸钠22.5g

碳酸钠33.75g

溴化钾20.95g

水加至500ml

4℃保存，使用时用自来水再稀释一倍。R：定影液的配制：

自来水(50℃) 700 ml

硫代硫酸钠240g

亚硫酸钠 15g

冰乙酸12.6ml

硼酸 7.5g

钾明矾 15g

水 加至 1000 ml

室温保存。

#### **3.1.11.2**蛋白 样品制备

(1)取培养的人表皮干细胞及角质形成细胞，分别加入4℃预冷的PBS液，轻轻洗涤细胞三次，以去除培养液；

(2)用干净的细胞刮棒轻轻刮下细胞，将其转移到1.5ml EP管内，离心，1000

rpm×10分钟，弃除上清液；

(3)以1ml裂解液加10µl PMSF(100mM)的比例配好，混合均匀置于冰上；

(4)将500µl含PMSF的去污裂解液加入每瓶细胞内，于冰上反复吹打裂解

30min；

(5) 4ºC 离心，12000r/min×10 min. 取上清置于-70ºC 保存。

40

#### **3.1.11.3** 蛋白质定量

采用中国北京康为世纪生物科技有限公司的Super-Bradford蛋白定量试剂盒进行。将A液与B液(50: l)充分混合均匀，室温下放置30min，将其加入96孔板中，每孔加入200µl，再于每孔中加入不同浓度的标准品BSA（10mg/mlBSA

0ul、2.5ul、5.0ul、7.5ul、10ul）以及待测样品10µl（加90ul生理盐水稀释），并于空白孔中加入10ul双蒸水调零，37ºC放置30min，在酶标仪上检测570nm吸光度值(OD值)，取标准品的OD值绘制标准曲线，根据曲线计算出各个样品的蛋白质浓度。

#### **3.1.11.4** **SDS**－**PAGE**电泳

（l）将玻璃板清洗干净，晾干备用；

(2)灌胶：

将清洗干净的玻璃板对齐，竖直卡在架子上准备灌胶。

将配好的10%分离胶，加入TEMED后充分混匀但不要产生气泡，立即注入两层玻璃板间隙，如有气泡可用10ml注射器针头排除。灌胶时可同时用l.0ml枪沿玻璃吸取胶，直到胶面上升到绿带中间线高度，然后沿玻璃板壁缓慢加1ml异丙醇，隔绝空气封胶面，待其在室温下聚合30min，倾去异丙醇，用ddH2O冲洗胶顶面。

将配好的5%积层胶，加入TEMED后立即充分摇匀，取3ml快速注入两层玻璃板间隙，将空隙灌满后迅速将梳子插入胶中，尽量避免产生气泡，如有气泡可用10ml注射器针头排除。在室温下待其凝固30 min，聚合完全后小心将梳子取出。若胶孔有歪斜，则用注射器吸出气泡加以修正。

(3)电泳：

取人表皮干细胞及角质形成细胞蛋白质样品各20μg，加入5×凝胶上样缓冲液按4: 1体积混合均匀，水浴，100ºC×5min，然后使用加样枪采用“对侧加样法”加样，上样时尽量避免蛋白质的交叉污染，将胶放入装有足够电泳缓冲液的电泳槽进行电泳。

电泳条件：将电泳装置连接上电源，电压调节至90 V，观察样品中的溴酚蓝染料迁移位置，待其前端进入分离胶后，调整电压为120V，待溴酚蓝进入胶的前沿时，结束电泳，电泳时间一般约需2h。

#### **3.1.11.5** 转膜

41

(1)准备l张7.3～8.6cm大小的PVDF膜和4张7.0～8.3cm大小的滤纸，准备滤纸和膜时需戴手套，防止滤纸和PVDF膜被蛋白污染。将准备好的PVDF膜浸泡于甲醇中3min后使用；

(2)搪瓷盘里放置转膜液、滤纸、浸泡了甲醇的PVDF膜、海绵垫两块、转膜用的夹子、玻棒一支；

(3)打开夹子黑的一面，垫一张海绵垫，保持水平位置，用玻棒来回去除其中的气泡。再在海绵垫子上垫二层滤纸，左手固定滤纸，右手用玻棒去除里面的气泡；

(4)将玻璃板撬开剥胶，剥胶时手应错开分离玻璃，动作要轻柔，使胶取出，去掉积层胶部分，避免刮破分离胶。小心剥下分离胶置于滤纸上，调整位置使其与滤纸对齐，将膜置于分离胶上，尽量避免出现气泡。再在膜上盖2张滤纸并赶尽里面的气泡，最后将另一块海绵垫盖上，检查一下保证没有气泡时合起夹子；

(5)将夹子插入转移槽中，夹子的黑面对着转移槽的黑面；夹子的白面对着转移槽的红面。因为电转移时会产热，故在转移槽的两边各放一块冰来降温。在160mA电流下转移至硝酸纤维素膜上，转膜时间约为1.5h；

(6)用l×丽春红染液将膜染5min，置于脱色摇床上摇，后用水冲洗掉多余的染液后即可显现膜上的蛋白。

#### **3.1.11.6** 免疫学检测

(1)封闭：转膜后，将硝酸纤维素膜置于TTBS中，缓慢摇10min，然后将硝酸纤维素膜置于封闭液中，在37C摇床缓慢平摇150 min；

(2)结合一抗：将封闭后的硝酸纤维素膜移入一抗反应液（一抗即兔源性p63

多克隆抗体按1: 200溶于封闭液），4ºC 过夜；回收一抗，将PVDF膜浸入20 ml

TTBS液中，在室温下脱色摇床上平摇3次，每次20 min，以清洗掉膜上残余的一抗；

(3)结合二抗：将PVDF膜移入二抗反应液（二抗即羊抗兔IgG-HRP按1：

5000溶于封闭液）中，室温下平摇2 h，将硝纤膜浸入30 ml的TTBS中，在室

温下脱色摇床上平摇3次，每次30 min，以清洗膜上残余的二抗。

#### **3.1.11.7** 化学发光、显影、定影

(1)化学发光：将发光液A和发光液B在保鲜膜上等体积混匀，将此混合

42

液加于膜上，等待lmin后，去除残液，包好，放入X光片夹中；

(2)显影：在暗室中，红灯下取出X光片，用剪刀将其裁剪成合适大小。打开X光片夹，把X光片放在膜的合适位置上，关上X光片夹，曝光30s-5min。曝光完成后，取2个塑料盘，分别倒入1×显影液和定影液，从X光片夹中取出

X光片，迅速浸入显影液中显影，约1~2min后出现明显条带即终止显影；

(3)定影：显影结束后，再把X光片立即浸入定影液中，一般为5-10min的定影时间，以胶片透明为止。用自来水将残留的定影液冲洗后，在室温下晾干。每组样品进行三次电泳，用于重复验证结果。

#### **3.1.11.8** 光密度分析

通过Image Proplus6.0图像分析软件读取X光片上目的条带的光密度扫描值，以各组β-actin条带的光密度扫描值标化其相应组样本p63蛋白表达量。

### **3.1.12** 统计学方法

数据以均数±标准差表示，采用SPSS17.0统计软件行ｔ检验，对miR-203表达与p63的mRNA和蛋白表达分别行Pearson相关分析，P＜0.05为差异有统计学意义。

### **3.2** 结果

### **3.2.1** 人表皮干细胞与角质形成细胞镜下观察结果

倒置相差显微镜下观察，人表皮干细胞，细胞分离即刻细胞分布较均匀，细胞小而圆，折光性较强（图3.1A）；培养3 d，细胞贴壁牢固并有明显克隆形成（图

### 3.1 B)；人角质形成细胞，细胞分离即刻，细胞分布不均匀，细胞大小不一，形状不规则，折光性不强(图3.1C)；培养3d，细胞贴壁不牢固且无克隆形成(图

### 3.1 D)。

43



图3.1 人原代表皮干细胞与角质形成细胞倒置相差显微镜下观察（×100 ）

A. 细胞分离即刻，表皮干细胞群细胞小而圆，折光性较强，分布较均匀；B. 培养3d表皮干细胞呈明显克隆性生长；C. 细胞分离即刻，角质形成细胞群细胞形状、大小不一致，分布不均匀；D. 培养3d角质形成细胞无明显克隆性生长

### **3.2.2** 人表皮干细胞与角质形成细胞的鉴定结果

免疫细胞化学染色显示快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞群ITGB1、CK19呈阳性表达，符合表皮干细胞特征；未快速黏附的细胞群CK１、CK10呈阳性表达，符合角质形成细胞特征。见图3.2。



图 3.2 免疫细胞化学染色鉴定２种细胞辣根过氧化物酶×400

A. 快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞CK19呈阳性表达；B．快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞ITGB1呈阳性表达；C．未快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞CK１呈阳性表达；D．未快速黏附于Ⅳ型胶原的细胞CK 10呈阳性表达

### **3.2.3** **RNA**质量检测结果

人表皮干细胞中提取总RNA为1.98ug，人角质形成细胞中提取总RNA 为

1.95ug，均≥1µg. NanoDropND-1000分光光度计结果显示，样品中提取RNA 的

44

吸收值A260/280均在1.8-2.0之间，经琼脂糖凝胶电泳检测，28S: 18S rRNA条带亮度清晰、完整，亮度大于或接近2: 1，判定所有样本的RNA的质量均符合实验要求。琼脂糖凝胶电泳图见图3.3。

1 2



图3.3 总RNA品质检测琼脂糖凝胶电泳图注：1.角质形成细胞；2.表皮干细胞

### **3.2.4** **miR-203 PCR**基因扩增结果

采用实时荧光定量PCR，以U6作为内参检测人表皮干细胞及角质形成细胞hsa-miR-203的相对表达量，结果示表皮干细胞miR-203的相对表达量为0.74±0.20，较角质形成细胞的3.66±0.34明显下调（ｔ＝16.582, Ｐ＜0.001）, 差异具有统计学意义。

### **3.2.5** **p63 PCR**基因扩增结果

采用实时荧光定量PCR，以β-actin作为内参检测人表皮干细胞与角质形成细胞中p63的mRNA相对表达量，结果示表皮干细胞p63的mRNA相对表达量为4.16±0.28，较角质形成细胞的2.90±0.39明显上调（ｔ＝5.850, Ｐ＝0.001）, 差异具有统计学意义。

### **3.2.6** 蛋白印迹法检测**p63**的蛋白表达结果

以β-Actin蛋白作为内参，经蛋白印迹法检测示人表皮干细胞中p63蛋白条带比角质形成细胞显色深，表明表皮干细胞中p63蛋白的表达高于角质形成细胞。并将X光片上的信号用Quantity one软件进行灰度扫描，以p63蛋白与β-Actin蛋白的光密度比值作为p63蛋白表达的相对含量。得到表皮干细胞中p63蛋白相对含量为1.42±0.05，而角质形成细胞中p63蛋白的相对含量为0.73±0.03（ｔ

45

＝26.460，P﹤0.001），差异具有统计学意义。见图3.4。



p63

β-Actin

相对分子质量

### **3.2.7** **miR-203**和**p63mRNA**和蛋白表达的关系

将5例患者样本中miR-203的mRNA表达与p63的mRNA及蛋白表达量分别做pearson相关分析。结果示miR-203表达量与p63的mRNA和蛋白表达量均呈明显负相关（r值分别为-0.938、-0.976，t值分别为4.687、7.763，P值分别为0.019、0.005），差异具有统计学意义。

### **3.3** 讨论

有学者[25]在对21个健康器官的miRNA表达研究中发现，有一种miRNA在皮肤中有很高的表达，在其他组织器官中的表达量很低甚至无表达，且在皮肤中主要表达于角质细胞，而不表达于黑色素细胞、成纤维细胞或树突状细胞，此miRNA即为miR-203，因此被称为皮肤特异性的miRNA，在皮肤中扮演着特殊角色。miRNA根据5' 端核苷酸序列不同被分为多个家族，不属于任何一个家族的称为孤儿miRNA. miR-203即为孤儿miRNA家族成员之一[55]。人miR-203基因座位于14号染色体长臂32.33区(14q32.33) [24], miR-203基因首先在细胞核内由RNA多聚酶Ⅱ转录，生成初级微小RNA（pri-miRNA），继而被RNaseⅢ核酸酶Drosha及DGCR8蛋白加工成60～110nt的微小RNA前体（pre-miRNA）。Pre-miRNA在输出蛋白５的协助下从细胞核被转运入细胞质内，在Dicer酶的作用下，被切割成长19～22nt的双链miRNA配对分子，双链中的其中一条链被降解，另一条链则发育为成熟的miR-203，并与相关蛋白质结合构成RNA诱导沉默复合物，继而通过完全互补或不完全互补配对的方式与靶基因mRNA3′非翻译区结合，降解靶mRNA或抑制其翻译，从而负性调控基因的表达。

46

皮肤的发生发育是一个非常复杂的过程，受到众多相互交织的信号通路的调节，已有一系列研究证实皮肤的正常形成离不开稳定的miRNA调控网络，miRNA通过与调控因子及信号通路相互作用形成了一个多层次、全方位的网络调控系统，进而实现对表皮形态发生、毛囊周期性发育、色素沉积及内环境稳态等的调控。成熟的miR-203在器官组织中的分布具有显著差异性，其可能参与了皮肤发育、稳态及功能维持，在协助皮肤细胞构建防护层，防止细菌入侵、机体脱水甚至癌症发生中发挥重要作用，是皮肤器官中重要的调控因子。Yi R等学者[28]研究小鼠胚胎期不同时间的表皮细胞总RNA表达情况时发现在小鼠胚胎发育第13.5天（此时小鼠单层表皮形成，皮肤主要由未分化的干细胞组成）时，miR-203在单层表皮细胞中几乎没有表达；但在胚胎发育第14.5天（此时表皮开始分层）时miR-203开始表达于表皮基底上层（suprabasal layers），但在基底部无表达；到了胚胎发育第15.5天时，这些干细胞开始分化，离开表皮基底层，历经棘层、颗粒层后，最终形成终末分化细胞迁移到最外层的角质层，此时miR-203在表皮基底上层中的表达水平最高，远高于其他的miRNA，且这种高表达于出生后一直保持，表明miR-203对复层表皮的形成及皮肤防护层的生成有重要作用**。**Wei T等学者[29]进一步以人为研究对象，对人胚胎、成人皮肤组织进行miR-203原位杂交实验时发现，人胚胎发育至第14周时在皮肤尚检测不到miR-203的表达，但从胚胎发育至第17周开始，miR-203的表达量逐渐增加，亦主要在表皮基底上层中表达。Nissan X等[30]在体外诱导人胚胎干细胞向角朊细胞早期定向分化实验中发现，于胚胎干细胞分化早期miR-203表达逐渐上调，并参与了随后的分化。结合本章课题研究结果即miR-203在已分化的角质形成细胞中高表达，而在高增殖潜能的表皮干细胞中低表达，提示miR-203伴随着分化的开始而表达。研究证实若抑制miR-203的表达，则皮肤无法形成坚实的防护层。有学者将小鼠miR-203生物合成必需的Dicer酶或DGCR8基因敲除，以致miR-203合成障碍，可导致小鼠表皮基底层细胞过度增殖、毛囊发育不良、表皮形态紊乱及皮肤屏障功能缺陷[26, 27]，表明miR-203对干细胞的增殖分化、皮肤发育及功能维持具有重要作用。总之，miR-203对皮肤发育的调控有如下特点：在脊椎动物皮肤中的表达具有高度的保守性[54]；miR-203的表达有高度的时空特异性；miR-203参与诱导胚胎干细胞向角朊细胞的早期定向分化；miR-203参与调控角朊细胞增殖分化平衡，即miR-203正向调控角朊细胞的分化，负向调控角朊细胞分裂增殖，拮抗miR-203增强细胞增殖能力。

47

皮肤是人体最大的器官，具有保护机体、感[受刺激](http://www.wiki8.com/ciji_104431/)、调节[体温](http://www.wiki8.com/tiwen_48362/)、分泌和[排泄](http://www.wiki8.com/paixie_48392/)、渗透和[吸收](http://www.wiki8.com/xishou_40743/)、维持内环境稳定、参与[代谢](http://www.wiki8.com/daixie_104205/)和[免疫活动](http://www.wiki8.com/mianyi_106949/)等多种生理[功能](http://www.wiki8.com/gongneng_119143/)。表皮干细胞是皮肤组织中的特异性成体干细胞，主要位于表皮基底层和毛囊外根鞘膨凸部，具有慢周期性特点，即表皮干细胞绝大多数处于静息状态，分裂缓慢，但具有极强的增殖、分化潜能，在皮肤出现病理情况时能迅速进入细胞分裂周期，进行增殖与分化，在维持皮肤及其附属器正常的结构与功能、皮肤的创伤修复等方面发挥着重要作用，而角质形成细胞位于角质层，为已分化细胞。表皮干细胞与角质形成细胞增殖分化等生物学特性有着显著的区别，miR-203可能在其中起了重要作用，但目前对miR-203在表皮干细胞与角质形成细胞中的表达变化、作用及其机制尚不十分清楚。

已有研究证实ITGB1由增殖细胞特异性表达，而终末分化细胞不表达，其表达水平的高低与细胞克隆形成能力即细胞增殖力及多向分化潜能正相关，其主要在表皮基底层表达，是表皮干细胞的特征蛋白[56]。随着表皮干细胞的分化及表皮的分层，ITGB1表达水平逐渐减弱以至消失。角蛋白是上皮细胞特有的结构蛋白，是细胞骨架蛋白的主要成分，随着表皮细胞增殖分化程度的不同而表达不同的角蛋白，因而可用于鉴别表皮干细胞和角质形成细胞。CK19与ITGB1类似，主要由增殖期的细胞表皮干细胞表达，其表达水平随着表皮干细胞的分化而降低，在终末分化细胞无表达。而CK1、CK10主要在基底上层已行终末分化的角质形成细胞胞浆中表达，是成熟表皮即高分化的角质形成细胞的特征蛋白[8, 57]，是表皮干细胞的阴性表面分子标志。本研究采用免疫细胞化学染色鉴定表皮干细胞及角质形成细胞结果亦显示人表皮干细胞阳性表达ITGB1及角蛋白19，角质形成细胞阳性表达角蛋白1及角蛋白10。同时，在上一章的实验中通过基因芯片技术比较人表皮干细胞与角质形成细胞之间miRNA的表达差异时发现，miR-203在表皮干细胞中下调最显著。本章进一步采用RT-PCR技术检测人表皮干细胞及角质形成细胞中miR-203基因表达水平，结果亦显示miR-203在角质形成细胞中表达明显高于表皮干细胞，与基因芯片结果一致；同时发现，

p63的mRNA和蛋白在角质形成细胞中的表达量明显低于表皮干细胞，且与miR-203表达量明显负相关，即miR-203与p63的表达模式相互排斥，提示在表皮中p63可能是miR-203的靶基因之一，miR-203可能通过转录后抑制p63调控表皮细胞的增殖分化。

人的p63基因定位于3q27.29，是肿瘤抑制基因p53家族成员之一,与p53 有

48

高度的序列和结构同源性，但p63基因亚型繁多，结构更为复杂，主要包含N-末端的转录激活区、核心DNA结合区、寡聚化区、C-末端SAM区。根据转录起始部位的不同，p63基因被分为两大类，△Np63和TAp63, 根据C-末端剪接不同又分为p63α、p63β、p63γ三类，即p63基因主要亚型包括△Np63α、△Np63β、

△Np63γ、TAp63α、TAp63β、TAp63γ，各种亚型的具体功能、相互调控机制尚不十分明确[58]。研究显示作为转录因子的p63基因与细胞增殖、凋亡、细胞周期、细胞信号传导及组织发育关系密切[59]，在上皮组织尤其是表皮的发育中起着独特作用[60]。免疫组化分析显示p63蛋白主要表达于上皮组织的基底层具有高度增殖能力和分化潜能的细胞和起源细胞中，如表皮、汗腺、毛囊、舌、食道及泌尿生殖器的上皮中[61]，与miR-203在表皮中的表达模式恰好相反。在胚胎发育阶段，p63不仅决定外胚层有关细胞分化为上皮干细胞，且作为分子开关使外胚层感应复层化指令继而启动上皮发生层化，是最初上皮分层所必需的[62]。研究发现若敲除小鼠p63基因，则小鼠外胚层顶脊发育缺陷，出生后表现为肢体变短甚至缺如、皮肤、牙齿、唾液腺、乳腺、前列腺和尿道上皮等结构缺陷；表皮没有正常的层次结构，仅为一单层扁平细胞，没有棘细胞层、颗粒细胞层及角化层，完全丧失了正常的鳞状上皮结构，小鼠出生数小时后因脱水而死亡

[63]. 且p63在皮肤附属器官中的分化中亦具有重要作用，p63缺失的小鼠不能形成正常的皮肤附属器[64]。在表皮成熟阶段，p63主要在基底层和毛囊等能增殖的细胞中表达，而在已分化细胞层的表达是下降的，被认为是维持表皮及其它复层上皮组织干细胞增殖潜能的必需因子。p63能够促进细胞周期的G1/S期转化，在维持表皮及其他复层上皮基底层干细胞的增殖潜能发挥重要作用，而p63表达水平下降是脊椎动物表皮干细胞分化为角质形成细胞的必要条件[65]。实验显示小鼠△Np63α可以阻滞钙离子诱导的表皮细胞分化，从而维持细胞的增殖状态[66]。在对斑马鱼的研究中发现斑马鱼若缺乏△Np63，表皮细胞则不能增殖

[67]. 总之，p63承担着双重角色：在胚胎发育阶段的表皮发育中启动层化现象，在表皮成熟阶段维持基底细胞的增殖潜能。miRBase数据库显示成熟的miR-203基因序列为：5’-GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG-3’，p63的mRNA３′非翻

译区序列为：5’-GAGAAUGAGUCCUUGAUUUCAAA- 3'，利用TargetScan 6.2

预测miR-203与p63基因序列结合位点为：

P63 3'UTR 5'-GAGAAUGAGUCCUUG- - AUUUCAAA- 3'. Hsa-miR-203 3'- GAUCACCAGGAUUUGUAAAGUG - 5'

49

生物学信息表明，miR-203基因与p63的mRNA３′非翻译区序列匹配，即

p63 的mRNA 3'非翻译区存在miR-203的靶序列，p63的mRNA可能是miR-203

的靶基因, miR-203通过特异性地靶向作用于p63的mRNA３′非翻译区直接调控

p63.

结合本章研究结果推测，表皮干细胞离开基底层向角质形成细胞分化的一个重要机制可能是miR-203通过靶向结合p63mRNA３′非翻译区在转录后水平下调p63的表达水平，进而影响相关的细胞转导通路，从而使表皮基底层干细胞增殖潜能受到限制，克隆形成能力下降，G1/S期转化受阻，G0/G1期的细胞显著增加，最终干细胞退出细胞周期，开始分化形成复层上皮。miR-203在皮肤发育中的这种时空特异性的表达模式可能作为开关调控细胞的增殖和分化，即miR-203在增殖分裂能力强的表皮干细胞中低表达，在已分化的角质形成细胞中高表达，且这种开关作用是依赖于p63的，高表达的miR-203通过下调p63的表达抑制干细胞的增殖能力及克隆形成率，诱导并促进高增殖状态的干细胞离开基底层并逐渐迁移到皮肤表层，向无分裂能力的角质形成细胞分化，并形成复层上皮从而建立起皮肤的防护层，即通过抑制“干性”促进表皮成熟，从而参与皮肤的发育。相反若拮抗了miR-203的功能，则无法关闭p63的作用，表现为皮肤角朊细胞增殖显著加快，皮肤无法形成坚实的保护层。

当前皮肤组织工程应用受限的主要原因是皮肤种子细胞来源不足，根据此实验结果设想，可以通过下调角质形成细胞的miR-203以诱导其去分化为干细胞，为组织工程皮肤提供新的种子细胞来源；另一方面，可以通过上调miR-203的表达优化复层表皮及附属器的形成，为实现创面的解剖修复与功能修复提供线索及实验依据，为miRNA的临床应用奠定基础。

### **3.4** 小结

（1）miR-203在体外培养人表皮干细胞中的表达明显低于角质形成细胞，而p63在人表皮干细胞中的表达显著高于角质形成细胞，miR-203与p63基因及蛋白表达呈负相关。

（2）p63的mRNA可能是miR-203的靶基因，miR-203可能通过抑制p63

参与调控表皮细胞的增殖分化。

50

# **第 4** 章**miR-203**下调促进人角质形成细胞去分化形成表皮样干细胞

皮肤作为机体与外界的机械屏障，具有保护、感觉、调节体温、分泌排泄、维持内环境稳定等重要生理功能，同时也是烧伤或创伤后最容易受损的器官。尤其是大面积深度烧伤严重破坏了患者皮肤的完整性，为了实现对重度烧伤患者创面的解剖修复首先要封闭裸露的创面，否则患者常常出现重度烧伤休克、感染、多脏器功能衰竭等严重并发症，甚至死亡。临床上对皮肤大面积缺损的治疗主要采用自体、同种异体或异种皮肤移植术覆盖创面。但自体移植存在的主要问题是供皮来源有限，同时又要牺牲人体正常组织作为代价，而同种异体、异种移植面临免疫排斥反应等风险，使皮肤移植术的临床应用受到限制。组织工程学的突飞猛进为皮肤缺损的治疗提供了新方法。干细胞具有强大的自我更新能力及多向分化潜能，是构建组织工程皮肤的理想种子细胞。干细胞包括胚胎干细胞及成体干细胞，胚胎干细胞引起的伦理学争议和免疫排斥的风险限制了它的临床应用，而成体干细胞即表皮干细胞数量很少（约占表皮基底细胞的

1％～l0％左右），加上烧伤后表皮干细胞残存数量进一步减少，因此种子细胞的来源不足成为制约组织工程技术在烧伤创面应用的瓶颈。

传统观念认为，哺乳动物的组织和器官受到损伤后，只能依靠体内数量不多的干细胞储备来进行再生修复。然而，近年许多关于哺乳动物分化成熟的细胞在一些因素的诱导下去分化形成干细胞的研究，改变了人们对创伤修复再生的传统认识[68]。本课题组前期研究发现表皮特有的miR-203在角质形成细胞的表达明显高于表皮干细胞，且证实miR-203低表达是维持干细胞增殖潜能的重要因素，而miR-203高表达促进表皮的分化与成熟。下调miR-203能否诱导人角质形成细胞向表皮样干细胞去分化，且这种去分化来源的表皮样干细胞与机体自身来源的表皮干细胞在形态和生物学特性方面是否一致，目前尚不清楚。本章研究设计合成了miR-203抑制物，通过脂质体转染将其导入人角质形成细胞，探索体外诱导人角质形成细胞向表皮样干细胞去分化的可能性，为组织工程皮肤提供新的种子细胞用于皮肤损伤重建和再生，为实现创面的解剖修复提供一

51

条理想途径。

### **4.1** 材料与方法

### **4.1.1** 研究对象

以包皮组织作为本章实验研究对象，标本取材于2014年2-4月在泌尿外科行包皮环切术的健康青年男性，共计5例，年龄18～40岁，平均26岁。所有取材均经患者知情同意，研究方案经医学伦理委员会审核批准。

### **4.1.2** 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 兔抗人 ITGB | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK1 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK10 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK19 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 β 肌动蛋白 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| 兔抗人 P63 | 美国 Abgent 公司 |
| K -SFM | 美国 Gibco 公司 |
| EGF | 美国 Gibco 公司 |
| 0.25％胰蛋白酶-EDTA | 美国 Gibco 公司 |
| FBS | 美国 Gibco 公司 |
| IV 型胶原 | 美国 Sigma 公司 |
| D-Hanks 液 | 美国 Hyclone 公司 |
| Opti-MEM 培养基 | 美国 GIBCO 公司 |
| TRIZOL | 美国 Invitrogen 公司 |
| PBS | 美国 Gibco 公司 |
| FAM 标记的人 miR-203 抑制物 | 中国上海吉玛制药技术有限公司 |
| FAM 标记的对照 miRNA 抑制物 | 中国上海吉玛制药技术有限公司 |
| 脂质体 Lipofectamine 2000 转染  试剂 | 美国 Invitrogen 公司 |

52

|  |  |
| --- | --- |
| HRP 标记的ft羊抗兔二步法免疫组织化学检测试剂盒 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| ft羊抗兔 IgG-HRP 二抗 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| 注射用庆大霉素 | 中国华北制药股份有限公司 |
| mirVana™miRNA 纯化试剂盒 | 美国 Ambion 公司 |
| Super-Bradford 蛋白定量试剂盒 | 中国北京康为世纪生物科技有限公司 |
| 互补 DNA 反转录试剂盒 | 日本 TaKaRa 公司 |
| SYBR Ｇreen 荧光定量试剂盒 | 日本 TaKaRa 公司 |
| 去氧胆酸钠 | 美国 Biosharp 公司 |
| 甘氨酸 | 美国 Sigma 公司 |
| PMSF | 美国 Sigma 公司 |
| Bromopheenol blue | 美国 Sigma 公司 |
| 二硫苏糖醇（DTT） | 美国 Sigma 公司 |
| Tris－Base | 中国北京索莱宝科技有限公司 |
| ECL | 中国北京普利莱基因技术有限公司 |
| PVDF 膜 | 中国北京索莱宝科技有限公司 |
| 十二烷基硫酸钠（SDS） | 美国 Sigma 公司 |
| 考马斯亮兰 G250 | 美国 Sigma 公司 |
| N,N,N',N'- 四 甲 基 乙 二 胺  （TEMED） | 美国 Sigma 公司 |
| N,N'-亚甲双丙烯酰胺 | 美国 Sigma 公司 |
| Tween-20 | 美国 Sigma 公司 |
| 过硫酸胺（APS） | 美国 Amresco 公司 |

### **4.1.3** 主要仪器设备与耗材

|  |  |
| --- | --- |
| Sw-CJ-lF 无菌超净工作台 | 苏州安泰空气技术公司 |
| CX40 型普通光学显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| CK40 倒置相差显微镜 | 日本 Olympus 公司 |

53

|  |  |
| --- | --- |
| CKX41 型倒置荧光显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| NanoDropND-1000 紫外分光光度计 | 美国 NanoDrop 公司 |
| 二氧化碳培养箱 | 德国 Thermo-BB15 公司 |
| FACSCalibur 流式细胞仪 | 美国 BD 公司 |
| LDZS-2 型自动平衡离心机 | 中国上海医用分析仪器厂 |
| Image-proplus6.0 图像分析软件 | 美国 MediaCyberneties 公司 |
| 7900 HT 实时定量 RT-PCR 系统 | 美国 ABI 公司 |
| 垂直电泳槽 | 中国北京六一仪器厂 |
| 水平电泳槽 | 中国北京六一仪器厂 |
| DYCZ-40D型转移槽 | 中国北京六一仪器厂 |
| FA 型电子分析天平 | 中国上海恒平科学仪器有限公司 |
| TGL-16C 型高速台式离心机 | 中国上海安亭科学仪器厂 |
| WD-9403D 型紫外仪 | 中国北京六一仪器厂 |
| 凝胶成像分析系统 | 中国北京君意东方电泳设备有限公司 |
| MultiskanSpectrumMicroplate 酶标仪 | 德国 Themo 公司 |
| HH-W420 型恒温水浴箱 . | 中国江苏荣华仪器制造有限公司 |
| 恒温干燥箱 | 中国上海康路仪器设备有限公司 |
| PHS-TP型酸度计 | 中国上海大普仪器有限公司 |
| 自动双重纯水蒸馏器 | 中国上海亚荣生化仪器厂 |
| -80°C 超低温冰箱 | 中国青岛海尔有限公司 |
| -20°C 超低温冰箱 | 中国青岛海尔有限公司 |
| 制冰机 | 美国 MVE 公司 |
| 系列可调式微量移液枪 | 德国 Eppendorf 公司 |

耗材：50ml细胞培养瓶、六孔细胞培养板、35mm细胞培养皿、15ml离心管

（美国Corning公司）、一次性无菌橡胶手套、封口胶、l.5mlEp管、各种规格吸头、一次性注射器、酒精棉球、口罩等。

### **4.1.4** 人角质形成细胞的分离培养

54

采用体积分数0.25%胰蛋白酶-EDTA联合消化法分离表皮与真皮，应用Ⅳ型胶原快速黏附法筛选细胞悬液获得人角质形成细胞，在加入EGF的K-SFM中体外培养，2-3天换液1次，倒置相差显微镜观察细胞分离即刻及培养３ｄ的生长及形态变化情况。具体步骤如下：

(1)无菌条件下取下的健康人包皮标本5块，用碘伏棉球擦拭标本，生理盐水将标本冲洗干净，置于超净工作台，用刀片将标本的皮下组织及结缔组织小心刮除；

(2)将皮肤标本置于无菌容器中，加入庆大霉素(1600u/mL)浸泡3min，再以无菌PBS液漂洗3遍，每遍2min；

(3)用无菌眼科剪将皮肤标本剪成0.5cm×0.3cm的皮条片置入无菌培养瓶中，滴加0.25%胰蛋白酶-EDTA液（体积比为1: 5），放入4℃冰箱过夜消化8-9h；

(4)用PBS将IV型胶原稀释成100mg/L，取适量均匀涂被后将培养瓶（板）置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中风干备用；

(5)取出消化过夜后的皮条片标本放于无菌培养皿中，滴加少许含FBS的培养基终止消化，D-Hank'S平衡盐液将标本漂洗2遍，每遍2min；

(6)用无菌眼科镊小心撕下表皮层放入另一无菌培养皿中，弃真皮，用无菌眼科剪将撕下的表皮充分剪碎后，放入无菌培养瓶或无菌试管中，加入适量无菌PBS液反复充分吹打，经200目筛网将混悬液过滤至离心管，离心，1000rpm×5min ；

(7)吸除上清后于离心管中加入K-SFM培养基吹打制成细胞悬液，常规细胞计数，将细胞浓度调整为1×10 5/L，接种于预处理好的Ⅳ型胶原培养板（瓶）中，置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养；

(8) 20min后将培养液及悬浮细胞吸出移至离心管中，离心，1000rpm×5min。吸除上清后于离心管中滴加含10ug/L EGF的K-SFM培养基制成细胞悬液，调整细胞浓度为1×10 5/L 接种于铺满Ⅳ型胶原的无菌培养板（瓶）中，继续置于

37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养；

(9) 20min后再次将培养液及悬浮细胞吸出离心，1000rpm×5min。吸去上清后于离心管中滴加含10ug/L EGF的K-SFM培养基制成细胞悬液，调整细胞浓度为1×10 5/L接种于无菌培养板（瓶）中，置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养；

(10)每隔2-3天换液1次。倒置相差显微镜观察细胞分离即刻及培养３ｄ

55

的生长及形态变化情况，取培养1周的细胞进行后续实验。

### **4.1.5** 人角质形成细胞的鉴定

将无菌的行免疫细胞化学染色鉴定专用玻片置于培养皿内，将2-3滴人角质形成细胞悬液（细胞密度为1×10 5/ml）接种于玻片上，置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养，24h后取出细胞爬片，采用HRP标记的ft羊抗兔二步法免疫组织化学检测试剂盒分别行CK19、ITGB1、CK1、CK10的免疫细胞化学染色（PV-9000法）。具体步骤如下：

(1)取细胞爬片，用pBS液(pH7.4)轻轻冲洗三遍，每遍3min。取4℃冰丙酮将其固定5min后，再次用PBS液冲洗3遍，每遍2min；

(2)每张玻片滴加1滴0.5%TritonX-100，孵育10min后用pBS浸泡三遍，每遍3min；

(3)每一张玻片加1滴3%过氧化氢去离子水，室温下孵育10min,以阻断内源性过氧化物酶活性，用PBS液小心冲洗3遍，每遍2min；

(4)每张玻片分别加1滴兔抗人CK19、ITGB1、CK1、CK10一抗(1: 150)，

（PBS取代一抗作为阴性对照），置入37℃保温箱中孵育2h，用PBS液冲洗3遍，每遍2min；

(5)每张玻片滴加1滴试剂1（Polymer Helper），于37℃保温箱中孵育20min，用PBS液小心冲洗3遍，每遍2min；

(6)每张玻片滴加1滴试剂2 （poly peroxidase-anti rabbit IgG），于37℃保温箱中孵育20min，用PBS液小心冲洗3遍，每遍2min；

(7)每张玻片加2滴新鲜配制的DAB溶液，显微镜下观察3-10min，适时终止显色；

(8)将玻片置于自来水下冲洗、苏木素复染0.5min、自来水冲洗返蓝5min、梯度酒精脱水干燥、二甲苯透明，最后中性树胶封片。将玻片置于400倍显微镜下观察并拍照，细胞呈棕黄色为阳性表达。

### **4.1.6** 人**miR-203**抑制物对人角质形成细胞的瞬时转染

根据人源miR-203序列，设计并合成其单链抑制物：FAM标记的人miR-203抑制物(miR-203 inhibitor-FAM)及FAM标记的对照miRNA抑制物(miRNA inhibitor NC-FAM). 运用脂质体Lipofectamine 2000转染试剂将抑制物分别瞬时

56

转染人角质形成细胞，操作步骤严格按脂质体Lipofectamine 2000说明书进行。具体步骤如下：

(1)转染前一天，将人角质形成细胞以5×10 5/孔的密度消化接种于6孔板中，在37℃、5%CO2的培养箱中培养24h左右，使转染时的细胞密度达到60%～80%；

(2)转染当天将Opti-MEM培养基放于37℃孵箱中预热1h左右；将6孔板中的培养基吸除，每孔加入1.5ml 预热好的Opti-MEM培养基；

(3)稀释lipo2000：取5μl/孔lipofectamine2000（使用前轻轻摇匀后放置室温），用250μl 的Opti-MEM稀释，轻柔混合均匀后在室温下孵育5min；

(4)稀释siRNA: 取10μl/孔miR-203 inhibitor-FAM或miRNA inhibitor NC-FAM，分别用250μl 的Opti-MEM稀释，轻轻混合均匀，在室温下孵育5min；

(5)将稀释好的并孵育5min后的lipofectamine2000试剂分别和miR-203 inhibitor-FAM、miRNA inhibitor NC-FAM轻柔混合均匀，室温下放置20分钟，以便形成siRNA/lipofectamine复合物。稀释好的lipofectamine2000需在25min之内与稀释好的siRNA混合。混合试剂时不能剧烈吹打或振荡，手指轻弹管壁即可，过度用力可能会破坏试剂中脂质体结构及影响siRNA-lipo2000混合物的形成；

(6)将500μl /孔siRNA/lipofectamin复合物加到6孔板各孔中，来回轻柔左右摇晃细胞培养板，置于37℃、5%CO2的培养箱中培养6 h；

(7)转染6 h后将孔里含有siRNA-lipo2000混合液的培养基吸除，更换新鲜的K-SFM培养基，于倒置荧光显微镜下观察转染情况。观察时先使光路对准没有转染荧光标记siRNA的孔，调好焦距后将光路转向对准转染孔，打开激发光后马上观察拍照，并在同一视野中拍下明场的细胞照片作为对比。观察绿色荧光蛋白（FAM）的表达情况，并按公式计算转染率=荧光视野细胞数/明视野细胞数×100%，同时用FACSCalibur流式细胞仪检测转染效率；

(8)更换培养基后将培养皿置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%培养箱继续孵育。72 h后倒置相差显微镜下观察转染后细胞生长情况及形态变化，并收集细胞测定相关指标的mRNA及蛋白表达情况；

(9)整个操作过程尽量避光，转染操作尽量迅速，操作时间尽量短，操作完毕后，尽快将培养板放入培养箱孵育。

流式细胞仪检测转染效率步骤：

57

(1)用0.25%的胰酶消化每组细胞，数分钟后细胞呈悬浮状态时，滴加含

10%FBS的培养基终止消化，离心，l000 rpm×5min ；

(2)用PBS液轻轻洗涤细胞2次，1000rpm离心5min；收集1～5×10 5细胞；

(3)每管中加入1ml PBS重悬细胞，轻轻摇匀，样品上流式细胞仪检测各组细胞FAM荧光表达情况，计算转染率。并重复进行3次。

### **4.1.7** 转染后免疫细胞化学染色鉴定

人角质形成细胞分别转染FAM标记的人miR-203抑制物（实验组）及FAM标记的对照miRNA抑制物（对照组），并于37℃、5%CO2、饱和湿度95%培养箱孵育72 h后，采用HRP标记的ft羊抗兔二步法免疫组织化学检测试剂盒以PV-9000二步法对2组细胞行ITGB1、CK19、CK1、CK10免疫细胞化学染色观察，严格按试剂盒说明书进行操作。具体步骤同4.1.5。

### **4.1.8** **RT-PCR**检测

取人角质形成细胞转染前及实验组、对照组转染72 h后的细胞，采用实时荧光定量RT-PCR方法检测3组细胞miR-203、p63、ITGB1、CK19、CK1、CK10的mRNA表达情况。

#### **4.1.8.1** 总**RNA**的提取

Trizol法分别提取人角质形成细胞转染前及转染miR-203 inhibitor-FAM（实验组）和miRNA inhibitor NC-FAM (对照组) 72 h的总RNA，具体操作如下：

(1)从保温箱中取出六孔板，移入超净工作台。吸除细胞培养液，每孔加1ml

4℃无菌预冷的PBS(pH7.2-7.4)液漂洗3次，以洗净培养液。吸除PBS液，每

10cm2加1ml的预冷的Trizol，用细胞刮轻轻刮取细胞将其转移到1.5ml的离心管中；

(2)用1ml 的移液管反复充分吹打，混合均匀，使细胞完全溶解，并冰浴

5min；

(3)每1ml的Trizol加0.2 ml氯仿充分混合均匀，盖紧管口，上下颠倒摇60

次；

(4)冰浴5min后离心，4℃，12000 rpm，15min。可见管中的液体分为上（肉眼观察为无色液相，内含总RNA）、中（肉眼观察为白色乳状，含蛋白质）及下

（肉眼观察为红色，含DNA）三相；

58

(5)小心吸取上层无色液相（约500μl），移入另一经DEPC水预处理的1.5 ml

EP管中，加入500μl的冰异丙醇，轻轻上下颠倒数次充分混匀，然后置入-20℃冰箱沉淀10min；

(6)取出，离心，4℃，12000 rpm，10min，弃上清。在管中先加750μl无水乙醇，再加250μl DEPC水，轻轻上下颠倒几次以充分洗涤RNA沉淀后再次离心，4℃，8000rpm，5min；

(7)弃上清，在管中加1ml无水乙醇，再离心，4℃，8000rpm，5min；移入超净台，弃上清；

(8)静置1-2分钟（超净台鼓风），加入10-15μl DEPC水溶解。

#### **4.1.8.2** **RNA**质量检测

采用NanoDrop ND-1000全波长紫外／可见光扫描分光光度计来检测RNA样品总RNA的浓度和纯度，计算OD260／OD280比值（1.7～2.1时合格）及RNA浓度；甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。

总RNA的浓度和纯度测定具体步骤如下：

(1)滴加0.1%DEPC水先给比色仪调零；

(2)每组各取1µl的RNA样品，用49µl 0.1%DEPC水稀释50倍，用加样器充分吹打混匀。用DEPC水标记空白，吸取DEPC水50μl加入比色杯中，采用NanoDrop ND-1000 型紫外分光光度计来检测RNA 样本的OD260nm 和OD

280nm, RNA260nm 吸收达峰值，蛋白280 nm 吸收达峰值，按以下公式计算

RNA浓度和纯度：

RNA浓度（µg/µl）=OD260nm×50×40

RNA纯度=OD260nm/OD280nm，理想纯度的RNA是其OD260/OD280的比值介于1.8和2.1之间，比值接近或大于1.8，说明RNA纯度较高，没有蛋白质的残余；而如果OD260 / OD280的比值> 2.1或者<1.6，说明RNA样品中有蛋白质、酚等污染。

RNA完整性的检测具体步骤如下：

(1) 1×TBE电泳缓冲液的制备：取7.44g EDTA、108gTris、55g硼酸入烧杯中，加入800ml去离子水，充分混匀；用NaOH将其pH值调至8.3，再次加去离子水至1L，室温下保存，使用时再稀释10倍；

(2)甲醛变性琼脂糖凝胶的制备：取30ml的1×TBE电泳缓冲液，加入0.45g

59

琼脂糖，于微波炉中加热使其完全溶化，轻轻摇动使电泳缓冲液与琼脂糖充分混匀，直至颗粒状悬浮物消失，室温下冷却至60℃，加入600μl甲醛，充分混匀，倒入RNA专用的制胶器中，室温静置30min后可使用；

(3)准备RNA样品：取500 ng RNA样本加入无菌DEPC水至6μl，再加入2μl EtBr (1.0 mg/mL)及2μl RNA上样缓冲液，充分混匀，孵育，65℃×5min，再置于冰上骤冷2min以上；

(4)电泳：先凝胶预电泳5-10分钟，随后将RNA电泳检测样品加入至上样孔中，调节电压为120-130V，时间设置为15-20min；

(5)成像：电泳结束后，凝胶成像仪照像；

(6)理想结果：RNA样品条带清晰，28S: 18S rRNA条带亮度大于或接近

2: 1。

#### **4.1.8.3** **RNA**的纯化

取10-20μg质检合格的各样本细胞总RNA，用mirVana™miRNA纯化试剂盒进行纯化，具体步骤如下：

(1)每组样本各取10-20μg 总RNA 加入EP 管中，注入5 倍体积的

Lysis/Binding缓冲液，充分混合均匀；

(2)加十分之一体积的miRNA 匀浆添加剂，充分混合均匀，冰上孵育

10min；

(3)加三分之一体积的100％乙醇，充分混合均匀；

(4)将上述混合液加入滤管中，离心，5000rpm×lmin，收集滤液；

(5)加入三分之二体积的100％乙醇于滤液中，充分混合均匀；

(6)置换滤管，将⑤的混合物过滤，离心，5000rpm×lmin，弃除滤液，继续使用收集管；

(7)将滤管放于收集管中，取700μlmiRNA 洗涤液清洗滤管，离心，

5000rpm×lmin，弃去滤液；

(8)取500μlmiRNA洗涤液清洗滤管，离心，5000rpm×1min，弃除滤液；再以miRNA洗涤液清洗一遍；将滤管连同收集管离心，10000rpm×lmin，弃除滤管中残留液体；

(9)置换一个新的收集管，将50μl 95℃的洗脱液加入滤器中，盖紧，室温下孵育2min；离心，10000 rpm×lmin，收集滤液。重复此步骤。纯化后重新定量。

60

#### **4.1.8.4** **RT-PCR**检测**miR-203**

总RNA逆转录反应(RT)

以总RNA为模板，逆转录成cDNA，反应体系的配制如下：

RNA样本100ng

50×SYBR Green Solution 1µl

无核酸酶超纯水至总体积12.3µl，孵育，

65℃×5 min；冰上放置2 min

dNTP混合物0.5µl

RNase Inhibitor 0.2µl

0.1M DTT 2µl

M-MLV反转录酶1µl

5×First -Strand缓冲液4µl

总体积20µl

逆转录反应条件：在PCR仪上进行，16℃×10 min；37℃×30 min；65℃×5

min。

定量PCR 反应

由美国Invitrogen公司设计引物，U6作为内参，进行归一化。引物序列见表3.1。

miRNA RealTime PCR反应体系的配制如下：

miRNA cDNA样本1µl

Power SYBR Green PCR Master Mix (2×) 10µl

正义引物(10µM) 0.5µl

反义引物(10µM) 0.5µl

无核酸酶超纯水8µl

总体积20µl

进行定量PCR反应条件：95℃变性10 min；95℃退火15 s；60℃延伸l min，循环40次；60-95℃绘制溶解曲线。

根据收集荧光建立的标准曲线获得各组样本miR-203相关的Ct值（每个样本测量3次，取平均值）。采用2-△△Ct方法计算miR-203基因相对表达量。具体方法如下：目标基因△Ct值=目标基因Ct值－同一样本U6Ct值；目标基因△△Ct

61

值=处理组△Ct值－对照组△Ct值，再计算2-△△Ct 值

#### **4.1.8.5** **RT-PCR**检测**p63**、**ITGB1**、**CK19**、**CK1**、**CK10**

取人角质形成细胞转染前及实验组、对照组转染72 h后的细胞，采用实时荧光定量RT-PCR方法检测3组细胞p63、ITGB1、CK19、CK1、CK10的mRNA表达情况。

每个样本各取0.2ul总RNA以OligdT为反转录引物，应用反转录试剂盒合成总互补DNA。采用引物设计软件PrimerPremier5.0设计p63、ITGB1、CK19 、

CK1、CK10及内参照β肌动蛋白的PCR引物，并经blast进一步验证。引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。p63及β肌动蛋白的引物序列见表

### 3.2 ，ITGB1、CK19 、CK1、CK10引物序列见表4.1。反转录产物采用SYBR Ｇ

reen荧光定量试剂盒和荧光定量RT-PCR行PCR。

表4.1 实时荧光定量RT-PCR引物序列及产物大小

| 基因名称 | 引物序列（5’→3’） | 产物大小 |
| --- | --- | --- |
| ITGB1 上游引物 | TTCCCTTTCCTCAGAAGTCATT | 106 |
| ITGB1 下游引物 | ATTTTCCCCTGTTCCATTCAC |  |
| CK19 上游引物 | GATAGTGAGCGGCAGAATCAG | 185 |
| CK19 下游引物 | AAGACACCCTCCAAAGGACAG |  |
| CK1 上游引物 | GAAGGATGTGGATGGTGCTTAT | 112 |
| CK1 下游引物 | CTGAGACAACTCTGCTTGGTAGA |  |
| CK10 上游引物 | ACTACTCTTCCTCCCGCAGTG | 221 |
| CK10 下游引物 | ACCTCCACCAAAACCTCCTAAT |  |

总RNA逆转录反应(RT)

以总RNA为模板，逆转录成cDNA，反应体系的配制如下：

RNA样本0.2 ul

5×PrimeScript缓冲液2 ul

PrimeScript[逆转录](http://www.baidu.com/s?wd=%E9%80%86%E8%BD%AC%E5%BD%95&amp;hl_tag=textlink&amp;tn=SE_hldp01350_v6v6zkg6)酶0.5 ul

Oligo (dT) Primer 0.5 ul

Radom 6 mers 0.5 ul

无核酸酶超纯水加至10 ul

逆转录反应条件：在PCR仪上进行，37℃×15 min；85℃×5 sec。定量PCR反应

PCR反应体系的配制如下：

62

mRNA cDNA样本2µl

SYBR®Premix Ex Taq™10µl

正义引物(10µM) 0.4µl

反义引物(10µM) 0.4µl

ROX Reference Dye(50×) 0.4µl

灭菌蒸馏水6.8µl

总体积20µl

定量PCR反应条件：95℃变性10 min；95℃退火15 s；60℃延伸l min，循环40次；60-95℃绘制溶解曲线。

根据收集荧光建立标准曲线获得Ct值（每个样本测量3次，取平均值）。采用2-△△Ct方法计算基因相对表达量。具体方法如下：目标基因△Ct值=目标基因Ct值－同一样本内参β-actin值；目标基因△△Ct值=处理组△Ct值－对照组△Ct值，再计算各组样本2-△△Ct值。

**4.1.9** **Western blot检测**

取人角质形成细胞转染前及实验组、对照组转染72 h后的细胞，采用Western

blot法检测3组细胞p63、ITGB1、CK19、CK1、CK10蛋白相对表达量。

#### **4.1.9.1** 配制试剂

（l）母液的配制

A: 40%丙烯酰胺贮存液（Acr/Bic）的配制：37.5g丙烯酰胺(Acr)加1.0g

甲叉双丙烯酰胺(Bic)加 100ml 超纯水溶解，棕色瓶 4℃保存。B: 浓缩胶缓冲液（1M Tris. HCl, pH6.8）的配制：取6.06g Tris-base 加

50ml蒸馏水溶解后，用浓盐酸调pH至6.8。

C：分离胶缓冲液（1.5M Tris. HCl, pH8.8）的配制：取45.43gTris-base加200ml蒸馏水溶解后，用浓盐酸调pH至6.8,再加蒸馏水至250ml，室温下保存。

D: 10%SDS的配制：取10gSDS加蒸馏水至100ml，500℃水浴溶解后，室温保存。

E: 10%过硫酸胺(AP)的配制：0.1g过硫酸胺加l.0ml超纯水溶解后，立即分装于50µl离心管中，置于-20℃避光保存。

F: 1.0mol/L的Tris HCl的配制：30.29g Tris加100ml蒸馏水溶解后，用浓

63

盐酸调配pH值（如下所示）：

PH HCl

7.4 约17ml

### 7.5 约16ml

7.6 约15ml

8.0 约10ml

G: 0.2mol/L NaH2PO4的配制：12g NaH2PO4加蒸馏水至500ml溶解后，高压灭菌，室温保存。

H: 0.2mol/L Na2HPO4的配制：71.6g Na2HPO4加蒸馏水至1000ml溶解后，高压灭菌，室温保存“

I: 10mM单去污剂裂解液(PMSF)的配制：0.174g PMSF加100ml异丙醇溶解后，分装于1.5ml离心管中，-20℃保存。

J: 20% Tween20的配制：20g Tween20加100ml蒸馏水混匀后4℃保存。

（2）使用液的配制

A: G250考马斯亮蓝溶液的配制：100mg考马斯亮蓝G250加50ml的95%

乙醇加100ml磷酸加2000ml蒸馏水混匀后4℃保存。

B：脱色液的配制：取45ml甲醇，先后加10ml冰乙酸及45ml双蒸水混匀。

C: 还原型SDSS(x)上样缓冲液的配制：0.5mol/LTris HCl(pH6.8) 2.5ml

溴酚蓝0.025g

二硫叔糖醇0.39g

SDS 0.5g

甘油2.5ml

混匀后4℃保存。

D: 单去污剂裂解液(PMSF):取2.5ml的1mol/L的Tris. HCl(pH8.0)加0.438g

NaCl加0.5ml TritonX-100加100ml蒸馏水混匀后4℃保存，使用时加入PMSF

至终浓度为100µg/ml(0.87ml裂解液加入10mM PMSF50µl). E: 电泳液缓冲液的配制：3.03gTris加18.77g甘氨酸加1.0g SDS加蒸馏

水至1000ml，调pH值至8.3，溶解后室温保存。

F：转膜缓冲液的配制：

Tris 5.8g

64

甘氨酸 2.9g

SDS 0.37g

甲醇 200ml

蒸馏水 至 1000ml，调 pH 值至 8.3

G: RlPA裂解液:50mM Tris. HCl pH7.4加150mM NaCl加lmM PMSF加lmM

EDTA加l%TritonX-100加l%脱氧胆酸钠加0.1%SDS。

H: 0.0lmol/L PBS(PH7.2-7.4) 的配制：19ml的0.2mol/L的NaH2PO4加8lml

的0.2mol/L的Na2HPO4加17g NaCl加2000ml蒸馏水溶解，室温下保存。

I: 0.15mol/L NaCl的配制：0.877g NaCl加100ml蒸馏水，高压灭菌，室温保存。

J: 100mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的配制：0.1gBSA加0.15mol/LNaCl 1ml溶解后-20℃保存。制作蛋白标准曲线时，用0.15mol/L NaCl进行100倍稀释成lmg/ml，-20℃保存。

K: 10%分离胶的配制：40%Acr/Bic(37.5:1) 2.5ml

1.5Mol/L Tris HCl(PH8.8) 2.5ml

TEMED 5µl

10%AP(过硫酸胺) 50µl

10% SDS 100µl

超纯水4.85ml

L: 5%积层胶的配制：

30%聚丙烯酰胺(37.5:1) 0.83ml

1 mM Tris-HCl(PH6.8) 0.63ml

TEMED 5µl

10%AP(过硫酸胺) 50µl

10% SDS 50µl

超纯水3.4ml

M: TTBS缓冲液的配制：1.65ml 20%Tween20加700ml TBS混匀，现配现用。

N: TBS缓冲液的配制：10ml 1mol/L Tris HCI(pH7.5)加8.8g NaCl加蒸馏水至1000ml，混匀。

65

O：封闭液（含5％脱脂奶粉的TTBS液）的配制：5g脱脂奶粉（WB专用）加100ml TBST，现配现用。

P: 洗脱抗体缓冲液的配制：700µl 14.4mol/Lβ-巯基乙醇加12.5ml 0.5mol/L Tris HCI(PH6.8)加1g SDS加超纯水至100ml，混匀。

Q：显影液的配制：

米吐尔1.55g

自来水(50℃) 375ml

亚硫酸钠22.5g

碳酸钠33.75g

溴化钾20.95g

水加至500ml

4℃保存，使用时用自来水再稀释一倍。R：定影液的配制：

自来水(50℃) 700 ml

硫代硫酸钠240g

亚硫酸钠 15g

冰乙酸12.6ml

硼酸 7.5g

钾明矾 15g

水 加至 1000 ml

室温保存。

#### **4.1.9.2** 蛋白样品制备

(1)取培养的转染前人角质形成细胞及实验组、对照组转染72 h后的细胞，分别加入4℃预冷的PBS液，轻轻洗涤细胞三次，以去除培养液；

(2)用干净的细胞刮棒轻轻刮下细胞，将其转移到1.5ml EP管内，离心，1000

rpm，10分钟，弃去上清液；

(3)以1ml裂解液加10µPMSF(100mM)的比例配好，混匀置于冰上；

(4)将500µl含PMSF的去污裂解液加入每瓶细胞内，于冰上反复吹打裂解

30min；

(5) 4ºC 离心，12000r/min，10 min. 取上清置于-70ºC 保存。

66

#### **4.1.9.3** 蛋白质定量

采用中国北京康为世纪生物科技有限公司的Super-Bradford蛋白定量试剂盒进行。将A液与B液(50: l)混匀，室温下放置30min，将其加入96孔板中，每孔加入200µl，于每孔中加入不同浓度的标准品BSA（10mg/mlBSA 0ul、2.5ul、

5.0ul、7.5ul、10ul）以及待测样品10µl（加90ul生理盐水稀释），空白孔加入10 ul双蒸水调零，37ºC放置30min后在酶标仪上测定570nm吸光度值(OD值)，根据标准品的OD值绘制成标准曲线，计算出各个样品的蛋白质浓度。

#### **4.1.9.4** **SDS**－**PAGE**电泳

（l）将玻璃板清洗干净，晾干备用；

(2)灌胶：

玻璃板对齐，竖直卡在架子上。将配好的10%分离胶，加入TEMED后充分混匀但不要产生气泡，立即注入两层玻璃板间隙，等待胶面升到绿带中间线高度时，沿玻璃板壁缓慢加1ml异丙醇，室温聚合30min，弃去异丙醇，ddH2O冲洗胶顶面。将配好的5%积层胶，加入TEMED后立即充分摇匀，取3ml快速注入两层玻璃板间隙，将空隙灌满后迅速将梳子插入胶中，避免产生气泡，室温凝固30 min以上。聚合完全后小心取出梳子。

(3)电泳：

各组取20μg蛋白质样品，加入4倍体积的5×凝胶上样缓冲液混匀，水浴，100ºC，5 min后使用加样枪采用“对侧加样法”加样，将胶放置于电泳槽进行电泳。

电泳条件：将电泳装置连接电源，电压90 V，待溴酚蓝染料前沿进入分离胶后，电压升至120V，待溴酚蓝迁移至胶的前沿时，结束电泳，电泳时间一般

2h。

#### **4.1.9.5** 转膜

(1)准备l张7.3～8.6cm大小的PVDF膜和4张7.0～8.3cm大小的滤纸，浸泡于甲醇中3min后使用；

(2)搪瓷盘里放置转膜液、滤纸、浸泡了甲醇的PVDF膜、海绵垫两块、转膜用的夹子、玻棒一支；

(3)打开夹子黑的一面，垫一张海绵垫，保持水平位置，用玻棒来回去除里面的气泡。再在海绵垫子上垫二层滤纸，左手固定滤纸，右手用玻棒去除里面的气泡；

67

(4)将玻璃板撬开剥胶，去掉积层胶部分，避免刮破分离胶。小心剥下分离胶置于滤纸上，并与滤纸对齐，将膜置于分离胶上。再在膜上盖2张滤纸并赶尽气泡，最后盖上另一块海绵垫，合起夹子；

(5)将夹子插入转移槽中，夹子的黑面对转移槽的黑面；白面对转移槽的红面。在160mA电流下转移至硝酸纤维素膜上，转膜时间为1.5h；

(6)用l×丽春红染液将膜染5min，脱色摇床上摇，后用水冲洗掉多余的染液就可以看到膜上的蛋白。

#### **4.1.9.6** 免疫学检测

(1)封闭：转膜后，将硝纤膜置于TTBS中，缓摇10 min，然后将硝纤膜置于封闭液中，37C摇床缓慢平摇150 min；

(2)结合一抗：将硝纤膜移入一抗反应液（一抗按1: 200溶于封闭液），4ºC过夜；回收一抗，将PVDF膜浸入20ml TTBS 液中，在室温下脱色摇床上平摇

3次，每次20min；

(3)结合二抗：将PVDF膜移入二抗反应液（二抗按1: 5000溶于封闭液）中，室温下平摇2h后，将硝纤膜浸入30ml TTBS中，在室温下脱色摇床上平摇

3次，每次30 min。

#### **4.1.9.7** 化学发光、显影、定影

将发光液A和发光液B在保鲜膜上等体积混匀后，将此混合液加于膜上，

lmin后，去除残液，包好，放入X光片夹中。在暗室中，红灯下取出X光片，用剪刀裁剪合适大小。打开X光片夹，把X光片放在膜上，关上X光片夹，曝光30s-5 min。将1×显影液和定影液分别倒入塑料盘中，打开X光片夹，取出X光片，迅速浸入显影液中，约1~2min后即可出现明显条带。把X光片立即浸入定影液中，5-10min后用自来水冲洗残留的定影液后，室温下晾干。

每组样品进行三次电泳，用于重复验证结果。

#### **4.1.9.8** 光密度分析

通过Image Proplus6.0图像分析软件读取目的条带在X光胶片上测得的光密度扫描值，以各组β-actin条带的扫描值标化其相应组样本蛋白表达量。

### 4.1.10 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示，组间比较采

68

用单因素方差分析，两两比较采用SNK检验；对miR-203的mRNA表达与p63

的mRNA和蛋白表达分别行Pearson相关分析；检验水准α=0.05。

### **4.2** 结果

### **4.2.1** 人角质形成细胞转染前形态学观察及鉴定

分离即刻的细胞于倒置相差显微镜下观察，细胞呈圆形，体积较大，分散不均匀，胞核小，核质比低（见图4.1A）；孵育3d后，细胞贴壁不牢固且无克隆形成，符合角质形成细胞特征（见图4.1B）。免疫细胞化学染色显示CK1、CK10呈棕黄色阳性表达，CK19、ITGB1 呈阴性表达，符合角质形成细胞特征（见图

### 5.2 A～2D)。



图4.1 人角质形成细胞转染前倒置相差显微镜×100

A：Ⅳ型胶原快速贴壁法筛选的人角质形成细胞；B：人角质形成细胞培养3d时无明显克隆形成



图4.2 人角质形成细胞转染前免疫细胞化学染色结果辣根过氧化物酶×100

图A：人角质形成细胞CK1呈阳性表达；图B：人角质形成细胞CK10呈阳性表达；图C：人角质形成细胞CK19呈阴性表达；图D：人角质形成细胞ITGB1呈阴性表达

### **4.2.2** 转染及转染效率

69

FAM标记的miR-203抑制物及对照miRNA抑制物转染人角质形成细胞6h后在荧光显微镜下观察，可见多数细胞的胞质内显示荧光（见图4.3），流式细胞仪检测显示转染后荧光细胞比例分别为(51.80±0.63) %和（52.51±0.75）%，两组转染率差异无统计学意义(*t*=1.621, *p*=0.144) (见图4.4)。



A1 A2

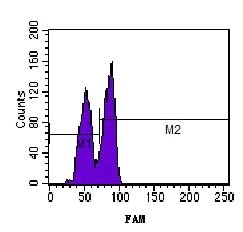


B1 B2

图 4.3 miRNA转染人角质形成细胞倒置荧光显微镜×100

图A：表示人角质形成细胞转染miR-203 抑制物；图B：表示人角质形成细胞转染对照

miRNA抑制物



A B C

图4.4 流式细胞仪检测转染率

图A：表示人角质形成细胞转染前；图B：表示人角质形成细胞转染miR-203 抑制物；图

C：表示人角质形成细胞转染对照miRNA抑制物

### **4.2.3** 人角质形成细胞转染后细胞形态

70

转染miR-203抑制物72h后的细胞于倒置相差显微镜下观察，细胞呈圆形，折光性较强，核质比大，且有克隆性生长，符合表皮干细胞特征（见图4.5A）；

而转染对照miRNA抑制物细胞转染后无克隆形成，符合角质形成细胞特征，即转染前后无显著性差异（见图4.5B）。



图4.5 人角质形成细胞转染后倒置相差显微镜×100

图A：表示人角质形成细胞转染miR-203 抑制物；图B：表示人角质形成细胞转染对照

miRNA抑制物

### **4.2.4** 人角质形成细胞转染后免疫细胞化学染色鉴定

人角质形成细胞转染miR-203抑制物72h后免疫细胞化学染色示CK19、

ITGB1呈棕黄色阳性表达，CK1、CK10呈阴性表达，符合表皮干细胞特征（见图

4.6）；而转染对照miRNA抑制物组与转染前无变化。



图4.6 人角质形成细胞转染miR-203 抑制物后免疫细胞化学染色结果辣根过氧化物酶

×100

图A：人角质形成细胞转染后CK19呈阳性表达；图B：人角质形成细胞转染后ITGB1呈阳性表达；图C：人角质形成细胞转染后CK1呈阴性表达；图D：人角质形成细胞转染后

CK10呈阴性表达

### **4.2.5** 转染前后**miR-203**、**p63**、**ITGB1**、**CK19**、**CK1**、**CK10**的**mRNA**

表达

71

人角质形成细胞转染miR-203抑制物72 h后p63、CK19、ITGB1的mRNA

相对表达量均高于转染前及转染对照miRNA抑制物组，而miR-203及CK1、

CK10的mRNA相对表达量均低于转染前及转染对照miRNA抑制物组，比较差异均有统计学意义（*P*<0.05）。转染对照miRNA 组与转染前比较差异均无统计学意义（*P*> 0.05）（见表4.2，表4.3）。

表4.2 实时荧光定量RT-PCR 检测各组p63、CK19、ITGB1表达（n=5）

| 组别 | p63 | CK19 | ITGB1 |
| --- | --- | --- | --- |
| 转染前 | 0.13±0.03 | 0.50±0.10 | 1.97±0.12 |
| 实验组 | 0.88±0.08 \*# | 1.14±0.13 \*# | 2.32±0.22 \*# |
| 对照组 | 0.12±0.04 | 0.49±0.11 | 2.00±1.52 |
| 统计值 | F=297.081 | F=52.861 | F=6.528 |
| P= 0.000 | P=0.000 | P= 0.012 |

\*与转染前比较*P*<0.05，#与对照组比较*P*<0.05

表4.3 实时荧光定量RT-PCR 检测各组miR-203、CK1、CK10表达（n=5）

| 组别 | miR-203 | CK1 | CK10 |
| --- | --- | --- | --- |
| 转染前 | 2.01±0.16 | 1.77±0.15 | 0.70±0.12 |
| 实验组 | 0.90±0.10 \*# | 1.51±0.09 \*# | 0.41±0.13 \*# |
| 对照组 | 1.94±0.17 | 1.81±0.18 | 0.71±0.10 |
| 统计值 | F=92.840 | F=6.140 | F=11.165 |
| P= 0.000 | P=0.015 | P=0.002 |

\*与转染前比较*P*<0.05，#与对照组比较*P*<0.05

### **4.2.6** 转染前后**p63**、**ITGB1**、**CK19**、**CK1**、**CK10**的蛋白表达

人角质形成细胞转染miR-203抑制物72 h后，p63、CK19、ITGB1蛋白相对表达量均高于转染前和转染对照miRNA抑制物组，而CK1、CK10蛋白相对表达量均低于转染前及转染对照miRNA 抑制物组，比较差异均有统计学意义

（*P*<0.05）。转染对照miRNA 抑制物组与转染前比较差异均无统计学意义

（*P*> 0.05）(见表4.4、图4.7)。

表4.4 Western blot 检测各组p63、CK19、ITGB1、CK1、CK10蛋白表达

| 组别 | p63 | ITGB1 | CK19 | CK1 | CK10 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 转染前 | 0.39±0.12 | 1.09±0.09 | 0.85±0.18 | 0.83±0.12 | 0.57±0.14 |
| 实验组 | 0.86±0.19 \*# | 1.35±0.18 \*# | 1.19±0.10 \*# | 0.32±0.08 \*# | 0.28±0.07 \*# |
| 对照组 | 0.41±0.13 | 1.13±0.11 | 0.88±0.11 | 0.87±0.07 | 0.53±0.10 |
| 统计值 | F=15.816 | F=5.778 | F=9.904 | F=53.206 | F=10.818 |
| P= 0.000 | P= 0.017 | P= 0.003 | P=0.000 | P= 0.002 |

\*与转染前比较*P*<0.05，#与对照组比较*P*<0.05

72

p63

β-actin

ITGB1



β-actin

相对分子质量

CK19

β-actin





CK1

β-actin

相对分子质量

67×10 3

43×10 3

CK10



β-actin

59×10 3

43×10 3

图4.7蛋白质印迹法检测细胞p63、CK19、ITGB1、CK1、CK10蛋白表达水平注：1为实验组转染后细胞；2为转染前细胞；3为对照组转染后细胞

### **4.2.7** **miR-203**和**p63**表达的相关性分析

miR-203表达量与p63的mRNA和蛋白表达量均呈明显负相关，转染前相关系数分别为-0.907（*t*=3.730, *P*=0.038）及-0.956（*t*=5.644, *P*=0.012）；转染后相关系数分别为-0.924（*t*=4.185, *P*=0.028）及-0.931（*t*=4.418, *P*=0.023）。

### **4.3** 讨论

大面积深度烧伤造成皮肤严重毁损时常需采用自体、同种异体或异种皮肤移植。但存在自体移植供皮来源有限，异体、异种移植免疫排斥反应等风险，使临床应用受到限制。组织工程学的迅速发展为烧伤创面的治疗提供了新方法。干细胞是组织工程学的第一要素，具有强大的自我更新能力及多向分化潜能，能够再生各种组织和器官，是组织工程皮肤构建的理想种子细胞。干细胞包括胚胎干细胞及成体干细胞。胚胎干细胞在理论上是最理想的种子细胞，能够向内中外三个胚层分化，形成各种细胞类型及组织器官[69]。但因其取材困难、免疫排斥、伦理学争议和可能形成畸胎瘤的不安全性等问题限制了它的临床应用

[70]，而成体干细胞即表皮干细胞也是理想的种子细胞，但其数量有限（约1％～

l0％的表皮基底细胞为干细胞），且随着年龄增大，表皮干细胞数量亦逐渐减少。虽然可以在体外模拟一定的环境下培养扩增表皮干细胞，但极易分化[3]，加上深

73

度烧伤后表皮干细胞大量毁损，其残存数量进一步减少，因此表皮干细胞来源仍十分紧张，大大限制了表皮干细胞在临床上的应用。因此种子细胞的来源不足成为制约组织工程技术在烧伤创面临床应用和基础研究的瓶颈。如何找到一个新的干细胞来源是解决这个问题的有效途径。越来越多有关将分化成熟的细胞去分化为干细胞的研究，为解决组织工程中干细胞来源紧张的难题提供了新思路。

去分化亦称逆行性分化，是指细胞从高分化状态沿着与发育相反的方向倒退分化，返回低分化状态，即已成熟的终末细胞可以转变为幼稚的具有增殖分裂潜能的干细胞。目前研究表明去分化现象广泛存在于不同等级的生物细胞中，如神经细胞[71]、脂肪细胞[72]、胰腺细胞[73]、角膜细胞[74]、肾小管上皮细胞[75]和软骨细胞[76]等成体细胞在某些因素的诱导下可以去分化为相应的干细胞，去分化来源的细胞具备干细胞形态即细胞体积小，细胞核大，核浆比增大，细胞器数目减少，同时具有增殖分裂潜能，即细胞重新进入细胞周期，并在某种因素的诱导下能够分化为多种细胞类型继而参与一系列生物学过程。Fu等[77]用重组人表皮细胞生长因子(rhEGF)治疗皮肤慢性溃疡创面时，在表皮基底层外的颗粒细胞和棘细胞中发现了可能由终末分化的角质细胞逆向分化来的干细胞团。且这些干细胞团与基底层的表皮干细胞无生物学联系。谢晓繁等[78]将不含干细胞的超薄表皮移植到去除全层皮肤的裸鼠身上，结果发现成熟的表皮细胞逆向分化为表皮干细胞，参与了皮肤创面的修复和再生。提示终末分化细胞并未彻底失去其增殖分化能力，它们在烧伤创面再生与修复等领域具有巨大潜能。因此成熟的表皮细胞具有去分化为表皮干细胞的潜能。

去分化是一个复杂的生物学过程，需要多种因素参与。目前诱导细胞发生去分化的方法有转基因和非转基因两种途径。有学者采用转基因的方法将某些与干细胞有关的“干”性基因和/或特定小分子物质导入体细胞使其去分化重编程为多潜能干细胞[79]。虽然多潜能干细胞在形态、生物学特性等方面与胚胎干细胞相似，但其安全性、稳定性尚不明确：如导入基因存在很大程度的随机性，同时导入肿瘤相关基因[80] (如c-myc)可能会激活癌基因，或者抑制部分重要基因的功能，因此探索一条更安全的转基因方法还有待进一步研究。有学者认为改变终末分化细胞所处的微环境，有可能诱导其逆转为干细胞，主要方法有化学诱导[81]、物理诱导[82]和生物诱导[83]等。多位学者已成功通过上述方法获得了干细胞，因此非转基途径也是提供干细胞来源的重要方法之一。通过选择适当的

74

诱导因素，成熟的表皮细胞有可能去分化为表皮干细胞，从而作为种子细胞，完成创面的解剖修复与功能重建。

根据文献及上一章实验研究结果本课题组拟采用下调miR-203作为一种诱导因素。前已述及miR-203是长约19～22nt的单链非编码RNA，能与靶mRNA3′非翻译区结合引起靶mRNA的降解或翻译抑制从而在转录后水平抑制蛋白质的合成，负性调控基因的表达。其在表皮及毛囊表达最丰富，是皮肤特异性的miRNA，对皮肤发育和功能维持具有重要作用，若体内miR-203合成缺失，可导致表皮基底层细胞过度增殖、毛囊发育不良、皮肤形态结构及功能缺陷。且已证实miR-203在增殖能力强的干细胞中低表达，其低表达是维持表皮干细胞增殖潜能的重要因素，因此本章研究根据人源miR-203序列，设计并合成了其单链抑制物，利用脂质体转染将miR-203抑制物分子导入人离体角质形成细胞中，通过流式细胞仪检测转染效率及转染前后miR-203的RT-PCR测定均表明转染成功。对转染前后的细胞于倒置显微镜下观察形态变化，发现转染后的细胞具有干细胞的特点，即细胞体积缩小、核大、核仁明显、核浆比例大，且具有强大的增殖分裂能力及克隆形成能力。通过免疫细胞化学染色、RT-PCR及Western blot技术检测转染前后细胞ITGB1、CK19、CK1、CK10的变化发现转染后的细胞ITGB1、CK19高表达，而CK1、CK10低表达。前已述及ITGB1、

CK19表达水平与细胞增殖力及细胞克隆形成能力正相关，是表皮干细胞的特征蛋白；CK1、CK10是成熟表皮即高分化的角质形成细胞的特征蛋白，本章研究结果表明去分化来源的细胞在形态及生物学特性方面与机体自身的表皮干细胞相似。说明通过下调miR-203单一诱导因素能在体外诱导人角质形成细胞向表皮样干细胞去分化，从而在表皮干细胞来源不足的情况下能够作为组织工程种子细胞应用于创面解剖修复与再生的实验与临床研究。

同时，本研究发现转染后细胞p63基因及蛋白的表达较转染前显著增加，且与miR-203基因的表达量呈负相关系，即miR-203与p63两者呈现相互排斥的表达模式，再次提示在表皮中p63可能是miR-203的靶基因。结合本章课题实验结果我们推测下调miR-203诱导角质形成细胞向表皮样干细胞去分化的一个重要机制可能是miR-203被抑制后，其靶基因p63的表达上调，从而通过一系列信号通路引起角质形成细胞的表型及增殖分化等生物特性发生改变，表现细胞形态及生物学特性与表皮干细胞类似，且ITGB1、CK19、CK1、CK10等的表达发生显著变化。

75

综上所述，本章研究利用miR-203抑制物体外诱导人角质形成细胞向表皮样干细胞去分化，去分化后的细胞与机体自身来源的表皮干细胞形态相似，并表达表皮干细胞的特异性标记物，同时具有干细胞的增殖分裂潜能。这种去分化源性表皮干细胞有可能在特定的微环境下再分化为表皮细胞或毛囊、汗腺等附属器细胞。此方法利用了自身的角质细胞，其分布广泛、数量远比干细胞充足，且取材方便，既避免了免疫排斥反应带来的风险，同时又不涉及伦理学争议。同时此种化学诱导方式与转基因途径相比更容易操作和控制，且较基因干扰更安全，因而通过改变内、外环境来调控细胞分化进程，诱导创面内残余组织的终末分化细胞去分化为干细胞，在解决干细胞的来源与数量方面提供了一条新的途径，对实现创面的解剖修复及功能修复具有良好的应用前景。但如何利用去分化源性干细胞成功构建出功能性组织工程皮肤，其中涉及的机制、信号通路及安全性等尚不明确，还有待进一步研究。

### **4.4** 小结

（1）miR-203下调能诱导体外培养的人角质形成细胞去分化为表皮样干细胞，且去分化源性表皮样干细胞与机体自身来源的表皮干细胞形态及生物学特性相似。靶基因p63表达上调可能是其重要机制之一。

（2）通过调控微小RNA途径诱导成熟细胞去分化为干细胞这一方法可行，有望为创面修复和皮肤组织工程种子细胞提供新来源和途径。

76

## **第 5** 章**miR-203**转染诱导人表皮干细胞向汗腺样细胞分化

大面积深度烧伤通过早期切（削）痴、植皮等治疗措施修复创面后仅能实现创面的解剖学愈合，而皮肤附件往往无法重建，对实现皮肤的功能性修复仍缺乏有效的策略和治疗措施[84]。患者烧伤后因汗腺无法再生或瘢痕组织堵隔其分泌管道而使汗腺丧失了分泌汗液的功能，导致患者体温调节功能障碍，给患者带来沉重的心理负担和痛苦[85]。如何修复汗腺等附属器以实现大面积严重烧伤后皮肤的功能重建的研究正日益受到重视，是目前医学研究热点及难点之一[86]。从前面的实验中得知miRNA与皮肤及其附属器官的再生修复明显相关，尤其是表皮及毛囊特异性表达的miR-203，其在富含未分化干细胞的表皮基底层几乎无表达，当表皮开始分化时其表达量成倍增加，即在富含已分化角质形成细胞的基底上层高表达，提示其功能类似于一个开关，在皮肤发育中调控细胞的增殖和分化。Nissan等亦发现miR-203有促分化作用，其能诱导胚胎干细胞定向分化为角朊细胞。胚胎学上，汗腺与表皮干细胞在发育学上有共同的起源[87]，miR-203能否诱导人表皮干细胞向汗腺细胞分化，目前尚不清楚。本研究设计合成了FAM标记的人miR-203模拟物及FAM标记的对照miRNA，通过脂质体转染将FAM标记的人miR-203模拟物导入人表皮干细胞作为实验组，将FAM标记的对照miRNA导入人表皮干细胞作为对照组，以探索体外诱导人表皮干细胞分化为汗腺样细胞的可能性，为实现创面的功能修复提供实验基础与理论依据。

### **5.1** 材料与方法

### **5.1.1** 研究对象

以包皮组织作为本章实验研究对象，标本取材于2013年9-11月在泌尿外科行包皮环切术的健康青年男性，共计５例。患者年龄18～40岁，平均27岁，所有取材均经患者知情同意，研究方案经医学伦理委员会审核批准。

### **5.1.2** 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 兔抗人 ITGB1 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK1 | 美国 Abgent 公司 |

77

|  |  |
| --- | --- |
| 兔抗人 CK10 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK19 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CEA | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 CK18 | 美国 Abgent 公司 |
| 兔抗人 β 肌动蛋白 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| 兔抗人 p63 | 美国 Abgent 公司 |
| K -SFM | 美国 Gibco 公司 |
| EGF | 美国 Gibco 公司 |
| 0.25％胰蛋白酶-EDTA | 美国 Gibco 公司 |
| FBS | 美国 Gibco 公司 |
| IV 型胶原 | 美国 Sigma 公司 |
| D-Hanks 液 | 美国 Hyclone 公司 |
| Opti-MEM 培养基 | 美国 GIBCO 公司 |
| TRIZOL | 美国 Invitrogen 公司 |
| PBS | 美国 Gibco 公司 |
| FAM 标记的人 miR-203 模拟物 | 中国上海吉玛制药技术有限公司 |
| FAM 标记的对照 miRNA | 中国上海吉玛制药技术有限公司 |
| 脂质体Lipofectamine2000 转染试剂 | 美国 Invitrogen 公司 |
| HRP 标记的ft羊抗兔二步法免疫组织化学检测试剂盒 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| ft羊抗兔 IgG-HRP 二抗 | 中国北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| 注射用庆大霉素 | 中国华北制药股份有限公司 |
| mirVana™miRNA 纯化试剂盒 | 美国 Ambion 公司 |
| Super-Bradford 蛋白定量试剂盒 | 中国北京康为世纪生物科技有限公司 |
| 互补 DNA 反转录试剂盒 | 日本 TaKaRa 公司 |
| SYBR Ｇreen 荧光定量试剂盒 | 日本 TaKaRa 公司 |
| 去氧胆酸钠 | 美国 Biosharp 公司 |

78

|  |  |
| --- | --- |
| 甘氨酸 | 美国 Sigma 公司 |
| PMSF | 美国 Sigma 公司 |
| Bromopheenol blue | 美国 Sigma 公司 |
| 二硫苏糖醇（DTT） | 美国 Sigma 公司 |
| Tris－Base | 中国北京索莱宝科技有限公司 |
| ECL | 中国北京普利莱基因技术有限公司 |
| PVDF 膜 | 中国北京索莱宝科技有限公司 |
| 十二烷基硫酸钠（SDS） | 美国 Sigma 公司 |
| 考马斯亮兰 G250 | 美国 Sigma 公司 |
| N,N,N’,N’-四甲基乙二胺（TEMED） | 美国 Sigma 公司 |
| N,N’-亚甲双丙烯酰胺 | 美国 Sigma 公司 |
| Tween-20 | 美国 Sigma 公司 |
| 过硫酸胺（APS） | 美国 Amresco 公司 |

### **5.1.3** 主要仪器设备与耗材

|  |  |
| --- | --- |
| Sw-CJ-lF 无菌超净工作台 | 苏州安泰空气技术公司 |
| CX40 型普通光学显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| CK40 倒置相差显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| CKX41 型倒置荧光显微镜 | 日本 Olympus 公司 |
| NanoDropND-1000 紫外分光光度计 | 美国 NanoDrop 公司 |
| 二氧化碳培养箱 | 德国 Thermo-BB15 公司 |
| FACSCalibur 流式细胞仪 | 美国 BD 公司 |
| LDZS-2 型自动平衡离心机 | 中国上海医用分析仪器厂 |
| Image-proplus6.0 图像分析软件 | 美国 MediaCyberneties 公司 |
| 7900 HT 实时定量 RT-PCR 系统 | 美国 ABI 公司 |
| 垂直电泳槽 | 中国北京六一仪器厂 |
| 水平电泳槽 | 中国北京六一仪器厂 |
| DYCZ-40D型转移槽 | 中国北京六一仪器厂 |

79

|  |  |
| --- | --- |
| FA 型电子分析天平 | 中国上海恒平科学仪器有限公司 |
| TGL-16C 型高速台式离心机 | 中国上海安亭科学仪器厂 |
| WD-9403D 型紫外仪 | 中国北京六一仪器厂 |
| 凝胶成像分析系统 | 中国北京君意东方电泳设备有限公司 |
| MultiskanSpectrumMicroplate 酶标仪 | 德国 Themo 公司 |
| HH-W420 型恒温水浴箱 . | 中国江苏荣华仪器制造有限公司 |
| 恒温干燥箱 | 中国上海康路仪器设备有限公司 |
| PHS-TP型酸度计 | 中国上海大普仪器有限公司 |
| 自动双重纯水蒸馏器 | 中国上海亚荣生化仪器厂 |
| -80°C 超低温冰箱 | 中国青岛海尔有限公司 |
| -20°C 超低温冰箱 | 中国青岛海尔有限公司 |
| 制冰机 | 美国 MVE 公司 |
| 系列可调式微量移液枪 | 德国 Eppendorf 公司 |

耗材：50ml细胞培养瓶、六孔细胞培养板、35mm细胞培养皿、15ml离心管

（美国Corning公司）、一次性无菌橡胶手套、封口胶、l.5mlEp管、各种规格吸头、一次性注射器、酒精棉球、口罩等。

### **5.1.4** 人表皮干细胞的分离培养

采用体积分数0.25%胰蛋白酶-EDTA消化法分离表皮与真皮，应用Ⅳ型胶原快速黏附法筛选细胞悬液获得人表皮干细胞，在加入EGF的K-SFM中体外培养。2-3天换液1次，倒置相差显微镜观察细胞分离即刻及培养３ｄ的生长情况。待细胞生长至80％融合时进行消化传代，取第２代细胞进行后续实验。

具体步骤如下：

(1)无菌条件下取下的健康人包皮标本5块，先用碘伏擦拭标本，后用生理盐水冲洗干净，置于超净工作台，用刀片将皮下组织及结缔组织小心刮除；

(2)将皮肤标本置于无菌培养皿中，加入庆大霉素(1600u/mL)浸泡3min，再以D-Hank, s平衡盐液漂洗3遍，每遍2min；

(3)用无菌眼科剪将皮肤标本剪成0.5cm×0.3cm皮条片置入无菌培养瓶中，滴加0.25%胰蛋白酶-EDTA液（体积比为1: 5），置于4℃冰箱过夜消化8-9h；

80

(4)用PBS将IV型胶原稀释成100mg/L，取适量均匀涂被后将培养瓶（板）置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中风干备用；

(5)取出消化过夜后的皮条片标本置于无菌培养皿中，滴加少许含FBS的培养基终止消化，用D-Hank'S平衡盐液漂洗标本两遍，每遍2min；

(6)用无菌眼科镊小心撕下表皮层放入另一无菌培养皿中，弃去真皮，用眼科剪将表皮层充分剪碎后用眼科镊将其放入消毒的培养瓶内，加入D-Hank'S液反复充分吹打，经200目筛网将混悬液过滤至离心管，离心，1000rpm×5min ；

(7)吸去上清后于离心管中加入K-SFM培养基吹打成细胞悬液，常规细胞计数，将细胞浓度调整为1×10 5/L，将其接种于预处理好的Ⅳ型胶原培养瓶（板）中，置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养；

(8) 15-20min后将培养液及未粘附细胞吸除，滴加含10ug/L EGF的K-SFM

培养基，置入37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养；

(9)每日于倒置相差显微镜下观察细胞的生长情况，每隔2-3天行换液1次。当细胞生长至70%-80%融合时，将培养液小心吸去，以无菌PBS液轻轻漂洗2次后滴加0.25%胰蛋白酶-EDTA 液消化，数分钟后细胞呈悬浮状态时，滴加含

10%FBS的培养基终止消化，离心，l000 rpm×5min；吸除上清，加入含10ug/L EGF的新鲜K-SFM培养基，反复吹打重悬细胞，再次将细胞接种于3个预处理好的铺满Ⅳ型胶原的培养瓶中，15min后将未贴壁的细胞吸除。取第２代细胞进行后续实验。

### **5.1.5** 人表皮干细胞的鉴定

将无菌的行免疫细胞化学染色鉴定专用玻片置于培养皿内，按lxl05/ml的细胞密度，将2-3滴表皮干细胞悬液接种于玻片上，置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%的恒温培养箱中培养，24h后取出细胞爬片，采用HRP标记的ft羊抗兔二步法免疫组织化学检测试剂盒分别行CK19、ITGB1、CK1、CK10、CK18、

CEA的免疫细胞化学染色（PV-9000法）。具体步骤如下：

(1)取细胞爬片，用pBS液(pH7.4)轻轻冲洗三遍，每遍3min。取4℃冰丙酮将其固定5min后，再次用PBS液冲洗3遍，每遍2min；

(2)每张玻片滴加1滴0.5%TritonX-100，孵育10min后用pBS浸泡三遍，每遍3min；

(3)每一张玻片加1滴3%过氧化氢去离子水，室温下孵育10min，以阻断内

81

源性过氧化物酶活性，用PBS液小心冲洗3遍，每遍2min；

(4)每张玻片分别加1滴兔抗人CK19、ITGB1、CK1、CK10、CK18、CEA一抗(1:150)(PBS取代一抗作为阴性对照)，置入37℃保温箱中孵育2h，用PBS液轻轻冲洗3遍，每遍2min；

(5)每张玻片滴加1滴试剂1（Polymer Helper），于37℃保温箱中孵育20min，用PBS液轻轻冲洗3遍，每遍2min；

(6)每张玻片滴加1滴试剂2 （poly peroxidase-anti rabbit IgG），于37℃保温箱中孵育20min，用PBS液轻轻冲洗3遍，每遍2min；

(7)每张玻片加2滴新鲜配制的DAB溶液，显微镜下观察3-10min，适时终止显色；

(8)将玻片置于自来水下冲洗、苏木素复染0.5min、自来水冲洗返蓝5min、梯度酒精脱水干燥、二甲苯透明，最后中性树胶封片。将玻片置于400倍显微镜下观察并拍照，细胞呈棕黄色显色作为阳性表达。

### **5.1.6** 人**miR-203**模拟物对人表皮干细胞的瞬时转染

根据人源miR-203序列，设计并合成其双链模拟物：FAM标记的人miR-203模拟物(miR-203 mimics-FAM)及FAM标记的对照miRNA(Negative control-FAM). 运用脂质体Lipofectamine 2000转染试剂分别瞬时转染第2代人表皮干细胞，操作步骤严格按脂质体Lipofectamine 2000说明书进行。具体步骤如下：

(1)转染前一天，将细胞以5×10 5/孔的密度消化接种于6孔板中，在37℃、

5%CO2的培养箱中培养24h左右，使转染时的细胞密度达到60%～80%；

(2)转染当天将Opti-MEM培养基放于37℃孵箱中预热1h左右；将6孔板中的培养基吸除，每孔加入1.5ml 预热好的Opti-MEM培养基；

(3)稀释lipo2000：取5μl/孔lipofectamine2000（使用前轻轻摇匀后放置室温），用250μl的Opti-MEM稀释，轻柔混合均匀后在室温下孵育5min；

(4)稀释siRNA: 取10μl/孔miR-203 mimics-FAM或Negative control-FAM，分别用250μl的Opti-MEM稀释，轻柔混合均匀，在室温下孵育5min；

(5)将稀释好的并孵育5min后的lipofectamine2000试剂分别和miR-203 mimics-FAM及Negative control-FAM轻柔混合均匀，室温下放置20分钟，以便形成siRNA/lipofectamine复合物。稀释好的lipofectamine2000需在25min之内

82

与稀释好的siRNA混合。混合试剂时不能剧烈吹打或振荡，手指轻弹管壁即可，过度用力可能会破坏试剂中脂质体结构及影响siRNA-lipo2000复合物的形成；

(6)将500μl /孔siRNA/lipofectamin复合物加到6孔板各孔中，来回轻轻左右摇晃细胞培养板，置于37℃、5%CO2的培养箱中培养6 h；

(7)转染6 h后将孔里含有siRNA-lipo2000混合液的培养基吸除，更换新鲜的K-SFM培养基，于倒置荧光显微镜下观察转染情况。观察时先使光路对准没有转染荧光标记siRNA的孔，调好焦距后将光路转向对准转染孔，打开激发光后马上观察拍照，并在同一视野中拍下明场的细胞照片作为对比。观察绿色荧光蛋白（FAM）的表达情况，并按公式计算转染率=荧光视野细胞数/明视野细胞数×100%，同时用FACSCalibur流式细胞仪检测转染效率；

(8)更换培养基后将培养皿置于37℃、5%CO2、饱和湿度95%培养箱继续孵育。72 h后倒置相差显微镜下观察细胞生长情况及形态变化，并收集细胞测定相关指标的mRNA及蛋白表达情况；

(9)整个操作过程尽量避光，转染操作尽量迅速，操作时间尽量短，操作完毕后，尽快将培养板放入培养箱。

流式细胞仪检测转染效率步骤：

(1)用0.25%的胰酶消化每组细胞，数分钟后细胞呈悬浮状态时，滴加含

10%FBS的培养基终止消化，离心，l000 rpm×5min ；

(2)用PBS液轻轻洗涤细胞2次，离心，1000rpm×5min；收集1～5×10 5细胞；

(3)每管中加入1ml PBS液重悬细胞，轻轻摇匀，样本上流式细胞仪检测各组细胞FAM荧光表达情况，计算转染率。并重复进行3次。

### **5.1.7** 转染后免疫细胞化学染色鉴定

第2代人表皮干细胞分别转染FAM标记的人miR-203模拟物（实验组）及

FAM标记的对照miRNA（对照组），并于37℃、5%CO2、饱和湿度95%培养箱孵育72 h后，采用HRP标记的ft羊抗兔二步法免疫组织化学检测试剂盒以PV-9000二步法对2组细胞行ITGB1、CK19、CK1、CK10、CK18、CEA免疫细胞化学染色观察，严格按试剂盒说明书进行操作。具体步骤同5.1.5。

### **5.1.8** **RT-PCR**检测**miR-203**

83

取第2代人表皮干细胞转染前及实验组、对照组转染72 h后的细胞，采用实时荧光定量RT-PCR方法检测3组细胞miR-203的表达情况。

#### **5.1.8.1** 总**RNA**的提取

Trizol法分别提取第2代人表皮干细胞转染前及转染miR-203 mimics-FAM

（实验组）、Negative control-FAM (对照组) 72 h的细胞总RNA，具体操作如下：

(1)从保温箱中取出培养皿，移入超净工作台。吸除细胞培养液，滴加1ml

4℃无菌预冷的PBS液轻轻漂洗3次，以洗净培养液；

(2)吸除PBS液，每10cm2加1ml的预冷的Trizol，用1ml的移液管反复吹打数次使细胞充分裂解后移入预冷的经DEPC水预处理的1.5mlEP管中，室温静置5分钟，使其完全变性；

(3)每1ml Trizol加0.2 ml氯仿充分混合均匀，盖紧管口，上下颠倒摇60

次。并冰浴15min；

(4)离心，4℃，12000 rpm,，15min。可见管中的液体分为上（肉眼观察为无色液相，内含总RNA）、中（肉眼观察为白色乳状，含蛋白质）及下（肉眼观察为红色，含DNA）三相；

(5)小心吸取上层无色液相，将其移入另一经DEPC水预处理的1.5ml EP

管中，加入等体积的冰异丙醇，轻轻上下颠倒数次混匀，然后置入-20℃冰箱

20min以沉淀RNA；

(6)取出，4℃离心,12000 rpm×15min，管底可见少许白色沉淀物，弃除上清。在管中加入75%乙醇1 ml，轻轻上下颠倒几次以充分洗涤RNA沉淀，后再次4℃离心，8000rpm×15min，弃上清×2次；

(7)弃除上清液，室温下静置10分钟，使之干燥，加入30µl无RNase水重悬沉淀，使沉淀溶解。

#### **5.1.8.2** **RNA**质量检测

采用NanoDrop ND-1000全波长紫外／可见光扫描分光光度计来检测RNA样品总RNA的浓度和纯度，计算260／280比值（1.7～2.1时合格）及RNA浓度；甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。

总RNA的浓度和纯度测定具体步骤如下：

(1)滴加0.1%DEPC水先将比色仪调零；

(2)每组各取1µl RNA样品，用49µl 0.1%DEPC水稀释50倍，用加样器充

84

分吹打混匀。用DEPC水标记空白，吸取DEPC水50μl加入比色杯中，采用

NanoDrop ND-1000型紫外分光光度计来检测RNA样品的OD 260nm和OD

280nm, RNA于260nm吸收达峰值，蛋白于280 nm吸收达峰值，按以下公式计算RNA浓度和纯度：

RNA浓度（µg/µl）=OD260nm×50×40

RNA纯度=OD260nm/OD280nm，理想纯度的RNA是其OD260/OD280的比值介于1.8和2.1之间，比值接近或大于1.8，说明RNA纯度较高，没有蛋白质的残余；而如果OD260/OD280的比值> 2.1或者<1.6，说明RNA样品中有蛋白质、酚等污染。

RNA完整性的检测具体步骤如下：

(1) 1×TBE电泳缓冲液的制备：取7.44g EDTA、108g Tris及55g硼酸加入烧杯中，加入约800ml去离子水，充分混匀；用NaOH将其pH值调至8.3，再次加去离子水至1L，室温下保存，使用时需稀释10倍；

(2)甲醛变性琼脂糖凝胶的制备：取1×TBE电泳缓冲液30ml，加入琼脂糖

0.45g，于微波炉中加热至完全溶化，轻轻摇动使电泳缓冲液与琼脂糖充分混匀，直至颗粒状悬浮物消失，室温下冷却至60℃，加入600μl甲醛，充分混匀，倒入RNA专用的制胶器中，室温静置30min后即可使用；

(3) RNA样品的准备：取500ng RNA样本加入无菌DEPC水至6μl，再加入2μl EtBr (1.0 mg/mL)及2μl RNA上样缓冲液，充分混合均匀，孵育，65℃×5min，再置于冰上骤冷2min以上；

(4)电泳：先凝胶预电泳5-10分钟，随后将RNA电泳检测样品加入至上样孔中，电压调节至120-130V，时间设置为15-20min；

(5)成像：电泳结束后，用凝胶成像仪照像；

(6)理想结果：RNA样品条带清晰，28S: 18S rRNA条带亮度大于或接近

2: 1。

#### **5.1.8.3** **RNA**的纯化

取10-20μg质检合格的各样本细胞总RNA，用mirVana™miRNA纯化试剂盒进行纯化，具体步骤如下：

(1)每组样本各取10-20μg 总RNA 加入EP 管中，注入5 倍体积的

Lysis/Binding缓冲液，充分混合均匀；

85

(2)加十分之一体积的miRNA匀浆添加剂，充分混合均匀，置于冰上孵育

10min；

(3)加三分之一体积的100％乙醇，充分混合均匀；

(4)将上述混合液加入滤管中，离心，5000rpm×lmin，收集其滤液；

(5)加入三分之二体积的100％乙醇于滤液中，充分混合均匀；

(6)置换滤管，将⑤的混合物过滤，离心，5000rpm×lmin，弃除滤液，继续使用收集管；

(7)将滤管放于收集管中，取700μlmiRNA 洗涤液清洗滤管，离心，

5000rpm×lmin，弃去滤液；

(8)取500μlmiRNA洗涤液清洗滤管，离心，5000rpm×1min，弃除滤液；再以miRNA洗涤液清洗一遍；将滤管连同收集管离心，10000rpm×lmin，弃除滤管中残留液体；

(9)置换一个新的收集管，将50μl 95℃的洗脱液加入滤器中，盖紧，室温下孵育2min；离心，10000 rpm×lmin，收集滤液。重复此步骤。纯化后重新定量。

#### **5.1.8.4** 总**RNA**逆转录反应**(RT)**

以总RNA为模板，逆转录成cDNA，反应体系的配制如下：

RNA样本100ng

50×SYBR Green Solution 1µl

无核酸酶超纯水至总体积12.3µl

孵育，65℃×5 min；冰上放置2 min

dNTP混合物0.5µl

RNase Inhibitor 0.2µl

0.1M DTT 2µl

M-MLV反转录酶1µl

5×First -Strand缓冲液4µl

总体积20µl

逆转录反应条件：在PCR仪上进行，16℃×10 min；37℃×30 min；65℃×5

min。

#### **5.1.8.5** 定量**PCR**反应

由美国Invitrogen公司设计引物，U6 作为内参，进行归一化。引物序列见

86

表3.1.

miRNA RealTime PCR反应体系的配制如下：

miRNA cDNA样本1µl

Power SYBR Green PCR Master Mix (2×) 10µl

正义引物(10µM) 0.5µl

反义引物(10µM) 0.5µl

无核酸酶超纯水8µl

总体积20µl

进行定量PCR反应条件：95℃变性10 min；95℃退火15 s；60℃延伸l min，循环40次；60-95℃绘制溶解曲线。

根据收集荧光建立的标准曲线获得各组样本miR-203相关的Ct值（每个样本测量3次，取平均值）。采用2-△△Ct方法计算miR-203基因相对表达量。具体方法如下：目标基因△Ct值=目标基因Ct值－同一样本U6Ct值；目标基因△△Ct值=处理组△Ct值－对照组△Ct值，再计算2-△△Ct值。

### **5.1.9** **RT-PCR**检测**p63**、**ITGB1**、**CK19**、**CK1**、**CK10**、**CK18**、**CEA**

取人表皮干细胞转染前及实验组、对照组转染72 h后的细胞，采用实时荧光定量RT-PCR方法检测3组细胞p63、ITGB1、CK19、CK1、CK10、CK18、

CEA的mRNA表达情况。

每个样本各取0.2ul总RNA以OligdT为反转录引物，应用反转录试剂盒合成总互补DNA。采用引物设计软件PrimerPremier5.0设计p63、ITGB1、CK19 、

CK1、CK10、CK18、CEA及内参照β肌动蛋白的PCR引物，并经blast进一步验证。引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。p63及β肌动蛋白的引物序列见表3.2，ITGB1、CK19、CK1、CK10的引物序列见表4.1，CK18、CEA的引物序列见表5.1。反转录产物采用SYBRＧreen荧光定量试剂盒和荧光定量RT-PCR仪行PCR。

表5.1 实时荧光定量RT-PCR引物序列及产物大小

| 基因名称 | 引物序列（5’→3’） | 产物大小 |
| --- | --- | --- |
| CK18 上游引物 | GGAAGATGGCGAGGACTTTA | 129 |
| CK18 下游引物 | ACTTTGGTGTCATTGGTCTCAG |  |
| CEA 上游引物 | CTGCTCACAGCCTCACTTCTAA | 169 |
| CEA 下游引物 | CATCCACTCTTTCCCCTTTGTA |  |

87

#### **5.1.9.1** 总**RNA**逆转录反应**(RT)**

以总RNA为模板，逆转录成cDNA，反应体系的配制如下：

RNA样本0.2 ul

5×PrimeScript缓冲液2 ul

PrimeScript[逆转录](http://www.baidu.com/s?wd=%E9%80%86%E8%BD%AC%E5%BD%95&amp;hl_tag=textlink&amp;tn=SE_hldp01350_v6v6zkg6)酶0.5 ul

Oligo (dT) Primer 0.5 ul

Radom 6 mers 0.5 ul

无核酸酶超纯水加至10 ul

逆转录反应条件：在PCR仪上进行，37℃×15 min；85℃×5 sec。

#### **5.1.9.2** 定量**PCR**反应

PCR反应体系的配制如下：

mRNA cDNA样本2µl

SYBR®Premix Ex Taq™10µl

正义引物(10µM) 0.4µl

反义引物(10µM) 0.4µl

ROX Reference Dye(50×) 0.4µl

灭菌蒸馏水6.8µl

总体积20µl

定量PCR反应条件：95℃变性10 min；95℃退火15 s；60℃延伸l min，循环40次；60-95℃绘制溶解曲线。

根据收集荧光建立的标准曲线获得Ct值（每个样本测量3次，取平均值）。采用2-△△Ct方法计算基因相对表达量。具体方法如下：目标基因△Ct值=目标基因Ct值－同一样本内参β-actin值；目标基因△△Ct值=处理组△Ct值－对照组

△Ct值，再计算各组样本2-△△Ct值。

### **5.1.10** **Western blot**检测

取人表皮干细胞转染前及实验组、对照组转染72 h后的细胞，采用Western

blot法检测3组细胞p63、ITGB1、CK19、CK1、CK10、CK18、CEA蛋白相对表达量（每个样本测量3次，取平均值）。

#### **5.1.10.1** 配制试剂

88

（l）母液的配制

A: 40%丙烯酰胺贮存液（Acr/Bic）的配制：丙烯酰胺(Acr) 37.5g加甲叉双丙烯酰胺(Bic) 1.0g加超纯水100ml溶解，棕色瓶4℃保存。

B: 浓缩胶缓冲液（1M Tris. HCl, pH6.8）的配制：取Tris-base 6.06g加蒸馏水50ml溶解后，用浓盐酸调pH至6.8.

C：分离胶缓冲液（1.5M Tris. HCl, pH8.8）的配制：取Tris-base45.43g加蒸馏水200ml溶解后，用浓盐酸调pH至6.8，再加蒸馏水至250ml，室温下保存。

D: 10%SDS的配制：取SDS10g加蒸馏水至100ml，500℃水浴溶解后，室温保存。

E: 10%过硫酸胺(AP)的配制：过硫酸胺0.1g加超纯水l.0ml溶解后，立即分装于50µl离心管中，置于-20℃避光保存。

F: 1.0mol/L的Tris HCl的配制：Tris30.29g加蒸馏水100ml溶解后，用浓盐酸调配pH值（如下所示）:

PH HCl

7.4 约17ml

### 7.5 约16ml

7.6 约15ml

8.0 约10ml

G: 0.2mol/L NaH2PO4的配制：NaH2PO4 12g加蒸馏水至500ml溶解后，高压灭菌，室温保存。

H: 0.2mol/L Na2HPO4的配制：Na2HPO4 71.6g加蒸馏水至1000ml溶解后，高压灭菌，室温保存。

I: 10mM单去污剂裂解液(PMSF)的配制：PMSF0.174g加异丙醇100ml溶解后，分装于1.5ml离心管中，-20℃保存。

J: 20% Tween20的配制：Tween20 20g加蒸馏水100ml混合均匀后4℃保存。

（2）使用液的配制

A: G250考马斯亮蓝溶液的配制：考马斯亮蓝G250 100mg加95%乙醇50ml

加磷酸100ml加蒸馏水2000ml混匀后4℃保存。

B：脱色液的配制：取甲醇45ml，先后加冰乙酸10ml及双蒸水45ml混合均匀。

C：还原型SDSS（x）上样缓冲液的配制：

89

0.5Mol/LTris HCl(pH6.8) 2.5ml

溴酚蓝0.025g

二硫叔糖醇0.39g

SDS 0.5g

甘油2.5ml

混匀后4℃保存。

D: 单去污剂裂解液(PMSF):1 mol/L Tris. HCl(pH8.0) 2.5ml加NaCl0.438g加TritonX-100 0.5ml加蒸馏水100ml混合均匀后4℃保存，使用时加入PMSF使终浓度为100µg/ml(0.87ml裂解液加入10mM PMSF50µl)。

E：电泳液缓冲液的配制：Tris 3.03g加甘氨酸18.77g加SDS 1.0g加蒸馏水至1000ml，调pH值至8.3，溶解后室温保存。

F：转膜缓冲液的配制：

Tris 5.8g

甘氨酸 2.9g

SDS 0.37g

甲醇 200ml

蒸馏水 至 1000ml，调 pH 值至 8.3

G: RlPA裂解液:50mM pH7.4的Tris. HCl加150mM NaCl加lmM PMSF 加

lmM EDTA加l%TritonX-100加l%脱氧胆酸钠加0.1%SDS，混合均匀。H: 0.0lmol/L PBS(PH7.2-7.4) 的配制：0.2mol/L NaH2PO419ml加0.2mol/L

Na2HPO48lml加NaCl 17g加蒸馏水2000ml溶解，室温下保存。

I: 0.15mol/L NaCl的配制：NaCl0.877g加蒸馏水100ml，高压灭菌，室温保存。

J: 100mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的配制：BSA 0.1g加0.15mol/LNaCl 1ml溶解后-20℃保存。制作蛋白标准曲线时，将0.15mol/L NaCl稀释100倍成lmg/ml浓度，-20℃保存。

K: 10%分离胶的配制：40%Acr/Bic(37.5:1) 2.5ml

1.5Mol/L Tris HCl(PH8.8) 2.5ml

TEMED 5µl

10%AP(过硫酸胺) 50µl

90

10% SDS 100µl

超纯水4.85ml

L: 5%积层胶的配制：

30%聚丙烯酰胺(37.5:1) 0.83ml

1 mM Tris-HCl(PH6.8) 0.63ml

TEMED 5µl

10%AP(过硫酸胺) 50µl

10% SDS 50µl

超纯水3.4ml

M: TTBS缓冲液的配制：20%Tween20 1.65ml加TBS700ml充分混匀，现配现用。

N: TBS缓冲液的配制：1mol/L Tris HCl(pH7.5) 10ml加NaCl 8.8g加蒸馏水至1000ml，混合均匀。

O：封闭液（含5％脱脂奶粉的TTBS液）的配制：脱脂奶粉(WB专用) 5g加TBST 100ml，现配现用。

P: 洗脱抗体缓冲液的配制：14.4mol/Lβ-巯基乙醇700µl加0.5mol/L PH6.8

的Tris HCl 12.5ml加SDS 1g加超纯水至100ml，充分混匀。Q: 显影液的配制：

米吐尔1.55g

自来水(50℃) 375ml

亚硫酸钠22.5g

碳酸钠33.75g

溴化钾20.95g

水加至500ml

4℃保存，使用时用自来水再稀释一倍。R：定影液的配制：

自来水(50℃) 700 ml

硫代硫酸钠240g

亚硫酸钠15g

冰乙酸12.6ml

硼酸7.5g

91

钾明矾15g

水加至1000 ml

室温保存。

#### **5.1.10.2** 蛋白样品制备

(1)取培养的转染前人表皮干细胞及实验组、对照组转染72 h后的细胞，分别加入4℃预冷的PBS液，轻轻洗涤细胞三次，以去除培养液；

(2)用干净的细胞刮棒轻轻刮下细胞，将其转移到1.5ml EP管内，离心，1000

rpm×10分钟，弃除上清液；

(3)以1ml裂解液加10µPMSF(100mM)的比例配好，混匀置于冰上；

(4)将500µl含PMSF的去污裂解液加入每瓶细胞内，于冰上反复吹打裂解

30min；

(5) 4ºC离心，12000r/min×10 min. 取上清置于-70ºC保存。

#### **5.1.10.3** 蛋白质定量

采用中国北京康为世纪生物科技有限公司的Super-Bradford蛋白定量试剂盒进行。将A液与B液(50: l)充分混匀，室温下放置30min,将其加入96孔板中，每孔加入200µl，于每孔中加入不同浓度的标准品BSA（10mg/mlBSA 0ul、2.5ul、

5.0ul、7.5ul、10ul）以及待测样品10µl（加90ul生理盐水稀释），空白孔则加入

10 ul双蒸水调零，37ºC放置30min，采用酶标仪测定570nm吸光度值(OD值)，利用标准品的OD值绘制成标准曲线，计算出各个样品的蛋白质浓度。

#### **5.1.10.4** **SDS**－**PAGE**电泳

(1)将玻璃板清洗干净，晾干备用；

(2)灌胶：

清洗干净的玻璃板对齐，将其竖直卡在架子上为灌胶做好准备。

将配好的10%分离胶，加入TEMED后充分混匀但不要产生气泡，立即注入两层玻璃板间隙，如有气泡可用10ml注射器针头吸除。灌胶时可同时用l.0ml枪吸取胶促进胶沿玻璃流动，直到胶面升到绿带中间线高度。然后沿玻璃板壁缓慢加1ml异丙醇，隔绝空气封胶面，待其在室温下聚合30min，弃去多余的异丙醇，最后用ddH2O冲洗胶顶面。

将配好的5%积层胶，加入TEMED后立即充分摇匀，取3ml快速注入两层玻璃板间隙，将空隙灌满后迅速将梳子插入胶中，避免产生气泡，如有气泡可用

92

10ml注射器针头吸除。在室温下待其凝固30 min，聚合完全后小心取出梳子。若胶孔有歪斜，则用注射器吸出气泡加以修正。

(3)电泳：

分别取人表皮干细胞转染前及实验组、对照组蛋白质样品（20μg），加入4倍容积的5×凝胶上样缓冲液充分混匀，水浴，100ºC×5 min，然后使用加样枪采用“对侧加样法”进行加样，上样时尽量避免蛋白质的交叉污染，将胶放入装有足够电泳缓冲液的电泳槽进行电泳。

电泳条件：将电泳装置连接好电源，电压调节至90 V，观察样品中的溴酚蓝染料迁移位置，待其前沿进入分离胶后，将电压调节至120V，待样品中的溴酚蓝迁移至胶的前沿时，结束电泳，电泳时间一般约需2h。

#### **5.1.10.5** 转膜

(1)准备l张7.3～8.6cm大小的PVDF膜和4张7.0～8.3cm大小的滤纸，准备时需戴手套，以防滤纸和PVDF膜被蛋白污染。将准备好的PVDF膜浸泡于甲醇中3min后使用；

(2)搪瓷盘里放置转膜液、滤纸、浸泡了甲醇的PVDF膜、海绵垫两块、转膜用的夹子、玻棒一支；

(3)打开夹子黑的一面，垫一张海绵垫，保持水平位置，用玻棒来回去除其中的气泡。再在海绵垫子上垫二层滤纸，左手固定滤纸，右手用玻棒去除里面的气泡；

(4)将玻璃板撬开准备剥胶，剥胶时手应错开分离玻璃，动作尽量轻柔，取出胶，去掉积层胶部分，避免刮破分离胶。小心剥下分离胶将其置于滤纸上，调整位置使其与滤纸对齐，然后将膜置于分离胶上，尽量避免出现气泡。再在膜上盖2张滤纸并赶尽里面的气泡，最后将另一块海绵垫盖上，检查一下保证没有气泡时将夹子合起；

(5)将夹子插入转移槽中，夹子的黑面对转移槽的黑面；夹子的白面对着转移槽的红面。因为电转移时会有热量产生，故在转移槽的两边各放一块冰来降温。在160mA电流下转移至硝酸纤维素膜上，转膜时间约为1.5h；

(6)用l×丽春红染液将膜染5min，置于脱色摇床上摇，后用水冲洗掉多余的染液就可显现膜上的蛋白。

#### **5.1.10.6** 免疫学检测

93

(1)封闭：转膜后，将硝酸纤维素膜置于TTBS中，缓慢摇10 min，然后将硝酸纤维素膜置于封闭液中，37C摇床缓慢平摇150 min；

(2)结合一抗：封闭后将硝酸纤维素膜移入一抗反应液（一抗按1: 200溶于封闭液），4ºC 过夜；回收一抗，将PVDF膜浸入20 ml TTBS 液中，在室温下脱色摇床上平摇3次，每次20 min，以清洗干净膜上残余的一抗；

(3)结合二抗：将PVDF膜移入二抗反应液（二抗按1: 5000溶于封闭液）中，室温下平摇2 h后，将硝酸纤维素膜浸入30 ml的TTBS中，在室温下脱色摇床上平摇3次，每次30 min，以清洗干净膜上残余的二抗。

#### **5.1.10.7** 化学发光、显影、定影

(1)化学发光：将发光液A和发光液B在保鲜膜上等体积混合均匀后，将此混合液加于膜上，等待lmin后，去除残液，包好，放入X光片夹中；

(2)显影：在暗室中，红灯下取出X光片，用剪刀将其裁剪成合适大小。打开X光片夹，把X光片放在膜的合适位置上，关上X光片夹，曝光30s-5 min。曝光结束后，取2个塑料盘，分别倒入1×显影液和定影液，从X光片夹中取出

X光片，迅速浸入显影液中显影，约1-2min后出现明显条带即结束显影；

(3)定影：显影结束后，再把X光片立即浸入定影液中，一般为5-10min的定影时间，直至胶片透明为止。用自来水将残留的定影液冲洗后，于室温下晾干。

每组样品进行三次电泳，用于重复验证结果。

#### **5.1.10.8** 光密度分析

通过Image Proplus6.0图像分析软件读取X光片上目的条带的光密度扫描值，以各组β-actin条带的光密度扫描值标化其相应组样本蛋白表达量。

### **5.1.11** 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用SNK检验；对miR-203的mRNA表达与p63的mRNA和蛋白表达分别行Pearson相关分析；检验水准α=0.05。

### **5.2** 结果

### **5.2.1** 人表皮干细胞转染前形态学观察及鉴定

94

采用Ⅳ型胶原快速黏附法分离的细胞于倒置相差显微镜下观察，细胞小而圆，分散较均匀，折光性较强，胞核大，核质比较大（见图5.1A）；孵育3d后，细胞贴壁牢固并呈克隆性生长，符合表皮干细胞特征（见图5.1B）。免疫细胞化学染色显示CK19、ITGB1呈棕黄色阳性表达，CK1、CK10、CK18、CEA呈阴性表达，符合表皮干细胞特征（见图5.2A～5.2F）。



图5.1 人表皮干细胞转染前倒置相差显微镜×100

图A：Ⅳ型胶原快速贴壁法筛选的人表皮干细胞；图B：人表皮干细胞培养3d时呈克隆性生长



图5.2 人表皮干细胞转染前免疫细胞化学染色结果辣根过氧化物酶×100

图A：人表皮干细胞CK19呈阳性表达；图B：人表皮干细胞ITGB1呈阳性表达；图C：人表皮干细胞CK1呈阴性表达；图D：人表皮干细胞CK10呈阴性表达；图E：人表皮干细胞CK18呈阴性表达；图F：人表皮干细胞CEA呈阴性表达

### **5.2.2** 转染及转染效率

FAM标记的miR-203模拟物及miRNA阴性对照转染人表皮干细胞6h后在倒置荧光显微镜下观察，可见多数细胞的胞质内显现荧光（见图5.3），流式细胞仪检测显示实验组和对照组转染后荧光细胞比例分别为(41.58±0.54) % 和

（40.84±0.67）%，两组转染率差异无统计学意义(*t*=1.937, *p*=0.089) (见图5.4)。

95



A1 A2

B1 B2





图5.3 两组细胞转染6 h后倒置荧光显微镜观察×100

图A：表示人表皮干细胞转染miR-203 模拟物；图B：表示人表皮干细胞转染对照miRNA

A B C



图5.4 流式细胞仪检测转染率

图A：表示人表皮干细胞转染前；图B：表示人表皮干细胞转染miR-203模拟物；图C：表示人表皮干细胞转染对照miRNA

### **5.2.3** 人表皮干细胞转染后细胞形态

实验组转染miR-203模拟物72h后的细胞于倒置相差显微镜下观察，细胞大小不一，分散不均，胞核小，核质比小，且无克隆性生长，符合角质形成细胞特征（见图5.5A）；而对照组细胞转染后仍呈克隆性生长，转染前后细胞形态无明显变化，符合表皮干细胞特征，即转染前后无显著性差异（见图5.5B）。

96



图5.5 人表皮干细胞转染后倒置相差显微镜×100

图A：表示人表皮干细胞转染miR-203 模拟物；图B：表示人表皮干细胞转染对照miRNA

### **5.2.4** 人表皮干细胞转染后免疫细胞化学染色鉴定

人表皮干细胞转染miR-203 模拟物72h后免疫细胞化学染色示CK1、CK10、

CK18、CEA呈棕黄色阳性表达，CK19、ITGB1呈阴性表达，符合角质形成细胞及汗腺细胞特征（见图5.6）；而转染对照miRNA组与转染前无变化。



图5.6 人表皮干细胞转染miR-203 模拟物后免疫细胞化学染色结果辣根过氧化物酶×100

图A：人表皮干细胞转染后CK1呈阳性表达；图B：人表皮干细胞转染后CK10呈阳性表达；图C：人表皮干细胞转染后CK18呈阳性表达；图D：人表皮干细胞转染后CEA呈阳性表达；图E：人表皮干细胞转染后CK19呈阴性表达；图F：人表皮干细胞转染后ITGB1呈阴性表达

### **5.2.5** 转染前后**miR-203**、**p63**、**ITGB1**、**CK19**、**CK1**、**CK10**、**CK18**、

**CEA的mRNA表达**

人表皮干细胞转染miR-203模拟物72 h后miR-203及CK1、CK10、CK18、

CEA的mRNA相对表达量均高于转染前及转染对照miRNA组，而p63、CK19、

ITGB1的mRNA相对表达量均低于转染前及转染对照miRNA组，比较差异均有统计学意义（*P*<0.05）。转染对照miRNA 组与转染前比较差异均无统计学意义（*P*> 0.05）。见表5.2，表5.3。

97

表5.2 实时荧光定量RT-PCR 检测各组miR-203、CK1、CK10、CK18、CEA表达（n=5）

| 组别 | miR-203 | CK1 | CK10 | CK18 | CEA |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 转染前 | 0.13±0.03 | 0.43±0.10 | 0.39±0.10 | 1.01±0.18 | 0.98±0.18 |
| 实验组 | 4.09±0.65 \*# | 0.98±0.16 \*# | 0.93±0.22 \*# | 1.97±0.22 \*# | 1.87±0.28 \*# |
| 对照组 | 0.10±0.04 | 0.44±0.10 | 0.38±0.13 | 0.90±0.32 | 0.99±0.19 |
| 统计值 | F=185.718 | F=33.401 | F=19.456 | F=28.059 | F=26.508 |
| P= 0.000 | P=0.000 | P=0.000 | P=0.000 | P=0.000 |

\*与转染前比较*P*<0.05，#与对照组比较*P*<0.05

表5.3 实时荧光定量RT-PCR 检测各组p63、CK19、ITGB1表达（n=5）

| 组别 | p63 | CK19 | ITGB1 |
| --- | --- | --- | --- |
| 转染前 | 0.91±0.1 4 | 1.93±0.33 | 1.78±0.14 |
| 实验组 | 0.48±0.18 \*# | 1.40±0.12 \*# | 1.30±0.06 \*# |
| 对照组 | 0.89±0.16 | 1.99±0.27 | 1.83±0.16 |
| 统计值 | F=11.961 | F=8.098 | F=26.825 |
| P= 0.001 | P=0.006 | P= 0.000 |

\*与转染前比较*P*<0.05，#与对照组比较*P*<0.05

### **5.2.6** 转染前后**p63**、**CK1**、**CK10**、**CK18**、**CEA**、**CK19**、**ITGB1**的蛋白表达

人表皮干细胞转染miR-203模拟物72 h后，CK1、CK10、CK18、CEA蛋白相对表达量均高于转染前及转染对照miRNA组，而p63、CK19、ITGB1蛋白相对表达量均低于转染前和转染对照miRNA 组，比较差异均有统计学意义

（*P*<0.05）。转染对照miRNA组与转染前比较差异均无统计学意义（*P*> 0.05）。见表5.4、表5.5、图5.7。

表5.4 Western blot 检测各组CK1、CK10、CK18、CEA蛋白表达

| 组别 | CK1 | CK10 | CK18 | CEA |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 转染前 | 0.39±0.03 | 0.31±0.03 | 0.74±0.05 | 0.68±0.04 |
| 实验组 | 0.71±0.08 \*# | 0.56±0.04 \*# | 1.37±0.06 \*# | 1.28±0.05 \*# |
| 对照组 | 0.38±0.05 | 0.32±0.04 | 0.72±0.07 | 0.71±0.06 |
| 统计值 | F=53.077 | F=72.585 | F=184.633 | F=223.350 |
|  | P= 0.000 | P= 0.000 | P= 0.000 | P=0.000 |

\*与转染前比较*P*<0.05，#与对照组比较*P*<0.05

98

表5.5 Western blot 检测各组p63、CK19、ITGB1蛋白表达

| 组别 | p63 | CK19 | ITGB1 |
| --- | --- | --- | --- |
| 转染前 | 0.69±0.04 | 1.34±0.04 | 1.29±0.05 |
| 实验组 | 0.36±0.04\*# | 1.09±0.03\*# | 0.86±0.04\*# |
| 对照组 | 0.63±0.07 | 1.25±0.10 | 1.16±0.14 |
| 统计值 | F=58.801 | F=18.816 | F=30.162 |
|  | P= 0.000 | P= 0.000 | P= 0.000 |

\*与转染前比较*P*<0.05，#与对照组比较*P*<0.05

p63 β-actin

ITGB1

β-actin

CK10

β-actin CEA

β-actin

相对分子质量

63×10 3

43×10 3

CK19

β-actin

CK1

β-actin CK18

β-actin

相对分子质量

图5.7蛋白质印迹法检测细胞p63、CK19、ITGB1、CK1、CK10、CK18、CEA蛋白表达水平注：1为实验组转染后细胞；2为转染前细胞；3为对照组转染后细胞

### **5.2.7** **miR-203**和**p63**表达的相关性分析

转染前后miR-203的mRNA表达量与p63的mRNA和蛋白相对表达量均成明显负相关，转染前miR-203的mRNA表达量与p63的mRNA表达量相关系数为－0.912(*t*=3.851, *P*=0.035)，miR-203的mRNA表达量与p63的蛋白相对表达量相关系数为－0.963（*t*=6.189, *P*=0.009）；转染后miR-203的mRNA表达量与p63的mRNA表达量相关系数为－0.918(*t*=4.009, *P*=0.032)，miR-203的mRNA表达量与p63的蛋白相对表达量相关系数为－0.947（*t*=5.106, *P*=0.015）。

### **5.3** 讨论

99

汗腺作为皮肤附属器官，在调节体温、体液平衡、代谢及排泄等方面具有重要作用，是人体不可缺少的重要组织结构。正常人约有3～4×10 6个汗腺，分为外泌汗腺和顶浆汗腺二种类型。外泌汗腺又称为小汗腺，占大部分，在人体皮肤分布最广，在体温调节方面起着极为重要的作用。汗腺发生和发育的全过程均在胎儿期内完成，其于胚胎期12周左右开始发育，至24周基本发育成熟，至出生时无论是结构、数量还是分布部位均已达到恒定，出生后将不再有新腺体生成[88]。外泌汗腺为单管结构，缺乏分支，由两部分组成，分别是分泌部和导管部，分泌部为无分支的粗而卷曲的管状结构，连同一段导管蟠曲成团，位于皮下组织和真皮交界处，或真皮的下1/3部分；导管部为细长稍扭曲的上皮管道，由真皮深层上行，呈螺旋状上升伸入表皮，直接开口于表皮汗孔。创伤或烧伤后汗腺本身具有增殖修复的生理变化，但与损伤程度密切相关，真皮浅层的伤口，汗腺细胞可以利用其深部未受损部分为模板进行增殖分化而完全恢复其正常的三维结构，下分泌部能够重新开始发挥分泌功能且其导管部能够重建其在皮肤表面的出口；而严重创伤或烧伤往往造成真皮深层组织丢失，汗腺分泌部结构破坏严重、汗腺导管受损导致汗腺等皮肤附属器无法再生[89]，最终形成慢性难愈性创面或增生性瘫痕或瘫痕疙瘩，从而给患者工作和生活带来不利影响。

随着医疗技术水平的进步，对大面积深度烧伤救治的成功率显著提高。为了进一步改善患者的生活质量对于皮肤创面的愈合更要求完美，不仅要使皮肤结构完全恢复正常状态，即解剖修复；更要求皮肤恢复原有的生理功能，即功能修复。而目前对大面积烧伤造成患者皮肤组织广泛缺损的修复主要为早期切削痂及人工皮肤对创面的覆盖，而人工皮肤缺乏皮肤的完整结构，无法重建汗腺等皮肤附属器，其仅能满足创面修复在外观上的需要，对皮肤功能性修复仍未解决。患者创面修复后常由于汗腺缺失或瘢痕组织阻塞其分泌管道而无法分泌汗液，降低了皮肤对外界环境的适应能力，导致患者体温调节功能严重障碍，生理和心理健康受到严重影响，生活质量及工作效率显著降低。因此，作为皮肤结构功能不可缺少的组成部分，汗腺再生修复的研究日益受到关注，如何实现皮肤汗腺等附属器的功能修复与重建是烧伤创面修复与组织再生研究的热点及难点。干细胞技术和组织工程学的建立和发展为解决大面积皮肤缺损的功能修复这一难题提供了新的思路，通过干细胞移植诱导再生汗腺是其中的重要方法之一[90,91]。干细胞分为胚胎干细胞与成体干细胞，由于胚胎干细胞涉及伦理道德争议且其来源有限， 限制了它的临床应用，而成体干细胞同样具有多向分化潜

100

能，且避免了免疫排斥反应及伦理道德争议，所以成体干细胞更适合应用于再生医学[92]。胚胎学理论认为，汗腺与表皮干细胞在发育学上有共同的来源，均由外胚层上皮分化形成。外胚层上皮细胞通过分裂增殖并内陷在表皮嵴形成上皮细胞索，上皮细胞索的末端发育成分泌部，近端发育为导管，上皮细胞索向深部组织内生长而不发生分支，并出现空隙，最终发育为分泌部和导管形成汗腺。且研究发现，胎儿时期皮肤如果受到全层损伤，能在结构与功能方面完全修复受损的皮肤及其附件[93]，其中，表皮干细胞起了重要作用。同时表皮干细胞来源丰富，易于分离，有强大的自我更新及增殖分化潜能，因此有可能利用表皮干细胞定向分化为汗腺细胞再生汗腺。但是表皮干细胞向汗腺细胞自然分化的几率非常低[94]，阻碍了创面的功能修复，如何促进表皮干细胞向汗腺细胞分化是本章研究的主要内容。

从前面的实验结果及分析中已知miR-203在表皮高表达能够抑制表皮干细胞的增殖潜能、促进其退出细胞周期，从而诱导表皮干细胞分化。为了证实其能否诱导表皮干细胞向汗腺样细胞分化，本章研究通过miRBase数据库查找人源miR-203序列，设计并合成miR-203双链模拟物，利用脂质体转染技术在体外将miR-203模拟物分子导入人表皮干细胞中，通过荧光显微镜下观察、流式细胞仪检测转染效率及RT-PCR技术测定转染前后miR-203的变化均表明转染成功。并通过倒置显微镜观察转染前后的细胞形态变化、通过免疫细胞化学染色、RT-PCR及Western blot技术检测转染前后细胞ITGB1、CK19、CK1、CK10、

CK18、CEA的变化，发现转染后的细胞CK1、CK10、CK18、CEA高表达，而

ITGB1、CK19低表达。CK18是被覆上皮中单层上皮的标志，在成人汗腺的分泌部表达，而CEA是对汗腺结构灵敏而特异的标记分子，由汗腺分泌细胞的腔面和导管的腔面表达，在表皮的其他部位不表达。由于CEA、CK18在汗腺组织较特异性的表达，因此常被作为汗腺细胞标记物[95-97]。本实验结果表明miR-203能在体外诱导人表皮干细胞分化为汗腺上皮细胞及角质形成细胞。

同时，实验组p63基因及蛋白的表达与miR-203的mRNA表达量呈负相关系，与前面的研究一致，因此我们推测miR-203诱导表皮干细胞分化为汗腺样细胞的一个重要机制可能是其通过抑制p63靶基因的表达，限制基底层表皮干细胞的增殖潜能，从而诱导表皮干细胞向汗腺样细胞分化。

综上所述，本章利用miR-203在体外诱导人表皮干细胞发生表型转化尤其是向汗腺上皮细胞分化，为重建汗腺的研究提供了重要的实验基础，为构建具

101

有生理功能的人工皮肤提供了新的思路和方法。若能进一步在体内通过上调miR-203的表达优化创面尤其是附属器官的愈合，对实现创面的功能修复将有非常重要的临床意义。但如何成功高效构建出三维立体的功能性组织工程皮肤，以及其中涉及的信号通路等还有待进一步研究。

### **5.4** 小结

miR-203能诱导体外培养的人表皮干细胞分化为汗腺样细胞，其作用可能是通过靶向抑制p63来实现的。

102

### 全文小结

（1）体外培养的人表皮干细胞与角质形成细胞miRNA表达谱存在明显差异，可能与两者不同的增殖分化能力等生物学特性有关。

（2）miR-203在体外培养人表皮干细胞中的表达明显低于角质形成细胞，而p63在人表皮干细胞中的表达显著高于角质形成细胞，miR-203与p63基因及蛋白表达呈负相关。p63的mRNA可能是miR-203的靶基因，miR-203可能通过抑制p63参与调控表皮细胞的增殖分化。

（3）miR-203下调能够诱导体外培养的人角质形成细胞去分化为表皮样干细胞，且去分化源性表皮样干细胞与机体自身来源的表皮干细胞形态及生物学特性相似。靶基因p63表达上调可能是其重要机制之一。

（4）miR-203能诱导体外培养的人表皮干细胞分化为汗腺样细胞，其作用可能是通过靶向抑制p63来实现的。

103

致**谢**

时光飞逝，转眼三年的博士研究生生涯即将结束，回首过去，思绪万千。值此之际，向所有给我关怀和帮助的人们表示衷心感谢！

首先向尊敬的导师刘德伍教授致以衷心的谢意！从论文选题、试验设计、实验完成到论文的撰写、修改与发表，每一环节都凝聚着导师的汗水与心血。恩师渊博的学识、孜孜不倦的治学态度、求真务实的工作作风和脚踏实地的做人风格，深刻影响着我今后的工作和生活，将使我终生受益。师恩之情，铭记于心！

感谢彭燕师妹在实验方面给与的大力支持及生活方面给与的关心和帮助！感谢已毕业的硕士研究生李津、章志伟、宁璞在实验过程中给予我的鼎力

相助。

衷心感谢南昌大学第一附属医院烧伤研究所、心内科及泌尿科的老师们给我的无私帮助。感谢研究生部的老师们，难忘你们在我整个学习期间不辞辛劳的热情付出。

衷心感谢所有给予过我帮助、关怀和支持的老师、同事和朋友们。

最后，要特别感谢我的家人，他们的支持和鼓励给我不断前进的动力，使我圆满完成学业。

104

参考文献

[1] Li N, Hu X, Liu Y, et al. [Systemic inflammatory responses and multiple organ dysfunction syndrome following skin burn wound and Pseudomonas aeruginosa infection in mice [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23707977) Shock, 2013, 40(2): 152-159.

[2] Green H, Kehinde O, Thomas J. [Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/293669) Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(11): 5665-5668.

[3] Bannasch H, Stark GB, Knam F, et al. [Decellularized dermis in combination with cultivated keratinocytes in a short- and long-term animal experimental investigation [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18181972) J Eur Acad Dermatol Venereol, 2008, 22(1): 41-49.

[4] Tao R, Sun TJ, Han YQ, et al. [Epimorphin-induced differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into sweat gland cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867521) Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(9): 1404-1410.

[5] BalañáME, Charreau HE, Leirós GJ. Epidermal stem cells and skin tissue engineering in hair follicle regeneration [J]. World J Stem Cells, 2015, 7(4): 711-727.

[6] Schepeler T, Page ME, Jensen KB. [Heterogeneity and plasticity of epidermal stem cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24961797) Development, 2014, 141(13): 2559-2567.

[7] Senoo M. [Epidermal Stem Cells in Homeostasis and Wound Repair of the Skin [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24527349) Adv Wound Care (New Rochelle), 2013, 2(6): 273-282.

[8] Wang Y, Yang X. [Identification and analysis of epidermal stem cells from primary mouse keratinocytes [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483388) Methods Mol Biol, 2013, 989: 71-81.

[9] Yang RH, Xie JL, Shu B, et al. [An improved method for the isolation and culture of rat epidermal stem cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24228116) Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(11): 2529-2534.

[10] Li J, Fu X, Sheng Z. [Study on the relationship between epidermal stem cells and the developing process of sweat gland in human fetal skin [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12641991) Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2002, 18(6): 369-371.

[11] Choi HR, Byun SY, Kwon SH, et al. [Niche interactions in epidermal stem cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25815134) World J Stem Cells, 2015, 7(2): 495-501.

[12] Lim X, Tan SH, Koh WL, et al. [Interfollicular epidermal stem cells self-renew via autocrine Wnt signaling [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24311688) Science, 2013, 342(6163): 1226-1230.

[13] Dong J, He Y, Zhang X, et al. [Calcitonin gene-related peptide regulates the growth of epidermal stem cells in vitro [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20654671) Peptides, 2010, 31(10): 1860-1865.

[[14] Stout GJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stout%20GJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19259387) [Blasco MA.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Blasco%20MA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19259387) Genetic dissection of the mechanisms underlying telomere-associated diseases: impact of the TRF2 telomeric protein on mouse epidermal stem cells [J]. [Dis Model Mech,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Epidermal%2Bstem%2Bcells%5BTitle%5D%2BAND%2Banti%2Boncogene) 2009, 2(3-4): 139-156.

[15] Wojtas B, Ferraz C, Stokowy T, et al. [Differential miRNA expression defines migration and reduced apoptosis in follicular thyroid carcinomas [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631480) Mol Cell Endocrinol, 2014, 388(1-2):

105

1-9.

[16] Bronevetsky Y, Ansel KM. [Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23550654) Immunol Rev, 2013, 253(1): 304-316.

[[17] Nie YQ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nie%20YQ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24288170)1, [Cao J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cao%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24288170) [Zhou YJ,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhou%20YJ%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=24288170) et al. The effect of miRNA-122 in regulating fat deposition in a cell line model [J]. [J Cell Biochem,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=miRNA%5BTitle%5D%2BAND%2BFat%2B%2B%5BTitle%5D) 2014, 115(5): 839-846.

[18] Rao R, Nagarkatti P, Nagarkatti M. [Role of miRNA in the regulation of inflammatory genes in staphylococcal enterotoxin B-induced acute inflammatory lung injury and mortality [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25564423) Toxicol Sci, 2015, 144(2): 284-297.

[19] Hu H, Zhao X, Jin Z, et al. [Hsa-let-7g miRNA regulates the anti-tumor effects of gastric cancer cells under oxidative stress through the expression of DDR genes [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972194) J Toxicol Sci, 2015, 40(3): 329-338.

[20] Li Y, Zhuang L, Wang Y, et al. [Connect the dots: a systems level approach for analyzing the miRNA-mediated cell death network](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322033) [J]. Autophagy, 2013, 9(3): 436-439.

[21] Cai T, Liu ZH, Wang ZX, et al. miRNA in regulation of skin and hair follicle development [J]. Yi Chuan, 2013, 35(9): 1087-1094.

[22] Roy S, Sen CK. MiRNA in wound inflammation and angiogenesis [J]. Microcirculation, 2012, 19(3): 224-232.

[23] Nissan X, Denis JA, Saidani M, et al. [MiR-203 modulates epithelial differentiation of human embryonic stem cells towards epidermal stratification [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684271) Dev Biol, 2011, 356(2): 506-515.

[24] Rajaram K, Harding RL, Hyde DR. [MiR-203 regulates progenitor cell proliferation during adult zebrafish retina regeneration](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24858486) [J]. Dev Biol, 2014, 392(2): 393-403.

[25] Sonkoly E, Wei T, Janson PC, et al. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis[J]. PLoSOne, 2007, 2(7): e610.

[26] Andl T, Murchison EP, Liu F, et al. The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles [J]. Curr Biol, 2006, 16(10): 1041–1049.

[27] Yi R, Pasolli HA, Landthaler M, et al. DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(2): 498–502.

[28] Yi R, Poy MN, Stoffel M, et al. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'[J]. Nature, 2008, 452(7184): 225-229.

[29] Wei T, Orfanidis K, Xu N, et al. The expression of microRNA-203 during human skin morphogenesis [J]. Exp Dermatol, 2010, 19(9): 854-856.

[30] Nissan X, Denis JA, Saidani M, et al. [MiR-203 modulates epithelial differentiation of human embryonic stem cells towards epidermal stratification [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684271) Dev Biol, 2011, 356(2): 506-515.

[31] Lewis BP, Burge CB, and Bartel DP. [Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477) [J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.

[32] Bartel DP. [MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438) Cell, 2004, 116(2): 281-297.

[33] Jinnin M. [Recent progress in studies of miRNA and skin diseases [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25917002) J Dermatol, 2015, 42(6): 551-558.106

[34] Shen Q, Jin H, Wang X. Epidermal stem cells and their epigenetic regulation [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(9): 17861-17880.

[35] Beck B, Blanpain C. [Mechanisms regulating epidermal stem cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22433839) EMBO J, 2012, 31(9): 2067-2075.

[36] Zhao L, Hantash BM. [Isolation and cultivation of human scalp interfollicular epidermal stem cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483383) Methods Mol Biol, 2013, 989: 11-19.

[37] Bose A, Teh MT, Mackenzie IC, et al. [Keratin k15 as a biomarker of epidermal stem cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24071939) Int J Mol Sci, 2013, 14(10): 19385-19398.

[38] Yi, R. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs [J]. Nat. Genet, 2006, 38: 356–362.

[39] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. [The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706289) Nature, 2000, 403(6772): 901-906.

[40] Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, et al. [The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699775) Cancer Res, 2007, 67(16): 7713-7722.

[41] Peng H, Kaplan N, Hamanaka RB, et al. [MicroRNA-31/factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1 nexus regulates keratinocyte differentiation [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22891326) Proc Natl Sci USA, 2012, 109(35): 14030-14034.

[42] Mardaryev AN, Ahmed MI, Vlahov NV, et al. [Micro-RNA-31 controls hair cycle-associated changes in gene expression programs of the skin and hair follicle [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522784) FASEB J, 2010, 24(10): 3869-3881.

[43] Biswas S, Roy S, Banerjee J, et al. [Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20308562) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(15): 6976-6981.

[44] Bertero T, Gastaldi C, Bourget-Ponzio I, et al. [MiR-483-3p controls proliferation in wounded epithelial cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21676945) FASEB J, 2011, 25(9): 3092-3105.

[45] Shin KH, Pucar A, Kim RH, et al. [Identification of senescence-inducing microRNAs in normal human keratinocytes](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725593) [J]. Int J Oncol, 2011, 39(5): 1205-1211.

[46] Lena AM, Mancini M, Rivetti di Val Cervo P, et al. MicroRNA-191 triggers keratinocytes senescence by SATB1 and CDK6 downregulation. [Biochem Biophys Res Commun](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=MicroRNA-191%2Btriggers%2Bkeratinocytes) [J]. 2012, 423(3): 509-514.

[47] Zhang L, Stokes N, Polak L, et al. Speciﬁc microRNAs are preferentially expressed by skin stem cells to balance self-renewal and early lineage commitment [J]. Cell Stem Cell, 2011, 8 (3): 294–308.

[48] Giglio S, Cirombella R, Amodeo R, et al. [MicroRNA miR-24 promotes cell proliferation by targeting the CDKs inhibitors p27(Kip1) and p16(INK4a.) [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23553486) J Cell Physiol, 2013, 228(10): 2015-2023.

[[49] Yang X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yang%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21647251) [Wang J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21647251) [Guo SL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Guo%20SL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21647251) et al. MiR-21 promotes keratinocyte migration and re-epithelialization during wound healing [J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(5): 685-690.

[50] Yu J, Peng H, Ruan Q, et al. [MicroRNA-205 promotes keratinocyte migration via the lipid](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530248)

107

[Phosphatase SHIP2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530248) [J]. FASEB J, 2010, 24(10): 3950-3959.

[51] Yu J, Ryan DG, Getsios S, et al. [MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033458) Proc Natl Acad Sci U S A [J]. 2008, 105(49): 19300-19305.

[52] He C, Gao H, Fan X, et al. [Identification of a novel miRNA-target gene regulatory network in osteosarcoma by integrating transcriptome analysis [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339404) Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(7): 8348-8357.

[53] Pio G, Ceci M, Malerba D, et al. ComiRNet: a web-based system for the analysis of miRNA-gene regulatory networks [J]. BMC Bioinformatics, 2015, 16 Suppl 9: S7.

[54] Jackson SJ, Zhang Z, Feng D, et al. [Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23571213) 2013, 140(9): 1882-1891.

[55] Bian K, Fan J, Zhang X, et al. [MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306317) FEBS Lett, 2012, 586(6): 804-809.

[56] Cerqueira MT, Frias AM, Reis RL, et al. [Interfollicular epidermal stem cells: boosting and rescuing from adult skin [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483382) Methods Mol Biol, 2013, 989: 1-9.

[57] Pan X, Hobbs RP, Coulombe PA. [The expanding significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270662) [J]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 25(1): 47-56.

[58] Oti M, Kouwenhoven EN, Zhou H. [Genome-wide p63-regulated gene expression in differentiating epidermal keratinocytes [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26484246) Genom Data, 2015, 5: 159-163.

[59] Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al. P63, a p53 homolog at3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing and dominant-negative activities [J]. Mol Cell, 1998, 2 (3): 305-316.

[60] Orzol P, Nekulova M, Vojtesek B, et al. [P63 - an important player in epidermal and tumour development](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23581010) [J]. Klin Onkol, 2012, 25 Suppl 2: 2S11-2S15.

[61] Botchkarev VA, Flores ER. [P53/p63/p73 in the epidermis in health and disease [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085956) Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 4(8).

[62] Yao JY, Chen JK. [Roles of p63 in epidermal development and tumorigenesis](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23442358) [J]. Biomed J, 2012, 35(6): 457-463.

[63] Tadeu AM, Horsley V. [Notch signaling represses p63 expression in the developing surface ectoderm [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23924630) Development, 2013, 140(18): 3777-3786.

[64] Koster MI. [P63 in skin development and ectodermal dysplasias [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445549) J Invest Dermatol, 2010, 130(10): 2352-2358.

[65] Romano RA, Sinha S. [Dynamic life of a skin keratinocyte: an intimate tryst with the master regulator p63 [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013738) Indian J Exp Biol, 2011, 49(10): 721-731.

[66] Wu NL, Lee TA, Tsai TL, et al. [TRAIL-induced keratinocyte differentiation requires caspase activation and p63 expression [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248767) J Invest Dermatol, 2011, 131(4): 874-883.

[67] Guzman A, Ramos-Balderas JL, Carrillo-Rosas S, et al. [A stem cell proliferation burst forms new layers of P63 expressing suprabasal cells during zebrafish postembryonic epidermal development [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24244854) Biol Open, 2013, 2(11): 1179-1186.108

[68] Waters MJ, Tweedale RC, Whip TA, et al. [Dedifferentiation of cultured thyroid cells by epidermal growth factor: some insights into the mechanism [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3030848) Mol Cell Endocrinol, 1987, 49(2-3): 109-117.

[69] Liu X, Wang P, Chen W, et al. [Human embryonic stem cells and macroporous calcium phosphate construct for bone regeneration in cranial defects in rats [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24972090) Acta Biomater, 2014, 10(10): 4484-4493.

[70] Chen L, Qiu R, Li L. [The role of nanotechnology in induced pluripotent and embryonic stem cells research [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26000365) J Biomed Nanotechnol, 2014, 10(12): 3431-3461.

[71] Ferretti P. Neural stem cell plasticity: recruitment of endogenous populations for regeneration [J]. Curr Neurovasc Res, 2009, 1(3): 215-229.

[72] Tholpady S S, AojanepongC, LlullR, et al. The cellularplasticity of human adipocytes [J]. Ann PlastSurg, 2010, 54(6): 651-656.

[73] Gerace D, Martiniello-Wilks R, O'Brien BA, et al. [The use ofβ-cell transcription factors in engineering artificialβcells from non-pancreatic tissue [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25338918) Gene Ther, 2015, 22(1): 1-8.

[74] Wang IJ, Tsai RJ, Yeh LK, et al. Changes in corneal basal epithelial phenotypes in an altered basement membrane [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e14537.

[75] Zhuang S, Yan Y, Han J, et al. P38 kinase-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor is required for dedifferentiation of renal epithelial cells after oxidant injury [J]. J Biol Chem, 2011, 280(22): 21036-21042.

[76] Gurusinghe S, Young P, Michelsen J, et al. [Suppression of dedifferentiation and hypertrophy in canine chondrocytes through lentiviral vector expression of Sox9 and induced pluripotency stem cell factors [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25813774) Biotechnol Lett, 2015, 37(7): 1495-1504.

[[77] Fu X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Fu%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11589942) [Sun X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sun%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11589942) [Li X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Li%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11589942) et al. Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo [J]. [Lancet,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The%2BDedifferentiation%2Bof%2Bepidermal%2Bcells%2BAND%2BrhEGF) 2001, 358(9287): 1067-1068.

[78] 谢晓繁, 贾赤宇, 陈壁, 等. 移植超薄表皮片中成熟细胞逆向分化为表皮干细胞的现象[J]. 中国临床康复, 2006, 10(17): 15-17.

[79] Cai Y, Dai X, Zhang Q, et al. [Gene expression of OCT4, SOX2, KLF4 and MYC (OSKM) induced pluripotent stem cells: identification for potential mechanisms [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25907774) Diagn Pathol, 2015, 10: 35.

[80] Folmes CD, Martinez-Fernandez A, Faustino RS, et al. [Nuclear reprogramming with c-Myc potentiates glycolytic capacity of derived induced pluripotent stem cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23247633) J Cardiovasc Transl Res, 2013, 6(1): 10-21.

[[81] Richter H](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Richter%20H%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9574811)1, [Vamvakas S.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Vamvakas%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=9574811) S-(1, 2-dichlorovinyl) -L-cysteine-induced dedifferentiation and p53 gene mutations in LLC-PK1 cells: a comparative investigation with S-(2-chloroethyl) cysteine, potassium bromate, cis-platinum and styrene oxide [J]. [Toxicol Lett,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dedifferentiation%5Btitle%5D%2Band%2BChemical%2Binduction) 1998, 94(2): 145-157.

[82] Kormos B, Belso N, Bebes A, et al. [In vitro dedifferentiation of melanocytes from adult epidermis [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383848) PLoS One, 2011, 6(2): e17197.

[83] Xu L, Zhang K, Wang J. [Exploring the mechanisms of differentiation, dedifferentiation,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25133589)

109

[Reprogramming and transdifferentiation [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25133589) PLoS One, 2014, 9(8): e105216.

[84] Plichta JK, Droho S, Curtis BJ, et al. [Local burn injury impairs epithelial permeability and antimicrobial peptide barrier function in distal unburned skin [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717471) Crit Care Med, 2014, 42(6): e420-431.

[85] Stollery N. [Sebaceous and sweat gland isorders [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469726) Practitioner, 2013, 257(1757): 32-33.

[86] Chuong CM, Randall VA, Widelitz RB, et al. [Physiological regeneration of skin appendages and implications for regenerative medicine [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505663) Physiology (Bethesda), 2012, 27(2): 61-72.

[87] Gkegkes ID, Aroni K, Agrogiannis G, et a1. [Expression of caspase-14 and keratin-19 in the human epidermis and appendages during fetal skin development [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377137) Arch Dermatol Res, 2013, 305(5): 379-387.

[88] Tao R, Sun TJ, Han YQ, et al. [Epimorphin-induced differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into sweat gland cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24867521) Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(9): 1404-1410.

[89] Zhang C, Chen Y, Fu X. Sweat gland regeneration after burn injury: is stem cell therapy a new hope [J]. Cytotherapy, 2015, 17(5): 526-535.

[90] Wang Y, Liu ZY, Zhao Q, et a1. [Future application of hair follicle stem cells: capable in differentiation into sweat gland cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24034106) Chin Med J (Engl), 2013, 126(18): 3545-3552.

[91] Yang S, Ma K, Feng C, et a1. [Capacity of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells to differentiate into sweat gland-like cells: a preclinical study [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23794058) Front Med, 2013, 7(3): 345-353.

[92] Zigdon-Giladi H, Rudich U, Michaeli Geller G, et al. [Recent advances in bone regeneration using adult stem cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25914769) World J Stem Cells, 2015, 7(3): 630-640.

[93] Kishi K, Okabe K, Shimizu R, et al. [Fetal skin possesses the ability to regenerate completely: complete regeneration of skin [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23324304) Keio J Med, 2012, 61(4): 101-108.

[94] Fu X, Li J, Sun X, et al. [Epidermal stem cells are the source of sweat glands in human fetal skin: evidence of synergetic development of stem cells, sweat glands, growth factors, and matrix metalloproteinases [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659042) Wound Repair Regen, 2005, 13(1): 102-108.

[95] Gao Y, Li M, Zhang X, et al. [Isolation, culture and phenotypic characterization of human sweat gland epithelial cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25187692) Int J Mol Med, 2014, 34(4): 997-1003.

[96] Noël F, Piérard GE, Delvenne P, et al. [Immunohistochemical sweat gland profiles [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992159) J Cosmet Dermatol, 2013, 12(3): 179-186.

[[97] Zhou L,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhou%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19275094) [Wu J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wu%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19275094) [Lei X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lei%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=19275094) et al. Preliminary study on formation of eccrine sweat gland-like structure in three-dimensional cell culture [J]. [Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=(sweat%2Bgland%5BTitle%5D)%2BAND%2BKeratin%2B18) 2009, 23(2): 156-160.

110

**攻读学位期间的研究成果**

**已发表论文：**

[1] Song ZF, Liu DW, Peng Y, et al. [Differential microRNA expression profile comparison](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25373715)

[Between epidermal stem cells and differentiated keratinocytes[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25373715) Mol Med Rep, 2015, 11(3): 2285～91.

[2]宋志芳，刘德伍，彭燕，等. 微小RNA-203与P63在人表皮干细胞和角质形成细胞中的表达变化[J]. 中华烧伤杂志, 2014, 30(4)：344～348.

[3]宋志芳，刘德伍. 微小RNA在皮肤发育再生及创面愈合中的作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(7)：913～918.

[4]宋志芳，刘德伍，李津. 不同发育阶段表皮细胞微小RNA的差异表达谱分析[J]. 中华创伤杂志, 2014, 30(5)：394～399.

[5]宋志芳，刘德伍，彭燕，等. miRNA-203转染诱导人表皮干细胞向汗腺细胞分化的研究[J].中国修复重建外科杂志, 2015, 29(3)：349～356.

**科研课题：**

[1]课题类别：江西省教育厅科学技术研究项目（2012年立项）

课题名称：诱导多能干细胞定向分化构建组织工程皮肤研究（第一主持）

[2]课题类别：江西省自然科学基金（2014年立项）

课题名称：抗miR-203 对角质形成细胞去分化作用研究（第一主持）

[3]课题类别：江西省研究生创新专项资金立项项目（2013年立项）

课题名称：miR-203在人表皮干细胞中的表达与调控研究（第一主持）

[4]课题类别：江西省卫生厅科技计划（2014年立项）

课题名称：微小RNA-203体外诱导人表皮干细胞向汗腺细胞分化的研究（第一主持）

111

**综 述**

**微小RNA在皮肤发育及创面愈合中的作用**

**【摘要】目的**综述微小RNA（micro RNA, miRNA）在皮肤发育、再生与创面愈合各环节中的作用。**方法**查阅近年miRNA参与皮肤发育及创面愈合方面的文献，并进行分析总结。**结果**miRNA广泛参与了机体皮肤发育，包括表皮细胞的增殖、分化、衰老及毛囊的发育，尤其是miR-203被称为“皮肤特异性的miRNA”，可通过直接抑制p63的表达而促进表皮分化。同时miRNA亦参与皮肤再生及创面愈合的各个阶段，miRNA的异常表达与伤口畸形愈合密切相关。**结论**miRNA在维持皮肤正常结构功能及创面再生修复过程中发挥了重要作用，探讨它们在皮肤创面愈合中的作用及其调控机制并为治疗提供新靶点，具有潜在应用价值与广阔前景。

【**关键词**】微小； RNA； 皮肤发育； 皮肤再生； 创面修复

**THE ROLE OF MICRORNA IN SKIN DEVELOPMENT AND WOUND**

【**Abstract**】**Objective** To review the role of miRNA in skin development and wound healing. **Methods** The recent literature about miRNA in skin development and wound healing was reviewed and analyzed. **Results** MiRNAs extensively involved in the development of the skin, including epidermal cell proliferation, differentiation, aging and hair follicle development, MiR-203 known as the" skin-specific miRNA" can directly inhibit the expression of p63 and promote the differentiation of the epidermis. Meanwhile, miRNA also involved in various stages of skin regeneration and wound healing. Abnormal expression of miRNA is closely related with abnormal wound healing. **Conclusion** miRNA play an important role in maintaining the normal Skin physiology and skin regeneration. To explore their roles

In the healing of skin wounds and their regulatory mechanism can provide a new target for the treatment, which has a potential value and broad prospects.

**【Key words】**MiRNA Skin Development Regeneration Wound healing

112

微小RNA（micro RNA, miRNA）作为内源性非编码单链RNA，在机体发育、细胞增殖分化与凋亡、肿瘤形成及疾病发生发展等许多生物过程中发挥重要作用。越来越多证据表明[1-3]，miRNA参与调控皮肤及其附属器官的形成和稳态，且与皮肤再生修复明显相关。本文就miRNA在皮肤发育、再生与创面愈合各环节中的作用作一综述。

**1 miRNA的Th物合成及功能概述**

miRNA是一类由19~24个核苷酸组成的单链非编码RNA分子，其基因位于内含子或非编码区的外显子或间隔区。大多数miRNAs基因是孤立的，并在自身启动子的控制下表达，少数miRNAs基因是成簇的，可以共表达[4]。在哺乳动物的基因组中，miRNA基因占基因总数的1%~3%[5]. miRNA的加工过程如下：首先，在细胞核内，RNA聚合酶II将编码miRNA的基因转录成含有几千个碱基、具备茎环结构的分子称前体miRNA(pri-miRNA)；pri-miRNA与信使核糖核酸（mRNA）分子类似，亦含有5，帽子结构和3，多聚A尾巴。然后，pri-miRNA的茎部被RNA酶III Drosha及其辅助因子DGCR8非对称地切割，形成约70个核苷酸长度的pre-miRNA。接着，pre-miRNA被核转运受体Exportin-5及核蛋白RanGTP输送至细胞质中，由RNA酶III Dicer切割其环部，产生一个短的双链分子，其中一条单链为成熟miRNA，能结合到靶mRNA的3，非翻译区来调节基因的表达；另一条为与之互补的miRNA\*，miRNA\*一般被降解，在某些情况下miRNA\*可不被降解，亦靶向结合某些特定的基因[6]。研究发现，

miRNA与靶基因的结合位点位于其自身5，端的第2~8个核苷酸，即由7个核苷酸组成的“种子序列”，并且是通过RNA诱导的沉默复合物（RNA induced silencing complex, RISC）发挥作用的[7]。虽然miRNA通过RISC调节基因表达的精确机制仍不清楚，但一般认为miRNA和靶mRNA之间的互补程度是调节基因表达的主要机制[8]，即两者如果高度互补，近乎完美，靶mRNA则被降解；如果互补程度低，则对靶mRNA进行翻译抑制。据估计，超过1/3编码蛋白的mRNA受miRNA调控[9]，miRNA通过转录后调控基因表达影响细胞蛋白质的合成[10]。因此，miRNA是动物发育及许多生物过程的重要调控者，如信号转导、细胞增殖与分化、细胞凋亡、衰老与死亡、免疫调节、炎性反应、脂肪代谢[11]、器官发育、肿瘤形成及疾病的发生发展等。皮肤的形态发生是一个复

113

杂过程，受到一系列信号通路的调节，已有许多研究证实稳定的miRNA调控网络在这一过程发挥了极其重要的作用，miRNA异常必将导致皮肤形态发生障碍。

**2 miRNA在皮肤发育中的作用**

初次探讨miRNA在皮肤中的作用是通过缺失miRNA生物合成所需的关键酶和蛋白来进行的。小鼠胚胎发育早期组成性缺失Dicer酶[12]或DGCR8[13]可导致胚胎在皮肤发育之前死亡，而在小鼠胚胎发育晚期条件性地缺失Dicer可以更好地研究miRNA的功能。Yi等[2]在表皮特异性启动子keratin-14的介导下将胚胎皮肤祖细胞的Dicer条件性地敲除，即胚胎发育17.5 d时皮肤相关的miRNA缺失，晚于表皮分化时间（胚胎发育13.5 d）及毛发初步发育时间[3]（胚胎发育

15.5 d）。Dicer敲除后新生小鼠的表型基本正常，但于出生后1～2 d体重开始下降，4～6 d出现明显脱水，在毛被发育前死亡。组织学检查示，毛囊发育不全及错位，凋亡增加，毛囊形成过程中不向内陷，而是向表皮外翻、退化，表皮层形成囊状结构，表皮屏障功能丧失，导致Dicer缺失小鼠脱水和早期死亡。且毛囊外根鞘膨凸部的干细胞标志物，如角蛋白15和CD34缺失，提示毛囊发育缺陷是由于毛囊干细胞的早期缺失所致。与之对比，滤泡间表皮未受到明显影响，保持其正常分化程序，表明一部分miRNAs（或它们的靶基因）作用于毛囊干细胞，而不是滤泡间表皮。除了Dicer, DGCR8也是miRNA生物合成过程中必不可少的辅酶。使用类似敲除Dicer酶的方法使表皮特异性缺失DGCR8，结果发现，DGCR8和Dicer缺失的小鼠表型无太大差异，如毛囊外翻、毛球细胞凋亡增多、皮肤粗糙、脱水及新生小鼠致死现象等[14]。总之，这些研究揭示了miRNA在哺乳动物的皮肤发育过程中起着关键作用。

**3单个miRNA在皮肤发育中的表达及功能**

通过研究Dicer和DGCR8敲除的小鼠皮肤，揭示了miRNAs在皮肤形态发生、毛囊干细胞的维持、表皮细胞增殖和凋亡中的重要作用。关于单个miRNA在皮肤调控机制中的研究也有很多报道，Andl等[15]对正常新生小鼠和转基因新生小鼠（即通过表达Wnt 抑制剂DKK1 干扰毛发发育的小鼠）全层皮肤的

miRNAs进行芯片扫描以辨别miRNAs表达有无差异，结果发现，miR-200家族

(miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 及miR-149)、miR-19/20 家族

114

（miR-19b、miR-20、miR-17-5p及miR-93）在表皮中优先表达，而miR-199a、miR-214、miR-126、miR-143、miR-152在毛囊中优先表达。

许多miRNAs对皮肤有特定功能[1,16]。miR-203是第一个被发现在表皮及毛囊丰富表达的miRNA. Sonkoly等[17]系统分析了miR-203在健康人皮肤及各器官中的表达，结果显示miR-203在皮肤中的表达比在其他器官中高出100倍，被称为是“皮肤特异性的miRNA”。另一项研究发现，miR-203在小鼠胚胎13.5 d时的皮肤（为单层上皮）中几乎检测不到，但胚胎15.5 d（表皮开始分层时）后成为皮肤中表达最丰富的miRNA，提示其表达与皮肤的分化和分层密切相关[18]。成熟皮肤原位杂交实验发现[18]，miR-203高表达于表皮基底上层或毛囊的内根鞘，而不表达于表皮基底层、毛囊外根鞘隆突部。且miR-203这种在皮肤最外层高表达的方式在斑马鱼[19]和人[20]中也得到了证实，表示一种跨物种的保守功能。当表皮细胞所处微环境中加入钙[21] 、TPA

（12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, 12-氧-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯）[22]或维生素D[22]时，miR-203的表达迅速增加。研究发现在表皮基底层过表达miR-203的转基因小鼠出生后不久死亡，组织学显示表皮菲薄、基底层角蛋白5阳性细胞耗竭，提示miR-203过表达能减少干细胞的数量，从而影响表皮的结构与功能[18]。然而，miR-203对表皮细胞的影响是有限的，其主要任务是使干细胞从基底层迁移至基底上层时生物学特性随之发生改变[23]。转录因子p63是表皮角质形成细胞中miR-203的重要靶基因，它是不同物种复层上皮组织中一个重要的干性维持者，若小鼠缺失p63会导致所有复层上皮灾难性损失[24]。p63和miR-203的表达是一种相互排斥的模式，生物信息学和实验表明，miR-203通过直接抑制p63的表达，促进基底层细胞退出细胞周期且向基底上层过渡[25]。另外，p63亦受miR-720、miR-574-3p[26]靶向调控，与miR-203的表达模式及功能类似，miR-720、miR-574-3p也主要在人表皮基底上层表达，参与表皮的分化。研究表明，p63调节角质形成细胞细胞周期进程的机制之一是通过对miR-34家族成员（miR-34a、miR-34c）的抑制[27]，继而增加细胞周期蛋白D1、CDK4的表达，促进干细胞由G1期向S期转变，即促进小鼠干细胞增殖。p63还能通过转录调控Dicer和miR-130b从而达到抑制肿瘤及其转移的作用[28]。

鉴于miRNA在调节胚胎和成体干细胞的关键作用，可以预见其也能调节表皮干细胞。研究显示，miR-125b在小鼠的表皮干细胞高表达，而在早期子代细胞表达大幅下降，其通过转录后抑制靶基因Blimp1及VDR维持角质形成细胞

115

“干性”[29]，若在转基因小鼠的皮肤干细胞及其子代细胞中持续过表达miR-125b可导致表皮增厚、皮脂腺增大，且未能产生毛被，说明了miR-125b能调节干细胞的自我更新，抑制干细胞分化。同样，在人表皮干细胞中高表达的miR-24通过转录后抑制细胞周期蛋白依赖激酶抑制蛋白P27、P16，促进干细胞由G1期向

S期转变，细胞增殖；相反，拮抗miR-24可抑制表皮干细胞增殖[30] 。

毛囊周期分为生长期、退行期和静止期，同时伴有表皮和毛囊显微解剖、血管、神经的显著变化[31]。miR-31为控制毛发生长周期的一个关键因子，其在小鼠毛发生长期表达显著增加，在退行期和休止期下降，通过抑制靶基因Krt16、

Dlx3、Fgf10来抑制毛发的生长；相反，抑制miR-31的表达后，毛囊数量增加，毛球增多，毛囊外根鞘增生肥厚[32]。Peng[33]还研究发现在人或小鼠中miR-31通过负向调控HIF-1（hypoxia inducible factor-1,缺氧诱导因子-1），继而激活Notch通路，促进表皮干细胞分化。

复制性细胞衰老是细胞分裂过程中不可避免地发生细胞损伤积累的结果，随着年龄增加，突变和损害几率也增加，细胞开始衰老，衰老时细胞周期停滞，细胞衰老可防止癌变，保护机体远离癌症。研究发现miR-137、miR-668[34]、miR-191[35]等与人角质形成细胞的复制性衰老有关，其通过转录后下调细胞周期调节基因SATB1、CDK6阻止细胞从G1期进入S期，导致细胞周期停滞，增殖停止，诱导角质形成细胞进入衰老程序。

**4 miRNA与皮肤创面愈合**

创面愈合涉及3个相互重叠的阶段[36]：炎性阶段，主要表现为血管扩张，毛细血管通透性增加，体液外渗及炎症细胞浸润；增殖阶段，主要表现为上皮化、血管形成及肉芽组织形成；重塑阶段，主要表现为胶原沉积。皮肤创面愈合的不同阶段中miRNA的表达各不相同，miRNA的异常表达在伤口畸形愈合中起着关键作用[37]。

**4.1炎性阶段miRNA的作用**

创面炎性反应始于中性粒细胞及其他白细胞通过受损血管被动渗漏入伤口，接着伤口的免疫细胞释放趋化因子、细胞因子及生长因子如巨噬细胞趋化蛋白、PDGF、血小板因子IV、IL-1β、TGF-β、TNF-α、Toll样受体（Toll-like

receptors，TLRs），继而吸引中性粒细胞和单核细胞聚集，聚集的中性粒细胞具

116

有清洁作用，并杀死入侵的微生物；渗出的单核细胞成熟为巨噬细胞，发挥吞噬、促炎或抗炎和促血管生成等作用。

研究发现创面释放的炎性介质能诱导特异的miRNA表达，继而miRNA又能沉默大量促炎因子，即体内存在一个调节环。miR-146[38]、miR-155[38]、miR-21[39]及miR-125b[40]参与了创面炎症及免疫应答，这些miRNAs能被促炎因子如IL-1β、TNFα和TLRs等诱导表达。miR-146家族包括两个成员：miR-146a和miR-146b，启动子分析研究认为miR-146a为NF-κB依赖的基因，暴露于炎症环境下，促炎细胞因子如TNFα或IL-1β、或TLR-2、4、5能显著诱导其表达。IRAK1和TRAF6为其靶基因，miR-146a结合于靶基因通过负反馈循环机制调控TLR信号，抑制IL-8和RANTES的释放。除了TRAF6和IRAK1, IRAK2为miR-146a的另一个靶基因，能调节干扰素的产生。miR-155同样能被许多炎性介质诱导表达，如TNF-α、聚肌苷酸-聚胞苷酸和IFN-β，通过作用于c/ebp靶基因促进IL-10发挥抗炎作用。miR-21亦是一种常见的受炎症诱导的miRNA，能转录后抑制多个靶基因。与炎症有关的靶基因是促炎因子PDCD4, miR-21通过抑制PDCD4使IL-10产生增加，从而抑制了LPS的促炎作用。炎症期间TLR-4亦能诱导miR-125b的表达，同时miR-125b能直接结合至TNF-α的3，非翻译区继而靶向沉默TNFα的表达。

**4.2增殖阶段miRNA的作用**

增殖期重要特征之一是血管形成。内皮细胞增殖迁移和毛细血管形成是血管形成的早期表现，毛细血管进入伤口床是支持组织再生的关键，若抑制创面血管生成，会严重影响伤口愈合[41]。研究发现敲除Dicer、Drosha酶后抑制了内皮细胞毛细血管发芽、迁移和血管生成，提示miRNA参与血管生成[42]。Dicer对鼠胚胎血管生成也是必需的[43]，耗竭内皮细胞的miRNA将抑制出生后各种刺激诱导血管生成的反应，如外源性VEGF、肿瘤、肢体缺血和创面。已发现的促血管生成的miRNA有miR-17-92[44]、miR-126[45]、miR-130a[46]、miR-210[47,48]、miR-296[49]、miR-378[50]等。研究发现，miR-17-92在创面增殖阶段往往表达增加，其靶基因TSP-1及CTGF为抗血管生成因子，miR-17-92通过抑制TSP-1 及

CTGF，发挥促血管生成作用。有报道miR-126能促进血管内皮细胞对血管内皮生长因子的反应性，在对斑马鱼的研究中发现敲除了miR-126后，导致胚胎发育过程中血管完整性丧失，出血增加。其靶基因Spred1及PIK3R2能抑制血管

117

内皮生长因子的表达，miR-126通过抑制Spred1及PIK3R2实现调节血管完整性和血管生成的作用。已发现GAX、HOXA5基因有抑制血管内皮细胞的血管生成作用，而miR-130a通过抑制GAX、HOXA5基因的表达从而促进血管内皮细胞发挥血管生成作用。另有研究发现当血管内皮细胞暴露于缺氧环境下，miR

-210的表达逐渐增加，其通过抑制靶基因EFNA3促进基底膜毛细管样结构的形成及内皮细胞迁移；相反，拮抗miR- 210则抑制血管内皮细胞生长及诱导细胞凋亡。炎症环境下生长因子能诱导miR-296显著升高，其通过抑制靶基因HGS降低了生长因子受体VEGFR2和PDGFRβ的降解，最终血管生成增加。另外miR-378 通过抑制靶基因Fus-1、Sufu 的表达促进血管生成。抑制血管生成的

miRNA有miR-92a[51,52]、miR-17[53]、miR-15b、miR-16、miR-20a[54]、miR-221、miR-222[55]、miR-320[56]等。miR-92a主要表达于人内皮细胞，在心肌梗塞的小鼠模型中，内皮细胞过表达miR-92a后通过抑制整合素-α5的表达能阻断血管的发生，相反，抑制了miR-92a能增强血管生长和损伤组织的功能恢复。有报道创面局部缺血能上调miR-17，通过抑制靶基因Janus Kinase1，从而抑制血管内皮细胞芽的形成，最终血管数量减少。同样，缺氧条件下，miR-15b、miR-16、miR-20a表达上调，能直接抑制血管内皮生长因子VEGF的表达，从而减少血管生成。研究miR-320表达于微血管内皮细胞，通过抑制促血管生成作用的胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor 1, IGF-1)的表达，影响血管内皮细胞的增殖与迁移，血管生成减少。miR-221、miR-222亦表达于血管内皮细胞，通过抑制血管生成因子c-kit的表达来控制内皮细胞形成新的毛细血管。

增殖期另一个重要特征是表皮细胞再生，表现为伤口边缘角质形成细胞的迁移和增殖[57]。沉默SHIP2和增强AKT信号能加速角质细胞迁移，研究发现miR-205通过抑制SHIP2的转录促进角质细胞迁移，并抗角质形成细胞凋亡，有利于上皮的稳定及创面愈合；拮抗miR-205后，可使创面的丝状肌动蛋白减少，细胞黏附力增加，焦点接触增强，从而创面愈合延迟[58]。而miR-205在体内受miR-184的制约，miR-184能拮抗miR-205的抗SHIP2能力，从而使角质形成细胞凋亡、死亡增加[59]。miR-210也通过调控角质形成细胞的增殖影响伤口闭合，

Biswas等[60]研究发现miR-210在体内缺血性伤口中表达上调，miR-210属于对缺氧敏感的miRNA，而大多数慢性伤口属缺血缺氧性伤口，在HIF-1α的刺激下miR-210表达增加，抑制靶基因细胞周期调节蛋白E2F3的转录[61]，阻碍细胞从

G1期进入S期，DNA合成率及细胞增殖率明显下降，创面愈合延迟。miR-21

118

也参与了创面愈合[62]，创面愈合过程中TGF-β1上调miR-21的表达，其通过抑制靶基因TIMP3、TIAM1从而促进角质形成细胞的迁移及创面的再上皮化。

4.3重塑阶段miRNA的作用

胶原沉积是重塑阶段的一个主要特征。在纤维增生性瘢痕疙瘩形成中

miRNA发挥了重要作用。哺乳动物妊娠早期阶段胎儿皮肤无痕愈合[63]，而在后期转成瘢痕愈合表型[64]，且发现一些miRNA在两阶段之间的表达明显差异，尤其是miR-29b、miR-29c和miR-192在妊娠后期显著升高，提示参与了瘢痕愈合

[65]. miR-29b和miR-29c抑制多种参与无痕愈合信号通路有关的蛋白质，包括细胞外基质蛋白、抗肝纤维化TGF-β、Smad蛋白及β-catenin蛋白[66]。miR-192通过靶向抑制Smad相互作用蛋白1增强胶原蛋白12的表达[67]。miR-29a能在转录后水平直接抑制胶原蛋白的表达，而在正常皮肤成纤维细胞，miR-29a受控于TGF-β、PDGF-B和IL-4[68]. Kashiyama等[69]比较了瘢痕疙瘩成纤维细胞与正常成纤维细胞的miRNA表达谱，发现20个下调和7个上调的miRNA，特别是miR-196a下调最明显，miR-196a的表达量与I型和III型胶原水平成负相关[68]。另有研究发现miR-483-3p 在创面愈合的终末阶段表达上调，通过抑制靶基因

MK2、MK167、YAP1的表达，抑制角质形成细胞的增殖与迁移，最终使创面再上皮化过程终止[70]。

**5展望**

miRNA在维持皮肤正常结构功能及创面再生修复过程中发挥了重要作用。进一步探讨其在创面再生修复不同阶段与正常皮肤之间的差异表达，将有助于识别和发现特异性的miRNAs，明确它们在皮肤创面愈合中的作用及其调控机制并为治疗提供靶点。难愈性伤口严重影响了患者的生理健康和生活质量，大大增加了社会负担与资源消耗，尽管目前已有很多有效治疗方法，但仍未达到预期效果，研发更为有效的治疗手段成为一种必然。由于部分miRNAs在创面修复中的重要作用，以miRNA为靶标的基因治疗可为临床难愈性伤口的修复提供新方法。值得注意的是，已发现同一个miRNA在不同细胞类型中常表现不同甚至截然相反的功能，因此对于其在创面再生修复各个阶段中的表达与调控作用以及miRNA的多效性可能带来的潜在副作用等，均还有待深入研究。

119

**6参考文献**

[1] Botchkareva NV. [MicroRNA/mRNA regulatory networks in the control of skin development and regeneration [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262186) Cell Cycle, 2012, 11(3):468-474.

[2] Yi R, Fuchs E. MicroRNA-mediated control in the skin [J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 229-235.

[3] Bostjancic E, Glavac D. [Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853072) Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat, 2008, 17(3): 95-102.

[4] Xu L, Yang BF, Ai J. [MicroRNA transport: a new way in cell communication [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23460497) J Cell Physiol, 2013, 228(8): 1713-1719.

[5] Vera J, Lai X, Schmitz U, et al. [MicroRNA-regulated networks: the perfect storm for classical molecular biology. The ideal scenario for systems biology [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377968) Adv Exp Med Biol, 2013, 774: 55-76.

[6] Finnegan EF, Pasquinelli AE. [MicroRNA biogenesis: regulating the regulators [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23163351) Crit Rev Biochem Mol Biol, 2013, 48(1): 51-68.

[7] Fabian MR, Sonenberg N. [The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664986) Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(6): 586-593.

[8] Ul Hussain M. [Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22622804) Cell Tissue Res, 2012, 349(2): 405-413.

[9] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. Genome Res, 2009, 19(1): 92-105.

[10] Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, et al. [Functional microRNA targets in protein coding sequences [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285563) Bioinformatics, 2012, 28(6): 771-776.

[11] Zhang R, Wang D, Xia Z, et al. [The role of microRNAs in adipocyte differentiation [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23606028) Front Med, 2013, 7(2): 223-230.

[12] Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, et al. Dicer is essential for mouse development [J]. Nat Genet, 2003, 35(3): 215-217.

[13] Wang Y, Medvid R, Melton C, et al. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal [J]. Nat Genet, 2007, 39(3): 380-385.

[14] Yi R, Pasolli HA, Landthaler M, et al. DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(2): 498-502.

[15] Andl T, Murchison EP, Liu F, et al. The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles [J]. Curr Biol, 2006, 16(10): 1041-1049.

[16] Ning MS, Andl T. [Control by a hair's breadth: the role of microRNAs in the skin](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983383) [J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(7): 1149-1169.

[17] Sonkoly E, Wei T, Janson PC, et al. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis[J]. PLoSOne, 2007, 2(7): e610.

[18] Yi R, Poy MN, Stoffel M, et al. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness' [J]. Nature, 2008, 452(7184): 225-229.

120

[19] Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al. MicroRNA expression in zebraﬁsh embryonic development [J]. Science, 2005, 309(5732): 310-311.

[20] Wei T, Orfanidis K, Xu N, et al. The expression of microRNA-203 during human skin morphogenesis [J]. Exp Dermatol, 2010, 19(9): 854-856.

[21] McKenna DJ, McDade SS, Patel D, et al. [MicroRNA 203 expression in keratinocytes is dependent on regulation of p53 levels by E6 [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702634) J Virol, 2010,84(20): 10644-10652.

[22] Sonkoly E, Wei T, Pavez LorièE, et al. Protein kinase C-dependent upregulation of miR-203 induces the differentiation of human keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2010, 130(1): 124-134.

[23] Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti Di Val Cervo P, et al. MiR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63 [J]. Cell Death Differ, 2008, 15(7): 1187–1195.

[24] Suzuki D, Senoo M. [Increased p63 phosphorylation marks early transition of epidermal stem cells to progenitors [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22622428) J Invest Dermatol, 2012, 132(10): 2461-2464.

[25] Jackson SJ, Zhang Z, Feng D, et al. [Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23571213) Development, 2013, 140(9): 1882-1891.

[26] Chikh A, Matin RN, Senatore V, et al. [IASPP/p63 autoregulatory feedback loop is required for the homeostasis of stratified epithelia [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21897369) EMBO J, 2011, 30(20): 4261-4273.

[27] Antonini D, Russo MT, De Rosa L, et al. Transcriptional repression of miR-34 family contributes to p63-mediated cell cycle progression in epidermal cells [J]. J Invest Dermatol, 2010, 130(5): 1249-1257.

[28] Su X, Chakravarti D, Cho MS, et al. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. Nature [J]. 2010, 467(7318): 986-990.

[29] Zhang L, Stokes N, Polak L, et al. Speciﬁc microRNAs are preferentially expressed by skin stem cells to balance self-renewal and early lineage commitment [J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(3): 294-308.

[30] Giglio S, Cirombella R, Amodeo R, et al. [MicroRNA miR-24 promotes cell proliferation by targeting the CDKs inhibitors p27Kip1 and p16INK4a [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23553486) J Cell Physiol, 2013, 228(10): 2015-2023.

[31] Wang X, Tredget EE, Wu Y. [Dynamic signals for hair follicle development and regeneration [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787229) Stem Cells Dev, 2012, 21(1): 7-18.

[32] Mardaryev AN, Ahmed MI, Vlahov NV, et al. [Micro-RNA-31 controls hair cycle-associated changes in gene expression programs of the skin and hair follicle [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522784) FASEB J, 2010, 24(10): 3869-3881.

[33] Peng H, Kaplan N, Hamanaka RB, et al. [MicroRNA-31/factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1 nexus regulates keratinocyte differentiation [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22891326) Proc Natl Sci USA, 2012, 109(35): 14030-14034.

[34] Shin KH, Pucar A, Kim RH, et al. [Identification of senescence-inducing microRNAs in normal human keratinocytes](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725593) [J]. Int J Oncol, 2011, 39(5): 1205-1211.

[35] Lena AM, Mancini M, Rivetti di Val Cervo P, et al. MicroRNA-191 triggers keratinocytes

121

Senescence by SATB1 and CDK6 downregulation [J]. [Biochem Biophys Res Commun,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=MicroRNA-191%2Btriggers%2Bkeratinocytes) 2012, 423(3): 509-514.

[36] Lee YS, Wysocki A, Warburton D, et al. [Wound healing in development [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109317) Birth Defects Res C Embryo Today, 2012, 96(3): 213-222.

[37] Roy S, Sen CK. [MiRNA in wound inflammation and angiogenesis [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22211762) Microcirculation, 2012, 19(3): 224-232.

[38] Schulte LN, Westermann AJ, Vogel J. [Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23143100) Nucleic Acids Res, 2013, 41(1): 542-553.

[39] Olivieri F, Spazzafumo L, Santini G, et al. [Age-related differences in the expression of circulating microRNAs: miR-21 as a new circulating marker of inflammating [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041385) Mech Ageing Dev, 2012, 133(11-12): 675-685.

[40] Tili E, Michaille JJ, Cimino A, et al. [Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911593) J Immunol, 2007, 179(8): 5082-5089.

[41] DiPietro LA. [Angiogenesis and scar formation in healing wounds [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114588) Curr Opin Rheumatol, 2013, 25(1): 87-91.

[42] Caporali A, Emanueli C. [MicroRNA regulation in angiogenesis [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21777698) Vascul Pharmacol, 2011, 55(4): 79-86.

[43] Yang WJ, Yang DD, Na S, et al. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development [J]. J Biol Chem, 2005, 280(10): 9330-9335.

[44] Fiedler J, Thum T. [MicroRNAs looping around angiogenesis [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011747) Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(11): 2367-2368.

[45] Chen JJ, Zhou SH. [Mesenchymal stem cells overexpressing MiR-126 enhance ischemic angiogenesis via the AKT/ERK-related pathway [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22113756) Cardiol J, 2011, 18(6): 675-681.

[46] Chen Y, Gorski DH. [Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5 [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17957028) Blood, 2008, 111(3): 1217-1226.

[47] Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, et al. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210 [J]. FEBS Lett, 2008, 582(16): 2397-2401.

[48] Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3 [J]. J Biol Chem, 2008, 283(23): 15878-15883.

[49] Langenkamp E, Zwiers PJ, Moorlag HE, et al. [Vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibition in-vivo affects tumor vasculature in a tumor type-dependent way and downregulates vascular endothelial growth factor receptor 2 protein without a prominent role for miR-296 [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075979) Anticancer Drugs, 2012, 23(2): 161-172.

[50] Chen LT, Xu SD, Xu H, et al. [MicroRNA-378 is associated with non-small cell lung cancer](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052152)

122

[Brain metastasis by promoting cell migration, invasion and tumor angiogenesis [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052152) Med Oncol, 2012, 29(3): 1673-1680.

[51] Ando H, Okamoto A, Yokota M, et al. [Development of a miR-92a delivery system for anti-angiogenesis-based cancer therapy [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239404) J Gene Med, 2013, 15(1): 20-27.

[52] Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, et al. [MiR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrinα5 expression [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499550) Am J Pathol, 2013, 182(5): 1876-1889.

[53] Doebele C, Bonauer A, Fischer A, et al. Members of the microRNA-17–92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells [J]. Blood, 2010, 115(23): 4944-4950.

[54] Roy S, Sen CK. [MiRNA in wound inflammation and angiogenesis [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22211762) Microcirculation, 2012, 19(3): 224-232.

[55] Wang XH, Qian RZ, Zhang W, et al. MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cellsand its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36(2): 181-188.

[56] Patella F, Rainaldi G. [MicroRNAs mediate metabolic stresses and angiogenesis [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21842412) Cell Mol Life Sci, 2012, 69(7): 1049-1065.

[57] Shibata S, Tada Y, Asano Y, et al. [Adiponectin regulates cutaneous wound healing by promoting keratinocyte proliferation and migration via the ERK signaling pathway [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22904306) J Immunol, 2012, 189(6): 3231-3241.

[58] Yu J, Peng H, Ruan Q, et al. MicroRNA-205 promotes keratinocyte migration via the lipid phosphatase SHIP2 [J]. FASEB J, 2010, 24(10): 3950-3959.

[59] Yu J, Ryan DG, Getsios S, et al. MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(49): 19300-19305.

[60] Biswas S, Roy S, Banerjee J, et al. Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(15): 6976-6981.

[61] Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M, et al. An integrated approach for experimental target identiﬁcation of hypoxia-induced miR-210 [J]. J Biol Chem, 2009, 284(50): 35134-35143.

[[62] Yang X,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Yang%20X%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21647251) [Wang J,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Wang%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21647251) [Guo SL,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Guo%20SL%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21647251) et al. MiR-21 promotes keratinocyte migration and re-epithelialization during wound healing [J]. Int J Biol Sci,2011, 7(5): 685-690.

[63] Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. [Scarless fetal wound healing: a basic science review [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20885241) Plast Reconstr Surg, 2010, 126(4): 1172-1180.

[64] Leung A, Crombleholme TM, Keswani SG. [Fetal wound healing: implications for minimal scar formation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22572760) Curr Opin Pediatr [J]. 2012, 24(3): 371-378.

[65] Cheng J, Yu H, Deng S, et al. MicroRNA proﬁling in mid- and late-gestational fetal skin: implication for scarless wound healing [J]. Tohoku J Exp Med, 2010, 221(3): 203-209.

[66] Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation [J]. J Biol Chem, 2009, 284(23): 15676-15684.

123

[67] Kato M, Zhang J, Wang M, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(9): 3432-3437.

[68] Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(6): 1733-1743.

[69] Kashiyama K, Mitsutake N, Matsuse M, et al. MiR-196a downregulation increases the expression of type I and III collagens in keloid fibroblasts [J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(6): 1597-1604.

[70] Bertero T, Gastaldi C, Bourget-Ponzio I, et al[. MiR-483-3p controls proliferation in wounded epithelial cells [J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21676945) FASEB J, 2011, 25(9): 3092-3105.

124