

的一致性,¹⁸F-FDG PET-CT 在结直肠癌术前 N 分期方面有一定的临床价值。以淋巴结大小和 SUV-max 高低作为诊断标准,都会出现假阳性和假阴性的可能,如果能同时提供特异性和假阴性指标,对临床选择可能更有意义。

参考文献

- Kim JH,Beets GL,Kim MJ, *et al.* High-resolution MR imaging for nodal staging in rectal cancer;are there any criteria in addition to the size? [J]. *Eur J Radiol*, 2004,52:78-83
- Monig SP,Schroder W,Baldus SE, *et al.* Preoperative lymph-node staging in gastro-intestinal cancer-correlation between size and tumor stage[J]. *Onkology*, 2002,25:342-344
- Smith NJ,Bees N,Barbachano Y, *et al.* Preoperative computed tomography staging of nonmetastatic colon cancer predicts outcome: implications for clinical trials[J]. *Br J Cancer*,2007,96: 1030-1036
- Brown G,Richards CJ,Bourne MW, *et al.* Morphologic predictors of lymph node status in rectal cancer with use of high-spatial-resolution MR imaging with histopathologic comparison [J]. *Radiology*, 2003,227:371-377
- Tsunoda Y,Ito M,Fujii H, *et al.* Preoperative diagnosis of lymph node metastases of colorectal cancer by FDG-PET/CT[J]. *Jpn J Clin On-*

- col,2008,38:347-353
- 张占文,胡平,张杰,等.40 层¹⁸F-FDG PET/CT 在直肠癌 N 分期中的应用[J]. *重庆医学*,2011,40:778-780
- Kim DJ,Kim JH,Ryu YH, *et al.* Nodal staging of rectal cancer: high-resolution pelvic MRI versus ¹⁸F-FDG PET/CT[J]. *J Comput Assist Tomogr*,2011,35:531-534
- 王晓燕,饶良俊,易芹芹,等.¹⁸F-氟代脱氧葡萄糖 PET/CT 与增强 CT 在结直肠癌区域淋巴结转移诊断价值对比分析[J]. *中华医学杂志*,2013,93:2288-2291
- Tateishi U, Maeda T, Morimoto T, *et al.* Non-enhanced CT versus contrast-enhanced CT in integrated PET/CT studies for nodal staging of rectal cancer[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*,2007,34:1627-1634
- Stahl A, Ott K, Weber WA, *et al.* FDG PET imaging of locally advanced gastric carcinomas: correlation with endoscopic and histopathological findings[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*,2003,30:288-295
- Yoshioka T, Yamaguchi K, Kubota K, *et al.* Evaluation of ¹⁸F-FDG PET in patients with advanced, metastatic, or recurrent gastric cancer[J]. *J Nucl Med*,2003,44:690-699

(收稿日期:2014-03-16)

(修回日期:2014-03-20)

局部应用 miR-26a 抑制剂对小鼠创面愈合的促进作用

俞楠泽 朱琳 白明 龙笑 王晓军

摘要 目的 观察局部应用 miR-26a 抑制剂对小鼠创面愈合的影响。**方法** 制作小鼠全层皮肤缺损创面模型,设为 miR-26a 抑制剂组和对照组,对创面愈合速度、肉芽组织厚度、表达 CD31 的新生血管、表达 Ki67 的增殖期细胞数进行统计学比较。**结果** miR-26a 抑制剂组较对照组创面愈合速度明显加快。术后第 10 天,miR-26a 抑制剂组创面肉芽组织厚度为对照组的 2 倍($P < 0.05$),每张切片内 CD31 阳性新生血管数分别为 65.0 ± 11.7 和 33.5 ± 13.0 ($P < 0.05$),Ki67 阳性细胞总数占细胞总数百分比分别为 69.5 ± 15.7 和 46.3 ± 14.0 ,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** miR-26a 抑制剂能诱导创面血管新生和细胞增生,从而促进创面愈合。

关键词 miR-26a 创面愈合

[中图分类号] R318.0

[文献标识码] A

Promotion Effect of miR-26a Antagomir on Wound Healing in Mice. Yu Nanze,Zhu Lin,Bai Ming, *et al.* Division of Plastic Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China

Abstract Objective To observe the function of miR-26a antagomir on wound healing. **Methods** Models of wound healing were made in C57 mice, and the animals were divided randomly into miR-26a antagomir group and control group. The rate of wound healing, the thickness of granulation tissues, the count of newly formed vessels and proliferating cells were measured and compared. **Results** The antagomir group healed much faster than the control group. 10 days after surgery, the thickness of the granulation tissue of the antagomir group was 2-fold that of the control group ($P < 0.05$), and the percentage of proliferating cell counts were newly formed vessels counts

基金项目:中国医学科学院协和青年科研基金资助项目(A101100)

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院整形外科

通讯作者:王晓军,电子邮箱:xjwang100@hotmail.com

were 65.0 ± 11.7 and 33.5 ± 13.0 , respectively ($P < 0.05$), 69.5 ± 15.7 and 46.3 ± 14.0 , respectively ($P < 0.01$). All of the results were statistically significant. **Conclusion** miR-26a antagomir can accelerates angiogenesis and cell proliferation, thus, promotes wound healing.

Key words miR-26a; Wound healing

皮肤创面愈合是一个高度复杂而又精密调控的过程,其目的是修复缺损并恢复皮肤的生理屏障作用。在修复的过程中,创面内残存的血管内皮细胞迁移、增殖形成新生血管,这一新生血管化过程是创面愈合的重要环节^[1]。

低分子 RNA(miRs)是一类内源性的、短的、具有调控功能的非编码 RNA,在转录后水平调控目标基因的表达^[2]。miRs 在大多数的动物的基因组中扮演着重要的角色,一个 miR 经常涉及的几个基因调控网络。miR-26a 是新发现的具有血管生成抑制作用的 miR,在心肌梗死模型中,利用 miR-26a 抑制剂阻断其表达后,血管新生增加两倍,梗死面积显著减少。因此,miR-26a 被认为是缺血性疾病的治疗新靶点^[3]。本研究中笔者将外源性 miR-26a 抑制剂应用于小鼠全层皮肤缺损创面,探讨其对伤口愈合的影响。

材料与方法

1. 实验材料:清洁级雄性 7~8 周龄 C57/BL6 小鼠 12 只,体重 20~25g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。mmu-miR-26a-5p 抑制剂和阴性对照剂(广州锐博生物科技有限公司),氯胺酮(美国 Phoenix 公司),甲苯噻嗪(美国 AnaSed 公司),大鼠抗小鼠 CD31、Ki67 抗体(美国 BD biosciences 公司),Tegaderm 透明敷料(美国 3M 公司),DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司)。

2. 实验方法:(1)小鼠全层皮肤缺损创面模型建立和处理:小鼠腹腔注射氯胺酮 90mg/kg + 甲苯噻嗪 9mg/kg 麻醉,电动剃刀剃去背部毛发再用 Nair 脱毛膏脱去除残存鼠毛。随后在小鼠背部正中偏尾侧制造 1cm × 1cm 皮肤全层缺损创面,注意彻底去除皮下的肉膜层,直至肌膜浅面,以阻止创面

收缩。将小鼠随机分为两个组:miR-26a 抑制剂组和对照组,分别用 1ml 注射器 25G 针头均匀注射浓度为 50μmol/L 的 miR-26a 抑制剂和阴性对照剂,每边 0.1ml。并在创面基底注射 0.1ml。处理完后用 Tegaderm 透明敷料覆盖创面。术后单笼饲养。(2)创面愈合观察:密切观察创面愈合情况,于术后 0、3、7、10 天更换敷料,创面拍照同时以透明薄膜描印创面。Image J 软件分析创面面积,计算创面愈合百分率。计算公式为:创面愈合率(%) = (初始创面面积 - 观察日创面面积)/初始创面面积 × 100%。(3)常规 HE 染色和免疫组化染色:①常规 HE 染色:于创面建立后第 10 天取材,标本甲醛固定,常规石蜡包埋切片、脱蜡后行 HE 染色观察创面新生组织中皮肤、肉芽等结构。Image J 软件测量创面肉芽组织的厚度;②CD31 和 Ki67 免疫组化染色:石蜡切片经抗原修复和血清封闭后在切片上滴加大鼠抗小鼠抗体,浓度:CD31 为 1:100, Ki67 为 1:200, 4℃ 过夜。次日滴加兔抗大鼠二抗,浓度 1:200, DAB 显色,苏木素复染,阳性细胞呈棕黄色。中性树脂封片。结果判定时各组创面随机选取 6 张切片,在高倍镜下数出每张切片中的所有阳性细胞数。由 3 位有经验的实验人员分别计数,取平均值做统计学分析。

3. 统计学方法:采用 SPSS 11.0 统计软件。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 *t* 检验分析组间差异, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 创面愈合速度:创面模型建立后第 3 天起 miR-26a 抑制剂组创面愈合百分率就显著高于对照组,其中以第 7 天最为明显。术后 10 天,两组动物创面均有残余,但对照组明显延迟,两组间差异均有统计学意义(第 3 天、第 7 天 $P < 0.01$,第 10 天 $P < 0.05$) (图 1、图 2)。

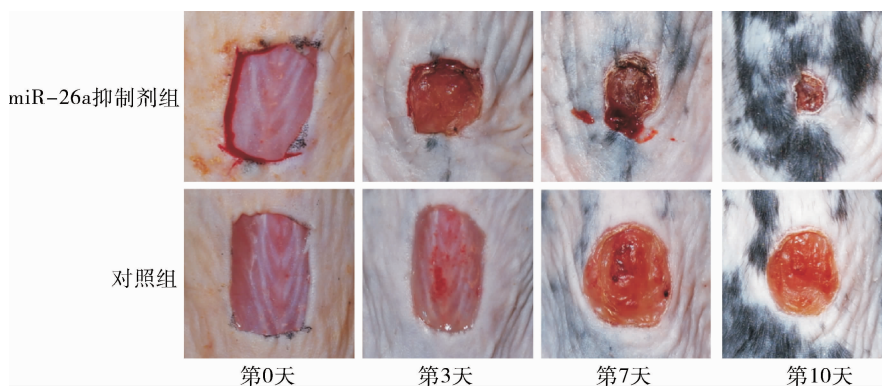


图 1 不同时间点创面愈合情况

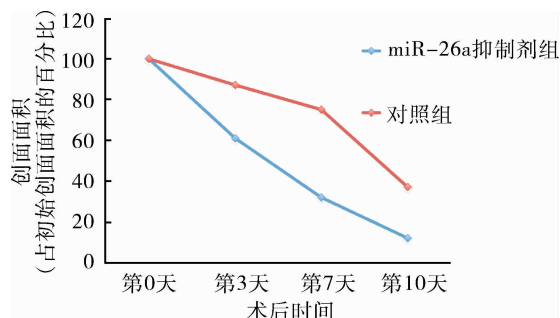


图 2 不同时间点创面愈合百分率比较

2. HE 染色: HE 染色能明确反映两组动物创面肉芽组织生长和上皮化程度的差异。术后第 10 天, 两组动物创面两侧均已完全上皮化。miR-26a 抑制剂组创面内肉芽组织较对照组明显增厚, 细胞层次增多。经测量, miR-26a 抑制剂组创面肉芽组织厚度为对照组的 2 倍 ($P < 0.05$, 图 3)。

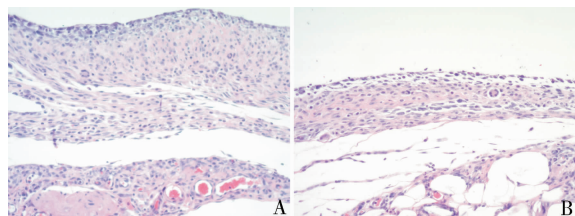


图 3 术后 10 天常规 HE 染色 ($\times 100$)

A. miR-26a 抑制剂组; B. 对照组

3. 免疫组化染色: CD31 主要表达于血管内皮细胞的细胞质, 呈棕黄色颗粒状。miR-26a 抑制剂组和对照组每张切片内的新生血管数分别为 65.0 ± 11.7 和 33.5 ± 13.0 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 miR-26a 抑制剂可能诱导创面血管新生从而促进创面愈合。Ki67 主要表达于分裂期的细胞的细胞核内, 呈棕褐色颗粒状。miR-26a 抑制剂组和对照组每张切片内阳性细胞总数占细胞总数百分比分别为 69.5 ± 15.7 和 46.3 ± 14.0 , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。提示 miR-26a 抑制剂可能诱导细胞的增生从而促进创面愈合 (图 4、图 5)。

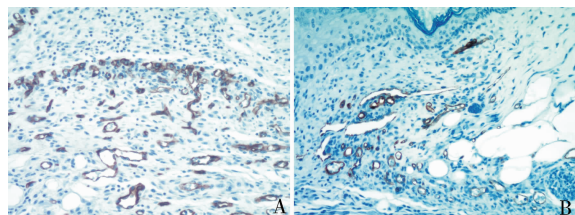


图 4 术后 10 天 CD31 免疫组化染色 ($\times 100$)

A. miR-26a 抑制剂组; B. 对照组

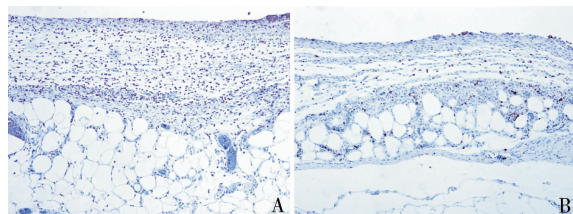


图 5 术后 10 天 Ki67 免疫组化染色 ($\times 100$)

A. miR-26a 抑制剂组; B. 对照组

讨 论

随着人口学特征的改变, 主要是人口老化和糖尿病发生率的上升, 临床医生在日常工作中面临着越来越多的慢性和难治性创面, 而大面积的全层皮肤缺损常导致残疾, 甚至死亡^[4,5]。创面愈合是一个复杂的病理生理过程, 包括炎症反应、再上皮化、肉芽生成、血管新生、细胞增殖、创缘收缩和组织塑形等, 由血管内皮细胞参与的血管新生过程在整个创面愈合的过程中发挥着重要的作用^[6]。新生的和迁移的成纤维细胞、血管内皮细胞和巨噬细胞等形成的肉芽组织构成了创面床。细胞外基质的沉积和成纤维细胞分泌的生长因子促进了血管内皮细胞新生血管并滋养肉芽组织。

虽然国内外研究者做了大量的基础研究和临床探索, 但慢性难治性创面的治疗始终是临床上棘手的难题。近年来, 与创面愈合相关的分子通路逐渐受到重视, 某些信号通路的刺激已成为定向创面愈合的必要条件。目标特异性药物仍是治疗伤口愈合的发展趋势。而同源性磷酸酶-张力蛋白 (PTEN) 因其参与了创面愈合中的多条通路而成为研究热点^[7,8]。在生长因子的刺激下, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 产生的脂质第二信使 3,4,5-三磷酸肌醇 (PIP₃), PIP₃ 反过来又结合到丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt, 将其聚集到细胞膜上并磷酸化, 随后激活。在正常组织中, PI3K 信号被 PTEN 抑制^[9,10]。Akt 的活化可维持 HIF-1 α 的稳定性, 而缺氧介导 PTEN 抑制乏氧诱导因子 1 (HIF-1 α) 稳定^[11]。PTEN 使 PIP₃ 向 PIP₂ 转化从而负调节 PI3K/Akt 信号通路。最近的研究表明, 除了抑制 Akt 的活化, PTEN 还控制 Jun N-末端激酶 (JNK) 的活性, 有效地促进 VEGF 的表达, 促进血管生成相关的细胞生长以及生存因子表达增加, 刺激血管的形成。PTEN 基因突变可影响血管内皮生长因子的活性^[12,13]。PTEN 基因突变也可以使促进 VEGF 转录的 HIF-1 α 失活^[14]。

miR 在转录后水平通过结合 30 非翻译区 (UTR)

互补的区域调节基因的表达,称为 mRNA 翻译抑制或 mRNA 降解^[5]。研究表明,miR 在不同的生理和病理过程中扮演着重要的角色,包括发育、分化、增殖、凋亡,与肿瘤的发生,其调节包括细胞分化、复制、迁移的不同的细胞过程中,细胞凋亡^[16]。miR - 26a 是新发现的具有血管生成抑制作用的 miR,常作为肿瘤抑制基因存在。PTEN 是 miR - 26a 的直接目标,其通过抑制 PTEN 的表达进而激活 Akt 信号通路^[17]。最近研究发现,在人类及动物心肌梗死模型中,利用 miR - 26a 抑制剂阻断其表达后,在两天内即可迅速诱导强有力的血管生成,新生血管数量增加两倍,梗死面积显著减少^[3]。在肝癌细胞中,miR - 26a 通过 PI₃K/AKT/HIF - 1 α /VEGFA 通路调节其血管生成^[18]。

本研究通过构建小鼠全层皮肤缺损创面模型,局部应用 miR - 26a 抑制剂后,创面内细胞增殖加快,新生血管增多,愈合速度提高。PTEN 相关的信号通路可能为其作用机制,但仍需进一步研究。本研究首次发现抑制 miR - 26a 对于创面愈合的促进作用,推测其可作为创面治疗新的研究靶点。

参考文献

- 1 Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Gene therapy and wound healing [J]. *Clinics in Dermatology*, 2007, 25(1):79 - 92
- 2 Lin L, Shen Q, Leng H, *et al.* Synergistic inhibition of endochondral bone formation by silencing Hif1 α and Runx2 in trauma - induced heterotopic ossification [J]. *Molecular Therapy*, 2011, 19(8):1426 - 1432
- 3 Icli B, Wara AK, Moslehi J, *et al.* MicroRNA - 26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling [J]. *Circulation Research*, 2013, 113(11):1231 - 1241
- 4 Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(10):738 - 746
- 5 Ashcroft GS, Mills SJ, Ashworth JJ. Ageing and wound healing [J]. *Biogerontology*, 2002, 3(6):337 - 345

- 6 Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration [J]. *European Surgical Research*, 2012, 49(1):35 - 43
- 7 Wang T, Feng Y, Sun H, *et al.* miR - 21 regulates skin wound healing by targeting multiple aspects of the healing process [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(6):1911 - 1920
- 8 Zhao M. PTEN: a promising pharmacological target to enhance epithelial wound healing [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(8):1141 - 1144
- 9 Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and PI 3 - kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(3):220 - 223
- 10 Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia [J]. *Blood*, 2012, 119(4):911 - 923
- 11 Li YM, Zhou BP, Deng J, *et al.* A hypoxia - independent hypoxia - inducible factor - 1 activation pathway induced by phosphatidylinositol - 3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8):3257 - 3263
- 12 Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis [J]. *Adv Cancer Res*, 2009, 102:19 - 65
- 13 Kanwar JR, Kamalapuram SK, Kanwar RK. Targeting survivin in cancer: the cell - signalling perspective [J]. *Drug Discovery Today*, 2011, 16(11 - 12):485 - 494
- 14 Jiang BH, Liu LZ. AKT signaling in regulating angiogenesis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(1):19 - 26
- 15 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2):281 - 297
- 16 Bushati N, Cohen SM. microRNA functions [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23:175 - 205
- 17 Liu B, Wu X, Liu B, *et al.* MiR - 26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2012, 1822(11):1692 - 1704
- 18 Chai ZT, Kong J, Zhu XD, *et al.* MicroRNA - 26a inhibits angiogenesis by down - regulating VEGFA through the PIK3C2 α /Akt/HIF - 1 α pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e77957

(收稿日期:2014 - 02 - 22)

(修回日期:2014 - 02 - 27)

青藤碱对人结肠癌细胞株 SW480 增殖和细胞周期的影响

杨海波 施 展 马艳春 倪振华 赵成根 高家治

摘 要 目的 研究青藤碱对人结肠癌 SW480 细胞增殖和细胞周期的影响。**方法** 用不同浓度的青藤碱处理体外培养的

基金项目:上海市教委基金资助项目(2012JW66);上海市普陀区卫生系统自主创新科研基金资助项目(2012PTKW008)

作者单位:200062 上海中医药大学附属普陀医院