

WHR降低,T水平升高<sup>[3]</sup>。而在本研究中,不同组的临床特征比较显示,BMI和WHR在 $1 \leq LH/FSH < 2$ 组高于 $LH/FSH \geq 2$ 组( $P < 0.05$ ),此部分结果与上述一致,但并未发现BMI和WHR低于 $LH/FSH < 1$ 组。一方面可能由于本研究样本量少故未发现上述差异,另一方面由于目前对于PCOS患者 $LH/FSH < 1$ 的研究甚少,因此需要大数据更深入的研究再进行探讨。李玉婷<sup>[10]</sup>研究显示,随着BMI的增长,PCOS患者血脂异常的发生率显著增加,依据BMI分层比较血脂异常的发病情况,发现PCOS患者血脂异常的总发生率从BMI $< 18\text{kg}/\text{m}^2$ 层的0增加到BMI $\geq 28\text{kg}/\text{m}^2$ 层的33.33%,差异有统计学意义( $P = 0.007$ ),故BMI增加是血脂异常的重要危险因素。因此,控制体重是治疗PCOS患者脂代谢异常的首要目标。本研究结果显示BMI和WHR在 $1 \leq LH/FSH < 2$ 组中最高,差异有统计学意义,因此TG、TC、LDL水平在 $1 \leq LH/FSH < 2$ 组均高于另外两组。本研究并未发现FPG、FINS及HOMA-IR在各组中的异常,此结果与王钊<sup>[3]</sup>的研究结果一致。但有研究显示,LH/FSH与胰岛素抵抗具有相关性。

综上所述,对于PCOS患者来说,虽然目前LH/FSH比值尚未作为PCOS的诊断标准之一,但LH/FSH在联合诊断时,其敏感度和特异性都有所提高,且在临床特征、性激素水平和脂代谢紊乱上均具有一定的参考价值<sup>[11]</sup>。因此,重视LH/FSH比值对临床

针对性治疗和预防具有一定的意义。

参考文献

- 1 Li R, Zhang Q, Yang D, *et al.* Prevalence of polycystic ovary syndrome in women in China: a large community-based study[J]. *Human Reprod*, 2013, 28(9):2562
- 2 吴效科,常惠,张颖,等.多囊卵巢综合征流行病学调查进展[J]. *科技导报*,2010,28(21):101-105
- 3 王钊. LH及LH/FSH在中国多囊卵巢综合征患者的特点、影响因素及诊断意义[D].北京:北京协和医学院,2012
- 4 于红亮.血清FSH、LH、TSTO检测在多囊卵巢综合征患者诊断中的临床价值探讨[J]. *航空航天医学杂志*,2017,28(6):676-677
- 5 邓茹,蔡敏生,李艳琼.血清促黄体生成素、雌二醇、促卵泡生成素水平与多囊卵巢综合征的关系分析[J]. *临床医学工程*,2016,23(11):1521-1522
- 6 何晓彤,孟祥雯,张雪娇,等.多囊卵巢综合征病因与发病机制的研究进展[J]. *中国妇幼保健*,2017,32(7):1588-1591
- 7 Azziz R, Woods KS, Reyna R, *et al.* The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6):2745-2749
- 8 黄晖明,王人卫,李森,等.体重指数与体脂率指标评价肥胖:基于诊断试验的比较研究[J]. *中国运动医学杂志*,2017,36(3):218-225
- 9 肖显超,王刚,孙琳,等.肥胖相关检测指标对血糖异常筛查和预测价值的比较[J]. *药品评价*,2018,3:21-28
- 10 李玉婷.多囊卵巢综合征患者糖脂代谢的临床研究[D].广州:南方医科大学,2013
- 11 胡艳军,杨永妮.多囊卵巢综合征患者血清FSH、LH、睾酮检测的临床意义[J]. *包头医学院学报*,2016,32(7):92-93

(收稿日期:2018-03-17)

(修回日期:2018-04-11)

## miR-34a及靶蛋白Foxp1对寻常型银屑病的作用研究

王慧琴 王瑶 赵宗峰 吴卫东

**摘要** **目的** 探讨miR-34a靶蛋白Foxp1调控在寻常型银屑病发生过程中其表达水平和作用意义。**方法** 运用实时荧光定量PCR法检测miR-34a在12例寻常型银屑病患者皮损组织和12例正常健康皮肤组织中的表达水平。利用化学合成的miR-34a mimic、miR-34a inhibitor,转染HaCaT细胞,使其过表达或抑制表达miR-34a;采用免疫印迹技术检测转染细胞中Foxp1蛋白的表达。**结果** 寻常型银屑病患者皮损组织miR-34a的表达水平显著高于正常健康皮肤组织,差异有统计学意义( $t = 3.047, P < 0.05$ )。免疫印迹检测转染后HaCaT细胞中Foxp1蛋白结果表明:过表达miR-34a时Foxp1蛋白表达量增加,miR-34a抑制表达时Foxp1蛋白表达降低,差异有统计学意义( $F = 286.722, P < 0.01$ )。**结论** miR-34a在寻常型银屑病患者皮肤组织中呈高表达,Foxp1作为miR-34a的靶蛋白受其调控参与寻常型银屑病的发生、发展过程。

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2015211C201)

作者单位:830000 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院临床医学研究中心(王慧琴、赵宗峰、吴卫东),临床检验中心(王瑶)

通讯作者:吴卫东,研究员,硕士生导师,电子信箱:xjwudong@126.com

关键词 银屑病 MiR-34a Foxp1 表达量

中图分类号 R758.63

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.06.016

**Regulation Effect of MiR-34a and Its Target Foxp1 Protein in Psoriasis Vulgaris.** Wang Huiqin, Wang Yao, Zhao Zongfeng, et al. People's Hospital of Xingjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang 830001, China

**Abstract Objective** To investigate the expression of miR-34a and its target protein Foxp1 in skin with psoriasis vulgaris and its significance in the development of psoriasis vulgaris. **Methods** The expressions of miR-34a were studied with real-time fluorescent quantitative PCR in the 12 psoriatic vulgaris lesions and 12 normal skin. Chemical synthesis of miR-34a mimic, miR-34a inhibitor, transfected HaCaT cells. Western blotting was used to detect the expression of Foxp1 protein in transfected cells. **Results** The expression level of miR-34a was higher in lesions of psoriasis vulgaris than in normal skin tissue, and differences was statistical significance ( $t = 3.047, P < 0.05$ ). HaCaT cells were transfected with miR-34a mimic and miR-34a inhibitor. Western blotting was used to detect the expression of Foxp1 protein. When over expressing miR-34a, the expression of Foxp1 protein were increased. When miR-34a inhibited the expression of Foxp1, protein were decreased. And the differences was statistical significance ( $F = 286.722, P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression of miR-34a was significantly higher in lesions of psoriasis vulgaris than in the normal skin tissue. Differential expression of miR-34a may be positive regulation of Foxp1 protein in the pathogenesis of psoriasis vulgaris.

**Key words** Psoriasis; MiR-34a; Foxp1; Expression

银屑病(psoriasis)是一种常见的慢性炎性皮肤病,以表皮角质形成细胞异常增生和角化不全为主要病理改变的。目前银屑病无法根治,并且具体的发病机制尚不明确,研究在银屑病的发生、发展中微小核糖核酸即 miRNA 起到了重要作用<sup>[1-3]</sup>。本研究选择 miR-34a 及其靶蛋白 Foxp1 为研究对象,运用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-34a 在寻常型银屑病患者皮损组织中的表达水平;在前期实验基础上培养 HaCaT 细胞,并转染 miR-34a 模拟物和抑制剂由此来研究下游靶蛋白 Foxp1 的表达是否受其调控;具体分析如下。

### 材料与方法

1. 材料:寻常型银屑病皮损组织选自 2012~2016 年在笔者医院皮肤科就诊并确诊的患者 12 例,其中男性 5 例,女性 7 例,患者年龄 19~71 岁,平均年龄  $44.417 \pm 17.547$  岁;取材前未使用过相关药物及治疗;不伴有其他免疫和肿瘤疾病;排除妊娠、哺乳期等女性;以此为病例组。正常皮肤组织取自泌尿外科、整形外科、截肢者手术切除的皮肤共 12 例,其中男性 6 例,女性 6 例;患者年龄 7~60 岁,平均年龄  $27.500 \pm 24.333$  岁,以此为正常对照组,正常对照组需排除自身免疫性疾病、遗传性疾病,并无银屑病家族史。本研究获笔者医院伦理学委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

2. 核酸提取:取冻存组织 30~50mg,迅速置于研钵,倒入液氮研磨,然后根据 miRNeasy Mini kit(德国 Qiagen 公司)说明书操作,进行核酸提取。提取的样本总 RNA 用超微量核酸蛋白测定仪(美国 Thermo 公

司)测定其浓度及纯度, $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.2,用于后续实验。

3. 反转录:使用 miScript II RT kit 反转录试剂盒(德国 Qiagen 公司),包含 4 种试剂 5 × HIFlex Buffer, 10 × Nucleics Mix, RT Enzyme Mix, RNase-Free H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;反应体系为 20 μl,反应在 Bio-Rad C1000 Touch PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上进行。反应体系:5 × HIFlex Buffer 4 μl, 10 × Nucleics Mix 2 μl, RT Enzyme Mix 2 μl, Total RNA + RNase-Free H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共 12 μl。将加好试剂的 EP 管放置于 C1000 Touch PCR 仪反应槽中,设置反应条件:37℃ 60min, 95℃ 5min。收集反转录产物进行后续实验。

4. 实时荧光定量 PCR:用 miScript SYBR® Green PCR kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司),包含 Quantitect SYBR Green PCR Master Mix 和 RNase-Free H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 两种试剂;反应体系为 20 μl:2 × Quantitect SYBR Green PCR Master Mix 10 μl, 10 × miR-34a 特异性引物 2 μl, 10 × U6 2 μl, RNase-Free H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 μl, 模板 1 μl。miR-34a 特异性引物及 U6 均购自德国 Qiagen 公司成品。反应在 Rotor Gene-Q 仪(德国 Qiagen 公司)上进行,反应条件:95℃ 15min, 1 个循环;94℃ 15s, 55℃ 30s, 70℃ 30s, 40 个循环。每个样本做 3 个复孔,反应结束后用 Rotor-Gene Q Series Software 软件进行数据导出和分析,得出曲线及 Ct 值。

5. 细胞培养及转染:37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 HaCaT 细胞(江苏南京凯基生物技术公司),培养基为 DMEM 培养液(美国 Gibco 公司),加入 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司),同时添加双抗(美国 Sigma

公司)。化学合成成品 miR - 34a mimic(德国 Qiagen 公司)和 miR - 34a inhibitor(德国 Qiagen 公司),用 Lipofectamine2000 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)转染细胞。转染时的细胞密度能够达到 30% ~ 50%;稀释 miRNA, 稀释 lipo2000 轻轻混匀并室温孵育 20min;将 miRNA - lipo2000 混合液加入含有细胞的 500 $\mu$ l 培养基的培养孔中,轻轻混匀;培养 4 ~ 6h 后,将孔中含 siRNA - lipo2000 混合液的培养基移去,更换新鲜培养基;将培养板置于 37 $^{\circ}$ C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48h。

6. Western blot(WB)法检测 Foxp1 表达:转染成功后收集细胞,RIPA 裂解细胞,提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。12% 分离胶进行 SDS - PAGE 电泳;蛋白样本电泳分离,转印到 PVDF 膜上,用 5% 蛋白质干粉 TBST 封闭 1h;TBST 洗膜 10min 3 次,加 Foxp1 一抗(英国 Abcam 公司)1:1000 室温孵育 1h;TBST 洗膜 10min 3 次,稀释二抗 1:1000 室温孵育 1h;TBST 洗膜 10min 3 次,暗室曝光定影。WB 实验过程中的所有试剂除一抗外均购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

7. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析,用  $\Delta$ Ct 值代表基因的相对定量, $\Delta$ Ct 值 = miR - 34aCt 值 - U6Ct 值, $\Delta\Delta$ Ct 值 =  $\Delta$ Ct 值 - 最小  $\Delta$ Ct 值,基因表达差异倍数用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值表示。 $q$  - RT PCR 数据使用  $t$  检验,以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示;免疫印迹结果用  $\chi^2$  分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. 实时荧光定量 PCR 检测结果:实时荧光定量 PCR 以 U6 扩增作为参照,miR - 34a 扩增良好(图 1、图 2)。病例组 miR - 34a 的表达高于正常对照组,即寻常型银屑病患者皮损组织中 miR - 34a 呈高表达,差异有统计学意义( $t = 3.047, P = 0.011$ ,表 1)。

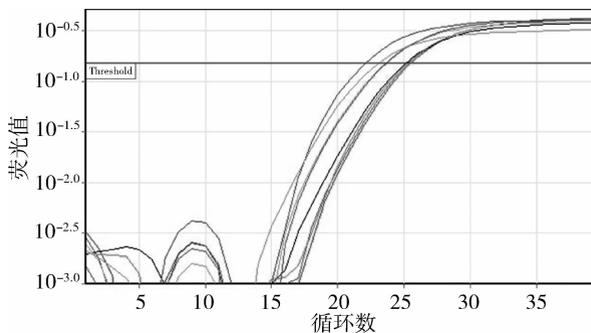


图 1 实时荧光定量 PCR 检测 miR - 34a 的扩增曲线图

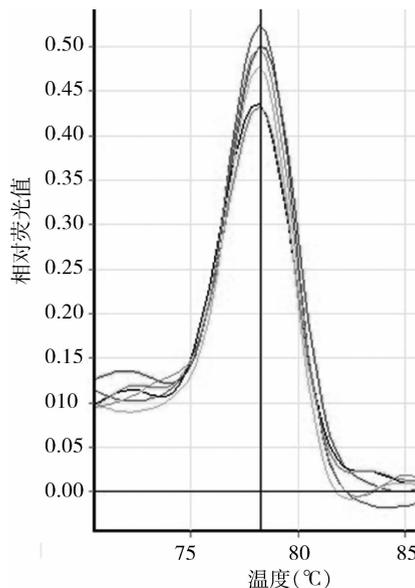


图 2 实时荧光定量 PCR 检测 miR - 34a 的溶解曲线图

表 1 miR - 34a 的表达 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	miR - 34a	t	P
正常对照组	12	0.0067 $\pm$ 0.0021	3.047	0.011
病例组	12	0.0243 $\pm$ 0.0199*		

与正常组织比较,\*  $P < 0.05$

2. Western blot 法检测结果:培养并转染 HaCaT 细胞,转染分为 3 个组,即正常对照组、miR - 34a 过表达组、miR - 34a 抑制表达组。Western blot 法检测 3 组 Foxp1 蛋白表达结果:miR - 34a 过表达组 Foxp1 蛋白表达量高;miR - 34a 抑制表达组 Foxp1 蛋白表达量低;差异有统计学意义 ( $F = 286.722, P = 0.000$ )。LSD 法组间比较显示,与正常对照组比较,miR - 34a 抑制表达时 Foxp1 蛋白表达降低 ( $P = 0.002$ );与正常对照组比较,miR - 34a 过表达时 Foxp1 蛋白表达量增加 ( $P = 0.000$ );miR - 34a 过表达组与 miR - 34a 抑制表达组 Foxp1 蛋白表达量比较,差异有统计学意义 ( $P = 0.000$ ,表 2、图 3)。

表 2 miR - 34a 转染细胞后不同组中 Foxp1 蛋白 Western blot 法检测表达量

组别	Foxp1/GAPDH	F	P
正常对照组	0.348 $\pm$ 0.023	286.722	0.000
miR - 34a 过表达组	0.615 $\pm$ 0.014		
miR - 34a 抑制表达组	0.265 $\pm$ 0.018		

讨 论

银屑病俗称牛皮癣,是一种多基因遗传背景下受

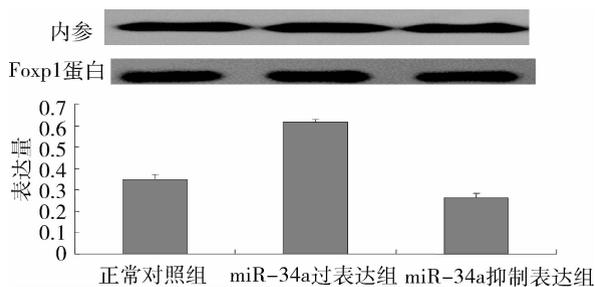


图3 不同细胞转染组中 Foxp1 蛋白表达水平图

多因素调控的慢性炎症性疾病。有研究表明,miRNA与皮肤生理、生化、免疫等许多过程均有重要相关性<sup>[2-5]</sup>。miR-34a定位于人类1p36染色体上,共有110个核苷酸序列,单独转录表达<sup>[6]</sup>。研究发现miR-34参与了Cyclin/CDK-pRb途径,通过向肿瘤细胞转染能够引起G<sub>1</sub>期细胞周期停滞,并且miR-34与细胞周期密切相关<sup>[7]</sup>,miR-34在癌细胞中重新激活可诱发caspase调控的凋亡途径<sup>[8]</sup>。此外,miR-34也可能与其他miRNA发挥协同作用,Bandi等发现miR-34a与miR-15/16共同作用诱导细胞周期阻滞,而且miR-34a及miR-15/16在肿瘤中均低表达<sup>[9]</sup>。miR-34a可通过调节其靶基因而参与细胞增殖、凋亡、存活、迁移、侵袭以及血管生成等生物过程<sup>[7,10]</sup>。因此本研究选择miR-34a为切入点,检测其在寻常型银屑病患者皮损组织中的表达;并通过细胞培养进行离体研究,观察靶蛋白Foxp1量的变化,综合多种方法来探究二者与银屑病发病可能的关系。

实时荧光定量PCR实验的结果说明:miR-34a在寻常型银屑病皮损组织中呈高表达,其与正常健康皮肤组织的差异有统计学意义( $t=3.047, P<0.05$ )。禹欢欢等<sup>[1]</sup>、陈春丽等<sup>[4]</sup>、杨志波等<sup>[11]</sup>利用不同技术方法得出miR-34a在银屑病中表达明显上调,与本研究结果一致。笔者推测miR-34a异常表达促使表皮角质形成细胞凋亡加速,过度增殖;细胞周期的变化使病理改变推进,因此miR-34a参与了寻常型银屑病发病过程。

叉头框蛋白p1(forkhead box P1, FOXP1)是miR-34a的重要靶基因,位于染色体3p14.1,完整编码产物含677个氨基酸的蛋白,在人类组织上有广泛的、程度不同的表达<sup>[12-14]</sup>。叉头框蛋白P1(Foxp1)基因隶属于FOX(forkhead box)家族的P亚族。FOX家族是一个庞大的、功能广泛并且进化保守的转录因子家族,其特点是具有叉头螺旋结构(forkhead/

winged helix, FKH)<sup>[13-15]</sup>。FOX家族蛋白参与了如胚胎发育、细胞周期调控、糖类和脂类代谢、免疫调节等过程,其突变和表达异常可导致发育畸形、代谢紊乱以及肿瘤的发生等疾病<sup>[11-18]</sup>。Foxp1受miR-34a调控参与多种生物学过程,并与皮肤性疾病的生理、免疫等密切相关。有研究表明在皮肤基底细胞癌中FOXP1蛋白的阳性表达率显著高于癌旁组织<sup>[19]</sup>。陈春丽等<sup>[16]</sup>利用免疫组化研究发现Foxp1蛋白表达在正常皮肤组织中的阳性率低于寻常性银屑病皮损中的表达,且阳性主要于表皮全层细胞核表达。这与笔者转染HaCaT细胞的研究结果一致:培养HaCaT细胞并转染miR-34a mimic和miR-34a inhibitor后,Western blot法检测结果表明,miR-34a过表达时Foxp1蛋白表达量增加;miR-34a抑制表达时Foxp1蛋白表达量降低,差异有统计学意义( $F=286.722, P<0.01$ )。

综上所述,笔者推断在寻常型银屑病发病过程中高表达的miR-34a通过调控其靶蛋白Foxp1参与了表皮细胞的异常增殖过程。表皮角质形成细胞异常增生的过程说明细胞周期被打乱,细胞凋亡加速,免疫调节紊乱,由此认为miR-34a及其靶蛋白Foxp1与寻常型银屑病的发病密切相关。

#### 参考文献

- 禹欢欢,王晓华,蔡碧珊,等.银屑病相关miRNAs表达的研究进展[J].皮肤性病诊疗学杂志,2015,22(3):258-260
- 王慧琴,唐承波,唐红,等.miR-21及其靶蛋白RASA1在寻常型银屑病患者皮肤组织中的表达及意义[J].中华全科医学,2017,15(7):1141-1180
- 王慧琴,补娟,赵宗峰,等.miR-21调控靶蛋白hMSH2对寻常型银屑病的作用[J].中国临床研究,2017,30(5):582-585
- 陈春丽,赵宗峰,刘新梅,等.寻常型银屑病患者皮损中miRNA-34a及其靶基因Notch1的表达及意义[J].皮肤性病诊疗学杂志,2015,22(6):423-427
- 彭立新.microRNA与炎症性皮肤病[J].中国麻风皮肤病杂志,2010,26(5):339-341
- 王慧琴,黄睿,陈春丽,等.microRNA-21和microRNA-34a在新疆维吾尔族寻常型银屑病患者皮肤组织中的表达及意义[J].中华实用诊断与治疗杂志,2016,30(12):1222-1224
- Wang R, Ma J, Wu Q, et al. Functional role of miR-34 family in human cancer[J]. Curr Drug Targets, 2013, 14(10):1185-1191
- 高砚春.miR-34a通过靶向调控Notch1表达影响乳腺癌细胞的增殖[J].中国比较医学杂志,2016,26(11):55-60
- 陈雪,刘建香.miR-34家族在肿瘤及辐射损伤中的研究进展[J].癌变.畸变.突变,2013,25(1):76-78
- Wang R, Ma J, Wu Q, et al. Functional role of miR-34 family in human cancer[J]. Curr Drug Targets, 2013, 14(10):1185-1191