

# miR-125b-5p靶向ΔNp63α对角质形成细胞分化的影响及其机制

丁毅<sup>1</sup>, 李敏<sup>2</sup>, 陈龙<sup>3</sup>, 张美林<sup>4</sup>, 冯树梅<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学基础医学院组织学与胚胎学教研室, 乌鲁木齐 830011; <sup>2</sup>新疆第二医学院基础医学院解剖组胚教研室, 乌鲁木齐 830011; <sup>3</sup>新疆医科大学基础医学院技能中心, 乌鲁木齐 830011; <sup>4</sup>新疆乌鲁木齐市中心的血站, 乌鲁木齐 830011

[中图分类号] R34

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.02.0128

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

丁毅, 李敏, 陈龙, 等. miR-125b-5p靶向ΔNp63α对角质形成细胞分化的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(2): 128-135.

[收稿日期] 2021-07-04

[录用日期] 2021-09-29

[上线日期] 2021-12-17

**[摘要]** 目的 探讨miR-125b-5p靶向ΔNp63α对角质形成细胞分化的影响及其机制。方法 用1.8 mmol/L氯化钙诱导角质形成细胞HaCaT, 于氯化钙处理0、1、5、7 d, 采用qRT-PCR检测miR-125b-5p、ΔNp63α、细胞角蛋白10(CK10)、外皮蛋白(*Inv*)、谷氨酰胺转移酶1(*TG1*)、磷脂酰肌醇3-激酶(*PI3K*)、蛋白激酶B(*Akt*)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(*mTOR*)的mRNA表达水平。于氯化钙处理0、5 d采用细胞免疫荧光分析ΔNp63α的表达情况。利用bibiserv网站预测miR-125b-5p与ΔNp63α的结合位点。用miR-125b-5p模拟物/抑制剂和阴性对照模拟物/抑制剂转染HaCaT细胞, 培养5 d后, 采用qRT-PCR和Western blotting检测ΔNp63α、CK10、*Inv*、*TG1*、*PI3K*、*Akt*和*mTOR*的mRNA和蛋白相对表达水平。结果 与氯化钙处理0 d时相比, 处理1、5、7 d时miR-125b-5p相对表达水平明显下降( $0.17 \pm 0.02$ 、 $0.08 \pm 0.01$ 、 $0.07 \pm 0.02$  vs.  $1.00 \pm 0.02$ ,  $P < 0.001$ ), 而ΔNp63α、CK10、*Inv*、*TG1*、*PI3K*、*Akt*和*mTOR* mRNA相对表达水平逐渐升高( $P < 0.05$ )。细胞免疫荧光分析结果显示, 与氯化钙处理0 d时相比, 氯化钙处理5 d时角质形成细胞中ΔNp63α阳性细胞率增高( $96.9\% \pm 0.9\%$  vs.  $43.2\% \pm 8.2\%$ ,  $P < 0.001$ )。bibiserv网站预测结果显示, miR-125b-5p可与ΔNp63α的3'-UTR位点相结合。与阴性对照模拟物组相比, miR-125b-5p模拟物组ΔNp63α、CK10、*Inv*、*TG1*、*PI3K*、*Akt*和*mTOR* mRNA相对表达水平明显降低, 且ΔNp63α、CK10、*Inv*、*TG1*、*PI3K*、*Akt*、p-Akt、*mTOR*和p-mTOR蛋白表达水平也明显降低( $P < 0.05$ ), 而抑制miR-125b-5p的表达可逆转上述效应( $P < 0.05$ )。结论 miR-125b-5p靶向ΔNp63α可通过下调PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制角质形成细胞的分化。

**[关键词]** miR-125b-5p; ΔNp63α; 细胞分化; 角质形成细胞

## Effect and mechanism of miR-125b-5p targeting ΔNp63α in keratinocyte differentiation

Ding Yi<sup>1</sup>, Li Min<sup>2</sup>, Chen Long<sup>3</sup>, Zhang Mei-Lin<sup>4</sup>, Feng Shu-Mei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, <sup>3</sup>Functional Center, Institute of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

<sup>2</sup>Department of Anatomy and Histoembryology, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Second Medical College, Urumqi 830011, China

<sup>4</sup>Xinjiang Urumqi City Central Blood Station, Urumqi 830011, China

\*Corresponding author, E-mail: 87391167@qq.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81660324, 81660521)

[基金项目] 国家自然科学基金(81660324, 81660521)

[作者简介] 丁毅, 硕士研究生, 主要从事皮肤发育方面的研究

[通信作者] 冯树梅, E-mail: 87391167@qq.com

**[Abstract] Objective** To explore the effect and potential mechanism of *miR-125b-5p* targeting  $\Delta Np63\alpha$  in keratinocyte differentiation. **Methods** To induce keratinocytes (HaCaT) differentiation, 1.8 mmol/L calcium chloride was added in the culture media. The mRNA level of *miR-125b-5p*,  $\Delta Np63\alpha$ , cytokeratin 10 (*CK10*), involucrin (*Inv*), transglutaminase 1 (*TG1*), phosphatidylinositol 3-kinase (*PI3K*), protein kinase B (*Akt*), and mammalian target of rapamycin (*mTOR*) during keratinocyte differentiation were quantified by qRT-PCR (at day 0, 1, 5 and 7). The expression of  $\Delta Np63\alpha$  was detected by cellular immunofluorescence after treatment for 0 and 5 days. The binding site of *miR-125b-5p* to  $\Delta Np63\alpha$  was identified by the bibiserv website. The mimics/inhibitors of *miR-125b-5p* and the mimics/inhibitors of the negative control were transfected into keratinocytes. After five days of culture, the mRNA and protein expression of  $\Delta Np63\alpha$ , *CK10*, *Inv*, *TG1*, *PI3K*, *Akt* and *mTOR* were determined by qRT-PCR and Western blotting analysis. **Results** Compared with calcium chloride treatment for 0 days ( $1.00 \pm 0.02$ ), the relative expression level of *miR-125b-5p* decreased significantly at 1 ( $0.17 \pm 0.02$ ), 5 ( $0.08 \pm 0.01$ ) and 7 days ( $0.07 \pm 0.02$ ) ( $P < 0.001$ ). Compared with calcium chloride treatment for 0 days, the expression of  $\Delta Np63\alpha$ , *CK10*, *Inv*, *TG1*, *PI3K*, *Akt* and *mTOR* mRNA increased gradually after calcium chloride treatment for 1, 5 and 7 days ( $P < 0.05$ ). The results of cellular immunofluorescence assay showed that the positive rate of  $\Delta Np63\alpha$  increased after calcium chloride treatment for five days ( $96.9\% \pm 0.9\%$  vs.  $43.2\% \pm 8.2\%$ ,  $P < 0.001$ ). *miR-125b-5p* can bind to the 3'-UTR site of  $\Delta Np63\alpha$ . Compared with negative control mimic group, the mRNA expression levels of  $\Delta Np63\alpha$ , *CK10*, *Inv*, *TG1*, *PI3K*, *Akt*, and *mTOR* decreased significantly in *miR-125b-5p* mimic group. In addition, the protein expression levels of  $\Delta Np63\alpha$ , *CK10*, *Inv*, *TG1*, *PI3K*, *Akt*, p-Akt, mTOR, and p-mTOR also decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Interestingly, the inhibition of *miR-125b-5p* could reverse the above effects ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *miR-125b-5p* targeting  $\Delta Np63\alpha$  inhibits keratinocyte differentiation by PI3K/Akt/mTOR signal pathway.

**[Key words]** *miR-125b-5p*;  $\Delta Np63\alpha$ ; cell differentiation; keratinocytes

皮肤是生物体远离外界环境影响的第一道屏障,位于皮肤最外层的表皮层主要由不断经历自我更新、分化和退化过程的角质形成细胞组成<sup>[1-2]</sup>。角质形成细胞的异常分化与银屑病、特应性皮炎及皮肤鳞癌等的发生关系密切<sup>[3-4]</sup>。因此,阐明角质形成细胞的分化机制对于了解皮肤疾病的发生非常重要。MicroRNAs(miRNAs)是一类内源性、长度为22~23个核苷酸的非编码小RNA,通过与靶基因的3'非翻译区(3'-UTR)配对来调节基因的表达<sup>[5]</sup>。多项研究发现,miRNA可调控分化、增殖和凋亡等多种重要的细胞功能,并且其表达异常与皮肤疾病密切相关<sup>[4-6]</sup>。*miR-125b-5p*作为一种重要的抑癌分子,在银屑病、皮肤鳞癌和黑色素瘤中低表达,并可调节细胞凋亡,参与肿瘤的发生发展<sup>[7-8]</sup>;过表达*miR-125b-5p*可抑制角质形成细胞和黑色素瘤细胞的增殖<sup>[9]</sup>。 $\Delta Np63\alpha$ 是皮肤发育的重要调控因子,在银屑病和皮肤鳞癌中表达上调<sup>[10]</sup>,过表达 $\Delta Np63\alpha$ 可促进角质形成细胞增殖<sup>[11]</sup>。靶基因预测发现,*miR-125b-5p*与 $\Delta Np63\alpha$ 密切相关,但*miR-125b-5p*能否通过调控 $\Delta Np63\alpha$ 的表达影响角质形成细胞的分化鲜见报道。本研究旨在分析*miR-125b-5p*和 $\Delta Np63\alpha$ 对角质形成细胞分化的影响及可能机制,以期为了解皮肤病的发病机制提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂及仪器** DMEM培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液购自美国Gibco公司;转染

试剂riboFECTTM CP、*miR-125b-5p*的模拟物及抑制剂、阴性对照模拟物/抑制剂购自广州锐博生物科技有限公司;  $\Delta Np63\alpha$ 单抗(ab203826)、 $\beta$ -actin单抗(ab75186)、蛋白激酶B(protein kinase B, Akt; ab179463)、p-Akt(Ser473; ab192623)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR; ab32028)、p-mTOR(Ser2448; ab109268)购自英国Abcam公司;磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K; sc-365290)、细胞角蛋白10(cytokeratin 10, CK10; sc-53252)、外皮蛋白(involucrin, Inv; sc-21748)、谷氨酰胺转移酶1(transglutaminase, TG1; sc-166767)单抗购自美国Santa Cruz公司;皂素(saponin)购自美国Sigma公司;辣根过氧化物酶标记的二抗购自上海爱必信生物科技有限公司;反转录试剂盒、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;BCA蛋白分析试剂盒和RIPA裂解液购自北京索莱宝科技有限公司;ECL化学发光底物试剂盒购自中国Biosharp公司。生物安全柜和CO<sub>2</sub>培养箱购自美国Thermo Fisher公司;激光共聚焦显微镜(Nikon C2)购自日本Nikon公司。

**1.2 细胞培养** 人正常皮肤永生化角质形成细胞株HaCaT购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,用含15%灭活胎牛血清(FBS)、1%青霉素和链霉素的DMEM培养。

**1.3 角质形成细胞分化模型的构建** 取对数生长期HaCaT细胞,按照 $3 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,加入1.8 mmol/L氯化钙处理0、1、5、7 d,提取

RNA行qRT-PCR检测。

**1.4 细胞免疫荧光分析 $\Delta Np63\alpha$ 的表达情况** 取对数生长期HaCaT细胞,按照8000个/孔铺于含细胞爬片的6孔板中,次日加入1.8 mmol/L氯化钙处理0、5 d。用PBS清洗3次,4%多聚甲醛溶液固定15 min; PBS洗涤10 min  $\times$  3次,将 $\Delta Np63\alpha$ 一抗(1:300)于saponin中稀释后加在玻片上孵育1 h; PBS洗涤,加入二抗(1:300)孵育1 h, PBS洗涤后封片,利用激光共聚焦显微镜进行共聚焦成像分析。

**1.5 细胞转染** 取对数生长期HaCaT细胞,按照 $3 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中。次日待细胞贴壁后按照如下分组进行转染:阴性对照模拟物组(转染阴性对照模拟物)、miR-125b-5p模拟物组(转染miR-125b-5p模拟物)、阴性对照抑制剂组(转染阴性对照抑制剂)、miR-125b-5p抑制剂组(转染miR-125b-5p抑制剂)。因瞬时转染效率仅可维持3 d左右,故在3 d后重新转染,转染5 d后收集细胞用于后续实验。

**1.6 qRT-PCR检测miR-125b-5p及 $\Delta Np63\alpha$ 、CK10、Inv、TG1、PI3K、Akt、mTOR的mRNA表达水平** 利用Trizol法提取细胞总RNA,采用反转录试剂盒进行反转录。PCR反应条件:94  $^{\circ}$ C 30 s; 94  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 90  $^{\circ}$ C 15 s。以U6或 $\beta$ -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达水平。引物由中国生工生物工程公司合成,引物序列见表1。

**1.7 Western blotting检测 $\Delta Np63\alpha$ 、CK10、Inv、TG1、PI3K、Akt、mTOR蛋白表达水平** 取转染阴性对照模拟物/抑制剂、miR-125b-5p模拟物/抑制剂的角质形成细胞,RIPA冰上裂解20 min,用BCA蛋白分析试剂盒进行定量检测。蛋白质经SDS-PAGE凝胶电泳后,转移到硝酸纤维素膜(NC)上。 $1 \times$  TBST洗涤后,用5%脱脂奶粉封闭2 h,加入TBST稀释的一抗 $\Delta Np63\alpha$ (1:1000)、CK10(1:100)、Inv(1:100)、TG1(1:1000)、PI3K(1:3000)、Akt(1:3000)、mTOR(1:3000)和 $\beta$ -actin(1:1000),4  $^{\circ}$ C孵育过夜。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔/鼠IgG二抗(1:5000)室温孵育1 h;洗膜后用ECL试剂盒发光显影,然后用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值。

**1.8 miR-125b-5p与 $\Delta Np63\alpha$ 结合位点预测** 在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站查询miR-125b-5p和 $\Delta Np63\alpha$ 的完整RNA序列,利用bibiserv(<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/>)在线网站对miR-125b-5p和 $\Delta Np63\alpha$ 的结合位点进行分析。

**1.9 统计学处理** 采用SPSS 28.0软件进行统计分

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequence of qRT-PCR	
基因	引物
$\Delta Np63\alpha$	正向: 5'-ATGTAAAGGGTCTCGGGGTG-3'
	反向: 5'-GGGCATTGTTTCCAGGTACA-3'
CK10	正向: 5'-GGAGGAGGAGGAGGAGTGTTCATC-3'
	反向: 5'-AAGCCAGGCGGTCAITCAGAITC-3'
Inv	正向: 5'-AGCTCCTCAAGACTGTCCTCCTC-3'
	反向: 5'-TCCTGCTCCTGTGGCTCCTTC-3'
TG1	正向: 5'-GTGGAACGACTGCTGGATGAAGAG-3'
	反向: 5'-TGTGACAATGAGTGTGCCGATGG-3'
PI3K	正向: 5'-GAGATTGCAAGCAGTGATAGTG-3'
	反向: 5'-TAATTTGGCAGTGATGTGGG-3'
Akt	正向: 5'-TGACCATGAACGAGTTTGAAGTA-3'
	反向: 5'-GAGGATCTTCATGGCGTAGTAG-3'
mTOR	正向: 5'-GAGATACGCTGTCATCCCTTTTAA-3'
	反向: 5'-CTGTATTAITGACGGCATGCT-3'
$\beta$ -actin	正向: 5'-CAACTTGATGTATGAAGGCTTTGGT-3'
	反向: 5'-ACTTTTAAITGGTCTCAAGTCAGTGTACAG-3'
miR-125b-5p	正向: 5'-TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA-3'
	反向: 5'-CCAGTGCAGG-GTCCGAGGTAT-3'
U6	正向: 5'-AGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAA-3'
	反向: 5'-ACGTAGCTAGCCAGCTAGCTCA-3'

CK10. 细胞角蛋白10; Inv. 外皮蛋白; TG1. 谷氨酰胺转移酶1; PI3K. 磷脂酰肌醇3-激酶; Akt. 蛋白激酶B; mTOR. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用Games-Howell检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 皮肤分化相关标志物和miR-125b-5p在氯化钙诱导的角质形成细胞分化模型中的表达情况** qRT-PCR检测结果显示,氯化钙处理7 d时角质形成细胞中CK10、Inv和TG1 mRNA相对表达水平(分别为 $300.70 \pm 13.27$ 、 $9.14 \pm 1.23$ 、 $5.49 \pm 0.34$ )高于处理0 d(分别为 $1.10 \pm 0.11$ 、 $1.02 \pm 0.23$ 、 $1.00 \pm 0.08$ )、1 d(分别为 $2.13 \pm 0.45$ 、 $1.21 \pm 0.21$ 、 $1.33 \pm 0.04$ )和5 d(分别为 $11.90 \pm 2.10$ 、 $5.86 \pm 1.03$ 、 $2.61 \pm 0.11$ )时,且处理5 d时高于处理1 d时,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图1A);氯化钙处理5 d时miR-125b-5p相对表达水平( $0.08 \pm 0.01$ )低于处理0 d( $1.00 \pm 0.02$ )和1 d( $0.17 \pm 0.02$ )时,差异有统计学意义( $P < 0.0001$ 或 $P < 0.05$ ,图1B),但氯化钙处理5 d与7 d( $0.07 \pm 0.02$ )时miR-125b-5p相对表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 氯化钙处理对角质形成细胞中 $\Delta Np63\alpha$ 表达**

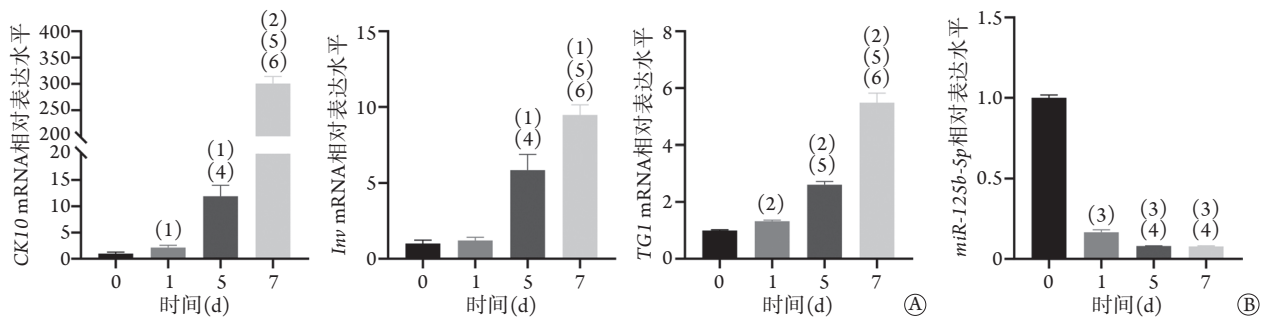


图1 皮肤分化相关标志物和miR-125b-5p在角质形成细胞分化模型中的表达情况

Fig.1 Expression of skin differentiation-related markers and miR-125b-5p in keratinocyte differentiation model

CK10. 细胞角蛋白10; Inv. 外皮蛋白; TGI. 谷氨酰胺转移酶1; A. qRT-PCR检测角质细胞分化模型中CK10、Inv、TGI mRNA相对表达水平; B. qRT-PCR检测角质细胞分化模型中miR-125b-5p相对表达水平; 与0 d比较, (1) $P < 0.05$ , (2) $P < 0.01$ , (3) $P < 0.0001$ ; 与1 d比较, (4) $P < 0.05$ , (5) $P < 0.01$ ; 与5 d比较, (6) $P < 0.01$

及PI3K/Akt/mTOR通路的影响 qRT-PCR检测结果显示, 氯化钙处理1、5、7 d时角质形成细胞中 $\Delta Np63\alpha$  mRNA相对表达水平均高于0 d, 差异有统计学意义( $3.55 \pm 0.24$ 、 $5.58 \pm 0.42$ 、 $20.82 \pm 0.58$  vs.  $1.01 \pm 0.23$ ,  $P < 0.01$ , 图2A)。激光共聚焦显微镜观察显示, 与氯化钙处理0 d时相比, 氯化钙处理5 d时角质形成细胞中 $\Delta Np63\alpha$ 阳性细胞率增高, 差异有统计学意义( $96.9\% \pm 0.9\%$  vs.  $43.2\% \pm 8.2\%$ ,

$t = 6.469$ ,  $P < 0.001$ , 图2B)。氯化钙处理1 d(分别为 $2.28 \pm 0.05$ 、 $1.66 \pm 0.04$ 、 $1.77 \pm 0.22$ )、5 d(分别为 $4.37 \pm 0.22$ 、 $2.42 \pm 0.05$ 、 $2.47 \pm 2.22$ )和7 d(分别为 $12.77 \pm 0.59$ 、 $2.88 \pm 0.20$ 、 $4.39 \pm 0.33$ )时PI3K、Akt和mTOR mRNA相对表达水平高于0 d(分别为 $1.00 \pm 0.11$ 、 $1.03 \pm 0.05$ 、 $1.00 \pm 0.05$ ), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图2C)。

2.3  $\Delta Np63\alpha$ 与miR-125b-5p的关系 bibiserv网站预

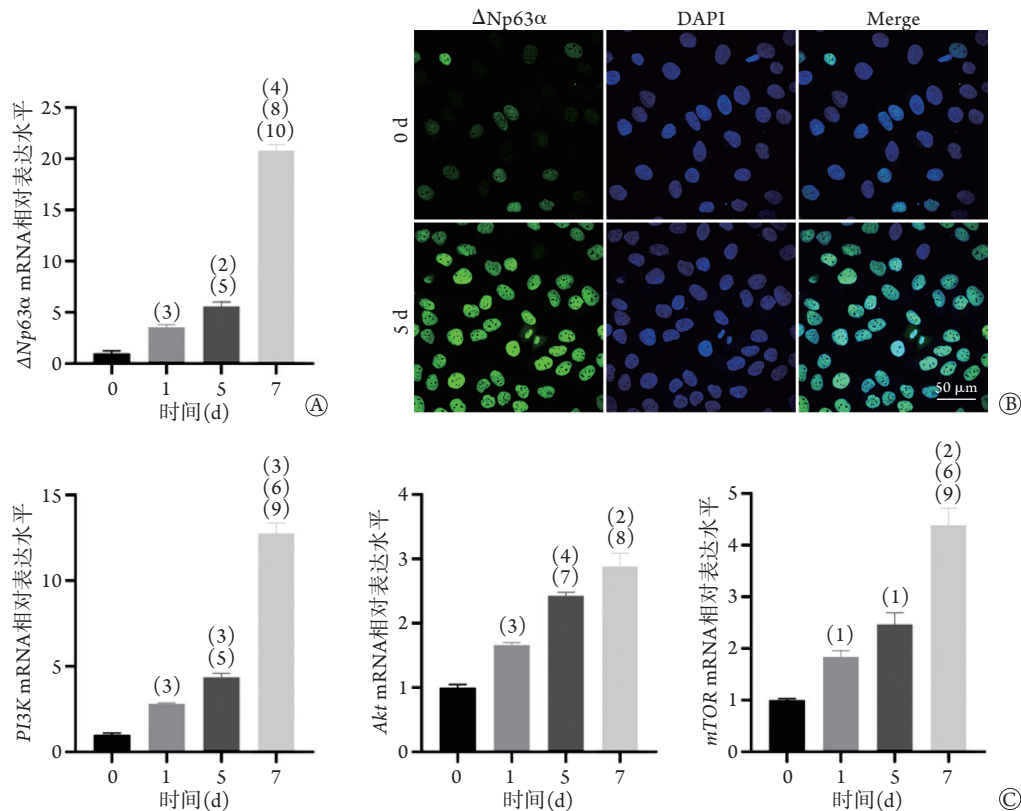


图2 氯化钙促进皮肤角质形成细胞中 $\Delta Np63\alpha$ 的表达且激活PI3K/Akt/mTOR通路

Fig.2 Calcium chloride promotes the expression of  $\Delta Np63\alpha$  and activates PI3K/Akt/mTOR pathway in keratinocyte

PI3K. 磷脂酰肌醇3-激酶; Akt. 蛋白激酶B; mTOR. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; A. qRT-PCR检测角质形成细胞中 $\Delta Np63\alpha$  mRNA相对表达水平; B. 激光共聚焦显微镜观察 $\Delta Np63\alpha$ 在角质形成细胞中的表达情况; C. qRT-PCR检测PI3K/Akt/mTOR通路的mRNA相对表达水平。与0 d比较, (1) $P < 0.05$ , (2) $P < 0.01$ , (3) $P < 0.001$ , (4) $P < 0.0001$ ; 与1 d比较, (5) $P < 0.05$ , (6) $P < 0.01$ , (7) $P < 0.001$ , (8) $P < 0.0001$ ; 与5 d比较, (9) $P < 0.01$ , (10) $P < 0.0001$

测结果显示, *miR-125b-5p*与 $\Delta Np63\alpha$ 的3'-UTR区有一个结合位点(图3)。

qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, *miR-125b-5p*模拟物组 $\Delta Np63\alpha$  mRNA和蛋白表达水平明显低于阴性对照模拟物组(mRNA:  $0.64 \pm 0.02$

vs.  $1.00 \pm 0.01$ ; 蛋白:  $0.92 \pm 0.19$  vs.  $1.22 \pm 0.20$ ,  $P < 0.05$ , 图4A、B); *miR-125b-5p*抑制剂组 $\Delta Np63\alpha$  mRNA和蛋白表达水平均高于阴性对照抑制剂组(mRNA:  $1.79 \pm 0.13$  vs.  $0.99 \pm 0.01$ ; 蛋白:  $0.78 \pm 0.09$  vs.  $0.60 \pm 0.11$ ,  $P < 0.05$ , 图4C、D)。

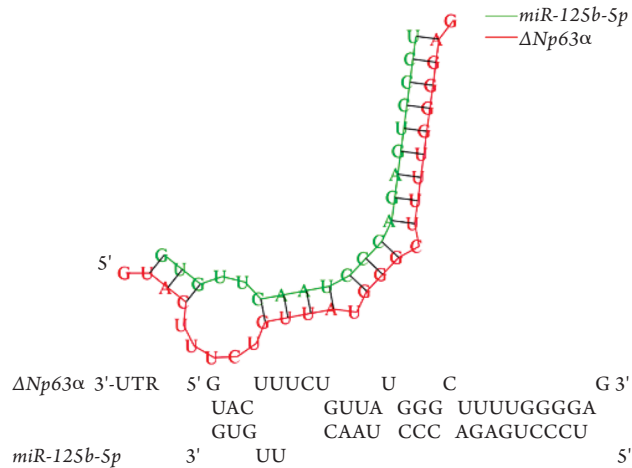


图3 bibiserv网站预测皮肤角质形成细胞中*miR-125b-5p*与 $\Delta Np63\alpha$ 的3'-UTR结合位点信息

Fig.3 Prediction of 3'-UTR binding sites between *miR-125b-5p* and  $\Delta Np63\alpha$  by bibiserv website in keratinocyte

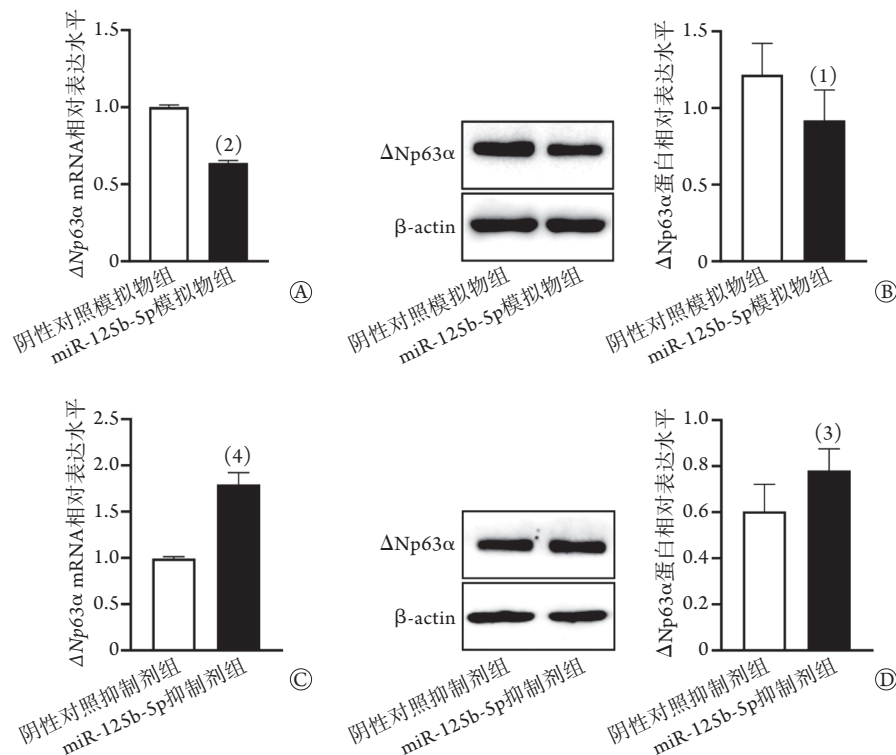


图4 皮肤角质形成细胞中 $\Delta Np63\alpha$ 与*miR-125b-5p*的关系

Fig.4 Relationship of  $\Delta Np63\alpha$  with *miR-125b-5p* in keratinocyte

A、B. qRT-PCR和Western blotting检测*miR-125b-5p*模拟物组中 $\Delta Np63\alpha$ 的表达水平; C、D. qRT-PCR和Western blotting检测*miR-125b-5p*抑制剂组中 $\Delta Np63\alpha$ 的表达水平。与阴性对照模拟物组比较, (1) $P < 0.05$ , (2) $P < 0.0001$ ; 与阴性对照抑制剂组比较, (3) $P < 0.05$ , (4) $P < 0.001$

**2.4 *miR-125b-5p*转染对角质细胞中皮肤分化相关标志物表达的影响** qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, *miR-125b-5p*模拟物组*CK10*、*Inv*、*TG1* mRNA和蛋白表达水平明显低于阴性对照模

拟物组( $P < 0.05$ , 图5A); *miR-125b-5p*抑制剂组*CK10*、*Inv*和*TG1* mRNA和蛋白表达水平明显高于阴性对照抑制剂组( $P < 0.05$ , 图5B)。

**2.5 *miR-125b-5p*转染对角质形成细胞中PI3K/Akt/**

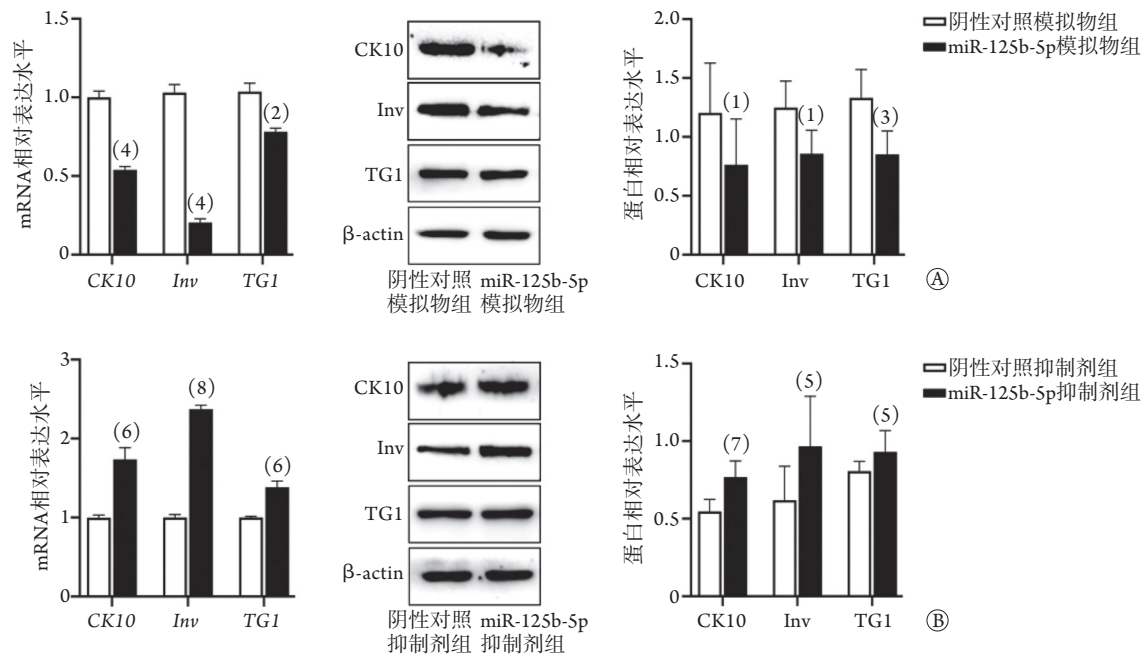


图5 miR-125b-5p转染对皮肤角质形成细胞中分化相关标志物表达的影响

Fig.5 Effect of miR-125b-5p transfection on the expression of skin differentiation-related markers in keratinocytes

CK10. 细胞角蛋白10; Inv. 外皮蛋白; TG1. 谷氨酰胺转移酶1; A. 转染miR-125b-5p模拟物5 d后, qRT-PCR和Western blotting检测角质细胞CK10、Inv、TG1 mRNA和蛋白表达水平; B. 转染miR-125b-5p抑制剂5 d后, qRT-PCR和Western blotting检测角质细胞CK10、Inv、TG1 mRNA和蛋白表达水平; 与阴性对照模拟物组比较, (1) $P<0.05$ , (2) $P<0.01$ , (3) $P<0.001$ , (4) $P<0.0001$ ; 与阴性对照抑制剂组比较, (5) $P<0.05$ , (6) $P<0.01$ , (7) $P<0.001$ , (8) $P<0.0001$

mTOR通路的影响 qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, 与阴性对照模拟物组相比, miR-125b-5p模拟物组PI3K、Akt、mTOR mRNA表达水平降低, PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR蛋白表达水平降低, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ , 图6A); 与阴性对照抑制剂组相比, miR-125b-5p抑制剂组PI3K、Akt、mTOR mRNA表达水平升高, PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR蛋白表达水平升高, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ , 图6B)。

### 3 讨 论

表皮再生和动态平衡对于维持正常皮肤功能非常重要, 且表皮的形成伴随着角质形成细胞的分化、增殖和迁移。分化的基底层角质形成细胞是表皮细胞补充的主要来源<sup>[12]</sup>。角质形成细胞的异常分化与银屑病和特应性皮炎等皮肤病相关, 并与皮肤肿瘤的形成有关<sup>[13]</sup>。因此, 研究角质形成细胞的分化对理解皮肤疾病的发生具有重要意义。

近年来多项研究发现, miRNA与角质形成细胞的分化、增殖和凋亡等相关。Wang等<sup>[14]</sup>发现, miR-744-3p可通过靶向KLLN抑制银屑病中角质形成细胞的分化。在皮肤表皮层分布的miR-155过表达可明显抑制角质形成细胞的终末分化<sup>[15]</sup>。但miRNA调控角质形成细胞分化的相关研究较

少。据报道, miR-125b-5p在部分癌症中起到癌基因或抑癌基因的作用, 这可能是由于miR-125b-5p在不同组织中的靶基因不同而导致的<sup>[16]</sup>。此外, Zheng等<sup>[17]</sup>发现, miR-125b-5p在银屑病患者皮肤中呈低表达。Lu等<sup>[18]</sup>发现, miR-125b-5p在皮肤鳞癌中呈低表达。过表达miR-125b-5p可促进皮肤鳞癌细胞的凋亡, 抑制肿瘤的增长。Tian等<sup>[19]</sup>也得到了相似的结果。同时, miR-125b-5p在口腔鳞癌、头颈鳞癌、肺鳞癌和食管鳞癌中也呈低表达<sup>[20-22]</sup>。由此可见, miR-125b-5p可能在角质形成细胞中作为一种抑癌基因而存在。本研究对角质形成细胞分化模型中miR-125b-5p的表达情况进行分析, 发现miR-125b-5p的表达水平随着角质形成细胞的分化而降低, 推测miR-125b-5p可能参与角质形成细胞的分化。本研究结果显示, miR-125b-5p模拟物组CK10、Inv、TG1的mRNA和蛋白表达水平明显降低, 且转染miR-125b-5p抑制剂后可逆转这一效应, 提示miR-125b-5p在角质形成细胞分化过程中发挥着重要作用。采用生物信息学技术分析发现, miR-125b-5p可以与ΔNp63α的3'-UTR区结合。过表达miR-125b-5p可降低ΔNp63α mRNA和蛋白的表达水平, 进一步表明miR-125b-5p抑制角质形成细胞的分化是通过下调ΔNp63α实现的。

ΔNp63α为p53家族的成员, 在上皮组织分化和

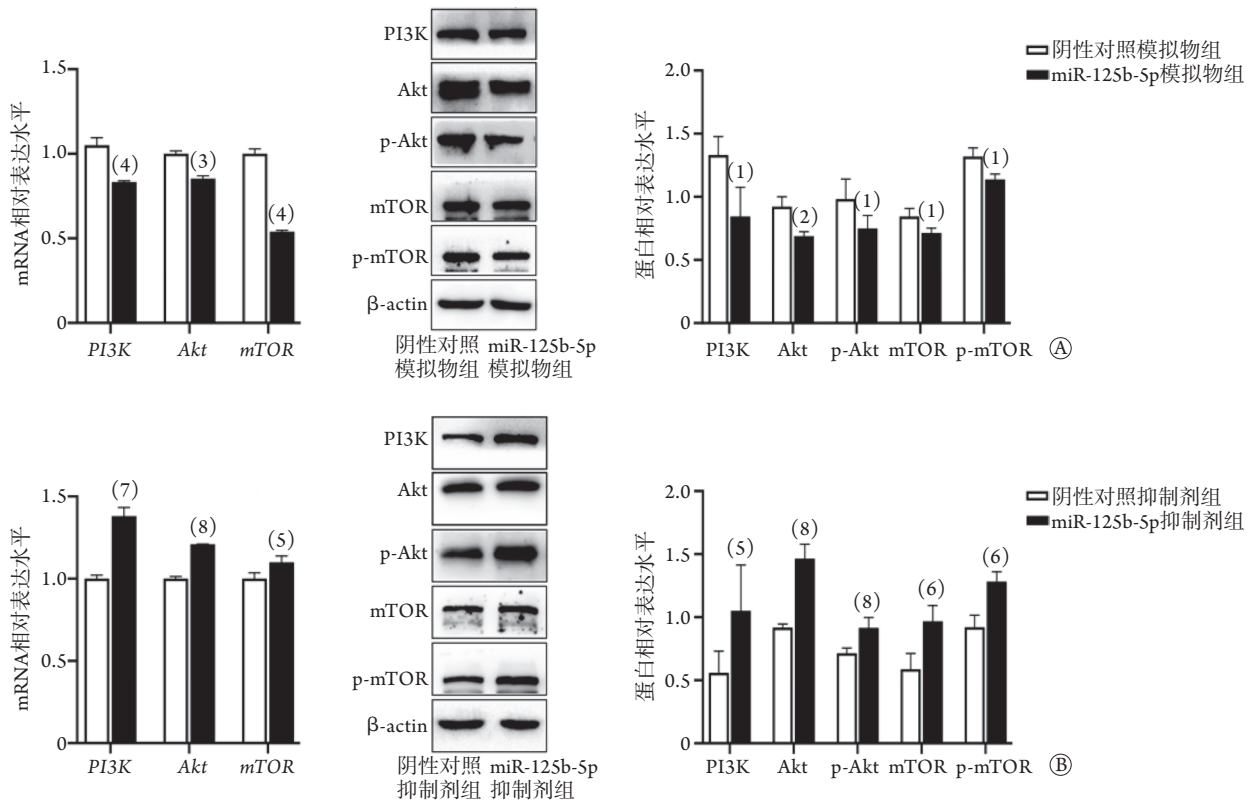


图6 *miR-125b-5p*表达对皮肤角质形成细胞中PI3K/Akt/mTOR通路的影响

Fig. 6 Effects of *miR-125b-5p* expression on PI3K/Akt/mTOR pathway in keratinocytes

PI3K. 磷脂酰肌醇3-激酶; Akt. 蛋白激酶B; mTOR. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; A. 转染*miR-125b-5p*模拟物5 d后, qRT-PCR和Western blotting检测PI3K/Akt/mTOR通路mRNA及总蛋白、磷酸化蛋白相对表达水平; B. 转染*miR-125b-5p*抑制剂5 d后, qRT-PCR和Western blotting检测PI3K/Akt/mTOR通路mRNA及总蛋白、磷酸化蛋白相对表达水平; 与阴性对照模拟物组比较, (1) $P<0.05$ , (2) $P<0.01$ , (3) $P<0.001$ , (4) $P<0.0001$ ; 与阴性对照抑制剂组比较, (5) $P<0.05$ , (6) $P<0.01$ , (7) $P<0.001$ , (8) $P<0.0001$

组织发育中发挥重要作用, 且与多种肿瘤的发生发展密切相关。 $\Delta Np63\alpha$ 在皮肤鳞癌、宫颈癌、肺癌组织中高表达, 且其表达水平与肿瘤的浸润、转移关系密切<sup>[23-24]</sup>。有研究发现,  $\Delta Np63\alpha$ 表达水平与皮肤鳞癌患者的生存率呈负相关<sup>[23]</sup>。此外,  $\Delta Np63\alpha$ 过度表达可促进皮肤鳞癌的发生和发展<sup>[25]</sup>。King等<sup>[26]</sup>发现,  $\Delta Np63\alpha$ 敲除小鼠的表皮不再生长。Nylander等<sup>[27]</sup>发现, 在*p63*敲除小鼠中过表达 $\Delta Np63\alpha$ 可以恢复皮肤分化标志物的水平, 并维持上皮的完整性。上述研究表明,  $\Delta Np63\alpha$ 在皮肤发育中发挥着重要的调控作用。

此外, 本研究证实, *miR-125b-5p*和 $\Delta Np63\alpha$ 对角质形成细胞分化的作用可能与PI3K/Akt/mTOR通路有关。既往研究发现, 激活PI3K/Akt/mTOR信号通路可促进角质形成细胞的分化<sup>[28-29]</sup>。Troiano等<sup>[30]</sup>发现, 在皮肤鳞癌中 $\Delta Np63\alpha$ 过表达与PI3K/Akt/mTOR信号通路异常激活有关。因此, 本研究评价*miR-125b-5p*和 $\Delta Np63\alpha$ 对角质形成细胞分化的影响时, 重点关注了PI3K/Akt/mTOR信号通路的作用。结果表明, 上调*miR-125b-5p*可降低角质形成

细胞中PI3K/Akt/mTOR通路mRNA、总蛋白及磷酸化蛋白的表达水平, 而下调*miR-125b-5p*则促进了PI3K/Akt/mTOR通路的激活, 提示*miR-125b-5p*靶向 $\Delta Np63\alpha$ 通过PI3K/Akt/mTOR信号通路调节角质形成细胞的分化。

综上所述, 本研究结果表明, *miR-125b-5p*靶向 $\Delta Np63\alpha$ 通过PI3K/Akt/mTOR通路抑制角质形成细胞的分化。该结果为理解皮肤疾病的发病机制提供了新的见解, 并为表皮细胞生物学研究奠定了基础。但本研究仅在体外细胞水平证实*miR-125b-5p*对角质形成细胞分化的影响, 且 $\Delta Np63\alpha$ 调控角质形成细胞分化是否与PI3K/Akt/mTOR信号通路相关尚无法证实。因此, 体内功能验证及 $\Delta Np63\alpha$ 的潜在机制尚需进一步研究。

#### 【参考文献】

- [1] Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(265): 265Sr6.
- [2] Gerasymchuk M, Cherkasova V, Kovalchuk O, et al. The role of microRNAs in organismal and skin aging[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,

- 21(15): 5281.
- [3] Aberdam D, Candi E, Knight RA, *et al.* miRNAs, 'stemness' and skin[J]. Trends Biochem Sci, 2008, 33(12): 583-591.
- [4] Wang WM, Wu C, Jin HZ. Exosomes in chronic inflammatory skin diseases and skin tumors[J]. Exp Dermatol, 2019, 28(3): 213-218.
- [5] Yang BY, Dong LD, Gao YL, *et al.* Expression of miRNA-203a and its target gene p63 in different stages of psoriasis[J]. World Latest Med Inform, 2018, 18(55): 27-29. [杨兵艳, 董灵娣, 高永龙, 等. miRNA-203a及其靶基因P63在银屑病不同时期的表达分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(55): 27-29.]
- [6] Flood KS, Houston NA, Savage KT, *et al.* Genetic basis for skin youthfulness[J]. Clin Dermatol, 2019, 37(4): 312-319.
- [7] Song Z, Liu D, Peng Y, *et al.* Differential microRNA expression profile comparison between epidermal stem cells and differentiated keratinocytes[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 2285-2291.
- [8] Luan W, Ding Y, Yuan H, *et al.* Long non-coding RNA LINC00520 promotes the proliferation and metastasis of malignant melanoma by inducing the miR-125b-5p/EIF5A2 axis[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 96.
- [9] Huber V, Vallacchi V, Fleming V, *et al.* Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma[J]. J Clin Invest, 2018, 128(12): 5505-5516.
- [10] Alshammari ES, Aljaghtmi AA, Stacy AJ, *et al.* ERK3 is transcriptionally upregulated by Np63alpha and mediates the role of Np63alpha in suppressing cell migration in non-melanoma skin cancers[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 155.
- [11] Ogawa E, Okuyama R, Egawa T, *et al.* p63/p51-induced onset of keratinocyte differentiation via the c-Jun N-terminal kinase pathway is counteracted by keratinocyte growth factor[J]. J Biol Chem, 2008, 283(49): 34241-34249.
- [12] Fortunel NO, Chadli L, Coutier J, *et al.* KLF4 inhibition promotes the expansion of keratinocyte precursors from adult human skin and of embryonic-stem-cell-derived keratinocytes[J]. Nat Biomed Eng, 2019, 3(12): 985-997.
- [13] Masood N, Basharat Z, Khan T, *et al.* Entangling relation of micro RNA-let7, miRNA-200 and miRNA-125 with various cancers[J]. Pathol Oncol Res, 2017, 23(4): 707-715.
- [14] Wang C, Zong J, Li Y, *et al.* MiR-744-3p regulates keratinocyte proliferation and differentiation via targeting KLLN in psoriasis[J]. Exp Dermatol, 2019, 28(3): 283-291.
- [15] Beer L, Kalinina P, Köcher M, *et al.* miR-155 contributes to normal keratinocyte differentiation and is upregulated in the epidermis of psoriatic skin lesions[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9288.
- [16] Yin H, Sun Y, Wang X, *et al.* Progress on the relationship between miR-125 family and tumorigenesis[J]. Exp Cell Res, 2015, 339(2): 252-260.
- [17] Zheng Y, Cai B, Li X, *et al.* MiR-125b-5p and miR-181b-5p inhibit keratinocyte proliferation in skin by targeting Akt3[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 862: 172659.
- [18] Lu X, Gan Q, Gan C, *et al.* Long non-coding RNA PICSAR knockdown inhibits the progression of cutaneous squamous cell carcinoma by regulating miR-125b/YAP1 axis[J]. Life Sci, 2021, 274: 118303.
- [19] Tian K, Liu W, Zhang J, *et al.* MicroRNA-125b exerts antitumor functions in cutaneous squamous cell carcinoma by targeting the STAT3 pathway[J]. Cell Mol Biol Lett, 2020, 25: 12.
- [20] Gao W, Shen H, Liu L, *et al.* MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(4): 557-566.
- [21] Gu J, Wang Y, Wu X. MicroRNA in the pathogenesis and prognosis of esophageal cancer[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(7): 1292-1300.
- [22] Chen YF, Wei YY, Yang CC, *et al.* miR-125b suppresses oral oncogenicity by targeting the anti-oxidative gene PRXL2A[J]. Redox Biol, 2019, 22: 101140.
- [23] Fisher ML, Kerr C, Adhikary G, *et al.* Transglutaminase interaction with alpha6/beta4-integrin stimulates YAP1-dependent deltaNp63alpha stabilization and leads to enhanced cancer stem cell survival and tumor formation[J]. Cancer Res, 2016, 76(24): 7265-7276.
- [24] Song WQ, Huang TT, Yu L, *et al.* Expression and clinical significance of ΔNp63α, DPC4/Smad4 and P21 in cervical squamous cell carcinoma[J]. J Southern Med Univer, 2018, 38(7): 850-855. [宋文庆, 黄婷婷, 俞岚, 等. 子宫颈鳞状细胞癌中ΔNp63α、DPC4/Smad4和P21的表达及其临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(7): 850-855.]
- [25] Moses MA, George AL, Sakakibara N, *et al.* Molecular mechanisms of p63-mediated squamous cancer pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3590.
- [26] King KE, George AL, Sakakibara N, *et al.* Intersection of the p63 and NF-kappaB pathways in epithelial homeostasis and disease[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(9): 1571-1580.
- [27] Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, *et al.* Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells[J]. J Pathol, 2002, 198(4): 417-427.
- [28] Chamcheu JC, Adhami VM, Esnault S, *et al.* Dual inhibition of PI3K/Akt and mTOR by the dietary antioxidant, delphinidin, ameliorates psoriatic features *in vitro* and in an imiquimod-induced psoriasis-like disease in mice[J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 26(2): 49-69.
- [29] Chamcheu JC, Esnault S, Adhami VM, *et al.* Fisetin, a 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone inhibits the PI3K/Akt/mTOR and MAPK pathways and ameliorates psoriasis pathology in 2D and 3D organotypic human inflammatory skin models[J]. Cells, 2019, 8(9): 1089.
- [30] Troiano A, Lomoriello IS, di Martino O, *et al.* Y-box binding protein-1 is part of a complex molecular network linking deltaNp63alpha to the PI3K/Akt pathway in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. J Cell Physiol, 2015, 230(9): 2067-2074.

(责任编辑: 纪方方)