

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.03.008

miR-152-3p 调控 Notch1/DLL4 通路对家兔深 II 度烧伤创面血管生成的影响*

倪少俊 王 成 方 鸿 杨 军 吴柏磊

(遵义医科大学第五附属(珠海)医院整形烧伤外科 广东 珠海 519100)

摘要 目的:探究微小核糖核酸(miR)-152-3p 调控果蝇 Notch 同源物 1(Notch1)/Delta 样配体 4(DLL4)通路对家兔深 II 度烧伤创面血管生成的影响。**方法:**将 50 只新西兰家兔随机分为对照组、模型组、miR-152-3p 拮抗剂(antagomir)组、miR-152-3p antagomir 阴性对照 + 空载组、miR-152-3p antagomir+Notch1 敲低组,每组 10 只,除对照组外其余各组家兔构建深 II 度烧伤模型,分组给药处理后,实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测各组家兔创面组织 miR-152-3p 与 Notch1、DLL4 mRNA 表达;检测各组家兔创面愈合率及微循环血流灌注值(MPD);免疫组织化学染色检测各组家兔创面微血管密度(MVD);酶联免疫吸附反应(ELISA)检测各组家兔血清血管内皮细胞生长因子(VEGF)及促血管生成素 1(Ang1)水平;免疫印迹检测各组家兔创面组织 VEGF、Ang1 与 Notch1/DLL4 通路蛋白表达;双荧光素酶报告基因实验检测兔脐静脉内皮细胞中 miR-152-3p 对 Notch1 及 DLL4 的靶向调节。**结果:**与对照组相比,模型组家兔创面组织 miR-152-3p 与 Notch1、DLL4 mRNA 表达升高($P<0.05$),创面 MPD 及 MVD、血清 VEGF 及 Ang1 水平、创面组织 VEGF 与 Ang1 蛋白表达降低($P<0.05$)。与模型组相比,miR-152-3p antagomir 组家兔创面组织 miR-152-3p mRNA 表达降低($P<0.05$),创面愈合率、创面 MPD 及 MVD、血清 VEGF 及 Ang1 水平、创面组织 Notch1、DLL4 mRNA 及蛋白表达、创面组织 VEGF 与 Ang1 蛋白表达升高($P<0.05$);miR-152-3p antagomir 阴性对照 + 空载组家兔各指标无明显差异($P>0.05$);与 miR-152-3p antagomir 组相比,miR-152-3p antagomir+Notch1 敲低组家兔创面组织 miR-152-3p mRNA 表达无明显差异($P>0.05$),创面愈合率、创面 MPD 及 MVD、血清 VEGF 及 Ang1 水平、创面组织 Notch1、DLL4 mRNA 及蛋白表达、创面组织 VEGF 与 Ang1 蛋白表达降低($P<0.05$)。miR-152-3p 可靶向下调兔脐静脉内皮细胞中 Notch1 及 DLL4 的表达。**结论:**敲低 miR-152-3p 可通过上调 Notch1/DLL4 通路而增强家兔深 II 度烧伤创面血管生成,进而促进其创面愈合。

关键词:miR-152-3p;Notch1/DLL4;深 II 度烧伤;创面;血管生成

中图分类号:R-33;R644 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)03-440-08

Influences of miR-152-3p on Angiogenesis of Rabbits with Deep II-Degree Burn Wounds by Regulating Notch1/DLL4 Pathway*

NI Shao-jun, WANG Cheng, FANG Hong, YANG Jun, WU Bai-lei

(Plastic Burn Surgery, The Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai, Guangdong, 519100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influences of microRNA (miR)-152-3p on angiogenesis of rabbits with deep II-degree burn wounds by regulating Drosophila Notch homolog 1 (Notch1)/Delta-like ligand 4 (DLL4) pathway. **Methods:** 50 new Zealand rabbits were randomly divided into control group, model group, miR-152-3p antagomir (antagomir) group, miR-152-3p antagomir negative control combined empty load group, and miR-152-3p antagomir combined Notch1 knockdown group, with 10 rabbits in each group, except the control group, the rabbits in the other groups were constructed with deep II-degree burn models. After group administration, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was performed to detect the expressions of miR-152-3p and Notch1, DLL4 mRNAs in wound tissue of rabbits in each group. The wound healing rate and microcirculation perfusion value (MPD) of rabbits in each group were detected. The immunohistochemical staining was performed to detect the wound microvessel density (MVD) of rabbits in each group. The levels of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin 1 (Ang1) of rabbits in each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was performed to detect the expressions of VEGF, Ang1 and Notch1/DLL4 pathway proteins in the wound tissues of rabbits in each group. The targeted regulation of Notch1 and DLL4 by miR-152-3p in rabbit umbilical vein endothelial cells was detected by dual-luciferase reporter gene assay. **Results:** Compared with the control group, the expressions of miR-152-3p, Notch1 and DLL4 mRNA in the wound tissues of the rabbits in the model group were increased ($P<0.05$), the MPD and MVD in the wound, the levels of serum VEGF and Ang1, and the expressions of VEGF and Ang1 proteins in the wound tissues were decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of miR-152-3p in the wound tissues of rabbits in the miR-152-3p antagomir group was decreased ($P<0.05$), the wound healing rate, MPD and MVD in the wound, the levels of serum VEGF and Ang1,

* 基金项目:珠海市科技计划医疗卫生项目(ZH22036201210084PWC);广东省医学科学技术研究基金项目(A201811302)

作者简介:倪少俊(1979-),男,本科,副主任医师,研究方向:烧伤外科,E-mail: nsj100182@163.com

(收稿日期:2022-06-18 接受日期:2022-07-15)

the protein expressions of Notch1 and DLL4 mRNA in wound tissues, and the protein expressions of VEGF and Ang1 in wound tissues were increased ($P<0.05$). There was no obvious difference in each index of rabbits in miR-152-3p antagomir negative control combined empty load group ($P>0.05$). Compared with the miR-152-3p antagomir group, there was no obvious difference in the expression of miR-152-3p mRNA in the wound tissues of the rabbits in the miR-152-3p antagomir combined Notch1 knockdown group ($P>0.05$), the wound healing rate, MPD and MVD in the wound, the levels of serum VEGF and Ang1, the protein expressions of Notch1 and DLL4 mRNA in wound tissues, and the protein expressions of VEGF and Ang1 in wound tissues were decreased ($P<0.05$). The miR-152-3p could target down-regulate the expressions of Notch1 and DLL4 in rabbit umbilical vein endothelial cells. **Conclusion:** Knockdown of miR-152-3p can enhance the angiogenesis of rabbits with deep II-degree burn wounds by up-regulating the Notch1/DLL4 pathway, thereby promoting wound healing.

Key words: miR-152-3p; Notch1/DLL4; Deep II-degree burns; Wounds; Angiogenesis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R644 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)03-440-08

前言

烧伤是由火、热气、热液体等热力所致的组织损伤,可造成皮肤细胞坏死,微循环发生障碍^[1]。深 II 度烧伤可到达真皮层,破坏其组织细胞,即使创面愈合后也常伴随不同程度的瘢痕增生,具有极高的致残、致畸、致死率,给患者身心带来极大痛苦^[2-4]。血管生成是深 II 度烧伤创面愈合的重要生理特征,增强创面新生血管生成可加快其愈合过程^[5,6]。miR-152-3p 是调控血管相关细胞增殖、运动、迁移等生理活动的重要核糖核酸(Ribonucleic acid, RNA) 分子,可介导血管形成过程^[7,8],拮抗 miR-152-3p 表达可以恢复人脐静脉内皮细胞功能,加速糖尿病足溃疡创面修复^[9],因而推测 miR-152-3p 可能调控深 II 度烧伤创面血管生成过程。Notch 信号可调控内皮细胞功能及血管形成,对其进行抑制可下调血管生成相关因子表达,抑制血管形成及创面瘢痕增生^[10,11],Delta 样配体 4 (Delta like ligand-4, DLL4) 作为 Notch 的一种配体,可与果蝇 Notch 同源物 1 (Notch1) 结合促使抑制肿瘤血管生成,抑制 Notch1/DLL4 信号可减弱血管生成而对结直肠癌发挥抗癌作用^[12],另外上调 Notch1 可减轻烧伤诱导的心肌损伤^[13],并通过增强真皮成纤维细胞运动和分泌能力促进皮肤创伤的伤口愈合^[14],有研究证实微小 RNA 是 Notch 通路参与血管生成过程中的重要调控因子^[15],因此推测 miR-152-3p 可能通过调控 Notch1/DLL4 通路影响深 II 度烧伤创面血管生成,本文通过构建家兔深 II 度烧伤模型,对上述推测进行研究验证。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级新西兰家兔购自青岛康大生物科技有限公司,生产许可证号 SCXK (鲁)2021 0003,雄性,体重 2.0~3.0 kg,严格按照《中华人民共和国实验动物管理条例》的要求进行饲养及实验。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔脐静脉内皮细胞 (货号 PRI-C-0002)、内皮细胞专用培养基 (货号 ZQ-1304) 购自上海中乔新舟生物科技有限公司;兔血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 酶联免疫吸附反应 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (货号 EK-R61701)、兔促血管生成素 1 (angiopoietin 1, Ang1) ELISA

试剂盒 (货号 EK-R60467) 购自上海继和生物科技有限公司;小鼠源抗兔 VEGF 一抗 (货号 NB100-648)、兔源抗兔 DLL4 一抗 (货号 NB600-892) 购自上海优宁维生物科技股份有限公司;兔源抗兔 Notch1 一抗 (货号 YLK-KT0599) 购自优利科 (上海) 生命科学有限公司;小鼠源抗兔 GAPDH 一抗 (货号 AG019) 购自上海碧云天生物技术有限公司;山羊源抗兔 Ang1 一抗 (货号 ab133425)、HRP 偶联山羊抗小鼠二抗 (货号 ab6789)、HRP 偶联驴抗山羊二抗 (货号 ab6885)、HRP 偶联山羊抗兔二抗 (货号 ab6721) 购自 Abcam 公司;兔源抗兔 CD34 一抗 (货号 HK210081L) 购自杭州浩克生物技术有限公司;动物总 RNA 快速抽提试剂盒 (货号 B518621)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (货号 E608001)、RIPA 裂解液 (货号 C500005-0050)、BCA 蛋白定量检测试剂盒 (货号 C503021)、一步法反转录荧光定量试剂盒 (货号 B639277) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;通用 SP 免疫组织化学试剂盒 (货号 SP0041) 购自北京索莱宝生物科技有限公司等。实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 仪 (上海凯杰企业管理有限公司, 中国), 型号 Rotor-Gene Q;激光多普勒血液灌流成像仪 (Perimed 公司, 瑞典), 型号 LISCA;旋转切片机 (Leica 公司, 德国), 型号 CUT 4050;研究型显微镜 (麦克奥迪公司, 加拿大), 型号 MotiC;全波长酶标仪 (biotek 公司, 美国), 型号 Uquant;电泳仪电源、垂直电泳槽、转膜槽 (Bio-Rad 公司, 美国), 型号 PowerPac Basic 1645050、Tetra System、Power Pac Basic 等。

1.2 方法

1.2.1 建立家兔深 II 度烧伤模型及分组给药 参考文献^[16]制备家兔深 II 度烧伤模型:将新西兰家兔背部毛发剪短后以 8% 硫化钠脱毛,脱毛范围直径为 15 cm,以生理盐水冲洗去皮肤上残留的硫化钠,使用盛满 98 °C 热水的铁筒 (直径 5 cm) 放置在背部脱毛处 18 s,获得以脊柱为对称轴的 2 个深 II 度创面,取创面切片进行病理检测发现:真皮层细胞坏死,毛细血管扩张且管腔可见血液瘀滞,表明模型建立成功,共成功建模 40 只,随机分为模型组、miR-152-3p 拮抗剂 (antagomir) 组、miR-152-3p antagomir 阴性对照 + 空载组、miR-152-3p antagomir+Notch1 敲低组,每组 10 只,另选 10 只新西兰家兔只进行脱毛处理作为对照组。以生理盐水溶解 miR-152-3p antagomir、miR-152-3p antagomir 阴性对照、空载质粒、Notch1 siRNA 质粒,miR-152-3p antagomir 组尾静脉注射 miR-152-3p

antagomir 500ng; miR-152-3p antagomir 阴性对照 + 空载组尾静脉注射 miR-152-3p antagomir 阴性对照和空载质粒各 500 ng; miR-152-3p antagomir+ 敲低组尾静脉注射 miR-152-3p antagomir 和 Notch1 siRNA 质粒各 500 ng, 对照组和模型组家兔尾静脉注射等剂量生理盐水, 每周注射 2 次, 共干预处理 2 周。

1.2.2 家兔创面愈合率、微循环血流灌注值 (microcirculation perfusion value, MPD) 检测及标本收集 各组家兔在 2 周干预结束后, 采用激光多普勒血液灌注成像仪测定创面 MPD, 仪器参数: 扫描宽度 64 像素、轮廓 50 像素、显示频率 5Hz、视距 12 cm、扫描速度 100 ms/Line, 每只家兔扫描 3 次取平均值。对 12 组家兔烧伤创面分别在给药前后进行拍照, 以 MotiC 6.0 数码医学图像分析系统定量测定创面面积, 计算创面愈合率 = (1 - 未愈创面面积 / 初始创面面积) × 100%。采集各组家兔耳缘静脉血液, 2000 r/min 离心 10 min 获得血清, 存在 -80℃ 备用。于耳缘静脉注入 15 mL 的空气处死各组家兔, 剥下背部烧伤创

面皮肤组织 (对照组取相对应位置的皮肤), 每只家兔剪下约 0.5 g 存在液氮备用; 再次剪下 0.5 g 加入适量 RIPA 裂解液, 研磨离心 (3000 r/min, 4℃, 20 min) 获得创面组织蛋白样品液, 以 BCA 法测出其中总蛋白浓度, 存在 -80℃ 备用; 剩余创面皮肤组织清洗后做常规固定、脱水、透明、石蜡包埋处理后固定在旋转切片机中, 切为约 4 μm 厚的切片备用。

1.2.3 家兔创面组织 miR-152-3p 与 Notch1、DLL4 mRNA 表达检测 上述 1.2.2 中收集的创面组织, 于研钵中研碎并采用动物总 RNA 快速抽提试剂盒提出各组总 RNA, 分别测定其浓度, 取适量总 RNA 和基因引物加入一步法反转录荧光定量试剂盒中的预混液内混匀, 参照其说明书指导设定反应条件, 进行实时荧光定量 PCR 反应后获得各基因 Ct 值, miR-152-3p 内参选用 U6, Notch1、DLL4 内参选用 GAPDH, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法分析后可量化得出基因相对表达, 引物序列见下表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 The qRT-PCR primer sequence

Primer name	Direction	Sequence(5'-3')
miR-152-3p	F	CTAGTCCAGTTTCCCAGGA
	R	CAGTGCCTGTCGTGGAGT
U6	F	CTCGCTTCGGCAGCACA
	R	AACGCTTCACGAATTTGCGT
Notch1	F	GGTGAGACCTGCCTGAATG
	R	GTTGGGGTCCTGGCATC
DLL4	F	AGGCCTGTTTTGTGACCAAG
	R	GTGCAGGTGTAGCTTCGCT
GAPDH	F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	R	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

1.2.4 家兔创面组织微血管密度 (microvessel density, MVD) 检测 CD34 是微血管主要标志物, 对其表达进行检测可用来评测 MVD^[17,18], 1.2.2 中的创面组织切片取出后做常规脱蜡、水化、0.3% H₂O₂ 孵育、漂洗处理, 以 5% 山羊血清封闭后孵育稀释 200 倍的抗兔 CD34 一抗, 然后采用通用 SP 免疫组织化学试剂盒孵育二抗、DAB 显色, 完成免疫组化操作, 在显微镜下采集图像, 以 MotiC 6.0 数码医学图像分析系统进行分析定量视野中切片面积及血管数 (设定 CD34 阳性表达细胞或细胞簇作为 1 个血管计数单位), 最终获得 MVD = 血管数 / 切片面积。

1.2.5 家兔血清 VEGF 及 Ang1 水平检测 1.2.2 中保存在 -80℃ 的血清取出缓慢解冻, 采用 ELISA 试剂盒测定其中 VEGF 及 Ang1 水平, 具体步骤参照试剂盒说明书进行。

1.2.6 家兔创面组织 VEGF、Ang1 与 Notch1/DLL4 通路蛋白表达检测 1.2.2 中保存在 -80℃ 的创面组织蛋白样品液取出缓慢解冻, 每组取 20 μg 总蛋白变性、上样、跑电泳、湿转, 以脱脂牛奶封闭分散在膜上的总蛋白非特异位点, 根据分子量将蛋白 VEGF、Ang1、Notch1、DLL4、GAPDH 裁下, 以相应一抗、二抗做抗原抗体反应后显色, 采集图像后以 Image-Pro plus 软件分

析定量蛋白条带灰度值, 以内参 GAPDH 为基准量化得出各组蛋白相对表达情况。

1.2.7 检测兔脐静脉内皮细胞中 miR-152-3p 对 Notch1 及 DLL4 的靶向调控 解冻兔脐静脉内皮细胞后复苏培养, 传代接种在无菌 24 孔板中 (1 × 10⁵ 个 / 孔), 培养 24 h 后随机分为 Notch1 突变 + miR-152-3p mimics 阴性对照组 (转染突变型 Notch1 3'-UTR 报告质粒 + 空载质粒)、Notch1 突变 + miR-152-3p mimics 组 (转染突变型 Notch1 3'-UTR 报告质粒 + miR-152-3p 过表达质粒)、Notch1 野生 + miR-152-3p mimics 阴性对照组 (转染野生型 Notch1 3'-UTR 报告质粒 + 空载质粒)、Notch1 野生 + miR-152-3p mimics 组 (转染野生型 Notch1 3'-UTR 报告质粒 + miR-152-3p 过表达质粒)、DLL4 突变 + miR-152-3p mimics 阴性对照组 (转染突变型 DLL4 3'-UTR 报告质粒 + 空载质粒)、DLL4 突变 + miR-152-3p mimics 组 (转染突变型 DLL4 3'-UTR 报告质粒 + miR-152-3p 过表达质粒)、DLL4 野生 + miR-152-3p mimics 阴性对照组 (转染野生型 DLL4 3'-UTR 报告质粒 + 空载质粒)、DLL4 野生 + miR-152-3p mimics 组 (转染野生型 DLL4 3'-UTR 报告质粒 + miR-152-3p 过

表达质粒),采用脂质体 2000 分组进行转染 24 h,然后收集各组细胞通过双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组细胞双荧光素酶相对活性,具体步骤按照制造商试剂盒说明书中指导方法进行。

1.3 统计学分析

本文数据使用 GraphPad Prism 8.0 软件做统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两之间进一步比较采用 SNK-q 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组家兔创面组织 miR-152-3p 与 Notch1、DLL4 mRNA 表

达的检测结果

与对照组相比,模型组家兔创面组织 miR-152-3p 与 Notch1、DLL4 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。与模型组相比,miR-152-3p antagomir 组家兔创面组织 miR-152-3p 表达降低 ($P<0.05$),Notch1、DLL4 mRNA 表达升高 ($P<0.05$),miR-152-3p antagomir 阴性对照 + 空载组家兔创面组织 miR-152-3p 与 Notch1、DLL4 mRNA 表达无明显差异 ($P>0.05$); 与 miR-152-3p antagomir 组相比,miR-152-3p antagomir+Notch1 敲低组家兔创面组织 miR-152-3p 表达无明显差异 ($P>0.05$),Notch1、DLL4 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。如表 2 所示。

表 2 各组家兔创面组织 miR-152-3p 与 Notch1、DLL4 mRNA 相对表达($n=10, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Relative expression of miR-152-3p and Notch1, DLL4 mRNA in wound tissues of rabbits in each group($n=10, \bar{x}\pm s$)

Groups	miR-152-3p	Notch1	DLL4
Control group	1.03 $\pm$ 0.15	0.96 $\pm$ 0.12	0.95 $\pm$ 0.11
Model group	2.24 $\pm$ 0.20 ^a	1.30 $\pm$ 0.15 ^a	1.28 $\pm$ 0.14 ^a
miR-152-3p antagomir group	1.12 $\pm$ 0.16 ^b	2.18 $\pm$ 0.19 ^b	2.20 $\pm$ 0.21 ^b
miR-152-3p antagomir negative control combined empty load group	2.23 $\pm$ 0.19	1.32 $\pm$ 0.14	1.27 $\pm$ 0.16
miR-152-3p antagomir combined Notch1 knockdown group	1.13 $\pm$ 0.17 ^b	1.36 $\pm$ 0.13 ^c	1.35 $\pm$ 0.18 ^c
F	128.201	93.279	81.820
P	0.000	0.000	0.000

Note: compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the miR-152-3p antagomir group, ^c $P<0.05$.

2.2 各组家兔创面愈合率及 MPD 的检测结果

与对照组相比,模型组家兔创面 MPD 明显降低 ($P<0.05$); 与模型组相比,miR-152-3p antagomir 组家兔创面愈合率、MPD 明显升高 ($P<0.05$),miR-152-3p antagomir 阴性对照 + 空载组

家兔创面愈合率、MPD 无明显差异 ($P>0.05$); 与 miR-152-3p antagomir 组相比,miR-152-3p antagomir+Notch1 敲低组家兔创面愈合率、MPD 明显降低 ($P<0.05$)。如表 3 所示。

表 3 各组家兔创面愈合率及 MPD($n=10, \bar{x}\pm s$)

Table 3 Wound healing rate and MPD of rabbits in each group($n=10, \bar{x}\pm s$)

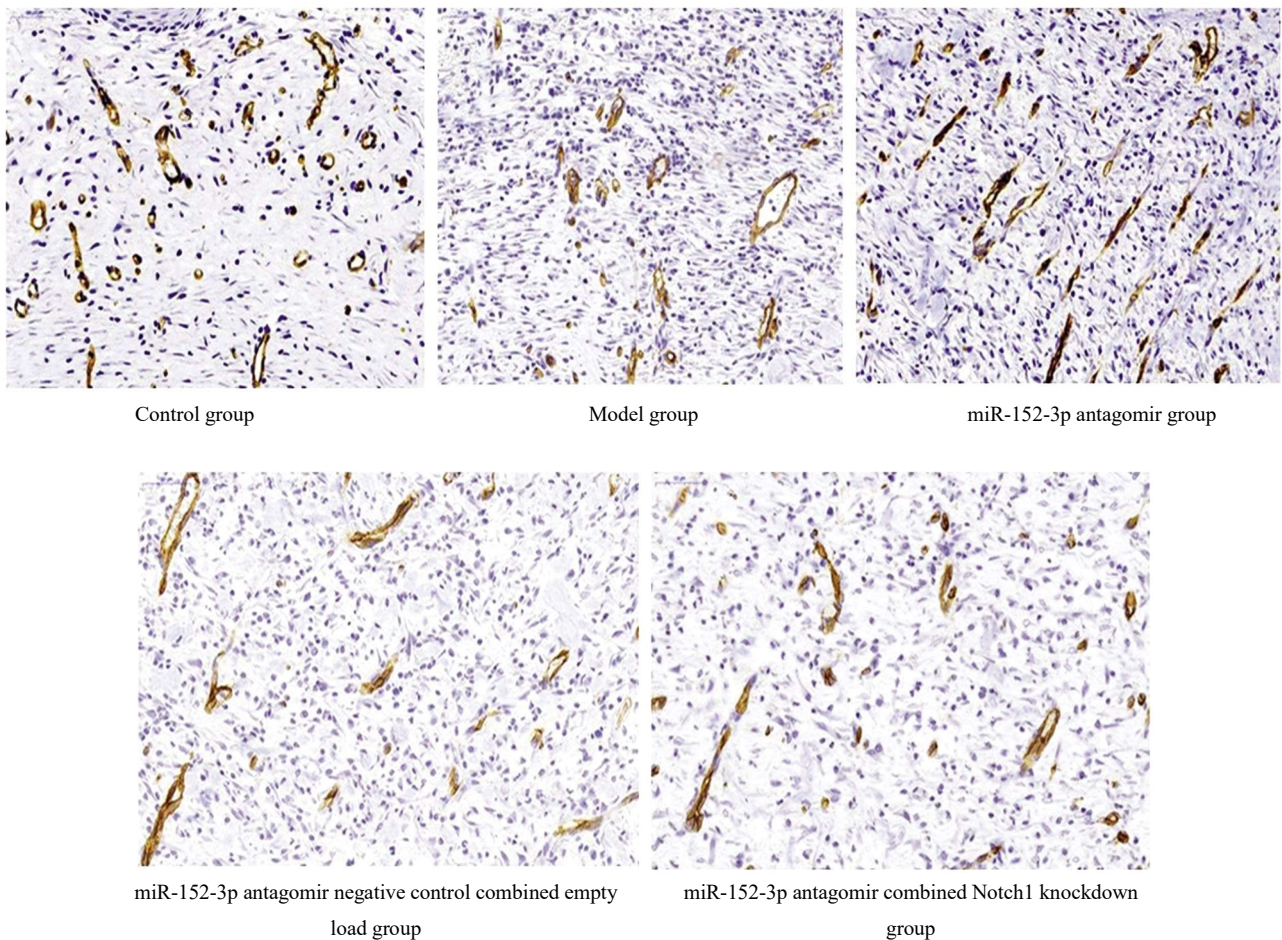
Groups	Wound healing rate(%)	MPD(PU)
Control group	-	1437.93 $\pm$ 251.46
Model group	29.14 $\pm$ 5.23	359.84 $\pm$ 78.52 ^a
miR-152-3p antagomir group	73.02 $\pm$ 12.63 ^b	1384.12 $\pm$ 176.30 ^b
miR-152-3p antagomir negative control combined empty load group	30.23 $\pm$ 6.74	364.25 $\pm$ 90.13
miR-152-3p antagomir combined Notch1 knockdown group	34.95 $\pm$ 5.92 ^c	391.76 $\pm$ 81.45 ^c
F	65.621	140.760
P	0.000	0.000

Note: compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the miR-152-3p antagomir group, ^c $P<0.05$.

2.3 各组家兔创面 MVD 的检测结果

与对照组相比,模型组家兔创面 MVD 明显降低 ($P<0.05$); 与模型组相比,miR-152-3p antagomir 组家兔创面 MVD 明显升高 ($P<0.05$),miR-152-3p antagomir 阴性对照 + 空载组家兔

创面 MVD 无明显差异 ($P>0.05$); 与 miR-152-3p antagomir 组相比,miR-152-3p antagomir+Notch1 敲低组家兔创面 MVD 明显降低 ($P<0.05$)。如图 1、表 4 所示。

图 1 免疫组织化学染色检测各组家兔创面 MVD($\times 200$)Fig.1 MVD of wounds of rabbits in each group detected by immunohistochemical staining($\times 200$)表 4 各组家兔创面 MVD($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 4 MVD in the wound of rabbits in each group($n=10, \bar{x} \pm s$)

Groups	MVD(n/mm^2)
Control group	53.45 $\pm$ 4.24
Model group	32.12 $\pm$ 2.13 ^a
miR-152-3p antagomir group	49.36 $\pm$ 4.32 ^b
miR-152-3p antagomir negative control combined empty load group	31.01 $\pm$ 2.76
miR-152-3p antagomir combined Notch1 knockdown group	35.94 $\pm$ 3.30 ^c
F	89.471
P	0.000

Note: compared with the control group, ^a $P < 0.05$. Compared with the model group, ^b $P < 0.05$. Compared with the miR-152-3p antagomir group, ^c $P < 0.05$.

2.4 各组家兔血清 VEGF 及 Ang1 水平的检测结果

与对照组相比,模型组家兔血清 VEGF 及 Ang1 水平明显降低($P < 0.05$);与模型组相比,miR-152-3p antagomir 组家兔血清 VEGF 及 Ang1 水平明显升高($P < 0.05$),miR-152-3p antagomir 阴性对照 + 空载组家兔血清 VEGF 及 Ang1 水平无明显差异($P > 0.05$);与 miR-152-3p antagomir 组相比,miR-152-3p antagomir+Notch1 敲低组家兔血清 VEGF 及 Ang1 水平明显降低($P < 0.05$)。如表 5 所示。

2.5 各组家兔创面组织 VEGF、Ang1 与 Notch1/DLL4 通路蛋白表达的检测结果

与对照组相比,模型组家兔创面组织 VEGF、Ang1 蛋白表达降低($P < 0.05$),Notch1、DLL4 蛋白表达升高($P < 0.05$)。与模型组相比,miR-152-3p antagomir 组家兔创面组织 VEGF、Ang1、Notch1、DLL4 蛋白表达升高($P < 0.05$);miR-152-3p antagomir 阴性对照 + 空载组家兔创面组织 VEGF、Ang1、Notch1、DLL4 蛋白表达无明显差异($P > 0.05$);与 miR-152-3p antagomir 组相比,miR-152-3p antagomir+Notch1 敲低组家兔创面组织 VEGF、Ang1、Notch1、DLL4 蛋白表达降低($P < 0.05$)。如图 2、表 6 所示。

表 5 各组家兔血清 VEGF 及 Ang1 水平($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 5 The levels of serum VEGF and Ang1 of rabbits in each group($n=10, \bar{x} \pm s$)

Groups	VEGF(pg/mL)	Ang1(ng/mL)
Control group	139.46 $\pm$ 15.76	879.35 $\pm$ 114.63
Model group	48.59 $\pm$ 9.13 ^a	124.86 $\pm$ 16.54 ^a
miR-152-3p antagomir group	128.24 $\pm$ 13.82 ^b	847.14 $\pm$ 120.36 ^b
miR-152-3p antagomir negative control combined empty load group	50.15 $\pm$ 11.42	119.75 $\pm$ 20.18
miR-152-3p antagomir combined Notch1 knockdown group	54.83 $\pm$ 12.19 ^c	137.92 $\pm$ 18.24 ^c
F	129.145	283.808
P	0.000	0.000

Note: compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the miR-152-3p antagomir group, ^c $P<0.05$.

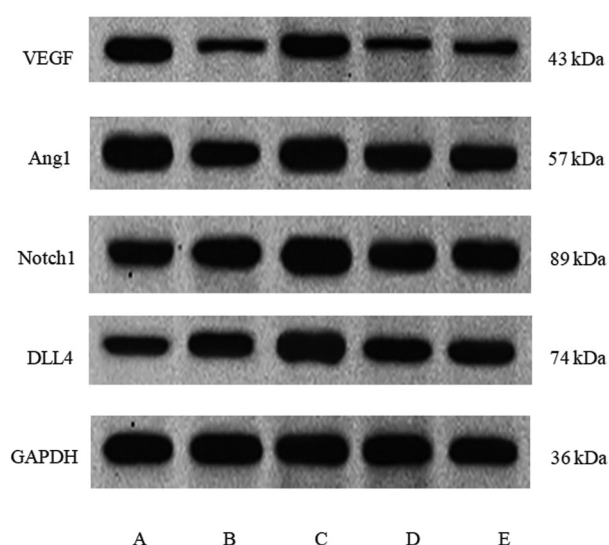


图 2 免疫印迹检测各组家兔创面组织 VEGF、Ang1 与 Notch1/DLL4 通路蛋白表达

Fig.2 The expressions of VEGF, Ang1 and Notch1/DLL4 pathway protein in wound tissues of rabbits in each group detected by Western blotting
Note A: control group. B: model group. C: miR-152-3p antagomir group. D: miR-152-3p antagomir negative control combined empty load group. E: miR-152-3p antagomir combined Notch1 knockdown group.

2.6 兔脐静脉内皮细胞中 miR-152-3p 对 Notch1 及 DLL4 的靶向调节

查询 starbase 数据库发现 miR-152-3p 和 Notch1、DLL4 之间均有结合位点,见图 3。与 Notch1 野生 +miR-152-3p mimics 阴性对照组比较,Notch1 野生 +miR-152-3p mimics 组相对荧光素酶活性降低($P<0.05$);与 DLL4 野生 +miR-152-3p mimics 阴性对照组比较,DLL4 野生 +miR-152-3p mimics 组相对荧光素酶活性降低($P<0.05$);Notch1 突变 +miR-152-3p mimics 阴性对照组与 Notch1 突变 +miR-152-3p mimics 组之间、DLL4 突变 +miR-152-3p mimics 阴性对照组与 DLL4 突变 +miR-152-3p mimics 组之间相对荧光素酶活性均无明显差异($P>0.05$)。见表 7、表 8。

3 讨论

深 II 度烧伤作为临床常见外伤,创面愈合过程与患者预后关系密切,创面愈合越慢,发生感染的风险越高,而血管生成是深 II 度烧伤创面修复与愈合的重要生理环节,探寻针对血管形成的相关治疗方案对深 II 度烧伤创面愈合及患者预后的提升具有重要价值^[19,20]。本研究采用盛满 98℃ 热水的直径 5 cm 铁筒置于家兔背部脱毛后的皮肤上 18s,建立深 II 度烧伤模型,

表 6 各组家兔创面组织 VEGF、Ang1 与 Notch1/DLL4 通路蛋白相对表达($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 6 Relative expressions of VEGF, Ang1 and Notch1/DLL4 pathway proteins in wound tissues of rabbits in each group($n=10, \bar{x} \pm s$)

Groups	VEGF/GAPDH	Ang1/GAPDH	Notch1/GAPDH	DLL4/GAPDH
Control group	0.79 $\pm$ 0.13	1.39 $\pm$ 0.24	0.69 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.06
Model group	0.16 $\pm$ 0.04 ^a	0.67 $\pm$ 0.08 ^a	0.94 $\pm$ 0.09 ^a	0.86 $\pm$ 0.10 ^a
miR-152-3p antagomir group	0.73 $\pm$ 0.15 ^b	1.32 $\pm$ 0.25 ^b	1.45 $\pm$ 0.16 ^b	1.37 $\pm$ 0.22 ^b
miR-152-3p antagomir negative control combined empty load group	0.17 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.09	0.93 $\pm$ 0.10	0.87 $\pm$ 0.13
miR-152-3p antagomir combined Notch1 knockdown group	0.23 $\pm$ 0.07 ^b	0.74 $\pm$ 0.11 ^b	0.98 $\pm$ 0.11 ^c	0.91 $\pm$ 0.14 ^c
F	103.079	44.768	63.320	43.817
P	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the miR-152-3p antagomir group, ^c $P<0.05$.

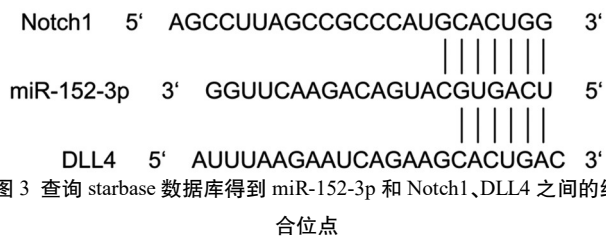


Fig.3 Binding sites between miR-152-3p and Notch1, DLL4 were obtained by querying Starbase database

结果显示,造模家兔烧伤创面 MPD 及 MVD、血清 VEGF 及 Ang1 水平、创面组织 VEGF 与 Ang1 蛋白表达降低,促血管新生因子 VEGF、Ang1 表达及血管密度明显降低,血液微循环受损,且病理检测发现创面组织真皮层细胞坏死,毛细血管扩张且管腔可见血液瘀滞,表明模型建立成功。

miR-152-3p 可通过调控血管内皮细胞存活、迁移和功能参与血管形成过程,抑制 miR-152-3p 可逆转缺氧诱导的人脐静脉内皮细胞活力下降和通透性增加,减轻血管内皮细胞功能障碍

表 7 检测 miR-152-3p 对 Notch1 靶向调节时各组兔脐静脉内皮细胞相对荧光素酶活性值($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 7 Relative luciferase activity values of rabbit umbilical vein endothelial cells in each group when miR-152-3p regulates Notch1 targeting($n=6, \bar{x} \pm s$)

Groups	Relative luciferase activity
Notch1 wild combined miR-152-3p mimics negative control group	1.02± 0.20
Notch1 wild combined miR-152-3p mimics group	0.32± 0.06 ^a
Notch1 mutation combined miR-152-3p mimics negative control group	1.01± 0.13
Notch1 mutation combined miR-152-3p mimics group	0.98± 0.15
F	56.398
P	0.000

Note: Compared with Notch1 wild combined miR-152-3p mimics negative control group, ^a $P<0.05$.

表 8 检测 miR-152-3p 对 DLL4 靶向调节时各组兔脐静脉内皮细胞相对荧光素酶活性值($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 8 Relative luciferase activity values of rabbit umbilical vein endothelial cells in each group when miR-152-3p regulates DLL4 targeting($n=6, \bar{x} \pm s$)

Groups	Relative luciferase activity
DLL4 wild combined miR-152-3p mimics negative control group	1.04± 0.22
DLL4 wild combined miR-152-3p mimics group	0.35± 0.04 ^a
DLL4 mutation combined miR-152-3p mimics negative control group	1.03± 0.17
DLL4 mutation combined miR-152-3p mimics group	0.97± 0.18
F	39.877
P	0.000

Note: compared with DLL4 wild combined miR-152-3p mimics negative control group, ^a $P<0.05$.

碍^[21],有研究显示,miR-152-3p 在糖尿病足溃疡样本中高表达,下调 miR-152-3p 表达可抑制成纤维细胞凋亡和炎症,修复人脐静脉内皮细胞功能,从而促进糖尿病足溃疡伤口愈合^[9,22],因此推测下调 miR-152-3p 可能促进深 II 度烧伤创面血管生成。本研究以 miR-152-3p antagomir 下调深 II 度烧伤模型家兔 miR-152-3p 表达,可升高创面愈合率、MPD 及 MVD、血清 VEGF 及 Ang1 水平、创面组织 VEGF 与 Ang1 蛋白表达,表明敲低 miR-152-3p 可提升促血管新生因子 VEGF、Ang1 表达,增加微血管密度,改善血液微循环,促进血管新生及烧伤创面愈合。

Notch 是介导细胞增殖、分化、运动、代谢等生理活动的重要信号,对于初级血管网络的形成和新生血管的成熟至关重要,可与其配体 DLL4 结合调控血管新生过程,进而参与伤口愈合过程^[23-25],上调 Notch1 表达,可显著减轻高糖诱导的人脐静脉内皮细胞功能障碍,增强其增殖、迁移和血管生成能力,进而促进伤口愈合^[26-28],还可促进表皮干细胞增殖,加速糖尿病大鼠皮肤创伤的伤口愈合并改善其愈合质量^[29,30],本研究结果显示,深 II 度烧伤模型家兔创面组织 Notch1、DLL4 mRNA 及蛋

白表达相比对照组升高,以 miR-152-3p antagomir 下调 miR-152-3p 表达,可进一步升高两者表达水平,表明 Notch1/DLL4 参与介导敲低 miR-152-3p 对促进深 II 度烧伤家兔血管新生及烧伤创面愈合的过程,家兔烧伤后,体内 Notch1/DLL4 会有一定程度上代偿性的激活,但并不足以对血管新生产生促进作用,另外以 miR-152-3p antagomir 和 Notch1 siRNA 质粒联合处理深 II 度烧伤家兔,相比 miR-152-3p antagomir 单独处理,可降低创面愈合率、MPD 及 MVD、血清 VEGF 及 Ang1 水平、创面组织 Notch1、DLL4 mRNA 及蛋白表达、创面组织 VEGF 与 Ang1 蛋白表达,表明敲低 Notch1 可减弱下调 miR-152-3p 对促血管新生因子 VEGF、Ang1 表达的增强作用,拮抗其对微血管血液微循环的改善作用,最终逆转其对烧伤创面血管新生及愈合的促进功能,且双荧光素酶报告基因实验结果显示 miR-152-3p 可靶向下调兔脐静脉内皮细胞中 Notch1 及 DLL4 的表达,揭示 miR-152-3p 可通过靶向调控 Notch1 及 DLL4 的表达介导血管新生过程,抑制 miR-152-3p 表达可通过激活 Notch1/DLL4 信号促进烧伤后创面血管新生

及愈合。

综上所述,miR-152-3p 可靶向下调 Notch1 及 DLL4 的表达,对 Notch1/DLL4 激活具有明显抑制作用,下调 miR-152-3p 可通过促使 Notch1/DLL4 信号传导促进深 II 度烧伤后创面血管生成,改善微血管血液微循环,加快创面愈合。

参考文献(References)

- [1] Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, et al. Burn injury [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 11
- [2] Zanganeh M, Keshavarzi A, Dahmardehei M, et al. Skin Grafting Compared with Conservative Treatment in Patients with Deep Second-Degree Burn Wounds of the Trunk and Buttocks [J]. World J Plast Surg, 2022, 11(1): 81-85
- [3] Kim EH, Lee SH. Efficacy of Cultured Allogenic Keratinocytes in Treatment of Deep Second-Degree Burn [J]. J Burn Care Res, 2021, 42(3): 533-537
- [4] 何放,徐达圆,罗鹏飞,等. 新型抗菌凝胶敷料治疗深 II 度烧伤创面的疗效评价[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(21): 4051-4054
- [5] 李晓光,方勇. 创面愈合过程中血管新生的机制和过程 [J]. 中华整形外科杂志, 2010, 26(6): 477-480
- [6] 肖长栓,刘娅平,孙奎,等. 复方黄柏液涂剂对深 II 度烧伤创面愈合过程中血管化的影响研究[J]. 中国美容医学, 2022, 31(2): 1-5
- [7] Marques JHM, Mota AL, Oliveira JG, et al. Melatonin restrains angiogenic factors in triple-negative breast cancer by targeting miR-152-3p: In vivo and in vitro studies [J]. Life Sci, 2018, 208: 131-138
- [8] 徐进,杨波. miR-152-3p 对血管平滑肌细胞的作用及其机制研究 [J]. 川北医学院学报, 2020, 35(4): 583-587, 615
- [9] Xu Y, Yu T, He L, et al. Inhibition of miRNA-152-3p enhances diabetic wound repair via upregulation of PTEN [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(14): 14978-14989
- [10] 李松莲,范洪桥,刘丽芳,等. 抑制 Notch 信号通路减少增生性瘢痕的血管生成[J]. 中南大学学报(医学版), 2021, 46(11): 1195-1202
- [11] 王美玲,刘华绪. HIF-VEGF-Notch 信号通路在血管生成中的作用 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2021, 37(5): 332-336
- [12] Yuan C, Wu C, Xue R, et al. Suppression of human colon tumor by EERAC through regulating Notch/DLL4/Hes pathway in inhibiting angiogenesis in vivo[J]. J Cancer, 2021, 12(19): 5914-5922
- [13] Fang Z, Wu G, Zhang D, et al. Genistein Protects Against Burn-Induced Myocardial Injury via Notch1-Mediated Suppression of Oxidative/Nitrative Stress[J]. Shock, 2020, 54(3): 337-346
- [14] 施彦,舒斌,杨荣华,等. Wnt 和 Notch 信号通路在大鼠创面愈合模型中的表达作用[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2014, 9(2): 151-157
- [15] Marchetti M, Meloni M, Anwar M, et al. MicroRNA-24-3p Targets Notch and Other Vascular Morphogens to Regulate Post-ischemic Microvascular Responses in Limb Muscles[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1733
- [16] 熊家青,刘丽芳,李逵,等. Notch 信号通路对兔深 II 度烧伤创面血管相关因子的表达[J]. 中南大学学报(医学版), 2018, 43(3): 246-252
- [17] Wang B, Pan D, Ban Y, et al. The relationship between pro static microvessel density and different concentrations of oestrogen/androgen in Sprague-Dawley rats[J]. Eur J Med Res, 2022, 27(1): 87
- [18] 鞠玲燕,王磊,王涛,等. 巨脾大部切除后残脾微血管密度和 CD34、VEGF、VEGFR-2 表达的临床研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2016, 19(2): 95-99
- [19] Wu Z, Zhu M, Mou XX, et al. Overexpressing of caveolin-1 in mesenchymal stem cells promotes deep second-degree burn wound healing[J]. J Biosci Bioeng, 2021, 131(4): 341-347
- [20] Zeng Q, Cai X, Cao Y, et al. Preparation, characterization, and pharmacodynamic study on deep second degree burns of total flavonoids composite phospholipids liposome gel of Oxytropis falcata Bunge[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2020, 46(12): 2000-2009
- [21] Zhao Z, Wu C, He X, et al. miR-152-3p aggravates vascular endothelial cell dysfunction by targeting DEAD-box helicase 6 (DDX6) under hypoxia[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4899-4910
- [22] Li B, Luan S, Chen J, et al. The MSC-Derived Exosomal lncRNA H19 Promotes Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers by Upregulating PTEN via MicroRNA-152-3p [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19(Suppl 1): 814-826
- [23] 陈凤娇,丁洁,周浩. Notch 与相关调控信号的相互作用在伤口愈合中的调控 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(6): 733-742
- [24] Li GX, Zhang S, Liu R, et al. Tetraspanin18 regulates angiogenesis through VEGFR2 and Notch pathways [J]. Biol Open, 2021, 10(2): bio050096
- [25] Pitulescu ME, Schmidt I, Giaimo BD, et al. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation[J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(8): 915-927
- [26] Qiu TY, Huang J, Wang LP, et al. Inhibition of miR-200b Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells by Activating The Notch Pathway [J]. Cell J, 2021, 23(1): 51-60
- [27] Zheng X, Narayanan S, Sunkari VG, et al. Triggering of a Dll4-Notch1 loop impairs wound healing in diabetes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(14): 6985-6994
- [28] 石紫云,李艳川,刘飞飞,等. Notch1 信号通路激活在低氧诱导人脐静脉内皮细胞血管形成中的作用[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2020, 10(03): 163-171
- [29] Liu J, Shu B, Zhou Z, et al. Involvement of miRNA203 in the proliferation of epidermal stem cells during the process of DM chronic wound healing through Wnt signal pathways [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 348
- [30] 李博文,金珏安,徐磊,等. 生肌象皮膏对糖尿病足溃疡大鼠创面愈合及 Notch 信号通路的影响 [J]. 中国药师, 2019, 22(9): 1634-1638