



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R758.41

U D C 616.5

密 级 公开

博士学位论文

miR-25 表达水平与白癜风发病关系
及分子调控机制研究

石琼

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 皮肤病与性病学

研 究 方 向 白癜风发病机制

指 导 教 师 李春英教授(主任医师)

培 养 单 位 第四军医大学西京皮肤医院

二〇一七年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，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，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。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了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____ 日期：_____

保护知识产权明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____ 导师签名：_____ 日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	4
ABSTRACT	8
前 言	13
文献回顾	14
正 文	26
第一部分 白癜风患者血清及皮损特异性 miRNAs 表达谱的筛选及验证	26
1 材料	26
2 方法	28
3 结果	36
4 讨论	39
第二部分 miR-25 调控黑素细胞活性及参与白癜风发病的机制研究	42
1 材料	42
2 方法	46
3 结果	60
4 讨论	71
第三部分 miR-25 在白癜风皮损中表达上调的机制研究	76
1 材料	76
2 方法	76
3 结果	82
4 讨论	87
小 结	89
参考文献	91
附 录	105
个人简历和研究成果	108
致 谢	112

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
APE1	apurinic/aprimidinic endonuclease	脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶
BAX	B cell lymphoma 2-associated X protein	Bcl-2 相关 X 蛋白
BCL2	B cell lymphoma 2	B 细胞淋巴瘤因子 2
bFGF	basic fibroblast growth factor	碱性成纤维细胞生长因子
Caspase	CysteinyI aspartate specific proteinase	半胱氨酸蛋白酶
CAT	Catalase	过氧化氢酶
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	细胞毒性 T 淋巴细胞
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DNMTs	DNA methyltransferases	DNA 甲基转移酶
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺甲乙酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
ET-1	endothelin-1	内皮素-1
FISH	fluorescence in situ hybridization	荧光原位杂交
GPX1	glutathione peroxidase 1	谷胱甘肽过氧化物酶 1
GWASs	Genome wide association studies	全基因组关联分析
h	Hour	小时

H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
HO-1	Heme oxygenase-1	血红素氧合酶-1
JNK	c-Jun amino terminal kinase	c-Jun 氨基末端激酶
KC	Keratinocyte	角质形成细胞
KD	Kilodalton	千道尔顿
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1	Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1
MAPK	Mitogen activated protein kinases	丝裂原活化蛋白激酶
MC	Melanocyte	黑素细胞
mg	Microgram	微克
min	Minute	分钟
miRNAs	microRNAs	微小 RNA
MITF	microphthalmia-associated transcription factor	小眼畸形转录因子
ml	Milliliter	毫升
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
NADPH	Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
ng	Nanogram	纳克
nM	Nanomole	纳摩尔
nm	Nanometer	纳米
Nrf2	Nuclear factor-E2-related factor 2	核因子 E2 相关转录因子 2
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	外周血单个核细胞
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液

PI	Propidium iodide	碘化丙啶
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
RNase	Ribonuclease	核糖核酸酶
ROS	Reactive oxygen species	活性氧簇
s	Second	秒
SCF	stem cell factor	干细胞因子
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TYR	Tyrosinase	酪氨酸酶
TYRP1	Tyrosinase-related protein 1	酪氨酸相关蛋白 1
TYRP2	Tyrosinase-related protein 2	酪氨酸相关蛋白 2
V	Volt	伏特
3' UTR	three prime untranslated region	3'-非翻译区
5-aza-dC	5-aza-2' -deoxycytidine	5-氮杂脱氧胞苷
α -MSH	α -melanocyte-stimulating hormone	α -黑素细胞刺激素

miR-25 表达水平与白癜风发病关系 及分子调控机制研究

博士研究生：石 琼

导 师：李春英 教授

第四军医大学西京医院皮肤科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（No.81172749）

中文摘要

背景：

白癜风是一种常见并且严重危害患者身心健康的顽固皮肤病，病因和发病机理不明，其主要病理特征是皮损部位黑素细胞的消失。近年来大量研究证据提示氧化应激在白癜风黑素细胞凋亡及功能损伤中扮演重要角色，然而其具体机制尚不明确。

miRNA 是一类非编码单链小 RNA 分子，在转录后水平对基因表达及多种生理过程进行精确调控，在皮肤正常结构的维持，黑素细胞发育、存活及功能发挥方面具有关键调控作用。近年研究显示，miRNA 可通过调节细胞抗氧化基因以及 ROS 生成关键酶的表达，发挥抗氧化应激和促氧化反应的双向调节功能，参与细胞氧化还原平衡的调控，而氧化应激也可从多个层面影响 miRNA 的生物合成，从而形成重要的调控网络，维持细胞稳态。已有研究证实，miRNA 分子参与心力衰竭、心肌病、神经退行性疾病等多种氧化应激相关性疾病的发生发展。

基于上述研究证据，我们提出如下假说：白癜风患者血清及皮损处 miRNAs 表达呈现疾病特征性，异常表达的 miRNAs 通过调控黑素细胞关键功能分子参与介导氧化应激导致的黑素细胞凋亡及功能损伤。

目的:

1. 筛选白癜风患者疾病特征性血清 miRNAs 表达谱,探讨 miR-25 和其它显著上调 miRNAs 与白癜风发生危险性的关系,明确其作为白癜风血清 miRNAs 疾病标志物的可行性;

2. 在组织水平检测并确认 miR-25 在正常人群和白癜风患者皮损中的表达情况,探讨白癜风患者皮损中异常高表达的 miR-25 调控黑素细胞增殖、凋亡、合成转运黑素功能及调控角质形成细胞合成、分泌细胞因子,参与白癜风发病的具体分子机制。

3. 深入研究 miR-25 在白癜风患者皮损处异常升高的原因及调控分子机制,为进一步寻找白癜风潜在治疗靶点提供科学依据。

方法:

1. 选取 50 例白癜风患者混合血清样本及 50 例正常健康对照的混合血清样本,采用 miRNA 检测芯片检测 miRNA 表达差异。

2. qRT-PCR 方法在独立样本(80 例白癜风患者和 80 例正常对照)中对芯片结果中白癜风患者血清异常高表达的前五位 miRNAs 进行表达差异验证。

3. qRT-PCR 方法在独立样本(40 例白癜风进展期患者和 40 例白癜风稳定期患者)检测血清中 miR-25, let-7b, miR-16, miR-451 及 miR-15b 表达水平与疾病活动性的相关性。

4. qRT-PCR 方法检测白癜风患者白斑及正常对照皮肤中 miR-25 表达情况;原位杂交方法检测 miR-25 在白癜风患者白斑组织、白斑旁组织及正常对照皮肤组织中的表达、分布情况。

5. 观察异常高表达 miR-25 对黑素细胞增殖、凋亡及细胞功能的影响:构建瞬时转染正义和反义表达 miR-25 黑素细胞模型,流式细胞术检测细胞凋亡,EdU 染色实验检测细胞增殖水平,检测黑素合成代谢水平及黑素细胞黑素小体转运等细胞功能变化。

6. 生物信息学方法(预测 miRNA 靶基因网站 miRanda, PICTAR5 及 Targetscan)预测 miR-25 调控黑素细胞凋亡、增殖及细胞功能的潜在关键靶基因,双荧光素酶报告基因实验证实 miR-25 对预测靶基因转录后调控关系的存在。

7. MITF 质粒回复实验及 APE1 质粒回复实验明确高表达 miR-25 通过靶向抑制 MITF 基因及其下游 APE1 分子,导致黑素细胞在氧化应激条件下细胞凋亡水平升高

的具体分子机制；MITF 回复实验明确 miR-25 通过靶向抑制 MITF 基因，调控细胞增殖及黑素细胞黑素合成及转运功能的具体分子机制。

8. 构建过表达及抑制表达 miR-25 角质形成细胞模型，检测角质形成细胞旁分泌细胞因子及趋化因子的蛋白合成及分泌情况，生物信息学方法（预测 miRNA 靶基因网站 miRanda, PICTAR5 及 Targetscan）预测 miR-25 对上述细胞因子及趋化因子的表达是否存调控作用，双荧光素酶报告基因实验明确角质形成细胞中异常高表达的 miR-25 调控细胞因子的蛋白表达的具体机制。

9. 检测过氧化氢或去甲基剂处理后黑素细胞及角质形成细胞中 miR-25 的表达情况，对比过氧化氢处理后 miR-25 启动子区 CpG 岛的甲基化水平，检测白癜风患者白斑组织、白斑旁组织及正常对照皮肤组织中甲基转移酶的表达情况，检测过氧化氢处理黑素细胞及角质形成细胞后 JNK 的磷酸化水平的变化。

结果：

1. 白癜风患者血清 miRNAs 表达谱具有疾病特异性，其中包含 let-7b 在内的 24 个 miRNAs 表达显著升高（升高大于两倍），miR-1914 等 24 个 miRNAs 表达显著降低（降低大于两倍）。qRT-PCR 结果进一步验证了 let-7b, miR-16, miR-451, miR-25 及 miR-15b 等 5 个 miRNAs 在白癜风患者血清中显著升高。miR-25 的表达在活动期的患者血清中显著升高。

2. qRT-PCR 结果显示白癜风患者皮损处 miR-25 显著升高。原位杂交的结果显示患者白斑处角质形成细胞中 miR-25 显著升高（高氧化应激水平，白斑处黑素细胞缺失，其 miR-25 表达情况难以观察）；白斑旁（高氧化应激水平）黑素细胞及角质形成细胞 miR-25 均呈现高表达；在正常皮肤中，可见到黑素细胞中 miR-25 的弱阳性表达。

3. 过表达 miR-25 在氧化应激条件下（H₂O₂ 处理），促进黑素细胞凋亡，抑制黑素细胞 BCL2 蛋白表达水平，BAX、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 的表达上调，低表达 miR-25 作用相反；过表达 miR-25 抑制黑素细胞增殖水平、黑素合成及转运，低表达 miR-25 作用相反。

4. miR-25 通过与 MITF 3'UTR 区不完全互补序列进行结合，负向调控 MITF 的表达。MITF 表达质粒回复及 APE1 表达质粒回复实验证实过表达 miR-25 通过对 MITF 的表达调控进而抑制黑素细胞增殖及黑素小体的合成和转运；过表达 miR-25

通过对 MITF 的表达调控促进氧化应激条件下黑素细胞的凋亡，其具体机制可能是通过抑制 MITF 下游基因 APE1 进而抑制黑素细胞抗氧化能力，促进细胞凋亡。

7. 在角质形成细胞中 miR-25 靶向抑制角质形成细胞中 SCF 及 bFGF 的蛋白表达，弱化角质形成细胞对黑素细胞的保护作用。

8. 过氧化氢及去甲基剂均可上调黑素细胞和角质形成细胞中 miR-25 的表达；过氧化氢的处理可显著降低 miR-25 启动子区 CpG 岛甲基化水平；DNMT1 及 DNMT3b 在白癜风患者白斑组织、白斑旁组织中均显著降低；过氧化氢处理后，黑素细胞及角质形成细胞中 DNMT1 及 DNMT3b 表达降低，JNK 磷酸化水平升高，给予黑素细胞及角质形成细胞 JNK 抑制剂处理，可逆转过氧化氢对 miR-25 表达水平的调控。

结论：

本研究首次明确白癜风患者血清 miRNAs 表达谱具有疾病特征性，miR-25 的表达与疾病的活动性相关，可作为白癜风潜在分子标志物。体外实验证实高表达 miR-25 通过对靶基因 MITF 基因转录后抑制性调控，促进黑素细胞发生凋亡、增殖抑制和功能障碍，此外，miR-25 抑制角质形成细胞中细胞因子 SCF 及 bFGF 表达和分泌，弱化角质形成细胞对黑素细胞的旁分泌保护作用，参与白癜风的疾病进展。最后，我们发现氧化应激通过调控启动子区 DNA 甲基化水平上调 miR-25 的表达水平的具体分子机制，从而较为系统地阐明血清及组织 miRNA 潜在标志物 miR-25 等在白癜风疾病模型中的特异性表达及其参与白癜风发生发展的分子机制。

关键词：白癜风；氧化应激；黑素细胞；微小 RNA；小眼畸形相关性转录因子

Oxidative stress-induced overexpression of miR-25: the mechanism underlying the degeneration of melanocytes in vitiligo

Candidate for Ph.D.: Shi Qiong

Supervisor: Li Chunying

Department of Dermatology, Xijing hospital, Fourth Military Medical University,
Xi'an, 710032, China

Sponsored Programs: National Natural Science Foundation of China (No. 81172749)

Abstract

Background:

Vitiligo is a common disfiguring skin disease, with an incidence rate of approximately 0.1% to 2% in the populations worldwide. Characterized by patchy depigmentation of the skin, the disease can affect the patients' self-image, thus substantially decreasing the quality of life among vitiligo patients. The generation of oxidative stress has long been demonstrated to play a crucial role in the onset and progression of vitiligo. However, the specific molecular mechanism involved in oxidative stress-induced melanocyte death in vitiligo is not fully clarified, which impedes the discovery of novel drug target for the antioxidant therapy in vitiligo.

MicroRNAs (miRNAs) are a class of noncoding RNAs that suppress gene expression by targeting messenger RNAs for translational repression or, less frequently, degradation. It is known that miRNAs can regulate the growth, differentiation and even death of cells, and the aberrant expression of miRNAs has been found to be involved in the pathogenesis of many diseases. Recently, several studies have found that the expression profile of miRNAs could be regulated by oxidative stress and mediate the pathogenic effect of ROS

in some diseases and animal models, which deepens the understanding of redox biology and implicates new therapeutic strategies for oxidative stress-related diseases. Given this crosstalk between redox signaling and miRNAs, we hypothesized that enhanced oxidative stress in vitiligo could induce the aberrant expression of miRNAs, which promotes the degeneration of melanocytes.

Aims:

1. To identify alterations in the miRNAome of vitiligo patients' serum.
2. To explore the correlation between the expression of microRNAs up-regulated in the serum samples of vitiligo patients and disease activity.
3. To fully clarify the location of increased miR-25 in vitiligo lesion.
4. To investigate whether increased miR-25 is responsible for melanocyte loss and dysfunction in vitiligo and detail mechanism.
5. To investigate the possible involvement of keratinocytes overexpressing miR-25 in vitiligo pathogenesis.
6. To explore the underlying mechanism for the aberrant expression of miR-25 in melanocytes and keratinocytes of vitiligo lesions.

Methods:

1. We performed a miRNA microarray study using serum samples from vitiligo patients (n= 50) and healthy controls (n=50) and then examined the five highest increased miRNAs (let-7b, miR-16, miR-451, miR-25 and miR-15b) in serum samples from vitiligo patients (n = 80) and healthy controls (n = 80) using qRT-PCR. We further examined the five highest increased miRNAs (let-7b, miR-16, miR-451, miR-25, and miR-15b) in serum samples from active vitiligo patients (n = 40) and stable vitiligo patients (n = 40) using qRT-PCR.
2. We collected lesional and perilesional skin from vitiligo patients as well as normal skin from healthy individuals, and detect miR-25 by qRT-PCR and fluorescence in situ hybridization.
3. To test whether overexpressed miR-25 contributed to melanocytes apoptotic, proliferation and cell dysfunction, normal human melanocytes were transfected with

miR-25 mimics, miR-25 inhibitor, and negative control respectively. Then we treated those cells with H₂O₂ (a main form of oxidative stress in vitiligo) and tested apoptosis level again and performed western blot to evaluate expression of anti-apoptotic protein, such as B-cell lymphoma 2 (BCL2) and pro-apoptotic proteins, including B-cell lymphoma 2-associated X protein (BAX), the active cleavages of caspase-3 and caspase-9. We also analyzed cell proliferation, melanin synthesis, the activity of tyrosinase, protein expression of crucial genes in melanin biosynthesis, such as TYR, tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) and tyrosinase-related protein 2 (TYRP2) and distribution of melanosomes of normal human melanocytes transfected with miR-25 mimics, miR-25 inhibitor, and negative control.

4. Three common bioinformatics tools including miRanda, PICTAR5 and Targetscan were used to screen the potential targets of miR-25 that may account for its regulatory function in melanocytes. Luciferase reporter assays were performed to verify whether miR-25 repressed the expression of MITF by targeting the predicted sequences in the 3' untranslated regions (3'UTR) of MITF mRNA. Melanocytes overexpressing miR-25 were co-transfected with 3'UTR-deleted MITF plasmids or control plasmids, and flow cytometry was used to evaluate the apoptosis rate of cells following H₂O₂ treatment.

5. Normal human keratinocytes were transfected with miR-25 mimics and expression and the secretion level of some cytokines and growth factors that have been reported to relate with the development of vitiligo were tested. Luciferase reporter assays were performed to verify whether miR-25 represses the expression of SCF and bFGF by targeting the predicted sequences involved in their 3'UTR.

6. To investigate whether H₂O₂ demethylated the promoter region of miR-25, genomic DNA was extracted from melanocytes and keratinocytes with or without H₂O₂ treatment and subjected to bisulfite sequencing analysis.

Results:

1. Compared to controls, there were 24 miRNAs (e.g., let-7b) were up-regulated, while another 24 (e.g., miR-1914) were down-regulated. Let-7b, miR-16, miR-451, miR-25 and miR-15b are significantly up-regulated in vitiligo serum. Beside, miR-25

showed the higher level in the serum samples from patients in the active stage.

Furthermore, miR-25 was significantly elevated in vitiligo lesion.

2. Overexpression of miR-25 increased the level of apoptosis of normal human melanocytes treated with H₂O₂, reduced the level of BCL2 but up-regulated some pro-apoptotic proteins while anti-miR-25 treatment presented with absolutely the opposite effect. Percentage of cells that undergo cell division was reduced ($P < 0.01$) in the cells overexpressing miR-25.

3. Overexpressed miR-25 inhibited the activity of TYR and significantly decreased the melanin content. The expression of TYR, TYRP1, and TYRP2 were reduced in melanocytes transfected with miR-25 mimics. In cells transfected with miR-25 mimics, we observed a perinuclear aggregation of melanosomes.

4. MITF was selected out as the target of miR-25 for its key role in melanocyte survival and function by bioinformatics prediction and luciferase reporter assays. The re-introduction of MITF significantly decreased the percentage of apoptotic cells and did invert the down-regulation of BCL2 and the up-regulation of Bax, cleaved caspase 3 and caspase 9. The mRNA level of two antioxidant genes downstream of NRF2, HO-1 and GPX1 were suppressed by miR-25 in melanocytes with or without the stimulation of H₂O₂.

5. Re-introduction of MITF promoted the proliferation of melanocytes transfected with miR-25 mimics, successfully up-regulated the activity of tyrosinase and the melanin content in melanocytes, and facilitated the relocation of melanosomes in the periphery of cells.

6. MiR-25 inhibits the production and secretion of growth factors (SCF and bFGF) in keratinocytes.

7. Oxidative stress induces the overexpression of miR-25 in melanocytes and keratinocytes by promoting DNA demethylation.

Conclusion:

Our experiments show that miR-25 was increased in serum and lesion samples from vitiligo patients, and its serum level was correlated with disease activity. Further

experiments showed that miR-25 facilitated H₂O₂-induced apoptosis by impairing the antioxidant response in melanocytes and led to the dysfunction of melanocytes due to its suppression on MITF. Noteworthily, miR-25 could inhibit the production and secretion of SCF and bFGF from keratinocytes and impaired their paracrine protective effect on the survival of melanocytes under oxidative stress. At last, we verified that oxidative stress induced the generation of miR-25 in both melanocytes and keratinocytes possibly by demethylating the promoter region of miR-25. Our findings indicate that oxidative stress-induced overexpression of miR-25 plays a crucial role in mediating the degeneration of melanocytes in vitiligo.

Key words: Vitiligo; Oxidative stress; Melanocyte; microRNAs; MITF

前 言

白癜风是一种常见并且严重危害患者身心健康的顽固皮肤病，主要病理特征是皮损部位黑素细胞的消失。白癜风的发病率约为 0.1-2%，无明显种族、性别差异，近年其发病呈现逐渐上升的趋势。目前我国患病人数估计逾 1000 万。由于白癜风可造成“毁容”后果，给患者带来严重的心理问题，造成了沉重的家庭和社会负担。本病的治疗相对困难，疗程长、收效慢、治愈率低。近年来，大量研究表明高氧化应激状态是导致白癜风患者皮肤组织中黑素细胞受到氧化损伤而发生凋亡的重要原因，其机制尚未完全阐明。

miRNA 是一类重要的小 RNA 分子，在进化上具有高度的保守性，在转录后水平对基因进行表达精细调控。生理状态下，其表达谱和表达水平具有较强的组织特异性和时相性；miRNA 表达谱和表达水平发生变化，破坏对靶基因原有的调控强度是其参与多种病理过程的可能机制。近年研究显示，miRNA 在皮肤正常结构的维持，黑素细胞发育、存活及功能方面具有关键调控作用，并可通过调控抗氧化基因以及细胞生成 ROS 的关键酶的表达，双向调节细胞氧化还原平衡，另一方面氧化应激也可从多个水平影响 miRNA 的生物合成，进而形成重要的调控网络，维持细胞稳态。已有研究证实，miRNA 分子参与心力衰竭、心肌病、神经退行性疾病等多种氧化应激相关性疾病的发生发展，上述研究证据强烈提示 miRNA 可能参与白癜风疾病中黑素细胞的氧化损伤过程。

本研究在筛选及验证白癜风疾病特异性 miRNAs 表达谱的基础上，分析 miR-25 与白癜风疾病活动性的相关性，探索其作为疾病标志物的可行性，为准确判断疾病的进展及治疗的个体化提供重要参考。重点研究 miR-25 在白癜风患者皮损区的表达及分布变化，探索其对白癜风黑素细胞凋亡、增殖及功能及角质形成细胞细胞因子分泌具体调控分子机制，并阐释白癜风患者皮损区 miR-25 升高的原因及具体机制，从功能学角度进一步验证流行病学研究结果，为阐明白癜风的发病机制提供理论依据，对于白癜风开展有效和目标明确的个体预防、个体治疗等方面均具有重要的理论意义和现实意义。

文献回顾

1. 白癜风概述

白癜风是一种获得性、慢性皮肤疾病，其临床特征为黑素细胞选择性破坏所导致的局限性皮肤黏膜色素脱失斑。白癜风影响患者外观形象，引起严重的心理障碍，如自我评估下降、社交恐惧、焦虑和抑郁等。此外，白癜风常合并多种自身免疫性疾病，危害患者身心健康和生活质量，造成了沉重的家庭和社会负担。深入研究白癜风发病机制，研发新型疾病分子标志物对临床实践具有重要的指导意义。

1.1 流行病学特征

文献报道的白癜风的全球发病率约为 0.1-2%[1]。对 88 个流行病学人群研究结果进行 meta 分析发现，白癜风的患病率约为 0.2%[2]。地区性的流行病学调查研究结果显示，印度的发病率约为 8.8%，墨西哥和日本的发病率分别为 2.6-4%及 1.68%，丹麦博恩霍尔姆岛地区约为 0.38%[3-5]。2004 年流调结果显示陕西地区白癜风患病率约为 0.09%[6]。白癜风患病率无明显种族、性别差异，近年其发病呈现逐渐上升及年轻化的趋势，约有一半的白癜风患者在 20 岁之前发病。其中，节段型白癜风约占总发病率的 5-16%，小于 10 岁的患者占 41.3% [7]。在非节段型白癜风患者中，70-80%的患者在 30 岁之前发病[8]；儿童（<12 岁）的发病率约为 32-37%[9-11]。

1.2 发病机制概述

1.2.1 遗传

家族聚集性和连锁不平衡的研究提示遗传因素在白癜风发病因素中的重要作用。流行病学研究结果提示白癜风患者具有家族聚集现象[12-15]，且具有家族遗传背景的患者发病年龄明显早于无家族史的患者[16]。然而同卵双生子的患病率仅为 23%左右[17]，由此可知白癜风的遗传方式并不严格符合孟德尔遗传规律，此外，患病率随着其亲属亲缘关系递减而降低也提示该疾病符合多基因遗传模式。近年来国内外多个候选基因关联性研究、全基因组关联分析研究（GWAS）进一步证实白癜风是多基因多因素遗传疾病，其易感基因涉及黑素的生物合成、细胞抗氧化系统、

自身免疫调节等多个生物学过程。

1.2.2 自身免疫

研究证实，白癜风患者常伴发自身免疫性疾病，如甲状腺疾病、恶性贫血、Addison 病、系统性红斑狼疮等[18-25]，由此提示自身免疫在白癜风的发生中扮演重要的角色。目前已有较多研究对体液免疫以及细胞免疫在白癜风发病机制中所发挥的作用进行了阐释。首先，胞膜抗原、酪氨酸酶抗原、酪氨酸相关蛋白、SOX 蛋白、糖蛋白-100 (gp-100) 及人黑素浓集素受体-1 (MCHR1) 等多种抗黑素细胞自身抗体的被发现，且白癜风患者血清中的抗黑素细胞抗体滴度与疾病的活动性和白斑面积密切相关[26]。其次，在细胞免疫方面的研究发现，患者皮损局部及循环系统中均存在黑素细胞特异的细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)，体外实验及小鼠模型均证实这些 CTL 可特异性杀伤黑素细胞[27-29]。此外，多种细胞因子在白癜风患者外周血及皮损处的表达水平出现显著异常，其中部分细胞因子的释放已被证实与疾病的严重程度相关[30-32]。

1.2.3 氧化应激

对白癜风黑素细胞破坏的始动因素的研究让氧化应激的作用逐渐受到研究者的重视。皮肤长期暴露于紫外线、环境污染物、电磁辐射、微生物病原体及药物等复杂的物理、化学及生物污染源中，承受较强的外源性 ROS 刺激[33, 34]。另外，线粒体能量转化以及细胞代谢等可产生内源性 ROS，加剧皮肤的氧化压力[35, 36]。皮肤组织可通过自身完整的抗氧化系统，包括抗氧化信号通路 (Nrf2-ARE 等) 及抗氧化分子 (维生素 A、维生素 C、维生素 E、硫辛酸、GSH、SOD、GPx、GSTs、CAT 等)，通过清除外源性氧自由基，发挥机体屏障作用，维持皮肤细胞稳态[37]。当病理因素致使 ROS 在皮肤中持续累积，可引起皮肤细胞发生氧化损伤、凋亡[38-41]，导致皮肤光老化、衰老、色素性皮肤病、皮肤炎症及皮肤肿瘤等氧化应激相关的皮肤疾病发生[42, 43]。在各类皮肤细胞中，黑素细胞比其他细胞更容易受到 ROS 攻击。黑素细胞因长期暴露于 UV 照射中，受到外源性 ROS 刺激；而黑素合成过程，特别是酪氨酸酶催化酪氨酸生成多巴的过程中产生大量 H_2O_2 加重黑素细胞内源性的氧化压力[44, 45]。此外，线粒体加速能量代谢提供黑素合成过程的能量供给，这一过程中也产生大量 ROS。有研究证实，与体外培养的角质形成细胞及成纤维细胞相比，

黑素细胞中抗氧化分子,超氧化物歧化酶及酶谷胱甘肽过氧化物酶水平及活性较低,由此可见在应对氧化应激时黑素细胞也更容易发生严重的氧化损伤[46],由此强烈提示氧化应激是导致白癜风患者黑素细胞损伤的可能原因。目前的研究结果从多个角度证实这一猜想。首先,在进展期白癜风患者表皮中可检测到过量蓄积的 H_2O_2 [47, 48]。其次,体外培养白癜风患者表皮中分离的黑素细胞成活率较低、生长缓慢,需要在细胞培养基中加入更多生长因子或触酶来促进细胞生长[49-51],在受到 UV 损伤、热损伤、 H_2O_2 等外源性应激时,更易发生凋亡[52, 53]。

2. miRNA

2.1 概述

MicroRNA (miRNA) 作为生物基因调控网络中的重要组成部分,在动植物中广泛存且其进化方式呈现较强的保守性。最新 miRBase 数据库 (release 21, June 2014, <http://www.mirbase.org/>) 显示,人类基因可组中至少有 28645 个 miRNAs,并预测 miRNAs 总数占人类所有表达基因的 1%-4%。生理状态下,miRNA 表达谱和表达水平具有较强的时序性、组织特异性及基因簇集现象等特点。大量研究结果提示,机体发生病理性的变化时,miRNA 表达谱和表达水平出现相应的具有疾病特征性的改变变化,进而破坏对靶基因的调控强度。

miRNAs 生物合成过程包括转录生成初级 miRNA 转录本、剪切形成具有颈环结构的前体 miRNAs,及进一步加工转运从而形成成熟体 miRNAs。成熟体 miRNA 与 RNP 装配形成沉默复合体 (RISC),通过靶 mRNA 中互补序列结合,进而切割、降解靶 mRNA 或者通过沉默转录因子、抑制蛋白翻译、形成多核糖体复合物等多种方式精确调控靶基因的表达[54]。由于在转录后水平能够更迅速地对基因表达进行调控,决定 miRNA 明显的生物学优势。

循环 miRNA 以被包裹在脂质泡中,形成微泡体或与 Argonaute2 (Ago2) 蛋白结合形成 Ago2-miRNA 蛋白复合体等形式,维持其自身的稳定性。RNA 酶降解,酸碱变化、高温、冻融、长期储存等各种处理方法均不会造成循环 miRNA 的损失[55-57]。这一特性为循环 miRNA 的检测及研究提供了可能。目前已有大量的研究证实,miRNA 不仅长期稳定地存在于体液中,且表达水平与疾病密切相关,为研发新的临床标志物提供重要的线索,具有重要的临床应用价值。

2.2 miRNA 分子和皮肤发育

miRNA 在调控皮肤正常发育，维持皮肤组织正常结构中发挥重要的作用。研究证实，Dicer 敲除小鼠模型其皮肤组织不能合成成熟的 miRNAs，小鼠表皮透皮水份丢失显著增加，生存时间较对照组显著缩短。进一步的观察发现其表皮过度增殖，毛囊生长不良，真皮乳头发育异常，提示表皮细胞的正常凋亡程序受到抑制[58]。多个 miRNA 家族在皮肤组织中的表达呈现亚结构的特征性，如表皮中 miR-200 家族表达强度较高，而毛囊中则特异性表达 miR-199 家族[59]。此外有研究发现 miR-203 能够通过靶向调控 P⁶³ 基因的表达，进而参与调控表皮细胞增殖和分化[60]。

2.3 miRNA 分子与皮肤疾病

2.3.1 皮肤肿瘤

多项实验研究探讨了 miRNA 在黑素瘤发生发展中的作用。研究证实 Dicer、Argonaute2 及多种 miRNA 分子在黑素瘤细胞系中存在拷贝异常[61]。在黑素瘤中，miR-137 可通过调控黑素细胞生长、成熟、凋亡和色素形成的主要调节基因 MITF 抑制细胞凋亡[62]。此外，miR-221 及 miR-222 能够通过下调 p27Kip1/CDKN1B 及 c-kit 受体表达，诱导黑素细胞产生恶性表型[63, 64]。Lodygin 等[65]报道 miR-34a 可下调 c-Met 蛋白、磷酸化的蛋白激酶 B 和细胞周期相关蛋白的表达，在黑素瘤细胞中其启动子 CpG 岛甲基化异常，导致其在原发性黑素瘤等多种肿瘤细胞系中表达沉默，从而起到促进肿瘤细胞增殖和迁移的作用。miR-205 与鳞状细胞癌的恶性进展相关，可以做为判断肿瘤侵袭性的标志物。另有研究证实异位表达 miR-184 可阻断 miR-205 表达，具有潜在的临床应用价值[66]。

2.3.2 炎症性疾病

银屑病是常见的慢性炎症性皮肤病。有研究首先证实，miRNA 在银屑病患者、特应性皮炎患者及健康人皮肤的表达模式具有显著差别，miR-203 及 miR-146a 仅高表达于银屑病皮损，miR-21 在银屑病皮损及特应性皮炎皮损中表达升高，与之相反，miR-125b 在银屑病及特应性皮炎中均呈现低表达，其中，miR-203 可以调控 SOCS3 的表达，参与炎症反应及角质形成细胞的分化、增殖，并抑制 STAT3 通路，引起免疫细胞的浸润，参与银屑病发展[67]。其后有研究证实，高表达的 miR-146 通过靶向调控 IRAK1 和 TRAF6 分子，抑制 TNF- α 通路，从而参与银屑病的炎症反应[68]。

此外, 有研究结果显示特应性皮炎患者皮损中 miR-155 呈显著高表达, 该分子通过负调控 CTLA-4 提高 Th 细胞的增殖反应性, 参与皮肤慢性炎症的发生[69]。

2.3.3 自身免疫性疾病

在系统性红斑狼疮 (SLE) 患者中 miR-146a 表达下降, 下调的 miR-146a 可能促进 I 型 IFN 通路的异常活化, 因此, miR-146a 可作为 SLE 潜在的疾病活动性与肾脏受累情况的生物学预测指标[70]。还有研究显示 miRNA 可作为 SLE 和血小板减少性紫癜 (ITP) 鉴别诊断的生物学标记物, 微阵列芯片检测结果提示 13 个 miRNAs 的表达模式在 SLE 和 ITP 中是相同的, 提示其可能与自身免疫相关。3 个 miRNAs 在 SLE 中特异性表达, 提示这些 miRNA 与系统炎症有关, 6 个 ITP 相关性 miRNAs 则可能参与器官特异性血小板损害[71]。miR-29 在硬皮病的皮损及硬皮病真皮成纤维细胞中表达降低, 在成纤维细胞中抑制 miR-29 表达后, I、III 型胶原生成增多。而 TGF- β 、PDGF 及 IL-4 可抑制 miR-29 在细胞中的表达水平, 上述结果提示 miR-29 低表达可能参与硬皮病的发生, 并可作为潜在的治疗靶点[72]。此外有研究证实, 在硬皮病纤维母细胞中 TGF- β 可抑制 miR-196a 表达, 促进 I 型胶原的持续高表达, 参与硬皮病的发病机制[73]。

2.3.4 皮肤创伤愈合

成纤维细胞是皮肤创伤愈合中起核心作用的一类细胞, 可通过分泌的细胞因子促进细胞增殖以及血管生成等方式加强组织的修复。miR-24 能够抑制 TGF- β 1, 它是创伤愈合过程中成纤维细胞有丝分裂的重要调节因子[74]。在瘢痕愈合出现前后, miRNA-29b、miRNA-29c 与 miRNA-192 的表达水平具有明显的差异。miRNA-29b、miRNA-29c 能够抑制细胞外基质、TGF- β 、 β -连环素、Smad 等的表达, 这些均是涉及瘢痕愈合的重要信号转导因子, 此外, miR-192 也能通过下调 SIP1 的表达, 促进胶原表达[75]。

上述研究证实, miRNA 在维持正常的皮肤结构及功能中起到重要作用, 并与多种皮肤疾病的发生密切相关。那么, miRNA 在白癜风发病中扮演什么样的角色? 目前已有研究初步观察了白癜风患者血清、全血、PBMC 及皮损区的 miRNA 表达谱的异常变化, 发现了如 miR-16、miR-1 等表达具有疾病特征性的 miRNA。虽然尚未见到有关报道阐明上述 miRNA 是否参与白癜风的发生发展及其具体机制如何, 但已有

较多研究阐释了 miRNA 在黑素细胞存活及功能调控中的作用以及 miRNA 与细胞氧化还原平衡调控之间的关系, 这为探索 miRNA 在白癜风发病机制中的具体作用及分子机制研究奠定了坚实的基础。

2.4 miRNA 分子与黑素细胞

通过研究分化的神经嵴细胞存活对 Dicer 酶 (核糖核酸酶 III) 的依赖作用, 研究者首次揭示了 miRNAs 在黑素细胞生物学中的作用[76]。其后, Dynoodt 等通过给予小鼠黑素细胞持续毛喉素和紫外线照射处理, 初步探索了与黑素合成相关的 miRNAs 表达谱。实验结果表明, 经过处理的 melan-a 小鼠黑素细胞株中 miR-145 等 16 种 miRNAs 呈现出差异性表达, 上调或者下调 miR-145 可导致与黑素合成相关的关键性功能蛋白 Sox9、MITF、Tyr、Trp1、Myo5a、Rab27a 和 Fscn1 表达发生相应变化, 提示 miR-145 在外部刺激引起的反应性黑素合成过程中起到重要调控作用[77]。miR-125b 能够有效调控稳态下黑色素的生成, 其表达水平与细胞黑素含量负相关。其调控靶点 TYR 和 TYRP2 均为黑素合成关键酶。在高度色素化的黑色素细胞中, miR-125b 基因因启动子处于高甲基化而表达沉默[78]。此外, miR-340 通过调节黑素细胞中 RhoA 的表达促进 UVB 诱导下黑素细胞树突的形成的作用已被证实。树突是黑素细胞重要的结构之一, 黑素通过树突被运送至其顶端并进一步进入角质形成细胞来保护皮肤免受紫外线照射引起的 DNA 损伤。Jian 等人的研究发现在紫外线照射处理后的黑素细胞中, miR-340 的表达下调 4.8 倍。在黑素细胞中过表达 miR-340, 可抑制 RhoA 蛋白的表达, 增加细胞中树突的数量和总长度, 促进黑素在树突顶端的聚积[79]。

小眼相关性转录因子 (MITF) 在黑素细胞发育、存活中起着重要作用。多个实验室在围绕着黑素细胞中以 MITF 为中心的 miRNA 调控网络展开深入研究。其中, Levy 等人的研究首先指出在黑素细胞中的 MITF 对 Dicer 酶转录有调节作用, 在黑素细胞分化过程中, MITF 可以结合并激活 DICER 酶转录, 促进特定 miRNAs 成熟, 进而维持黑素细胞活力[80]。靶向敲除 Dicer 基因可导致黑素细胞死亡, 这与在黑素细胞中敲除 MITF 的结果一致[81], 其可能机制是 Dicer 酶依赖的 pre-miRNA-17-92 生物合成显著减少, 导致其靶分子凋亡蛋白 BIM 的表达升高, 导致黑素细胞凋亡数量显著升高。与上述研究结果一致的是, 在敲除 MITF 基因的黑素细胞中, miRNAs

的表达出现紊乱[82]。此外有研究显示，MITF 可通过调节 miR-204/211 的表达促进视网膜色素上皮细胞（RPE）的分化，在去分化的 RPE 细胞中转染 miR-204/211 可诱导上皮细胞的分化[83]。

另一方面，研究证实 MITF 可被多个 miRNA 所靶向调控。首先，对有色羊驼和白色羊驼皮肤中 miRNAs 进行微阵列筛选的结果显示 miR-25 的表达在两者中的差异具有显著性，且其位于 MITF 的 3' 非翻译区的保守结合位点在人、大鼠、小鼠以及狗具有较高的保守性。在羊驼黑素细胞中过表达 miR-25 可以降低 MITF、TYR 及其酪氨酸酶相关蛋白的表达[84]。Dong 等人研究发现，pre-miR-137 过表达的小鼠模型其毛色发生变化，MITF 的表达水平降低并且其下游基因表达也有所下降[85]。 α -黑素细胞刺激素（ α -MSH）可介导紫外线照射引起的黑素合成，研究发现 α -MSH 可以抑制内源性 miR-137 基因的表达并且激活 MITF，从而促进皮肤黑素细胞产生更多的黑素[62]。

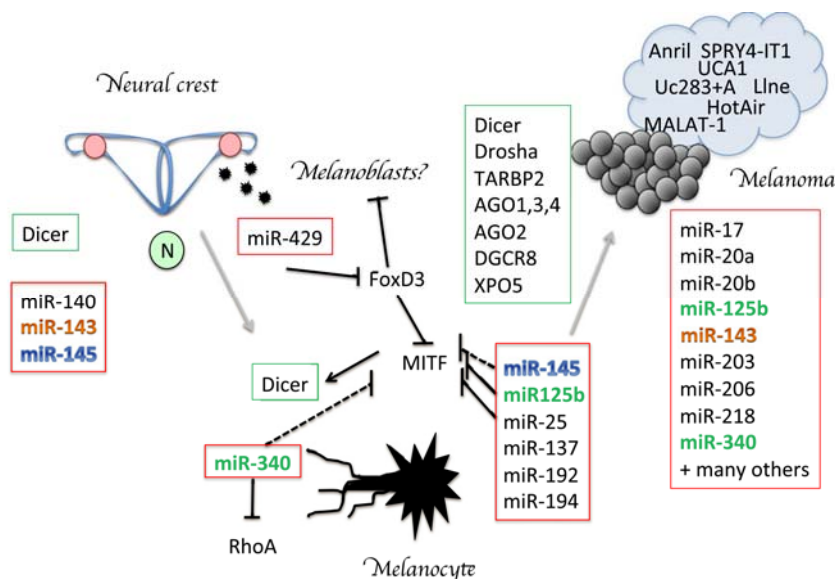


图 1. miRNAs 与黑素细胞功能主要调控因子之间的调控网络

(Marina Mione1 and Anja Bosserhoff, Pigment Cell Melanoma Res, 2014)

上述一系列研究结果表明 miRNAs 与黑素细胞功能主要调控因子如 MITF、RhoA 等之间存在复杂的调控网络，其中 MITF 可以靶向调控作为 miRNA 加工过程中的重要组成部分 Dicer 及多个 miRNAs 的表达，从而将 miRNAs 纳入黑素细胞特异性转录调控系统。另一方面，MITF 可作为多个 miRNAs（miR-137、miR-125b、miR-25 等）的靶基因，建立负反馈调控机制来控制不同分化水平及不同生理病理条件下 MITF

在黑素细胞中的表达（见图 1），这样的调控网络对于维持黑素细胞的稳态具有重要作用。

2.5 miRNA 分子与氧化应激

miRNAs 具有精细调控多种蛋白表达和生理过程的能力，其中包括直接调控 Nrf2 通路以及活性氧簇（ROS）细胞内合成相关蛋白的过程，发挥促氧化反应和抗氧化应激的双向调节功能，调节细胞氧化还原平衡，同时这一过程也可进一步影响 microRNAs 的生物合成，从而形成重要的调控网络。

2.5.1 氧化还原调控 MicroRNAs 生物合成

Dicer 酶是 miRNAs 生物合成中负责加工形成成熟 miRNA 片段的关键酶。研究表明大鼠脑微血管内皮细胞（CMVECs）内的过氧化氢诱导的衰老和氧化应激信号可抑制 Dicer 活性，从而导致 miRNAs 成熟受阻。通过对转录因子结合位点的生物信息学分析发现 Dicer 基因 5'端侧翼存在一个 ARE 结合序列，这表明 Nrf2/ARE 途径的氧化还原信号通路可对 miRNAs 的生物合成进行调控[86]。衰老脂肪细胞、3T3-F442A 前脂肪细胞、经过过氧化氢处理的 JAR 滋养层细胞等氧化应激水平较高的细胞中 Dicer 蛋白水平降低，间接提示 Dicer 可能会引起氧化还原所介导的 miRNAs 生物合成失调[87]。在人微血管内皮细胞中敲除 Dicer 基因可通过降低 NADPH 氧化酶 p47^{phox} 亚基的表达，降低基础超氧化物的产生量[88]。由于超氧化物可作为信号分子激活 Nrf2 途径和维持基础抗氧化水平，提示氧化应激所致的 Dicer 表达下降将最终导致细胞的适应性抗氧化防御反应受损。

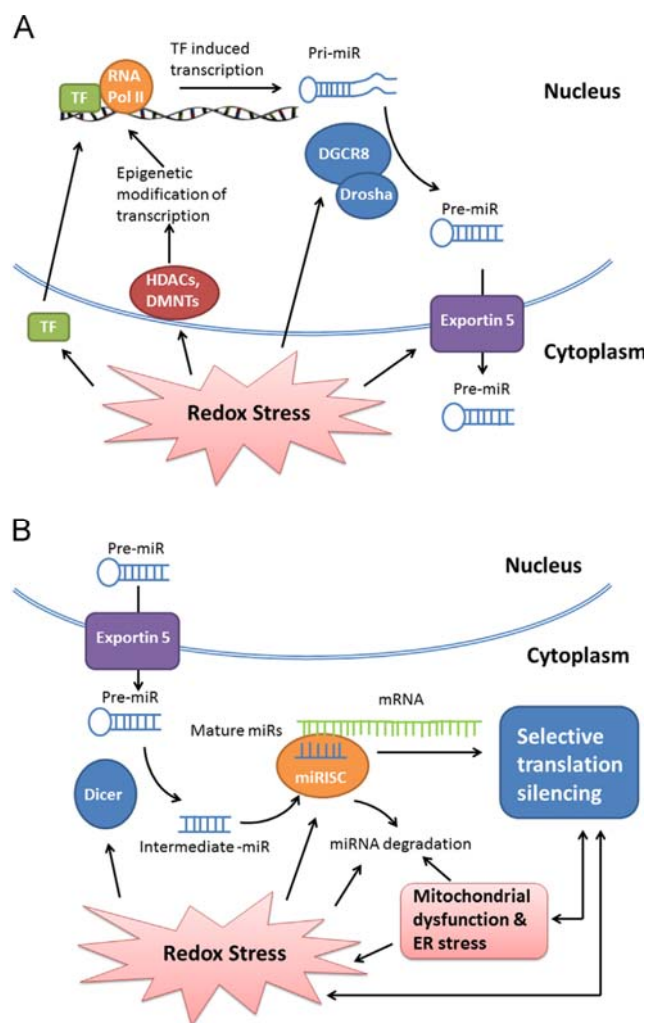


图 2 氧化还原调控 miRNAs 生物合成

(Xinghua Cheng, Free Radical Biology and Medicine, 2013)

ROS 抑制 Dicer 表达的具体机制目前尚在探索中，在人成纤维细胞中氧化应激可以上调 let-7 表达[89]，而 let-7 家族可以抑制 Dicer 表达[90]，因此 let-7 家族可能是氧化应激导致 Dicer 降低表达并引起一系列 miRNAs 表达变化，导致氧化还原失衡的重要环节。值得注意的是，急性氧化应激后 Dicer 水平仅出现短暂的下降，在应激消失后其水平可以恢复，这表明 miRNAs 表达谱的变化可以反映细胞的氧化还原状态[91]。此外，ROS 在 miRNA 转录、核内及核外运输及 miRNA 的降解等不同阶段都可起到一定的调控作用（图 2）。

3.5.2 miRNAs 对 Nrf2 信号通路的调控作用

氧化还原敏感的 miRNAs 作为“redoximiRs”以其参与调控 Nrf2/ARE 信号通路等方式，为细胞氧化还原平衡增添了重要的调控机制（图 3）。首先，miRNAs 可直接

下调表达 Nrf2, 例如神经元 SH-SY5Y 细胞系中的 miR-153、miR-27a、miR-142-5p 和 miR-144[92]; 淋巴母细胞 K562 细胞系、人红系祖细胞和镰状细胞病网织红细胞中的 miR-144[93]; 人乳腺上皮细胞和乳腺癌 MCF-7 细胞系中的 miR-28[94]及人胚胎肾脏 HEK293 细胞系中的 miR-34a[95]。其中, 在红系血细胞中 miR-144 表达的增加会引起 Nrf2 蛋白水平下降, 进而导致细胞内抗氧化谷胱甘肽(GSH)水平下降[96], 从而抑制细胞抗氧化能力。对临床标本检测的结果发现镰状细胞病的网织红细胞中 miR-144 的异常高表达[97]。在人乳腺上皮细胞和乳腺癌 MCF-7 细胞系中, miR-28 通过降解 Nrf2 mRNA 及降低 Nrf2 蛋白稳定性, 导致未结合于 Keap1 蛋白的 Nrf2 水平整体下降, 从而调控肿瘤细胞生长[94]。Narasimhan 等的研究表明单独异位表达 miR-144、miR-153、miR-27a 和 miR-142-5p 中每个 microRNA, 均可以直接下调 SH-SY5Y 神经细胞中 Nrf2 水平, 进而导致 GSH 水平下降以及抑制谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GSH 从头合成过程中的限速酶)的 mRNA 和蛋白的表达水平, 提示 miRNAs 可能在提高神经细胞对氧化应激反应的敏感性中发挥重要作用[92]。

除 Nrf2 分子之外, 该信号通路中其他蛋白表达的改变, 可能也会影响 ARE 介导的氧化还原信号传导。研究证实 miR-200a 可以靶作用于人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 Hs578T 中 Keap1 的 mRNA, 导致 Nrf2 活化以及 ARE 介导的抗氧化基因表达的增强, 而沉默 miR-200a 则作用相反[98]。miR-34a 除抑制 Nrf2 表达之外, 还可调节 HEK293 细胞中的微粒体谷胱甘肽 S-转移酶 1 (MGST1) 基因, 其表达水平在衰老大鼠肝脏中显著升高, 表明其可对 ARE 介导的抗氧化反应产生双重抑制作用[95]。

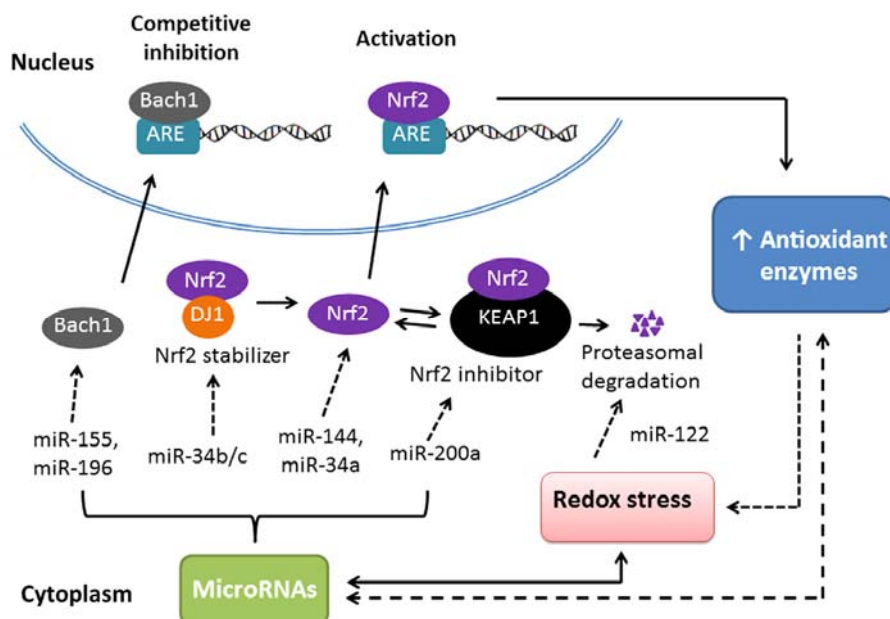


图 3 microRNAs 在调控 Nrf2 通路中的作用

(Xinghua Cheng, Free Radical Biology and Medicine, 2013)

3.5.3 miRNAs 对活性氧簇生成的调节

miRNAs 影响细胞氧化还原信号传导的机制，不仅包括调控抗氧化基因表达，而且包括调控生成 ROS 基因。既往已有大量的研究分析 ROS 在细胞内信号传导过程中及在多种疾病进程发病机制中的作用，然而 miRNAs 在调控 ROS 生成途径中的作用仍需明确。有研究在人微血管内皮细胞中敲除 Dicer，导致细胞内由佛波酯、TNF α 或血管内皮生长因子的诱导产生的 ROS 显著降低，此外在该研究中 Dicer 敲除和 NADPH 氧化酶复合物的亚基 p47^{phox} 蛋白表达的降低相关[88]。Nox4 是 NADPH 氧化酶的主要催化亚基，有研究发现 miR-146a 的过表达可降低人脐静脉内皮细胞（HUVEC）的衰老速率，通过 miRNAs 芯片检测和生物信息学分析发现 miR-146a 靶向调控 Nox4 的表达。在衰老细胞中，Nox4 表达的增加与 miR-146a 水平的下降相关[99]。

除 NADPH 氧化酶外，线粒体也是细胞内 ROS 产生的主要来源。目前已发现部分 miRNAs 定位于线粒体并调节其代谢活性[100, 101]。其中一项研究发现在小鼠海马 HT22 细胞系中 miR-743a 可调控苹果酸脱氢酶，提示 miRNAs 可能通过改变线粒体活性，对神经元氧化还原状态进行调控[102]。在人肿瘤细胞系和肺动脉内皮细胞中，miR-210 可靶向作用于线粒体铁-硫支架蛋白，从而降低复合物 I 活性并增加线

粒体 ROS 的产生[103, 104]。

上述研究提示 miRNA 参与机体抗氧化应激反应，同时调控 ROS 生成的基因，从而参与调控机体的氧化还原平衡，另一方面活性氧簇在 miRNA 生成及降解的不同环节存在调控作用，由此可见推测，白癜风疾病中 ROS 的过量积累可能导致 miRNA 表达谱的异常变化，miRNA 同时也可能导致黑素细胞的氧化损伤。在以上研究证据的基础上，我们提出如下研究假说：氧化应激导致白癜风 miRNA 表达谱的异常，其通过调控重要靶基因促进黑素细胞的损伤及疾病的进展。

正文

第一部分 白癜风患者血清及皮损特异性 miRNAs 表达谱的筛选及验证

1 材料

1.1 主要仪器设备

Chemi凝胶成像仪	美国BIO-RAD公司
DNA电泳槽	北京市六一仪器厂
DNA电泳仪	北京市六一仪器厂
iQ5多色实时荧光定量PCR检测系统	美国BIO-RAD公司
PCR扩增仪	美国BIO-RAD公司
超声水浴锅	上海声彦超声波仪器公司
倒置显微镜	日本Olympus公司
全自动酶标仪	美国BIO-RAD公司
水平摇床	北京六一厂
台式离心机	美国Beckman Coulter公司
涡旋仪	海门其林贝尔公司
制冰机	宁波格兰特公
紫外线凝胶成像系统	美国Alphamager公司

1.2 主要实验试剂

多聚甲醛	美国Sigma公司
30% H ₂ O ₂ 溶液	西安化学试剂厂
DAPI	碧云天生物技术有限公司

DEPC水	华美生物工程公司
miRNA cDNA First Strand Synthesis	Qiagen公司
miRNA SYBR qRT-PCR Kit	Qiagen公司
SYBR Premix Ex Taq II kit	大连Takara公司
Triton X-100	美国Sigma公司
Trizol	美国Invitrogen公司
反转录cDNA试剂盒	大连Takara公司
甲醇	西安化学试剂厂
氯仿	西安化学试剂厂
浓盐酸	华美生物工程公司
十二烷基磺酸钠(SDS) 粉	华美生物工程公司
鼠抗人Melan-A单克隆抗体	美国Abcam公司
无水乙醇	西安化学试剂厂
异丙醇	西安化学试剂厂
异丁醇	华美生物工程公司
脂质体2000	美国Invitrogen公司
总RNA提取试剂盒	美国AnyWay公司

1.3 其它材料

1.3.1 皮肤组织

研究对象者由本院皮肤科门诊纳入，皮损由本院皮肤病理中心于患者非曝光部位取材所得。健康对照皮肤组织为我院泌尿外科提供，均取材于正常青年男性包皮，需排除 HBV、HPV、HIV、支原体及衣原体感染个体，经供皮者知情同意及医院伦理委员会批准后进行取材。本研究获第四军医大学西京医院伦理委员会的批准及监督。

纳入标准：

- 1) 诊断依据：白癜风诊断、临床分型及疗效判定标准（全国中西医皮肤性病色素病学组于 2003 年修订版）；

排除标准:

- 1) 近期接受过糖皮质激素或免疫抑制剂治疗。
- 2) 肝、肾功能异常;
- 3) 患有器质性功能障碍者;
- 4) 患有急、慢性感染性疾病;
- 5) 合并其他自身免疫性疾病;

1.3.2 芯片

microRNA 表达谱芯片 Agilent miRNA 芯片由美国 Agilent 公司生产, 上海生物芯片有限公司代理。

1.3.3 引物

实时荧光定量 RT-PCR 的引物由 Qiagen 公司合成。

1.3.4 原位杂交探针

原位杂交探针由丹麦 Exiqon 公司合成。

2 方法

2.1 芯片检测白癜风 miRNA 表达谱

2.1.1 样品准备

- 1) 研究对象: 白癜风患者(临床确诊, 尚未治疗)血清样本 50 例及健康对照血清样本 50 例(年龄和性别频数匹配)。
- 2) 流行病学调查: 设计统一的流行病学调查表(调查表见附录)。调查内容主要包括:
 - A 一般情况;
 - B 个人疾病史;
 - C 家族史;
 - D 生活习惯(包括吸烟、饮酒、饮食等);
 - E 主要环境危险因素暴露史(如职业接触情况等);
 - F 临床资料(包括临床分期、分型、疾病活动情况等)。

2.1.2 RNA 提取 (TIANGEN, miRcute Serum/plasma miRNA isolation kit 试剂盒)

- 1) 取 200 μl 血清加入 900 μl 裂解液 MZA, 振荡混匀 30s, 颠倒混匀数次, 室温放置 5 min。
- 2) 上述样品中加入 200 μl 氯仿, 涡旋振荡 15 sec, 室温放置约 5 min。
- 3) 上述样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 (12,000 rpm, 15 min), 可见样品分成颜色不同的三层: 有机层为黄色, 中间层为白色及水相为无色, 将水相转移到新 EP 管中, 量取液体体积。
- 4) 缓慢加入无水乙醇, 其体积是上述液体 2 倍, 轻柔混匀后加入吸附柱, 室温放置 2 min, 将吸附柱以 12,000 rpm 离心 30 s, 离心后弃去废液保留吸附柱。
- 5) 取 700 μl 去蛋白液 MRD 加入吸附柱 miRelute 中, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 离心 30 s, 弃废液。
- 6) 500 μl 漂洗液 RW 加入吸附柱 miRelute 中, 室温静置 2 min, 12,000 rpm, 离心 30 s, 弃废液, 重复该步骤一次。
- 7) 室温, 12,000 rpm, 离心 2 min, 将吸附柱于室温放置数分钟。
- 8) 把处理后的吸附柱装入 RNase-Free 1.5 ml EP 管中, 取 RNase-Free ddH₂O 30 μl 滴加至吸附膜中心位置, 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 2 min。
- 9) 光度皿中加入 100 μl DEPC 水作为 Blank, 每个待测 RNA 样品 1 μl 用 RNase-Free ddH₂O 稀释 20 倍, 在紫外分光光度计下分别读取 260 nm 和 280 nm 的 OD 值, 并根据 A260 吸光度值及 A260/A280 比值算出样品 RNA 浓度。

2.1.3 miRNA 芯片杂交实验及数据分析 (采用 Agilent's miRNA Complete Labeling and Hyb Kit 试剂盒, 美国 Agilent 公司)

- 1) 使用 DNase/RNase-free 水将 RNA 样品稀释至 50ng/ μL 。取 1.5mL 离心管加入 2 μL 稀释后样品, 置于冰上, 备用。
- 2) 配制去磷酸化混合液, 备用 (按照表格所示顺序配制):

试剂组份	体积
10× Calf Intestinal Phosphatase Buffer	0.4
Nuclease-Free Water	1.1
Calf Intestinal Phosphatase	0.5
Total Volume	2.0

- 3) 取 2 μ L 上述混合液加入样品管与原样品混匀，其后置于 37 $^{\circ}$ C PCR 仪中反应 30min。
- 4) 取 2.8 μ L 100% DMSO 加入每管样品中。
- 5) 100 $^{\circ}$ C 金属浴中加热上述反应混合液，10min，然后将其迅速转入冰水浴中。
- 6) 37 $^{\circ}$ C 温育并间隔涡旋震荡 10 \times T4 RNA Ligase Buffer，使其沉淀充分溶解后降至室温，备用。
- 7) 按照下表配制连接反应液：

试剂组份	体积
10 \times T4 RNA Ligase Buffer	1.0
Cyanine 3-pCp	3.0
T4 RNA Ligase	0.5
Total Volume	4.5

- 8) 取 4.5 μ L 上述反应液加入样品管中混匀，离心，16 $^{\circ}$ C 温育 2h。其后将样品抽干。
- 9) 取 125 μ L nuclease-free 水，加入 10 \times GE Blocking Agent，涡旋混匀。
- 10) 每只样品用 18 μ L nuclease-free 水充分溶解后加入 4.5 μ L 10 \times GE Blocking Agent，再取 22.5 μ L 2 \times Hi-RPM Hybridization Buffer 加入样品中，混匀后 100 $^{\circ}$ C 加热 5min，冰水浴，5min，离心，收集反应液。
- 11) 将组装好的 SureHyb chamber 平衡放置在杂交炉中，55 $^{\circ}$ C，20rpm，杂交 20h。
- 12) 取 2 mL 10% 的 Triton X-102 加入 Gene Expression wash buffers 1 中，混匀。
- 13) 取 1L Gene Expression Wash Buffer 2 37 $^{\circ}$ C 过夜，将 slide-staining dish #3 放置在 37 $^{\circ}$ C 水浴中过夜。
- 14) 洗涤芯片，时间和温度如下表：

	Dish	Wash Buffer	Temperature	
Disassembly	1	GE Wash Buffer 1	Room temperature	
1 st wash	2	GE Wash Buffer 1	Room temperature	5 minutes
2 ^{ed} wash	3	GE Wash Buffer 2	37°C	5 minutes

2.1.4 扫描图象，分析数据

使用 Agilent 扫描仪扫描芯片结果，并使用 Feature Extraction software (V.9.5.3, Agilent Tech) 软件读取扫描所得图像文件，标准化后通过 Genespring 对数据进行 Fold change 比较。

2.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证芯片结果中差异表达的 miRNAs

2.2.1 样本准备

选取在临床上已确诊的白癜风患者 80 例（未经治疗），同时选择与病例组性别和年龄频数相匹配的健康者 80 例为对照。所有病例样本来自本院皮肤科门诊，正常对照来自本院同期的队列研究基地。

2.2.2 RNA 提取

具体实验步骤同前。

2.2.3 RNA 定量

光度皿中加入 100 μ l DEPC 水作为 Blank，每个待测 RNA 样品 1 μ l 用 RNase-Free ddH₂O 稀释 20 倍，在紫外分光光度计下分别读取 260 nm 和 280 nm 的 OD 值，并根据 A260 吸光度值及 A260/A280 比值算出样品 RNA 浓度。

2.2.4 miRNA 逆转录

- 1) RNase Free 的反应管置于冰上预冷，后加入以下试剂至总体积 20 μ l (E.coli Poly (A) Polymerase 最后加入)

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA*	-	可达 2 μg
E.coli Poly(A) Polymerase(5 U/ μl)	0.4 μl	2 U
10 \times Poly(A) Polymerase Buffer	2 μl	1 \times
5 \times rATP Solution	4 μl	1 \times
RNase-Free ddH ₂ O	补水至 20 μl	-

- 2) 轻柔混匀上述反应液, 短暂离心, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min, 为 miRNA 3' 末端加 Poly (A)。
- 3) 按下表配制逆转录反应液

试剂组分	体积
Poly(A) 反应液	2 μl
10 \times RT Primer	2 μl
10 \times RT Buffer	2 μl
Super Pure dNTPs (2.5 mM each)	1 μl
RNasin (40 U/ μl)	1 μl
Quant RTase	0.5 μl
RNase-Free ddH ₂ O	11.5 μl
Total volume	20 μl

- 4) 轻柔混匀上述反应液, 短暂离心, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min 完成逆转录, 备用。

2.2.5 PCR 反应

- 1) 按照下表成分配制PCR反应液

组成成分	20 μ l体系	终浓度
2 \times miRcute miRNA Premix (含SYBR, 含ROX)	10 μ l	1 \times
Forward Primer	-	200nM
Reverse Primer(10 μ M)	0.4 μ l	200nM
miRNA第一链cDNA	-	-
ddH ₂ O	4 μ l	-

2) 按照以下程序进行PCR反应:

循环	温度	时间	内容
1 \times	94 $^{\circ}$ C	2min	起始模板变性
45 \times	94 $^{\circ}$ C	20sec	PCR循环中模板变性
	60 $^{\circ}$ C	34sec	退火, 延伸

2.2.6 数据分析

以 cel-39 作为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算白癜风患者血清和正常对照血清间目标 miRNA 表达水平的差异, 按以下公式计算 miRNA 表达水平: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{白癜风患者}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$; $\Delta Ct = Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{cel-39}}$ 。健康对照血清目标 miRNA 表达水平设定为 1, 重复三次实验, 用 Student's t test 进行统计学分析。

2.3 qRT-PCR 检测白癜风患者高表达 miRNAs 与疾病活动性的关系

2.3.1 样本准备

40 例进展期白癜风 (6 个月内有新发皮疹) 患者血清, 40 例年龄和性别频数匹配的稳定期白癜风患者血清。所有病例样本来自第四军医大学西京医院皮肤科。

2.3.2 RNA 提取及定量

具体实验步骤同前。

2.3.3 miRNA 逆转录

具体实验步骤同前。

2.3.5 PCR 反应

具体实验步骤同前。

2.3.6 数据分析

以 cel-39 作为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算白癜风进展期患者血清和白癜风稳定期患者血清间目标 miRNA 表达水平的差异, 按以下公式计算 miRNA 表达水平: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{进展期组}} - \Delta Ct_{\text{稳定期组}}$; $\Delta Ct = Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{cel-39}}$ 。白癜风稳定期患者血清目标 miRNA 表达水平设定为 1, 重复实验三次, 用 Student's t test 进行统计学分析。

2.4 qRT-PCR 验证白癜风患者皮损差异表达的 miRNAs

2.4.1 样本准备

6 例白癜风患者皮肤组织 (白斑) 及 4 例健康对照的皮肤组织。

2.4.2 总 RNA 提取

具体实验步骤同前。

2.4.3 总 RNA 紫外定量及质量检测

具体实验步骤同前。

2.4.4 miRNA 逆转录

具体实验步骤同前。

2.4.5 PCR 反应

具体实验步骤同前。

2.4.6 数据分析

以 hsnRNA U6 作为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算白癜风患者皮损和正常对照皮肤组织中目标 miRNA 表达水平的差异, 按以下公式计算 miRNA 表达水平: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{白癜风组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$; $\Delta Ct = Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{hsnRNA U6}}$ 。白癜风稳定期患者血清目标 miRNA 表达水平设定为 1, 重复实验三次, 用 Student's t test 进行统计学分析。

2.5 原位杂交

2.5.1 样本准备

选择白癜风患者皮损皮肤组织及其皮损旁皮肤组织、健康对照皮肤组织各 5 例，

2.5.2 原位杂交

- 1) 探针使用丹麦 EXIQON 公司的 DIG-labeled detection probes。
- 2) 皮肤组织石蜡切片，二甲苯脱蜡，梯度酒精水化，DEPC 处理的 ddH₂O 速洗两次。
- 3) DEPC-PBS 洗 2×5min，TE 缓冲液稀释的 Rnase-free 蛋白酶 K (10μg/ml) 37℃ 孵育 5min，0.2%甘氨酸洗 30s，DEPC-PBS 洗 2×30s，4%多聚甲醛固定 10min。
- 4) DEPC-PBS 洗 2×5min，杂交缓冲液处理 2h，使用标记笔标记杂交位置，滴加杂交液（探针浓度为 20nM /ml）于组织后，将玻片置于湿盒中（盒底保湿用 DEPC 水）过夜；同时设立无探针的空白对照。
- 5) 杂交后于杂交温度下 2×SSC 速洗，50%甲酰胺浸泡 30min，2×SSC 洗涤，重复 3 次，室温下 PBST 洗 5×5min，室温下封闭缓冲液封闭 1h。
- 6) 加入 1:2000 抗体 4℃过夜，PBST 洗 5×5min，AP buffer 洗 3×5min，室温暗室内观察呈色反应。

2.6 组织免疫荧光

- 1) 以 5 μm 厚度对石蜡组织进行常规切片，烤干，脱蜡。
- 2) 封闭组织 15 min (3%H₂O₂ 封闭液)。
- 3) 1×PBS 洗 5 min，重复 3 次。
- 4) 高压抗原修复，1×PBS 洗 5 min，重复 3 次。
- 5) 加一抗孵育：用蜡笔在组织周围画圈，每张切片加入鼠抗人 Melan-A 单克隆抗体 50 μL，4℃过夜。
- 6) 室温静置 1h，1×PBS 洗 5 min，重复 3 次。
- 7) 加入 melan-A 荧光二抗 (CY3; CRT AF488)，室温下避光孵育 1 h，使用蒸馏水摇洗 5min，重复 3 次；
- 8) 切片上的残余液体被吸干后，加入 1:1000DAPI，在避光环境室温孵育 15 min；
- 9) 使用蒸馏水摇洗 5min，重复 3 次；
- 10) 吸干切片残余液体，封片剂封片，激光共聚焦技术观察切片，保存实验结果。

3 结果

3.1 miRNA array 芯片筛选白癜风患者 miRNAs 表达谱

采用 miRNA 提取专用试剂盒分别抽提 50 例白癜风患者混合血清样本及 50 例正常对照人血清样本的总 RNA, 提取的 RNA 经定量检测显示无明显降解, 符合 miRNA 芯片检测要求。取 miRNA 芯片与样品 RNA 进行杂交, 筛选差异表达即 Fold change \geq 2 的 miRNA 分子进行进一步研究。

如表 1-1 所示: let-miR-7b、hsa-miR-16、hsa-miR-451 和 miR-25 等共 24 种 miRNA 在白癜风患者血清中高表达, 而 miR-1914*和 miR-187*共 24 种 miRNA 等在白癜风患者血清中低表达。

表 1-1 MicroRNA 芯片检测白癜风患者特异性的 microRNA 表达谱

上调 microRNAs	倍数	下调 microRNAs	倍数
hsa-let-7b	13.27	hsa-miR-1914*	9.15
hsa-miR-16	7.39	hsa-miR-187*	5.46
hsa-miR-451	6.55	hsa-miR-1305	4.97
has-miR-25	6.29	hsa-miR-516a-5p	4.21
hsa-miR-15b	5.67	hsa-miR-557	4.14
has-miR-1323	5.36	hsa-miR-574-5p	3.97
hsa-miR-186*	4.07	hsa-miR-663	3.92
hsa-let-7a	3.99	hsa-miR-1182	3.85
has-miR-19b	3.91	hsa-miR-139-3p	3.65
hsa-miR-636	3.78	ebv-miR-BART7	3.37
hsa-miR-885-3p	3.69	hsa-miR-1181	2.69
hsa-let-7c	3.64	hsa-miR-1225-5p	2.69
hsa-miR-107	3.47	hsa-miR-623	2.68
hsa-let-7i	3.35	hsa-miR-1202	2.53
hsa-let-7g	3.21	hsa-miR-149*	2.41
hsa-miR-550	2.89	hsa-miR-320a	2.37
hsa-miR-223	2.88	hsa-miR-1307	2.33

hsa-miR-486-5p	2.77	hsa-miR-610	2.33
hsa-let-7d*	2.75	hsa-miR-877	2.29
hsa-miR-627	2.69	hsa-miR-32*	2.22
hsa-miR-548c-5p	2.61	hsa-miR-1226*	2.21
hsa-miR-15a	2.45	hsa-miR-1225-3p	2.13
hsa-miR-190	2.24	hsa-miR-1207-5p	2.11
hsa-miR-146a	2.23	hcmv-miR-UL70-3p	2.00

3.2 qRT-PCR 验证芯片结果中差异表达的 miRNAs

在对白癜风患者及健康对照血清进行 miRNA 检测芯片检测分析的基础上,选择在白癜风患者血清中高表达的前 5 位的 miRNAs (let-miR-7b、miR-16、miR-451、miR-25 及 miR-15b) 在 80 例白癜风及 80 例健康对照血清样本中进行验证。

如图 1-1 所示:白癜风患者血清中 let-miR-7b、miR-16、miR-451、miR-25 及 miR-15b 的表达量与正常对照相比显著升高 ($P < 0.001$),与芯片的结果相一致。

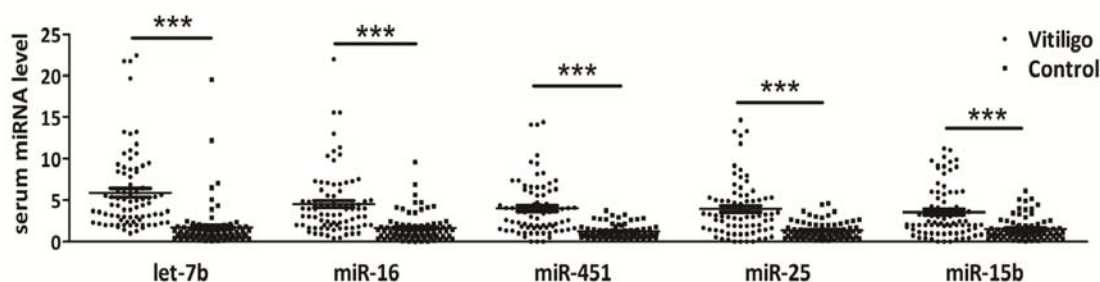


图 1-1 白癜风患者及健康对照血清中 let-miR-7b、miR-16、miR-451、miR-25 及 miR-15b 的表达量

3.3 miR-25 血清表达水平与白癜风疾病活动性的关系

收集 40 例白癜风患者进展期患者血清及 40 例稳定期患者血清,提取血清 miRNAs, qRT-PCR 方法检测血清 let-miR-7b、miR-16、miR-451、miR-25 及 miR-15b 表达水平。

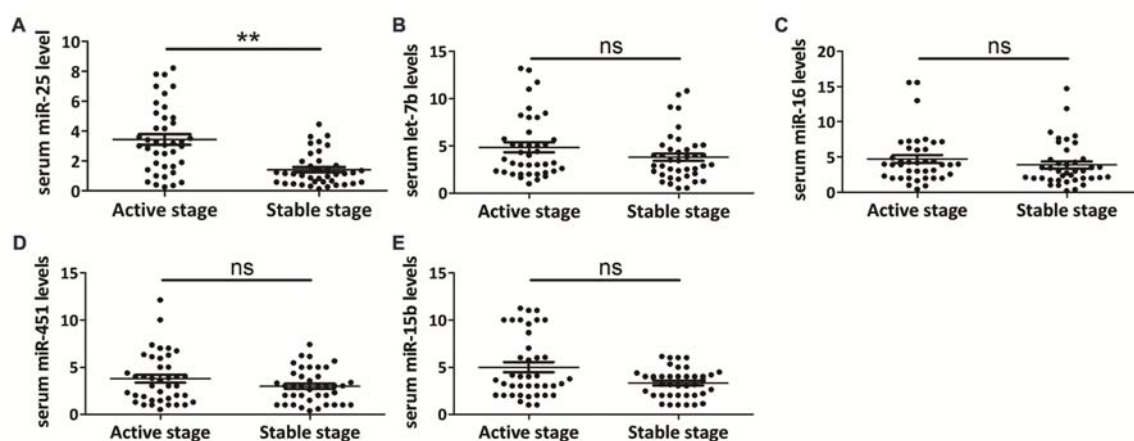


图 1-2 进展期及稳定期白癜风患者血清中 let-miR-7b、miR-16、miR-451、miR-25 及 miR-15b 表达量

如图 1-2 所示：miR-25 在进展期患者的血清表达水平显著增高 ($P < 0.01$)，提示 miR-25 的表达量与疾病进展密切相关，血清 let-miR-7b、miR-16、miR-451 及 miR-15b 的表达量在两组没有显著性的差异。以上结果说明：miR-25 在白癜风患者血清中显著升高，且与疾病活动性相关，提示其可作为疾病标志物，监测疾病动态发展状态，为治疗方案的调整提供重要参考。

3.4 miR-25 在皮肤组织的表达水平

为进一步明确 miR-25 是否参与疾病的发生发展，我们对 miR-25 在皮肤中的表达水平及具体分布进行了进一步的观察。我们收集了 6 例白癜风患者皮肤组织（白斑）及 4 例健康对照的皮肤组织，使用 TIANGEN 的 miRcute isolate kit 试剂盒提取组织中 miRNAs，以 hsnRNA U6 为内参照，使用 qRT-PCR 方法测定组织中 miR-25 的表达量。进一步我们采用荧光 microRNA 原位杂交探针检测白癜风患者皮损白斑、白斑旁及正常对照皮肤组织中 miR-25 mRNA 表达水平，联合 melan-A 组织免疫荧光标记定位表皮基底部黑素细胞，进一步明确 miR-25 在皮损中的分布情况。

如图 1-3 所示：①白癜风患者皮损处 miR-25 显著高表达 ($P < 0.05$ ，图 1-3A)。②健康对照对照皮肤组织的表皮基底层黑素细胞中 miR-25 表达水平较低，角质形成细胞 miR-25 表达为阴性；皮损旁黑素细胞及角质形成细胞均呈现 miR-25 的高表达；在白癜风皮损处，未见到典型黑素细胞，角质形成细胞仍呈现 miR-25 高表达（图 1-3B）。miR-25 在患者的皮损中显著高表达，强烈提示其可能参与白癜风的发生和

(或) 进展。

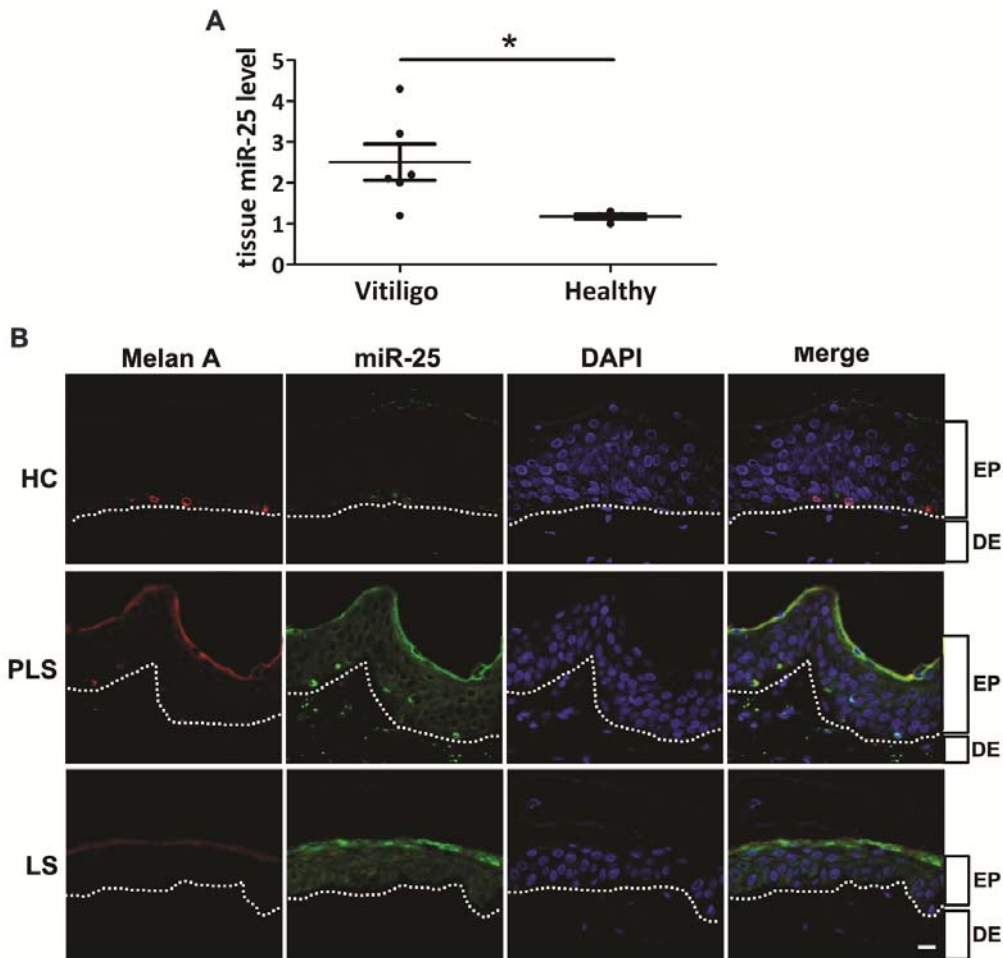


图 1-3 miR-25 在皮肤组织的表达水平检测

(A) qRT-PCR 检测白癜风皮损及正常对照组织中 miR-25 表达量；(B) 原位杂交检测白癜风皮损、皮损旁及正常皮肤 miR-25 mRNA 表达分布（绿色荧光为 miR-25，红色荧光显示 Melan-A 阳性黑素细胞）

4 讨论

白癜风是一种常见并且严重危害患者身心健康的顽固皮肤病，治疗相对困难，疗程长、收效慢、治愈率低，目前尚没有满意的治疗方法，因此，疾病预防和探索个体化的治疗方案是未来白癜风疾病控制的主要方向，与个体罹患白癜风的易感性、治疗反应、疾病进程及预后相关的分子标志物的研究也日渐成为热点。循环 miRNA 的表达水平被证实具有疾病特征性，研究者在多种肿瘤及非肿瘤性疾病中证实循环

miRNA 在疾病的诊断及预后判断中具有巨大的价值。由此，我们对白癜风患者血清及组织 miRNA 表达谱是否具有疾病特征性进行了初步的探索。首先，我们收集 50 例白癜风患者血清及 50 例健康对照血清作为实验样本，利用 miRNA 芯片对白癜风患者及健康对照的 miRNA 表达谱进行了初步筛选，并在独立验证样本（80 例白癜风患者血清样本及 80 例健康对照血清样本）中对表达差异较大的 5 个 microRNA 的表达水平进行了进一步的验证。我们发现 let-miR-7b、miR-16、miR-451、miR-25 及 miR-15b 在白癜风患者血清中显著升高，且 miR-25 与疾病的活动性相关。查阅文献发现，Shi 等人通过 miRNA 芯片对白癜风患者血清 microRNA 表达谱进行了检测，发现 miR-16 等 17 个 miRNAs 在白癜风患者血清中显著上调，其中 miR-25 也呈现显著上调趋势，与我们的研究结果一致[105]。他们发现血清 miR-16、miR-19b 及 miR-720 水平可较好的区分白癜风患者与健康对照。此外，相对于正常对照中表达量，miR-574-3p 在白癜风患者血清中的表达水平随皮损面积的增大而降低，提示其与疾病的严重程度相关。Yi 等人研究对比了白癜风患者与正常对照的 PBMC 中 miRNAs 表达的异常变化，其中 miR-224-3p, miR-4712-3p 表达显著上调，而 miR-3940-5p 表达降低[106]。另有研究显示，白癜风患者全血中 miR-1, miR-184, miR-328, miR-383 及 miR-577 表达异常[107]。上述结果提示，白癜风患者循环 miRNAs 表达谱具有疾病特征性，miR-16、miR-451、miR-25 等 miRNAs 在白癜风患者血清中显著高表达，部分 miRNAs，例如 miR-25 及 miR-574-3p 与疾病的严重程度及疾病活动性相关，提示 miRNA 可作为白癜风患者潜在标志物，在疾病的诊断，疾病活动动态判断，调整治疗方案方面具有广泛而重要的临床应用潜在价值。

为进一步明确 miR-25 与白癜风疾病发生及进展中的作用，我们通过 qRT-PCR 及原位杂交等方法，检测了白癜风患者皮损、非皮损区皮肤组织及健康对照皮肤组织 miR-25 的表达水平，发现 miR-25 在皮损旁及皮损部位的黑素及角质形成细胞中均呈现显著高表达。Mansuri 等人通过采用芯片检测对比分析白癜风患者皮损、非皮损区皮肤组织及正常对照皮肤组织 miRNA 表达谱差异，发现了 miR-1 等 12 种 miRNAs 在白癜风患者皮损处呈现显著高表达，miR-221 呈低表达；相对于正常对照皮肤，白癜风患者非皮损区 let-7c 等 28 种 miRNAs 表达升高，miR-141 表达降低。其中，miR-25 在白癜风患者非皮损区的皮肤组织中高表达，与我们的结果一致[108]。上述结果显示，miR-25 在皮损区及白癜风患者的皮损旁皮肤中的表达异常，提示其

可能参与疾病的发生和（或）进展。

miR-25 位于人染色体 7q22.1 的 miR-106-25 基因簇中，在 MCM7 基因初级转录本的第 13 个内含子区。目前对于 miR-25 作为分子标志物的研究多集中于肿瘤性疾病，其中 miR-25 在肺癌、前列腺癌、肝癌、胃癌、甲状腺癌、舌鳞状细胞癌中呈现异常表达。此外，miR-25 还有助于肿瘤亚型的诊断，例如 miR-25 仅在表皮生长因子受体（EGFR）阳性的肺癌中表达上调[109]。

此外，miR-25 表达水平与肿瘤患者的临床病理特点息息相关，提示其可作为肿瘤预后的生物标记物。Su 等[110]研究发现肝细胞癌患者 miR-25 表达水平与血清 AFP 水平和 TNM 分期呈相关，提示 miR-25 可作为一种新型的肝癌预后指标。Li 等[111]首次证实 miR-25 在大肠癌患者预后判断中显示出其高度特异性和敏感性。肺腺癌组织中 miR-25 显著高表达，其表达水平与临床分期、淋巴结转移、EGFR 突变相关，因此 miR-25 可作为女性肺腺癌患者的独立的预后因素[112]。此外，miR-25 在预测肺鳞状细胞癌患者生存期中的特异性较肺腺癌高[113]。

在非肿瘤性疾病的研究结果显示，低表达 miR-25 通过调控 NADPH 氧化酶 4 的表达，影响心脏的氧化/硝化应激作用从而导致心肌功能障碍[114]。由于氧化应激诱导黑素细胞损伤在白癜风发病机制中的重要环节，结合 miR-25 在氧化应激相关疾病的发病机制中扮演的重要角色。我们进而推测，miR-25 在白癜风患者皮损中的特异性表达模式提示其可能参与疾病发生及进展。然而，miR-25 对黑素细胞增殖、凋亡、细胞功能会有怎样的影响，具体调控的分子机制如何，什么原因导致白癜风患者皮损区 miR-25 的表达紊乱，其具体机制又是如何？对这些问题的探讨和回答有望加深我们对白癜风发病机制的认识。

第二部分 miR-25 调控黑素细胞活性及参与白 癜风发病的机制研究

1 材料

1.1 主要仪器设备

ChemiDocTM XRS+实验室凝胶成像系 统	美国伯乐 BIO-RAD 公司
MillipakR40 纯水系统	美国 Millipore 公司
PCR 扩增仪	美国伯乐 BIO-RAD 公司
Power Pac 蛋白电泳系统	美国伯乐 BIO-RAD 公司
PVDF 膜	德国 Millipore 公司
SMARTSPEC 紫外线分光光度计	美国伯乐 BIO-RAD 公司
Trans-Blot TurboTM 转膜系统	美国伯乐 BIO-RAD 公司
超低温离心机	美国 Beckman Coulter 公司
超净工作实验台	中国苏州安泰公司
倒置显微镜	重庆光电仪器有限公司
低温冰箱	日本三洋公司
低压电泳仪	北京市六一仪器厂
电子称量器	瑞士 Mettler 公司
二氧化碳培养箱	美国 THERMO 公司
各型细胞培养瓶/板	美国 Corning 公司
恒温蛋白加热器	上海之信仪器有限公司
恒温水浴箱	美国 Poly Science 公司
激光共聚焦显微镜	日本 Olympus 公司
流式细胞仪	美国 Beckman Coulter 公司
全波长酶标仪 Model 680	美国伯乐 BIO-RAD 公司

全自动病理组织染色机	德国 Lycra 公司
水平摇床	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
涡旋震荡器	美国 Scientific Instrument Services 公司
荧光定量 PCR IQ-5 检测系统	美国伯乐 BIO-RAD 公司
掌上离心机	西安莱博科技发展有限公司
制冰机	宁波 Grant 公司
组织石蜡切片机	德国 Lycra 公司

1.2 主要试剂

1640 培养基	美国 HyClone 公司
30% H ₂ O ₂ 溶液	西安化学试剂厂
30%丙烯酰胺	华美生物公司
Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒	北京达科为生物技术有限公司
BCA 蛋白定量试剂盒	碧云天生物技术研究
DAPI	碧云天生物技术有限公司
DEPC 水	华美生物工程公司
Dispase II	美国 Sigma 公司
DMEM/F12	美国 Gibco 公司
ECL 化学发光显色液	美国 Advansta 公司
EDTA	美国 Sigma 公司
EdU 细胞增殖检测试剂盒	锐博生物科技有限公司
HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体	美国 Pierce 公司
HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体	美国 Pierce 公司
LipofectamineTM2000	Invitrogen 公司
PMSF 蛋白酶抑制剂	美国 Sigma 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
RIPA 蛋白裂解液 (中)	碧云天生物技术有限公司
RNAiso Reagent	TaKaRa 公司
SYBR Premix Ex Taq II kit	大连 Takara 公司

TEMED (N,N,N,N-四甲基乙二胺)	德国 Serva 进口分装
Tris 碱	华美生物工程公司
Triton X-100	美国 Sigma 公司
Tween-20	华美生物工程公司
β -巯基乙醇	美国 Sigma 公司
多聚甲醛	美国 Sigma 公司
反转录 cDNA 试剂盒	大连 Takara 公司
过硫酸铵	西安化学试剂厂
黑素细胞专用 254 培养基	美国 Portland 公司
甲醇	西安化学试剂厂
氯仿	西安化学试剂厂
浓盐酸	华美生物工程公司
人黑素细胞生长因子 HMGS	美国 Cascade Biologics 公司
人角质形成细胞生长因子	美国 Gibco 公司
十二烷基磺酸钠(SDS) 粉	华美生物工程公司
鼠抗人 APE1 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
鼠抗人 Endothelin 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
鼠抗人 gp100 多克隆抗体	美国 Abcam 公司
鼠抗人 TYR 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司
兔抗人 BAX 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 BCL2 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 bFGF 单克隆抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 Cleaved-Caspase-3 单克隆抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 Cleaved-Caspase-9 多克隆抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 CXCL10 多克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 CXCL9 多克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 MITF 多克隆抗体	美国 Abcam 公司

兔抗人 SCF 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 TYRP1 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 TYRP2 多克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 β -actin 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
脱脂奶粉	伊利乳业集团
无水乙醇	西安化学试剂厂
胰酶	美国 Sigma 公司
异丙醇	西安化学试剂厂
预染蛋白 Marker	美国 Fermentas 公司
脂质体 2000	美国 Invitrogen 公司
总 RNA 提取试剂盒	美国 Anyway 公司

1.3 其他材料

1.3.1 健康人包皮组织

用于提取原代黑素细胞和角质形成细胞的正常皮肤组织收集于本院泌尿外科，供皮者本人或者监护人均签署知情同意书。本研究获第四军医大学西京医院伦理委员会的批准及监督。

1.3.2 miRNA 特异的过表达及抑制物寡核苷酸片段

miR-25 mimics, miR-25 mimics control; miR-25 inhibitor, miR-25 inhibitor control 均购自 Invitrogen 公司；miR-25 qRT-PCR Primer 购自 Qiagen 公司。

1.3.3 PCR 引物

实时荧光定量 PCR 引物序列如下

Gene	Primers1 (5'→3')	Product (bp)
MITF	F ¹ : ATAATGAGGAAATCTTGGGCTTG	131
	R ¹ : GGAGTTGCTGATGGTGAGG	
SCF	F: GATGTTTTGCCAAGTCATTGTTGG	351
	R: ACTGACTCTGGAATCTTTCTCAGG	

bFGF	F: GGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG R: TCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAGAAAAAG	243
HO-1	F: CAGGAGCTGCTGACCCATGA R: AGCAACTGTCGCCACCAGAA	195
CAT	F: TGGAGCTGGTAACCCAGTAGG R: CCTTTGCCTTGGAGTATTTGGTA	209
SOD1	F: AAAGATGGTGTGGCCGATGT R: CAAGCCAAACGACTTCCAGC	167
GPX1	F: CAGTCGGTGTATGCCTTCTCG R: GAGGGACGCCACATTCTCG	105
NQO1	F: GAAGAGCACTGATCGTACTGGC R: GGATACTGAAAGTTCGCAGGG	196
Actin	F: CCCATCTATGAGGGTTACGC R: TTTAATGTCACGCACGATTTTC	202

2 方法

2.1 人原代黑素细胞培养

- 1) 在超净台内用 0.01 mol/L 无菌 PBS 冲洗修剪过的包皮组织至少 3 次，用 75% 的酒精浸泡组织 30 s 后将其剪成长约 1 cm 的细条；
- 2) 在 4℃ 下用浓度为 0.25% Dispase II 消化液消化组织，16 h；
- 3) 将分离的表皮置于一清洁平皿中剪碎，放入 0.25% 胰酶中，在 37℃ 中消化 5 min，震荡数次，反复轻柔吹打 4-6 min，待液体浑浊后，加入含血清的 DMEM/F12 培养基终止消化，并吹打约 40 次；
- 4) 经细胞筛网过滤组织，将含有细胞的混悬液离心 8 min (1100 rpm)，弃上清；
- 5) 用 DMEM/F12 培养液 (含 0.1% 青、链霉素) 重悬细胞，随后将细胞悬液按每 10 ml 接种于培养瓶中，置于孵箱中培养 2h 后，弃上清；
- 6) 使用角质细胞培养基 K-SFM 培养 72h，随后更换为 254 培养基 (5% 胎牛血清)，72h 传代一次。
- 7) 采用胰酶消化差速贴壁法继续纯化黑素细胞，用 S-100 特异性染色鉴定所培养黑

素细胞后将其置于用 254 培养基（含 5% 胎牛血清，HMGS，不含抗生素）中常规培养。

2.2 细胞转染

- 1) 原代黑素细胞（处于对数生长期）被胰酶消化后，细胞计数并接种于 6 孔板（密度为每孔 1×10^6 细胞），用含 5% 胎牛血清的黑素细胞 254 培养基培养细胞，贴壁生长 24h 后用于次日的转染试验（以下功能实验相同）
- 2) 为了去除血清及悬浮的坏死细胞，先用 DMEM 液（无血清）清洗 6 孔板 3 次，随后将 2ml 无血清 DMEM 液加入每孔。
- 3) 对于待转染细胞，将 miR-25 mimics/ inhibitor 及相应对照片段（NC）按照 200 pmol/ μ l/每孔的浓度稀释于 250 μ l DMEM 液中（无血清），并在室温下静置 5-6 min。
- 4) 对于每孔待转染细胞，将 5 μ l 的 Lipofectamine 2000 稀释于 250 μ l 无血清 DMEM，室温静置 5 min。
- 5) 将 3)、4) 两种液体轻柔混合，室温静置 20 min。
- 6) 将 500 μ l 的上述混合液加入含有转染组细胞的孔中，培养 6h。
- 7) 最后为了鉴定转染的效果，去除培养板中混合液，并使用含 5% 胎牛血清的 254 培养液，培养 2 天后收集细胞。

2.3 黑素细胞凋亡、增殖、黑素合成、分布情况的检测

2.3.1 流式细胞术检测黑素细胞凋亡

- 1) 将上述转染后各组黑素细胞通过胰酶（0.25%，不含 EDTA）消化，离心 5min（700rpm），弃上清，PBS 反复洗涤。
- 2) 将 1 \times binding buffer 加入每管细胞样品中重悬细胞至 1×10^6 /ml。
- 3) 在流式管（5ml）中加入 10 μ l PI、100 μ l 细胞悬液及 5 μ l Annexin V/FITC 并混匀。
- 4) 在反应管中加入 400 μ l 的 1 \times binding buffer，室温避光反应 9-11min。
- 5) 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。激发波长为 488nm，发射波长 530nm，实验重复 3 次。

2.3.2 EdU 检测细胞增殖水平

- 1) 以 1000: 1 的比例使用细胞培养基稀释 EdU 溶液（试剂 A），制备 50 μ M EdU 培

培养基备用；

- 2) 将 100 μ L 50 μ M EdU 培养基加入每孔细胞中，孵育约 120min，弃去培养基；
- 3) PBS 液清洗细胞，每次约 6 min，重复 2 次。
- 4) 将固定液（含 4% 多聚甲醛的 PBS）加入孔中，于室温下孵育 25-35 min，弃去固定液；
- 5) 将 50 μ L 甘氨酸（2 mg/mL）加入每孔，脱色摇床孵育 4-6 min，弃去甘氨酸溶液；
- 6) 每孔加入 100 μ L PBS 液，脱色摇床清洗 4-6 min，弃去 PBS；
- 7) 将 100 μ L 1 \times Apollo[®]染色反应液加入每孔，避光、室温、脱色摇床孵育 25-35min，弃去染色反应液；
- 8) 加入 100 μ L 渗透剂（含 0.5% TritonX-100 的 PBS），脱色摇床清洗 9-11 min，重复 2 次，弃去渗透剂；
- 9) 制备需避光保存的 1 \times Hoechst33342 反应液，备用；
- 10) 将 100 μ L 1 \times Hoechst 33342 反应液加入每孔细胞中，避光、室温、脱色摇床孵育 25-35 min，弃去染色反应液；
- 11) 每次将 100 μ L PBS 加入每孔并清洗 4-6min，重复 3 次；
- 12) 荧光显微镜获取图像及并进行分析，曝光时间可设置为 30ms。

2.3.3 黑素细胞黑素合成测定

- 1) 以 1 \times 10⁵/mL 密度将黑素细胞接种于 6 孔板，常规培养；
- 2) 次日将 miR-25mimics、inhibitor 及对照片段转染黑素细胞，2 天后终止培养；
- 3) 将 500 μ l 胰酶（0.25%）加入每孔细胞中，消化约 8 min，加入 DMEM/F12 培养基（含 10%胎牛血清）终止消化；
- 4) 800rpm，离心 5min，PBS 漂洗 3 min，重复两次；
- 5) 在 500 μ l NaOH 溶液（1 mol/L）中将细胞重悬，，水浴 120min（70 $^{\circ}$ C）；
- 6) 将细胞悬液转移至 96 孔板，每组处理设 5 个复孔，每孔加入细胞悬液 100 μ l；
- 7) 酶标仪 A405 nm 处测吸光值，记录实验数据；
- 8) 结果数值：黑素合成量等于 A 值（各孔）除以细胞密度（各孔）。

2.3.4 酪氨酸酶活性检测

- 1) 将原代培养的黑素细胞按 5 \times 10⁵/mL 的密度接种于 6 孔板中，培养过夜；

- 2) 原代黑素细胞被 miR-25mimics、inhibitor 及对照片段转染（具体步骤同前所述），2 天后终止培养；
- 3) 弃去培养液，PBS 漂洗 3-4 min，重复两次，将 1% Triton X-100 溶液 90 μ l 加入每孔，迅速置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱，冻存 25-35min，于室温下取出融化；
- 4) 将 100 μ l 0.1% L-DOPA 溶液加入每孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 120min；
- 5) 酶标仪 A490 nm 处测吸光值，记录实验数据；
- 6) 计算数值：酪氨酸酶活性等于吸光度 A 值除以 MTT 值（A 值）

2.3.5 细胞免疫荧光（gp100 染色标记黑素小体分布）

- 1) 黑素细胞爬片，次日终止培养；
- 2) 使用 4% 的多聚甲醛固定细胞 35-45min；
- 3) 0.5% TrionX-100 孵育细胞 20 min；
- 4) 滴加 gp100 抗体（1:200）溶液，将切片置于湿盒内，4 $^{\circ}$ C，过夜；
- 5) PBS 清洗细胞 3-4min，重复 3 次；
- 6) 将荧光二抗 IgG-Cy3 抗体（1:200）溶液滴加在玻片上，37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 60 min；
- 7) PBS 清洗细胞 3-4 min，重复 3 次；
- 8) 滴加 1 μ g/ml DAPI 溶液于玻片上染核，避光、室温孵育 20-25 min；
- 9) 将玻片置于荧光倒置显微镜下观察细胞并采集图像，激发光谱为 350 nm，发射光谱为 460 nm。

2.4 miR-25 对靶基因 MITF 调控的机制研究

2.4.1 应用生物信息学方法进行 miR-25 的靶基因预测

通过 miRanda (<http://www.microrna.org>)，TargetScan (<http://www.targetscan.org>) 及 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) 等多个生物信息学网站对 miR-25 的潜在靶基因进行预测及整合，进一步结合已报道靶点及功能学实验部分的结果进行汇总分析。

2.4.2 MITF 3'-UTR 报告基因质粒构建

以健康者基因组 DNA 作为模板，设计引物，采用 TA cloning kit 试剂盒克隆 MITF 基因扩增 MITF3'-UTR 长片段 1000-1999nt (1000bp)，琼脂糖凝胶分离 PCR 产物并纯化，并将合成好的序列（表 2-1，序列 1）克隆入 psiCHECKTM-2 载体（见图 2-1），

构建 psiCHECK-MITF WT 重组质粒；对目的基因中 1437-1440 nt 位点进行反向突变（序列 2），构建 psiCHECK MITF MUT 重组质粒，所有构建的质粒均采用酶切图谱和测序加以确认。目的片段序列如下：

表 2-1 合成序列

序列 1
AGTTTTCCATATTTTTACAACACTCACTGGTGGTTTTCCGCATTCTTTGTACACCATGAAAGAA AACTTTTATGCAAGGTCTTGCATTTAAAAGACAGCTTTGCGAATATTTTGTAATTACAGT CTCACTCAGAACTGTTTTTGGACACATTTAAGGTGTAGTATTAATAGGTTAAAACCAGGCT TTCTAGAAAGAATAAACTTACATATTTATTTTTAGGACATGAAAATAGCAATATTCTTGGA GATTGATAACCATAGCATTAAATACGCCATTATGGTCATTTAAATTGGGGTTTATTTTCAGC AAACCTGTTGAATTTATTTTTAAGAAAGAAATACTGTATTGGGAAGTTACTGTTACTTGAT AACAATGTTTTAACAAGAAGCAATGTTATAAAGTTAGTTTCAGTGCATTATCTACTTGTGT AGTCCTAT GCA TAACAGTAGTGTTACATGTATCAAGCCTAGATGTTTTATACAGATGCCA TATAGTGTTATGAGCCAGGCTGTTGAATGGAATTTCTCAGTAGCAGCCTACAACCTGAATAG CAAGTGGCATAAAGCATATCCATTCAGAATGAAGTGCCTTAAATATAGCAGTAGTCTTTTT TGGACTAGCACTGACTGAACTGTAATGTAGGGGAAAGTTTCATGATGGTATCTATAGTCA AGACGAACATGTAGCATGGTGCCTATGTAGACAATATAAGAGCTTCCAATTTTCCTTCAGA TATTTTTAATATTAATATATTTTTAGTGACAGAGTGCCAACCTTCTTTCATCAGGAAACCTTA TTCAGGAGGGTTTTTAAAAAGTGTTTAAATGTCAAATGTGAATTGGTGATGGGTGATGGA GGGTTCAGAGAGGAGTGATCGTCAGATGTGTGAATGGACGGTTTAGGTGAAAATAATCAA CTGCATAGTTCCCATGCACGCTGGGCAATGAGAATCCTTGGAAACATTGGTGATGCTATCA GTTTTATAGCTTTATTTCTTAAGG
序列 2
AGTTTTCCATATTTTTACAACACTCACTGGTGGTTTTCCGCATTCTTTGTACACCCATGAAAGA AACTTTTATGCAAGGTCTTGCATTTAAAAGACAGCTTTGCGAATATTTTGTAATTACAG TCTCACTCAGAACTGTTTTTGGACACATTTAAGGTGTAGTATTAATAGGTTAAAACCAGGC TTTCTAGAAAGAATAAACTTACATATTTATTTTTAGGACATGAAAATAGCAATATTCTTGG AGATTGATAACCATAGCATTAAATACGCCATTATGGTCATTTAAATTGGGGTTTATTTTCAG CAAACTGTTGAATTTATTTTTAAGAAAGAAATACTGTATTGGGAAGTTACTGTTACTTGA TAACAATGTTTTAACAAGAAGCAATGTTATAAAGTTAGTTTCAGTGCATTATCTACTTGTG TAGTCCTAT CGCC TAACAGTAGTGTTACATGTATCAAGCCTAGATGTTTTATACAGATGCC ATATAGTGTTATGAGCCAGGCTGTTGAATGGAATTTCTCAGTAGCAGCCTACAACCTGAATA GCAAGTGGCATAAAGCATATCCATTCAGAATGAAGTGCCTTAAATATAGCAGTAGTCTTTT TTGGACTAGCACTGACTGAACTGTAATGTAGGGGAAAGTTTCATGATGGTATCTATAGTCA AGACGAACATGTAGCATGGTGCCTATGTAGACAATATAAGAGCTTCCAATTTTCCTTCAGA TATTTTTAATATTAATATATTTTTAGTGACAGAGTGCCAACCTTCTTTCATCAGGAAACCTTA TTCAGGAGGGTTTTTAAAAAGTGTTTAAATGTCAAATGTGAATTGGTGATGGGTGATGGA GGGTTCAGAGAGGAGTGATCGTCAGATGTGTGAATGGACGGTTTAGGTGAAAATAATCAA CTGCATAGTTCCCATGCACGCTGGGCAATGAGAATCCTTGGAAACATTGGTGATGCTATCA

GTTTTATAGCTTTATTCTTAAGG

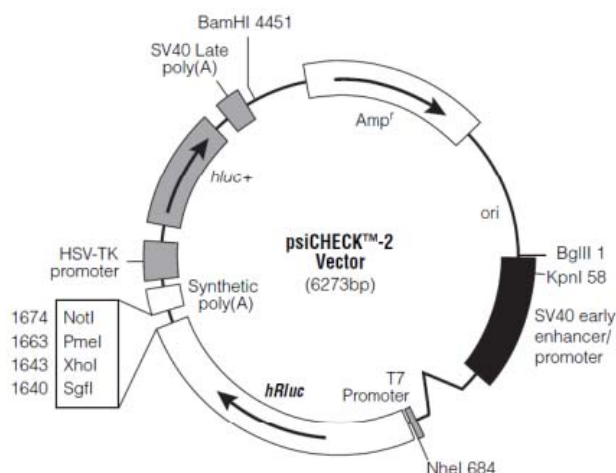


图 2-1 载体图谱 (序列插入位点: XhoI/NotI)

2.4.3 报告基因实验检测

将 miR-25 过表达或对照片段与报告基因质粒共转染黑素细胞, 根据转染质粒的不同分为 MITF WT、MITF MUT 及空白 psiCHECK™ 的三组, 每组均预设三个复孔, 48h 后收集细胞裂解液, 对样本荧光素酶活性进行检测。具体操作步骤如下:

- 1) 每组中取 20 μ l 细胞裂解液, 加入发光板 (GloMax 生物发光检测仪), 读取背景荧光值 2s。
- 2) 每孔加入 100 μ l LAR II 工作液, 混匀, 读值 2s。
- 3) 每孔再加入 100 μ l Stop & Glo® Reagent, 混匀后放入化学发光检测仪中, 读值 2s。保存实验数据。
- 4) 翻译活性以荧光素酶相对活性表示。萤火虫荧光素酶活性值为 F, 海肾荧光素酶活性值为 R, 结果以 Δ 活性倍数=(R/F)样品/(R/F)对照表示。

2.5 qRT-PCR 检测 MITF 等靶基因的 mRNA 表达水平

2.5.1 细胞总 RNA 提取

- 1) 已处理各组细胞弃培养液, 用 4℃ 预冷 PBS 清洗细胞培养板/瓶, 重复三次;
- 2) 每孔加入 1 ml 的 Trizol, 将细胞培养板/瓶置于冰上裂解 10-20 min 后, 用枪头反复吹打, 裂解细胞, 将裂解液转入 1.5 ml EP 管中;
- 3) 每管加入 200 μ l 的三氯甲烷, 盖紧盖子, 用手剧烈震荡 1min, 并于室温静置 10

min, 充分裂解;

- 4) 4℃, 12000 rpm, 离心 15min, 离心后样品分层 (RNA 在上层水相中);
- 5) 取上清至另一 DEPC 处理过的 EP 管, 取 600 μl 的异丙醇加入管中, 上下轻柔颠倒 2~3 次混匀, -20℃ 静置 2 h;
- 6) 4℃, 12000 rpm, 离心 15 min, 弃上清液, 可见 RNA 沉于管底;
- 7) 取 1000μl 75% 乙醇加入沉淀中, 沉淀物吹起即可;
- 8) 4℃, 12000 rpm, 离心 15 min, 弃上清液;
- 9) 将 EP 管倒置于滤纸上 4-5 min, 不要彻底干燥;
- 10) 加入 10 μl DEPC 水溶解 RNA 样品, 备用。

2.5.2 RNA 质检及定量

具体实验步骤同前。

2.5.3 反转录

- 1) 配制如下反应液。

Total RNA	1μg
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5μl
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5μl
5 ×PrimeScript™ Buffer	2μl
RNase Free dH ₂ O	up to 10μl
总体积	10μl

- 2) 反转录程序: 37℃, 15 分钟; 85℃, 5 秒; 4℃ 保存。

2.5.4 PCR 反应

- 1) PCR 反应体系如下:

Template (cDNA)	0.5 μ l
Primer F (10 μ M)	0.75 μ l
Primer R (10 μ M)	0.75 μ l
2 \times Taq Plus PCR Master Mix	5 μ l
ddH ₂ O	3 μ l
总体积	10 μ l

2) 反应程序: 95 °C 变性 15 秒, 60 °C 退火 30 秒 (35 个循环)。

2.6 免疫印迹

2.6.1 细胞培养和处理方法。

具体实验步骤同前。

2.6.2 细胞总蛋白的制备

- 1) 将待处理细胞培养瓶或培养板置于冰上, 移液器弃去陈旧培养基, 用 4°C PBS 洗涤, 重复两次。
- 2) 向细胞培养瓶中加入 1ml 已预冷的 PBS, 使用细胞刮快速的将细胞刮下, 将细胞悬液加入 1.5ml EP 管中, 4°C, 1000 rpm 离心 5min, 吸除废液。
- 3) 每组样品沉淀物中加入 100 μ l 细胞裂解液 RIPA, 0.8 μ l PMSF, 反复吹打, 充分裂解, 放置于冰上, 继续裂解 20 分钟, 4°C 12,000 rpm 离心 25min。
- 4) 上清液为所提取蛋白样品。从其中取少量进行蛋白定量, 其余与 5 \times 蛋白上样缓冲液混合 (4: 1 比例), 煮沸 5min, -20°C 保存备用。

2.6.3 SDS-PAGE 电泳

配制聚丙烯酰胺凝胶 (上层为 6% 浓缩胶, 下层为 12~15% 分离胶), 加蛋白样品。跑上层胶采用稳压 90V, 下层胶采用稳压 120V。室温下电泳, 通过蛋白 Marker 实时观察电泳情况, 待溴酚蓝迁移胶底后终止电泳。

2.6.4 Western Blot

- 1) 电泳结束后, 小心取出凝胶。
- 2) 根据目的蛋白的条带位置, 剪裁适当大小的厚滤纸 2 张和 PVDF 膜 1 张, 切割凝

- 胶，使其与滤纸和 PVDF 膜等大，放置于 4℃ 预冷的转移缓冲液中，浸泡 15min。PVDF 膜先在甲醇中浸泡 15s，去离子水漂洗后，再浸泡于转移缓冲液中，15min。
- 3) 转膜：按滤纸—PVDF 膜—凝胶—滤纸的顺序（从下到上）安装转移装置，恒压 20V，8-14min 进行转膜。
 - 4) 双蒸水漂洗 PVDF 膜，重复 3 次。
 - 5) 使用 10%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2 h，室温，TBST 摇洗 PVDF 膜，重复 3 次，每次 15min。
 - 6) 加入 2%脱脂奶粉稀释一抗，4℃ 孵育过夜，次日，TBST 摇洗 15min，重复三次。
 - 7) 加 2%脱脂奶粉稀释二抗，37℃ 孵育 1h，TBST 摇洗 15min，重复三次。
 - 8) 用去离子水将 PVDF 膜轻柔漂洗，滤纸吸干 PVDF 膜。
 - 9) 避光配制发光液，A 液与 B 液按照 1:1 比例配置。
 - 10) 在膜上滴加适量发光液后，放入化学发光成像系统仪中，扫描，保存图像。

2.7 回复实验

2.7.1 MITF 表达质粒的构建

- 1) 构建含 MITF 全长阅读框架（1260KB）的 GV141-pCMV/MITF 重组体。
设计引物对：
F: 5'-GCTGGATATCTGCAGAATTCATGCTGGAAATGCTAGAATATAATCAC-3'
R: 5'- TTGGTACCGAGCTCGGATCCCTAACAAGTGTGCTCCGTCTCTTC-3'
- 2) 以人 cDNA 为模板，进行扩增。产物经 EcoRI/BamHI 双酶切消化，连接到经相同酶切的 GV141-pCMV 载体（图 2-2）上。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ，进一步挑选单克隆，经细菌扩增后抽提质粒。
- 3) 单克隆质粒送测序鉴定插入序列的正确性。
- 4) 目的片段序列如下：

```
AGCAGAGCTCTCTGGCTaACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAA  
ATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGG  
CCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCATG  
CTGGAAATGCTAGAATATAATCACTATCAGGTGCAGACCCACCTCGAAAAC  
CCCACCAAGTACCACATACAGCAAGCCCAACGGCAGCAGGTAAAGCAGTA
```

CCTTTCTACCACTTTAGCAAATAAACATGCCAACCAAGTCCTGAGCTTGCCA
TGTCCAAACCAGCCTGGCGATCATGTCATGCCACCGGTGCCGGGAGCAG
CGCACCCAACAGCCCCATGGCTATGCTTACGCTTAACTCCAAGTGTGAAAA
AGAGGGATTTTATAAGTTTGAAGAGCAAAACAGGGCAGAGAGCGAGTGCC
CAGGCATGAACACACATTCACGAGCGTCCTGTATGCAGATGGATGATGTAA
TCGATGACATCATTAGCCTAGAATCAAGTTATAATGAGGAAATCTTGGGCTT
GATGGATCCTGCTTTGCAAATGGCAAATACGTTGCCTGTCTCGGGAACTT
GATTGATCTTTATGGAAACCAAGGTCTGCCCCACCAGGCCTCACCATCAG
CAACTCCTGTCCAGCCAACCTTCCCAACATAAAAAGGGAGCTCACAGCGT
GTATTTTTCCACAGAGTCTGAAGCAAGAGCACTGGCCAAAGAGAGGCAG
AAAAAGGACAATCACAACTGATTGAACGAAGAAGAAGATTTAACATAAA
TGACCGCATTAAAGAACTAGGTACTTTGATTCCCAAGTCAAATGATCCAGA
CATGCGCTGGAACAAGGGAACCATCTTAAAAGCATCCGTGGACTATATCCG
AAAGTTGCAACGAGAACAGCAACGCGCAAAGAAGTGTGAAAACCGACAG
AAGAACTGGAGCACGCCAACCGGCATTTGTTGCTCAGAATACAGGAACT
TGAAATGCAGGCTCGAGCTCATGGACTTTCCTTATTCCATCCACGGGTCTC
TGCTCTCCAGATTTGGTGAATCGGATCATCAAGCAAGAACCCGTTCTTGAG
AACTGCAGCCAAGACCTCCTTCAGCATCATGCAGACCTAACCTGTACAACA
ACTCTCGATCTCACGGATGGCACCATCACCTTCAACAACAACCTCGGAACT
GGGACTGAGGCCAACCAAGCCTATAGTGTCCCCACAAAATGGGATCCAA
ACTGGAAGACATCCTGATGGACGACACCCTTTCTCCCGTCGGTGTCACTGA
TCCACTCCTTTCTCAGTGTCCCCGGAGCTTCCAAAACAAGCAGCCGGAG
GAGCAGTATGAGCATGGAAGAGACGGAGCACACTTGTTAGGGATCCGAGC
TCGGTACCAAGCTTAAGTACTACAAGGATGACGATGACAAGGATTACAAA
GACGACGATGATAAGGACTATAAGGATGATGACGACAAATCTAGATAGTTA
AACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTT
GCCCTCCCCCGtGCCTtCC

5) 质粒图谱如图

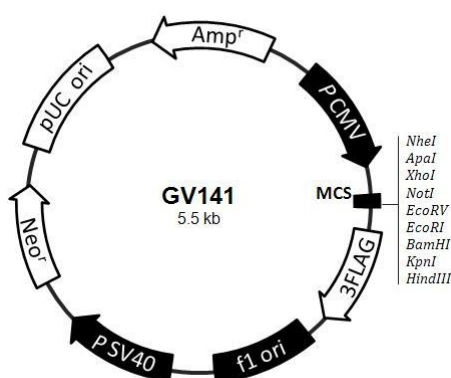


图 2-2 载体图谱 (序列插入位点: XhoI/NotI)

2.7.2 APE1 表达质粒的构建

- 1) 构建含 APE1 全长阅读框架 (957KB) 的 GV141-pCMV/APE1 重组体。设计引物对

F: 5'-GCTGGATATCTGCAGAATTCATGCCGAAGCGTGGGAAAAGGGAG-3'

R: 5'-TTGGTACCGAGCTCGGATCCTCACAGTGCTAGGTATAGGGTG-3'

- 2) 以人 cDNA 为模板,进行扩增。产物经 EcoRI/ BamHI 双酶切消化, 连接到经相同酶切的 GV141-pCMV 载体 (图 2-2) 上。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 进一步挑选单克隆送公司测序, 细菌扩增后抽提质粒。

- 3) 目的片段序列如下:

```
AGCAGAGCTCTCTGGCTaACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAA
ATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGGG
CCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCATG
CCGAAGCGTGGGAAAAGGGAGCGGTGGCGGAAGACGGGGATGAGCTCA
GGACAGAGCCAGAGGCCAAGAAGAGTAAGACGGCCGCAAAGAAAATGA
CAAAGAGGCAGCAGGAGAGGGCCCAGCCCTGTATGAGGACCCCCAGATC
AGAAAACCTCACCCAGTGGCAAACCTGCCACACTCAAGATCTGCTCTTGG
AATGTGGATGGGCTTCGAGCCTGGATTAAGAAGAAAGGATTAGATTGGGTA
AAGGAAGAAGCCCCAGATATACTGTGCCTTCAAGAGACCAAATGTTTCAGA
GAACAAACTACCAGCTGAACTTCAGGAGCTGCCTGGACTCTCTCATCAATA
CTGGTCAGCTCCTTCGGACAAGGAAGGGTACAGTGGCGTGGGCCTGCTTT
```

CCCGCCAGTGCCCACTCAAAGTTTCTTACGGCATAGGCGATGAGGAGCATG
ATCAGGAAGGCCGGGTGATTGTGGCTGAATTTGACTCGTTTGTGCTGGTAA
CAGCATATGTACCTAATGCAGGCCGAGGTCTGGTACGACTGGAGTACCGGC
AGCGCTGGGATGAAGCCTTTCGCAAGTTCCTGAAGGGCCTGGCTTCCCGA
AAGCCCCTTGTGCTGTGTGGAGACCTCAATGTGGCACATGAAGAAATTGAC
CTTCGCAACCCCAAGGGGAACAAAAGAATGCTGGCTTCACGCCACAAGA
GCGCCAAGGCTTCGGGGAATTACTGCAGGCTGTGCCACTGGCTGACAGCT
TTAGGCACCTCTACCCCAACACACCCTATGCCTACACCTTTTGGACTTATAT
GATGAATGCTCGATCCAAGAATGTTGGTTGGCGCCTTGATTACTTTTTGTTG
TCCCCTCTCTGTTACCTGCATTGTGTGACAGCAAGATCCGTTCCAAGGCC
CTCGGCAGTGATCACTGTCCTATCACCTATACCTAGCACTGTGAGGATCCG
AGCTCGGTACCAAGCTTAAGTGACTACAAGGATGACGATGACAAGGATTAC
AAAGACGACGATGATAAGGACTATAAGGATGATGACGACAAATCTAGATAG
TTAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTG
TTTGCCCCTCCCCCGtGCCTtCC

2.8 ELISA 方法检测黑素细胞培养上清细胞因子及趋化因子含量

- 1) 取出所有试剂和样品，缓慢降至室温。
- 2) 稀释标准品至 10 ng/mL，然后依次倍比稀释标准品至 5 ng/mL、2.5 ng/mL、1.25 ng/mL、0.625 ng/mL、0.312 ng/mL、0.156 ng/mL，分别加入 7 个 EP 管中，做好标记，第 8 管加入标准品稀释液（0 ng/mL）作为空白孔。
- 3) 现场配置检测溶液 A（第一抗体工作液）、检测溶液 B（酶标抗体工作液）及洗涤液。
- 4) 标准孔中按照浓度梯度依次加入标准品 100 μ L，样本孔加入细胞培养上清样品 100 μ L，各孔均设立三个复孔，薄膜覆盖酶标板，轻柔混匀。37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。
- 5) 弃废液，每孔加洗涤液 350 μ L，洗涤 4 次，印干。
- 6) 每孔加入 A 液 100 μ L，薄膜覆盖酶标板，轻柔混匀。37 $^{\circ}$ C 孵育 1h，洗涤 2 次。
- 7) 每孔加入 B 液 100 μ L，薄膜覆盖酶标板，轻柔混匀。37 $^{\circ}$ C 孵育 30min，洗涤 2 次。

- 8) 每孔加入底物 90 μL ，薄膜覆盖酶标板，轻柔混匀。37 $^{\circ}\text{C}$ 于暗室显色。
- 9) 每孔加入终止液 50 μL 。
- 10) 酶标仪在 450 nm 波长读取光密度，绘制标准曲线，计算各样本细胞因子的浓度。

2.9 miR-25 对靶基因 BFGF 及 SCF 调控的机制研究

2.9.1 应用生物信息学方法进行 miR-25 的靶基因预测

通过 miRanda (<http://www.microrna.org>), TargetScan (<http://www.targetscan.org>) 及 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) 多个生物信息学网站对 miR-25 的潜在靶基因进行预测及整合，与已检测的细胞因子及趋化因子进行比对。

2.9.2 BFGF 3'-UTR 报告基因质粒构建

以健康者基因组 DNA 作为模板，设计引物，采用 TA cloning kit 试剂盒克隆 BFGF 基因扩增 BFGF3'-UTR 长片段 1700–2699 nt (1000bp)，琼脂糖凝胶分离 PCR 产物并纯化，并将合成好的序列 (表 2-2，序列 1) 克隆入 psiCHECKTM-2 载体 (见图 2-1)，构建 psiCHECK-BFGF WT 重组质粒；对目的基因中 2242-2245 nt 位点进行反向突变 (序列 2)，构建 psiCHECK BFGF MUT 重组质粒，所有构建的质粒均采用酶切图谱和测序加以确认。目的片段序列如下：

表 2-2 合成序列

序列 1
GTCTTACCATAGACTGTCTTACCCATCCCCTGGATATGCTCTTGTTTTTCCCTCTAATAGCTA TGGAAAGATGCATAGAAAGAGTATAATGTTTTAAAACATAAGGCATTCGTCTGCCATTTTTTC AATTACATGCTGACTTCCCTTACAATTGAGATTTGCCCATAGGTTAAACATGGTTAGAAACA ACTGAAAGCATAAAAGAAAAATCTAGGCCGGGTGCAGTGGCTCATGCCTATATTCCCTGCA CTTTGGGAGGCCAAAGCAGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAGTTCAAGACCAACCTGGTGA AACCCCGTCTCTACAAAAAACACAAAAATAGCCAGGCATGGTGGCGTGTACATGTGGTC TCAGATACTTGGGAGGCTGAGGTGGGAGGGTTGATCACTTGAGGCTGAGAGGTCAAGGTT GCAGTGAGCCATAATCGTGCCACTGCAGTCCAGCCTAGGCAACAGAGTGAGACTTTGTCTC AAAAAAGAGAAATTTTCTTAATAAGAAAAGTAATTTTACTCTGATGT GCA AACATTTG TTATTAATTTATTATTTAAGATGGTAGCACTAGTCTTAAATTGTATAAAATATCCCCTAACATG TTAAATGTCCATTTTTATTCAATTATGCTTTGAAAAATAATTATGGGGAAATACATGTTTGTAT TAAATTTATTATTAAGATAGTAGCACTAGTCTTAAATTTGATATAACATCTCCTAACCTTGTTT AAATGTCCATTTTTATTCTTTATGTTTGAAAATAAATTATGGGGATCCTATTTAGCTCTTAGTA CCACTAATCAAAGTTTCGGCATGTAGCTCATGATCTATGCTGTTTCTATGTCGTGGAAGCACC

```
GGATGGGGGTAGTGAGCAAATCTGCCCTGCTCAGCAGTCACCATAGCAGCTGACTGAAAAT
CAGCACTGCCTGAGTAGTTTTGATCAGTTTAACTTGAATCACTAACTGACTGAAAATTGAAT
GGG
```

序列 2

```
GTCTTACCATAGACTGTCTTACCCATCCCCTGGATATGCTCTTGTTTTTCCCTCTAATAGCTA
TGAAAGATGCATAGAAAGAGTATAATGTTTTAAAACATAAGGCATTCGTCTGCCATTTTTTC
AATTACATGCTGACTTCCCTTACAATTGAGATTTGCCCATAGGTTAAACATGGTTAGAAACA
ACTGAAAGCATAAAAGAAAAATCTAGGCCGGGTGCAGTGGCTCATGCCTATATCCCTGCA
CTTTGGGAGGCCAAAGCAGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAGTTCAAGACCAACCTGGTGA
AACCCCGTCTCTACAAAAAACAAAAAATAGCCAGGCATGGTGGCGTGTACATGTGGTC
TCAGATACTTGGGAGGCTGAGGTGGGAGGGTTGATCACTTGAGGCTGAGAGGTCAAGGTT
GCAGTGAGCCATAATCGTGCCACTGCAGTCCAGCCTAGGCAACAGAGTGAGACTTTGTCTC
AAAAAAGAGAAATTTTCCCTAATAAGAAAAGTAATTTTTACTCTGATGTGGCTTACATTTG
TTATTAAATTTATTATTTAAGATGGTAGCACTAGTCTTAAATTGTATAAAATATCCCCTAACATG
TTAAATGTCCATTTTTATTCAATTATGCTTTGAAAAATAATTATGGGGAAATACATGTTTGTAT
TAAATTTATTATTAAGATAGTAGCACTAGTCTTAAATTTGATATAACATCTCCTAACTTGTTT
AAATGTCCATTTTTATTCTTTATGTTTAAAAATAAATTATGGGGATCCTATTTAGCTCTTAGTA
CCACTAATCAAAGTTCGGCATGTAGCTCATGATCTATGCTGTTTCTATGTCGTGGAAGCACC
GGATGGGGGTAGTGAGCAAATCTGCCCTGCTCAGCAGTCACCATAGCAGCTGACTGAAAAT
CAGCACTGCCTGAGTAGTTTTGATCAGTTTAACTTGAATCACTAACTGACTGAAAATTGAAT
GGG
```

2.9.3 SCF 3'-UTR 报告基因质粒构建

以健康者基因组 DNA 作为模板, 设计引物, 采用 TA cloning kit 试剂盒克隆 SCF 基因扩增 SCF3'-UTR 长片段 2600–3599nt (1000bp), 琼脂糖凝胶分离 PCR 产物并纯化, 并将合成好的序列 (表 2-3, 序列 1) 克隆入 psiCHECK™-2 载体 (见图 2-1), 构建 psiCHECK-SCF WT 重组质粒; 对目的基因中 3163-3166 nt 位点进行反向突变 (序列 2), 构建 psiCHECK-SCF MUT 重组质粒, 所有构建的质粒均采用酶切图谱和测序加以确认。目的片段序列如下:

表 2-5 合成序列

序列 1

```
TGAAGTGTTCCCTGGATATTGTATTGTAATTTAATGTGCTTACCACACTGCCACATTTAATG
AGTCAGAGAAAAATTAATTTTTCTTCAATACAATAATAGAACAAGTAGCCTATTCTCTTAA
AAAGTATGTGAAAAGAAAATTATGAAAAAATATGCATACCTAATGAAGTATTGGTTTTAG
TAAGAATTAATACATTTTCATTGAGCTTTAAAGTACTTTGGAGAACTTTGGGGCACGTTT
TCCTACTCTAATTCAACTAAAGTTATAAATAAAGAGAAAACTCATTTCAGAAATCATGGA
```

TTTTAAAAATATTTTACTGCAGCCAAGTTTTTCATTTCAAAAATGTAATTTTCAGTTTGGAGCTT
 TTAGGCATTATGTATATTTAAAAAATATATTCTTCAAAAATGCATTTTGGCATGGTGGGAT
 GGATGTTGCAAAGATATCCGGAGCCTCCAGTCTGTCATTAAGTATGGTAAATCACCT
 CTCTTCTTTGGGTCTCAATTTTTTATTTATCTATATGGTAAACTCAGAGATCACTCCTTAGG
 GGTGAGTCCTATT**GCAA**TATGACCGACAAAGAAGACAAAATAGCATTGAAACTAACCCAT
 ACAAATATCCAACCTCTGGATTCTGTGAATAAGTATCTTGACCATAAAAAGTCATTGCTGT
 TCTTGTCTAATGTAAATAGTGTCCATTAGTAAAAGTGAAATTCAGTCTTAAGTAGGGTG
 AATTGGATCACCATTTACACAAGAGATGGCTTTTTCTTTGCTTGAATAAACATTTTGGAT
 CACCTCAAAGAATGAAAACCAGTAGTACGTTTTAGTCATATTAGTCAGGATGAGAACT
 ATAAGATGTGTGTAACATTTGGAAATGCACCAAAGTGAGCGTTTAAATCTTCTCATTTTAT
 TGAAAATAAGAGCAGAAAATGTAAAATGCTCATGAAGGTTTTGAATGCCAAAAGATATT
 TTAGAATCAATTTATAAAGGGGTAAT

序列 2

TGAAGTGTTCTGGATATTGTATTGTAATTTAATGTGCTTACCACACTGCCACATTTTAATG
 AGTCAGAGAAAATTAATTTTTCTTCAATACAATAATAGAACAAGTAGCCTATTCTCTTAA
 AAAGTATGTGAAAAGAAAATTATGAAAAAATATGCATACCTAATGAAGTATTGGTTTTAG
 TAAGAATTAATACATTTTCATTGAGCTTTAAAGTACTTTGGAGAACTTTGGGGCACGTTT
 TCCTACTCTAATTCAACTAAAGTTATAAATAAAGAGAAAACCTCATTTCAGAAATCATGGA
 TTTTAAAAATATTTTACTGCAGCCAAGTTTTTCATTTCAAAAATGTAATTTTCAGTTTGGAGCTT
 TTAGGCATTATGTATATTTAAAAAATATATTCTTCAAAAATGCATTTTGGCATGGTGGGAT
 GGATGTTGCAAAGATATCCGGAGCCTCCAGTCTGTCATTAAGTATGGTAAATCACCT
 CTCTTCTTTGGGTCTCAATTTTTTATTTATCTATATGGTAAACTCAGAGATCACTCCTTAGG
 GGTGAGTCCTATT**CGCC**TATGACCGACAAAGAAGACAAAATAGCATTGAAACTAACCCAT
 ACAAATATCCAACCTCTGGATTCTGTGAATAAGTATCTTGACCATAAAAAGTCATTGCTGT
 TCTTGTCTAATGTAAATAGTGTCCATTAGTAAAAGTGAAATTCAGTCTTAAGTAGGGTG
 AATTGGATCACCATTTACACAAGAGATGGCTTTTTCTTTGCTTGAATAAACATTTTGGAT
 CACCTCAAAGAATGAAAACCAGTAGTACGTTTTAGTCATATTAGTCAGGATGAGAACT
 ATAAGATGTGTGTAACATTTGGAAATGCACCAAAGTGAGCGTTTAAATCTTCTCATTTTAT
 TGAAAATAAGAGCAGAAAATGTAAAATGCTCATGAAGGTTTTGAATGCCAAAAGATATT
 TTAGAATCAATTTATAAAGGGGTAAT

2.9.4 报告基因实验检测

具体实验步骤同前。

3 结果

3.1 miR-25 对黑素细胞凋亡水平及凋亡相关蛋白表达的调控作用

原代黑素细胞分别转染 miR-25mimics、inhibitor 及对照片段 24 小时后，流式细胞仪检测转染后凋亡情况。如图 2-3A 及 B 所示，单独过表达或抑制 miR-25 不能显著改变黑素细胞凋亡水平。根据既往文献所证实氧化应激在白癜风发病机制中的重

要作用，在原代黑素细胞分别转染 miR-25mimics、inhibitor 及对照片段 24 小时后，进一步给予转染细胞 400uM H₂O₂ 刺激 24 小时，流式细胞仪检测转染后凋亡情况。如图 2-3 中 C 及 D 所示，在 H₂O₂ 即氧化应激条件下，过表达 miR-25 促进黑素细胞凋亡，抑制 miR-25 表达抑制黑素细胞凋亡。

在上述结果的基础上，原代黑素细胞分别转染 miR-25mimics、inhibitor 及对照片段 24 小时后，施加 400uM H₂O₂ 刺激 24 小时，Western blot 等方法分别检测转染后原代黑素细胞 BCL2 等凋亡相关蛋白表达情况。实验结果显示：过表达 miR-25 抑制原代黑素细胞 BCL2 蛋白表达水平，上调 BAX、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 的表达；低表达 miR-25 作用相反（图 2-3E）。

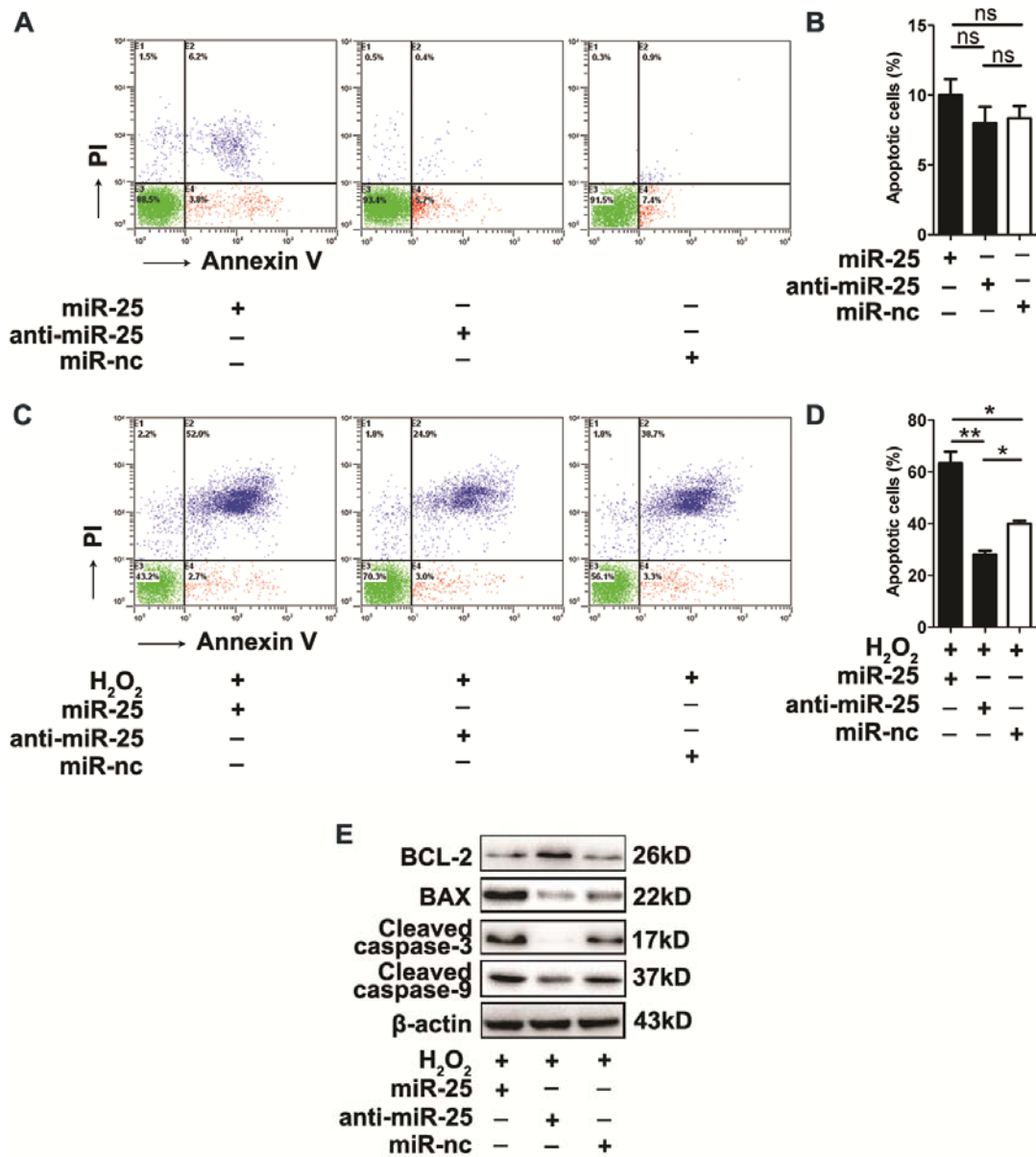


图 2-3 miR-25 对黑素细胞凋亡水平的影响

(A-D) 流式细胞术检测细胞凋亡水平; (E) 细胞凋亡相关蛋白表达水平

3.2 miR-25 对黑素细胞增殖水平的调控作用

miR-25mimics、inhibitor 及对照片段转染原代黑素细胞，24 小时后每孔中加入 1000:1 比例稀释的 EdU 溶液 100uL，孵育 2 小时，细胞固定及染色，荧光显微镜观察。实验结果显示：过表达 miR-25 抑制原代黑素细胞增殖水平 ($P < 0.01$)，低表达 miR-25 促进黑素细胞增殖 ($P < 0.05$)，图 2-4)。

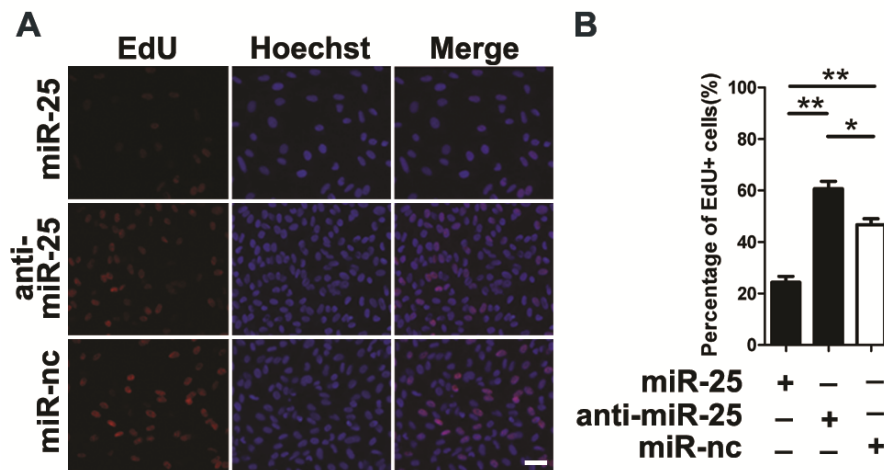


图 2-4 miR-25 对原代黑素细胞增殖水平的影响

3.3 miR-25 对黑素细胞黑素合成和分布的调控作用

在原代黑素细胞中过表达及抑制 miR-25（转染 miR-25mimics、inhibitor 及对照片段 48 小时后），对细胞黑素合成水平、酪氨酸酶活性及黑素合成关键蛋白 TYR、TYRP1、TYRP2 进行测定，固定黑素细胞，anti-gp100 抗体标记黑素小体，Hoechst 33258 染核，细胞免疫荧光实验观察黑素小体分布的变化。

实验结果提示：① miR-25 高表达后，原代黑素细胞酪氨酸酶活性显著降低（ $P < 0.05$ ），抑制 miR-25 表达，酪氨酸酶活性水平升高（ $P < 0.05$ ，图 2-5A）。②高表达 miR-25 后，黑素合成水平相对正常对照有显著降低（ $P < 0.01$ ），抑制 miR-25 表达作用相反（ $P < 0.05$ ，图 2-5B）。③过表达 miR-25 的黑素细胞 TYR、TYRP1、TYRP2 蛋白表达水平均有显著下降，抑制 miR-25，TYR、TYRP1、TYRP2 蛋白表达水平升高（图 2-5C）。④在正常黑素细胞中可见看到黑素小体延树突分布，在转染了 miR-25 过表达质粒的黑素细胞，黑素小体转运过程发生障碍，在核周浓集（图 2-5D）。

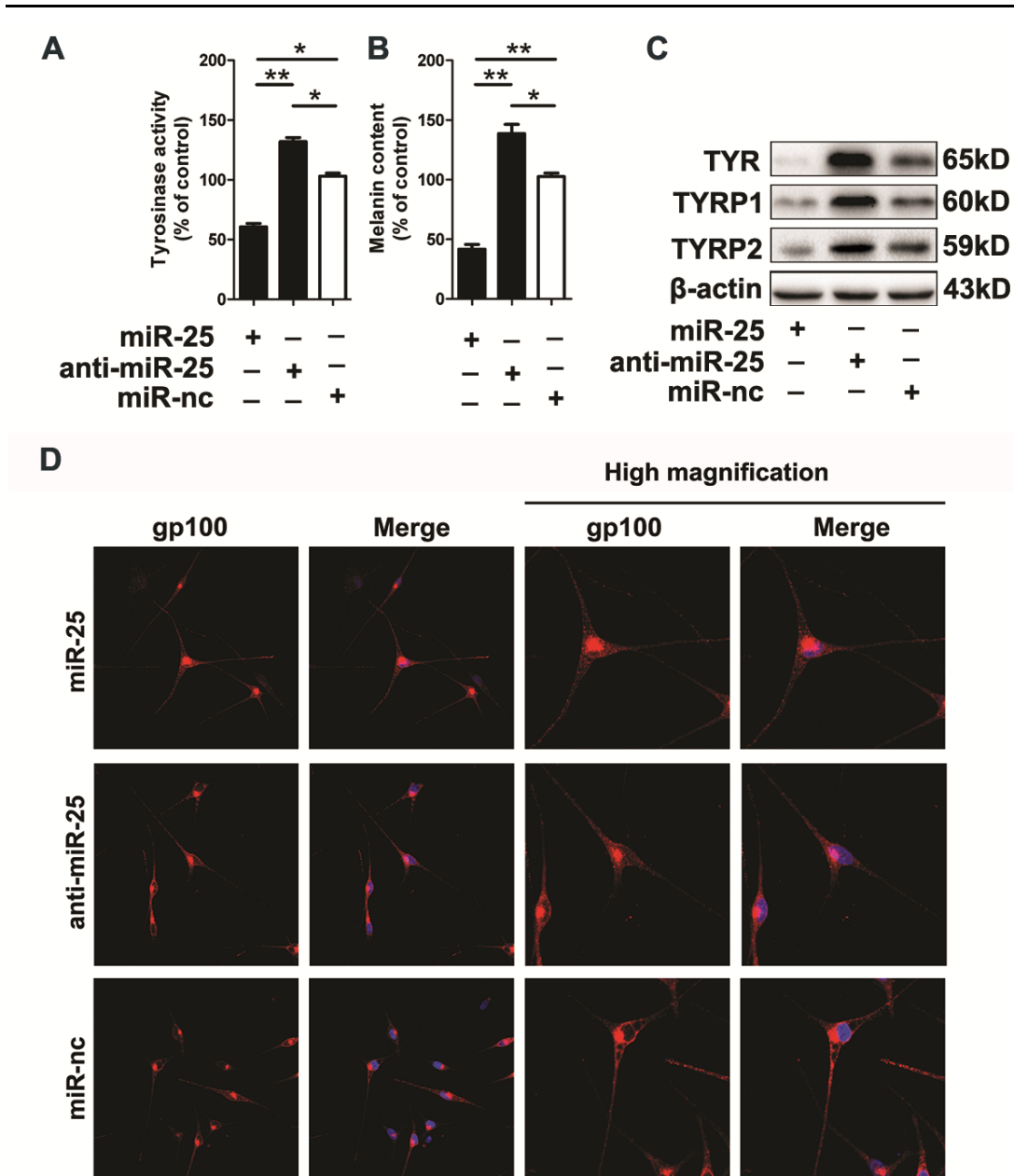


图 2-5 miR-25 对原代黑素细胞细胞功能的影响

(A) 细胞酪氨酸酶活性；(B) 黑素合成水平；(C) TYR、TYRP1、TYRP2 蛋白表达；
(D) 黑素小体转运

3.4 miR-25 对角质形成细胞细胞因子合成及分泌的调控作用

在对白癜风患者皮损及皮损旁的组织进行 miR-25 的原位杂交的实验结果显示，miR-25 在角质形成细胞中同样表达升高。由于已有大量研究表明，角质形成细胞通过分泌细胞因子等方式，参与白癜风疾病的发生发展，因此我们通过进一步的功能学实验，对 miR-25 对角质形成细胞分泌的细胞因子谱的变化进行了观察。

在原代角质形成细胞中转染 miR-25mimics 及对照片段，通过 Western Blot 及 ELISA 等试验方法，分别观察角质形成细胞中对黑素细胞增殖及功能具有促进作用的细胞因子及趋化因子的蛋白表达变化，及细胞培养上清中相关分子的含量。

实验结果如图 2-5 显示：在角质形成细胞中过表达 miR-25 后，干细胞生长因子 SCF 及成纤维细胞生长因子 bFGF 的蛋白表达显著降低（图 2-6A），此外，上述两种分子在细胞培养上清的含量显著降低（ $P < 0.001$ ，图 2-6B），提示在白癜风患者皮损处异常高表达的 miR-25 可能通过抑制角质形成细胞合成及分泌 SCF 及 bFGF，弱化角质形成细胞对黑素细胞的保护作用，从而参与白癜风的进展。

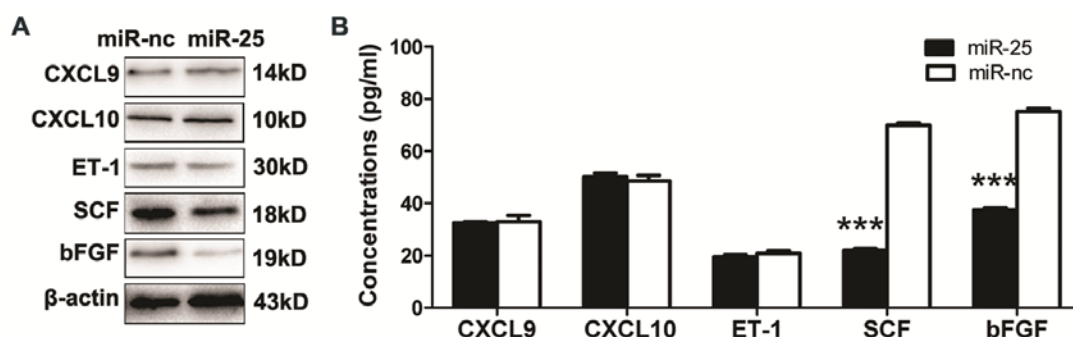


图 2-6 miR-25 对角质形成细胞细胞因子及趋化因子合成及分泌的影响

(A) 角质形成细胞细胞因子及趋化因子的蛋白表达；(B) 角质形成细胞细胞因子及趋化因子的分泌水平

3.5 miR-25 通过靶向调控 MITF 影响黑素细胞活性的具体分子机制

qRT-PCR 方法检测过表达 miR-25 原代黑素细胞 MITF mRNA 表达水平，Western Blot 检测 MITF 蛋白表达水平。实验结果提示：转染 miR-25mimics 的黑素细胞 MITF 的 mRNA 的表达水平与对照组相比没有显著性差异（图 2-7A），蛋白表达水平均有显著下降（图 2-7B）提示 miR-25 对 MITF 的调节可能发生在转录后水平。

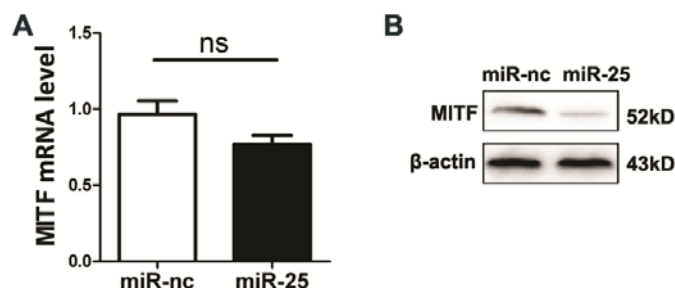


图 2-7 miR-25 对黑素细胞 MITF mRNA 及蛋白表达的影响

根据上述结果，我们进一步通过报告基因转染及荧光素酶翻译活性检测，验证靶基因预测结果。首先，我们设计了两种不同的质粒，第一种质粒插入 MITF 等位基因 3'-UTR 区包含结合种子区在内的 1000bp 长度的片段，第二种质粒为第一种质粒的突变形式，在种子区序列中对 4 个碱基进行反向突变（图 2-8A）。将上述两种质粒及空白对照质粒分别与 miR-25 的 mimics 共转染黑素细胞，24 小时后收获细胞，待检荧光素酶活性。化学发光测定仪检测荧光素酶活性。以相对荧光素酶单位表示，翻译活性以荧光素酶相对活性表示。

实验结果显示：与正常对照相比，包含种子区序列的质粒其荧光强度显著下降，种子区序列突变的质粒其的荧光强度没有显著变化。提示 miR-25 是分别通过与 MITF 3'-UTR 非翻译区种子序列的特异性结合，负向调节 MITF 的表达（图 2-8B）。

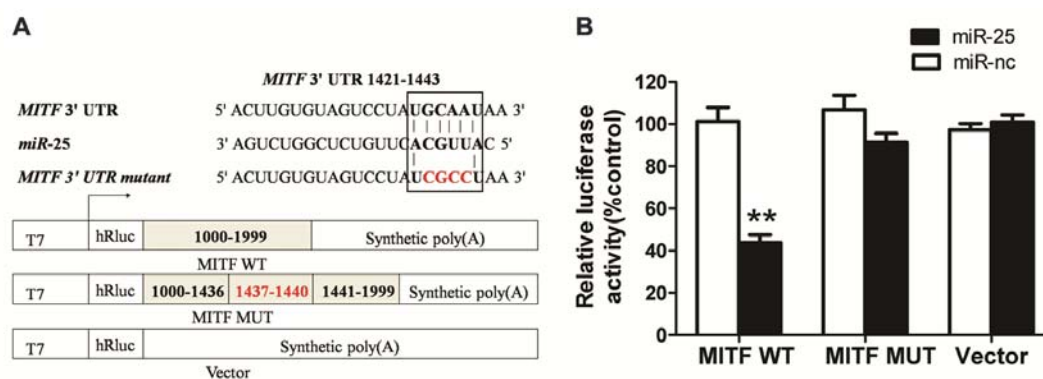


图 2-8 双荧光素酶报告基因实验

3.6 miR-25 靶向调控细胞因子 SCF 及 bFGF 具体分子机制

qRT-PCR 方法检测过表达 miR-25 原代黑素细胞 SCF 及 bFGF mRNA 表达水平。实验结果提示：转染 mir-25mimics 的黑素细胞 SCF 及 bFGF 的 mRNA 的表达水平与对照组相比没有显著性差异（图 2-9A, B），结合 2-6A 中 Western Blot 结果，提示 miR-25 对 SCF 及 bFGF 的调节可能发生在转录后水平。根据上述结果，我们用相似的方法，构建荧光素酶报告系统，验证了 miR-25 对 SCF 及 bFGF 的靶向调节关系。

实验结果显示：与正常对照相比，包含种子区序列的质粒其荧光强度显著下降，种子区序列突变的质粒其的荧光强度没有显著变化。提示 miR-25 是分别通过与 SCF 及 bFGF 基因 3'-UTR 非翻译区种子序列的特异性结合，负向调节 SCF 及 bFGF 的表达（图 2-9D, F）。

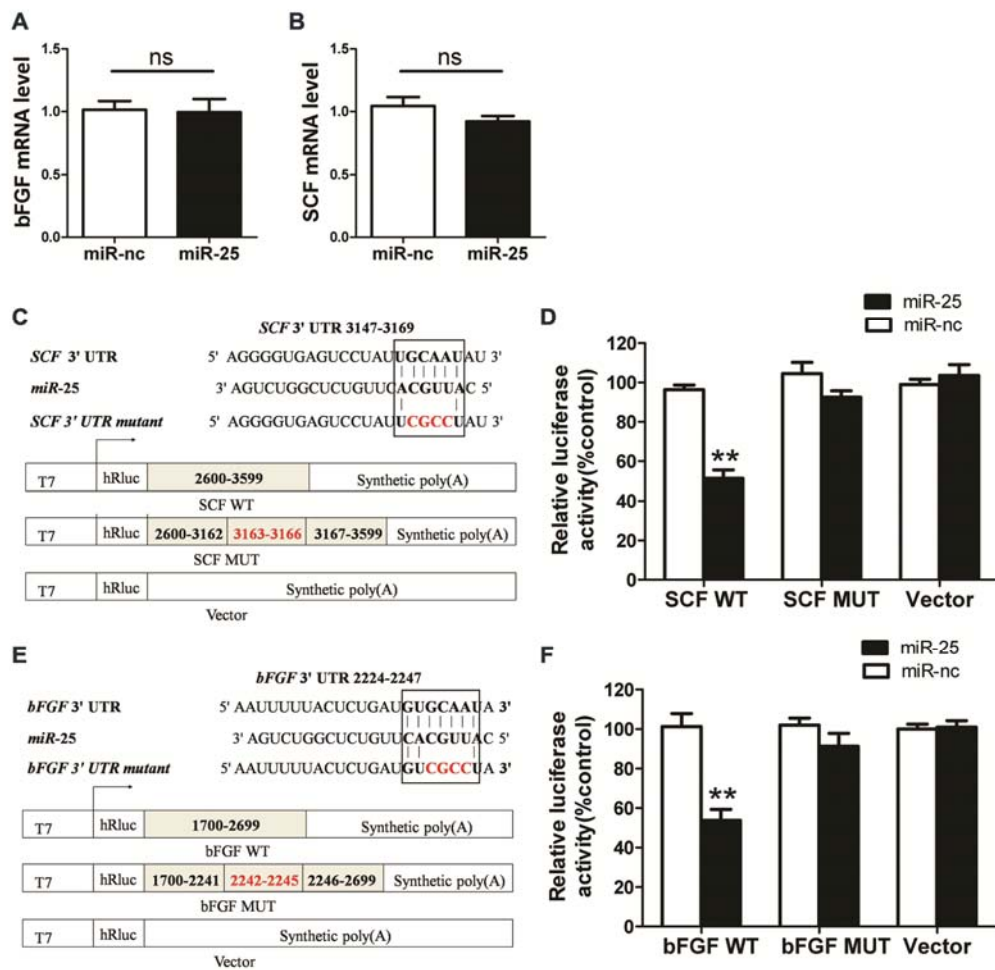


图 2-9 miR-25 对细胞因子 SCF 及 BFGF 转录后调控

3.7 回复实验证实 miR-25 通过调控 MITF 影响黑素细胞的活力及功能

3.7.1 回复实验证实过氧化氢处理条件下，miR-25 对黑素细胞凋亡调控的作用靶点

过表达miR-25及对照片段黑素细胞转染3'UTR缺失的MITF质粒，过氧化氢处理黑素细胞，通过流式细胞术及Western Blot检测细胞凋亡水平及凋亡相关蛋白表达变化。实验结果如下：在H₂O₂即氧化应激条件下，过表达 miR-25促进黑素细胞凋亡，回复MITF表达质粒后，由于质粒中并不包含MITF的3'UTR，因此不受到miR-25的调控，此时，细胞凋亡水平可逆转，凋亡相关蛋白的表达亦发生逆转，说明miR-25通过调控MITF调控黑素细胞凋亡（图2-10）。

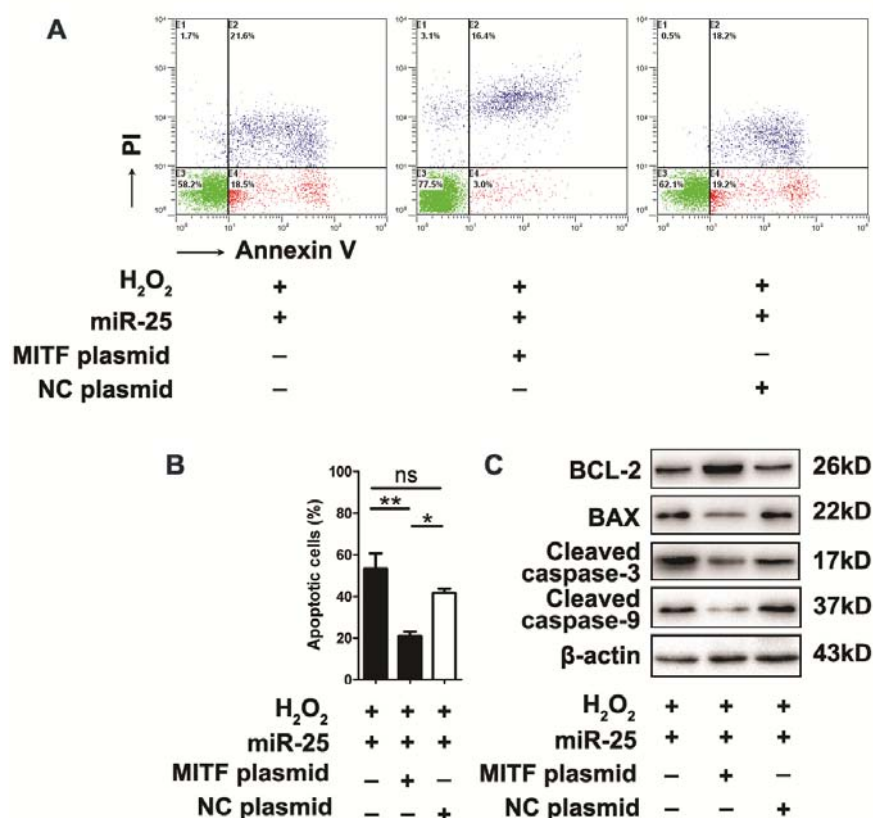


图 2-10 回复实验证实 miR-25 对黑素细胞凋亡影响的作用靶点

(A) 凋亡水平 (B) 凋亡相关蛋白表达

根据前述研究结果，即单独过表达或抑制 miR-25 不能显著改变黑素细胞凋亡水平；在 H₂O₂ 促凋亡条件，过表达 miR-25 促进黑素细胞凋亡，抑制 miR-25 表达抑制黑素细胞凋亡，我们初步推测，miR-25 抑制细胞的抗氧化应激能力，因此在没有氧化应激的存在下，对细胞凋亡没有显著的调控作用，而在有氧化应激存在的时候，抑制细胞抗氧化，细胞凋亡显著增加。查阅文献发现，APE1 (apurinic/aprimidinic endonuclease 1) 是转录因子 MITF 调控的靶基因之一，可以通过它的氧化还原酶活性维持多种转录因子关键半胱氨酸残基的还原状态，从而激活其转录活性。重要的抗氧化核因子 E2 相关转录因子 2 (NRF2) 也受到 APE1 的调控。有研究证实，在氧化应激条件下，干涉 APE1 的表达，细胞凋亡显著升高。那么，miR-25 在氧化应激条件下引起的细胞凋亡是否通过对 MITF-APE1 调控作用所实现？我们通过 Western Blot 检测了过表达 miR-25 后 APE1 蛋白表达变化，如图 2-11A 及 D 所示，在过氧化氢处理组及非处理组均可以观察到过表达 miR-25 可抑制 APE1 的蛋白表达。进一步我们进行了回复实验，在过表达 miR-25 及对照片段黑素

细胞中转染 3'UTR 缺失的 APE1 质粒，过氧化氢处理黑素细胞，流式细胞仪检测细胞凋亡水平。实验结果显示：在 H₂O₂ 即促凋亡条件，过表达 miR-25 促进黑素细胞凋亡，回复 APE1 表达后，细胞凋亡水平可逆转，说明 miR-25 通过调控 APE1 调控黑素细胞凋亡（图 2-11B, C）。在证实了 miR-25 对 MITF-APE1 通路的调控作用的基础上，我们还具体检测了过表达 miR-25 黑素细胞中 APE1 调控的靶基因 NRF2 下游的五个抗氧化应激分子血红素氧合酶-1（heme oxygenase 1, HO-1），超氧化物歧化酶（superoxide dismutase 1, SOD1），过氧化氢酶（catalase, CAT），谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase 1, GPX1）及 NADP(H) 醌氧化还原酶（NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1, NQO1）的 mRNA 表达水平，如图 2-11E 所示，HO-1 ($P < 0.05$) 及 GPX1 mRNA 的表达水平 ($P < 0.01$) 在过表达 miR-25 的黑素细胞中呈现降低趋势，更为完善的阐述了 miR-25 抑制细胞抗氧化能力，在氧化应激条件下促进细胞凋亡的具体机制。

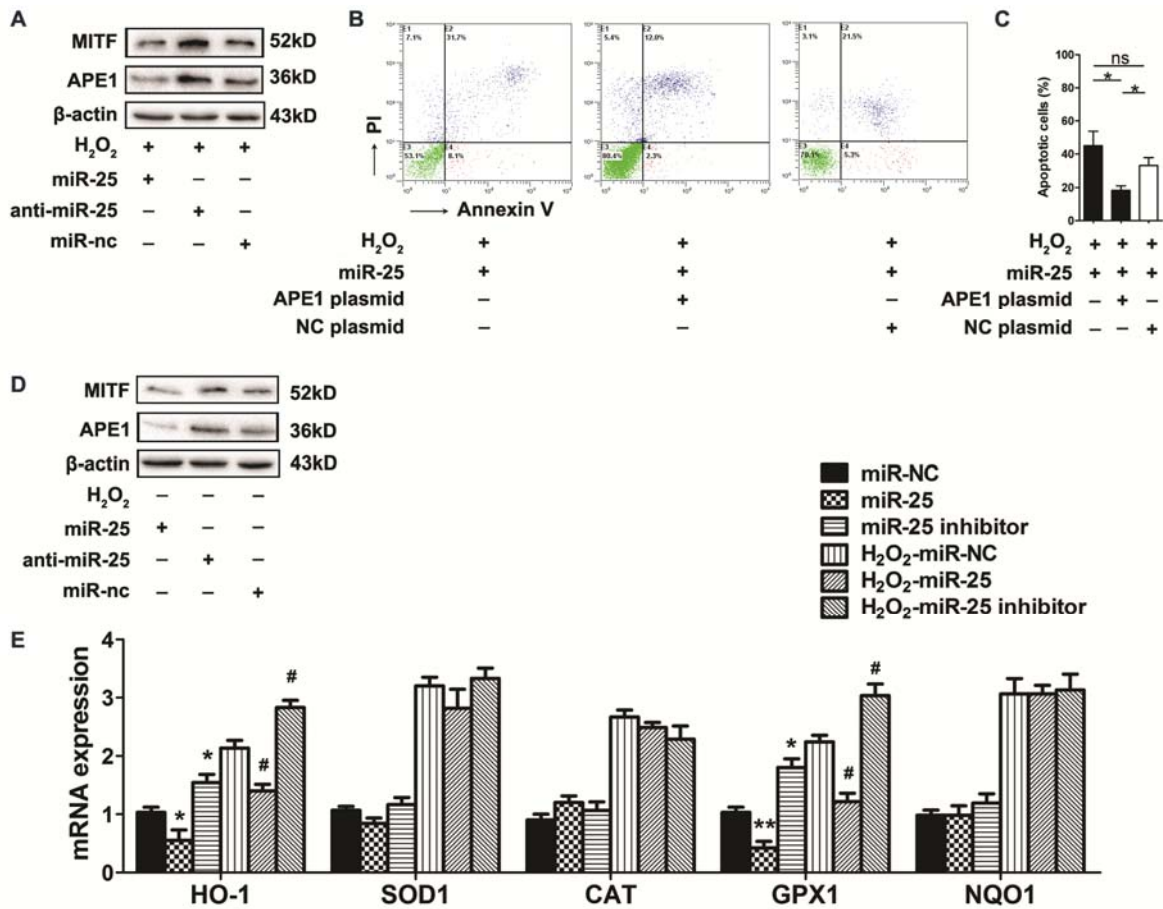


图2-11 miR-25通过APE1调控黑素细胞抗氧化能力

(A) H₂O₂处理条件下, 转染miR-25mimics及抑制片段后MITF及APE1的蛋白表达水平(B-C)细胞流式检测黑素细胞凋亡(D)无H₂O₂处理条件下, 转染miR-25mimics及抑制片段后MITF及APE的蛋白表达水平(E) miR-25对黑素细胞中抗氧化基因表达调控作用

3.7.2 回复实验证实 miR-25 对黑素细胞增殖调控作用的调控靶点

miR-25mimics 及对照片段转染原代黑素细胞, 共转染 3'UTR 缺失的 MITF 质粒及对照质粒, EdU 试剂染色观察处于增殖期的细胞数量。实验结果显示: 过表达 miR-25 抑制原代黑素细胞增殖水平, 回复 MITF 表达后, 细胞增殖抑制可缓解, 说明 miR-25 通过调控 MITF 调控黑素细胞增殖 (图 2-12)。

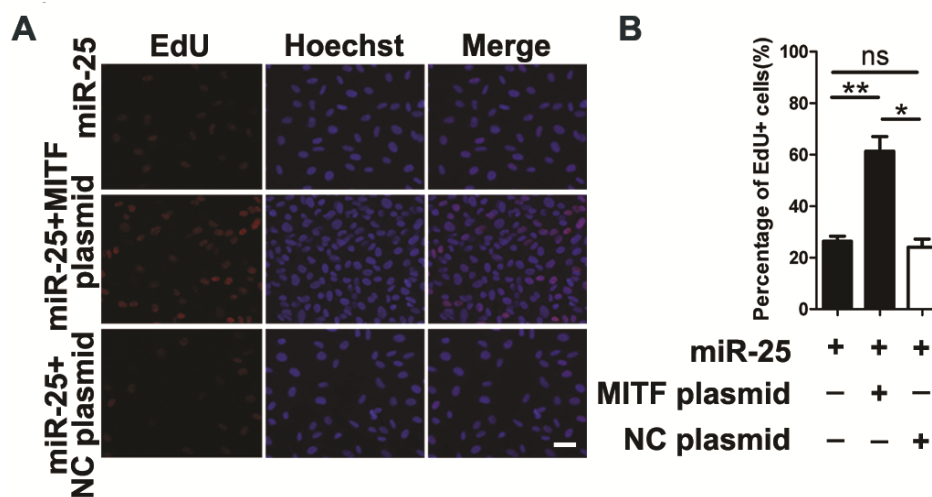


图 2-12 回复实验证实 miR-25 对黑素细胞增殖影响的作用靶点

2.7.3 回复实验证实 miR-25 对黑素细胞黑素合成水平和分布调控的作用靶点

在原代黑素细胞中过表达及抑制 miR-25, 共转染 3'UTR 缺失的 MITF 质粒及对照质粒, 对细胞黑素合成水平、酪氨酸酶活性、黑素合成代谢关键限速酶 TYR、TYRP2 及 TYRP2 蛋白表达及黑素小体分布进行检测, 实验结果提示: miR-25 高表达后, 黑素合成水平、酪氨酸酶活性、黑素合成代谢关键限速酶 TYR、TYRP2 及 TYRP2 蛋白表达显著降低, 黑素小体在核周浓集, 回复 MITF 后, 黑素合成水平、酪氨酸酶活性、黑素合成代谢关键限速酶 TYR、TYRP2 及 TYRP2 蛋白表达水平显著逆转, 黑素细胞延树突分布。说明 miR-25 通过调控 MITF 调节黑素细胞的黑色素合成 (图 2-13)。

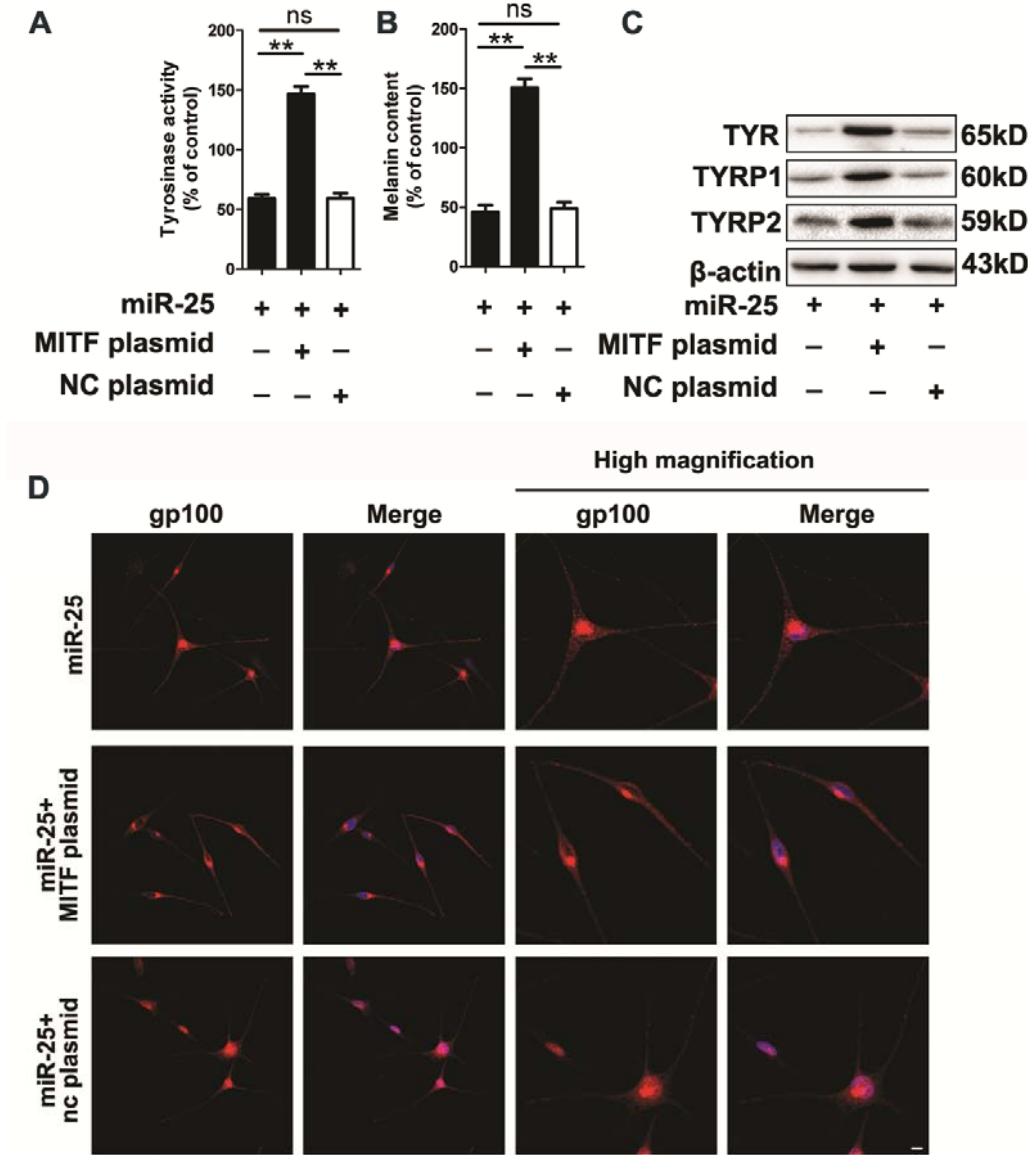


图 2-13 回复实验证实 miR-25 对黑素细胞功能影响的作用靶点

(A) 酪氨酸酶活性检测 (B) 黑素生成量测定 (C) 黑素合成代谢关键酶蛋白检测 (D) 黑素小体转运

4 讨论

课题第一部分的实验证实 miR-25 在白癜风皮损及皮损旁的黑素细胞及角质形成细胞中显著高表达，为了明确异常高表达的 miR-25 是否调控黑素细胞的凋亡、增殖及细胞功能，是否参与疾病的发生及进展及其具体机制如何，我们在原代黑素黑素细胞中干预 miR-25 的表达水平，观察人黑素细胞的生物学行为的变化情况。

首先我们在原代黑素细胞模型中，将 miR-25 过表达片段和抑制物转染入细胞，

功能学实验结果显示：①与对照组细胞相比，单独过表达或抑制 miR-25 黑素细胞凋亡水平未见明显变化，在氧化应激条件下（H₂O₂ 处理），过表达 miR-25 促进黑素细胞凋亡，抑制 miR-25 表达后黑素细胞凋亡水平显著降低；过表达 miR-25 抑制黑素细胞抗凋亡蛋白 BCL2 蛋白表达水平，凋亡蛋白 BAX、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 的表达上调，抑制 miR-25 表达作用相反；②过表达 miR-25 抑制黑素细胞增殖水平，低表达 miR-25 促进黑素细胞增殖；③过表达 miR-25 黑素细胞中，黑素合成水平相对正常对照有显著降低，酪氨酸酶活性显著降低，TYR、TYRP1、TYRP2 蛋白表达水平均有显著下降，黑素小体转运过程发生障碍，在核周浓集；miR-25 低表达的黑素细胞中，黑素合成水平升高，酪氨酸酶活性水平升高，TYR、TYRP1、TYRP2 蛋白表达水平升高，黑素小体延树突分布。

上述结果提示 miR-25 在氧化应激条件下调控黑素细胞凋亡、增殖及功能。预测并验证 miRNA 可能调控的靶基因是研究 miRNA 发挥功能机制的关键。我们通过 3 个专业生物信息学软件（miRanda, PICTAR5 及 Targetscan）预测与黑素细胞凋亡、增殖、功能密切相关的 miR-25 的靶基因，预测结果显示，其中潜在靶基因之一在黑素细胞的分化发育、黑素合成、黑素小体生成及运输等生理功能的调节中发挥关键性作用的转录因子 MITF 可能受到 miR-25 的靶向调控。

MITF 是一种具有特殊结构（基本-螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链）的转录因子[115]。人类 MITF 基因在黑素细胞发育、存活中起着重要作用。首先，皮肤黑素细胞来源于神经嵴，MITF 是神经嵴细胞定向发育分化成黑素细胞过程中最早发生的标志之一[116]，在发育后期，MITF 通过调控 c-kit 信号通路，参与人表皮黑素细胞分裂和黑素化（即分化）过程，MITF 与 c-Kit 的任何一个分子失活时，成黑素细胞出生后可发生但很快消失[117]。目前已证实黑素细胞 MITF 的表达降低与黑素细胞功能障碍或数量减少相关。其次，MITF 可靶向调控酪氨酸酶等黑素合成关键酶的表达，调控生理性黑素生成。其次，激素、应激等内外界刺激导致的色素沉着相关基因表达的变化受到 MITF 的调控。 α -MSH, SCF 等，可通过 CAMP 途径、MAPK 途径等，促进 MITF 激活或降解，进一步通过 MITF 下游酪氨酸酶基因家族成员的表达变化调控黑素的生成。同时， α -MSH 受体 MC-1R 是 MITF 的靶基因，MC-1R 与 MITF 可形成正反馈环路，使激素受体在激素诱导的黑素生成的过程中持续高表达[118]。此外，MITF 通过对非酶类的结构蛋白的表达调控参与对黑素小体生物合成及运输的调节

[119]。实验证明结构蛋白 PMEL17、Rab27a、MYO5A、GPNMB、MLANA、OA1、AIM-1 等是 MITF 调节的靶基因[120-122]。

在我们的研究中，Western Blot 及双荧光素酶报告基因实验证实 miR-25 通过与 MITF 3'UTR 区不完全互补序列进行结合，负向调控 MITF 的表达。MITF 回复实验证实过表达 miR-25 对黑素细胞在氧化应激条件下的凋亡的促进作用、对黑素细胞增殖的抑制作用、以及对黑素小体的合成和转运的抑制作用均通过对 MITF 的表达调控完成。我们的研究在证实 miR-25 对 MITF 的靶向调控关系的基础上，拓宽了目前对黑素细胞中 MITF 上游调控机制的认识，强烈提示白癜风中异常高表达的 miR-25 通过靶向关键分子 MITF，破坏其在维持黑素细胞存活及细胞功能中所起的作用，参与黑素细胞损伤的病理机制。

值得注意的是，在第二部分的研究中我们发现，单独过表达或抑制 miR-25 不能显著改变黑素细胞凋亡水平；在 H₂O₂ 即促凋亡条件下，过表达 miR-25 促进黑素细胞凋亡，抑制 miR-25 表达抑制黑素细胞凋亡，且 MITF 的回复实验证实回复 MITF 可以逆转 miR-25 对黑素细胞在氧化应激条件下的凋亡的促进作用，由此，我们初步推测，miR-25 通过调控 MITF 抑制细胞的抗氧化应激能力，在没有氧化应激刺激的存在下，miR-25 对细胞凋亡没有显著的调控作用，在有氧化应激存在的时候，抑制细胞抗氧化，细胞凋亡显著增加。为证实这一推测，我们查阅文献发现，人类脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 APE1 是转录因子 MITF 调控的靶基因之一[123]，APE1 可作为一种无碱基位点内切酶参与 DNA 碱基切除修复，并可通过维持多种转录因子，如缺氧诱导因子-1 (HIF-1)、活化因子蛋白-1 (AP-1) 及重要的抗氧化核因子 E2 相关转录因子 2 (NRF2) DNA 结合域和转录激活域中半胱氨酸残基还原状态，增强上述转录因子的转录活性[124-126]。有研究证实，MITF 可转录调控 APE1/Ref-1 的表达，用小干扰 RNA 抑制 APE-1 的表达后，随着 DNA 损伤的增多，氧化应激引起的细胞凋亡数显著增多[127, 128]，且 ROS 引起 APE1 mRNA 及蛋白的增加[129]。在上述研究发现的基础上，我们在第二部分实验中观察了过表达 miR-25 黑素细胞中 APE1 mRNA 及蛋白表达水平，并在过表达 miR-25 的黑素细胞中回复 APE1 表达质粒，观察过氧化氢处理后黑素细胞的凋亡水平。我们的研究发现：①miR-25 过表达组 APE1 的 mRNA 及蛋白表达水平均降低；②APE1 表达质粒回复实验证实 miR-25 对黑素细胞在氧化应激条件下的凋亡的促进作用的可能机制是抑制细胞抗氧化能力的降低；

③PCR 实验结果显示 miR-25 过表达组抗氧化分子 HO-1 及 GPX1 表达降低。从而证实 miR-25 通过靶向 MITF 进而调控其下游分子 APE1, 抑制细胞的抗氧化能力, 导致黑素细胞在过氧化氢处理条件下发生凋亡的具体分子机制, 进一步丰富了我们对黑素细胞中氧化平衡调控机制网络的认识。

角质形成细胞和黑素细胞在表皮内互为比邻, 解剖关系密切。既往研究发现白癜风白斑区及白斑边缘表皮 KC 变性, 包括粗面内质网扩张、线粒体肿胀、细胞内水肿, 桥粒及半桥粒消失、细胞外出现颗粒样物质沉积。近年来发现白癜风中受破坏的黑素细胞所处微环境异常, 角质形成细胞通过自分泌和旁分泌方式, 分泌细胞因子, 如 α -MSH、bFGF、ET-1 及 SCF 等, 与黑素细胞表面的受体相结合, 进而影响黑素细胞的存活及细胞功能。其中, 角质形成细胞和成纤维细胞分泌的碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF), 是一种重要的黑素细胞有丝分裂原。研究显示, 在白癜风患者血清及白斑处负压吸引疱液中 bFGF 浓度均显著高于正常对照[130]。窄波紫外线促进角质形成细胞合成释放 bFGF 进而促进黑素细胞增殖[131]。干细胞因子 SCF 是另一种对黑素细胞的迁移、增殖、分化等过程有重要调控作用的细胞因子。当角质形成细胞表达的 SCF 与黑素细胞表达 SCF 的受体 c-kit 结合后, SCF/c-kit 信号即可通过活化磷脂酰肌醇-3 激酶, 保护黑素细胞前体及成熟的黑素细胞, 抑制细胞凋亡[132]。有多项研究证实, 白癜风患者皮损区 SCF 的表达较正常皮肤明显减少[133, 134]。此外, 角质形成细胞还可分泌一种生物活性多肽, 内皮素-1 (endothelin-1, ET-1), ET-1 可参与调控黑素细胞的黏附和迁移[135], 并促使外毛根鞘部的无色素黑素细胞向无色素区域皮肤迁移, 促进皮肤的色素沉着[136]。ET-1 的表达在白癜风患者的皮损区域显著降低[137]。最新研究发现, 除了细胞因子的分泌失调, 研究者在白癜风正常及皮损部位角质形成细胞中检测到趋化因子 CXCL9 及 CXCL10 表达升高, CXCL9 及 CXCL10 已被证实是介导黑素细胞特异性 CD8+T 细胞皮肤趋化和免疫效应功能的重要信号[138]。我们在第一部分的研究中发现, 在白癜风患者皮损及皮损旁组织中, 角质形成细胞也呈现 miR-25 的高表达, 由此推测, 角质形成细胞中异常表达的 miR-25 可能通过影响细胞因子及趋化因子的分泌, 进而参与白癜风黑素细胞的氧化损伤。围绕这一推测, 我们通过 Western Blot、ELISA 及双荧光素酶报告基因实验等方法, 对 miR-25 在角质形成细胞中的生物学作用进行了初步的探索。我们的研究发现: ①在角质形成细胞中过表达 miR-25 后, SCF

及 bFGF 的蛋白表达显著降低,在细胞培养上清的含量显著降低。②生物信息学预测,western blot 及双荧光素酶报告实验结果提示 miR-25 靶向抑制角质形成细胞中 SCF 及 bFGF 的蛋白表达。我们的研究结果证实角质形成细胞中高表达的 miR-25,通过靶向调控 SCF 及 bFGF,弱化角质形成细胞对黑素细胞的保护作用,参与白癜风的发生机制。

综上所述,我们第二部分的研究结果回答了“白癜风患者皮损处 miR-25 异常升高的病理学意义是什么的”的问题,揭示了 miR-25 促进黑素细胞在氧化应激条件下凋亡的具体分子学机制,扩宽了对黑素细胞中关键分子 MITF 基因表达调控及角质形成细胞因子及趋化因子对黑素细胞损伤的保护作用的认识。在第三部分研究中,我们需要解决的重要问题是,白癜风患者皮损处 miR-25 升高的原因及具体分子机制是什么,这一问题的回答将有助于我们进一步探索白癜风发病的原因,为 miR-25 作为分子标志物及治疗靶点的临床研究奠定良好的基础。

第三部分 miR-25 在白癜风皮损中表达上调的机制研究

1 材料

1.1 主要仪器设备

同第一部分实验。

1.2 主要实验试剂

兔抗人 DNMT1 多克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 DNMT3b 多克隆抗体	美国 Abcam 公司
兔抗人 phospho-JNK 单克隆抗体	美国 Cell Signaling Technology 公司
兔抗人 β -actin 单克隆抗体	美国 Abcam 公司
HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体	美国 Pierce 公司
HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体	美国 Pierce 公司
DAPI	碧云天生物技术有限公司

余同第一部分实验。

2 方法

2.1 qRT-PCR 检测细胞 miR-25 表达

2.1.1 细胞总 RNA 提取

- 1) 样品处理：取各组转染后黑素细胞，弃去原培养液，用 1×PBS 清洗细胞，在每孔中加入 1ml RNAiso 试剂后，吹打使细胞充分裂解后将其移至离心管中，混匀震荡。
- 2) 室温下将裂解液放置 10min，每 1ml 裂解液中加入氯仿 200 μ l，涡旋振荡后，静置 5min，并在 4℃ 下离心 15min (12,000 rpm)，随后可观察到样品分为 3 层，其中 RNA 样品位于最上层。

- 3) 吸取 450 μ l 含 RNA 的上清液至新离心管中（含有 600 μ l 预冷冻异丙醇），充分混匀，放置约 10min（-20 $^{\circ}$ C），随后在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10min（12,000 rpm）。
- 4) 弃去上清后将 500 μ l 预冷冻的 75%乙醇加入各离心管中，弹起沉淀后在 4 $^{\circ}$ C 下离心 5min（12,000 rpm），弃去上清。
- 5) 风干，5min，沉淀泛白时加入 35 μ l DEPC 水。标记后-80 $^{\circ}$ C 保存。

2.1.2 miRNA 逆转录

具体实验步骤同第一部分实验。

2.1.3 PCR 反应

具体实验步骤同第一部分实验。

2.1.4 数据分析

以 hsnRNA U6 作为内参，通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算黑素细胞及角质形成细胞 5-aza-dC 或/和 H₂O₂ 处理前后 miR-25 表达水平的差异，计算公式： $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{处理后}} - \Delta Ct_{\text{处理前}}$ ； $\Delta Ct = Ct_{\text{miR-25}} - Ct_{\text{U6}}$ 。分别将处理前细胞中 miR-25 的表达水平设定为 1，以相对比值表示处理后细胞中 miR-25 的表达水平。

2.2 甲基化定量分析

2.2.1 引物设计

引物通过 Sequenom 公司的 Epidesigner (<http://www.epidesigner.com>) 软件设计。

2.2.2 DNA 提取

待测细胞的 DNA 采用 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) 试剂盒提取。所提取 DNA 的浓度采用分光光度计进行定量检测，并且对 DNA 样本通过凝胶电泳进行质检，调整样本浓度（75ng/ μ l），随后在-20 $^{\circ}$ C 下保存。

2.2.3 DNA 样品的处理（试剂盒：EZ DNA Methylation-Gold Kit, ZYMO）

- 1) 在 Wash Buffer 溶液中加入 24mL 无水乙醇，室温保存；
- 2) 将 900 μ L RNase-free 水、50 μ L M-Dissolving Buffer 和 300 μ L M-Dilution Buffer 加入 CT Conversion 试剂中，充分混匀。
- 3) 取约 1.5 μ g DNA 待测样品，用水补足总体积 20 μ L。

- 4) 在对应的样品中加入 130 μ L 配制好的 CT Conversion 试剂, 混匀;
- 5) PCR 程序: 98 $^{\circ}$ C 下 10 min; 64 $^{\circ}$ C 下 2.5h; 4 $^{\circ}$ C 下维持。
- 6) 在 EZ 纯化柱中加入 550 μ L M-Binding Buffer, 并编号, 随后取出处理好的样品并将其加入对应的有 M-Binding Buffer 的 EZ 纯化柱中, 混匀, 离心 30s (13,000rpm);
- 7) 弃去收集管里的液体, 加入 100 μ L Wash Buffer, 离心 30s (13,000rpm);
- 8) 在收集管内加入 190 μ L M-Desulphonation Buffer 并室温放置, 约 15min, 离心 30s (13,000rpm);
- 9) 取 200 μ L Wash Buffer 加入收集管中, 离心 30s (13,000rpm);
- 10) 再取 200 μ L Wash Buffer 加入收集管, 离心 30s (13,000rpm);
- 11) 弃去收集管里的液体, 离心 1min (13,000rpm);
- 12) 将 EZ 纯化柱放入干净的 1.5mL 离心管中, 并加入 20 μ L M-Elution Buffer, 室温放置 10min 后, 离心 1min (13,000rpm);
- 13) 亚硫酸盐处理后, 检测样品浓度。

2.2.4 PCR 扩增反应 (PCR Accessory Set, SEQUENOM 试剂盒)

- 1) 将 3'-(T7)Primer 及 5'-Primer 混合后配制成 Primer Mix 备用 (终浓度均为 1 μ mol/L)。
- 2) PCR 体系反应液的配制见下表:

PCR 体系	Vol. 1 \times (μ L)
Water	1.37
10 \times HotStar Taq buffer	0.50
dNTP mix (25 mmol/L)	0.04
HotStar Taq (5U/ μ L)	0.09
Primer Mix	2.00
Total Volume	4.00
DNA 模板	1.00

- 3) PCR 程序:

循环	温度	时间
	94°C	10 min
	94°C	45sec
10×	62°C, -0.5°C/cycle	48sec
	72°C	1 min
	94°C	45sec
35×	57°C	48sec
	72°C	1 min
	4°C	forever

4) 将 5 μ L, 2 \times Loading Buffer 及 1 μ L PCR 产物加入电泳板内进行电泳。

2.2.5 碱性磷酸酶处理 (MassCLEAVE Kit, SEQUENOM 试剂盒)

1) 碱性磷酸酶处理反应体系 (SAP) 的配制见下表:

SAP 体系	Vol. 1 \times (μ L)
Water	1.37 μ L
SAP enzyme	0.50 μ L
Total Volume	1.60 μ L
PCR 产物	4.00 μ L

2) 充分混匀上述体系内液体, 在 4°C 下离心 1min (1,000rpm)。

3) PCR 程序: 37°C, 20min ; 85°C, 5min; 4°C, 维持。

2.2.6 体外转录 (IVT) 和 RNase 酶切 (MassCLEAVE Kit, SEQUENOM 试剂盒):

1) 体外转录和 RNase 酶切反应体系 (TC) 的配制见下表:

TC 体系	Vol. 1 × (μL)
RNAse free Water	3.15
5 × T7 polymerase buffer	0.89
T Cleavage Mix	0.24
DTT (100mM)	0.22
T7 RNA/DNA Polymerase	0.44
RNAse A	0.06
Total Volume	5.00
SAP 处理后的 PCR 产物	2.00

- 1) 充分混匀上述反应液，封口；在 4°C 下离心 1min (1,000rpm)。
- 2) PCR 程序：37°C，3h； 4°C，维持。

2.2.7 纯化，点样及质谱 (Spectro CHIP® Arrays and Clean Resin Kit, SEQUENOM 试剂盒)

- 1) 在 4°C 下将酶切产物平板离心 1min (1,000rpm)；
- 2) 将 18μLMBG 水加入上述产物中，用电枪 (20MI) 吹吸混匀；用膜封好，在 4°C 下离心 1min (1,000rpm)；
- 3) 在样品中加入树脂 (6mg)；用膜封好，放入杂交炉，室温，30min，10rpm，使样品与树脂充分作用，并在 4°C 下离心 3min (3000 rpm)。
- 4) 将纯化后的产物通过 MassARRAY Nanodispenser RS1000 点样仪 (SEQUENOM) 点样至 384 格式的 SpectroCHIP 芯片 (SEQUENOM) 上，放入 MassARRAY Compact System (SEQUENOM) 进行检测。分析芯片的方法是采用 MALDI-TOF 基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱分析技术，并使用 EpiTYPER 软件 (SEQUENOM) 分析并得出结果。

2.2.8 miR-25 基因启动子区 CpG 岛分析

DNA 模板 CpG 甲基化状态可通过上述检测系统转变成 RNA 酶切片段的序列差异。再通过质谱检测的分子量差异，应用专用的分析软件进行处理，即可得到 DNA 片段的 CpG 甲基化状态。甲基化水平检测数据是以 CpG 单元为单位的。

2.3 组织免疫荧光

具体实验步骤同第一部分实验。

2.4 qRT-PCR 检测 DNMT1 及 DNMT3b mRNA 表达

2.4.1 细胞总 RNA 提取

具体实验步骤同第二部分实验。

2.4.2 RNA 质检及定量

具体实验步骤同第二部分实验。

2.4.3 cDNA 的制备

具体实验步骤同第二部分实验。

2.5.4 PCR 反应

具体实验步骤同第二部分实验。

PCR所用引物序列:

Gene	Primers1 (5'→3')	Product (bp)
DNMT1	F: GGTTTCCTTCCTCAGCTACTGCGA R: CACTGATAGCCCATGCGGACCA	138
DNMT3b	F: GGTGCGTCGTTTCAGGCAGT R: TCCTCATCTTCCCCTCGGTC	305
Actin	F: CCCATCTATGAGGGTTACGC R: TTTAATGTCACGCACGATTTTC	202

2.5 细胞免疫荧光

具体实验步骤同第二部分实验。

2.6 免疫印迹

2.6.1 细胞培养和处理方法

具体实验步骤同第二部分实验。

2.6.2 细胞总蛋白的制备

具体实验步骤同第二部分实验。

2.6.3 SDS-PAGE 电泳

具体实验步骤同第二部分实验。

2.6.4 Western Blot

具体实验步骤同第二部分实验。

3 结果

3.1 过氧化氢及去甲基剂对细胞中 miR-25 表达水平的影响

前述实验中显示白癜风患者皮损区及皮损旁黑素细胞及角质形成细胞中 miR-25 的表达水平异常升高。既往研究及我课题组前期研究结果已证实白癜风患者皮损处氧化应激水平显著升高，此外，氧化应激可通过影响基因启动子区的甲基化水平调控基因表达也已被证实。由此，本课题组通过对黑素细胞进行过氧化氢处理构建氧化应激模型，检测 miR-25 启动子区的甲基化变化，对白癜风中异常高表达 miR-25 的原因及机制进行初步探索。我们分别给予黑素细胞及角质形成细胞 400 μ M H₂O₂ 刺激 24h 处理，构建氧化应激模型，观察 miR-25 的表达变化。实验结果显示，过氧化氢可上调黑素细胞和角质形成细胞中 miR-25 的表达（图 3-1，黑素细胞中 $P < 0.01$ ；角质形成细胞中 $P < 0.05$ ）；在黑素细胞及角质形成细胞中给予去甲基化剂 5-aza-dC 处理组及 5-aza-dC 及 H₂O₂ 与去甲基剂共处理组观察 miR-25 的表达，实验结果显示：去甲基剂处理后 miR-25 表达升高（黑素细胞中 $P < 0.05$ ；角质形成细胞中 $P < 0.05$ ），去甲基剂与过氧化氢共处理组细胞 miR-25 的表达上调更为显著（黑素细胞中 $P < 0.01$ ；角质形成细胞中 $P < 0.05$ ）。

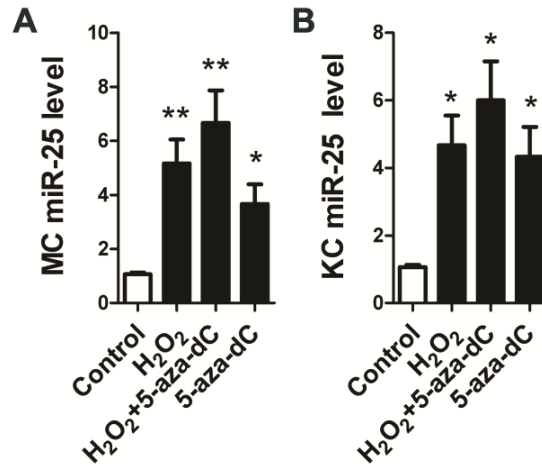


图3-1 过氧化氢及去甲基剂对黑素细胞及角质形成细胞中miR-25表达水平的影响
(A) 黑素细胞 (B) 角质形成细胞

3.2 H₂O₂ 处理对 miR-25 启动子区 CpG 岛甲基化的影响

给予黑素细胞及角质形成细胞 400uM H₂O₂ 刺激 24h 处理，构建氧化应激模型，亚硫酸氢盐修饰后测序检测氧化应激对 miR-25 启动子区 CpG 岛甲基化的影响。如图 3-2A 所示，miR-25 的启动子区分成前 (miR-25-1)、中 (miR-25-2)、后 (miR-25-3) 三段，分别有 46、37 及 41 个 CpG 岛，黑素细胞 miR-25 启动子区中位于前段的 16 号 CpG 岛的甲基化水平最高 (50%)；在角质形成细胞中，位于中段的 22 号 CpG 岛的甲基化水平最高 (43%)。过氧化氢的处理可显著降低 miR-25 启动子区前段和中段 CpG 岛甲基化水平，后段的 CpG 岛甲基化水平未见明显变化，提示过氧化氢可能通过促进启动子区的去甲基化是氧化应激促进 miR-25 高表达的可能机制 (图 3-2)。

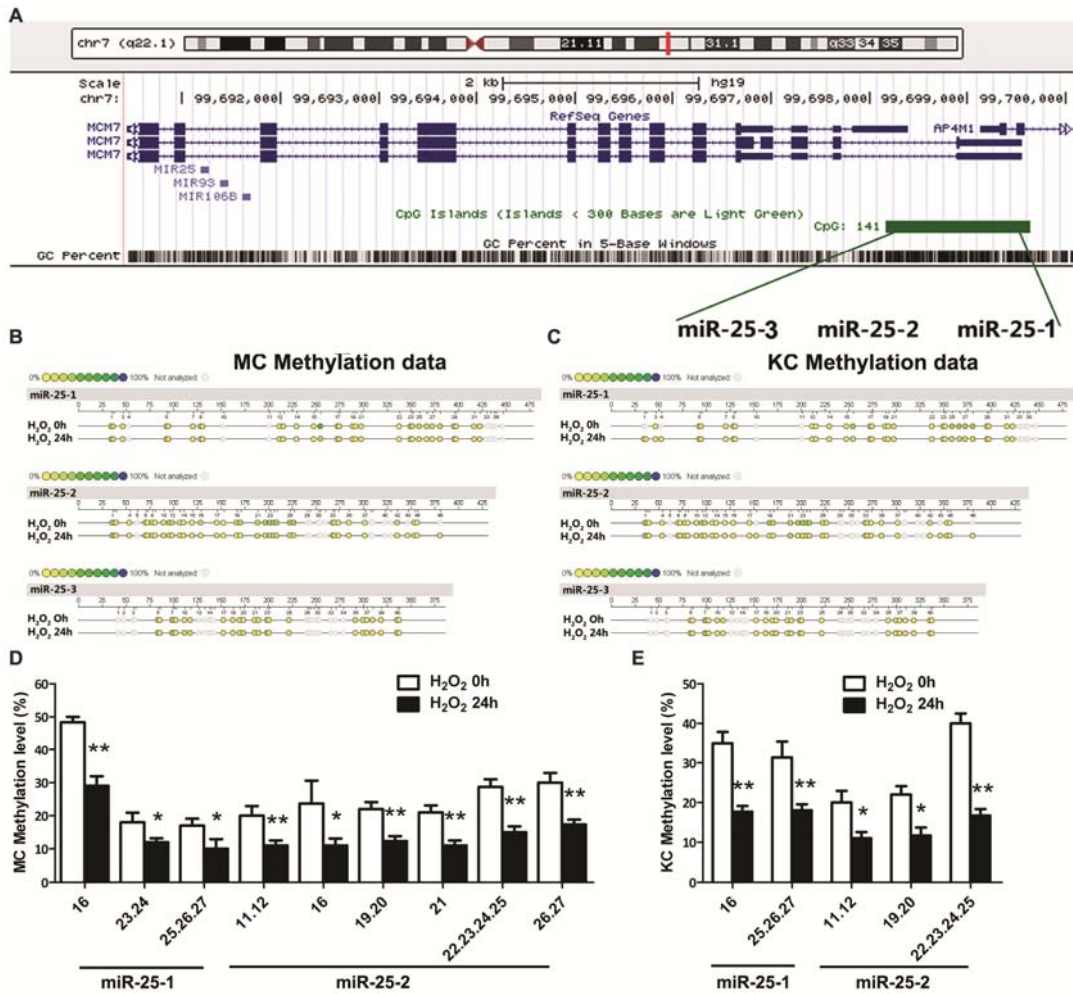


图3-2 亚硫酸氢盐修饰后测序检测氧化应激对miR-25启动子区CpG岛甲基化的影响
(A) miR-25启动子区示意图 (B, D) 黑素细胞; (C, E) 角质形成细胞

3.3 白癜风患者皮损处的 DNMTs 的表达量

既往研究证实, 甲基转移酶 DNMT 家族在 DNA 甲基化的中起到关键修饰作用, 因此我们进一步通过组织免疫荧光检测了白癜风患者皮损处的 DNMTs 的表达量。结果显示: 相对于正常对照皮肤组织, DNMT1 及 DNMT3b 在白癜风患者的皮损处及皮损旁均显著降低, 提示氧化应激处理条件下 miR-25 的启动组区 CpG 岛的甲基化降低的可能原因是 DNMT1 及 DNMT3b 降低所导致 (图 3-3 及图 3-4)。

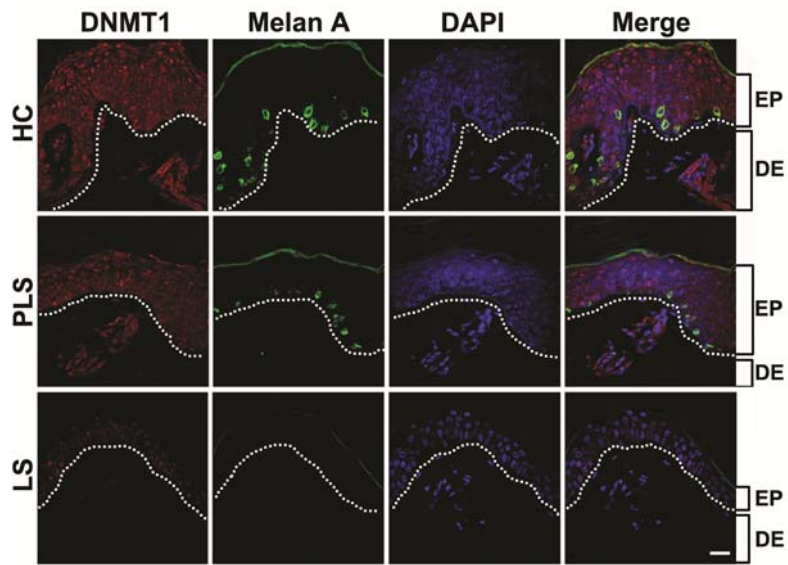


图3-3 白癜风患者皮损处、皮损旁及正常对照皮肤组织中DNMT1的蛋白表达

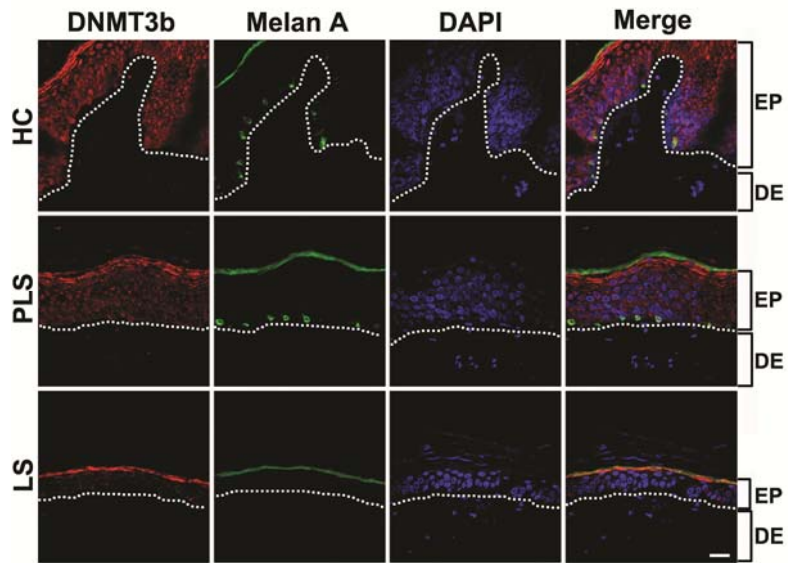


图3-4 白癜风患者皮损处、皮损旁及正常对照皮肤组织中DNMT3b的蛋白表达

3.4 H₂O₂ 处理对黑素细胞及角质形成细胞中 DNMT1 及 DNMT3b 表达的影响

400uM H₂O₂ 刺激 24h 处理黑素细胞及角质形成细胞，qRT-PCR 检测 DNMT1 及 DNMT3b mRNA 表达水平变化，Western Blot 及细胞免疫荧光检测 DNMT1 及 DNMT3b 蛋白表达变化。实验结果显示：氧化应激下调黑素细胞及角质形成细胞中 DNMT1 和 DNMT3b 的 mRNA 及蛋白表达（图 3-5 及图 3-6）。

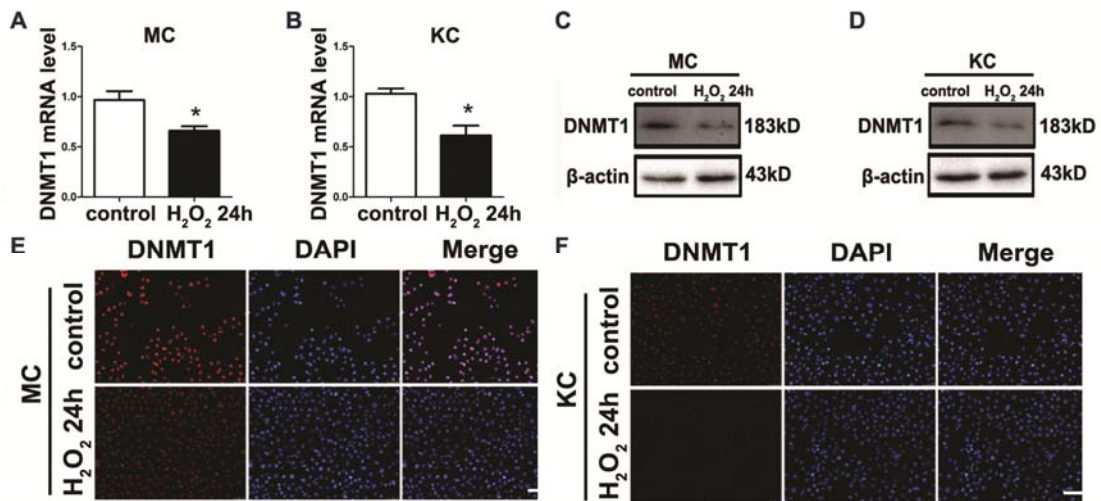


图3-5 H₂O₂处理后黑素细胞及角质形成细胞中DNMT1mRNA及蛋白表达变化 (MC: 黑素细胞; KC: 角质形成细胞)

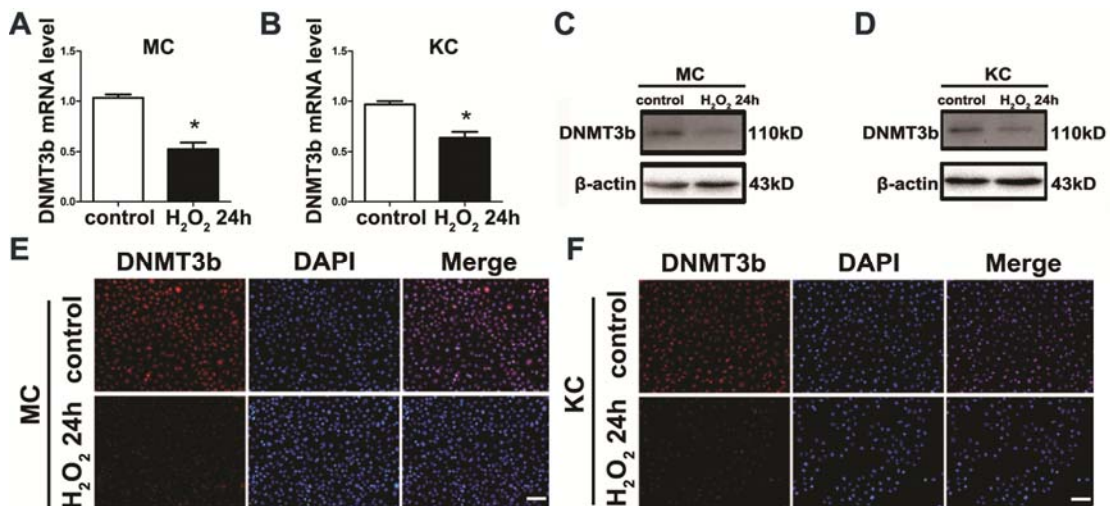


图3-6 H₂O₂处理后黑素细胞及角质形成细胞中DNMT3b的mRNA及蛋白表达变化 (MC: 黑素细胞; KC: 角质形成细胞)

3.5 过氧化氢抑制调控甲基转移酶 DNMT1 及 DNMT3b 的信号通路

Western Blot 检测 400uM H₂O₂ 刺激 24h 处理后黑素细胞及角质形成细胞中磷酸化 JNK 的蛋白表达变化; qRT-PCR 检测黑素细胞及角质形成细胞中给予过氧化氢及在过氧化氢处理同时给予 JNK 的抑制剂 (JNKi) 时 miR-25 的变化。实验结果显示: 过氧化氢处理后黑素细胞及角质形成细胞中 DNMT1 及 DNMT3bmRNA 及蛋白水平降低, 磷酸化 JNK 水平升高, 给予过氧化氢同时给予 JNK 的抑制剂后, DNMT1 及

DNMT3b mRNA 的表达水平可回复。上述研究证实，过氧化氢可能通过上调磷酸化 JNK，抑制 DNMT1 及 DNMT3b 的表达水平，导致 miR-25 的启动子区去甲基化，上调其表达水平（图 3-7）。

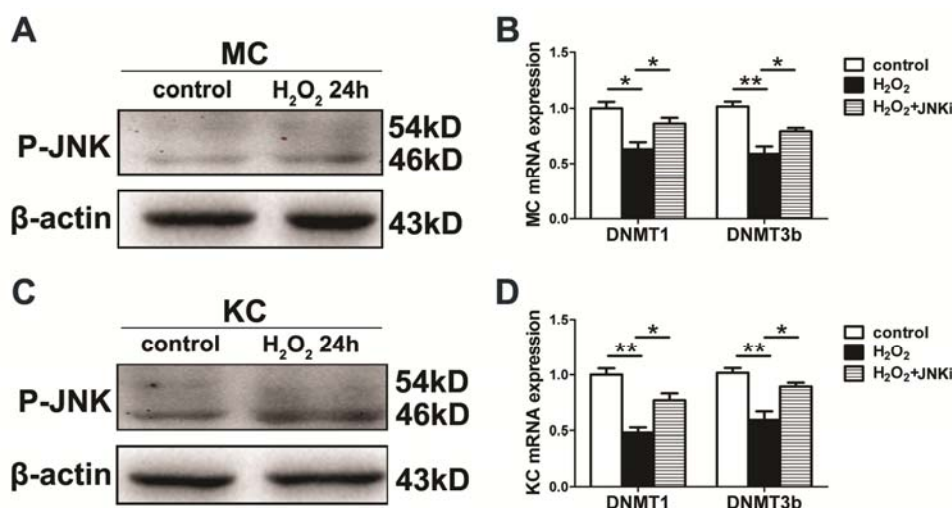


图 3-7 过氧化氢通过调控细胞磷酸化 JNK，影响 DNMT1 及 DNMT3b 的表达

4 讨论

在第一部分的研究中我们发现，白癜风患者皮损及皮损旁 miR-25 均呈现出显著高表达，既往研究显示 miRNA 的表达可在多个水平如 miRNA 的转录、细胞内转运、细胞外转运、成熟及降解等过程中受到氧化应激的调控，而目前尚未有研究报道氧化应激在黑素细胞及角质形成细胞中对 miRNA 表达调控。我们在黑素细胞及角质形成细胞中观察到 H₂O₂ 可显著上调 miR-25 的表达水平，其具体机制是我们在第三部分中研究重点。

目前，表观遗传对 miRNA 分子生物合成的调控机制及参与疾病发生发展等过程是研究者关注的焦点之一。染色质结构异常、加工异常及表观遗传状态改变等多种因素的均影响 miRNA 的水平。在表观遗传方面，miRNA 表达受到 DNA 甲基化不足、CpG 岛过度甲基化以及组蛋白修饰等因素的精确调控[139, 140]。其中，DNA 甲基化是调控 miRNA 表达的主要方式和手段。有研究通过 5-Aza-CdR 诱导或单敲除结肠直肠癌细胞株中 DNMT1 和 DNMT3B 基因等方法观察 miRNA 表达变化情况，发现靶向调控 p53 基因的两个 miRNAs，即 miR-34b 和 miR-34c 受表观遗传调控而表达沉默[141]。此外，研究结果显示，miR-21、miR-203 及 miR-205 在卵巢癌细胞中表达升高，且去甲

基剂5-Aza-CdR处理卵巢癌细胞后上述miRNAs也呈现表达显著升高，由此研究者推测在卵巢癌细胞中DNA甲基化不足是导致miR-21、miR-203和miR-205的异常表达的主要表观遗传调控机制[142]。在上述研究的基础上，我们观察了过氧化氢及去甲基剂对miR-25表达的影响并发现，过氧化氢及去甲基剂均可上调黑素细胞和角质形成细胞中miR-25的表达，共处理组细胞miR-25的表达上调更为显著，提示miR-25的表达可能受到氧化应激及甲基化的调控；亚硫酸氢盐修饰后测序检测结果进一步提示过氧化氢的处理可显著降低miR-25启动子区CpG岛甲基化水平，提示氧化应激促进miR-25表达上调可是通过甲基化调控实现的。那么过氧化氢是如何调控miR-25启动子区甲基化水平的呢？

DNA甲基转移酶（DNA methyltransferase, Dnmt）是DNA甲基化的催化和维持的关键蛋白。其中，DNA复制和修复中过程中的甲基化水平主要由Dnmt1家族维持；而Dnmt3家族则催化CpG从头甲基化[143]。已有研究初步探索了氧化应激对甲基转移酶的影响。神经母细胞中过氧化氢可抑制DNMT1及DNMT3A的表达，进而导致淀粉样蛋白-β前体蛋白（APP）基因启动子区去甲基化从而上调其表达，促进疾病的发生及进展[144]，在红斑狼疮疾病模型中，过氧化氢可抑制DNMT1的表达，调控基因启动子的甲基化水平[145]。我们的研究发现，相对于正常对照皮肤组织，DNMT1及DNMT3b在白癜风患者白斑组织、白斑旁组织中均显著增高；过氧化氢处理后，黑素细胞及角质形成细胞中DNMT1及DNMT3b表达降低。从而证实过氧化氢可通过抑制DNMT1及DNMT3b的水平，导致miR-25启动子区CpG岛去甲基化从而上调miR-25的表达量。

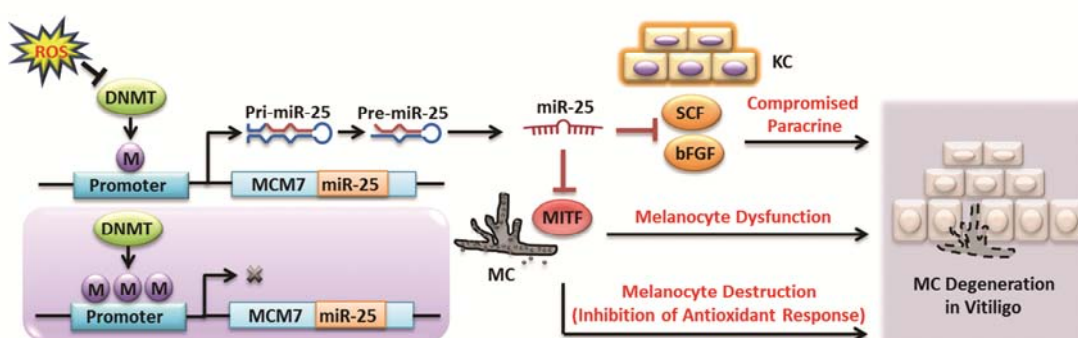


图3-8 miR-25表达异常参与白癜风发病机制示意图

最后，我们对过氧化氢抑制DNMT1及DNMT3B表达的具体分子通路进行了初步探索。过氧化氢处理后黑素细胞及角质形成细胞中JNK磷酸化水平降低，JNK抑制剂

处理黑素细胞及角质形成细胞可逆过氧化氢对DNMT1、DNMT3B表达水平的抑制作用，上述结果提示氧化应激可能通过调控JNK磷酸化水平，进而调控DNMT1及DNMT3b的表达，最终影响miR-25的启动组区CpG岛的甲基化水平，上调miR-25表达水平。至此，我们的研究较为系统的阐明了白癜风患者皮损及皮损旁黑素细胞及角质形成细胞中miR-25异常高表达的具体机制（图3-8）。本部分研究从表观遗传的角度阐明了白癜风疾病特异性miRNAs的具体调控机制，为开展以miR-25为白癜风靶点治疗的临床研究提供理论和实验依据。

小 结

氧化应激在白癜风发生发展中发挥重要作用，miRNA作为重要的基因表达调控分子，在维持皮肤正常结构，调控黑素细胞发育、存活及功能方面具有重要作用，并通过精细调控抗氧化基因以及细胞生成ROS的关键酶的表达，调节细胞氧化还原平衡，此外，氧化应激也可从多个水平影响miRNA的生物合成，进而形成重要的调控网络，维持细胞稳态。

本研究首次发现并证实白癜风患者血清miRNAs表达谱具有疾病特异性，miR-25等白癜风潜在分子标志物的表达与疾病的发生及活动性显著相关；探索了miR-25通过调控MITF，抑制黑素细胞抗氧化能力，促进黑素凋亡、抑制增殖及细胞功能，调控角质形成合成及分泌细胞因子，影响其对黑素细胞的保护作用，从而参与疾病发生及进展的具体机制，得到了以下结论：

1. 发现并证实白癜风患者血清及皮损miRNAs表达谱具有疾病特异性，miR-25等白癜风潜在分子标志物的表达与疾病活动性显著相关。

2. 本研究首次发现并证实miR-25对MITF、SCF和bFGF的靶向调控作用。黑素细胞中异常高表达的miR-25可抑制细胞增殖、黑素合成水平及分布；抑制细胞的抗氧化能力；在氧化应激条件下，显著促进黑素细胞凋亡；miR-25抑制角质形成细胞中生长因子SCF和bFGF的表达和分泌，弱化角质形成细胞在氧化应激环境中对黑素细胞的旁分泌保护作用。

3. 氧化应激可通过抑制白癜风皮损细胞中DNMTs的表达，导致miR-25启动子区的去甲基化，上调miR-25的表达水平。

本研究较系统地阐明白癜风miRNA潜在标志物miR-25与白癜风发生发展相关的可能病理学机制。丰富和完善了白癜风的发病机制，具有较好的创新性。miRNA有望作为高特异性和强敏感性高的新的白癜风分子标志物，为白癜风预防、治疗、新药研发等提供重要参考。

参考文献

1. Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T, Katayama I, Hamzavi I, Lan CC, Goh BK, Anbar T, Silva de Castro C, Lee AY *et al*: Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012, 25(3):E1-13.
2. Zhang Y, Cai Y, Shi M, Jiang S, Cui S, Wu Y, Gao XH, Chen HD: The Prevalence of Vitiligo: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2016, 11(9):e0163806.
3. Howitz J, Brodthagen H, Schwartz M, Thomsen K: Prevalence of vitiligo. Epidemiological survey on the Isle of Bornholm, Denmark. *Arch Dermatol* 1977, 113(1):47-52.
4. Behl PN, Bhatia RK: 400 cases of vitiligo. A clinico-therapeutic analysis. *Indian J Dermatol* 1972, 17(2):51-56.
5. Sehgal VN, Srivastava G: Vitiligo: compendium of clinico-epidemiological features. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2007, 73(3):149-156.
6. Lu T, Gao T, Wang A, Jin Y, Li Q, Li C: Vitiligo prevalence study in Shaanxi Province, China. *Int J Dermatol* 2007, 46(1):47-51.
7. Hann SK, Lee HJ: Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. *J Am Acad Dermatol* 1996, 35(5 Pt 1):671-674.
8. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V: Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol* 2011, 65(3):473-491.
9. Ezzedine K, Diallo A, Leaute-Labreze C, Seneschal J, Boniface K, Cario-Andre M, Prey S, Ballanger F, Boralevi F, Jouary T *et al*: Pre- vs. post-pubertal onset of vitiligo: multivariate analysis indicates atopic diathesis association in pre-pubertal onset vitiligo. *Br J Dermatol* 2012, 167(3):490-495.
10. Silverberg NB: Update on childhood vitiligo. *Curr Opin Pediatr* 2010, 22(4):445-452.
11. Nicolaidou E, Antoniou C, Miniati A, Lagogianni E, Matekovits A, Stratigos A, Katsambas A: Childhood- and later-onset vitiligo have diverse epidemiologic and clinical characteristics. *J*

- Am Acad Dermatol* 2012, 66(6):954-958.
12. Alkhateeb A, Fain PR, Thody A, Bennett DC, Spritz RA: Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res* 2003, 16(3):208-214.
 13. Majumder PP, Nordlund JJ, Nath SK: Pattern of familial aggregation of vitiligo. *Arch Dermatol* 1993, 129(8):994-998.
 14. Nath SK, Majumder PP, Nordlund JJ: Genetic epidemiology of vitiligo: multilocus recessivity cross-validated. *Am J Hum Genet* 1994, 55(5):981-990.
 15. Kim SM, Chung HS, Hann SK: The genetics of vitiligo in Korean patients. *Int J Dermatol* 1998, 37(12):908-910.
 16. Ando I, Chi HI, Nakagawa H, Otsuka F: Difference in clinical features and HLA antigens between familial and non-familial vitiligo of non-segmental type. *Br J Dermatol* 1993, 129(4):408-410.
 17. Mohr J: Vitiligo in a pair of monozygotic twins. *Acta Genet Stat Med* 1951, 2(3):252-255.
 18. Nath SK, Kelly JA, Namjou B, Lam T, Bruner GR, Scofield RH, Aston CE, Harley JB: Evidence for a susceptibility gene, SLEV1, on chromosome 17p13 in families with vitiligo-related systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2001, 69(6):1401-1406.
 19. Boelaert K, Newby PR, Simmonds MJ, Holder RL, Carr-Smith JD, Heward JM, Manji N, Allahabadia A, Armitage M, Chatterjee KV *et al*: Prevalence and relative risk of other autoimmune diseases in subjects with autoimmune thyroid disease. *Am J Med* 2010, 123(2):183 e181-189.
 20. Ochi Y, DeGroot LJ: Vitiligo in Graves' disease. *Ann Intern Med* 1969, 71(5):935-940.
 21. Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, Perheentupa J: Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med* 1990, 322(26):1829-1836.
 22. Dawber RP: Integumentary associations of pernicious anaemia. *Br J Dermatol* 1970, 82(3):221-223.
 23. Zelissen PM, Bast EJ, Croughs RJ: Associated autoimmunity in Addison's disease. *J Autoimmun* 1995, 8(1):121-130.

24. Schallreuter KU, Lemke R, Brandt O, Schwartz R, Westhofen M, Montz R, Berger J: Vitiligo and other diseases: coexistence or true association? Hamburg study on 321 patients. *Dermatology* 1994, 188(4):269-275.
25. Birlea SA, Fain PR, Spritz RA: A Romanian population isolate with high frequency of vitiligo and associated autoimmune diseases. *Arch Dermatol* 2008, 144(3):310-316.
26. Rezaei N, Gavalas NG, Weetman AP, Kemp EH: Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007, 21(7):865-876.
27. Badri AM, Todd PM, Garioch JJ, Gudgeon JE, Stewart DG, Goudie RB: An immunohistological study of cutaneous lymphocytes in vitiligo. *J Pathol* 1993, 170(2):149-155.
28. Le Poole IC, van den Wijngaard RM, Westerhof W, Das PK: Presence of T cells and macrophages in inflammatory vitiligo skin parallels melanocyte disappearance. *Am J Pathol* 1996, 148(4):1219-1228.
29. Ogg GS, Rod Dunbar P, Romero P, Chen JL, Cerundolo V: High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *J Exp Med* 1998, 188(6):1203-1208.
30. Caixia T, Hongwen F, Xiran L: Levels of soluble interleukin-2 receptor in the sera and skin tissue fluids of patients with vitiligo. *J Dermatol Sci* 1999, 21(1):59-62.
31. Basak PY, Adiloglu AK, Ceyhan AM, Tas T, Akkaya VB: The role of helper and regulatory T cells in the pathogenesis of vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2009, 60(2):256-260.
32. Bassiouny DA, Shaker O: Role of interleukin-17 in the pathogenesis of vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 2011, 36(3):292-297.
33. Athar M: Oxidative stress and experimental carcinogenesis. *Indian J Exp Biol* 2002, 40(6):656-667.
34. Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ: Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* 2004, 43(5):326-335.
35. Han D, Williams E, Cadenas E: Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001, 353(Pt 2):411-416.

36. Deffert C, Cachat J, Krause KH: Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections. *Cell Microbiol* 2014, 16(8):1168-1178.
37. Briganti S, Picardo M: Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003, 17(6):663-669.
38. Kulms D, Schwarz T: Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000, 16(5):195-201.
39. Seo SJ, Fisher DE: Melanocyte photobiology, ultraviolet radiation and melanoma. *G Ital Dermatol Venereol* 2010, 145(5):603-611.
40. Abdel-Naser MB, Krasagakis K, Garbe C, Eberle J: Direct effects on proliferation, antigen expression and melanin synthesis of cultured normal human melanocytes in response to UVB and UVA light. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003, 19(3):122-127.
41. Marionnet C, Pierrard C, Lejeune F, Sok J, Thomas M, Bernerd F: Different oxidative stress response in keratinocytes and fibroblasts of reconstructed skin exposed to non extreme daily-ultraviolet radiation. *PLoS One* 2010, 5(8):e12059.
42. Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR: Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid Redox Signal* 2002, 4(4):665-673.
43. Bickers DR, Athar M: Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *The Journal of investigative dermatology* 2006, 126(12):2565-2575.
44. Meredith P, Riesz J: Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem Photobiol* 2004, 79(2):211-216.
45. Mastore M, Kohler L, Nappi AJ: Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine. *FEBS J* 2005, 272(10):2407-2415.
46. Yohn JJ, Norris DA, Yrastorza DG, Buno IJ, Leff JA, Hake SS, Repine JE: Disparate antioxidant enzyme activities in cultured human cutaneous fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* 1991, 97(3):405-409.
47. Schallreuter KU, Wood JM, Berger J: Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. *The Journal of investigative dermatology* 1991, 97(6):1081-1085.
48. Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC, Tobin DJ, Marshall HS, Panske

- A, Panzig E, Hibberts NA: In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999, 4(1):91-96.
49. Puri N, Mojamdar M, Ramaiah A: In vitro growth characteristics of melanocytes obtained from adult normal and vitiligo subjects. *The Journal of investigative dermatology* 1987, 88(4):434-438.
50. Jimbow K, Chen H, Park JS, Thomas PD: Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *Br J Dermatol* 2001, 144(1):55-65.
51. Maresca V, Roccella M, Roccella F, Camera E, Del Porto G, Passi S, Grammatico P, Picardo M: Increased sensitivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. *The Journal of investigative dermatology* 1997, 109(3):310-313.
52. Shalhaf M, Gibbons NC, Wood JM, Maitland DJ, Rokos H, Elwary SM, Marles LK, Schallreuter KU: Presence of epidermal allantoin further supports oxidative stress in vitiligo. *Exp Dermatol* 2008, 17(9):761-770.
53. Gibbons NC, Wood JM, Rokos H, Schallreuter KU: Computer simulation of native epidermal enzyme structures in the presence and absence of hydrogen peroxide (H₂O₂): potential and pitfalls. *The Journal of investigative dermatology* 2006, 126(12):2576-2582.
54. Wu L, Fan J, Belasco JG: MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(11):4034-4039.
55. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A *et al*: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(30):10513-10518.
56. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X *et al*: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008, 18(10):997-1006.
57. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N *et al*: Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008, 3(9):e3148.

58. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovsky A, Fuchs E: Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet* 2006, 38(3):356-362.
59. Andl T, Murchison EP, Liu F, Zhang Y, Yunta-Gonzalez M, Tobias JW, Andl CD, Seykora JT, Hannon GJ, Millar SE: The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles. *Curr Biol* 2006, 16(10):1041-1049.
60. Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E: A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature* 2008, 452(7184):225-229.
61. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR *et al*: microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(24):9136-9141.
62. Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey DG, Erickson PF, Shellman YG, Robinson WA: MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Res* 2008, 68(5):1362-1368.
63. Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, Felli N, Mattia G, Petrini M, Colombo MP *et al*: The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 2008, 68(8):2745-2754.
64. Alexeev V, Yoon K: Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2006, 126(5):1102-1110.
65. Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H: Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 2008, 7(16):2591-2600.
66. Yu J, Ryan DG, Getsios S, Oliveira-Fernandes M, Fatima A, Lavker RM: MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(49):19300-19305.
67. Sonkoly E, Wei T, Janson PC, Saaf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M, Norstedt G, Alenius H, Homey B, Scheynius A *et al*: MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One* 2007, 2(7):e610.

68. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D: NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(33):12481-12486.
69. Sonkoly E, Janson P, Majuri ML, Savinko T, Fyhrquist N, Eidsmo L, Xu N, Meisgen F, Wei T, Bradley M *et al*: MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 126(3):581-589 e581-520.
70. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, Huang X, Zhou H, de Vries N, Tak PP *et al*: MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 2009, 60(4):1065-1075.
71. Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, Xu ZM, Yin YB: Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2007, 16(12):939-946.
72. Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay RE, Michel BA, Distler JH *et al*: MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010, 62(6):1733-1743.
73. Honda N, Jinnin M, Kajihara I, Makino T, Makino K, Masuguchi S, Fukushima S, Okamoto Y, Hasegawa M, Fujimoto M *et al*: TGF-beta-mediated downregulation of microRNA-196a contributes to the constitutive upregulated type I collagen expression in scleroderma dermal fibroblasts. *J Immunol* 2012, 188(7):3323-3331.
74. Sun Q, Zhang Y, Yang G, Chen X, Zhang Y, Cao G, Wang J, Sun Y, Zhang P, Fan M *et al*: Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Res* 2008, 36(8):2690-2699.
75. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, Aqeilan RI, Garzon R, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB: Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2009, 284(23):15676-15684.
76. Zehir A, Hua LL, Maska EL, Morikawa Y, Cserjesi P: Dicer is required for survival of differentiating neural crest cells. *Dev Biol* 2010, 340(2):459-467.
77. Dynoodt P, Mestdagh P, Van Peer G, Vandesompele J, Goossens K, Peelman LJ, Geusens B,

- Speeckaert RM, Lambert JL, Van Gele MJ: Identification of miR-145 as a key regulator of the pigmentary process. *The Journal of investigative dermatology* 2013, 133(1):201-209.
78. Kim KH, Bin BH, Kim J, Dong SE, Park PJ, Choi H, Kim BJ, Yu SJ, Kang H, Kang HH *et al*: Novel inhibitory function of miR-125b in melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014, 27(1):140-144.
79. Jian Q, An Q, Zhu D, Hui K, Liu Y, Chi S, Li C: MicroRNA 340 is involved in UVB-induced dendrite formation through the regulation of RhoA expression in melanocytes. *Mol Cell Biol* 2014, 34(18):3407-3420.
80. Levy C, Khaled M, Robinson KC, Veguilla RA, Chen PH, Yokoyama S, Makino E, Lu J, Larue L, Beermann F *et al*: Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes. *Cell* 2010, 141(6):994-1005.
81. Widlund HR, Fisher DE: Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 2003, 22(20):3035-3041.
82. Wang P, Li Y, Hong W, Zhen J, Ren J, Li Z, Xu A: The changes of microRNA expression profiles and tyrosinase related proteins in MITF knocked down melanocytes. *Mol Biosyst* 2012, 8(11):2924-2931.
83. Adijanto J, Castorino JJ, Wang ZX, Maminishkis A, Grunwald GB, Philp NJ: Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) promotes differentiation of human retinal pigment epithelium (RPE) by regulating microRNAs-204/211 expression. *J Biol Chem* 2012, 287(24):20491-20503.
84. Zhu Z, He J, Jia X, Jiang J, Bai R, Yu X, Lv L, Fan R, He X, Geng J *et al*: MicroRNA-25 functions in regulation of pigmentation by targeting the transcription factor MITF in Alpaca (*Lama pacos*) skin melanocytes. *Domest Anim Endocrinol* 2010, 38(3):200-209.
85. Dong C, Wang H, Xue L, Dong Y, Yang L, Fan R, Yu X, Tian X, Ma S, Smith GW: Coat color determination by miR-137 mediated down-regulation of microphthalmia-associated transcription factor in a mouse model. *RNA* 2012, 18(9):1679-1686.
86. Ungvari Z, Tucsek Z, Sosnowska D, Toth P, Gautam T, Podlitsky A, Csiszar A, Losonczy G, Valcarcel-Ares MN, Sonntag WE *et al*: Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial

- cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013, 68(8):877-891.
87. Ungvari Z, Bailey-Downs L, Sosnowska D, Gautam T, Koncz P, Losonczy G, Ballabh P, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A: Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011, 301(2):H363-372.
88. Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK: Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, 28(3):471-477.
89. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM: Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Mol Aspects Med* 2011, 32(4-6):234-246.
90. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK: The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol* 2013, 85(6):705-717.
91. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, Macotela Y, Russell SJ, Kirkland JL, Blackwell TK, Kahn CR: Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab* 2012, 16(3):336-347.
92. Narasimhan M, Patel D, Vedpathak D, Rathinam M, Henderson G, Mahimainathan L: Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells. *PLoS One* 2012, 7(12):e51111.
93. Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT: microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* 2010, 116(20):4338-4348.
94. Yang M, Yao Y, Eades G, Zhang Y, Zhou Q: MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. *Breast Cancer Res Treat* 2011, 129(3):983-991.
95. Li N, Muthusamy S, Liang R, Sarojini H, Wang E: Increased expression of miR-34a and miR-93 in rat liver during aging, and their impact on the expression of Mgst1 and Sirt1. *Mech Ageing Dev* 2011, 132(3):75-85.
96. Lu SC: Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009, 30(1-2):42-59.
97. Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, Jeney V, Chora A, Palha NR, Rebelo S, Henri A, Beuzard Y, Soares MP: Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell* 2011,

- 145(3):398-409.
98. Eades G, Yang M, Yao Y, Zhang Y, Zhou Q: miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2011, 286(47):40725-40733.
 99. Vasa-Nicotera M, Chen H, Tucci P, Yang AL, Saintigny G, Menghini R, Mahe C, Agostini M, Knight RA, Melino G *et al*: miR-146a is modulated in human endothelial cell with aging. *Atherosclerosis* 2011, 217(2):326-330.
 100. Sripada L, Tomar D, Singh R: Mitochondria: one of the destinations of miRNAs. *Mitochondrion* 2012, 12(6):593-599.
 101. Li P, Jiao J, Gao G, Prabhakar BS: Control of mitochondrial activity by miRNAs. *J Cell Biochem* 2012, 113(4):1104-1110.
 102. Shi Q, Gibson GE: Up-regulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *J Neurochem* 2011, 118(3):440-448.
 103. Favaro E, Ramachandran A, McCormick R, Gee H, Blancher C, Crosby M, Devlin C, Blick C, Buffa F, Li JL *et al*: MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU. *PLoS One* 2010, 5(4):e10345.
 104. Chan SY, Zhang YY, Hemann C, Mahoney CE, Zweier JL, Loscalzo J: MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell Metab* 2009, 10(4):273-284.
 105. Shi YL, Weiland M, Li J, Hamzavi I, Henderson M, Huggins RH, Mahmoud BH, Agbai O, Mi X, Dong Z *et al*: MicroRNA expression profiling identifies potential serum biomarkers for non-segmental vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013, 26(3):418-421.
 106. Wang Y, Wang K, Liang J, Yang H, Dang N, Yang X, Kong Y: Differential expression analysis of miRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with non-segmental vitiligo. *J Dermatol* 2015, 42(2):193-197.
 107. Mansuri MS, Singh M, Begum R: miRNA signatures and transcriptional regulation of their target genes in vitiligo. *J Dermatol Sci* 2016, 84(1):50-58.
 108. Mansuri MS, Singh M, Dwivedi M, Laddha NC, Marfatia YS, Begum R: MicroRNA profiling reveals differentially expressed microRNA signatures from the skin of patients with

- nonsegmental vitiligo. *Br J Dermatol* 2014, 171(5):1263-1267.
109. Dacic S, Kelly L, Shuai Y, Nikiforova MN: miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status. *Mod Pathol* 2010, 23(12):1577-1582.
110. Su ZX, Zhao J, Rong ZH, Geng WM, Wu YG, Qin CK: Upregulation of microRNA-25 associates with prognosis in hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol* 2014, 9:47.
111. Li X, Yang C, Wang X, Zhang J, Zhang R, Liu R: The expression of miR-25 is increased in colorectal cancer and is associated with patient prognosis. *Med Oncol* 2014, 31(1):781.
112. Xu FX, Su YL, Zhang H, Kong JY, Yu H, Qian BY: Prognostic implications for high expression of MiR-25 in lung adenocarcinomas of female non-smokers. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014, 15(3):1197-1203.
113. Yang T, Chen T, Li Y, Gao L, Zhang S, Wang T, Chen M: Downregulation of miR-25 modulates non-small cell lung cancer cells by targeting CDC42. *Tumour Biol* 2015, 36(3):1903-1911.
114. Varga ZV, Kupai K, Szucs G, Gaspar R, Paloczi J, Farago N, Zvara A, Puskas LG, Razga Z, Tiszlavicz L *et al*: MicroRNA-25-dependent up-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) mediates hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress and subsequent dysfunction in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2013, 62:111-121.
115. Tachibana M, Perez-Jurado LA, Nakayama A, Hodgkinson CA, Li X, Schneider M, Miki T, Fex J, Francke U, Arnheiter H: Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Human molecular genetics* 1994, 3(4):553-557.
116. Hou L, Pavan WJ: Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell Res* 2008, 18(12):1163-1176.
117. Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE: MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 1998, 391(6664):298-301.
118. Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP, Ballotti R: Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* 1998, 142(3):827-835.

119. Simon JD, Hong L, Peles DN: Insights into melanosomes and melanin from some interesting spatial and temporal properties. *J Phys Chem B* 2008, 112(42):13201-13217.
120. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE: MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* 2003, 163(1):333-343.
121. Chiaverini C, Beuret L, Flori E, Busca R, Abbe P, Bille K, Bahadoran P, Ortonne JP, Bertolotto C, Ballotti R: Microphthalmia-associated transcription factor regulates RAB27A gene expression and controls melanosome transport. *J Biol Chem* 2008, 283(18):12635-12642.
122. Alves CP, Yokoyama S, Goedert L, Pontes CL, Sousa JF, Fisher DE, Espreafico EM: MYO5A Gene Is a Target of MITF in Melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2017, 137(4):985-989.
123. Liu F, Fu Y, Meyskens FL, Jr.: Mitf regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *The Journal of investigative dermatology* 2009, 129(2):422-431.
124. Xanthoudakis S, Curran T: Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J* 1992, 11(2):653-665.
125. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF: Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996, 271(50):32253-32259.
126. Garcia-Diaz B, Barca E, Balreira A, Lopez LC, Tadesse S, Krishna S, Naini A, Mariotti C, Castellotti B, Quinzii CM: Lack of aprataxin impairs mitochondrial functions via downregulation of the APE1/NRF1/NRF2 pathway. *Human molecular genetics* 2015, 24(16):4516-4529.
127. Fung H, Demple B: A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. *Mol Cell* 2005, 17(3):463-470.
128. Yang S, Misner BJ, Chiu RJ, Meyskens FL, Jr.: Redox effector factor-1, combined with reactive oxygen species, plays an important role in the transformation of JB6 cells. *Carcinogenesis* 2007, 28(11):2382-2390.
129. Ramana CV, Boldogh I, Izumi T, Mitra S: Activation of apurinic/apyrimidinic endonuclease in

- human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(9):5061-5066.
130. Ozdemir M, Yillar G, Wolf R, Yillar O, Unal G, Tuzun B, Tuzun Y: Increased basic fibroblast growth factor levels in serum and blister fluid from patients with vitiligo. *Acta Derm Venereol* 2000, 80(6):438-439.
131. Wu CS, Yu CL, Wu CS, Lan CC, Yu HS: Narrow-band ultraviolet-B stimulates proliferation and migration of cultured melanocytes. *Exp Dermatol* 2004, 13(12):755-763.
132. Larribere L, Khaled M, Tartare-Deckert S, Busca R, Luciano F, Bille K, Valony G, Eychene A, Auburger P, Ortonne JP *et al*: PI3K mediates protection against TRAIL-induced apoptosis in primary human melanocytes. *Cell Death Differ* 2004, 11(10):1084-1091.
133. Bondanza S, Maurelli R, Paterna P, Migliore E, Giacomo FD, Primavera G, Paionni E, Dellambra E, Guerra L: Keratinocyte cultures from involved skin in vitiligo patients show an impaired in vitro behaviour. *Pigment Cell Res* 2007, 20(4):288-300.
134. Lee AY, Kim NH, Choi WI, Youm YH: Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-blistered epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *The Journal of investigative dermatology* 2005, 124(5):976-983.
135. Mou KH, Zhang XQ, Yu B, Zhang ZL, Feng J: Effects of endothelin-1 on melanocyte adhesion and migration. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2004, 29(3):247-251.
136. Ma HJ, Zhu WY, Wang DG, Yue XZ, Li CR: Endothelin-1 combined with extracellular matrix proteins promotes the adhesion and chemotaxis of amelanotic melanocytes from human hair follicles in vitro. *Cell Biol Int* 2006, 30(12):999-1006.
137. Kitamura R, Tsukamoto K, Harada K, Shimizu A, Shimada S, Kobayashi T, Imokawa G: Mechanisms underlying the dysfunction of melanocytes in vitiligo epidermis: role of SCF/KIT protein interactions and the downstream effector, MITF-M. *J Pathol* 2004, 202(4):463-475.
138. Rashighi M, Agarwal P, Richmond JM, Harris TH, Dresser K, Su MW, Zhou Y, Deng A, Hunter CA, Luster AD *et al*: CXCL10 is critical for the progression and maintenance of depigmentation in a mouse model of vitiligo. *Sci Transl Med* 2014, 6(223):223ra223.
139. Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002,

- 3(6):415-428.
140. Fraga MF, Esteller M: Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell Cycle* 2005, 4(10):1377-1381.
141. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008, 68(11):4123-4132.
142. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H *et al*: MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007, 67(18):8699-8707.
143. Cheng X, Blumenthal RM: Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 2008, 16(3):341-350.
144. Gu X, Sun J, Li S, Wu X, Li L: Oxidative stress induces DNA demethylation and histone acetylation in SH-SY5Y cells: potential epigenetic mechanisms in gene transcription in Abeta production. *Neurobiol Aging* 2013, 34(4):1069-1079.
145. Li Y, Gorelik G, Strickland FM, Richardson BC: Oxidative stress, T cell DNA methylation, and lupus. *Arthritis Rheumatol* 2014, 66(6):1574-1582.

附 录

第四军医大学西京医院全军皮肤性病研究所

白癜风治疗观察表

日期: ____年__月__日 DNA号 _____ 编号: _____

病人姓名 _____ 性别: 男 女 年龄 ____ 婚否: 是 否 职业 _____ 民族: 汉, 回 ____ 籍贯 _____

永久通讯地址 _____ 邮政编码 _____

家庭电话号码 _____ 手机 _____ 联系人 _____ (关系) _____

白斑部位: 头皮 眉区 白毛 面 口角 唇 颈 胸 腹 背 腰 臀 会阴 腋 上臂 前臂 手背 手掌 股 小腿 足背 双侧均有: 是, 否
 粘膜: 唇红 外生殖器 乳头 肛周 范围: 局限, 散发, 泛发 斑片数 ____ 片, 最大 ____ × ____ cm². 病期 ____ 月
 白斑: 6 月内未发展, 发展 快速发展 程度: 轻(< 1%体表面积), 中(1~5%体表面积), 重(5~50%), 特重(>50%)
 以往治疗用药: 强的松, 转移因子, 胸腺肽, 其它西药, 敏白灵 _____, 中药 _____
 外用药: 驱虫斑鸠菊, 敏白灵, 补骨脂 白癣净 复氮擦剂 _____ 就诊医院 _____
 用药月数: ____ 停药月数 ____ 疗效: 显效, 好转, 无效, 好转后复发, 发病季节: 不明, 春, 夏, 秋, 冬

诱因: 药物 _____ 农药 _____ 化工产品 _____ 冻伤 烫伤 外伤 精神抑郁 紧张 受刺激
 受惊吓 过度劳累 太阳曝晒 高热 感冒 腹泻 其它 _____ 饮食特殊嗜好: 酸 甜 苦 辣 烟 酒 无
 伴发疾病: 甲亢 甲减 重症肌无力 肾上腺皮功减退 糖尿病 斑秃 红斑狼疮 硬皮病 皮炎 慢性肝炎: (甲 乙 丙) 恶性黑素瘤 其它疾病 _____ 有无晕痣: 有 无

你有双胞胎兄弟姐妹: 无 有 若有, 他们有无白癜风: 无 有
 亲属有无白癜风患者: 有 无 (无者不填写下表) 亲友中有几人患本病 _____, 无

父系亲属		有无白癜风		母系亲属		有无白癜风			
共	人患白癜风	1有	2无	3不清楚	共	人患白癜风	1有	2无	3不清楚
	祖父	1有	2无	3不清楚		外祖父	1有	2无	3不清楚
	祖母	1有	2无	3不清楚		外祖母	1有	2无	3不清楚
	父亲	1有	2无	3不清楚		母亲	1有	2无	3不清楚
祖父(母)的兄弟姐妹	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风		外祖父(母)的兄弟姐妹	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风			
父亲的兄弟姐妹	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风		母亲的兄弟姐妹	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风			
自己的堂兄弟姐妹	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风		自己的表兄弟姐妹	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风			
自己的兄弟姐妹	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风		自己的子女	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风			
自己的子女	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风		自己的外子女	共 ____ 人	其中 ____ 人患白癜风			

分型: 1 皮节型 2 局限 3 肢端型 4 面颈型 5 散发 6 泛发

第四军医大学西京医院

疾病研究调查表（对照组）

填表日期_____年__月__日 编号（对照组）：_____（医生填）
原疾病登记号：_____（医生填） 编号（研究组）：_____（医生填）

姓名：_____ 性别：①男；②女 年龄：__岁 民族：①汉族；②其他_____
婚姻：①未婚；②已婚 体重：__公斤 身高：__厘米 居住地区：__省__市（县）
学历：①文盲；②小学；③初中；④高中或中专；⑤大学或大专；⑥研究生
经济状况：①很差；②差；③一般；④好；⑤很好
职业：①农民；②工人；③学生；④公务员或教师；⑤医务或科研人员；⑥服务行业；⑦商业；⑧军、警；⑨无业或退休；⑩其他_____

你的皮肤属于：①油性；②干性；③中性 肤色：①白；②很白；③黑；④很黑；⑤中等
肤质：①细嫩；②粗糙；③中等

心情：①愉悦；②轻松；③一般；④紧张；⑤非常紧张；⑥抑郁；⑦非常抑郁
性格：①暴躁；②开朗；③内向；④一般 受过惊吓：①无；②偶尔；③5次以上
睡眠情况：①好；②一般；③差；④很差

是否常接触：①农药；②放射线；③染发剂；④化工产品；⑤汽油、煤油、柴油；⑥其它有害物质_____；⑦无
住宅周边有：①化工厂；②火力发电厂；③造纸厂；④化肥厂；⑤钢铁厂；⑥制药厂；⑦印染厂；⑧味精厂；⑨其它有害工厂_____；⑩无
屋内湿度：①干燥；②适中；③轻度潮湿；④很潮湿
住房：①拥挤；②一般；③宽松 住宅噪音：①无；②偶尔；③经常
洗澡的频率：①2次/天；②1次/天；③1-2次/周；④1次/2周；⑤1次/月；⑥半年以上
饮水来源：①自来水；②纯净水；③井水；④河水；⑤湖水
平均每天在户外的时间：①小于2小时；②2-5小时；③5小时以上

太阳晒伤	程度	①红斑；②水疱 ③无
	16岁前晒伤次数	①无；②1-2次；③3-5次；④6-10次；⑤10次以上

饮食喜好	味道	①酸；②甜；③苦；④辣 ⑤咸 ⑥无
	种类	①蔬菜水果；②肉类；③蛋类；④奶制品；⑤豆制品；⑥碳酸饮料 ⑦糖果及巧克力 ⑧冰淇淋
	禁忌	（您平常不喜欢吃的食物）1.无 2._____

饮酒 情况	每日量	①从不; ②偶尔; ③少于1两; ④1-5两; ⑤5两以上
	开始时间	10岁以前; ②10-20岁; ③20以后
	酒精度数	①高(50度以上); ②中(10-50度); ③低(10度以下)

吸烟 情况	每日量	①从不; ②偶尔; ③少于5支; ④5-10支; ⑤10-20支 20支以上
	开始时间	①10岁以前; ②10-20岁; ③20-40岁; ④40岁以上
	烟档次	①高档(10元以上); ②中档(5-10元); ③低档(5元以下)

是否常在有吸烟的环境中: ①是; ②否 ③偶尔

在家	①从不; ②偶尔; ③经常	在工作室	①从不; ②偶尔; ③经常
----	---------------	------	---------------

饮用茶叶的频率: ①从不; ②偶尔; ③经常

饮用咖啡的频率: ①从不; ②偶尔; ③经常

是否受过下列损伤: ①手术; ②烫伤; ③摔伤; ④擦伤; ⑤晒伤; ⑥冻伤; ⑦无

现在患有何种疾病: ①无; ②还未诊断清楚; ③_____ ; ④_____

患过哪些疾病 A: ①白癜风; ②银屑病; ③甲亢; ④斑秃; ⑤类风湿性关节炎; ⑥硬皮病; ⑦特应性皮炎; ⑧ 红斑狼疮; ⑨慢性肾上腺功能不全

患过哪些疾病 B: ①痤疮; ②扁挑体炎; ③肝炎; ④真菌感染; ⑤疣; ⑥无

亲属是否患过白癜风: ① 是 ② 否 共几人患过_____人

患者是: ①父母、子女、兄弟姊妹; ②爷爷奶奶、外公外婆、孙子女; ③ 叔姑、姨舅; ④其他

亲属是否患过银屑病: ① 是 ② 否 共几人患过_____人

患者是: ①父母、子女、兄弟姊妹; ②爷爷奶奶、外公外婆、孙子女; ③ 叔姑、姨舅; ④其他

亲属是否患过痤疮: ① 是 ② 否 共几人患过_____人

患者是: ①父母、子女、兄弟姊妹; ②爷爷奶奶、外公外婆、孙子女; ③ 叔姑、姨舅; ④其他

女性请填写: 月经初潮年龄_____岁 绝经年龄_____岁

是否规律: ①规律; ②偶尔不规律; ③不规律 ④绝经; ⑤无经

有无痛经: ①有; ②无 疼痛程度: ①轻; ②较重; ③严重 ④无痛

若一些化验结果不正常, 是否通知你: ①是; ②否 若填是, 请留联系方式

永久通讯地址 _____ 邮政编码 _____

家庭电话号码 _____ 手机 _____ 联系人 _____ (关系)

我所填写资料均是真实的, 我自愿提供本个人资料及血液样本, 仅供研究用, 不得用于任何商业目的, 不得泄露我的个人资料。

志愿者签字 _____

日期 _____

个人简历和研究成果

个人基本情况

姓名：石琼

性别：女

出生年月：1986年1月

政治面貌：党员

籍贯：陕西子长

2004年9月-2009年6月 第四军医大学五年制临床医学专业

2010年9月-至今 第四军医大学西京医院皮肤科 硕博学位连读

2015年7月-2017年4月 美国杜克大学肿瘤研究中心 博士联合培养

已发表及接受的文章

1. **Qiong Shi**[#], Weigang Zhang[#], Sen Guo[#], Zhe Jian, Shuli Li, Kai Li, Rui Ge, Wei Dai, Gang Wang, Tianwen Gao, Chunying Li^{*}. Oxidative stress-induced overexpression of miR-25: the mechanism underlying the degeneration of melanocytes in vitiligo. *Cell Death and Differentiation* 2016, 23(3): 496-508. (IF = 8.218, 第一作者)
2. **Qiong Shi**[#], Hongliang Liu[#], Peng Han[#], Chunying Li, Yanru Wang, Wenting Wu, Dakai Zhu, Christopher I. Amos, Shenyang Fang, Jeffrey E. Lee, Jiali Han^{*}, Qingyi Wei^{*}. Genetic Variants in WNT2B and BTRC Predict Melanoma Survival. *J Invest Dermatol*. doi: 10.1016/j.jid.2017.04.023 (Epub ahead of print, IF = 6.915, 第一作者)
3. **Qiong Shi**[#], Kai Li[#], Jun Fu, Yanchun Wang, Cuiling Ma, Qiang Li, Chunying Li^{*}, Tianwen Gao^{*}. Comparison of the 308-nm excimer laser with the 308-nm excimer lamp in the treatment of vitiligo--a randomized bilateral comparison study. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine* 2013, 29:27-33. (IF = 1.897, 第一作者)
4. Weinan Guo[#], Huina Wang[#], Yuqi Yang[#], Sen Guo[#], Weigang Zhang, Yu Liu, Xiuli Yi, Jingjing Ma, Tao Zhao, Lin Liu, Zhe Jian, Ling Liu, Gang Wang, Tianwen Gao, Qiong Shi^{*}, and Chunying Li^{*}. Down-regulated mir-23a contributes to the metastasis of cutaneous melanoma by promoting autophagy. *Theranostics*. (已接受, IF = 8.854, 共同通讯作者)
5. Jiayi Chen[#], **Qiong Shi**[#], Xiaowen Wang[#], Sen Guo, Wei Dai, Kai Li, Pu Song, Chao

Wei, Gang Wang, Chunying Li^{*}, Tianwen Gao^{*}. Genetic polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and risk of vitiligo in Han Chinese populations: a genotype-phenotype correlation study. *The British journal of dermatology* 2014, 170:1092-9. (IF = 4.317, 共同第一作者)

6. Kai Li[#], **Qiong Shi**[#], Li Yang[#], Xia Li, Ling Liu, Ling Wang, Qiang Li, Gang Wang, Chunying Li, Tianwen Gao^{*}. The association of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D levels with generalized vitiligo. *The British journal of dermatology* 2012, 167:815-21. (IF = 4.317, 共同第一作者)

7. Rui Ge[#], Lin Liu[#], Wei Dai[#], Yuqi Yang, Huina Wang, **Qiong Shi**, Sen Guo, Xiuli Yi, Gang Wang, Tianwen Gao, Qi Luan^{*}, Chunying Li^{*}. XPA promotes autophagy to facilitate cisplatin resistance in melanoma cells through the activation of PARP1. *Journal of Investigative Dermatology*. 2016 Feb 12. pii: S0022-202X(16)00468-1. doi: 10.1016/j.jid.2016.01.031.

8. Xiaowen Wang[#], Kai Li[#], Ling Liu[#], **Qiong Shi**, Pu Song, Zhe Jian, Sen Guo, Gang Wang, Chunying Li, Tianwen Gao^{*}. AHR promoter variant modulates its transcription and downstream effectors by allele-specific AHR-SP1 interaction functioning as a genetic marker for vitiligo. *Scientific Reports* 2015; 5:13542.

9. Weigang Zhang[#], Xiuli Yi[#], Sen Guo[#], **Qiong Shi**, Chao Wei, Xia Li, Lin Gao, Gang Wang, Tianwen Gao, Lei Wang^{*}, Chunying Li^{*}. A single-nucleotide polymorphism of miR-146a and psoriasis: an association and functional study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2014, 18(11): 2225-34.

10. Sen Guo[#], Weigang Zhang[#], Chao Wei[#], Lei Wang, Guannan Zhu, **Qiong Shi**, Shuli Li, Rui Ge, Kai Li, Lin Gao, Tianwen Gao, Gang Wang^{*}, Chunying Li^{*}. Serum and skin levels of miR-369-3p in patients with psoriasis and their correlation with disease severity. *European journal of dermatology* : EJD 2013, 23:608-13.

11. Ye Huang[#], Xiuli Yi[#], Zhe Jian[#], Chao Wei[#], Shuli Li, Chuan Cai, Ping Zhang, Kai Li, Sen Guo, Ling Liu, **Qiong Shi**, Tianwen Gao^{*}, Chunying Li^{*}. A single-nucleotide polymorphism of miR-196a-2 and vitiligo: an association study and functional analysis in a Han Chinese population. *Pigment cell & melanoma research* 2013, 26:338-47.

12. Chao Wei[#], Zhe Jian[#], Lin Wang[#], Huini Qiang, **Qiong Shi**, Sen Guo, Kai Li, Ye Huang, Ling Liu, Qiang Li, Qi Luan, Xiuli Yi, Xia Li, Gang Wang, Tianwen Gao^{*}, Chunying Li^{*}. Genetic variants of the APE1 gene and the risk of vitiligo in a Chinese population: a genotype-phenotype correlation study. *Free radical biology & medicine* 2013, 58:64-72.

会议交流

1. **Qiong Shi**, Oxidative stress-induced overexpression of miR-25: the mechanism underlying the degeneration of melanocytes in vitiligo. 7th Annual Meeting of the Asian Society for Pigment Cell Research, China, Shanghai, 27 August 2015.
2. **Qiong Shi**, Aberrant expression of miR-25 promotes pigmentation disorders in vitiligo by repressing MITF and MYO5A. 73th Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology, America, New Mexico, 7 May 2014.
3. **Qiong Shi**, Aberrant expression of miR-25 promotes pigmentation disorders in vitiligo by repressing MITF and MYO5A. ADC 2013-The 9th Asian Dermatological Congress, China, Hongkong, 10 July 2013.
4. **Qiong Shi**, Comparison of the 308-nm Excimer Laser with the 308-nm Excimer Lamp in the Treatment of Vitiligo. ADC 2013-The 9th Asian Dermatological Congress, Hongkong, China, 11 July 2013.
5. **Qiong Shi**, Circulating miRNAs associated with pigment disorder in vitiligo identified by microarray profiling. 2012 International VRF-China Master Class on Vitiligo and Pigmentary Disorders, China, Shenyang, 16 November 2012.
6. **Qiong Shi**, Circulating miRNAs associated with pigmentation disorders in vitiligo identified by microarray profiling. The 3rd sino-german dermatology forum research symposium, China, Hangzhou, 25 April 2012.
7. **Qiong Shi**, Comparison of the 308-nm Excimer Laser with the 308-nm Excimer Lamp in the Treatment of Vitiligo. The Second Eastern Asia Dermatology Congress, China, Beijing, 13 June 2012.

主持或参加科研项目（课题）及人才计划项目情况

1. 国家自然科学基金青年项目，81502863，外泌体 microRNAs：肢端黑素瘤预后及

干扰素治疗敏感性标志物筛选研究，2016/01-2018/12，18 万元，在研，主持。

授权发明专利

1. 李春英、高天文、郭森、石琼、李凯、王刚，与恶性黑素瘤相关的血清循环 MicroRNA 标志物及其应用，2015-02-25，中国，ZL201310638020.7
2. 李春英、石琼、郭森、高天文、李凯、王刚，血清 microRNA 分子标志物及其应用，2014-09-24，中国，ZL201210207911.2

获奖情况

1. 2012 年获第四军医大学硕士研究生二等奖学金
2. 2013 年获第四军医大学硕士研究生三等奖学金
3. 2014 年获第四军医大学优秀研究生
4. 2016 年获第四军医大学博士研究生一等奖学金
5. 2016 年 6 月获中华医学会皮肤性病学会年度 SCI 论文二等奖

致 谢

终于来到迎接博士研究生毕业的这一刻，心中充满感慨、不舍及对新生活的无限憧憬。专业知识的学习及科学研究的训练让这七年的生活充实而难忘。此时此刻，第一次来到科室时的懵懵懂懂，在科研道路上最初的摸爬滚打，导师对课题每一次的悉心指导，病房学习时的不眠之夜，在美国开始全新的课题研究的日子，在国际会议中站在讲台的时刻……一起涌上了脑海，一张张友善的面庞无疑是这一切中最珍贵的。

特别感谢我的导师李春英教授，您以广博的学识、精益求精的科研追求、对学生认真负责的态度及生活中优雅的风姿，在方方面面为我树立了最好的榜样。何等幸运，在人生的这一阶段遇到您。感谢您对我学业的悉心指导，在生活上给予我的关心与爱护，更感谢您对我的错误、疏漏给予及时的指导和批评。我的每一个小小的进步都倾注了您大量的汗水和心血，而每当有这样的小进步，您总是给予我极大的鼓励，让我信心满满继续扬帆前行。

衷心感谢我在美国杜克大学肿瘤中心流行病学研究室学习期间的导师魏庆义教授，作为 DNA 损伤修复及肿瘤流行病学领域的领军学者，魏庆义教授对每一个学生都尽全力去引导与帮助，教授对课题深入浅出的讲解让我难忘，熬夜为我修改文章让我感动，更受到鞭策。教授平易近人亲切的态度更是让异国他乡的日子也像在家一样温暖。

感谢敬爱的刘玉峰教授、高天文教授、王刚教授，感谢你们为一批又一批有梦想的年轻人搭建了“和谐、拼搏、超越”的西京皮肤医院这样的学习平台。感谢马翠玲教授、李巍教授、李承新教授、廖文俊教授、付萌教授等科室的各位教授及李强博士、高琳博士、王雷博士、栾琪博士、刘玲博士、李凯博士、高继鑫博士、坚哲博士等各位师兄师姐给予我学习和工作中的指导和帮助。

感谢乔洪江主任、王华主任为大家创造良好有序的实验室环境；感谢郭森研究员对本课题实验设计及操作细节给予耐心而细致的指导与帮助，感谢杨钰琪研究员、易秀莉研究员、马晶晶研究员、党二乐研究员、于梅红技师、刘兆红技师、叶瑜技

师、刘影技师在我实验技术上提供的指导和帮助。

感谢已经毕业的晋亮博士、张雅君博士、周福波博士、杨阳博士、刘振峰博士、张楠博士、王筱雯博士、宋璞博士、朱冠男博士、葛睿博士、黄也博士、李冰博士；感谢同期学习的张伟刚博士、李舒丽博士、戴维博士、郭伟楠博士、王李文博士、柳琳博士、何源民博士；非常感谢研究生的学习阶段有你们相伴，大家相互帮助、相互鼓励，一起进步的经历永远难忘。

感谢父母，我幸福快乐无忧的成长道路是你们用无尽的爱与无私的付出铺就；感谢先生韩鹏在生活中给予巨细无遗的支持、帮助，对我各种激烈的情绪的包容以及在各种困境中给予的安慰和鼓励。感谢可爱的孩子若一，是你给我重新认识生命和生活的机会。