

· 综 述 ·

MicroRNA 在皮肤损伤时间推断中的应用前景

程剑^{1,2}, 索陇陇^{1,3}, 王林林¹, 赵锐¹, 官大威¹

1. 中国医科大学法医学院法医病理教研室, 辽宁 沈阳 110122; 2. 长沙市公安局刑事侦查支队, 湖南 长沙 430100; 3. 潍坊医学院附属医院司法鉴定中心, 山东 潍坊 261000

摘要: 损伤时间推断是法医学实践中的主要工作之一, 但准确推断损伤时间一直是国内外尚未解决的难题和研究热点。研究证明, 微RNA(microRNA, miRNA)参与皮肤损伤修复的整个过程, 由于miRNA的特性优势, 有望成为推断皮肤损伤时间的生物学指标。本文综述了miRNA的基本生物学功能、特性、皮肤损伤时间推断研究进展及其存在的主要问题, 展望了miRNA在损伤时间推断中的应用和研究前景。

关键词: 法医病理学; 损伤时间推断; 皮肤; 微RNA; 综述

中图分类号: DF795.1 文献标志码: A doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2020.400709

文章编号: 1004-5619(2021)06-0841-06



Application Prospect of MicroRNA in Skin Wound Age Estimation

CHENG Jian^{1,2}, SUO Long-long^{1,3}, WANG Lin-lin¹, ZHAO Rui¹, GUAN Da-wei¹

1. Department of Forensic Pathology, School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110122, China; 2. Detachment of Criminal Investigation, Changsha Public Security Bureau, Changsha 430100, China; 3. Judicial Appraisal Center, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261000, Shandong Province, China

Abstract: Wound age estimation is one of the major tasks in forensic practice. However, relatively accurate estimation of the wound age is still a conundrum and research spotlight world-widely. Studies show that microRNAs (miRNAs) are involved in the whole process of the skin wound repair, and miRNAs, as biomarkers, might be used to estimate the time of skin injury owing to their characteristic advantage. This paper summarizes the miRNA fundamental function, properties, current research progress in the estimation of wound age, and its limitations, and put forward prospect of potential application and research based on miRNAs in estimation of wound age.

Keywords: forensic pathology; wound age estimation; skin; microRNA; review

损伤时间推断是法医学实践的重要工作之一和研究热点, 对限定犯罪时间、划定嫌疑人范围、判断损伤顺序以及分析案件性质等具有重要作用^[1-2], 可为案件侦破、司法审判、民事赔偿等提供科学依据。鉴定实践中, 损伤时间推断会受到多种因素干扰, 包括损伤部位、损伤方式、年龄、营养状况、既往病史、用药情况、死后变化等^[1-3], 各种干扰因素相互作用, 给准确推断损伤时间带来了极大的影响^[4-5]。

皮肤是人体最大的器官, 约占人体质量的15%。皮肤组织作为人体抵御外界刺激的第一道屏障, 其结构复杂, 功能众多, 由于其直接暴露于外界环境中, 是人体最易受损的器官, 所以国内外对损伤时间推断的

研究也始于皮肤组织损伤^[2]。皮肤损伤愈合过程通常可分为炎症期、增殖期和重塑期^[6-8], 三期相互重叠, 大量细胞及细胞因子参与调控, 形成了一个复杂的分子网络调控系统^[1]。

法医学实践中用于皮肤损伤时间推断的尸体检材多已发生不同程度死后变化, 包括组织自溶甚至腐败等, 而现阶段用于皮肤损伤时间推断的技术方法主要基于检验皮肤损伤后的形态学变化、mRNA及蛋白质等生物大分子含量的变化, 这些指标易受死后变化的影响。微RNA(microRNA, miRNA)因其具有片段小、性质稳定、耐受死后变化影响等特性, 有望成为皮肤损伤时间推断的新生物学指标。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81871529)

作者简介: 程剑(1992—), 男, 硕士研究生, 主要从事法医病理学研究; E-mail: 1358153763@qq.com

通信作者: 官大威, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事器官组织损伤愈合机制及钝力性心脏外伤研究, 法医病理学教学以及鉴定; E-mail: dwguan@mail.cmu.edu.cn

1 miRNA 的发现及生物学功能

1.1 miRNA 的发现

1993年,LEE等^[9]发现秀丽隐杆线虫中一种名为 *lin-4* 的基因转录产生一种短序列非编码 RNA,并能够与 *lin-14* mRNA 的 3' 非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 互补配对,显著降低 LIN-14 蛋白含量,促进线虫从第一幼虫期细胞分裂到第二幼虫期细胞分裂,但对 *lin-14* mRNA 含量没有影响。当时,这种现象并未引起生物学的重视。直到 2000 年,REINHART 等^[10]发现由 21 个核糖核苷酸构成的 *let-7* 也能够调控秀丽隐杆线虫发育,学者们才意识到这可能是生物界广泛存在的一种基因调节机制,而这种短序列非编码 RNA 也被命名为 miRNA。

1.2 miRNA 的生物学功能

miRNA 作为内源性非编码 RNA,长度为 20~24 个核苷酸,介导基因转录后调控。miRNA 在基因中大多以单拷贝、多拷贝或基因簇的方式存在于基因组中^[11],miRNA 5' 端由 2~8 个碱基组成 miRNA 的种子序列,对靶基因 mRNA 的识别至关重要^[12]。miRNA 经典的作用方式是与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 互补配对,切割降解或(和)抑制 mRNA 翻译;与靶基因完全互补,切割降解 mRNA;与靶基因 mRNA 不完全互补,则抑制其翻译^[13]。有报道^[14-15]指出,miRNA 也能够与 5'-UTR 和编码序列(coding sequences, CDS)结合,与 5'-UTR 结合能够促进 mRNA 的翻译^[14],而与 CDS 区结合则能抑制 mRNA 的翻译^[15]。在植物中 miRNA 与 mRNA 倾向于完全互补配对,使 mRNA 降解;在动物中则几乎均是不完全互补配对,抑制 mRNA 翻译^[16]。但研究^[17]结果显示,动物中也有近乎完全互补配对切割 mRNA 的情况。如在人类,miR-196 能够与 *HOXB8* 近乎完美地互补配对,切割 *HOXB8* 的 mRNA。miRNA 发挥其生物学功能主要定位于细胞质,但某些 miRNA 在胞质中加工成熟后也可以进入细胞核内发挥作用^[18]。最新发布的 miRBase v22 数据库(<https://www.mirbase.org/>)收录了 271 个物种 38 589 个前体 miRNA,这些前体 miRNA 能产生 48 860 个不同的成熟 miRNA 序列,其中脊椎动物基因组包含了数千个 miRNA^[19],这些 miRNA 几乎参与了所有的细胞生物学过程,对动物的生长发育,内环境稳态,细胞的增殖、分化、迁移、凋亡等过程起着重要的调控作用^[20-21]。

2 皮肤损伤修复各阶段特定 miRNA 的生物学调控作用

皮肤损伤后,炎症期血管内皮细胞受损,启动内

源性凝血系统和外源性凝血系统,血小板凝聚形成血小板栓,继而纤维蛋白基质形成,充当损伤修复的骨架^[8],释放一系列炎症介质,趋化炎症细胞、增强炎症细胞功能、促进再上皮化和血管新生^[22]。炎症细胞杀伤和降解病原体物质,吞噬清除坏死组织及变性的中性粒细胞,并分泌细胞因子和生长因子,促进结缔组织、内皮和上皮组织增生^[23]。增殖期,促进纤维组织增生、血管新生、创面收缩和表皮再生^[23-24]以及角质形成细胞增殖并向创面迁移^[22, 25-28]。通过调控成纤维细胞转化为肌成纤维母细胞,产生大量细胞外基质,为血管内皮细胞生芽形成毛细血管提供框架,通过肌成纤维收缩、牵拉缩小创口^[8, 29]。重塑期,损伤区胶原纤维重新排列,形成规则、坚固的网状结构,毛细血管闭塞、数量减少,成纤维细胞的细胞核变细长、致密化,细胞数量通过凋亡的方式减少^[30],最终形成主要由胶原纤维、细胞基质蛋白等构成的瘢痕组织。

研究^[31]表明,炎症期某些 miRNA 表达水平的变化会影响血小板的功能,并调控纤维蛋白原、组织因子和凝血因子 XI 表达。miR-146a 和 miR-155 可以促进单核细胞分化为巨噬细胞^[32],miR-146a 还可抑制角质形成细胞内的过度炎症反应^[33]。增殖期,miR-31 能促进角质形成细胞的增殖和迁移^[34],miR-210 抑制角质形成细胞的增殖并促进血管的生成^[35-36]。重塑期,miR-29a 通过靶向转化生长因子- β 活化激酶 1 结合蛋白 1(transforming growth factor- β activated kinase 1 binding protein 1, TAB1)来调控真皮成纤维细胞的收缩功能^[37]。miR-96 通过靶向调控 Smad7 促进胶原蛋白沉积^[38]。以上研究表明,不同 miRNA 在皮肤损伤愈合不同阶段发挥着相应功能,协同调控皮肤损伤修复。这些 miRNA 出现的时间及表达量具有一定的时程规律,有望成为推断皮肤损伤时间的生物学指标。

3 miRNA 作为损伤时间推断生物学指标的优势

3.1 半衰期长、稳定性好

miRNA 相对稳定。通过 RNA 聚合酶 II 抑制剂或者耗竭 miRNA 合成酶的方式进行研究的结果显示,miRNA 在肝细胞、心肌细胞中的半衰期能达到数小时甚至数天^[39-40]。BALZANO 等^[41]比较了新鲜血浆样品中 miRNA 的含量与-80℃冻存不同时间后的 miRNA 含量,-80℃冻存时长分为 6 个月、12 个月、3 年、4 年、10 年、11 年和 14 年,发现 4 年内 miRNA 水平没有明显变化,大部分 miRNA 从第 5 年开始下降,个别 miRNA(miR-212-3p)经冻存 14 年后其含量亦未下降。MALL 等^[42]将来自 8 名健康成人(4 男 4 女,25~57 岁)的中段

清洁尿液,采取室温放置、4℃放置以及-80℃至室温反复冻融处理,发现:室温放置5 d后,miRNA实际含量为初始含量的35%;4℃放置5 d后,miRNA实际含量为初始含量的42%~56%;-80℃至室温冻融10次后,miRNA含量仍相当于初始量的23%~37%。经以上3种方式处理后仍能满足实时定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)的检测要求。最新研究结果^[43]还显示,在经历了5300年冷冻保存的木乃伊多种组织中仍可检测出特定的miRNA。

3.2 物种间保守,功能调节作用相似

动物miRNA在进化过程中体现了高度的保守性。如秀丽隐杆线虫中62%的miRNA与果蝇相关,55%的miRNA与果蝇或人类miRNA具有同源性,并且这些同源数值还会随着新发现的miRNA数量的增加而增加^[44]。miRNA在物种间广泛存在的保守性提示其在某些特定的生物学过程中发挥着重要的调节作用,如miR-21-3p在人和小鼠中均具有促进皮肤损伤愈合的作用^[45-46],let-7 miRNA在人和鼠中均可抑制原癌基因的表达^[47-48]。

3.3 耐受物理化学不良因素及死后变化

miRNA性质稳定,可耐受甲醛和石蜡等组织固定、包埋等过程中的不良因素作用。NELSON等^[49]应用原位杂交技术成功检测出脑组织石蜡切片中的多种miRNA。XI等^[50]通过比较小鼠新鲜和石蜡包埋肝组织中miRNA表达量,并检测最长保存了10年的经甲醛固定石蜡包埋(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)的结直肠癌样品中的miRNA表达量,发现FFPE样品中miRNA的表达量与新鲜冻存样品中miRNA的表达量具有很好的相关性,甲醛固定对miRNA的稳定性没有显著影响,保存了10年的FFPE样本中miRNA的表达也相当稳定。在(10±1)℃~(35±1)℃环境中,脑组织特异性miRNA(miR-9和miR-125b)能在死后144 h内保持其自身含量不受死后变化的影响^[51]。

3.4 miRNA调节模式精密

miRNA所调节的靶基因广泛,一个miRNA可以调控多个靶基因,一个靶基因也可以受到多个miRNA调控^[52],形成了异常复杂的调控系。据估算,动物中有20%~30%的基因受miRNA调节,因此普遍认为miRNA是“微调器”,主要作用是维持全部表达基因的稳态^[53-54]。miRNA在正常生理条件下调节内环境稳态作用相对“温和”,而当组织损伤时其作用相对“剧烈”^[55],如:DNA受损可激活转录因子包括p53、核因子κB(nuclear factor-κB, NF-κB)等,上调或下调特定miRNA的表达^[56];在炎症过程中,巨噬细胞对感染的

炎症反应涉及多种miRNA的上调,如miR-155、miR-146、miR-147、miR-21及miR-9等^[57]。

4 miRNA用于损伤时间推断的研究现状及局限性

CHANG等^[58]使用活检穿孔器在20名健康志愿者的腹部行全层皮肤切口,通过实时qPCR检测分析miR-126在皮肤损伤后的变化情况,发现miR-126表达在皮肤损伤后1 d和7 d均显著增加,呈上升趋势,与损伤时间具有良好的相关性,且损伤7 d时miR-126表达量为正常皮肤中的4倍。LI等^[59]应用miRNA微阵列芯片技术对人体皮肤损伤后6个月的皮肤瘢痕组织中的多种miRNA表达情况进行了研究,发现与正常皮肤组织中的相应miRNA含量进行对比,瘢痕组织中的miR-149-5p、miR-203a、miR-222-3p、miR-122-5p含量显著降低。WANG等^[60]在小鼠皮肤切创研究中发现,miR-21的表达量在伤后1、3、7 d持续上调,具有良好的时间相关性。彭涛等^[61]应用芯片技术筛选新生大鼠脑皮质缺氧缺血损伤后差异表达miRNA,发现27个miRNA表达上调超过2倍,60个miRNA下调超过2倍,并选取9个miRNA通过实时qPCR技术验证了miRNA的芯片检测结果,提示脑组织损伤后多种miRNA的表达量发生了改变。SUN等^[62]发现,创伤性脑损伤1、3、5 d后,大鼠海马组织中有17种miRNA表达量在各时间点均有显著性变化,具有良好的时间相关性。上述研究表明,脑组织损伤后miRNA表达量可发生变化,且与损伤时间具有相关性,miRNA也可能成为除皮肤组织外其他器官组织损伤时间推断的生物学指标。

尽管现有研究结果显示组织器官损伤后miRNA的表达量变化具有良好的时间相关性,为法医学损伤时间推断研究提供了新的生物学指标和研究思路,但现阶段采用miRNA差异表达进行损伤时间推断的研究尚处于起步阶段,相关研究较少,多为采用miRNA微阵列或二代测序技术通过动物实验筛选差异表达miRNA,继之通过实时qPCR技术靶向验证及定量检测相应损伤时间点的miRNA表达,探讨miRNA表达与损伤时间的相关性,还缺乏人体样本验证及损伤时间推断相关数学模型的建立。同时,miRNA用于损伤时间推断还存在其他方面的问题。如小鼠皮肤损伤修复过程中,8周龄和2年龄小鼠中有37种miRNA表达趋势相反^[63],表明在不同年龄段皮肤损伤愈合过程中miRNA表达谱并不完全相同,存在年龄段差异。不同组织器官中耐受死后变化影响的miRNA也不尽相同,需要考虑miRNA内参基因的选择,如小鼠心肌

组织中耐受死后变化最强的是 miR-122 和 miR-133a, 肝组织中是 miR-122, 骨骼肌中是 miR-133a^[64], 而大鼠脾组织中 miR-125b 和 miR-143 则对死后变化表现出高度稳定性^[65]。另外, 虽然实时 qPCR 因其灵敏度高、特异性强等优势已成为核酸定量检测的主流技术, 但目前尚缺乏标准化和规范化的检验策略^[66]。miRNA 还具有组织特异性, 不同组织的 miRNA 表达谱并不相同^[67-69], 检测不同组织器官 miRNA 时的内参基因也可能不同。这些因素均需要在损伤时间推断研究或应用中进一步探讨。

5 展 望

综上所述, 多种 miRNA 在皮肤损伤修复的不同阶段规律性表达, 与损伤时间具有良好相关性, 其相关特性也为解决损伤时间推断受死后变化影响的问题提供了可行性。同时, miRNA 与 mRNA、蛋白之间具有一对多和多对一的调控机制, 在同一损伤时间段可以检测更多的生物学检测指标, 为提高损伤时间推断的准确性提供了技术方案。此外, 在皮肤受到损伤的最初几分钟或几小时内, 常规的组织学检测结果可能不能鉴别损伤是生前还是死后造成的^[70], 而 miRNA 序列短, 结构简单, 不需要经过炎症因子等蛋白质翻译及翻译后修饰的过程, 在皮肤损伤早期即可检测到与止血、炎症相关的 miRNA 表达量的变化, 有助于判断生前伤与死后伤。通过对 miRNA 在皮肤损伤时间推断的深入研究, 结合其他生物学指标检测, 将有助于提高损伤时间推断的准确性。

参考文献:

- [1] GRELLNER W, MADEA B. Demands on scientific studies: Vitality of wounds and wound age estimation[J]. *Forensic Sci Int*, 2007, 165(2/3): 150-154. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.05.029.
- [2] 官大威, 赵锐, 王林林. 法医学损伤时间推断: 过去、现在与未来[J]. *法医学杂志*, 2019, 35(2): 131-135. doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2019.02.001.
- [3] GUAN D W, ZHAO R, WANG L L. Forensic injury timing inference: Past, present and future[J]. *Fayixue Zazhi*, 2019, 35(2): 131-135.
- [4] CECCHI R. Estimating wound age: Looking into the future[J]. *Int J Legal Med*, 2010, 124(6): 523-536. doi: 10.1007/s00414-010-0505-x.
- [5] YAGI Y, MURASE T, KAGAWA S, et al. Immunohistochemical detection of CD14 and combined assessment with CD32B and CD68 for wound age estimation[J]. *Forensic Sci Int*, 2016, 262: 113-120. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.02.031.
- [6] DU Q, LI N, DANG L, et al. Temporal expression of wound healing-related genes inform wound age estimation in rats after a skeletal muscle contusion: A multivariate statistical model analysis[J]. *Int J Legal Med*, 2020, 134(1): 273-282. doi: 10.1007/s00414-018-01990-2.
- [7] MULHOLLAND E J, DUNNE N, MCCARTHY H O. MicroRNA as therapeutic targets for chronic wound healing[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 8: 46-55. doi: 10.1016/j.omtn.2017.06.003.
- [8] MENG Z, ZHOU D, GAO Y, et al. miRNA delivery for skin wound healing[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2018, 129: 308-318. doi: 10.1016/j.addr.2017.12.011.
- [9] KONDO T, ISHIDA Y. Molecular pathology of wound healing[J]. *Forensic Sci Int*, 2010, 203(1/2/3): 93-98. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.004.
- [10] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
- [11] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906. doi: 10.1038/35002607.
- [12] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858. doi: 10.1126/science.1064921.
- [13] WANG X. Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2014, 30(10): 1377-1383. doi: 10.1093/bioinformatics/btu045.
- [14] BANERJEE J, CHAN Y C, SEN C K. MicroRNAs in skin and wound healing[J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(10): 543-556. doi: 10.1152/physiolgenomics.00157.2010.
- [15] ØROM U A, NIELSEN F C, LUND A H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation[J]. *Mol Cell*, 2008, 30(4): 460-471. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.001.
- [16] TAY Y, ZHANG J, THOMSON A M, et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation[J]. *Nature*, 2008, 455(7216): 1124-1128. doi: 10.1038/nature07299.
- [17] BARTEL D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- [18] YEKTA S, SHIH I, BARTEL D P. MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA[J]. *Science*, 2004,

- 304(5670):594-596. doi:10.1126/science.1097434.
- [18] TANG R, LI L, ZHU D, et al. Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: Evidence for a microRNA hierarchy system[J]. *Cell Res*, 2012, 22(3):504-515. doi:10.1038/cr.2011.137.
- [19] KOZOMARA A, BIRGAOANU M, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: From microRNA sequences to function[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D155-D162. doi:10.1093/nar/gky1141.
- [20] GEBERT L F R, MACRAE I J. Regulation of microRNA function in animals[J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2019, 20(1):21-37. doi:10.1038/s41580-018-0045-7.
- [21] AMBROS V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006):350-355. doi:10.1038/nature02871.
- [22] BARRIENTOS S, STOJADINOVIC O, GOLINKO M S, et al. Growth factors and cytokines in wound healing[J]. *Wound Repair Regen*, 2008, 16(5):585-601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.
- [23] MAHDAVIAN DELAVARY B, VAN DER VEER W M, VAN EGMOND M, et al. Macrophages in skin injury and repair[J]. *Immunobiology*, 2011, 216(7):753-762. doi:10.1016/j.imbio.2011.01.001.
- [24] SHAH J M Y, OMAR E, PAI D R, et al. Cellular events and biomarkers of wound healing[J]. *Indian J Plast Surg*, 2012, 45(2):220-228. doi:10.4103/0970-0358.101282.
- [25] WERNER S, PETERS K G, LONGAKER M T, et al. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(15):6896-6900. doi:10.1073/pnas.89.15.6896.
- [26] PILCHER B K, DUMIN J A, SUDBECK B D, et al. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix[J]. *J Cell Biol*, 1997, 137(6):1445-1457. doi:10.1083/jcb.137.6.1445.
- [27] BUGGE T H, KOMBRINCK K W, FLICK M J, et al. Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency[J]. *Cell*, 1996, 87(4):709-719. doi:10.1016/s0092-8674(00)81390-2.
- [28] QIANG L, YANG S, CUI Y H, et al. Keratinocyte autophagy enables the activation of keratinocytes and fibroblasts and facilitates wound healing[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9):2128-2143. doi:10.1080/1548627.2020.1816342.
- [29] GOLDMAN R. Growth factors and chronic wound healing: Past, present, and future[J]. *Adv Skin Wound Care*, 2004, 17(1):24-35. doi:10.1097/00129334-200401000-00012.
- [30] GREENHALGH D G. The role of apoptosis in wound healing[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998, 30(9):1019-1030. doi:10.1016/s1357-2725(98)00058-2.
- [31] TERUEL-MONTOYA R, ROSENDAAL F R, MARTÍNEZ C. MicroRNAs in hemostasis[J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(2):170-181. doi:10.1111/jth.12788.
- [32] FAHS F, BI X, YU F, et al. New insights into microRNAs in skin wound healing[J]. *IUBMB Life*, 2015, 67(12):889-896. doi:10.1002/iub.1449.
- [33] MEISGEN F, XU LANDÉN N, WANG A, et al. MiR-146a negatively regulates TLR2-induced inflammatory responses in keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(7):1931-1940. doi:10.1038/jid.2014.89.
- [34] LI D, LI X I, WANG A, et al. MicroRNA-31 promotes skin wound healing by enhancing keratinocyte proliferation and migration[J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(6):1676-1685. doi:10.1038/jid.2015.48.
- [35] BISWAS S, ROY S, BANERJEE J, et al. Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(15):6976-6981. doi:10.1073/pnas.1001653107.
- [36] FASANARO P, D'ALESSANDRA Y, DI STEFANO V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23):15878-15883. doi:10.1074/jbc.M800731200.
- [37] CIECHOMSKA M, O'REILLY S, SUWARA M, et al. MiR-29a reduces TIMP-1 production by dermal fibroblasts via targeting TGF- β activated kinase 1 binding protein 1, implications for systemic sclerosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12):e115596. doi:10.1371/journal.pone.0115596.
- [38] LI C, ZHU H Y, BAI W D, et al. miR-96 promotes collagen deposition in keloids by targeting Smad7[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(1):773-781. doi:10.3892/etm.2018.7008.
- [39] VAN ROOIJ E, SUTHERLAND L B, QI X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA[J]. *Science*, 2007, 316(5824):575-579. doi:10.1126/science.1139089.
- [40] GATFIELD D, LE MARTELOT G, VEJNAR C E, et al. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression[J]. *Gene Dev*, 2009, 23(11):1313-1326. doi:10.1101/gad.1781009.
- [41] BALZANO F, DEIANA M, DEI GIUDICI S, et al. miRNA stability in frozen plasma samples[J]. *Molecules*, 2015, 20(10):19030-19040. doi:10.3390/molecules201019030.
- [42] MALL C, ROCKE D M, DURBIN-JOHNSON B, et al. Stability of miRNA in human urine supports

- its biomarker potential[J]. *Biomark Med*, 2013, 7(4): 623-631. doi:10.2217/bmm.13.44.
- [43] KELLER A, KREIS S, LEIDINGER P, et al. miRNAs in ancient tissue specimens of the tyrolean iceman[J]. *Mol Biol Evol*, 2017, 34(4): 793-801. doi:10.1093/molbev/msw291.
- [44] IBANEZ-VENTOSO C, VORA M, DRISCOLL M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2818. doi:10.1371/journal.pone.0002818.
- [45] YANG X, WANG J, GUO S, et al. miR-21 promotes keratinocyte migration and re-epithelialization during wound healing[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(5): 685-690. doi:10.7150/ijbs.7.685.
- [46] HU Y, RAO S, WANG Z, et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function[J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 169-184. doi:10.7150/thno.21234.
- [47] JOHNSON S M, GROSSHANS H, SHINGARA J, et al. *RAS* is regulated by the *let-7* microRNA family[J]. *Cell*, 2005, 120(5): 635-647. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014.
- [48] ESQUELA-KERSCHER A, TRANG P, WIGGINS J F, et al. The *let-7* microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(6): 759-764. doi:10.4161/cc.7.6.5834.
- [49] NELSON P T, BALDWIN D A, KLOOSTERMAN W P, et al. RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain[J]. *RNA*, 2006, 12(2): 187-191. doi:10.1261/rna.2258506.
- [50] XI Y, NAKAJIMA G, GAVIN E, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples[J]. *RNA*, 2007, 13(10): 1668-1674. doi:10.1261/rna.642907.
- [51] MA J, PAN H, ZENG Y, et al. Exploration of the R code-based mathematical model for PMI estimation using profiling of RNA degradation in rat brain tissue at different temperatures[J]. *Forensic Sci Med Pathol*, 2015, 11(4): 530-537. doi:10.1007/s12024-015-9703-7.
- [52] BARTEL D P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [53] BARTEL D P, CHEN C. Micromanagers of gene expression: The potentially widespread influence of metazoan microRNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(5): 396-400. doi:10.1038/nrg1328.
- [54] STARK A, BRENNECKE J, BUSHATI N, et al. Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution[J]. *Cell*, 2005, 123(6): 1133-1146. doi:10.1016/j.cell.2005.11.023.
- [55] LEUNG A K L, SHARP P A. MicroRNA functions in stress responses[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 205-215. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.027.
- [56] OLEJNICZAK M, KOTOWSKA-ZIMMER A, KRZY-ZOSIAK W. Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2): 177-191. doi:10.1007/s00018-017-2591-0.
- [57] O'CONNELL R M, RAO D S, CHAUDHURI A A, et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(2): 111-122. doi:10.1038/nri2708.
- [58] CHANG L, LIANG J, XIA X, et al. miRNA-126 enhances viability, colony formation, and migration of keratinocytes HaCaT cells by regulating PI3 K/AKT signaling pathway[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(2): 182-191. doi:10.1002/cbin.11088.
- [59] LI P, HE Q, LUO C, et al. Differentially expressed miRNAs in acute wound healing of the skin: A pilot study[J]. *Medicine*, 2015, 94(7): e458. doi:10.1097/MD.0000000000000458.
- [60] WANG T, FENG Y, SUN H, et al. miR-21 regulates skin wound healing by targeting multiple aspects of the healing[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(6): 1911-1920.
- [61] 彭涛, 贾延劼, 文全庆, 等. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织小RNA表达的变化[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(5): 373-376.
- PENG T, JIA Y J, WEN Q Q, et al. Expression of microRNA in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Zhongguo Dangdai Erke Zazhi*, 2010, 12(5): 373-376.
- [62] SUN T, CHEN X, LIU Z, et al. Expression profiling of microRNAs in hippocampus of rats following traumatic brain injury[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2014, 34(4): 548-553. doi:10.1007/s11596-014-1313-1.
- [63] AUNIN E, BROADLEY D, AHMED M I, et al. Exploring a role for regulatory miRNAs in wound healing during ageing: Involvement of miR-200c in wound repair[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3257. doi:10.1038/s41598-017-03331-6.
- [64] TU C, DU T, SHAO C, et al. Evaluating the potential of housekeeping genes, rRNAs, snRNAs, microRNAs and circRNAs as reference genes for the estimation of PMI[J]. *Forensic Sci Med Pathol*, 2018, 14(2): 194-201. doi:10.1007/s12024-018-9973-y.