



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.05.006

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201405471.pdf>

丹参联合小剂量泼尼松龙对口腔黏膜下纤维性变 相关miRNA表达的改变

刘斌杰¹, 陈瑒², 翦新春³

(中南大学 1. 湘雅口腔医院牙周黏膜科,
2. 口腔医学院口腔七年制0801班; 3. 湘雅医院口腔颌面外科, 长沙 410008)

[摘要]目的: 探讨与分析丹参联合小剂量泼尼松龙对口腔黏膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF)相关miRNA表达的改变。**方法:** 选取临床上具有典型中、晚期病理特征的OSF组织及正常口腔颊黏膜配对组织各10对。对正常和病变组织行昂飞 miRNA芯片筛查, 发现与OSF相关的miRNA表达谱。从正常口腔黏膜组织获得原代成纤维细胞, 以槟榔碱(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)诱导培养3, 6, 12 d后(以0 d为对照), 检测差异miRNA的表达。原代培养OSF的成纤维细胞, 经丹参(90 mg/mL)联合小剂量泼尼松共培养12, 24, 36 h后(以0 h为对照), 检测差异miRNA的表达。**结果:** 槟榔碱能诱导正常口腔黏膜成纤维细胞中miRNA的表达改变, 而丹参联合小剂量泼尼松龙能逆转OSF成纤维细胞中相关miRNA的表达。**结论:** 临床组织验证提示差异miRNA在OSF的发生、发展中发挥作用, 丹参联合小剂量泼尼松龙能逆转相关miRNA的表达。

[关键词] 丹参; 泼尼松龙; 口腔黏膜下纤维性变; miRNA

Changes of miRNA after oral submucous fibrosis co-cultured with Salvia and low-dose prednisolone

LIU Binjie¹, CHEN Jun², JIAN Xinchun³

(1. Department of Periodontics and Oral Mucosal Diseases, Xiangya Stomatological Hospital;

2. Class 0801, Seven Year System of Stomatology, Stomatology College;

3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT

Objective: To explore and analyze the the expression change of miRNA associated with oral submucous fibrosis (OSF) treated by the Salvia combined with law-dose prednisolone.

Methods: Ten pairs of tissues from patients with typical early or advanced stage clinical pathological features of OSF and their paired normal tissues (internal control), were selected respectively. The miRNA expression profiles between the OSF and its paired

收稿日期(Date of reception): 2013-08-23

作者简介(Biography): 刘斌杰, 博士, 副主任医师, 主要从事组织工程与发育生物学的研究。

通信作者(Corresponding author): 翦新春, Email: jianxinchun@hotmail.com

controls were compared by the Affymetrix analysis. The primary normal oral mucous cells were cultured in arecoline (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 3, 6, 12 d (0 d served as control), and the primary OSF-fibroblast cells were cultured with Salvia (90 mg/mL) combined with low-dose prednisolone for 12, 24, 36 h (0 h served as control). The differential expression of miRNA was detected.

Results: Arecoline induced the expression changes of miRNAs in normal mucosal cells. Salvia combined with low doses of prednisolone reversed the related miRNA expression.

Conclusion: MiRNAs play an essential role in the occurrence and development of OSF. Salvia combined with low-dose prednisolone can reverse the expression of related miRNAs in OSF cells.

KEY WORDS

Salvia miltiorrhiza; prednisolone; oral submucous fibrosis; miRNA

近年来, 虽对口腔黏膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF)的发病机制有所报道, 但是其阐述尚不清楚。目前, 认为OSF主要是因多种因素的共同作用发展过来的, 另外还承受着某些生长因子(如炎症细胞因子及抗纤维化因子)的调节^[1]。本课题组前期临床观察研究结果发现: 丹参联合小剂量泼尼松龙对OSF患者具有明显的治疗效果, 但其机制不甚明了。本实验主要观察丹参联合小剂量泼尼松龙治疗口腔黏膜下纤维性变后能否引起相应miRNA的转归。希望为口腔黏膜下纤维性变的治疗提供具有实验依据的理论基础。

1 材料与方法

1.1 组织样本

选取2010年3月至2011年5月在湘雅医院口腔门诊就诊、具有典型病理特征、未经治疗、不伴有其他口腔疾病的中晚期OSF病变组织和正常配对组织各10对, 入选者均未进行任何治疗, 具有典型的病理特征, 不伴有其他口腔疾病。

1.2 试剂与仪器

主要试剂: 新生牛血清购自杭州四季青生物公司; 丹参购自美国Sigma公司; 泼尼松龙购自美国Sigma公司; RPMI-1640培养基购自美国Gibcobl公司; miRNA抽提试剂盒购自美国OMEGA公司; miRNA特异性反转录试剂盒及miRNA实时定量PCR MIX miR-145, miR-203, miR-206, miR-494, let-7c, let-7b, miR-30a, miR-30b, miR-200c, miR-23b特异性上游引物及U6内参引物均购自德国QIAGEN公司。主要仪器: BIO-RAD

IQ5实时定量PCR仪购自美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 OSF成纤维细胞与丹参联合小剂量泼尼松龙共培养及miRNA表达水平测定

待患者颊神经阻滞麻醉后, 用0.1%新洁尔灭漱口, 于颊部病变明显处取约8 mm \times 8 mm大小的组织, 深度直达黏膜下层, 待标本切取后放入盛有生理盐水的无菌容器中。然后进行口腔黏膜原代成纤维细胞的培养, 待获得口腔黏膜原代成纤维细胞后, 使用丹参联合小剂量泼尼松龙进行处理, 于12, 24和36 h收集细胞, 检测差异miRNA表达(以0 h为对照)。miRNA表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算, miRNA的相对表达量根据下列公式计算: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct miRNA} - \text{Ct U6}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct OSF} - \Delta\text{Ct N}$ 。 $\Delta\text{Ct N} = \text{对照组目的基因Ct值} - \text{对照组内参基因Ct值}$ 。MiRNA相对表达量 >2 或 <-2 表示差异有统计学意义。

miRNA提取: 待用PBS将细胞洗两次后, 加入1 mL的细胞裂解液, 充分裂解后转至1.5 mL离心管中, 加入200 μL 氯仿, 涡旋震荡放置冰上15 min, 去除蛋白质与基因组DNA, 将含RNA的上清转至新离心管中, 加乙醇涡旋震荡后移至大RNA结合柱, 离心后转至新离心管中, 再加乙醇, 混匀后转至miRNA结合柱中, 离心后吸附miRNA, 倒弃滤液; 加入700 μL 的冲洗液I于结合柱中, 离心后弃滤液; 加入500 μL 的冲洗缓冲液, 离心后弃滤液; 将结合柱置于收集管中, 离心后将残留液体除净; 加热无核酶水至95 $^{\circ}\text{C}$, 洗脱miRNA, 收集miRNA。

miRNA反转录: 准备反转录试剂, 离心后冰上解冻, miRNA (0.5 μg), 加入反转录酶复合物印记1 μL , 5 \times 反转录缓冲液4 μL , 无核糖核

酸酶水 20 μL , 体系混匀后置入 PCR 仪, 反转录反应(1 h, 37 $^{\circ}\text{C}$), 高温反应(15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$)灭活反转录酶。

MiRNA 的实时荧光定量 PCR(RT-PCR)反应: RT-PCR 试剂先在冰上解冻, 然后加样如下: 模板 cDNA 1 μL , 10 X 微印记底物 2 μL , 10 X 微印记通用底物 2 μL , 无核糖核酸水 7 μL , 2 X QuantiTect SYBR 绿色聚合酶链式反应混合物 10 μL , 混匀后置入 Bio-Rad IQ5 实时定量 PCR 仪上予以扩增并实时检测。反应程序: 酶激活(15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$), 扩增反应(15 s, 94 $^{\circ}\text{C}$), 变性(30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$), 退火, 延伸(30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$), 荧光检测, 共循环 40 个。

1.3.2 正常口腔黏膜成纤维细胞与槟榔碱共培养及 miRNA 表达水平测定

将切取的正常口腔黏膜立即投入装有 1640 培养基的小瓶中, 带回无菌细胞操作台内后, 按下述方法进行组织块原代细胞培养操作: 1) 将原材料剪成约 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小的组织块, 在剪切过程中, 适当向组织上滴加 2~4 滴培养液, 保持湿润, 以防干燥; 2) 将已备好的组织块置入培养瓶内, 用弯头吸管将组织块在瓶壁上摆置均匀, 每个组织块间距 1.0 cm 左右, 每 25 mL 培养瓶中摆置 30 块左右, 组织块放置好后, 轻轻将培养瓶翻转, 让瓶底朝上, 向瓶内加入 3 mL 培养基, 盖好瓶盖后, 将培养瓶倾斜放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内; 3) 放置 2~4 h, 待组织块贴附后, 将培养瓶慢慢翻转放平, 继续放置培养, 让液体缓慢覆盖组织块; 4) 原代细胞长到一定程度后, 按常规标准方法进行传代及冻存等。5) 将获得的细胞与槟榔碱进行共培养, 于 3, 6, 12 d 收集细胞, 检测差异 miRNA 表达(以 0 d 为对照)。MiRNA 相对表达量 >4 或 <-4 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常黏膜组织及 OSF 黏膜组织成纤维细胞培养结果

正常黏膜组织原代成纤维细胞培养 36 h 后, 倒置显微镜下可见细胞从组织块边缘爬出, 细胞呈菱形(图 1); 当原代成纤维细胞培养至第 10 天后, 倒置显微镜下见 80%~90% 的细胞汇集, 这时可进行细胞传代。本实验第 4 代正常黏膜组织成纤维细胞生长状态良好, 细胞形态规则, 胞浆均匀, 细胞核呈圆形或椭圆形, 核仁清晰。

OSF 黏膜成纤维细胞原代成纤维细胞培养 36 h 后, 倒置显微镜下可见细胞从组织块边缘爬出, 爬出的细胞呈菱形或多边形; 当原代成纤维细胞培养至第 10 天后, 倒置显微镜下见 80%~90% 的细胞汇集, 这时可进行细胞传代。本实验第 4 代 OSF 黏膜组织成纤维细胞生长状态良好, 细胞与细胞核的形态与正常黏膜组织原代培养的成纤维细胞相似。

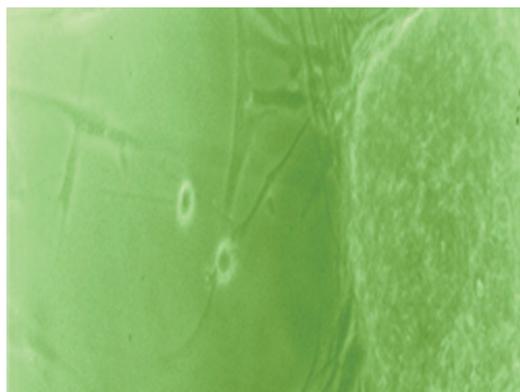


图 1 正常口腔黏膜组织成纤维细胞原代培养($\times 200$)

Figure 1 Normal oral mucosa fibroblast cells in primary culture ($\times 200$)

Fibroblasts climbing out from the tissue block are shown.

2.2 槟榔碱诱导正常黏膜细胞中相关 miRNA 的表达改变

将培养至第 4 代的成纤维细胞经 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槟榔碱作用 36 h 后, 观察细胞形态改变并检测相关 miRNA 的表达, 结果发现槟榔碱作用后细胞形态的改变不明显(图 2), 但经 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槟榔碱作用 36 h 后的成纤维细胞中的相关 miRNA(尤其是 miR-206, miR-145, miR-203 等)的表达与正常成纤维细胞的相关 miRNA 比较, 影响明显(图 3, $P < 0.05$)。

2.3 丹参联合小剂量泼尼松龙对 OSF 相关 miRNA 表达的逆转变

本研究从 OSF 组织获得原代细胞并予以丹参联合泼尼松龙作用后, 分别于 12, 24, 36 h 不同时间点检测相关 miRNA 的表达改变, 并观察细胞形态改变, 结果表明与 oh 比较, 相关 miRNA 的表达改变明显($P < 0.05$), 尤其是 miR-203 的表达最为明显(图 4, $P < 0.01$), 各作用组的细胞形态则改变不明显(图 5)。

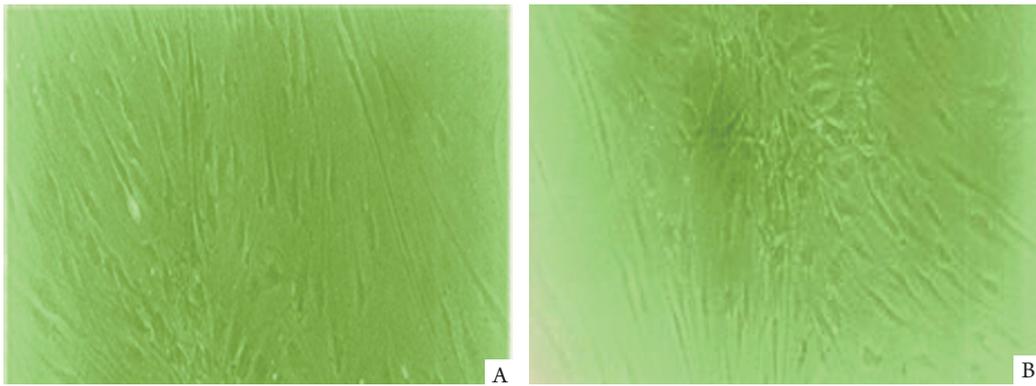


图2 槟榔碱作用于正常口腔黏膜组织成纤维细胞前后的形态变化 (×100, 36 h)

Figure 2 Morphological changes of fibroblast before and after the treatment of arecoline hydrobromide in normal oral mucosa (×100, 36 h)

A: Before the treatment; B: After the treatment

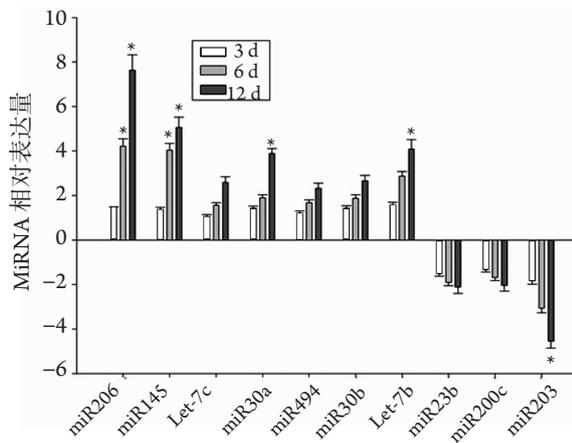


图3 槟榔碱与正常口腔黏膜组织成纤维细胞共培养后的miRNA的表达改变

Figure 3 Expression changes of miRNA after the coculture of arecoline and normal oral mucosa fibroblast

*P<0.05 vs the normal oral mucosa fibroblast

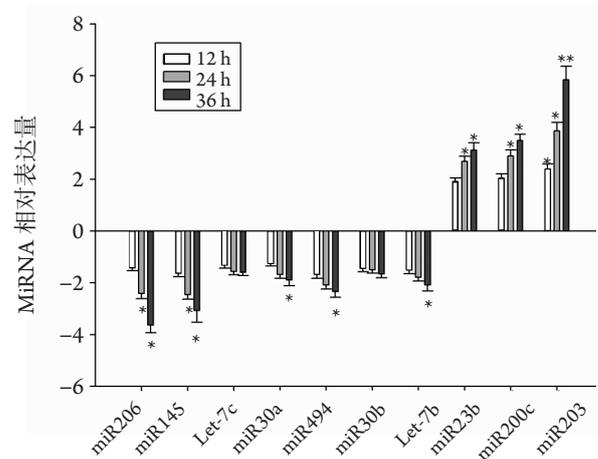


图4 丹参联合小剂量泼尼松龙对OSF相关miRNA的表达改变

Figure 4 Expression changes of miRNA after the tissue of OSF cultured with Salvia combined with low-dose prednisolone

*P<0.05, **P<0.01 vs the normal mucosa fibroblast

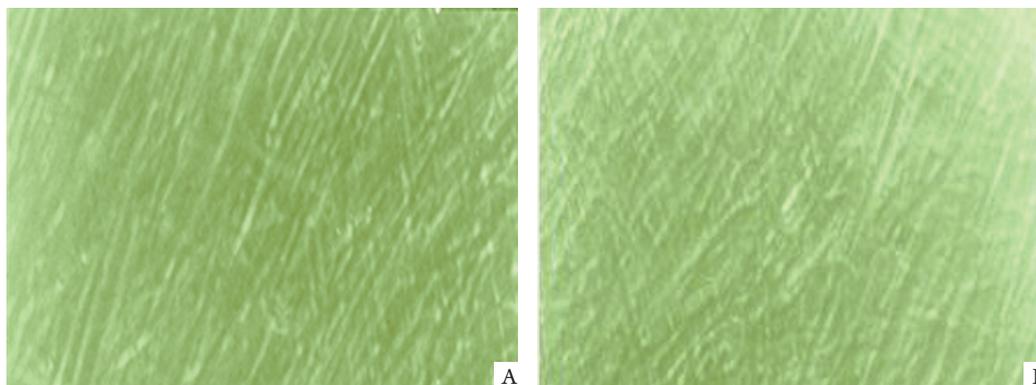


图5 丹参联合小剂量泼尼松龙作用前后 OSF 成纤维细胞形态 (×100, 36 h)

Figure 5 Morphological changes of OSF-fibroblast before and after the treatment of Salvia combined with low-dose prednisolone (×100, 36 h)

A: Before the treatment; B: After the treatment

3 讨论

OSF是一种慢性、隐匿性、与嚼槟榔有关的疾病,其癌变率为7%~13%,好发于印度、东南亚地区及我国湖南、台湾等地^[1-5]。OSF不仅会导致患者出现伸舌困难与渐进性张口受限,严重者会使得患者的生活质量受到严重影响^[6]。OSF目前多见于我国台湾、海南及湖南等地区,而其发病率与癌变率则呈逐年上升趋势。高义军等^[7]调查研究发现湖南娄底城区中小学生就有咀嚼槟榔习惯且有OSF患者;咀嚼槟榔率男性高于女性;咀嚼槟榔与年级相关,年级越高咀嚼槟榔率越高;小学生槟榔主要来源于父母,中学生槟榔主要来源于朋友。目前临床认为OSF与咀嚼槟榔、遗传、免疫、微循环、血液流变学及胶原代谢紊乱等多因素有关,但其发病机制尚不清楚。胡延佳^[8]研究发现差异表达基因主要定位于1, 2, 5, 6, 7, 11和12号染色体上;GO(gene ontology)分析显示差异表达基因主要参与免疫反应、防御反应等生物过程,并主要与细胞外基质、细胞骨架、细胞膜的组成和蛋白结合,细胞外基质结构组成和信号转导激活等分子功能相关。郑廉^[9]通过Logistic回归分析表明咀嚼槟榔时间越长、吸烟的时间越长、每次饮酒的量越多,越易发生口腔黏膜白斑癌变。

MiRNA是一个长度约为18~24个核苷酸的内源性非编码单链小RNA分子,其参与了机体的造血、器官形成、生长发育、细胞增殖、分化及凋亡等生理病理过程^[10]。MiRNA通过调控mRNA的复制或转录表达来有效调控基因表达,大量研究表明miRNA不仅存在于细胞中,也存在于体液中^[11]。吴旭等^[12]在高浓度腹膜透析液诱导的大鼠腹膜纤维化模型中,多条miRNAs呈一致性差异表达,提示miRNA可能参与大鼠腹膜纤维化。Porrello等^[13]发现miRNA对心肌细胞再生有重要作用。Jackson等^[14]研究发现miR-203在表皮细胞分化过程中起重要作用,从而猜测miR-203在皮肤癌的发生过程中扮演重要角色。王莎莎^[15]表明miR-149的下调及IL-6的上调可能参与了SiO₂粉尘处理后的炎症、肺纤维化等相关过程,miR-149可以负调控A549细胞表达IL-6的水平。上述研究均表明miRNA与纤维化有一定的相关性。

刘丽芳^[16]选取经丹参治疗前后的OSF颊黏膜组织做透射电镜观察。结果OSF经丹参治疗后的内皮细胞、成纤维细胞、上皮细胞超微结构接近正常细胞,表明丹参治疗OSF临床有效。杨芳等^[17]表明丹参联合曲安奈德局部注射治疗口腔黏膜下纤维性变引起的口腔灼痛和张口受限有较确切的

临床疗效。路慧敏^[18]的研究表明:通过抑制上述蛋白编码的抗凋亡基因,在应激状态下miR-34具有显著的促进心肌细胞凋亡作用,而丹参酮IIA能够逆转这一过程;因此,通过抑制miR-34表达而上调Bcl-2及其他抗凋亡蛋白,是丹参酮IIA的抗心肌细胞凋亡可能机制之一,进而发挥其保护心肌缺血损伤作用。为探讨丹参联合小剂量泼尼松龙治疗OSF是否能引起相应miRNA的转归,本文对20例OSF患者的不同时间点的miRNA的表达改变进行分析研究,结果miRNA的表达改变明显,尤其是miR-203的表达最为明显,而祖细胞形态则改变不明显,说明丹参联合小剂量泼尼松龙能逆转相关miRNA的表达。

参考文献

1. Tilakaratne WM, Klinkowski ME, Saku T, et al. Oral submucosal fibrosis: review on aetiology and pathogenesis[J]. *Oral Oncol*, 2006, 42(6): 561-568.
2. 高义军, 凌天旸, 尹晓敏, 等. 槟榔碱及尼古丁对口腔角质形成细胞端粒酶逆转录酶表达的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2007, 42(1): 26-30.
GAO Yijun, LING Tianyou, YIN Xiaomin, et al. Effects of arecoline and nicotine on the expression of hTERT in oral keratinocytes[J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2007, 42(1): 26-30.
3. 李霞, 凌天旸, 高义军. 槟榔碱对口腔黏膜肌成纤维细胞分化的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2007, 42(7): 423-427.
LI Xia, LING Tianyou, GAO Yijun. Effect of arecoline on the differentiation of myofibroblasts of oral mucosa[J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2007, 42(7): 423-427.
4. 尹晓敏, 彭解英, 高义军. 咀嚼槟榔习惯与牙体磨损关系的临床研究[J]. *湖南医科大学学报*, 2003, 28(2): 171-173.
YIN Xiaomin, PENG Jieying, GAO Yijun. Clinical study on the relationship between tooth abrasion and the habits of chewing betel nut[J]. *Bulletin of Hunan Medical University*, 2003, 28(2): 171-173.
5. 尹晓敏, 温春燕, 韩玉玲, 等. FHIT和MDM2在口腔黏膜下纤维性变及其癌变组织中的表达[J]. *中南大学学报:医学版*, 2010, 35(6): 572-575.
YIN Xiaomin, WEN Chunyan, HAN Yuling, et al. Expression of FHIT and MDM2 in oral submucosal fibrosis and canceration tissues[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2010, 35(6): 572-575.
6. 封丽莎, 樊晓明. MicroRNA在纤维化疾病中的研究进展[J]. *复旦学报:医学版*, 2012, 39(1): 94-98, 102.
FENG Lisha, FAN Xiaoming. Advance on fibrosis-related miRNAs[J]. *Journal of Fudan University. Medical Sciences*, 2012,

- 39(1): 94-98,102.
7. 高义军. 湖南省娄底市城区中小学生嚼槟榔情况调查[J]. 中华口腔医学杂志, 2009, 44(11): 686-689.
GAO Yijun. Epidemiological study of betel nut chewing among elementary and middle school students in Loudi city, Hunan province[J]. Chinese Journal of Stomatology, 2009, 44(11): 686-689.
 8. 胡延佳. 两种基因芯片数据分析软件在口腔黏膜下纤维化差异表达基因分析中的应用[J]. 中华口腔医学杂志, 2008, 43(3): 168-171.
HU Yanjia. Application of bioinformatic tools in analysis of differentially expressed genes in oral submucosal fibrosis[J]. Chinese Journal of Stomatology, 2008, 43(3): 168-171.
 9. 郑廉. 湖南地区口腔黏膜白斑癌变危险因素相关性研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
ZHENG Lian. Epidemiological study of risk factors of canceration of OLK in Hunan Province[D]. Changsha: Central South University, 2012.
 10. 尤小寒, 章慧娣, 苏震, 等. 与小鼠肾间质纤维化相关microRNA的初步研究[J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28(10): 785-789.
YOU Xiaohan, ZHANG Huidi, SU Zhen, et al. Preliminary study of microRNA related to renal interstitial fibrosis in rats[J]. Chinese Journal of Nephrology, 2012, 28(10): 785-789.
 11. Ling X. MicroRNA transport: A new way in cell communication[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(8): 1713-1719.
 12. 吴旭, 林凡, 黄朝兴, 等. 大鼠腹膜纤维化相关miRNA的初步筛选[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(3): 203-206.
WU Xu, LIN Fan, HUANG Chaoxing, et al. The preliminary screening of miRNA related with rat peritoneal fibrosis[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2013, 14(3): 203-206.
 13. Porrello ER. MicroRNAs in cardiac development and regeneration[J]. Clin Sci, 1979, 2013, 1253(4): 151-166.
 14. Jackson SJ, Zhang ZJ. Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation[J]. Development, 2013, 140(9): 1882-1891.
 15. 王莎莎. MiR-149调控矽尘诱导肺纤维化的初步研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2012.
WANG Shasha. The preliminary study on silica induced pulmonary fibrosis of the regulation of miR-149[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2012.
 16. 刘丽芳. 丹参治疗OSF的形态学及iNOS, eNOS表达差异的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
LIU Lifang. The study of morphology of OSF treated by Salvia and differentially expressed iNOS, eNOS[D]. Changsha: Central South University, 2007.
 17. 杨芳, 罗和平, 李琴, 等. 丹参联合曲安奈德局部注射治疗口腔黏膜下纤维性变的临床研究[J]. 广东牙病防治, 2010, 18(4): 206-209.
YANG Fang, LUO Heping, LI Qin, et al. Treatment of oral submucous fibrosis by local injection of salvia and triamcinolone acetonide[J]. Journal of Dental Prevention and Treatment, 2010, 18(4): 206-209.
 18. 路慧敏. 丹参酮II A的抗凋亡机制揭示miR-34的促心肌细胞凋亡作用[D]. 哈尔滨: 哈尔滨医科大学, 2010.
LU Huimin. Salvia-ketone II A anti-apoptotic mechanisms reveal miR-34 to promote cell apoptosis[D]. Harbin: Harbin Medical University, 2010.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 刘斌杰, 陈珺, 翦新春. 丹参联合小剂量泼尼松龙对口腔黏膜下纤维性变相关miRNA表达的改变[J]. 中南大学学报: 医学版, 2014, 39(5): 471-476. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.05.006

Cite this article as: LIU Binjie, CHEN Jun, JIAN Xinchun. Changes of miRNA after oral submucous fibrosis co-cultured with Salvia and low-dose prednisolone[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2014, 39(5): 471-476. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.05.006